

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E HUMANAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOCIÊNCIA

Matheus del Valle

**AVALIAÇÃO DO OSSO ALVEOLAR COM
OSTEOPOROSE SIMULADA UTILIZANDO
TOMOGRAFIA POR COERÊNCIA ÓPTICA**

São Bernardo do Campo – SP

2019

Matheus del Valle

AVALIAÇÃO DO OSSO ALVEOLAR COM OSTEOPOROSE SIMULADA
UTILIZANDO TOMOGRAFIA POR COERÊNCIA ÓPTICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnociência da Universidade Federal do ABC, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnociência.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Patricia Aparecida da Ana

Coorientador: Prof. Dr. Emery Cleiton Cabral Correia Lins

São Bernardo do Campo – SP

2019

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do ABC
Elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFABC
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

DEL-VALLE, Matheus

Avaliação do Osso Alveolar com Osteoporose Simulada Utilizando Tomografia por Coerência Óptica / Matheus DEL-VALLE. — 2019.

88 fls. : il.

Orientadora: Patricia Aparecida da Ana

Coorientador: Emery Cleiton Cabral Correia Lins

Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal do ABC, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, São Bernardo do Campo, 2019.

1. Osteoporose. 2. Osso alveolar. 3. Tomografia por coerência óptica. 4. Processamento de imagens. I. Aparecida da Ana, Patricia. II. Cleiton Cabral Correia Lins, Emery. III. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2019. IV. Título.

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, de acordo com as observações levantadas pela banca no dia da defesa, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Bernardo do Campo, 04 de abril de 2019.

Assinatura do autor: Mathusalli

Assinatura do orientador: Salvador Ace



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Fundação Universidade Federal do ABC
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Avenida dos Estados, 5001 – Bairro Santa Terezinha – Santo André – SP
CEP 09210-580 · Fone: (11) 4996-0017
ppgbtc@gmail.com

FOLHA DE ASSINATURAS

Assinaturas dos membros da Banca Examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Matheus del Valle, realizada em 4 de fevereiro de 2019:

Prof.(a) Dr.(a) **Patricia Aparecida da Ana** (Universidade Federal do ABC) – Presidente

Prof.(a) Dr.(a) **Luciano Soares da Cruz** (Universidade Federal do ABC) – Membro Titular

Prof.(a) Dr.(a) **Marcelo Magri Amaral** (Universidade Brasil) – Membro Titular

Prof.(a) Dr.(a) **Jean Jacques Bonvent** (Universidade Federal do ABC) – Membro Suplente

Prof.(a) Dr.(a) **Denise Maria Zzell** (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares) – Membro Suplente



AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Patricia Aparecida da Ana por toda confiança depositada à mim, por todo aprendizado que recebi, pela amizade sempre presente e pela extrema dedicação durante todo o trabalho. Sem dúvidas, se tornou meu exemplo número um do profissional que almejo me tornar.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Emery Lins pelas ideias dadas, pela amizade e pelos conselhos e oportunidades que ajudaram a guiar minhas escolhas.

Aos meus pais, Sueli e Alfredo, por todo o suporte e compreensão que tornaram essa jornada possível. Este título de mestre é tão de vocês quanto meu.

À todos docentes e alunos do grupo de biofotônica pelo convívio e ensinamentos.

À toda família e amigos pela compreensão durante os momentos de ausência e apoio motivacional para seguir em frente.

À Universidade Federal do ABC pelas oportunidades concebidas, pela infraestrutura disponibilizada e por apresentar a importância da ciência e pesquisa, moldando quem hoje sou.

À Central Experimental Multiusuário da UFABC-SBC pela disponibilização do equipamento de OCT e de apoio técnico durante todo o mestrado.

Ao Laboratório Nacional de Nanotecnologia pela disponibilização de uso do equipamento de micro-CT e apoio técnico para a análise.

À CAPES pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

Ao Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD-CAPES edital 071/2013-88881.068505/2014-01) pelo apoio realizado.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica (CNPq INCT #465763/2014-6 INFO) pelo apoio realizado.

À todos que aqui não foram mencionados, mas que contribuíram para esta pesquisa.

Os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A osteoporose é uma patologia caracterizada pelo comprometimento da resistência óssea a fratura devido a redução da Densidade Mineral Óssea (BMD), afetando principalmente idosos e mulheres em período pós-menopausa. Quando acometida em osso alveolar, a osteoporose pode implicar em uma série de complicações na arcada dentária, como a perda de dentes, dificuldades no uso de próteses e no processo de recuperação após a inserção de implantes dentários. O diagnóstico clínico da osteoporose é realizado por equipamentos de densitometria óssea, os quais fazem o uso de radiação ionizante e avaliam apenas a BMD. Estudos recentes apontaram o uso da técnica não ionizante de tomografia por coerência óptica (OCT) como método em potencial para a análise da patologia cárie, a qual está relacionada com a perda de mineral do esmalte e dentina, assim como da doença periodontal, relacionada com a perda óssea vertical ou horizontal de osso alveolar. Considerando a perda de mineral promovida pela osteoporose, a proposta deste estudo é utilizar o processamento em MATLAB de imagens de OCT para possibilitar a avaliação da osteoporose alveolar por técnica de imageamento que empregue radiação não ionizante. Para tal, foi realizada a simulação *in vitro* da osteoporose em osso alveolar suíno por imersão em solução ácida. A aquisição e análise de imagens foi dividida em duas fases experimentais: na primeira fase, amostras de mandíbula foram imageadas por micro-CT e OCT, onde os parâmetros calculados pela análise da OCT – coeficiente de atenuação óptica médio ($\bar{\mu}_t$), refletividade integrada (ΔR) e densidade óssea por OCT (DO) – apresentaram boa correlação com os parâmetros obtidos pela análise da micro-CT – razão volume ósseo/volume tecidual (BV/TV) e porosidade total (Po); na segunda fase, amostras de mandíbula e maxila foram imageadas por OCT, onde os parâmetros calculados de DO e ΔR apresentaram diferenças estatísticas significativas entre amostras sadias e os diferentes níveis de osteoporose simulados, além de permitirem a diferenciação entre os tipos de ossos (maxila *vs* mandíbula). As técnicas de processamento de imagens por coeficiente de atenuação óptica (μ_t) e $\bar{\mu}_t$ demonstraram deficiências que prejudicam significativamente a avaliação da osteoporose, enquanto a DO e a ΔR demonstraram ser técnicas em potencial para o diagnóstico e monitoramento da osteoporose por OCT, sem o uso de radiação ionizante e com avaliação de parâmetros alternativos à análise da BMD.

Palavras-chave: Osteoporose, osso alveolar, tomografia por coerência óptica, processamento de imagens.

ABSTRACT

Osteoporosis is a pathology characterized by compromising bone fracture resistance due to reduction of Bone Mineral Density (BMD), affecting mainly elderly and postmenopausal women. When affected by alveolar bone, osteoporosis may involve a series of complications in the dental arch, such as tooth loss, difficulties in the use of prostheses and in the recovering process after insertion of dental implants. The clinical diagnosis of osteoporosis is performed by bone densitometry equipments, which use ionizing radiation and evaluate only the BMD. Recent studies have pointed the use of the non-ionizing technique optical coherence tomography (OCT) as a potential method for the analysis of caries pathology, which is related to the loss of enamel and dentin mineral, as well as periodontal disease, related to vertical or horizontal bone loss of alveolar bone. Considering the mineral loss promoted by osteoporosis, the proposal of this study is to use MATLAB processing of OCT images to enable the evaluation of alveolar osteoporosis by an imaging technique employing non-ionizing radiation. For that, an in vitro model of osteoporosis was simulated in porcine alveolar bone by immersion in acid solution. The image acquisition and analysis was divided into two experimental phases: in the first phase, jaw samples were imaged by micro-CT and OCT, where the parameters calculated by the analysis of the OCT – average optical attenuation coefficient ($\bar{\mu}_t$), integrated reflectivity (ΔR) and bone density by OCT (DO) – presented good correlation with the parameters obtained by the analysis of the micro-CT – bone volume/tissue volume ratio (BV/TV) and total porosity (Po); in the second phase, jaw and maxilla samples were imaged by OCT, where the calculated parameters of DO and ΔR presented significant statistical differences between healthy samples and the different levels of simulated osteoporosis, in addition to allow differentiation between the bone types (maxilla vs jaw). Imaging techniques by optical attenuation coefficient (μ_t) and $\bar{\mu}_t$ demonstrated deficiencies that significantly impair osteoporosis evaluation, whereas DO and ΔR demonstrated to be potential techniques for diagnosis and monitoring of osteoporosis by OCT without the use of ionizing radiation and evaluation of alternative parameters to BMD analysis.

Keywords: *Osteoporosis, alveolar bone, optical coherence tomography, image processing.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Secção do fêmur, sendo evidenciadas as principais estruturas ósseas macroscópicas.	18
Figura 2.	Representação da estrutura óssea microscópica.	19
Figura 3.	Representação do posicionamento de osteoblastos e osteoclastos em atividade no mesmo osso.	20
Figura 4.	Anatomia do osso alveolar e suas interfaces no suporte dentário.	21
Figura 5.	Secção da mandíbula ao nível apical.	22
Figura 6.	Secção transversal da maxila à meia altura dos dentes.	23
Figura 7.	Eletromicrografias de um osso saudável (esquerda) e de um osso com osteoporose (direita).	23
Figura 8.	Comparação da arquitetura óssea em relação à resistência.	24
Figura 9.	Densidade mineral óssea e resistência mecânica do osso cortical em relação à porosidade e tamanho dos poros	26
Figura 10.	Prevalência da osteoporose (em %) no Brasil em 2008 por sexo e grupo etário.	27
Figura 11.	Interações da luz com o meio.	31
Figura 12.	Espectro de absorção e espalhamento da luz em tecidos biológicos.	32
Figura 13.	Exemplos de interferência construtiva e destrutiva.	33
Figura 14.	Esquema representativo do funcionamento de um OCT.	34
Figura 15.	Tipos de aquisições da OCT demonstradas em um olho humano.	35
Figura 16.	<i>B-scan</i> de uma amostra de dentina.	35
Figura 17.	Espectros de emissão de (a) LED, (b) Laser e (c) SLED.	38
Figura 18.	Esquema da TD-OCT.	40
Figura 19.	Esquema da FD-OCT.	41
Figura 20.	Esquema da SS-OCT.	42
Figura 21.	Fluxograma do delineamento experimental seguido para as amostras não-pareadas.	47
Figura 22.	Fluxograma do delineamento experimental seguido para as amostras pareadas.	48

Figura 23. Esquema de escaneamento das amostras utilizando a OCT.	51
Figura 24. Fluxograma do processamento da ROI	53
Figura 25. Fluxograma para obtenção do coeficiente de atenuação óptica (μ_t).	55
Figura 26. Fluxograma para obtenção do coeficiente de atenuação óptica médio ($\bar{\mu}_t$).	56
Figura 27. Fluxograma para obtenção da refletividade integrada (ΔR).	57
Figura 28. Fluxograma para obtenção da densidade óssea por OCT (DO).	58
Figura 29. Imagens microtomográficas representativas da Amostra 1 (controle).	59
Figura 30. Imagens microtomográficas representativas da Amostra 2 (7 dias de imersão em EDTA).	60
Figura 31. Imagens microtomográficas representativas da Amostra 3 (15 dias de imersão em EDTA).	61
Figura 32. Imagens microtomográficas representativas da Amostra 4 (30 dias de imersão em EDTA).	62
Figura 33. <i>B-scans</i> de mandíbulas (primeira fase) em cada período de imersão em EDTA: sem imersão (controle), 7 dias, 15 dias e 30 dias.	65
Figura 34. Imagens volumétricas das amostras da primeira fase.	66
Figura 35. Ajuste linear e coeficiente de correlação de Pearson (r) entre os parâmetros da OCT (Densidade Óssea, Refletividade Integrada e Coeficiente de Atenuação Óptica Médio) e da micro-CT (BV/TV e Po).	67
Figura 36. <i>B-scans</i> de uma mesma amostra de mandíbula (segunda fase) em cada período de imersão em EDTA: sem imersão (controle), 7 dias, 15 dias e 30 dias.	68
Figura 37. <i>B-scans</i> de uma mesma amostra de maxila (segunda fase) em cada período de imersão em EDTA: sem imersão (controle), 7 dias, 15 dias e 30 dias.	69
Figura 38. Imagens volumétricas da amostra de mandíbula da segunda fase.	70
Figura 39. Imagens volumétricas da amostra de maxila da segunda fase.	71
Figura 40. Comparação estatística entre os coeficientes de atenuação óptica médios.	73
Figura 41. Comparação estatística entre as refletividades integradas.	75
Figura 42. Comparação estatística entre as densidades ósseas por OCT.	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Parâmetros definidos para a aquisição das imagens por OCT.	52
Tabela 2.	Valores obtidos dos parâmetros analisados por imagens microtomográficas.	63
Tabela 3.	Médias dos coeficientes de determinação (R^2) dos ajustes exponenciais.	72
Tabela 4.	Comparação entre os coeficientes de atenuação óptica médios de mandíbula e maxila para os mesmos períodos de imersão em EDTA. . .	74
Tabela 5.	Comparação entre as refletividades integradas de mandíbula e maxila para os mesmos períodos de imersão em EDTA.	76
Tabela 6.	Comparação entre as densidades ósseas por OCT de mandíbula e maxila para os mesmos períodos de imersão em EDTA.	78

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVO	16
3	REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1	Morfofisiologia Óssea	17
3.1.1	<i>Ossos alveolares</i>	21
3.2	A Osteoporose	23
3.2.1	<i>Osteoporose em osso alveolar</i>	28
3.2.2	<i>Diagnóstico da Osteoporose</i>	29
3.3	Tomografia por Coerência Óptica	30
3.3.1	<i>Fundamentos de biofotônica</i>	31
3.3.2	<i>Princípio de funcionamento da tomografia por coerência óptica</i>	33
3.3.3	<i>Cálculo base da OCT</i>	36
3.3.4	<i>Fontes de luz</i>	37
3.3.5	<i>Sistemas de Escaneamento</i>	39
3.3.6	<i>Aplicações em tecido ósseo</i>	43
4	MATERIAL E MÉTODO	46
4.1	Delineamento Experimental	46
4.2	Preparo das Amostras	48
4.3	Aquisição das imagens e Processamento dos Dados obtidos por Microtomografia	49
4.4	Aquisição das imagens e Processamento dos Dados obtidos por Tomografia por Coerência Óptica	50
4.4.1	<i>Coefficiente de atenuação óptica</i>	54
4.4.2	<i>Refletividade integrada</i>	56
4.4.3	<i>Densidade óssea por OCT</i>	57
4.5	Análise Estatística dos Dados	58
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1	Primeira Fase Experimental	59

5.1.1	<i>Análise por micro-CT</i>	59
5.1.2	<i>Análise por OCT</i>	65
5.1.3	<i>Comparação quantitativa entre micro-CT e OCT</i>	67
5.2	Segunda Fase Experimental	68
5.2.1	<i>Coefficiente de atenuação óptica</i>	72
5.2.2	<i>Refletividade Integrada</i>	75
5.2.3	<i>Densidade Óssea por OCT</i>	76
6	CONCLUSÃO	80
	REFERÊNCIAS	81
	ANEXOS	88

1 INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma patologia definida como um distúrbio esquelético, onde ocorre comprometimento da resistência óssea, predispondo a um risco aumentado de fratura devido à redução da densidade mineral óssea. A composição óssea permanece a mesma, porém há diminuição na quantidade de matriz óssea, alterando a estrutura do tecido e diminuindo sua resistência a esforços mecânicos [1, 2]. A osteoporose acomete, em sua maior parte, idosos e mulheres no período pós-menopausa [3].

No Brasil, a fratura por osteoporose tem alta prevalência, acometendo 12,8% das fraturas em homens com mais de 40 anos e 15,1% das fraturas em mulheres com mais de 40 anos [4]. Isso representa um importante problema para a saúde pública, onde o diagnóstico precoce é um fator fundamental para amenizar os impactos causados pela doença, assim como para adoção de medidas preventivas [5]. Quando a osteoporose acomete o osso alveolar, pode ser afetada a movimentação e sustentação dos dentes [6], implicando em uma série de complicações, como a perda de dentes e dificuldades no uso de próteses [7].

O diagnóstico clínico da osteoporose é realizado utilizando equipamentos de densitometria óssea, onde a densidade mineral do tecido ósseo do paciente é avaliada através da análise da coluna lombar e do fêmur. Apesar dos diferentes equipamentos de densitometria óssea existentes, todos fazem o uso de radiação ionizante [8].

Uma alternativa para o diagnóstico utilizando radiação não ionizante pode ser o uso de técnicas de biofotônica, onde são avaliadas as interações da luz com os tecidos biológicos, a fim de trazer informações morfológicas e fisiológicas dos tecidos [9]. Neste meio, surge a Tomografia por Coerência Óptica (OCT, do inglês *Optical Coherence Tomography*): técnica não invasiva e sem o uso de radiação ionizante, contando apenas com a interação da luz emitida na região do infravermelho com o tecido biológico [10].

A técnica de OCT possui resolução de 1 a 15 μm e penetração de 1 a 3 mm, variando de acordo com a instrumentação do equipamento e com o tecido a ser avaliado [11]. Desta forma, o osso alveolar é uma região em potencial para o estudo por OCT, pois a espessura da gengiva, tecido mole que recobre o osso alveolar, é de até 2 mm, variando de acordo com a região da boca [12]. Isto pode possibilitar o imageamento com a fonte de luz da OCT até o osso alveolar.

O uso da OCT para a avaliação da osteoporose em osso alveolar pode prover um diagnóstico mais precoce, pois além do fato do diagnóstico por equipamentos de densitometria óssea avaliar

mais diretamente a coluna lombar e o fêmur, estes equipamentos são mais robustos e fazem o uso de radiação ionizante, não sendo acessível para todos os pacientes, principalmente aqueles que não podem ser submetidos à radiação X, como no caso de mulheres grávidas [13].

A literatura evidencia estudos promissores empregando-se a técnica de OCT como ferramenta para o diagnóstico e acompanhamento da doença cárie, que resulta na diminuição de mineral do esmalte e/ou da dentina, e também da doença periodontal [14], onde são afetados os tecidos de suporte do dente, causando danos como a perda da inserção periodontal e perda de osso alveolar [15]. Alguns estudos apresentaram a OCT como técnica em potencial para análise morfológica do tecido ósseo [16, 17], porém ainda não há na literatura estudos empregando a avaliação da osteoporose em osso alveolar utilizando a técnica de OCT.

2 OBJETIVO

O objetivo deste estudo é avaliar o potencial de diagnóstico e de monitoramento da osteoporose simulada em osso alveolar utilizando a tomografia por coerência óptica, além de desenvolver uma rotina de processamento da imagem obtida para que seja possível a quantificação das lesões.

3 REVISÃO DA LITERATURA

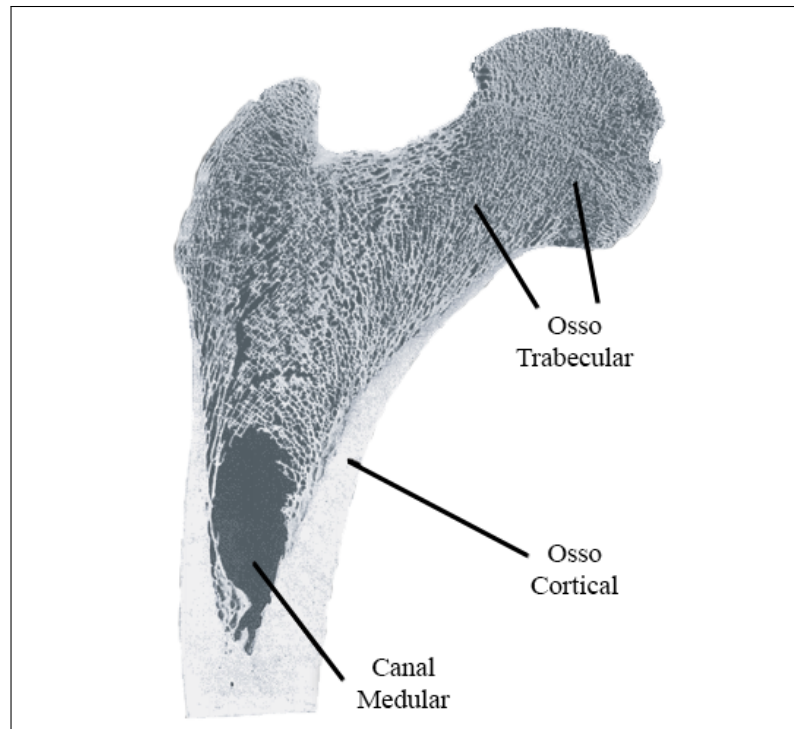
3.1 Morfofisiologia Óssea

O tecido ósseo é responsável pela sustentação e proteção de diversos tecidos do corpo, além de reserva para homeostase de cálcio, fatores de crescimento e citocinas, sendo caracterizado por sua alta rigidez e dureza [18]. Cerca de 25% da massa óssea é composta por uma matriz orgânica, formada principalmente por colágeno tipo I, onde são depositados sais de cálcio e fosfato, que compõem cerca de 65% da massa óssea. Os 10% restantes são devidos à água, que se liga à matriz óssea e também circula livremente pelos canais ósseos [19]. Os sais de cálcio e fosfato promovem dureza ao osso, enquanto as fibras de colágeno aumentam a tenacidade, *i.e.*, concede ao osso uma maior capacidade de absorver impactos mecânicos sem que ocorram fraturas [20].

Macroscopicamente, o osso pode ser classificado em dois tipos: cortical, mais denso, e trabecular, mais poroso (Figura 1). O osso cortical corresponde a aproximadamente 80% da massa do tecido esquelético, possuindo alta densidade de matriz óssea e baixa porosidade (cerca de 10% em relação à seu volume). É revestido por uma membrana externa chamada periósteo, o qual é formado por uma camada externa de tecido conjuntivo fibroso e uma camada interna de células progenitoras de células ósseas, além de possuir vasos sanguíneos e fibras nervosas. Suas principais funções envolvem promover a osteogênese, proteger e nutrir o osso.

O osso trabecular possui alta porosidade (variando de 50 a 90% em relação à seu volume). Seus poros são espaçados ordenadamente em uma rede estrutural horizontal e vertical em formato de hastes e vigas, chamadas trabeculações, que concedem aparência esponjosa ao osso trabecular. Entre a face interna do osso cortical e a externa do osso trabecular está presente um revestimento membranoso chamado endósteo. O endósteo possui uma camada de células ósseas maduras, tendo para o osso trabecular função análoga à do periósteo para o cortical [18, 21, 22]. No interior do osso trabecular está localizada o canal medular, onde é armazenada a porção vermelha da medula óssea, a qual contém células hematopoiéticas, *i.e.*, precursoras das células sanguíneas, e a porção amarelada da medula, composta por tecido adiposo e amplamente presente na fase adulta [19]. Deste modo, o osso cortical está mais relacionado com funções mecânicas e de proteção, enquanto o trabecular está mais relacionado com funções metabólicas [20].

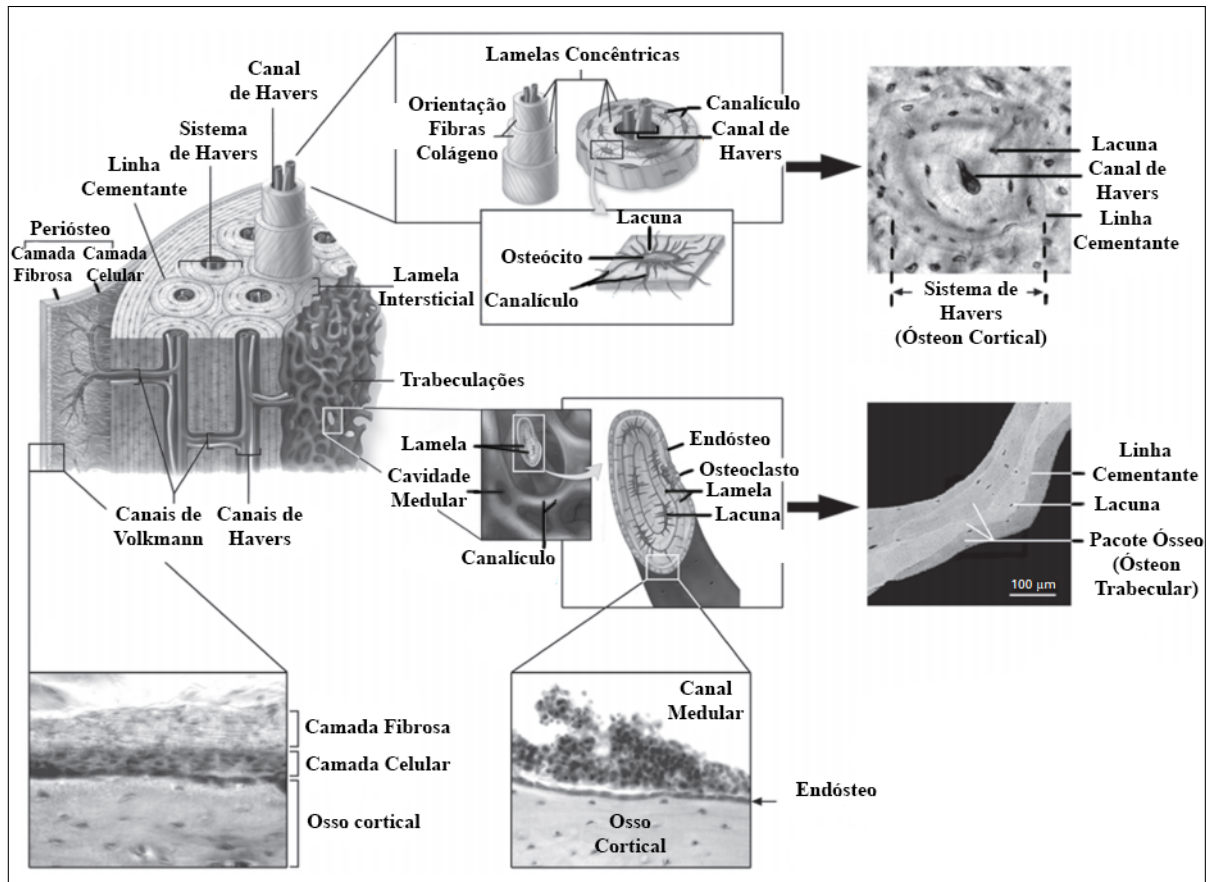
Figura 1 – Secção do fêmur, sendo evidenciadas as principais estruturas ósseas macroscópicas.



Fonte: Adaptado de U.S. Department of Health and Human Services, 2004 [21].

Microscopicamente, tanto o osso cortical quanto o trabecular são compostos por unidades estruturais chamadas de ósteons. No caso do osso cortical, os ósteons são referidos como sistemas de Havers, unidades de 100 a 250 μm de diâmetro, constituídos por canais onde ocorrem a inervação e vascularização, chamados de canais de Havers, envoltos por lamelas ósseas concêntricas com células arranjadas de modo circular. Os canais de Havers são conectados por canais transversais, chamados de canais de Volkmann [19]. O limite entre os sistemas de Havers e a matriz se dá pelas linhas cementantes, as quais são anéis de cerca de 5 μm de osso tão ou mais mineralizado quanto o presente nos ósteons. Uniformemente espaçadas entre as lamelas concêntricas estão as lacunas, onde canalículos ramificados se difundem em todas as direções, formando uma rede de cavidades interconectadas contínua. O preenchimento das regiões entre ósteons adjacentes se dá pelo osso intersticial, constituído por ósteons remanescentes, que foram parcialmente reabsorvidos. No caso do osso trabecular, os ósteons são referidos como pacotes ósseos em formato de pires, constituídos por camadas de lamelas empilhadas. Pacotes adjacentes são separados por linhas cementantes [22]. A Figura 2 representa a estrutura óssea microscópica.

Figura 2 – Representação da estrutura óssea microscópica.



Fonte: Adaptado de Fuchs, Warden e Turner, 2009 [22].

A porosidade do osso cortical é dada pelos canais intracorticais, apresentando uma distribuição homogênea da microestrutura composta por lamelas concêntricas e paralelas, enquanto a porosidade do osso trabecular é dada pelos espaços intratrabeculares da medula, apresentando uma distribuição menos homogênea composta por hastes e vigas de menores densidades e menor grau de orientação paralela [23, 24]

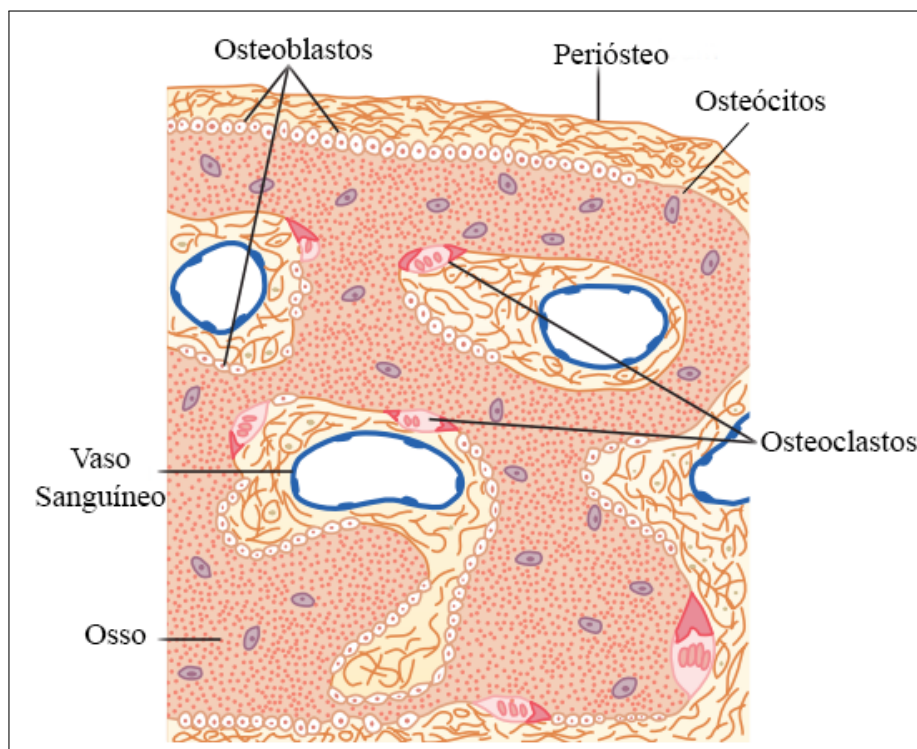
A formação óssea, chamada de osteogênese, se inicia com a secreção da matriz orgânica por células chamadas osteoblastos, originadas de células-tronco mesenquimais [18]. Os monômeros de colágeno se polimerizam rapidamente, formando fibras de colágeno. O resultado é um tecido chamado osteoide, onde sais de cálcio precipitam rapidamente. Ao serem formados os osteoides, os osteoblastos ficam aprisionados, se tornando fixos, passando a serem chamados de osteócitos. Os sais de cálcio se precipitam na superfície das fibras de colágeno, formando cristais de hidroxiapatita ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$), caracterizando o processo de mineralização óssea [25].

Quando o osso é rapidamente formado, as fibras de colágeno ficam desorganizadas,

caracterizando o chamado osso imaturo. Este osso está presente em fetos e em algumas condições patológicas ou no reparo de fraturas. No caso de ossos maduros, as fibras de colágeno se arranjam de maneira organizada, em forma lamelar [18]. Em regiões onde há maior compressão nos ossos (ossos sendo empurrados), as fibras se orientam predominantemente de modo transversal, já em regiões onde ocorre maior tração (ossos sendo puxados), as fibras se organizam longitudinalmente, possibilitando uma maior resistência óssea para cada situação [19].

Durante toda a vida, a deposição óssea pelos osteoblastos é contínua, sendo equilibrada pelo processo de remodelação. A remodelação envolve a síntese óssea pelos osteoblastos e a absorção pelos osteoclastos (Figura 3), células de origem hematopoiética. Os osteoclastos atuam como células fagocitárias, secretando diversos ácidos e lisossomos, contendo enzimas proteolíticas, para que ocorra a absorção óssea [25]. Embora cerca de 60% do conteúdo mineral ósseo possa ser depositado em duas semanas, a mineralização por completo é um processo demorado, se estendendo por diversos meses. A remodelação ocorre em cerca de um a dois milhões de diferentes sítios nos ossos do corpo [26].

Figura 3 – Representação do posicionamento de osteoblastos e osteoclastos em atividade no mesmo osso.



Fonte: Adaptado de Hall, 2016 [25].

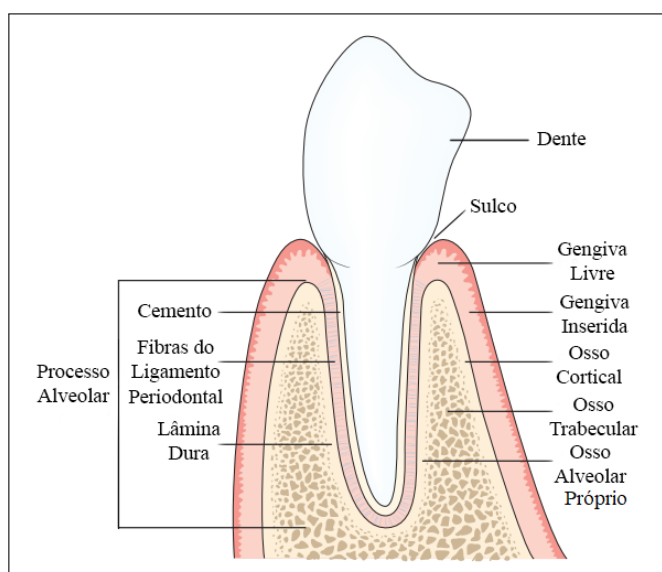
A remodelação é um processo de extrema importância, pois realiza diversos ajustes fisiológicos e estruturais do osso, como o ajuste proporcional da resistência e da estrutura óssea em função dos esforços mecânicos sofridos, além da renovação óssea, para que o tecido ósseo não se torne frágil com o envelhecimento, devido ao desgaste sofrido [25].

O equilíbrio da remodelação se dá por inúmeros fatores. Os osteócitos são responsáveis pela secreção de fatores de crescimento, que regulam as atividades dos osteoblastos e osteoclastos [27]. A deficiência do hormônio estrogênio ou tratamentos utilizando glicocorticóides podem causar apoptose dos osteoclastos, prejudicando o tecido ósseo. Já os osteoblastos possuem receptores para o hormônio da paratireóide (PTH) e estrogênio, sendo prejudicados em caso de condições que afetam o mesmos, como hipotireoidismo e menopausa. O PTH, juntamente com a vitamina D, é um importante mediador na regulação de cálcio. Além disso, fatores de crescimento, atividade física (esforço mecânico) e diversos outros hormônios alteram a atividade de remodelação, principalmente dos osteoblastos [18, 27].

3.1.1 Osso alveolar

O osso alveolar, juntamente ao ligamento periodontal e ao cimento, forma o suporte para os dentes (Figura 4). Durante a formação dos ossos da mandíbula e da maxila, o osso alveolar se dá por uma formação óssea intramembranosa, sendo formado simultaneamente com a formação e erupção dos dentes, desenvolvendo um arcabouço para abrigar os dentes. Pode ser dividido em duas partes: processo alveolar e lâmina dura [19].

Figura 4 – Anatomia do osso alveolar e suas interfaces no suporte dentário.



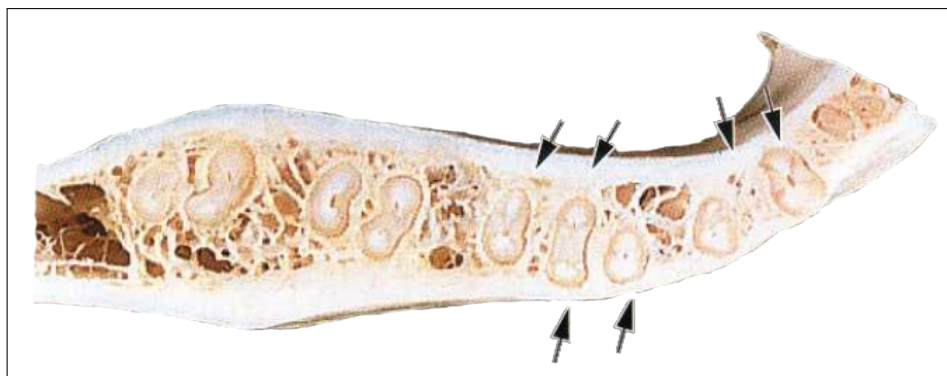
Fonte: Adaptado de Burr e Allen, 2014 [19].

O processo alveolar é formado por osso cortical e trabecular. A espessura cortical tende a ser menor na maxila do que na mandíbula. Contém nervos e vasos sanguíneos que fornecem suporte para os dentes. Quando os dentes são perdidos, ocorre a reabsorção óssea gradativa do processo alveolar, diminuindo sua espessura e altura permanentemente [19,28].

A lâmina dura, frequentemente chamada de osso alveolar próprio, é a parte do osso alveolar que faz a fronteira entre o processo alveolar e o ligamento periodontal. Enquanto o folículo dentário dá origem aos cementoblastos, que depositarão o cimento, outras células mesenquimais do folículo dentário se diferenciam em fibroblastos, formando o ligamento periodontal, e em osteoblastos, formando os arcabouços para as raízes dos dentes, chamados de rebordos alveolares. Desta forma, as fibras de colágeno do ligamento periodontal se incorporam ao cimento e à lâmina dura, promovendo uma forte ligação entre o dente e o osso [12, 19].

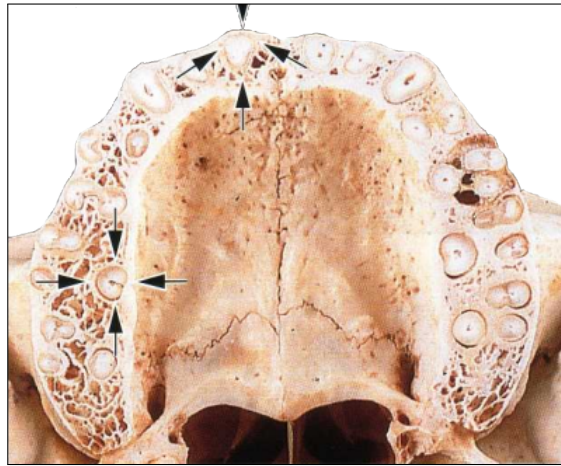
Durante a formação da estrutura de suporte e dos dentes, o osso alveolar apresenta remodelação contínua, preenchendo os espaços em torno das raízes conforme estas se alongam. A lâmina dura se funde ao osso cortical do processo alveolar para formar a chamada crista alveolar. Em geral, em um indivíduo saudável, a espessura da crista alveolar é de 1 a 2 mm [19]. O osso que preenche os espaços entre os rebordos é chamado de septo interdental. A quantidade de osso cortical ou trabecular no septo interdental varia ao longo da arcada dentária, possuindo menor quantidade de osso trabecular na região anterior da arcada, onde estão situados os dentes incisivos e maior quantidade de osso trabecular na região posterior da arcada, onde estão os dentes com mais de uma raíz (Figuras 5 e 6) [12].

Figura 5 – Secção da mandíbula ao nível apical. As setas indicam a continuidade entre a lâmina dura e o osso cortical. Maior espessura e quantidade de osso trabecular em direção à região posterior (para a esquerda).



Fonte: Adaptado de Lindhe, 2015 [12].

Figura 6 – Secção transversal da maxila à meia altura dos dentes. As setas indicam a presença de osso cortical ao redor dos dentes.

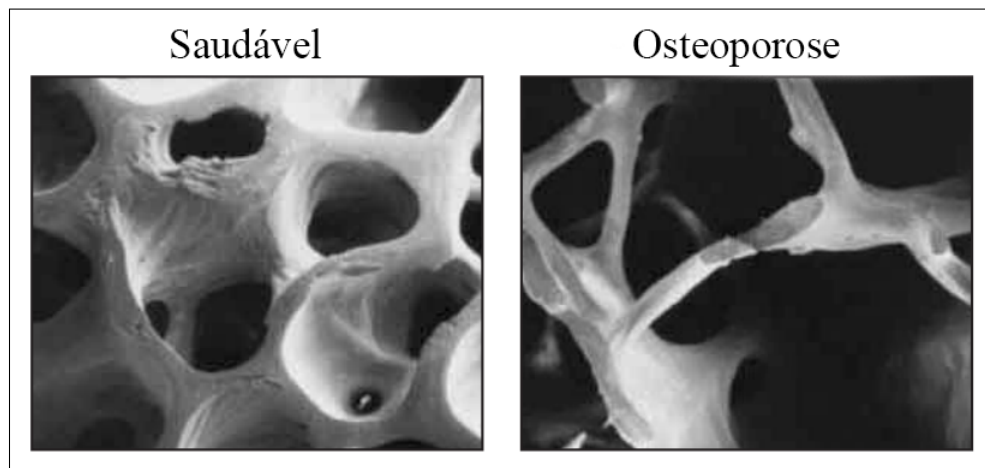


Fonte: Adaptado de Lindhe, 2015 [12].

3.2 A Osteoporose

A osteoporose é uma doença que acomete o tecido ósseo, causando diminuição da Densidade Mineral Óssea (BMD, do inglês *Bone Mineral Density*). Baixos índices de BMD estão associados ao aumento do risco de fratura, pois alteram a estrutura óssea e diminuem a quantidade (massa óssea) e qualidade do osso (Figura 7), tornando o tecido frágil e susceptível a trincas e fraturas, mesmo que esforços mecânicos de baixa intensidade sejam realizados [2, 21, 29, 30].

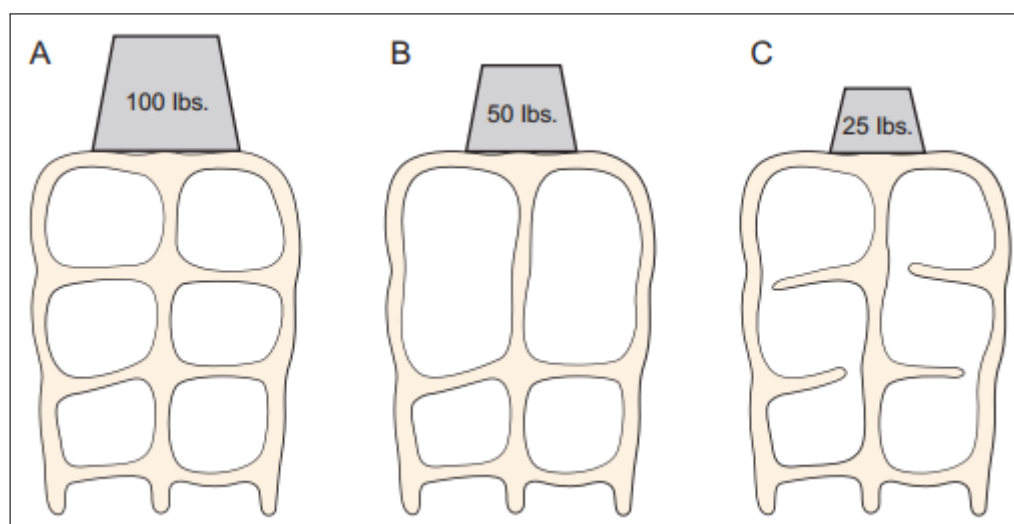
Figura 7 – Eletromicrografias de um osso saudável (esquerda) e de um osso com osteoporose (direita). O osso saudável apresenta maior densidade de massa óssea, com estruturas mais espessas, enquanto o osso com osteoporose apresenta estruturas com densidade reduzida, sendo mais propenso à trincas e fraturas. Largura de campo de cada imagem de 2,6 mm.



Fonte: Adaptado de U.S. Department of Health and Human Services, 2004 [21].

A causa das fraturas relacionadas à osteoporose é complexa. O principal fator de risco de fratura é a diminuição da massa óssea. O desequilíbrio da remodelação, tanto o aumento quanto a diminuição, resulta na redução da massa óssea. A remodelação aumentada pode causar maior absorção óssea do que deposição, já a diminuição da remodelação resulta em falta de reparo aos tecidos que se desgastam por fadiga. A proporcionalidade entre os cristais de hidroxiapatita e colágeno também é essencial, pois o colágeno tanto pouco quanto muito mineralizado implica na diminuição da resistência à fratura [31]. Além disso, a simples alteração da arquitetura já pode causar o enfraquecimento do osso, conforme modelo representativo na Figura 8 [19].

Figura 8 – Comparação da arquitetura óssea em relação à resistência. (A) Poros com diâmetros menores e arquitetura mais conexas, suportando até 100 lbs. (B) Poros com diâmetros maiores, suportando até 50 lbs. (C) Arquitetura desconexa, suportando até 25 lbs.



Fonte: Burr, 2014 [19].

Com relação à microestrutura óssea, a alteração principal se dá no colágeno presente na matriz óssea. O padrão de formação de ligações cruzadas (ligações covalentes inter e intramoleculares de proteínas) entre as fibras de colágeno é um fator determinante para as características de resistência à tração e viscoelasticidade da matriz. Durante o processo de maturação óssea, em que as fibras de colágeno se organizam em forma lamelar, o número de ligações cruzadas aumenta, resultando em uma maior resistência ao osso. Quando a remodelação óssea está desbalanceada, ocorre diminuição no número de ligações cruzadas, enfraquecendo o osso [31].

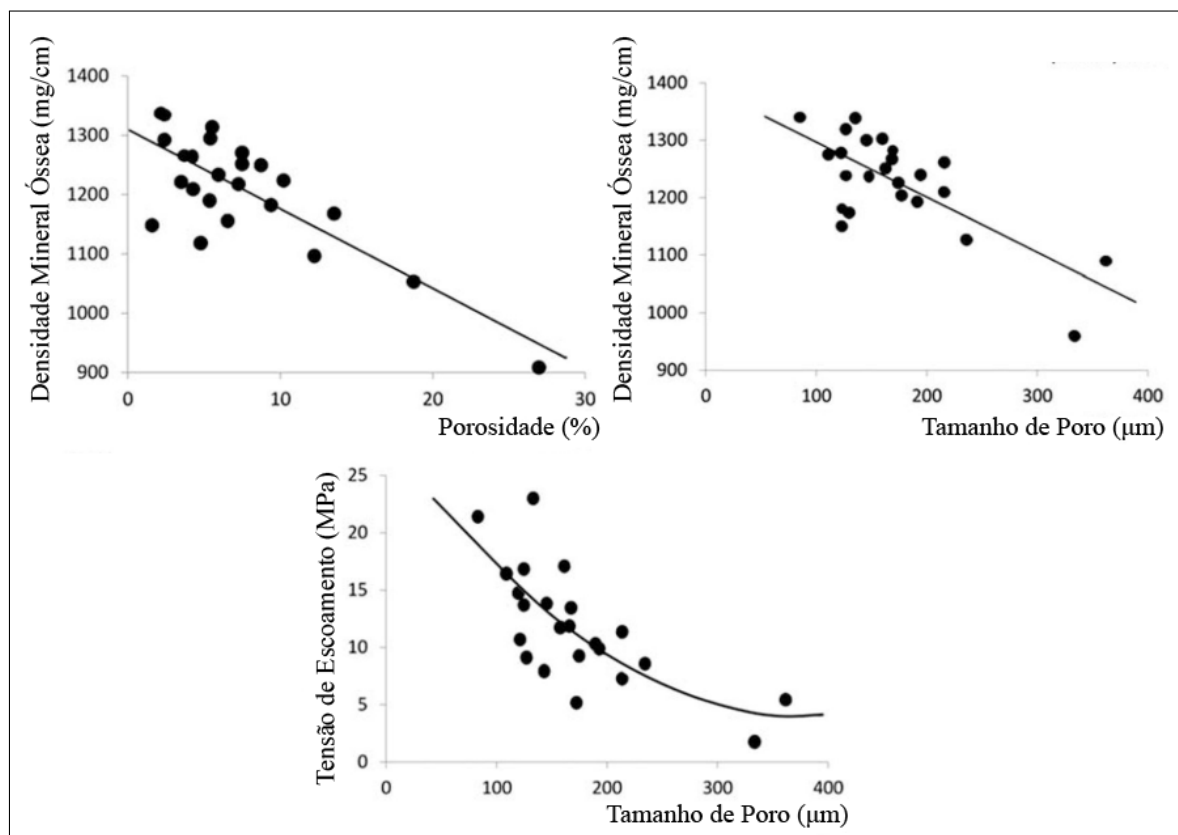
Os principais fatores que influenciam na manifestação da osteoporose são [25]:

- Falta de estímulo mecânico: sedentarismo ou patologias que incapacitem atividades físicas;
- Menopausa: redução dos níveis de estrogênio no período pós-menopausa;
- Envelhecimento: redução dos níveis de hormônios e fatores de crescimento, além de deterioração das funções anabólicas de proteínas, impedindo a deposição da matriz óssea;
- Má nutrição: ausência de vitaminas, proteínas e outras substâncias necessárias para a formação da matriz óssea.

Em geral, o pico na síntese óssea se dá entre os 20 e 30 anos de idade, decrescendo e estabilizando até 40 anos. Após os 40 anos, a proporção entre síntese e absorção, bem com a taxa com que as mesmas ocorrem, diminuem progressivamente. No caso de mulheres, há um alto decréscimo da síntese nos primeiros 10 anos após a menopausa [20,29].

O número e tamanho dos poros são determinantes para os parâmetros de porosidade e BMD (Figura 9), sendo significativamente maiores em indivíduos com osteoporose. A porosidade é responsável por cerca de 70% do módulo de elasticidade e 55% da tensão de escoamento (tensão máxima em regime elástico de deformação) do osso cortical, sendo que com aumento de tamanho dos poros, as propriedades mecânicas do osso cortical são prejudicadas consideravelmente. O aumento da porosidade em osso cortical também pode ser evidenciado pelo envelhecimento, onde o valor passa de cerca de 4% em jovens saudáveis para cerca de 50% em idosos. O osso trabecular, por conter maior porosidade e maior taxa de remodelação, sofre maior perda óssea em processos incipientes da osteoporose [23].

Figura 9 – Densidade mineral óssea e resistência mecânica do osso cortical em relação à porosidade e tamanho dos poros



Fonte: Adaptado de Osterhoff *et al.*, 2016 [23].

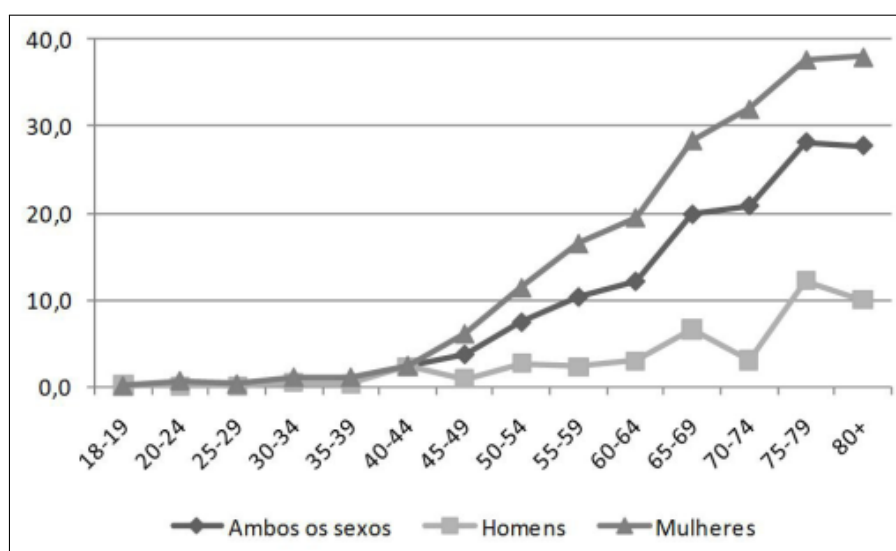
A osteoporose tem progressão assintomática, sendo evidenciada quando ocorre a fratura de uma estrutura de importância relativa e altamente relacionada à osteoporose: vértebras, porção proximal do fêmur (quadril) e porção distal do antebraço (pulso). As fraturas causadas pela osteoporose afetam significativamente a qualidade de vida do paciente, pois além de serem dolorosas e causarem deformidades e incapacidades, a recuperação é lenta, visto que o reparo de fraturas em pacientes com osteoporose é prejudicado [27].

Fatores étnicos e geográficos influenciam nos riscos de ocorrência da osteoporose. A razão média de fraturas no quadril (relacionadas à osteoporose) em mulheres por fraturas no quadril em homens varia em 2,4 na América Latina, 2,3 na Oceania, 2,2 na América do Norte, 2,0 na Europa, 1,5 na Ásia e 1,1 na África. Apesar dos valores médios, isso não significa que as fraturas em homens são sempre em menores porcentagens. Em alguns países como Itália, México, Irã e Austrália a quantidade de fraturas em homens é maior do que em mulheres. Dados dos Estados Unidos apontam que as quantidades destas fraturas são cerca de 50% menores em mulheres de etnia negra e asiática e cerca de 30% menores em mulheres de etnia hispânica

quando comparadas com mulheres de etnia branca. Variações étnicas e geográficas também ocorrem para outros tipos de fraturas [32].

No Brasil, os dados estatísticos ainda são escassos, porém aponta-se uma variação da taxa de incidência da osteoporose de 24% a 33% em mulheres com mais de 40 anos, e que 12,8% das fraturas em homens com mais de 40 anos e 15,1% das fraturas em mulheres com mais de 40 anos estão relacionadas com a osteoporose [4]. Através dos dados estabelecidos em 2008 de expectativa de vida e prevalência da osteoporose, Camargos e Bomfim [33] evidenciaram que, ao nascer, um homem viveria, em média, por 69,1 anos, onde 1,3 ano seria vivido com osteoporose. Já no caso das mulheres, a expectativa de vida seria 76,7 anos, onde 7,9 anos seriam vividos com osteoporose. A Figura 10 exibe a prevalência da osteoporose no Brasil em 2008 em função do sexo e grupo etário.

Figura 10 – Prevalência da osteoporose (em %) no Brasil em 2008 por sexo e grupo etário.



Fonte: Camargos e Bomfim, 2017 [33].

A economia também é amplamente afetada pela osteoporose. Nos Estados Unidos, em 2005, os gastos foram de 19 bilhões de dólares em fraturas relacionadas à osteoporose. A projeção para 2025 é de 25 bilhões de dólares [27, 34]. No Brasil, considerando apenas os gastos federativos no triênio de 2008 a 2010 e em pessoas com 65 anos ou mais, o valor foi de quase 290 milhões de reais [35]. A expectativa de vida global também está aumentando. A projeção é que em 2050 a população global de pessoas com 65 anos ou mais passe de 323 milhões para 1555 milhões [36]. No Brasil, esta população era de 20 milhões em 2010, onde dois terços eram compostos por mulheres, sendo projetados mais de 50 milhões para 2050 [4]. Isto implica em um aumento significativo nas ocorrências de osteoporose.

3.2.1 Osteoporose em osso alveolar

A osteoporose, quando acometida em osso alveolar, pode implicar em uma série de complicações, como a perda de dentes, dificuldades no uso de próteses e no processo de recuperação após a inserção de implantes dentários [7]. As mudanças observadas incluem, principalmente, redução da BMD, deterioração da microarquitetura dos poros, aumento da atividade dos osteoclastos e da taxa de remodelação, redução volumétrica dos rebordos alveolares e da espessura cortical [37].

O osso alveolar possui altas taxas de remodelação, auxiliando no progresso da osteoporose. Um estudo realizado em cachorros apontou que a velocidade de remodelação da mandíbula é de 37% ao ano, enquanto na maxila é de 19% ao ano. Ambas demonstraram maior velocidade de remodelação em comparação ao fêmur, o qual foi de 6,4% ao ano [38]. Já um estudo realizado em porcos, com indução da osteoporose via administração de glicocorticóides na alimentação por 6 meses, apresentou maior redução da BMD em osso alveolar (redução de 21,57% em mandíbula e de 21,62% em maxila) do que na coluna lombar (redução de 10,04 %) [39].

A movimentação dos dentes é um fator afetado pela osteoporose em osso alveolar. Dependendo da intensidade e direção da força aplicada aos dentes, ocorre distorção da matriz extracelular do ligamento periodontal, causando mudanças no formato das células e na organização do citoesqueleto. Com isto, ocorre compressão das fibras periodontais, formação de áreas livres de células e consequente reabsorção óssea [6].

A literatura evidencia a prevalência de perda dentária em indivíduos com osteoporose, indicando este ser um dos principais motivos pela perda [40]. Um estudo apresentou a relação linear positiva entre o número de dentes e o índice de BMD em mulheres no período pós-menopausa [41], concluindo que a osteoporose pode ter contribuído para a perda dentária em indivíduos que não apresentam nenhuma outra doença relevante para tal.

No caso de um paciente afetado por osteoporose sendo acometido pela perda dentária, a redução do rebordo alveolar será maior e mais intensa do que a redução em um paciente não sendo afetado por osteoporose. Após a extração dentária, a atividade de osteoclastos é intensamente ativada nos primeiros 6 a 24 meses, sendo reduzida progressivamente conforme a redução dos rebordos alveolares. Com a associação da osteoporose sistêmica, a atividade osteoclástica é ativada ainda mais intensamente [42]. A alteração no padrão de remodelação da área edentada varia entre os indivíduos. Além disso, há a associação positiva entre baixos índices de BMD e a perda de tecido ósseo oral [43].

A redução da BMD pode facilitar também a reabsorção do osso alveolar em pacientes acometidos pela doença periodontal, doença inflamatória dos tecidos de suporte dos dentes devido à infecção induzida por biofilme. Indivíduos com osteoporose sistêmica e doença periodontal podem reagir de modo diferente ao aumento de citocinas e mediadores inflamatórios, induzindo à um quadro mais grave da doença periodontal. Além disso, baixos índices de cálcio e vitamina D também podem influenciar nas condições periodontal e na perda de dentes [15].

3.2.2 Diagnóstico da Osteoporose

O diagnóstico clínico da osteoporose é realizado através da avaliação do histórico de fraturas sofridas pelo paciente [27] e por técnicas de imagens que possibilitam analisar a BMD, chamadas de densitometrias ósseas. Densitometria é um termo aplicado para mensurar a densidade de alguma amostra. No caso da densitometria óssea, utilizam-se equipamentos que fazem uso de radiação ionizante para avaliar a BMD, pois além de possuir boa penetração, a absorção óssea por esta radiação é alterada de acordo com os níveis de BMD [13].

A escala comparativa utilizada para analisar a BMD foi elaborada com base em valores padrões de indivíduos saudáveis na faixa dos 30 anos, chamada de *T-score*. O *T-score* avalia o desvio padrão (DP) entre o valor de BMD obtido pelo exame e os valores padrões. A Organização Mundial da Saúde define que um paciente é considerado saudável se o valor do *T-score* varia entre +1 e -1, ou seja, DP = 1. Caso o valor do *T-score* esteja entre 1 e 2,5, será considerado um paciente com osteopenia, ou seja, grau inicial de perda óssea, que indica baixa densidade óssea, mas ainda não está ao nível da osteoporose. Valores maiores que 2,5 indicam a osteoporose. Caso seja associado o valor de 2,5 com um histórico de fraturas, a doença é considerada como osteoporose severa [2, 13, 44].

A técnica mais comumente utilizada e considerada pela Organização Mundial da Saúde como a melhor para a avaliação da BMD é a de absorptometria radiológica de dupla energia (DXA, do inglês *Dual-Energy X-Ray Absorptiometry*) [45]. Como os tubos de raio-x possuem uma ampla faixa de emissão, os equipamentos de DXA possuem filtros específicos para que se formem dois picos de intensidade significativamente distintos, denominando o termo “dupla energia”. A dupla energia é necessária para distinção entre o osso e tecidos moles que o recobrem. Em geral, os picos variam de 70 a 140 kV, sendo alternados 60 vezes por segundo. O tempo de escaneamento dura entre 1 e 2 minutos e geralmente são considerados os ossos do

fêmur e da coluna lombar para a análise da BMD [13,46].

Para o diagnóstico da osteoporose em osso alveolar, a técnica clinicamente considerada padrão-ouro também é a DXA, mas outras técnicas como a radiografia e tomografia computadorizada (CT, do inglês *Computed Tomography*) também possibilitam a avaliação do osso alveolar [47]. No caso de experimentos científicos, a técnica de microtomografia (micro-CT) é considerada padrão-ouro para análise de pequenas amostras de osso, na ordem de milímetros, pois possui resoluções que variam entre 5 e 150 μm , de acordo com o equipamento e tamanho da amostra, e possibilitam avaliações morfológicas da microestrutura óssea [30,48].

Todas estas técnicas citadas fazem o uso de radiação ionizante e são realizadas por equipamentos mais robustos, reduzindo sua portabilidade e frequência de uso para os pacientes, além de necessitarem de salas especiais e do cumprimento de protocolos de segurança para garantir a proteção radiológica do técnico operador e também dos pacientes próximos à sala, o que aumenta significativamente o custo de execução destas técnicas [13]. O uso de uma técnica que não faça uso de radiação ionizante pode possibilitar um diagnóstico mais precoce e acessível para os pacientes, como é o caso da tomografia por coerência óptica, abordada no Item 3.3. Além disso, apesar de ser o padrão-ouro de medida atual, apenas a análise da BMD pode não ser satisfatória para uma completa avaliação da osteoporose, pois outros outros fatores também podem influenciar no enfraquecimento do osso, como características morfológicas do tecido. Desta forma, o diagnóstico pode ser mais eficaz quando a análise da BMD for associada à avaliação de informações clínicas do paciente e de outros parâmetros obtidos por técnicas de análise diferentes [49–51].

3.3 Tomografia por Coerência Óptica

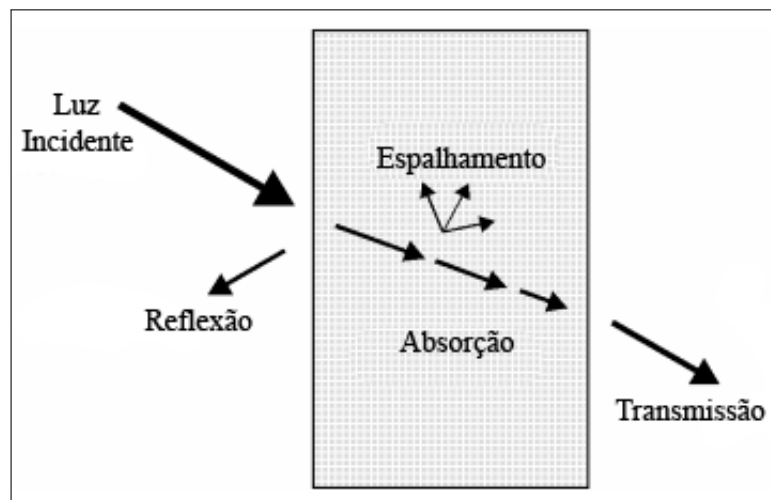
A Tomografia por Coerência Óptica (OCT, do inglês *Optical Coherence Tomography*) é uma técnica não invasiva e sem uso de radiação ionizante para a obtenção de imagens em cortes seccionais (tomográficos), podendo ser aplicada *in vivo*, apresentada pela primeira vez por Huang *et al.* em 1991 [52]. Os equipamentos de OCT possuem uma fonte de luz emitida na região do infravermelho próximo (NIR, do inglês *Near-Infrared*), possibilitando penetrações em tecidos biológicos de 1 a 3 mm e resoluções de 1 a 15 μm , variando de acordo com a instrumentação do equipamento e com o tecido a ser avaliado [11, 53]. Para um melhor entendimento da técnica de OCT, primeiramente devem ser apresentados alguns conceitos

básicos de biofotônica, ou seja, da luz e suas interações com tecidos biológicos.

3.3.1 Fundamentos de biofotônica

As principais interações entre a luz e os diferentes meios são: reflexão, absorção, espalhamento e transmissão (Figura 11). A **reflexão** se dá quando a luz incidida retorna após interagir com a superfície de um meio. Isto ocorre quando a luz, que está se propagando em um meio, incide em outro meio com determinado índice de refração diferente do primeiro. A **absorção** ocorre quando o meio atenua a intensidade da luz incidente, pois as moléculas do meio e a energia dos fótons incidentes estão em ressonância. As moléculas que realizam a absorção da luz são chamadas de cromóforos. O **espalhamento** ocorre quando as frequências de vibração da luz e das moléculas do meio são diferentes, fazendo com que a luz mude de direção de propagação, podendo perder parte de sua intensidade. A **transmissão** é dada pela porção de luz que não sofre estas interações, atravessando o meio [54].

Figura 11 – Interações da luz com o meio.

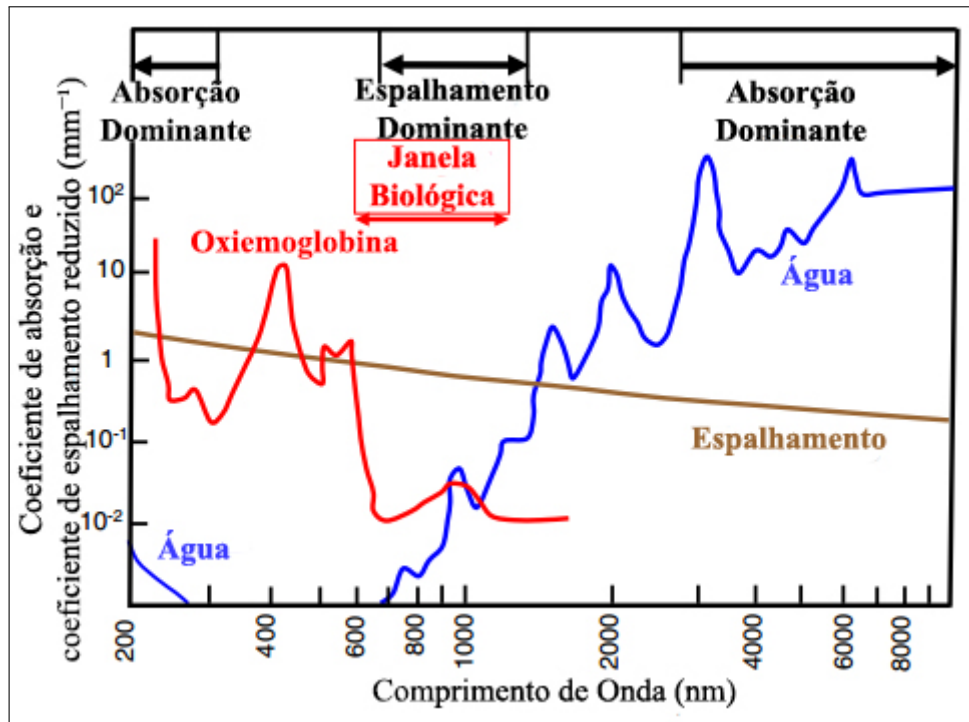


Fonte: Adaptado de Niemz, 2007 [54].

No caso de tecidos biológicos, por serem altamente heterogêneos, com diferentes moléculas e estruturas, todos estes efeitos podem ocorrer simultaneamente, mas em geral, a absorção e o espalhamento são as interações que ocorrem com maior intensidade. As proporções de ocorrência variam de acordo com o comprimento de onda da luz incidente e com o tecido em questão. Os parâmetros ópticos dos tecidos que caracterizam essas interações são definidos como coeficiente de absorção (μ_a) e coeficiente de espalhamento (μ_s) [55]. A Figura 12 apresenta a absorção e o espalhamento da luz em função do comprimento de onda, evidenciando

os principais cromóforos presentes nos tecidos biológicos: água e hemoglobina em sua forma oxigenada (oxiemoglobina). A região de aproximadamente 650 a 1300 nm é dita janela biológica, pois a absorção é minimizada, prevalecendo o espalhamento [56].

Figura 12 – Espectro de absorção e espalhamento da luz em tecidos biológicos.

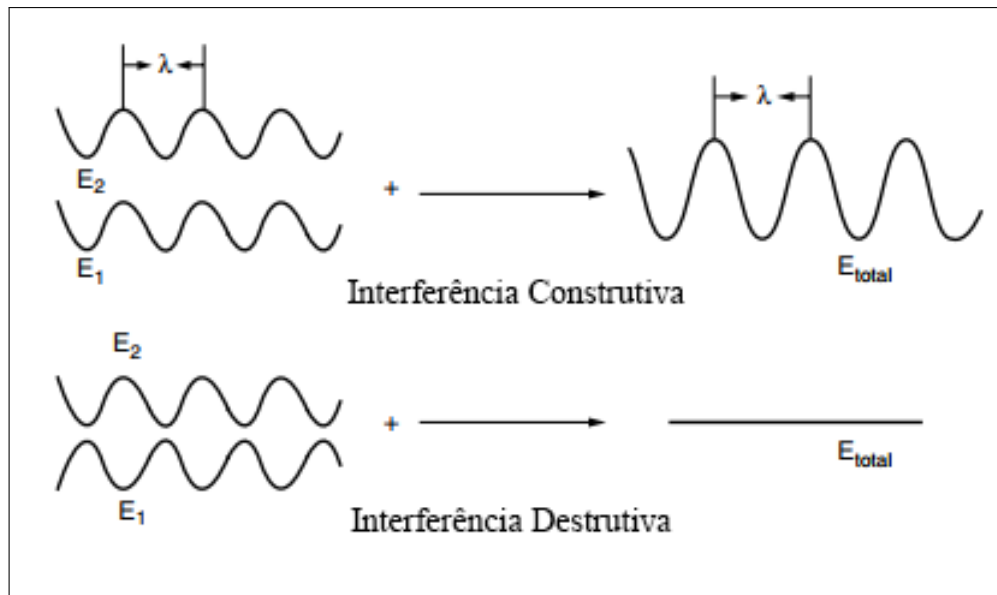


Fonte: Adaptado de Yamada e Okawa, 2014 [56].

Uma característica que algumas fontes de luz apresentam é a de coerência. O conceito de coerência envolve dois tipos: temporal e espacial. A coerência temporal está relacionada com ondas possuindo o mesmo comprimento de onda ou comprimentos de onda próximos, ou seja, largura de banda espectral estreita. Este tipo de luz é chamada de monocromática, *i.e.*, observa-se uma única cor em sua emissão. Já a coerência espacial está relacionada com a propagação em fase, *i.e.*, os máximos e mínimos das ondas estão alinhados [9].

Um fenômeno que pode ser compreendido através da propriedade de coerência é a interferência (Figura 13), onde duas ondas de luz são combinadas. Caso essas ondas estejam em fase, ocorre a interferência construtiva, resultando no aumento da amplitude da luz, ou seja, aumentando o brilho da luz. Caso essas ondas não estejam em fase, ou seja, máximos e mínimos desalinhados, ocorre a interferência destrutiva, resultando na diminuição da amplitude da luz, ou seja, diminuindo ou até anulando o brilho da luz [9, 57].

Figura 13 – Exemplos de interferência construtiva e destrutiva, onde λ é o comprimento de onda, E_1 e E_2 são as amplitudes dos campos elétricos das ondas 1 e 2, respectivamente, e E_{total} é a amplitude do campo elétrico após a interferência das ondas 1 e 2.



Fonte: Adaptado de Prasad, 2003 [9].

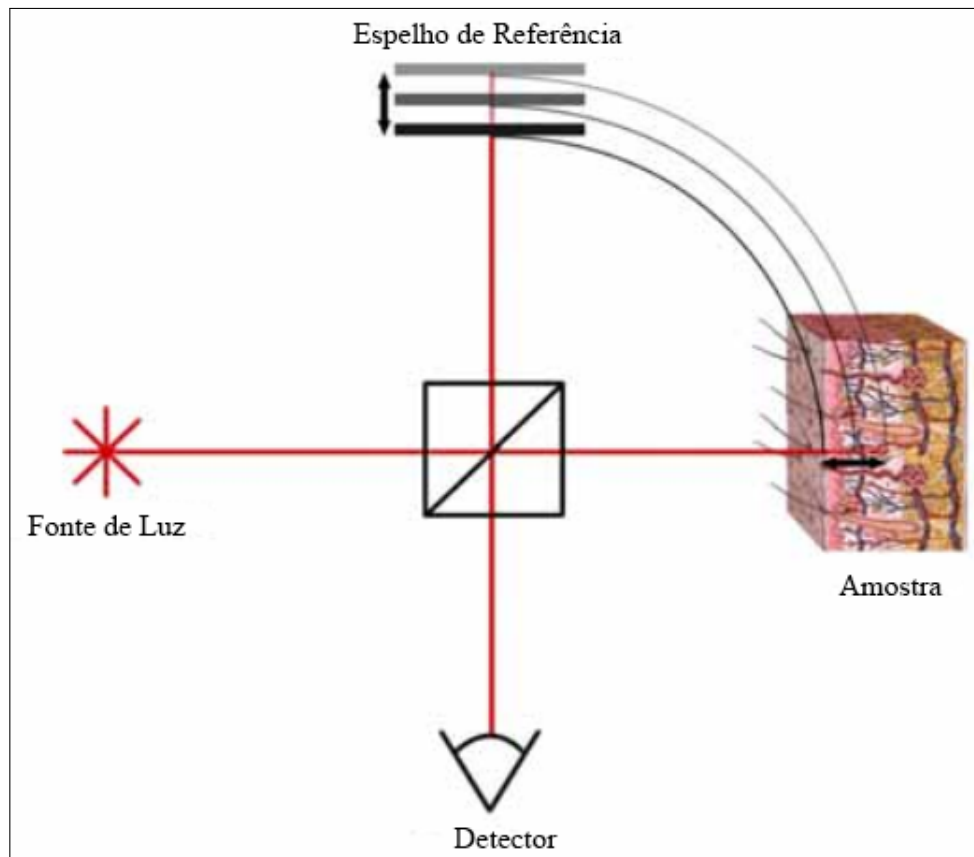
3.3.2 Princípio de funcionamento da tomografia por coerência óptica

Para simplificar o entendimento, o funcionamento da OCT pode ser visto como um análogo ao da ultrassonografia. No caso da ultrassonografia, o som (ondas mecânicas) incide no tecido, as intensidades das ondas refletidas são detectadas e o tempo de atraso entre a onda incidida e a refletida é calculado por um sistema eletrônico para se obter a profundidade relacionada a cada intensidade. Na OCT, a luz incide no tecido e as intensidades das ondas retroespalhadas são detectadas, porém como a velocidade da luz é muito maior do que a do som (no vácuo, 300000 km/s da luz contra 0,3 km/s do som), mensurar o tempo de atraso por um sistema eletrônico atual é impossibilitado [53,57].

Para isto, o esquema de funcionamento da OCT (Figura 14) se baseia em um interferômetro de Michelson, equipamento utilizado para analisar a interferência de dois feixes. Considerando um OCT com sistema de escaneamento no domínio do tempo para simplificação (os tipos de escaneamento serão abordados no Item 3.3.5), o funcionamento se inicia com a luz proveniente da fonte sendo dividida em duas partes por um filtro (divisor de feixe), sendo uma parte direcionada para um espelho de referência (espelho móvel) e a outra parte para a amostra. Como a fonte de luz da OCT está na região do NIR, ou seja, dentro da janela biológica, ao incidir na amostra o espalhamento será prevalente. Parte deste feixe voltará ao filtro por

retroespalhamento, *i.e.*, espalhamento à 180°. Já o feixe incidente no espelho de referência sofrerá reflexão e voltará ao filtro. O feixe refletido e o retroespalhado se recombinarão no filtro, causando um padrão de interferência. Através do posicionamento do espelho em que ocorre o padrão de interferência mais intenso, ou seja, feixes coerentes, é possível ser identificada a profundidade do sinal retornado da amostra [11, 58, 59].

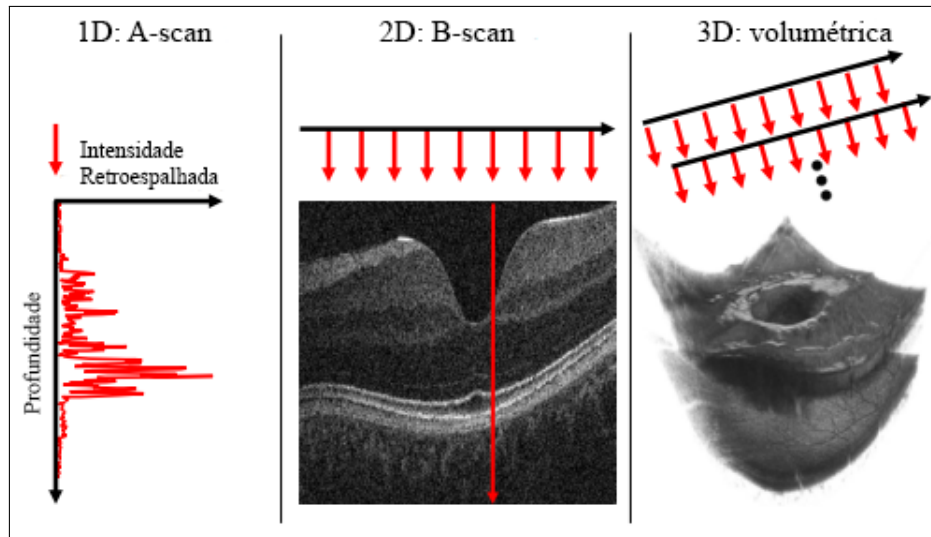
Figura 14 – Esquema representativo do funcionamento de um OCT.



Fonte: Adaptado de Freitas, Amaral e Rael, 2010 [58].

A OCT possibilita as seguintes aquisições (Figura 15): unidimensional (1D), ao ser plotado o perfil de intensidades do sinal em apenas uma linha de profundidade, chamada de *A-scan* (varredura A); bidimensional (2D), ao serem agrupados todos os *A-scans* de uma região, formando a imagem chamada de *B-scan* (varredura B), ou seja, um *A-scan* representa uma coluna do *B-scan*; tridimensional (3D, volumétrica), ao serem agrupados todos os *B-scans* de uma região [10, 60].

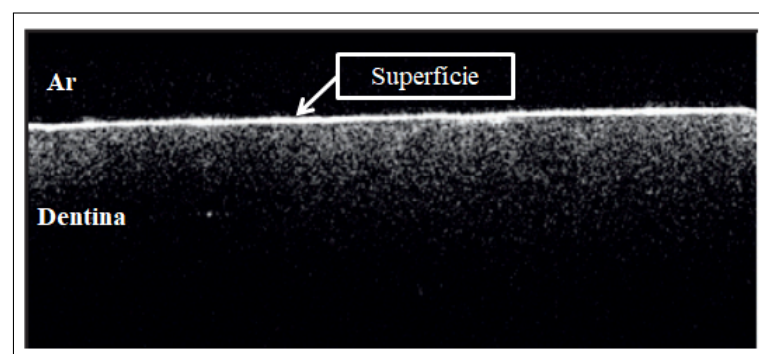
Figura 15 – Tipos de aquisições da OCT demonstradas em um olho humano. À esquerda, representação do *A-scan* e seu perfil da intensidade detectada (retroespalhada) em função da profundidade; Ao centro, representação do *B-scan* (seta em preto), formado pelo agrupamento de diversos *A-scans* (setas em vermelho). À direita, representação volumétrica, formada por diversos *B-scans*.



Fonte: Adaptado de Kraus *et al.*, 2012 [60].

Como o sistema da OCT não diferencia se a intensidade detectada é proveniente de retroespalhamento ou reflexão, algumas amostras podem apresentar uma linha de sinal mais intensa (saturada) em sua superfície. Isso ocorre em superfícies com prevalência de reflexão (reflexão de Fresnel) devido à diferença de índice de refração em relação ao ar ou ao padrão de rugosidade em relação ao comprimento de onda da luz incidente [61]. A Figura 16 exibe este comportamento em uma amostra de dentina com superfície plana e lisa devido ao polimento realizado [62].

Figura 16 – *B-scan* de uma amostra de dentina. Estão evidenciadas as regiões referentes ao ar e à dentina. A seta evidencia a linha de alta intensidade (saturada) referente à superfície da amostra (interface ar-dentina).



Fonte: Adaptado de Azevedo *et al.*, 2011 [62].

3.3.3 Cálculo base da OCT

O cálculo base por trás de um equipamento de OCT, de maneira simplificada, está relacionado com a análise dos campos elétricos e intensidades provenientes dos feixes do espelho de referência e da amostra. A amplitude do campo elétrico detectado (E_D) é dado pela soma das amplitudes dos campos elétricos do espelho (E_r) e da amostra (E_s).

$$E_D = E_r + E_s \quad (1)$$

A função de coerência entre E_r e E_s é dada por:

$$\Gamma_{rs}(\tau) = \langle E_r(t) + E_s^*(t + \tau) \rangle_T \quad (2)$$

onde E_s^* é o complexo conjugado de E_s , t é o tempo que o feixe leva para percorrer o caminho do divisor de feixe até o espelho (caminho óptico do espelho) e $t + \tau$ é o tempo que o feixe leva para percorrer o caminho do divisor de feixe até a amostra (caminho óptico da amostra). Desta forma, τ é o tempo de atraso entre os dois feixes.

A notação $\langle \rangle_T$ representa a média temporal do fluxo de energia na direção de propagação do feixe, chamado de vetor de Poynting. Este cálculo é necessário, pois o detector capta a intensidade e não o campo elétrico, sendo que a relação entre intensidade detectada e campo elétrico é dada por:

$$I_D \propto \langle E_D E_D^* \rangle_T \quad (3)$$

A coerência dos feixes, ou seja, a interferência entre eles, é então definida pela seguinte função:

$$\gamma_{rs}(\tau) = \frac{\Gamma_{rs}(\tau)}{\sqrt{I_r I_s}} \quad (4)$$

onde I_r é a intensidade do feixe proveniente do espelho de referência e I_s é a intensidade do feixe proveniente da amostra. Se o valor em módulo de γ_{rs} for igual a 1, isto implica que ocorreu coerência total. Se for entre 0 e 1, implica em coerência parcial. Caso o valor seja 0, não houve coerência (incoerência total).

É importante ressaltar que os equipamentos de OCT utilizam fontes com determinadas larguras de banda espectral, ou seja, fontes que emitem em mais de uma frequência de onda. Devido à este fato, diversas interferências ocorrem simultaneamente, mas apenas entre frequências iguais [57, 58].

As resoluções axial (em profundidade) e transversal (lateral) da OCT são dependentes do comprimento de onda da fonte de luz. A resolução axial (Δz) pode ser calculada do seguinte modo:

$$\Delta z = \frac{2\ln(2)}{\pi} \cdot \frac{\lambda_0^2}{\Delta\lambda} \quad (5)$$

onde λ_0 é o comprimento de onda central, ou seja, comprimento de onda na intensidade máxima de emissão, e $\Delta\lambda$ é a largura de banda à meia altura (FWHM, do inglês *Full Width at Half Maximum*), *i.e.*, é a faixa de comprimentos de onda na região de intensidade média da onda (intensidade máxima dividida por dois). Desta forma, a resolução axial é dependente também da largura de banda da fonte. Já a resolução transversal (Δx) pode ser obtida por:

$$\Delta x = \frac{4\lambda_0}{\pi} \cdot \frac{f}{d} \quad (6)$$

onde d é o tamanho do feixe incidente nas lentes objetivas e f é a distância focal [11, 53, 58].

3.3.4 Fontes de luz

As fontes de luz dos equipamentos de OCT devem possuir determinadas características em relação a quatro propriedades: comprimento de onda, largura de banda, intensidade e estabilidade [58].

O **comprimento de onda** da luz emitida pelas fontes utilizadas pela OCT se dá dentro da região da janela biológica, entre 650 e 1300 nm. Conforme apresentado na Figura 12, a absorção é maior em 650 nm do que em 1300 nm, onde se encontra um vale da absorção de água e oxiemoglobina. Portanto, fontes com emissões mais próximas de 650 nm terão menor penetração do que com as com emissões mais próximas de 1300 nm. Em contrapartida, as Equações 5 e 6 demonstram que o aumento do comprimento de onda, entre outros fatores, prejudica a resolução, ou seja, fontes com emissões mais próxima de 650 nm terão, em geral, resoluções melhores (menores) do que as próximas de 1300 nm [63].

A **largura de banda** também é fator determinante para a resolução. Larguras de banda muito grandes podem tornar os cálculos de interferência mais complexos. Por outro lado, o aumento da largura de banda implica em melhora da resolução, conforme evidenciado na Equação 5.

A relação entre comprimento de onda central, largura e resolução pode ser mais facilmente compreendida pelo seguinte exemplo: uma equipamento OCT com fonte de luz emitindo

no comprimento de onda central de 800 nm e com largura de banda de 28 nm apresentará uma resolução de 10 μm (conforme Equação 5). Para se obter a mesma resolução em um equipamento OCT com emissão em 1600 nm, a fonte deverá proporcionar uma largura de banda de 113 nm [53].

A **intensidade** da luz emitida pela fonte deve ser o suficiente para que seja captada pelos detectores após a interação com a amostra [58]. A intensidade da luz influencia diretamente na relação sinal-ruído (SNR, do inglês *Signal-to-Noise Ratio*), conforme a seguinte equação:

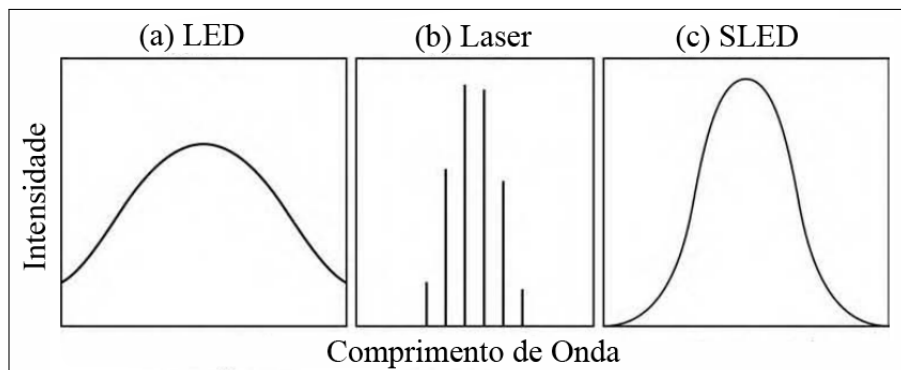
$$\frac{\text{SNR} \cdot v_s}{I_s \cdot \Delta z} = \text{constante} \quad (7)$$

onde v_s é proporcional à velocidade de aquisição do escaneamento axial e I_s é a intensidade máxima emitida pela fonte. Assim, uma forma de aumentar a velocidade de aquisição das imagens ou melhorar a resolução, sem que a SNR seja alterada, é a de aumentar a intensidade emitida pela fonte de luz [53].

Por fim, a fonte de luz deve apresentar **estabilidade**, ou seja, as características de largura espectral e intensidade devem se manter constantes no tempo. Alterações durante a aquisição podem resultar em diversos problemas, como a identificação de falsas estruturas [58].

Dentre os diversos tipos de fontes de luz existentes, as principais utilizadas em equipamentos de OCT são: LED superluminescentes (SLED, do inglês *Superluminescent Light Emitting Diodes*), laser e *swept source* (um tipo específico de laser) [58]. Uma das diferenças entre LED, SLED e laser está em seus espectros de emissão típico (Figura 17) [64].

Figura 17 – Espectros de emissão de (a) LED, (b) Laser e (c) SLED.



Fonte: Adaptado de Schubert, 2006 [64].

Os **SLEDs** estão muito presentes em equipamentos de OCT devido ao seu baixo custo e facilidade de manuseio. Apresentam intensidades suficientes para realizar a detecção do sinal, porém não suficientes para realizar a aquisição dos escaneamentos em alta velocidade como outras fontes [58]. A fabricação dos SLEDs abrange de 390 a 2700 nm. Um SLED comumente utilizado é o de 840 nm. Equipamentos OCT com este SLED apresentam largura de banda de 50 a 80 nm e resolução de 7 a 8 μm [11].

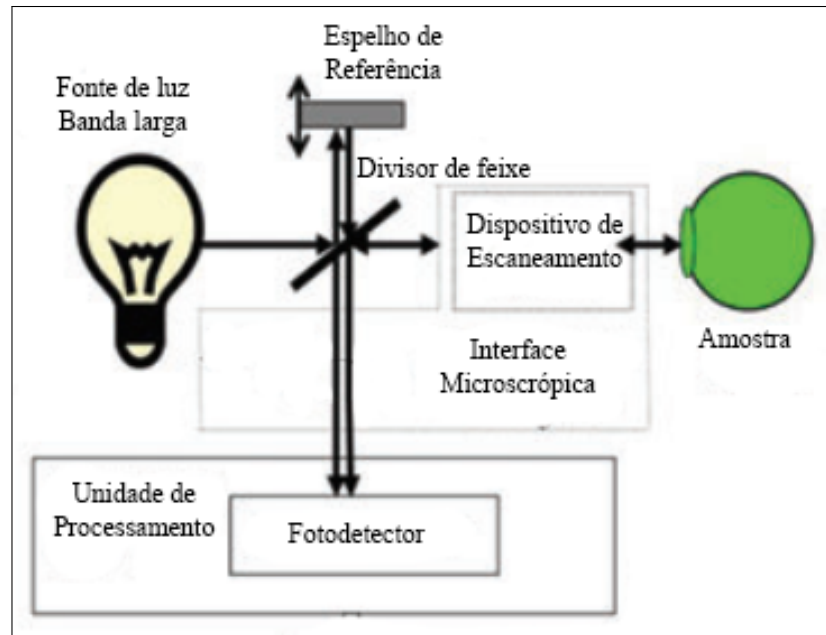
Os **lasers** são mais flexíveis, em relação à intensidade e à largura de banda, do que os SLEDs. Suas maiores intensidades possibilitam maiores velocidades de aquisição dos escaneamentos. Esta característica é essencial para a análise *in vivo*, pois diminui o ruído causado pelo movimento involuntário dos sistemas biológicos. A maior desvantagem está relacionada ao grande aumento do custo [58]. A maioria dos lasers utilizados em OCT operam em *mode locking*. Esta técnica controla as fases das ondas produzidas pela fonte, produzindo pulsos ultracurtos na ordem de pico a femtossegundos, ou seja, a emissão da luz é pulsada, não contínua, e possibilitando ao laser uma largura espectral significativa ao invés da estreita largura de banda característica de lasers [53]. Um dos lasers mais utilizados é o de cristal de safira dopado com titânio ($\text{Ti:Al}_2\text{O}_3$), o qual possui emissão em 810 nm, pulsos de cerca de 15 fs e uma largura de banda de 260 nm, possibilitando uma resolução de 1 a 3 μm [63].

Os **swept source** são tipos específicos de lasers de banda larga, possuindo um filtro em seu sistema, que possibilita a emissão ajustável de apenas um comprimento de onda, ou seja, possibilita a alternância do comprimento de onda da luz emitida [58]. Com a alternância do comprimento de onda, as interferências são mensuradas individualmente, de modo sequencial, concedendo alta resolução espectral, SNR e velocidade de aquisição dos escaneamentos, pois as interferências individuais eliminam a necessidade de tempo de atraso da referência [11].

3.3.5 Sistemas de Escaneamento

Existem diferentes sistemas de aquisição dos *A-scans*. Os principais sistemas são: domínio do tempo (TD-OCT, do inglês *Time Domain OCT*), domínio da frequência (FD-OCT, do inglês *Frequency Domain OCT*) e *swept source* (SS-OCT, do inglês *Swept Source OCT*) [58].

A **TD-OCT** utiliza fonte de luz de banda larga (SLED ou laser) e um fotodetector como unidade de processamento (Figura 18). Neste sistema, o caminho óptico do espelho de referência deve variar no tempo, para que o fotodetector possa captar a variação das interferências, identificando a posição em que ocorre coerência total entre os feixes [65].

Figura 18 – Esquema da TD-OCT.

Fonte: Adaptado de Podoleanu, 2012 [65].

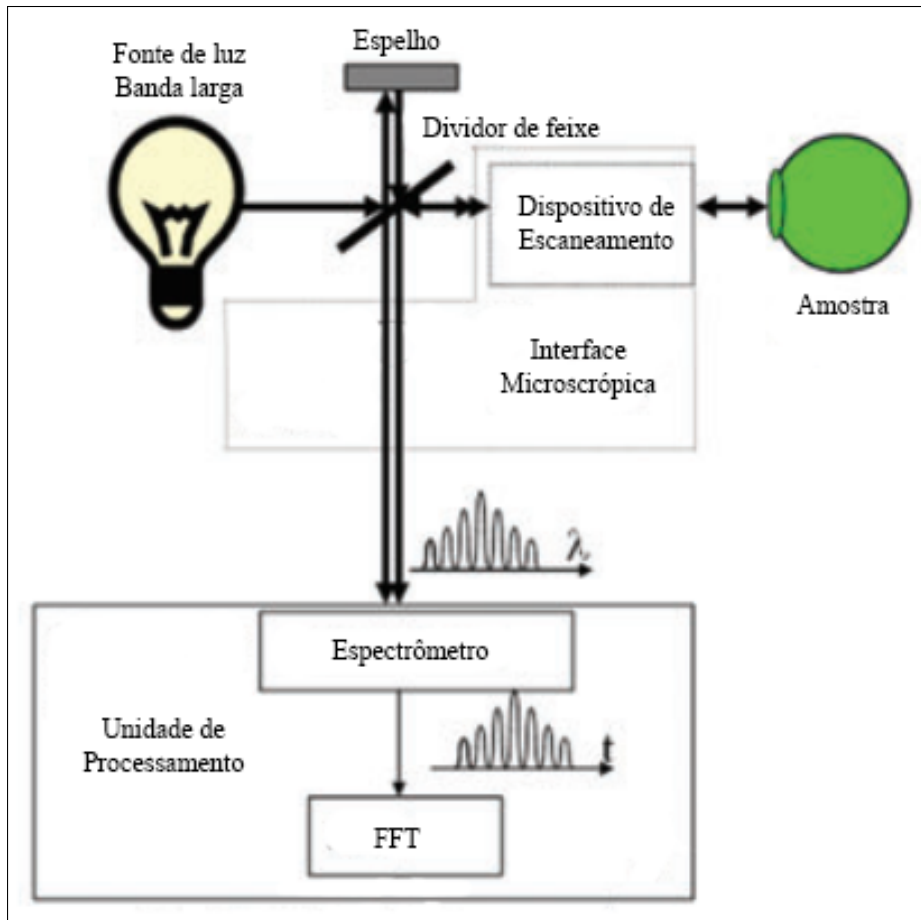
A intensidade do sinal no detector para este tipo de sistema é dada por:

$$I_D \propto \frac{e}{h\beta\eta_0} \text{Re} \left\{ 1 + e^{-\frac{\Delta_{\tau g}^2}{2\sigma_\tau}} e^{-i\omega_0 \Delta_{\tau p}} \right\} \quad (8)$$

onde h é a constante de Planck, η_0 é a impedância intrínseca no vácuo, β é a constante de propagação, ω_0 é a frequência angular central da fonte, σ_τ é o desvio padrão da largura temporal, $\Delta_{\tau g}$ e $\Delta_{\tau p}$ são as diferenças de atraso de grupo e de fase, respectivamente. O segundo termo da equação está relacionado com a componente oscilatório do sinal e representa a amplitude das franjas de interferência, que carregam as informações sobre a estrutura da amostra [53, 58].

A **FD-OCT** utiliza fonte de luz de banda larga (SLED ou laser) e um espectrômetro como unidade de processamento (Figura 19). Este sistema se baseia em analisar o espectro de interferência espectral, através da transformada de Fourier (FFT, do inglês *Fast Fourier Transform*), extraindo as componentes de frequência do sinal. Este espectro apresenta picos e vales, onde o período em que estes se repetem é proporcional à diferença de caminho óptico entre os feixes. Quanto maior a diferença de caminho óptico, maior o número de picos no espectro [65]. Como todas as informações necessárias estão presentes no espectro no domínio da frequência, não há necessidade de um espelho móvel. O custo e a complexidade deste sistema são significativamente maiores do que a TD-OCT [58].

Figura 19 – Esquema da FD-OCT.



Fonte: Adaptado de Podoleanu, 2012 [65].

A intensidade do sinal para um sistema no domínio da frequência é dada por:

$$I(k) = \left(\frac{E_{fo}(k)}{2} \right)^2 \left(1 + \frac{1}{8} \mathfrak{F}_z [\text{AutCorr}(R_s(z))] + \frac{1}{2} \mathfrak{F}_z [R_s(z)] \right) \quad (9)$$

onde E_{fo} é a amplitude do campo elétrico da fonte e $R_s(z)$ é a refletividade da amostra na profundidade z . Para obtenção das informações do sinal espectral ($I(k)$) e de R_s , é aplicada a transformada de Fourier inversa:

$$\mathfrak{F}_z^{-1} [I(k)] = \mathfrak{F}_z^{-1} \left[\left(\frac{E_{fo}(k)}{2} \right)^2 \right] \otimes \left(\delta(z) + \frac{1}{8} \text{AutCorr}(R_s(z)) + \frac{1}{2} R_s(z) \right) \quad (10)$$

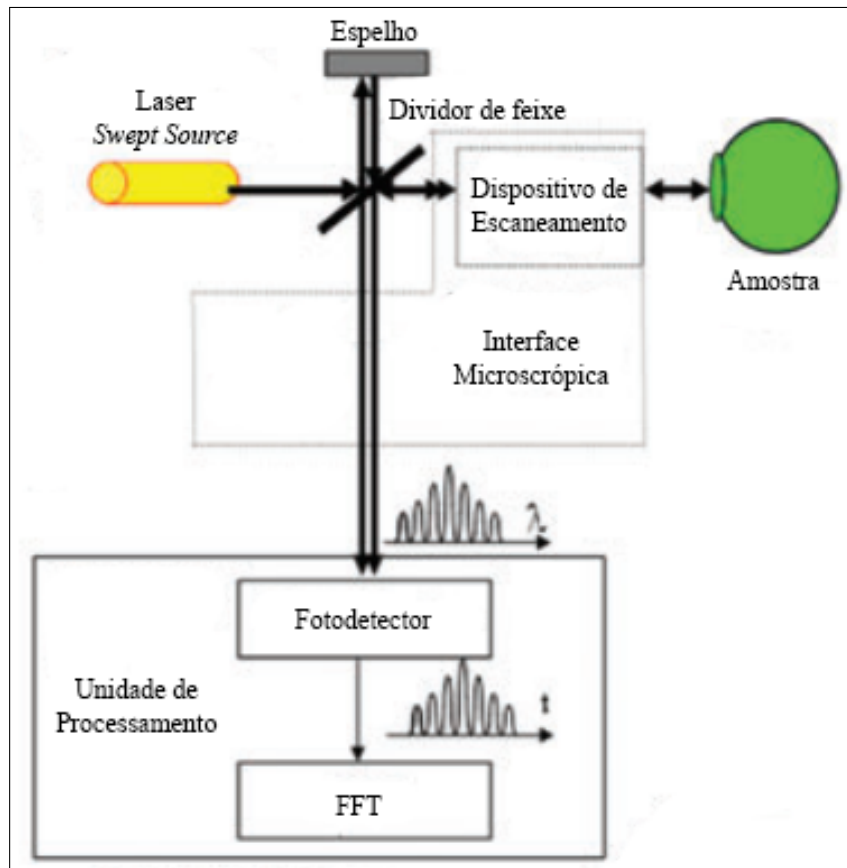
$$\mathfrak{F}_z^{-1} [I(k)] = A \otimes (B + C + D) \quad (11)$$

onde a convolução $A \otimes B$ contém as informações das propriedades da fonte, $A \otimes C$ contém

as informações de $R_s(z)$ e $A \otimes D$ contém as informações da interferência entre as ondas retroespalhadas nas diferentes posições da amostra [53, 58].

A **SS-OCT**, como o próprio nome evidencia, utiliza fonte de luz *swept source*, além de um fotodetector como unidade de processamento (Figura 20). Na prática, a SS-OCT também é um sistema no domínio da frequência, fazendo uso da FFT. Porém, como a fonte de luz emite, idealmente, apenas um comprimento de onda, um fotodetector é capaz de ir detectando as interferências nas frequências exatas, conforme a fonte alterna o comprimento de onda emitido, ou seja, realizando a aquisição em função do tempo [65]. Neste sistema, o espelho também não precisa ser móvel e não é necessário um espectrômetro, porém a fonte em si possui alto custo e complexidade [53, 58].

Figura 20 – Esquema da SS-OCT.



Fonte: Adaptado de Podoleanu, 2012 [65].

3.3.6 Aplicações em tecido ósseo

Apesar da vasta gama de aplicações em tecidos moles, sendo utilizada clinicamente com ampla frequência na área da Oftalmologia, a literatura evidencia aplicações da OCT em tecidos duros, sendo mais prevalente na área da Odontologia [58]. Aplicações odontológicas da OCT envolvem o potencial de avaliação e diagnóstico da doença periodontal [14, 66, 67], onde são afetados os tecidos de suporte do dente, causando danos como a perda da inserção periodontal e perda de osso alveolar, e da doença cárie [14, 68–70], onde ocorre a diminuição de mineral do esmalte e dentina. A cárie pode ser vista, de forma bastante simplista, como um análogo da osteoporose para o dente, uma vez que ambas estão relacionadas com a diminuição de mineral de tecidos duros.

Estudos empregando a OCT para avaliação de tecido ósseo ainda são escassos na literatura, pois em geral, os ossos estão localizados muito internamente, sob camadas de tecidos moles, implicando em uma maior dificuldade de penetração do feixe de luz. Em geral, os estudos utilizam as imagens obtidas por OCT para medir espessuras e para identificar as estruturas ósseas e dos tecidos adjacentes.

Xu, Wang e Haj [71] utilizaram a OCT para monitorar mudanças no estado redox da enzima citocromo c oxidase em amostras de periosteos provenientes da calvaria de ratos. Além da possibilidade de obtenção da espessura do periosteio, foi calculado o coeficiente de atenuação óptica do sinal da OCT, sendo observado que ocorria diminuição do coeficiente em função da redução da enzima por solução de ditonito de sódio.

Kasseck *et al.* [16] compararam o imageamento de amostras de osso trabecular, provenientes de fêmur humano, pelas técnicas de OCT, micro-CT e histologia. A técnica de OCT possibilitou a identificação de trabeculações, estruturas lamelares e das cavidades medulares, apresentando boa correlação com a inspeção por micro-CT e pelos cortes histológicos.

Webster *et al.* [72] evidenciaram o uso da OCT como guia para ablação de tecido ósseo. Neste estudo, um sistema consistindo em um laser pulsado acoplado a um SD-OCT foi utilizado para a ablação de amostras de osso cortical provenientes de vértebras lombares bovinas, realizando o imageamento das amostras paralelamente ao processo de ablação. As imagens obtidas por OCT possibilitaram a avaliação dos padrões de crateras característicos da ablação por laser pulsado, demonstrando que a OCT em tempo real pode aumentar a precisão de cortes em tecidos ósseos. Estes padrões de ablação também foram avaliados por Zhan *et al.* [73], onde

a geometria das crateras foi medida e avaliada utilizando a OCT.

Tachikawa, Yoshimura e Ohbayashi [17] avaliaram o uso da OCT como técnica assistiva para cirurgias de implante dentário. Para tal, um SS-OCT foi utilizado para imagear amostras de mandíbulas suínas, as quais foram demarcadas por cortes padrões para avaliar a eficácia da OCT em identificar essas demarcações, além de avaliar a penetração e medição da espessura da amostra. O estudo concluiu que a OCT pode ser utilizada para avaliar estes parâmetros, sendo uma técnica em potencial para guiar cirurgias de implantes dentário, diminuindo os riscos de perfurações da maxila e da mandíbula.

Negrutiu *et al.* [74] demonstraram o potencial uso da OCT para avaliação da regeneração óssea após realização de enxerto ósseo. Foram utilizados fêmures de rato, sendo realizadas perfurações para a simulação da lesão e inserindo enxertos ósseos nos buracos formados. O imageamento por OCT e por micro-CT foi realizado durante a regeneração do tecido. O estudo concluiu a eficácia da OCT para análise das interfaces entre o osso e o enxerto osteocondutor, avaliando o grau da regeneração óssea.

Mohebbi *et al.* [75] realizaram um ensaio de descalcificação do ouvido interno através da ciclagem em ácido e de perfuração (remoção mecânica do osso), onde a técnica de OCT foi utilizada como guia para a visualização das estruturas membranosas durante a perfuração, evitando perfurações prejudiciais. Em seguida, Mohebbi *et al.* [76] realizaram o mesmo procedimento, porém utilizando a OCT no pós-imageamento, demonstrando sua capacidade de distinguir e medir as estruturas do ouvido interno.

Kamalden, Lingam e Sundar [77] utilizaram a OCT para avaliar a evolução de osteoma de coroide, o qual é um tipo raro de tumor benigno, constituído de osso trabecular localizado entre as camadas coroidais do olho. Enquanto a técnica de fundoscopia possibilita a avaliação da área superficial do tumor, podendo resultar em avaliações errôneas do crescimento em volume do tumor, a OCT possibilitou avaliar sua espessura, demonstrando seu potencial uso para auxiliar o monitoramento do crescimento do osteoma de coroide.

Bykov *et al.* [78] realizaram a caracterização da interface osso-cartilagem. A técnica de clareamento óptico foi utilizada na cartilagem, onde o espalhamento da luz foi reduzido, aumentando a transmissão. Desta forma, a penetração do sinal da OCT na cartilagem foi aumentada, possibilitando a interação com o osso subcondral (porção óssea recoberta pela cartilagem). Assim, foi possível a avaliação da interface osso-cartilagem e da superfície do osso subcondral, evidenciando um potencial uso da técnica para auxiliar em cirurgias ou artroscopias.

Giardini *et al.* [79] demonstraram o potencial uso da OCT como técnica de imageamento intra-operatória da medula espinhal. Foi realizado um modelo de cirurgia da medula espinhal em ratos, onde foi possível a identificação das estruturas da medula: músculos, osso espinhal, fluido cérebro-espinhal, dura mãe e medula espinhal. Além disso, através da realização simultânea de registros eletrofisiológicos obtidos por microeletrodos na mesma região imageada pela OCT, foi demonstrado que a luz incidente da OCT não influencia na atividade neuronal.

Mahdian *et al.* [80] realizaram um estudo piloto em amostras de quatro tipos de tecidos humanos *ex vivo* de origem oral: osso cortical, osso trabecular, esmalte e tecido adiposo. O imageamento destes tecidos foi realizado pelas técnicas de OCT e de CT, onde a distribuição de intensidades dos pixels das imagens obtidas foram comparados, evidenciando o uso da OCT para distinção dos tecidos como técnica alternativa sem o uso de radiação ionizante.

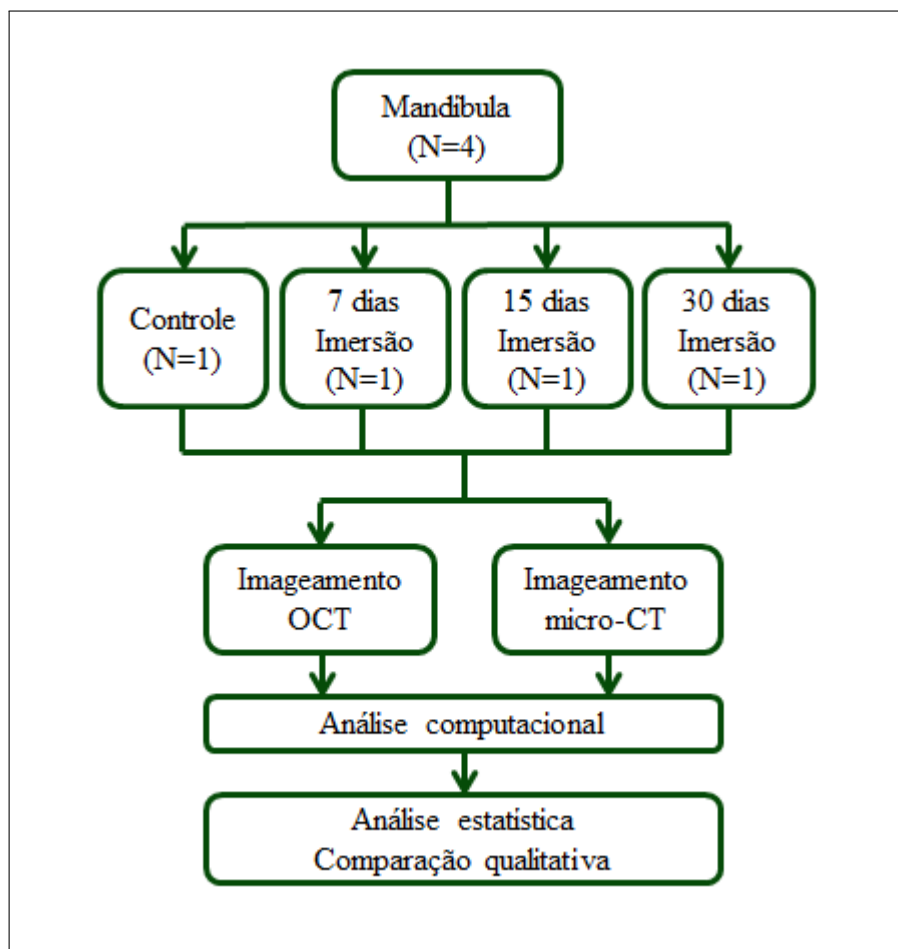
Como pode ser visto na revisão de literatura, embora a técnica tenha amplo potencial, não há estudos que avaliam o potencial da OCT no diagnóstico e acompanhamento do processo de osteoporose, o que motivou a realização do presente estudo.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Delineamento Experimental

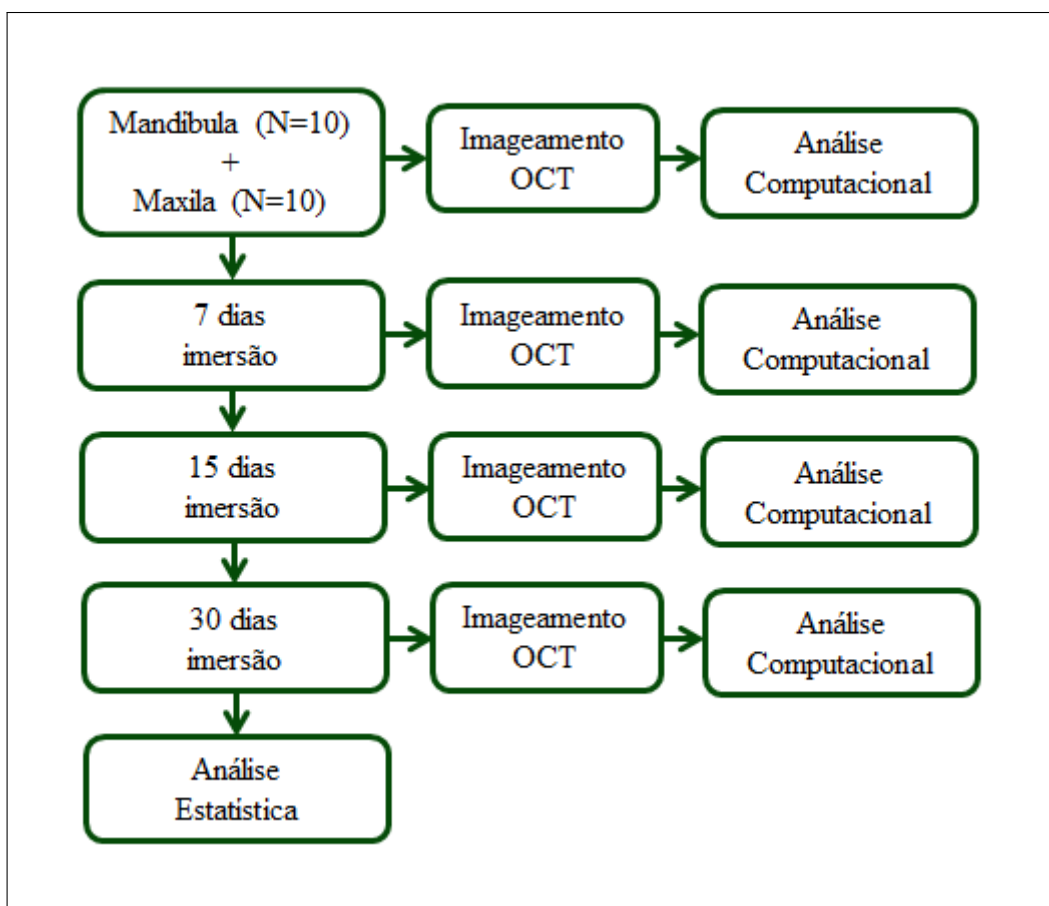
Foi conduzido um estudo *in vitro* no qual foram simuladas lesões de osteoporose, por meio de imersão em solução de Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA, do inglês *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*), em ossos de maxilas e mandíbulas suínas. O estudo foi dividido em duas fases experimentais. Na primeira, buscou-se estabelecer rotina de análise de imagens de OCT que possibilite o diagnóstico da doença, validando-se com imageamento por micro-CT. Na segunda, buscou-se aplicar a metodologia desenvolvida para quantificar a progressão das lesões. Para a primeira fase experimental, foram empregadas 4 amostras de mandíbulas as quais foram imersas em EDTA por 4 períodos distintos ($n = 1$): sem imersão, 7 dias, 15 dias e 30 dias de imersão; em seguida, as amostras foram avaliadas por micro-CT e OCT. Na segunda fase experimental, 10 amostras de maxila e 10 amostras de mandíbulas foram imersas em EDTA por 30 dias ($n = 10$), sendo submetidas à avaliação por OCT em 4 períodos distintos: inicial (0 dias), após 7 dias, 15 dias e 30 dias de imersão. A análise estatística foi efetuada individualmente para cada fase experimental: na primeira fase, foi considerado o bloco de osso como unidade experimental, a técnica analítica (OCT ou micro-CT) e o tempo de imersão (0, 7, 15 e 30 dias) como fatores de variação e a porosidade e a relação volume ósseo/volume total como variáveis resposta. Para a fase 2, foi considerado o bloco de osso como unidade experimental, o tipo de osso (maxila e mandíbula) e o tempo de imersão (0, 7, 15 e 30 dias) como fatores de variação e o coeficiente de atenuação óptica, refletividade integrada e densidade óssea por OCT como variáveis resposta. O nível de significância estatística adotado foi de 5%.

Figura 21 – Fluxograma do delineamento experimental seguido para as amostras não-pareadas.



Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Figura 22 – Fluxograma do delineamento experimental seguido para as amostras pareadas.



Fonte: Elaboração do autor, 2018.

4.2 Preparo das Amostras

Após aprovação do estudo pela Comissão de Ética em Uso de Animais da UFABC (parecer em Anexo A), foram utilizadas amostras provenientes de 5 cabeças de origem suína (*Sus scrofa domesticus*) adulta. As mandíbulas e maxilas foram obtidas utilizando um arco de serra e então descarnadas com o auxílio de um bisturi descartável e de uma pinça Kocher reta, ambos em aço inoxidável.

As mandíbulas e maxilas foram tratadas com solução de formol 10% (Êxodo Científica, São Paulo, Brasil) por 24 horas para preservação [81]. Utilizando o micromotor LB-100 (Beltec, São Paulo, Brasil), foram preparadas 14 amostras de mandíbula e 10 amostras de maxila. As amostras foram levemente polidas utilizando uma lixa P1200 para retirar imperfeições causadas pelo micromotor. O processo de simulação da osteoporose foi realizado com base no estudo apresentado por Lee *et al.* [81], em que as amostras foram imersas em solução de EDTA 0,5 M (Êxodo Científica, São Paulo, Brasil), com renovação semanal do ácido.

Para as amostras da primeira fase experimental, foram cortados 4 blocos de cerca de 3 x 3 x 3 mm (largura x comprimento x profundidade) de uma mesma mandíbula. O período de imersão de cada uma das 4 amostras foi variado, o que tem por objetivo reproduzir um processo de simulação da osteoporose incipiente e sua progressão para um processo mais agressivo:

- Amostra 1: Sem imersão (controle);
- Amostra 2: 7 dias de imersão;
- Amostra 3: 15 dias de imersão;
- Amostra 4: 30 dias de imersão.

Para as amostras da segunda fase experimental, foram cortados dois blocos de 10 x 10 x 3 mm por maxila e por mandíbula, totalizando 20 blocos. As superfícies foram demarcadas com grafite para que o imageamento fosse realizado sempre na mesma posição. Todas as 20 amostras passaram pelo mesmo desafio ácido, com aquisição das imagens após o término de cada período de imersão:

- Ciclo 0: Sem imersão (controle);
- Ciclo 1: 7 dias de imersão;
- Ciclo 2: 15 dias de imersão;
- Ciclo 3: 30 dias de imersão.

Após o término dos períodos de imersão, as amostras foram colocadas em sonicação em água destilada por 1 hora utilizando a Cuba de Ultrassom Cristófoli 220V (Cristófoli, Paraná, Brasil), com o objetivo de retirar o EDTA residual e parar a progressão do ataque ácido. Nos intervalos entre imersão e aquisição das imagens, as amostras foram mantidas em ambiente úmido (algodão umedecido com água destilada e timol 0,64 g/L) para evitar a proliferação fúngica), sendo retiradas e deixadas em recipiente aberto por 12 horas prévias à aquisição das imagens para eliminar excesso de água na superfície, a fim de minimizar a influência da absorção da luz da OCT pela água.

4.3 Aquisição das imagens e Processamento dos Dados obtidos por Microtomografia

Para realizar o imageamento das amostras por micro-CT, foi utilizado o equipamento SKYSCAN 1272 (Bruker Corporation, Massachusetts, EUA), disponível no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano, Campinas, SP). Foi utilizado tamanho de pixel e de voxel de 7 μm , tensão de 30 kV, corrente de 160 μA , tempo de exposição de 2875 ms e filtro de alumínio de 0,5 mm para endurecimento do feixe de raios-X. O escaneamento foi realizado

com rotação completa de 180°, com passo angular de 0,6°. Apenas as amostras da primeira fase experimental foram imageadas.

As análises foram realizadas utilizando os programas computacionais do fabricante. Para a análise qualitativa, foi utilizado o programa DataViewer para imagens bidimensionais e o programa CTVox para as reconstruções tridimensionais. A análise quantitativa foi realizada utilizando o programa CTAn.

No CTAn, foi definida uma Região de Interesse (ROI, do inglês *Region of Interest*), contendo uma área relacionada apenas à amostra (eliminando a região de ar). Em seguida, foi realizado o processo de *thresholding* manual, conforme estabelecido na literatura [49, 50], o qual é um procedimento para tornar a imagem bitonal: pixels com intensidades menores que o *threshold* (limiar) recebem o valor 0 (preto) e pixels com intensidades maiores ou iguais ao *threshold* recebem valor 1 (branco), sem valores intermediários (sem escala de cinza). Por fim, foram obtidos os seguintes parâmetros pelo programa:

- Razão entre volume ósseo e volume tecidual (BV/TV), em porcentagem;
- Porosidade total (Po), em porcentagem, determinada pela área de espaços completamente fechados (poros) em relação à área total;
- Espessura trabecular (Tb.Th), em mm, determinada pela espessura média das trabéculas;
- Separação trabecular (Tb.Sp), em mm, determinada pelo diâmetro médio dos poros;
- Número trabecular (Tb.N), em 1/mm, determinado pelo número de trabéculas por unidade de comprimento [49];
- Densidade Mineral Óssea (BMD), em g/cm^3 .

Este procedimento foi realizado por três operadores diferentes, cada qual escolhendo sua ROI e seu *threshold*, resultando em valores médios e seus respectivos desvios-padrões para cada parâmetro.

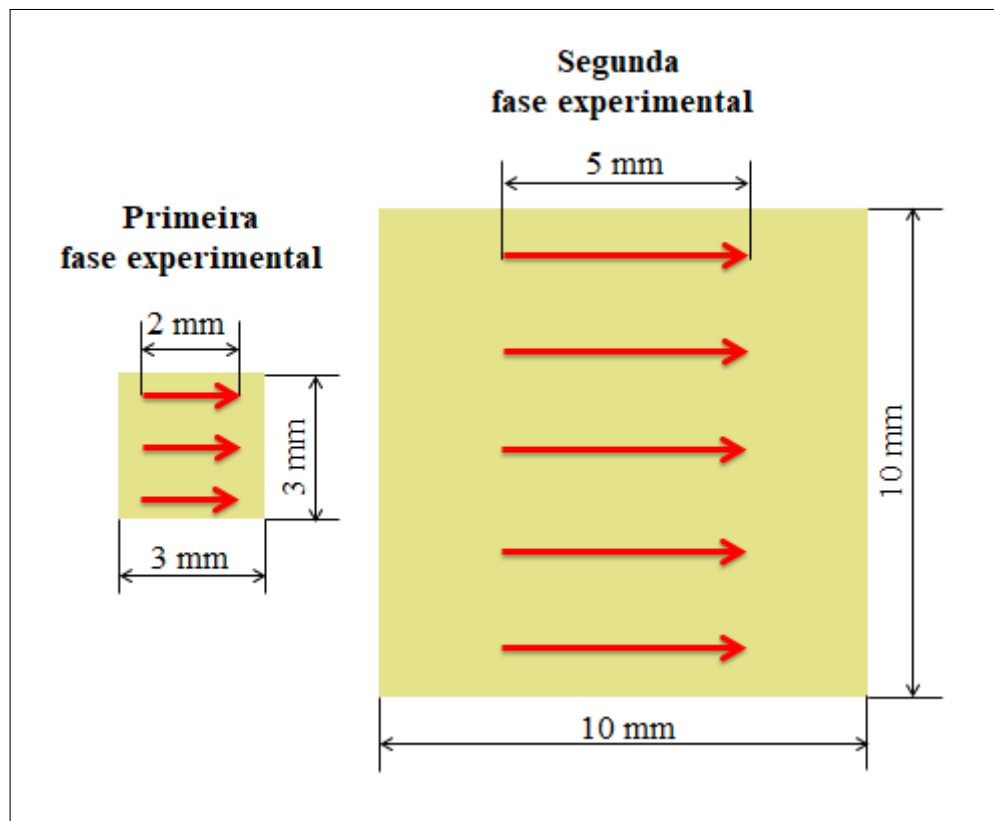
4.4 Aquisição das imagens e Processamento dos Dados obtidos por Tomografia por Coerência Óptica

Para realizar o imageamento das amostras por OCT, foi utilizado o equipamento Calisto110C1 (ThorLabs Inc., Nova Jersey, EUA), disponível na Central Experimental Multiusuário da UFABC. Este equipamento é um FD-OCT, possuindo como fonte de luz um SLED com comprimento de onda central em 930 nm, resolução axial de 7 μm , resolução transversal de 8 μm por utilizar a lente OCT-LK3-BB com distância focal de 36 mm, penetração

máxima de 1,71 mm e SNR de 107 dB para velocidade de escaneamento de 1.2 kHz [82, 83].

Foram realizados 3 *B-scans* de 2 mm de comprimento (2 mm em x) para cada amostra da primeira fase experimental e 5 *B-scans* de 5 mm de comprimento para cada amostra segunda da fase experimental (Figura 23). Foi utilizada penetração máxima (1,71 mm em z) em ambos os experimentos.

Figura 23 – Esquema de escaneamento das amostras utilizando a OCT. Os quadrados na cor bege representam as amostras da primeira e da segunda fase experimental. Cada seta espessa em vermelho representa um *B-scan*.



Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Cada *B-scan* foi composto por 598 *A-scans* para as amostras da primeira fase experimental e por 1495 *A-scans* para da segunda fase experimental. Para melhorar a qualidade da imagem obtida, foi realizada uma média de 3 *A-scans* durante a aquisição, ou seja, cada um dos 598 ou 1495 *A-scans* foram uma média de 3 *A-scans*, diminuindo a quantidade de ruído na imagem, relacionado principalmente ao ruído *speckle*, dado pela flutuação do sinal entre imagens consecutivas [84]. O equipamento possibilita também o controle da intensidade medida no espelho de referência, a qual foi mantida em cerca de 75% para todas as amostras. A Tabela 1 apresenta todos os parâmetros definidos para cada grupo.

Tabela 1 – Parâmetros definidos para a aquisição das imagens por OCT.

Parâmetro	Primeira Fase	Segunda Fase
	Experimental	Experimental
<i>B-scans</i> por amostra	3	5
Tamanho em x (mm)	2	5
Tamanho em z	1,71	1,71
<i>A-scans</i> por <i>B-scans</i>	598	1495
Média de <i>A-scans</i>	3	3
Tempo de aquisição (s)	1,50	3,76
Tamanho pixel (μm)	3,34 x 3,34	3,34 x 3,34
Pixels na imagem	512 x 598	512 x 1495
Intensidade Medida	$\sim 75\%$	$\sim 75\%$

Fonte: Elaboração do autor, 2018.

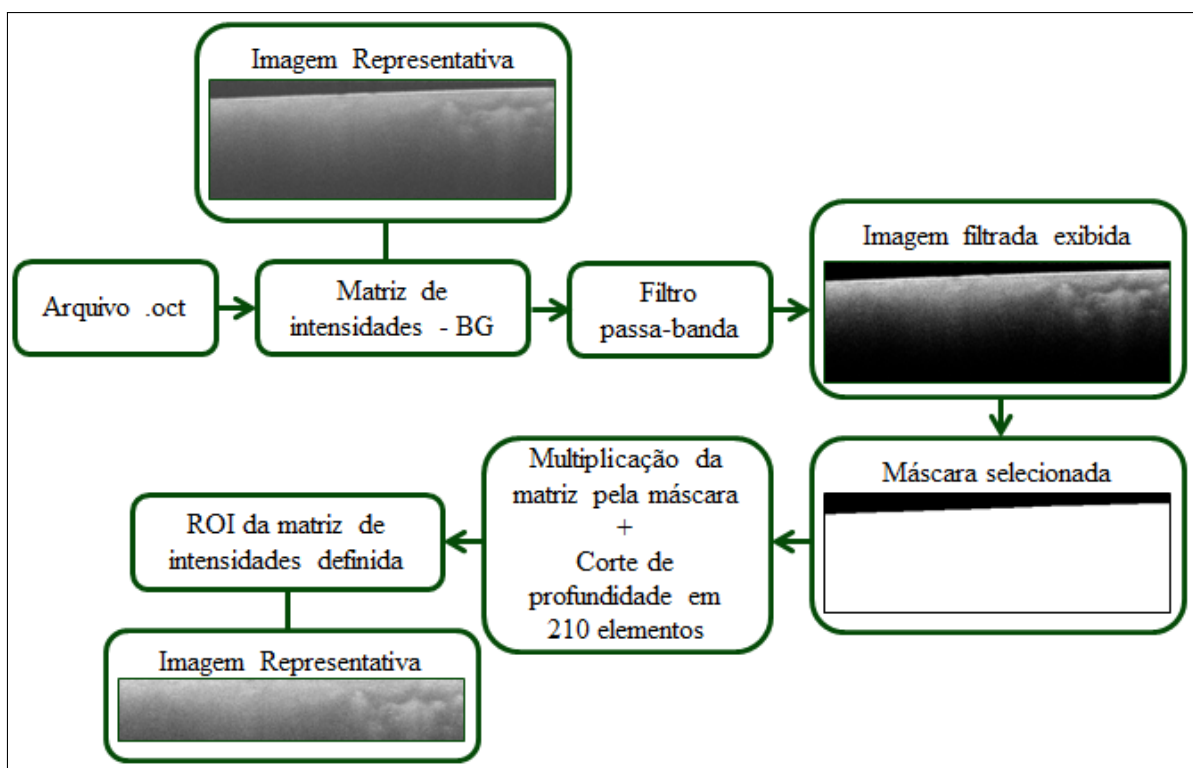
A análise quantitativa dos dados foi realizada por meio de processamento em MATLAB (MathWorks Inc., Massachusetts, EUA). Para tal, foram elaboradas rotinas para análise de três parâmetros: coeficiente de atenuação óptica, refletividade integrada e densidade óssea por OCT.

Todos os parâmetros foram analisados com base em uma ROI. Para tal, a matriz de intensidades, *i.e.*, intensidades em dB detectadas pelo equipamento e utilizadas para formar a imagem (*B-scan*), foi carregada utilizando o arquivo “.oct”. Esta extensão é nativa do equipamento de OCT utilizado e contém todas as informações do *B-scan* realizado. Em seguida, foi subtraído o ruído de fundo (BG, do inglês *background*) da matriz de intensidades. Este ruído é dado por um sinal DC acrescentado à aquisição, que não apresenta valor zero como média e pode variar com a profundidade [84]. O BG foi obtido pela média de seis *B-scans* adquiridos sem a presença de amostra: três anteriores ao início das aquisições realizadas no mesmo dia e três após o término destas aquisições.

Para gerar uma imagem para a seleção da ROI, um filtro passa-banda de ganho de 40 a 80 dB foi aplicado, *i.e.*, valores menores ou iguais a 40 dB foram definidos como preto (pixel de valor 0), valores maiores ou iguais a 80 dB foram definidos como branco (pixel de valor 255) e valores intermediários foram definidos com valores dentro da escala de cinza (pixels de valores 1 a 254), ou seja, imagens de 8-bits ($2^8 = 256$ intensidades de pixels, de 0 a 255). A imagem filtrada foi exibida para que o usuário selecionasse manualmente a região

correspondente ao tecido ósseo, criando uma máscara para eliminar a região correspondente ao ar e a linha de superfície saturada. Esta máscara foi aplicada à matriz de intensidades, ou seja, a imagem filtrada foi utilizada apenas para facilitar a visualização do usuário, fazendo com que todos os pontos iniciais ($z = 0$) da matriz fossem correspondentes ao tecido ósseo. Por fim, a profundidade da matriz após a máscara foi ajustada automaticamente em 210 elementos, ou seja, 0,7 mm, para que regiões com ausência do sinal não prejudicassem as análises. O fluxograma a seguir exemplifica o processamento da ROI.

Figura 24 – Fluxograma do processamento de ROI. As imagens nos processos da matriz de intensidades são apenas representativas de como seriam se plotadas.



Fonte: Elaboração do autor, 2018.

A análise qualitativa foi realizada através da inspeção dos aspectos morfológicos e das distribuições de intensidades das imagens geradas após aplicação do filtro passa-banda e conversão em imagem de 8-bits, além da inspeção de imagens volumétricas.

As imagens volumétricas (3D) foram adquiridas em uma região de $2 \times 2 \times 1,71$ mm ($x \times y \times z$) para as amostras da primeira fase experimental e de $3 \times 3 \times 1,71$ mm para as amostras da segunda fase experimental.

4.4.1 Coeficiente de atenuação óptica

O coeficiente de atenuação óptica (μ_t), também chamado de coeficiente de extinção ou de atenuação total, é o parâmetro que governa o decaimento do sinal como resultado da absorção e do espalhamento, ou seja, está relacionado com os parâmetros μ_a e μ_s [85, 86]. A alteração deste coeficiente em esmalte e dentina é diretamente relacionada com a diminuição de mineral provocada pela doença cárie [14, 68, 69].

No cálculo base do equipamento, as intensidades em dB são obtidas pelo cálculo de 20 vezes o log na base 10 das intensidades detectadas (em u.a.) [82], resultando em um decaimento linear das intensidades. Para possibilitar a obtenção do μ_t pelo método de ajuste exponencial, as intensidades da ROI foram recalculadas para u.a., conforme a equação a seguir:

$$I_{ua} = 10^{(I_{dB}/20)} \quad (12)$$

Em seguida, a ROI foi ajustada pelo índice de refração do osso, estabelecido pela literatura por 1,5 [87, 88], onde o tamanho em profundidade do *A-scan* foi ajustado conforme o inverso do índice de refração n . Assim, o eixo z de profundidade foi corrigido pela diferença entre o caminho óptico (ΔS_o) e o caminho físico (ΔS_p) [85, 86]:

$$\Delta S_o = \frac{\Delta S_p}{n} \quad (13)$$

O decaimento do sinal ao longo da profundidade apresentado em cada *A-scan* (cada coluna da matriz de intensidades em u.a.) foi modelado pelo seguinte ajuste exponencial:

$$y(x) = ae^{bx} \quad (14)$$

onde $y(x)$ é a intensidade do sinal no ponto x e a e b são parâmetros variáveis do ajuste.

Estes parâmetros foram comparados com a Equação apresentada por Maia *et al.* (Equação 15) [68], a qual é baseada na Lei de Beer-Lambert, que descreve o decaimento exponencial da luz em função da sua penetração [9, 10].

$$I(z) = I_0 e^{-2\mu_t z} \quad (15)$$

onde $I(z)$ é a intensidade do sinal na profundidade z e I_0 é a intensidade inicial do sinal. Esta

equação se diferencia da equação original de Beer-Lambert pelo fator de 2 multiplicando o coeficiente de atenuação, adequação realizada para o sinal de OCT, pois devido ao sinal ser retroespalhado, deve-se considerar o caminho de ida e de volta da luz, necessitando então a multiplicação por dois.

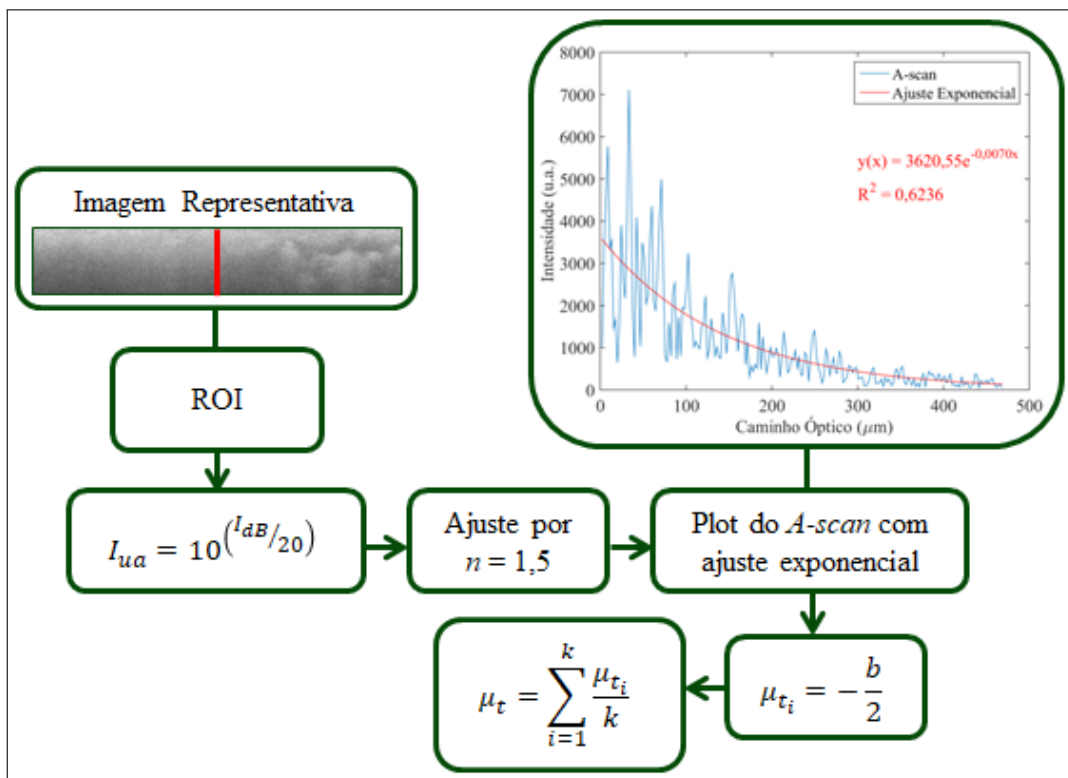
Desta forma, comparando o ajuste da Equação 14 com a Equação 15, foi obtido o coeficiente de atenuação do *A-scan* selecionado.

$$\mu_t = -\frac{b}{2} \quad (16)$$

Este cálculo foi realizado para todos os *A-scans* que constituem a ROI, sendo calculado também o coeficiente de determinação (R^2) para avaliar a eficiência do ajuste. O coeficiente de atenuação da imagem foi definido como a média dos coeficientes de atenuação calculados nos *A-scans*, assim como o coeficiente de determinação foi obtido por sua média.

O fluxograma a seguir exemplifica a obtenção do coeficiente de atenuação óptica.

Figura 25 – Fluxograma para obtenção do coeficiente de atenuação óptica (μ_t). A linha espessa em vermelho, no centro da imagem representativa da ROI, identifica a região do *A-scan* de número i , apresentado na imagem subsequente no fluxograma.

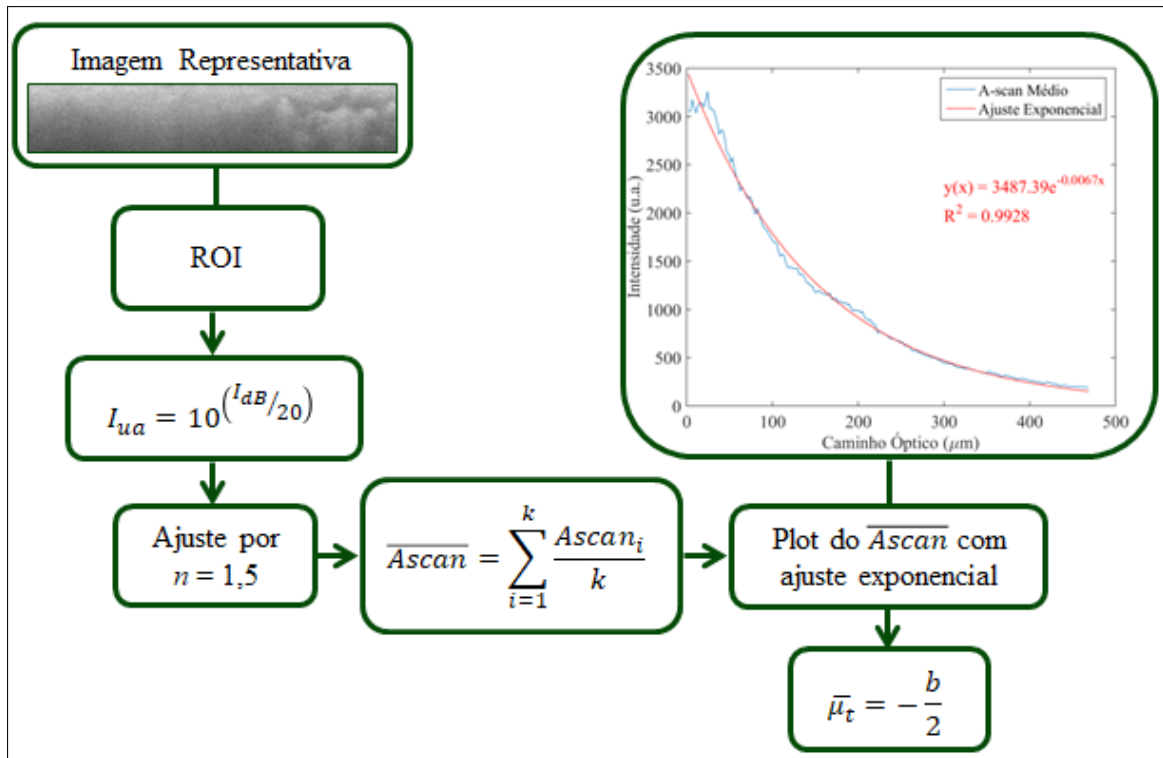


Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Foi calculado também o coeficiente de atenuação óptica médio ($\bar{\mu}_t$), onde foi calculado o *A-scan* médio da imagem, *i.e.*, a média de cada linha da ROI, gerando um único *A-scan*, e então realizado o ajuste exponencial uma única vez por imagem, além do coeficiente de determinação.

O fluxograma a seguir exemplifica a obtenção do coeficiente de atenuação óptica médio.

Figura 26 – Fluxograma para obtenção do coeficiente de atenuação óptica médio ($\bar{\mu}_t$).



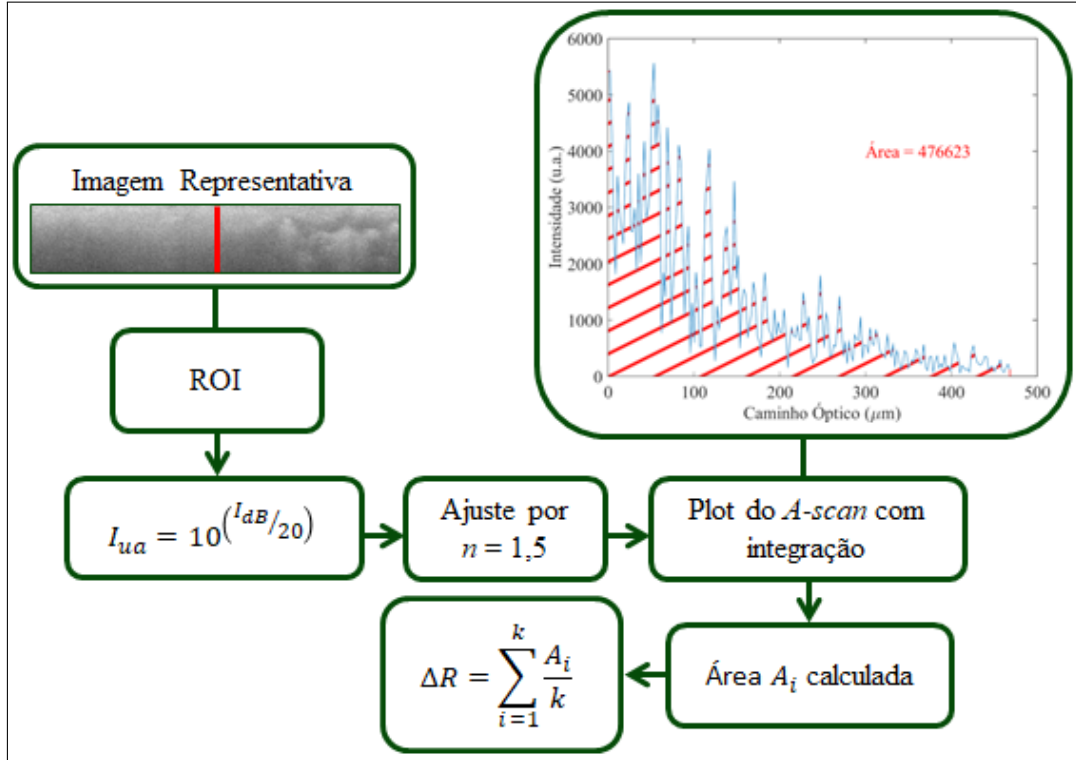
Fonte: Elaboração do autor, 2018.

4.4.2 Refletividade integrada

A refletividade quantifica a área sob curva dos *A-scans*, apresentando a intensidade total detectada. Estudos utilizaram este parâmetro como base para avaliação da diminuição de mineral em esmalte [69] e monitoramento da remineralização de cárie radicular [70].

Após ajuste da ROI para intensidades em u.a. e pelo índice de refração, cada *A-scan* da ROI foi plotado e a área (A) abaixo da curva do perfil de Intensidade vs Profundidade foi obtida pelo método de integração trapezoidal. A refletividade (ΔR) da imagem foi definida como a média das áreas calculadas em cada *A-scan*. O fluxograma a seguir exemplifica a obtenção da refletividade.

Figura 27 – Fluxograma para obtenção da refletividade integrada (ΔR). A linha espessa em vermelho, no centro da imagem representativa da ROI, identifica a região do *A-scan* de número i , apresentado na imagem subsequente no fluxograma. A região hachurada em vermelho no gráfico do *A-scan* representa a área A_i integrada.



Fonte: Elaboração do autor, 2018.

4.4.3 Densidade óssea por OCT

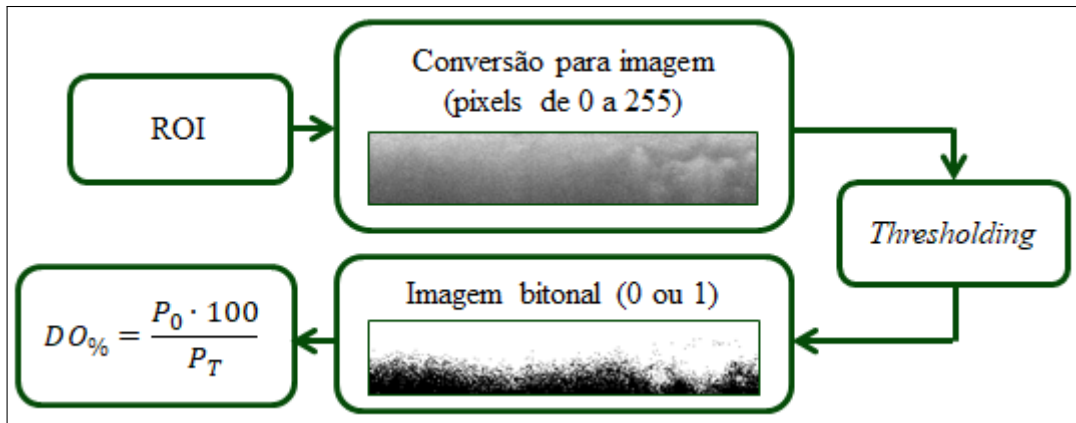
A densidade óssea por OCT foi determinada pela porcentagem de intensidades da imagem referente à matriz óssea. Para tal, foi realizada a conversão da matriz de intensidades em dB para imagem em escala de cinza (0 a 255), sem aplicação do filtro passa-banda de 40 a 80 dB. Em seguida, foi realizado o processo de *thresholding* automático, com determinação do *threshold* pelo método de máxima variância [89], resultando em uma imagem bitonal. Deste modo, a densidade óssea por OCT (DO), em porcentagem, foi definida da seguinte maneira:

$$DO\% = \frac{P_0 \cdot 100}{P_T} \quad (17)$$

onde P_0 é a quantidade de pixels de valor 0 e P_T é a quantidade total de pixels da imagem.

O fluxograma a seguir exemplifica a obtenção da densidade óssea por OCT.

Figura 28 – Fluxograma para obtenção da densidade óssea por OCT (*DO*).



Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Foi testado o uso de um valor médio de *threshold*, obtido através da média de *thresholds* de todas as imagens, para que o mesmo valor fosse utilizado no *thresholding* de todas as imagens. Além disso, foi testado ainda o *thresholding* na imagem com filtro passa-banda, também das duas maneiras: cada imagem com seu respectivo valor de *threshold* e também um *threshold* médio. Contudo, estes métodos foram ineficazes e apenas o método explicado anteriormente (representado na Imagem 28) foi considerado neste trabalho, evitando que os resultados se tornassem muito extensos e confusos.

4.5 Análise Estatística dos Dados

A distribuição e normalidade de variâncias dos parâmetros obtidos através dos processamentos das imagens foi testada pelos métodos de D'Agostino-Pearson e de Shapiro-Wilk. Para a comparação entre os parâmetros obtidos pela técnica de micro-CT e os parâmetros obtidos pela técnica de OCT da primeira fase experimental foi utilizado o teste de correlação, com cálculo do coeficiente de correlação de Pearson e teste de hipótese da correlação ser aleatória com *p* bicaudal. Os parâmetros obtidos pela técnica de OCT na segunda fase experimental foram comparados entre si, separando as análises de mandíbula e maxila, através do teste ANOVA de uma via para medidas repetidas (pareadas), com múltiplas comparações entre as médias de cada grupo utilizando o pós-teste de Tukey. Os mesmos períodos de imersão entre mandíbula e maxila foram comparados individualmente através do teste *t-student* não-pareado bicaudal. Todos os testes foram realizados ao nível de significância estatística de 5%.

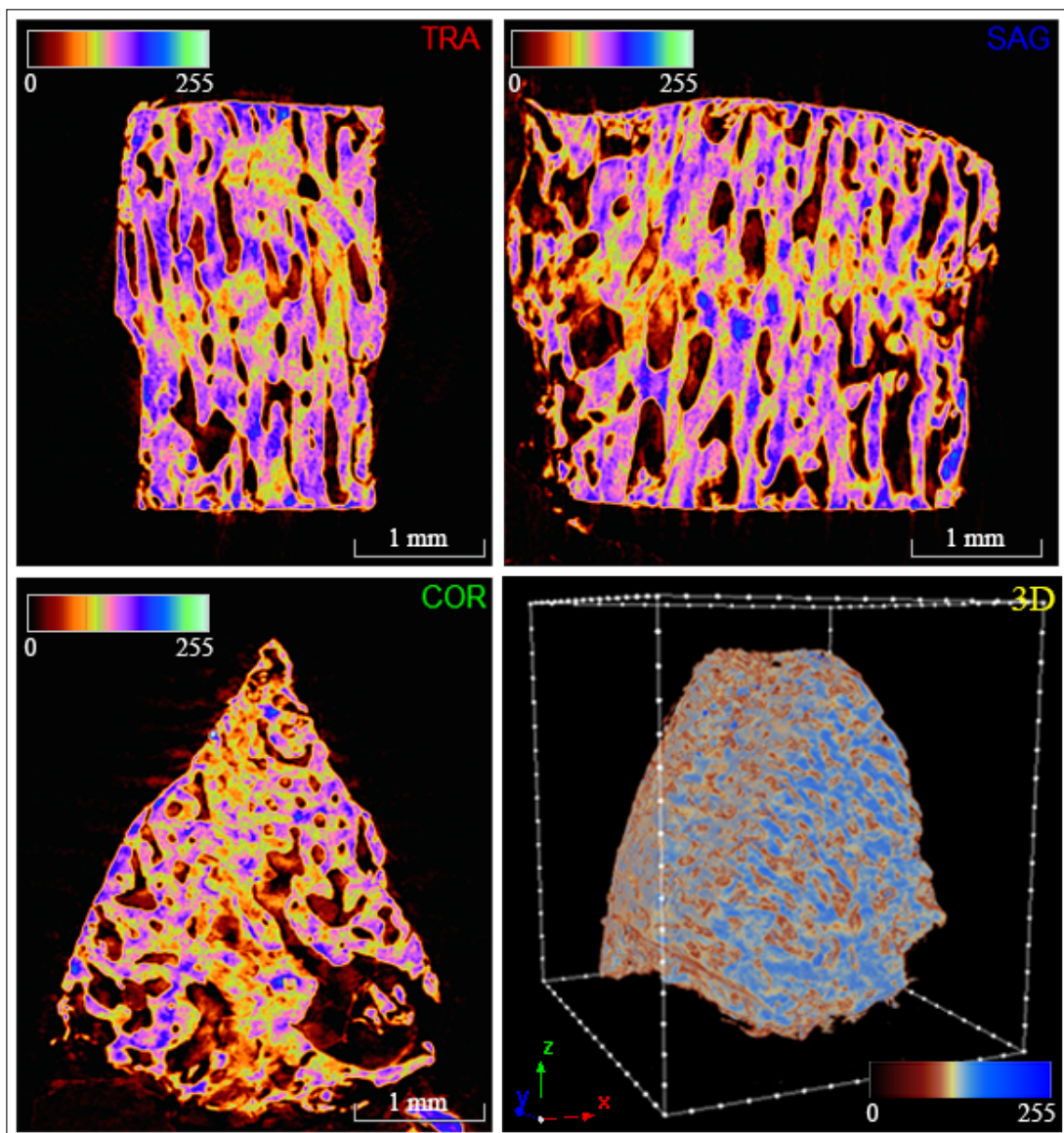
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Primeira Fase Experimental

5.1.1 Análise por micro-CT

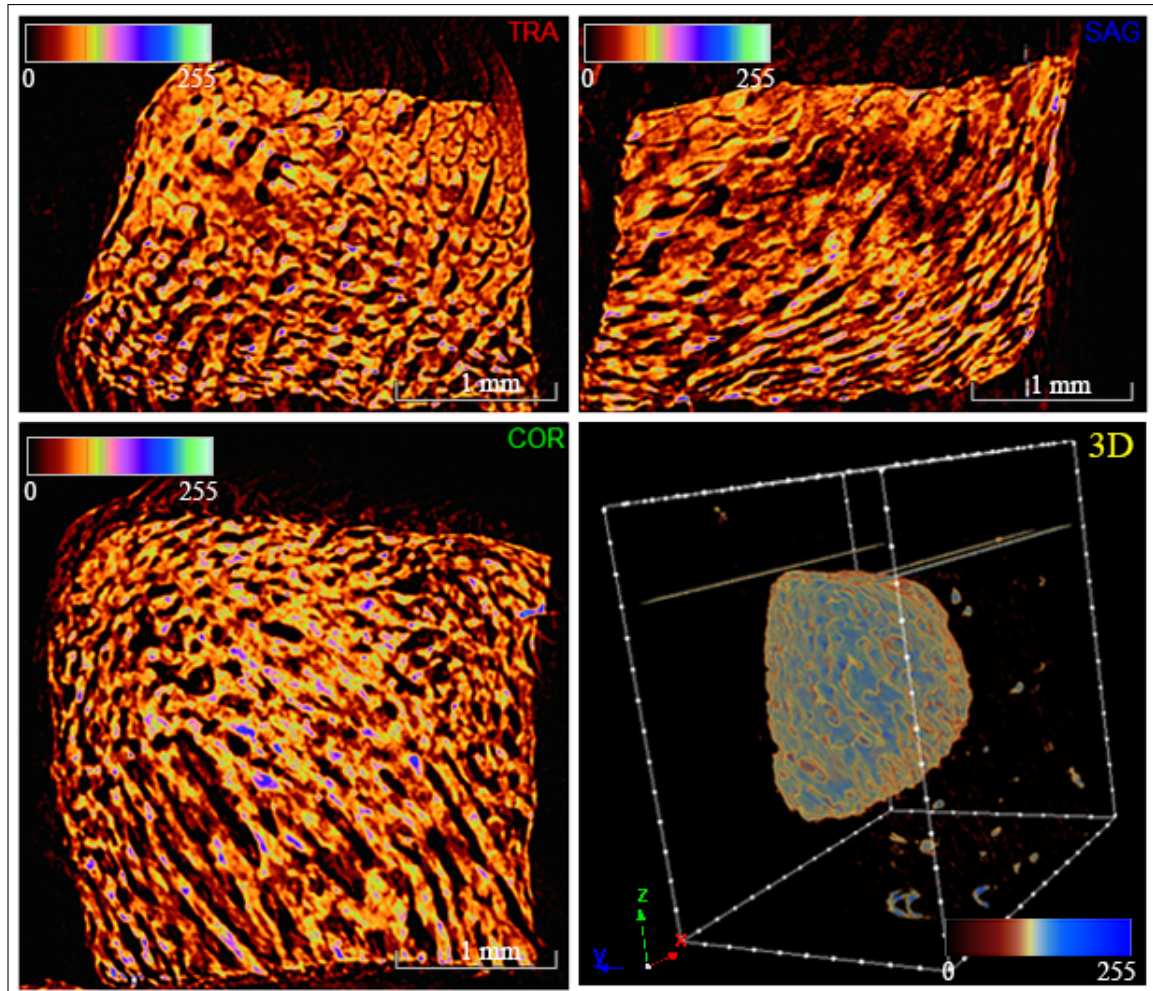
As Figuras 29, 30, 31 e 32 são representativas das imagens obtidas por micro-CT, onde é possível evidenciar cortes seccionais e reconstruções tridimensionais de cada uma das amostras.

Figura 29 – Imagens microtomográficas representativas da Amostra 1 (controle). Cortes seccionais - transversal (TRA), sagital (SAG) e coronal (COR) - e reconstrução tridimensional (3D).



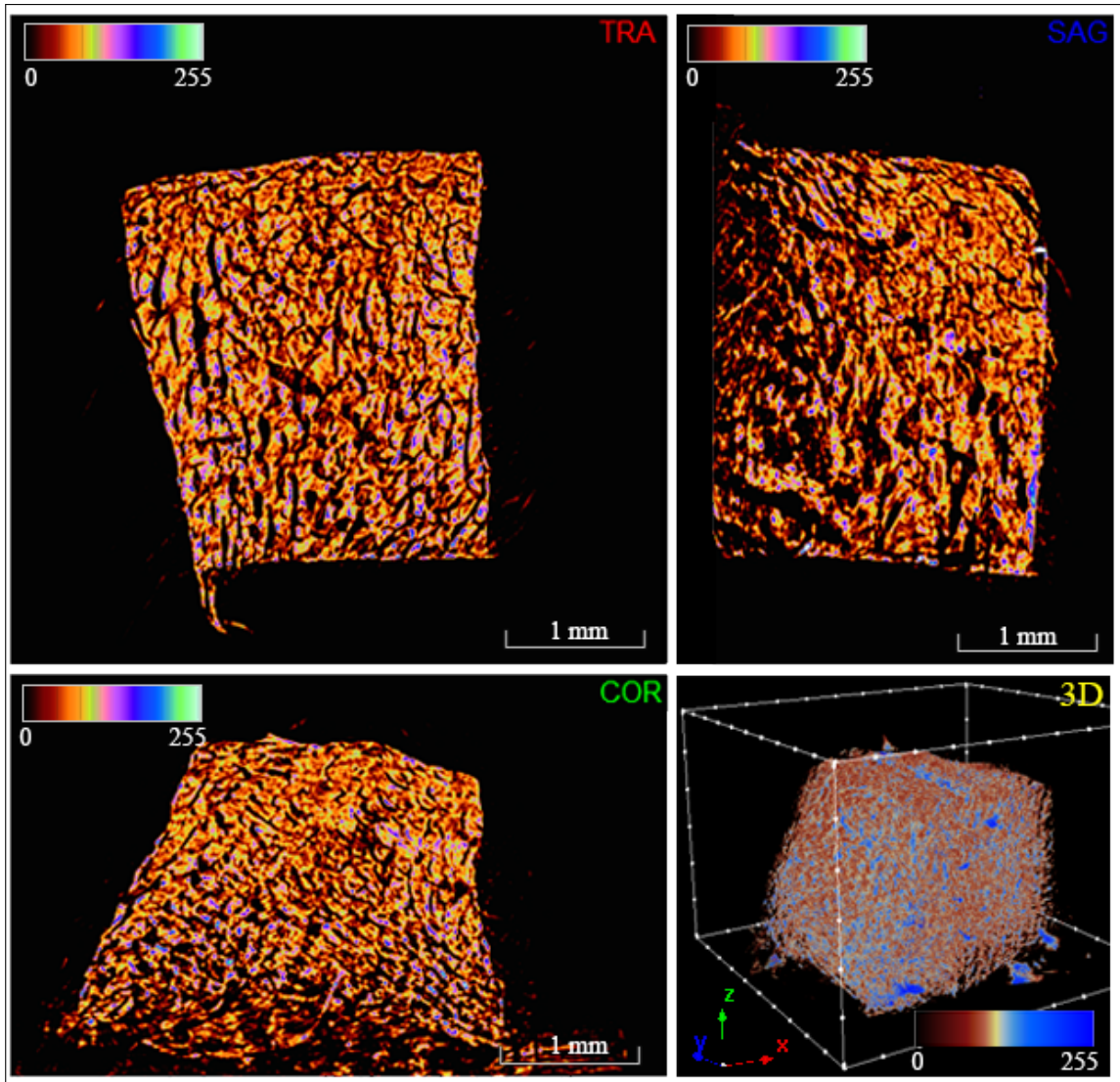
Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Figura 30 – Imagens microtomográficas representativas da Amostra 2 (7 dias de imersão em EDTA). Cortes seccionais - transversal (TRA), sagital (SAG) e coronal (COR) - e reconstrução tridimensional (3D).



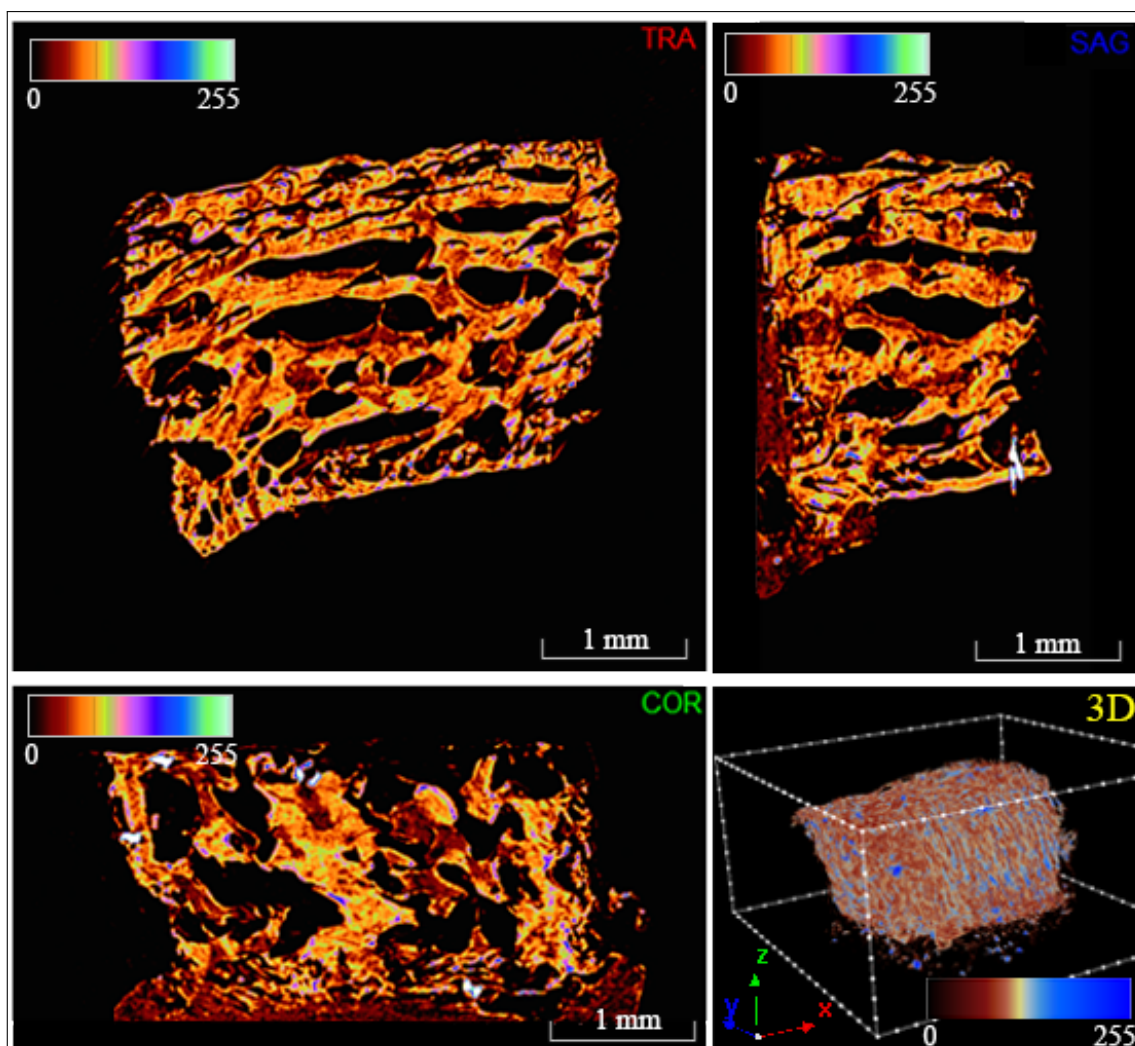
Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Figura 31 – Imagens microtomográficas representativas da Amostra 3 (15 dias de imersão em EDTA). Cortes seccionais - transversal (TRA), sagital (SAG) e coronal (COR) - e reconstrução tridimensional (3D).



Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Figura 32 – Imagens microtomográficas representativas da Amostra 4 (30 dias de imersão em EDTA). Cortes seccionais - transversal (TRA), sagital (SAG) e coronal (COR) - e reconstrução tridimensional (3D).



Fonte: Elaboração do autor, 2018.

A escala de cores aplicada apresenta a distribuição de maiores intensidades na amostra controle (Amostra 1) em relação às amostras que passaram por imersão em EDTA. Como as intensidades de uma imagem obtida por micro-CT são determinadas pelas atenuações dos raios-X, onde maiores intensidades são devido a maiores atenuações [30], este fato indica uma maior quantidade de mineral na amostra controle, responsável pela maior atenuação quando comparado às demais amostras, conforme esperado devido à redução de mineral causada pela simulação da osteoporose.

O aumento dos poros em função da progressão da simulação da osteoporose pôde ser melhor evidenciado visualmente pela amostra com maior intervalo de imersão em EDTA (Amostra 4), onde os cortes seccionais apresentaram poros com maiores áreas, implicando em uma aparente

redução da área tecidual. Este fato está de acordo com a literatura [23], onde a diminuição da resistência óssea devido à alteração da microestrutura dos poros é um dos fatores que influenciam na osteoporose.

A Tabela 2 apresenta os parâmetros quantitativos obtidos através da análise das imagens obtidas por micro-CT: razão volume ósseo/volume tecidual (BV/TV), porosidade total (Po), espessura trabecular (Tb.Th), separação trabecular (Tb.Sp), número trabecular (Tb.N) e densidade mineral óssea (BMD).

Tabela 2 – Valores obtidos dos parâmetros analisados por imagens microtomográficas.

Amostra	BV/TV (%)	Po (%)	Tb.Th (mm)	Tb.Sp (mm)	Tb.N (1/mm)	BMD (g/cm³)
1	83,48±1,42	16,49±1,36	2,180±0,101	0,431±0,089	0,383±0,024	2,340±0,102
2	82,50±0,98	17,45±0,95	0,599±0,071	0,127±0,055	1,378±0,180	0,273±0,057
3	72,56±1,29	27,16±1,35	0,215±0,095	0,081±0,012	3,380±0,289	0,206±0,084
4	59,60±1,26	40,28±1,28	0,229±0,089	0,155±0,009	2,607±0,304	0,060±0,014

Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Os valores destes parâmetros são variáveis na literatura, pois dependem, dentre outros fatores, da espécie do animal de onde o osso foi obtido, da região do corpo de origem do osso e do equipamento utilizado no estudo. Para amostras de mandíbulas suínas, provenientes de animais com tempos de vida de 29 a 250 dias de vida, Zhang *et al.* [90] obtiveram um valor médio de BMD de 1,62 g/cm³. Também em amostras de mandíbulas suínas, mas provenientes de recém-nascidos, Mulder *et al.* [91] obtiveram um valor de BMD de cerca de 1,0 g/cm³, além dos valores aproximados de BV/TV de 65%, de Tb.Th de 0,18 mm, Tb.Sp de 0,15 mm e Tb.N de 7 mm⁻¹. Já para amostras de fêmures suínos, provenientes de animais com 6 meses de vida, Tatara *et al.* [92] obtiveram valores médios de BMD de 2,523 g/cm³ para a porção cortical e 1,411 g/cm³ para a porção trabecular.

Como as amostras não tiveram suas superfícies desgastadas, apenas polidas levemente, o que origina perda de poucos microns de espessura, e cortadas em 3 mm de espessura, a espessura cortical da superfície não sofreu variações significativas, fazendo com que o modelo de estudo ficasse com estruturas mais preservadas e, portanto, mais próximas de um modelo *in vivo*. Este fato está relacionado com o valor de BMD da amostra controle obtido neste estudo

ser mais próximo do valor de BMD cortical apresentado por Tataru *et al.*, apesar da diferença entre fêmur e mandíbula. Além disso, em ambos os estudos foram utilizados animais adultos.

A diminuição no valor da relação BV/TV e consequente aumento do valor de Po evidencia a alteração da microestrutura causada pela simulação da osteoporose, reduzindo o tecido ósseo em quantidade devido à dissolução de cálcio dos cristais de hidroxiapatita. Estes parâmetros corroboram com o aumento das áreas dos poros da Amostra 4 evidenciado pelas imagens apresentadas.

O valor de BMD diminuiu em função da progressão do desafio ácido, conforme o esperado para a simulação da osteoporose [81]. O maior valor de BMD da amostra controle em relação às amostras com imersão em EDTA corrobora com a distribuição de maiores intensidades evidenciada pelas imagens apresentadas.

Os parâmetros trabeculares (Tb.Th, Tb.Sp e Tb.N) apresentaram resultados variáveis, porém, ao serem comparados os parâmetros da amostra controle com as amostras com imersão em EDTA, foi evidenciado a redução significativa nos valores de Tb.Th e Tb.Sp e aumento significativo nos valores de Tb.N. Estes dados demonstram que o desafio ácido provocou mudanças morfológicas na microestrutura óssea por meio da alteração da distribuição e dimensão das trabéculas, onde estas podem ser consideradas mais frágeis com a progressão do desafio (menos espessas e poros maiores).

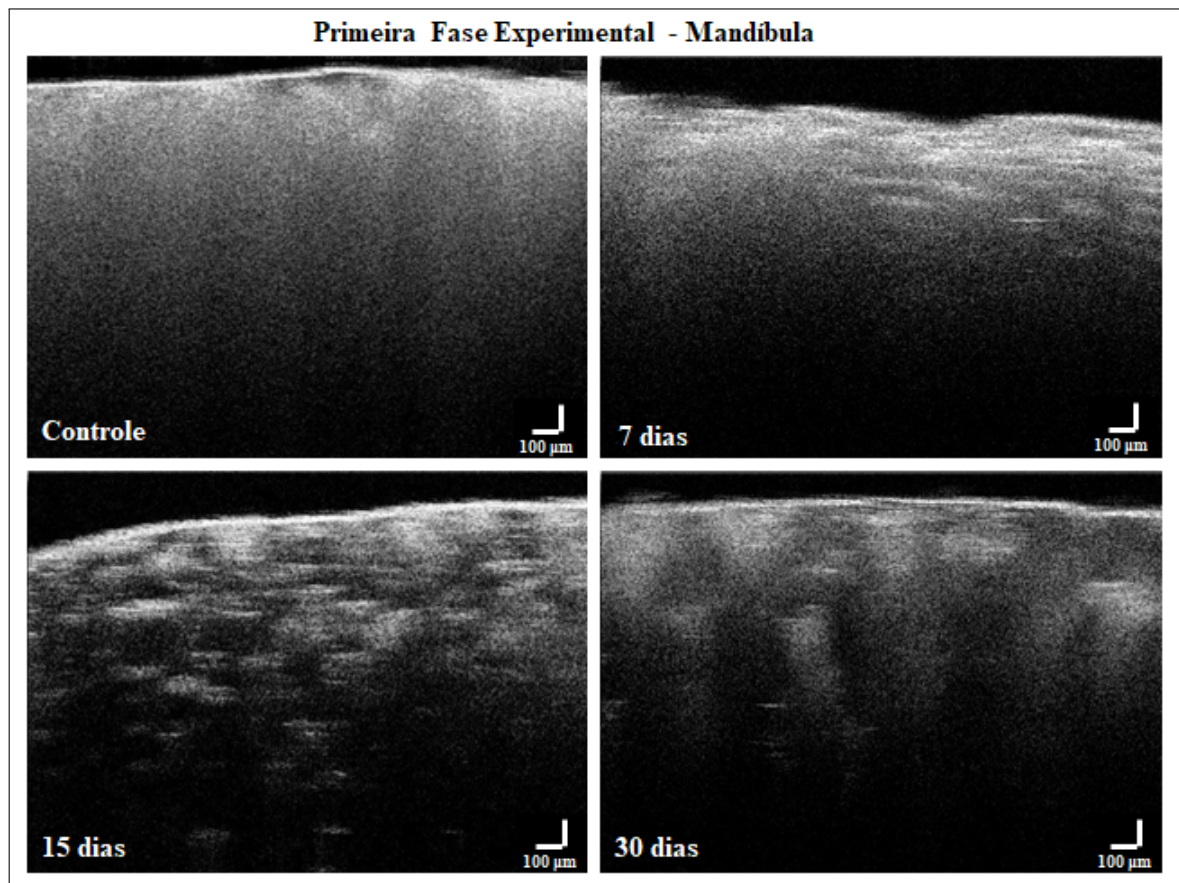
Os valores dos parâmetros obtidos demonstraram um processo de indução da osteoporose mais agressivo em relação ao modelo proposto por Lee *et al.* [81], onde amostras de vértebras suínas apresentaram redução de 48,9% da BMD em 60 dias de ensaio ácido (1,189 g/cm² nas amostras controle e 0,608 g/cm² nas amostras após 60 dias de imersão em EDTA), enquanto neste estudo foi obtida redução de 97,5% da BMD da amostra controle em relação a amostra de 30 dias de imersão. Esta diferença se deu, além da diferença entre vértebra e osso alveolar, devido ao fato de no estudo apresentado por Lee *et al.* as amostras serem imersas em solução EDTA por inteiras, sem padronização de tamanho, imageadas por DXA e apenas então cortadas para o estudo utilizando micro-CT e histologia. Neste presente estudo, objetivou-se a padronização da interação ácido-superfície de contato, eliminando esta variável de interação do estudo por OCT.

Desta forma, com base nas análises qualitativas e quantitativas, pode-se concluir que o método de indução da osteoporose foi realizado de modo eficaz, porém com indução mais agressiva que o modelo achado na literatura [81].

5.1.2 Análise por OCT

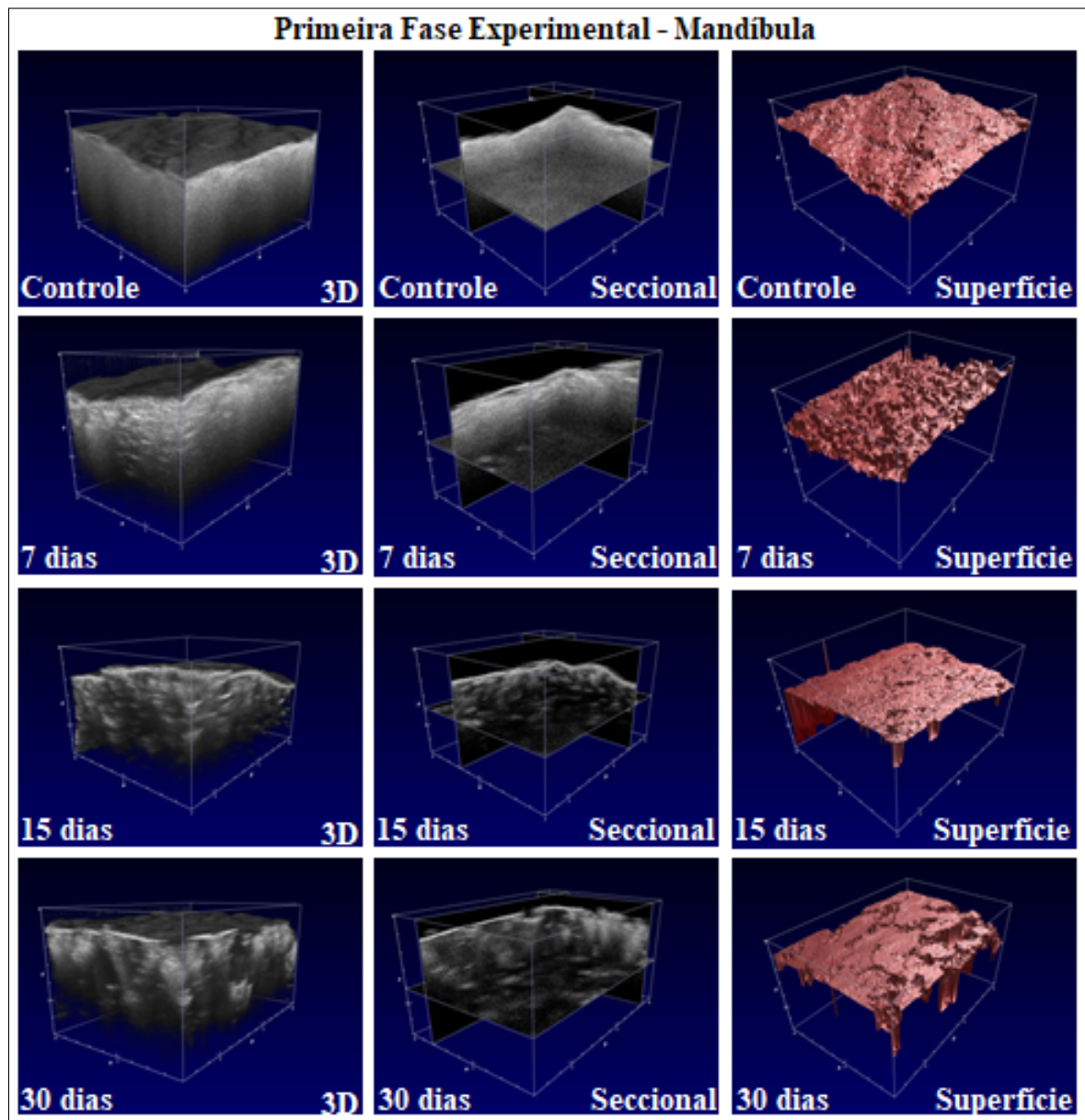
A Figura 33 é representativa dos *B-scans* obtidos em cada período de imersão em EDTA: sem imersão (controle), 7 dias, 15 dias e 30 dias. Os *B-scans* estão apresentados após a aplicação do filtro passa-banda de 40 a 80 dB e conversão para escala de cinza (8-bits), pois esta forma facilita a visualização e análise qualitativa das imagens. As aquisições volumétricas das quatro amostras estão apresentadas na Figura 34, obtidas pelo processamento do próprio programa computacional do equipamento de OCT, onde a reconstrução de superfície consiste na segmentação da superfície externa da amostra, renderizada com cores em uma escala entre vermelho e branco [93].

Figura 33 – *B-scans* de mandíbulas (primeira fase) em cada período de imersão em EDTA: sem imersão (controle), 7 dias, 15 dias e 30 dias. As barras inferiores à direita representam 100 μm .



Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Figura 34 – Imagens volumétricas das amostras da primeira fase: reconstrução tridimensional (3D), cortes seccionais e reconstrução de superfície.



Fonte: Elaboração do autor, 2018.

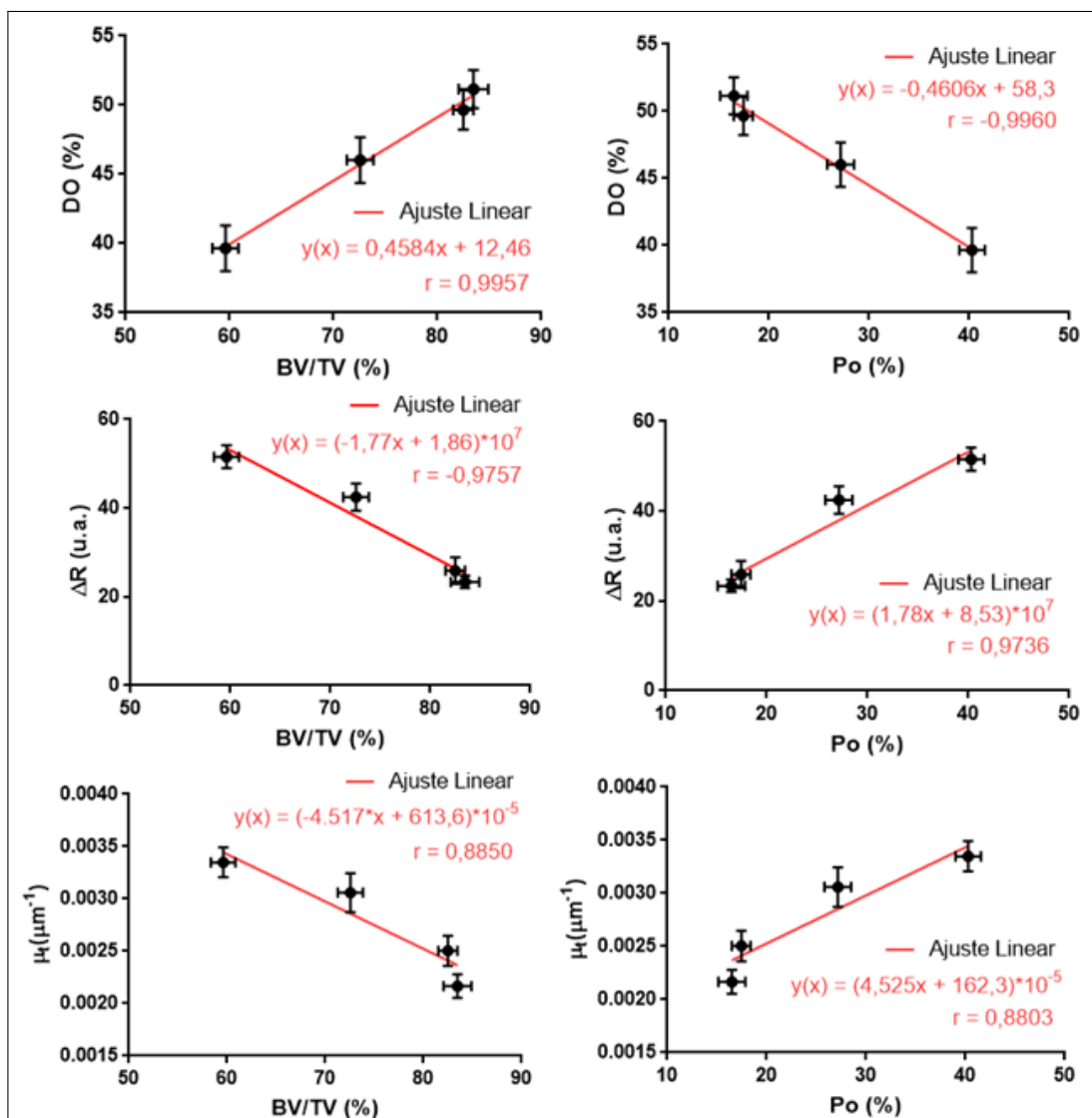
As imagens referentes à amostra controle apresentaram distribuições mais homogêneas das intensidades, *i.e.*, decaimentos mais uniformes das intensidades ao longo da profundidade, quando comparadas com as imagens referentes às amostras que sofreram imersão em EDTA, onde foram evidenciados padrões de altas e baixas intensidades ao longo da profundidade, sem decaimentos uniformes. Estes padrões podem ser relacionados às alterações morfológicas dos poros causada pela simulação da osteoporose, onde podem ser influenciados os ângulos de incidências do feixe no tecido, resultando em diferentes espalhamentos e reflexões, e o aumento

do número de interfaces ar-osso ou ar-líquido dos poros, que possuem índices de refração diferentes do osso, resultando em maiores intensidades de reflexões e espalhamentos [69, 94]. Além disso, a mudança na quantidade de mineral presente no tecido também pode influenciar na interação luz-tecido, uma vez que são alteradas as quantidades de moléculas que interagem com o feixe de luz.

5.1.3 Comparação quantitativa entre micro-CT e OCT

A Figura 35 apresenta as correlações entre os parâmetros da OCT (DO , ΔR e $\bar{\mu}_t$) e da micro-CT (BV/TV e Po).

Figura 35 – Ajuste linear e coeficiente de correlação de Pearson (r) entre os parâmetros da OCT (Densidade Óssea, Refletividade Integrada e Coeficiente de Atenuação Óptica Médio) e da micro-CT (BV/TV e Po).



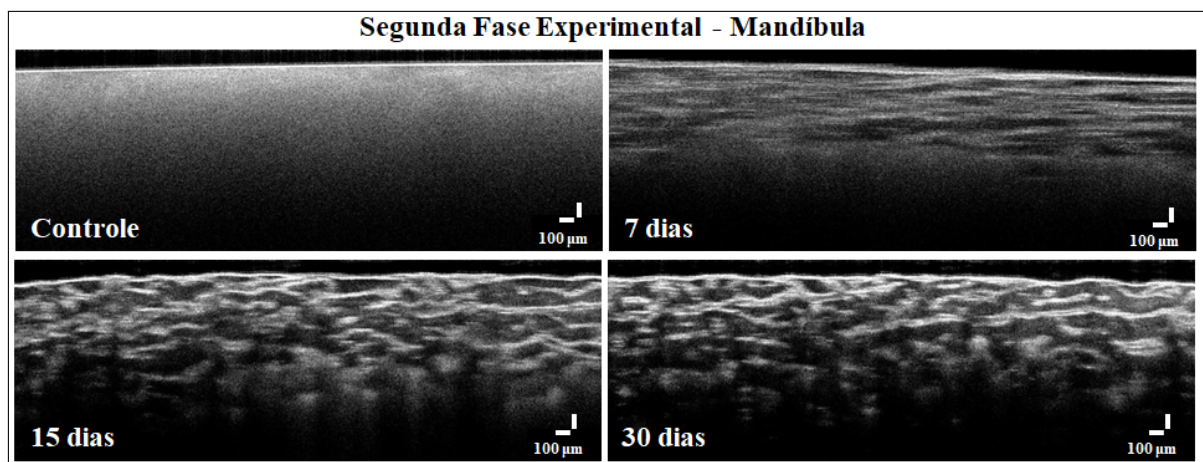
Valores de r entre 0,9 e 1,0 indicam uma correlação positiva muito alta e entre -0,9 e -1,0 indicam uma correlação negativa muito alta [95]. Assim, cerca de 99% da variância em DO está relacionada com BV/TV e Po, cerca de 97% da variância em ΔR está relacionada com BV/TV e Po, e cerca de 88% da variância em $\bar{\mu}_t$ está relacionada com BV/TV e Po. Os seis testes rejeitaram a hipótese da correlação ser aleatória ($p < 0,05$).

As comparações com os demais parâmetros da micro-CT (BMD, Tb.Th, Tb.Sp e Tb.N), bem como a comparação entre μ_t e quaisquer parâmetros obtidos por micro-CT, não apresentaram correlações significativas ($r < 0,8$). Desta forma, o $\bar{\mu}_t$ e, principalmente, a DO e a ΔR podem ser parâmetros com potencial sensibilidade para a análise da osteoporose.

5.2 Segunda Fase Experimental

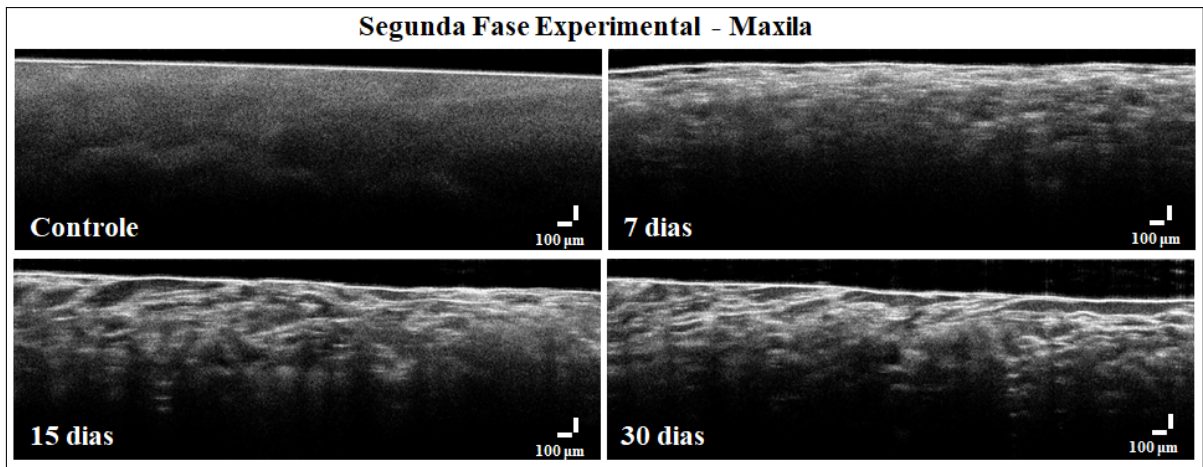
As Figuras 36 e 37 são representativas dos *B-scans* obtidos em uma mesma amostra de mandíbula e maxila, respectivamente, em cada período de imersão em EDTA: sem imersão (controle), 7 dias, 15 dias e 30 dias. As aquisições volumétricas das mesmas amostras de mandíbula e maxila originárias destes *B-scans* estão apresentadas nas Figuras 38 e 39, respectivamente.

Figura 36 – *B-scans* de uma mesma amostra de mandíbula (segunda fase) em cada período de imersão em EDTA: sem imersão (controle), 7 dias, 15 dias e 30 dias. As barras inferiores à direita representam 100 μm .



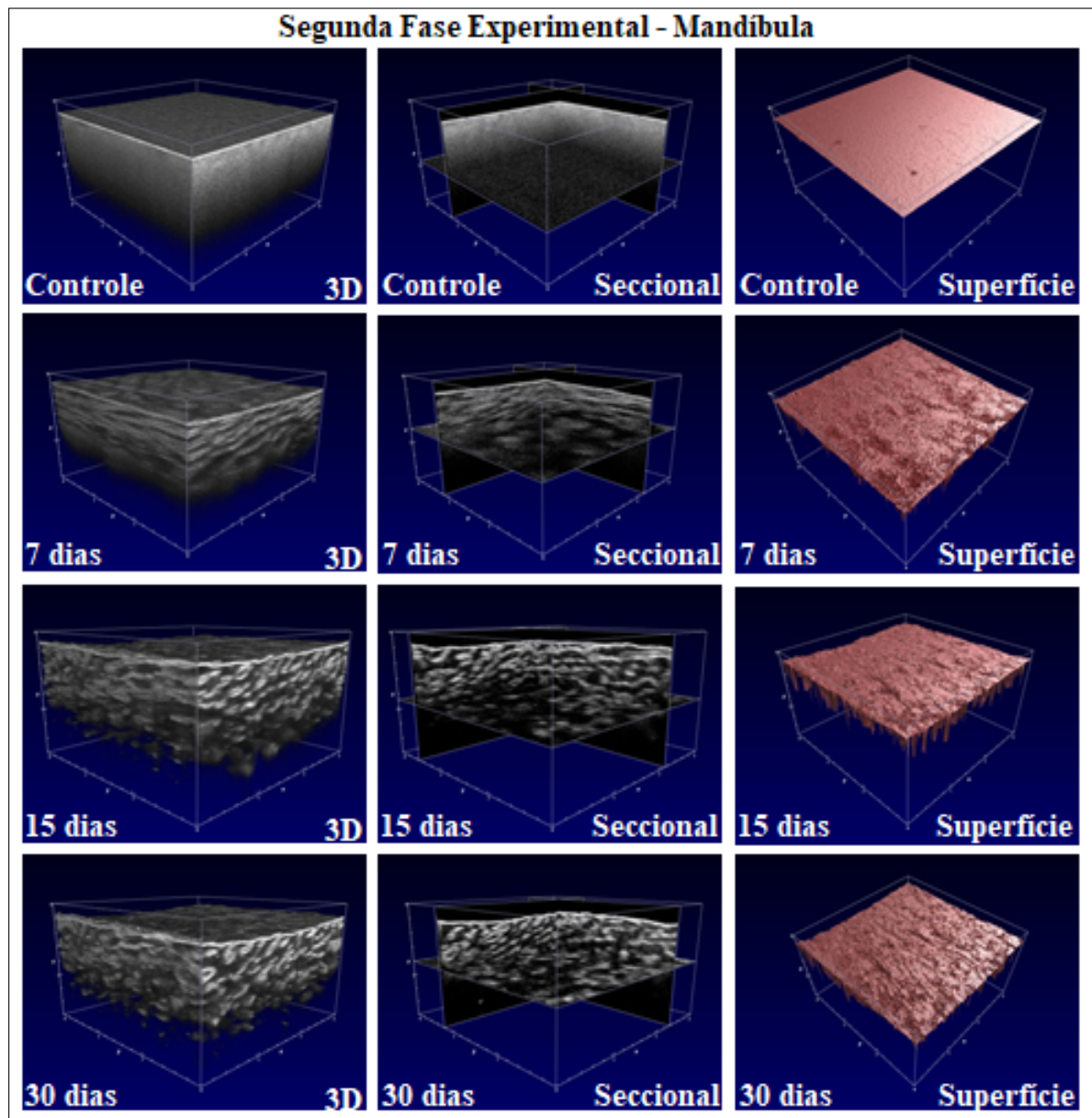
Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Figura 37 – *B-scans* de uma mesma amostra de maxila (segunda fase) em cada período de imersão em EDTA: sem imersão (controle), 7 dias, 15 dias e 30 dias. As barras inferiores à direita representam 100 μm .



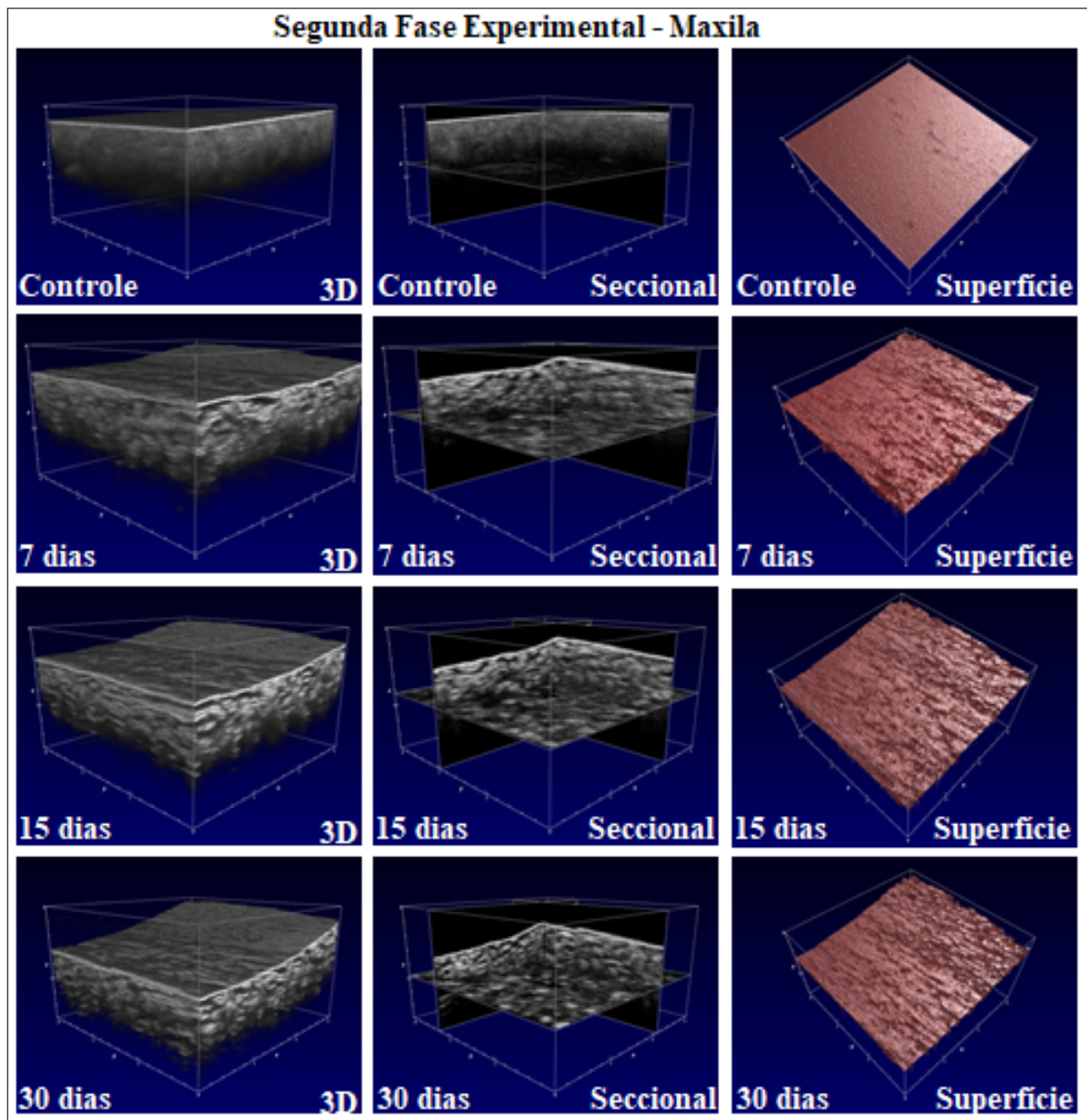
Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Figura 38 – Imagens volumétricas da amostra de mandíbula da segunda fase: reconstrução tridimensional (3D), cortes seccionais e reconstrução de superfície.



Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Figura 39 – Imagens volumétricas da amostra de maxila da segunda fase: reconstrução tridimensional (3D), cortes seccionais e reconstrução de superfície.



Fonte: Elaboração do autor, 2018.

As imagens do ciclo 0 (controle) apresentaram distribuição relativamente homogênea das intensidades, com poucos padrões de alta intensidade e quase ausência de padrões de baixa intensidades (“buracos”). A ausência destes padrões pode estar relacionada a valores significativamente pequenos de diâmetros dos poros (menores ou próximos a resolução do equipamento), não apresentando um caminho suficientemente longo de transmissão da luz pelo poro e sendo “encoberto” por padrões de altas intensidades devido às interfaces ar-osso ou ar-líquido. A quantidade de ambos os padrões aumentou em função da progressão do desafio ácido, onde as imagens obtidas após imersão em EDTA não apresentaram um decaimento

uniforme das intensidades ao longo da profundidade. Este fato está relacionado com o aumento do número e diâmetro dos poros em função da simulação da osteoporose, aumentando a quantidade de interfaces ar-osso ou ar-líquido e a distância do caminho de transmissão em ar.

As amostras de mandíbula apresentaram distribuições discretamente mais intensas em relação às amostras de maxila, o que pode estar relacionado com a maior densidade e maior espessura de osso cortical presente nas mandíbulas [12], pois as amostras não foram desgastadas, conforme explicado no Item 5.1.1.

A influência do desafio ácido nas amostras pode ser evidenciada através da alteração morfológica nas reconstruções de superfície, onde as amostras apresentaram superfícies relativamente lisas no grupo controle, devido ao polimento realizado, e superfícies rugosas nas amostras dos ciclos de imersão em EDTA, devido à interação do ácido com a superfície de contato. A rugosidade das superfícies parece aumentar conforme aumenta o tempo de exposição ao ácido, em uma relação positiva.

5.2.1 Coeficiente de atenuação óptica

A Tabela 3 apresenta as médias dos coeficientes de determinação dos ajustes exponenciais realizados para os cálculos dos coeficientes de atenuação.

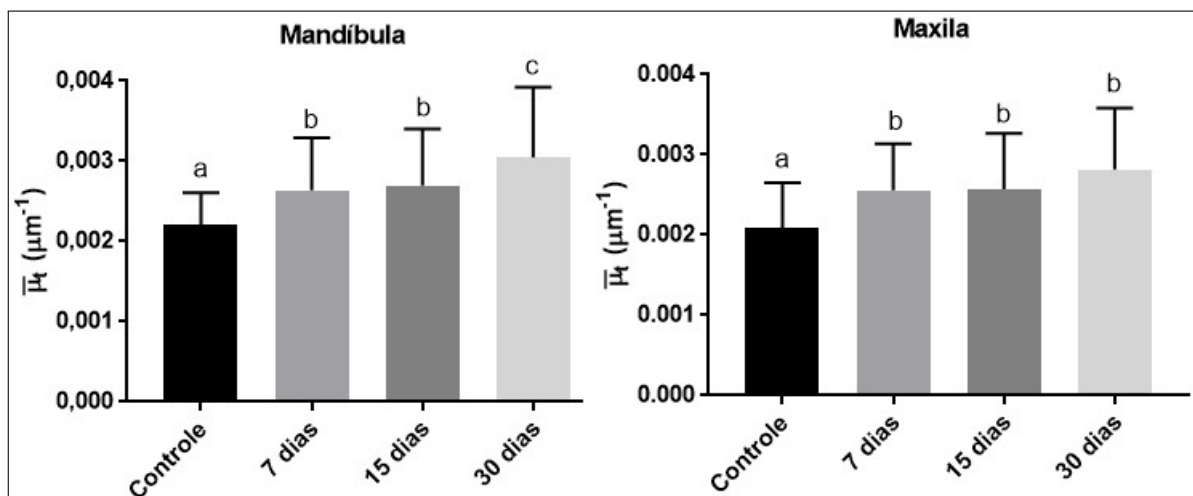
Tabela 3 – Médias dos coeficientes de determinação (R^2) dos ajustes exponenciais dos parâmetros de coeficiente de atenuação óptica (μ_t) e coeficiente de atenuação óptica médio ($\bar{\mu}_t$) das amostras da segunda fase.

Amostras	Período Imersão	$R^2(\mu_t)$	$R^2(\bar{\mu}_t)$
Mandíbula	Controle	0,443 ± 0,067	0,970 ± 0,027
	7 dias	0,308 ± 0,098	0,878 ± 0,238
	15 dias	0,286 ± 0,095	0,887 ± 0,105
	30 dias	0,300 ± 0,112	0,867 ± 0,108
Maxila	Controle	0,415 ± 0,123	0,926 ± 0,127
	7 dias	0,290 ± 0,075	0,823 ± 0,109
	15 dias	0,255 ± 0,123	0,829 ± 0,114
	30 dias	0,241 ± 0,103	0,824 ± 0,114

Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Os valores de R^2 foram menores entre o período controle e os períodos com imersão em ácido, o que evidencia a influência dos padrões de intensidades não uniformes, prejudicando o ajuste exponencial. Ao ser calculada a média de todos *A-scans* previamente à um único ajuste exponencial, a influência destes padrões foi reduzida, o que pode ser evidenciado pelos valores de R^2 significativamente maiores para o $\bar{\mu}_t$ em relação ao μ_t . Desta forma, os dados obtidos através do cálculo de μ_t foram descartados por não apresentarem confiança significativa no ajuste exponencial, o que poderia levar a interpretações equivocadas. A análise do $\bar{\mu}_t$ não elimina o risco de falsas análises, uma vez que também sofre influência destes padrões nos ajustes, porém o risco é significativamente reduzido. A Figura 40 apresenta a comparação estatística dos $\bar{\mu}_t$ de acordo com os tempos de imersão em EDTA e origem da amostra (mandíbula e maxila).

Figura 40 – Comparação estatística entre os coeficientes de atenuação óptica médios nas amostras de mandíbula e maxila. Letras distintas denotam diferenças estatisticamente significantes de acordo com o teste Anova+Tukey. As barras evidenciam desvio-padrão.



Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Os valores médios dos coeficientes $\bar{\mu}_t$ aumentaram significativamente em função da progressão do tempo de imersão em EDTA, apresentando diferença estatística significativa entre as medidas controle e as demais medidas, tanto para mandíbula quanto para maxila. Isso indica que este método identifica o surgimento da lesão, mas não a progressão da mesma. Houve ainda a diferenciação estatística significativa entre as amostras com imersão em ácido por 30 dias e as demais amostras de mandíbula, porém isto não ocorreu para as amostras de maxila. As variações nos padrões de intensidades por causa dos poros e consequente variação entre os valores obtidos estão claramente evidenciadas pelos tamanhos significativamente grandes das

barras de desvios padrão.

O aumento dos valores de $\bar{\mu}_t$ em relação às amostras que sofreram desafio ácido e consequente perda de mineral está de acordo com a literatura de desmineralização em tecidos duros do dente, onde também ocorre o aumento do coeficiente de atenuação óptica em função da perda de mineral [14, 68, 69].

Ao serem comparados estatisticamente os valores obtidos nos mesmos períodos entre mandíbula e maxila (controle x controle, 7 dias x 7 dias, 15 dias x 15 dias e 30 dias x 30 dias), não foram obtidas diferenças estatísticas significativas entre nenhum dos períodos (Tabela 4), demonstrando não haver influência da origem da amostra no cálculo do coeficiente $\bar{\mu}_t$ e não apresentando uma sensibilidade no método para potencial distinção entre análises de mandíbulas e de maxilas.

Tabela 4 – Comparação entre os coeficientes de atenuação óptica médios de mandíbula e maxila para os mesmos períodos de imersão em EDTA. Valores de p menores que 0,05 indicam diferença estatística significativa entre os grupos.

Período	Valor de p
Controle	0,3738
7 dias	0,6302
15 dias	0,4862
30 dias	0,2872

Fonte: Elaboração do autor, 2018.

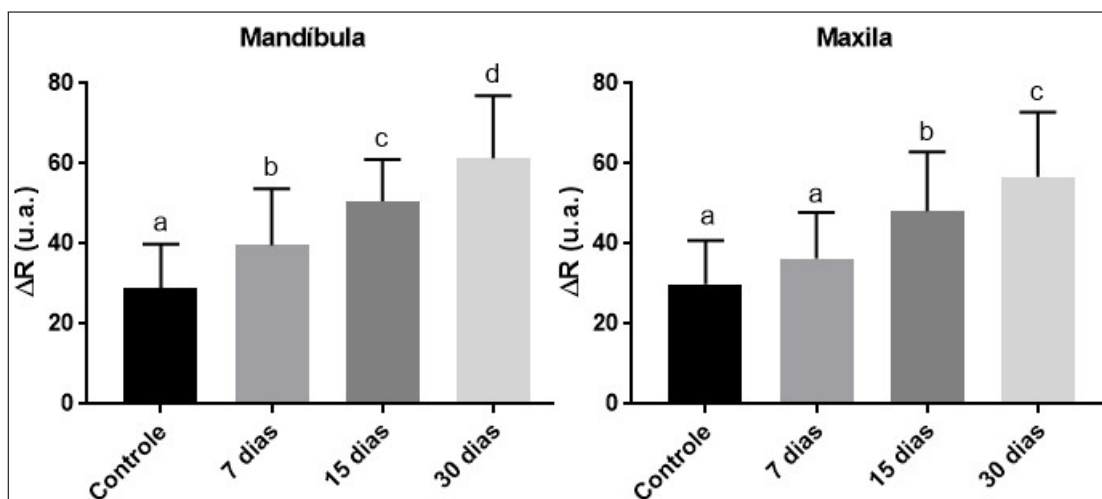
A seleção manual da máscara da ROI possibilitou a retirada da região referente ao ar e também referente à superfície saturada pela alta reflexão, a qual pode prejudicar o cálculo do coeficiente de atenuação. Porém, a seleção depende de critérios subjetivos do usuário, podendo implicar em variações nos coeficientes.

Desta forma, a análise pelo coeficiente de atenuação óptica pode ser considerada ineficaz para uma avaliação clínica acurada, uma vez que não foi capaz de diferenciar lesões graves de outras menos severas, induzidas pelo processo mais agressivo presente neste estudo quando comparado ao modelo clínico, onde há reposição mineral [25].

5.2.2 Refletividade Integrada

A Figura 41 apresenta a comparação estatística das ΔR de acordo com os tempos de imersão em EDTA e origem da amostra (mandíbula e maxila).

Figura 41 – Comparação estatística entre as refletividades integradas nas amostras de mandíbula e maxila. Letras distintas denotam diferenças estatisticamente significantes de acordo com o teste de Tukey. As barras evidenciam desvio-padrão.



Fonte: Elaboração do autor, 2018.

A comparação estatística evidenciou diferença significativa entre todos os períodos de imersão, com exceção da comparação entre controle e 7 dias para as amostras de maxila. O aumento dos valores de ΔR em função da progressão do desafio ácido também está de acordo com a literatura de desmineralização em tecidos duros do dente, onde metodologias análogas do cálculo de refletividade integrada apresentam o aumento dos valores em função da perda de mineral [14, 69, 70].

O aumento dos valores de ΔR em função da progressão da simulação da osteoporose está relacionado com a maior intensidade de reflexões e espalhamentos causados pelo maior número e dimensão das interfaces ar-osso ou ar-líquido dos poros, o que aumenta a intensidade do feixe de luz que retorna ao detector e reduz a intensidade absorvida em função da penetração [69, 94], que não retorna ao detector. Assim, uma maior quantidade de sinal detectado será integrado no cálculo das ΔR de amostras com osteoporose simulada.

Os padrões de intensidades também influenciam nos valores calculados de área sob a curva do *A-scan*, uma vez que alteram os valores de intensidades detectadas, podendo ser relacionados com os tamanhos também significativamente grandes das barras de desvios padrão, assim como

na análise do $\bar{\mu}_t$. Contudo, a integração não é dependente de um decaimento estritamente exponencial, não apresentando risco de falsas análises devido a ajustes não confiáveis.

A comparação estatística dos mesmos períodos entre mandíbula e maxila não apresentou diferenças estatísticas significativas entre nenhum dos períodos (Tabela 5), o que demonstra, assim como na análise dos $\bar{\mu}_t$, que não há sensibilidade no método para potencial distinção entre análises de mandíbulas e de maxilas.

Tabela 5 – Comparação entre as refletividades integradas de mandíbula e maxila para os mesmos períodos de imersão em EDTA. Valores de p menores que 0,05 indicam diferença estatística significativa entre os grupos.

Período	Valor de p
Controle	0,7534
7 dias	0,3240
15 dias	0,4455
30 dias	0,2711

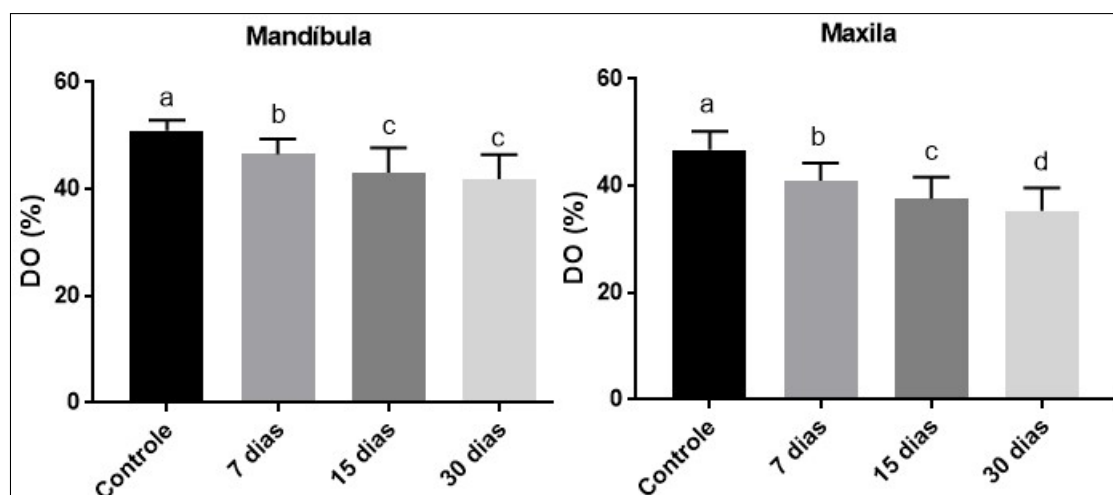
Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Desta forma, o cálculo da refletividade permite não só diagnosticar o início da lesão, mas também permite monitorar a progressão da mesma, sendo mais promissor para um diagnóstico clínico acurado.

5.2.3 Densidade Óssea por OCT

A Figura 42 apresenta a comparação estatística das DO de acordo com os tempos de imersão em EDTA e origem da amostra (mandíbula e maxila).

Figura 42 – Comparação estatística entre as densidades ósseas por OCT nas amostras de mandíbula e maxila. Letras distintas denotam diferenças estatisticamente significativas de acordo com o teste de Tukey. As barras evidenciam desvio-padrão.



Fonte: Elaboração do autor, 2018.

A comparação estatística apresentou diferença significativa entre todos os períodos de imersão, com exceção da comparação entre 15 e 30 dias para as amostras de mandíbula, o que permite inferir que este método não só permite o diagnóstico do início da lesão como também o seu monitoramento.

A comparação estatística dos mesmos períodos entre mandíbula e maxila apresentou diferenças estatísticas significativas entre todos os períodos (Tabela 6), corroborando com a análise qualitativa em que as amostras de mandíbula apresentaram distribuições de intensidades discretamente maiores. Este fato demonstra uma sensibilidade no método para potencial distinção entre análises de mandíbulas e de maxilas. Desta forma, considerando estes achados e os achados obtidos por meio da comparação com os dados de micro-CT, obtidos na primeira fase experimental, é possível inferir que esta parece ser a melhor forma de quantificar a osteoporose por OCT.

Tabela 6 – Comparação entre as densidades ósseas por OCT de mandíbula e maxila para os mesmos períodos de imersão em EDTA. Valores de p menores que 0,05 indicam diferença estatística significativa entre os grupos.

Período	Valor de p
Controle	<0,0001
7 dias	<0,0001
15 dias	<0,0001
30 dias	<0,0001

Fonte: Elaboração do autor, 2018.

O uso da conversão da matriz de intensidades em dB para imagens em 8-bits ao invés do uso direto da matriz de intensidades foi possível, diferentemente dos cálculos dos coeficientes e das refletividades, pois este processo é um análogo ao *thresholding* realizado posteriormente, ou seja, as intensidades são filtradas duas vezes (para 8-bits e para bitonal) para isolar a matriz óssea. O *thresholding* automatizado elimina a subjetividade do usuário em escolher um valor para isolar a matriz óssea, porém diferentes valores podem ser obtidos ao serem utilizados outros métodos de *thresholding* automatizados.

O cálculo de obtenção da DO não necessita de um decaimento exponencial das intensidades, além de não ser diretamente afetado por grande parte das variações nas intensidades, pois independente da variação, se o valor for maior que o *threshold*, será atribuído como valor 1. Variações significativamente grandes podem influenciar diretamente no valor do *threshold* determinado automaticamente. A menor influência dos padrões de intensidades na obtenção da DO pode ser evidenciada pelas barras de desvio padrão significativamente menores em comparação às barradas exibidas nas análises do $\bar{\mu}_t$ e da ΔR .

A densidade óssea por OCT pode ser comparada ao parâmetro de BV/TV da micro-CT, uma vez que ambos os métodos avaliam a quantidade da área óssea em relação à área total da imagem analisada, descartando a quantidade referente aos poros. Os valores de DO calculadas nas amostras controle, de cerca de 50%, estão abaixo dos valores teóricos da relação volume ósseo/volume total do osso cortical, de cerca de 90% [18], pois além de não ter sido isolado apenas o osso cortical, conforme discutido sobre a influência do preparo da espessura das amostras no Item 5.2, a OCT detecta o feixe de luz que retorna após interação com o tecido, ao invés do feixe transmitido pela amostra como no casos de técnica que utilizam raios-X, uma

vez que não há penetração suficiente da luz para ser avaliada em tecido ósseo. Este fato não implica em avaliações ineficazes da relação volume ósseo/volume pela OCT, mas sim que há uma relação entre a variação dos valores calculados pela DO e a variação dos valores reais, assim como a relação evidenciada na correlação com os valores de micro-CT, discutida no Item 5.1.3.

Desta forma, a tomografia por coerência óptica é uma técnica em potencial para avaliação da osteoporose em osso alveolar, sem o uso de radiação ionizante e com avaliação de parâmetros alternativos à análise da densidade mineral óssea, onde estudos *in vivo* deverão ser realizados para uma melhor avaliação da aplicabilidade clínica.

6 CONCLUSÃO

A análise de imagens obtidas por tomografia por coerência óptica demonstrou eficácia na distinção entre amostras sadias e amostras com osteoporose simulada. As análises de densidade óssea por OCT e refletividade integrada são as metodologias de processamento que apresentaram maior sensibilidade para diagnóstico e monitoramento da osteoporose em relação às análises por coeficientes de atenuação óptica, pois apresentaram boa correlação com parâmetros microtomográficos, possibilitaram a distinção dos níveis de osteoporose simulados e, ainda assim, permitiram a diferenciação dos tecidos.

REFERÊNCIAS

- 1 GOLDMAN, Lee; SCHAFER, Andrew I. **Goldman-Cecil Medicine**. 25. ed. Philadelphia: Elsevier, 2016. v. 2.
- 2 World Health Organization. WHO scientific group on the assessment of osteoporosis at primary health care level **World Health Organization**, 2004.
- 3 SIRIS, E. S. *et al.* The clinical diagnosis of osteoporosis: a position statement from the national bone health alliance working group. **Journal of the International Academy of Periodontology**, v. 9, n. 3, p. 77–84, 2007.
- 4 MARINHO, Bruna Coelho Galvão *et al.* The burden of osteoporosis in brazil. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 58, n. 5, p. 434–443, 2014.
- 5 PINHEIRO, Marcelo M. *et al.* O impacto da osteoporose no brasil: dados regionais das fraturas em homens e mulheres adultos – the brazilian osteoporosis study (brazos). **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 2, p. 113–127, 2010.
- 6 SIDIROPOULOU-HATZIGIANNIS, Sossani; KOURTIDOU, Maria; TSALIKIS, Lazaros. The effect of osteoporosis on periodontal status, alveolar bone and orthodontic tooth movement. a literature review. **Journal of the International Academy of Periodontology**, v. 9, n. 3, p. 77–84, 2007.
- 7 LEE, Byung Do; WHITE, Stuart C. Mandibular bone loss in an animal model of male osteoporosis (orchidectomized rat): a radiographic and densitometric study. **Osteoporosis International**, v. 15, n. 10, p. 814–819, 2004.
- 8 PEARSON, Derek; MILLER, Colin G. **Clinical Trials in Osteoporosis**. 2. ed. London: Springer, 2007.
- 9 PRASAD, Paras N. **Introduction to Biophotonics**. 1. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2003.
- 10 VO-DINH, Tuan. **Biomedical photonics handbook**. Boca Raton: CRC Press, 2003.
- 11 DREXLER, Wolfgang; FUJIMOTO, James G. **Optical Coherence Tomography: Technology and Applications**. 2. ed. Cham: Springer, 2015.
- 12 LINDHE, Jan. **Clinical Periodontology and Implant Dentistry**. 6. ed. Oxford: Blackwell Munksgaard, 2015.
- 13 BONNICK, Sydney Lou; LEWIS, Lori Ann. **Bone Densitometry**. 2. ed. New Jersey: Humana Press, 2006.
- 14 MACHOY, Monika *et al.* The use of optical coherence tomography in dental diagnostics: A state-of-the-art review. **Journal of Healthcare Engineering**, v. 2017, p. 1–31, 2004.
- 15 PENONI, Daniela Cia *et al.* Possíveis ligações entre a osteoporose e a doença periodontal. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 57, n. 3, p. 270–273, 2017.

- 16 KASSECK, Christoph *et al.* Comparison of optical coherence tomography, microcomputed tomography, and histology at a three-dimensionally imaged trabecular bone sample. **Journal of Biomedical Optics**, v. 15, n. 4, p. 046019–1–046019–6, 2010.
- 17 TACHIKAWA, Noriko; YOSHIMURA, Reiko; OHBAYASHI, Kohji. Cross-sectional imaging of extracted jawbone of a pig by optical coherence tomography. In: **Proceedings of SPIE - Lasers in Dentistry XVII**. São Francisco: [s.n.], 2011. v. 7884, p. 78840F–1–78840F–6.
- 18 KINI, Usha; NANDEESH, B. N. Physiology of bone formation, remodeling and metabolism. In: **Radionuclide and Hybrid Bone Imaging**. 1. ed. Heidelberg: Springer, 2012. cap. 2, p. 29–57.
- 19 BURR, David B.; ALLEN, Matthew R. **Basic and Applied Bone Biologys**. 1. ed. Waltham: Academic Press, 2014.
- 20 BILEZIKIAN, John P.; RAISZ, Lawrence G.; RODAN, Gideon A. **Principles of Bone Biology**. 3. ed. San Diego: Academic Press, 2014. v. 1.
- 21 U.S. Department of Health and Human Services. **Bone Health and Osteoporosis: A Report of the Surgeon General**. Rockville, MD: U.S. Department of Health and Human Services, Office of the Surgeon General, 2004.
- 22 FUCHS, Robyn K.; WARDEN, Stuart J.; TURNER, Charles H. Bone anatomy, physiology and adaptation to mechanical loading. In: PLANELL, Josep A. *et al* (Ed.). **Bone Repair Biomaterials**. CRC Press, 2009. cap. 2, p. 25–68.
- 23 OSTERHOFF, Georg *et al.* Bone mechanical properties and changes with osteoporosis. **Injury**, v. 47, n. 2, p. S11–S20, 2016.
- 24 RENDERS, Greetje A. P. *et al.* Porosity of human mandibular condylar bone. **Journal of Anatomy**, v. 210, n. 3, p. 239–248, 2007.
- 25 HALL, John E. **Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology**. 13. ed. Philadelphia: Elsevier, 2016.
- 26 JONASSON, Grethe; RYTHEN, Marianne. Alveolar bone loss in osteoporosis: a loaded and cellular affair? **Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry**, v. 13, n. 8, p. 95–103, 2016.
- 27 GOLOB, Anna L.; LAYA, Mary B. Osteoporosis screening, prevention and management. **Medical Clinics of North America**, v. 99, n. 3, p. 587–606, 2015.
- 28 HOLLINS, Carole. **Basic Guide to Anatomy and Physiology for Dental Care Professionals**. 1. ed. West Sussex: Wiley-Blackwel, 2012.
- 29 WALLACE, Ian J.; RUBIN, Clinton T.; LIEBERMAN, Daniel E. Osteoporosis. **Evolution, Medicine, and Public Health**, v. 2015, n. 1, p. 343, 2015.
- 30 WESTENDORF, Jennifer J. **Osteoporosis: Methods and Protocols**. 1. ed. Totowa: Humana Press, 2008.
- 31 MARTINS, Milton de Arruda *et al.* **Clínica Médica**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2016. v. 5.

- 32 CAULEY, Jane A. *et al.* Geographic and ethnic disparities in osteoporotic fractures. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 10, n. 6, p. 338–351, 2014.
- 33 CAMARGOS, Mirela Castro Santos; BOMFIM, Wanderson Costa. Osteoporose e expectativa de vida saudável: estimativas para o brasil em 2008. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 25, n. 1, p. 106–112, 2007.
- 34 CAULEY, Jane A. Public health impact of osteoporosis. **Journals of Gerontology: Medical Sciences**, v. 68, n. 10, p. 1243–1251, 2013.
- 35 MORAES, Luci Fabiane Scheffer *et al.* Expenditures on the treatment of osteoporosis in the elderly in brazil (2008 - 2010): Analysis of associated factors. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 17, n. 3, p. 719–734, 2014.
- 36 HARVEY, Nicholas; DENNISON, Elaine; COOPER, Cyrus. Osteoporosis: Impact on health and economics. **Nature Review Rheumatology**, v. 6, n. 4, p. 99–105, 2010.
- 37 ERDOGAN, Ozgur *et al.* A review of the association between osteoporosis and alveolar ridge augmentation. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 104, n. 6, p. 738e1–738e13, 2007.
- 38 HUJA, Sarandeep S. *et al.* Remodeling dynamics in the alveolar process in skeletally mature dogs. **The Anatomical Record. Part A, Discoveries in Molecular, Cellular and Evolutionary Biology**, v. 288, n. 12, p. 1243–1249, 2006.
- 39 SCHULZ, Matthias C. *et al.* Site-specific variations in bmd under systemic conditions inducing osteoporosis in minipigs. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. 426, p. 1–11, 2017.
- 40 ANWAR, R. Binte *et al.* Relationship between porotic changes in alveolar bone and spinal osteoporosis. **Journal of Dental Research**, v. 86, n. 1, p. 52–57, 2007.
- 41 KRALL, E. A. *et al.* Tooth loss and skeletal bone density in healthy postmenopausal women. **Osteoporosis International**, v. 4, n. 2, p. 104–109, 1994.
- 42 SRDAN, Postic D. *et al.* Systemic non-malignant osteoporosis and reduction of edentulous alveolar ridges. **Journal of the International Academy of Periodontology**, v. 9, n. 1, p. 13–23, 2014.
- 43 WACTAWSKI-WENDE, Jean *et al.* The association between osteoporosis and alveolar crestal height in postmenopausal women. **Journal of Periodontology**, v. 76, n. 11, p. 2116–2124, 2005.
- 44 National Institutes of Health. What Is a Bone Density Test? **National Institutes of Health**, 2015.
- 45 MAGHRAOUI, Abdellah El. **Dual Energy X-Ray Absorptiometry**. 1. ed. Rijeka: InTech, 2012.
- 46 GUGLIELMI, Giuseppe. **Osteoporosis and Bone Densitometry Measurements**. 1. ed. Heidelberg: Springer, 2013.
- 47 GUNGOR, Enes; YILDIRIM, Derya; ÇEVİK, Remzi. Evaluation of osteoporosis in jaw bones using cone beam ct and dual-energy x-ray absorptiometry. **Journal of Oral Science**, v. 58, n. 2, p. 185–194, 2016.

- 48 PLESSIS, Anton du *et al.* Laboratory x-ray micro-computed tomography: a user guideline for biological samples. **GigaScience**, v. 6, n. 6, p. 1–11, 2017.
- 49 SILVA, Alessandro Márcio Hakme da. **Análise Morfométrica 2D e 3D de Amostras de Osso Trabecular Utilizando Microtomografia Tridimensional por Raio-X**. Dissertação (Mestrado) — Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.
- 50 FERNANDES, Patricia Garani. **Aplicação da Microtomografia Computadorizada para a Análise Morfométrica Bi e Tridimensional na Avaliação da Perda Óssea Experimental em Ratos**. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.
- 51 LEE, Byung Do; WHITE, Stuart C. Age and trabecular features of alveolar bone associated with osteoporosis. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 100, n. 1, p. 92–98, 2005.
- 52 HUANG, David *et al.* Optical coherence tomography. **Science**, v. 254, n. 5035, p. 1178–1181, 1991.
- 53 BOUMA, Brett E.; TEARNEY, Guilherme J. **Handbook of optical coherence tomography**. 1. ed. New York: Marcel Dekker, 2002.
- 54 NIEMZ, Markolf H. **Laser-Tissue Interactions: Fundamentals and Applications**. 3. ed. Heidelberg: Springer, 2007.
- 55 JACQUES, Steven L. Optical properties of biological tissues: a review. **Physics in Medicine and Biology**, v. 58, n. 11, p. R37–R61, 2013.
- 56 YAMADA, Yukio; OKAWA, Shinpei. Diffuse optical tomography: present status and its future. **Optical Review**, v. 21, n. 3, p. 185–205, 2014.
- 57 BREZINSKI, Mark. **Optical coherence tomography: Principles and Applications**. 1. ed. Florida: Academic Press, 2006.
- 58 FREITAS, Anderson Zanardi de; AMARAL, Marcello Magri.; RAELE, Marcus Paulo. Optical coherence tomography: development and applications. In: DUARTE, Francisco Javier (Ed.). **Laser pulse phenomena and applications**. InTech, 2010. cap. 20, p. 409-432.
- 59 KRAMOREVA, Larisa I.; ROZHKO, Yu. I. Optical coherence tomography (review). **Journal of Applied Spectroscopy**, v. 77, n. 4, p. 449–467, 2010.
- 60 KRAUS, Martin F. *et al.* Motion correction in optical coherence tomography volumes on a per a-scan basis using orthogonal scan patterns. **Biomedical Optics Express**, v. 3, n. 6, p. 1182–1198, 2012.
- 61 ASHTAMKER, Y.; FREILIKHER, V.; DAINTY, J. C. Ambiguity of optical coherence tomography measurements due to rough surface scattering. **Optics Express**, v. 19, n. 22, p. 21658–21664, 2011.
- 62 AZEVEDO, Cynthia Soares de *et al.* Evaluation of caries-affected dentin with optical coherence tomography. **Brazilian Oral Research**, v. 25, n. 5, p. 407–413, 2011.
- 63 FERCHER, Adolf F. *et al.* Optical coherence tomography - principles and applications. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 104, n. 6, p. 738e1–738e13, 2003.

- 64 SCHUBERT, E. Fred. **Light-Emitting Diodes**. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2006.
- 65 PODOLEANU, A. Gh. Optical coherence tomography. **Journal of Microscopy**, v. 247, n. 3, p. 209–219, 2012.
- 66 PARK, Jin-Young *et al.* Comparisons of the diagnostic accuracies of optical coherence tomography, micro-computed tomography, and histology in periodontal disease: an ex vivo study. **Journal of Periodontal & Implant Science**, v. 47, n. 1, p. 30–40, 2017.
- 67 KAKIZAKI, S. *et al.* Observation and determination of periodontal tissue profile using optical coherence tomography. **Journal of Periodontal Research**, v. 53, n. 2, p. 188–199, 2017.
- 68 MAIA, Ana Marly Araújo *et al.* Evaluation of dental enamel caries assessment using quantitative light induced fluorescence and optical coherence tomography. **Journal of Biophotonics**, v. 9, n. 6, p. 596–602, 2016.
- 69 CARA, Ana C.B. *et al.* Evaluation of two quantitative analysis methods of optical coherence tomography for detection of enamel demineralization and comparison with microhardness. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 46, n. 9, p. 666–671, 2014.
- 70 DARLING, Cynthia L. *et al.* Remineralization of root caries monitored using cross-polarization optical coherence tomography. In: **Proceedings of SPIE - Lasers in Dentistry XVIII**. São Francisco: [s.n.], 2013. v. 8208, p. 82080V–1–82080V–7.
- 71 XU, Xiangqun; WANG, Ruikang K; HAJ, Alicia El. In vitro imaging of bone tissue and monitoring of tissue viability by optical coherence tomography. In: **Proceedings of SPIE - Laser-Tissue Interaction XII: Photochemical, Photothermal, and Photomechanical**. São Francisco: [s.n.], 2001. v. 4257, p. 442–447.
- 72 WEBSTER, Paul J. L. *et al.* Guidance of hard tissue ablation by forward-viewing optical coherence tomography. In: **Proceedings of SPIE - Optical Coherence Tomography and Coherence Domain Optical Methods in Biomedicine XIV**. São Francisco: [s.n.], 2015. v. 7554, p. 75540Z–1–75540Z–6.
- 73 ZHAN, Zhenlin *et al.* Measurement of crater geometries after laser ablation of bone tissue with optical coherence tomography. **Chinese Optics Letters**, v. 6, n. 12, p. 896–898, 2008.
- 74 NEGRUTIU, Meda L. *et al.* Bone regeneration assessment by optical coherence tomography and microct synchrotron radiation. In: **Proceedings of SPIE - Optical Coherence Tomography and Coherence Techniques VI**. São Francisco: [s.n.], 2013. v. 8802, p. 880204–1–880204–6.
- 75 MOHEBI, Saleh *et al.* Optical coherence tomography (oct) guided inner ear decalcification, fast and safe method. **Biomed Technologies**, v. 59, n. S1, p. S564–S567, 2014.
- 76 MOHEBBI, Saleh *et al.* Experimental visualization of labyrinthine structure with optical coherence tomography. **Biomed Technologies**, v. 29, n. 1, p. 5–9, 2017.
- 77 KAMALDEN, Tengku Ain; LINGAM, Gopal; SUNDAR, Gangadhara. Bone remodeling in choroidal osteoma monitored by fundus photography and spectral-domain optical coherence tomography. **Ocular Oncology and Pathology**, v. 1, n. 1, p. 13–18, 2015.

- 78 BYKOV, Alexander *et al.* Imaging of subchondral bone by optical coherence tomography upon optical clearing of articular cartilage. **Journal of Biophotonics**, v. 9, n. 3, p. 270–275, 2016.
- 79 GIARDINI, Mario E. *et al.* Electrophysiological and anatomical correlates of spinal cord optical coherence tomography. **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. 1–15, 2016.
- 80 MAHDIAN, Mina *et al.* Tissue characterization using optical coherence tomography and cone beam computed tomography: A comparative pilot study. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology**, v. 122, n. 1, p. 98–103, 2016.
- 81 LEE, Ching yi *et al.* A method to develop an in vitro osteoporosis model of porcine vertebrae: histological and biomechanical study. **Journal of Neurosurgery: Spine**, v. 14, n. 6, p. 789–798, 2011.
- 82 Thorlabs, Inc. (Ed.). **ThorImage OCT Operating Manual**. Newton, NJ, EUA, 2018. 78 p.
- 83 THORLABS, Inc. (Ed.). **Sistema de Imagem Callisto 930 nm OCT**. Disponível em: https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=3779. Acesso em: 15 mar. 2018.
- 84 AMARAL, Marcelo Magri. **Análise de Sinais de Tomografia por Coerência Óptica: Equação LIDAR e Métodos de Inversão**. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- 85 SCOLARO, Loretta *et al.* Parametric imaging of the local attenuation coefficient in human axillary lymph nodes assessed using optical coherence tomography. **Biomedical Optical Express**, v. 3, n. 2, p. 366–379, 2012.
- 86 YUAN, Wu *et al.* Robust and fast characterization of oct-based optical attenuation using a novel frequency-domain algorithm for brain cancer detection. **Scientific Reports**, v. 7, n. 44909, p. 1–8, 2017.
- 87 RAHLVES, Maik *et al.* Towards refractive index corrected optical coherence tomography as a navigation tool for bone surgery. In: **2013 Conference on Lasers Electro-Optics Europe International Quantum Electronics Conference**. Munique: [s.n.], 2013. p. 1–1.
- 88 STRITZEL, Jenny; RAHLVES, Maik; ROTH, Bernhard. Refractive-index measurement and inverse correction using optical coherence tomography. **Optics Letters**, v. 40, n. 23, p. 5558–5561, 2015.
- 89 OTSU, Nobuyuki. A threshold selection method from gray-level histograms. **IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics**, v. 9, n. 1, p. 62–66, 1979.
- 90 ZHANG, F. *et al.* Mass properties of the pig mandible. **Journal of Dental Research**, v. 80, n. 1, p. 327–335, 2001.
- 91 MULDER, Lars *et al.* Architecture and mineralization of developing cortical and trabecular bone of the mandible. **Anatomy and Embryology**, v. 211, n. 1, p. 71–78, 2006.

- 92 TATARA, Marcin R. *et al.* Biochemical bone metabolism markers and morphometric, densitometric and biomechanical properties of femur and tibia in female and gonadectomised male polish landrace pigs. **Journal of Pre-Clinical and Clinical Research**, v. 6, n. 1, p. 14–19, 2012.
- 93 Thorlabs, Inc. (Ed.). **ThorImage OCT: Operating Manual**. Dachau, MU, Alemanha, 2016. 74 p.
- 94 MUJA, Claudia *et al.* Optical path-length spectroscopy of incipient caries lesions in relation to quantitative light-induced fluorescence and lesion characteristics. **Applied Optics**, v. 42, n. 16, p. 2979–2986, 2003.
- 95 MUKAKA, M.M. Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. **Malawi Medical Journal**, v. 24, n. 3, p. 69–71, 2012.

ANEXOS

ANEXO A - Parecer da Comissão de Ética em Uso de Animais da UFABC



Universidade Federal do ABC

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Fundação Universidade Federal do ABC
Comissão de Ética em Uso de Animais



Santo André, 17 de agosto de 2018
CEUAx N 7604010818

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Patrícia Aparecida Da Ana
Área: Centro De Engenharia, Modelagem E Ciências Sociais Aplicadas - Cecs
Docente (orientador)

Título do projeto: "Avaliação da osteoporose em osso alveolar utilizando tomografia por coerência óptica".

Parecer Consubstanciado da CEUA UFABC

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Universidade Federal do ABC, na reunião de 17/08/2018, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Valéria Lima Fabrício Borghesi
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Fundação Universidade Federal do ABC

Profa. Dra. Renata Simões
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Fundação Universidade Federal do ABC