



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Estudo de densitometria óssea de cães SRD com as propriedades físicas e químicas.

DANY BRUNO BORELLA DOS SANTOS GROSSKLAUSS

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Biologia Geral e Aplicada, área de concentração *Biologia Celular Estrutural e Funcional*.

Orientador: Prof. Dr. Joel Mesa Hormaza

BOTUCATU – SP

2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Estudo de densitometria óssea de cães SRD com as propriedades
físicas e químicas.

DANY BRUNO BORELLA DOS SANTOS GROSSKLAUSS

ORIENTADOR: PROF. DR. JOEL MESA HORMAZA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Biologia Geral e Aplicada, área de concentração *Biologia Celular Estrutural e Funcional*.

Orientador: Prof. Dr. Joel Mesa Hormaza

BOTUCATU – SP

2011

À minha mãe,
meu pai e minha
avó.

RESUMO

Existem enfermidades em animais vertebrados associadas à estrutura do tecido ósseo que afetam diretamente o sistema locomotor do animal. Tratando-se de um endoesqueleto, o diagnóstico dessas patologias torna-se abstruso *in vivo*. A caracterização física da estrutura do tecido ósseo de animais sadios torna-se uma grande ferramenta no diagnóstico comparativo de animais vivos. Existem várias técnicas para determinação da densidade mineral óssea, e uma delas que merece destaque é a densitometria óptica; que vem desenvolvendo muito com o avanço da informática e possui um baixo custo.

O objetivo desse trabalho foi avaliar e discutir a metodologia da densitometria óptica, realizando uma comparação com o método de imersão em água. O método de imersão em água também foi utilizado para avaliar os efeitos do peso, sexo e idade do grupo de animais na densidade mineral óssea de cães sem raça definida (SRD).

As amostras foram cedidas pelo Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu-SP e pelo canil municipal da cidade de Araras, sendo de cães machos e fêmeas. Foram utilizadas as partes dos membros anteriores direitos da região da articulação úmero-rádio-ulnar de cada animal e submetidas aos métodos citados acima para obtenção da densidade mineral óssea. Posteriormente as amostras foram moídas para a realização da análise química para a determinação das concentrações de cálcio nessas amostras e determinar-se uma possível correlação com a densidade óssea.

O trabalho apresentou para densidade mineral óssea média em cães SRD um valor de $3,080 \pm 0,582$ milímetros de alumínio para o método de densitometria óptica e de $1,630 \pm 0,125$ g/cm³ para o método de imersão, sendo a correlação entre os métodos dada pela seguinte equação: $y = 0,197x + 0,824$, sendo a densidade mineral óssea em milímetros de alumínio representado por y e a densidade mineral óssea em g/cm³ pela variável x .

O método de imersão em água apesar de ser pouco utilizado na área de densidade óssea, demonstrou ser de grande utilidade para pesquisa e acompanhamento de outros métodos como calibração e checagem de resultados.

Este método pode ser extremamente útil quando se deseja estudar também pequenas variações de densidade mineral óssea, pois o mesmo apresenta excelente precisão, e tem uma aplicação simples e rápida e apresenta um baixo custo.

ABSTRACT

There are some diseases in vertebrates associated with the structure of bone tissue that directly affect the locomotor system of the animal. In the case of an endoskeleton, the diagnosis of these diseases becomes abstruse “in vivo”. The characterization of the physical structure of the bone tissue of healthy animals becomes a great tool in comparative diagnosis in live animals. There are several techniques for determining bone mineral density, and one that deserves mention is the optical density. It is a technique that has been developing a lot with the advancement of information technology and has a low cost.

The objective of this study was to evaluate and discuss the methodology of optical density, doing a comparison with the method of immersion in water. The water immersion method was also used to further evaluate the effect of weight, sex and age on bone mineral density of mongrel dogs.

The samples were provided by the Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine of Botucatu and the kennel in the city of Araras, being male and female dogs. Were used the share rights of former members of the joint area humerus radio-ular of each animal and subjected to the above methods to obtain bone mineral density. Subsequently, the samples were ground for holding the chemical analysis for the determination of calcium concentrations in these samples and to determine a possible correlation with bone density.

The work presented for average bone mineral density in mongrel dogs a value of 3.080 ± 0.582 mm aluminum for the method of optical densitometry and 1.630 ± 0.125 g/cm³ for the immersion method, and the correlation between the methods given by the following equation: $y = 0.197 x + 0.824$, and bone mineral density in millimeters of aluminum is represented by y in bone mineral density in g/cm³ by the variable x.

The method of immersion in water although it is little used in the area of bone density, proved to be very useful for research and other tracking methods such as calibration and check results.

This method can be extremely useful to study small variations in bone mineral density, because it has excellent accuracy, and has a quick and easy application and provides a low cost.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida.

Aos meus orientadores e amigos Prof^o Joel Mesa Hormaza e Prof^o Marcos Antônio Rezende, por acreditarem em mim, e fazerem parte da minha vida nos momentos bons e ruins, por serem exemplos de profissional.

Ao Prof^o Vladimir Eliodoro Costa e ao funcionário Edson Marcelo Bruder pela ajuda durante os experimentos do projeto e também as risadas para descontrair o nosso dia a dia.

Ao meu pai, José Ernesto. Não importa onde esteja estou certo de que ele está torcendo muito por mim.

À minha mãe que sempre me incentivou a alcançar caminhos cada vez mais distantes, sempre dando conselhos e puxões de orelha. O maior exemplo na minha vida.

Ao meu avó Guilherme e minhas avós Flávia e Neyde que sempre me incentivaram e me deram carinho.

À minha família, pela formação que me permitiu ter, com os sacrifícios que só ela sabe quais foram, esta que é meu orgulho e meu suporte em todo momento.

A todos meus amigos que moraram na república RT e os que ainda moram nela, pelos bons momentos e pelas “bagunças”, em especial Arthur Nakayama e Murillo Longo que me aturam desde o primeiro dia de faculdade.

Aos amigos, do Departamento de Física e Biofísica, pela companhia nos momentos acadêmicos e pela agradável presença nos momentos de descontração. que sempre me ajudaram e me atrapalharam, que acabaram se tornando pessoas importantes diariamente.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, ao Instituto de Biociências de Botucatu, ao Departamento de Física e Biofísica e aos professores, que me ajudaram a chegar onde estou hoje e me forneceram toda estrutura necessária para que este trabalho pudesse ser desenvolvido.

À todos aqueles que, por um lapso, esqueci de mencionar e que foram importantes para a realização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Foto mostrando: a) Osso após Processo 1: Limpeza; b)Osso após Processo 2: Confecção, com divisão da amostra em 5 partes.....	19
Figura 2: Imagem de entrada do programa Cromox 3.1 Vet.....	21
Figura 3: Imagem representando a balança tarada.....	21
Figura 4: Esquema do arranjo experimental utilizado no método de Archimedes.....	22
Figura 5: Gráfico da Relação da densitometria óptica utilizando amostras de cães SRD de porte médio com e sem tecido mole	26
Figura 6: Gráfico da relação entre as densidades ósseas utilizando os métodos de densitometria óptica e imersão em água.....	27
Figura 7: Gráfico dos valores médios da DMO (g/cm^3) em cães SRD, em função da posição das amostras considerando os grupos por faixa de peso.....	30
Figura 8: Gráfico dos valores médios da DMO (g/cm^3) em cães SRD, relacionando a concentração de cálcio com os grupos por faixa de peso.....	31
Figura 9: Gráfico dos valores médios da DMO (g/cm^3) em cães SRD, em função da posição das amostras considerando os grupos por faixa de peso.....	32
Figura 10: Gráfico dos Valores médios da DMO (g/cm^3) em cães SRD, em função da posição das amostras considerando os grupos por faixa de idade.....	33
Figura 11: Gráfico dos valores médios da DMO (g/cm^3) em cães SRD, relacionando a concentração de cálcio com os grupos por faixa de idade.....	34
Figura 12: Gráfico dos valores médios da DMO (g/cm^3) em cães SRD, em função da posição das amostras considerando os grupos por faixa de idade.....	35
Figura 13: Gráfico dos valores médios da DMO (g/cm^3) em cães SRD, em função da posição das amostras considerando os grupos por faixa de idade.....	37
Figura 14: Gráfico dos valores médios da DMO (g/cm^3) em cães SRD, relacionando a concentração de cálcio com os grupos por sexo.....	37
Figura 15: Gráfico dos valores médios da DMO (g/cm^3) em cães SRD, em função da posição das amostras considerando o sexo do animal.....	38
Figura 16: Gráfico dos valores médios da porosidade do tecido ósseo de cães SRD, em função da posição da amostra.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores da densitometria óptica em cães SRD de porte médio com e sem tecido mole.....	25
Tabela 2: Médias e desvios padrão da DMO em gramas por centímetro cúbico (g/cm^3) em cães SRD, considerando os grupos por faixa de peso.....	30
Tabela 3: Valores obtidos da DMO (g/cm^3) em cães SRD, considerando os subgrupos em função do peso de acordo com a posição na amostra.....	31
Tabela 4: Médias e desvios padrões da DMO (g/cm^3) em cães SRD, considerando os grupos por faixa de idade.....	33
Tabela 5: Valores obtidos da DMO (g/cm^3) em cães SRD, considerando os subgrupos em função do idade de acordo com a posição na amostra.....	34
Tabela 6: Valores Médios e desvios padrão da DMO (g/cm^3) em cães SRD, considerando o sexo.....	36
Tabela 7: Valores obtidos da DMO (g/cm^3) em cães SRD, considerando os subgrupos em função do sexo de acordo com a posição na amostra.....	38
Tabela 8: Interação entre a DMO e os parâmetros peso, idade, sexo e concentração de cálcio.....	39
Tabela 9: Análise estatística descritiva da DMO em grama por centímetros cúbicos, para os subgrupos de peso (P1, P2 E P3), idade (A1, A2 e A3) e sexo (M e F).....	40
Tabela 10: Valores obtidos da densidade de partículas, massas secas e volumes das partículas com seus respectivos valores médios e desvios padrões.....	40

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	III
AGRADECIMENTOS	V
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	VIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1 Tecido Ósseo	6
2.2 Importâncias fisiológicas do cálcio	7
2.3 Atenuação dos raios-X e radiação gama	8
2.4 Evolução da mensuração da densidade mineral óssea	9
2.4.1 Métodos clínicos	9
2.4.2 Métodos laboratoriais	12
3. OBJETIVOS	15
4. MATERIAL E MÉTODO	17

	X
4.1 Arranjo experimental e Amostragem	17
4.1.1 Etapa 1: Aspectos metodológicos.	18
4.1.2 Etapa 2: Densidade mineral óssea em função dos parâmetros peso, idade e sexo	19
4.2 Metodologia	19
4.2.1 Ensaio da influência do tecido mole na densidade mineral óssea	19
4.2.2 Técnica de Densitometria Óptica	20
4.2.3 Método de Imersão	21
4.2.4 Método de determinação da densidade das partículas e porosidade	23
4.3 Análises Químicas	24
4.4 Análise Estatística	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
6. CONCLUSÃO	42
7. BIBLIOGRAFIA	43
8. APÊNDICE	49

1. INTRODUÇÃO

Os ossos do esqueleto têm muitas funções importantes. Estes são os principais elementos estruturais do corpo, protegendo órgãos vitais e fornecendo uma estrutura rígida para a locomoção (MORGAN e BOUXSEIN, 2008). A qualidade óssea é um termo que se refere aos efeitos de fatores esqueléticos que contribuem para a resistência, mas que não pode ser avaliada por medidas da massa, e sim pela sua densidade (HERNADEZ e KEAVENY, 2006).

O conhecimento das propriedades físicas dos materiais, tais como densidade, umidade, porosidade e resistência mecânica são extremamente importantes para o estudo de suas estruturas e está relacionado com seus parâmetros de qualidade. As propriedades físicas dos ossos mostram relações importantes da variação do metabolismo.

A densidade mineral óssea é um parâmetro biofísico de grande importância experimental e clínica, que permite avaliar o processo de mineralização óssea (LOUZADA et al., 1997). Ela é definida como a razão entre a massa e o volume do osso, e se mostrou útil na determinação do risco de fraturas consequentes da osteoporose e pode ajudar a identificar indivíduos que provavelmente se beneficiam com a prevenção desta doença (JEFFCOAT et al., 2000).

A osteoporose é uma doença caracterizada pela perda da massa e pela deterioração da estrutura óssea e, conseqüentemente, uma diminuição da densidade mineral óssea. O critério mais utilizado para avaliar a osteoporose é definido pela Organização Mundial de Saúde (BLAKE, 2008).

Durante as últimas duas décadas, diferentes definições de osteoporose tem sido propostas, incluindo medidas qualitativas e quantitativas (LÖFMAN ET al.,2000). Existem muitas maneiras de avaliar a força dos ossos e estimar o risco de fratura em laboratórios de pesquisa, poucos são práticos na clínica devido ao tempo, equipamentos e especialidades (DAVISON et al., 2009). Algumas técnicas de imagem têm sido desenvolvidas para quantificar, de maneira mais sensível a massa óssea, estas utilizando radiações ionizantes ou ultrassom. A acurácia e a precisão variam entre os métodos.

A avaliação da densidade mineral óssea é extremamente importante para o diagnóstico da osteoporose (WILKIE et. al., 2004). A mensuração desta é de grande importância no diagnóstico inicial e prematuro da osteoporose. Como resultado, a técnica de densitometria óssea tem se tornado altamente importante nestes casos (GENANT et. al.,1991), assim como na determinação de terapias mais eficazes. (LESLIE et. al., 2005).

Antes do advento de técnicas quantitativas, como a densitometria óssea, o termo “osteoporose” era atribuído a um paciente que havia sofrido uma fratura de osso que era inexplicável por qualquer outra doença. Ou seja, um diagnóstico de osteoporose foi alcançado por exclusão. Para muitos médicos e da maioria do público afetado era visto como uma consequência inevitável do envelhecimento. Em 1947, Albright, reconheceu a osteoporose, até então não considerada uma doença, como uma desordem do metabolismo do tecido, que considerou haver uma diminuição relativa no anabolismo ósseo. Ele também reconheceu as contribuições de envelhecimento, a menopausa, corticosteróides, nutrição e a diminuição da tensão mecânica como fatores que contribuem para a doença. A situação era que se tinha uma doença, mas não havia meios de identificar vítimas ou de seguir a história natural da perda de óssea ou de avaliar o impacto de qualquer intervenção sobre as consequências aparentemente inexorável da doença. (WEBBER, 2006).

A primeira manifestação do princípio da densitometria óssea foi feita pelo físico alemão Wilhelm Conrad Röntgen, ao radiografar a mão de sua esposa em 1895. Porém as radiografias convencionais não têm sensibilidade suficiente para permitir o diagnóstico de perda da densidade mineral óssea. Vários estudos em humanos demonstraram que perdas ósseas de 30% a 50% devem ocorrer antes que as alterações sejam detectadas visualmente (LAUTEN, 2001).

Posteriormente, as técnicas de radiação ionizante emergiram como as mais úteis e práticas, na avaliação rotineira do osso e no diagnóstico e tratamento de pacientes com osteoporose. Naturalmente, outras técnicas de densitometria têm sido aplicadas com sucesso nessa

área e qualquer história credível de medição de osteoporose remete a outros métodos (GENANT et. al. 1996).

A absorção de fótons monoenergéticos (*Single Photon Absorptiometry* - SPA) foi o primeiro método prático de medida não invasiva da densidade mineral óssea, estando limitada a medir sítios ósseos que estivessem imersos em água ou embebidos em materiais com as mesmas propriedades de absorção do tecido mole (GRIER et.al., 1996).

A absorção de fótons de duas energias (*Dual Photon Absorptiometry* - DPA) foi desenvolvida para superar algumas das limitações da SPA, podendo medir sítios que não estejam circundados por uma constante espessura de tecido mole, como a coluna lombar e fêmur proximal, fornecendo a composição corporal e mineral total do organismo. Porém, esta técnica conta com a desvantagem prática do longo tempo do exame (GRIER et al., 1996).

Na medicina veterinária esses métodos têm sido empregados, mas com alguns inconvenientes, relacionados ao fato de que o animal ao ser examinado, deve permanecer imóvel durante 10 a 15 minutos, sendo necessária a utilização de determinados anestésicos para a realização do exame (TOOL et al., 1994).

No caso de diagnósticos mais precisos, em determinadas alterações que afetam o tecido ósseo se faz necessário correlacionar o valor da densidade mineral óssea com os teores de macronutrientes e micronutrientes no osso do animal a ser examinado, objetivando uma padronização de valores que possam auxiliar no estabelecimento de protocolos terapêuticos que ajudem na recuperação das osteopatias (LEAL, 2002).

Outras técnicas têm sido utilizadas para a medida da densidade mineral óssea *in vivo*, como a tomografia computadorizada quantitativa (*Quantitative Computed Tomography* - QCT), que é capaz de medir o osso trabecular, sítios do esqueleto axial e periférico, alcançando alta sensibilidade para diagnosticar perdas de massas ósseas relacionadas com a idade ou processos doentios. Porém, este é um procedimento caro e a dose de radiação empregada é 30 vezes maior que a utilizada na técnica de absorção de raios X de duas energias (DXA) (GRIER et.al., 1996).

A densitometria óptica em imagem radiográfica é outra técnica que ganhou projeção na medicina veterinária decorrente aos avanços da área de informática (LOUZADA et al., 1998), porém seus resultados são fornecidos numa escala de milímetros de alumínio (mmAl), e não no Sistema Internacional de Unidade (SI), relevando a importância de uma padronização das unidades de medidas para comparação com outras técnicas.

A utilização da técnica de densitometria óssea tem sofrido modificações e a calibração desses equipamentos tornou-se importante para obtenção do resultado confiável e reprodutível. Sendo assim um método semelhante é utilizado como base a fim de checar os resultados obtidos, e a calibração dos equipamentos para melhoria da metodologia.

Alguns estudos foram realizados com a técnica de densitometria óptica. Utilizando fragmentos de peças ósseas para avaliar esclerose subcondral nas osteoartrites em cavalos selvagens, através da densitometria óptica radiográfica, foi constatado que há um aumento da densidade mineral óssea na região examinada. Este aumento foi justificado pela esclerose do osso subcondral, causada pelo uso do membro (CANTLEY et al.,(1999).

Frank et al. (2002) examinaram cortes transversais do terço médio da diáfise do úmero de cães de várias idades e encontraram que a quantidade de microdanos e a porosidade aumentam com a idade, sendo esse aumento relativamente pequeno quando comparado à espécie humana. Com relação ao sexo dos animais (fêmeas castradas ou não e machos castrados ou não), não foi observado efeito significativo na porosidade e quantidade de microdanos ósseos.

Outros modelos animais têm sido amplamente utilizados para correlacionar alterações “in vivo” na densidade mineral óssea com alterações patológicas nos ossos. As radiografias convencionais foram superadas, em alguns casos, pelas técnicas de tomografia computadorizada quantitativa e absorção de raios-X duo-energéticos. No entanto, há alguns empecilhos no uso dos métodos computadorizados, principalmente em pequenos animais (HAIDEKKER et al., 2004).

O cão apesar de não ser o modelo animal ideal para o estudo da osteoporose, por causa da sua insuficiência para desenvolver significativa osteopenia (patologia que consiste na diminuição da densidade mineral dos ossos), está entre os animais experimentais mais comumente utilizados para os estudos do metabolismo ósseo, avaliando tratamentos instituídos para impedir perdas ósseas ou restituir massa óssea, e avaliar respostas à exercícios físicos (GRIER et al., 1996).

Em muitos aspectos, o osso do cão é um excelente modelo para o estudo das mudanças ósseas relacionadas com a idade na espécie humana. O esqueleto adulto de ambas as espécies contém uma fração similar de osso compacto (80%), e é similar na composição e características microscópicas, exhibe perda óssea mais rápida nas fêmeas e mostram respostas similares a fatores que influenciam o metabolismo ósseo, como hormônios, drogas e imobilização (DRAPER, 1994).

Outro método bastante utilizado para determinação da densidade mineral óssea é o de imersão em fluidos, baseado no princípio de Arquimedes (KEENAN, 1997). Este princípio utiliza medidas da força de empuxo para determinar o volume da amostra, a explicação para isso é que por ser empuxo uma força verticalmente dirigida para cima, que tende a equilibrar o corpo, o valor numérico fornecido pelo *display* da balança em gramas será igual ao empuxo em gramas-força, porém este método é quase que desconhecido quando se trata de densidade mineral óssea. Keenan, 1997, realizou um estudo comparando um software de análise de densidade mineral óssea para pequenos animais usando DXA com o princípio de Arquimedes (método de imersão), obtendo como resultado que o princípio de Arquimedes é o mais adequado para a avaliação *in vitro* de ossos sem tecido mole (ocos).

Assim o trabalho tem como objetivo propor uma metodologia simples (Método de Imersão em Água) que tem grandes aplicações em diversas áreas nas determinações de densidade, mas ainda pouco aplicada para a mensuração densidade mineral óssea.

Ainda neste trabalho pretende-se avaliar e discutir a metodologia da densitometria óptica realizando uma comparação com o método de imersão em água.

O método de imersão em água foi utilizado também para avaliar o efeito do peso, sexo e idade do grupo de animal na densidade mineral óssea de membros anteriores direitos da região da articulação úmero-rádio-ulnar de cães.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tecido Ósseo

O tecido ósseo, denominado de tecido conjuntivo vascular, é constituído de células e matriz intercelular calcificada, e pode se caracterizar como denso (compacto) ou esponjoso (trabecular). O osso esponjoso é encontrado no interior das epífises ou cabeças de ossos longos e está sempre envolvido por osso compacto. O osso esponjoso é assim chamado por apresentar grandes espaços porosos rodeados por placas ósseas que se anastomosam. O osso compacto é muito mais denso do que o osso esponjoso, sendo seus espaços porosos muito menores e sua organização muito mais precisa e desenvolvida (DOBLARÉ, 2004).

A matriz intercelular calcificada é constituída basicamente de bases inorgânicas (minerais) e bases orgânicas (proteínas) se mostrando um tecido muito desenvolvido e importante no controle de diversos fenômenos como, por exemplo, suporte de reserva iônico, hematopoiese, além de sustentação e proteção (DOBLARÉ, 2004).

Distribuídas em fibras organizadas de forma a darem maior sustentação a tensões aplicadas ao longo do osso, a base orgânica é constituída de colágeno, representando valores na ordem de 90% da constituição total e se mostrando uma proteína importante no processo de mineralização óssea. A base inorgânica é composta fundamentalmente de cálcio e fósforo sob a forma de fosfato de cálcio, agrupados para a formação de estruturas cristalinas semelhantes à hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ que são depositadas diante as fibras de colágeno no osso (CHAN e BASS, 2006).

Caracterizado como um tecido dinâmico, o tecido ósseo se depara com constantes mudanças estruturais geradas pelos processos de crescimento, modelação e remodelação do osso. Destaque para as mudanças de forma, tamanho, disposição estrutural e quantidade está o crescimento do tecido, ficando para a modelação apenas as mudanças a nível microscópico como orientação espacial das fibras de colágeno para melhoramento de resistência óssea. A remodelação, predominante no tecido ósseo trabecular devido à maior área de contato entre o tecido mineralizado e o tecido orgânico, está ligado a estímulos externos e internos e se destaca por ser um processo de regeneração espontâneo (YOSHIKAWA, 2007).

2.2 Importâncias fisiológicas do cálcio

O Ca é o principal mineral do esqueleto e um dos cátions mais abundantes no organismo, representando cerca de 2% do peso corporal, ou seja, de 1000 a 1500 g no indivíduo adulto. Aproximadamente 99% do Ca corporal encontra-se no esqueleto, principalmente sob a forma de cristais de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. O restante (1%) encontra-se nos dentes, tecidos moles e no fluido extracelular. Cerca de 1% do Ca ósseo é livremente intercambiável com o cálcio do fluido extracelular. O Ca é absorvido no intestino delgado e sua concentração plasmática é medida pela ação dos hormônios 1,25 - diidróxicolecalciferol (vitamina D3), calcitonina e hormônio da paratireóide (PTH), onde controlam sua absorção, excreção e o metabolismo ósseo (HENRY, 1995).

A resistência óssea é dependente dos níveis de cálcio plasmáticos, pois, a homeostase de Ca é fundamental para a manutenção das funções vitais em que participa. Caso não se tenha níveis adequados de Ca, ocorrerá estímulo da secreção de PTH e síntese de vitamina D, que estimularão a reabsorção óssea (RATH et al, 2000).

Embora a porcentagem de cinzas dos ossos varie com a idade, o teor de Ca, que é o seu maior constituinte, se mantém relativamente constante, variando pouco entre espécies e localização anatômica dos ossos (FIELD, 2000).

O P e o Ca em conjunto formam a hidroxiapatita, que é o principal componente da matriz inorgânica do osso. Estes participam das funções celulares como componentes de fosfolípidos da membrana celular, dos ácidos nucleicos, do transporte de energia e da regulação da atividade de várias enzimas (Henry, 1995). O intestino delgado realiza a absorção do P, prin-

principalmente no duodeno. Os níveis sanguíneos, assim como os do Ca, são controlados pelo PTH, vitamina D e calcitonina (KÄRLKÄINEN, 1996).

2.3 Atenuação dos raios-X e radiação gama

Um feixe de raios-X e radiação gama ao atravessar uma material sofrerá atenuação (ou Absorção) que depende diretamente da espessura e das características físicas do material absorvedor.

Para um feixe monoenergético de raios-X ou gama o número de fótons que atravessam o material, pode ser dado pela seguinte relação:

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

Onde I é o número de fótons medidos após passagem pelo material, ou intensidade do feixe após atravessar o material, I_0 é o número de fótons do feixe medidos na ausência do absorvedor, ou intensidade do feixe na ausência do material, μ é o coeficiente de absorção linear, x é a espessura do material absorvedor e e é a base dos logaritmos neperianos.

Da equação (1), pode-se obter:

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{I_0}{I}\right)}{x} \quad (2)$$

O coeficiente de absorção (ou atenuação) linear pode ser dado por:

$$\mu = \mu_m \rho \quad (3)$$

onde μ_m é denominado coeficiente de absorção de massa dado em cm^2/g e ρ é a densidade do material. O coeficiente de absorção de massa desta forma depende somente das características químicas e físicas do material com exceção da densidade.

O coeficiente de absorção linear para ossos na energia de 60 keV é de aproximadamente $0,660 \text{ cm}^{-1}$ e o coeficiente de atenuação de massa $0,330 \text{ cm}^2/\text{g}$. (GROSSKLAUSS, 2008).

Para tecido mole nesta energia de 60keV o coeficiente de absorção linear é da ordem de $0,202 \text{ cm}^{-1}$.

A atenuação causada pela massa óssea para uma mesma espessura aproxima-se de um valor 4 vezes maior do que a dos tecidos moles. Esse número pode ser ainda maior para feixes de raios-X de menor energia.

2.4 Evolução da mensuração da densidade mineral óssea

Existem dois tipos de métodos de mensuração da densidade mineral óssea, os clínicos e os laboratoriais. Cada um tem a sua vantagem sobre o outro, porém ao trabalhar com os dois métodos juntos estes podem-se complementar.

Os métodos clínicos possuem uma tecnologia mais sofisticada, que envolve radiação ionizante, possuem um alto custo, são métodos indiretos e requerem calibração e muitas vezes não apresentam boa precisão.

Os métodos laboratoriais são mais simples, de fácil aplicação e encaixam nessa parte de calibração, pois eles são chamados de métodos diretos, ou seja, não precisam ser calibrado. Entretanto esses métodos exigem a retirada do osso do animal sendo portanto métodos limitados e destrutivos.

2.4.1 Métodos clínicos

A densidade mineral óssea de qualquer material sólido é o seu principal parâmetro de qualidade e está diretamente correlacionada com a sua resistência mecânica e também a doenças. A determinação precisa da densidade mineral óssea tem grande importância em diversas áreas como engenharia civil, florestal, agrônômica, biológica.

O estudo destas propriedades físicas tais como, densidade aparente, porosidade e umidade possibilitou desde 1963 um grande avanço no conhecimento detalhado dos materiais, fornecendo dados importantes para o desenvolvimento de novas técnicas de controle de qualidade e melhoramento das principais propriedades físicas, em diversas áreas da saúde e indústria..

O início da quantificação óssea clínica através da densitometria óssea foi descrito, no ano de 1963 utilizando a técnica de SPA. A SPA é o método de densitometria óssea que tem sido amplamente utilizado para medição da massa óssea do esqueleto apendicular, quando foi descrito por Cameron e Sorenson (ECKERT,1996), este foi o primeiro método prático de medida não invasiva, utilizando uma fonte de radionuclídeo (Iodo-125 ou Amerício 241) para produzir o feixe de fóton colimado. Por utilizar apenas um fóton monoenergético, essa

técnica não permite a separação da atenuação produzida pelo tecido ósseo dos demais tecidos moles. Em decorrência disso, essa técnica não invasiva é empregada em locais onde o tecido ósseo seja predominante, como no calcânhar e rádio (IBAÑEZ,2003).

A medida das propriedades físicas dos objetos consistia unicamente na distinção de diferentes materiais em caráter radiológico. Esta limitação se fez presente devido à medida de transmissão do feixe através da amostra fornecer a densidade e número atômico efetivo além de outras propriedades de um único tecido devido à utilização de um único feixe de energia (IBAÑEZ, 2003).

A otimização para aperfeiçoamento e aplicações clínicas pôde ser feita em vários pontos da técnica. Na energia da fonte do radioisótopo com o compromisso de maximizar a diferença de secção de choque fotoelétrico para materiais ósseo e tecido mole. A uniformidade na espessura do tecido mole e a restrição da baixa energia dos fótons.

Assim, as condições básicas para uma aceitação clínica de analisar uma quantidade significativa de osso de diferentes massas e de diferentes espessuras tornaram a técnica SPA insatisfatórias (WEBBER, 2006).

Estas condições determinaram uma linha de evolução das pesquisas da área de modo que todas as condições pudessem ser satisfatórias. Seu início foi introduzido pelo DPA, onde a restrição aos locais periféricos foi superada quando o feixe de fótons monoenergéticos do SPA foi substituído por um feixe de fótons que contenham pelo menos duas energias distintas. O requisito para a medição da transmissão em locais de tecidos adjacentes de mesma espessura foi eliminado e agora, o método é capaz de medir espessuras de minerais e tecidos moles em um único local. A técnica refere-se a DPA e utiliza a fonte do radioisótopo Gadolínio-153. Este avanço aparentemente pequeno abriu a possibilidade de medir a massa óssea em locais centrais, como a coluna lombar e do fêmur proximal. (SWANPALMER, 1998).

A DPA possui limitações. O corpo altamente trabecular vertebral não pode ser separados dos elementos cortical posterior, e a camada cortical do corpo vertebral não pode ser separada do interior trabecular. Sobrejacentes calcificações em tecidos moles e aorta abdominal podem atenuar o feixe e falsamente aumentar os valores da densidade mineral óssea. Além disso, tanto SPA e DPA exigiram ajuste para decaimento periódico e reposição da fonte, que tem um alto custo monetário. Após a substituição da fonte, as leituras de densidade mineral óssea podem cair em até 6,2%, conseqüentemente fórmulas foram desenvolvidas para compensar o efeito da deterioração de origem, preocupando com precisão e exatidão do diagnóstico.

O tempo de escaneamento desta técnica é longo, aproximadamente 30 minutos em locais como quadril e coluna vertebral, a resolução espacial da DPA é limitada, sendo SPA e DPA substituído amplamente pelo DXA, que tem menor custo operacional, maior precisão e facilidade de uso.

Ainda limitado pelo fato de distinguir apenas objetos composto por dois distintos materiais radiológicos, a idéia de incremento de mais uma faixa de energia para cada restrição imposta pelas propriedades físicas variáveis foi examinada e demonstrada em phantoms, mas nas aplicações *in vivo* se mostraram inúteis devido a pequena diferença entre os coeficientes de atenuação linear dos componentes do tecido mole.

O desenvolvimento final em quantificação óssea foi determinado pela troca da fonte radiativa por tubos de RX. A partir desse momento surgiram as técnicas de absorciometria de um único feixe de RX (*Single-energy X-ray Absorptiometry – SXA*) e absorciometria de duplo feixe de RX (*Dual-energy X-ray Absorptiometry – DXA*), o método SXA emprega energia de RX para determinar a densidade mineral óssea do esqueleto periférico. (KEENAN, 1997), sem necessidade de empregar isótopos radioativos. A vantagem apresentada por essa técnica é de utilizar aparelhos de menor tamanho, escassa radiação γ , além de maior velocidade de contagem o que condiciona maior precisão e mais determinação e um baixo custo (MILLER et. al., 1998).

A DXA surgiu como um método de medição da densidade mineral óssea, com duplo feixe de raios-X, cada um com diferentes níveis de energia. Um detector mede os RX que atravessam a região estudada, e um programa computacional segmenta a área para quantificação e subtrai os valores obtidos com os dois feixes de energia. Os valores de atenuação são convertidos em medidas de massa mineral óssea através da comparação com as densidades de materiais usados para calibração do aparelho. No componente ósseo, determina o conteúdo mineral ósseo (CMO) numa determinada projeção do osso em gramas. Dividindo-se o CMO pela área, obtém-se a densidade mineral óssea “areal” (aDMO) em g/cm^2 , ou seja, está não é uma densidade mineral óssea real, o verdadeiro deve ter unidade de gramas por centímetro cúbico (g/cm^3). (KANIS, 1994; ENGLAND, 2009; KUIJK, 2010)

O método, chamado de DXA, possibilita um incremento de intensidade de fótons, diminuindo drasticamente o tempo de medida. Ainda, o aumento da precisão das medidas imposto pelo aumento da intensidade de fótons e diminuição da probabilidade de movimento do paciente (FELSENBERG, 1998).

Apesar da evolução das técnicas de mensuração, elas apresentam algumas desvantagens, como o alto custo financeiro, a tempo de exame e de exposição a dose de radiação ao paciente. Um método que evoluiu bastante com o avanço tecnológico é a densitometria óptica, que atualmente vem sendo aplicada na área de medicina veterinária.

A densitometria óptica é uma técnica que foi desenvolvida para avaliar a densidade do osso em esqueleto apendicular, mas esta despertou um interesse renovado. Apresentando uma vantagem na utilização do equipamento de raios-X convencionais, geralmente é utilizada a adição de uma cunha de alumínio no campo de imagem para a calibração. A imagem radiográfica é capturada em um computador e depois transformada automaticamente com a utilização de uma aplicação de software especialmente desenvolvido para medir a densidade mineral óssea (DMO) dependendo do tipo de animal.

A principal vantagem da densitometria óptica é o seu potencial para uso geral e com ampla disponibilidade de radiografia convencional. (BLAKE, 2001).

2.4.2 Métodos laboratoriais

A física do tecido ósseo é a ciência que estuda a matéria óssea e suas interações com o meio. As características físicas que podem definir o grau das interações da matéria óssea com o meio são: a porosidade, que define a porcentagem de vazio dentro do volume aparente; a retratibilidade, que define a variação volumétrica aparente quando alterada a umidade do meio; a densidade real da substância óssea, que define a razão da massa pelo volume real; e a densidade aparente, que quantifica a matéria óssea por unidade de volume aparente (COSTA, 2006)

Quanto ao grau de interações da matéria com a radiação são definidas por propriedades físicas a secção de choque da matéria óssea; os coeficientes de atenuação linear e de massa; a rigidez elétrica, magnética e térmica; flexibilidade e etc (YOUNG, 1996)

Para determinação das propriedades físicas que podem definir um grau de interações da matéria óssea com o meio, métodos laboratoriais práticos são empregados, como o método da imersão. Este método baseia-se no princípio de Arquimedes, em que a perda aparente de peso de um corpo imerso em líquido é igual à massa do líquido deslocado. Este método é considerado um dos mais precisos e pode ser usado para amostras com formato irregular, sendo o volume determinado pela variação de peso do líquido, em virtude da imersão da amostra.

A densidade real ou das partículas, é representada pela quantidade de massa das partículas em umidade zero e retratibilidade desconsiderada contida em um volume chamado de volume das partículas, este, obtido sem a consideração dos poros ou água da amostra através do método de picnômetro, onde a amostra é moída e submetida a testes laboratoriais para determinação do volume de água correspondente a dada massa de amostra utilizada, sendo representada por ρ_0 .

A densidade de partículas tem sido determinada predominantemente pela medição do volume de sólidos via deslocamento de líquidos e normalmente usa medidas volumétricas para essa quantificação.

A escolha do método para a determinação da densidade de partículas leva em consideração aspectos como quantidade do material a ser analisada, disponibilidade de equipamentos e exatidão requerida na determinação, bem como praticidade e tempo de processamento. Os métodos mais usuais para determinação da densidade de partículas baseiam-se no deslocamento de um volume de líquido ou ar por uma amostra de osso de massa conhecida. Outra possibilidade sugere a determinação da densidade de partículas pela relação entre a porosidade e a densidade do osso. (FLINT & FLINT, 2002).

Dos métodos baseados no deslocamento de líquido, o método do picnômetro e similares geralmente utilizam água, podendo também ser usado querosene (FORSYTHE, 1975). Tais métodos utilizam câmara de vácuo ou submetem a amostra à fervura para a retirada do ar do interior da suspensão. O método do balão volumétrico, por sua vez, utiliza álcool (KIEHL, 1979; EMBRAPA, 1997), dispensando o uso da câmara de vácuo e fervura da suspensão, em função da maior facilidade de penetração do álcool pelas interfaces dos constituintes da amostra, por apresentar baixa tensão superficial quando comparado à água.

O método de imersão em água tem sido bastante utilizado para determinação de densidade aparente nas áreas de biomassa florestal, tecnologia de madeira e física de solo, entretanto para a determinação óssea essa técnica ainda é muito pouco utilizada (REZENDE 2003).

A literatura mostra o método de Arquimedes na determinação da medida de densidade de osso, músculo e gordura, destacando seus resultados confiáveis (AKAR, 2006)

Os espaços porosos de materiais sólidos são sempre constituídos de microporos e o volume total desses é denominado porosidade. A porosidade mede o nível de compactação do material e está ligada diretamente a densidade aparente do material. Quanto maior a densidade aparente da amostra menor será sua porosidade.

Segundo Reichardt (1985), a porosidade é definida pela equação:

$$\delta = \frac{V_t - V_s}{V_t} \cdot 100 \quad (4)$$

onde: δ é a porosidade(%), V_t é o volume total do material e V_s é volume da parte sólida do material.

A partir da equação 4, podem-se obter as equações 5 e 6.

$$\delta = \left(1 - \frac{V_s}{V_t}\right) \cdot 100 \quad (5)$$

$$\delta = \left(1 - \frac{\rho_o}{\rho_p}\right) \cdot 100 \quad (6)$$

Onde: ρ_o densidade aparente do material e ρ_p a densidade das partículas do material sólido, determinado pelo método de picnômetro.

A porosidade, caracterizada como a distribuição de poros ao longo de um volume de um material, pode ser obtida através de métodos nucleares como o espalhamento de raios-x ou a transmissão de raios gama para medição de densidade aparente, quando feito em conjunto com o método de picnômetro para determinação da densidade das partículas. A porosidade média é determinada em dada amostra utilizando a equação 6. (APPOLONI, 2004)

3. OBJETIVOS

Este trabalho, desenvolvido no Laboratório de Física Aplicada do Departamento de Física e Biofísica do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, em conjunto com o Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, teve como objetivos específicos:

- Propor um método laboratorial simples (método de imersão em água) para a determinação da densidade mineral óssea.
- Discutir e avaliar os aspectos metodológicos envolvidos na densitometria óptica utilizada atualmente, apresentando suas vantagens e desvantagens.
- Analisar o efeito do peso do animal, idade e sexo na densidade mineral óssea de cães de porte médio.
- Avaliar as vantagens e limitações do método de imersão em água para a determinação da densidade mineral óssea de animais.

- Discutir e aprimorar a forma de apresentação dos resultados da densitometria óptica no trabalho.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1 Arranjo experimental e Amostragem

Na primeira etapa deste trabalho foi realizada a comparação entre os métodos de densitometria óptica e de imersão em água. Foram selecionados e utilizados 60 membros anteriores direitos de caninos, intactos, sendo 32 machos e 28 fêmeas, cedidos pelo Departamento de Patologia da FMVZ (UNESP/Botucatu) e pelo Canil Municipal da cidade de Araras/SP.

No ensaio de correlação entre os métodos de densitometria óptica e imersão em água foram utilizadas amostras de cães de porte médio (10kg a 25kg), totalizando 38 amostras das 60 obtidas durante o trabalho.

Na segunda etapa foram feitas correlações entre a DMO com os parâmetros peso, idade e sexo de cada grupo de animais, utilizando o método de imersão.

A classificação das amostras foi feita em três grupos, um deles relacionado com o peso, idade e o outro com sexo. O primeiro, relacionado ao peso do animal, foi subdividido em três subgrupos da seguinte maneira: cães de 10kg até 15kg, de 15,1kg até 20kg e maiores que 20kg, denominados P1(n=24), P2 (n=26) e P3 (n=10), respectivamente.

O segundo grupo, relacionado à idade, também foi dividido em três subgrupos de animais com menos de quatro anos, de quatro a sete anos e maiores de sete anos, denominados A1(n=20), A2 (n=19) e A3 (n=21), respectivamente. E o terceiro em macho (n=38) e fêmea (n=22).

Os membros foram desarticulados na região da articulação úmero-rádio-ulnar direitos, e mantidos congelados na câmara fria do Serviço de Patologia do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da FMVZ, UNESP, Campus de Botucatu-SP, onde posteriormente foram descongelados na câmara refrigerada, para que fossem radiografados.

4.1.1 Etapa 1: Aspectos metodológicos.

As análises experimentais foram realizadas em dois laboratórios pertencentes a UNESP/Botucatu. No Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ foram determinadas as medições pelo método de densitometria óptica.

No Departamento de Física e Biofísica – IBB (Laboratório de Física Aplicada) foram determinadas as densidades das amostras pelo método de imersão.

Nessa etapa, as amostras de tecido ósseo tiveram suas densidades determinadas pelo método de densitometria óptica. Em seguida, as amostras passaram por um processo de limpeza, sendo retirados os tecidos moles periféricos: perióstio, tecido cartilaginoso, entre outros. O material foi colocado em uma cuba com água oxigenada (130 volumes) por um período de aproximadamente três dias para a retirada do restante dos tecidos.

Após a limpeza, as amostras tiveram suas densidades ósseas novamente determinadas pelo método de densitometria óptica, para comparação e possível correlação entre a presença de tecido mole e o aumento ou diminuição de sua densidade.

Com a obtenção apenas do tecido ósseo, composto de osso cortical e trabecular, se iniciou o processo de confecção das amostras. Este processo se iniciou com o corte dos ossos em seu eixo transversal de forma que cada osso resultasse em cinco amostras, sendo as duas extremidades não utilizadas nos experimentos (figura 1).

Após o corte, as amostras foram submetidas à lixa para retirada do perióstio, além de determinar uma linearidade na superfície das amostras. Estes procedimentos foram realizados com a intenção de observar o comportamento das propriedades ao longo de todo o osso cortical e melhorar a qualidade final dos resultados.



Figura 1. Foto mostrando: a) Osso após Processo 1: Limpeza; b) Osso após Processo 2: Confeção, com divisão da amostra em 5 partes.

Posteriormente, a densidade mineral óssea das 38 amostras foram determinadas pelo método de imersão em água, no Laboratório de Física Aplicada, os resultados obtidos por este método comparado com os resultados pelo método de densitometria óptica, com objetivo de avaliar a precisão desses métodos e também apresentar os resultados no mesmo sistema de unidade, como SI e o CGS.

4.1.2 Etapa 2: Densidade mineral óssea em função dos parâmetros peso, idade e sexo

Nesta etapa, as 60 amostras passaram pelo processo de limpeza, e tiveram suas densidades ósseas determinadas através do método de imersão.

Com os resultados obtidos, foram feitas análises comparativas de correlações entre a densidade mineral óssea e os seguintes parâmetros: concentração de cálcio no osso, peso, sexo e idade de cada grupo de animais.

4.2 Metodologia

4.2.1 Ensaio da influência do tecido mole na densidade mineral óssea

Foram selecionados amostras de 10 membros anteriores direitos para a determinação da densidade mineral óssea, juntamente com o tecido mole, pela técnica de densidade óptica. Em seguida os mesmos membros passaram pelo processo de limpeza, e feita novamente a determinação da densidade mineral óssea. Os resultados foram então comparados com o

objetivo de avaliar a interferência do tecido mole na precisão do método de densitometria óptica.

4.2.2 Técnica de Densitometria Óptica

Foram feitas 38 radiografias da região distal da diáfise do rádio e ulna no membro direito, em incidência crânio caudal. Foi utilizado chassi 24 x 30 cm, contendo filme radiográfico inserido dentro de um porta-chassi confeccionado em madeira compensada com espessura de 3 mm, onde se fixou paralelamente a região radiografada uma escala de alumínio (phantom) (ANDERSON,1966).

Esse material utilizado como escala referencial densitométrica, constituída de 20 degraus, tendo o primeiro degrau a espessura de 0,5 mm, variando a seguir de 0,5 mm em 0,5 mm, de um degrau para outro, até o vigésimo degrau, cada qual com área de 5 x 15 mm.

A técnica utilizada no aparelho de raios-X em relação a kilovoltagem (kVp) foi de 45 kVp e a miliamperagem por segundo (mAs) variando entre 1,3 mAs e 2,5 mAs. Para o processo de revelação foi utilizado uma processadora automática padrão.

Após a digitalização das imagens do rádio e ulna e do phantom, através do Scanner HP ScanJet 6C5, com adaptador para transparência HP ScanJet 6C6, elas foram armazenadas em um computador, o qual possui o programa computacional (software CROMOX 3.1 vet), que realizou as leituras e análise da densidade óptica radiográfica.

Primeiramente foram demarcados dois pontos no pentômetro como referência de escala. Em seguida foi selecionada a extremidade distal do rádio e ulna do membro anterior direito, acima da linha metafisária. Nessa região foi aberta uma janela, cujo ajuste da largura é de acordo com os tecidos moles que circundam o osso na região analisada (figura 2). A altura da janela foi considerada como sendo a metade de sua largura.

Em seguida, foi realizada a leitura dos dados da densidade mineral óssea da região de interesse, sendo estes valores expressos em milímetros de alumínio (mmAl). Essas leituras da densidade mineral óssea foram repetidas três vezes para cada indivíduo, tendo um valor médio final.

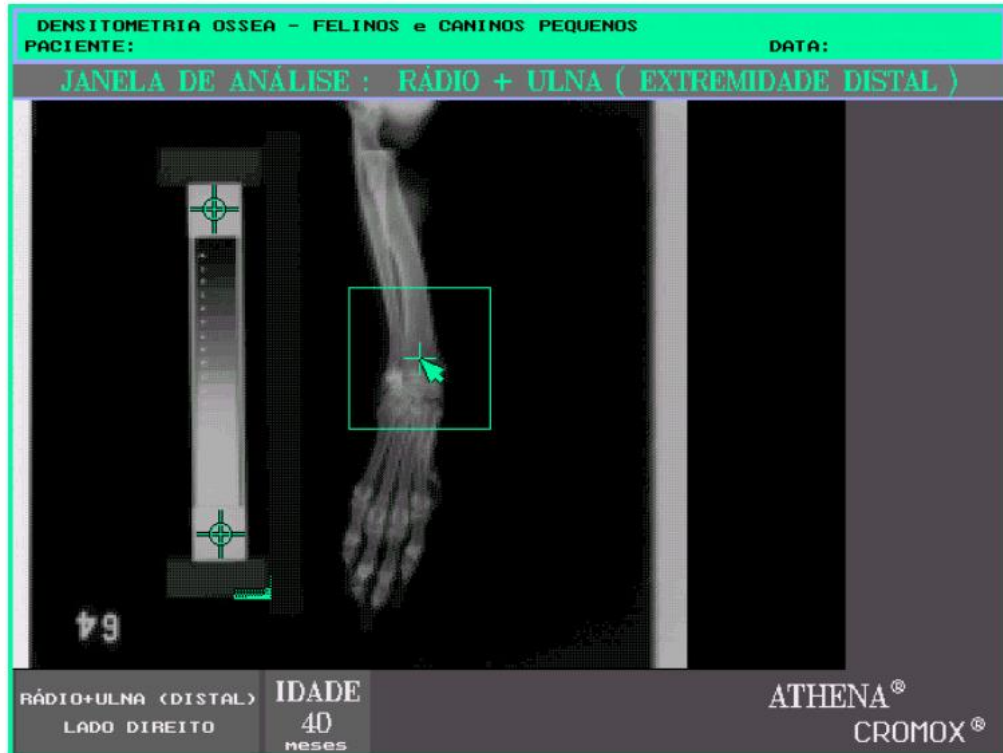


Figura 2. Imagem de entrada do programa Cromox 3.1 Vet

4.2.3 Método de Imersão

A densidade foi obtida pela relação entre massa e volume das amostras ósseas, sendo a massa determinada em gramas, por pesagem, utilizando uma balança de precisão da marca TECNAL-BG 400.

Para a determinação do volume, utilizou-se o método de imersão em água. Para isso colocou-se um béquer contendo água sobre a balança, que foi tarada, ou seja: zerada como representado pela figura 3.

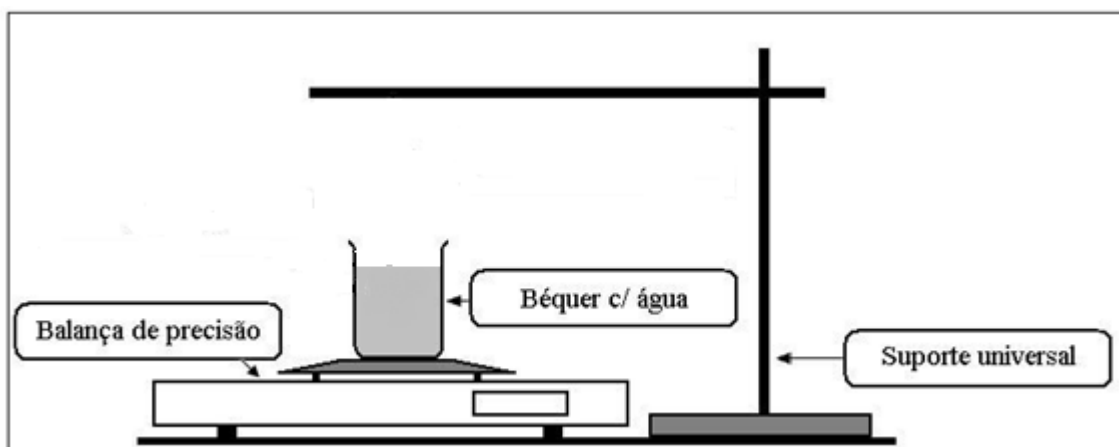


Figura 3: Imagem representando a balança tarada.

Logo após, a amostra foi fixada por um fio e imersa na água contida no béquer, tomando-se o cuidado para que a mesma não encostasse nas paredes e no fundo do béquer como mostra a figura 4. O valor do volume da amostra em cm^3 será igual ao empuxo em gramas-força.

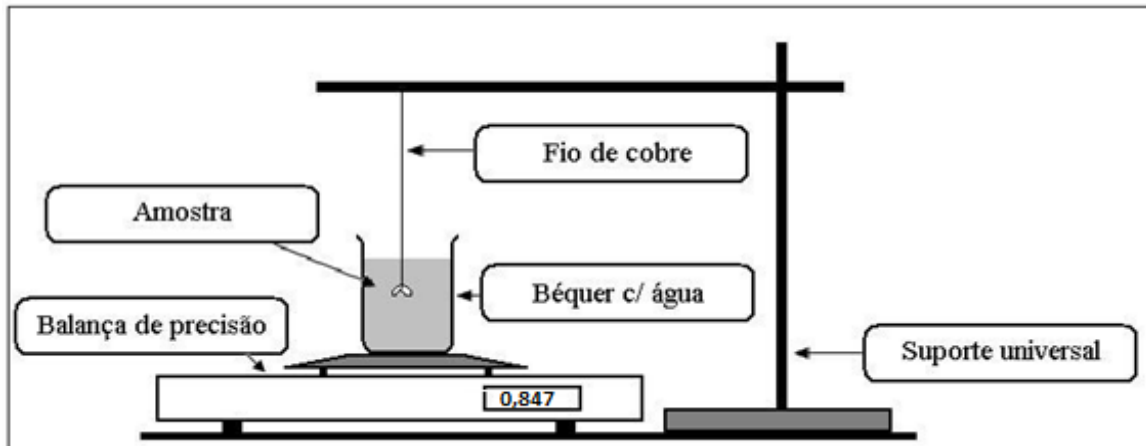


Figura 4: Imagem representando a obtenção do volume pelo método de Arquimedes.

Pelo princípio de Arquimedes, o valor numérico do empuxo é igual ao peso do volume de fluido deslocado, portanto ele pode ser calculado pela equação 7:

$$F_e = \rho V_s g \quad (7)$$

Sendo F_e a força de empuxo, ρ a densidade da água, V_s o volume submerso e g a aceleração da gravidade.

Foram utilizadas as unidades de medida no sistema de unidades CGS*, em que as unidades fundamentais são centímetro, grama e segundo.

O empuxo é definido como a força exercida em um objeto pelo líquido ao qual está imerso e que é igual, em módulo, ao peso do fluido deslocado (REZENDE, 1997). Ao mergulhar o objeto no líquido determinou-se o peso do fluido deslocado na balança, que é numericamente igual ao empuxo.

Portanto pela equação 7, o volume deslocado é numericamente igual ao empuxo. Como no sistema adotado a densidade da água é $\rho=1 \text{ g/cm}^3$, e o empuxo é dado em gf (grama-força), o valor indicado pelo display da balança será o volume do objeto dado em cm^3 .

Com os dados de massa e volume pode-se obter o resultado da densidade aparente utilizando a seguinte equação:

$$\rho_o = \frac{M}{V} \quad (8)$$

sendo, ρ_o a densidade aparente, M a massa da amostra em gramas e V representa o volume em cm^3 (REZENDE, 2003).

4.2.4 Método de determinação da densidade das partículas e porosidade

Para a determinação da densidade por partículas, foram selecionadas 5 amostras variando as características dos animais, estas foram moídas por um moinho criogênico, e em seguida colocadas em estufa durante 6 horas à 90°C , para que a umidade fosse 0%.

Um balão volumétrico de 100 ml foi preenchido com água deionizada até seu menisco, logo após essa água foi retirada e colocada em um Becker. Após a pesagem da amostra seca na forma de pó, esta foi colocada dentro do balão volumétrico por meio de um funil e através deste, foi colocada a água novamente até atingir o menisco. O volume das partículas das amostras do osso seco foi obtido através da pesagem da água restante no Becker, após o preenchimento com água do balão contendo as amostras até o menisco. Para esse procedimento foram realizados três repetições.

Com esses resultados, foram feitas as medidas das densidades das partículas através da equação (9):

$$\rho_p = \frac{M_o}{V_p} \quad (9)$$

onde ρ_p é a densidade de partículas (g/cm^3), M_o é a massa por partículas (g) e V_p é o volume por partículas (cm^3).

Com o valor da densidade de partículas e da densidade aparente foi possível calcular a porosidade das amostras de osso através da equação (6) mostrada a seguir:

$$\delta = \left(1 - \frac{\rho_o}{\rho_p} \right) \cdot 100 \quad (10)$$

onde δ é a porosidade(%), ρ_o é a densidade aparente (g/cm^3) e ρ_p é a densidade das partículas (g/cm^3).

4.3 Análises Químicas

Foram determinados os teores de Cálcio das amostras ósseas com o objetivo de estabelecer correlações com a densidade mineral óssea. Essas análises foram realizadas usando um espectrofotômetro de absorção atômica pertencente ao Departamento de Química da UNESP de Botucatu (NEVES, 2009).

4.4 Análise Estatística

Foi utilizada a análise de Correlação de Pearson entre a densidade mineral óssea em g/cm^3 e os parâmetros de peso, idade, sexo e concentração de cálcio.

O estudo comparativo da densidade mineral óssea em g/cm^3 , para animais de diferentes peso, idade e sexo, foi feito pelo teste Tukey para a comparação dos subgrupos de cada parâmetros, utilizando-se análise de variância com cálculo estatístico P.

As estatísticas realizadas foram consideradas significativas ao nível de 5%, ou seja ; para $p < 0,05$.

Foram feitas análises descritivas das variáveis peso, sexo e idade, calculando valores de mínimo (min) e máximo (max), amplitude, média (x), mediana, desvio padrão (s) e coeficiente de variação (CV%).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 contém os dados obtidos para a densidade mineral óssea pelos dois métodos.

A partir dos dados dessa tabela 1 foi feito o gráfico da figura 5. Este gráfico mostra os resultados obtidos através do método de densitometria óptica, para as duas situações distintas, com relação ao preparo das amostras com e sem tecido mole. Para os dois casos foi utilizada a técnica de densitometria óptica de 40 quilovolts (kVp), variando a miliamperagem por segundo (mAs) entre 1,3 e 2,5.

Tabela 1. Valores da densitometria óptica em cães SRD de porte médio com e sem tecido mole.

Amostras	Com tecido mole (DMO mmAl)	Sem tecido mole (DMO mmAl)
1	2,084	1,427
2	2,111	1,741
3	2,164	1,809
4	2,317	1,841
5	2,377	2,056
6	2,886	2,156
7	2,979	2,203
8	2,994	2,165
9	3,364	2,753
10	3,491	2,847

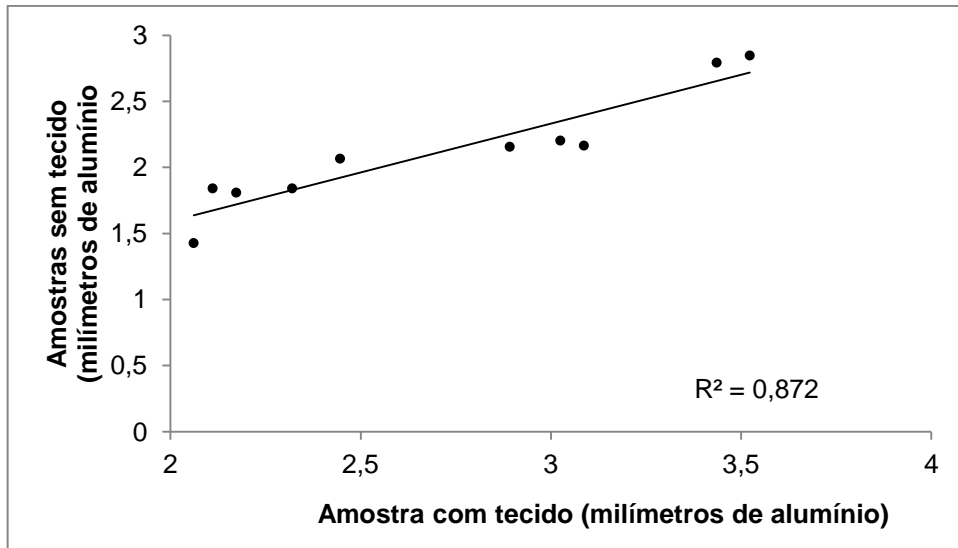


Figura 5. Gráfico da relação da densitometria óptica utilizando amostras de cães SRD de porte médio com e sem tecido mole

Pela análise do gráfico da figura 5 pode-se verificar a correlação linear para esses dois casos, com um coeficiente de determinação razoável, sendo de 0,872. Este resultado mostra uma concordância entre os métodos demonstrando que a influência do tecido mole no esqueleto apendicular, praticamente não interferiu no diagnóstico da densidade mineral óssea. Isto devido à baixa atenuação dos raios-X, causada por este tecido comparado com a atenuação do tecido ósseo.

Na figura 6, são apresentados os dados comparativos de 38 amostras utilizadas para aplicação dos dois métodos utilizados para a medida da densidade mineral óssea.

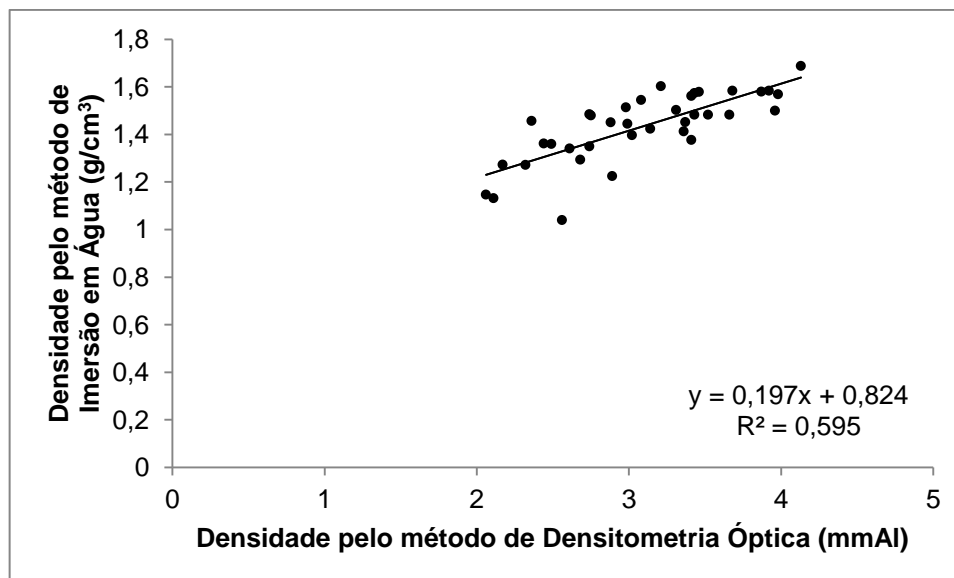


Figura 6. Gráfico da relação entre as densidades ósseas utilizando os métodos de densitometria óptica e imersão em água

Os resultados da densidade mineral óssea fornecidos pela densitometria óptica foram dados em milímetros de alumínio (mmAl) e os resultados fornecidos pelo método de imersão em água dado em gramas por centímetro cúbico (g/cm³).

A correlação realizada pela comparação entre estes dois métodos possibilitou a transformação dos valores de densidade em mmAl em g/cm³, pela equação $y = 0,197x + 0,824$ com coeficiente de determinação $R^2 = 0,595$.

A obtenção da densidade em gramas por centímetros cúbicos foi de grande importância para uma melhor comparação de resultados com outros métodos, principalmente com os resultados obtidos por métodos de laboratórios.

O valor de R^2 reflete a concordância entre os dois métodos e está relacionado com a precisão desses métodos, apesar de apresentar um valor significativo apenas razoável quando se compara os dois métodos.

O software ao estipular a DMO em mmAl, estabelece uma relação entre a escala de cinza do tecido ósseo e do alumínio referente a escala densitométrica utilizado durante o procedimento, determinando a DMO do tecido ósseo em mmAl.

Para se obter uma melhor relação da DMO entre o tecido ósseo e o alumínio deve-se levar em consideração a equação de atenuação da radiação, levando em consideração todos os parâmetros, principalmente a espessura da amostra.

Sendo as leituras baseadas na Lei de Beer Lambert de atenuação de radiação, e utilizando as equações separadamente para alumínio e tecido ósseo pode-se obter:

1) para o alumínio:

$$\rho_a = \frac{\ln\left(\frac{I_o}{I_a}\right)}{\mu_a X_a} \quad (7)$$

sendo: ρ_a, μ_a, X_a = densidade, coeficiente de atenuação de massa, e espessura do alumínio;
 I_o, I_a = intensidade dos raios incidentes e emergentes ao longo do alumínio.

2) para o tecido ósseo:

$$\rho_t = \frac{\ln\left(\frac{I_o}{I_t}\right)}{\mu_t X_t} \quad (8)$$

sendo: ρ_t, μ_t, X_t = densidade, coeficiente de atenuação de massa e espessura do tecido ósseo;

I_o, I_t = intensidade dos raios incidentes e emergentes ao longo do tecido ósseo

Para os pontos em que $I_a = I_t$, podemos comparar 7 e 8, e teremos:

$$\rho_t \mu_t X_t = \rho_a \mu_a X_a \quad (9)$$

ou

$$\rho_t = \rho_a \mu_a X_a / \mu_t X_t \quad (10)$$

Na aplicação da equação 11, para obtenção dos resultados surgiram alguns problemas de ordem prática que pode ter limitado os resultados.

O valor do produto $\mu_t X_t$ considerado constante nos cálculos de ρ_t independente da espessura dos ossos dos animais, proporcionando então erros de medidas.

Apresentamos como sugestão para outros trabalhos considerar o produto $\mu_t x_t$ nos cálculos com o objetivo de melhorar a precisão dos resultados. O valor de μ_t será sempre constante para uma dada energia de fótons que pode ser fixada pela quilovoltagem.

O valor da espessura óssea pode ser medida diretamente por paquímetro. Porém ressalta-se ainda a dificuldade causada neste caso pela presença do tecido mole.

O resultado da densidade mineral óssea é dado em função da absorção de raios-X, que depende também da espessura do osso na direção incidente do feixe de raios-X. Como cada animal tem uma espessura óssea diferente, esta variável deve influenciar nos resultados diminuindo a precisão das análises.

Assim sendo, a densitometria óptica por ser um método mais complexo, envolvendo radiação, a dificuldade na sua aplicação, pode estar submetida a várias fontes de fatores de erros, como: espessura dos ossos, dificuldade de um procedimento uniforme para todos os animais e até pela influência dos tecidos moles. A tarefa mais difícil seria então minimizar estes erros, ajustando bem o equipamento e adotando um procedimento uniforme independentemente das características de cada animal.

Considera-se também que o método de imersão por ser um método laboratorial, apresenta uma limitação de ser aplicado somente em amostras biológicas de tecido ósseo “in natura”, porém tem todas as condições para um bom manuseio e facilidade para a realização de repetições de medidas. As pequenas variações de densidade poderão ser detectadas pelo método de imersão em água, devido a sua excelente precisão. O que poderia não ser possível detectar pela densitometria óptica.

A média da densidade mineral óssea para o método de densitometria óptica em cães SRD foi de $3,080 \pm 0,582$ mmAl, enquanto que para o método de imersão em água a densidade mineral óssea foi de $1,630 \pm 0,125$ g/cm³.

As médias e os desvios padrão dos resultados obtidos para a densidade mineral óssea em cães SRD, em função da concentração de cálcio, peso, idade e sexo, estão apresentadas nas Tabelas 2, 3, 4, 5, 6 e 7, e nas Figuras 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15.

A interação da densidade mineral óssea com os parâmetros utilizados e a análise descritiva são apresentados nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 2. Médias e desvios padrão da DMO em gramas por centímetro cúbico (g/cm^3) em cães SRD, considerando os grupos por faixa de peso.

Grupo por faixa de peso	DMO (g/cm^3)	Concentração de Cálcio (%)
P ₁	1,550 ± 0,510 (b)	34,65±1,77(a)
P ₂	1,670 ± 0,740 (a)	33,68±1,12(a)
P ₃	1,685 ± 0,690 (a)	34,03±3,25(a)
	p < 0,001**	p > 0,05 ^{ns}

** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < 0,01)

ns não significativo (p >= 0,05)

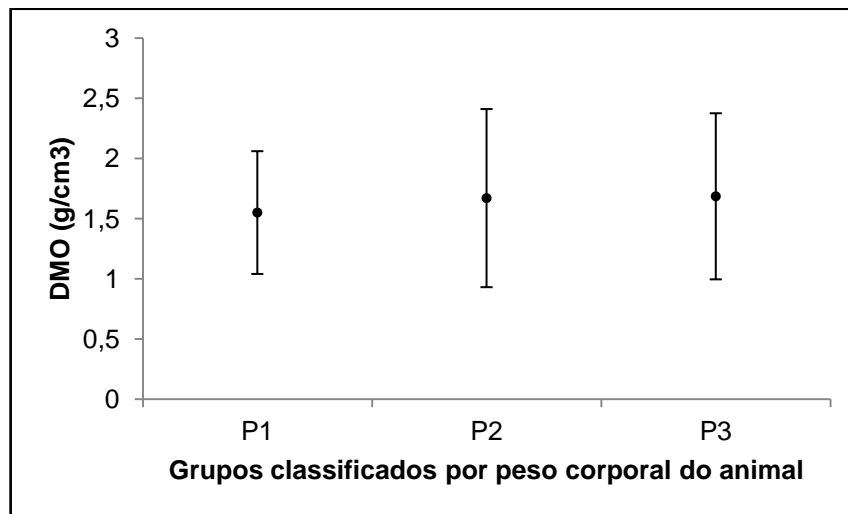


Figura 7. Gráfico dos valores médios da DMO (g/cm^3) em cães SRD, em função da posição das amostras considerando os grupos por faixa de peso.

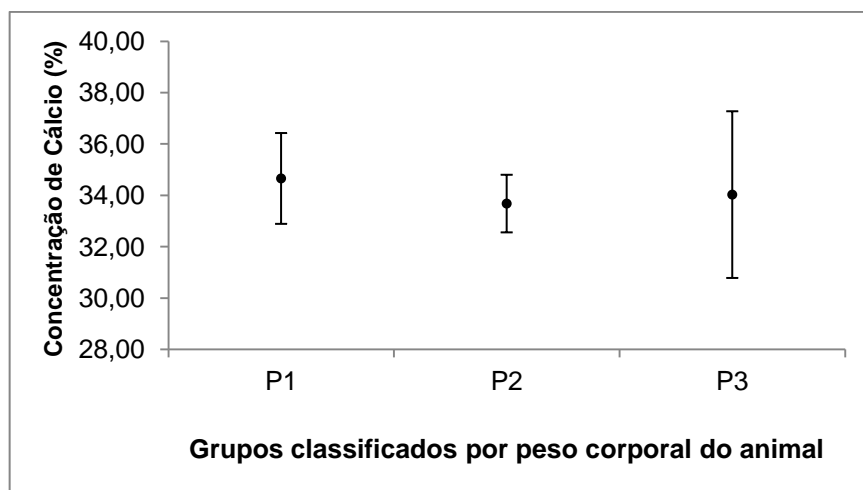


Figura 8. Gráfico dos valores médios da densidade mineral óssea (g/cm^3) em cães SRD, relacionando a concentração de cálcio com os grupos por faixa de peso.

Tabela 3. Valores obtidos da densidade mineral óssea (g/cm^3) em cães SRD, considerando os subgrupos em função do peso de acordo com a posição na amostra.

Posição	Subgrupos da DMO (g/cm^3) em função do peso do animal.		
	P1	P2	P3
1	1,394 \pm 0,188	1,538 \pm 0,141	1,559 \pm 0,120
2	1,557 \pm 0,187	1,705 \pm 0,173	1,743 \pm 0,140
3	1,674 \pm 0,177	1,764 \pm 0,155	1,776 \pm 0,068
4	1,650 \pm 0,167	1,720 \pm 0,176	1,725 \pm 0,079
5	1,491 \pm 0,169	1,540 \pm 0,143	1,520 \pm 0,118

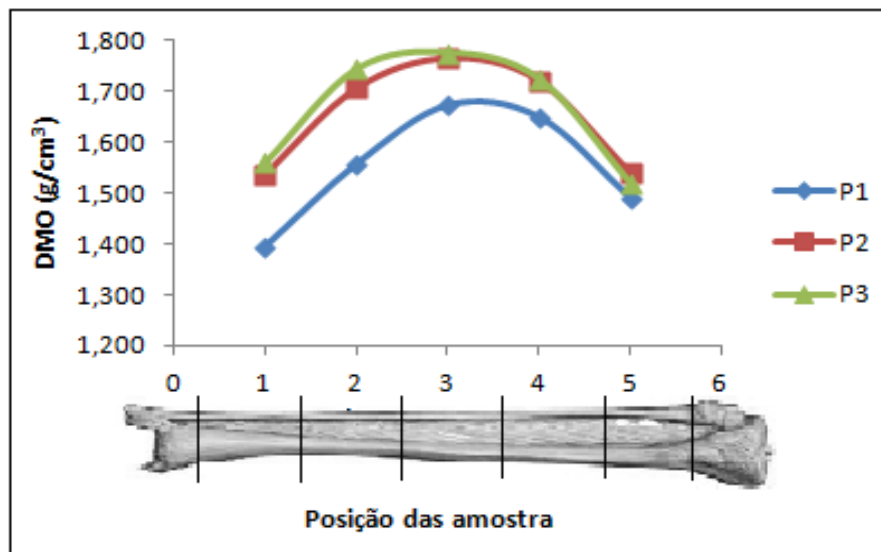


Figura 9. Gráfico dos valores médios da DMO (g/cm^3) em cães SRD, em função da posição das amostras considerando os grupos por faixa de peso.

Os resultados obtidos na tabela 2, demonstrados na figura 7, pela análise entre os sub-grupos P1, P2 e P3 mostraram que os valores da densidade mineral óssea aumentaram com a elevação do peso corporal dos animais, concordando com os resultados apresentados pela literatura, como mostram os trabalhos de; Vulcano (2008), e Martin et al (1981). Estes dados também concordam com os obtidos por Lipscomp et al. 2001, que explica que o aumento do peso do animal com seu crescimento, ocorre através de ações osteogênicas, aumentando sua massa óssea.

Leal (2002) em seu trabalho obteve uma forte correlação entre a densidade mineral óssea e a variável peso dos animais estudados, ao estabelecer os valores da densidade mineral óssea da extremidade distal em cães de diferentes portes e idades, pela técnica de absorciometria óptica, corroborando os resultados obtidos na tabela 11.

Considerando os animais de acordo com o peso, os valores médios obtidos para a densidade mineral óssea pela técnica de imersão em água do membro radio-ulnar do cães SRD foram: $1,550 \pm 0,510 \text{ g}/\text{cm}^3$ para animais de 0,1 a 10 kg, $1,670 \pm 0,740 \text{ g}/\text{cm}^3$ para animais de 10,1 a 20kg e $1,685 \pm 0,690 \text{ g}/\text{cm}^3$ para animais maiores que 20,1kg.

Os valores obtidos na tabela 3, expresso na figura 9, para a densidade mineral óssea ao longo do osso do animal apresentaram menores valores nas regiões periféricas, ou seja, nas epífises, e as maiores densidades foram encontradas na região central (diáfise), devido a maior predominância de tecido ósseo compacto.

Uma diferença estatística significativa ($p < 0,01$) foi encontrada entre os grupos P1, com os grupos P2 e P3, para os animais leves e os outros dois mais pesados respectivamente, como descrito na tabela 2. Na concentração de cálcio não obteve diferença estatística significativa com a variação do peso, isso ocorre devido ao organismo realizar a homeostase do Ca, mantendo em equilíbrio sua concentração nos ossos e no meio extracelular.

Tabela 4. Médias e desvios padrões da DMO (g/cm^3) em cães SRD, considerando os grupos por faixa de idade.

Grupo por faixa de idade	DMO	Concentração de Cálcio (%)
A ₁	1,547 ± 0,150 (b)	34,03±2,15(a)
A ₂	1,655 ± 0,100 (a)	34,82±1,54(a)
A ₃	1,673 ± 0,090 (a)	32,77±3,48(a)
	$p < 0,002^{**}$	$p > 0,05^{ns}$

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$)
 ns não significativo ($p \geq 0,05$)

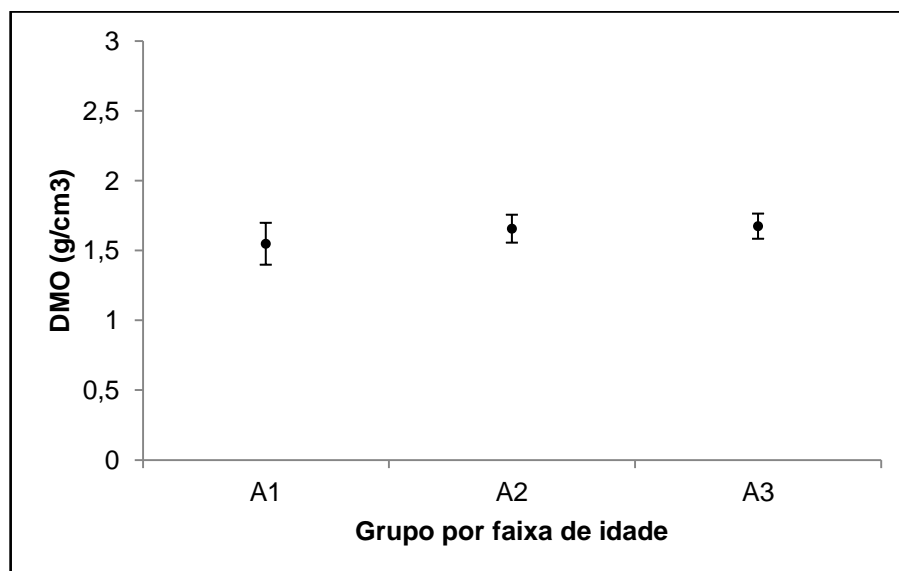


Figura 10. Gráfico dos valores médios da DMO (g/cm^3) em cães SRD, em função da posição das amostras considerando os grupos por faixa de idade.

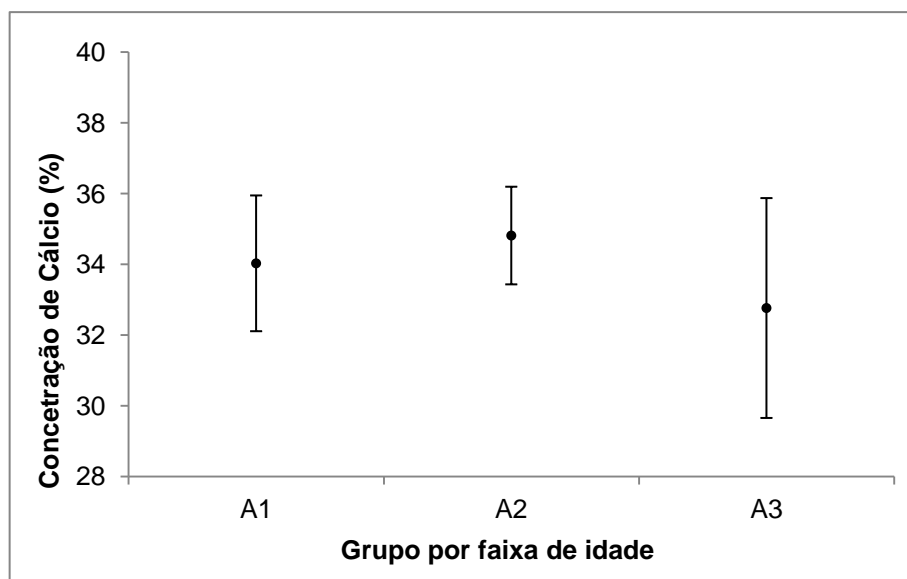


Figura 11. Gráficos dos valores médios da DMO (g/cm^3) em cães SRD, relacionando a concentração de cálcio com os grupos por faixa de idade.

Tabela 5. Valores obtidos da DMO (g/cm^3) em cães SRD, considerando os subgrupos em função da idade de acordo com a posição na amostra.

Posição	Subgrupos da DMO (g/cm^3) em função da idade		
	A1	A2	A3
1	1,389±0,097	1,555±0,152	1,541±0,125
2	1,576±0,123	1,707±0,137	1,739±0,199
3	1,640±0,245	1,787±0,117	1,794±0,116
4	1,627±0,218	1,714±0,130	1,749±0,145
5	1,505±0,197	1,515±0,127	1,546±0,114

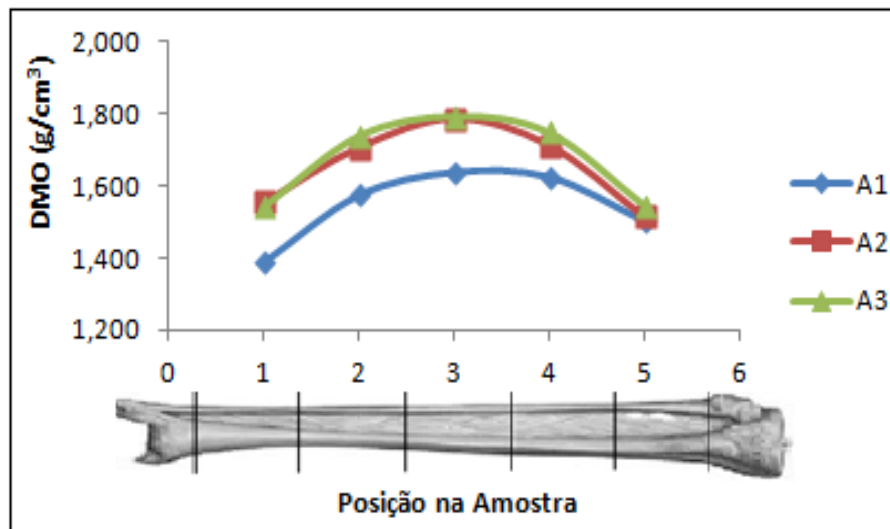


Figura 12. Gráfico dos valores médios da DMO (g/cm^3) em cães SRD, em função da posição das amostras considerando os grupos por faixa de idade.

Os valores obtidos na tabela 4 da densidade mineral óssea em função da idade, tiveram uma elevação na densidade mineral óssea com o aumento da faixa etária, ou seja, quanto mais velho for o animal maior a sua densidade mineral óssea, como mostra a figura 10, Schneider (2004) utilizando a técnica DXA e TCQ obteve o mesmo resultado utilizando cães jovens e adultos.

Martin et al., (1981) encontrou um resultado semelhante, verificando um pico de massa óssea em torno do 7 anos de idade, similar ao apresentado no gráfico da figura 10.

Porém Lauten et al. (2001) utilizando da técnica DXA, comparou a densidade mineral óssea de cães da raça Beagles de diferentes faixas etárias e obteve um resultado, onde não houve diferença significativa entre da densidade mineral óssea com a idade do animal. Resultados semelhantes foram encontrados por Leal (2002) por via da técnica de densitometria óptica.

Vulcano (2008) e Zotti (2004) realizaram trabalhos utilizando a técnica de densitometria e DXA respectivamente, encontrando uma forte correlação entre a densidade mineral óssea e a idade, resultado similar apresentado na tabela 8, pelo coeficiente de correlação linear de Pearson.

Considerando os animais de acordo com sua idade, a densidade mineral óssea média pela técnica de imersão em água do membro radio-ulnar do cães SRD mostrados na tabela 4 foram: $1,547 \pm 0,150 \text{ g}/\text{cm}^3$ para animais com menos de quatro anos, $1,655 \pm 0,100 \text{ g}/\text{cm}^3$

para animais de quatro a sete anos e $1,673 \pm 0,090 \text{ g/cm}^3$ para animais com idade superiores a sete anos.

A tabela 5 contém os valores de densidade mineral óssea em função da posição, para cada subgrupo classificado de acordo com a idade, ficando evidente a diferença de densidade entre os tecidos compacto e trabecular, mostrando a rápida diferenciação do tecido ósseo interno e externo. Esta diferença é causada principalmente pela grande presença de matriz óssea não mineralizada na porção central de sua estrutura.

A análise estatística verificado na tabela 4 mostrou uma diferença significativa da densidade mineral óssea com a idade dos animais, comparando o subgrupo A1 de animais jovens e os subgrupos A2 e A3 de animais adultos e de animais idosos respectivamente.

Com relação à concentração de cálcio não houve diferença significativa com o aumento da faixa etária, conforme mostra os dados tabela 4, ilustrados na figura 11, como o organismo se mantém em equilíbrio através de processos fisiológicos, a variação de cálcio se comporta da mesma maneira, não variando com a faixa etária (RATH et al, 2000).

Tabela 6. Valores Médios e desvios padrão da DMO (g/cm^3) em cães SRD, considerando o sexo.

Grupo por Sexo	DMO	Concentração de Cálcio (%)
M	$1,623 \pm 0,680$ (a)	$33,57 \pm 2,32$ (a)
F	$1,616 \pm 0,730$ (a)	$34,21 \pm 2,82$ (a)
	$p > 0,05^{\text{ns}}$	$p > 0,05^{\text{ns}}$

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$)

ns não significativo ($p \geq 0,05$)

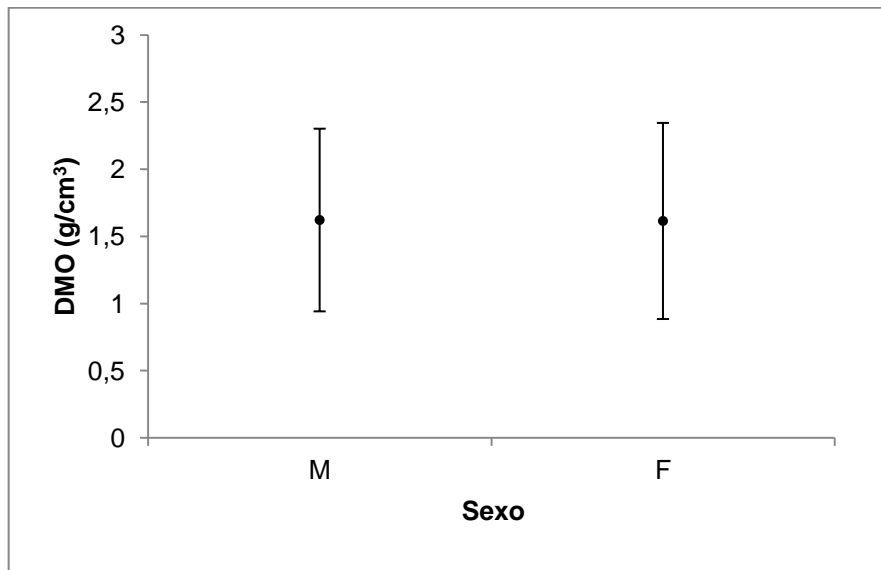


Figura 13. Gráfico dos valores médios da DMO (g/cm^3) em cães SRD, em função da posição das amostras considerando os grupos por faixa de idade.

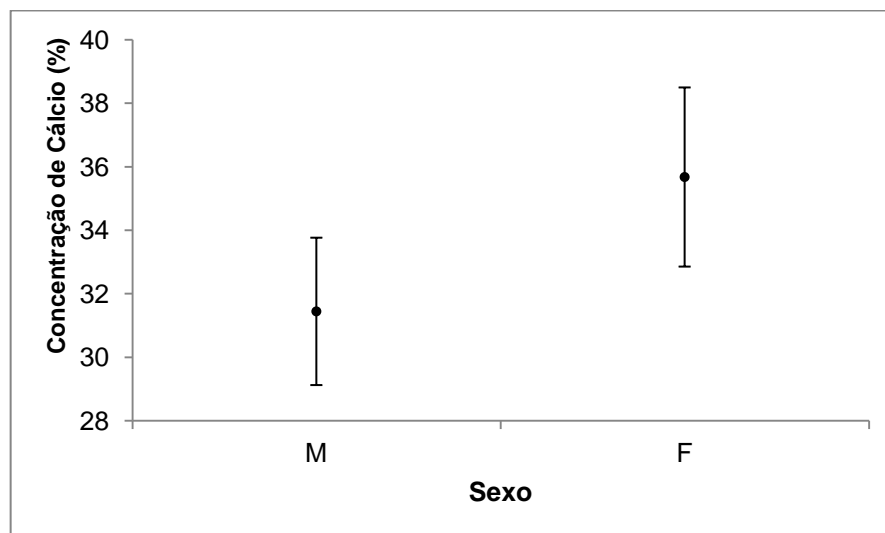


Figura 14. Gráfico dos valores médios da DMO (g/cm^3) em cães SRD, relacionando a concentração de cálcio com os grupos por sexo.

Tabela 7. Valores obtidos da DMO (g/cm^3) em cães SRD, considerando os subgrupos em função do sexo de acordo com a posição na amostra.

Posição	Subgrupos da DMO (g/cm^3) em função do sexo	
	M	F
1	1,489 \pm 0,176	1,490 \pm 0,158
2	1,635 \pm 0,176	1,673 \pm 0,176
3	1,738 \pm 0,159	1,739 \pm 0,170
4	1,707 \pm 0,180	1,631 \pm 0,172
5	1,548 \pm 0,164	1,486 \pm 0,123

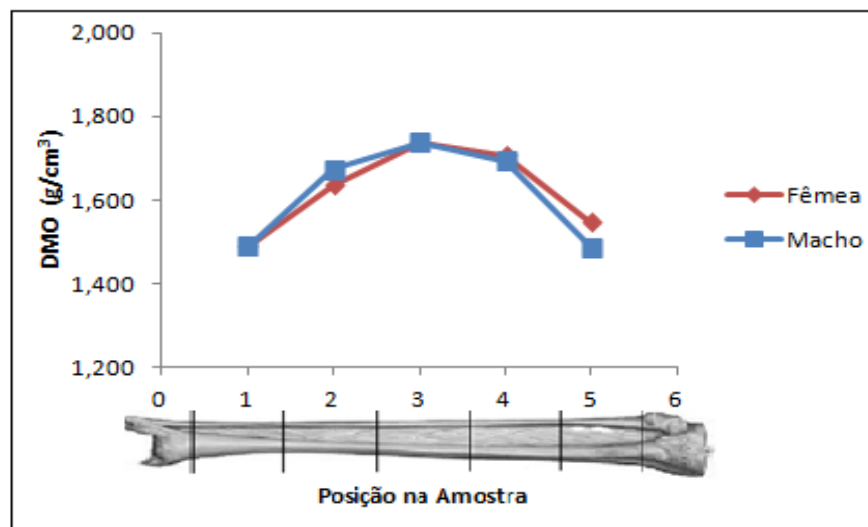


Figura 15. Gráfico dos valores médios da DMO (g/cm^3) em cães SRD, em função da posição das amostras considerando o sexo do animal.

Pode-se verificar pelos dados da tabela 6 e o gráfico exposto na figura 13, que tanto os animais machos quanto as fêmeas obtiveram valores semelhantes para a densidade mineral óssea, não apresentando diferença significativa. O mesmo resultado foi obtido por Leal (2002) e Zotti (2004). Essa semelhança entre os sexos ocorreu conforme o esperado, já que as fêmeas não sofrem perdas de massa óssea durante seu ciclo de vida. Em mulheres, após a menopausa (SPEROFF, 1996), observam-se perdas de 7% no início, e, após algum tempo, pode atingir até 15% (CHRSTIANSEN AND CHRISTENSEN, 1981). As fêmeas de cães não possuem menopausa; portanto, este é um dos fatores que contribuem para a similaridade da densidade mineral óssea em ambos os sexos.

Martin et al. (1981) e Lauten et al (2001) ao analisarem a densidade mineral óssea em relação ao sexo dos animais estudados obtiveram correlação entre eles, sendo que o macho apresentava uma maior densidade mineral óssea em ambos os trabalhos.

Os valores da densidade mineral óssea média pela técnica de imersão em água do membro radio-ulnar dos cães SRD de acordo com o sexo foram de $1,623 \pm 0,680$ para macho e $1,616 \pm 0,730$ para fêmea.

Com relação aos dados da tabela 7 da densidade mineral óssea ao longo do osso a curva do gráfico ilustrado na figura 15, apresenta uma maior densidade na região central do osso e menor em suas extremidades. O mesmo comportamento foi apresentado nos parâmetros peso e idade. Na tabela 6 pode-se verificar que não houve influência do sexo na concentração de cálcio, pois os resultados não apresentaram diferenças estatísticas significativas. Como os cães do gênero feminino não sofrem uma queda de produção de hormônio quando atingem uma idade avançada (SCHMIDT, 2006), ele não sofrerá perda de massa óssea, sendo assim os resultados obtidos podem ser relacionados a este fator.

Tabela 8. Interação entre a DMO e os parâmetros peso, idade, sexo e concentração de cálcio.

Correlação	Coefficiente de Correlação	Significativo
Peso x DMO	0,473	**
Idade x DMO	0,329	**
Sexo x DMO	-0,026	ns
Concentração de Cálcio x DMO	0,232	ns

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$)

ns não significativo ($p \geq 0,05$)

Tabela 9. Análise estatística descritiva da DMO em grama por centímetros cúbicos, para os subgrupos de peso (P1, P2 E P3), idade (A1, A2 e A3) e sexo (M e F).

Variáveis	M	F	P1	P2	P3	A1	A2	A3
Nº DE AMOSTRAS	32	28	24	26	10	20	19	21
Menor valor (min)	1,221	1,375	1,211	1,502	1,554	1,221	1,476	1,503
Maior valor (max)	1,789	1,894	1,719	1,894	1,808	1,738	1,894	1,826
Amplitude (max-min)	0,578	0,519	0,508	0,392	0,254	0,524	0,418	0,323
Média	1,617	1,623	1,550	1,670	1,685	1,547	1,656	1,673
Mediana	1,643	1,624	1,587	1,677	1,694	1,539	1,665	1,662
Desvio padrão	0,125	0,128	0,133	0,084	0,086	0,150	0,104	0,087
Coefficiente de Variação (CV %)	7,741	7,905	8,580	6,001	5,098	9,628	6,256	5,202

Tabela 10. Valores obtidos da densidade de partículas, massas secas e volumes das partículas com seus respectivos valores médios e desvios padrões.

Amostras	Massa seca (g)	Volume das partículas(cm ³)	Densidade de partículas (g/cm ³)	Densidade aparente (g/cm ³)
1	10,37±0,042	4,632±0,283	2,239±0,307	1,788±0,012
2	13,14±0,021	5,816±0,418	2,259±0,313	1,882±0,028
3	13,26±0,011	5,757±0,401	2,303±0,226	1,927±0,013
4	16,38±0,054	7,271±0,507	2,253±0,501	1,904±0,066
5	18,23±0,102	8,237±0,505	2,213±0,503	1,814±0,017
Média	14,27±5,421	6,342±1,413	2,253±0,036	1,863±0,059

Na tabela 10 são apresentados os resultados obtidos referentes às massas secas (g), volume das partículas em cm^3 , densidade das partículas (g/cm^3) e densidade aparente das amostras (g/cm^3). Os valores médios das densidades das partículas e densidade aparente, apresentados na tabela 10, foram de 2,253 e 1,863 respectivamente.

Estes resultados concordam com os apresentados na literatura por Nogueira, 2008 ao desenvolver um trabalho com ossos de equinos, sendo que a densidade por partículas tem como característica o mesmo valor para o mesmo tipo de material.

Utilizando os dados da tabela 10, e a equação 3 foi possível determinar a porosidade óssea das amostras em cada posição, cujos resultados são mostrados na figura 16. O valor médio obtido foi de $17,424 \pm 1,999$. Nogueira (2008) encontrou um valor médio para a porosidade do osso de equino de aproximadamente $14,147 \pm 4,826$. A maior valor da porosidade encontrado foi nas regiões das extremidades, epifíses, onde foram encontrados os menores valores para a densidade mineral óssea.

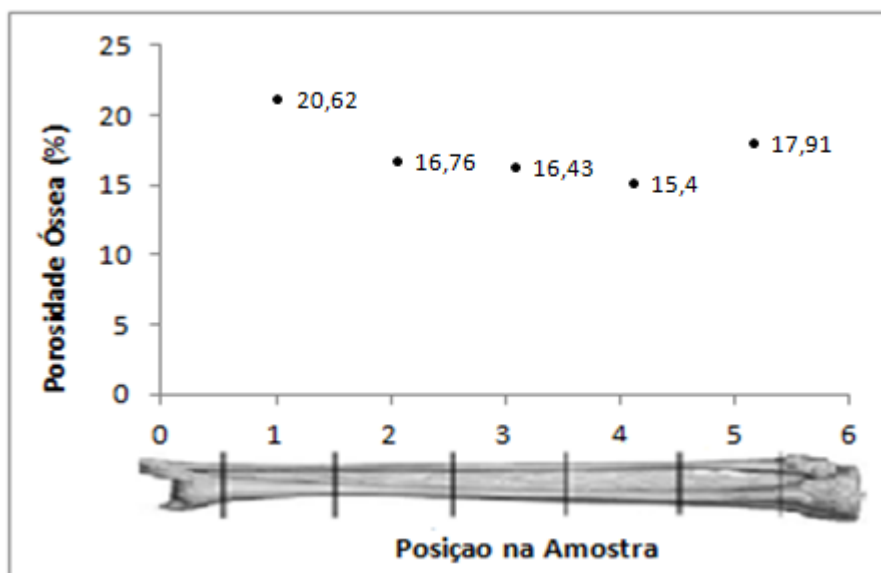


Figura 16. Gráfico dos valores médios da porosidade do tecido ósseo de cães SRD, em função da posição da amostra, a média geral obtida foi de $17,424 \pm 1,999$.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos pela densitometria óssea para determinação da densidade mineral óssea, realizada na presença tecido mole e na ausência de tecido mole mostraram-se concordantes. Isto significa que a presença do tecido mole não prejudicou as análises da densidade mineral óssea de forma significativa.

A técnica de densitometria óssea foi eficiente e de grande aplicabilidade para a mensuração da densidade mineral óssea, sendo de baixo custo e fácil manuseio, porém uma desvantagem é que este não leva em conta a espessura do osso no cálculo da densidade óssea.

A densidade mineral óssea dada em milímetros de alumínio pode ser transformada em g/cm^3 utilizando a seguinte equação: $y = 0,197x + 0,824$.

Existe uma correlação positiva entre a DMO e o peso corporal de cães SRD; o mesmo pode ser dito com relação às faixas etárias

Os dados da densidade mineral óssea de cães SRD ao longo do osso apresentaram uma maior concentração de osso trabecular nas regiões periféricas, epífises, e maior concentração de osso cortical na parte central, diáfise, dos ossos do rádio-ulna.

Este método demonstrou ser extremamente valioso quando se deseja maior precisão nos resultados e pode ser utilizado também de apoio para os outros métodos não destrutivos na confirmação ou não de resultados e para calibração de equipamentos.

7. BIBLIOGRAFIA

ANDERSON, J.B., SHIMMINS, J., SMITH, D.A. **A new technique for the measurements of metacarpal density.** Br. J. Radiol., v. 39, p. 443-450, 1966.

AKAR, A. et al. **Measurement of attenuation coefficients for bone, muscle, fat and water at 140, 364 and 662 keV gamma ray energies.** Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer, Elsevier, v. 102, p. 203 – 211, 2006.

APPOLONI, C. R. and POTTKER, W. E. **Non-destructive porosity profile measurement of amorphous materials by gamma-ray transmission.** Applied Radiation and Isotopes, Elsevier, v. 61, p. 1133 – 1138, 2004.

CANTLEY,C.E.L.;FIRTH,E.C.;DELAHUNT.J.W.;PFEIFER,D.U.;THOMPSON,K.J. **Naturally occurring osteoarthritis in the metacarpophalangeal joints of wild horses.** Equine. Vet. J., v.31, n.1, p.73-81, 1999.

CHAN, G.M., BASS, J.K. **Calcium nutrition and metabolism during infancy.** Nutrition v 22, p. 1057-1066, 2006.

CHRISTIANSEN, C.; CHRISTENSEN, M.S. **Bone mass in postmenopausal after withdrawal of oestrogen/gestagen replacement therapy.** Lancet, v.28, p. 459-461, 1981

COSTA, V. E. **Caracterização físico-energética da madeira e produtividade reflorestamentos de clones de híbridos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*.** 2006. 99 f. Tese (Doutorado em Agronomia / Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônômica, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

DAVISON, S.K. ET AL. **Assessing Fracture Risk and Effects of Osteoporosis Drugs: Bone Mineral Density and Beyond.** The American Journal of Medicine, v.122, p. 992- 997, 2009.

DOBLARÉ, M.; GARCÍA, J.M.; GÓMEZ, M.J. **Modelling bone tissue fracture and healing: a review.** Engineering Fracture Mechanics, v. 71, p. 1809-1840, 2004

DRAPER, H.H. **Bone loss in animals.** Adv. Nutr. Res., New York, v.9, p.53-71,1994.

FELSENBERG, D.; WOLFGANG, G. **Bone densitometry: applications in sports-medicine.** European Journal of Radiology. v. 28, p 150-154, 1998.

FRANK, J.D. et al. **Aging and accumulation of microdamage in canine bone.** Bone.,Tarrytown, v.30, n.1, p.201-206, jan. 2002.

FIELD, R.A. **Ash and calcium as measures of bone in meat and bone mixtures.** Meat Science, v. 55, n.3, p. 255-264, 2000.

GENANT, H.K.; FAULKNER, K.G.; GLÜER, C.C. **Measurement of bone mineral density: current status.** Am. J. Med., New York, v.91, n.25, p.5B-49S-5B-53S, nov.1991.

GRIER, S.J.; TURNER, A.S.; ALVIS, M.R. **The use of dual-energy X-ray absorptiometry in animals.** Invest. Radiol., Philadelphia, v.31, n.1, p.50-62, jan.1996.

HAIDEKKER, M.A., STEVENS, H.Y., FRANGOS, J.A. **Computerized methods for x-ray-based small bone densitometry**. *Comput. Meth. and Progr. Biomed.* v. 73, n. 1, p. 35-42, 2004.

HENRY, J.B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 18ª Ed. Brasil: Editora Manole LTDA, 1678 p. 1995.

HERNANDEZ, C.J., KEAVENY, T.M. **A biomechanical perspective on bone quality**. *Bone* v 39, p 1173-1181, 2006.

IBÁÑEZ, R. **Técnicas de medida de densidad de masa ósea**. *Na. Sist. Sanit. Navar.* v. 3, p 19 – 27, 2003.

JEFFCOAT, M.K., LEWIS C.E., REDDY M.S., WANG C.Y., Redford M. **Postmenopausal bone loss and its relationship to oral bone loss**. *Periodontol.* v 23, p 94-102, 2000.

KÄRLKÄINEN M., LAMBERG-ALLARDT C. **An acute intake of phosphate increases parathyroid hormone secretion and inhibits bone formation in young women**. *Journal of Bone and Mineral Research*, New York, v.11, p.1905-1912, 1996.

KEENAN, M.J. ET al. **Comparison of bone density measurement techniques: DXA and Archimedes' principle**. *Journal of bone and mineral research*, v. 12, p. 1903-1907, 1997.

LAUTEN, S.D.; COX, N.R.; BRAWNER, J.R. **Use of dual energy x-ray absorptiometry for noninvasive body composition measurements in clinically normal dogs**. *Am. J. Vet. Res.*, v.62, n8, p.1295-1301, 2001.

LEAL, A.C.R. **Determinação dos valores normais da densidade mineral óssea (DMO) da extremidade distal do rádio em cães por meio da técnica de densitometria óptica em imagens radiográficas: correlação entre o peso, sexo e idade**. 2002, 51p. Dissertação.

tação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.

LESLIE, W.D. et al. **A population-based study of osteoporosis testing and treatment following introduction of a new bone densitometry service.** *Osteop. Intern.*, v. 16, p. 773-82, 2005.

LIPSCOMB, V.J. et al. **Asymmetric densitometric and mechanical adaptation of the left fifth metacarpal bone in racing greyhounds.** *Vet. Rec.*, v. 148, n. 10, p. 308-11, 2001.

LÖFMAN, O., LARSSON, L., TOSS, G., **Bone Mineral Density in Diagnosis of Osteoporosis.** *Journal of Clinical Densitometry*, v. 8, p. 177-186, 2000.

LOUZADA, M.J.Q. et al. **Avaliações de densidade óssea em imagens radiográficas: estudos em peças ósseas de cães.** *Rev. Bras. Eng. – Cad. Eng. Bioméd.*, v. 14, n. 1, p. 47-64, 1998a.

LOUZADA, M.J.Q. et al. **Densidade de peças ósseas de frangos. Estudo pela densitometria óptica radiográfica.** *Vet. e Zoot.*, São Paulo, v.9, p.95-109, 1997.

MARTIN, R. et al. **Bone loss in the Beagle tibia: influence of age, weight and sex.** *A.M. Bone histomorphometry.* Paris: SNPMD Publishers, p.497, 1981.

MIRSKY, E.C., EINHORN, T.A. **Current concepts review. Bone densitometry in orthopaedic practice.** *J. Bone Joint Surg*, v. 80, n. 11, p. 1687-98, 1998.

MORGAN, E.F., BOUXSEIN M.F. **Biomechanics of Bone and Age-Related Fractures.** *Principles of Bone Biology (Third Edition)*, p 29-51, 2008.

NEVES, R.T.Y; **Fass Determination of metal nutrients in fish feed after ultrasound extraction.** *Rev. Food Chemistry*, v. 113, n.2, p. 679-683, 2009.

RATH, N.C.; HUFF, G.R.; HUFF, E.W. BALOG, J.M. **Factors regulating bone maturing and strenght in poultry.** Poultry Science. 79:1024-1032, 2000.

REICHARDT, K. **Processos de Transferência no Sistema solo-planta-atmosfera,** 4ªed. rev. e ampliada, Fundação Cargill, 1985.

REZENDE, M. A. **Wood shrinkage of Pinus caribaea var. hondurensis and Eucalyptus grandis and their relationships with moisture content and specific gravity.** Scientia Forestalis, Piracicaba, n. 64, p. 120-127, 2003.

REZENDE, M. A., **Uma abordagem não convencional sobre as principais características físicas da Madeira, com ênfase para retratibilidade, massa específica e técnica de atenuação da radiação gama.** Tese de Livre Docência – UNESP – Botucatu, 1997.

SCHMIDT, C.; FRANCO, S.R.V.S. et al, **Densidade mineral óssea em cadelas submetidas à ovariosterectomia com e sem reposição estrogênica oral.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.58, p.506-510, 2006

SPEROFF, L.; ROWAN, J.; SYMONS, J. et al. **The comparative effect on bone density, endometrium, and lipids of continuous hormones as replacement therapy.** J. Am. Med. Assoc., v.6, p.1397-1403, 1996.

TOLL, P.W. et al. **Usefulness of dual energy x-ray absorptiometry for body composition in adult dogs.** J. Nutr., Philadelphia, v.124, p.2601S-2603S, 1994.

VULCANO, L.C.V, MARQUES, F.A., GODOY, C.L.B., **Determinação da densidade mineral óssea da extremidade distal do rádio-ulna em gatos: correlação entre peso, sexo e idade.** Ciência Rural, v.38, n.1, jan-fev, 2008.

ZOTTI, A. et al. **Vertebral mineral density measured by dual-energy x-ray absorptiometry (DEXA) in a group of health Italian boxer dogs.** J. Vet. Med., v. 51, n. 5, p. 254-8, 2004.

WEBBER, C. E. **Photon absorptiometry, bone densitometry and the challenge of osteoporosis.** Physics Med. Biol., Inst. Of Physics Publishing, Review v. 51, p. 169 – 185, 2006.

WILKIE, J.R., GIGER, M.L., CHINANDER, M.R. **Investigation of physical image quality indices of a bone densitometry system.** Med. Physics, v. 31, p. 873-881, 2004.

YOSHIKAWA, D. S. **Medidas de densidade óssea utilizando técnicas nucleares não destrutivas.** 2007. 67 p. Trabalho de Conclusão de Curso (bacharelado- Física médica) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

YOUNG, H. D.; FREEDMAN, R. A. University Physics, **9 rd edition, Addison – Wesley Publishing Company**, New York. 1996.

8. APÊNDICE

Tabela 11. Dados dos cães SRD (sexo, idade, peso e valores da DMO), submetidos à mensuração da densidade mineral óssea pelos métodos de densitometria óptica (mmAl) e imersão em água (g/cm^3).

Amostra	Peso (kg)	Idade	Sexo	DMO (mmAl)	DMO (g/cm^3)
A	14	7	F	2,084	1,603
B	22	4	F	2,111	1,514
C	10	4	F	2,164	1,36
D	15	4	M	2,317	1,225
E	12	2	M	2,377	1,457
F	12	4	M	2,886	1,132
G	25	5	M	2,979	1,272
H	16	4	F	2,994	1,294
I	11	3	M	3,364	1,04
J	15	5	F	3,491	1,58
1A	12	4 a 5	M	2,149	1,789
2 B	14	4	M	2,886	1,499
4 D	12	4	M	2,147	1,687
5 E	25	7	M	3,923	1,722
6 F	30	5	F	-	1,801
7 G	10	7	M	2,612	1,602
8 H	5	2	F	-	1,360
9 I	4	2	M	-	1,441
10 J	5	3	F	-	1,586
11 K	13	9	M	3,436	1,469
12 L	6,5	5	F	-	1,693
13 M	10	10	F	3,078	1,588
14 N	4,5	4	F	-	1,382
15 O	15	10	F	4,499	1,848
16 P	23	6	M	4,030	1,575
17 Q	13	4	M	2,994	1,804

18 R	4	6	M	-	1,692
19 S	4	5	M	-	1,691
20 T	25	9	M	-	1,680
21 U	10,70	8	M	3,362	1,756
22 V	4,40	10	F	-	1,545
23 X	5,44	1	M	-	1,604
24 Z	4,66	1	F	-	1,402
25 A	10,28	5	F	2,347	1,589
26 B	8,5	3	M	-	1,696
27 C	16,32	1	F	2,170	1,545
28 D	16,74	3	F	4,133	1,831
29 E	6,14	2	M	-	1,740
30 F	13,26	2	F	2,848	1,462
31 G	14	8	M	3,808	1,770
32 H	12	4	M	3,967	1,539
33 I	11	3	F	2,743	1,713
34J	12	4a7	F	2,442	1,493
35K	10,68	6a9	M	3,140	1,424
36L	2	8	M	-	1,297
37M	3,66	4	F	-	1,503
38N	7,46	2a4	M	-	1,755
39O	20	6a9	M	3,957	1,576
40P	6	4a6	M	-	1,558
41Q	4	4	M	-	1,193
42R	30	7a9	F	-	1,611
43S	8,5	5a7	M	-	1,706
44T	23	6a8	F	4,010	1,550
45U	26	6a8	M	4,079	1,617
46V	15	4	M	2,741	1,400
47X	26	11	F	-	1,701
48Z	10,6	4a6	F	2,501	1,625
50B	6,36	8a10	F	-	1,715
51C	7,25	3a5	M	-	1,665

52D	3,6	4a6	F	-	1,647
53E	10	6a8	M	3,017	1,576
54F	11	9a10	F	3,220	1,658

Tabela 12. Dados dos cães SRD, submetidos à mensuração da concentração de cálcio através de um espectrofotômetro de absorção atômica.

Amostra	Conc.	Conc.	Conc	Diluição	Massa	g/kg	%	Média	DESVPAD
	(mg/L)	(g/L	Vol.		(g)				
I A	2,65	0,00265	0,00013	0,01	0,05	261,09	26,11	32,39	8,90
I B	2,39	0,00392	0,00020	0,02	0,05	386,76	38,68		
1A A	3,66	0,00366	0,00018	0,02	0,05	368,59	36,86	36,52	0,50
1A B	3,61	0,00361	0,00018	0,02	0,05	361,74	36,17		
5E A	3,57	0,00357	0,00018	0,02	0,05	354,85	35,49	35,20	0,40
5E B	3,51	0,00351	0,00018	0,02	0,05	349,24	34,92		
10J A	3,50	0,00350	0,00018	0,02	0,05	348,67	34,87	34,42	0,60
10J B	3,47	3,00347	0,00017	0,02	0,05	339,71	33,97		
13M A	3,56	0,00356	0,00018	0,02	0,05	356,41	35,64	35,21	0,60
13M B	3,58	0,00358	0,00018	0,02	0,05	347,82	34,78		
18R A	3,48	0,00348	0,00017	0,02	0,05	345,57	34,56	34,96	0,60
18R B	3,53	0,00353	0,00018	0,02	0,05	353,66	35,37		
24Z A	3,74	0,00374	0,00019	0,02	0,05	368,55	36,86	36,84	0,00
24Z B	3,72	0,00372	0,00019	0,02	0,05	368,30	36,83		
25A A	3,34	0,00334	0,00017	0,02	0,05	327,08	32,71	32,93	0,30
25A B	3,32	0,00332	0,00017	0,02	0,05	331,52	33,15		
28D A	3,63	0,00363	0,00018	0,02	0,05	352,75	35,27	35,92	0,90
28D B	3,69	0,00369	0,00018	0,02	0,05	365,60	36,56		
30F A	3,57	0,00357	0,00018	0,02	0,05	353,17	35,32	35,05	0,40
30F B	3,52	0,00352	0,00018	0,02	0,05	347,91	34,79		
39O A	2,10	0,00210	0,00010	0,01	0,05	210,31	21,03	25,28	6,00
39O B	2,96	0,00296	0,00015	0,01	0,05	295,24	29,52		
44T A	3,04	0,00304	0,00015	0,02	0,05	284,56	28,46	26,12	3,30
44T B	2,50	0,00250	0,00012	0,01	0,05	237,80	23,78		
45U A	3,37	0,00337	0,00017	0,02	0,05	338,72	33,87	33,51	0,50
45U B	3,45	0,00345	0,00017	0,02	0,05	331,53	33,15		
46V A	3,18	0,00318	0,00016	0,02	0,05	313,99	31,40	31,45	0,10
46V B	3,19	0,00319	0,00016	0,02	0,05	315,08	31,51		
50B A	3,62	0,00362	0,00018	0,02	0,05	352,32	35,23	35,68	0,60
50B B	3,63	0,00363	0,00018	0,02	0,05	361,30	36,13		