



AVALIAÇÃO E MONITORIZAÇÃO DA QUALIDADE ÓSSEA POR MEIO DE
PARÂMETROS DE RETROESPALHAMENTO E REFLEXÃO DE ULTRASSOM
QUANTITATIVO EM MODELO ANIMAL

Aldo José Fontes Pereira

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica.

Orientadores: Wagner Coelho de Albuquerque
Pereira
Marco Antônio von Krüger

Rio de Janeiro

Junho de 2016

AVALIAÇÃO E MONITORIZAÇÃO DA QUALIDADE ÓSSEA POR MEIO DE
PARÂMETROS DE RETROESPALHAMENTO E REFLEXÃO DE ULTRASSOM
QUANTITATIVO EM MODELO ANIMAL

Aldo José Fontes Pereira

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ
COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA BIOMÉDICA.

Examinada por:

Prof. Wagner Coelho de Albuquerque Pereira, D.Sc.

Prof. Marco Antônio von Krüger, Ph.D.

Prof. Dr. Roberto Macoto Ichinose, D.Sc.

Prof. Sergio Augusto Lopes de Souza, D.Sc.

Profa. Mônica Calixto de Andrade, D.Sc.

Prof. Rodrigo Pereira Barretto Costa-Félix, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

JUNHO DE 2016

Pereira, Aldo José Fontes

Avaliação e monitorização da qualidade óssea por meio de parâmetros de retroespalhamento e reflexão de ultrassom quantitativo em modelo animal / Aldo José Fontes Pereira. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2016.

XVI, 70 p.: il.; 29,7 cm.

Orientador: Wagner Coelho de Albuquerque Pereira

Marco Antônio von Krüger

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Biomédica, 2016.

Referências Bibliográficas: p.43-52.

1. Ultrassom Quantitativo. 2. Osso. 3. Modelo animal.
I. Pereira, Wagner Coelho de Albuquerque *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Biomédica. III. Título.

“E a terra era sem forma e vazia; e havia trevas sobre a face do abismo; e o Espírito de
Deus se movia sobre a face das águas”
Gênesis 1:2

DEDICATÓRIA

A meus pais.

A toda a minha família.

A todos os meus amigos.

A todos os meus professores que tive ao longo da minha caminhada acadêmica.

A todos os fisioterapeutas.

A todos os brasileiros.

A todos de Belém do Pará.

A você que se encontra lendo esta tese.

AGRADECIMENTOS

A Deus. Muito obrigado Senhor por todas as coisas que me permitiste viver. Sou o seu servo. “Até aqui nos ajudou o Senhor.” (1 Samuel 7:12)

A minha mãe Maria Auxiliadora Fontes Pereira e ao meu pai Décio Nabiça Pereira (*in memoriam*). Eu amo vocês! Sou eternamente agradecido por tudo que vocês fizeram por mim. Vocês também são os responsáveis por todas as minhas conquistas. Mãe, obrigado todas as horas de estudos juntos, “macetes”, cuidados e conversas. Pai, hoje eu entendo melhor as coisas que o senhor queria me ensinar e o seu incentivo em me fazer criar remédios para as lesões que o senhor provocou em si mesmo, criou um filho cientista... rrsrs.

Aos meus irmãos e a toda a minha família por todo apoio oferecido.

As professoras da “Escolinha da vovó filó”, em especial a professora Rosana; professores do Núcleo Pedagógico Integrado (NPI), em especial a professora Socorro Pastana; aos professores do Sistema de ensino Universo, em especial aos professores Robson Gurjão, Jurueno Sampaio e Paulo Ornela; aos professores da Universidade do Estado do Pará, em especial aos professores Renato Teixeira e Cléa Bichara; aos professores do Programa de Engenharia Biomédica.

Aos meus orientadores Marco Antônio von Krüger e Wagner Coelho de Albuquerque Pereira sou eternamente agradecido a toda paciência que tiveram comigo, aos valiosos conhecimentos oferecidos, por todos os momentos de brincadeiras. Tudo isso foi apenas o começo...

A Gisely de Andrade Costa por toda paciência, conselhos e ajuda no desenrolar desta tese de doutorado.

Aos meus colegas de turma do mestrado de Engenharia Biomédica – UFRJ/2010.

A todos que foram, que são e que serão do Laboratório de Ultrassom (LUS) da UFRJ, somos uma grande família! Em especial, a equipe do “Ultrosso” (Daniel Matusin e Paulo Rosa), muito obrigado por todos os conhecimentos oferecidos e todos os momentos de brincadeira.

Ao Departamento de Zoologia da UFRJ, na figura da Professora Leila Maria Pessoa.

Ao Departamento de Radiologia da UFRJ, na figura do Professor Sergio Sousa e Thiago Barbosa.

Ao Laboratório Fronteiras em Neurociências/Instituto de Ciências Biomédicas - UFRJ, na figura do professor Jean Christophe Houzel e Mariana Acquarone.

Ao Laboratório de Desenvolvimento Analítico - LaDA, Departamento de Química Analítica (DQA) do Instituto de Química - UFRJ., na figura do professor Ricardo Santeli e Aline

Ao Laboratório de Cirurgia experimental - UEPA, na figura do professor Rui Barros e Renan Teixeira.

A Lílian Danielle Paiva Magno, minha eterna amiga. Muito obrigado por toda ajuda nesta caminhada.

A todos da minha linda cidade morena, Belém do Pará.

Ao Alexandre por toda disposição e paciência em resolver todas as minhas solicitações. Você é um profissional excelente.

À UFRJ pela formação humana, cidadã e técnica.

Às agências CAPES, CNPq e FAPERJ, pelo apoio financeiro.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

AVALIAÇÃO E MONITORIZAÇÃO DA QUALIDADE ÓSSEA POR MEIO DE
PARÂMETROS DE RETROESPALHAMENTO E REFLEXÃO DE ULTRASSOM
QUANTITATIVO EM MODELO ANIMAL

Aldo José Fontes Pereira

Junho/2016

Orientadores: Wagner Coelho de Albuquerque Pereira

Marco Antônio von Krüger

Programa: Engenharia Biomédica

Parâmetros quantitativos de ultrassom (QUS) de pulso-eco e um protocolo simples de monitorização da condição óssea foram propostos caracterizar a diáfise femoral de ratos Wistar *in vitro*. Quatro parâmetros quantitativos: *Integrated Reflection Coefficient* (IRC), *frequency Slope of Integrated Reflection* (FSIR), *apparent integrated backscatter* (AIB) e *frequency slope of apparent backscatter* (FSAB) foram adquiridos a partir de oito fêmures de ratos Wistar *in vitro* com diferentes graus de desmineralização por EDTA e, também, a partir de 30 amostras de diáfise do fêmur de ratos Wistar com osteoporose. No estudo por EDTA foi encontrada boa concordância, principalmente, entre os parâmetros de reflexão e tomografia. Além disso, os parâmetros AIB, IRC e FSIR apresentaram tendência semelhante às curvas de decaimento de minerais extraídos das amostras. No estudo da osteoporose, não foi possível detectar tendência, sendo os parâmetros estatisticamente indiferenciáveis entre as 30 amostras. Possivelmente, o modelo de osteoporose escolhido não foi o adequado para estudos de radiação (ultrassônica e raios X).

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

ASSESSMENT AND MONITORING OF BONE QUALITY BY REFLECTION AND
BACKSCATTERING PARAMETERS IN ANIMAL MODEL

Aldo José Fontes Pereira

June/2016

Advisors: Wagner Coelho de Albuquerque Pereira

Marco Antônio von Krüger

Department: Biomedical Engineering

Quantitative ultrasound (QUS) pulse-echo parameters and a simple protocol to assessment are here proposed to characterize femoral diaphysis of Wistar rats *in vitro*. Four quantitative parameters: Integrated Reflection Coefficient (IRC), frequency Slope of Integrated Reflection (FSIR), apparent integrated backscatter (AIB), and frequency slope of apparent backscatter (FSAB) were estimated from *in vitro* echoes from eight femur diaphysis of Wistar rats with different degrees of demineralization by EDTA, and also from 30 samples of femur diaphysis of Wistar rats with osteoporosis. A good agreement was found between the reflection parameters and quantitative computerized tomography. The parameters IRC, FSIR, and AIB presented similar trends to the decay curves of minerals. Regarding the osteoporosis study no specific tendency was observed and parameters were not differentiated statistically among the thirty samples. Possibly the osteoporosis model was not adequately chosen considering radiation study (ultrasound as well as X rays).

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
OBJETIVO GERAL	6
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
Tecido ósseo	7
Ultrassom Quantitativo	10
Ultrassom Quantitativo e tecido ósseo	11
Materiais e métodos.....	13
Normativas Éticas	14
Medição dos parâmetros ultrassônicos.....	15
Protocolo de aquisição de sinais:	19
Aquisição da Tomografia Computadorizada Quantitativa (TCQ)	20
Experimento I: O estudo de parâmetros ultrassônicos, de reflexão e de retroespalhamento, em modelo animal <i>in vitro</i> de desmineralização por meio EDTA.	21
Amostras e processo de desmineralização.....	21
Análise química analítica.....	22
Experimento II: O estudo de parâmetros ultrassônicos, de reflexão e de retroespalhamento, em modelo animal mais próximo do caso real de osteoporose.	23
Amostra.....	24
Procedimento cirúrgico.....	24
Análise Bioquímica.....	25
Dissecação e preparação das amostras.....	25
Análise Radiográfica.....	26
RESULTADOS.....	26
Experimento II	33
DISCUSSÃO	36
CONCLUSÃO.....	41

REFERÊNCIAS	43
ARTIGOS NO DOUTORADO	53
Artigos relacionados com a tese.....	53
Publicados:.....	53
Artigos submetidos:	53
Artigos publicados relacionados com o tema de ultrassom:	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Etapas experimentais. Em experimento 1: Monitorização, por meio de parâmetros de <i>Quantitative Ultrasound</i> - QUS, da desmineralização óssea por ácido etilendiamino tetra-acético - EDTA em diáfise do fêmur a partir do modelo animal em ratos Wistar; Em experimento 2: Monitorização, por meio de parâmetros QUS, das alterações ósseas ocorridas em fêmures de ratos Wistar <i>in vitro</i> com osteoporose provocada por ooforectomia.	14
Figura 2 (“BBC - GCSE Bitesize”, [s.d.]; FONTES-PEREIRA et al., 2014a): figura demonstrando os ecos ultrassônicos: eco da superfície do osso e eco de retroespalhamento do interior do osso.	16
Figura 3 (FONTES-PEREIRA et al., 2014a): Em “a”, definição da janela retangular sobre o eco refletido a partir da placa de aço de referência (limites de 10% do pico de amplitude); em “b”, janela de referência colocada sobre o eco do osso cortical. Os ecos a direita, com uma duração de 4 μ s, são da estrutura interna do osso.....	17
Figura 4: Diagrama de passos para a obtenção dos parâmetros ultrassônicos.	19
Figura 5: localização dos três sinais RF ao longo do terço médio da diáfise do fêmur, com um passo de 1,5 mm entre eles.	20
Figura 6: Diagrama experimental para a obtenção da desmineralização óssea por EDTA em 7 grupos de fêmures.....	22
Figura 7: Mensuração, por meio de espectrometria de emissão óptica, da quantidade de Ca (A), Mg (B) e P (C) presente na solução de EDTA ao longo dos cinco dias de experimento.	28
Figura 8: tomografias das 8 amostras realizadas após 5 dias de desmineralização por EDTA.	29
Figura 9: Comportamento das 8 amostras de acordo com cada parâmetro de QUS durante o processo de desmineralização.....	32

Figura 10: ajuste linear dos parâmetros de retroespalhamento (AIB e FSAB) e reflexão (IRC e FSIR) com as DMO após todo o processo de desmineralização. 33

Figura 11: Radiografias dos fêmures dos ratos com osteoporose. O número ao lado direito indica o dia da eutanásia. 34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relevantes descobertas científicas sobre o osso ¹	7
Tabela 2: Parâmetros instrumentais para a determinação de Ca, Mg e P em solução de EDTA depois da imersão.....	23
Tabela 3: Concentração dos elementos (Ca, Mg e P) em EDTA durante os 5 dias (período de desmineralização)	27
Tabela 4: valores médios e desvios padrão (DP) das densidades minerais ósseas (DMO) nas 8 amostras, adquiridas no último dia do experimento.....	30
Tabela 5: média e desvio padrão (DP) dos parâmetros AIB, FSAB, IRC e FSIR para cada amostra/dia.	30
Tabela 6: Média e desvio padrão das dosagens de Fosfatase alcalina e Cálcio sérico nos diferentes grupos	33
Tabela 7: média e desvios padrão (DP) dos DMO (HU) para cada grupo.....	34
Tabela 8: média e desvio padrão (DP) dos parâmetros AIB, FSAB, IRC e FSIR para cada grupo.....	35

LISTA DE SÍMBOLOS

ABTF - Função de Transferência do Retroespalhamento Aparente

AIB - Retroespalhamento Aparente Integrado

ATP - Trifosfato de adenosina

CEUA - Comitê de Ética de Uso em Animais

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

DMO – Densidade mineral óssea

DQA - Departamento de Química Analítica

DXA - *Dual-energy X-ray absorptiometry*

EDTA - *Ethylenediaminetetraacetic acid* (Ácido etilenodiamino tetra-acético)

f – Frequência

FSAB - Inclinação Frequencial do Retroespalhamento Aparente

FSIR - Inclinação Frequencial da Reflexão Integrado

GC – Grupo controle

GO – Grupo osteoporose

Hz – Hertz

IBC - Coeficiente de Retroespalhamento Integrado

IRC - Coeficiente de Reflexão Integrado

LaDA - Laboratório de Desenvolvimento Analítico

°C - Grau Celsius

PTH – Hormônio Paratireóideo

QUS - *Quantitative Ultrasound* (Ultrassom quantitativo)

RADAR - *Radio Detection And Ranging*

RF – Radiofrequência

ROI - Região de interesse

RTF - Função de Transferência da Reflexão

SONAR - *Sound Navigation And Ranging*

TCQ - Tomografia Computadorizada Quantitativa

TV – Tempo de voo

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

US – Ultrassom

INTRODUÇÃO

O Ultrassom (US) é uma onda mecânica inaudível para os seres humanos, com frequência superior a 20 kHz (WELLS, 1977). A sua potencialidade é explorada em diversos campos da ciência. Assim, por meio das ondas ultrassônicas é possível detectar objetos, falhas em produtos e estruturas, limpar, misturar e acelerar processos químicos, e medir distâncias. Iniciando-se na década de 1920, devido a essa gama de aplicações, iniciaram-se os primeiros ensaios para analisar o comportamento do US em tecidos biológicos (ERIKSON; FRY; JONES, 1974).

Isso facilitou a introdução do US na área médica. Por volta de 1927, com os estudos de Loomis, Wood e Harvey (ERIKSON; FRY; JONES, 1974; HARVEY; LOOMIS, 1928), a comunidade científica presenciou os primeiros relatos de efeitos térmicos e mecânicos da onda ultrassônica em meio biológico, assim sugerindo o US como forma de terapia.

Em 1954, o professor de obstetrícia Ian Donald (“Ian Donald (1910-1987)”, [s.d.], “Professor Ian Donald, pioneer of Ultrasonography in Obstetrics and Gynecology”, [s.d.]) da Universidade de Glasgow utilizou os seus conhecimentos sobre a tecnologia do *Radio Detection And Ranging* (RADAR) e do *Sound Navigation And Ranging* (SONAR), adquiridos na Força Aérea Real Inglesa, onde serviu como oficial médico durante a 2ª Guerra Mundial, em pesquisas de ultrassom em Medicina (“University of Glasgow :: Story :: Biography of Ian Donald”, [s.d.]). Em meados de 1958, o professor Donald juntamente com os colaboradores John MacVicar e Tom Brown publicaram, na conceituada revista *The Lancet*, o artigo intitulado “*Investigation of Abdominal Masses by Pulsed Ultrasound*” (DONALD; MACVICAR; BROWN, 1958). Essa pesquisa foi importante para o desenvolvimento da ultrassonografia diagnóstica e tornou o professor Donald um dos pioneiros em usar o ultrassom diagnóstico em Medicina. Assim, o US foi introduzido na Medicina com credibilidade para fins de diagnóstico (FISH, 1990) e terapêuticos (DALECKI, 2004). Portanto, devido à sua eficiência, o US ocupa um lugar especial na história médica e é utilizado em diversas especialidades da Medicina (BAXTER; ALLAN; MORLEY, 1999; DALECKI, 2004; ERIKSON; FRY; JONES, 1974).

No campo da Traumatologia-ortopedia, em 1983, Duarte, em um estudo pioneiro, intitulado “*The stimulation of bone growth by ultrasound*” (DUARTE, 1983), analisou os efeitos do US em fraturas ósseas em coelhos e observou que o US no modo pulsado, frequência 1,5 MHz e intensidade de 30mW/cm^2 acelerou o processo de consolidação óssea. Em 1985, o mesmo autor registrou a patente do seu aparelho e método de ultrassom para a cura de fraturas ósseas, pseudoartroses e outras lesões ósseas (DUARTE, 1985). Posteriormente, diversos pesquisadores realizaram estudos nesta área, a saber, Pilla *et al.* (1990) analisaram o efeito do US terapêutico (1,5 MHz pulsado, 1 kHz de frequência de repetição, intensidade de 30 mW/cm^2 e por 20 minutos/dia) em osteotomia de 139 fíbulas de coelhos e concluíram que o US terapêutico acelerou o processo de consolidação em um fator de 1,7, alterando, principalmente, a resistência dos ossos após 28 dias de tratamento. Mayr *et al.* (2000) conseguiram acelerar o processo de recuperação em pseudoartroses utilizando o ultrassom de baixa intensidade (1,5 MHz pulsado, 1 kHz de frequência de repetição, intensidade de 30 mW/cm^2) e Gebauer *et al.* (2005) que, utilizando o US de baixa intensidade, com 1,5 MHz, por 20 minutos, reverteram em 85% os casos de pseudoartroses, após 168 dias de tratamento.

De forma geral, atualmente, é aceito pela comunidade científica que o uso do US atua no processo de consolidação (ALVARENGA *et al.*, 2010; CHAN *et al.*, 2006; DOAN *et al.*, 1999; HADJIARGYROU *et al.*, 1998; ITO *et al.*, 2000; KOKUBU *et al.*, 1999; REHER *et al.*, 1997, 1999; SANT’ANNA *et al.*, 2005; SPADARO; ALBANESE, 1998; TAKIKAWA *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2005a). Entretanto, os mecanismos celulares e moleculares, desencadeados nos tratamentos com o US, ainda são pouco compreendidos (ALVARENGA *et al.*, 2010; BUSSE *et al.*, 2002; DALECKI, 2004; DE SOUSA *et al.*, 2008; DOAN *et al.*, 1999; EVANGELISTA *et al.*, 2003; FRÉZ *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 1996). O tecido ósseo é tão complexo quanto o cérebro (BUENZLI; SIMS, 2015) e ainda não há completa compreensão do processo de reparação óssea. O processo de recuperação após fratura, responsável pelo restabelecimento da integridade mecânica, do tecido ósseo (ALVARENGA *et al.*, 2010; GARTNER; HIATT, 2007; LIRANI; LAZARETTI-CASTRO, 2005) é complexo: envolve a proliferação, a diferenciação celular, a quimiotaxia, a síntese de matriz extracelular (ALVARENGA *et al.*, 2010; GARTNER;

HIATT, 2007) e requer a expressão de determinados genes, no momento e local certos (LINKHART; MOHAN; BAYLINK, 1996).

Além disso, em torno de 10% das lesões ósseas, a saber, fraturas, não se recuperam normalmente (EINHORN; GERSTENFELD, 2015). Portanto os métodos de tratamento, avaliação e monitorização do tecido ósseo despertam um grande interesse dos pesquisadores (BUENZLI; SIMS, 2015; HADJIARGYROU et al., 1998; LAUGIER, 2008; MACHADO et al., 2011; YANG et al., 2012), pois compreender melhor o tecido ósseo garantiria maiores chances para a descoberta de tratamentos mais eficientes e diminuição dos gastos expressivos para a saúde pública (BONADIO, 2000; ROSE; OREFFO, 2002; YOUNG; PENG; HUARD, 2002).

Devido à idade média da população mundial ter aumentado drasticamente, o número de problemas ósseos, como fraturas por fragilidade e doenças metabólicas, aumentou. A osteoporose é uma doença em que a densidade e a qualidade do osso são reduzidas, principalmente, pela perda de massa óssea e da degradação da estrutura de osso trabecular (KODA-KIMBLE; YOUNG, 2016). Assim, como o osso torna-se mais poroso e, por consequência, frágil, o risco de fratura é gradativamente aumentado, essa perda de massa óssea ocorre silenciosamente e as vítimas de osteoporose normalmente descobrem a doença apenas após a primeira fratura (KANIS et al., 1994).

Segundo a Fundação Internacional de Osteoporose (“Osteoporosis | International Osteoporosis Foundation”, [s.d.]), em todo o mundo, esta enfermidade causa mais de 8,9 milhões de fraturas por ano, o que resulta em uma fratura osteoporótica a cada 3 segundos (JOHNELL; KANIS, 2006). Em torno de 75 milhões de pessoas na Europa, Estados Unidos e Japão sofrem com osteoporose (“Who are candidates for prevention and treatment for osteoporosis?”, 1997). No Brasil, em torno de 10 milhões de pessoas, cerca de uma pessoa em cada 17, tem osteoporose (PASTORE, 2000) e estima-se que, devido o aumento da população acima de 50 anos, ocorrerá o aumento no número de fraturas por fragilidade em torno de 32% em 2050.

Nos EUA, o custo anual com fraturas por fragilidade é de cerca de 16,9 bilhões de dólares. No Brasil, o custo com esse problema também é relevante. Sambrook e Cooper

(2006) mostraram o aumento acentuado do custo do tratamento em fraturas de quadril por fragilidade (acima de 50 bilhões de dólares por ano), apenas para os sistemas privados de cuidados com a saúde.

Nos casos de fraturas ósseas por fragilidade, o estudo da estrutura óssea também é muito importante para se compreender e avaliar o risco de fratura de um paciente. Sabe-se que o entendimento da sua qualidade e propriedades pode melhorar os métodos para diagnóstico, prevenção e tratamento da osteoporose e outras doenças e lesões ósseas (KANIS et al., 1994).

Um método promissor emergente que é debatido no meio científico é o uso do Ultrassom Quantitativo (*quantitative ultrasound* - QUS) para medir parâmetros acústicos da estrutura óssea (DIMITRIOU; TSIRIDIS; GIANNOUDIS, 2005; FONTES-PEREIRA et al., 2014a; MARKS; HERMEY, 1996; PHILLIPS, 2005; ROSE; OREFFO, 2002). Os parâmetros de QUS são largamente apresentados na literatura para caracterização de tecidos biológicos moles e obtiveram considerável grau de sucesso. Meziri *et al.* (2005) estudaram três parâmetros ultrassônicos (coeficiente de atenuação, velocidade do som e *integrated backscatter coefficient* - IBC) para discriminar diferentes graus de fibrose hepática e relataram a potencialidade desses parâmetros em conjunto para detectarem essas doenças no fígado humano. Bridal et al. (1997) utilizaram parâmetros de QUS de retroespalhamento (*apparent integrated backscatter* – AIB e a inclinação da atenuação) para caracterizar aortas humanas *in vitro*. Desse modo, os parâmetros ultrassônicos podem detectar alterações ósseas, seja devido a traumas, seja devido a alterações provocadas por doenças. Além disso, os parâmetros de QUS apresentam diversas vantagens: podem minimizar a subjetividade em diagnósticos realizados por métodos de imagem convencionais, como a radiografia (FONTES-PEREIRA et al., 2014a); podem fornecer outras informações úteis para o diagnóstico (MEZIRI et al., 2005); baixo custo de aquisição e manutenção (HAKULINEN et al., 2004); facilidade de manuseio (LAUGIER, 2008), e radiação não ionizante empregada (DALECKI, 2004).

Na literatura há diversos métodos e parâmetros para caracterização óssea e esses já foram testados em modelos animais, como bovinos (LEE, 2009), ovinos (BARBIERI et al.,

2012) e roedores (FONTES-PEREIRA et al., 2014a) e foram posteriormente explorados em humanos (BARONCELLI et al., 2003; ZEHNDER et al., 2004). No entanto, a aplicação clínica ainda é modesta devido à carência de reprodutibilidade do método (LAUGIER, 2008). Além disso, os parâmetros de reflexão (Integrated Reflection Coefficient - *IRC* e Frequency Slope of Integrated Reflection - *FSIR*, definidos em Materiais e Métodos) e retroespalhamento (Apparent Integrated Backscatter - *AIB*, Frequency Slope of Apparent Backscatter - *FSAB*, definidos em Materiais e Métodos) não foram utilizados em modelo de desmineralização por ácido etilendiamino tetra-acético (*Ethylenediaminetetraacetic acid* - EDTA) e em modelo animal de osteoporose.

Desse modo, o presente estudo objetivou avaliar e monitorar a qualidade óssea por meio de parâmetros de retroespalhamento e reflexão de ultrassom quantitativo em modelo animal.

OBJETIVO GERAL

Avaliar e monitorar a qualidade óssea por meio de parâmetros de retroespalhamento e reflexão de ultrassom quantitativo em modelo animal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar o modelo de desmineralização de osso em ratos Wistar *in vitro* por meio de EDTA.
- Validar, por meio de parâmetros QUS, a desmineralização óssea em diáfise do fêmur a partir do modelo animal em ratos Wistar.
- Estudar, por meio de parâmetros QUS, as alterações ósseas ocorridas em fêmures de ratos Wistar *in vitro* com osteoporose provocada por ooforectomia.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tecido ósseo

O tecido ósseo tem sido discutido por séculos pelos cientistas, com momentos de interesse científicos variados. No entanto, até a segunda metade do século XIX não foram obtidos progressos significativos na compreensão mecânica e morfológica da construção, funcionamento e crescimento do osso (NIGG; HERZOG, 2007). Recentemente, novas tecnologias de imagem e estudos de biologia molecular aplicada ao tecido ósseo (BONEWALD, 2011; SIMS; BUENZLI, [s.d.]) revelaram que o tecido ósseo foi subestimado e que eles são tão complexos quanto o cérebro humano, com presença de uma rede de osteócitos similares às redes neurais do cérebro (BUENZLI; SIMS, 2015). Além disso, estudos mostraram que o osso contribui na regulação de múltiplos órgãos, sendo um regulador do sistema endócrino na fertilidade masculina (OURY et al., 2011), interfere no metabolismo da gordura (SATO et al., 2013) e nas funções renais (ITO; FINDLAY; ATKINS, 2014). A Tabela 1 sumariza a história de descobertas relacionadas ao tecido ósseo.

Tabela 1: Relevantes descobertas científicas sobre o osso¹

Ano	Autor	Destques
1678	van Leeuwenhoek	Anunciou a observação de um extenso sistema de canais no osso.
1691	Havers	Propôs que o osso é composto por compostos orgânicos e lâminas inorgânicas, que são bem organizados ao redor de cavidades tubulares. Ele encontrou poros entre essas lâminas.
1739	Du Hamel	Demostraram a natureza laminar do osso.
1742	Lieutaud	Sugeriu que o osso é composto lâminas e fibras compactas.
1754	Albinus	Reconheceu que os poros eram usados como canais vasculares.
1776	Monro	Descobriu que a reabsorção e formação óssea ocorriam ao longo da vida.
1816	Howship	Descobriu que o osso intersticial pode ser removido por absorção.

1841	Burns	Reafirmou a observação de van Leeuwenhoek dos ósteons no osso.
1855	Breithaupt	Descreve as fraturas por estresse em recrutas militares de uma unidade militar Prussiana.
1856	Fick	Sugeriu que o osso é uma estrutura passiva e que os músculos circundantes determinam a forma do osso.
1856	Virchow	Indicou que o osso desempenha um papel ativo no desenvolvimento de sua forma e estrutura.
1862	Volkman	Sugeriu que a pressão inibe o crescimento ósseo e a retirada da pressão o promove.
1867	Culman	Indica a similaridade entre o arranjo trabecular no osso e os elementos estruturais de um crânio. Em ambos os casos, princípios de alta eficiência e economia são usados.
1867	van Meyer	Sugere a relação entre arquitetura e função do osso.
1870	Wolff	Resumiu várias sugestões e afirmações sobre o osso declarando que há interdependência entre forma e função do osso. Leis físicas tem estrito controle sobre o crescimento do osso.
1883	Roux	Propôs que a orientação do sistema trabecular corresponde com a direção da tensão e estresse de compressão e desenvolve usando o princípio de máxima economia de uso de material (como dito por Wolff). Arquitetura do osso segue os princípios da engenharia.
1897	Stechow	Fez primeira verificação radiográfica de fratura por estresse.
1920	Jores	Propôs que células ósseas ativam sensores para alterações estruturais.
1931	Greig	Sugeriu que dano local microscópico pode ser estimular a remodelação óssea.
1942	Maj	Mostrou, experimentalmente, que o tecido cortical do osso se torna mais fraco com o avanço da idade.
1984	Lanyon e Rubin	Demonstrou a influência da carga do osso no remodelamento ósseo.
1986	Frost	Propôs um mecanismo de controle para as adaptações estruturais e funcionais do osso.

¹Tabela traduzida de (NIGG; HERZOG, 2007)

O osso é um tecido conjuntivo complexo, especializado, cuja matriz extracelular é calcificada e contém as células que a secretam, porém apresenta certo grau de elasticidade (GARTNER; HIATT, 2007; MARKS; HERMEY, 1996; RHO; KUHN-SPEARING; ZIOUPOS, 1998). Os ossos são leves, mas resistentes, reparam-se quando essa resistência é rompida e substituem o tecido ósseo velho pelo novo. Além disso, o tecido ósseo se ajusta a fim de atender às necessidades mecânicas e fisiológicas do corpo (NIGG; HERZOG, 2007; SEEMAN, 2008).

O tecido ósseo é uma das substâncias do corpo mais rígidas e resistentes (GARTNER; HIATT, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO; OTHERS, 2006; LIRANI, 2004), isto se deve à associação dos cristais de hidroxiapatita com o colágeno (GARTNER; HIATT, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO; OTHERS, 2006). Dessa forma, os ossos desempenham a função de proteção de órgãos internos vitais e de suporte aos músculos, permitindo os movimentos do esqueleto (GARTNER; HIATT, 2007; LITTLER; KNIGHT; STRANGE, 1952). Segundo Rho *et al.* (1998), o osso apresenta diversas estruturas que podem ser divididas em níveis de organização: *a*) macroestrutura: osso cortical e trabecular; *b*) microestrutura (de 10 a 500 μm): sistemas Haversianos, ósteons, a trabécula; *c*) sub-microestrutura (de 1 a 10 μm): lamela óssea; *d*) nanoestrutura (de 100 nm a 1 μm): fibras colágenas e minerais incrustados; e por fim, *e*) sub-nanoestrutura (menos de 100 nm): estrutura molecular dos elementos constituintes ósseos, como minerais, colágeno, e proteínas orgânicas não-colagenosas.

Quando a resistência do osso é rompida e ocorre, a saber, uma fratura, inicia-se o processo de recuperação, com vistas ao restabelecimento da integridade mecânica, e conseqüentemente funcional, do tecido ósseo (ALVARENGA *et al.*, 2010; LIRANI; LAZARETTI-CASTRO, 2005). Segundo Phillips (2005) a resolução de fraturas pode ser dividida em cinco fases: formação de hematoma, inflamação, angiogênese, formação de cartilagem (com subsequente calcificação, remoção da cartilagem e então formação de osso) e remodelação óssea.

No entanto, este processo de reparo ósseo pode ocorrer lentamente (retardo de consolidação) ou até não se desenvolver (pseudoartrose), resultando em deficiência ou

incapacidade dos indivíduos (EVANGELISTA et al., 2003). Isto pode estar relacionado com a severidade da fratura, sua localização, a natureza do suprimento sanguíneo para o osso, a extensão da lesão em tecidos moles, perda óssea devido a doenças metabólicas, contato com o ar e contaminação, ou mesmo presença de tumor. Outros fatores sistêmicos podem estar envolvidos, como alcoolismo, fumo, idade e diabetes (HADJIARGYROU et al., 1998).

Ultrassom Quantitativo

O osso trabecular é um meio extremamente poroso e heterogêneo, composto por uma matriz sólida (colágeno mineralizado) de trabéculas interconectadas (com diâmetros variando de 50 a 200 μm), o tamanho médio dos poros varia de 1000 a 2000 μm (JENSON et al., 2006). Dada a complexidade dessa estrutura e o seu potencial como sinalizadora de possíveis doenças e lesões devido a modificações na sua estrutura, pesquisas com o QUS vêm crescendo (CALIGIURI; GIGER; FAVUS, 1994; CHAFFAI et al., 2000, 2002; HAKULINEN et al., 2006; KAUFMAN; LUO; SIFFERT, 2003; LAUGIER et al., 1997; NICHOLSON et al., 2000; PADILLA; PEYRIN; LAUGIER, 2003; POTHUAUD et al., 1998; WEAR, 1999; WEAR; ARMSTRONG, 1999).

Vários parâmetros foram desenvolvidos para quantificar a energia ultrassônica espalhada por um meio, sendo, velocidade de propagação da onda, impedância, espalhamento, atenuação, periodicidade do meio, relação A/B e outros parâmetros não lineares, os mais empregados (BAMBER, 1998; HOFFMEISTER et al., 2008; LAUGIER, 2008; ROBERJOT et al., 1996). As modificações nesses parâmetros acústicos podem indicar o aparecimento de doenças (BAMBER, 1998; HOFFMEISTER et al., 2008; MACHADO et al., 2006; PARKER, 1983).

Barbieri *et al.* (2006) acompanharam a evolução de fraturas em tíbias de carneiro, usando como parâmetro ultrassônico a velocidade de propagação. Mostraram que, de forma evidente, a velocidade aumenta à medida que a consolidação óssea se desenvolve. Porém, o acompanhamento foi realizado somente no 30º, 45º e 60º dia pós-fratura, ou seja, os processos ocorridos nos 30 dias iniciais não foram avaliados. Bossy *et al.* (2005) e Padilla

et al. (2006), utilizando o *software* simulador SimSonic, estudaram estruturas ósseas trabeculares reconstruídas por microtomografia synchrotron (SR- μ CT).

Os parâmetros obtidos pelos sinais simulados foram similares aos obtidos experimentalmente (BOSSY *et al.*, 2005; PADILLA *et al.*, 2006). Convém ressaltar, que não consideraram a absorção da energia do US pelo tecido, mesmo assim, as simulações mostraram diversos fenômenos observados no experimento, como a variação da atenuação correlacionado com a frequência. Machado *et al.* (2011) buscaram identificar o efeito específico da mineralização do osso cortical por meio de simulações numéricas e medições por transmissão axial em um osso bovino, após sofrer ação do EDTA e observaram que o tempo de voo (TV) sofreu alteração devido à desmineralização, assim concluíram que o TV pode monitorar a maturação de calo ósseo. Esta pesquisa foi um grande salto nos estudos de caracterização óssea por ultrassom, pois monitorou, diariamente, a desmineralização óssea.

Na literatura há uma vasta contribuição científica para o uso do QUS em osso, com diferentes parâmetros, diferentes modelos animais, diferentes métodos numéricos e experimentais etc. Todos atingiram variados graus de sucesso e contribuíram para o avanço da implementação do QUS como ferramenta de diagnóstico de lesões ósseas e/ou monitorização de consolidação de fraturas ou tratamentos, no entanto ainda não há padronização com relação ao método a e aos parâmetros ultrassônicos a serem utilizados e em quais casos clínicos os mesmos podem ser aplicados.

Ultrassom Quantitativo e tecido ósseo

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (2007), a osteoporose é responsável por mais de 8,9 milhões de fraturas anualmente em todo o mundo. Cerca de 4,5 milhões de casos ocorrem nas Américas e na Europa. É a doença osteometabólica mais comum entre os idosos, o que representa grandes desafios para a saúde pública contemporânea.

Há consenso de que a densidade mineral óssea (DMO) é o principal parâmetro para o diagnóstico da osteoporose, bem como para a predição de fraturas e de controle de

tratamentos (CUMMINGS et al., 1993). Absorciometria com Raios X de Dupla Energia (DXA) e Tomografia computadorizada quantitativa (TCQ) são duas técnicas ionizantes para estimar a DMO (MARSHALL; JOHNELL; WEDEL, 1996). A TCQ é mais sensível do que DXA, no entanto é mais dispendiosa e apresenta riscos mais elevados de radiação, apesar de se obter melhor qualidade (BERGOT et al., 2001; BLACK et al., 2008). Além disso, sabe-se que mesmo com a avaliação clínica indicando osteoporose, em alguns casos a DXA não é sensível e não detecta a osteoporose (LI et al., 2003). De acordo com Seo et al. (2014), a discussão sobre a exatidão e as diferenças dos valores para detectar alterações ósseas entre a DMO, TCQ e DXA é relevante.

Uma alternativa relevante para a avaliação da DMO é o QUS. Este apresenta muitas vantagens, dentre elas: baixo custo de manutenção, facilmente transportáveis, fácil manuseio e não ionizante (FONTES-PEREIRA et al., 2014a; LAUGIER, 2008; MACHADO, 2013). Os parâmetros calculados a partir dos sinais de radiofrequência (RF) do ultrassom são preditivos da qualidade do tecido ósseo.

No que se refere ao teor mineral ósseo, há três importantes minerais responsáveis pela qualidade óssea: cálcio (Ca), magnésio (Mg) e fósforo (P). Cerca de 50% do volume do osso é composto por colágeno e outras proteínas, como glicoproteínas. O principal constituinte mineral do osso é o fosfato de cálcio, sob a forma de hidroxiapatita (PETERSON; BRONZINO, 2007). O magnésio também tem um papel fundamental na homeostase mineral óssea, uma vez que está diretamente relacionado com a formação/secreção de hormonas que regulam a homeostase do esqueleto e as funções das células do osso, bem como as influências no crescimento e formação de cristais de hidroxiapatita. Pessoas com baixa ingestão de Mg podem apresentar hipocalcemia por causa da secreção prejudicada do hormônio da paratireóide (PTH). Além disso, a carência de ingestão de Mg é um importante fator de risco para a osteoporose (BILEZIKIAN; RAISZ; MARTIN, 2008). Por outro lado, o fósforo é essencial na fisiologia celular e mineralização óssea, é importante: (1) na composição de ácidos nucleicos, hidroxiapatita e trifosfato de adenosina (ATP); (2) na formação de fosfolipídios das membranas celulares; (3) para influenciar uma variedade de reações enzimáticas, por exemplo, a glicólise, e

outras funções proteicas, a saber, o transporte de oxigênio pela hemoglobina. Sabe-se que a hipofosfatemia diminui a mineralização, o que pode acarretar o raquitismo e a osteomalacia (BILEZIKIAN; RAISZ; MARTIN, 2008).

Vários protocolos de descalcificação têm sido propostos nos últimos anos a fim mimetizar doenças metabólicas ósseas, como por exemplo, a osteoporose (BOWMAN et al., 1996; SILVA et al., 2006), alguns deles sendo aplicados para avaliar o efeito da desmineralização nos parâmetros QUS (MACHADO et al., 2011). No entanto, esses estudos não consideram alguns aspectos da desmineralização óssea, como, por exemplo, a presença de magnésio. É fato conhecido que o DMO tem papel importante na caracterização óssea por ultrassom, entretanto a falta de padronização adequada dos parâmetros e métodos leva a dificuldades em extrapolar os resultados experimentais para os ensaios clínicos. Dessa forma, são necessárias mais pesquisas para melhor correlacionar o conteúdo mineral aos parâmetros QUS.

Materiais e métodos

Para atingir o objetivo proposto, foram estabelecidas duas etapas experimentais, a saber (Figura 1):

1. O estudo de parâmetros ultrassônicos, de reflexão e de retroespalhamento, em modelo animal *in vitro* de desmineralização por meio EDTA;
2. O estudo de parâmetros ultrassônicos, de reflexão e de retroespalhamento, em modelo animal mais próximo do caso real de osteoporose;

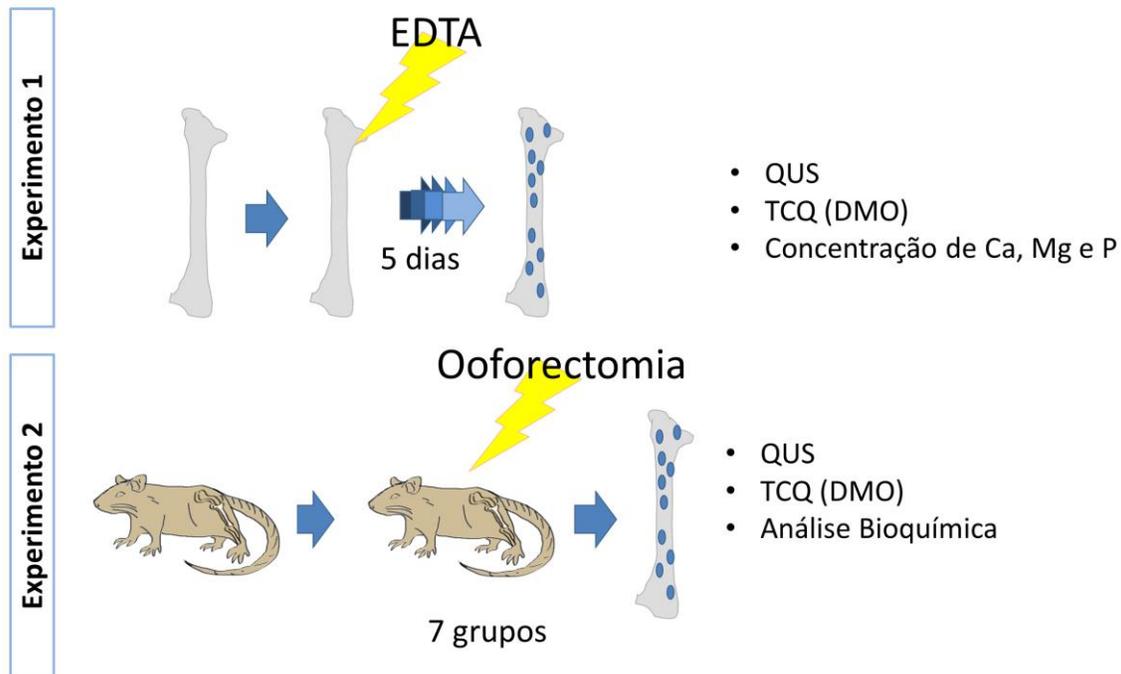


Figura 1: Etapas experimentais. Em experimento 1: Monitorização, por meio de parâmetros de *Quantitative Ultrasound* - QUS, da desmineralização óssea por ácido etilendiamino tetra-acético - EDTA em diáfise do fêmur a partir do modelo animal em ratos Wistar; Em experimento 2: Monitorização, por meio de parâmetros QUS, das alterações ósseas ocorridas em fêmures de ratos Wistar *in vitro* com osteoporose provocada por ooforectomia.

Esses experimentos serão descritos a seguir, antes, porém, serão apresentados tópicos gerais referentes à ética, medição dos parâmetros, aquisição de sinais e tomografia por raios X.

Normativas Éticas

As duas etapas experimentais foram realizadas em ratos Wistar, respeitando as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), o Comitê de Ética de

Uso em Animais (CEUA) da Universidade Federal do rio de Janeiro – UFRJ (Protocolo 18/11) e a legislação nacional de vivisseção animal em vigor (Lei Federal 11.794/2008).

Protocolo de preparação das amostras

- Eutanásia dos animais por meio injeção letal de quetamina e xilasina por via intraperitoneal no experimento I e injeção de cloreto de potássio (KCl) endovenoso pela veia cava inferior no experimento II;
- Desarticulação dos fêmures e dissecação manual do tecido mole com o uso de tesoura cirúrgica e bisturi número 15;
- Identificação das amostras com linha e etiqueta rotex;
- Imersão das amostras em álcool 70% (6 amostras para cada 1 litro de álcool) por 7 dias;
- Secagem das amostras em recipiente coberto por tecido “tule de nylon” (para evitar a entrada de insetos e não prejudicar a secagem) por 10 dias;
- Manutenção das amostras por 30 dias na presença de larvas de besouros (*Dermestes Maculatus*) para remover completamente o tecido mole (HEFTI et al., 1980).

Medição dos parâmetros ultrassônicos

A técnica medição dos parâmetros foi basicamente a mesma adotada em outros trabalhos do grupo (FERREIRA et al., 2010; FONTES-PEREIRA et al., 2013a, 2014a, 2014b, 2013b; PEREIRA et al., 2012). Para a caracterização dos ossos foram utilizados dois segmentos do eco ultrassônico: *a*) o eco da superfície do osso e *b*) o eco de retroespalhamento do interior do osso (Figura 2). A primeira janela retangular, que representa o eco da superfície do osso, é a janela do sinal do fêmur cuja duração corresponde à do eco de referência adquirido a partir da placa de aço, que apresenta os seus limites de acordo com um limiar de amplitude de pico de 10%. A partir dessa janela há outra janela com duração de 4 μ s, contendo o sinal do retroespalhamento a partir do interior

do osso (Figure 3). Este período de tempo foi escolhido para assegurar que o sinal de retroespalhamento veio do interior do osso, pois ratos Wistar adultos apresentam o diâmetro médio do fêmur em torno de $3,12 \pm 0,1$ mm e o seu interior apresenta velocidade do som menor que do osso cortical.

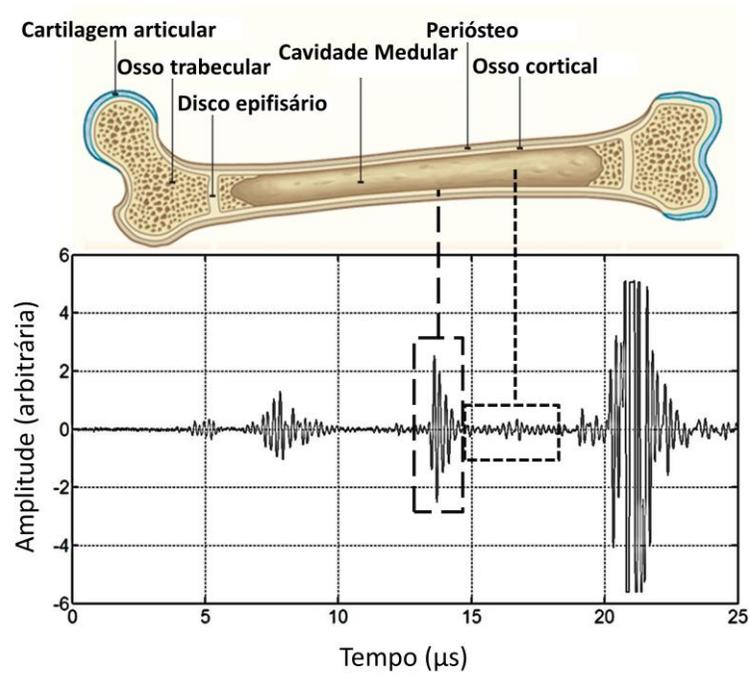


Figura 2 (“BBC - GCSE Bitesize”, [s.d.]; FONTES-PEREIRA et al., 2014a): figura demonstrando os ecos ultrassônicos: eco da superfície do osso e eco de retroespalhamento do interior do osso.

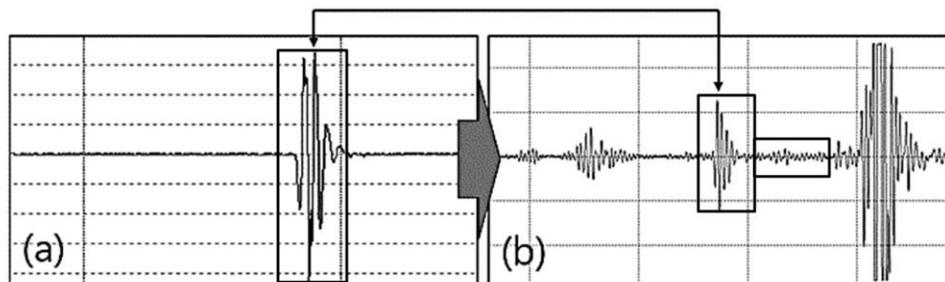


Figura 3 (FONTES-PEREIRA et al., 2014a): Em “a”, definição da janela retangular sobre o eco refletido a partir da placa de aço de referência (limites de 10% do pico de amplitude); em “b”, janela de referência colocada sobre o eco do osso cortical. Os ecos a direita, com uma duração de 4 μ s, são da estrutura interna do osso.

Quatro parâmetros (AIB, FSAB, IRC e FSIR) foram calculados para caracterizar os ossos. Para esse fim foi desenvolvido um algoritmo em Matlab® (MathWorks, Inc., EUA).

Para o cálculo dos parâmetros de retroespalhamento, faz-se necessário, primeiramente, o cálculo da Função de Transferência do Retroespalhamento Aparente – *ABTF* (Equação 1) (FONTES-PEREIRA et al., 2014a).

$$ABTF = 10 \log_{10} P_{animal}(f) - 10 \log_{10} P_{referência}(f), \quad \text{Equação 1}$$

onde P_{animal} e $P_{referência}$ são os espectros de potência dos sinais (ecos) da amostra e da referência, respectivamente.

O parâmetro AIB é obtido a partir da integração da curva de *ABTF*. Este parâmetro expressa o valor médio de retroespalhamento aparente em uma banda de frequência de interesse (banda passante do transdutor).

$$AIB = \frac{\int_{f_{\min}}^{f_{\max}} [ABTF] df}{f_{\max} - f_{\min}}, \quad \text{Equação 2}$$

onde f_{\min} e f_{\max} são, respectivamente, os limites de frequência inferior e superior da banda passante do transdutor a -6 dB do pico do espectro de potência dos sinais.

O FSAB é a inclinação da regressão linear obtida a partir da curva de *ABTF* versus frequência, representa a fração de retroespalhamento aparente a cada frequência.

A Função de Transferência de Reflexão – *RTF* (Equação 3) é calculada a partir da janela do sinal de reflexão e apresenta definição semelhante ao *ABTF*.

$$RTF = 10 \log_{10} P_{animal}(f) - 10 \log_{10} P_{referência}(f), \quad \text{Equação 3}$$

onde P_{animal} e $P_{referência}$ são os espectros de potência dos sinais (ecos) da amostra e da referência, respectivamente.

Assim, o *IRC* é obtido pela integração de *RTF*, dessa forma, ele representa o valor médio de reflexão numa banda de frequência de interesse (banda passante do transdutor). Este parâmetro indica o grau de reflexão de um tecido, neste caso o osso, assim, um tecido mais denso apresentará a tendência a maiores valores de *IRC*.

$$IRC = \frac{\int_{f_{\min}}^{f_{\max}} [RTF] df}{f_{\max} - f_{\min}}, \quad \text{Equação 4}$$

onde f_{\min} e f_{\max} são, respectivamente, os limites de frequência inferior e superior da banda passante do transdutor a -6 dB do pico do espectro de potência dos sinais.

Por sua vez o *FSIR* é a inclinação da regressão linear de *RTF* e é a fração aparente da reflexão correspondente a cada uma das frequências, esse parâmetro é calculado semelhantemente ao *FSAB*.

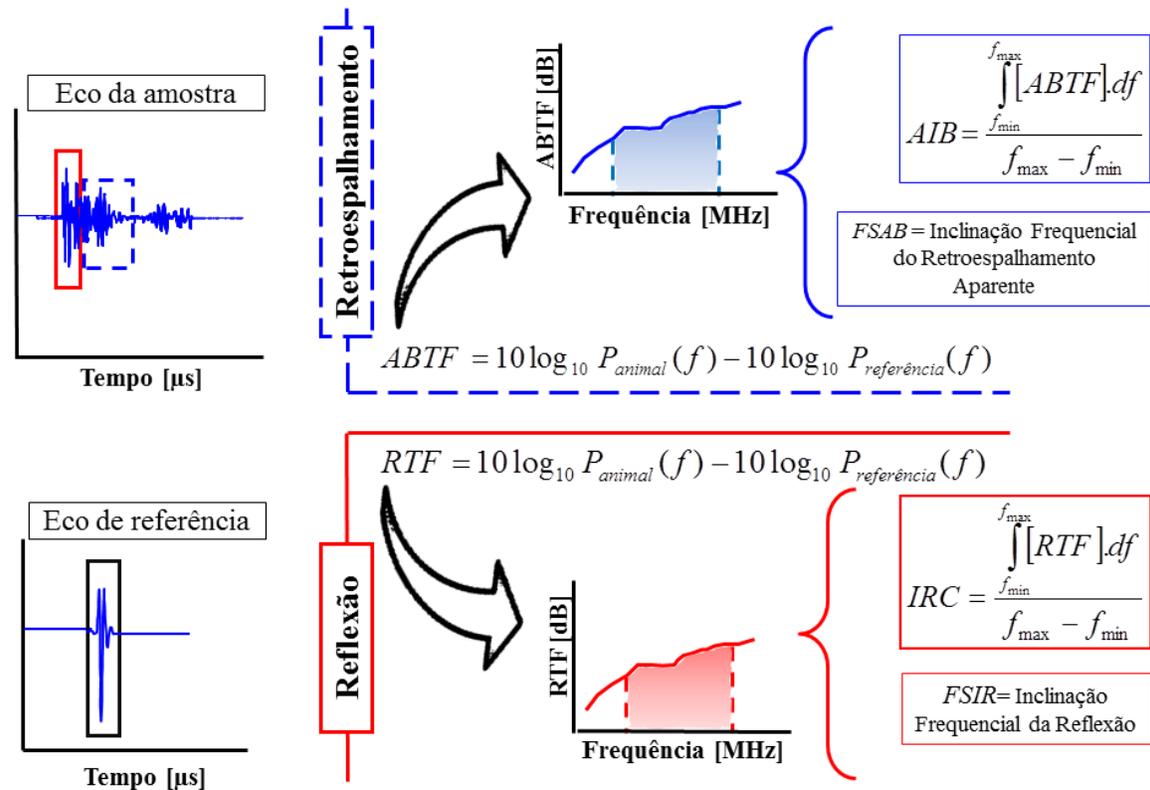


Figura 4: Diagrama de passos para a obtenção dos parâmetros ultrassônicos.

Protocolo de aquisição de sinais:

Como forma de acompanhamento da qualidade óssea, foram calculados parâmetros de QUS obtidos a partir dos ecos (FONTES-PEREIRA et al., 2014a) relacionados a reflexão e retroespalhamento do osso, após a eutanásia dos animais.

Para aquisição dos sinais, seguiu-se o protocolo abaixo:

- As amostras posicionadas em vista anterior sobre uma placa refletora polida de aço de 5,80 cm a distancia de 69,3 mm do transdutor;
- As amostras e a placa refletora imersa em água destilada ($20,8 \pm 0,8^\circ\text{C}$);

- Transdutor de frequência nominal 5 MHz (model V326, Olympus® NDT Inc., Massachusetts, USA) excitado por gerador de pulso US-key (Gaussian pulse, 1,75 microssegundos - 140 pontos de amostragem a 80 MHz) (Lecoeur Electronique®, Loiret, FR) e os ecos foram visualizados em um notebook;
- O transdutor posicionado no terço médio da diáfise dos fêmures (região de interesse - ROI),
- Depois de identificada a ROI e coletado o sinal nessa região, realizou-se a varredura para adquirir mais 2 sinais (um sentido cefálico e outro no sentido podálico em relação a ROI), com passos de 1,5 mm, controlados por meio de montagem estereostática de 2 μ m de resolução (Figura 5).
- Adquiriu-se um sinal de referência da placa de refletora de aço polido posicionada na mesma distância do membro do animal.

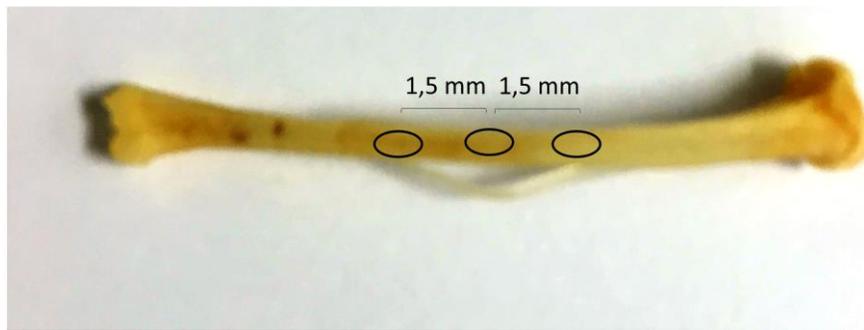


Figura 5: localização dos três sinais RF ao longo do terço médio da diáfise do fêmur, com um passo de 1,5 mm entre eles.

Aquisição da Tomografia Computadorizada Quantitativa (TCQ)

A tomografia computadorizada quantitativa utilizada foi realizada no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho - HUCFF/UFRJ com o equipamento PET/CT 560 (GE Healthcare, ©General Electric Company, Chicago, USA). O protocolo de aquisição consiste em cortes axiais de 0,65 mm de espessura, 80kVA e 200mA com um total de 10 segundos de exposição. As imagens tomográficas foram processadas com auxílio do

software Osirix Imaging (©Pixmeo SARL), para análise da densidade óssea (em unidades Hounsfield) da diáfise do fêmur. Esses dados são utilizados como padrão-ouro para a densidade óssea.

Experimento I: O estudo de parâmetros ultrassônicos, de reflexão e de retroespalhamento, em modelo animal *in vitro* de desmineralização por meio EDTA.

Amostras e processo de desmineralização

Foram utilizados oito fêmures *in vitro* de ratos saudáveis (*Rattus norvegicus Albinus*), pesando $54 \pm 0,2$ g. Antes de aquisição dos sinais, as amostras foram preparadas conforme descrito na secção “Protocolo de preparação das amostras”.

O protocolo de desmineralização consistiu em imergir os fêmures em uma solução de 25 ml de EDTA, sal dissódico (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), em um pH = 8, e concentração de 0,376 M, durante 24 horas, em uma temperatura de $25 \pm 1,5^\circ\text{C}$. Foi utilizada uma nova solução e um novo frasco para cada dia, seguindo o protocolo descrito por Machado et al., (2011). Após cada 24 horas de imersão, as amostras foram analisadas por QUS. Este protocolo foi seguido por 6 dias (Figura 6).

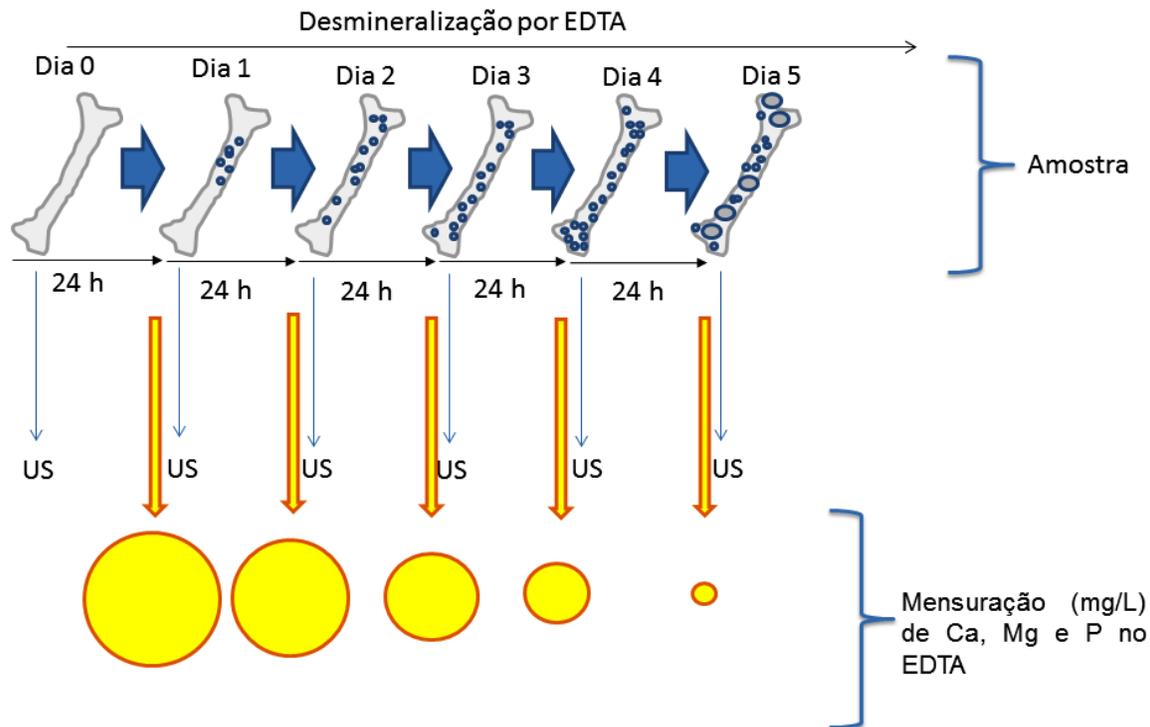


Figura 6: Diagrama experimental para a obtenção da desmineralização óssea por EDTA em 7 grupos de fêmures.

Análise química analítica

A análise química analítica foi realizada no Laboratório de Desenvolvimento Analítico – LaDA, Departamento de Química Analítica (DQA) do Instituto de Química - UFRJ.

Para a determinação das concentrações dos elementos Ca, Mg e P nos extratos de osso, utilizou-se um espectrômetro de emissão óptica com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP OES), com configuração de visão dupla (axial e radial), marca Thermo Scientific, modelo iCAP 6300 (Cambridge, Inglaterra), equipado com câmara de nebulização ciclônica, nebulizador do tipo MiraMist (Mira Mist CE, Burgener Research Inc., Ontario, Canadá), detector do tipo dispositivo de carga acoplado (CCD) e software operacional iTEVA 2.0 para a aquisição de dados. As determinações de P foram realizadas na vista axial, enquanto que as determinações de Ca e Mg foram realizadas na vista radial.

Para a quantificação foram utilizadas curvas analíticas com seis soluções-padrão para a calibração e a quantificação foi realizada por interpolação. As soluções de Ca, Mg e P foram obtidas a partir de diluição de soluções-padrão estoque SpecSol de concentração 1.000 mg L^{-1} (Quimlab Química & Metrologia®, Jardim Califórnia, Jacareí, São Paulo, Brasil), até obtenção das concentrações desejadas, utilizando água ultrapura obtida de um sistema Milli-Q®, modelo Direct 8 (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, EUA). Devido à alta concentração de alguns analitos e também pelo teor de sais dissolvidos nos extratos (a matriz original é composta por EDTA $0,376 \text{ mol L}^{-1}$, representando cerca de 140 g L^{-1}), os mesmos foram diluídos na proporção de 1:100 (v/v) utilizando água ultrapura obtida pelo mesmo sistema anteriormente citado.

A Tabela 2 apresenta as condições instrumentais utilizadas para essa análise:

Tabela 2: Parâmetros instrumentais para a determinação de Ca, Mg e P em solução de EDTA depois da imersão

Variáveis	Valores
Gerador de energia de radiofrequência (W)	1200
Vazão de gás de plasma (L min^{-1})	12
Fluxo de gás auxiliar (L min^{-1})	1,00
Pressão do gás nebulizador (bar)	0,19
Rotação de bomba peristáltica (rpm)	50
Tempo de integração (s)	1
Número de repetição da análise	3
	Ca: 393,366
Comprimento de onda analítica (nm)	Mg: 279,553
	P: 213,618

Experimento II: O estudo de parâmetros ultrassônicos, de reflexão e de retroespalhamento, em modelo animal mais próximo do caso real de osteoporose.

A fim de estudar os parâmetros de reflexão e retroespalhamento em um caso mais próximo do real de enfermidades óssea, os parâmetros de QUS foram utilizados em modelo animal de osteoporose.

Amostra

Foram utilizados 30 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, fêmeas e peso variando entre 180 a 200 gramas, oriundas do Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental da Universidade do Estado do Pará. Todos os animais apresentavam a mesma idade (120 dias) ao início do experimento. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas, com, no máximo, quatro animais em cada, em uma sala refrigerada a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, com controle de umidade (60-65%) e foto período de 12 horas com luz e 12 horas sem luz. Água e ração foram ofertadas *ad libitum* durante todo o estudo.

Os animais foram randomicamente distribuídos em 2 grupos:

- Grupo controle (GC): Animais utilizados como parâmetro de normalidade (N=6)
- Grupo osteoporose (GO): Animais submetidos à osteoporose experimental (N=4)

Os animais do grupo osteoporose foram distribuídos em 6 subgrupos distintos apenas pela data da eutanásia dos animais que foram realizadas 30, 35, 40, 45, 50 e 55 dias, após o procedimento cirúrgico. A data da eutanásia dos animais do grupo controle foi 55 dias após o procedimento cirúrgico.

Procedimento cirúrgico

Todos os animais foram submetidos inicialmente a anestesia por meio da injeção intraperitoneal de quetamina (70mg/Kg) e xilasina (10mg/kg). Confirmado a anestesia, foi realizada a epilação e antisepsia da região abdominal. Mediante técnica asséptica foi realizada uma incisão infraumbilical de 2 cm. No grupo controle foi realizada apenas a manipulação dos ovários. No grupo osteoporose foi realizada a ooforectomia bilateral, conforme a técnica descrita por Brito *et al.*, (2000) e Atmaca *et al.* (2013).

A sutura da parede abdominal foi realizada em 2 planos, o primeiro envolvendo os planos músculo-aponeurótico onde foi realizada um sutura barra grega com fio de Prolene 5-0 e o segundo envolvendo apenas a pele utilizando pontos simples com fio de nylon 5-0.

Terminado o procedimento cirúrgico, foi realizada a ressuscitação volêmica com soro fisiológico 0,9% na dose de 5ml/kg por via subcutânea no dorso do animal. Após todos estes procedimentos, os animais foram devolvidos as suas respectivas gaiolas.

Análise Bioquímica

No dia da eutanásia de cada grupo, os animais foram anestesiados e sofreram, sob técnica asséptica, uma laparotomia mediana. Assim foi realizada a coleta de sangue pela veia cava inferior com o auxílio de uma seringa (10 mL) e uma agulha (22G). Após a coleta foi realizada a eutanásia do animal por meio de injeção de cloreto de potássio (KCl) endovenoso pela veia cava inferior e o sangue coletado foi encaminhado para análise bioquímica.

A análise dos marcadores bioquímicos da síntese de matriz óssea foi feita com kit laboratorial (Labtest) com absorvância a 590 nm para dosagem sérica de Fosfatase alcalina e o kit laboratorial (Labtest) com absorvância a 570 nm para a dosagem da concentração de cálcio sérico. As duas análises foram realizadas no sistema Labtest automatizado - Vitalab Selectra E, Chemistry Analyzer (Vital Scientific N.V, Holliston, MA, USA).

Dissecação e preparação das amostras

Foi realizada a incisão na região inquino-crural de 3 cm no membro traseiro direito, seguida da dissecação delicada dos músculos do quadril com o auxílio de uma tesoura de Iris, sem danificar o osso e deixando o mínimo de tecido frouxo possível. Após, realizou-se a separação do fêmur do quadril, para isso foi realizada uma secção das estruturas articulares com o auxílio de um bisturi frio até a identificação da cabeça do fêmur, na articulação proximal e da cartilagem do fêmur, na articulação distal. A partir da

identificação dessas estruturas foi realizada a luxação do fêmur, liberando este osso das demais estruturas articulares.

Logo após, para retirada total do tecido mole dos fêmures, seguiu-se o protocolo descrito na secção “Protocolo de preparação das amostras”.

Análise Radiográfica

A avaliação radiográfica óssea foi realizada com a mesma técnica (40kV x 2mAs) e sempre na mesma distância da ampola de raios X (1m).

Análise estatística

O número de amostras para cada experimento foi calculado por meio do teste ANOVA, considerando-se $\alpha = 0,05$, o poder de teste de 80%. Para a análise dos dados foi utilizado o teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) e análise da igualdade de variância (teste de Levene). Foi realizado o teste de Pearson para verificar a correlação entre os elementos químicos. Para o cálculo dos coeficientes de determinação entre os parâmetros ultrassônicos e tomografia, no experimento I, foi realizada a regressão linear (R^2). No experimento II, para a análise dos marcadores ósseos bioquímicos foi utilizado o teste ANOVA e teste t-student, quando foi necessário. Os testes estatísticos foram realizados no software SigmaStat 3.5 (Systat Software Inc., San Jose, CA, EUA). Assumiu-se um valor de $\alpha = 0,05$ e o intervalo de confiança de 95%.

RESULTADOS

Experimento I

As correlações entre os elementos foram muito forte e positivas entre Ca e Mg [$r = 0,99$; $p \leq 0,0001$], Ca e P [$r = 0,99$; $p \leq 0,0001$] e Mg e P [$r = 0,99$; $p \leq 0,0001$]. A Tabela 3 e a Figura 7 apresentam a mensuração da quantidade de Ca, Mg e P presente na solução de EDTA ao longo dos cinco dias.

Tabela 3: Concentração dos elementos (Ca, Mg e P) em EDTA durante os 5 dias (período de desmineralização)

Dia	Amostras	Ca [mg/L]	Mg [mg/L]	P [mg/L]
		$\lambda = 393,366 \text{ nm}$	$\lambda = 279,553 \text{ nm}$	$\lambda = 213,618 \text{ nm}$
1	Fêmur 1	2884,00	71,55	1814,00
	Fêmur 2	2506,00	63,94	1602,00
	Fêmur 3	2549,00	61,85	1622,00
	Fêmur 4	2270,00	56,41	1473,00
	Fêmur 5	1096,00	25,57	669,00
	Fêmur 6	2528,00	63,42	1643,00
	Fêmur 7	2512,00	64,01	1638,00
	Fêmur 8	2547,00	64,47	1650,00
2	Fêmur 1	1714,00	43,53	1086,00
	Fêmur 2	1805,00	45,34	1126,00
	Fêmur 3	1230,00	29,70	764,50
	Fêmur 4	1451,00	36,54	920,20
	Fêmur 5	784,00	22,81	474,00
	Fêmur 6	1635,00	41,01	1027,00
	Fêmur 7	1480,00	36,62	1011,00
	Fêmur 8	1388,00	34,03	934,50
3	Fêmur 1	312,20	7,57	206,60
	Fêmur 2	558,20	13,51	375,20
	Fêmur 3	277,20	6,85	177,10
	Fêmur 4	466,60	11,81	313,20
	Fêmur 5	468,40	11,82	309,30
	Fêmur 6	622,00	15,05	415,70
	Fêmur 7	117,50	2,91	71,51
	Fêmur 8	148,20	3,65	93,82
4	Fêmur 1	14,38	1,06	6,27
	Fêmur 2	28,57	0,93	15,43
	Fêmur 3	9,25	0,48	1,05
	Fêmur 4	9,94	1,00	2,06
	Fêmur 5	39,18	1,82	22,30
	Fêmur 6	46,22	1,47	21,54
	Fêmur 7	4,56	0,41	0,67
	Fêmur 8	6,72	0,33	0,94
5	Fêmur 1	2,38	0,43	0,20
	Fêmur 2	3,56	0,46	0,37
	Fêmur 3	2,13	0,42	0,25
	Fêmur 4	3,86	0,33	0,36
	Fêmur 5	4,53	0,60	0,64
	Fêmur 6	1,77	0,43	0,83
	Fêmur 7	1,51	0,44	0,04
	Fêmur 8	3,44	0,43	0,88

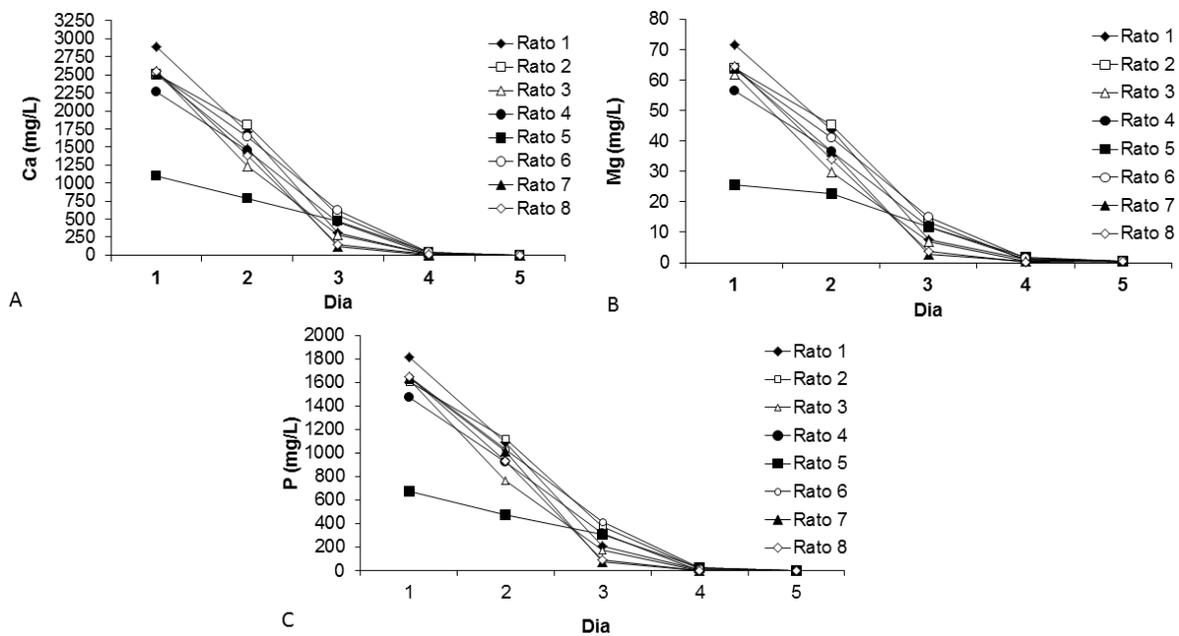


Figura 7: Mensuração, por meio de espectrometria de emissão óptica, da quantidade de Ca (A), Mg (B) e P (C) presente na solução de EDTA ao longo dos cinco dias de experimento.

A Figura 8 ilustra a TCQ das 8 amostras e a Tabela 4 apresenta os valores da densidade mineral óssea presente nas 8 amostras no final do experimento I.

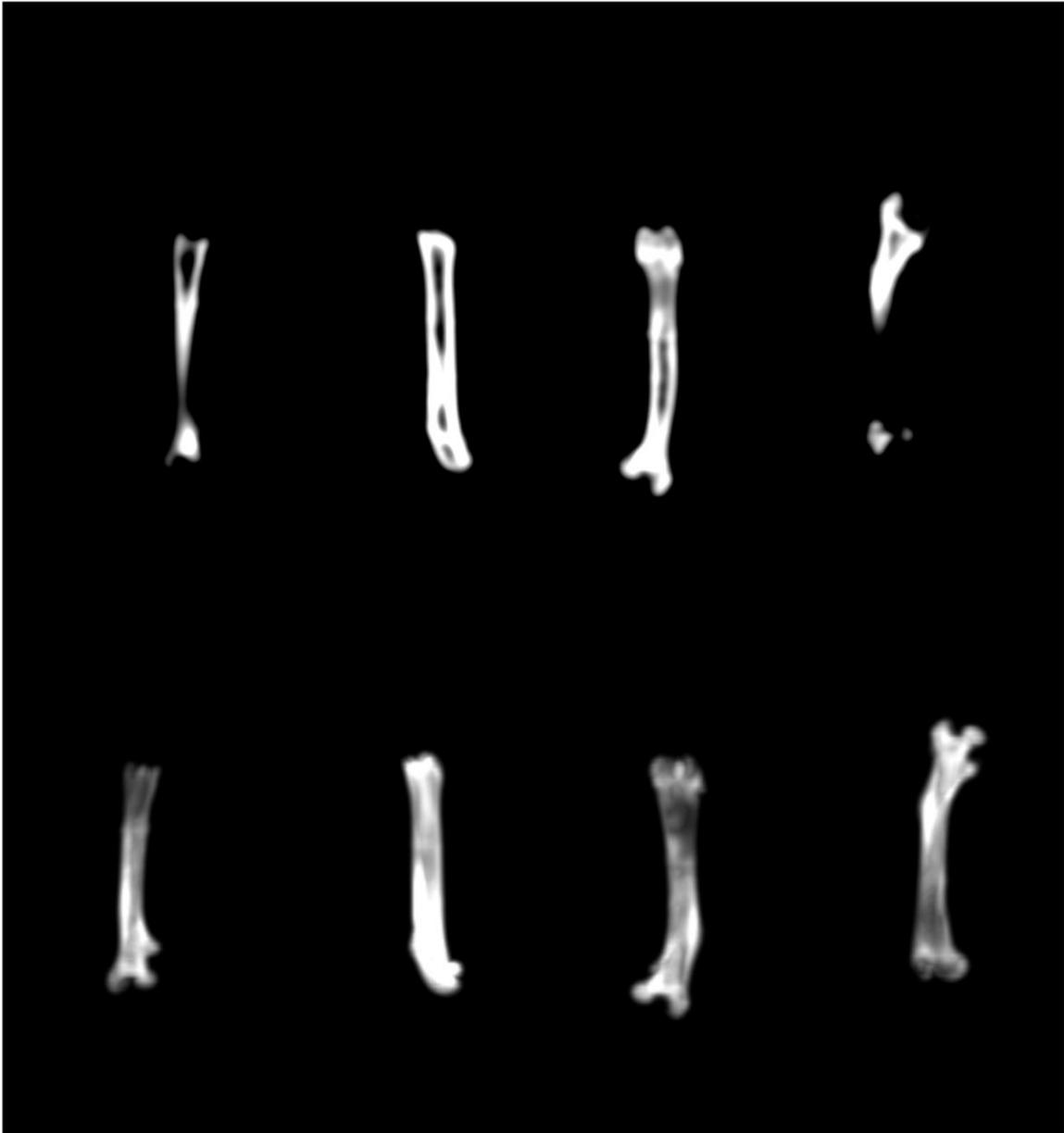


Figura 8: tomografias das 8 amostras realizadas após 5 dias de desmineralização por EDTA.

Tabela 4: valores médios e desvios padrão (DP) das densidades minerais ósseas (DMO) nas 8 amostras, adquiridas no último dia do experimento.

DMO (HU)	Amostras (Fêmur)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Média	-693,83	-761,75	-812,79	-818,27	-725,37	-715,67	-661,35	-768,56
DP	22,88	32,78	36,18	21,52	40,13	28,71	30,08	24,97

A Tabela 5 apresenta os valores médios e desvio padrão dos parâmetros AIB, FSAB, IRC e FSIR para cada dia.

Tabela 5: média e desvio padrão (DP) dos parâmetros AIB, FSAB, IRC e FSIR para cada amostra/dia.

Amostras	AIB (dB)					
	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
Fêmur 1	-44,52	-44,15	-49,43	-21,59	-29,32	-26,83
Fêmur 2	-43,79	-44,83	-32,66	-24,42	-31,27	-30,80
Fêmur 3	-42,29	-28,57	-23,62	-23,86	-24,58	-24,42
Fêmur 4	-42,19	-38,56	-42,56	-27,22	-39,21	-31,22
Fêmur 5	-30,94	-25,42	-21,70	-22,87	-26,38	-21,82
Fêmur 6	-44,03	-47,60	-34,99	-21,02	-31,60	-22,84
Fêmur 7	-42,69	-47,25	-23,66	-17,14	-32,28	-34,08
Fêmur 8	-40,27	-41,25	-26,31	-20,00	-33,34	-25,50
Amostras	FSAB (dB/MHz)					
	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
Fêmur 1	-4,41	-3,45	-1,66	-6,89	-5,30	-4,92
Fêmur 2	-5,49	-3,35	-7,29	-7,45	-2,99	-3,52
Fêmur 3	-3,17	-1,34	-7,09	-6,31	-3,60	-6,31
Fêmur 4	-3,58	-2,27	-3,69	-0,69	-5,60	-4,44
Fêmur 5	-1,89	-0,33	-5,54	-4,85	-3,35	-5,14
Fêmur 6	-4,24	-4,71	-5,77	-5,87	-3,25	-3,96
Fêmur 7	-5,56	-3,32	-4,96	-5,20	-3,76	-4,29
Fêmur 8	-2,53	-2,43	-2,00	-1,18	-2,34	-4,46
Amostras	IRC (dB)					
	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5

	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
Fêmur 1	-15,47	-19,99	-20,40	-27,40	-31,66	-28,30
Fêmur 2	-15,92	-17,59	-16,69	-19,87	-32,56	-31,13
Fêmur 3	-20,73	-20,77	-21,98	-24,29	-31,70	-35,70
Fêmur 4	-18,25	-19,35	-19,63	-26,11	-35,42	-37,39
Fêmur 5	-17,78	-17,94	-16,95	-29,92	-29,50	-29,57
Fêmur 6	-17,03	-22,45	-19,83	-22,75	-28,80	-28,48
Fêmur 7	-18,22	-17,21	-22,75	-24,83	-26,17	-27,31
Fêmur 8	-22,29	-18,93	-19,36	-28,99	-31,44	-33,38
	FSIR (dB/MHz)					
Amostras	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
Fêmur 1	-3,28	-3,07	-4,28	-6,15	-2,49	-5,53
Fêmur 2	-5,33	-2,40	-4,59	-3,39	-1,91	-3,01
Fêmur 3	-4,11	-4,27	-3,70	-4,91	-3,00	-5,16
Fêmur 4	-4,59	-2,08	-5,49	-3,47	-4,37	-3,94
Fêmur 5	-2,59	-2,21	-3,89	-4,59	-0,50	-5,54
Fêmur 6	-2,11	-3,77	-4,44	-4,81	-6,06	-6,53
Fêmur 7	-2,66	-5,61	-3,80	-5,28	-2,77	-6,42
Fêmur 8	-3,42	-2,76	-4,89	-4,51	-4,45	-3,69

As amostras apresentaram comportamento semelhante nos 4 parâmetros ao longo do processo de desmineralização. Os parâmetros de reflexão (IRC e FSIR), durante a desmineralização, apresentaram tendência à diminuição, enquanto o parâmetro de retroespalhamento (AIB) apresentou tendência a aumentar, e o FSAB demonstrou-se oscilatório sem tendência definida, como é observado na Figura 9.

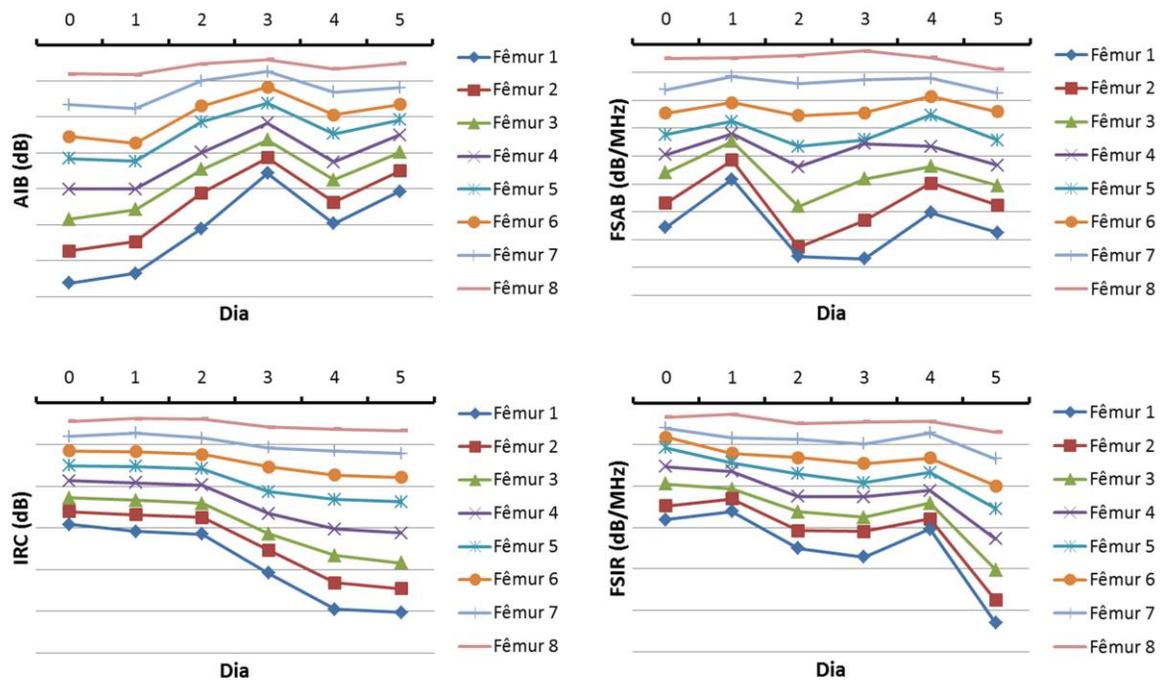


Figura 9: Comportamento das 8 amostras de acordo com cada parâmetro de QUS durante o processo de desmineralização.

Os parâmetros de reflexão (IRC e FSIR) apresentaram maiores coeficientes de determinação com a DMO, ($R^2 = 0,93$) e ($R^2 = 0,54$), respectivamente. Enquanto, os parâmetros de retroespalhamento (AIB e FSAB) apresentaram menores coeficientes de determinação ($R^2 = 0,47$) e ($R^2 = 0,05$). A Figura 10 apresenta a disposição dos dados.

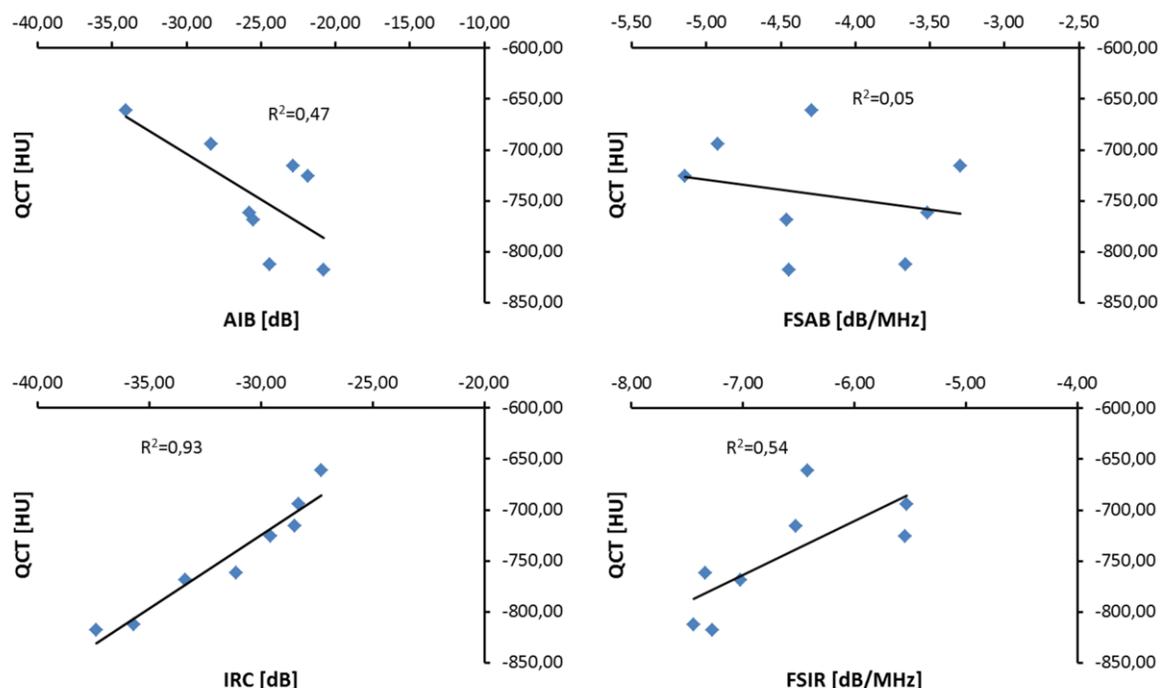


Figura 10: ajuste linear dos parâmetros de retroespalhamento (AIB e FSAB) e reflexão (IRC e FSIR) com as DMO após todo o processo de desmineralização.

Experimento II

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, nas dosagens de Fosfatase alcalina [$F(6,49) = 1,25$; $P = 0,30$] e Cálcio sérico [$F(6,49) = 1,78$; $P = 0,12$]. No entanto, houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle com o grupo ooforectomizados 45 dias [$t(14) = 2,62$; $IC95\% = 1,14 - 11,36$; $P = 0,02$] na dosagem de Fosfatase alcalina e houve diferença estatisticamente significativa, também, entre o grupo controle e grupo ooforectomizado 30 dias [$t(14) = -2,73$; $IC95\% = -0,82 - -0,10$; $P = 0,02$] na dosagem de Cálcio sérico. A Tabela 6 apresenta a média e o desvio padrão das dosagens de Fosfatase alcalina e Cálcio sérico.

Tabela 6: Média e desvio padrão das dosagens de Fosfatase alcalina e Cálcio sérico nos diferentes grupos

Grupo	Fosfatase alcalina (U/L) ^a	Cálcio sérico (mg/dL) ^b
-------	---------------------------------------	------------------------------------

	Controle	30	35	40	45	50	55
Média	415,05	395,87	474,33	449,21	364,26	418,52	373,07
DP	64,66	171,16	194,90	217,31	174,09	176,44	112,42

A Tabela 8 apresenta os valores médios e desvios padrão dos parâmetros AIB, FSAB, IRC e FSIR para cada grupo.

Tabela 8: média e desvio padrão (DP) dos parâmetros AIB, FSAB, IRC e FSIR para cada grupo.

Grupos	AIB (dB)	FSAB (dB/MHz)	IRC (dB)	FSIR (dB/MHz)
Controle	-43,98	-5,09	-26,96	-4,23
30	-43,93	-2,79	-25,27	-3,75
35	-46,11	-3,26	-27,47	-4,42
40	-44,08	-3,08	-24,68	-3,85
45	-40,66	-4,10	-27,18	-3,95
50	-40,57	-5,74	-19,91	-5,03
55	-45,98	-3,19	-20,14	-3,18

DISCUSSÃO

Neste capítulo se discutem os resultados encontrados nas duas etapas experimentais, bem como se comparam aos estudos de outros autores.

Foi proposto avaliar e monitorar a qualidade óssea da diáfise do fêmur, por meio de parâmetros de retroespalhamento e reflexão de ultrassom quantitativo em dois modelos animais in vitro: 1 - desmineralização por EDTA e, 2 - modelo animal de osteoporose. Para atingir este objetivo, foram utilizados quatro parâmetros (AIB, FSAB, IRC e FSIR) para avaliar e monitorar os 8 ossos que sofreram desmineralização por EDTA e 30 fêmures de animais ooforectomizados.

Devido ao fato das amostras estudadas apresentarem pequenas dimensões e por se tratar de amostras de tecido ósseo, foi utilizado um transdutor de 5 MHz, pois tecidos altamente ecoicos como o osso, necessitam de frequências baixas para penetrar mais no tecido, mas que ainda permita uma melhor resolução em comparação a transdutores de frequências inferiores (CHAFFAI et al., 2002; FORTIN et al., 2003; LAUGIER et al., 1997). O uso do rato *Rattus norvegicus albinus*, linhagem Wistar, como modelo animal, justifica-se por apresentar propriedades patofisiológicas e biomecânicas similares aos ossos humanos (BLOUIN; BASLÉ; CHAPPARD, 2005; LELOVAS et al., 2008), além de ser de fácil obtenção e manuseio em pesquisas científicas. É consagrado na literatura que estudos em ratos são de grande importância para a avaliação de doenças metabólicas ósseas (BLOUIN; BASLÉ; CHAPPARD, 2005; FONTES-PEREIRA et al., 2013a; LELOVAS et al., 2008), assim os resultados são mais susceptíveis de serem semelhantes aos esperados em humanos e, assim, aproximar a tecnologia estudada da utilização clínica. Poucos são os estudos de parâmetros ultrassônicos utilizados em ratos. Acredita-se que mesmo os ratos apresentando propriedades mais similares aos dos humanos, com exceção dos primatas, para esses estudos, eles são poucos utilizados devido às pequenas dimensões dos seus ossos.

Na literatura há diversos testes de parâmetros ultrassônicos para caracterização óssea, sendo em modelos numéricos e em modelos animais, como bovinos (LEE, 2009),

ovinos (BARBIERI et al., 2012) e roedores (FONTES-PEREIRA et al., 2014a). Em 2011, ocorreu um grande salto nos estudos de caracterização óssea por ultrassom, pois Machado *et al.* (2011) estudaram o efeito da mineralização do osso cortical por meio de simulações numéricas e medições por dois parâmetros de transmissão axial em apenas um osso bovino, após sofrer ação do EDTA. Dessa forma, espera-se que a presente pesquisa pretendeu avançar um pouco mais nessa direção, uma vez que apresenta a monitorização em oito ossos de ratos e utilizou cinco parâmetros ultrassônicos.

Na presente pesquisa, foi adotada a aquisição do sinal ultrassônico em varredura de três pontos controlados por posicionador estereostático, assegurando uma aquisição realizada dentro da ROI, a fim de adquirir sinais com menores influências das variações anatômicas e, portanto, uma pequena variação no sinal, o que está de acordo com o trabalho de Matusin *et al.* (2009) e Pereira et al. (2012).

Em estudos anteriores, o AIB demonstrou potencial para caracterizar tecidos moles (BRIDAL *et al.*, 1997; CHÉRIN *et al.*, 1998). Na literatura, os parâmetros, aqui propostos, já foram utilizados para a caracterização óssea (FERREIRA et al., 2010; HOFFMEISTER et al., 2008; PEREIRA et al., 2011), no entanto, analisando um número menor de detalhes. Não é do nosso conhecimento, até a presente data, que haja registro na literatura da aplicação desses parâmetros nos dois modelos aqui propostos.

Há consenso de que a densidade mineral óssea (DMO) é o principal parâmetro para o diagnóstico da osteoporose, bem como para a predição de fraturas e de controle de tratamentos. Absorciometria com Raios-X de Dupla Energia (DXA) e Tomografia Computadorizada Quantitativa (TCQ) são duas técnicas ionizantes para estimar a DMO. A TCQ é mais sensível do que a DXA, no entanto a TCQ é mais dispendiosa e apresenta riscos mais elevados de radiação para obter melhor qualidade (BERGOT et al., 2001; BLACK et al., 2008). Além disso, sabe-se que mesmo com a avaliação clínica indicando osteoporose, em alguns casos, a DXA não é sensível e não detecta a osteoporose (LI et al., 2003). De acordo com Seo et al. (2014), é pertinente a discussão sobre a exatidão e as diferenças dos valores para detectar alterações ósseas entre a DMO, TCQ e DXA.

Uma alternativa relevante para a avaliação da DMO é o QUS, que apresenta muitas vantagens, dentre elas: baixo custo de manutenção, fácil manuseio e radiação não ionizante (FONTES-PEREIRA et al., 2014a; MACHADO, 2013). Os parâmetros calculados a partir dos sinais de rádiofrequência (RF) do ultrassom são preditivos da qualidade do tecido ósseo.

O principal constituinte mineral do osso é um fosfato de cálcio, sob a forma de hidroxiapatita. O magnésio também tem um papel fundamental no equilíbrio mineral ósseo, uma vez que está diretamente relacionado com a formação/secreção de hormônios que regulam a homeostase do esqueleto e as funções das células ósseas, bem como atuam no crescimento e formação de cristais de hidroxiapatita. Vários protocolos de descalcificação têm sido propostos nos últimos anos (BOWMAN et al., 1996; SILVA et al., 2006), alguns deles aplicados para avaliar o efeito da desmineralização nos parâmetros QUS (MACHADO et al., 2011).

No presente estudo, a desmineralização foi realizada em ossos de ratos em diferentes graus de descalcificação com um cuidado especial para a padronização e consolidação do protocolo de desmineralização pelo EDTA. Este é o primeiro estudo a fazer este tipo de análise em um grande número amostra de ratos Wistar. Uma das contribuições desse trabalho é o emprego de ossos de rato, quatro potenciais parâmetros QUS (especialmente de reflexão e parâmetros de retroespalhamento), e análise de vários elementos químicos relacionados com a densidade e qualidade óssea, o cálcio, fósforo e magnésio.

No presente estudo foi possível perceber que as correlações entre os elementos minerais foram positivas e muito fortes. É sabido que a matriz inorgânica é formada predominantemente por Ca e P, na forma de cristais de hidroxiapatita, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, sendo responsável pelas propriedades de rigidez e resistência à compressão. Dessa forma, a extração proporcional desses dois íons sugere que a desmineralização por EDTA ocorreu de tal forma que alterou, além da densidade do osso, a qualidade óssea. Assim, o modelo de desmineralização por EDTA apresenta potencial para estudos de parâmetros de QUS para fins clínicos. Além disso, a forte correlação entre os elementos ratifica os estudos que

mostram a relação da ingestão de Mg com a qualidade óssea. O Mg atua como regulador da entrada e saída de cálcio, assim, controlando o metabolismo de cálcio para manutenção da homeostase sanguínea e adequação da formação da matriz óssea. Além disso, ele também participa da ativação da vitamina D, importante para a absorção de cálcio pelos ossos. Rude et al. (2009) sugerem que a baixa ingestão de Mg pode prejudicar a secreção do hormônio da paratireóide (PTH) repercutindo na hipocalcemia e até em osteoporose. Assim, a forte correlação entre os elementos reforça a necessidade da análise dos outros elementos, além do cálcio, em estudos de caracterização óssea por QUS. Apenas a dosagem de cálcio no osso não garante a qualidade óssea.

Os parâmetros apresentaram, de forma geral, uma correlação moderada com a quantidade de minerais que foram extraídos por EDTA. Esse resultado sugere que os parâmetros ultrassônicos, principalmente o IRC, tem potencial para ser utilizado como ferramenta para detectar a diminuição da qualidade óssea. Possivelmente, o modelo de desmineralização utilizado, não extrai de forma homogênea os minerais, assim, uma vez que alcança a região trabecular nas epífises ósseas, os minerais serão mais extraídos dessa região devido a maior superfície de contato, então os ossos que tiveram a região trabecular atingida primeiro, foram os ossos que mais repeliram os minerais e a grande maioria dos minerais foi oriunda da região trabecular, o que pode ter provocado uma menor correlação com os parâmetros AIB e FSAB. Sugere-se que em estudos que almejam utilizar esse método de desmineralização, desmineralize apenas a região óssea que será atingida pelo feixe ultrassônico, preservando as outras áreas intactas.

A primeira mudança notável aconteceu no parâmetro IRC, no terceiro dia, onde uma queda acentuada foi observada indicando uma importante desmineralização na superfície da diáfise do osso. Tal tendência até o 4º dia e estabilizou-se no 5º dia. No que se refere ao parâmetro AIB ele cresceu progressivamente com a desmineralização até o 3º dia. Uma diminuição brusca aconteceu no 4º dia que foi o mesmo dia em que o parâmetro IRC atingiu o seu mínimo. Seria de se esperar que o parâmetro AIB continuasse na sua rota de crescimento. Essa diminuição brusca parece indicar a existência de uma estrutura ainda muito calcificada, que poderia ter sido provocado pela distribuição de tensão no osso (Lei

de Wolff). Já no 5º dia o parâmetro AIB voltou a crescer, sugerindo que o EDTA desmineralizou esta barreira.

A densidade mineral óssea foi mensurada a partir da superfície do osso pelo TCQ, sendo assim, pode-se pensar que, conforme diminua a densidade da região cortical, aumentaria o AIB e FSAB na mesma proporção. Entretanto, a maior quantidade de energia que penetra no osso sofre atenuação o que provoca a diminuição da energia retroespalhada. Este fato pode explicar a menor correlação entre os parâmetros de retroespalhamentos (AIB e FSAB) e os valores de TCQ quanto comparados com os parâmetros de reflexão (IRC e FSIR).

De forma geral, fica claro que existe uma grande relação da perda de minerais do osso com o comportamento das ondas ultrassônicas, pois os ossos que apresentaram menores densidades minerais óssea, quantificados por tomografia, apresentaram menores valores dos parâmetros de reflexão (IRC e FSIR) e maior valor de um parâmetro de retroespalhamento (AIB), após a desmineralização.

No 5º dia não ocorreu muita diferença para os parâmetros de IRC e AIB em relação ao dia anterior. Isso está de acordo com as curvas de decaimento, pois do 4º para o 5º dia, os valores de perda de Ca, Mg e P foram praticamente zero. Isto é mais uma indicação que o QUS é sensível a essa alteração de minerais.

Os valores médios encontrados em IRC para o dia 0 (ossos íntegros) foram levemente maiores que os encontrados em um estudo anterior em ratos Wistar *in vivo* (FONTES-PEREIRA et al., 2014a). Acredita-se que, no presente estudo, o fato de se usar um osso sem tecido mole influenciou para uma maior diferença de impedância entre a interface água/osso, assim refletindo mais. Devido a esse fato, pode-se justificar, também, os valores menores em FSAB e FSIR. O parâmetro AIB permaneceu semelhante ao encontrado nos estudos de Fontes-Pereira et al. (2014c) e Matusin et al. (2009). Dessa forma, a presente pesquisa apresenta uma forma indicação que estudos em *in vivo* alteram de forma significativa os parâmetros de reflexão e retroespalhamento.

Quanto ao estudo dos parâmetros em amostras de fêmures de ratos ooforectomizados, os parâmetros não apresentaram as mesmas tendências do estudo em

amostras desmineralizadas por EDTA e todos foram estatisticamente indiferenciáveis entre os grupos. As análises dos marcadores bioquímicos, Fosfatase alcalina (enzima que indica a atividade de osteoblastos, que determinam formação ou reabsorção óssea (ALVARENGA et al., 2010; YANG et al., 2005b) e Cálcio sérico, que indica o processo de síntese de matriz óssea (KORSTJENS et al., 2004) mostrou que houve diferença entre o grupo controle e o grupos ooforectomizados. Assim, sugere que esse método animal de osteoporose, avaliado por esses marcadores, alterou a qualidade óssea.

Não foi detectada diferença significativa para nenhum dos parâmetros ultrassônicos. Algumas das possíveis explicações são: 1 - a osteoporose começou a ocorrer de dentro para fora, partindo do osso trabecular e não alterando a região cortical na diáfise; 2 - Segundo Yerramshetty e Akkus (2012) a osteoporose não necessariamente altera a densidade mineral óssea e Atmaca et al. (2013) não detectou diferença em 14 dias de raios X, isto está compatível com a não diferenciação estatística entre tomografias realizadas nesse estudo; 3 - o modelo de ooforectomia utilizado ainda que consagrado, aparentemente nunca foi investigado no ponto de vista radiográfico. Neste caso seria aconselhável que tal estudo devesse ser feito para que se garantisse em que estado de osteoporose há modificação radiográfica detectável e assim, poder investigar caracterização óssea por parâmetros ultrassônicos.

CONCLUSÃO

O modelo de desmineralização em ossos de ratos *in vitro*, aqui proposto, apresentou potencial para ser utilizado como modelo para estudos de ultrassom quantitativo. O protocolo proposto para avaliar e monitorar a qualidade óssea por meio de parâmetros de retroespalhamento e reflexão de ultrassom quantitativo em modelo animal *in vitro*, demonstrou-se promissor. A presente pesquisa sugere que os parâmetros ultrassônicos de reflexão são mais sensíveis do que os parâmetros de retroespalhamento (AIB e FSAB) para detectar a desmineralização óssea por EDTA, sendo que o IRC é mais acurado.

O parâmetro AIB mostrou-se complementar aos parâmetros de reflexão, pois pareceu sofrer a influência, mesmo que em menor proporção, da desmineralização óssea.

O modelo de osteoporose baseado em ooforectomia não causou mudanças estatisticamente significativas nos parâmetros ultrassônicos nem tomográficos, sendo isso uma indicação para a sua inadequação para tal estudo. Necessário se faria um estudo mais acurado desse modelo para estudar a sua sensibilidade a métodos que incluam radiação (raios X e ultrassom).

Entre os passos futuros, pretende-se utilizar a monitoração por QUS e TQC na monitoração da consolidação óssea em modelo de ratos, possivelmente com e sem a aplicação de células tronco nas fraturas.

REFERÊNCIAS

ALVARENGA, É. C. et al. Low-intensity pulsed ultrasound-dependent osteoblast proliferation occurs by via activation of the P2Y receptor: role of the P2Y 1 receptor. **Bone**, v. 46, n. 2, p. 355–362, 2010.

ATMACA, H.; AYDIN, A.; MUSAOĞLU, R. Experimental model of osteoporosis: comparison between ovariectomy and botulinum toxin A. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 21, n. 6, p. 340–343, 2013.

BAMBER, J. C. Ultrasonic properties of tissues. **Ultrasound in medicine**, p. 57–88, 1998a.

BAMBER, J. C. Ultrasonic properties of tissues. **Ultrasound in medicine**, p. 57–88, 1998b.

BARBIERI, G. et al. Ultrasonometric evaluation of bone healing: Experimental study using a model of diaphyseal transverse osteotomy of sheep tibiae. **Ultrasound in medicine & biology**, v. 32, n. 6, p. 875–882, 2006.

BARBIERI, G. et al. A Comparative Analysis between Ultrasonometry and Computer-Aided Tomography to Evaluate Bone Healing. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 30, n. 7, p. 1076–1082, 1 jul. 2012.

BARONCELLI, G. I. et al. Assessment of Bone Quality by Quantitative Ultrasound of Proximal Phalanges of the Hand and Fracture Rate in Children and Adolescents with Bone and Mineral Disorders. **Pediatric Research**, v. 54, n. 1, p. 125–136, jul. 2003.

BAXTER, G. M.; ALLAN, P. L. P.; MORLEY, P. **Clinical Diagnostic Ultrasound**. [s.l.] Wiley, 1999.

BBC - GCSE Bitesize: Bone growth. Disponível em: <http://www.bbc.co.uk/schools/gcsebitesize/pe/appliedanatomy/2_anatomy_skeleton_rev4.shtml>. Acesso em: 9 jun. 2016.

BERGOT, C. et al. A comparison of spinal quantitative computed tomography with dual energy X-ray absorptiometry in European women with vertebral and nonvertebral fractures. **Calcified tissue international**, v. 68, n. 2, p. 74–82, 2001.

BILEZIKIAN, J. P.; RAISZ, L. G.; MARTIN, T. J. **Principles of Bone Biology: Two-Volume Set**. [s.l.] Academic Press, 2008.

BLACK, D. M. et al. Proximal femoral structure and the prediction of hip fracture in men: a large prospective study using QCT. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 23, n. 8, p. 1326–1333, 2008.

BLOUIN, S.; BASLÉ, M. F.; CHAPPARD, D. Rat models of bone metastases. **Clinical & experimental metastasis**, v. 22, n. 8, p. 605–614, 2005.

BONADIO, J. Tissue engineering via local gene delivery:: Update and future prospects for enhancing the technology. **Advanced drug delivery reviews**, v. 44, n. 2, p. 185–194, 2000.

BONEWALD, L. F. The Amazing Osteocyte. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 26, n. 2, p. 229–238, fev. 2011.

BOSSY, E. et al. Three-dimensional simulation of ultrasound propagation through trabecular bone structures measured by synchrotron microtomography. **Physics in medicine and biology**, v. 50, n. 23, p. 5545, 2005.

BOWMAN, S. M. et al. The tensile behavior of demineralized bovine cortical bone. **Journal of biomechanics**, v. 29, n. 11, p. 1497–1501, 1996.

BRIDAL, S. L. et al. Parametric (integrated backscatter and attenuation) images constructed using backscattered radio frequency signals (25-56 MHz) from human aortae in vitro. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 23, n. 2, p. 215–229, 1997.

BRITO, N. M. B.; LAMARÃO, L. G.; DAMOUS, S. H. Estudo colpocitológico de ratas ooforectomizadas. **Rev. para. med**, v. 14, n. 3, p. 25–8, 2000.

BUENZLI, P. R.; SIMS, N. A. Quantifying the osteocyte network in the human skeleton. **Bone**, v. 75, p. 144–150, 1 jun. 2015.

BUSSE, J. W. et al. The effect of low-intensity pulsed ultrasound therapy on time to fracture healing: a meta-analysis. **Canadian Medical Association Journal**, v. 166, n. 4, p. 437–441, 2002.

CALIGIURI, P.; GIGER, M. L.; FAVUS, M. Multifractal radiographic analysis of osteoporosis. **Medical physics**, v. 21, n. 4, p. 503–508, 1994.

CHAFFAI, S. et al. Frequency dependence of ultrasonic backscattering in cancellous bone: Autocorrelation model and experimental results. **The Journal of the Acoustical Society of America**, v. 108, n. 5, p. 2403–2411, 2000.

CHAFFAI, S. et al. Ultrasonic characterization of human cancellous bone using transmission and backscatter measurements: relationships to density and microstructure. **Bone**, v. 30, n. 1, p. 229–237, 2002.

CHAN, C. W. et al. Low intensity pulsed ultrasound accelerated bone remodeling during consolidation stage of distraction osteogenesis. **Journal of orthopaedic research**, v. 24, n. 2, p. 263–270, 2006.

CUMMINGS, S. R. et al. Originally published as Volume 1, Issue 8837 Bone density at various sites for prediction of hip fractures. **The Lancet**, v. 341, n. 8837, p. 72–75, 9 jan. 1993.

DALECKI, D. Mechanical Bioeffects of Ultrasound. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 6, n. 1, p. 229–248, 15 ago. 2004.

DE SOUSA, V. L. et al. Ultra-som pulsado de baixa intensidade em fraturas diafisárias: aplicação clínica em cães. **Ciencia rural**, v. 38, n. 4, p. 1030–1037, 2008.

DIMITRIOU, R.; TSIRIDIS, E.; GIANNOUDIS, P. V. Current concepts of molecular aspects of bone healing. **Injury**, v. 36, n. 12, p. 1392–1404, dez. 2005.

DOAN, N. et al. In vitro effects of therapeutic ultrasound on cell proliferation, protein synthesis, and cytokine production by human fibroblasts, osteoblasts, and monocytes. **Journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 57, n. 4, p. 409–419, 1999.

DONALD, I.; MACVICAR, J.; BROWN, T. G. Investigation of abdominal masses by pulsed ultrasound. **Lancet (London, England)**, v. 1, n. 7032, p. 1188–1195, 7 jun. 1958.

DUARTE, L. R. The stimulation of bone growth by ultrasound. **Archives of orthopaedic and traumatic surgery**, v. 101, n. 3, p. 153–159, 1 abr. 1983.

DUARTE, L. R. **Method for healing bone fractures with ultrasound**. [s.l.] Google Patents, 1985.

EINHORN, T. A.; GERSTENFELD, L. C. Fracture healing: mechanisms and interventions. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 11, n. 1, p. 45–54, jan. 2015.

ERIKSON, K. R.; FRY, F. J.; JONES, J. P. Ultrasound in Medicine-A Review. **IEEE Transactions on Sonics and Ultrasonics**, v. 21, n. 3, p. 144–170, jul. 1974.

EVANGELISTA, R. A. et al. Estudo do efeito ultra-sônico na consolidação óssea. **Fisioter. Bras**, v. 4, n. 2, p. 139–143, 2003.

FERREIRA, M. L. et al. Characterization of pseudarthrosis with ultrasound backscattered signals in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 25, n. 1, p. 13–17, fev. 2010.

FISH, P. **Physics and instrumentation of diagnostic medical ultrasound**. [s.l.] John Wiley & Sons Incorporated, 1990.

FONTES-PEREIRA, A. et al. **Use of Ultrasonic Parameters as Adjuvant Tool for Diagnosis and Monitoring of Bone Lesions**. International Work-Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering. **Anais...2013a** Disponível em: <http://iwbbio.ugr.es/papers/iwbbio_040.pdf>. Acesso em: 29 maio. 2016

FONTES-PEREIRA, A. et al. Ultrasound method applied to characterize healthy femoral diaphysis of Wistar rats in vivo. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 47, n. 5, p. 403–410, 2014a.

FONTES-PEREIRA, A. et al. ASSESSMENT OF BONE DECALCIFICATION BY QUANTITATIVE ULTRASONIC PARAMETERS IN ANIMAL MODEL. 2014b.

FONTES-PEREIRA, A. et al. Ultrasound method applied to characterize healthy femoral diaphysis of Wistar rats in vivo. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 47, n. 5, p. 403–410, maio 2014c.

FONTES-PEREIRA, A. J. et al. The effect of low-intensity therapeutic ultrasound in induced fracture of rat tibiae. **Acta ortopédica brasileira**, v. 21, n. 1, p. 18–22, 2013b.

FORTIN, M. et al. Dynamic measurement of internal solid displacement in articular cartilage using ultrasound backscatter. **Journal of Biomechanics**, v. 36, n. 3, p. 443–447, mar. 2003.

FRÉZ, A. R. et al. Efeito do ultra-som terapêutico contínuo em placas epifisárias de coelhos. **Rev Bras Med Esporte**, v. 12, n. 3, p. 150–152, 2006.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de histologia em cores. Tradução de Adriana Paulino do Nascimento**. [s.l.] Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

GEBAUER, D. et al. Low-intensity pulsed ultrasound: effects on nonunions. **Ultrasound in medicine & biology**, v. 31, n. 10, p. 1391–1402, 2005.

HADJIARGYROU, M. et al. Enhancement of fracture healing by low intensity ultrasound. **Clinical orthopaedics and related research**, v. 355, p. S216–S229, 1998.

HAKULINEN, M. A. et al. Ability of ultrasound backscattering to predict mechanical properties of bovine trabecular bone. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 30, n. 7, p. 919–927, 1 jul. 2004.

HAKULINEN, M. A. et al. Ultrasonic characterization of human trabecular bone microstructure. **Physics in medicine and biology**, v. 51, n. 6, p. 1633, 2006.

HARVEY, E. N.; LOOMIS, A. L. High frequency sound waves of small intensity and their biological effects. **Nature**, v. 121, p. 622–624, 1928.

HEFTI, E. et al. Use of dermestid beetles for cleaning bones. **Calcified Tissue International**, v. 31, n. 1, p. 45–47, 1980.

HOFFMEISTER, B. K. et al. Ultrasonic characterization of human cancellous bone in vitro using three different apparent backscatter parameters in the frequency range 0.6-15.0 MHz.

Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control, IEEE Transactions on, v. 55, n. 7, p. 1442–1452, 2008.

Ian Donald (1910-1987). Disponível em: <<http://www.sciencemuseum.org.uk/broughttolife/people/iandonald>>. Acesso em: 29 maio. 2016.

ITO, M. et al. Effects of ultrasound and 1, 25-dihydroxyvitamin D 3 on growth factor secretion in co-cultures of osteoblasts and endothelial cells. **Ultrasound in medicine & biology**, v. 26, n. 1, p. 161–166, 2000.

ITO, N.; FINDLAY, D. M.; ATKINS, G. J. Osteocyte Communication with the Kidney Via the Production of FGF23: Remote Control of Phosphate Homeostasis. **Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism**, v. 12, n. 1, p. 44–58, 28 jan. 2014.

JENSON, F. et al. In vitro ultrasonic characterization of human cancellous femoral bone using transmission and backscatter measurements: relationships to bone mineral density. **The Journal of the Acoustical Society of America**, v. 119, n. 1, p. 654–663, 2006.

JOHNELL, O.; KANIS, J. A. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. **Osteoporosis International**, v. 17, n. 12, p. 1726–1733, 16 set. 2006.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. L.; OTHERS. **Histologia básica**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=FVL.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mf=008081>>. Acesso em: 29 maio. 2016.

KANIS, J. A. et al. The diagnosis of osteoporosis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 9, n. 8, p. 1137–1141, 1 ago. 1994.

KAUFMAN, J. J.; LUO, G.; SIFFERT, R. S. **On the relative contributions of absorption and scattering to ultrasound attenuation in trabecular bone: A simulation study**. Ultrasonics, 2003 IEEE Symposium on. **Anais...IEEE**, 2003 Disponível em: <http://ieeexplore.ieee.org/xpls/abs_all.jsp?arnumber=1293195>. Acesso em: 29 maio. 2016

KODA-KIMBLE, M. A.; YOUNG, L. Y. **Applied Therapeutics: Clinical Use of Drugs**. [s.l.] Springer, 2016.

KOKUBU, T. et al. Low intensity pulsed ultrasound exposure increases prostaglandin E 2 production via the induction of cyclooxygenase-2 mRNA in mouse osteoblasts. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 256, n. 2, p. 284–287, 1999.

KORSTJENS, C. M. et al. Stimulation of bone cell differentiation by low-intensity ultrasound—a histomorphometric in vitro study. **Journal of orthopaedic research**, v. 22, n. 3, p. 495–500, 2004.

LAUGIER, P. et al. In vitro assessment of the relationship between acoustic properties and bone mass density of the calcaneus by comparison of ultrasound parametric imaging and quantitative computed tomography. **Bone**, v. 20, n. 2, p. 157–165, 1997.

LAUGIER, P. Instrumentation for in vivo ultrasonic characterization of bone strength. **IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control**, v. 55, n. 6, p. 1179–1196, jun. 2008.

LEE, K. I. Relationships of bone density with quantitative ultrasound parameter in bovine cancellous bone. **Journal of the Korean Physical Society**, v. 54, n. 1, p. 71–74, 2009.

LELOVAS, P. P. et al. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. **Comparative medicine**, v. 58, n. 5, p. 424, 2008.

LI, J. K. et al. Cytokine release from osteoblasts in response to ultrasound stimulation. **Biomaterials**, v. 24, n. 13, p. 2379–2385, 2003.

LINKHART, T. A.; MOHAN, S.; BAYLINK, D. J. Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF β and BMP. **Bone**, v. 19, n. 1, p. S1–S12, 1996.

LIRANI, A. P. R. **Estudo comparativo dos efeitos do ultra-som e do laser de baixa intensidade no reparo ósseo de tibia de rato**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2004.

LIRANI, A. P. R.; LAZARETTI-CASTRO, M. Evidências da ação de agentes físicos sobre o metabolismo do tecido ósseo e seus potenciais usos clínicos. **Arq. bras. endocrinol. metab**, v. 49, n. 6, p. 891–896, 2005.

LITTLER, T. S.; KNIGHT, J. J.; STRANGE, P. H. Hearing by bone conduction and the use of bone-conduction hearing aids. **Proceedings of the Royal Society of Medicine**, v. 45, n. 11, p. 783, 1952.

MACHADO, C. B. et al. Characterization of in vitro healthy and pathological human liver tissue periodicity using backscattered ultrasound signals. **Ultrasound in medicine & biology**, v. 32, n. 5, p. 649–657, 2006.

MACHADO, C. B. et al. Experimental and simulation results on the effect of cortical bone mineralization in ultrasound axial transmission measurements: A model for fracture healing ultrasound monitoring. **Bone**, v. 48, n. 5, p. 1202–1209, 2011.

MACHADO, C. B. **Ultrasound in Bone Fractures: from Assessment to Therapy**. [s.l.] Nova Science Publishers, Incorporated, 2013.

MARKS, S. C.; HERMEY, D. C. The structure and development of bone. **Principles of bone biology**, v. 1, p. 3–8, 1996.

MARSHALL, D.; JOHNELL, O.; WEDEL, H. Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures. **BMJ**, v. 312, n. 7041, p. 1254–1259, 18 maio 1996.

MATUSIN, D. P. Estudo preliminar de caracterização ultrassônica da pseudoartrose. **Rio de Janeiro, RJ. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica)-Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ**, 2009.

MAYR, E.; FRANKEL, V.; RÜTER, A. Ultrasound – an alternative healing method for nonunions? **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery**, v. 120, n. 1–2, p. 1–8, jan. 2000.

MEZIRI, M. et al. In vitro chronic hepatic disease characterization with a multiparametric ultrasonic approach. **Ultrasonics**, v. 43, n. 5, p. 305–313, mar. 2005.

NICHOLSON, P. H. F. et al. Scattering of ultrasound in cancellous bone: predictions from a theoretical model. **Journal of biomechanics**, v. 33, n. 4, p. 503–506, 2000.

NIGG, B. M.; HERZOG, W. **Biomechanics of the musculo-skeletal system**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2007.

Osteoporosis | International Osteoporosis Foundation. Disponível em: <<http://www.iofbonehealth.org/osteoporosis>>. Acesso em: 19 jun. 2015.

OURY, F. et al. Endocrine Regulation of Male Fertility by the Skeleton. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 796–809, 4 mar. 2011.

PADILLA, F. et al. Numerical simulation of wave propagation in cancellous bone. **Ultrasonics**, v. 44, p. e239–e243, 2006.

PADILLA, F.; PEYRIN, F.; LAUGIER, P. Prediction of backscatter coefficient in trabecular bones using a numerical model of three-dimensional microstructure. **The Journal of the Acoustical Society of America**, v. 113, n. 2, p. 1122–1129, 2003.

PARKER, K. J. Ultrasonic attenuation and absorption in liver tissue. **Ultrasound in medicine & biology**, v. 9, n. 4, p. 363–369, 1983.

PASTORE, K. Futuro frágil. Pesquisa internacional revela que médicos e pacientes não sabem tratar a osteoporose. **Revista Veja. Ed**, v. 1658, n. 19, p. 7, 2000.

PEREIRA, A. J. F. et al. **In vivo characterization of long-bone in animal model by two ultrasonic scattering parameters: AIB and FSAB**. Health Care Exchanges (PAHCE),

2011 Pan American. **Anais...** In: HEALTH CARE EXCHANGES (PAHCE), 2011 PAN AMERICAN. mar. 2011

PEREIRA, A. J. F. et al. **In vivo characterization of long-bone in animal model by ultrasonic reflection parameters: IRC and FSIR.** Health Care Exchanges (PAHCE), 2012 Pan American. **Anais...IEEE**, 2012Disponível em: <http://ieeexplore.ieee.org/xpls/abs_all.jsp?arnumber=6233452>. Acesso em: 29 maio. 2016

PEREIRA, A. J. F. **CARACTERIZAÇÃO DA DIÁFISE DO FÊMUR POR REFLEXÃO E RETROESPALHAMENTO ULTRASSÔNICO EM MODELO ANIMAL IN VIVO e IN VITRO.** [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.

PETERSON, D. R.; BRONZINO, J. D. **Biomechanics: Principles and Applications, Second Edition.** [s.l.] CRC Press, 2007.

PHILLIPS, A. M. Overview of the fracture healing cascade. **Injury**, v. 36, n. 3, p. S5–S7, 2005.

PILLA, A. A. et al. Non-invasive low-intensity pulsed ultrasound accelerates bone healing in the rabbit. **Journal of orthopaedic trauma**, v. 4, n. 3, p. 246–253, 1990.

POTHUAUD, L. et al. Fractal analysis of trabecular bone texture on radiographs: discriminant value in postmenopausal osteoporosis. **Osteoporosis International**, v. 8, n. 6, p. 618–626, 1998.

Professor Ian Donald, pioneer of Ultrasonography in Obstetrics and Gyanecology. Disponível em: <<http://www.ob-ultrasound.net/iandonaldbio.html>>. Acesso em: 29 maio. 2016.

REHER, P. et al. The stimulation of bone formation in vitro by therapeutic ultrasound. **Ultrasound in medicine & biology**, v. 23, n. 8, p. 1251–1258, 1997.

REHER, P. et al. Effect of ultrasound on the production of IL-8, basic FGF and VEGF. **Cytokine**, v. 11, n. 6, p. 416–423, 1999.

RHO, J.-Y.; KUHN-SPEARING, L.; ZIOUPOS, P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. **Medical engineering & physics**, v. 20, n. 2, p. 92–102, 1998.

ROBERJOT, V. et al. Absolute backscatter coefficient over a wide range of frequencies in a tissue-mimicking phantom containing two populations of scatterers. **Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control, IEEE Transactions on**, v. 43, n. 5, p. 970–978, 1996.

ROSE, F. R.; OREFFO, R. O. Bone tissue engineering: hope vs hype. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 292, n. 1, p. 1–7, 2002.

RUDE, R. K.; SINGER, F. R.; GRUBER, H. E. Skeletal and Hormonal Effects of Magnesium Deficiency. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 28, n. 2, p. 131–141, 1 abr. 2009.

SAMBROOK, P.; COOPER, C. Osteoporosis. **Lancet (London, England)**, v. 367, n. 9527, p. 2010–2018, 17 jun. 2006.

SANT'ANNA, E. F. et al. Effect of low intensity pulsed ultrasound and BMP-2 on rat bone marrow stromal cell gene expression. **Journal of orthopaedic research**, v. 23, n. 3, p. 646–652, 2005.

SATO, M. et al. Osteocytes Regulate Primary Lymphoid Organs and Fat Metabolism. **Cell Metabolism**, v. 18, n. 5, p. 749–758, 5 nov. 2013.

SEEMAN, E. Modeling and remodeling: the cellular machinery responsible for the gain and loss of bone's material and structural strength. **Principles of bone biology**, v. 1, p. 3–28, 2008.

SEO, S. H.; LEE, J.; PARK, I. H. Efficacy of Dual Energy X-ray Absorptiometry for Evaluation of Biomechanical Properties: Bone Mineral Density and Actual Bone Strength. **Journal of bone metabolism**, v. 21, n. 3, p. 205–212, 2014.

SILVA, M. J. et al. Decreased collagen organization and content are associated with reduced strength of demineralized and intact bone in the SAMP6 mouse. **Journal of bone and mineral research**, v. 21, n. 1, p. 78–88, 2006.

SIMS, N.; BUENZLI, P. **Brainy bones: the hidden complexity inside your skeleton**. Disponível em: <<http://theconversation.com/brainy-bones-the-hidden-complexity-inside-your-skeleton-38713>>. Acesso em: 3 jun. 2016.

SPADARO, J. A.; ALBANESE, S. A. Application of low-intensity ultrasound to growing bone in rats. **Ultrasound in medicine & biology**, v. 24, n. 4, p. 567–573, 1998.

TAKIKAWA, S. et al. Low-intensity pulsed ultrasound initiates bone healing in rat nonunion fracture model. **Journal of ultrasound in medicine**, v. 20, n. 3, p. 197–205, 2001.

University of Glasgow :: Story :: Biography of Ian Donald. Disponível em: <<http://www.universitystory.gla.ac.uk/biography/?id=WH2489&type=P>>. Acesso em: 1 jun. 2016.

WEAR, K. A. Frequency dependence of ultrasonic backscatter from human trabecular bone: Theory and experiment. **The Journal of the Acoustical Society of America**, v. 106, n. 6, p. 3659–3664, 1999.

WEAR, K. A.; ARMSTRONG, D. W. The relationship between ultrasonic backscatter and bone mineral density in human calcaneus. **IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control**, v. 47, n. 4, p. 777–780, 1999.

WELLS, P. N. T. **Biomedical ultrasonics**. [s.l.] Academic Pr, 1977.

Who are candidates for prevention and treatment for osteoporosis? **Osteoporosis International**, v. 7, n. 1, p. 1–6, jan. 1997.

YANG, K.-H. et al. Exposure to low-intensity ultrasound increases aggrecan gene expression in a rat femur fracture model. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 14, n. 5, p. 802–809, 1996.

YANG, L. et al. Distribution of bone density in the proximal femur and its association with hip fracture risk in older men: The osteoporotic fractures in men (MrOS) study. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 27, n. 11, p. 2314–2324, 1 nov. 2012.

YANG, R.-S. et al. Regulation by ultrasound treatment on the integrin expression and differentiation of osteoblasts. **Bone**, v. 36, n. 2, p. 276–283, 2005a.

YANG, R.-S. et al. Regulation by ultrasound treatment on the integrin expression and differentiation of osteoblasts. **Bone**, v. 36, n. 2, p. 276–283, 2005b.

YERRAMSHETTY, J.; AKKUS, O. Changes in Cortical Bone Mineral and Microstructure with Aging and Osteoporosis. In: SILVA, M. J. (Ed.). . **Skeletal Aging and Osteoporosis**. Studies in Mechanobiology, Tissue Engineering and Biomaterials. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 2012. p. 105–131.

YOUNG, B. H.; PENG, H.; HUARD, J. Muscle-based gene therapy and tissue engineering to improve bone healing. **Clinical orthopaedics and related research**, v. 403, p. S243–S251, 2002.

ZEHNDER, Y. et al. Long-term changes in bone metabolism, bone mineral density, quantitative ultrasound parameters, and fracture incidence after spinal cord injury: a cross-sectional observational study in 100 paraplegic men. **Osteoporosis International**, v. 15, n. 3, p. 180–189, 13 jan. 2004.

ARTIGOS NO DOUTORADO

Artigos relacionados com a tese

Publicados:

Ultrasound method applied to characterize healthy femoral diaphysis of Wistar rats in vivo - 2014 (Brazilian Journal of Medical and Biological Research)

Use of Ultrasonic Parameters as Adjuvant Tool for Diagnosis and Monitoring of Bone Lesions – 2013 (Proceedings of International Work-Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering).

Assessment of bone decalcification by quantitative ultrasonic parameters in animal model – 2014 (Proceedings of XXIV Brazilian Congress on Biomedical Engineering).

Artigos submetidos:

The influence of low-intensity physiotherapeutic ultrasound on the initial stage of bone healing in rats: an experimental and simulation study - 2016 (Journal of Therapeutic Ultrasound).

Monitoring of calcium, magnesium and phosphorus loss in rat femurs using quantitative ultrasound and computed tomography (Brazilian Journal of Physical Therapy).

Artigos publicados relacionados com o tema de ultrassom:

Effect of low-intensity therapeutic ultrasound on wound healing in rats subjected to third-degree burns (Acta Cirúrgica Brasileira).

Radiation force balance as a resource to estimate attenuation of high power continuous ultrasound from insertion loss measurements - 2014 (Proceedings of XXIV Brazilian Congress on Biomedical Engineering).

Avaliação da potência ultrassônica durante um ano de um equipamento de ultrassom fisioterapêutico - 2014 (Proceedings of XXIV Brazilian Congress on Biomedical Engineering).

Ultrasound propagation in fractures with intramedullary nailing - 2014 (Proceedings of XXIV Brazilian Congress on Biomedical Engineering).

Modelo computacional aplicado à análise do tipo de fratura óssea usando ultrassom quantitativo - 2014 (Proceedings of XXIV Brazilian Congress on Biomedical Engineering).