

**MARCIA REGINA MILANETTI**

**AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO EM OSTEOTOMIA  
EXPERIMENTAL POR MICROTOMOGRÁFIA POR  
RAIO-X**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de Concentração: Bioengenharia

Orientador: Prof. Dr. José Marcos Alves

São Carlos

2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE  
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,  
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento  
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

M637a Milanetti, Marcia Regina  
Avaliação do reparo ósseo em osteotomia experimental  
por microtomografia por raio-X / Marcia Regina  
Milanetti ; orientador José Marcos Alves. -- São Carlos,  
2010.

Dissertação (Mestrado-Programa de Pós-Graduação e Área  
de Concentração Interunidades em Bioengenharia) -- Escola  
de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos da  
Universidade de São Paulo, 2010.

1. Calo ósseo. 2. Regeneração óssea.  
3. Microtomografia. I. Título.



Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia  
EESC / FMRP / IQSC



MARCIA REGINA MILANETTI  
MESTRADO EM CIÊNCIAS  
ÁREA DE BIOENGENHARIA

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS  
- GRADUAÇÃO INTERUNIDADES BIOENGENHARIA  
EESC - FMRP - IQSC DA UNIVERSIDADE DE SÃO  
PAULO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM  
CIÊNCIAS NA ÁREA DE BIOENGENHARIA.

Aprovado em: 15/9/10

PROF. DR. JOSÉ MARCOS ALVES  
(ORIENTADOR)

Escola de Engenharia de São Carlos - USP

Resultado: Aprovada

Assinatura: [Handwritten Signature]

PROF. DR. ALBERTO CLIQUET JÚNIOR

Escola de Engenharia de São Carlos - USP

Resultado: Aprovada

Assinatura: [Handwritten Signature]

PROF. DR. ORIVALDO LOPES DA SILVA

Escola de Engenharia de São Carlos - USP

Resultado: aprovada

Assinatura: [Handwritten Signature]

Dedico esse trabalho à minha Mãe, Maria Aparecida Rodrigues Milanetti "*In Memoriam*", que tanto sonhou em assistir à minha, usando suas palavras, "formatura" no mestrado.

Saudades sempre...

## AGRADECIMENTOS

A Deus por seu amor e constante presença em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais Antonio e Maria Aparecida “*In Memoriam*” por todo o amor, apoio, incentivo e pela inestimável educação que recebi.

Ao PPGIB – USP por disponibilizar toda infra-estrutura para a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. José Marcos Alves do PPGIB – USP pela orientação, pela paciência e atenção a mim prestadas durante o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Dr. Carlos Vaz da EMBRAPA São Carlos por disponibilizar o microtomógrafo de raios-X para a realização desse trabalho. Ao Engenheiro Paulo Lasso e ao Engenheiro Luiz Matteo pela aquisição e reconstrução das imagens das amostras ósseas.

Ao Biotério da UNESP de Araraquara pela disponibilização de animais para o experimento.

Ao Biólogo Néelson Ferreira da Silva do PPGIB - USP pelo apoio, amizade e por todo o empenho durante os procedimentos experimentais dessa pesquisa.

Às secretárias Janete e Eunice do PPGIB – USP pelo pronto atendimento, carinho e toda atenção nas questões administrativas relativas ao Programa.

À Jaqueline, aluna do PPGIB, pela imensa colaboração, amizade e carinho.

Ao Alessandro, aluno do PPGIB, pelo incentivo e esclarecimentos.

Às minhas irmãs Marilandi e Meire, meu cunhado Fausto e minhas primas Lê, Célia e Maria Inez por todo o apoio, incentivo, amor incondicional e carinho.

À Judith Cazarin pelo constante incentivo e apoio ao meu crescimento profissional e pessoal.

À Janaína Goulart, Ricardo Degani, Rosana Paschoalino, Suely Cardoso, Suely Sanches, equipe das bibliotecas do IFSC e EESC, pela colaboração em etapas diversas desse trabalho.

Aos meus amigos Adriana Zamora, Celso Gullo, Daisy Bunemer, Éderson Catoia, Glaucy Brighanti, Heloisa Ferreira, Márcia Martinez, Mariana Arruda, Maura Torrezan, Nara Vieira, Suely Cardoso, Suely Sanches, Tânia Othero e todos aqueles que de alguma forma participaram dessa etapa da minha vida.

## RESUMO

MILANETTI, M. R. Avaliação do reparo ósseo em osteotomia experimental por microtomografia por raio-X. 2010. 58f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

A microtomografia 3D por raio-X proporciona medidas quantitativas e tridimensionais da estrutura do calo e essas medidas podem potencialmente estar relacionadas com a resistência do calo. A avaliação quantitativa do reparo ósseo por meio de novas metodologias tem importante aplicação nas pesquisas experimentais relacionadas a tecnologias invasivas e não invasivas para a estimulação do mesmo. O objetivo desse estudo foi avaliar o reparo ósseo por meio da  $\mu$ CT em defeito ósseo em fêmur de rato. Trinta ratos machos da classe Wistar com peso médio de 300g foram divididos em grupos experimentais de 10 animais em cada grupo. Os animais foram anestesiados e um furo com 1,2mm de diâmetro foi realizada na porção medial do fêmur utilizando-se uma broca odontológica. No 7°, 14° e 21° pós-cirúrgico, os animais dos grupos experimentais 1, 2 e 3, respectivamente, foram sacrificados e o fêmur esquerdo excisado. Os fêmures foram envolvidos em gaze e mergulhas em solução PBS e armazenados em um saco plástico em freezer a -20° até a análise microtomográfica. Os fêmures foram escaneados pelo microtomógrafo 1172 (SkyScan, Bélgica). Os softwares NRecon, Dataviewer, CT-Analyzer and CT-Vol, fornecidos pelo fabricante do microtomógrafo, foram utilizados para as seguintes análises: a) análise visual das reconstruções microtomográficas dos fêmures através de seções transversais, coronais e sagitais; b) segmentação do calo ósseo nas reconstruções através de algoritmo de processamento de imagem para quantificação dos parâmetros volume total do calo ósseo (TV), volume do calo ósseo mineralizado (BV), relação BV/TV e densidade mineral óssea volumétrica do calo ósseo (BMD); c) visualização 3D do calo ósseo. A análise estatística dos parâmetros medidos utilizou o teste t de Student com um nível de significância  $p < 0,05$ . Houve um aumento estatisticamente significativo nos valores dos parâmetros BV/TV e BMD na comparação entre os grupos experimentais 1 e 2. A comparação entre os grupos 3 e 4 não apresentou significância estatística. Os resultados são coerentes com dados encontrados na literatura sobre a fisiologia óssea, porém o algoritmo de processamento de imagem utilizado necessita aprimoramento em alguns de seus procedimentos para se obter melhor resultado de segmentação do calo ósseo na região de interesse.

Palavras-chaves: calo ósseo, reparo ósseo, microtomografia tridimensional ( $\mu$ CT)

## ABSTRACT

MILANETTI, M. R. Fracture healing valuation in experimental osteotomy using X-ray microtomography. 2010. 58 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

X-ray microtomography ( $\mu$ CT) provides quantitative and three dimensional measurements of the callus structure and these measurements could potentially be related to callus strength. The assessment of bone repair through new methodologies has important application in animal investigations regarding invasive or non invasive technologies for the stimulation of bone healing. The aim of this investigation was the use of  $\mu$ CT for the assessment of bone repair in a rat femur bone defect. Thirty male Wistar rats weighting about 300g were divided in three experimental groups with 10 animals on each group. The animals were anesthetized and a circular hole with a 1.2mm diameter was generated at the medial region of the left femur using a dental drill. At the 7th, 14th and 21<sup>st</sup> day after surgery the animals of experimental groups 1, 2 and 3, respectively, were sacrificed and the left femur excised. The femurs were wrapped in gauze immersed in phosphate-buffered solution and stored in a plastic bag at -20°C until the analysis by microtomograph. The femurs were scanned by the 1172 microtomograph (SkyScan, Belgium). The softwares NRecon, Dataviewer, CT-Analyzer and CT-Vol, provided by the microtomograph manufacture, were used for the following assessments: a) visual examination of the femurs microtomographic reconstructions using transversal, coronal and sagittal sections; b) segmentation of the bone callus in the reconstructions using an image processing algorithm to quantify the parameters total bone callus volume (TV), volume of the mineralized bone callus (BV), the ratio BV/TV and the volumetric bone callus mineral density (BMD); c) 3D rendering of the bone callus. The statistical analysis of the measured parameters was performed by the Student t test with a level of significance  $p < 0,05$ . There was a statistically significant increase in the mean values of the parameters BV/TV and BMD in the comparison of experimental groups 1 and 2. The comparison between groups 2 and 3 was not statistically significant. Results are according to bone physiology data from literature although the image processing algorithm used needs some adjustments to get better results in bone callus segmentation in ROI.

Keywords: bone callus, fracture healing, x-ray microtomography ( $\mu$ CT)

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	- Tecidos envolvidos no processo de reparo ósseo .....	16
<b>Figura 2</b>	- Reparo ósseo por meio de tecido ósseo neoformado a partir do periósteo e do endósteo.....	17
<b>Figura 3</b>	- 1º dia pós-fratura: fratura transversa em fêmur de rato.....	18
<b>Figura 4</b>	- 7º dia pós-fratura: condrogênese e resposta inflamatória no sítio da lesão.....	19
<b>Figura 5</b>	- 14º dia pós-fratura: calcificação da cartilagem de cicatrização.....	20
<b>Figura 6</b>	- 21º dia pós-fratura: o calo composto em sua maior parte por cartilagem calcificada.....	21
<b>Figura 7</b>	- 28º a 35º dias pós-fratura: cartilagem e osso neoformado.....	22
<b>Figura 8</b>	- Atenuação de um feixe de fótons por uma amostra.....	23
<b>Figura 9</b>	- Componentes de um microtomógrafo.....	24
<b>Figura 10</b>	- Etapas da microtomografia computadorizada por raio-X.....	25
<b>Figura 11</b>	- Aplicação do anestésico e relaxante muscular.....	30
<b>Figura 12</b>	- Incisão cirúrgica para exposição do fêmur.....	30
<b>Figura 13</b>	- Osteotomia utilizando uma broca odontológica.....	30
<b>Figura 14</b>	- Microtomógrafo por raio-X de alta resolução.....	31
<b>Figura 15</b>	- Phantoms de hidroxiapatita com diâmetro de 4mm e concentração de 0.25g/cm <sup>3</sup> e 0.75g/cm <sup>3</sup>	32
<b>Figura 16</b>	- Projeção e secção transversal do phantom com concentração 0,75g/cm <sup>3</sup> de hidroxiapatita.....	33
<b>Figura 17</b>	- Seleção da secção transversal inferior da VOI (linha vermelha) do phantom com concentração 0,75g/cm <sup>3</sup> .....	33
<b>Figura 18</b>	- Seleção da secção transversal superior da VOI (linha vermelha) do phantom com concentração 0,75g/cm <sup>3</sup> .....	34
<b>Figura 19</b>	- Escolha da região de interesse (ROI) na secção transversal do phantom com concentração 0,75g/cm <sup>3</sup> .....	34



<b>Figura 20</b> -	Superposição da região de interesse (ROI) na secção transversal do phantom com concentração 0,75g/cm <sup>3</sup> .....	35
<b>Figura 21</b> -	Binarização dos tons de cinza para cálculo do valor médio do coeficiente de atenuação.....	35
<b>Figura 22</b> -	Secção transversal contendo o tecido de reparo do defeito ósseo no 14º dia pós-cirúrgico.....	37
<b>Figura 23</b> -	Secção transversal mais distal da VOI.....	38
<b>Figura 24</b> -	ROI da secção transversal mais distal da VOI.....	38
<b>Figura 25</b> -	ROI de uma secção transversal da VOI onde há presença do calo ósseo..	39
<b>Figura 26</b> -	Visualização coronal, transversal e sagital das reconstruções microtomográficas de um fêmur (7º dia).....	41
<b>Figura 27</b> -	Visualização coronal, transversal e sagital das reconstruções microtomográficas de um fêmur (14º).....	41
<b>Figura 28</b> -	Visualização coronal, transversal e sagital das reconstruções microtomográficas de um fêmur (21º).....	42
<b>Figura 29</b> -	Thresholding de reconstrução microtomográfica transversal em tons de cinza.....	42
<b>Figura 30</b> -	Delimitação da região de interesse contendo tecido de reparo e o tecido adjacente.....	43
<b>Figura 31</b> -	Segmentação do tecido de reparo do tecido adjacente.....	43
<b>Figura 32</b> -	Segmentação do tecido de reparo na imagem em tons de cinza da reconstrução microtomográfica transversal de um fêmur (dia 7).....	43
<b>Figura 33</b> -	Segmentação do tecido de reparo na imagem em tons de cinza da reconstrução microtomográfica transversal de um fêmur (dia 14).....	44
<b>Figura 34</b> -	Segmentação do tecido de reparo na imagem em tons de cinza da reconstrução microtomográfica transversal de um fêmur (dia 21).....	44
<b>Figura 35</b> -	Visualização 3D do tecido de reparo (14º).....	45
<b>Figura 36</b> -	Visualização 3D da região medial do fêmur contendo o tecido de reparo (14º).....	45
<b>Figura 37</b> -	Percentual de volume ósseo mineralizado no calo ósseo das amostras do grupo 1.....	47

<b>Figura 38 -</b>	Percentual de volume ósseo mineralizado no calo ósseo das amostras do grupo 2.....	47
<b>Figura 39 -</b>	Percentual de volume ósseo mineralizado no calo ósseo das amostras do grupo 3.....	48
<b>Figura 40 -</b>	Densidade mineral volumétrica do calo ósseo das amostras do grupo1....	48
<b>Figura 41 -</b>	Densidade mineral volumétrica do calo ósseo das amostras do grupo2....	49
<b>Figura 42 -</b>	Densidade mineral volumétrica do calo ósseo das amostras do grupo3....	49
<b>Figura 43 -</b>	Valor médio da relação BV/TV dos grupos experimentais.....	50
<b>Figura 44 -</b>	Valor médio da densidade mineral óssea dos grupos experimentais.....	50

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Parâmetros morfométricos do calo ósseo dos fêmures do grupo experimental 1.....	46
<b>Tabela 2 -</b>	Parâmetros morfométricos do calo ósseo dos fêmures do grupo experimental 2.....	46
<b>Tabela 3 -</b>	Parâmetros morfométricos do calo ósseo dos fêmures do grupo experimental 3.....	46
<b>Tabela 4 -</b>	Relação BV/TV no calo ósseo.....	50
<b>Tabela 5 -</b>	BMD no calo ósseo.....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu$ CT	Microtomografia computadorizada
CCD	Charge-coupled device (Dispositivo de Carga Acoplado)
ROI	Região de interesse do objeto
VOI	Volume de interesse do objeto
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
CT	Tomografia computadorizada
PTH	Hormônio paratireóide
BMD	Densidade mineral óssea
TV	Volume total do calo
BV	Volume do calo ósseo mineralizado
UNESP	Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho
USP	Universidade de São Paulo
PBS	Phosphato buffered solution
°C	Graus Celsius
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

## LISTA DE SÍMBOLOS

<b>ml</b>	Mililitro
<b>g</b>	Gramas
<b>mm</b>	Milímetros
<b>g/cm<sup>3</sup></b>	Gramas por centímetro cúbico
<b>μA</b>	Microampere
<b>cm<sup>-1</sup></b>	Centímetro a menos um
<b>mm<sup>3</sup></b>	Milímetro cúbico

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>1.1 Tecido ósseo</b> .....	14
<b>1.2 Fratura Óssea</b> .....	15
<b>1.3 Consolidação Óssea</b> .....	15
<b>1.4 Microtomografia (<math>\mu</math>TC)</b> .....	22
<b>2 OBJETIVO</b> .....	28
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	29
<b>3.1 Animais</b> .....	29
<b>3.2 Cirurgia</b> .....	29
<b>3.3 Quantificação do Reparo Ósseo por Microtomografia 3D</b> .....	31
<b>3.4 Análise Estatística</b> .....	40
<b>4 RESULTADOS</b> .....	41
<b>4.1 Visualização das Reconstruções Microtomográficas</b> .....	41
<b>4.2 Segmentação do Calo Ósseo</b> .....	42
<b>4.3 Visualização 3D</b> .....	44
<b>4.4 Quantificação do Calo Ósseo</b> .....	45
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	52
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	54
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	55
<b>ANEXOS</b> .....	58

## 1 INTRODUÇÃO

As fraturas ósseas afetam economicamente a sociedade tanto nos custos em saúde como na produtividade (NYMAN et al., 2009). Por essa razão, há um crescente interesse em pesquisas que esclareçam os mecanismos envolvidos no reparo ósseo e que possibilitem o desenvolvimento de técnicas de intervenção que possam acelerar esse processo.

A consolidação da fratura é um processo que geralmente alcança um resultado adequado. Ele envolve uma série de eventos celulares e moleculares que obedecem a uma seqüência específica de tempo (EINHORN, 2005).

O monitoramento da consolidação de fraturas em processos normais e patológicos é normalmente realizado por meio de procedimento radiográfico que, associado à histomorfometria, imunohistoquímica e ultramicroscopia, possibilita achados relevantes para a compreensão das alterações no tecido ósseo. A radiografia proporciona uma análise bidimensional de uma estrutura tridimensional. A análise por microtomografia que resulta em imagens tridimensionais, vem se mostrando como um procedimento mais efetivo para o estudo dos eventos que levam a cicatrização óssea (AUGAT; RYABY, 2001; FREEMAN et al., 2009).

### 1.1 Tecido ósseo

O tecido ósseo é um tecido conectivo especializado que apresenta duas funções básicas, ambas relacionadas à sua característica única de apresentar uma matriz extracelular calcificada. A primeira função é suportar cargas mecânicas derivadas da contração muscular e da sustentação de peso. A segunda função é servir de reservatório de íons cálcio, magnésio e fosfato, além de auxiliar a manutenção da homeostase desses íons no sangue. (BURGER et al., 1995).

A formação do tecido ósseo inicia-se pela secreção do colágeno e da substância fundamental amorfa pelos osteoblastos. A polimerização do colágeno é rápida formando as fibras de colágeno, o que resulta no osteóide que é um tecido cartilaginiforme diferente da

cartilagem porque nele ocorre precipitação dos sais de cálcio. Ao formar-se o osteóide, alguns osteoblastos ficam presos nele e são designados osteócitos. Após a formação do osteóide, ocorre uma precipitação dos sais de cálcio sobre a superfície das fibras de colágeno que aparecem em intervalos regulares ao longo de cada fibra formando ao final de dias a semanas os cristais de hidroxiapatita (HUISKES; RIETBERGEN, 2005).

No tecido ósseo estão presentes os osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e células de revestimento ósseo. Os osteoblastos são células de formação óssea, os osteoclastos de reabsorção óssea e os osteócitos de manutenção óssea (HUISKES; RIETBERGEN, 2005).

## **1.2 Fratura Óssea**

A fratura caracteriza-se por uma perda da continuidade do tecido ósseo com ou sem deslocamento. Pode ter causa traumática, degenerativa, por fadiga ou doenças, sendo que a maioria resulta da combinação de diversos fatores que ocorrem simultaneamente (RIEGGER, 1993). Resulta de carga excessiva que ultrapassa a capacidade de resistência do osso ou de uma fadiga da estrutura de um osso (VELLOSO, 2005).

Ao ocorrer uma fratura, além da lesão de células, vasos sanguíneos e matriz óssea, são lesados os tecidos moles adjacentes incluindo músculos e nervos (SFEIR et al., 2005).

Imediatamente após a lesão inicia-se uma seqüência de respostas específicas do tecido que desencadeia o processo de reparo da fratura com o objetivo de restauração da competência mecânica do osso (KRISTIENSEN et al., 1997).

## **1.3 Consolidação Óssea**

A consolidação óssea compreende o processo de regeneração óssea pós-fratura que ocorre por meio de uma reação inflamatória localizada, acelerada e controlada que produz cura de uma fratura pela formação de tecido ósseo de forma bastante semelhante à sua estrutura inicial. A resposta do osso ao trauma consiste de uma seqüência ordenada e bem



diferenciada de eventos que, em condições normais, não apresenta problemas de consolidação embora em algumas situações o processo de reparo pode ser acelerado de forma a assegurar um retorno mais rápido da função músculo esquelética (SFEIR et al., 2005).

Os tecidos principais envolvidos no reparo da fratura são o osso cortical, o periósteo, os tecidos moles adjacentes à fratura e à medula óssea, conforme esquematizado na Figura 1 (EINHORN, 2005).

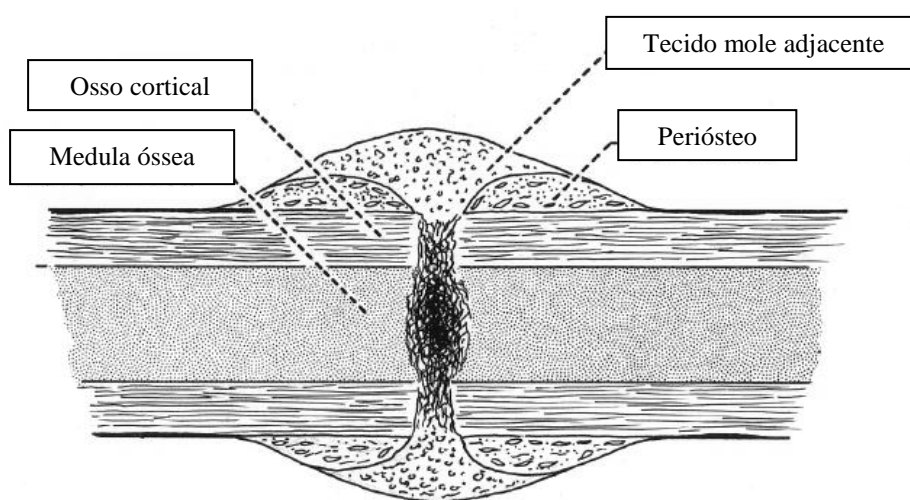


Figura 1 – Tecidos envolvidos no processo de reparo ósseo (EINHORN, 2005, p.S4)

O reparo ósseo pode ser primário ou secundário o que é determinado pela utilização ou não de tratamento por osteossíntese com fixação.

A reparação primária, também chamada direta ou cortical, ocorre quando é utilizada fixação interna rígida de forma a aproximar as bordas da fratura. Nesse caso o tecido envolvido é o osso cortical com pequena participação do periósteo, dos tecidos moles adjacentes e da medula óssea. Essa estabilização rígida suprime a formação do calo ósseo. A reparação secundária é caracterizada pela cicatrização espontânea da fratura na ausência de fixação rígida, onde há uma combinação de ossificação intramembranosa e endocondral resultando na formação do calo ósseo (EINHORN, 2005; SFEIR et al., 2005).

No local da fratura há uma hemorragia causada pelo rompimento de vasos sanguíneos e morte de células ósseas, além da destruição da matriz. Os macrófagos são os responsáveis pela “limpeza” do local, retirando os restos celulares, os restos da matriz e o coágulo

sanguíneo que dá início ao processo de reparação. Ao redor da fratura forma-se uma aglomeração de células osteoprogenitoras que se infiltram entre as extremidades ósseas lesionadas. Nesse anel conjuntivo, bem como no conjunto que se localiza entre as extremidades ósseas fraturadas, surge tecido ósseo primário ou imaturo, tanto pela ossificação endocondral de pequenos pedaços de cartilagem que aí se formam, como também por ossificação intramembranosa. Podem ser encontradas no local de reparação áreas de cartilagem e áreas de ossificação endocondral. Esse processo evolui de modo a aparecer, após algum tempo, um calo ósseo que envolve a extremidade dos ossos fraturados. Essa seqüência de eventos está demonstrada na Figura 2. O calo ósseo é constituído por tecido ósseo imaturo que une provisoriamente as extremidades do osso fraturado (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

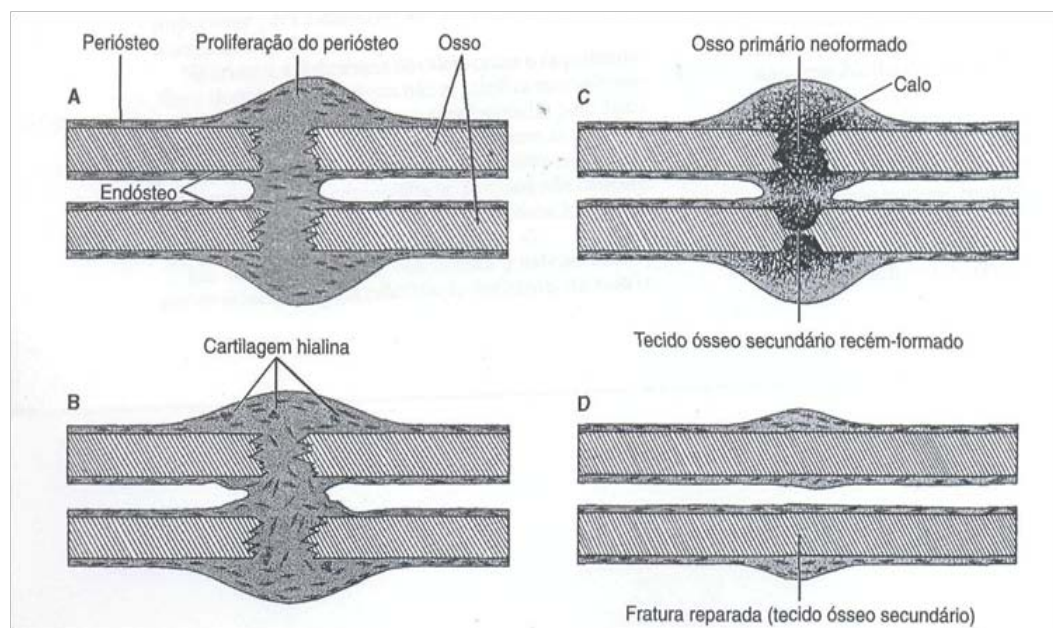


Figura 2 – Reparo ósseo por meio de tecido ósseo neo-formado a partir do periosteio e do endosteio (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008)

O processo de reparo, que leva à formação do calo ósseo, pode formar um tecido com propriedades biomecânicas variáveis o que irá caracterizar a capacidade do osso consolidado em suportar cargas fisiológicas sem sofrer nova fratura (NYMAN et al., 2009).

A formação do calo ósseo envolve quatro fases caracterizadas pela presença de diferentes células e componentes extracelulares: fase inflamatória, calo mole, calo duro e

remodelamento (CLAES; ITO, 2005; EINHORN, 2005; SFEIR et al., 2005, VELLOSO, 2005).

A primeira fase é a inflamatória que auxilia na imobilização em função da presença de dor e edema (Figura 3). O seu pico ocorre em 48 horas e desaparece em uma semana pós-fratura, e inclui o processo de condrogênese que leva ao desenvolvimento de cartilagem adjacente ao sítio da lesão e à formação de osso diretamente a partir de células osteoprogenitoras presentes sob o periósteo. Também envolve a estabilização interfragmentária com a formação de um calo periostal e endostal, baseado no processo de diferenciação da fibrocartilagem do foco da fratura, e é conhecido como fase do calo ósseo mole. O período de 7 a 10 dias (Figura 4) pós-fratura envolve o processo de condrogênese que leva a formação da cartilagem adjacente ao sítio da fratura e a formação do osso diretamente a partir das células osteoprogenitoras localizadas sob o periósteo (EINHORN, 2005; SFEIR, 2005).

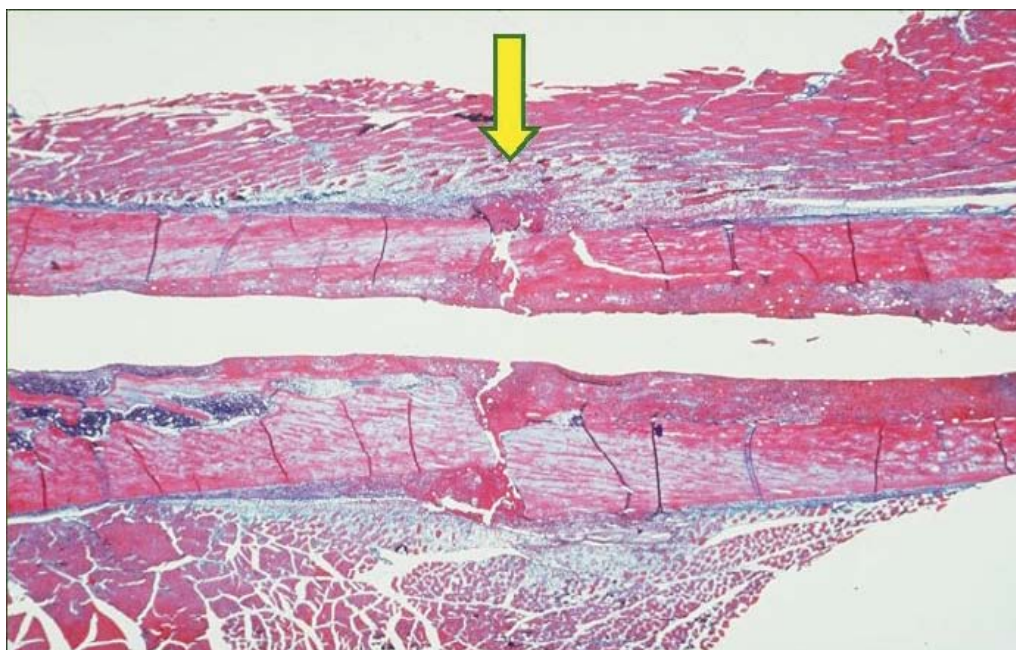


Figura 3 – 1º dia pós-fratura: fratura transversa em fêmur de rato (EINHORN, 2005, p.S5)

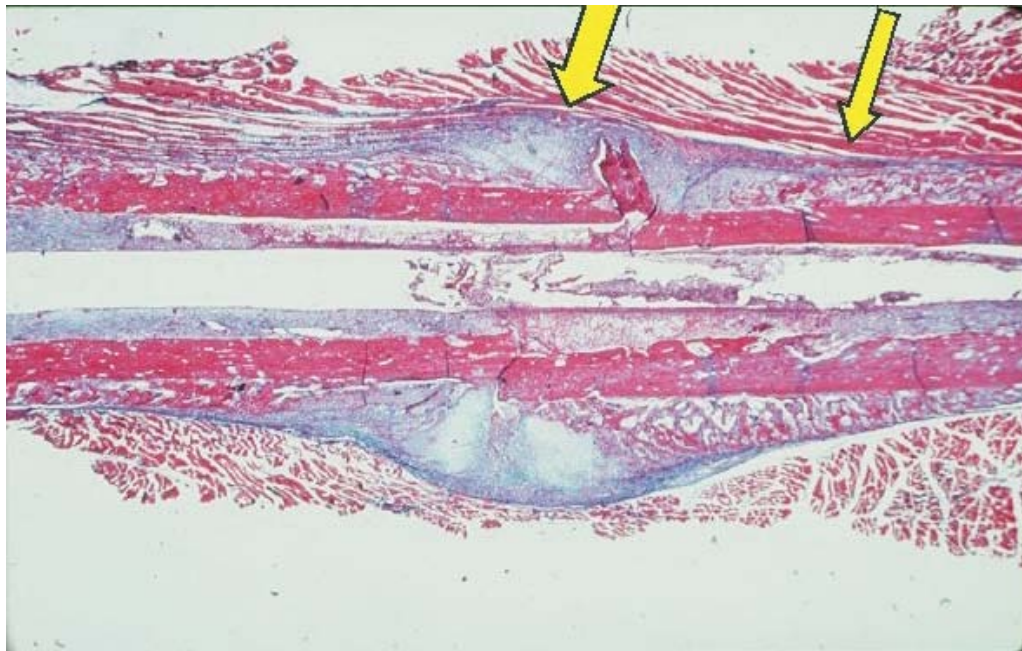


Figura 4 – 7º dia pós-fratura: condrogênese e resposta inflamatória no sítio da lesão. A seta larga mostra a condrogênese. A seta estreita indica a formação de osso a partir do periósteo (EINHORN, 2005, p. S5)

No início da fase do calo mole, as células osteoprogenitoras, originadas do periósteo, endósteo, medula óssea e tecidos moles adjacentes, invadem o tecido de granulação do calo desenvolvido durante a fase inflamatória. Os leucócitos polimorfonucleares, linfócitos, monócitos, macrófagos são atraídos para o sítio da lesão e são ativados para liberar as citocinas que tem função pró-inflamatória. Entende-se que a migração dessas células para o calo é modulada por fatores de crescimento e pelas citocinas liberadas durante a fase inflamatória a partir da sinalização química deflagrada pela lesão do endotélio vascular. Como elas migram para dentro do calo, elas diferenciam-se em vários fenótipos de células e proliferam para fora do calo. Ao longo do periósteo e endósteo, essas células diferenciam-se em osteoblastos e iniciam a produção de osso por meio da ossificação intramembranosa, o que permite um rápido crescimento ósseo em direção à falha óssea. Fora do calo e da falha óssea, as células progenitoras diferenciam-se em fibroblastos e condrócitos, proliferam e começam a produzir tecido conectivo fibroso e matriz cartilaginosa, respectivamente. Esse tecido mole liga o final do fragmento e estabiliza a fratura em algum grau (CLAES; ITO, 2005; EIHORN, 2005; SFEIR et al., 2005).

Na segunda fase, denominada reparativa, ocorre a formação do calo fibrocartilaginoso e, em seguida, do calo ósseo. Inicia-se a formação de tecido fibroso e da nova cartilagem enquanto ocorre a revascularização e observa-se a presença de macrófagos, condroblastos,



condrócitos, osteoclastos, osteoblastos, fibroblastos e células endoteliais. É a restauração do foco da fratura quando ocorre reorganização celular intensa e a formação de novo arcabouço ósseo, sendo denominada fase do calo duro. Em torno do 14º mais tecido ósseo se forma sob o perióstio (Figura 5). Inicia-se a calcificação da cartilagem ainda que essa permaneça até desenvolver um volume suficiente para estar pronta para a calcificação completa. Os condrócitos liberam as enzimas fosfatases e proteases para preparar a matriz para a calcificação. As fosfatases produzem íons fosfato para serem precipitados com o cálcio. As proteases degradam as proteoglicanas que inibem a mineralização permitindo aos condrócitos controlar a taxa físico-química do processo de mineralização. Nesse estágio, os condrócitos presentes na interface entre tecido mole e duro, proliferam e sofrem hipertrofia e calcificação, formando osso por meio da ossificação endocondral. Em outra parte do calo, fibroblastos e tecido conectivo são, aos poucos, substituídos por condrócitos e cartilagem. Esses dois processos permitem uma lenta substituição de osso a partir da extremidade distal do calo até que se estabeleça na periferia do calo, uma ponte de ligação inicial na falha óssea. Então, essa substituição se interioriza. Quando a falha óssea fica preenchida pelo osso produzido, a fratura é considerada consolidada. Na seqüência inicia-se o processo de ossificação intramembranosa e endocondral para depositar o novo tecido ósseo (CLAES; ITO, 2005; EIHORN, 2005; SFEIR et al., 2005).

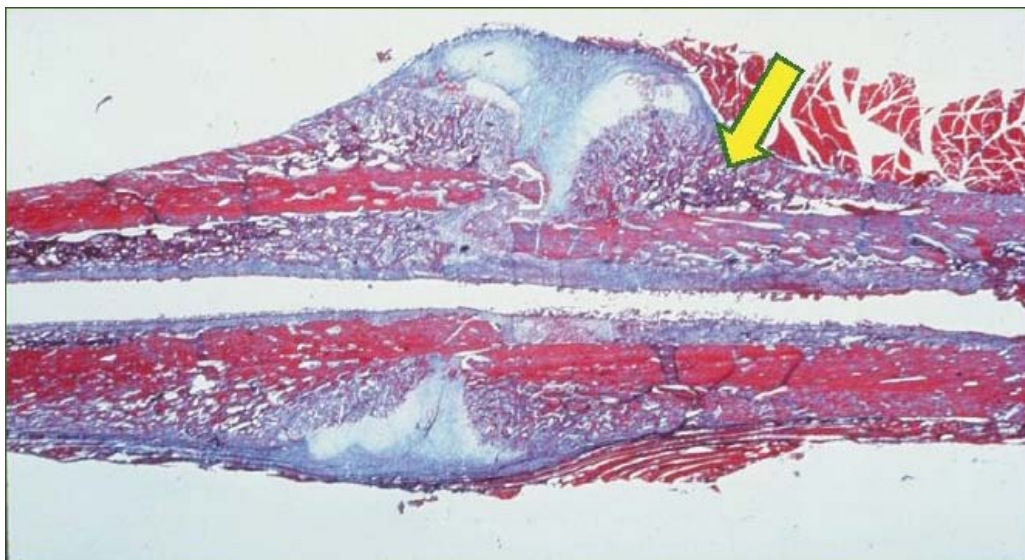


Figura 5 – 14º dia pós-fratura: calcificação da cartilagem. A seta mostra a cartilagem calcificada na interface entre o calo cartilaginoso e a formação de osso a partir do perióstio (EINHORN, 2005, p.S5)

A terceira fase caracteriza-se pela substituição das áreas de necrose por osso novo, feita pelo sistema haversiano do osso compacto. Após 21 dias, o calo está formado essencialmente por cartilagem calcificada que deve ser removida e substituída pelo osso (Figura 6). Essa cartilagem torna-se um alvo para os condroclastos que são células multinucleadas especializadas na reabsorção de tecidos calcificados. Esses condroclastos degradam a cartilagem calcificada e, ao fazê-lo, sinalizam para que vasos sanguíneos penetrem o tecido e tragam células tronco mesenquimais perivasculares que se diferenciam em células osteoprogenitoras e então, em células de formação óssea, os osteoblastos. O processo de remoção da cartilagem calcificada inclui a reabsorção da matriz mineralizada assim como a remoção dos próprios condrócitos (EINHORN, 2005; VELLOSO, 2005).

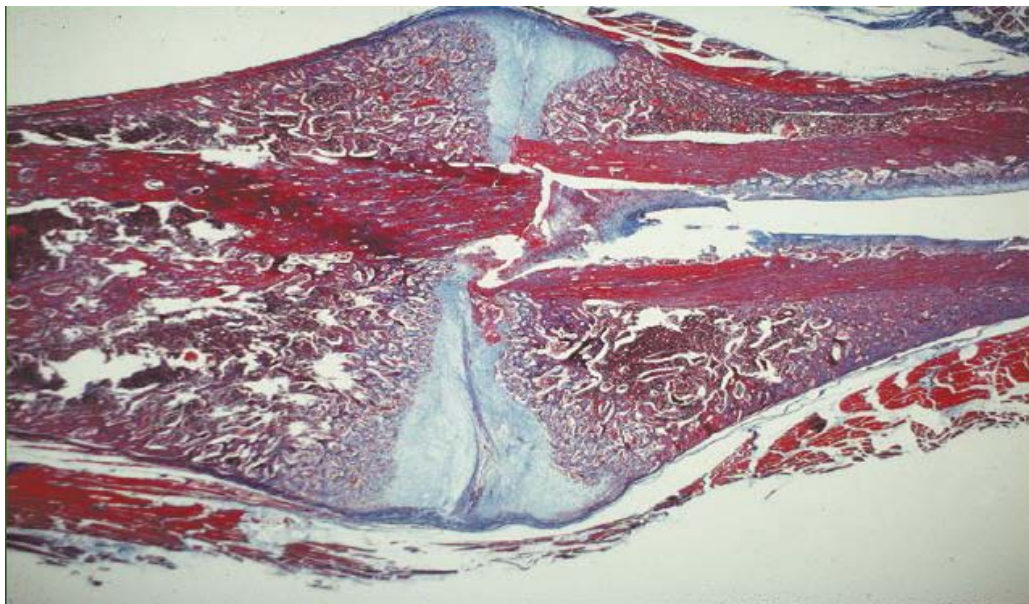


Figura 6 – 21º dia pós-fratura: o calo composto em sua maior parte por cartilagem calcificada (EINHORN, 2005, p.S6)

Na fase seguinte, que é a de remodelamento, ocorre a substituição do novo tecido ósseo por osso lamelar e a reabsorção do calo ósseo (Figura 7). Há uma combinação de cartilagem calcificada e trabeculado ósseo neo-formado. Nesse estágio, os osteoclastos estão presentes no tecido e o calo é remodelado e convertido em estrutura de osso lamelar capaz de suportar cargas mecânicas. A modificação gradual da região da fratura leva a restauração da arquitetura óssea normal visando à adaptação funcional das forças que agem sobre o tecido

local (EINHORN, 2005; SFEIR et al., 2005). O final do processo corresponde à união óssea e representa, do ponto de vista tecidual, a recomposição completa da lesão do osso (VELLOSO, 2005).

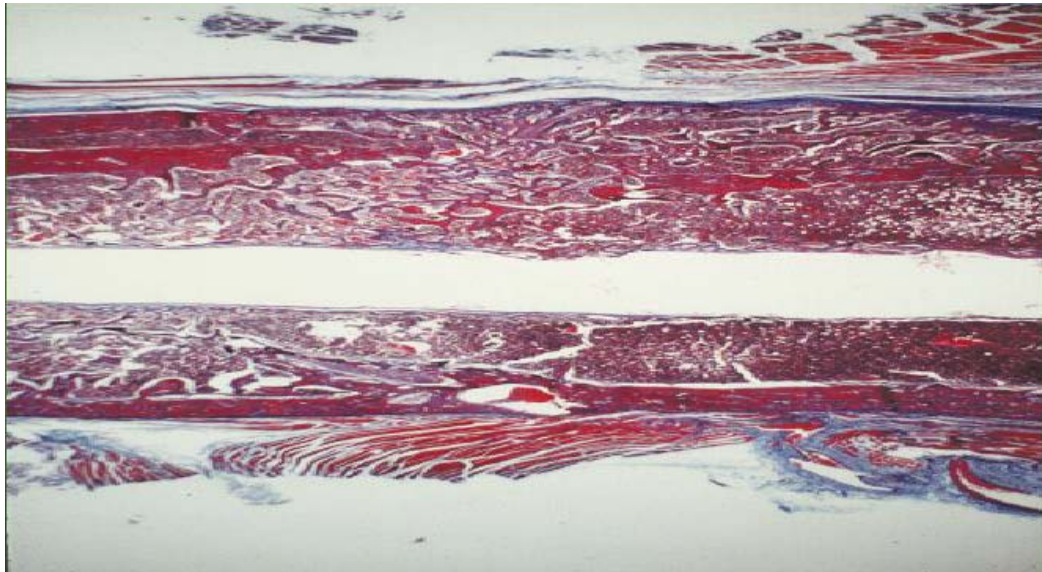


Figura 7 – 28° a 35° dias pós-fratura: cartilagem calcificada e osso neo-formado (EINHORN, 2005, p. S6)

#### 1.4 Microtomografia ( $\mu$ TC)

Análises qualitativas e quantitativas da microestrutura de um objeto podem ser realizadas pela técnica de microtomografia computadorizada por raios-X ( $\mu$ CT).

Quando um feixe de raios-X com intensidade  $I_0$  atravessa um objeto com espessura  $x$ , conforme Figura 8, a intensidade de radiação  $I$  após a propagação é dada pela equação (1), onde  $\mu$  é o coeficiente de atenuação linear do material. Se a trajetória do feixe inclui regiões com diferentes coeficientes de atenuação ( $\mu_1, \mu_2, \dots, \mu_n$ ) então a intensidade  $I$  é dada pela equação (2).

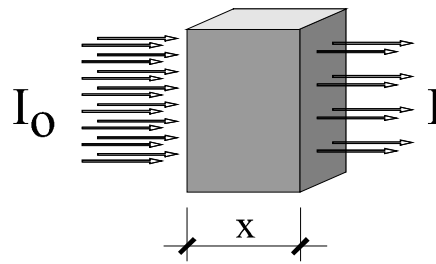


Figura 8 - Atenuação de um feixe de fótons por uma amostra (SILVA, 2009)

$$I = I_0 e^{-\mu x} \quad (1)$$

$$I = I_0 e^{-\sum_{i=1}^n \mu_i x_i} \quad (2)$$

O interesse de investigar a microestrutura de um objeto resultou no desenvolvimento de algoritmos matemáticos para se determinar a distribuição espacial dos coeficientes de atenuação em cada uma das secções transversais do objeto e reconstruir a imagem das secções transversais conhecendo-se um conjunto de projeções do objeto. O algoritmo matemático mais utilizado para a reconstrução das secções, quando o feixe de raios-X é cônico, isto é, produzido por uma fonte pontual, é o de Feldkamp et al. (1984). O feixe cônico é utilizado em microtomógrafos de raios-X disponíveis comercialmente.

A Figura 9 descreve os componentes de um microtomógrafo: a) fonte de raio-x com um foco de dimensão micrométrica e um feixe cônico. Um filtro metálico de alumínio ou cobre de pequena espessura deve ser colocado na frente da fonte para reduzir o efeito denominado de “endurecimento de feixe”; b) mesa com movimento de precisão rotacional ( $\theta$ ) e translacional (direções X, Y e Z) onde é fixado o objeto a ser analisado; c) detector de radiação (câmara CCD) para aquisição das projeções do objeto.



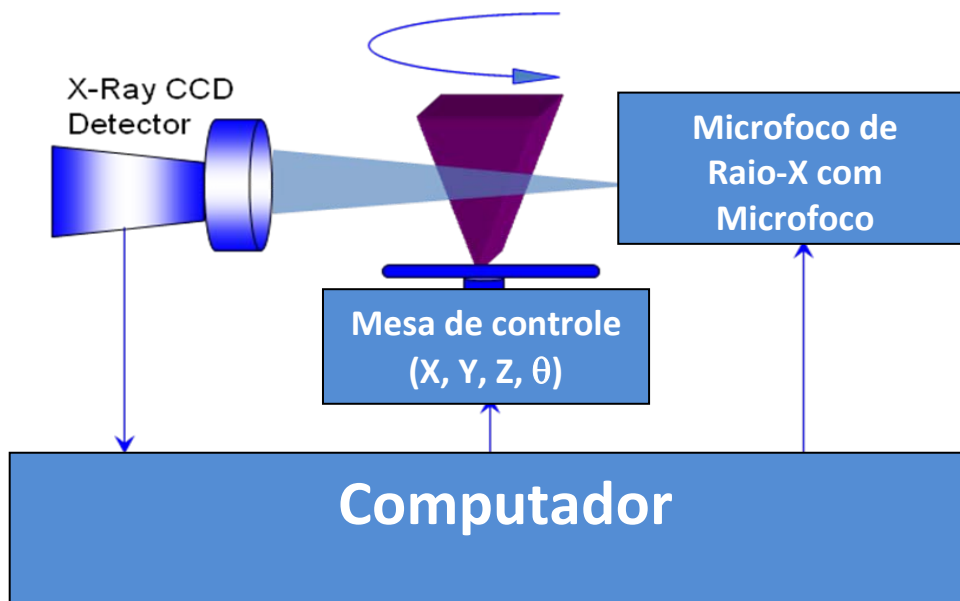


Figura 9 - Componentes de um microtomógrafo (SILVA, 2009)

A Figura 10 ilustra as etapas da análise microtomográfica utilizando uma amostra óssea trabecular:

a) Obtenção de projeções do objeto em diferentes posições através de rotações com um incremento angular  $\theta$ . Uma média de projeções é obtida a cada incremento angular. O incremento angular  $\theta$  determina o número  $n$  de projeções (por exemplo, se  $\theta=1^\circ$ ,  $n=360$ ). A amostra deve ser fixada firmemente à um suporte colocado sobre a mesa de modo a impedir qualquer movimento durante a aquisição das projeções. Utiliza-se uma massa de modelar para fixar o objeto no suporte. O tamanho do pixel do detetor e da magnificação das projeções irá determinar a resolução microtomográfica. As variáveis que influem nesta resolução são a a distância da fonte ao objeto ( $D_1$ ), a distância da fonte ao detetor de radiação ( $D_2$ ),  $H_1$  a altura do objeto ( $H_1$ ) e a altura do objeto projetado no detetor de radiação ( $H_2$ ). O fator de magnificação é  $M=(D_1+D_2/D_1)$ . Se  $R$  é a resolução microtomográfica e  $K$  é a dimensão do pixel do detetor, então a resolução é  $R=K/M$ .

b) Reconstrução 2D das seções transversais do objeto utilizando o algoritmo de Feldkamp.

c) Escolha da região de interesse (ROI) das secções transversais para a análise morfométrica 2D e 3D.

d) Escolha do volume de interesse (VOI) para a análise morfométrica 2D e 3D.

e) Binarização das imagens das secções transversais do objeto para se determinar os pixels que representam o tecido ósseo. Cada pixel da secção transversal possui um valor binário de 8 bits. O valor binário pode estar contido ou não em um intervalo de valores de pixels denominado de *threshold*: a) se o valor do pixel não está contido no *threshold* ele é convertido em 0 (região da secção transversal que não contém tecido ósseo); b) se o valor do pixel está contido no *threshold* o seu valor é convertido em 1 (região da secção transversal que contém tecido ósseo).

f) Análise morfométrica 2D e 3D da amostra óssea.

g) Reconstrução 3D do VOI.

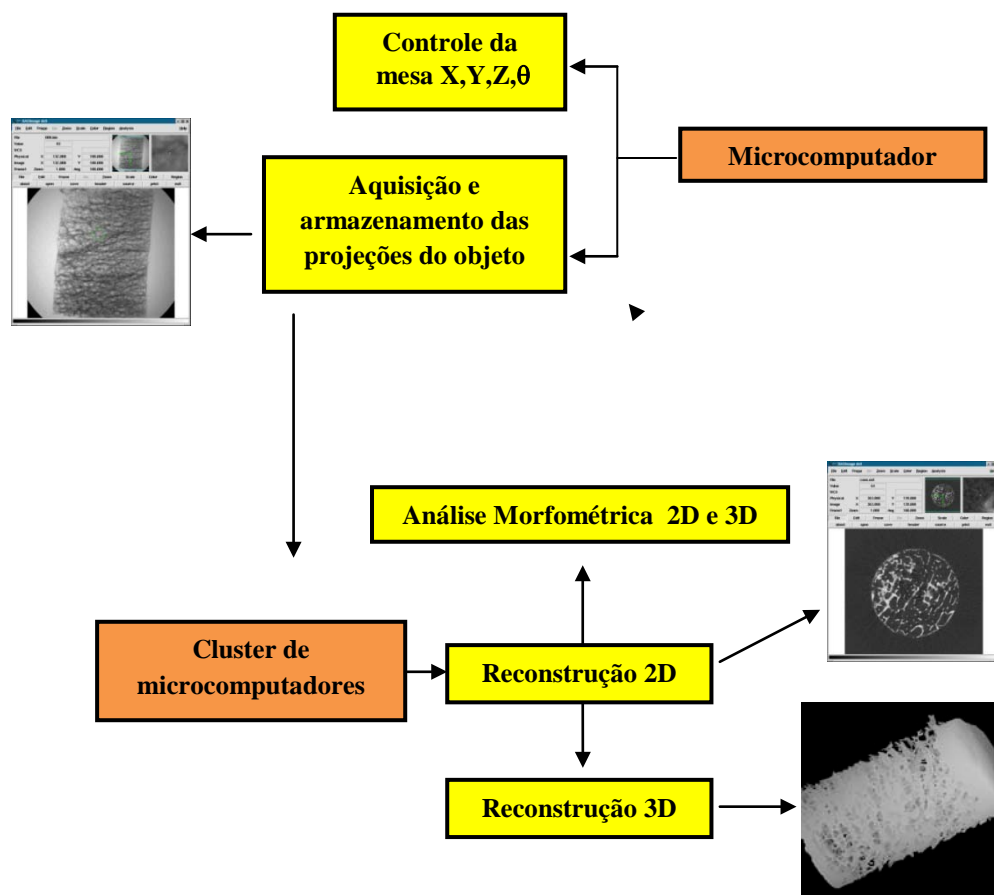


Figura 10 - Etapas da microtomografia computadorizada por raios-X (SILVA, 2009)

A quantificação do reparo ósseo por  $\mu$ CT de campo paralelo (radiação sincrotron) ou campo cônico é uma técnica com grande potencialidade para a quantificação do reparo ósseo, mas poucos são os relatos sobre seu uso na literatura científica.

Kerchkhoff et al. (2008) relatam o uso de microtomografia por campo cônico para a determinação do volume ósseo formado no interior e no exterior de implantes utilizados como substitutos ósseos fabricados com metal, cerâmica ou polímero.

Augat e Ryaby (2001), Kinney e Nichols (1992) utilizaram a  $\mu$ CT por radiação sincrotron para avaliar a estrutura 3D do calo da fratura em experimento animal sobre regeneração óssea. Augat e Ryaby (2001) descrevem gráficos da frequência de distribuição da densidade mineral óssea em secções transversais do calo ósseo obtidas por microtomografia.

Morgan et al. (2009) afirmam que radiografias proporcionam uma avaliação bidimensional da estrutura tridimensional do reparo ósseo. Em comparação a tomografia computadorizada (CT) proporciona medidas quantitativas e tridimensionais da estrutura e mineralização do reparo ósseo, e essas medidas podem estar relacionadas à rigidez e resistência do calo ósseo. A análise quantitativa, baseada em análises de CT da estrutura e composição do calo, pode levar ao desenvolvimento de medidas confiáveis, não-invasivas da regeneração. A caracterização de mudanças temporais na estrutura e mineralização do calo em diferentes condições fisiológicas também são de grande valor para se relacionar os processos biológicos de regeneração com a resistência mecânica, possibilitando entender as relações entre biologia e biomecânica da fratura. A microtomografia oferece resolução superior à tomografia computadorizada na avaliação do reparo ósseo em pequenos animais.

Beleville et al. (2008) em um estudo com camundongos monitoraram o reparo do tecido ósseo em fraturas diafisárias de fêmur tratadas com hormônio paratireóide (PTH). Análises tridimensionais do osso fraturado foram realizadas pelo software CT-Analyser fornecido pelo fabricante do microtomógrafo. Com os recursos computacionais disponíveis foi possível separar o calo ósseo do osso adjacente para medida do volume e superfície óssea do calo formado.

Bakker, Gerrits e Gossn (2008) monitoraram durante 90 dias a taxa de reparo do osso cortical em um defeito produzido na vértebra da cauda de camundongos utilizando microtomografia in vivo.

A tomografia computadorizada (TC) pode fornecer características estruturais e densidade mineral óssea volumétrica (BMD) de um calo. É uma técnica não destrutiva que pode ser usada em modelos pré-clínicos de reparo de fratura e comparada a testes biomecânicos. Assim, mudanças na resistência do calo devido a um tratamento possam potencialmente ser explicadas por mudanças na estrutura do calo e BMD. Resultados

experimentais em fratura de fêmur de rato comprovaram uma boa correlação entre parâmetros microestruturais e BMD com resistência mecânica (NYMAN et al., 2009).

A sequência de eventos que ocorrem ao longo do processo de mineralização pode ser monitorada por meio da  $\mu$ TC de forma mais efetiva por produzir imagens tridimensionais e avaliar índices como volume ósseo, área superficial óssea e densidade mineral óssea (FREEMAN, 2009).

## 2 OBJETIVO

Essa investigação teve como objetivo avaliar o reparo ósseo em defeito em fêmures de ratos, produzido por uma broca odontológica, através de microtomografia tridimensional por raio-X para a determinação do volume total do calo ósseo (TV), volume do calo ósseo mineralizado (BV), relação BV/TV, densidade mineral óssea volumétrica do calo ósseo (BMD) e visualização 2D e 3D do calo ósseo.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Os procedimentos experimentais com os animais foram aprovados pelo “Comitê de Ética em Experimentação Animal” da Universidade Federal de São Carlos, sob o número de protocolo 65/2009 (Anexo 1).

Foram utilizados 30 ratos machos da classe Wistar com massa corporal de aproximadamente 300 gramas fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Araraquara que permaneceram no Biotério do Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia da Universidade de São Paulo (USP) em ambiente com ciclo claro-escuro de 12 horas e temperatura controlada. Os animais receberam alimentação composta pela dieta balanceada comercial e água *ad libitum*.

#### 3.2 Cirurgia

As cirurgias foram realizadas no Biotério do Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia – USP. Aos animais foi administrada uma mistura de 0,1ml do anestésico cloridrato de cetamina (Ketamina ou Ketamin) e 0,1ml do relaxante muscular cloridrato de xilazina (Rompun) para cada 100g de massa corporal (Figura 11). A área da cirurgia foi submetida à higienização e tricotomia pré-operatória e, com o auxílio de um bisturi, o terço médio do fêmur foi exposto para evitar lesões no músculo e periósteo (Figura 12).

O modelo de osteotomia é o descrito em um estudo sobre o efeito do ultra-som de baixa intensidade e do laser no reparo ósseo em tíbia de ratos (LIRANI, 2004). Uma osteotomia parcial transversal foi realizada no terço médio do fêmur esquerdo para se produzir um defeito ósseo em toda a extensão cortical lateral utilizando-se um aparelho da marca Driller K<sup>®</sup> modelo BLM 600 plus, com caneta de alta rotação com fresa de 1 mm de diâmetro, 690 rpm irrigado com soro fisiológico estéril para controle da temperatura (Figura 13). A sutura da incisão na pele utilizou mono nylon 5.0.



Figura 11 – Aplicação do anestésico e relaxante muscular



Figura 12 - Incisão cirúrgica para exposição do fêmur



Figura 13 - Osteotomia utilizando uma broca odontológica

Os animais foram divididos em três grupos experimentais com 10 ratos em cada grupo. O sacrifício dos animais dos Grupos 1, 2 e 3 ocorreu no 7º, 14º e 21º dia após a cirurgia, respectivamente. Os animais foram sacrificados por overdose de Ketamin e Rompun para a análise do reparo ósseo por microtomografia 3D. Os fêmures excisados dos animais foram envolvidos por uma gaze, mergulhados em uma solução tampão de fosfato (PBS – phosphate buffered solution) e mantidos à -20°C em freezer até a realização da análise microtomográfica.

### 3.3 Quantificação do Reparo Ósseo por Microtomografia 3D

A avaliação do reparo do defeito ósseo nos fêmures esquerdos  $\mu$ CT foi realizada na Empresa Instrumentação Agropecuária (São Carlos – SP) utilizando-se o microtomógrafo modelo 1172 (SkyScan, Bélgica) e os softwares NRecon, Dataviewr, CT-Analyser e CT-Vol fornecidos pelo fabricante do microtomógrafo. Uma imagem do microtomógrafo, modelo 1172 (SkyScan, Bélgica), é mostrada na Figura 14. A avaliação compreendeu as seguintes etapas:

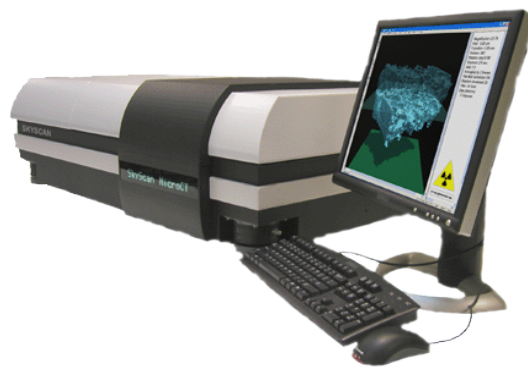


Figura 14 – Microtomógrafo por raio-X de alta resolução (SkyScan 1172, Bélgica)

➤ **Etapa 1:** Calibração da medida da densidade mineral óssea em phantoms

Phantoms cuja composição química mineral é a mesma do tecido ósseo foram escaneados por microtomografia. Esses phantoms são comercialmente disponíveis e foram



importados do fabricante do microtomógrafo. Eles possuem geometria cilíndrica com diâmetro de 4 mm (Figura 15) e as seguintes características:

- Concentração: 0,25 g/cm<sup>3</sup> ou 0,75 g/cm<sup>3</sup>

- Composição

Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>: 97 – 98%

Ca<sub>2</sub>(P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>): 2%

B-Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>: 1%

- Solubilidade: insolúvel em água, meio neutro ou alcalino. Solúvel em meio com pH <5.5

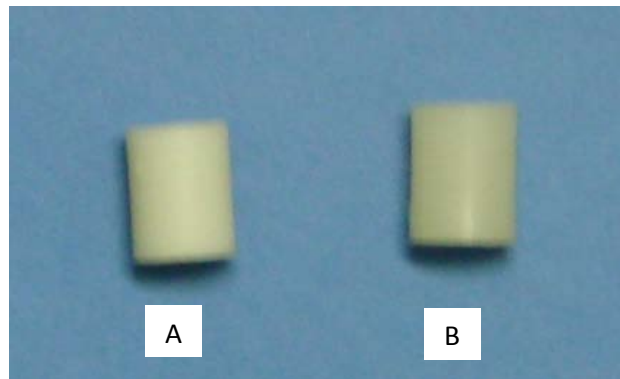


Figura 15 - Phantoms de hidroxiapatita com diâmetro de 4 mm e concentração de 0.25g/cm<sup>3</sup> (A) e 0.75g/cm<sup>3</sup> (B)

Os seguintes procedimentos foram utilizados na calibração:

a) Escaneamento microtomográfico dos phantons com os seguintes parâmetros: fonte de raio-X com 89KV e 112μA, filtro de alumínio de 0,5mm de espessura, rotação de 180° com incremento angular de 0,4°, aquisição com câmara CCD de 10Mp de 8 projeções radiográficas em cada rotação e resolução de 4,7μm.

b) Reconstrução microtomográfica dos phantons pelo software NRecon utilizando-se algoritmo de Feldkamp (1984).

c) Visualização da reconstrução microtomográfica do phantom. A Figura 16 mostra a reconstrução do phantom com 0.75g/cm<sup>3</sup> de hidroxiapatita utilizando-se o software CT-Analyzer. Na janela superior à esquerda observa-se a imagem de umas das projeções do phantom obtida durante o processo de escaneamento. A linha horizontal vermelha indica a

secção transversal do phantom que está sendo mostrada na janela inferior. A janela superior à direita lista os arquivos imagens das reconstruções 2D das seções transversais do phantom.

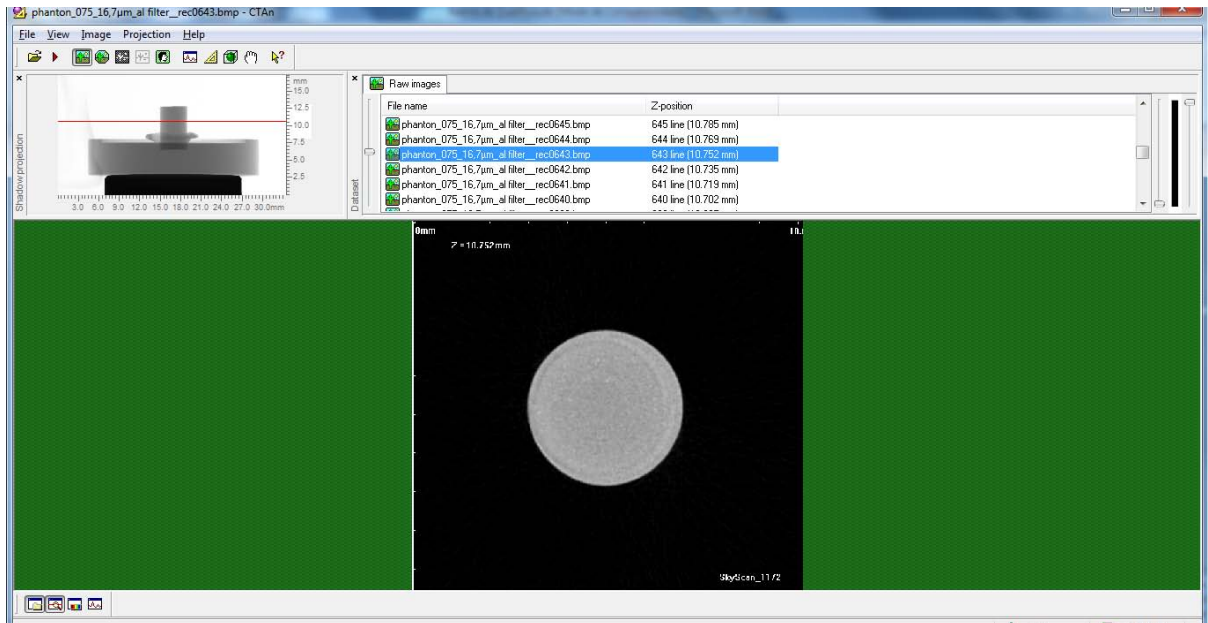


Figura 16 – Projecção e secção transversal do phantom com concentração  $0,75 \text{ g/cm}^3$  de hidroxiapatita

d) Seleção do volume de interesse (VOI) do phantom para o cálculo do coeficiente médio de atenuação do phantom. A linha vermelha delimita a secção transversal inferior (Figura 17) e superior (Figura 18) da VOI. Foram selecionadas 100 seções transversais.

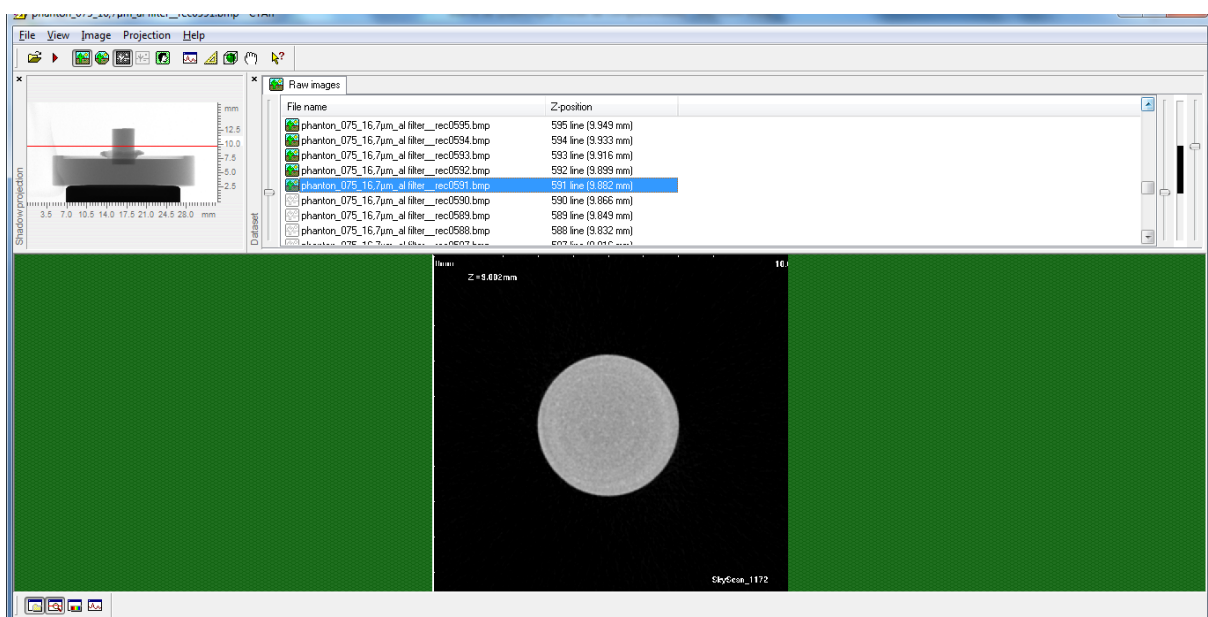


Figura 17 – Seleção da secção transversal inferior da VOI (linha vermelha) do phantom com concentração  $0,75 \text{ g/cm}^3$

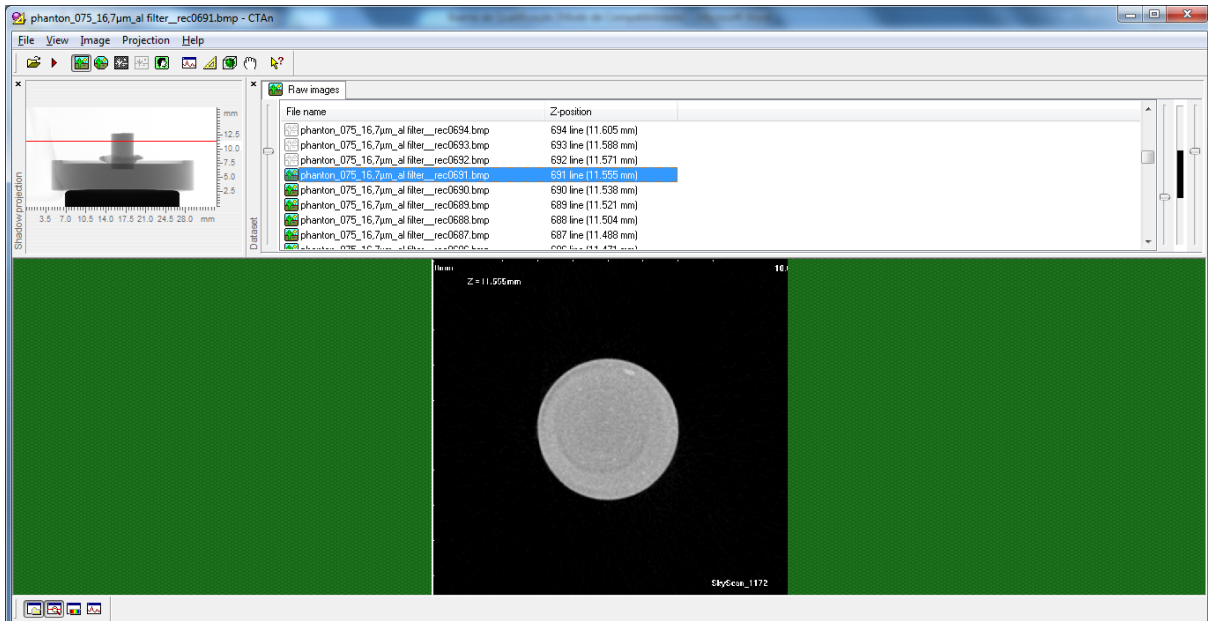


Figura 18 – Seleção da secção transversal superior da VOI (linha vermelha) do phantom com concentração 0,75 g/cm<sup>3</sup>

e) Determinação da região de interesse (ROI) de cada secção transversal da VOI do phantom. Na figura 19 o círculo vermelho com diâmetro ligeiramente inferior ao do phantom foi superposto à secção transversal. A superposição das duas imagens aparece na Figura 20 sendo a ROI a região compreendida pelo círculo de menor diâmetro.

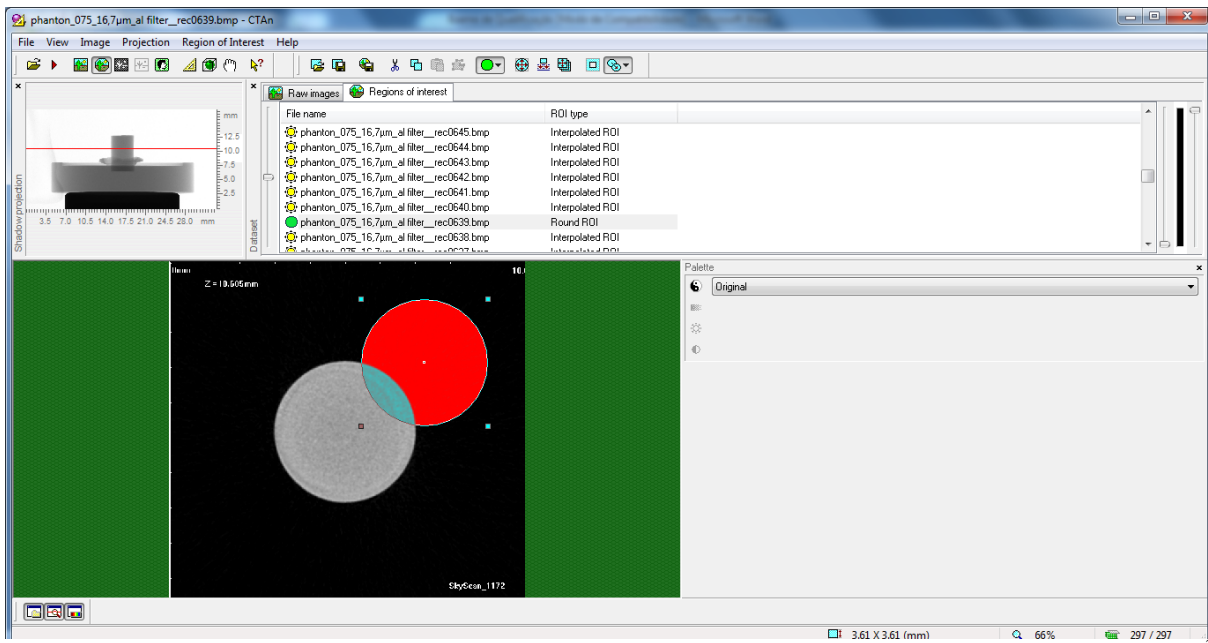


Figura 19 – Escolha da região de interesse (ROI) na secção transversal do phantom com concentração 0,75 g/cm<sup>3</sup>

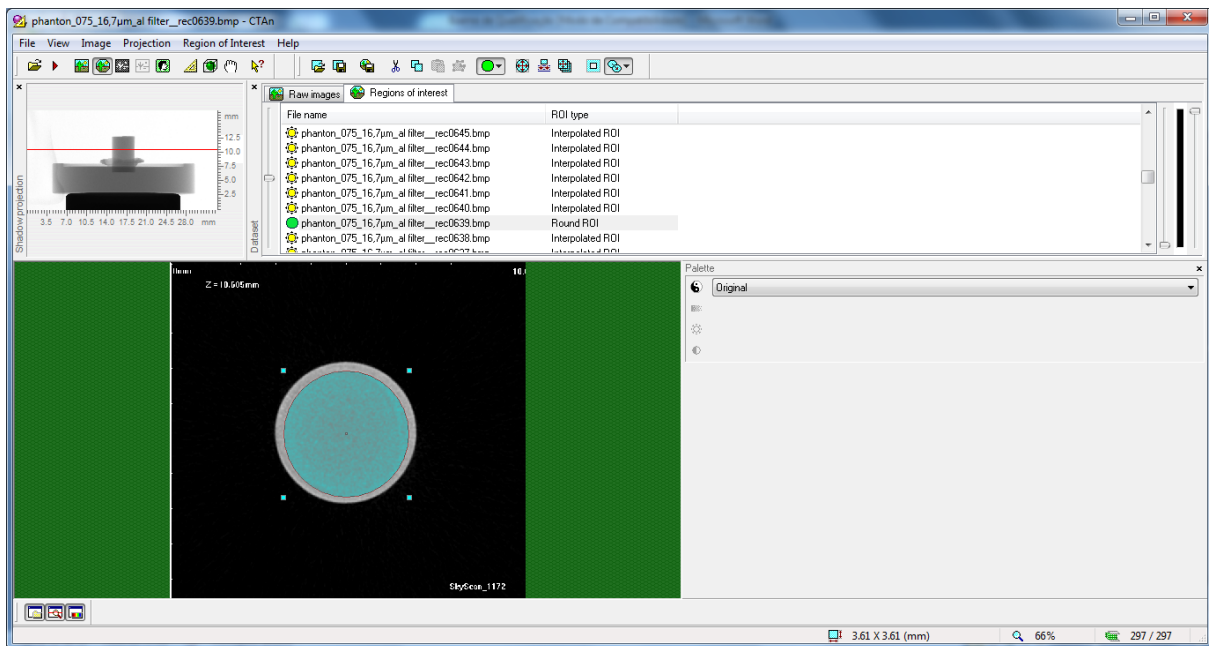


Figura 20 – Superposição da região de interesse (ROI) na seção transversal do phantom com concentração 0,75 g/cm<sup>3</sup>

f) Binarização das imagens da VOI utilizando-se um *threshold* (Figura 21) dos tons de cinza para determinação do valor médio dos coeficientes de atenuação dos voxels da VOI. Para o phantom de maior concentração este valor é 0.02253 cm<sup>-1</sup>.

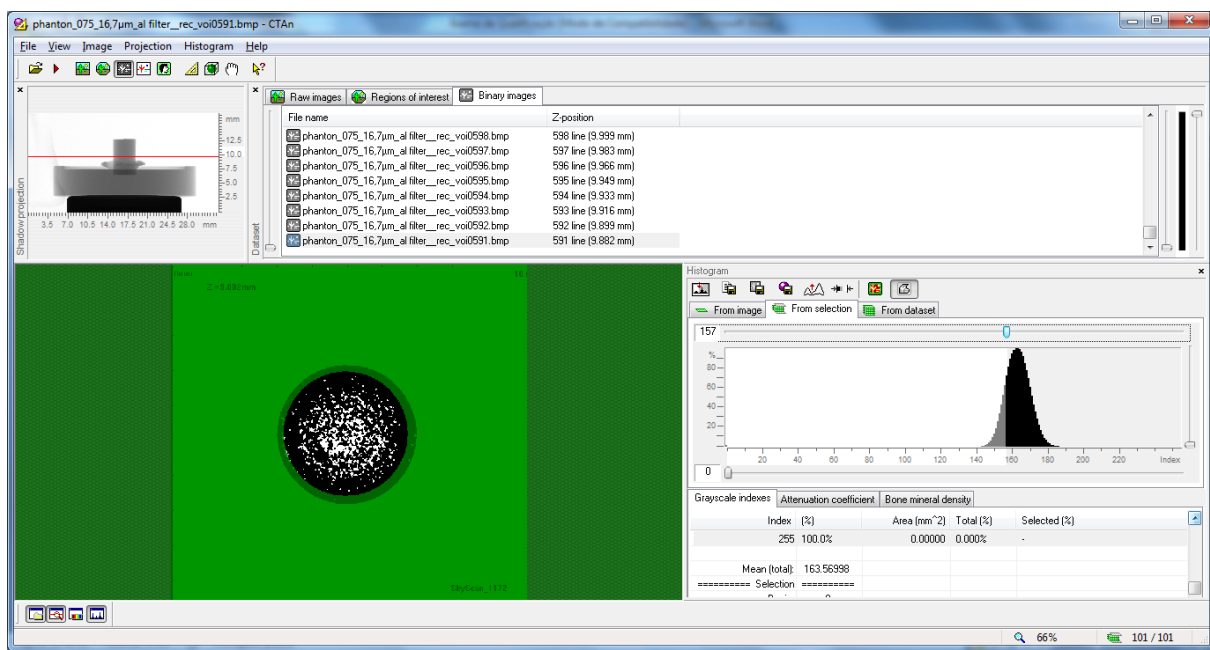


Figura 21 – Binarização dos tons de cinza para cálculo do valor médio do coeficiente de atenuação

g) Os procedimentos anteriores foram repetidos para o phantom de menor concentração. O valor médio do coeficiente de atenuação medido para este phantom foi  $0.01070 \text{ cm}^{-1}$ . A relação linear entre BMD e o coeficiente de atenuação resulta na equação de conversão de valores de coeficiente de atenuação para BMD (Equação 3) que é determinada utilizando-se as concentrações de hidroxiapatita ( $0,25$  e  $0,75 \text{ g/cm}^3$ ) e os respectivos valores médios dos coeficientes de atenuação ( $0.01070$  e  $0.02253 \text{ cm}^{-1}$ ) dos phantoms.

$$\text{BMD} = \frac{\text{Coeficiente de Atenuação} - 0.004785}{0.02366} \quad (\text{g/cm}^3) \quad (3)$$

A BMD de um calo ósseo é determinada através da Equação 3 desde que se conheça o seu coeficiente médio de atenuação que é medido utilizando-se as reconstruções microtomográficas dos fêmures esquerdos, conforme descrito a seguir.

➤ **Etapa 2:** Utilização da reconstrução microtomográfica do fêmur esquerdo para a segmentação do calo ósseo formado no reparo do defeito e medida dos parâmetros volume total (TV), volume de osso mineralizado (BV) e densidade mineral (BMD) do calo ósseo.

A avaliação do reparo do defeito ósseo nos fêmures por uCT foi realizada na Embrapa Instrumentação Agropecuária (São Carlos – SP) utilizando-se o microtomógrafo modelo 1172 (Skyscan, Bélgica). A avaliação foi realizada através dos softwares NRecon, Dataviewer, CT-Analyzer e CT-Vol fornecidos pelo fabricante do microtomógrafo. Os seguintes procedimentos foram utilizados para a segmentação e visualização do calo ósseo e medida dos parâmetros acima descritos:

a) Escaneamento microtomográfico dos fêmures excisados com os seguintes parâmetros: fonte de raio-X operando com 89KV e  $112 \mu\text{A}$ , filtro de alumínio de  $0,5\text{mm}$  de espessura, rotação de  $180^\circ$  com incremento angular de  $0,4^\circ$ , aquisição com câmara CCD de  $10\text{Mp}$  de 8 projeções radiográficas em cada rotação e resolução de  $4,7 \mu\text{m}$ .

b) Reconstrução microtomográfica dos fêmures pelo software NRecon utilizando-se algoritmo de Feldkamp (1984).

c) Visualização coronal, transversal e sagital das reconstruções microtomográficas dos fêmures através do software Dataviewer.

d) Seleção de uma VOI nos fêmures contendo o calo ósseo utilizando-se o software CT-Analyser. Foram selecionadas 100 secções transversais localizadas abaixo e acima da secção central do defeito ósseo adotando-se o critério de escolha de uma a cada quatro secções transversais. Este critério de escolha teve o objetivo de acelerar os processamentos computacionais realizados pelos softwares CT-Analyser e Dataviewer, pois foi utilizado um número menos de secções. A Figura 22 mostra uma secção central contendo o tecido de reparo do defeito ósseo no 14º dia pós-cirúrgico.

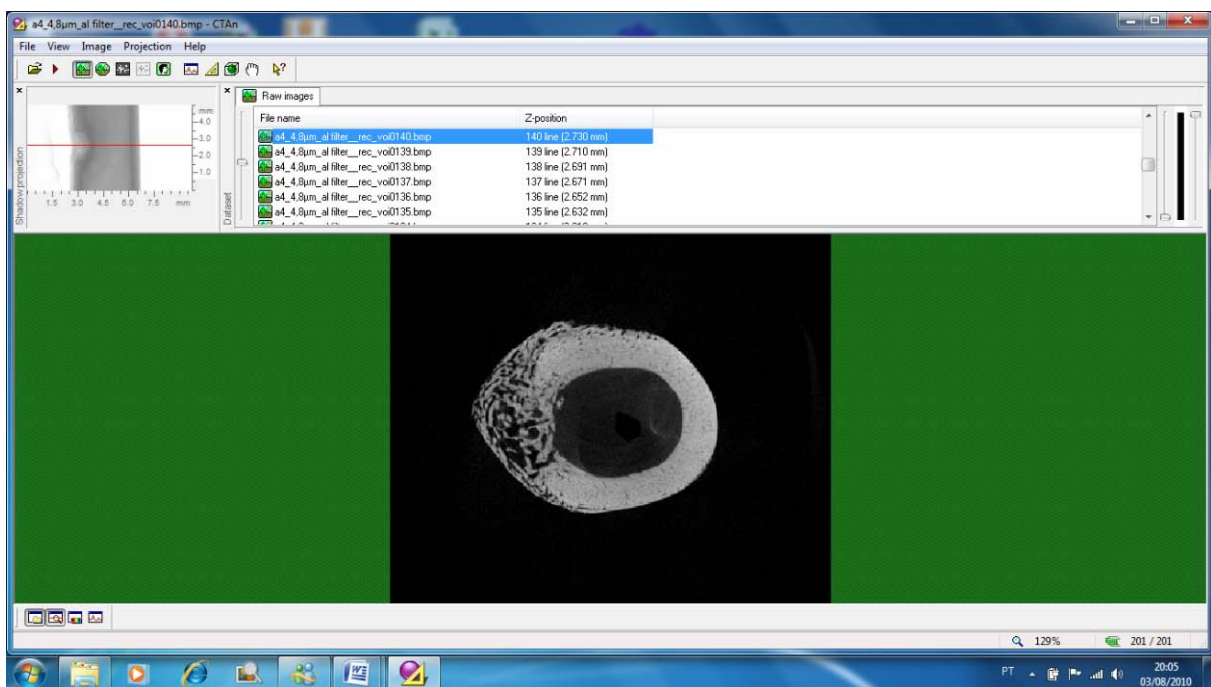


Figura 22 – Secção transversal contendo o tecido de reparo do defeito ósseo no 14º dia pós-cirúrgico

d) Escolha de uma ROI em cada secção transversal da VOI que contenha as fronteiras interna e externa do tecido ósseo. Salmon afirma que a ROI é utilizada por um procedimento de processamento de imagem denominado *shrink-wrap*, disponível no software CT-Analyser, para se detectar a presença de tecido ósseo em cada secção (SKYSCAN, 2009). A Figura 23 mostra uma secção transversal mais distal da VOI onde não se observa o reparo do defeito e a Figura 24 mostra a ROI utilizada para esta secção. Essa etapa deve ser repetida na secção transversal mais proximal da VOI. O software gera automaticamente uma ROI com as mesmas características das secções descritas em todas as secções da VOI. Na Figura 25 observa-se a ROI de uma secção onde há descontinuidade da cortical devido à presença do calo ósseo.



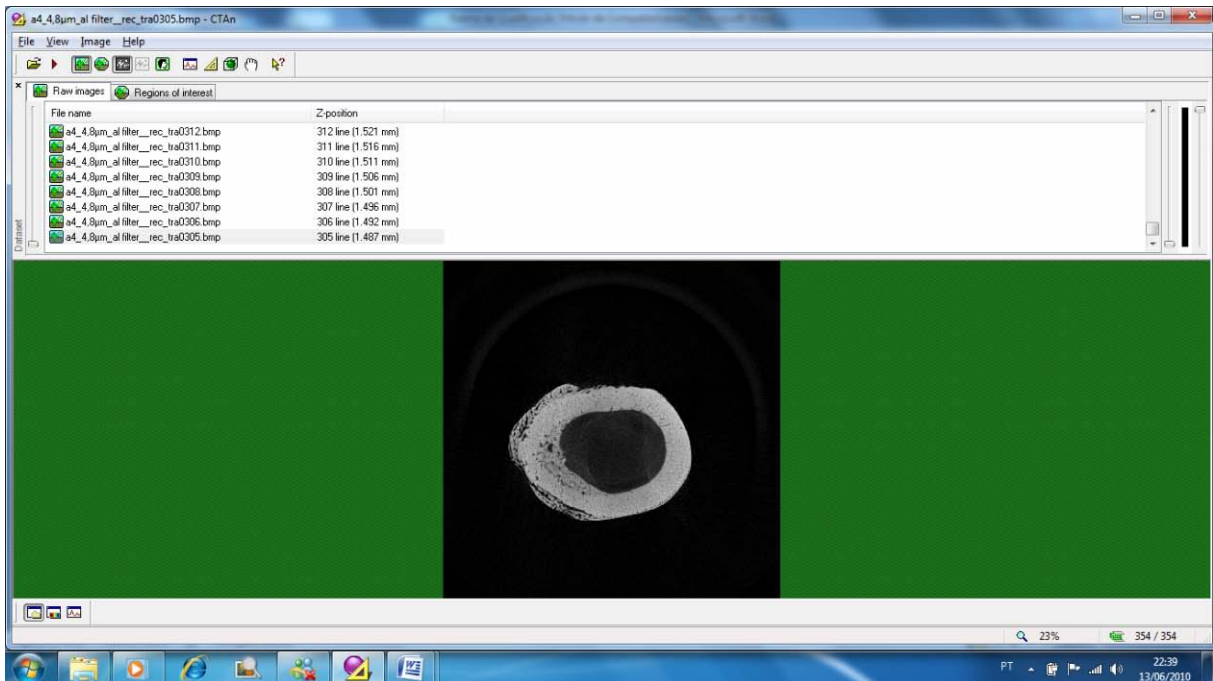


Figura 23 – Secção transversal mais distal da VOI

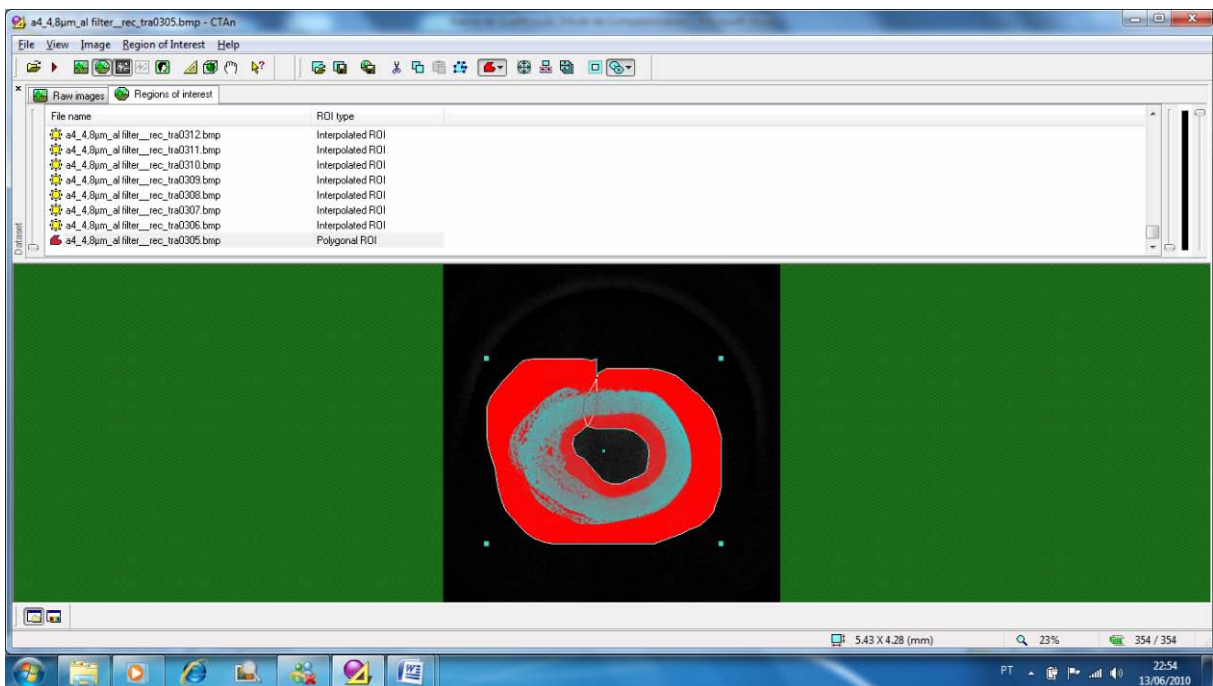


Figura 24 – ROI da secção transversal mais distal da VOI

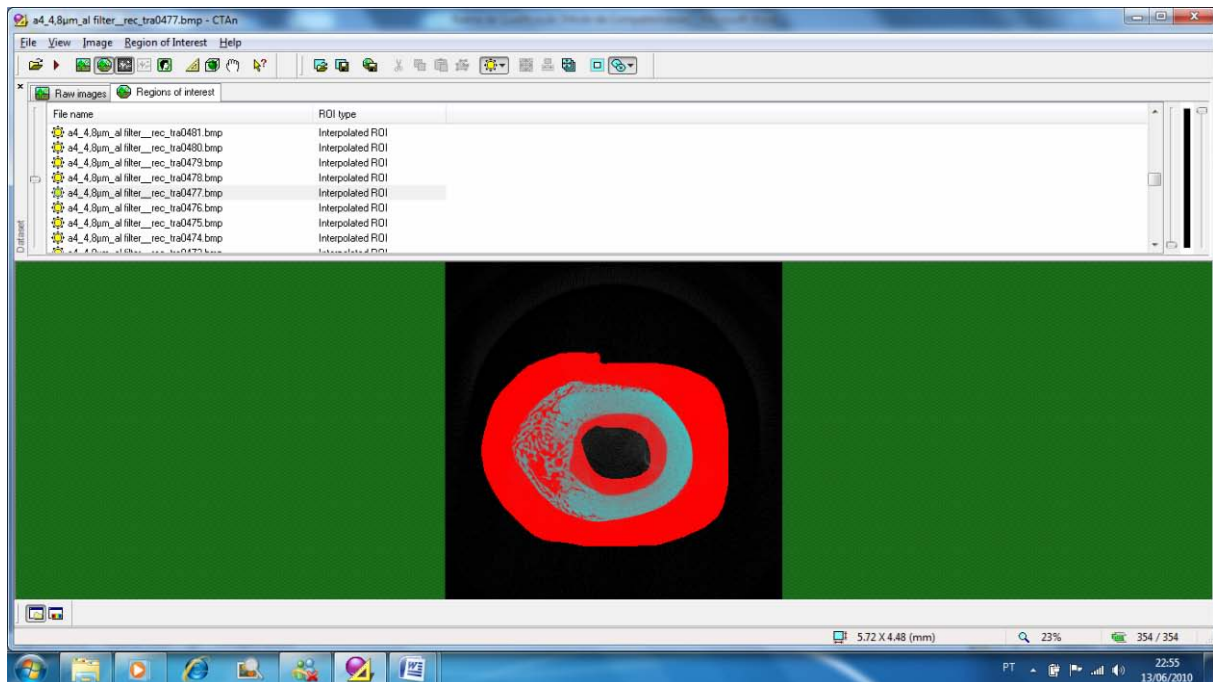


Figura 25 – ROI de uma secção transversal da VOI onde há presença do calo ósseo

e) Segmentação do tecido de reparo ósseo nas reconstruções microtomográficas de cada fêmur através do software CT-Analyser utilizando um algoritmo de processamento de imagem com os seguintes procedimentos:

- *Thresholding* para binarização das reconstruções microtomográficas.
- Delimitação da região de interesse contendo o tecido de reparo e o tecido adjacente.
- Segmentação do tecido de reparo do tecido adjacente com operações morfológicas de abertura e fechamento.

f) Medida dos parâmetros TV e BV do calo ósseo utilizando-se o *plug-in 3D Analysis* do software CT-Analyser.

g) Medida da BMD do calo ósseo utilizando-se o *plug-in Histogram* do software CT-Analyser. Esse *plug-in* calcula o valor médio do coeficiente de atenuação do calo ósseo e utiliza a Equação 3 para o cálculo da BMD.

h) Visualização 3D do calo ósseo e da região medial dos fêmures contendo o calo ósseo através do software CT-Vol.



### 3.4 Análise Estatística

A análise estatística foi efetuada com o software Microsoft Office Excel. O teste t de Student foi aplicado, presumindo-se variâncias diferentes com nível de significância  $p < 0,05$ , para análise dos valores médios dos parâmetros BV/TV e BMD dos grupos experimentais. A hipótese nula ( $H_0$ ), ou de não diferença entre as médias, é rejeitada se o módulo do valor de t é maior que t crítico.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Visualização das Reconstruções Microtomográficas

As reconstruções microtomográficas dos fêmures foram visualizadas por meio do software Dataviewer utilizando-se planos de visualização coronal, transversal e sagital. As Figuras 26 a 28 mostram as reconstruções microtomográficas de um fêmur dos grupos experimentais 1, 2 e 3, respectivamente, onde se observa o tecido de reparo ósseo no defeito no terço médio. A secção transversal em cada figura está localizada na região central do defeito ósseo.

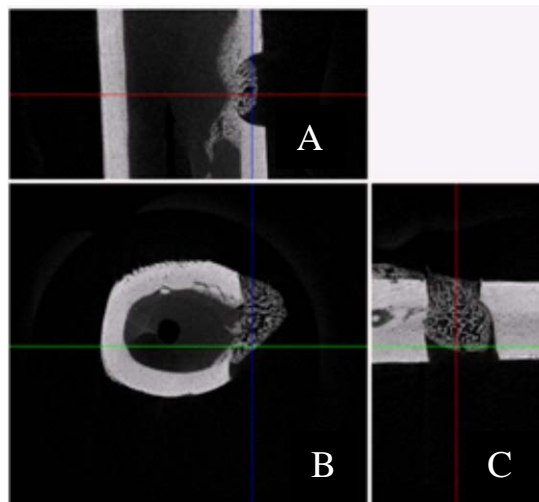


Figura 26 - Visualização coronal (A), transversal (B) e sagital (C) das reconstruções micromográficas de um fêmur (7º dia)

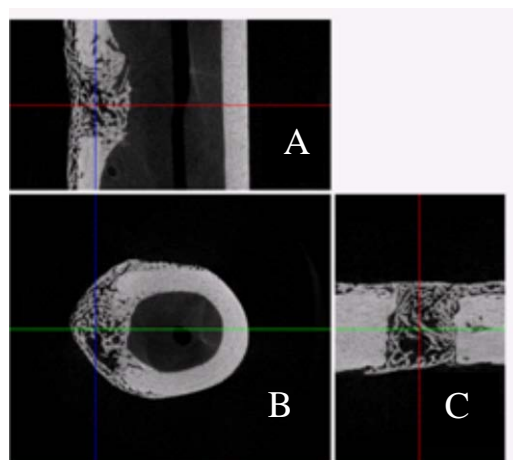


Figura 27 - Visualização coronal (A), transversal (B) e sagital (C) das reconstruções micromográficas de um fêmur (14º dia)

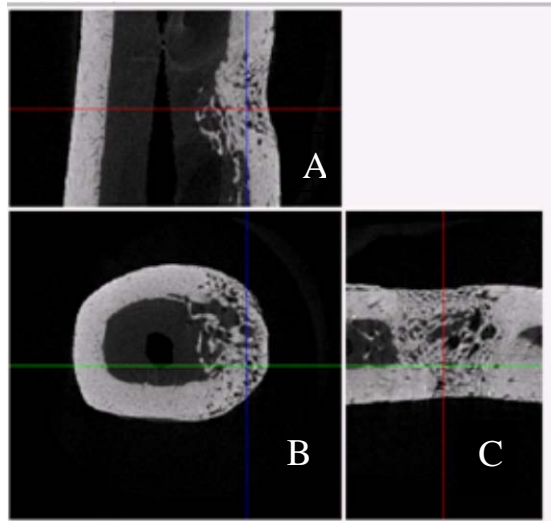


Figura 28 - Visualização coronal (A), transversal (B) e sagital (C) das reconstruções microtomográficas de um fêmur (21º dia)

#### 4.2 Segmentação do Calo Ósseo

As Figuras 29 a 34 exemplificam em uma reconstrução microtomográfica transversal de um fêmur, após 7 dias de reparo ósseo, o resultado dos procedimentos de *thresholding*, delimitação da região de interesse e segmentação do tecido de reparo do tecido adjacente.

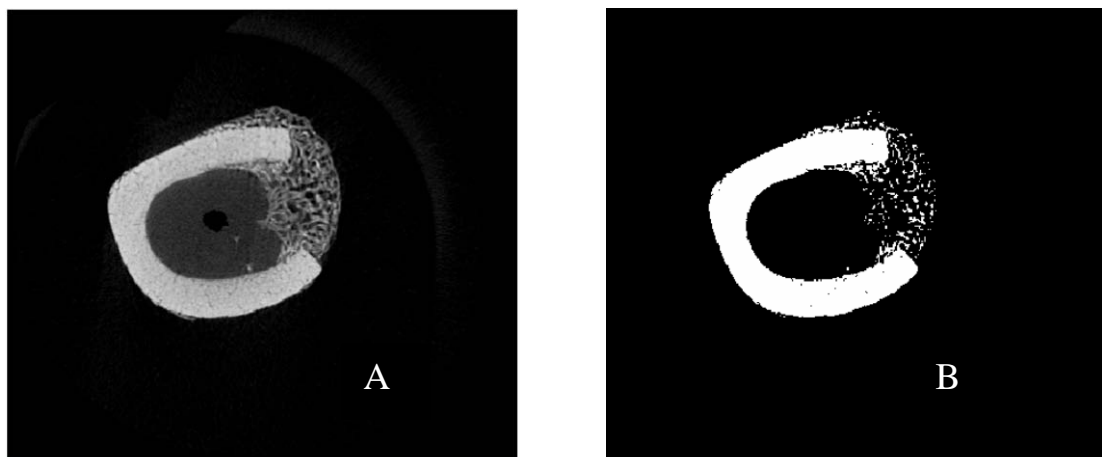


Figura 29 – Thresholding (B) de reconstrução microtomográfica transversal em tons de cinza (A)

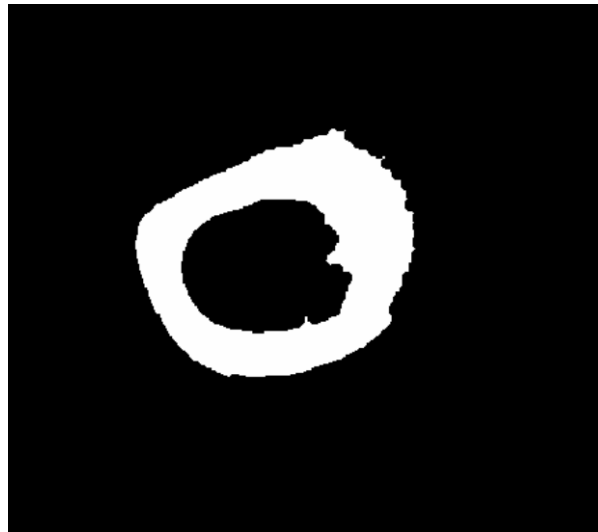


Figura 30 – Delimitação da região de interesse contendo tecido de reparo e o tecido adjacente



Figura 31 – Segmentação do tecido de reparo (B) do tecido adjacente (A)

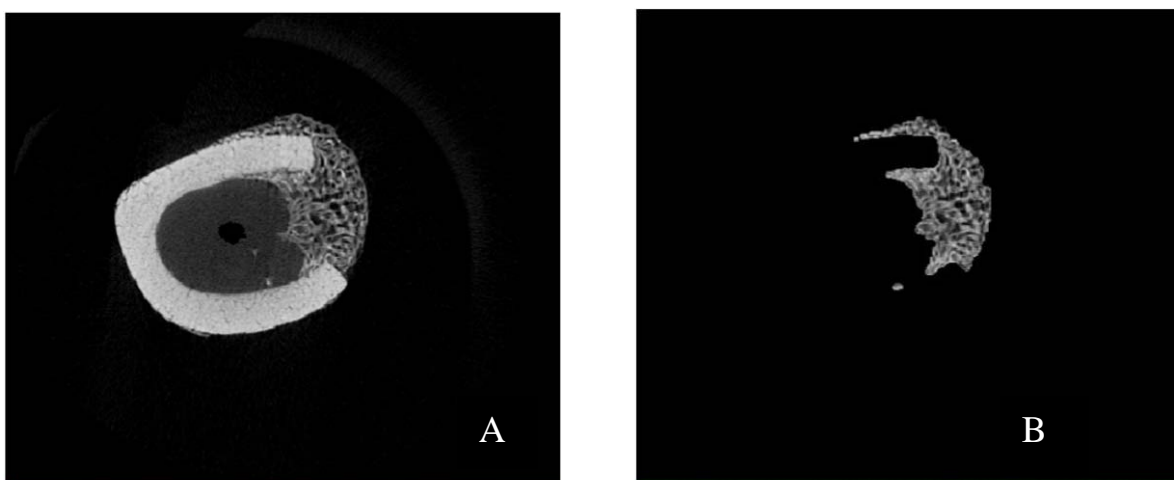


Figura 32 – Segmentação do tecido de reparo (B) na imagem em tons de cinza (A) da reconstrução microtomográfica transversal de um fêmur (dia 7)

As figuras 33 e 34 exemplificam a segmentação do tecido de reparo do defeito ósseo em reconstruções microtomográficas de fêmures nos dias 14 e 21, respectivamente.

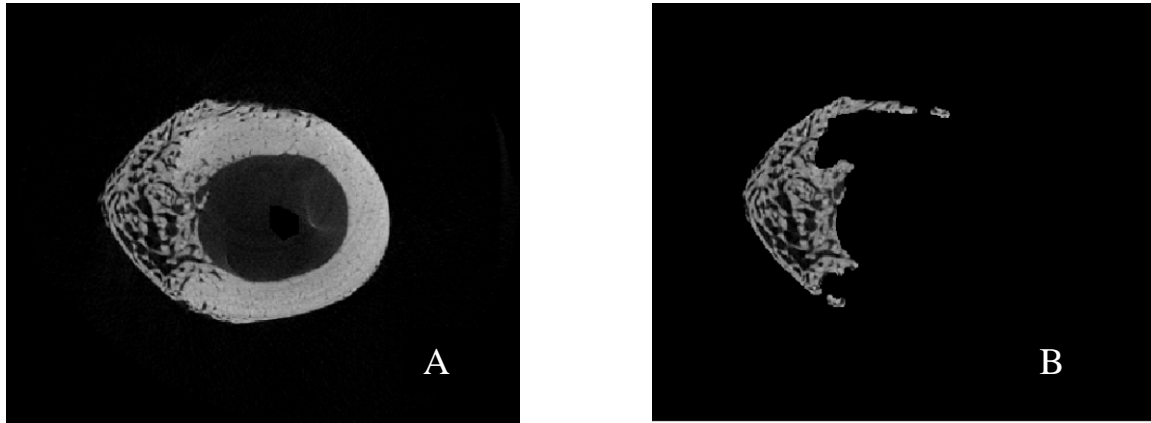


Figura 33 – Segmentação do tecido de reparo (B) na imagem em tons de cinza (A) da reconstrução microtomográfica transversal de um fêmur (dia 14)

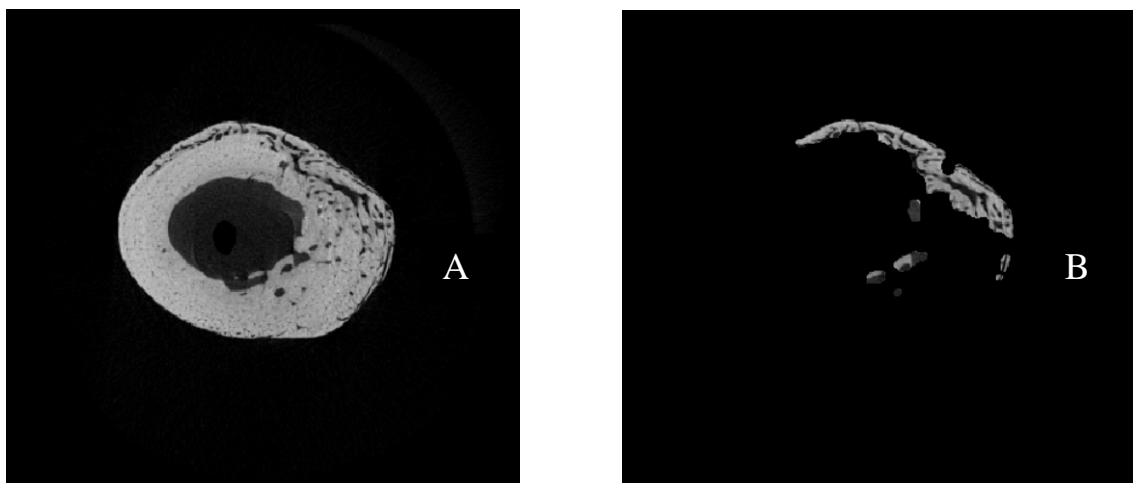


Figura 34 – Segmentação do tecido de reparo (B) na imagem em tons de cinza (A) da reconstrução microtomográfica transversal de um fêmur (dia 21)

### 4.3 Visualização 3D

A visualização 3D do tecido de reparo e da região medial do fêmur contendo o tecido de reparo está exemplificada nas figuras 35 e 36 para a mesma amostra da figura 32.

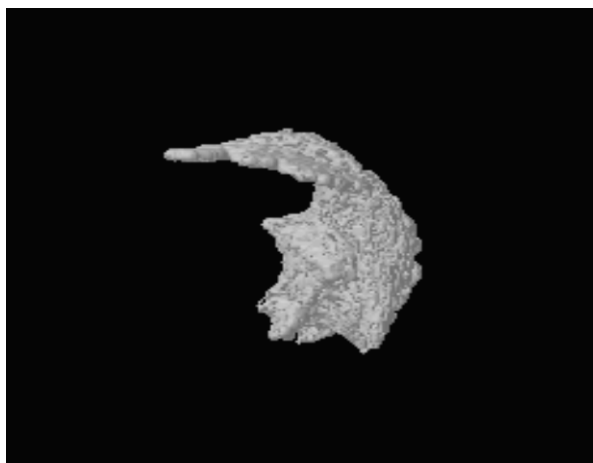


Figura 35 - Visualização 3D do tecido de reparo (14°)

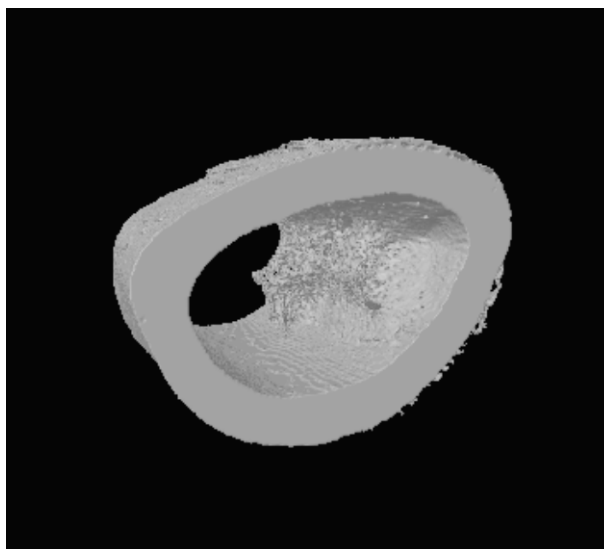


Figura 36 - Visualização 3D da região medial do fêmur contendo o tecido de reparo (14°)

#### 4.4 Quantificação do Calo Ósseo

Os valores dos parâmetros volume total do calo ósseo (TV), volume do calo ósseo mineralizado (BV) relação BV/TV e densidade mineral óssea volumétrica do calo ósseo (BMD) estão descritos nas Tabelas 1 a 3.

Tabela 1 – Parâmetros morfométricos do calo ósseo dos fêmures do grupo experimental 1

<b>GRUPO 1</b>				
<b>AMOSTRAS</b>	<b>TV (mm<sup>3</sup>)</b>	<b>BV (mm<sup>3</sup>)</b>	<b>BV/TV</b>	<b>BMD (g/cm<sup>3</sup>)</b>
1	4,87	2,30	0,47	0,32
2	4,85	2,13	0,44	0,35
3	3,25	1,20	0,37	0,44
4	3,40	1,61	0,47	0,42
5	3,84	2,10	0,55	0,45
6	0,96	0,52	0,54	0,45
7	5,05	1,21	0,24	0,22
8	6,85	3,09	0,45	0,37
<b>MÉDIA</b>	<b>4,13</b>	<b>1,77</b>	<b>0,44</b>	<b>0,38</b>

TV = volume total do calo ósseo, BV = volume do calo ósseo mineralizado,

BV/TV = volume do calo ósseo mineralizado/ volume total do calo ósseo,

BMD = densidade mineral óssea volumétrica do calo ósseo, mm<sup>3</sup> = milímetros cúbicos, g/cm<sup>3</sup> = gramas por centímetro cúbico

Tabela 2 – Parâmetros morfométricos do calo ósseo dos fêmures do grupo experimental 2

<b>GRUPO 2</b>				
<b>AMOSTRAS</b>	<b>TV (mm<sup>3</sup>)</b>	<b>BV (mm<sup>3</sup>)</b>	<b>BV/TV</b>	<b>BMD (g/cm<sup>3</sup>)</b>
1	6,35	3,55	0,56	0,61
2	5,07	2,86	0,56	0,70
3	4,11	2,46	0,60	0,63
4	5,81	3,77	0,65	0,66
5	5,33	3,02	0,57	0,60
6	5,03	3,16	0,63	0,67
7	1,93	1,24	0,64	0,65
8	4,11	2,37	0,58	0,63
9	3,23	1,86	0,58	0,64
<b>MÉDIA</b>	<b>4,55</b>	<b>2,70</b>	<b>0,60</b>	<b>0,64</b>

Tabela 3 – Parâmetros morfométricos do calo ósseo dos fêmures do grupo experimental 3

<b>GRUPO 3</b>				
<b>AMOSTRAS</b>	<b>TV (mm<sup>3</sup>)</b>	<b>BV (mm<sup>3</sup>)</b>	<b>BV/TV</b>	<b>BMD (g/cm<sup>3</sup>)</b>
1	0,54	0,38	0,70	0,69
2	2,58	1,73	0,67	0,68
3	4,07	2,47	0,61	0,67
4	2,36	1,44	0,61	0,64
5	1,46	0,90	0,62	0,67
6	1,84	1,23	0,67	0,66
7	2,04	1,14	0,56	0,64
8	5,55	3,25	0,59	0,61
9	3,88	2,69	0,69	0,75
<b>MÉDIA</b>	<b>2,70</b>	<b>1,69</b>	<b>0,63</b>	<b>0,67</b>

As figuras 37 a 39 mostram graficamente os valores da relação BV/TV nos grupos experimentais 1, 2 e 3, respectivamente, e a média desses valores em cada grupo.

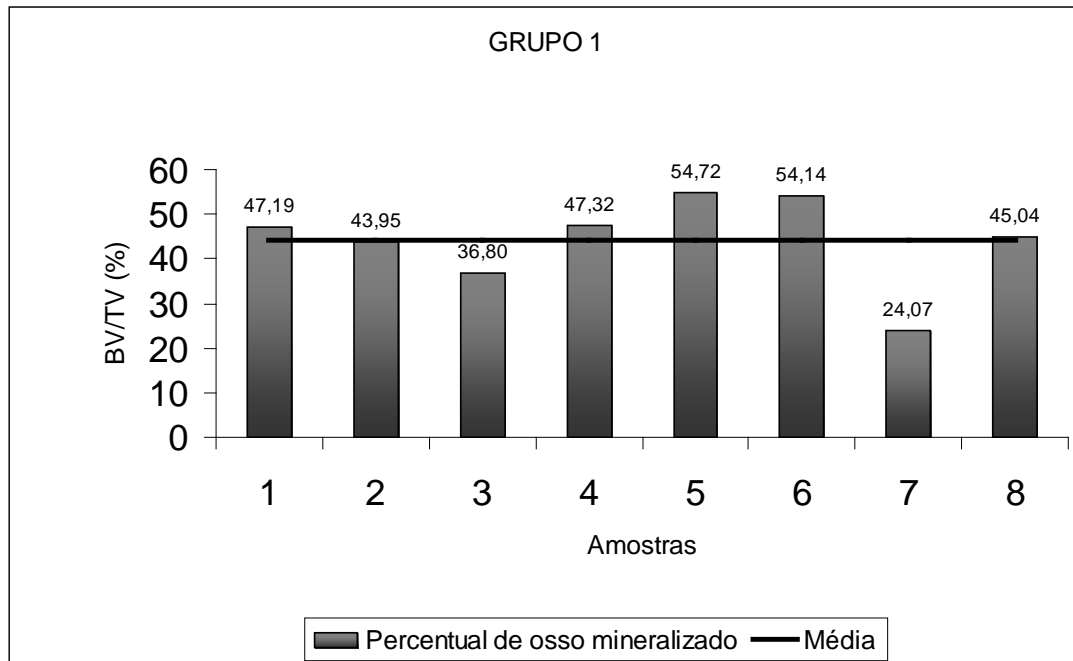


Figura 37 – Percentual de volume ósseo mineralizado no calo ósseo das amostras do grupo 1

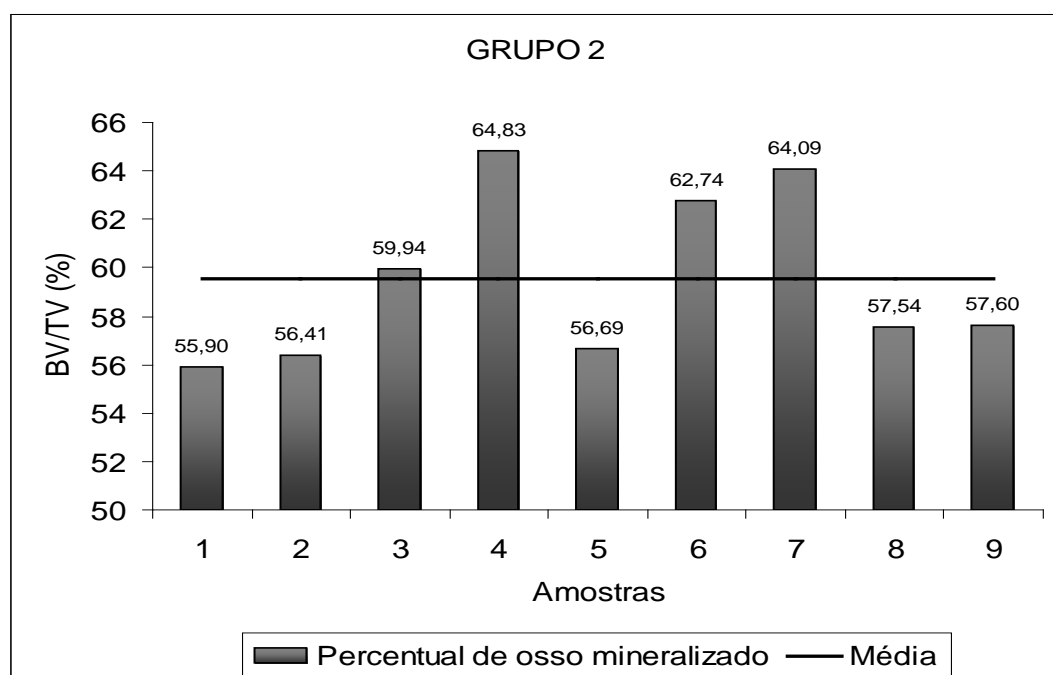


Figura 38 – Percentual de volume ósseo mineralizado no calo ósseo das amostras do grupo 2



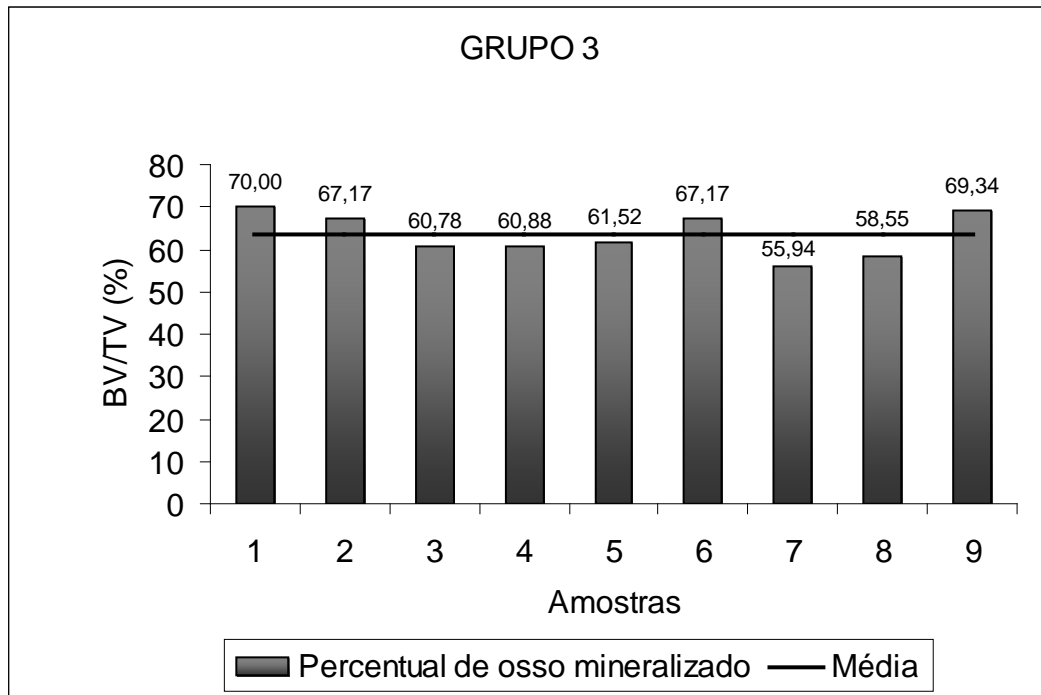


Figura 39 – Percentual de volume ósseo mineralizado no calo ósseo das amostras do grupo 3

As figuras 40 a 42 mostram graficamente os valores da densidade mineral volumétrica do calo ósseo nos grupos 1, 2 e 3, respectivamente, e a média desses valores em cada grupo.

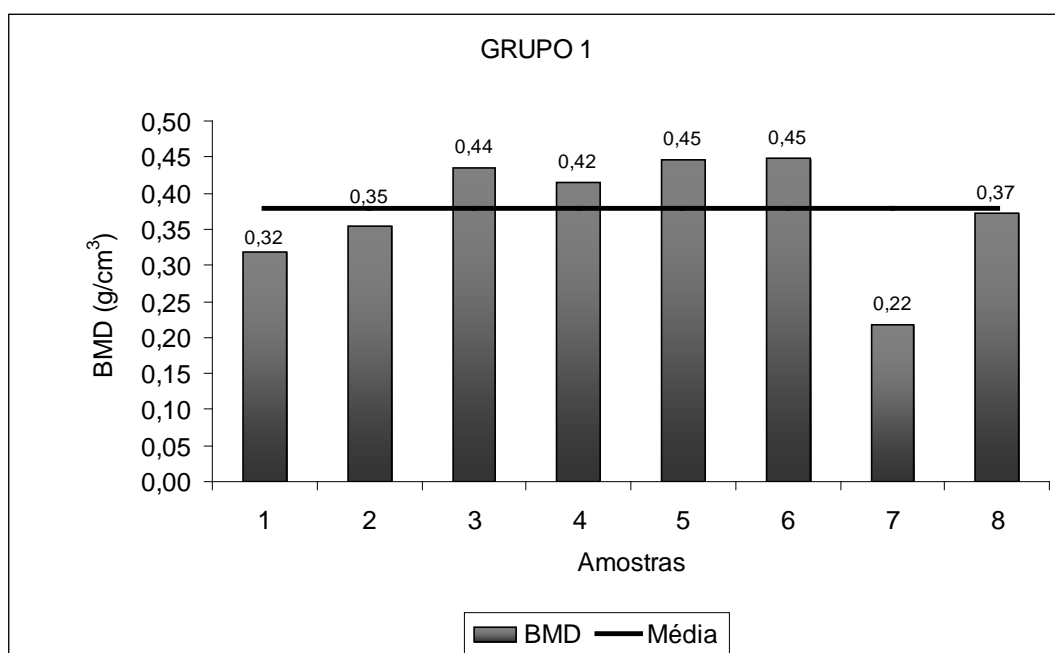


Figura 40 – Densidade mineral volumétrica do calo ósseo das amostras do grupo 1

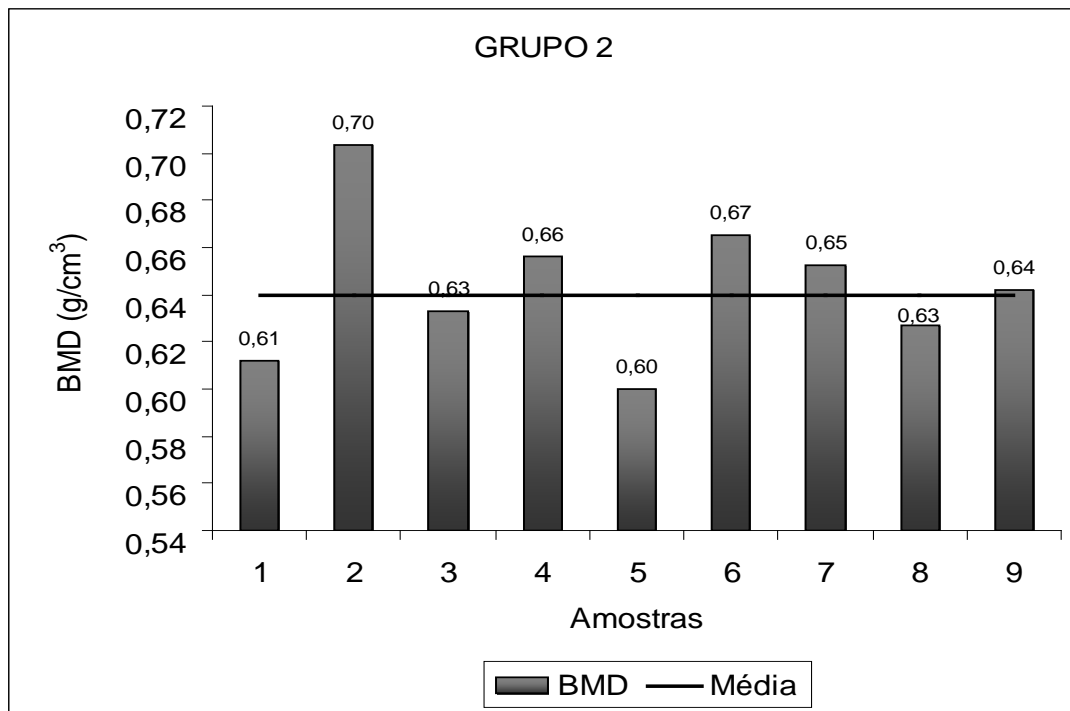


Figura 41 – Densidade mineral volumétrica do calo ósseo das amostras do grupo 2

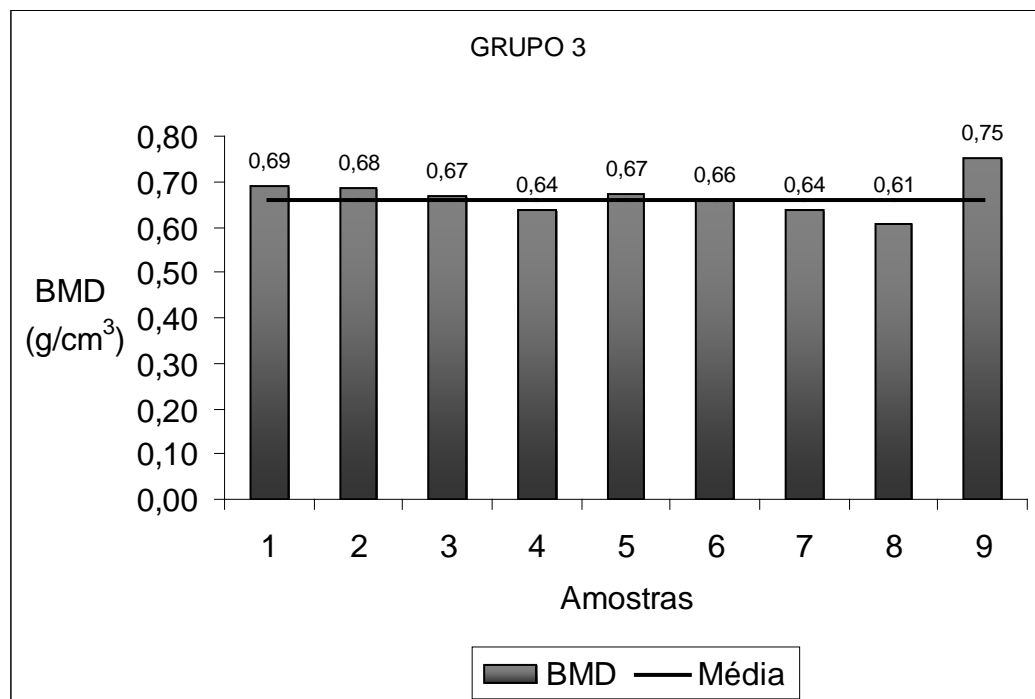


Figura 42 – Densidade mineral volumétrica do calo ósseo das amostras do grupo 3

O valor percentual médio dos parâmetros BV/TV e BMD dos três grupos experimentais é mostrado nas figuras 43 e 44, respectivamente.

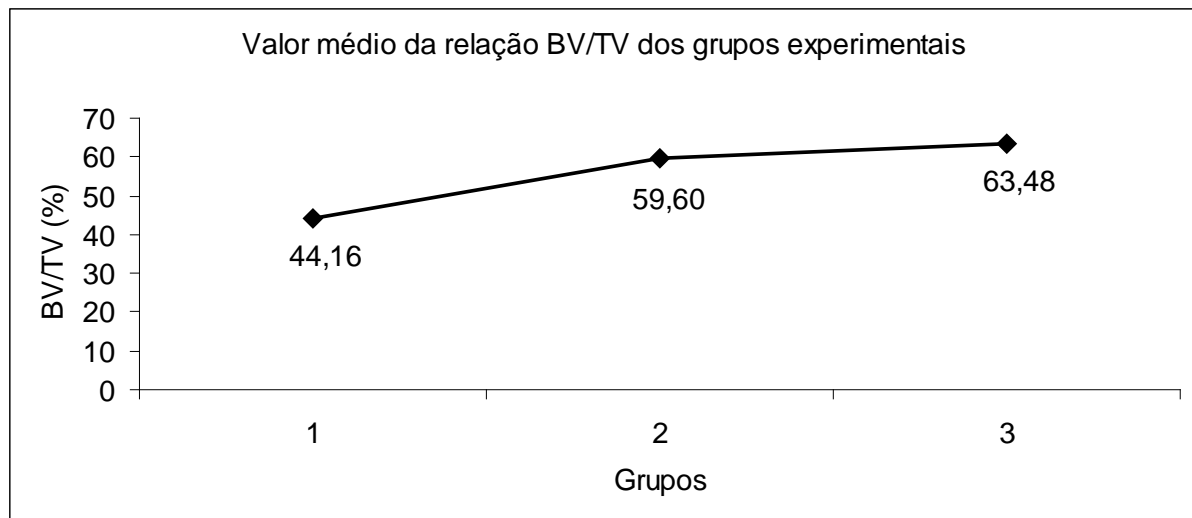


Figura 43 – Valor médio da relação BV/TV dos grupos experimentais

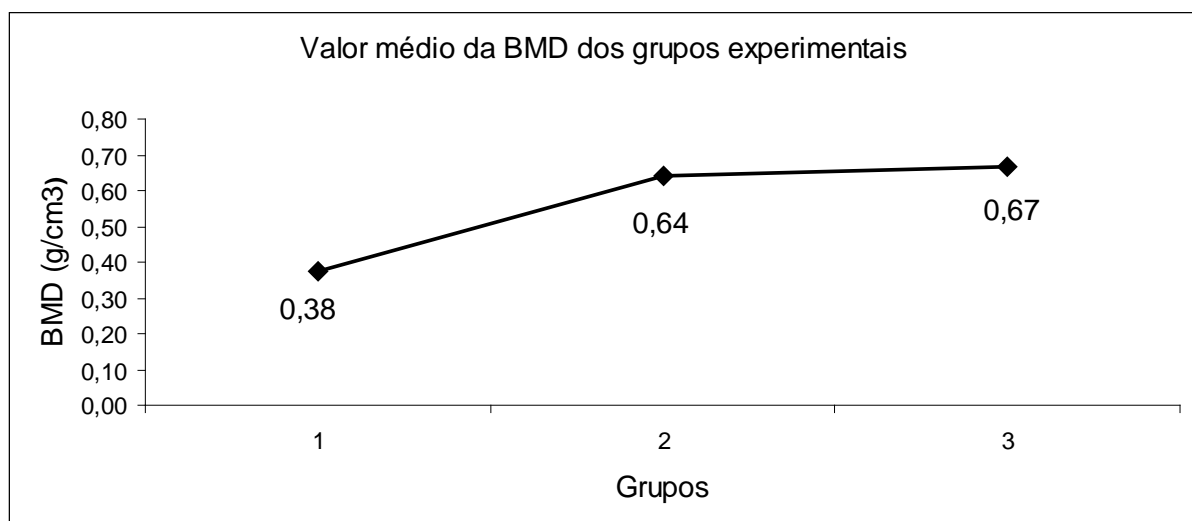


Figura 44 – Valor médio da densidade mineral óssea volumétrica dos grupos experimentais

As Tabelas 4 e 5 demonstram os valores de  $t$ ,  $t$  crítico e  $p$ , que resultaram da aplicação do teste  $t$  de student na comparação das médias da relação BV/TV e da BMD entre os grupos de forma pareada.

Tabela 4 – Relação BV/TV no calo ósseo

Grupos	$t$	$t$ crítico	$p$ value
G1 X G2	-4,1583333	2,262157	0,002454
G2 X G3	-1,934381	2,2144787	0,0735638

G1 = Grupo 1, G2 = Grupo 2, G3 = Grupo 3

BV = volume de osso mineralizado, TV = volume total

Tabela 5 – BMD no calo ósseo

<i>Grupos</i>	<i>t</i>	<i>t crítico</i>	<i>p value</i>
G1 X G2	-9,134807	2,262157	0,00000756
G2 X G3	-1,409466	2,13145	0,179092

G1 = Grupo 1, G2 = Grupo 2, G3 = Grupo 3

BMD = densidade mineral óssea

## 5 DISCUSSÃO

Na análise visual da segmentação do tecido de reparo relativa aos dias 7, 14 e 21 (Figuras 32, 33 e 34) observa-se uma perda de pixels. O tecido de reparo é facilmente identificável nas reconstruções microtomográficas relativas aos dias 7 e 14.

Os valores médios das análises morfométricas descritos nas Tabelas 1, 2 e 3 e nas figuras 43 e 44 mostram que nos grupos experimentais houve uma variação crescente dos parâmetros BV/TV e densidade mineral óssea volumétrica (BMD) do grupo 2 em relação ao grupo 1 e do valor percentual do grupo 3 em relação ao do Grupo 2.

Analisando-se os resultados estatísticos descritos na Tabela 4 observa-se que para os grupos 1 e 2 há diferença entre as médias dos valores BV/TV e que essa diferença apresenta significância estatística ( $|t| > t$  crítico e  $p < 0,05$ ). Para os grupos 2 e 3 não há diferença estatística ( $|t| < t$  crítico e  $p > 0,05$ ).

Analisando-se os resultados estatísticos descritos na Tabela 5 observa-se que para os grupos 1 e 2 há diferença entre as médias dos valores da BMD e que essa diferença apresenta significância estatística ( $|t| > t$  crítico e  $p < 0,05$ ). Para os grupos 2 e 3 não há diferença estatística ( $|t| > t$  crítico e  $p > 0,05$ ).

A densidade mineral volumétrica do calo avaliada por meio de microtomografia 3D é uma medida grau de mineralização do reparo ósseo.

Einhorn (2005) caracterizou a sequência de eventos que ocorrem no processo de reparo ósseo por meio de um modelo experimental onde foi realizada fratura transfemoral fechada em ratos. Ele estudou o reparo ósseo endocondral demonstrando que nesse processo fisiológico há um aumento do tecido neoformado a partir do primeiro dia pós-cirúrgico que se mantém até o décimo quarto dia e posteriormente diminui.

Boer e colaboradores (1998), em um estudo com cabras onde foi realizada osteotomia fechada completa verificaram que, após duas semanas, o volume do calo alcançou seu tamanho máximo e, em seguida, sofreu diminuição. A densidade mineral do calo aumentou ao longo do tempo.

O resultado de Boer foi confirmado nessa investigação ao se observar as Tabelas 1 a 3 onde está demonstrado o aumento e posterior diminuição da média do volume total do calo ósseo (TV), o aumento da média da relação volume de osso mineralizado e volume total do

calo ósseo (BV/TV) e o aumento da densidade mineral óssea volumétrica (BMD) nos três grupos.

A quantificação do calo ósseo apresentou variação na significância estatística entre as médias dos parâmetros BV/TV e BMD ao se comparar os grupos 1, 2 e 3. Essa variação é esperada porque as amostras pertencentes ao grupo 1 são de animais sacrificados no sétimo dia pós-cirúrgico. Nessa fase, de acordo com Einhorn (2005), já se formou uma matriz cartilaginosa, porém, ainda sem calcificação. Para Claes e Ito (2005) esse volume de tecido neoformado é chamado calo mole. Na figura 32 observa-se claramente esse tecido neoformado.

As amostras do grupo 2 são de animais sacrificados no décimo quarto dia pós-cirúrgico onde há a reparação óssea com intensa reorganização celular e a formação de novo arcabouço ósseo (EINHORN, 2005). Essa fase é denominada de calo duro por Claes e Ito (2005). Na imagem de uma amostra desse grupo (Figura 33) observa-se um volume de tecido neoformado similar ao da amostra do Grupo 1 (Figura 32).

Os diversos estudos encontrados na literatura são de caráter experimental e não foram encontrados relatos da aplicação clínica da técnica de microtomografia computadorizada por raios-X.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nessa investigação são promissores e mostram que a técnica de microtomografia pode dar importantes contribuições na avaliação do reparo ósseo em investigações de novas tecnologias de tratamento de fraturas através de experimento animal.

A quantificação de parâmetros sobre a evolução do processo de reparo ósseo em osteotomia experimental obtidos por meio de microtomografia é coerente com os dados encontrados na literatura sobre a fisiologia desse processo.

O algoritmo de processamento de imagem utilizado nessa investigação envolve procedimentos de *thresholding*, delimitação da região de interesse e segmentação do calo ósseo do tecido adjacente que precisam ser aprimorados para se obter um melhor resultado de segmentação do calo ósseo na região de interesse. Esse aprimoramento é inerente ao processo em andamento de formação de pesquisadores brasileiros no uso da técnica de microtomografia e de softwares a ela associada para a caracterização do reparo ósseo em fraturas.

## REFERÊNCIAS

- AUGAT, P.; RYABY, J. T. Fracture healing and micro architecture. **Advances in Experimental and Medicine and Biology**, v.496, p.99-109, 2001.
- BAKKER, N.; GERRITS, H.; GOSSN, J. **Validation of new potential drugs targets for osteoporosis and fracture repair by in vivo  $\mu$ CT**. In: Proceedings of Skyscan User Meeting, 15-17 June, Belgium, 2008.
- BELLEVILLE, C., CECCOTTI, M.C., FEVEN, J. **High resolution tomodensitometry of bone fracture healing in mouse**. In: Proceedings of SkyScan User Meeting, 15-17 June, Belgium, 2008.
- BOER, F.C. den, BRAMER, J.A.M., PATKA, P., BAKKER, F.C., BARENTSEN, R.H., FEILZER, A.J., LANGE, E.S.M. de, HAARMAN, H.J.T.M. Quantification of fracture healing with three-dimensional computed tomography. **Archives of Orthopaedic Trauma Surgery**, v.117, p.345-350, 2008.
- BURGER, E.H., KLEIN-NULEND, J., VAN DER PLAS, A., NIJWEIDE, P.J. Function of osteocytes in bone: their role in mechanotransduction. **Journal of Nutrition**, v.125, supl.7, p.2020S-2023S, 1995.
- CLAES, L.E., ITO, K. (2005). Biomechanics of fracture fixation and fracture healing. In: Mow, V.C., Huijskes, R., eds. **Basic orthopaedic biomechanics and mechano-biology**. 3.ed. Philadelphia: Lippincott, 2005.
- EINHORN, T.A. The science of fracture healing. **Journal of Orthopaedic Trauma**, v.19, n.10 Suppl., p.S4-S6, nov/dez, 2005.
- FELDKAMP, L.A., DAVIS, L.C., KRESS, J.W. Practical cone-beam algorithm. **Journal of Acoustical Society**, v.1, n.6, p. 612-619, 1984.
- FELDKAMP, L.A., GODSTEIN, S.A., PARFITT, A.M., JESION, G., KLEEREKOPER, M. The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.4, n.1, p.3 – 11, 1989.
- FREEMAN, T.A., PATEL, P., PARVIZI, J., ANTOCI JR., V., SHAPIRO, I.M. Micro-CT analysis with multiple thresholds allows detection of bone formation and resorption during



ultrasound-treated fracture healing. **Journal of Orthopaedic Research**, v.27, n.5, p.673-9, may, 2009.

HUISKES, R., RIETBERGEN B. van. Biomechanics of bone. *In*: Mow, V.C., Huiskes, R., eds. **Basic orthopaedic biomechanics and mechano-biology**. 3.ed. Philadelphia: Lippincott, 2005.

JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KERCHKHOFF, G. et al. **Validation of uCT as an imaging tool for the quantification of bone formation in and around explanted bone tissue engineering scaffolds**. SkyScan User Meetings, Belgium, 2008.

KINNEY, J.H.; NICHOLS, N.C. X-ray tomographic microscopy using synchrotron radiation. **Annual Review of Materials Science**, v.22, p.121-152, 1992.

KINNEY, J.H., STÖLKEN, J.S., SMITH, T.S., RYABY, J.T., LANE, N.E. An orientation distribution function for trabecular bone. **Bone**, v.36, n.2, p. 193-201, Feb, 2005.

KRISTIANSEN, T.K. et al. Accelerated healing of distal radial fractures with the use of specific, low-intensity ultrasound. A multicenter, prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study. **American Journal of Bone and Joint Surgery**, v.79, n.7, p.961-73, 1997.

LIRANI, A.P.R. **Estudo comparativo dos efeitos do ultra-som e do laser de baixa intensidade no reparo ósseo de tíbia de ratos**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia – USP (Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos). São Carlos, 2004, 94p.

MORGAN, E.F., MASON, Z.D., CHIEN, K.B., PFEIFFER, A.J., BARNES, G.L., EINHORN, T.A., GERSTENFELD, L.C. Micro-computed tomography assessment of fracture healing: relationships among callus structure, composition, and mechanical function. **Bone**, v.44, n.2, p.335-44, Oct., 2009.

NYMAN, J.S., MUNOZ, S., JADHAV, S., MANSOUR, A., YOSHII, T., MUNDI G.R., GUTIERREZ, G.E. Quantitative measures of femoral fracture repair in rats derived by micro-computed tomography. **Journal of Biomechanics**, v.42, p.891-7, 2009.

RIEGGER, C.L. Propriedades mecânicas do osso. *In*: Gould III, J.A, ed. **Fisioterapia na ortopedia e na medicina do esporte**. 2.ed. São Paulo: Manole, 1993

SFEIR, C., HO, L., DOLL, B.A., AZARI, K., HOLLINGER, J.O. Fracture repair. *In*: Lieberman, J.R., Friedlaender, G.E., eds. **Bone regeneration and repair: biology and clinical applications**. Totowa: Humana, 2005.

SILVA, A.M.H. da. Análise morfométrica 2D e 3D de amostras de osso trabecular utilizando microtomografia tridimensional por Raio-X. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia – USP (Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos). São Carlos, 2009, 77p.

SKYSCAN (2010). BMD calibration from attenuation coefficient. Disponível na Internet: <https://rcpt.yousendit.com/802028452/c6a564d80385b9751baab3f815f4b5ed>><https://rcpt.yousendit.com/802028452/c6a564d80385b9751baab3f815f4b5ed>. Acesso em fevereiro, 2010.

SKYSCAN. Morfometric parameters in CT-Analyser. *In*: Skyscan. **The user's guide**. Aartselaar, Bélgica, 2009.

VELLOSO, G.R. Fraturas: origem e tratamentos. **Universitas**: ciências da saúde, Brasília, v.3, n.2, p.297-301, jul/dez., 2005.

## **ANEXOS**

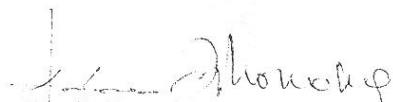


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
Comissão de Ética em Experimentação Animal  
Via Washington Luis, km. 235 - Caixa Postal 676  
Fones: (016) 3351.8109 / 3351.8110  
Fax: (016) 3361.3176  
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil  
[propp@power.ufscar.br](mailto:propp@power.ufscar.br) - [www.propp.ufscar.br](http://www.propp.ufscar.br)

Protocolo CEEA nº 065/2009

Aprovo *ad referendum* da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – CEEA/UFSCar, o projeto de pesquisa “Correlação entre Volume e Densidade Mineral do Calo Ósseo em Fraturas Experimentais Medida por Microtomografia 3D por Raio-X”, elaborado Márcia Regina Milanetti, José Marcos Alves e Nelson Ferreira da Silva Júnior.

São Carlos, 28 de janeiro de 2010.

  
Prof. Dra. Keico Okino Nonaka

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal.