

Universidade Federal de São Carlos- UFSCar  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde- CCBS  
Programa de Pós-Graduação em Gerontologia- PPGGERO

**CAMILA MARQUES DE ARAÚJO**

***DUAL ENERGY X-RAY ABSORPTIOMETRY: DESENVOLVIMENTO,  
VALIDAÇÃO E REPRODUTIBILIDADE DE RECOMENDAÇÕES TÉCNICAS  
PARA OSTEOARTRITE DE RATOS***

São Carlos

2021

***DUAL ENERGY X-RAY ABSORPTIOMETRY: DESENVOLVIMENTO,  
VALIDAÇÃO, REPRODUTIBILIDADE DE RECOMENDAÇÕES TÉCNICAS  
PARA OSTEOARTRITE DE RATOS***

**CAMILA MARQUES DE ARAÚJO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Gerontologia da Universidade Federal de São Carlos - PPGGero como requisito para obtenção do título de Mestre em Gerontologia" – Área de Concentração: Saúde, biologia e envelhecimento. **Orientador:** Prof. Dr. Fernando Augusto Vasilceac

São Carlos

2021



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Gerontologia

---

### Folha de Aprovação

---

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Camila Marques de Araujo, realizada em 28/05/2021.

#### Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Fernando Augusto Vasilceac (UFSCar)

Profa. Dra. Germanna de Medeiros Barbosa (UFRN)

Profa. Dra. Paula Regina Mendes da Silva Serrão (UFSCar)

## **DEDICATÓRIA**

Dedico essa dissertação de mestrado há minha avó Ana (*in memoriam*). A sua integridade e resiliência sempre estava além de onde meus pés poderiam um dia tocar. Todos os seus sonhos acumulados e não realizados na área educacional eu agradeço por tê-los deixado para mim. Você não está presencialmente aqui, mas, eu ainda sinto a senhora por toda a parte.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a **Jesus** por todos os benefícios que tem me concedido durante minha vida. Agradeço também **ao meu mentor** que sempre estivera disposto a ajudar-me quando precisei de conselhos, fé, coragem e diligência.

Agradeço a minha **mãe Lucimara** por me dar todos os melhores dias da minha vida. Sua integridade, caráter e coragem são características que almejo diariamente conseguir. Desejo ser merecedora do esforço dedicado pela senhora a mim em todos os aspectos, especialmente quanto á minha criação e formação. Obrigada por sempre acreditar em mim. Obrigada novamente por tudo e por ser tudo! Se fosse me dada a oportunidade de nascer sua filha novamente eu escolheria essa opção. Eu te amo!

Agradeço aos meus **avós maternos Ana e Benedito** (*in memoriam*) ambas as partidas deixaram um sentimento de ausência e saudades que serão eternos. Não importa quanto tempo passe, a presença de vocês se mantém tão constante, eu deveria ter agradecido mais, ter abraçado mais, ter ouvido mais, argumentado menos, devia ter perguntado aos senhores como ser e como viver sem vocês. Mas hoje só me resta agradecer por poder ter convivido todos esses anos com o senhor e senhora. Porém, apesar de eu saber a verdade de alguma forma peculiar, eu sinto que senhores estão aqui agora. Muito obrigada por serem meus avós!

Agradeço também ao **Prof. Dr. Fernando Augusto Vasilceac** meu orientador, pelos importantes direcionamentos, ensinamentos e conselhos e amizade. Consegui encontrar minha motivação e interesse durante a graduação devido a nossa pesquisa. Sua orientação para mim passou de apenas conhecimento intelectual, técnico e profissional para conhecimentos que aplico na minha vida pessoal. Só tenho agradecimentos pela confiança, paciência e apoio a mim concedidos. Quando penso em todas as minhas boas memórias da graduação e mestrado elas sempre estão relacionadas ao senhor de alguma forma. Muito obrigada por me orientar por todos esses anos! Espero poder trabalharmos juntos novamente!

Agradeço também ao **Ms. Dr. Rafael Vanconcelos Valadares** e a sua empresa **rvanalítica** pelo apoio durante o processo estatístico e analítico deste trabalho.

Agradeço ao Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pela bolsa de mestrado concedida.

“Lança o barco contra o mar  
Venha o vento que houver  
E se virar, **nada**

Pega a mala que couber  
Vira a estrada sem saber  
E se perder, **calma**

Lança o barco contra o mar  
Venha o vento que houver  
E se puder, **voa**”

(O velho e o mar - Rubel)

## RESUMO

**Objetivo:** O objetivo do presente estudo é desenvolver, validar e tornar reprodutível regiões de interesse anatômicas padronizadas para densidade mineral óssea (DMO) e conteúdo mineral ósseo (CMO) de joelho de ratos em diferentes tempos da osteoartrite (OA) formulando um guia de recomendações técnicas para utilização do Absorciometria de raios X de dupla energia, (DXA). **Metodologia:** Foram utilizados 7 ratos machos da raça *winstar* divididos em 2 grupos intitulados Osteoartrite (OA) (n=6) e Teste (T) (N=1). O grupo OA grupo foi submetido a transeção do ligamento cruzado anterior para indução da OA na 14<sup>o</sup> semana. Os animais foram anestesiados e escaneados pelo DXA na 14<sup>o</sup>, 19<sup>o</sup> e 24<sup>o</sup> semanas. Posteriormente ao escaneamento todas as imagens dos animais foram analisadas utilizando o software no modo pequenos animais específico e de alta resolução (resolução: 311  $\mu\text{m}^2$ ) e foram confeccionadas regiões de interesse anatômicas nos ossos frequentemente associados a OA de joelho fêmur e tíbia as regiões de interesse foram intituladas Fêmur Distal e Tíbia Proximal. Em sequência, foi desenvolvido, validado e tornado reprodutível o guia de recomendações técnicas com normatizações e padronizações das técnicas para utilização do DXA contendo orientações específicas para o pré e pós teste e confecção de regiões de interesse. Os avaliadores foram divididos em dois grupos com 2 integrantes cada um os avaliadores foram classificados em experientes e inexperientes. Foram realizados treinamentos para realização do posicionamento do animal e seleção de regiões de interesse para os avaliadores experientes e inexperientes. Os avaliadores realizaram as atividades propostas seguindo o novo guia de recomendação confeccionados sem nenhuma interferência da pesquisadora utilizando o rato do grupo T. **Resultados:** As validações das regiões de interesse em conjunto da formulação das recomendações técnicas formularam uma base válida e confiável para avaliar a DMO e CMO em diferentes tempos de OA de joelho. **Conclusão:** Os usos das regiões de interesse validadas e do guia de recomendações tornam análises objetivas e menos tendenciosa aumentando a eficiência nas padronizações de pesquisas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Osteoartrite, Absorciometria de raios X de dupla energia, região de interesse, validação



## ABSTRACT

**Objective:** The aim of the present study is to develop, validate and make reproducible standardized anatomical regions of interest for bone mineral density (BMD) and bone mineral content (BMO) of rat knee at different times of osteoarthritis (OA) by formulating a guide to recommendations techniques for using dual energy X-ray absorptiometry (DXA). **Methodology:** 7 male winstar rats were used, divided into 2 groups entitled Osteoarthritis (OA) (n=6) and Test (T) (N=1). The OA group underwent transection of the anterior cruciate ligament for OA induction in the 14th week. The animals were anesthetized and scanned by DXA at the 14th, 19th and 24th weeks. After the scan, all images of the animals were analyzed using the software in specific and high-resolution small animal mode (resolution: 311  $\mu\text{m}^2$ ) and anatomical regions of interest were made in the bones often associated with OA of the knee, femur and tibia. they were named Distal Femur and Proximal Tibia. In sequence, the technical recommendations guide was developed, validated and made reproducible, with norms and standardizations of the techniques for using the DXA, containing specific guidelines for the pre and post-test and preparation of regions of interest. The evaluators were divided into two groups with 2 members each, the evaluators were classified as experienced and inexperienced. Training was carried out to perform the positioning of the animal and selection of regions of interest for experienced and inexperienced evaluators. The evaluators carried out the proposed activities following the new recommendation guide made without any interference from the researcher using the group T mouse. **Results:** The validations of the regions of interest together with the formulation of technical recommendations formulated a valid and reliable basis for evaluating the BMD and CMO at different times of knee OA. **Conclusion:** The uses of the validated regions of interest and the recommendations guide make analyzes objective and less biased, increasing the efficiency of research standardization.

**KEYWORDS:** Osteoarthritis, Dual energy X-ray absorptiometry, region of interest, validation

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Delineamento Experimental.

**Figura 2.** Delineamento Experimental para treinamento e avaliação final.

**Figura 3.** Gráfico de barras com média e intervalo de confiança para as variáveis Área (cm<sup>2</sup>), Conteúdo Mineral Ósseo (CMO, g) e Densidade Mineral Óssea (DMO, g/cm<sup>2</sup>) com medidas realizadas no DXA para a região Fêmur Distal Direito (FDD), Fêmur Distal Esquerdo (FDE).

**Figura 4.** Gráfico de barras com média e intervalo de confiança para as variáveis Área (cm<sup>2</sup>), Conteúdo Mineral Ósseo (CMO, g) e Densidade Mineral Óssea (DMO, g/cm<sup>2</sup>) com medidas realizadas no DXA para a região Fêmur Distal Direito (FDD) (as letras comparam medidas realizadas nos dois níveis de experiência pelo teste de *tukey* à  $p < 0,05$ ).

**Figura 5.** Gráfico de barras com média e intervalo de confiança para as variáveis Área (cm<sup>2</sup>), Conteúdo Mineral Ósseo (CMO, g) e Densidade Mineral Óssea (DMO, g/cm<sup>2</sup>) com medidas realizadas no DXA para a região Fêmur Distal Esquerdo (FDE) (as letras comparam medidas realizadas nos dois níveis de experiência pelo teste de *tukey* à  $p < 0,05$ ).

**Figura 6.** Gráfico de barras com média e intervalo de confiança para as variáveis Área (cm<sup>2</sup>), Conteúdo Mineral Ósseo (CMO, g) e Densidade Mineral Óssea (DMO, g/cm<sup>2</sup>) com medidas realizadas no DXA para a região Tíbia Proximal Direita (TPD) (as letras comparam medidas realizadas nos dois níveis de experiência pelo teste de *tukey* à  $p < 0,05$ ).

**Figura 7.** Gráfico de barras com média e intervalo de confiança para as variáveis Área (cm<sup>2</sup>), Conteúdo Mineral Ósseo (CMO, g) e Densidade Mineral Óssea (DMO, g/cm<sup>2</sup>) com medidas realizadas no DXA para a região Tíbia Proximal Esquerda (TPE) (as letras comparam medidas realizadas nos dois níveis de experiência pelo teste de *tukey* à  $p < 0,05$ ).

**Figura 8.** Confiabilidade intra e inter-observador de todas as avaliações realizadas .A barra de erro no entorno da média da correlação indica o LIC – Limite Inferior da Correlação; e o LSC – Limite Superior da Correlação, para o intervalo de confiança de 95 % dos resultados.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Medidas de tendência central (média) e de variabilidade/confiabilidade (desvio padrão, erro padrão da média, coeficiente de variação e intervalo de confiança) da área da região de interesse realizada com o DXA em três tempos.

**Tabela 2.** Medidas de tendência central (média) e de variabilidade/confiabilidade (desvio padrão, erro padrão, coeficiente de variação e intervalo de confiança) do conteúdo mineral ósseo (CMO, g) da região de interesse realizada com o DXA em três tempos.

**Tabela 3.** Medidas de tendência central (média) e de variabilidade/confiabilidade (desvio padrão, erro padrão, coeficiente de variação e intervalo de confiança) da densidade mineral óssea (DMO, g/cm<sup>2</sup>) da região de interesse realizada com o DXA em três tempos.

**Tabela 4.** Resumo da análise de variância das medidas realizada no DXA em função das regiões de interesse e nível de experiência.

**Tabela 5.** Medidas de tendência central (média) e de variabilidade/confiabilidade (desvio padrão, erro padrão, coeficiente de variação e intervalo de confiança) da variável área das diferentes regiões de interesse realizadas com o DXA por pessoas experientes e inexperientes.

**Tabela 6.** Medidas de tendência central (média) e de variabilidade/confiabilidade (desvio padrão, erro padrão, coeficiente de variação e intervalo de confiança) da variável conteúdo mineral ósseo (CMO, g) das diferentes regiões de interesse realizadas com o DXA por pessoas experientes e inexperientes.

**Tabela 7.** Medidas de tendência central (média) e de variabilidade/confiabilidade (desvio padrão, erro padrão, coeficiente de variação e intervalo de confiança) da variável densidade mineral óssea (DMO, g/cm<sup>2</sup>) das diferentes regiões de interesse realizadas com o DXA por pessoas experientes e inexperientes.

**Tabela 8.** Confiabilidade intra e inter-observador de todas as avaliações realizadas.

## PRINCIPAIS ABREVIATURAS

OA - Osteoartrite

DXA - Absorciometria de raios X de dupla energia

DMO - Densidade Mineral Óssea

CMO - Conteúdo Mineral Ósseo

FD - Fêmur Distal

TP - Tíbia Proximal

FDD - Fêmur distal direito

FDE - Fêmur distal esquerdo

TPD - Tíbia Proximal Direita

TPE - Tíbia Proximal Esquerda

TLCA - Transecção do ligamento cruzado anterior

UFSCar - Universidade Federal de São Carlos

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>16</b>
2.1 Objetivo Geral .....	16
2.2 Objetivo Especifico .....	16
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>17</b>
3.1 Validação de Métodos Alternativos .....	17
3.2 Animais.....	17
3.3 Grupos Experimentais .....	17
3.4 Modelo Animal de Osteoartrite .....	18
3.5 Avaliação no DXA .....	18
3.6 Desenho Experimental .....	18
3.7 Posicionamento do animal no DXA.....	19
3.8 Avaliação da densidade mineral óssea e conteúdo mineral ósseo.....	19
3.9 Definições de regiões de Interesse para análise de OA de joelho no DXA .....	20
3.10 Desenho experimental baseado na literatura.....	20
3.11 Geração de itens .....	21
3.12 Confeção do Guia .....	21
3.13 Treinamento para o posicionamento dos animais no DXA.....	21
3.14 Avaliação para a posição dos animais no DXA .....	22
3.15 Treinamento para as regiões anatômicas e as regiões de interesse .....	22
3.16 Avaliação das regiões de interesse .....	23
3.17 Eutanásia .....	23
3.18 Certificação da reprodutibilidade do guia.....	24
3.19 Análise Estatística.....	24
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>25</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>37</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>40</b>
<b>7. REFERENCIAS .....</b>	<b>41</b>
<b>8. APÊNDICES .....</b>	<b>44</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>45</b>

## 1.INTRODUÇÃO

Atualmente muito se discute sobre o papel do osso subcondral no início e progressão da Osteoartrite (OA). Segundo Jung et al (2018), na OA alterações no osso subcondral contribuem para a dispersão das forças mecânicas de carga na articulação, além disso, em sua pesquisa foram encontrados osteoclastos ativos durante o processo patológico da OA. No processo fisiopatológico da OA o osso subcondral sofre uma desregulação na homeostase entre osteoblastos e osteoclastos (BOUDENOT et al., 2014) o que resulta na diminuição da espessura na placa óssea subcondral e osso trabecular, mineralização da matriz óssea e diminuição da densidade mineral óssea (DMO) e conteúdo mineral ósseo (CMO) (BOTTER et al., 2011; ZHEN et al., 2013; KARSDAL et al., 2014).

Para compreender o comportamento do osso subcondral, as modalidades de imagem radiográfica não convencionais demonstram com precisão as alterações fisiopatológicas *in vivo* do osso subcondral, incluindo principalmente a *dual energy X-ray absorptiometry* (DXA) (BARR et al., 2015). O DXA tornou-se uma das melhores técnicas para avaliar a DMO e CMO *in vivo*, e pesquisas indicam o DXA como um equipamento rápido e eficaz para análise da DMO e CMO do joelho (SEPRIANO et al., 2015; MURPHY, BRESNIHAN, FITZGERALD, 2001). O DXA pode analisar a composição e espessura dos ossos com uma eximia precisão e exatidão (KARAHAN et al., 2002). Além disso, o software de análise DXA permite análises de regiões de interesse anatômicas relacionada a doença estudada (BOUDENOT et al., 2014).

No entanto, quando se trata de pequenos animais o DXA apresenta algumas falhas devido à falta de referência em relação ao crescimento do animal e falta de um método patronizado para posicionamento correto realizar as regiões de interesse anatômicas que dificultam a replicabilidade metodológica das pesquisas e validação das próprias (BOULDENOT 2014; KARAHAN et al., 2002). Além disso, não foram encontrados valores de referência para OA assim como, delineamento da área necessária ou formatos específicos para formulação de regiões de interesse anatômicas (BOULDENOT et al., 2014; KARAHAN et al., 2002; MURPHY; BRESNIHAN; FITZGERALD, 2001).

Há uma necessidade que dados de pesquisas sejam informativos e que apresentem replicabilidade e comparações, há uma crescente necessidade que esses dados possibilitem e melhorem a utilidade translacional de dados de modelos pré-clínicos e mesológicos (MALFAIT & LITTLE, 2015), facilitando a comunicação entre pesquisadores de todo o mundo.

Dessa forma, há uma necessidade de recomendações técnicas que formulem uma metodologia padronizada para utilização do DXA em pesquisas longitudinais em pequenos animais que inclua as principais lacunas encontradas na literatura como padronização do método de realização de regiões de interesse e posicionamento do animal. Isso proporcionará aos pesquisadores cometer menos erros durante seus períodos experimentais durante as pesquisas com o DXA o que facilitará a disseminação de dados científicos globais e a redução do número de animais utilizados em pesquisas semelhantes fornecendo pesquisas que sejam informativas possibilitando replicabilidade e comparações.

## **2. OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo Geral**

O objetivo do presente estudo é o de desenvolver, validar e tornar reprodutível um guia de recomendações técnicas para utilização do DXA para OA de joelho de ratos.

### **2.2 Objetivo Especifico**

Desenvolver e validar regiões de interesse anatômicas padronizadas para DMO e CMO de joelho de ratos em diferentes tempos da OA.



### **3. METODOLOGIA**

#### **FASE 1 – Padronização das regiões de interesse e posicionamento do animal**

##### **3.1 Validação de Métodos Alternativos**

Nosso projeto está em sintonia com as recomendações éticas da resolução normativa CONCEA nº 17.2014, pois segue o princípio apresentado no Art. 2º. Para os efeitos desta Resolução Normativa, considera-se: I – Método Alternativo: qualquer método que possa ser utilizado para substituir, reduzir ou refinar o uso de animais em atividades de pesquisa.

##### **3.2 Animais**

Seguindo nosso protocolo em nosso estudo foram utilizados 7 ratos machos *Wistar* (*rattus norvegicus*) livres de patógenos com peso inicial de (360±10g) e idade inicial de 12 semanas do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), que permaneceram agrupados em gaiolas plásticas (2 animais por gaiola), com livre acesso a água e ração. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Fisioterapia (UFSCar), com as condições ambientais controladas (luminosidade: ciclo de 12h (escuro/claro) em ciclo invertido há temperatura de 26°C e umidade de 40% (KARAHAN et al., 2002). O experimento foi conduzido de acordo com recomendações éticas internacionais (National Research Council, 1996) e o projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos e foi aprovado sob número: 1017090919 (ID 001342) (Anexo A).

##### **3.3 Grupos Experimentais**

Os animais foram divididos em 2 grupos intitulados Osteoartrite (OA) (n= 6) e Teste (T) (n= 1).

### **3.4 Modelo Animal de Osteoartrite**

O modelo animal de OA utilizado foi o da transecção do ligamento Cruzado Anterior (TLCA). Apenas o grupo OA foi submetido ao procedimento cirúrgico. A TLCA foi realizada bilateralmente com os animais sob anestesia (injeção intraperitoneal de solução de xylazina 8 mg/Kg/peso corporal e ketamina 60 mg/Kg/peso corporal), seguindo as recomendações éticas internacionais (National Research Council, 1996). Previamente a cirurgia, os joelhos dos animais foram tricotomizados e uma incisão de aproximadamente 1 cm na região medial do joelho foi realizada. Em seguida a patela foi deslocada medialmente e o joelho flexionado a fim de expor o LCA. Com tesoura oftálmica o LCA foi seccionado. Posteriormente, a patela foi recolocada e os tecidos suturados (GALOIS et al., 2004). Um teste de gaveta anterior positivo validou a transecção do TLCA, que foi realizada por dois pesquisadores com intuito de reduzir o viés de percepção individual.

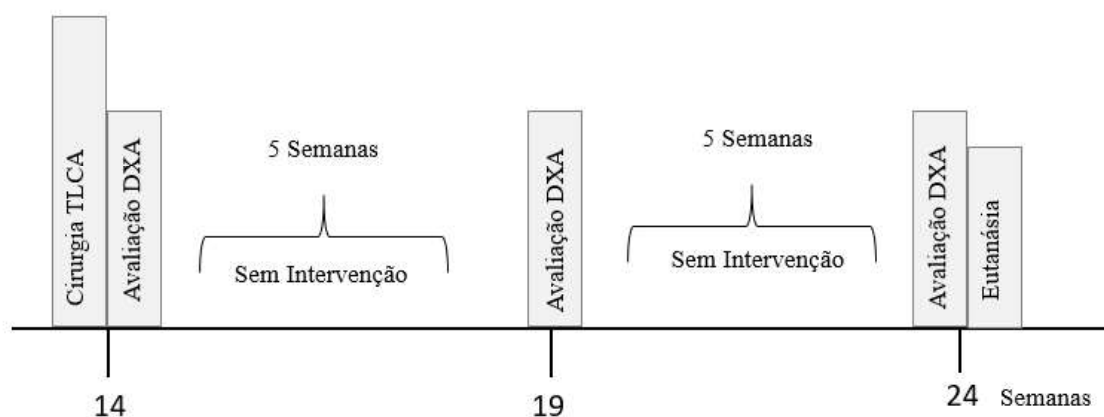
### **3.5 Avaliação no DXA**

Foi utilizado o equipamento de Densitometria Óssea Dual-Energy X-Rayabsorptiometry (DXA) da marca Hologic (Sistema de densitometria óssea de alta performance - modelo Discovery A - Bedford, MA, USA). Em todas as avaliações, os animais foram anestesiados (injeção intraperitoneal de solução de xylazina 8 mg/Kg/peso corporal e ketamina 60 mg/Kg/peso corporal), seguindo as recomendações éticas internacionais (National Research Council, 1996), para realizar o exame de densitometria óssea DXA na opção do escaneamento de corpo total para pequenos animais. Todas as imagens dos animais foram analisadas utilizando o software no modo de pequenos animais específico e de alta resolução (resolução: 311  $\mu\text{m}^2$ ) para mensurar a DMO e CMO da epífise do osso subcondral.

### **3.6 Desenho Experimental**

O grupo OA iniciou as análises com 14<sup>o</sup> semanas de idade onde foi realizado o DXA e em seguida realizado a TLC, após isso os grupos realizaram o escaneamento nas 19<sup>o</sup> e

24<sup>o</sup> semanas seguintes. Durante todo o processo experimental os animais não sofreram nenhuma intervenção, apenas ficaram livres nas gaiolas com livre acesso a água e ração Glüer et al (1995) (Figura 1).



**Figura 1.** *Delineamento Experimental.*

### 3.7 Posicionamento do animal no DXA

Os ratos foram posicionados em decúbito ventral na mesa nua seus membros anteriores foram alocados em decúbito palmar, os membros posteriores foram alocados lateralmente com os joelhos levemente flexionados enquanto os pés foram posicionados em decúbito plantar (KARAHAN et al., 2002 & BOUDENOT et al., 2014), O posicionamento foi estabilizado pelo uso de fita crepe nas patas inferiores, anteriores, cabeça e rabo.

### 3.8 Avaliação da densidade mineral óssea e conteúdo mineral ósseo

Foi realizado na opção do escaneamento de corpo total no modo de pequenos animais de alta resolução (resolução: 311  $\mu\text{m}^2$ ). O escaneamento de corpo total de cada animal foi realizado 3 vezes sem movimentação do animal na maca para posterior

confeção das medias como sugerido por (MURPHY et al., 2001; NAGY et al., 2001; HAWKINS et al., 2009) em pesquisas previas.

### **3.9 Definições de regiões de Interesse para análise de OA de joelho no DXA**

Posterior ao escaneamento de corpo total as imagens dos animais foram analisadas utilizando o software no modo de pequenos animais específico e de alta resolução (resolução: 311  $\mu\text{m}^2$ ). Esse procedimento foi realizado para selecionar regiões de interesse que abordem dois dos principais ossos atingidos pela OA de joelho fêmur e tibia 9 (BOUDENOT et al., 2014). As regiões de interesse foram intituladas Fêmur Distal (FD) e Tibia Proximal (TP) para o lado direito e esquerdo: Fêmur Distal Direito (FDD) e Fêmur Distal Esquerdo (FDE) e Tibia Proximal Direita (TPD) e Tibia Proximal Esquerda (TPE)

Descrição da mensuração das regiões de interesse:

TP: Um quadrado foi desenhado manualmente. Dois lados devem ser desenhados acima dos planaltos tibiais com o topo localizado nas espinhas intercondilares. Dois outros lados foram desenhados ao redor do osso trabecular subcondral localizados perto cabeça da fíbula. A área média deve ser de 32,9 (31.4, 34.4)  $\text{mm}^2$ .

FD: Um segundo quadrado foi desenhado manualmente. Dois lados estarão acima dos côndilos femorais e um terceiro lado separará os côndilos femorais da patela. A linha mais próxima produziu uma linha reta em continuidade ao côndilo posterior e a última linha. A área média deve ser (32,5, 35.7)  $\text{mm}^2$ .

## **FASE 2: CONFEÇÃO DO GUIA DE RECOMENDAÇÕES TÉCNICAS**

### **3.10 Desenho experimental baseado na literatura**

A confeção do guia foi baseada na metodologia padrão de dois estudos, um de validação de uma nova classificação para degeneração de discos intervertebrais (RUTGES et al., 2013) e outro também de validação, porém, de pontuação ultrassonográfico para OA de joelho (RIECKE et al., 2014).

### **3.11 Geração de itens**

Para aumentar a qualidade do guia de recomendações, foi utilizado sistema de classificação de PRITZKER et al., 2006. Que aborda os seguintes princípios: simplicidade, utilidade, escalabilidade, extensão e comparabilidade. Simplicidade diz respeito ao guia ser simples e reprodutível, ser capaz de ser aplicado facilmente por pesquisadores com níveis variados de experiência. Utilidade, o guia deverá ser útil para avaliação experimental da OA. A escalabilidade, o guia deverá ser escalável e apresentar fases e etapas que facilitem a sua interpretação. Extensibilidade, o guia deverá ser capaz de abranger e acomodar as necessidades de pesquisadores de diversos níveis e ser passível de inserção de novos componentes quando reaplicável. Comparabilidade o guia deve ser capaz de ser harmônico e relacionado eventualmente com sistemas de avaliação similares.

### **3.12 Confeção do Guia**

Em seguida, com base na literatura, testes e pilotos prévios, experiência do grupo de pesquisa e reuniões do nosso grupo de pesquisa, um novo guia de recomendações técnicas foi desenvolvido. Foi confeccionado o guia de recomendações que possibilite a padronização e replicabilidade de dados em pesquisas que envolvam a utilização do DXA com ratos com recomendações mais abrangentes como: posicionamento correto do animal, forma correta de realizar o escaneamento evitando erros, peso mínimo indicado pelo aparelho, idade mínima do animal, anestésicos apropriados para pesquisas longitudinais e recomendações específicas para ratos com OA do joelho como melhores maneiras de padronizar e realizar a regiões de interesse com base nos principais ossos atingidos pela doença ( Apêndice C).

### **3.13 Treinamento para o posicionamento dos animais no DXA**

Nesta etapa quatro avaliadores independentes, sendo dois avaliadores experientes (possuem experiência com o DXA) e dois avaliadores inexperientes (não possuem experiência com o DXA) realizaram o treinamento com intuito de evitar a subjetividade

de cada avaliação individual, e assim padronizá-la para todos os avaliadores, desde os inexperientes até o pesquisador experiente.

Foram realizados dois encontros, com intervalo de uma semana e com a participação de todos os avaliadores. No primeiro momento os avaliadores foram treinados por meio de uma apresentação onde foi exemplificado o que é o DXA e várias radiografias aleatórias foram apresentadas aos avaliadores com diferentes posicionamentos de ratos no DXA, e assim, os avaliadores as classificaram como posições corretas ou incorretas sem nenhuma explicação quanto as características necessárias para o posicionamento correto. Posteriormente, foi apresentado aos avaliadores as imagens que apresentavam posicionamento correto e depois, foi indicado o que estava incorreto nas imagens. Em conjunto com os avaliadores foram formulados cinco parâmetros essenciais para o escaneamento correto (Apêndice A)

No segundo momento, foi repetido esse treinamento sobre o posicionamento correto do animal utilizando o DXA e os avaliadores posicionaram o animal e realizaram o escaneamento.

### **3. 14 Avaliação para a posição dos animais no DXA**

Após um mês do treinamento, quatro avaliadores os mesmos que realizaram o treinamento descrito anteriormente, sem nenhuma explicação utilizarão o guia de recomendações técnicas para OA de joelho de ratos confeccionado no estudo para posicionar o animal, realizando o escaneamento 3 vezes seguidas sem movimentação do animal no DXA (Apêndice C).

### **3.15 Treinamento para as regiões anatômicas e as regiões de interesse**

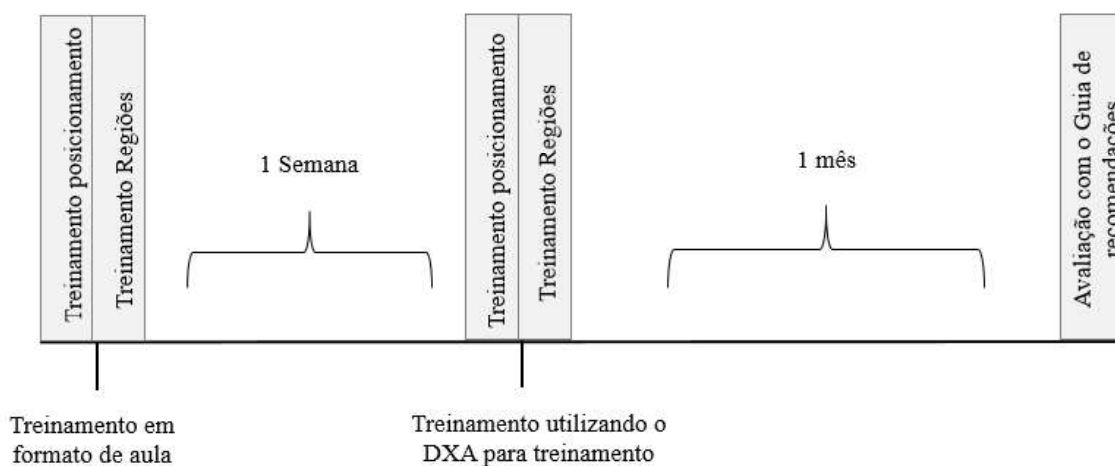
Nesta etapa os quatro observadores da etapa anterior realizaram o treinamento. No primeiro momento os avaliadores foram treinados quanto às referências anatômicas tendo como base fêmur e tíbia. Inicialmente os avaliadores identificaram com base em imagens onde o fêmur e tíbia estão localizados no copo humano. Posterior a isso, cinco ossos semelhantes foram mostrados e os avaliadores classificaram qual na opinião deles era o fêmur e a tíbia.

No segundo momento, foi realizada uma apresentação utilizando o *software 3D Rat Anatomy v1.30b* que auxiliou na explicação sobre identificação dos ossos que devem ser identificados para confecção das regiões anatômicas envolvidas na OA do joelho.

No segundo momento, uma semana depois foi demonstrado como confeccionar e reproduzir regiões de interesse no software no modo de pequenos animais específico e de alta resolução (resolução:  $311 \mu\text{m}^2$ ) do DXA. Os avaliadores foram e auxiliados orientados a confeccionarem três formas geométricas distintas e posteriormente foi apresentado as formas das regiões de interesse corretas e os avaliadores confeccionaram. Cada região de interesse deveria ser realizada cinco vezes por cada avaliador (Apêndice B).

### 3.16 Avaliação das regiões de interesse

Após um mês do treinamento os quatro avaliadores, os mesmos que realizaram o treinamento, sem nenhuma explicação utilizaram o guia de recomendações técnicas para OA de joelho de ratos confeccionado no estudo para a seleção das regiões de interesse (Apêndice C).



**Figura 2.** Delineamento Experimental para treinamento e avaliação final.

### 3.17 Eutanásia

Ao final do experimento todos os animais foram submetidos a eutanásia seguindo as recomendações presentes nas diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA. O método

físico utilizado foi decapitação. Anterior a realização da eutanásia os animais foram anestesiados (injeção intraperitoneal de solução de xylazina 8 mg/Kg/peso corporal e ketamina 60 mg/Kg/peso corporal), seguindo as recomendações éticas internacionais (National Research Council, 1996).

### **3.18 Certificação da reprodutibilidade do guia**

Para assegurar a reprodutibilidade do guia foi utilizado as análises estatísticas propostas por Glüer et al (1995) no artigo ``*Accurate assessment of precision errors: how to measure the reproducibility of bone densitometry techniques*`` que tem como intuito a diminuição dos erros em análises de DMO E CMO no instrumento. O artigo sugere a utilização de avaliação de precisão, coeficiente de variação e confiabilidade.

### **3.19 Análise Estatística**

Os dados da fase 1 foram analisados no software R (*R Core Team*, 2021), sendo realizados os seguintes procedimentos: pré-processamento, manipulação, análise e produção de gráficos. Foram estudados os padrões existentes nos dados por meio do cálculo das variáveis estatísticas: média, desvio padrão, intervalo de confiança e coeficiente de variação utilizando o pacote “Rmisc” (HOPE, 2013). Os efeitos gerais dos fatores regiões e tempo analisados pelo DXA foram estudados pela análise de variância (ANOVA) das variáveis área, CMO e DMO utilizando-se o pacote estatístico “ExpDes” (FERREIRA et al., 2021), considerando os fatores e interações significativos à  $p < 0,05$  pelo teste de F.

Os dados da fase 2 foram estudados os padrões existentes nos dados por meio do cálculo das variáveis estatísticas: média, desvio padrão, intervalo de confiança e coeficiente de variação utilizando o pacote “Rmisc” (HOPE, 2013). Os efeitos gerais dos fatores regiões, tempo e nível de experiência nas propriedades avaliadas pelo DXA foram estudados pela análise de variância (ANOVA) das variáveis área, conteúdo mineral ósseo (CMO) e densidade mineral óssea (DMO) utilizando-se o pacote estatístico “ExpDes” (FERREIRA et al., 2021), considerando os fatores e interações significativos à  $p < 0,05$  pelo teste de F.



A confiabilidade intra e inter-observador foi avaliada pelo cálculo do Coeficiente de Correlação Intraclassa (CCI) para a avaliação de dois tipos de confiabilidade: inter e intra-observadores, assim como os valores do limite inferior e superior do intervalo de confiança a 95 % de probabilidade. Foi utilizado o teste paramétrico de Pearson para os resultados das medições de área, conteúdo mineral ósseo e densidade mineral óssea realizadas por indivíduos treinados e não-treinados segundo o protocolo de análise do DXA. Por fim, os dados foram compilados em tabelas e gráficos confeccionados utilizando-se o pacote “ggplot2” em alta resolução (dpi = 600) (Wickham et al., 2020).

#### **4. RESULTADOS**

Os resultados indicados nas tabelas 1, 2 e 3 indicam um resumo da análise de variância conforme as semanas estudadas em composição aos fatores conhecidos como região e tempo e fatores desconhecidos residuais (erro experimental). Podemos compreender que em relação ao as regiões de interesse anatômicas apresentam valores de área, CMO e DMO diferentes em relação ao tempo analisando do estudo ( $p < 0,05$ ) demonstrando valores de variabilidade dos dados.

Considerando o proposto por Glüer et al., 1995 & PIMENTEL-GOMES, 2009 as melhores variáveis são as que apresentam índice de variação entre 1 e 10%. Para variável área as regiões de interesse que apresentaram menores valores foi a variável TPE (5,86 e 7, 50%) (Tabela 1).

**Tabela. 1.** Medidas de tendência central (média) e de variabilidade/confiabilidade (desvio padrão, erro padrão da média, coeficiente de variação e intervalo de confiança) da área da região de interesse realizada com o DXA em três tempos.

Região	Tempo	Área média	Des. Pad.	Erro padrão da média	Intervalo de confiança (95 %)	Coeficiente de variação
	(semanas)	-----( $\text{cm}^2$ )-----				(%)
TPE	14	1,9	0,11	0,04	0,11	5,86
	19	1,8	0,33	0,14	0,35	18,62
	24	1,7	0,13	0,05	0,13	7,50
TPD	14	1,8	0,21	0,09	0,22	11,48
	19	1,9	0,33	0,14	0,35	17,79
	24	1,6	0,21	0,09	0,22	12,93
FDE	14	1,7	0,19	0,08	0,20	11,51
	19	1,6	0,22	0,09	0,23	13,74
	24	1,4	0,35	0,14	0,37	26,26
FDD	14	2,0	0,39	0,16	0,41	19,91
	19	1,6	0,26	0,11	0,28	17,05
	24	1,5	0,48	0,19	0,50	30,94

Em relação as medidas da variabilidade CMO o menor valor foi o TPE (4,78 e 8,17%), (Tabela 2). Além disso, o nosso protocolo de avaliação do DXA desencadeou uma diminuição da DMO e CMO no intervalo de 14, 19 e 24 semanas onde os resultados da DMO e CMO apresentaram resultados decrescentes com o passar das semanas em nosso modelo animal de OA (Tabelas 1,2 e 3).

**Tabela. 2.** Medidas de tendência central (média) e de variabilidade/confiabilidade (desvio padrão, erro padrão, coeficiente de variação e intervalo de confiança) do conteúdo mineral ósseo (CMO, g) da região de interesse realizada com o DXA em três tempos.

Região	Tempo	CMO médio	Des. Pad.	Erro padrão da média	Intervalor confiança (95 %)	de Coeficiente de variação	de	
	(semanas)	----- (g) -----				(%)		
TPE	14	0,4	0,02	0,01	0,02	4,78		
	19	0,3	0,05	0,02	0,05	14,99		
	24	0,3	0,02	0,01	0,02	8,17		
TPD	14	0,4	0,06	0,02	0,06	16,44		
	19	0,3	0,10	0,04	0,10	30,43		
	24	0,3	0,04	0,02	0,04	14,61		
FDE	14	0,2	0,03	0,01	0,03	14,63		
	19	0,2	0,02	0,01	0,02	12,90		
	24	0,1	0,07	0,03	0,07	54,27		
FDD	14	0,3	0,06	0,02	0,06	22,03		
	19	0,2	0,04	0,01	0,04	19,08		
	24	0,2	0,06	0,02	0,06	33,28		

Já em relação ao coeficiente de variação a DMO apresentou bons resultados em todas as variáveis estudadas em ordem crescente os melhores resultados foram TPE (4,73%), FDE (4,75%), TPE (7,31%), FDD (9,07%) e novamente TPE com (9,11%) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Medidas de tendência central (média) e de variabilidade/confiabilidade (desvio padrão, erro padrão, coeficiente de variação e intervalo de confiança) da densidade mineral óssea (DMO, g/cm<sup>2</sup>) da região de interesse realizada com o DXA em três tempos

Região	Tempo	DMO médio	Des. Pad.	Erro padrão da média	Intervalor de confiança (95 %)	Coeficiente de variação
	(semanas)	----- (g/cm <sup>2</sup> )-----				(%)
TPE	14	0,2	0,01	0,01	0,02	7,31
	19	0,2	0,02	0,01	0,02	10,57
	24	0,2	0,01	0,01	0,02	9,11
TPD	14	0,2	0,03	0,01	0,03	14,65
	19	0,2	0,04	0,02	0,04	22,64
	24	0,2	0,01	0,00	0,01	4,72
FDE	14	0,1	0,01	0,01	0,01	10,95
	19	0,1	0,01	0,00	0,01	4,75
	24	0,1	0,01	0,00	0,01	10,40
FDD	14	0,1	0,03	0,01	0,03	22,77
	19	0,1	0,03	0,01	0,03	20,92
	24	0,1	0,01	0,00	0,01	9,07

Na tabela 4 é possível verificar a análise do efeito da região e o fator experiência com as variáveis utilizadas nesse estudo área, DMO e CMO podemos observar que a apenas na CMO houve interseção entre região e experiência ou seja, o avaliador experiente e inexperientes apresentaram comportamentos distintos. Em contraposição nas análises na área e DMO os demais itens os avaliadores inexperientes e experientes apresentaram efeitos isolados da região e experiência.

**Tabela 4.** Resumo da análise de variância das medidas realizada no DXA em função das regiões de interesse e nível de experiência

Fonte de variação	A	CMO	DMO
	cm <sup>2</sup>	g	g/cm <sup>2</sup>
Região	p<0,01	p<0,01	p<0,01
Experiência	p<0,01	p<0,01	p<0,01
Região*Experiência	ns	p<0,05	ns

<sup>1</sup>indica significância a p <0.01, 0.05 e 0.10 pelo teste F. “ns” indica que a causa de variação é, no geral, não significativa.

Com relação as regiões de interesse da variável área e o item coeficiente de variação temos que as regiões de interesse que apresentaram menores variabilidade, ou seja, maior confiabilidade para os avaliadores experientes foram FDD (3,64%) e TPE (5,95%) e para os avaliadores inexperientes TPE (1,93%) e FDE (5,92%). No entanto, o coeficiente de variação no geral apresentou muita variabilidade tanto para os experientes quanto para inexperientes (Tabela 5).

**Tabela 5.** Medidas de tendência central (média) e de variabilidade/confiabilidade (desvio padrão, erro padrão, coeficiente de variação e intervalo de confiança) da variável área das diferentes regiões de interesse realizadas com o DXA por pessoas experientes e inexperientes

Região	Experiência	Área média	Des. Pad.	Erro padrão da média	Intervalo de confiança (95 %)	Coeficiente de variação
		----- (cm <sup>2</sup> ) -----				(%)
FDD	Não	0,80	0,15	0,07	0,24	18,42
	Sim	0,98	0,04	0,02	0,06	3,64
FDE	Não	0,79	0,13	0,06	0,20	16,17
	Sim	1,20	0,41	0,20	0,65	33,95
TPD	Não	0,85	0,04	0,02	0,06	4,33
	Sim	1,21	0,32	0,16	0,51	26,47
TPE	Não	0,76	0,01	0,01	0,02	1,93
	Sim	1,10	0,06	0,03	0,10	5,92

Nos resultados da média global obtivemos na variável CMO um resultado interessante já que os resultados dos avaliadores demonstravam que os inexperientes explicitaram que os resultados das regiões de interesse eram muito heterogêneos para todas as regiões de interesse. Em contraposição os avaliadores experientes demonstraram que os resultados foram homogêneos para todas as regiões. Contudo, novamente, os inexperientes apresentaram menores valores comparados aos experientes. Já considerando as regiões de interesse em relação a confiabilidade temos que as regiões que apresentaram melhores confiabilidade para os avaliadores experientes foram FDD (6,52%) para os avaliadores inexperientes FDE (8,56%) (Tabela 6)

**Tabela 6.** Medidas de tendência central (média) e de variabilidade/confiabilidade (desvio padrão, erro padrão, coeficiente de variação e intervalo de confiança) do variável conteúdo mineral ósseo (CMO, g) das diferentes regiões de interesse realizadas com o DXA por pessoas experientes e inexperientes

Região	Experiência	CMO médio	Des. Pad.	Erro padrão da média	Intervalo de confiança (95 %)	Coeficiente de variação
				(g)		
				-----	-----	(%)
FDD	Não	0,10	0,01	0,01	0,02	11,51
	Sim	0,16	0,01	0,01	0,02	6,52
FDE	Não	0,11	0,01	0,00	0,01	8,56
	Sim	0,16	0,03	0,02	0,05	19,46
TPD	Não	0,14	0,01	0,01	0,02	10,55
	Sim	0,19	0,04	0,02	0,07	22,86
TPE	Não	0,13	0,00	0,00	0,00	0,22
	Sim	0,20	0,02	0,01	0,03	10,14

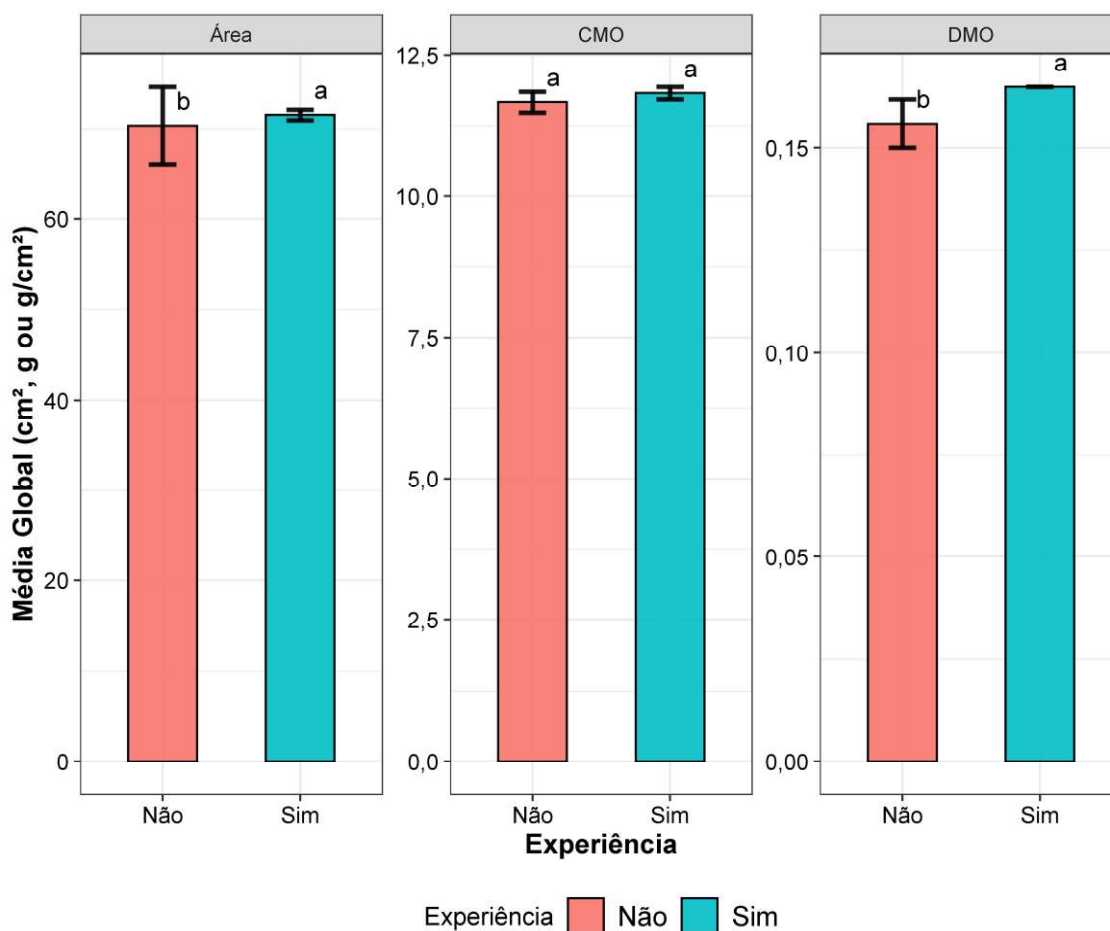
Tendo em vista a variável DMO região que apresentou melhores resultados de confiabilidade para avaliadores experientes foram FDE (4,19%) e TPE (4,21%) e para avaliadores inexperientes foram TPE (2,90%) e TPD (6,25%) (Tabela 7).

**Tabela 7.** Medidas de tendência central (média) e de variabilidade/confiabilidade (desvio padrão, erro padrão, coeficiente de variação e intervalo de confiança) da variável densidade mineral óssea (DMO, g/cm<sup>2</sup>) das diferentes regiões de interesse realizadas com o DXA por pessoas experientes e inexperientes

Região	Experiência	DMO Média	Des. Pad.	Erro padrão da média	Intervalo de confiança (95 %)	Coeficiente de variação
				(g/cm <sup>2</sup> )		
				-----	-----	(%)
FDD	Não	0,12	0,00	0,00	0,00	0,54
	Sim	0,16	0,02	0,01	0,03	11,82
FDE	Não	0,15	0,03	0,02	0,05	20,69
	Sim	0,15	0,01	0,00	0,01	4,19
TPD	Não	0,17	0,01	0,01	0,02	6,25
	Sim	0,17	0,02	0,01	0,03	11,01
TPE	Não	0,18	0,01	0,00	0,01	2,90
	Sim	0,19	0,01	0,00	0,01	4,21

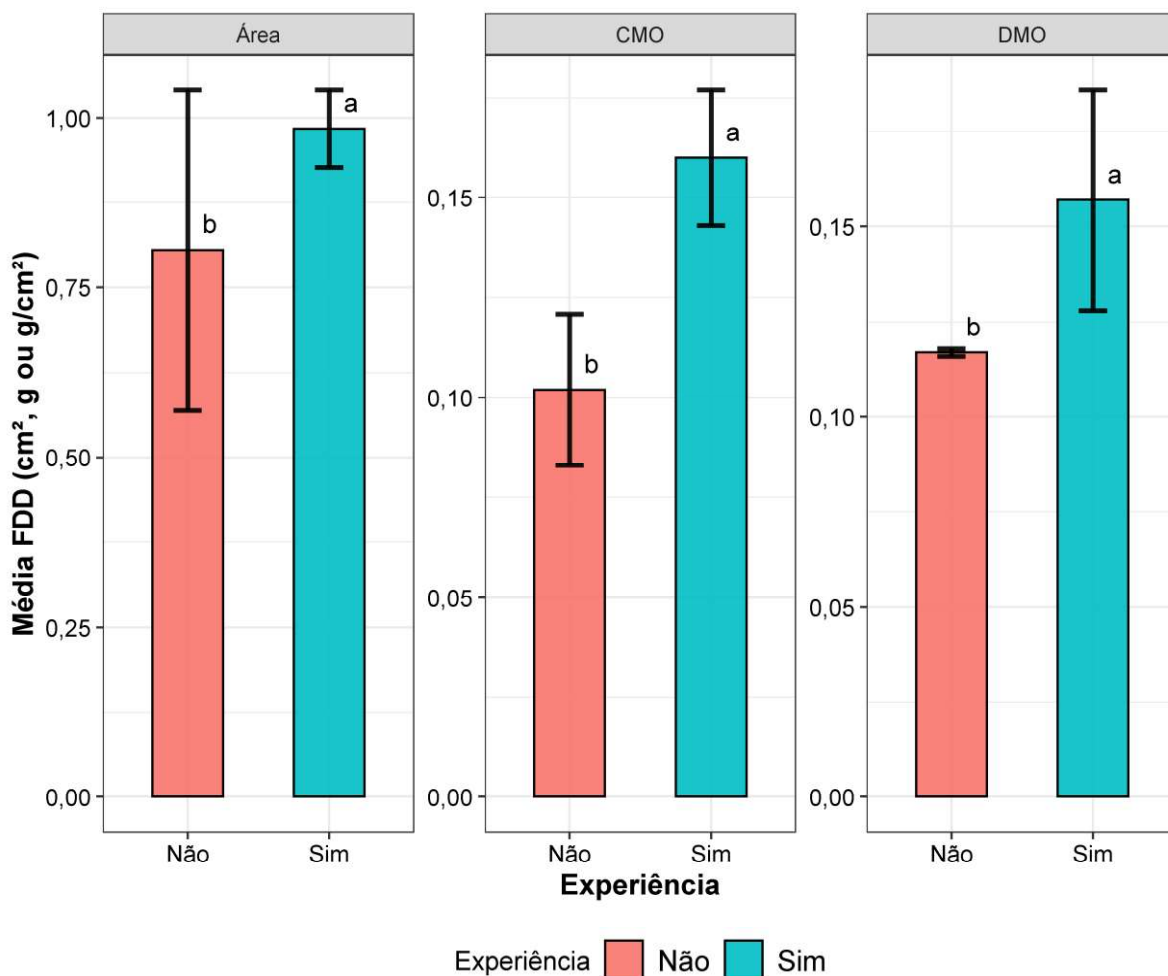
As figuras de 3 a 7 apresentam um resumo das médias conforme as regiões de interesse estudadas em relação aos avaliadores experientes e inexperientes. Demonstrando de forma visual e intuitiva o desempenho dos avaliadores experientes ou inexperientes em determinadas variáveis.

No item área nós não obtivemos diferença estatística entre as áreas das regiões estudadas, porém, houve uma tendência estatística relevante nos resultados em relação a experiência e não experiência dos avaliadores onde os avaliadores experientes apresentaram valores maiores de média e os inexperientes independente das regiões apresentaram menores valores menores o que indicando que o fator experiência é relevante e influenciou nos resultados. No entanto, o intervalo de confiança apresentou resultados semelhantes tanto para os experientes quanto para experientes na variável área (Figura 3).



**Figura 3.** Gráfico de barras com média e intervalo de confiança para as variáveis Área (cm<sup>2</sup>), Conteúdo Mineral Ósseo (CMO, g) e Densidade Mineral Óssea (DMO, g/cm<sup>2</sup>) com medidas realizadas no DXA para a região Global (tamanho total da imagem) (as letras comparam medidas realizadas nos dois níveis de experiência pelo teste de tukey à  $p < 0,05$ ).

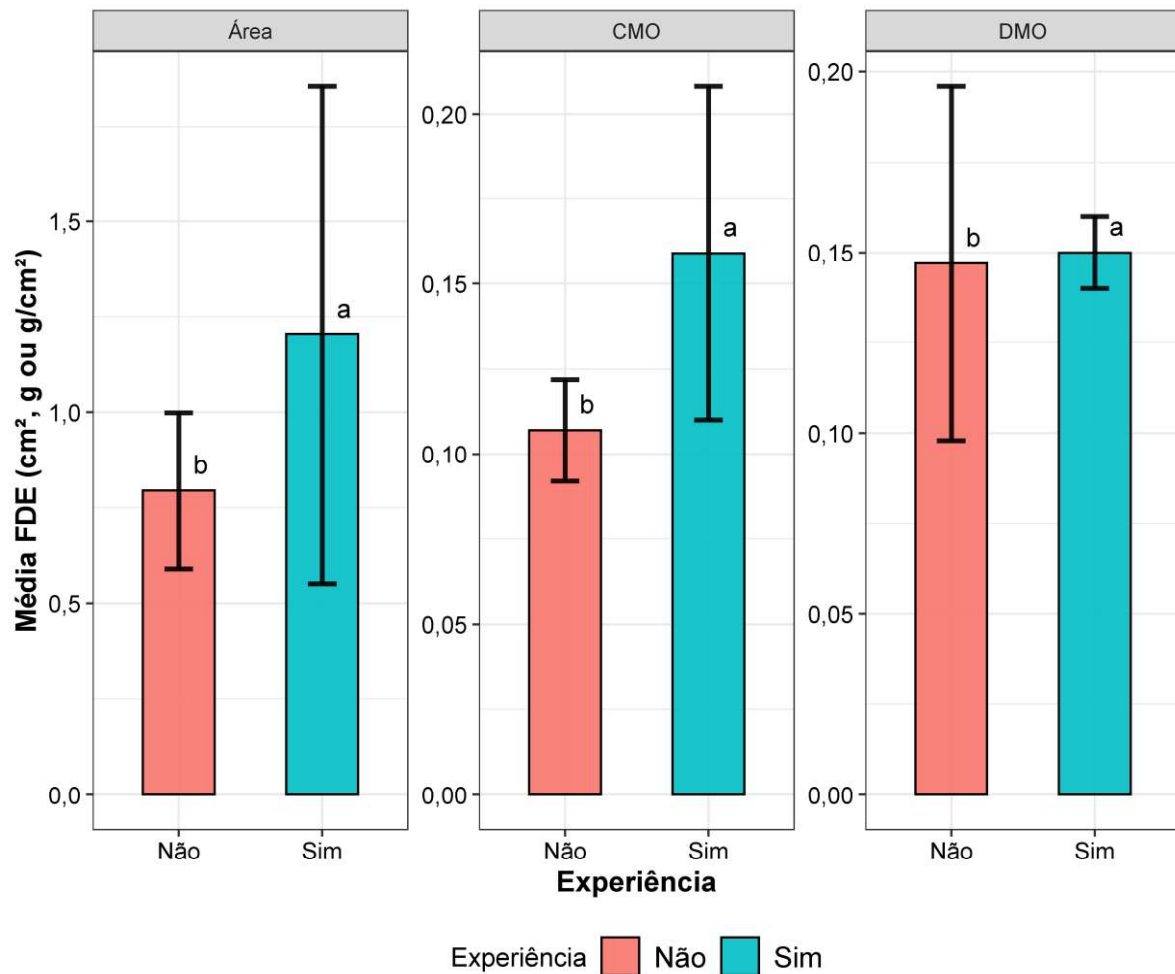
Com a média global do FDD demonstrada graficamente na (Figura 4) observamos que em todas as variáveis estudadas em relação as regiões de interesse houve uma propensão de os avaliadores experientes mostrarem maiores resultados de média global. Ademais, em relação ao intervalo de confiança as variáveis apresentaram resultados muito variáveis.



**Figura 4.** Gráfico de barras com média e intervalo de confiança para as variáveis Área (cm<sup>2</sup>), Conteúdo Mineral Ósseo (CMO, g) e Densidade Mineral Óssea (DMO, g/cm<sup>2</sup>) com medidas realizadas no DXA para a região Fêmur Distal Direito (FDD) (as letras comparam medidas realizadas nos dois níveis de experiência pelo teste de tukey à p<0,05)

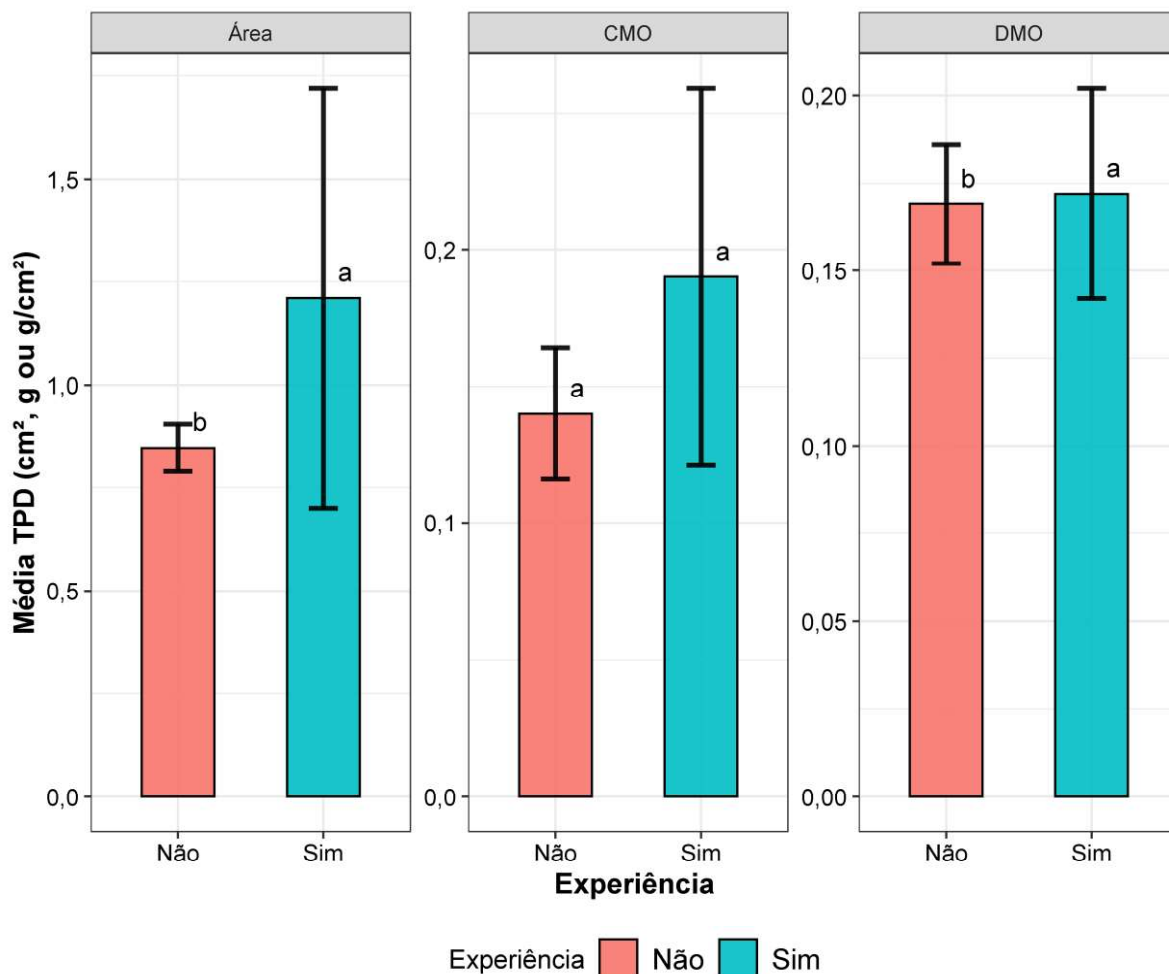
Iniciamos no gráfico 5 com a possibilidade de observar a tendência de os avaliadores experientes mostrarem maiores valores de resultados de média global. Podemos observar também que para a variável FDE o intervalo de confiança para os experientes apresentou resultados novamente variáveis.





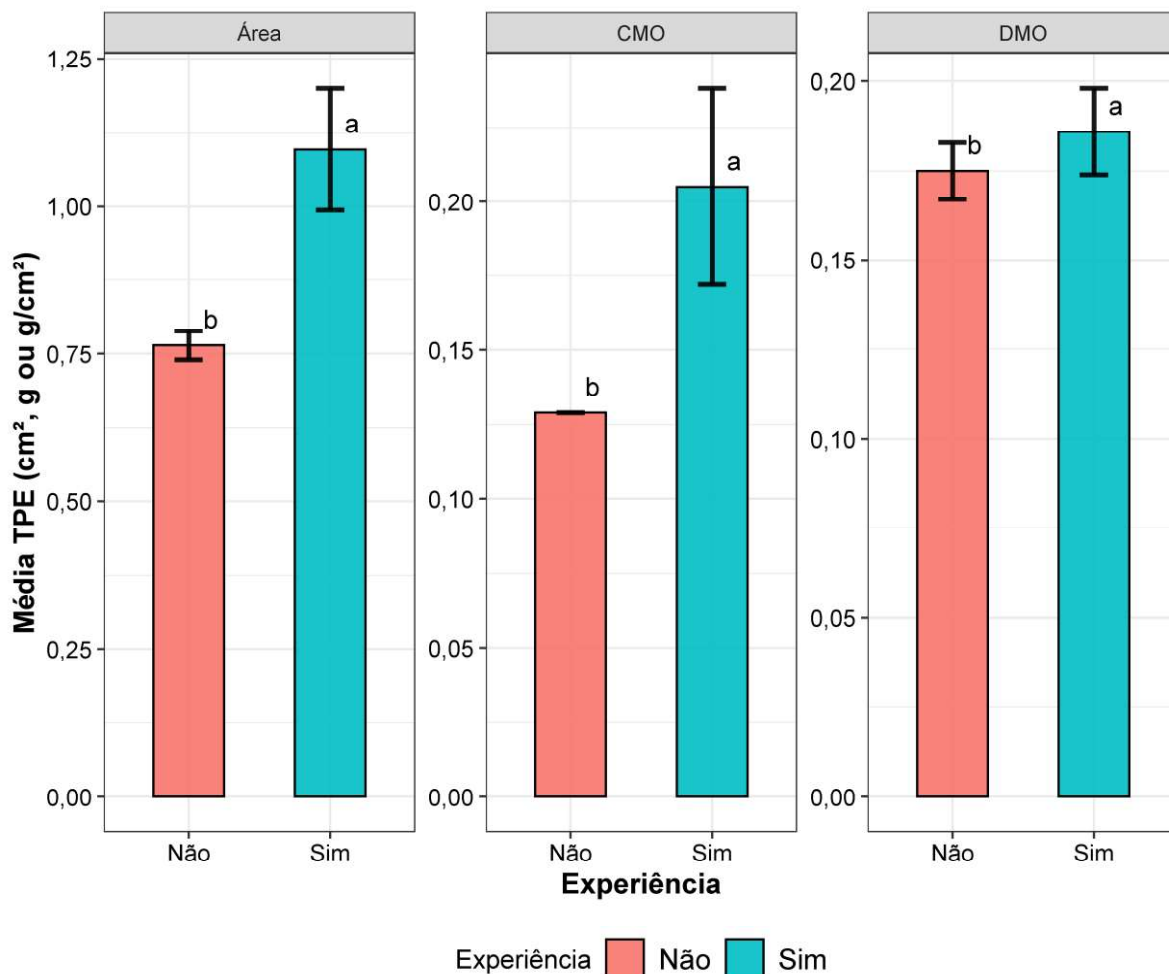
**Figura 5.** Gráfico de barras com média e intervalo de confiança para as variáveis Área (cm<sup>2</sup>), Conteúdo Mineral Ósseo (CMO, g) e Densidade Mineral Óssea (DMO, g/cm<sup>2</sup>) com medidas realizadas no DXA para a região Fêmur Distal Esquerdo (FDE) (as letras comparam medidas realizadas nos dois níveis de experiência pelo teste de tukey à  $p < 0,05$ )

Com as figuras 6 e 7 observamos novamente a predisposição de os avaliadores experientes mostrarem maiores resultados de média global o que implica que os resultados dos avaliadores experientes foram estatisticamente melhores em comparação aos avaliadores inexperientes ilustrando novamente que a experiência é um fator de implica nos resultados.



**Figura 6.** Gráfico de barras com média e intervalo de confiança para as variáveis Área (cm<sup>2</sup>), Conteúdo Mineral Ósseo (CMO, g) e Densidade Mineral Óssea (DMO, g/cm<sup>2</sup>) com medidas realizadas no DXA para a região Tibia Proximal Direita (TPD) (as letras comparam medidas realizadas nos dois níveis de experiência pelo teste de tukey à  $p < 0,05$ )

Podemos observar também que para as variáveis FPD e FDE a intervalo de confiança para os experientes apresentou resultados maiores comparados aos experientes em todas as variáveis, apontando uma maior imprecisão isso pode indicar que novamente que o fator possuir experiência implica resultados (Figura 6 e 7)



**Figura 7.** Gráfico de barras com média e intervalo de confiança para as variáveis Área ( $\text{cm}^2$ ), Conteúdo Mineral Ósseo (CMO, g) e Densidade Mineral Óssea (DMO,  $\text{g}/\text{cm}^2$ ) com medidas realizadas no DXA para a região Tíbia Proximal Esquerda (TPE) (as letra comparam medidas realizadas nos dois níveis de experiência pelo teste de tukey à  $p < 0,05$ )

Como a da média global dos experientes apresentou uma tendência sempre a médias maiores isso demonstra que a experiência é um fator relevante. Porém, os resultados do intervalo de confiança apresentam resultados bastantes variáveis para ambos experientes e inexperientes. Ademais, os resultados de confiabilidade em algumas regiões de interesse para os avaliadores inexperientes foram muito divergentes (FDE: área: 33,95; TPD: DMO 20, 69; FDD: DMO 11,82; TPE CMO 10,14  $p < 0,05$  (Tabelas 2, 3 e 4)) essas características implicam há espaço para melhoria do estudo que poderá ser aprimorada. .

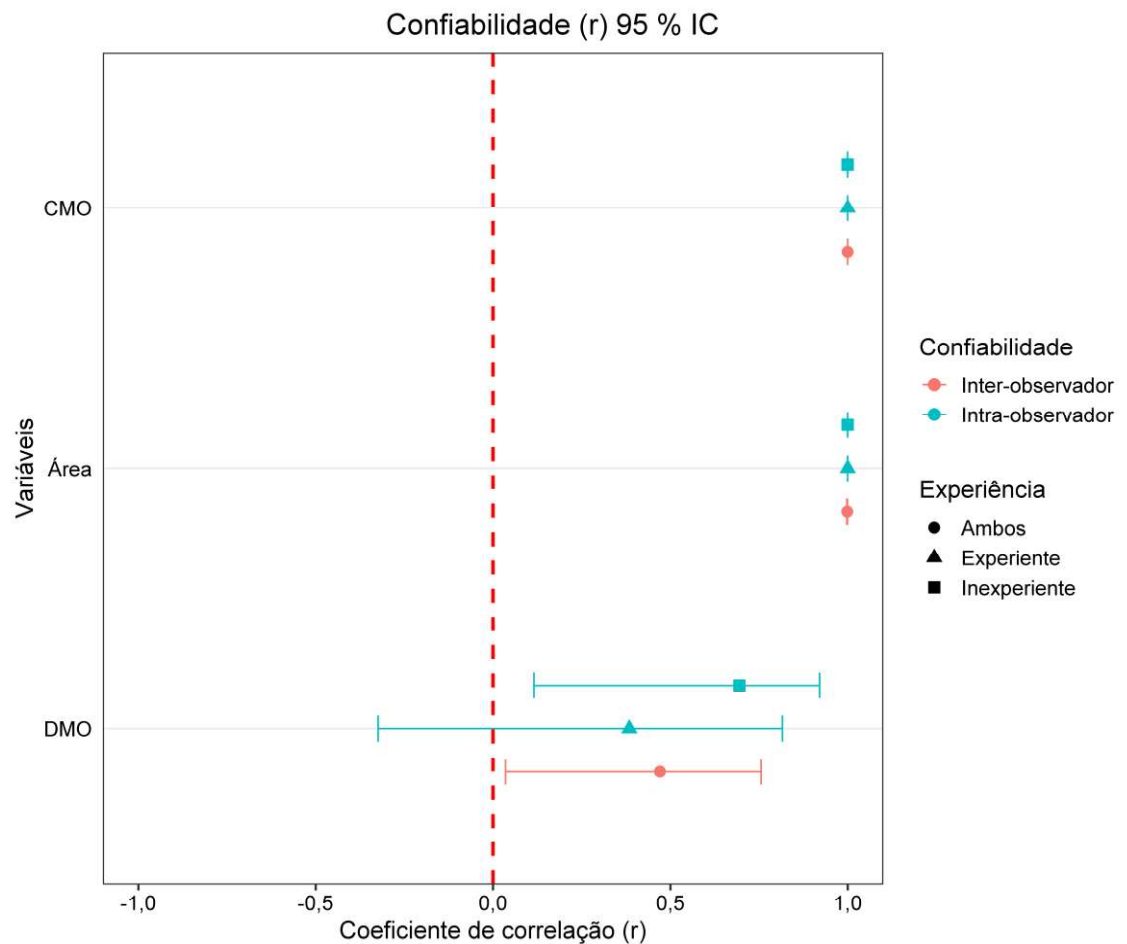
Houve alta correlação para ambas as avaliações realizadas pelos dois observadores em relação as áreas de interesse estudadas pelo índice de correlação de Pearson para experientes os melhores resultados foram das regiões área com média CCI de 1,0 e CMO com média CCI e 1,0 e para o inexperiente temos resultados semelhantes região área com média CCI 1,0 e para variável CMO com média CCI 1,0 compreendendo intervalo de confiança de 95% como mostrado na tabela 8.

**Tabela 8.** Confiabilidade intra e inter-observador de todas as avaliações realizadas

Confiabilidade <sup>1</sup>	Experiência	Variável	r	LIC	LSC
Intra-observador	Experiente	Área	0,9999	0,9998	1,0000
		DMO	0,3842	-0,3238	0,8163
		CMO	1,0000	0,9999	1,0000
	Inexperiente	Área	1,0000	1,0000	1,0000
		DMO	0,6946	0,1155	0,9213
		CMO	1,0000	1,0000	1,0000
Inter-observador	Ambos	Área	0,9991	0,9975	0,9996
		DMO	0,4707	0,0356	0,7558
		CMO	1,0000	0,9999	1,0000

<sup>1</sup> r - índice de correlação de Pearson; LIC – Limite Inferior da Correlação; LSC – Limite Superior da Correlação, que compreende o intervalo de confiança de 95 % dos resultados

Ademais, a confiabilidade inter-observador média do nosso guia para avaliadores experientes e inexperiente também foi excelente, com um CCI médio de 0,91 para variável área e CCI média 1,0 para CMO (Figura 7).



**Figura 8.** Confiabilidade intra e inter-observador de todas as avaliações realizadas. A barra de erro no entorno da média da correlação indica o LIC – Limite Inferior da Correlação; e o LSC – Limite Superior da Correlação, para o intervalo de confiança de 95 % dos resultados

## 5. DISCUSSÃO

Em nosso estudo foram encontrados resultados positivos envolvendo a validação de regiões de interesse para DMO e CMO e obtivemos sucesso em relação a identificação de confiabilidade considerando os parâmetros indicados pelo estudo *“Accurate assessment of precision errors: how to measure the reproducibility of bone densitometry techniques”* (GLÜER et al., 1995) que tem como intuito a diminuição dos erros em análises de DMO e CMO no DXA.

Nosso modelo experimental de OA mostrou ser um bom para discutir o papel do osso subcondral na progressão da OA uma vez que o nosso resultado encontrado

corroborar com os achados na literatura. Karahan et al 2002 realizou análises em três períodos de seis em seis semanas entre os grupos controle e OA demonstrou que a queda DMO e CMO foram altamente correlacionadas com o aumento tempo em ambos os grupos. Além disso, no estudo de Rieger et al (2017) apresentaram resultados semelhantes ao nosso, uma vez que concluíram que a DMO e CMO diminuiriam significativamente com o tempo.

Uma característica interessante nos resultados consiste também nos fatos das áreas apresentarem sempre resultados menores com o passar das semanas isso pode ser explicado pela fisiopatologia da OA estar desempenhando um papel na diminuição do osso com a perda da DMO e CMO o que resultaria em menores áreas. A literatura demonstra que com a progressão da OA o osso subcondral é geralmente associado à remodelação óssea excessiva, incluindo esclerose óssea subcondral, cistos e formação de osteófitos (WANG et al., 2017; DUAN et al., 2017). E na pesquisa de Borges et al (2017) os autores observaram também que as modificações estruturais lineares evolutivas significativas ósseas subcondrais e osteófitos apresentaram mudanças progressivas em uma pesquisa longitudinal de 36 semanas. Outra característica sobre as áreas a ser apontado é a diferença de tamanho entre fêmur e tibia seus formatos diversificados podem ser o resultado de uma maior variabilidade e diferença entre as regiões de interesse em relação as áreas.

O maior diferencial e contribuição da nossa pesquisa em relação a literatura diz respeito ao nosso estudo buscar por padronizar o posicionamento do animal e das regiões de interesse para OA de joelho de ratos já que autores previamente descreverem que a falta de padronização foram limitações de seus estudos. FULLER et al (1992) descrevem que a falta de precisão na posição utilizada durante o escaneamento resultou em variações os resultados finais assim como, JEBB (1993) evidencia que há necessidade de padrões nas posições para que os resultados sejam mais precisos do que os obtidos por eles. Assim como, TOTHILL et al (1994) detalhou que mudanças na proporção e precisão durante o posicionamento do animal pode resultar em erros estatísticos. Dessa forma, nosso estudo vem para preencher essas lacunas indicadas pelos autores anteriores.

Além disso, em nosso estudo nós confeccionamos e validamos um guia de recomendações técnicas para OA de joelho ser reprodutível para avaliadores experientes e inexperientes. Na literatura sobre validações de instrumentos como o DXA poucos estudos apresentam uma validação mais extensa e aprofundada. A pesquisa de Bouldenot

et al (2014) que possuía como objetivo avaliar o efeito preventivo do exercício de treinamento intervalado no osso subcondral e osteócitos em modelo de iodoacetato monossódico experimental de OA. O equipamento utilizado para as análises foram o DXA focando na DMO e CMO como variáveis principais, os autores realizaram regiões de interesse na tíbia e fêmur. Os resultados sugeriram que o DXA é um bom instrumento para análise de região de interesse de OA de joelho e para definição de regiões de interesse de ossos como fêmur e tíbia. Apesar dos resultados positivos apresentados a pesquisa foi possível observar que os autores não realizaram análises que comprovem uma validação da posição utilizada para escaneamento nem das regiões de interesse, deixando lacunas que dificultam sua replicabilidade metodológica, dessa forma, nosso estudo apresenta resultados mais completos e de fácil replicagem metodológica.

Na revisão de literatura de SHIEL et al (2018) que objetivava identificar e avaliar sistematicamente métodos e protocolos usados para reduzir erros técnicos e biológicos em estudos publicados que investigaram a confiabilidade DXA para avaliar a composição corporal. A revisão compreendeu dados desde a concepção das plataformas utilizadas até julho de 2017, 12 estudos preencheram os critérios de elegibilidade. Quatro dos artigos foram considerados de alta qualidade e para ser incluso nessa sessão era necessário que os estudos que fornecessem evidências que indicassem uma confiabilidade teste-reteste muito alta. Os autores concluíram que existem poucos artigos de alta confiabilidade no tema resultando em variações metodológicas substanciais que dificultariam a replicabilidade das metodologias aplicadas devido principalmente ao fato de todos os artigos utilizarem padrões diferentes para análise principalmente porque não houve nenhum artigo onde o protocolo de posicionamento específico foi relatado.

Como demonstrado nos estudos anteriores a padronização no posicionamento e regiões de interesse com resultados em base estatística de confiabilidade são exclusivos do nosso estudo, uma vez que a maior parte dos estudos encontrados na literatura não demonstram essas características em suas metodológicas. Além disso, nosso estudo é reprodutível para avaliadores de diferentes níveis tanto experientes como inexperientes e uma característica interessante encontrada na literatura em pesquisas que envolvam validação de guias relacionados a equipamentos em sua maioria não incluem pesquisadores com avaliadores inexperientes durante as avaliações nas pesquisas. Nas pesquisas de RIECKE et al (2014), KARAHAN et al (2002), MURPHY; BRESNIHAN; FRITZGERALD (2001), BARRY et al (2019) NAGY; PRINCE; JING (2001) e GRASSI

et al (2017) todas apresentaram dados reprodutíveis apenas para avaliadores experientes uma vez que em nenhum estudo foi realizado avaliações entre experientes e inexperientes.

Nosso estudo resultou em bons resultados, o CCI mostrou-se excelente confiabilidade intra e interobservador para avaliadores experientes e inexperientes em todas as variáveis estudadas. Assim, confiabilidade foi avaliada afim de verificar a reprodutibilidade entre indivíduos com experiências variadas quanto avaliações do DXA. Uma vez que, confiabilidade reflete não apenas o grau de correlação, mas também a concordância entre as avaliações, ou seja, relação de variância real pela variância de erro (KOO e LI., 2016). Portanto, foram realizados teste e treinamento entre todos os avaliadores, utilizando ferramentas e formulários de avaliações prévias, como realizado nos estudos de validações (RUTGES et al., 2013; GERWIN et al., 2010) o que demonstrou bons resultados da confiabilidade entre os avaliadores e entre as regiões de interesse.

Portando, o guia de recomendações técnicas realizado nesse estudo apresenta métodos informativos e padronizados que possibilitam a replicabilidade e comparações, proporcionando aos pesquisadores cometerem menos erros durante o período experimental em pesquisas semelhantes o que facilitará a comunicação entre pesquisadores de todo o mundo.

## **6. CONCLUSÃO**

Em conclusão, desenvolvemos e validamos regiões de interesse anatômicas para utilização do DXA em OA nas variáveis DMO e CMO e confeccionamos um guia de recomendações técnicas para utilização do DXA para ratos. Os usos das regiões de interesse validas podem tonar análise de resultados estudos mais objetivas e menos tendenciosa. Além disso, elas permitem análises padronizadas de pesquisa básica e translacional e podem aumentar a eficiência e padronizações de pesquisas. O uso deste guia irá auxiliar na padronização e validação tornando os estudos mais replicáveis entre pesquisadores de todo mundo.



## 7. REFERENCIAS

BOUDENOT, A. et al. Effect of interval-training exercise on subchondral bone in a chemically-induced osteoarthritis model. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 22, n. 8, p. 1176-1185, 2014.

BURNETT, W D. et al. Proximal tibial trabecular bone mineral density is related to pain in patients with osteoarthritis. **Arthritis research & therapy**, v. 19, n. 1, p. 200, 2017.

CHEN, YP et al. Worsen depression after viscosupplementation treatment for geriatric people with knee osteoarthritis? **International Journal of Clinical and Health Psychology**, 2019.

DUAN, Xi. et al. Therapeutic efficacy of intra-articular hyaluronan derivative and platelet-rich plasma in mice following axial tibial loading. *PloS one*, v. 12, n. 4, p. 175682, 2017.

FULLER, NJ.; LASKEY, MA.; ELIA M. Assessment of the composition of major body regions by dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA), with special reference to limb muscle mass. **Clinical Physiology**, v. 12, n. 3, p. 253-266, 1992.

GERWIN, N., et al. The OARSI histopathology initiative e recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rat. *Osteoarthritis and Cartilage*, v.18, p. S24-S34, 2010.

GLÜER, CC. et al. Accurate assessment of precision errors: how to measure the reproducibility of bone densitometry techniques. **Osteoporosis international**, v. 5, n. 4, p. 262-270, 1995.

GLYN-JONES, S.; et al. Osteoarthritis. *Lancet*. 386. p. 376–87, 2015.

HAWKINS, J et al. Energy Restriction Is Associated with Lower Bone Mineral Density of the Tibia and Femur in Lean but Not Obese Female Rats1–3. **The Journal of nutrition**, v. 140, n. 1, p. 31-37, 2009.

JEBB, SA.; GOLDBERG, GR.; ELIA, M. DXA measurements of fat and bone mineral density in relation to depth and adiposity. In: *Human body composition*. Springer, Boston, MA, p. 115-119, 1993.

KARAHAN, S et al. In vivo whole body and appendicular bone mineral density in rats: a dual energy X-ray absorptiometry study. **Comparative medicine**, v. 52, n. 2, p. 143-151, 2002.

KOO T.K., LI. M.Y. A Guideline of Selecting and Reporting Intraclass Correlation Coefficients for Reliability Research. *Journal of Chiropractic Medicine*. 15. p. 155–163. 2016

MURPHY, E.; BRESNIHAN, B.; FITZGERALD, O. Validated measurement of periarticular bone mineral density at the knee joint by dual energy x ray absorptiometry. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 60, n. 1, p. 8-13, 2001.

NAGY, TIR.; PRINCE, CW.; LI, Ji. Validation of peripheral dual-energy X-ray absorptiometry for the measurement of bone mineral in intact and excised long bones of rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 16, n. 9, p. 1682-1687, 2001.

RIEGER, R. et al. Chitosan in viscosupplementation: in vivo effect on rabbit subchondral bone. *BMC musculoskeletal disorders*, v. 18, n. 1, p. 350, 2017.

SEPRIANO, A et al. DXA in the assessment of subchondral bone mineral density in knee osteoarthritis—a semi-standardized protocol after systematic review. In: **Seminars in arthritis and rheumatism**. WB Saunders, p. 275-283, 2015.

SHARMA, L. Osteoarthritis year in review 2015: clinical. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 24, n. 1, p. 36-48, 2016.

SHIEL, Flinn et al. Dual energy X-ray absorptiometry positioning protocols in assessing body composition: A systematic review of the literature. **Journal of science and medicine in sport**, v. 21, n. 10, p. 1038-1044, 2018.

TOTHILL, P. et al. Comparisons between Hologic, Lunar and Norland dual-energy X-ray absorptiometers and other techniques used for whole-body soft tissue measurements. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 48, n. 11, p. 781-794, 1994.

UCHÔA, MR; CONSTANTINO, GC; FELÍCIO, AP. Conceitos atuais em osteoartrite. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 21, n. 2, 2013.

WANG, CJ. et al. Changes of articular cartilage and subchondral bone after extracorporeal shockwave therapy in osteoarthritis of the knee. *International Journal of Medical Sciences*, v. 14, n. 3, p. 213, 2017.

## 8. APÊNDICES

## **9. ANEXOS**



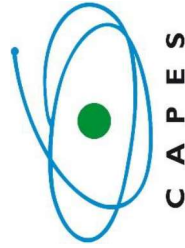
Universidade Federal de São Carlos- UFSCar  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde- CCBS  
Programa de Pós-Graduação em Gerontologia- PPGGERO  
Rodovia Washington Luís, km 235 | São Carlos | SP | CEP: 13565-905 |  
Telefone: (16) 3306-674 | E-mail: ppggero@ufscar.br



# Apêndice A

## Treinamento para o posicionamento dos animais no DXA

**Orientador:** Prof. Dr. Fernando Augusto Vasilceac  
**Discente:** Camila Marques de Araújo



São Carlos  
2020

# Absorciometria bifotónica de raio X

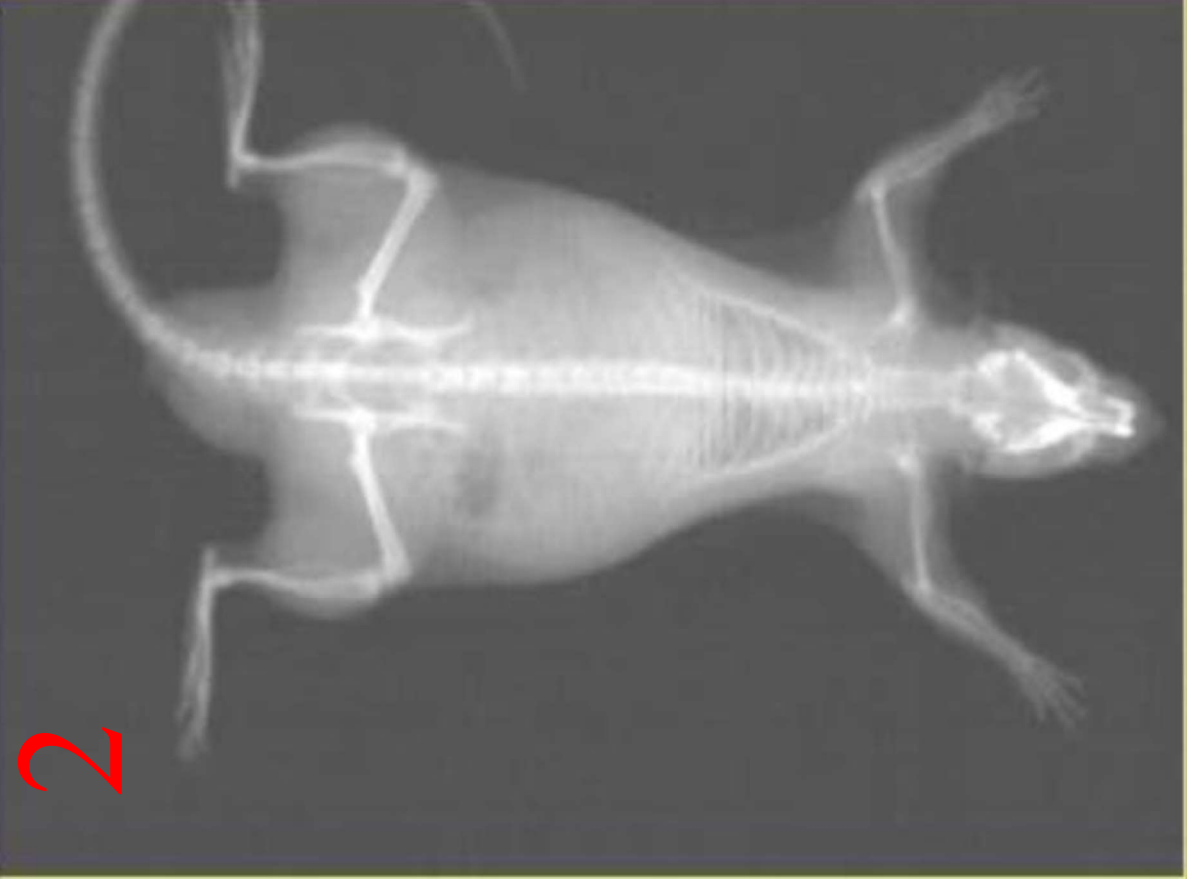
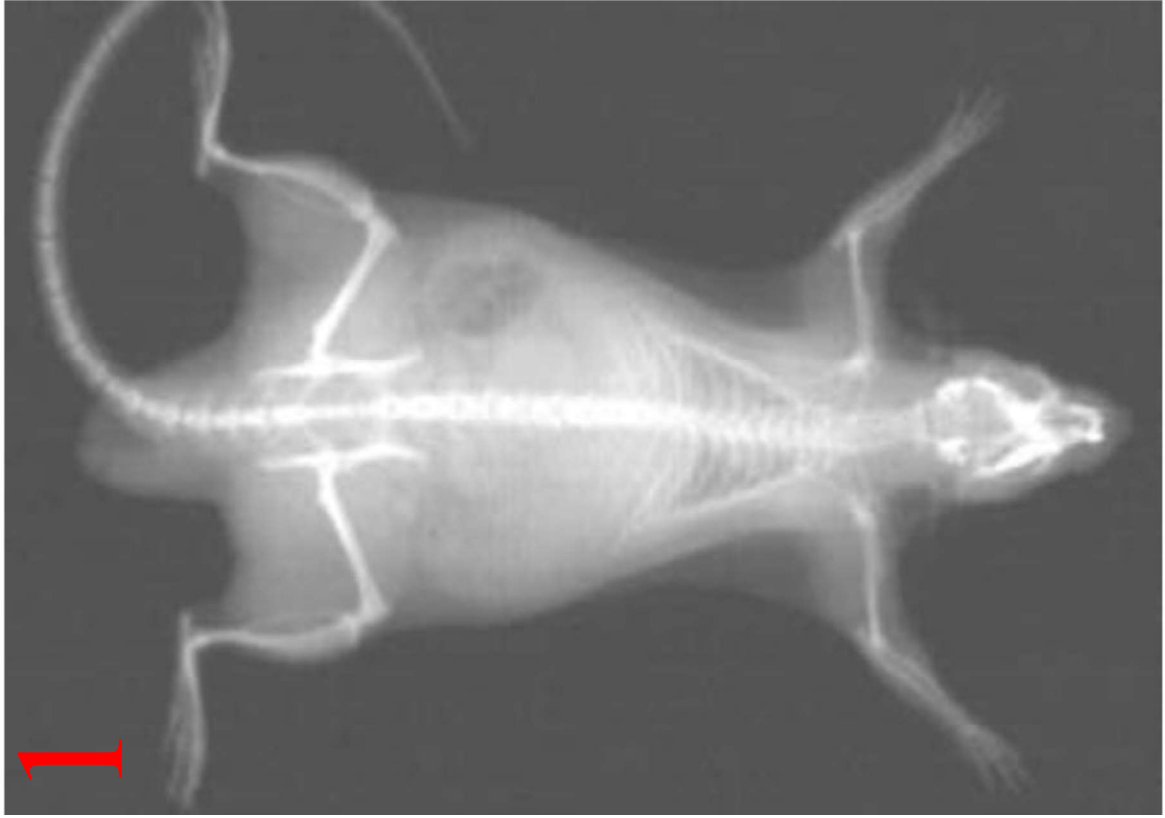
*Dual-energy X-ray absorptiometry (DXA)*

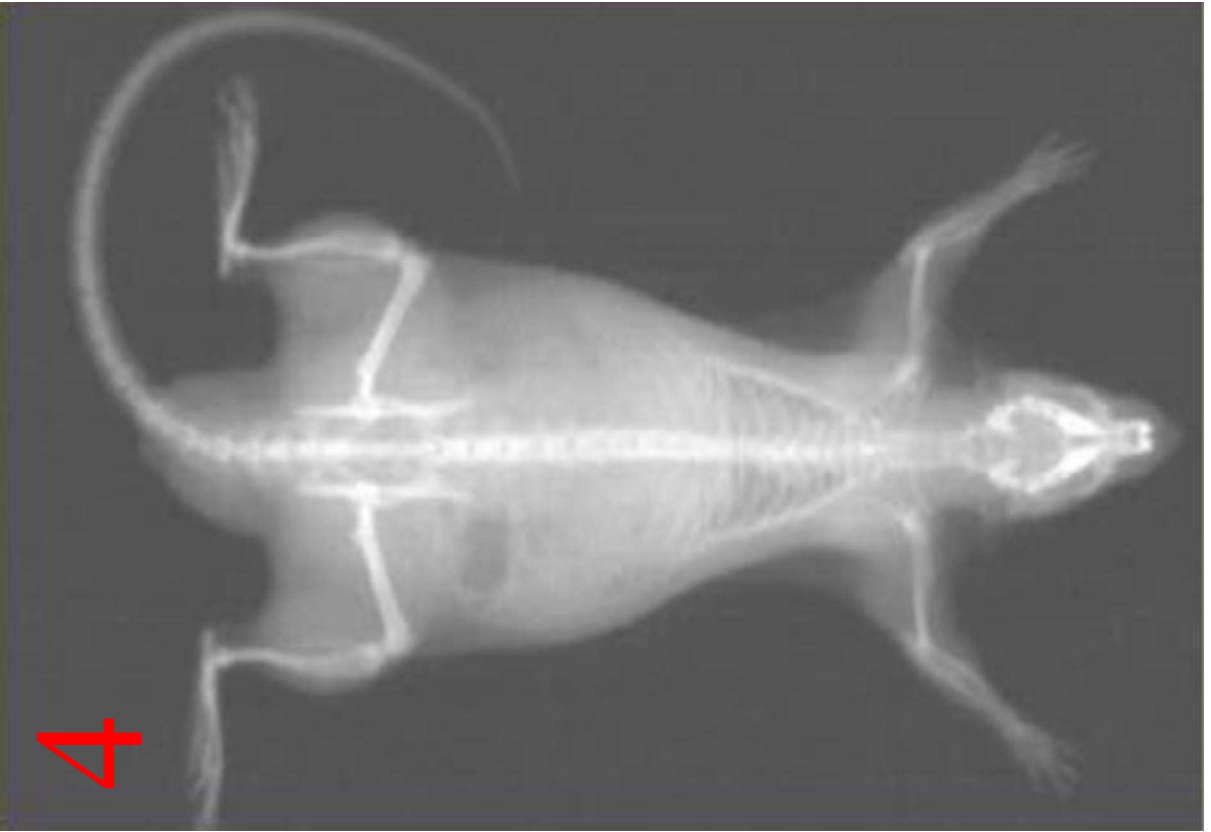
É um método de medição da **densidade mineral óssea, conteúdo mineral ósseo** entre outras variáveis na qual feixes de raio X com diferentes níveis de energia são emitidos para o corpo do animal. Quando é subtraída a absorção pelo tecido mole, é possível determinar a densidade óssea a partir da absorção de cada raio pelo osso.

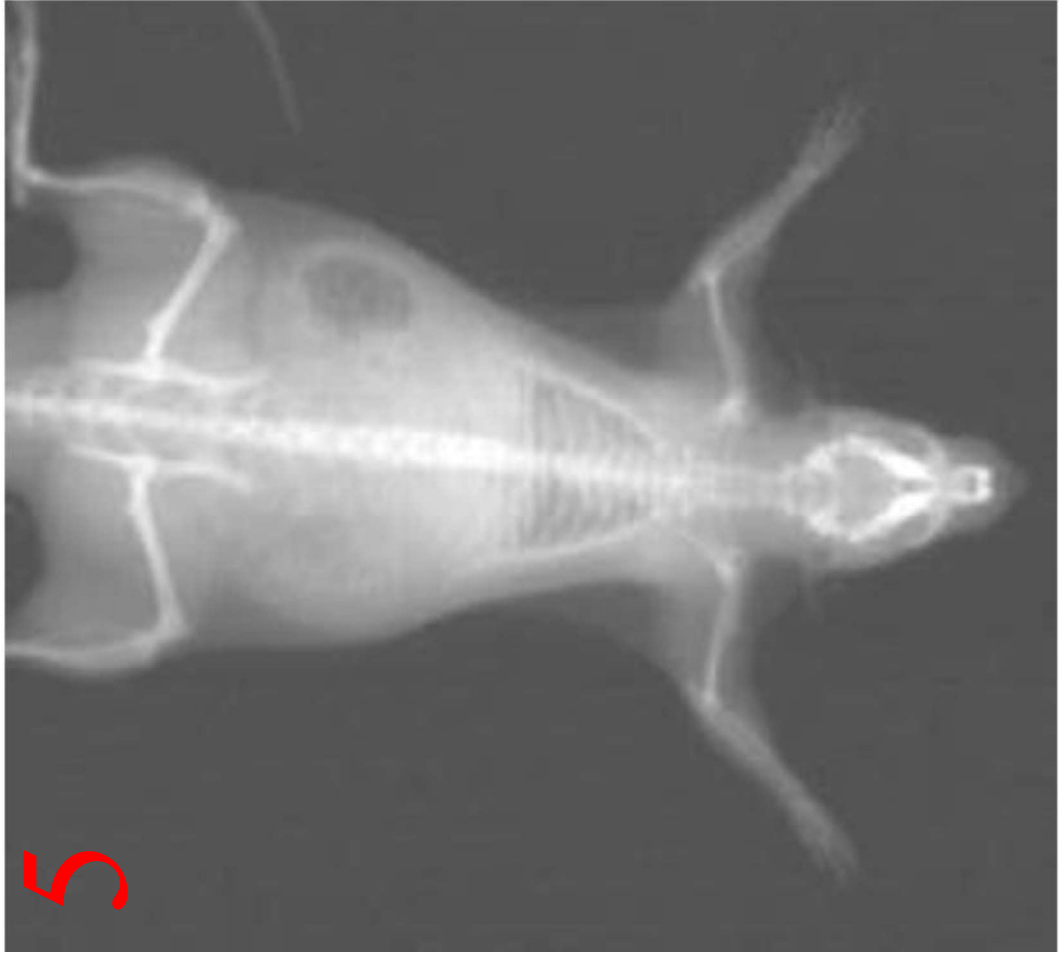
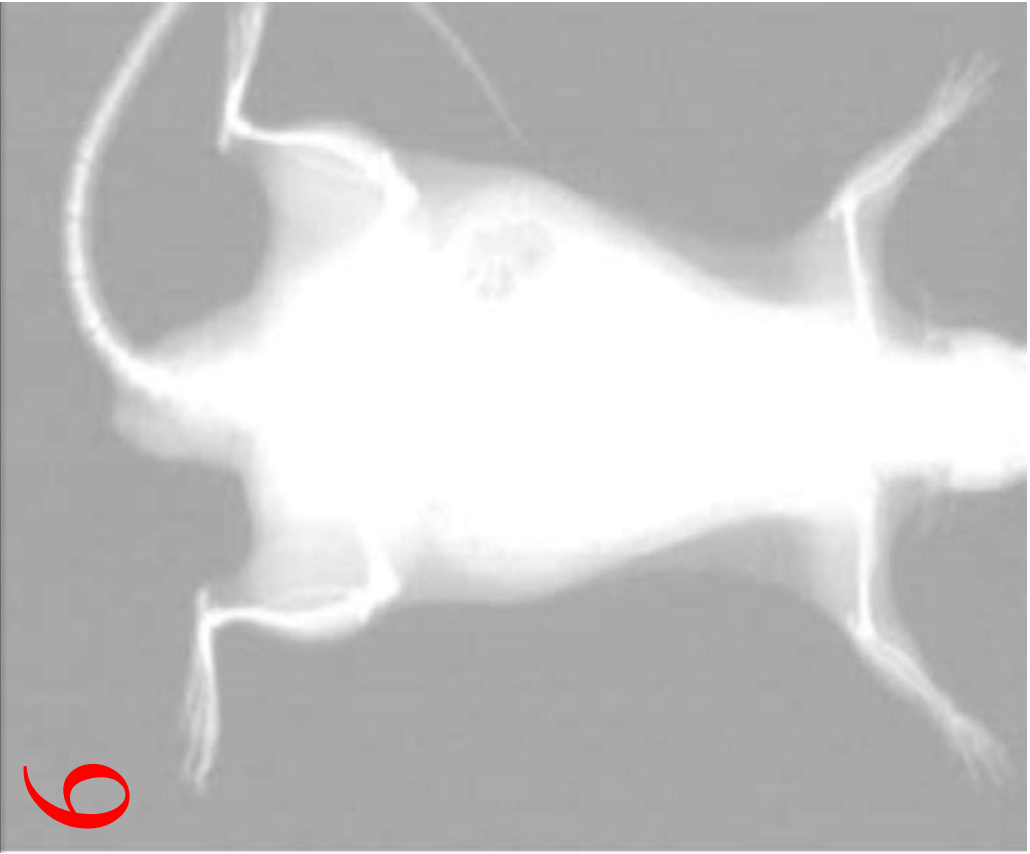


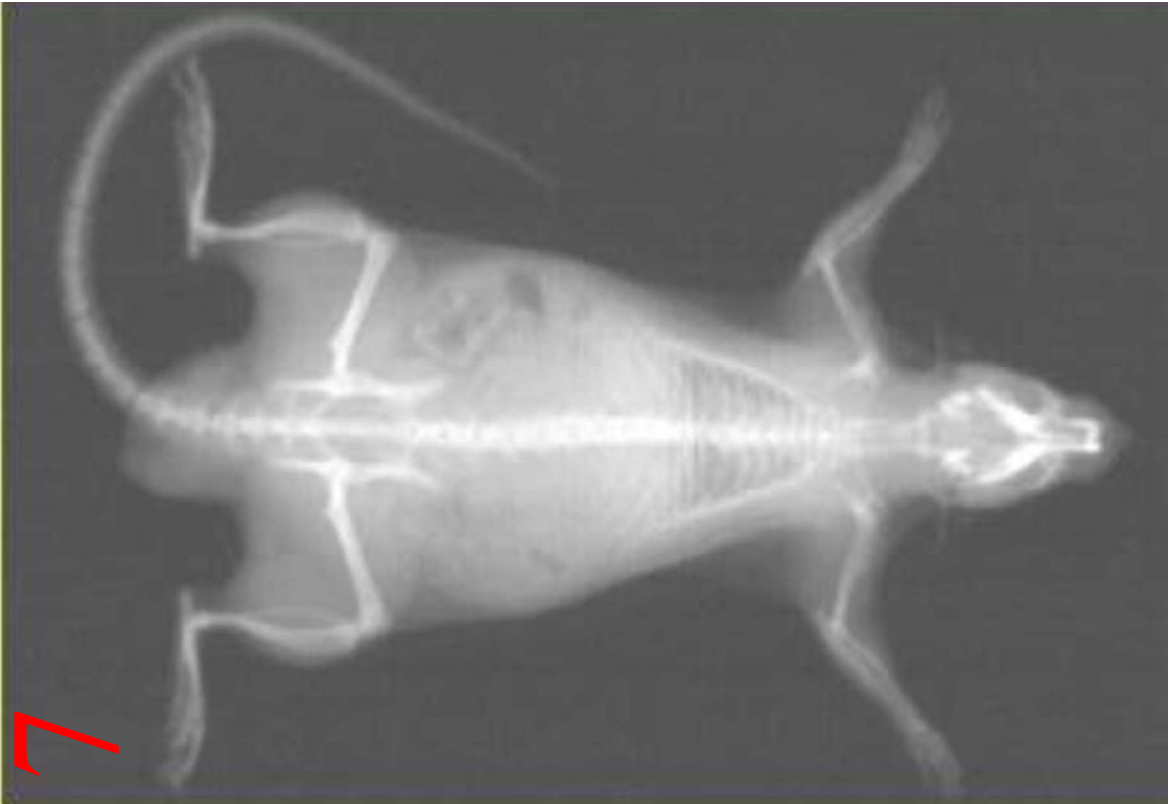
Indique as imagens que você  
considera incorretas e corretas





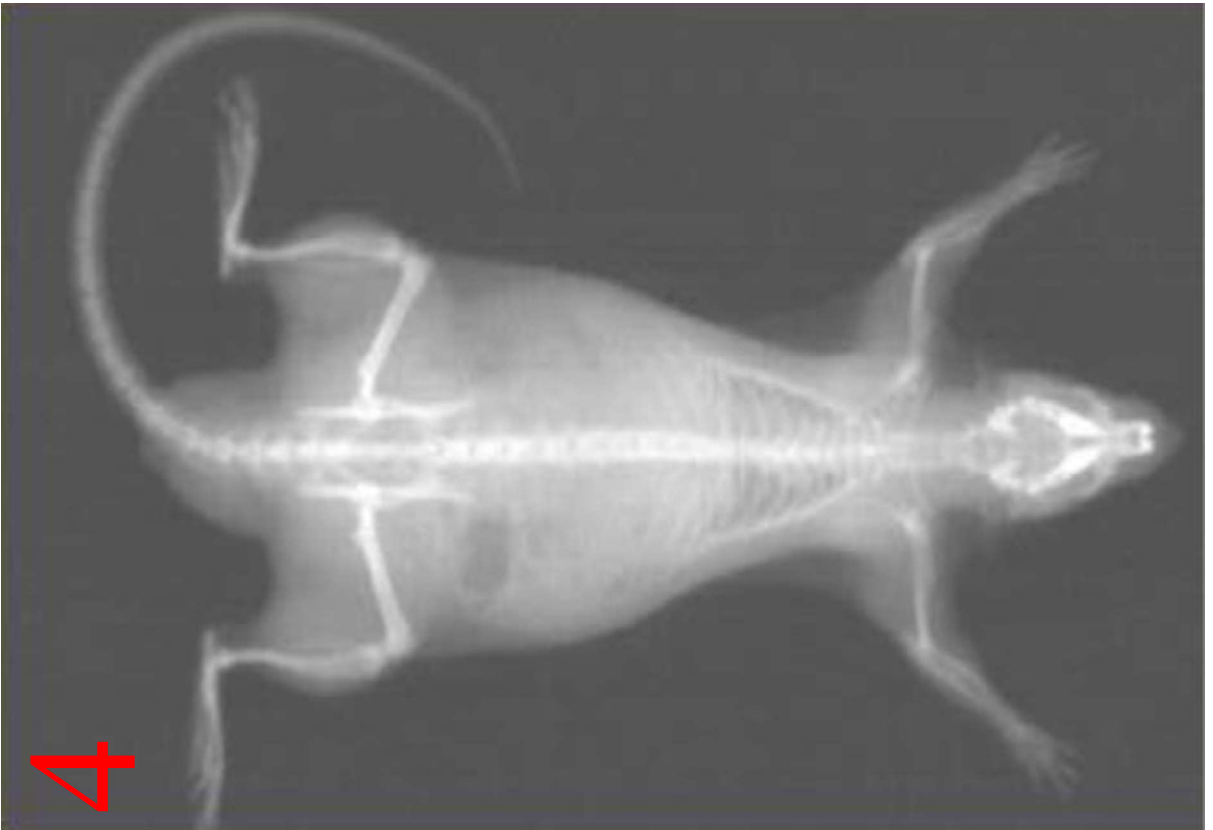






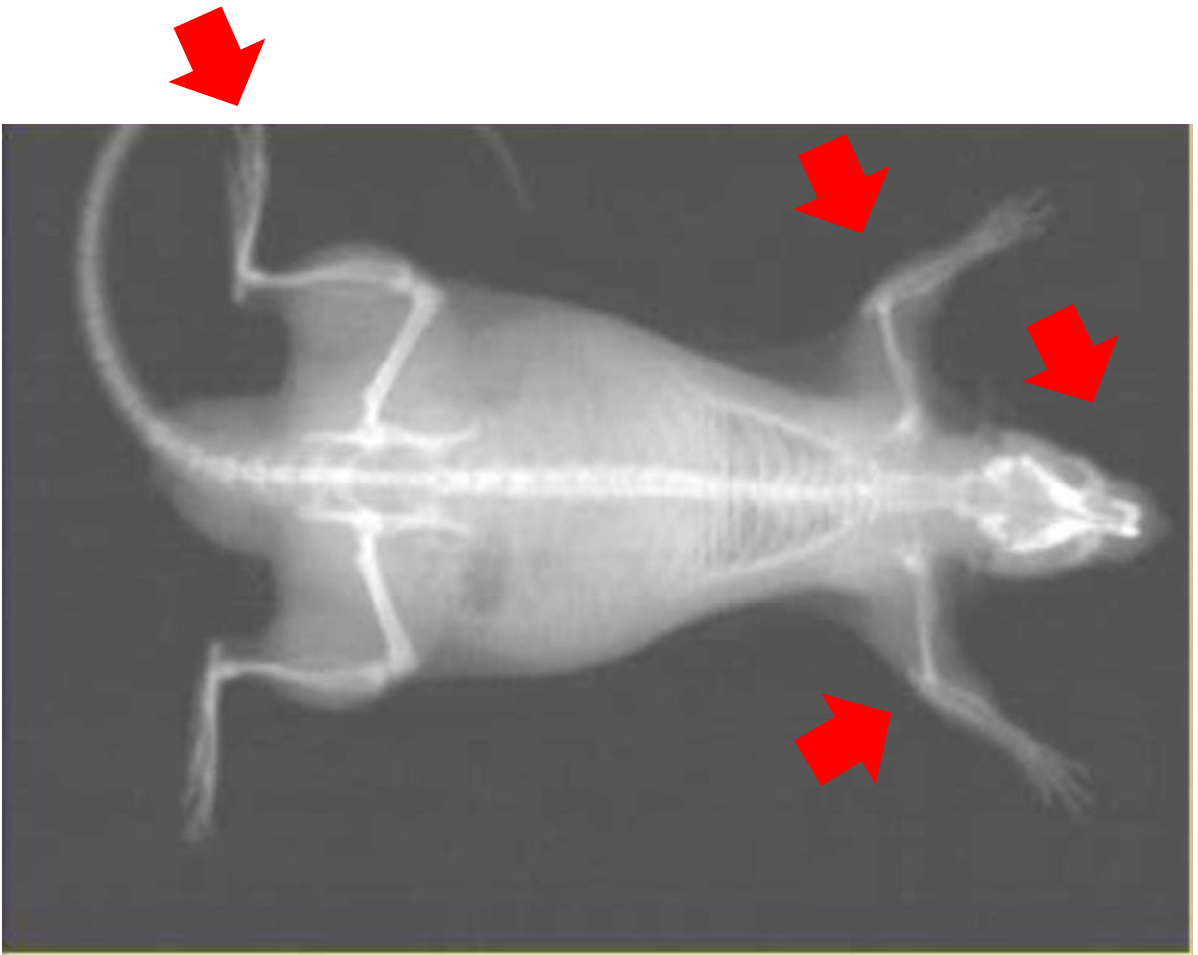


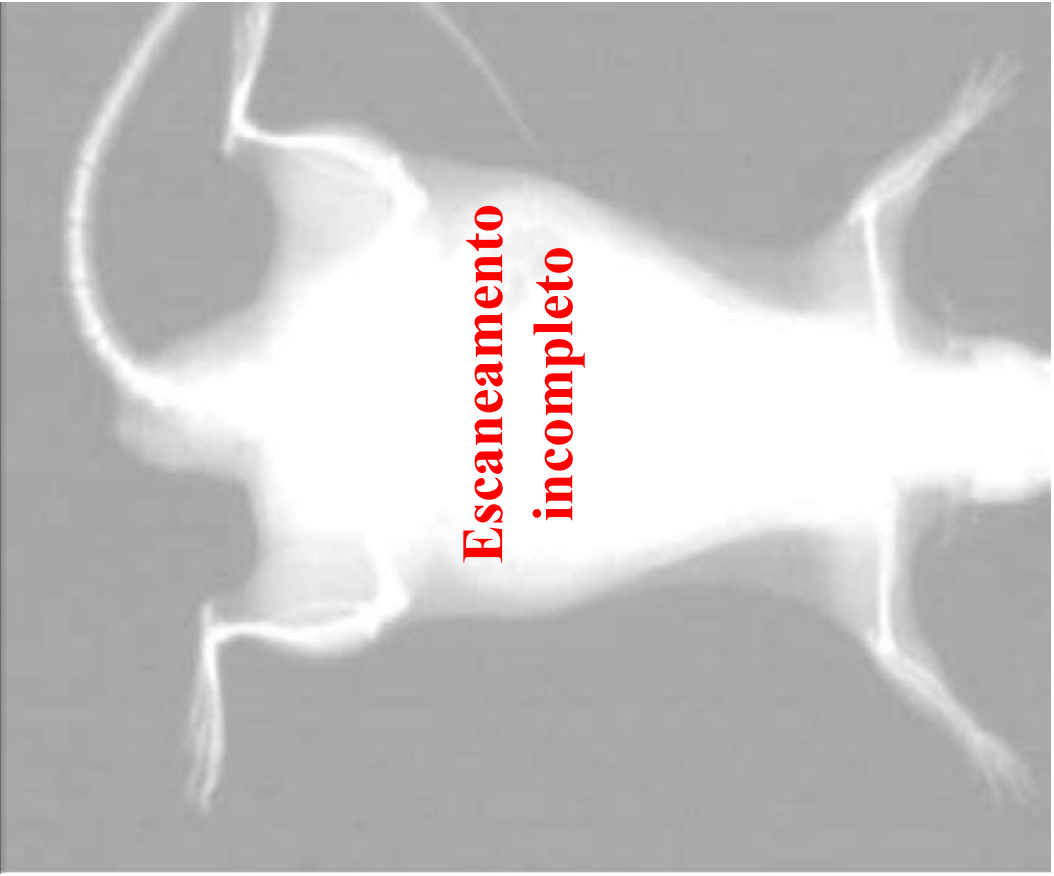
Quais são as imagens corretas?

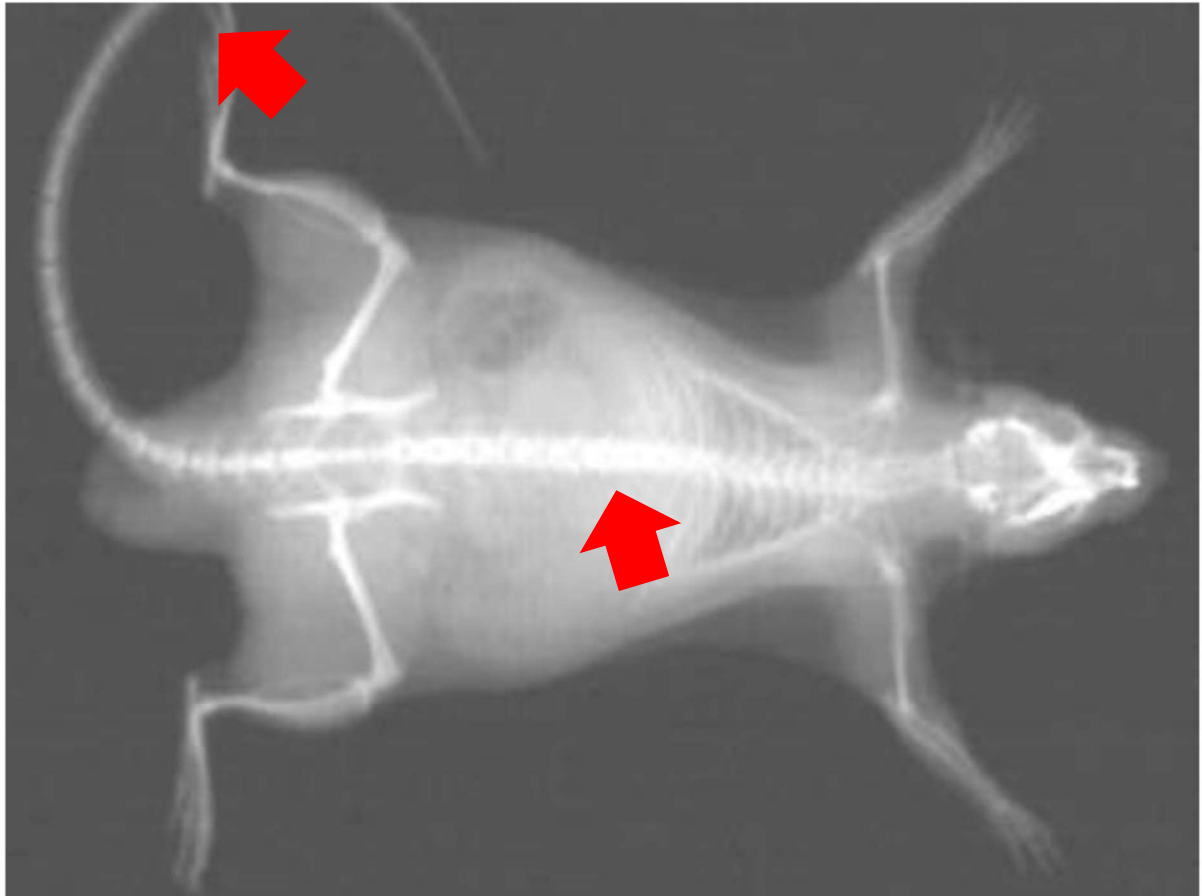
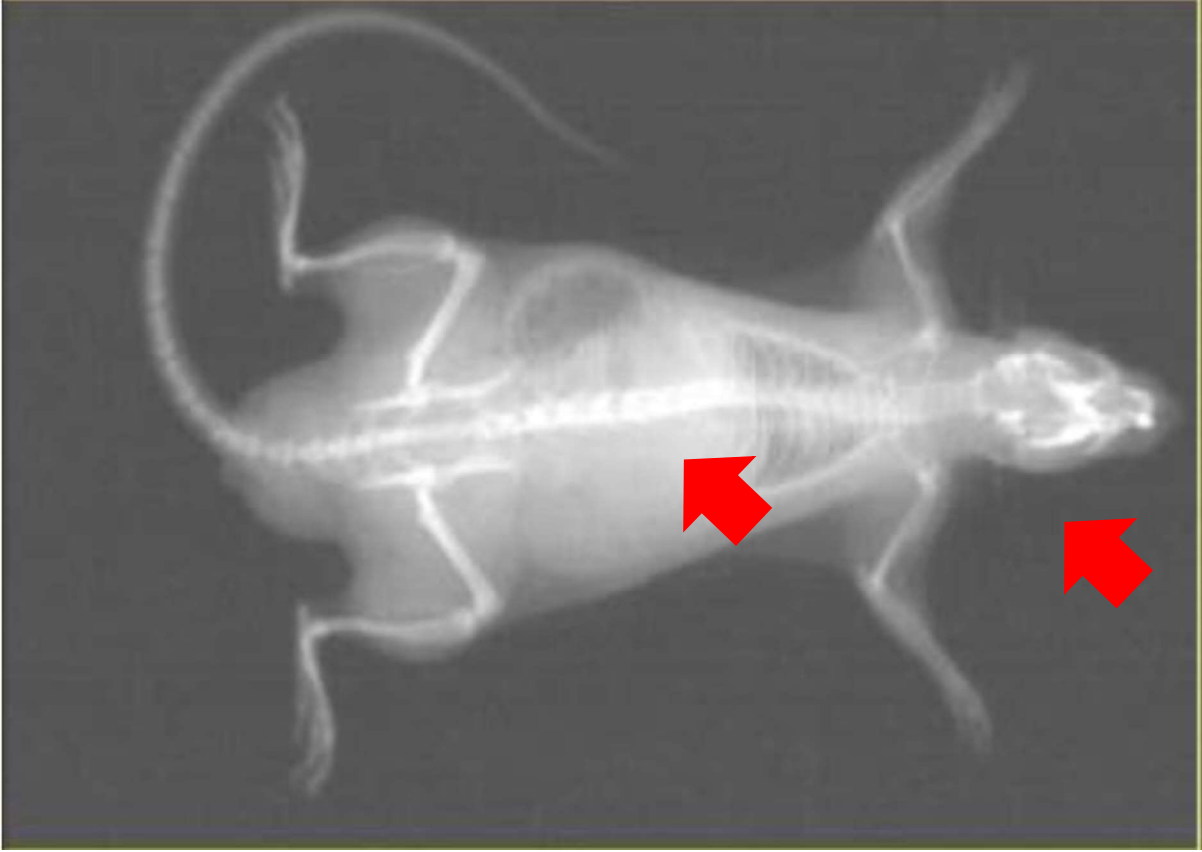


Indique o que está incorreto  
nas imagens

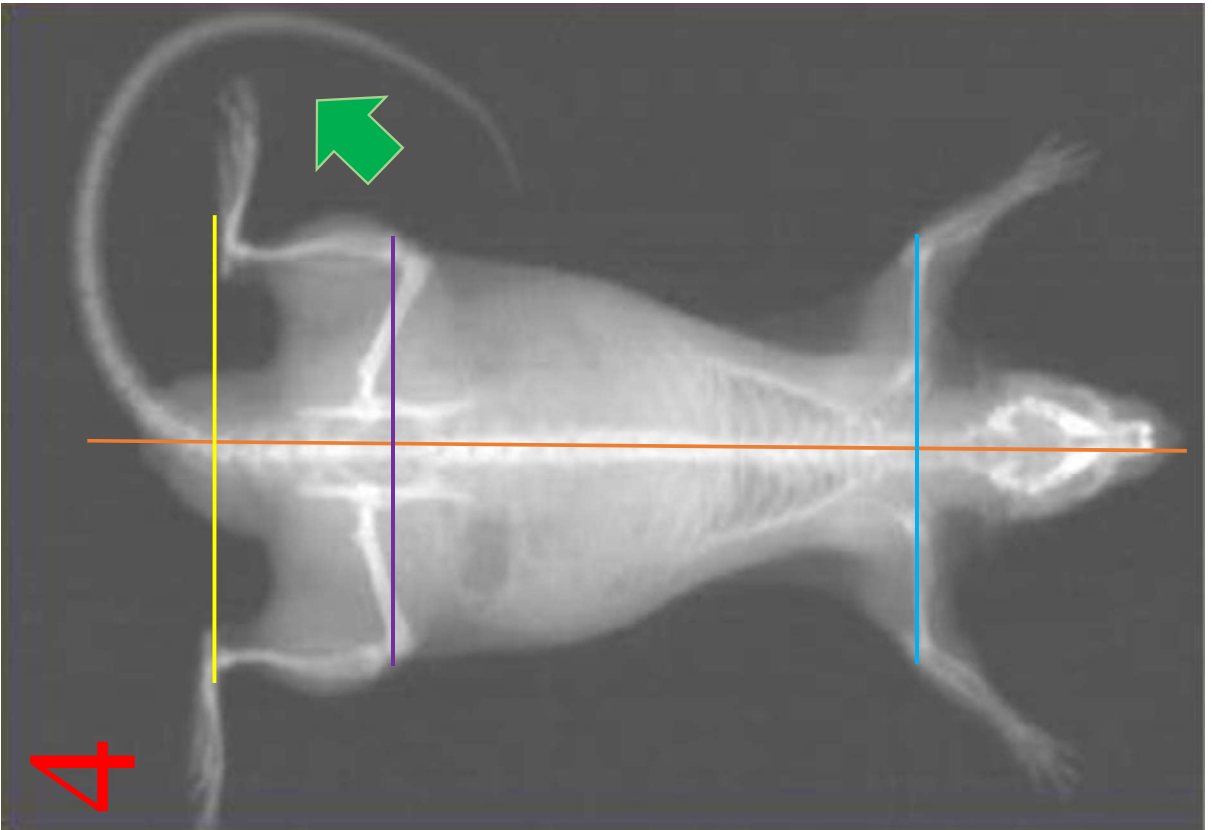
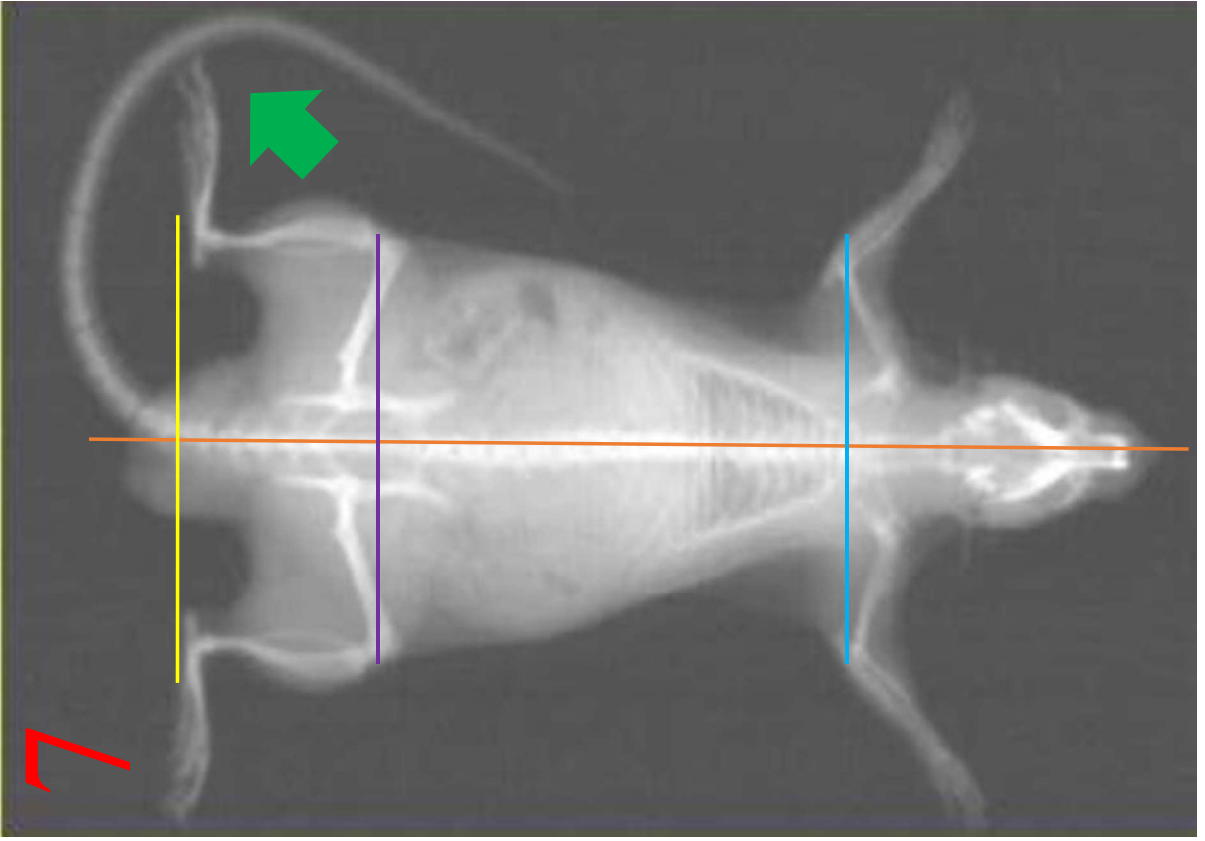








Sabendo os parâmetros incorretos de  
posicionamento indique os  
parâmetros corretos de  
posicionamento encontrado nas  
imagens



# Resumo Simplificado: Parâmetros Corretos



Coluna reta;



Tornozelos direitos e esquerdos em linha reta;



Interseção entre fêmur em Tíbia em linha reta;



Rabo completo na imagem;



Ombros em linha reta.

*Obrigada!*

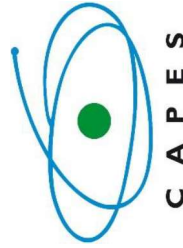


Universidade Federal de São Carlos- UFSCar  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde- CCBS  
Programa de Pós-Graduação em Gerontologia- PPGGERO  
Rodovia Washington Luís, km 235 | São Carlos | SP | CEP: 13565-905 |  
Telefone: (16) 3306-674 | E-mail: ppggero@ufscar.br



# Apêndice B

## Treinamento para as regiões anatômicas e as regiões de interesse

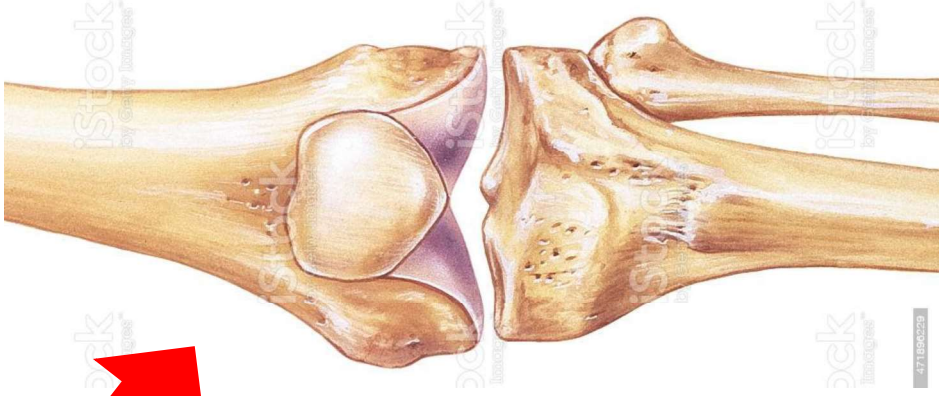
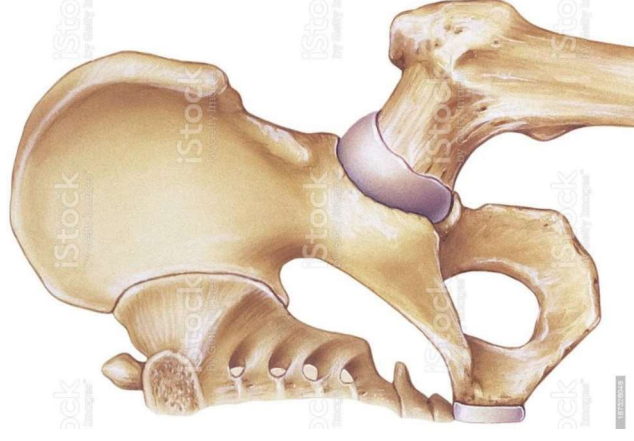
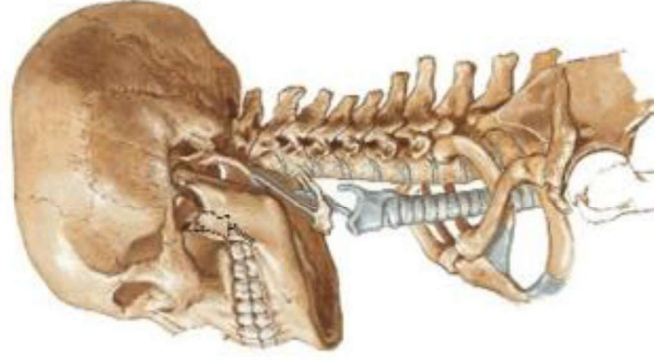
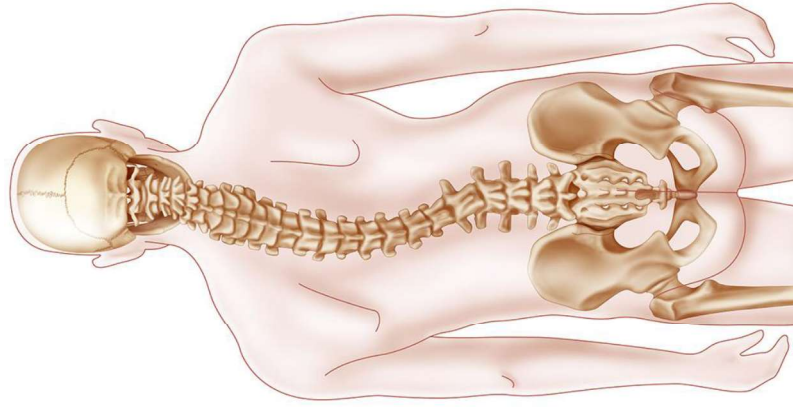


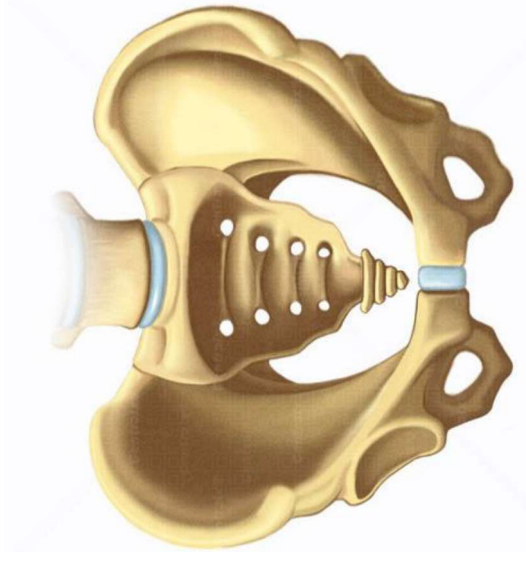
**Orientador:** Prof. Dr. Fernando Augusto Vasilceac  
**Discente:** Camila Marques de Araújo

São Carlos  
2020



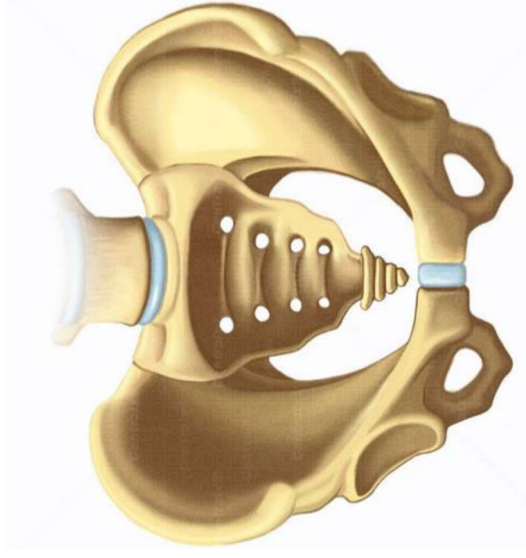
Em qual parte do corpo Tíbia e o Fêmur estão localizadas?





Quais desses ossos são a tíbia e o fêmur?

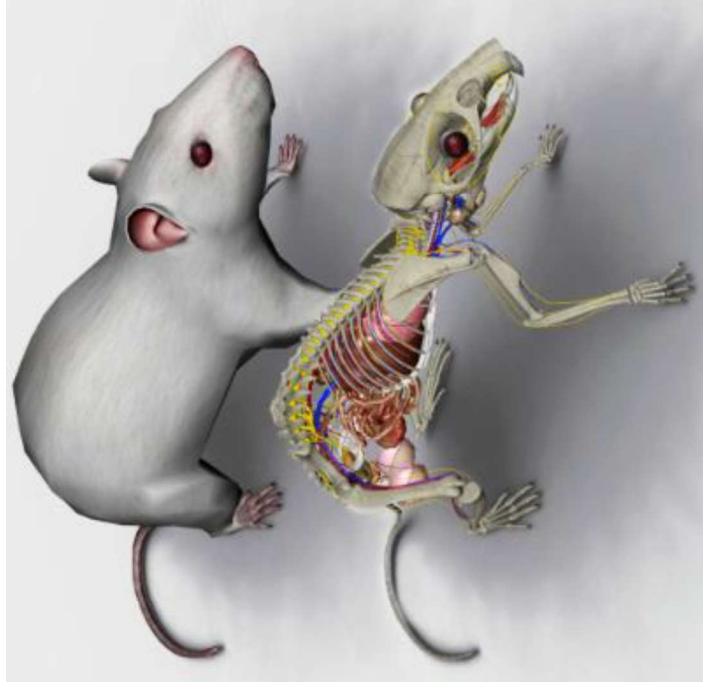




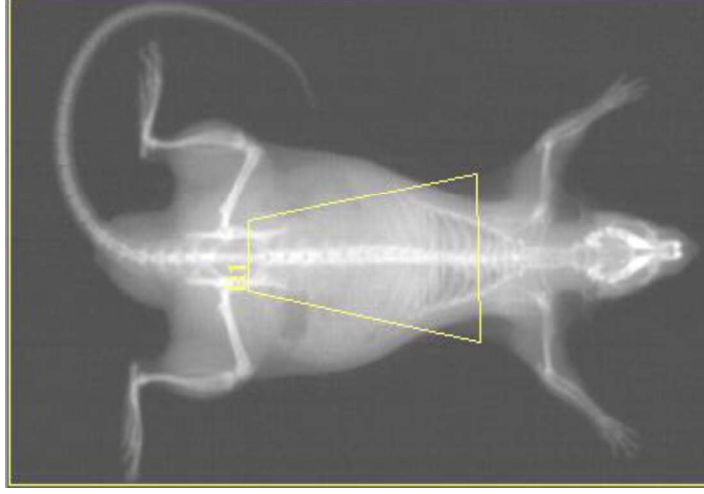
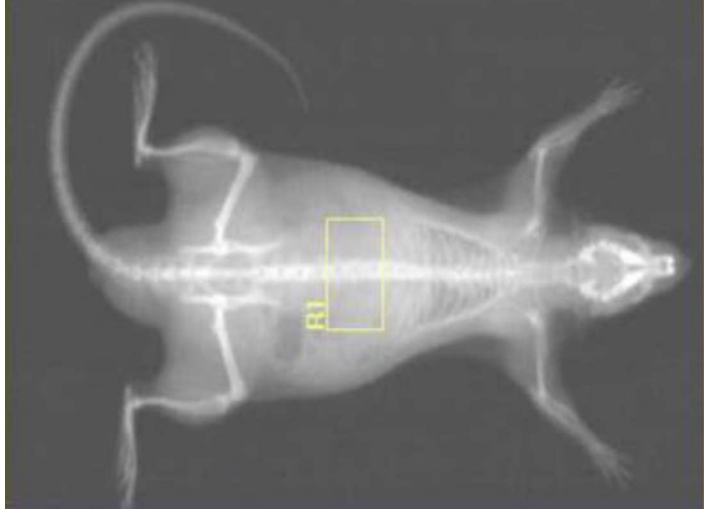
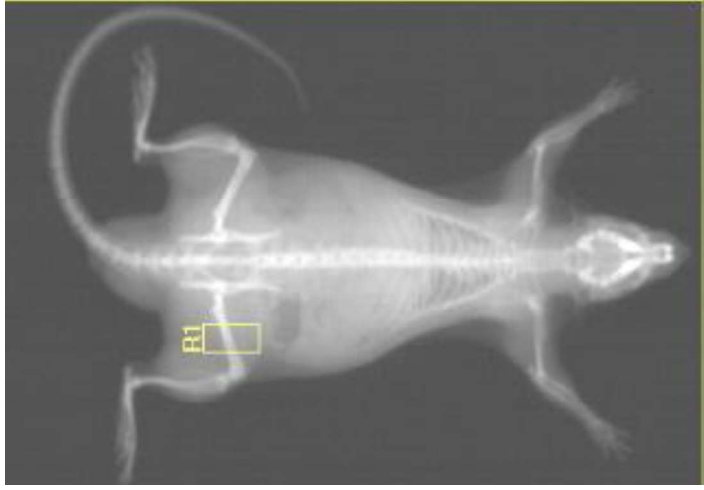
Quais desses ossos são a tíbia e o fêmur?



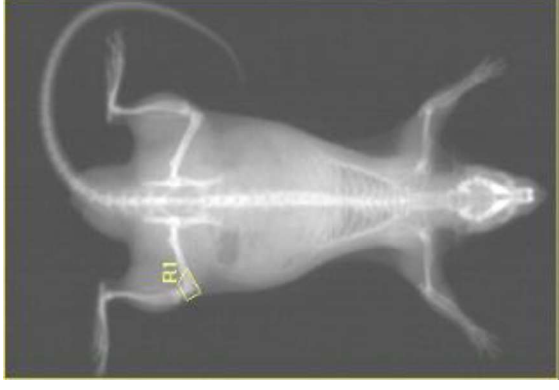
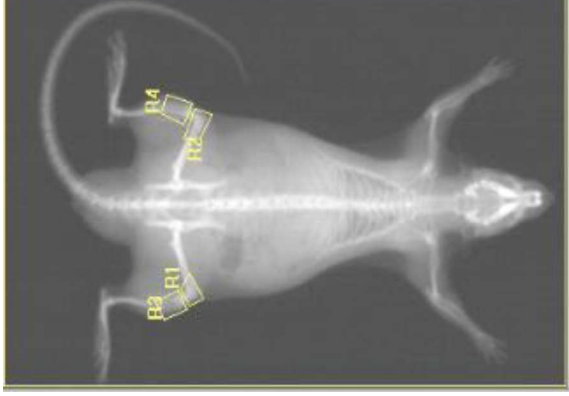
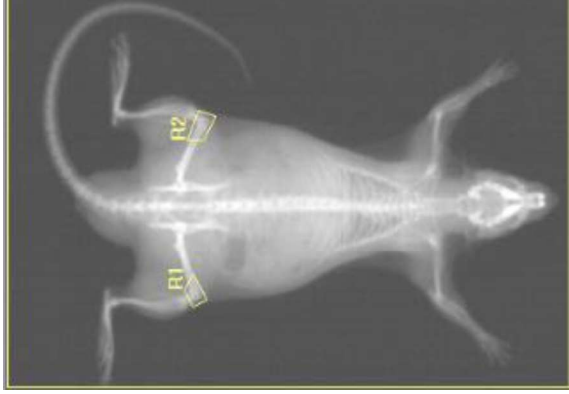
# Aula: Anatomia do joelho: Rato 3D *biosphera*



Desenhe essas regiões de interesse no  
*software*



Desenhe essas regiões de interesse no  
*software*



*Obrigada!*

## APÊNDICE C

### GUIA DE RECOMENDAÇÕES TÉCNICAS

#### **Características necessárias para os animais serem submetidos ao DXA**

Recomendamos a utilizarmos de ratos com 15 semanas de vida cerca de 120 a 140 dias de idade para início do estudo devido a maturidade óssea encontrada nos animais com essa idade. Recomenda-se também que os animais estejam com o peso inicial de 350 a 399 gramas pois com pesos inferiores os resultados encontrados podem sofrer alterações e desbalanceamento resultando em dados não passíveis de análise concreta (KARAHAN et al., 2002). Recomendamos que os animais sejam medidos do rabo até o ponto médio do focinho com uma fita métrica e que peso seja anotado posterior a anestesia esses itens devem ser realizados anteriormente ao início do escaneamento para que o tamanho e peso adicionados aos formulários do *software* sejam o correspondente de forma íntegra ao animal.

#### **Contraindicações e limitações**

Não há contraindicações específicas para a realização de DXA em ratos identificado na literatura devido ao fato de as doses de radiações serem pequenas. Na literatura é recomendado a utilização de ratos com peso inicial entre 350 a 399 g e idade superior 120 dias (KARAHAN et al., 2002).

#### **Utilização do *rat step quality control phantom* para manobrar o DXA**

A utilização do *rat step phantom* (hologic P/N 0-10-0758 Ver. 004) 280 – 0180 Rev.002 foi necessária para manutenção da manobragem do equipamento. Ao utilizar o *quality control phantom* para pequenos animais. O sistema operacional do software se adapta ao tamanho e necessidades desses animais aumentando a qualidade e confiabilidade dos resultados finais quando comparado ao *hologic DXA quality control Phantom* para humanos.



## **Cuidados com os animais submetidos ao DXA**

Baseado na experiência descrita na literatura recomenda-se que o clico cartesiano animais seja invertido para que o escaneamento ocorra no período escuro do ciclo quando os animais estão acordados (GERBAIX et al., 2010). Para utilização do DXA não há restrição hídrica ou alimentícia logo, os animais podem estar com livre acesso a água e comida com exceção de 12h antes de realizar o escaneamento quando os animais devem ser submetidos a jejum de água e comida. Para realização do exame é necessário que os animais estejam anestesiados (injeção intraperitoneal de solução de xylazina 8 mg/Kg/peso corporal e ketamina 60 mg/Kg/peso corporal) com intuito de diminuir qualquer estresse para o animal. A dose menor de anestésico indicada é baseada na experiência do grupo de pesquisa e da literatura para manutenção de animais com estudos com períodos crônicos com minimização de perdas.

### **Preparação do DXA para scaneamento de *small animal***

Baseados na experiência contida na literatura e em testes realizados pelo grupo de pesquisa sugere-se que os animais sejam alocados na bancada sem nenhum tipo de suporte com exceção da fita adesiva posicionada em locais estratégicos (patas dianteiras, traseiras e rabo) para que o animal não se desloque durante o processo de escaneamento qualquer outro suporte ou objeto alocado na bancada alterará os resultados finais os deixando aumentados o que resultara em resultados incorretos, inadequados e não passíveis de análises concreta (ARAÚJO, C.M 2018; CUSTÓDIO J.F,2019).

### **Posicionamento correto do animal no DXA para análise de OA**

O rato posicionado em decúbito ventral na mesa nua membros anteriores devem alocados em decúbito palmar com uma distância de 3 cm de abertura entre a cabeça e as patas. Os ombros devem apresentar uma adução, há necessidade de uma flexão de cotovelo e pronação do antebraço. Os membros posteriores devem ser alocados

lateralmente com os joelhos apresentando uma leve flexão e o tornozelo deve permanecer em posição neutra enquanto os pés devem ser posicionados em decúbito plantar com distanciamento de 1,5 cm do calcanhar ao início do rabo há uma necessidade do quadril apresentar rotação lateral. (Figura 1).

É necessário cuidado para evitar colocar pressão excessiva no joelho e articulações do quadril. (KARAHAN et al., 2002 & BOUDENOT et al., 2014), O posicionamento foi ser estabilizado pelo uso de fita crepe nas patas inferiores, anteriores, ponto médio entre cabeça e nariz e rabo (Figura 1).



**Figura 1.** *Demonstração do posicionamento correto do animal no DXA para escaneamento e posterior análise das regiões anatômicas de interesse.*

## Quantidade de escaneamentos para diminuição da variabilidade

O escaneamento de corpo total de cada animal deve ser realizado 3 vezes sem movimentação do animal na maca para posterior confecção das medias como sugerido por (MURPHY et al., 2001; NAGY et al., 2001; HAWKINS et al., 2009).

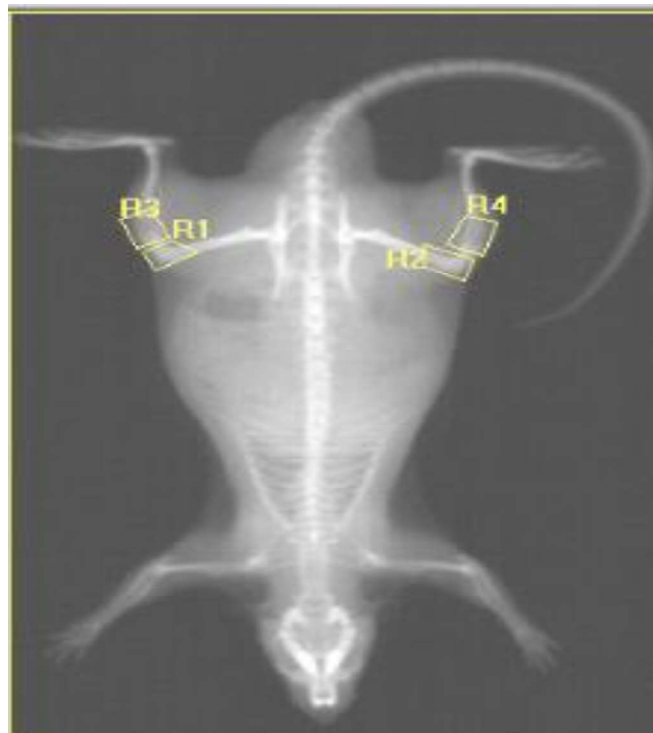
## Mensuração e definição das regiões de interesse

Descrição da mensuração das regiões de interesse:

TP: Um quadrado será desenhado manualmente. Dois lados serão desenhados acima dos planaltos tibiais com o topo localizado nas espinhas intercondilares. Dois outros lados serão desenhados ao redor do osso trabecular sub-condral localizados perto cabeça da fíbula. A área média deve ser de 32,9 (31.4, 34.4) mm<sup>2</sup>.

FD: Um segundo quadrado será desenhado manualmente. Dois lados estarão acima dos côndilos femorais e um terceiro lado separará os côndilos femorais da patela. A linha mais próxima produziu uma linha reta em continuidade ao côndilo posterior e a última linha. A área média deve ser (32,5, 35.7) mm<sup>2</sup>. (Imagem 2)

O procedimento deve ser iniciado pela TPD deve-se espelhar o quadrado e realizar a TPE e o mesmo procedimento deve ocorrer para FDD e espelhamento para o FDE.



**Imagem 2.** *Laudo esquemático da avaliação do conteúdo mineral ósseo e densidade mineral óssea dos ratos. A região R1 corresponde a tibia próxima direita (TPD) e a região R2 corresponde a Tibia Proximal Esquerda (TPE) e as regiões R3 e R4 correspondem ao fêmur distal direito (FDD) e fêmur distal esquerdo (FDE) respectivamente.*

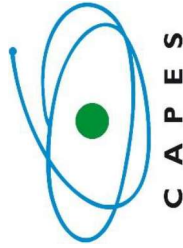


Universidade Federal de São Carlos- UFSCar  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde- CCBS  
Programa de Pós-Graduação em Gerontologia- PPGGERO  
Rodovia Washington Luís, km 235 | São Carlos | SP | CEP: 13565-905 |  
Telefone: (16) 3306-674 | E-mail: ppggero@ufscar.br



# APÊNDICE - C

## Guia de Recomendações Técnicas



São Carlos  
2020

**Orientador:** Prof. Dr. Fernando Augusto Vasilceac  
**Discente:** Camila Marques de Araújo

**LEMBRETE!**



Antes de iniciar o processo etapa lembre-se que ter os dados anotados e que esses precisam ser exatos. Logo, meça os animais já anestesiados com uma fita e os pese também anestesiados antes de iniciar o processo.

Para ligar o equipamento  
primeiro deve puxar  
chave preta que está  
localizada atrás do  
equipamento para cima



Em seguida aperte o botão verde ao lado da  
maca

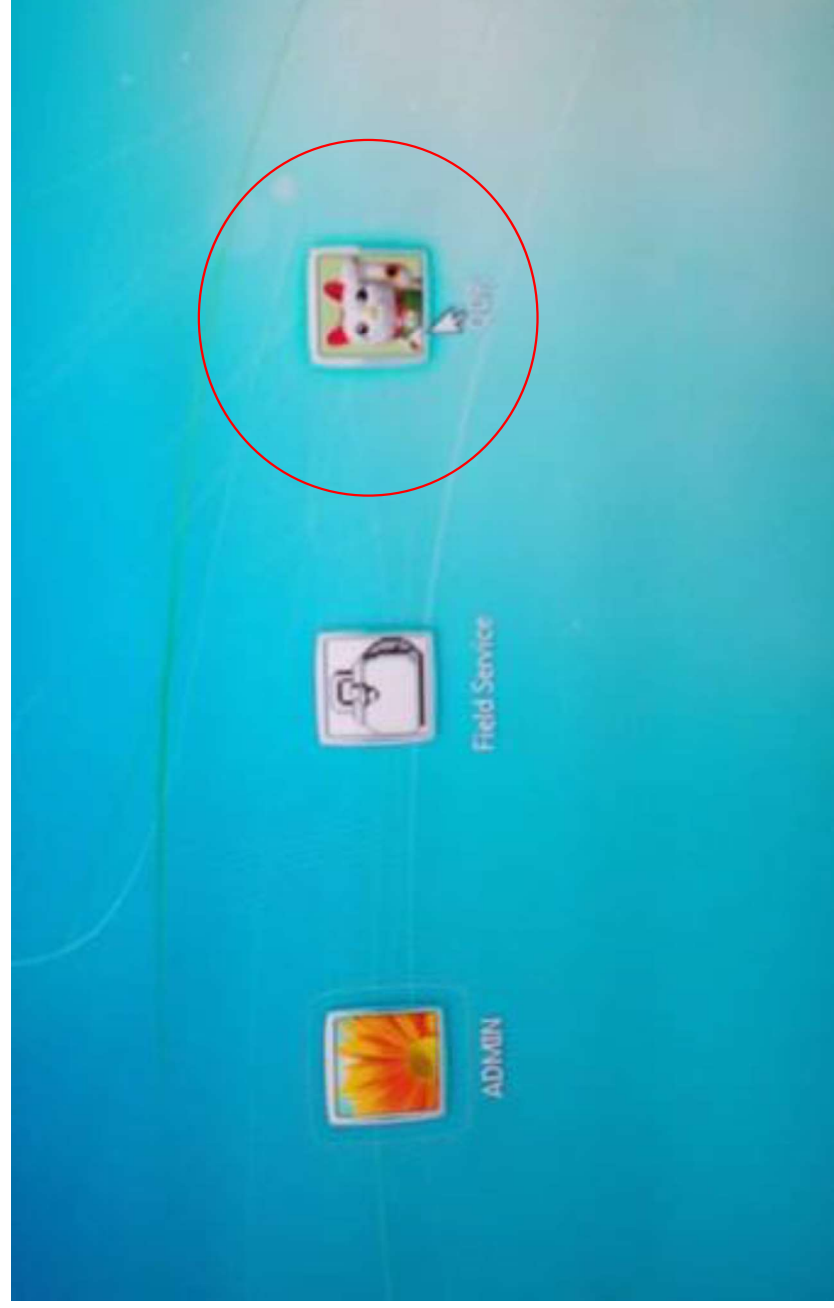






Após, ligue a CPU do  
computador

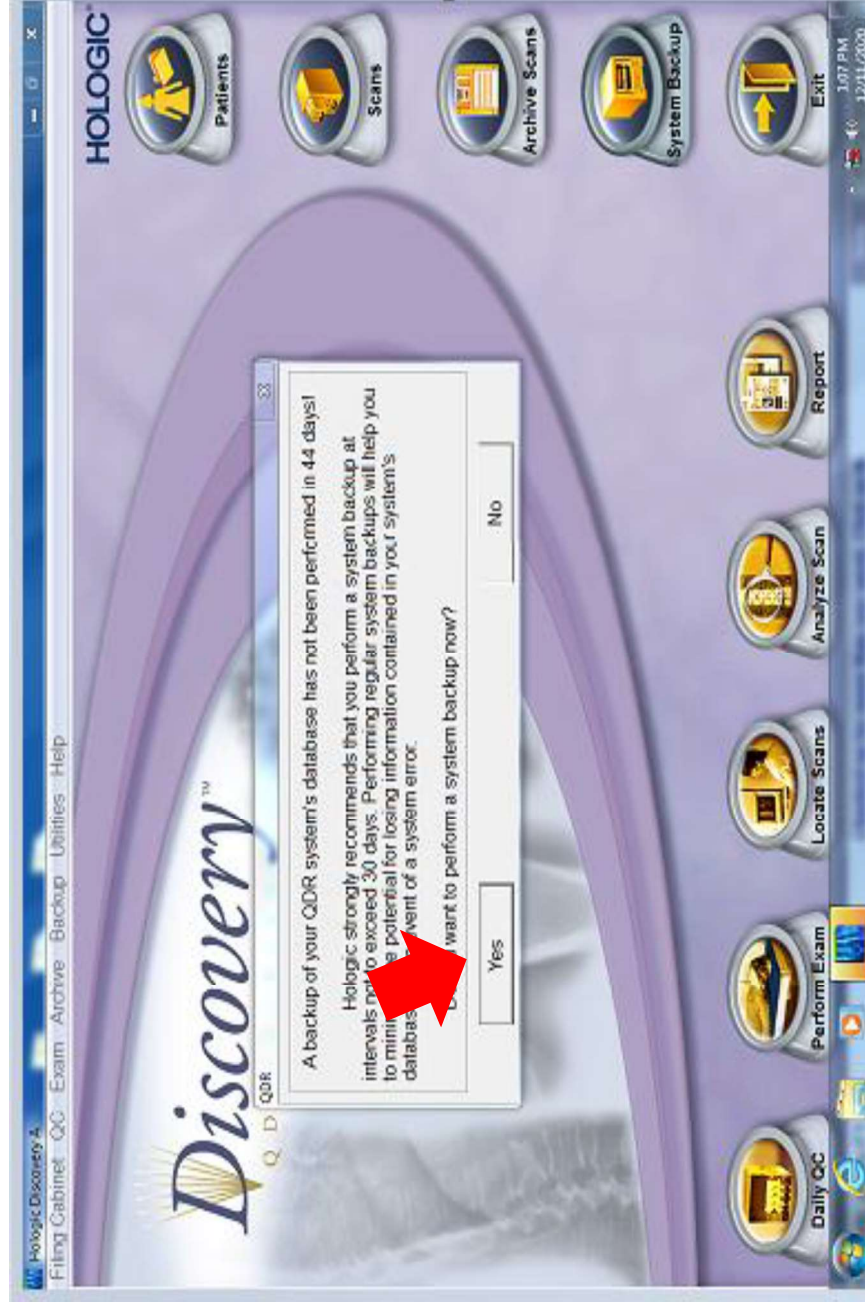
Então, você terá acesso a seguinte tela do computador. Clique em QDR e aguarde



Depois, você terá uma página semelhante a essa:

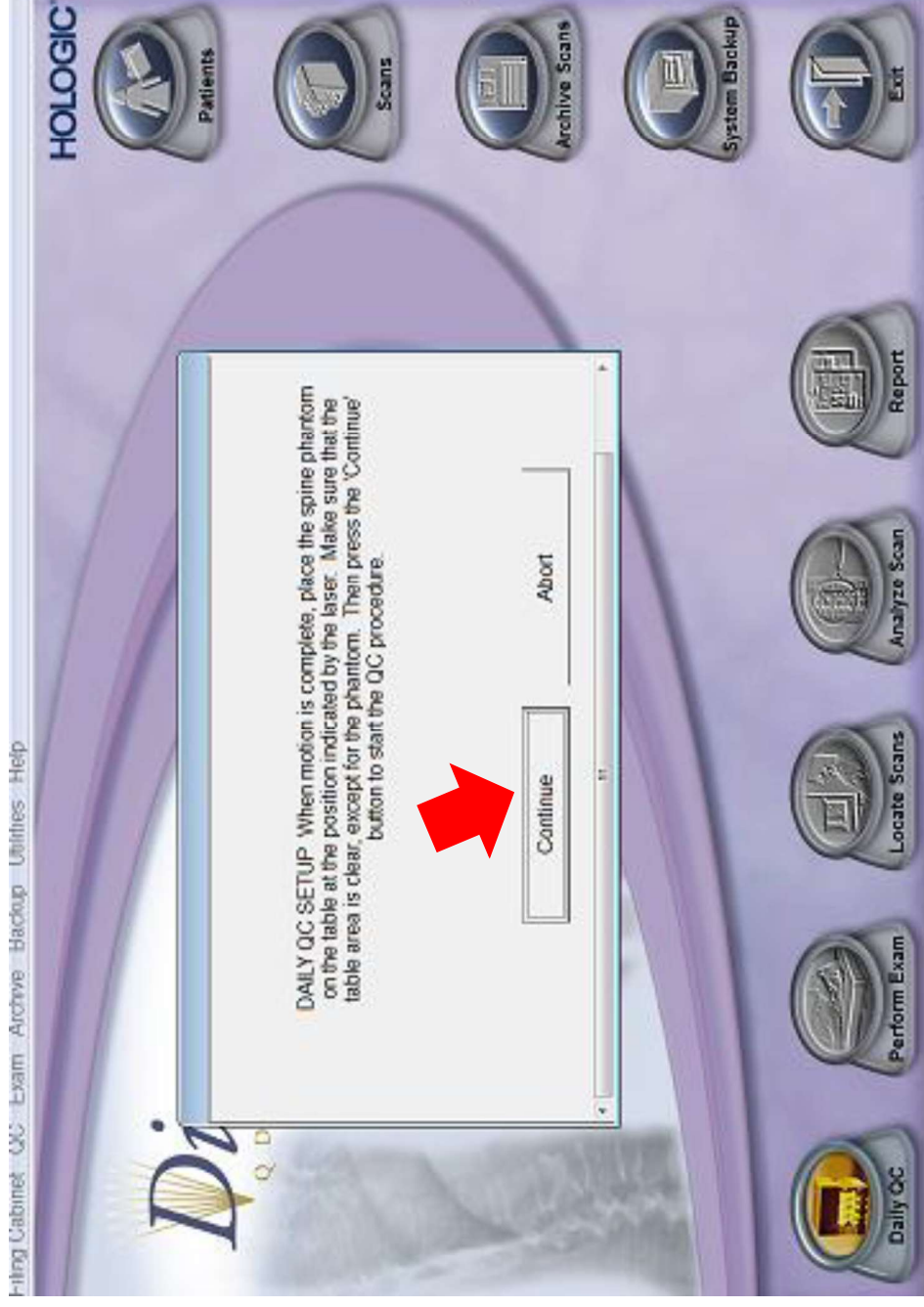


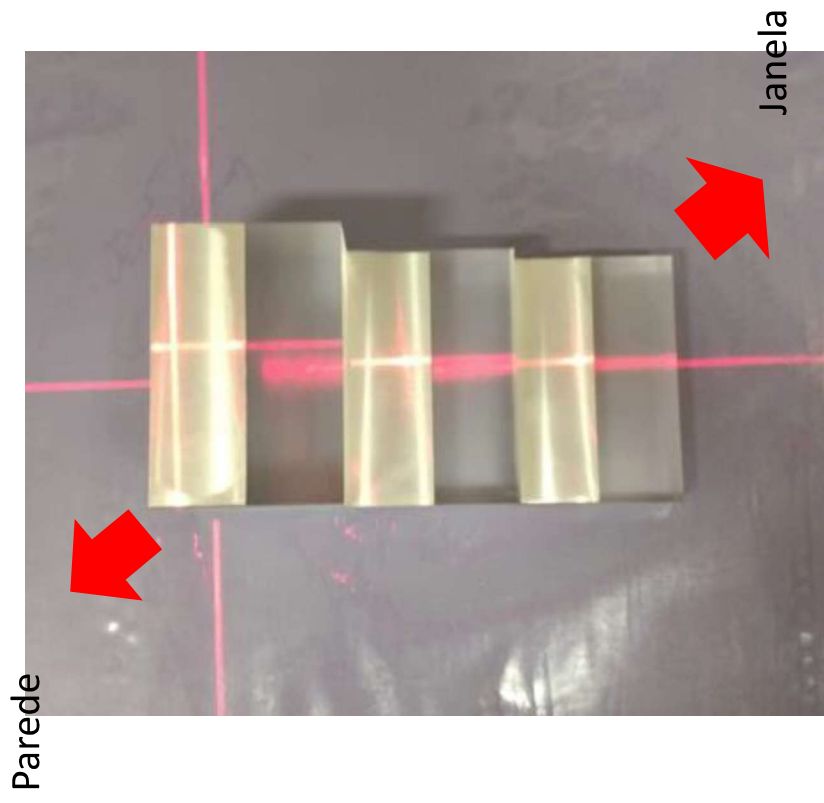
Se for a primeira vez no dia que alguém estiver utilizando o *software* essa mensagem aparecerá:



Clique em  
“yes” e  
aguarde

Quando você também for o primeiro a usar terá a necessidade de realizar o scanemanto do *Phanton*





*Posicione o rat step phantom*  
(hologic P/N 0-10-0758 Ver.  
004) 280 – 0180 Rev.002  
segundo as ordens descritas



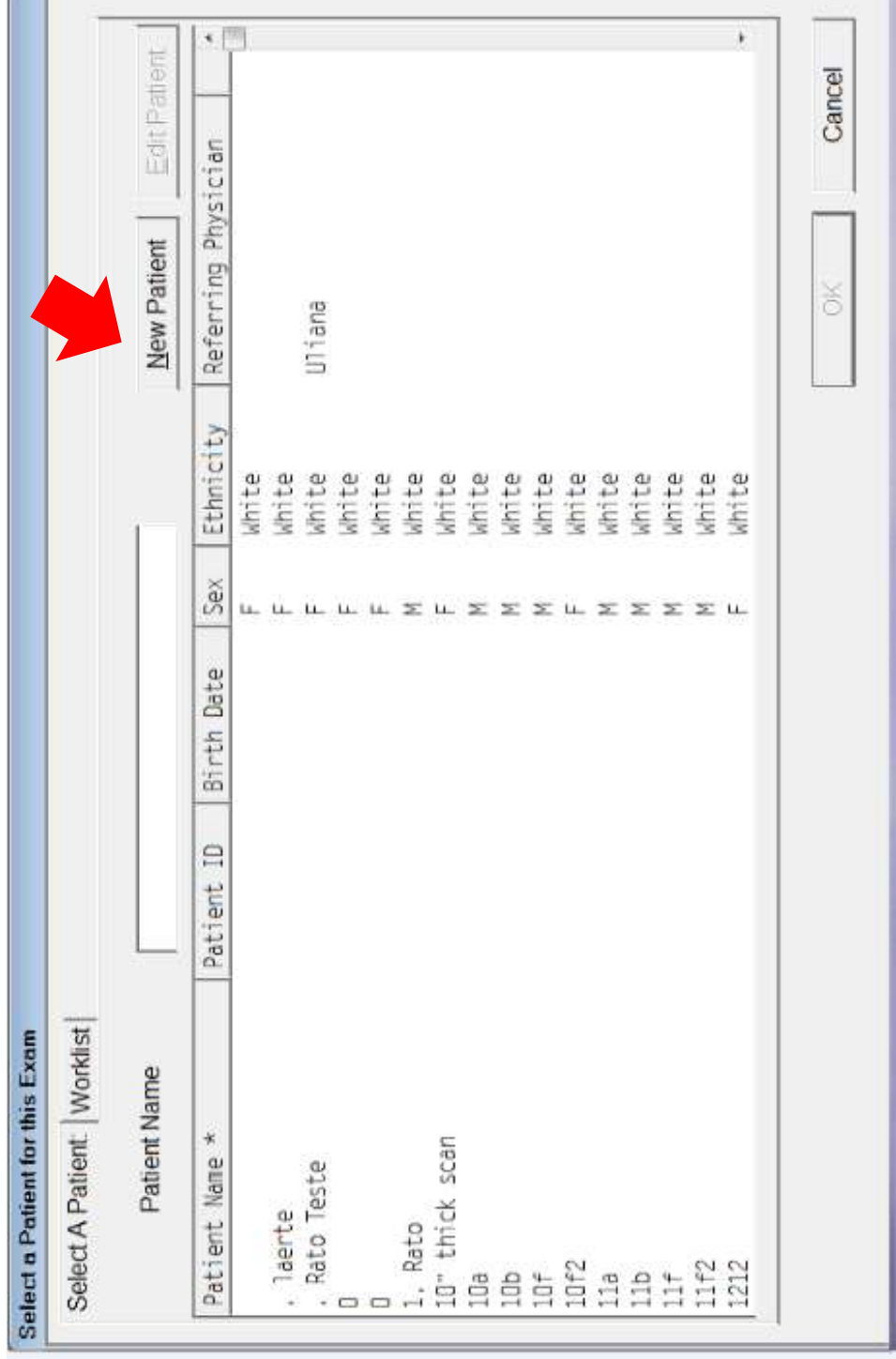
Clique  
em “ Ok ”

Para iniciar o teste clique em “Performe Exam”





Então uma tela para nomear o animal será aberta.  
Clique em “New Patient”



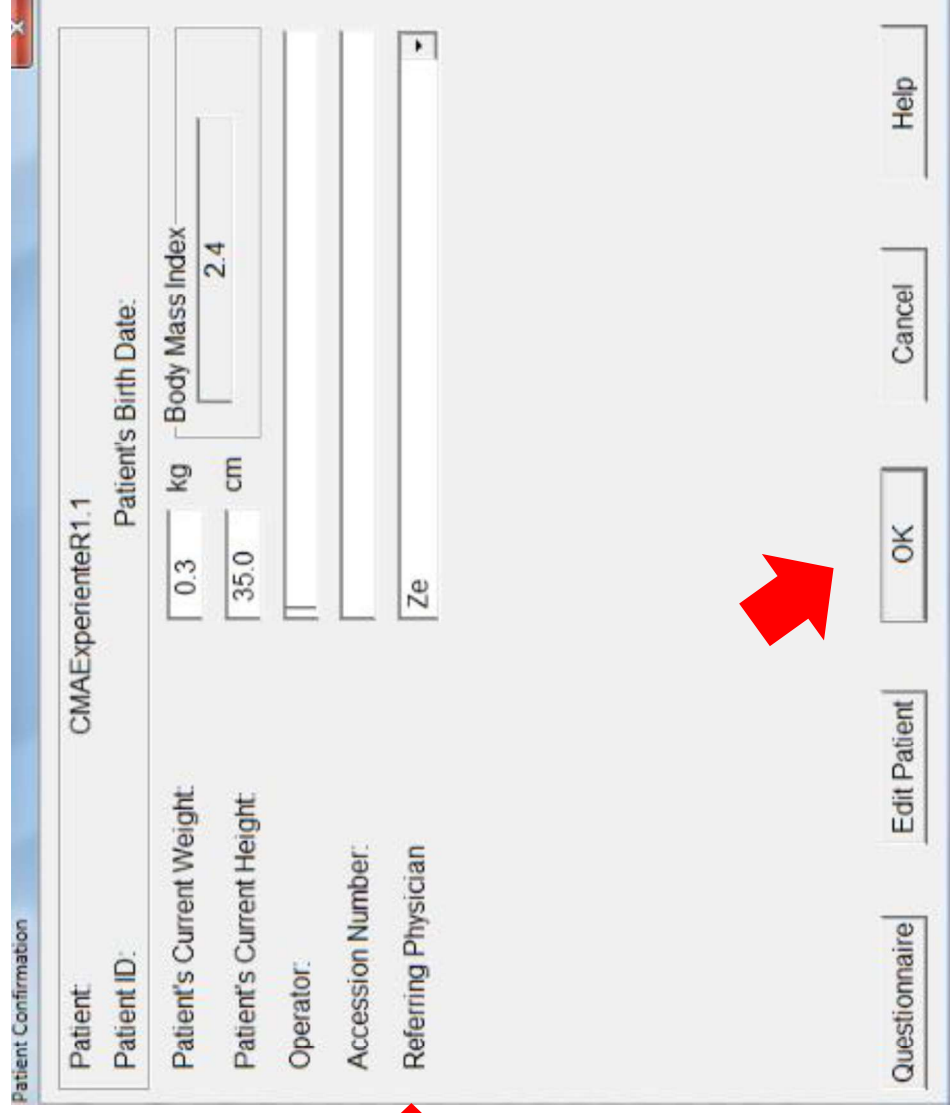
A tela para preenchimento dos dados será aberta ao selecionar o nome do animal, você terá acesso a uma tela para confirmar alguns dados preenchida “*Frist name*”, “*sex*”, “*weight*” e “*height*”. Ao finalizar clique em “*ok*”

The image shows a screenshot of a software window titled "Patient" with a tab labeled "Biography | Insurance". The form contains the following fields and controls:

- Last Name: [Text input field]
- First Name: [Text input field]
- Middle Initial: [Text input field]
- Ethnicity: [Dropdown menu with "White" selected]
- Patient ID: [Text input field]
- Identifier2: [Text input field]
- Sex: [Dropdown menu with "Female" selected]
- DOB: [Form with Month, Day, and Year dropdowns]
- Referring Physician: [Text input field]
- Menopause Age: [Text input field]
- Weight: [Text input field] kg
- Height: [Text input field] cm
- Body Mass Index: [Text input field]
- Patient Comment: [Text area]
- Buttons: OK, Cancel, Delete, Help

Red arrows point to the "Last Name" field, the "First Name" field, the "Weight" field, the "Height" field, and the "OK" button.

Em “ *patiente psycician* ” escolha Ze. Então clique em Ok

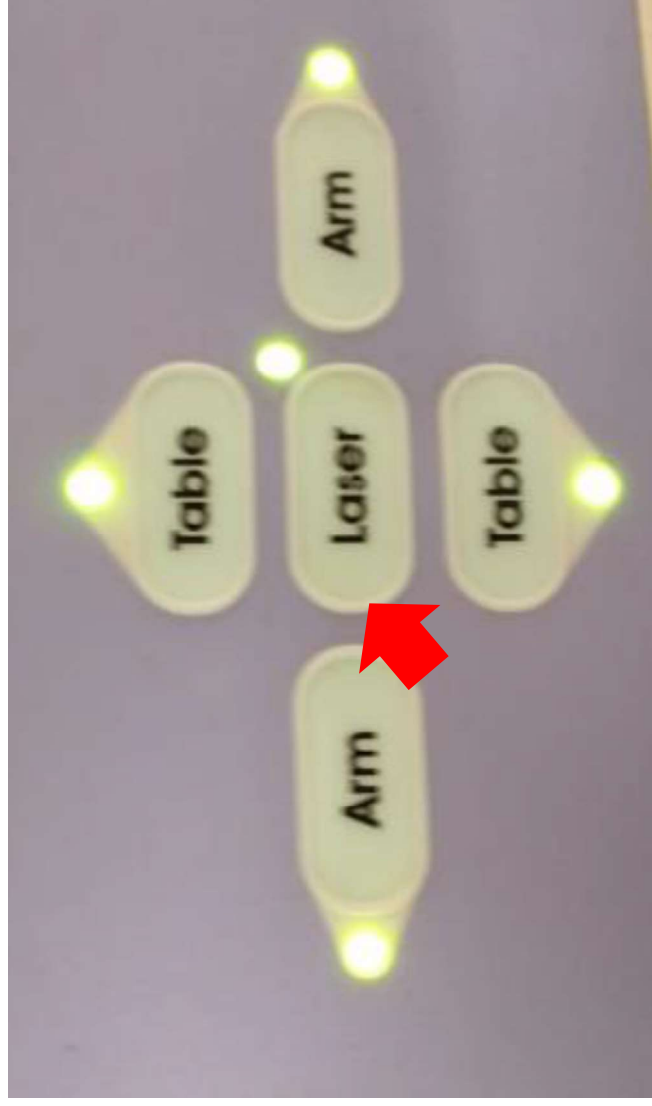


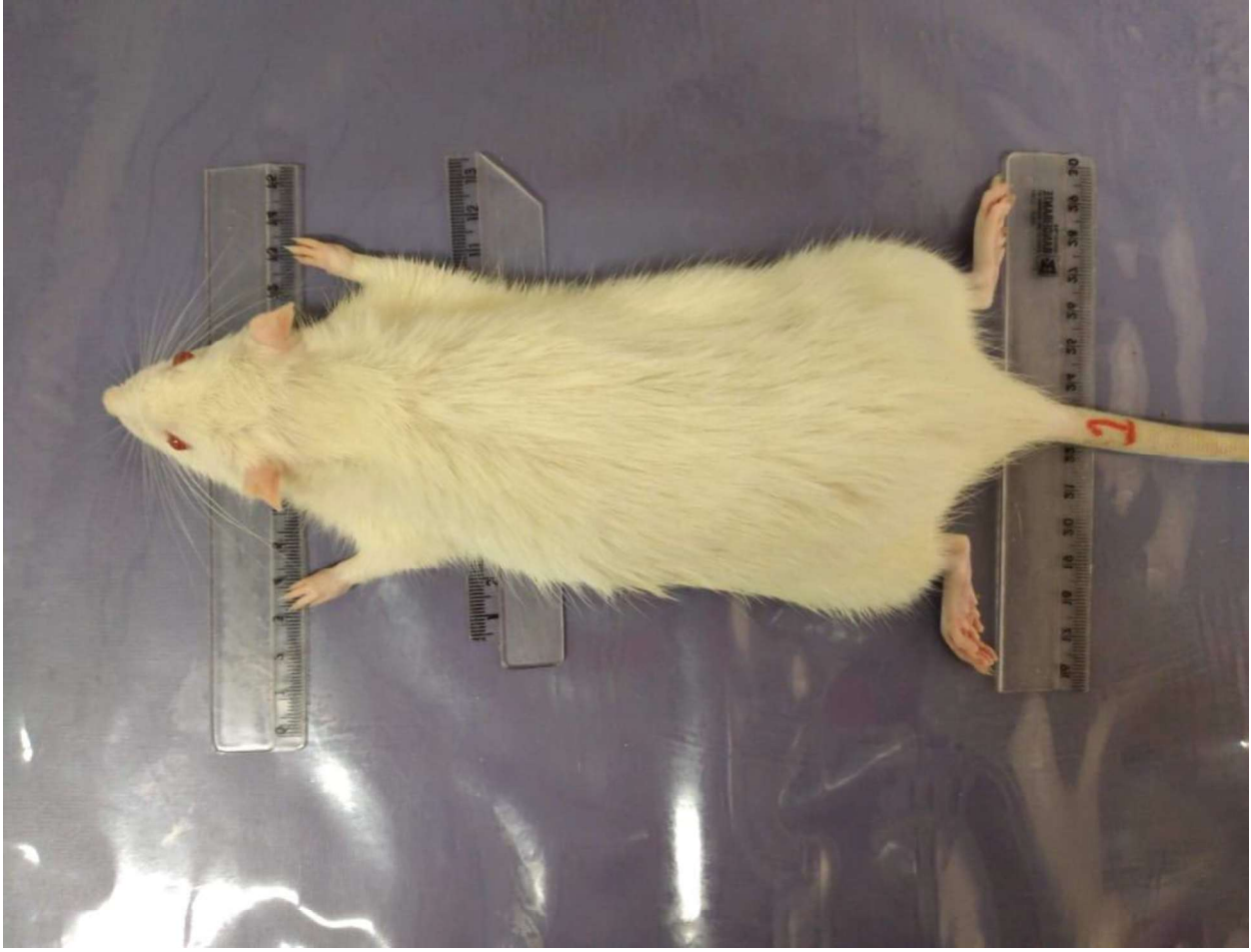
The image shows a 'Patient Confirmation' dialog box with the following fields and values:

Field	Value
Patient	CMAExperienteR1.1
Patient ID:	
Patient's Current Weight:	0.3 kg
Patient's Current Height:	35.0 cm
Operator:	
Accession Number:	
Referring Physician	Ze

At the bottom of the dialog box, there are four buttons: 'Questionnaire', 'Edit Patient', 'OK', and 'Help'. A red arrow points to the 'Referring Physician' field, and another red arrow points to the 'OK' button.

Em seguida clique, clique no botão “*laser*” na maca para auxiliar o posicionamento do animal



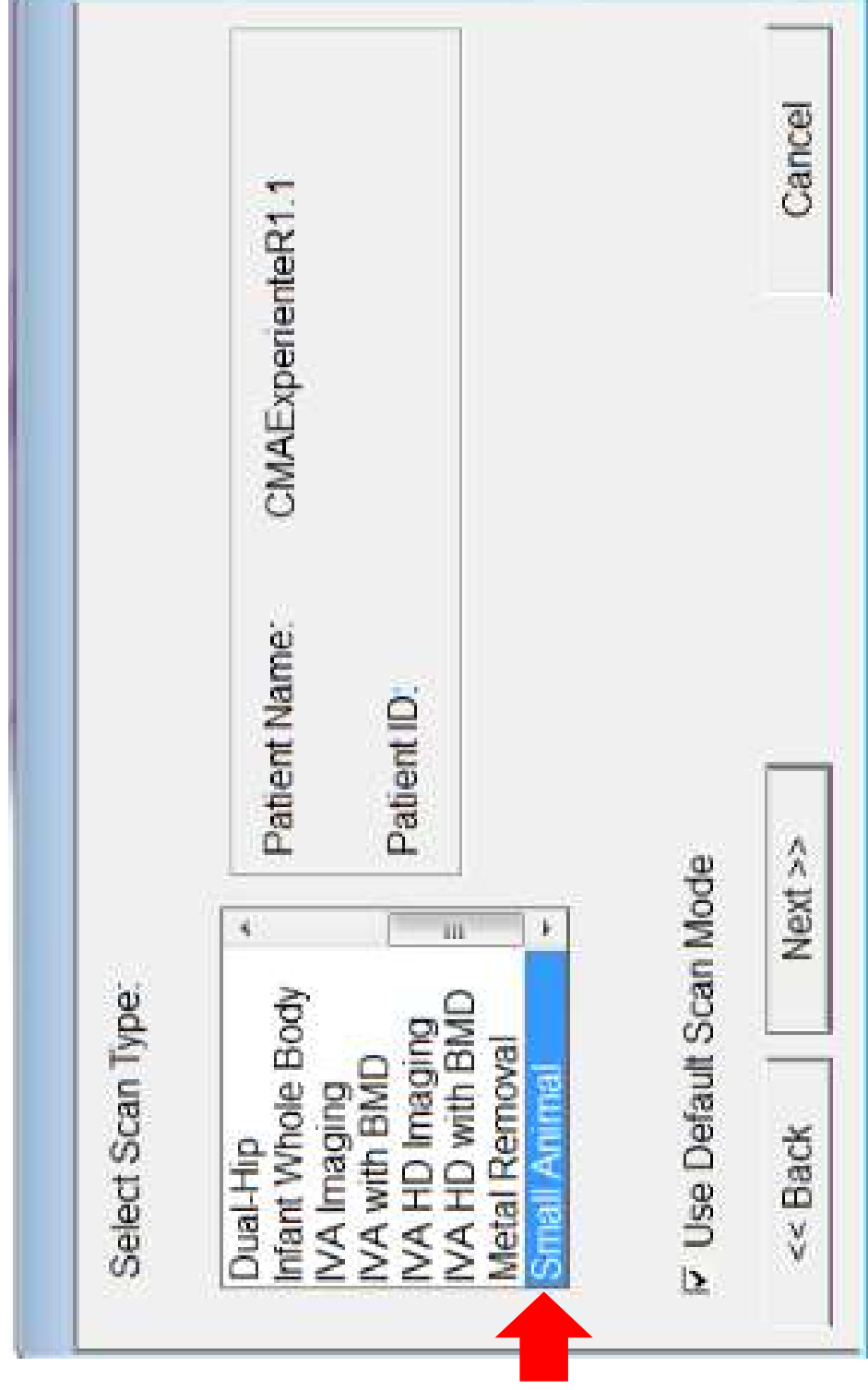


Posicione o animal na  
mesa nua. Utilize as  
regras para manter  
precisão linear.

Utilize as a fita crepe para manter a estabilidade do animal



Em seguida você poderá escolher um dos modos de análise. Escolha “*small animal*” e clique em “*next*”



Então, selecione “*Whole Body*” e clique em “next”

Select Small Animal Scan Type:

**Rat Whole Body**  
Regional High Resoluti

Patient Name: CMAExperienteR1.1

Patient ID:

<< Back    Next >>    Cancel



Confira os dados em “scan parameters” e clique em “star scan”

**Scan Parameters**

Patient Name:	CMAExperienteR1.1
Patient ID:	
Scan Type:	a Rat WB
Scan ID:	A1209200B


Scan Length	30.5	cm
Scan Width	17.9	cm
Line Spacing	0.1512	cm
Point Resolution	0.0640	cm

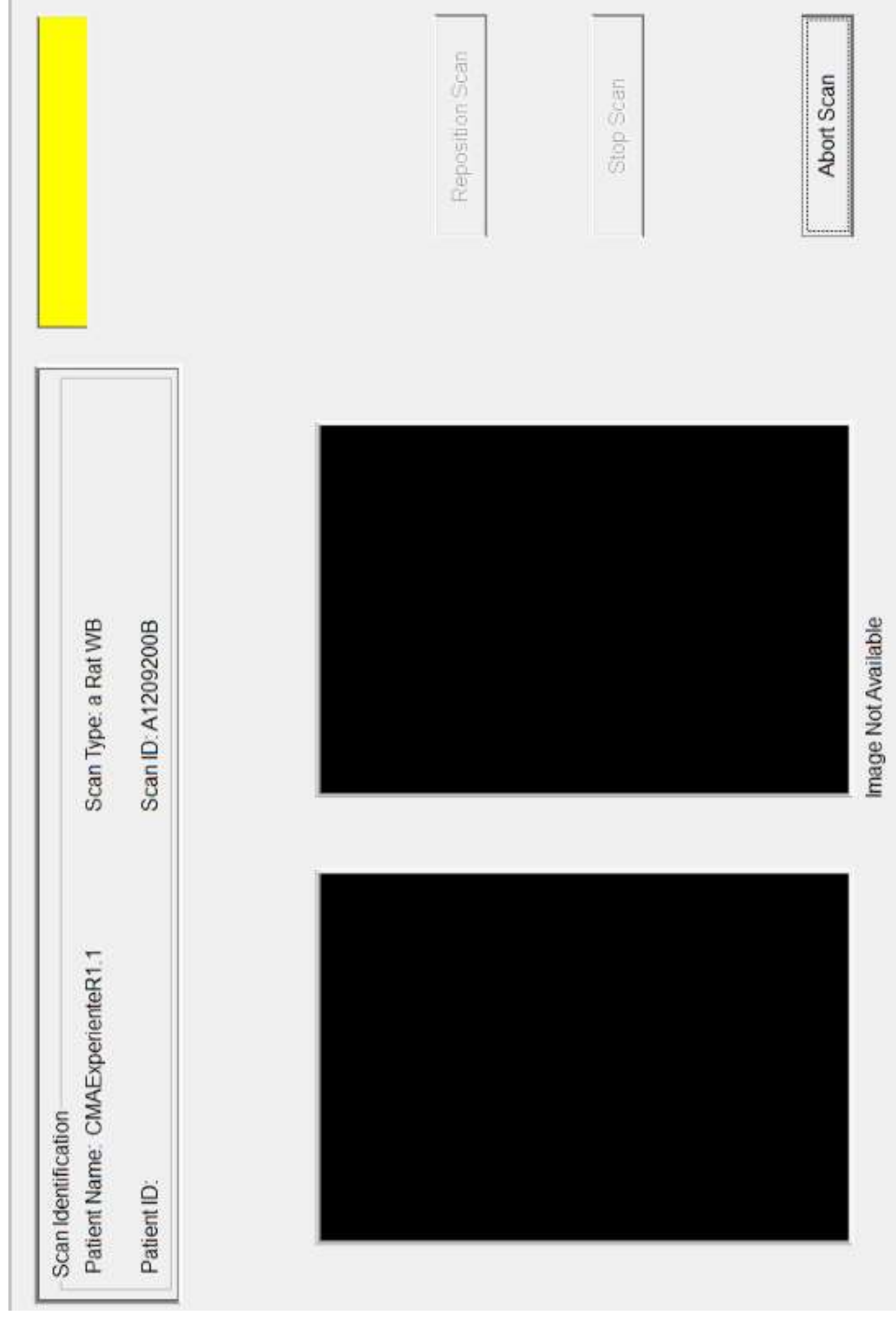
10.24 X 0.10 Coll.  
140/100 kVp  
2.5 mA avg.  
122 seconds  
60 Hz

**\*\* XRAY DEVICE READY \*\***  
You may begin scanning

Please position the patient for a Rat WB scan

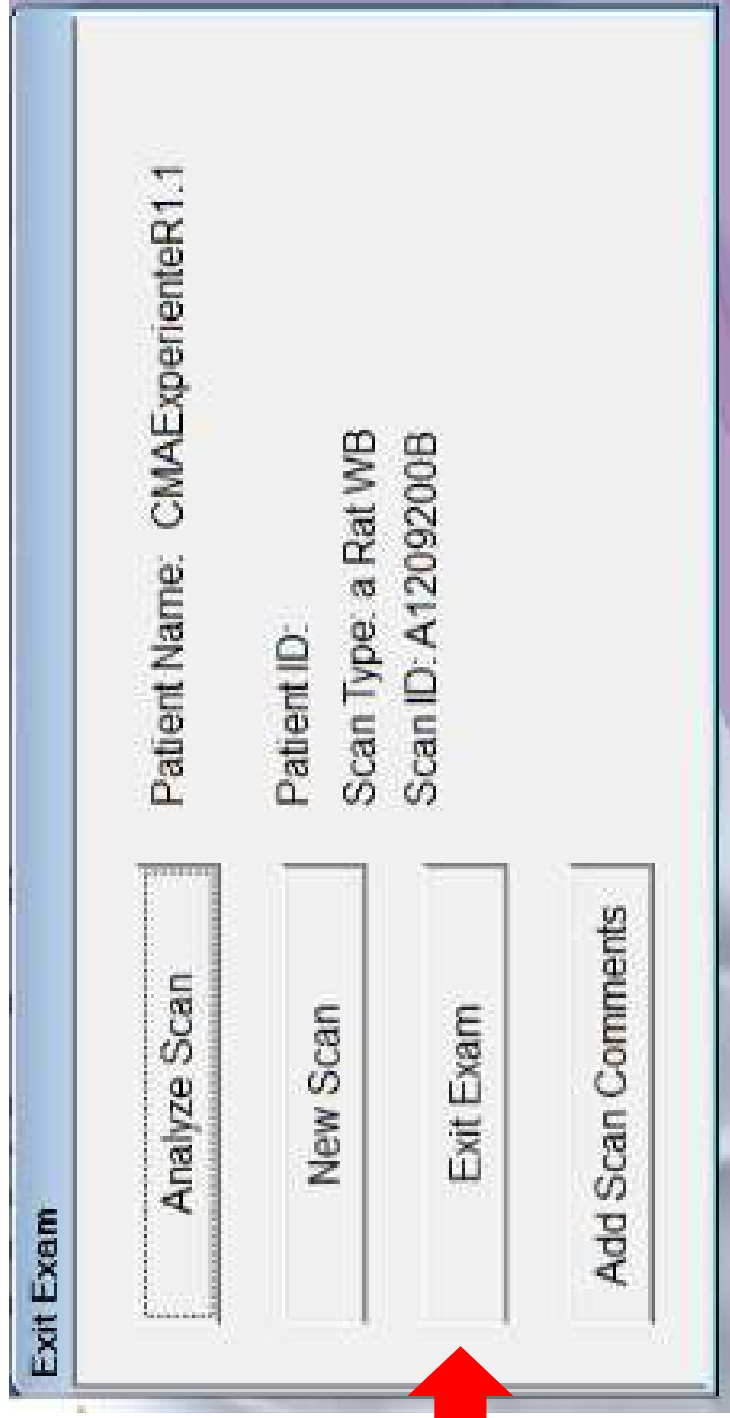


Então, o escaneamento iniciará e você poderá analisar se posicionou o animal corretamente



Após posicionar o animal clique em  
“*start scan*” realize o escaneamento **três**  
**vezes consecutivas sem movimentação**  
**do animal na maca**

Clique em “exit scan”



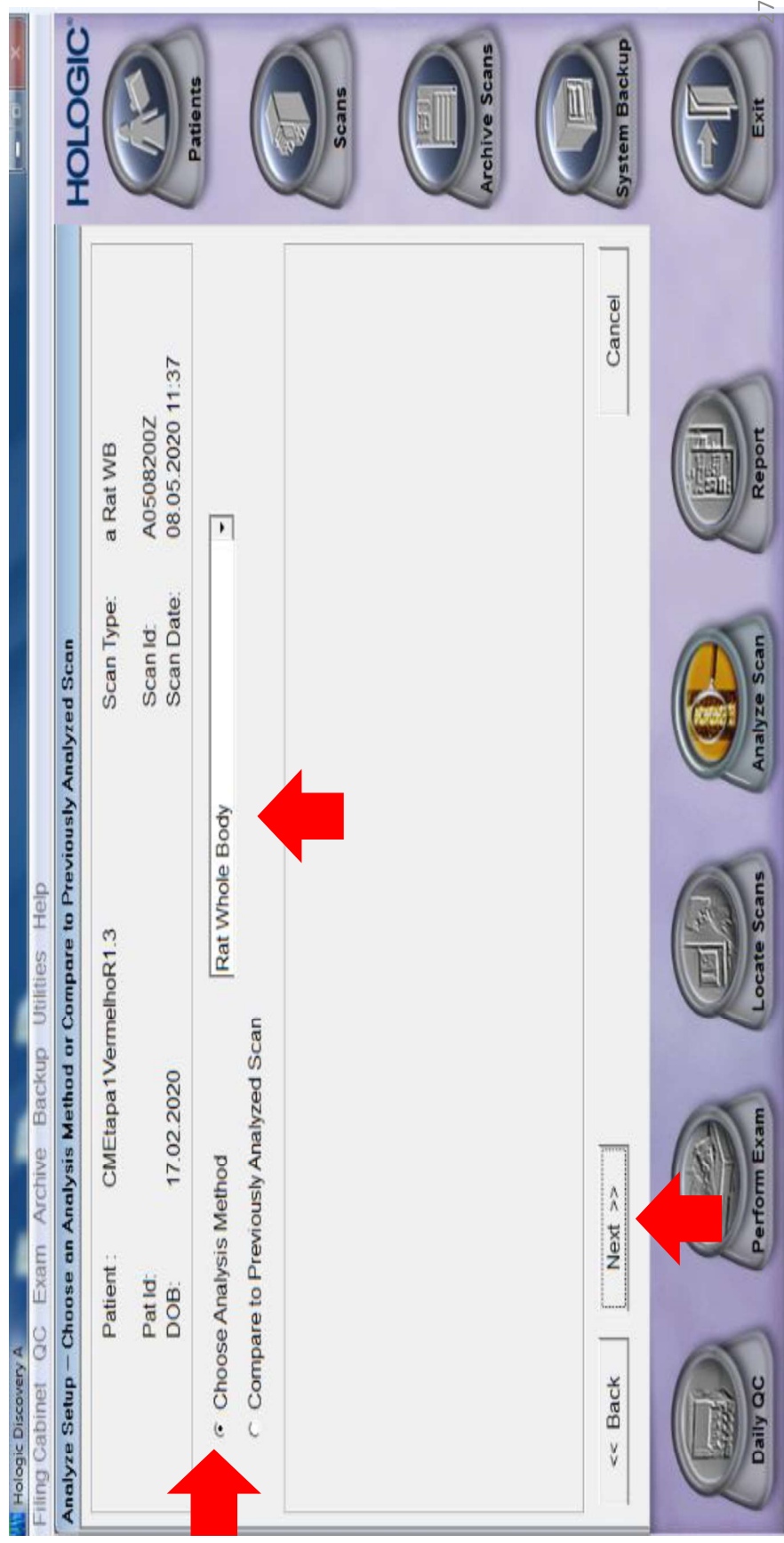
E inicie o processo por mais duas vezes.  
Clicando em “perform exam”



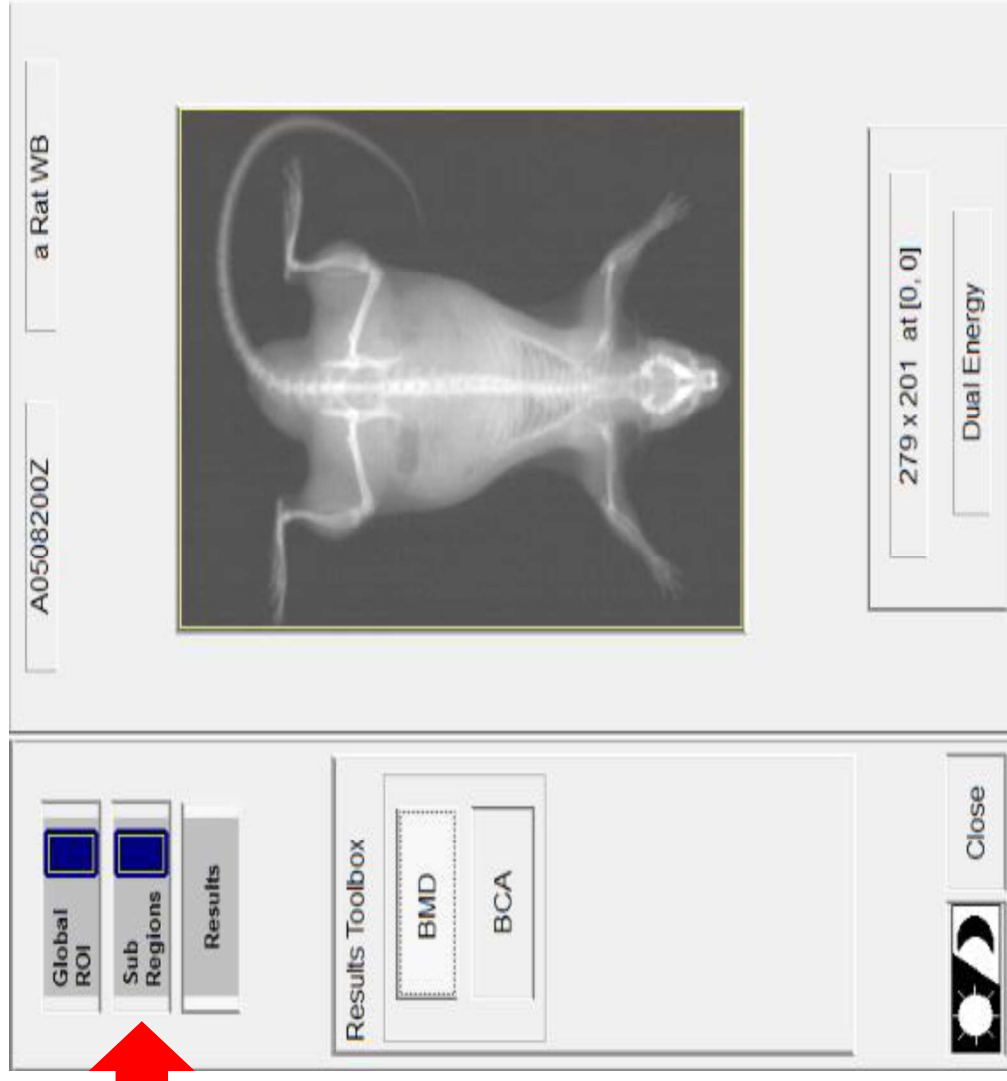
Ao finalizar o exame clique em "Analyze Scan"



Então, escolha “*choose analysis Method*” e seleccione “*rat whole body*” e clique em “*next*”

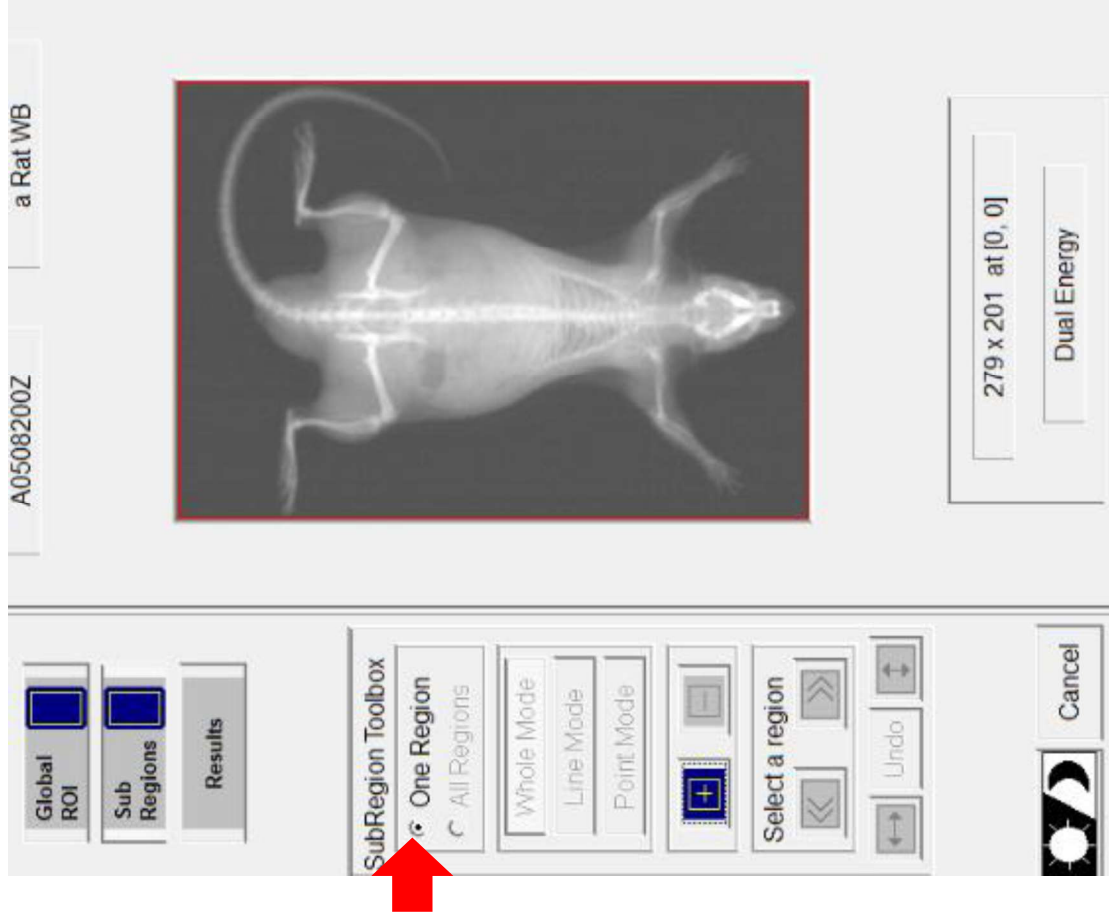


Em seguida você terá  
acesso a imagem  
abaixo. Então clique em  
“*Sub Regions*”



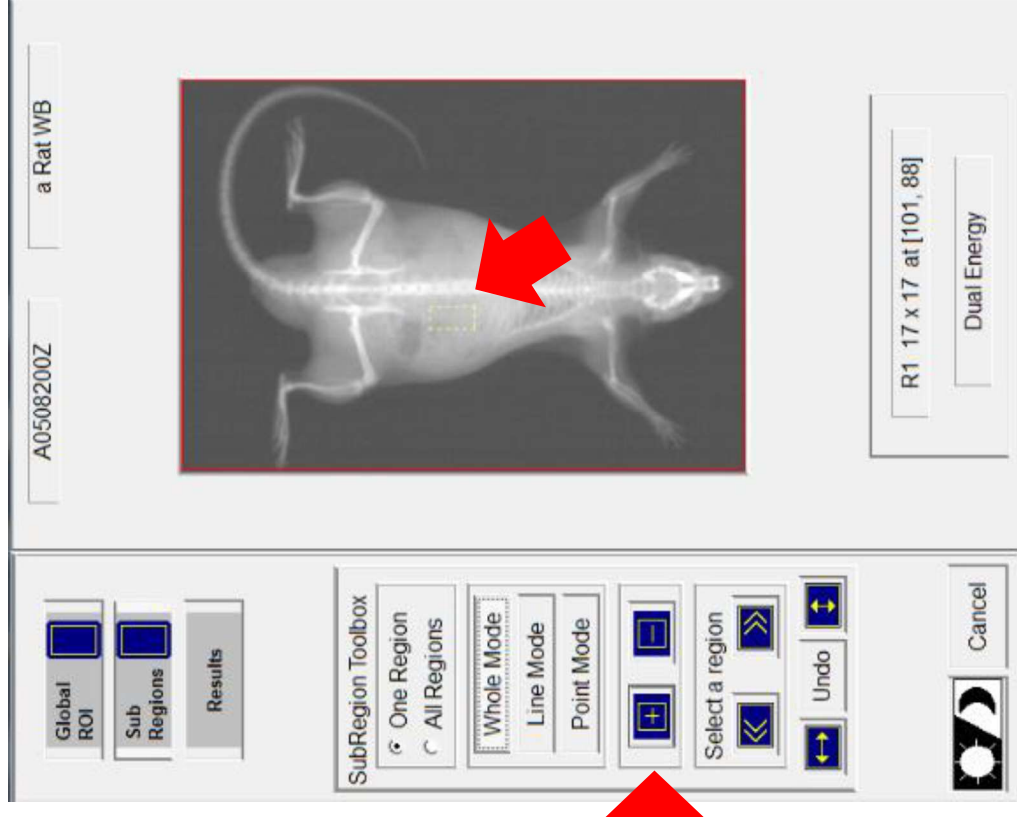


No lado esquerdo  
no item “SubRegion  
Toolbox” seleccione  
“one region”

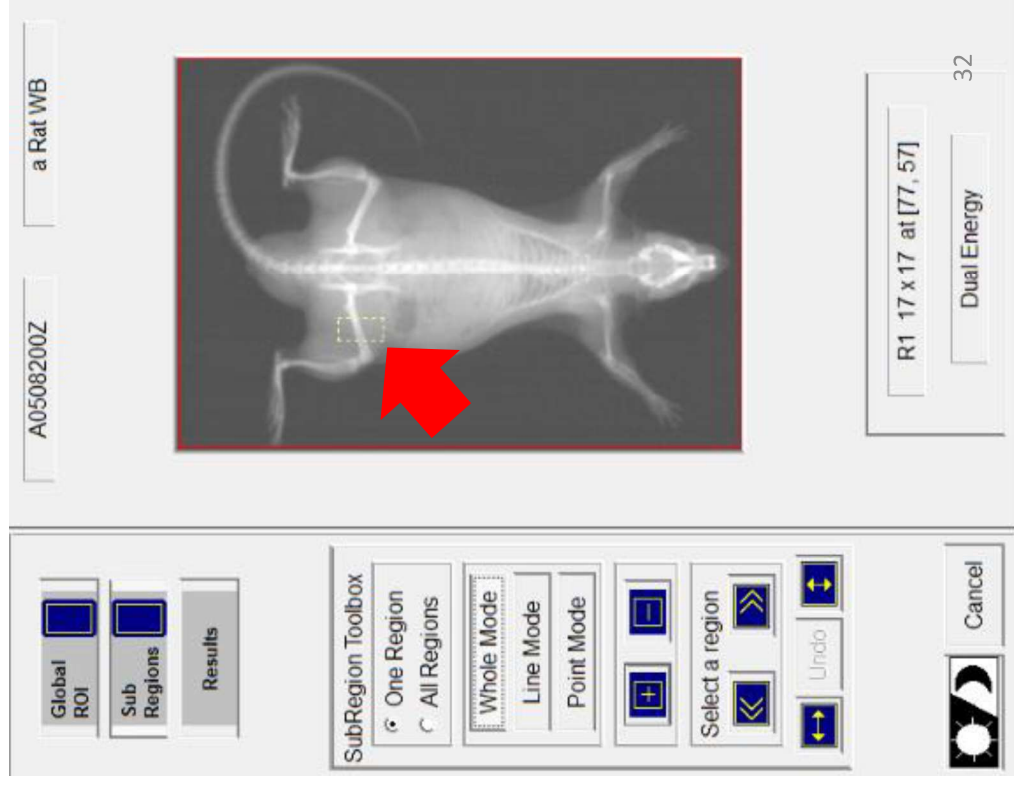


**IMPORTANTE: A região de interesse R1 deve corresponder ao TP do lado esquerdo e o R2 deve corresponder ao TP do lado esquerdo. A região de interesse R3 deve corresponder ao FD do lado esquerdo e o R4 ao FD do lado direito.**

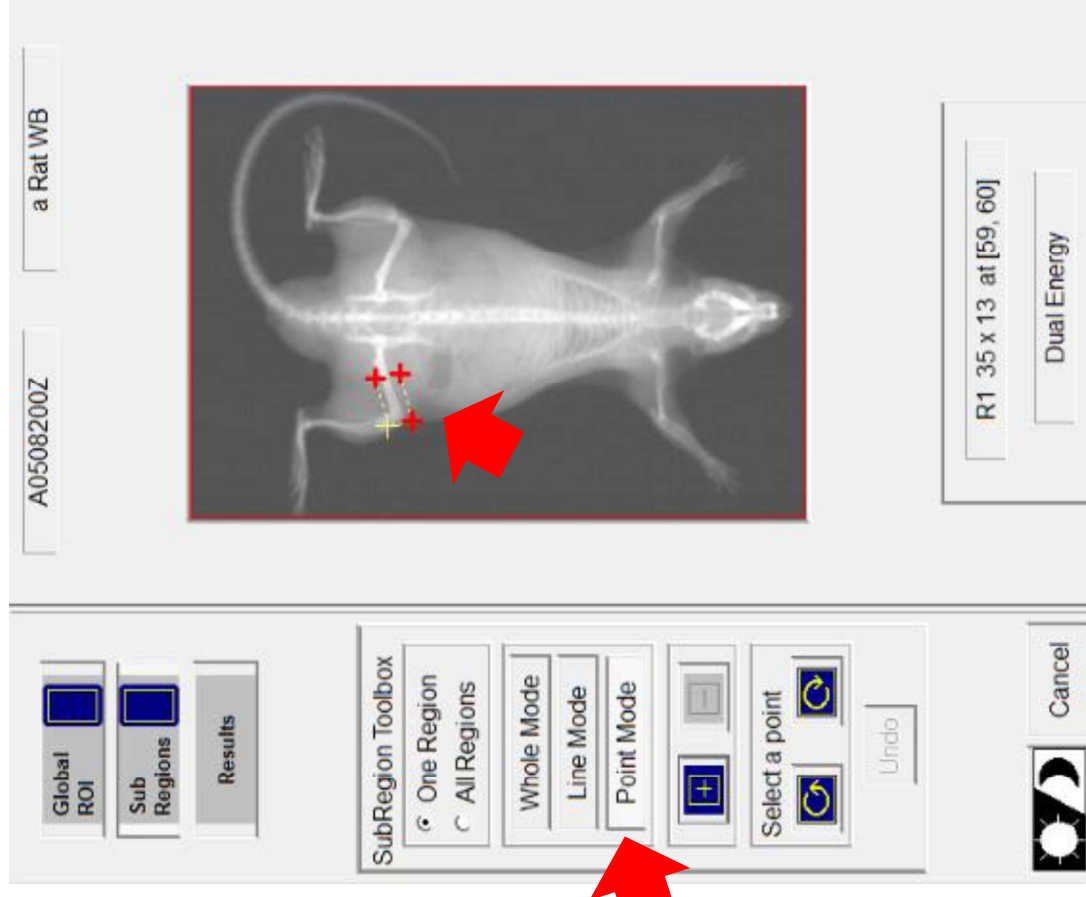
Posteriormente clique no botão [+] e com auxílio do mouse movimente o pontilhado **amarelo** até a tíbia. Veja que um quadrado **amarelo** se pontilhado **amarelo** se formará na parte central da imagem



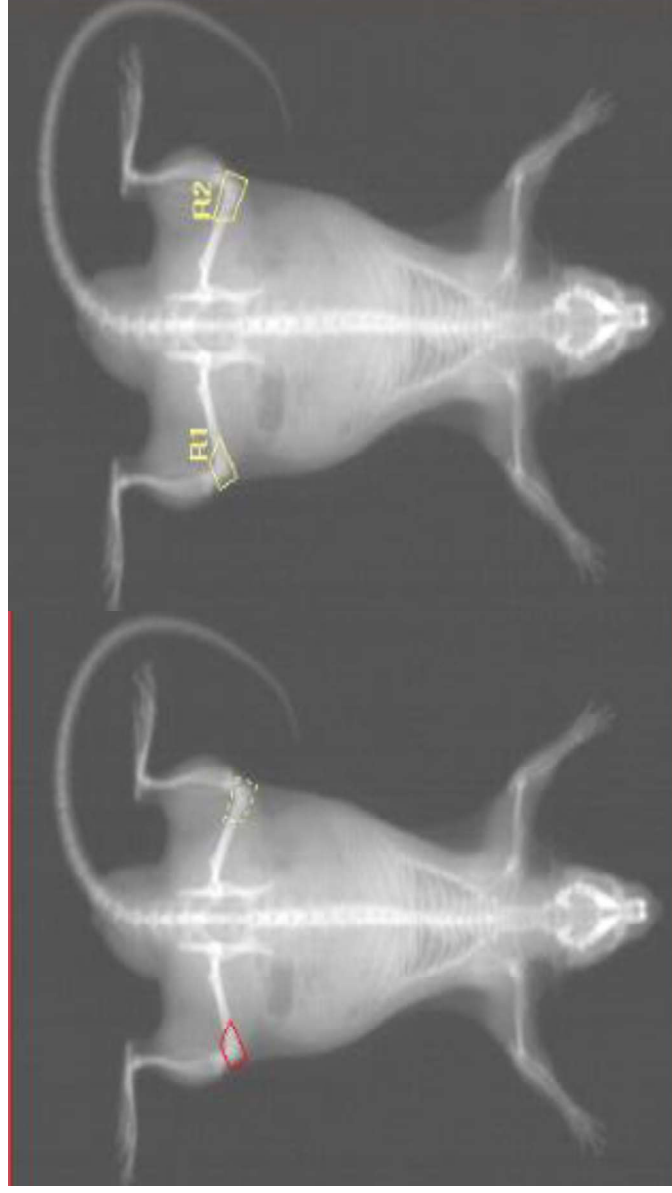
Com auxílio do mouse  
movimente o pontilhado  
**amarelo** até a tíbia



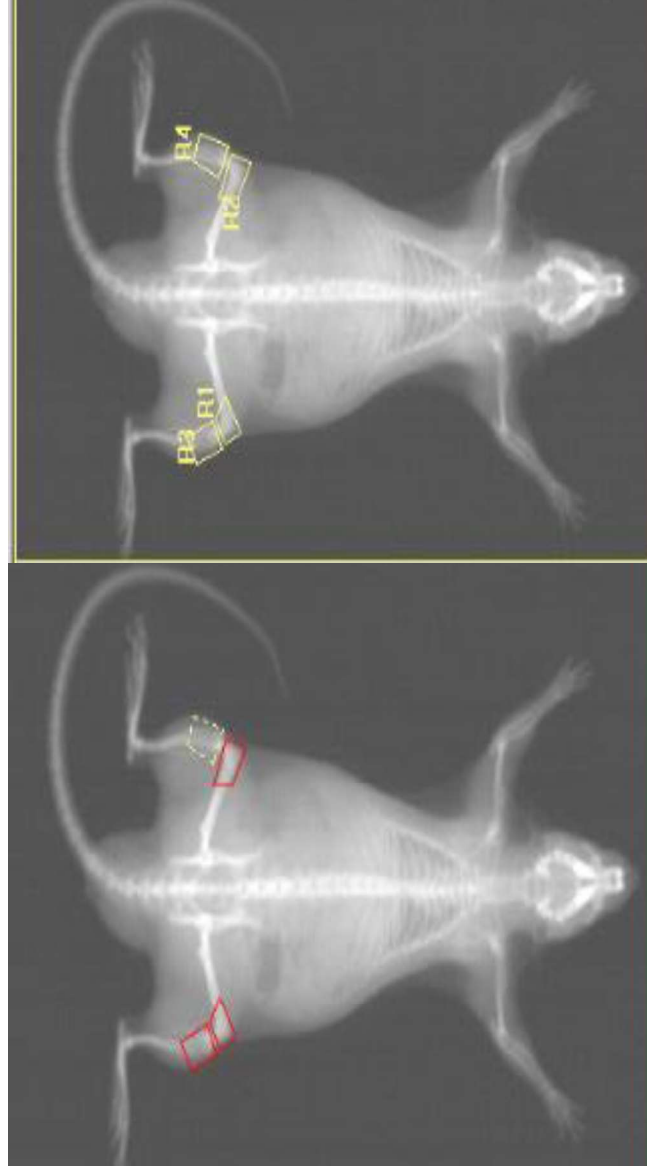
Clique em “*point mode*”  
é forme o pentágono  
formando a tíbia  
proximal



Repita o processo em ambos os joelhos. O resultado final deverá ficar semelhante a isso:



Como descrito anteriormente clique em [+] e com auxílio do mouse movimente o pontilhado **amarelo** até o fêmur. Clique em “*point mode*” é forme o quadrado formando o fêmur distal. Repita o processo em ambos os joelhos. O resultado final ficara semelhante a isso:



**CONFIRME: A região de interesse R1 deve corresponder ao TP do lado esquerdo e o R2 deve corresponder ao TP do lado esquerdo. A região de interesse R3 deve corresponder ao FD do lado esquerdo e o R4 ao FD do lado direito.**



Quando finalizar de confeccionar as regiões de interesse clique em “*results*” onde você poderá conferir sua análise. Em seguida clique em “*close*”;

The screenshot displays a software interface for rat whole body analysis. At the top left, there are buttons for 'Global ROI', 'Sub Regions', and 'Results'. The 'Results' button is highlighted with a red arrow. Below these buttons is a 'Results Toolbox' containing 'BMD' and 'BCA' buttons. The central part of the interface shows a grayscale image of a rat with four regions of interest (R1, R2, R3, R4) highlighted in yellow. To the right of the image is a control panel with a text box showing '279 x 201 at [0, 0]' and a 'Dual Energy' button. At the bottom right, there is a 'Close' button with a red arrow pointing to it. The top right section contains patient data and a table of results.

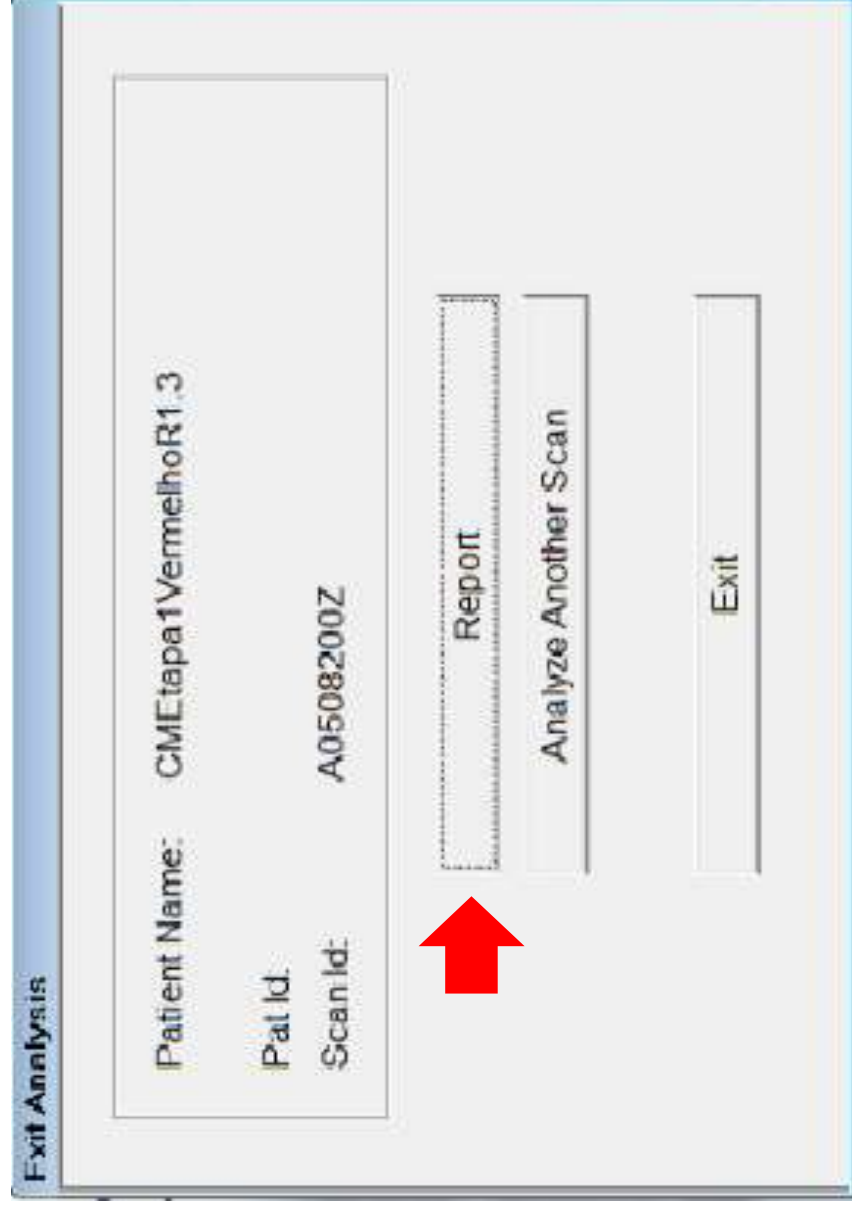
**Patient Data**  
Scan Date: 08.05.2020 11:37  
Name: CMEtapa1VermelhoR1.3  
Pat Id: M  
Birthdate: 17.02.2020  
Height: 90.0 cm  
Ethnic: White  
Sex: M  
Age: 0  
Weight: 0.4 kg

**Rat Whole Body Analysis**  
Image not for diagnostic use  
k=1.194 d0=66.0 t=

C.F.	1.035	1.013	1.000
Region	Area(cm <sup>2</sup> )	BMC(g)	BMD(g/cm <sup>3</sup> )
GLOBAL	75.9702	10.9735	0.1444
R1	0.9316	0.1653	0.1775
R2	1.2069	0.1872	0.1551
R3	1.1116	0.1361	0.1224
R4	1.2386	0.1464	0.1182
NETAVG	4.4888	0.6349	0.1414

Discovery A SN: 88385  
Version 13.5.3 :3 05.12.2020 14:34

Para passar para PDF os dados logo após de  
terminar suas análises, clique em “Report”



E em seguida se optar por checar o documento antes clique em “*preview*” caso contrário, clique em “*print*”

Print

Name: CMEtapa1VermelhoR1.3

Patient ID:

Edit comment...

DICOM / IMA report

Select report type and number of copies to print:

Filing

Interpreting

Referring

Rate of change

1

0

0

0

Print...

Preview...

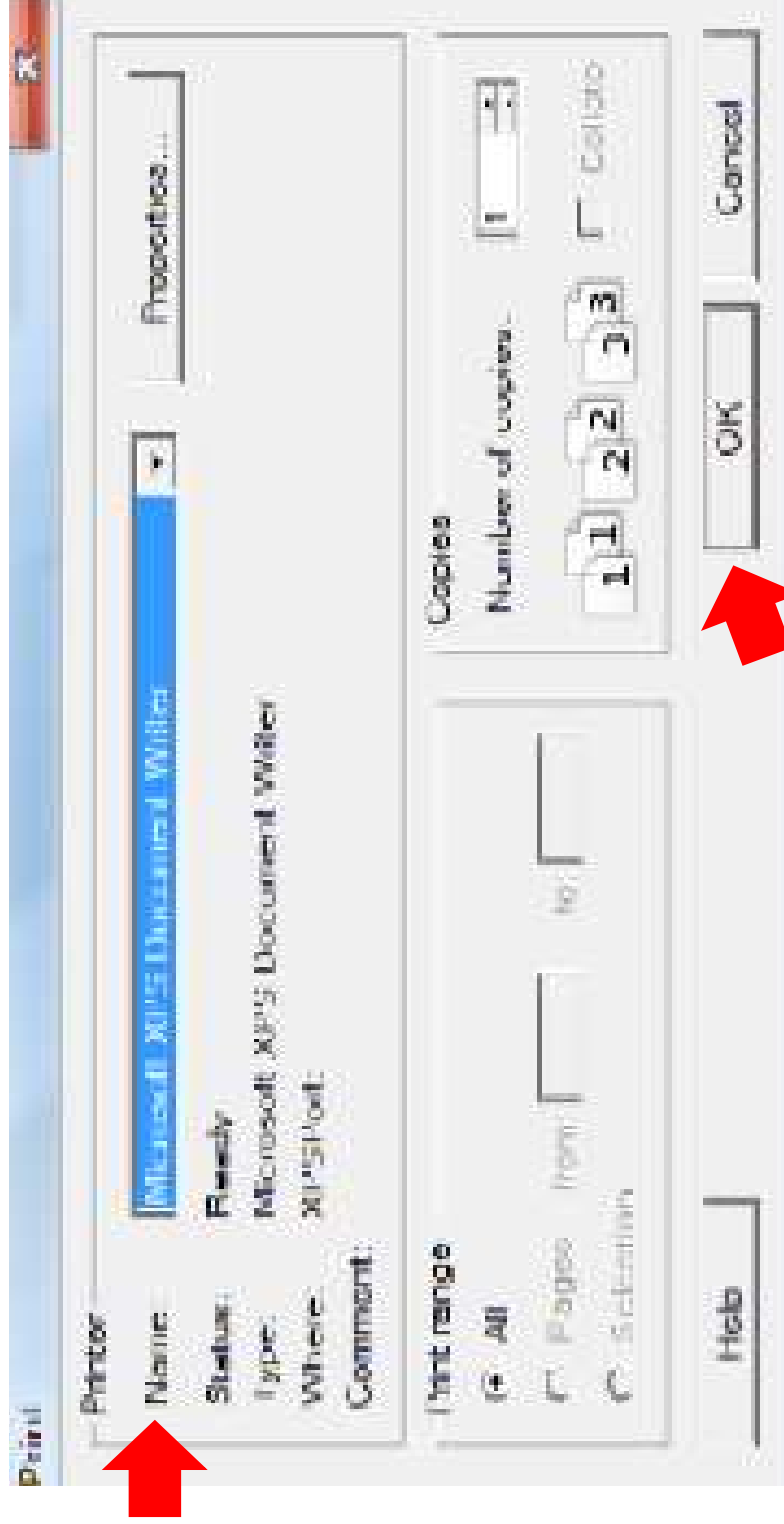
Print: Questionnaire

Configure Reports...

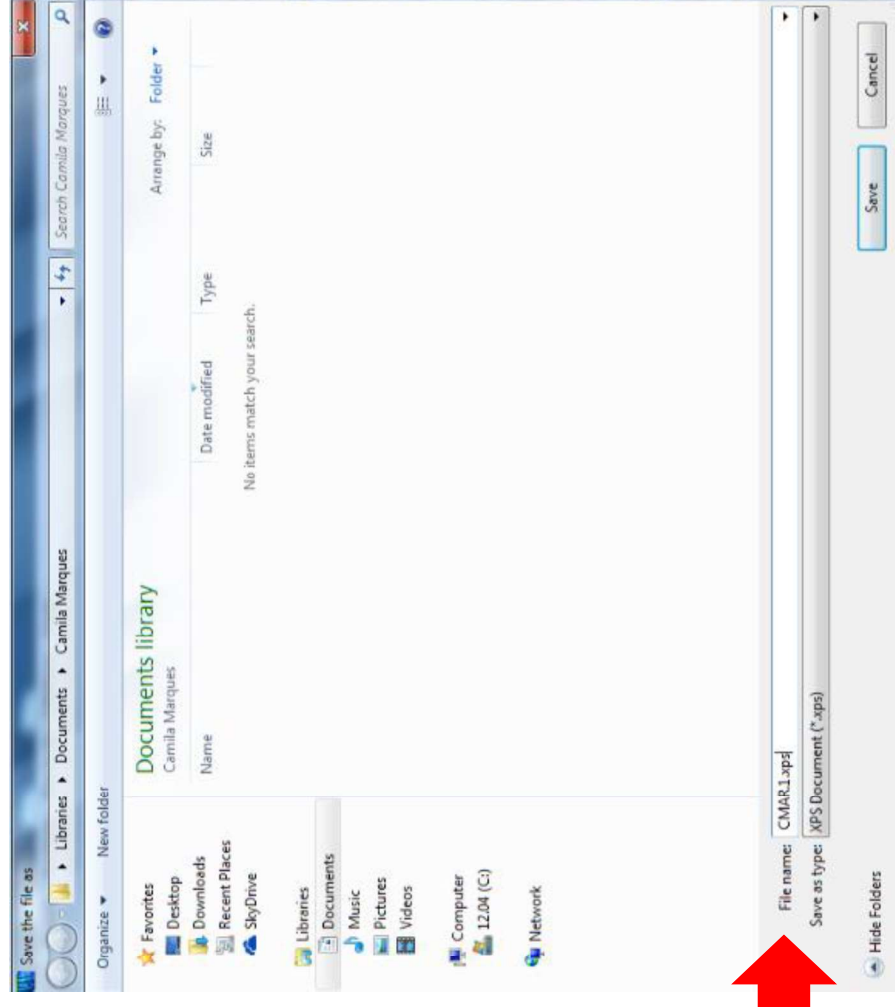
Close

<< Back

Posteriormente, em “Name” selecione “Microsoft XPS Document Writer” e clique em “Ok”



Uma página para salvar o documento abrirá em “file name” selecione o nome indicado pela responsável da pesquisa. Não esqueça de manter o .xps ao final do nome. Então, clique em “save”



Ao finalizar suas análises clique em “Exit” na página principal do software, desligue o computador.



*Obrigada!*

## FORMULÁRIO 1/4

CPF: 34686092809 Finalidade: Pesquisa

Título da proposta (Português): Dual energy x-ray absorptiometry: Desenvolvimento, validação e reprodutibilidade de recomendações técnicas para osteoartrite de ratos

Título da proposta (inglês): Dual energy x-ray absorptiometry: Development, validation and reproducibility of technical recommendations for osteoarthritis rat model

Responsável: Fernando Augusto Vasilceac

Celular: 16-996099688 e-mail: fervasilceac@ufscar.br

CV. Lattes: <http://lattes.cnpq.br/1220838672192063>

Área: Gerontologia Campus: São Carlos

Experiência: Sim : 4 anos ano(s) Treinamento: Sim : 12 mes(es)

Vínculo: Aluno de Graduação

Obj. Acadêmico: Mestrado Patente: Não

Grande área: Interdisciplinar específica: Saúde e biológicas

Patrocínio: Governamental Patrocinador: CAPES

Chefe de Depto: Márcia Regina Cominetti e-mail: mcominetti@ufscar.br

## FORMULÁRIO 2/4

Instituição participante: 1: Universidade Federal de São Carlos

Resumo: Objetivo: desenvolver, validar e tornar reprodutível técnicas e regiões de interesse para utilização do DXA para análise de joelho de ratos em diferentes tempos da OA confeccionando um guia ao final do estudo. Metodologia: O projeto será dividido em 2 fases: Fase 1:Desenvolvimento contendo duas etapas. 1º Etapa: Experimentação o grupo Osteoartrite (OA) grupo será submetido a transeção do ligamento cruzado anterior para indução da OA na 14ª semana. Os animais serão anestesiados e escaneados pelo DXA na 14ª, 19ª e 24ª semanas. Posteriormente ao escaneamento todas as imagens dos animais serão analisadas e serão confeccionadas regiões de interesse no fêmur e tíbia identificando as variáveis densidade mineral óssea e conteúdo mineral ósseo. 2ª Etapa: Confeção de uma nova recomendação será realizado as normatizações e padronizações das técnicas para utilização do DXA em ratos e orientações específicas para regiões de interesse de ratos com OA de joelho. A Fase 2: Validação será dividida em 2 etapas. 1ª Etapa: Verificação e Avaliações serão realizadas os treinamentos com pesquisadores experientes e inexperientes no uso do DXA para posicionamento do animal e seleção de regiões de interesse. 2ª Etapa: Reprodutibilidade Nesta etapa um novo grupo realizará as atividades propostas no novo guia de recomendação sem nenhum treinamento. Serão realizadas análises estatísticas nesta etapa também: avaliação de precisão, coeficiente e variação, confiabilidade e correlação.

Objetivos: O objetivo deste presente estudo é desenvolver, validar e tornar reprodutível técnicas e regiões de interesse para utilização



do DXA para análise de Joelho de ratos em diferentes tempos da Osteoartrite confeccionando um guia de recomendações ao final do estudo.

**Justificativa e relevância:** Embora haja resultados positivos em pesquisas, vários autores descrevem lacunas quanto ao uso do DXA em relação aos seus resultados e replicabilidade (NORCROSS & VAN-LOAN, 2004). Fuller et al (1992) observaram que ao realizar análises com todas as variáveis incluídas no DXA foi possível observar que a falta de precisão na posição utilizada durante o escaneamento resultou em variações os resultados finais. Logo, apesar da pesquisa concluir que o DXA permite análises de corpo total de forma válida ele não se apresentou uma ferramenta reprodutível. JEBB (1993) observou havia uma não replicabilidade metodológica em relação ao DXA quando analisados tecidos moles como a gordura e realizaram uma pesquisa com intuito de identificar se o DXA era um equipamento adequado para análises de gordura. Os resultados finais indicaram que o DXA possibilita a análise do tecido mole individualmente, porém, em relação as regiões de intense os pesquisadores concluíram que há uma grande necessidade de padrões nas posições sendo elas dorsais ou não para que os resultados sejam mais precisos do que os obtidos por eles. TOTHILL et al (1994) realizaram uma pesquisa utilizando DXA de três fabricantes, usados para medir a composição dos tecidos moles e comparabilidade entre si e com outros equipamentos. Os autores identificaram mudanças na proporção e precisão in vivo ao comparar as três versões do DXA. Na revisão de literatura de SHIEL et al (2018) que objetivava identificar e avaliar sistematicamente métodos e protocolos usados para reduzir erros técnicos e biológicos em estudos publicados que investigaram a confiabilidade DXA para avaliar a composição corporal. A revisão compreendeu dados desde a concepção das plataformas utilizadas até julho de 2017 12 estudos preencheram os critérios de elegibilidade. Quatro dos artigos foram considerados de alta qualidade e para ser incluso nessa sessão era necessário que os estudos que fornecessem evidências que indicassem uma confiabilidade teste-reteste muito alta. Os autores concluíram que a evidência de poucos artigos de alta confiabilidade no tema resulta em variações metodológicas substanciais que dificultariam a replicabilidade das metodologias aplicadas substanciais que dificultariam a replicabilidade das metodologias aplicadas devido principalmente ao fato de todos os 7 artigos utilizarem padrões diferentes para análise principalmente porque não houve nenhum artigo onde o protocolo de posicionamento específico foi relatado. Ademais, o software aplicável para analisar pequenos animais como o rato foi projetado unicamente para fins de pesquisa e suas populações de referência não estão disponíveis. Além disso, há relatórios insuficientes sobre anatomia corpo, bem como o esqueleto apendicular dos animais que incluem diferentes estágios de seu desenvolvimento (KARAHAN et al., 2002). Não foram encontrados na literatura dados para referência populações de ratos e nem sobre para valores de referência que os pesquisadores deveriam utilizar no equipamento para estes animais.

Portanto, a uma necessidade que dados de pesquisas devem ser informativos devem replicabilidade e comparações, há uma crescente necessidade que esses dados possibilitem e melhorem a utilidade translacional de dados de modelos pré-clínicos e mesológicos (MALFAIT & LITTLE, 2015), facilitando a comunicação entre pesquisadores de todo o mundo. Portanto, o objetivo do presente estudo é validar técnicas para utilização padronizada do DXA considerando diferentes regiões de interesse em diferentes períodos da doença em ratos com OA do joelho. **Relevância:** O desenvolvimento de regiões de interesse técnicas in vivo para analisar com precisão a DMO e CMO em locais focais nos ossos poderiam aumentar a compreensão dos processos de doença e fornecer um método para avaliar mudanças na estrutura óssea durante a patogênese de doenças ou respostas cronológicas a tratamentos (KARAHAN et al., 2002). Além disso, novas estratégias terapêuticas para OA incluem modificação da densidade e alterações patológicas da lesão do subcondral osso (STAPLETON et al., 2017). Além disso, uma metodologia padronizada proporcionará a pesquisadores a cometer menos erros durante seus períodos experimentais e facilitará a disseminação de dados científicos globais. Ademais, Nosso projeto está sintonia as recomendações éticas da resolução normativa CONCEA nº 17.2014 pois segue o princípio apresentado no Art. 2º. Para os efeitos desta Resolução Normativa, considera-se: I  **Método Alternativo:** qualquer método que possa ser utilizado para substituir, reduzir ou refinar o uso de animais em atividades de pesquisa. Com a confecção do nosso guia de recomendações além de padronizações em pesquisas, haverá menos erros pelos pesquisadores e por consequência menos mortes de animais que são frequentes em pesquisas longitudinais auxiliando assim no refinamento e redução do número de animais. Portanto, fica evidente, que há uma necessidade crescente de pesquisas que busquem por ferramentas mais acessíveis que auxiliem aos profissionais da saúde a realizarem o diagnóstico precoce em um equipamento que seja mais acessível financeiramente para as instituições como o DXA.

**Delimitação experimental:** Serão utilizados 20 ratos machos Wistar (360±10g) do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos, que permanecerão agrupados em gaiolas plásticas, com livre acesso à água e ração. Os animais serão mantidos no biotério do Departamento de Fisioterapia (UFSCar), com as condições ambientais controladas (luminosidade: ciclo de 12h claro/escuro). O experimento será conduzido de acordo com recomendações éticas internacionais (National Research Council, 1996) e o projeto será encaminhado ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos. Os animais serão divididos em 2 grupos 2 grupos para Fase 1 Osteoartrite (OA) (n= 8) 1 grupo para fase 2 intitulados Teste com (n= 4). O modelo animal de OA utilizado

será o de TLCA. O grupo OA será submetido a procedimentos cirúrgico após os anestésicos injeção intraperitoneal de solução de xylazina 20 mg/Kg/peso corporal e ketamina 90 mg/Kg/peso corporal. Será utilizado o equipamento de Densitometria Óssea (DXA - dual-energy x-ray absorptiometry) da marca Hologic (Sistema de densitometria óssea de alta performance - modelo Discovery A - Bedford, MA, USA). O equipamento fica alocado no Departamento de Fisioterapia/UFSCar sob responsabilidade da Prof<sup>a</sup>Dr<sup>a</sup> Stela Márcia Mattiello (DFisio) e do Prof<sup>o</sup>Dr<sup>o</sup> Fernando Augusto Vasilceac (DGERO). Os 8 animais restantes serão utilizados na segunda etapa da pesquisa pelos avaliadores durante o treinamento das regiões de interesse e posicionamento dos animais. Em todas as avaliações os animais serão anestesiados (halotano e pentobarbital sódico (50 mg / kg do peso corporal do animal) e realizaram o exame de densitometria óssea DXA na opção do escaneamento de corpo total para pequenos animais. Todos as imagens dos animais serão analisadas utilizando o software de pequenos animais específico e de alta resolução (resolução: 311  $\mu$ m<sup>2</sup>) para mensurar a DMO e CMO da epífise do osso subcondral. Em todas as avaliações os animais serão anestesiados com halotano e pentobarbital sódico (50 mg / kg do peso corporal do animal) e será realizado na opção do escaneamento de corpo total para pequenos animais de alta resolução (resolução: 311  $\mu$ m<sup>2</sup>). O escaneamento de corpo total de cada animal será realizado 3 vezes sem movimentação do animal.

Espécie:	Ratos heterogênicos	Sexo:	Machos	Peso:	350 a 399 g	idade:	12 a 12 semanas		
Linhagem:	Wistar	Instalação:	Gaiola	Tipo de cama:	maravalha	N por área:	3/gaiola - Piloto 1/Gaiola	N:	12
Animais eutanasiados e/ou abatidos: 12 (100,00%)									
Origem: Biotério Central da UFSCar									
Dimensões da instalação: 41x34x18cm (comprimento, profundidade, altura) (altura x largura x profundidade, volume, etc...)									
Informações da procedência: Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos,									
Manutenção: Biotério da Fisioterapia (UFSCar) divididos em gaiolas plásticas.									
Condições de alojamento:									
Manutenção: Os animais serão mantidos no Biotério da Fisioterapia (UFSCar) divididos em gaiolas plásticas									
Condições do Alojamento: Iluminação: ciclo de 12 horas claro/escuro									
Alimentação: ração peletizada									
Fonte de água: filtrada									
Ventilação: ar condicionado									
Local do experimento:									
Departamento de Fisioterapia - Laboratório de Análise da Função Articular									

Local do experimento: Biotério Departamento de Fisioterapia - Laboratório de Análise da Função Articular

Procedimentos: Procedimento: Biotério UNESP responsável Prof. Dr. Laurival Antonio de LUCA Junior [lucajr@foar.unesp.br](mailto:lucajr@foar.unesp.br) - Endereço: R. Humaitá, 1680, Araraquara - SP, 14801-385 - (16) 3301-6300 [CNPj: 48.031.918/0026-82.](http://www.foar.unesp.br/#/administracao/comissoes/bioterio/) [Site: http://www.foar.unesp.br/#/administracao/comissoes/bioterio/](http://www.foar.unesp.br/#/administracao/comissoes/bioterio/)

Justificativa do uso dos procedimentos e da espécie: O desenvolvimento de regiões de interesse técnicas in vivo para analisar com precisão a DMO e CMO em locais focais nos ossos poderiam aumentar a compreensão dos processos de doença e fornecer um método para avaliar mudanças na estrutura óssea durante a patogênese de doenças ou respostas cronológicas a tratamentos (KARAHAN et al., 2002). Além disso, novas estratégias terapêuticas para OA incluem modificação da densidade e alterações patológicas da lesão do subcondral osso (STAPLETON et al., 2017). Além disso, uma metodologia padronizada proporcionará a pesquisadores a cometer menos erros durante seus períodos experimentais e facilitará a disseminação de dados científicos globais. Portanto, fica evidente, que há uma necessidade crescente de pesquisas que busquem por ferramentas mais acessíveis que auxiliem aos profissionais da saúde a realizarem o diagnóstico precoce em um equipamento que seja mais acessível financeiramente para as instituições como o DXA.

Destinação: São Carlos Ambiental - Serviço de limpeza urbana e tratamento de resíduos

Envolve organismos geneticamente modificados? Não.

Envolve manipulação de agentes radioativos? Não.

Cronograma do estudo, início previsto para: 10/2019 com término previsto para: 12/2020

## FORMULÁRIO 3/4

Invasividade: GI 3 - Experimentos que causam estresse, desconforto ou dor, de intensidade intermediária.

Estresse intencional? Nenhum estresse provocado

Dor intencional? Sim, haverá dor intencional causada nos animais (Curta duração).

Dor aguda, de intensidade leve na articulação do joelho após a cirurgia de indução da osteoartrite.

Fármaco para dor: Nenhum

Justificativa para o não uso de analgésico para dor: Devido a dor de leve intensidade optamos por não utilizar nenhum medicamento nos animais pois as características anti-inflamatórias dos medicamentos interferir no procedimento

Haverá procedimento cirúrgico? Sim, haverá uma ÚNICA cirurgia.

De indução da osteoartrite (cirurgia de transecção do ligamento cruzado anterior de ambos os joelhos dos ratos)

Fármaco utilizado na cirurgia: Anestésico

Nome do princípio ativo (Denominação Comum Brasileira): Xilazina (DCB 09207)

Dose administrada: 8 mg / kg

Via de administração: Intraperitoneal

Frequência do uso: 1x

Duração do uso: 1 dia

Fármaco utilizado na cirurgia: Anestésico

Nome do princípio ativo (Denominação Comum Brasileira): Cetamina (DCB 01936)

Dose administrada: 60 mg/kg

Via de administração: Intraperitoneal

Frequência do uso: 1x

Duração do uso: 1 dia

Haverá observação na recuperação dos animais? Sim.

6 horas

Fármaco utilizado no pós-operatório: Anestésico

Nome do princípio ativo (Denominação Comum Brasileira): Xilazina (DCB 09207)

Dose administrada: 8 mg/ kg

Via de administração: Intraperitoneal

Frequência do uso: 4x

Duração do uso: 1 dia

Fármaco utilizado no pós-operatório: Anestésico

Nome do princípio ativo (Denominação Comum Brasileira): Cetamina (DCB 01936)

Dose administrada: 60 mg/ kg

Via de administração: Intraperitoneal

Frequência do uso: 2x

Duração do uso: 1 dia

Fármaco utilizado no pós-operatório: Anestésico

Nome do princípio ativo (Denominação Comum Brasileira): Xilazina (DCB 09207)

Dose administrada: 8 mg/kg

Via de administração: Intraperitoneal

Frequência do uso: 2x

Duração do uso: 1 dia

Justificativa para o não uso de analgésico no PO: Embora haja dor de leve intensidade em experiências anteriores do grupo de pesquisa não obtivemos resultados positivos na melhora da dor. Além disso, a utilização de medicamentos fora do protocolo estabelecido poderá gerar alterações.

Haverá outro tipo de cuidado no PO? Não.

Exposição/inoculação de substâncias ou organismos que não fármacos? Não.

Será utilizado alguma outra droga, substância, extrato, vitamina ou suplemento? NÃO, não utilizo outras drogas, substâncias, extratos ou vitaminas.

Há extração de material biológico? Não.

Os animais serão eutanasiados? Sim.

Substância utilizada 1: Xylazia

Via de administração: Intraperitoneal

Dose administrada: 8mg/kg/peso

Substância utilizada 2: Ketamina

Via de administração: Intraperitoneal

Dose administrada: 60 mg/kg/peso

Substância utilizada 3:

Via de administração:

Dose administrada:

Método de eutanásia: Decapitação

Método restrito: Ao final do experimento os animais serão eutanasiados seguindo as recomendações presentes nas diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA. O método físico utilizado será decapitação posterior a realização os animais serão anestesiados (injeção intraperitoneal de solução de xylazina 8 mg/Kg/peso corporal e ketamina 60 mg/Kg/peso corporal), seguindo as recomendações éticas internacionais (National Research Council, 1996).

Método de descarte: São Carlos Ambiental - Serviço de limpeza urbana e tratamento de resíduos

## FORMULÁRIO 4/4

Documentos anexados ao sistema

Título do documento: [Termo de Compromisso](#)

Nome do arquivo: [Termo de Compromisso Camila\\_Marques](#)

Título do documento: [Projeto de Pesquisa](#)

Nome do arquivo: [Projeto\\_Mestrado\\_Camila\\_Marques\\_de\\_](#)

Título do documento: [FormConcea\\_28.08.2019](#)

Nome do arquivo: [FormConcea\\_28.08.2019.pdf](#)

Título do documento: [FormConcea\\_15.10.2019](#)

Nome do arquivo: [FormConcea\\_15.10.2019.pdf](#)



[www.rvanalitica.com](http://www.rvanalitica.com)

# RELATÓRIO ESTATÍSTICO

***PROJETO: DUAL ENERGY X-RAY ABSORPTIOMETRY:  
DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO E REPRODUTIBILIDADE DE  
RECOMENDAÇÕES TÉCNICAS PARA OSTEOARTRITE DE RATOS***

Camila Marques de Araújo (**ALUNA- Beneficiária**)

Prof. Dr. Fernando Augusto Vasilceac (**ORIENTADOR - Responsável**)

**Responsável técnico pelas análises  
estatísticas:**

Dr. Rafael Vasconcelos Valadares

Empresa RV Analítica, Rua República da  
Bolívia, n. 35, Bairro JK, Montes Claros-  
MG, CEP: 39404-017

Montes Claros,  
Março de 2021

## Descrição do experimento: fornecida pelos autores

**Objetivo:** desenvolver, validar e tornar reprodutível técnicas e regiões de interesse para utilização do *Dual Energy X-Ray Absorptiometry* (DXA) para análise de joelho de ratos em diferentes tempos da Osteoartrite (AO) confeccionando um guia ao final do estudo.

**Metodologia:** O projeto foi dividido em 2 fases: **Fase 1: Desenvolvimento** contendo duas etapas. **1º Etapa: Experimentação** utilizando 8 ratos em um grupo Osteoartrite (OA), sendo este submetido à transeção do ligamento cruzado anterior para indução da OA na 14ª semana. Os animais foram anestesiados e escaneados pelo DXA na 14ª, 19ª e 24ª semanas. Posteriormente ao escaneamento, todas as imagens dos animais foram analisadas e confeccionadas regiões de interesse no fêmur e tíbia, identificando as variáveis área da região de interesse (área), densidade mineral óssea (DMO) e conteúdo mineral ósseo (CMO). **2ª Etapa: Confecção de um novo guia de recomendações**, onde foram realizadas as normatizações e padronizações das técnicas para utilização do DXA em ratos e orientações específicas para regiões de interesse de ratos com OA de joelho. A **Fase 2: Validação** - foi dividida em 2 etapas. **1ª Etapa: na Verificação e Avaliações** foram realizados os treinamentos com pesquisadores experientes e inexperientes no uso do DXA para posicionamento do animal e seleção de regiões de interesse. **2º Etapa: Reprodutibilidade** - nesta etapa um novo grupo realizou as atividades propostas no novo guia de recomendação sem nenhum treinamento.

### 1. Objetivo do relatório estatístico

O presente relatório estatístico teve por objetivo analisar os dados provenientes de medições no DXA das fases 1 e 2 supracitadas, considerando-se: 1- as avaliações dos joelhos de ratos em diferentes regiões do animal e tempos da osteoartrite por meio de testes de agrupamento, estatísticas descritivas, correlação e regressão; 2- comparar o efeito do treinamento no DXA nas medidas área, CMO e DMO por meio de teste de agrupamento de médias e estatísticas descritivas.

### 2. Procedimento estatístico

#### 2.1. Delineamento e esquema experimental

##### 2.1.1. Fase 1

O experimento foi realizado no delineamento inteiramente ao acaso (DIC), com esquema de parcela subdividida (*split plot*) no tempo (5x3). Na parcela, considerou-se o efeito do fator regiões de interesse (5 níveis: Global - Tamanho Total da Imagem; TPE- Tíbia Proximal Esquerda; TPD- Tíbia Proximal Direita; FDE- Fêmur Distal Esquerdo; FDD- Fêmur Distal Direto). Na subparcela (dentro de cada parcela) foi estudado o efeito do fator tempo em que foram feitos escaneamentos dos animais no DXA (3 níveis: 14, 19 e 24 semanas).

### 2.1.2. Fase 2

O experimento foi realizado no delineamento inteiramente ao acaso (DIC), com esquema fatorial 5x2. Para o primeiro fator, considerou-se o efeito do fator regiões de interesse (5 níveis: Global - Tamanho Total da Imagem; TPE- Tíbia Proximal Esquerda; TPD- Tíbia Proximal Direita; FDE- Fêmur Distal Esquerdo; FDD- Fêmur Distal Direto). No segundo fator, foi estudado o efeito do nível de experiência do usuário que realizava os escaneamentos dos animais no DXA (2 níveis: experiente e inexperiente).

### 2.2. Análise estatística e visualização dos dados

Os dados foram analisados no software R (R Core Team, 2021), sendo realizados os seguintes procedimentos: pré-processamento, manipulação, análise e produção de gráficos. Foram estudados os padrões existentes nos dados por meio do cálculo das variáveis estatísticas: média, desvio padrão, intervalo de confiança e coeficiente de variação utilizando o pacote “Rmisc” (Hope, 2013). Os efeitos gerais dos fatores regiões, tempo e nível de experiência nas propriedades avaliadas pelo DXA foram estudados pela análise de variância (ANOVA) das variáveis área, conteúdo mineral ósseo (CMO) e densidade mineral óssea (DMO) utilizando-se o pacote estatístico “ExpDes” (Ferreira et al., 2021), considerando os fatores e interações significativos à  $p < 0,05$  pelo teste de F. Os efeitos de cada um dos níveis do fator regiões, tempo e experiência foram desdobrados pelo método de agrupamento de médias pelo teste de tukey, à  $p < 0,05$ . Adicionalmente, foram calculados os coeficientes de correlação linear de Pearson para estudo do grau de relação entre as variáveis área x CMO x DMO no nível geral e dentro do fator região. E realizados os ajustes de modelos de 1º e 2º grau para analisar o efeito do tempo na variabilidade e confiabilidade dos dados, considerando-se as métricas desvio padrão e coeficiente de variação. Os dados que não seguiram os pressupostos da análise de variância foram pré-processados utilizando o pacote estatístico de transformação de dados “BestNormalize” (Peterson, 2020). Por fim, os dados foram compilados em tabelas e gráficos confeccionados utilizando-se o pacote “ggplot2” em alta resolução (dpi = 600) (Wickham et al., 2020).



### 3. Resultados

#### 1. Fase 1

**Tabela 1.** Resumo da análise de variância das medidas realizada no DXA em função das regiões de interesse e tempo

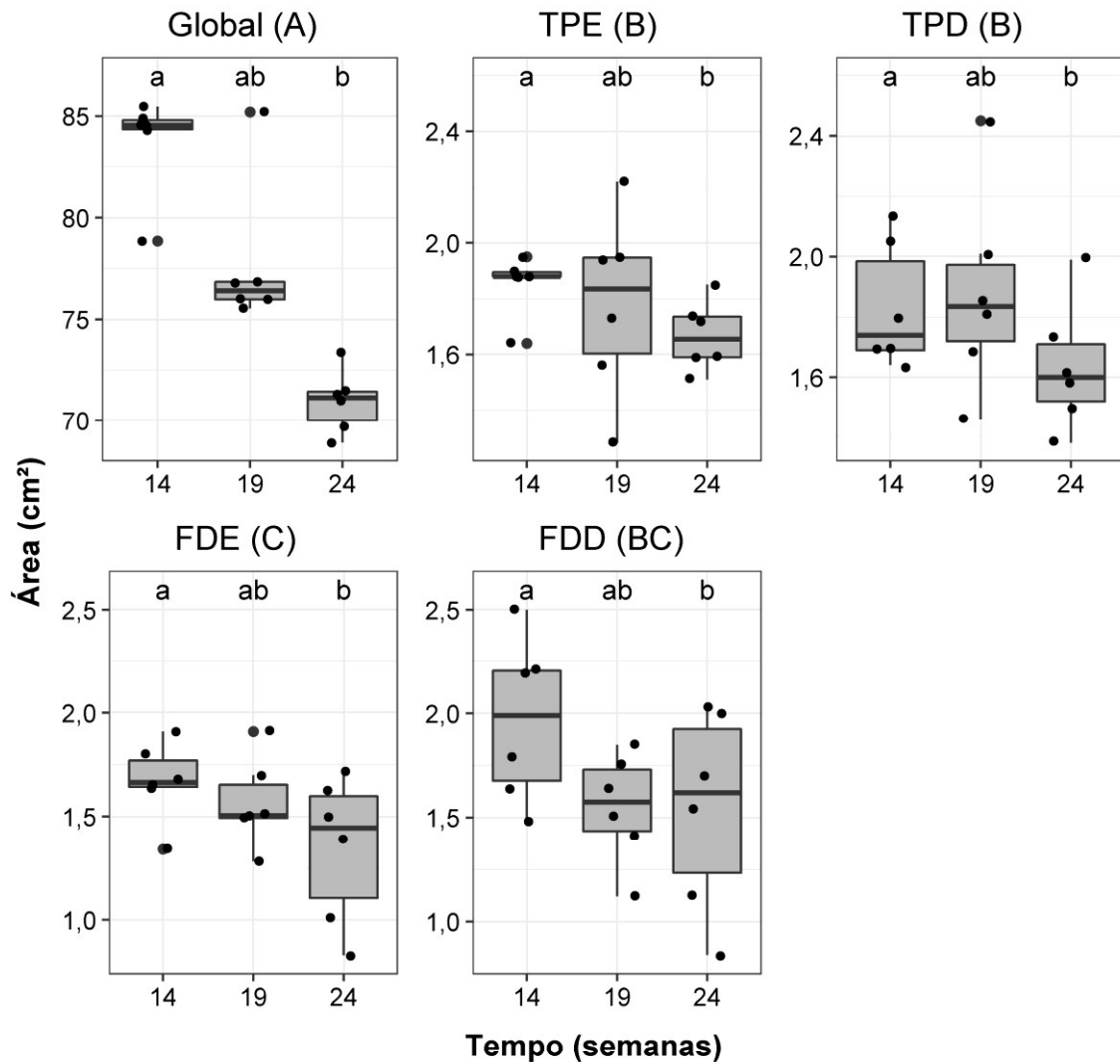
Fonte de variação	A	CMO	DMO
	cm <sup>2</sup>	g	g/cm <sup>2</sup>
Região	p<0.01	p<0.01	p<0.01
Tempo	p<0.01	p<0.01	p<0.01
Região*Tempo	ns	ns	ns

<sup>1</sup>indica significância a p <0.01, 0.05 e 0.10 pelo teste F. “ns” indica que a causa de variação é, no geral, não significativa.

**Tabela. 2.** Medidas de tendência central (média) e de variabilidade/confiabilidade (desvio padrão, erro padrão da média, coeficiente de variação e intervalo de confiança) da área da região de interesse realizada com o DXA em três tempos

Região	Tempo (semanas)	Área média	Des. Pad.	Erro padrão da média	Intervalo de confiança (95 %)	Coeficiente de variação
		------(cm <sup>2</sup> )-----				(%)
Global	14	83,8 <b>Aa</b>	2,44	1,00	2,56	2,91
	19	77,7 <b>Aab</b>	3,70	1,51	3,88	4,76
	24	71,0 <b>Ab</b>	1,56	0,64	1,63	2,19
TPE	14	1,9 <b>Ba</b>	0,11	0,04	0,11	5,86
	19	1,8 <b>Bab</b>	0,33	0,14	0,35	18,62
	24	1,7 <b>Bb</b>	0,13	0,05	0,13	7,50
TPD	14	1,8 <b>Ba</b>	0,21	0,09	0,22	11,48
	19	1,9 <b>Bab</b>	0,33	0,14	0,35	17,79
	24	1,6 <b>Bb</b>	0,21	0,09	0,22	12,93
FDE	14	1,7 <b>Ca</b>	0,19	0,08	0,20	11,51
	19	1,6 <b>Cab</b>	0,22	0,09	0,23	13,74
	24	1,4 <b>Cb</b>	0,35	0,14	0,37	26,26
FDD	14	2,0 <b>BCa</b>	0,39	0,16	0,41	19,91
	19	1,6 <b>BCab</b>	0,26	0,11	0,28	17,05
	24	1,5 <b>BCb</b>	0,48	0,19	0,50	30,94

\*Letras maiúsculas comparam regiões e minúsculas comparam os tempos dentro de cada região pelo teste de tukey à p<0,05.

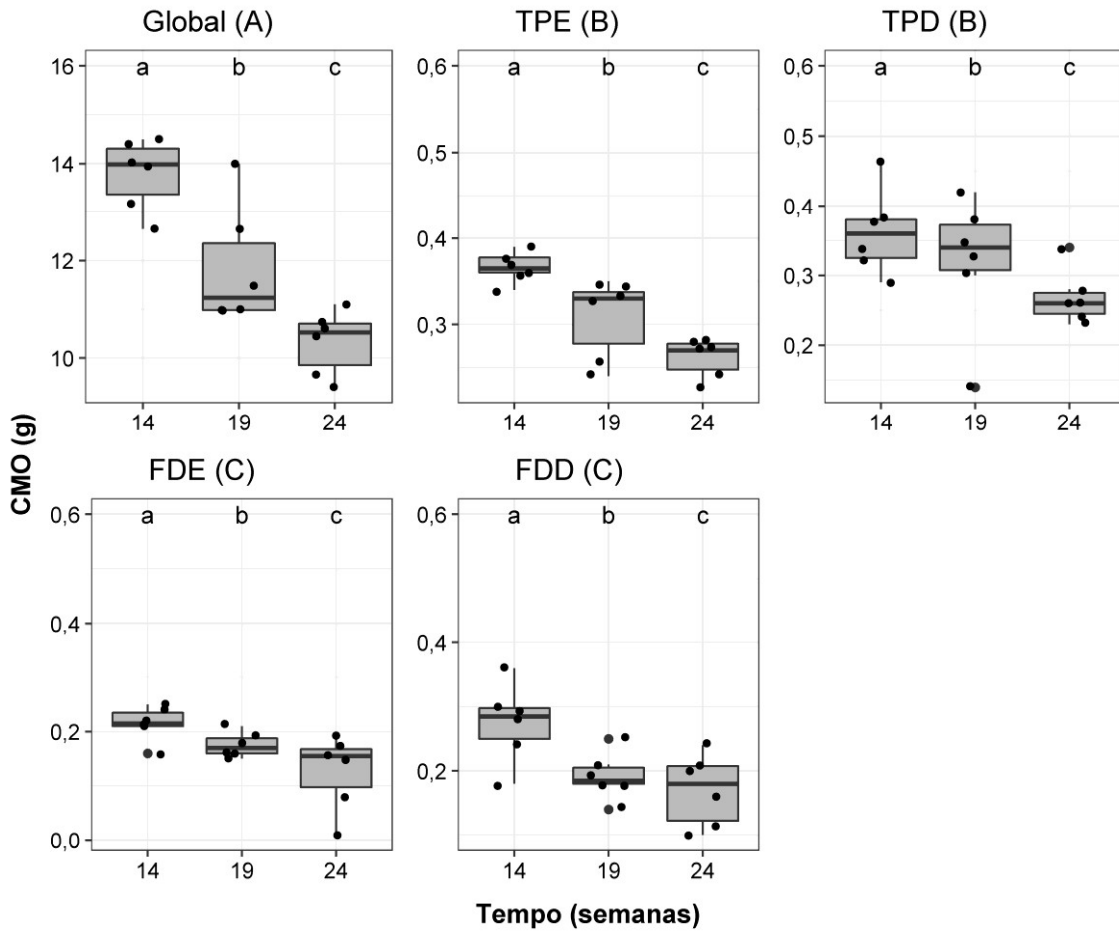


**Figura 1.** Gráfico do tipo boxplot da variável área (Área, cm<sup>2</sup>) em função das áreas de interesse e tempos (letras maiúsculas entre parênteses comparam regiões de interesse e minúsculas comparam os tempos em semanas, considerando-se teste de tukey à  $p < 0,05$ )

**Tabela. 3.** Medidas de tendência central (média) e de variabilidade/confiabilidade (desvio padrão, erro padrão, coeficiente de variação e intervalo de confiança) do conteúdo mineral ósseo (CMO, g) da região de interesse realizada com o DXA em três tempos

Região	Tempo (semanas)	CMO médio	Des. Pad.	Erro padrão da média	Intervalo de confiança (95 %)	Coeficiente de variação (%)
		----- (g) -----				
Global	14	13,8 <b>Aa</b>	0,73	0,30	0,76	5,26
	19	11,9 <b>Ab</b>	1,24	0,51	1,30	10,44
	24	10,3 <b>Ac</b>	0,66	0,27	0,69	6,37
TPE	14	0,4 <b>Ba</b>	0,02	0,01	0,02	4,78
	19	0,3 <b>Bb</b>	0,05	0,02	0,05	14,99
	24	0,3 <b>Bc</b>	0,02	0,01	0,02	8,17
TPD	14	0,4 <b>Ba</b>	0,06	0,02	0,06	16,44
	19	0,3 <b>Bb</b>	0,10	0,04	0,10	30,43
	24	0,3 <b>Bc</b>	0,04	0,02	0,04	14,61
FDE	14	0,2 <b>Ca</b>	0,03	0,01	0,03	14,63
	19	0,2 <b>Cb</b>	0,02	0,01	0,02	12,90
	24	0,1 <b>Cc</b>	0,07	0,03	0,07	54,27
FDD	14	0,3 <b>Ca</b>	0,06	0,02	0,06	22,03
	19	0,2 <b>Cb</b>	0,04	0,01	0,04	19,08
	24	0,2 <b>Cc</b>	0,06	0,02	0,06	33,28

\*Letras maiúsculas comparam regiões e minúsculas comparam os tempos dentro de cada região pelo teste de tukey à  $p < 0,05$ .

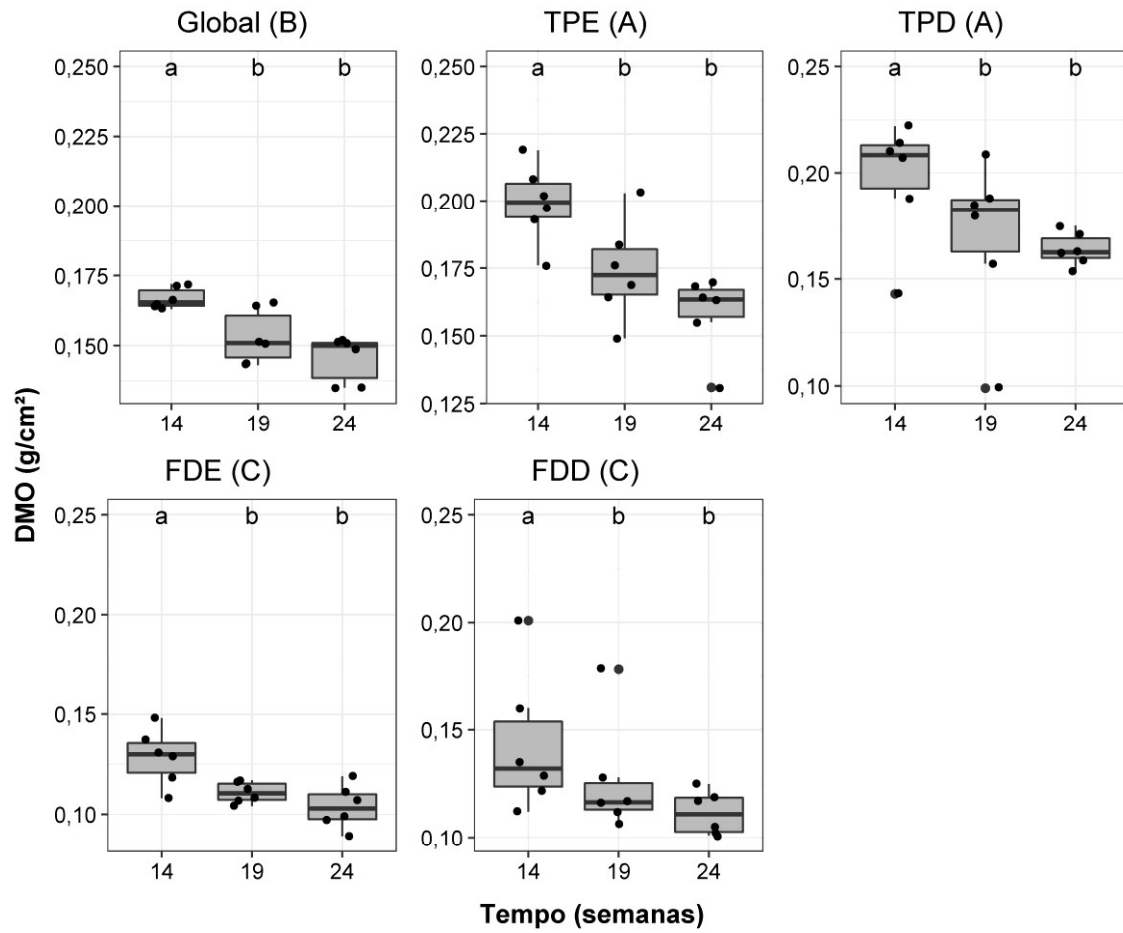


**Figura 2.** Gráfico do tipo boxplot da variável conteúdo mineral ósseo (CMO, g) em função das áreas de interesse e tempos (letras maiúsculas comparam regiões de interesse e minúsculas comparam os tempos em semanas, considerando-se teste de tukey à  $p < 0,05$ )

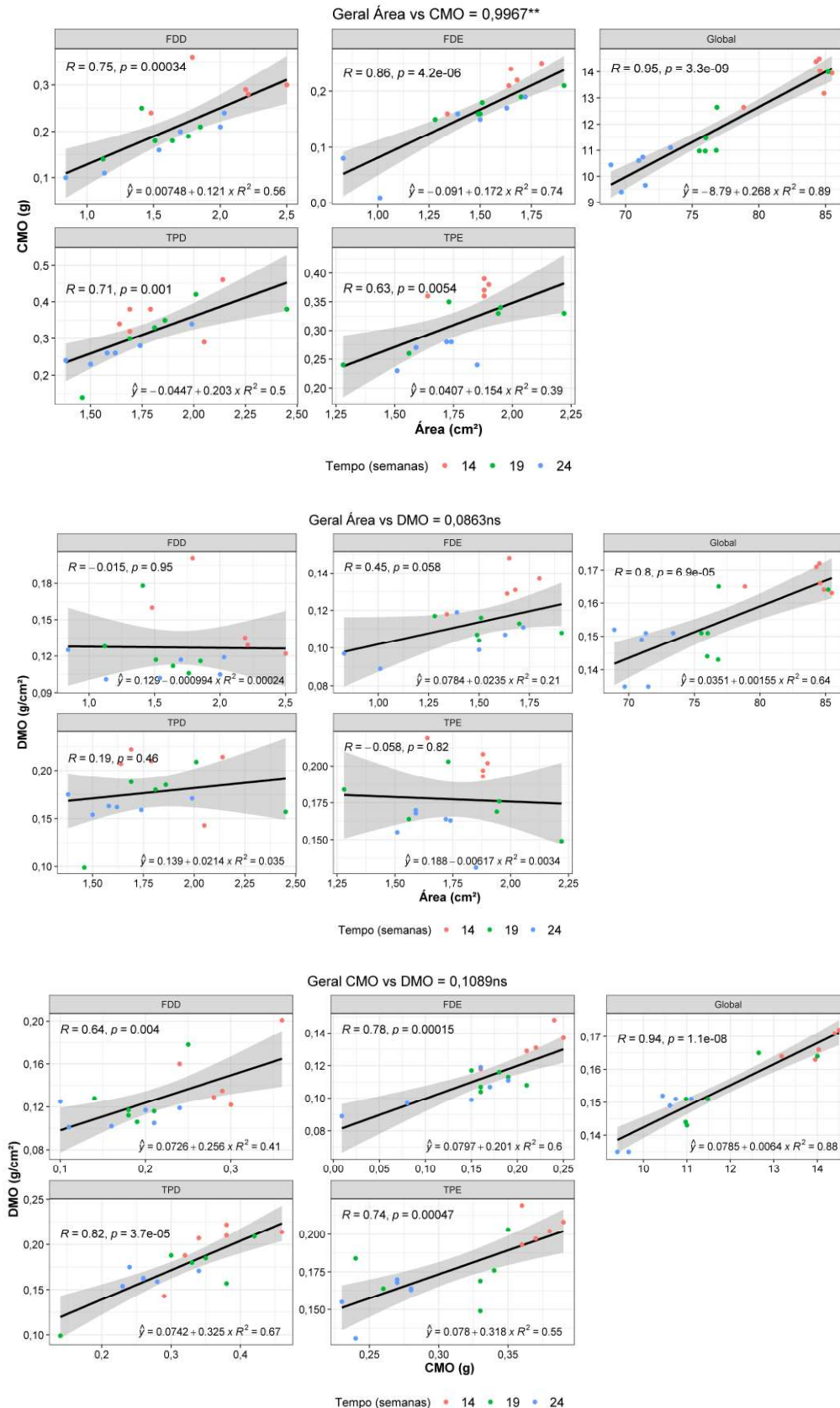
**Tabela. 4.** Medidas de tendência central (média) e de variabilidade/confiabilidade (desvio padrão, erro padrão, coeficiente de variação e intervalo de confiança) da densidade mineral óssea (DMO, g/cm<sup>2</sup>) da região de interesse realizada com o DXA em três tempos

Região	Tempo (semanas)	DMO médio	Des. Pad.	Erro padrão da média	Intervalo de confiança (95 %)	Coeficiente de variação (%)
		----- (g/cm <sup>2</sup> )-----				
Global	14	0,2 <b>Ba</b>	0,00	0,00	0,00	2,26
	19	0,2 <b>Bb</b>	0,01	0,00	0,01	6,23
	24	0,1 <b>Bb</b>	0,01	0,00	0,01	5,63
TPE	14	0,2 <b>Aa</b>	0,01	0,01	0,02	7,31
	19	0,2 <b>Ab</b>	0,02	0,01	0,02	10,57
	24	0,2 <b>Ab</b>	0,01	0,01	0,02	9,11
TPD	14	0,2 <b>Aa</b>	0,03	0,01	0,03	14,65
	19	0,2 <b>Ab</b>	0,04	0,02	0,04	22,64
	24	0,2 <b>Ab</b>	0,01	0,00	0,01	4,72
FDE	14	0,1 <b>Ca</b>	0,01	0,01	0,01	10,95
	19	0,1 <b>Cb</b>	0,01	0,00	0,01	4,75
	24	0,1 <b>Cb</b>	0,01	0,00	0,01	10,40
FDD	14	0,1 <b>Ca</b>	0,03	0,01	0,03	22,77
	19	0,1 <b>Cb</b>	0,03	0,01	0,03	20,92
	24	0,1 <b>Cb</b>	0,01	0,00	0,01	9,07

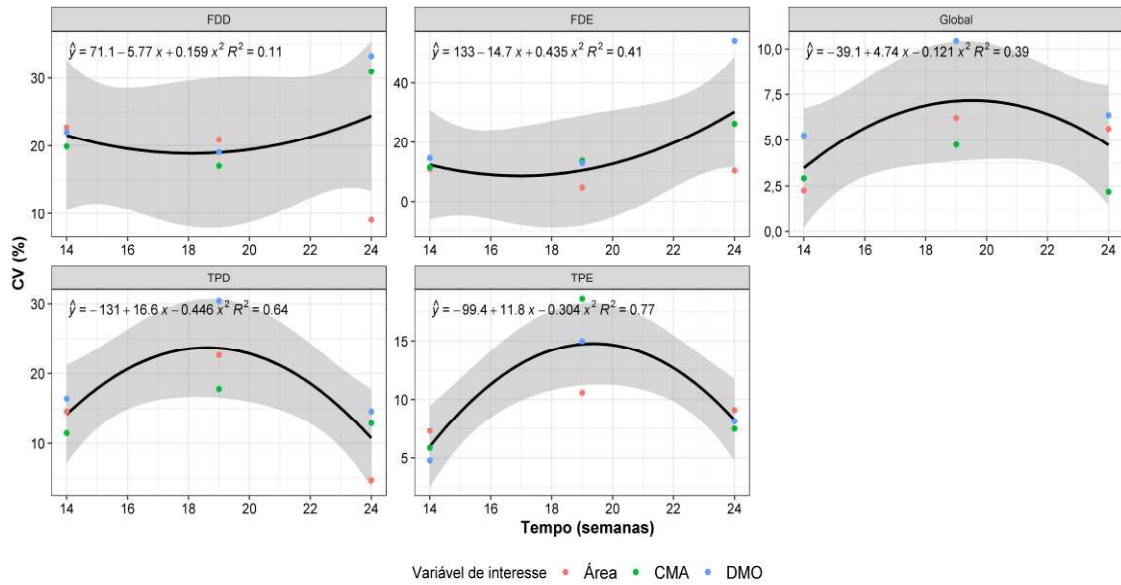
\*Letras maiúsculas comparam regiões e minúsculas comparam os tempos dentro de cada região pelo teste de tukey, à p<0,05.



**Figura 3.** Gráfico do tipo boxplot da variável densidade mineral óssea (DMO, g/cm<sup>2</sup>) em função das áreas de interesse e tempos (letras maiúsculas comparam regiões de interesse e minúsculas comparam os tempos em semanas, considerando-se teste de tukey à p<0.05)

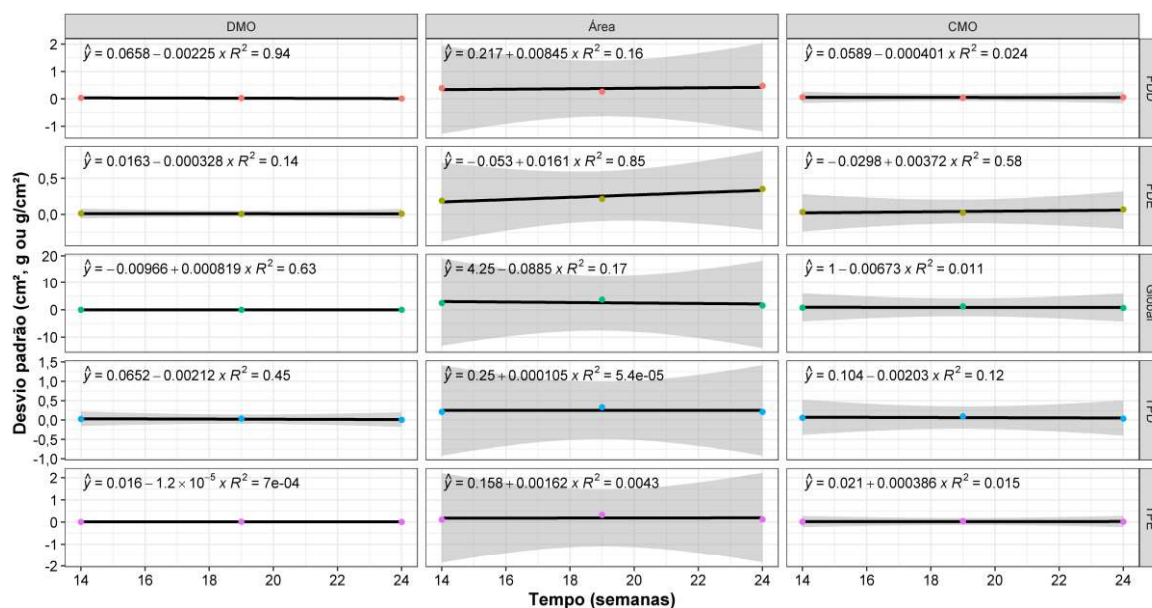


**Figura 4.** Gráfico de regressão com índice de correlação linear de Pearson (R) entre variáveis medidas (Área vs CMO, Área vs DMO e CMO vs DMO) no DXA e suas correções dentro de cada região medida (a confiabilidade da medida é dada pelo  $p < 0,01$ , 0,05 ou “não significativo” (ns) e a qualidade do ajuste da regressão aos dados pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ))



**Figura 5.** Análise de regressão entre tempo e coeficiente de variação das variáveis medidas (Área, Conteúdo Mineral Ósseo (CMO) e Densidade Mineral Óssea (DMO)) no DXA e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) para as diferentes regiões de interesse (a qualidade do ajuste da regressão aos dados é dada pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ))





**Figura 6.** Análise de regressão entre tempo e o desvio padrão das variáveis medidas (Área, Conteúdo Mineral Ósseo (CMO) e Densidade Mineral Óssea (DMO)) no DXA e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) (a qualidade do ajuste da regressão aos dados é dada pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ))

## 2. Fase 2

**Tabela 7.** Resumo da análise de variância das medidas realizada no DXA em função das regiões de interesse e nível de experiência

Fonte de variação	A	CMO	DMO
	cm <sup>2</sup>	g	g/cm <sup>2</sup>
Região	p<0,01	p<0,01	p<0,01
Experiência	p<0,01	p<0,01	p<0,01
Região*Experiência	ns	p<0,05	ns

<sup>1</sup>indica significância a p <0.01, 0.05 e 0.10 pelo teste F. “ns” indica que a causa de variação é, no geral, não significativa.

**Tabela 6.** Medidas de tendência central (média) e de variabilidade/confiabilidade (desvio padrão, erro padrão, coeficiente de variação e intervalo de confiança) da variável área das diferentes regiões de interesse realizadas com o DXA por pessoas experientes e inexperientes

Região	Experiência	Área média	Des. Pad.	Erro padrão da média	Intervalo de confiança (95 %)	Coeficiente de variação
				----- (cm <sup>2</sup> ) -----		(%)
FDD	Não	0,80 <b>Bb</b>	0,15	0,07	0,24	18,42
	Sim	0,98 <b>Ba</b>	0,04	0,02	0,06	3,64
FDE	Não	0,79 <b>Bb</b>	0,13	0,06	0,20	16,17
	Sim	1,20 <b>Ba</b>	0,41	0,20	0,65	33,95
Global	Não	70,37 <b>Ab</b>	2,70	1,35	4,30	3,84
	Sim	71,58 <b>Aa</b>	0,37	0,18	0,58	0,51
TPD	Não	0,85 <b>Bb</b>	0,04	0,02	0,06	4,33
	Sim	1,21 <b>Ba</b>	0,32	0,16	0,51	26,47
TPE	Não	0,76 <b>Bb</b>	0,01	0,01	0,02	1,93
	Sim	1,10 <b>Ba</b>	0,06	0,03	0,10	5,92

\*Letras maiúsculas comparam regiões e minúsculas comparam níveis de experiência pelo teste de tukey à  $p < 0,05$ .

**Tabela 7.** Medidas de tendência central (média) e de variabilidade/confiabilidade (desvio padrão, erro padrão, coeficiente de variação e intervalo de confiança) da variável conteúdo mineral ósseo (CMO, g) das diferentes regiões de interesse realizadas com o DXA por pessoas experientes e inexperientes

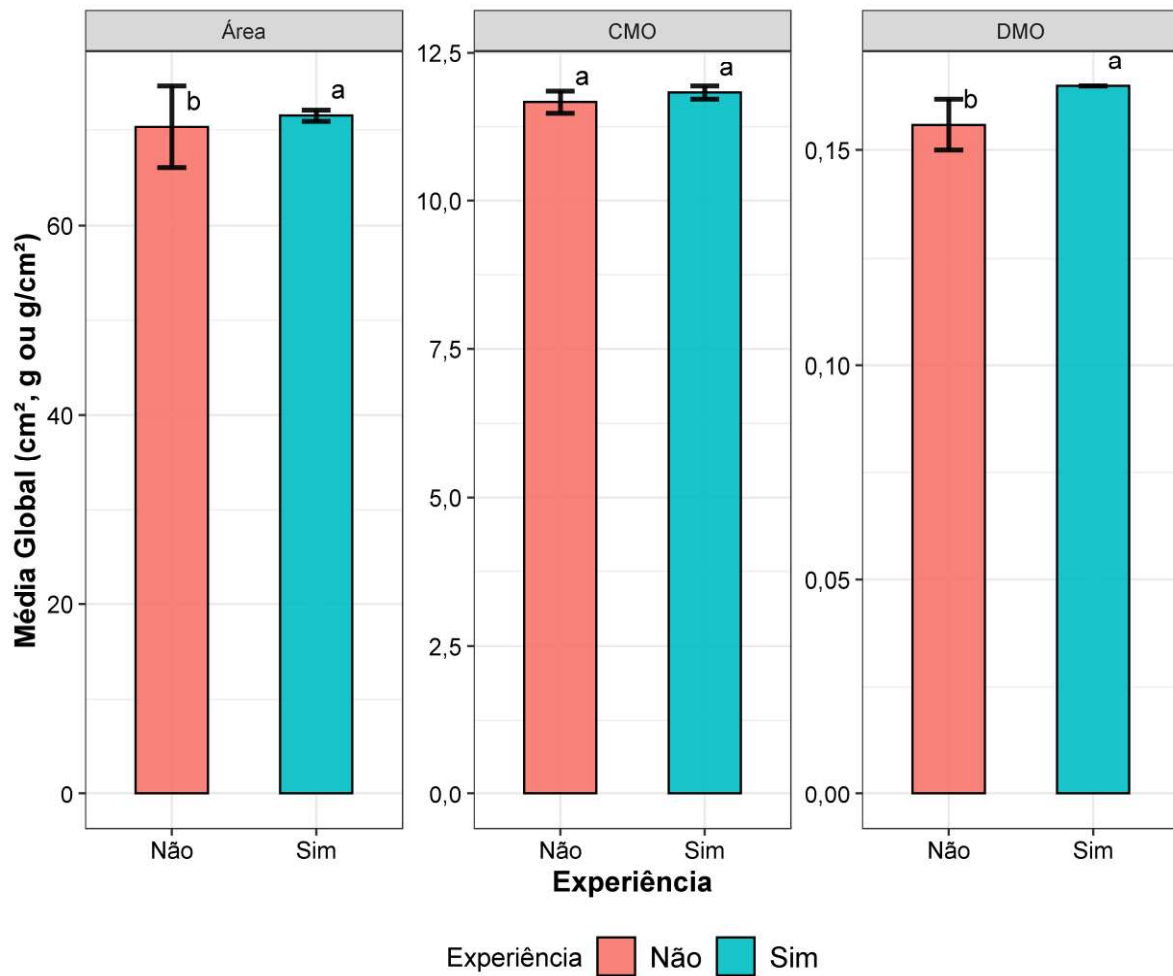
Região	Experiência	CMO médio	Des. Pad.	Erro padrão da média	Intervalo de confiança (95 %)	Coeficiente de variação
				----- (g) -----		(%)
FDD	Não	0,10 <b>Db</b>	0,01	0,01	0,02	11,51
	Sim	0,16 <b>Ba</b>	0,01	0,01	0,02	6,52
FDE	Não	0,11 <b>CDb</b>	0,01	0,00	0,01	8,56
	Sim	0,16 <b>Ba</b>	0,03	0,02	0,05	19,46
Global	Não	11,66 <b>Aa</b>	0,12	0,06	0,19	1,00
	Sim	11,82 <b>Aa</b>	0,07	0,03	0,11	0,58
TPD	Não	0,14 <b>Ba</b>	0,01	0,01	0,02	10,55
	Sim	0,19 <b>Ba</b>	0,04	0,02	0,07	22,86
TPE	Não	0,13 <b>BCb</b>	0,00	0,00	0,00	0,22
	Sim	0,20 <b>Ba</b>	0,02	0,01	0,03	10,14

\*Letras maiúsculas comparam regiões e minúsculas comparam níveis de experiência pelo teste de tukey à  $p < 0,05$ .

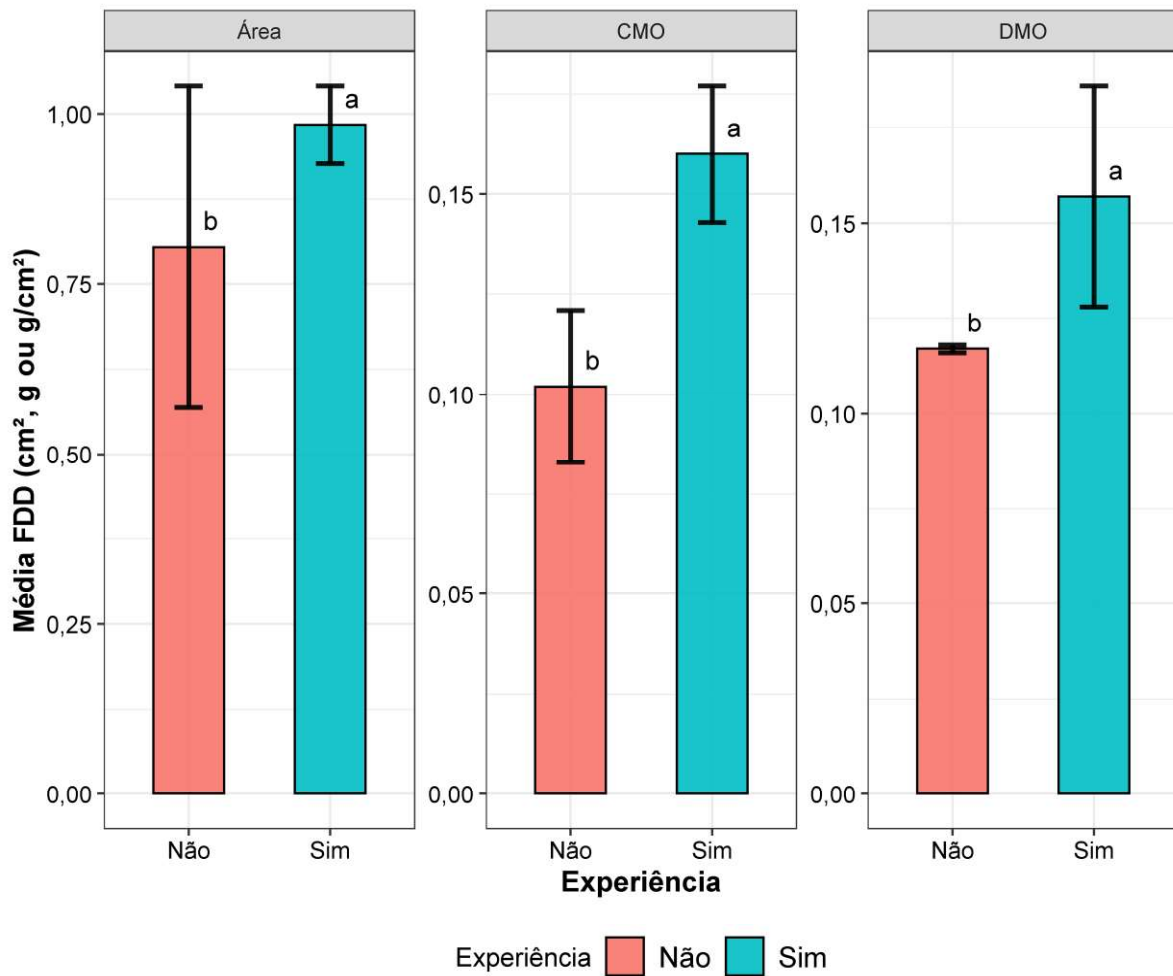
**Tabela 8.** Medidas de tendência central (média) e de variabilidade/confiabilidade (desvio padrão, erro padrão, coeficiente de variação e intervalo de confiança) da variável densidade mineral óssea (DMO, g/cm<sup>2</sup>) das diferentes regiões de interesse realizadas com o DXA por pessoas experientes e inexperientes

Região	Experiência	DMO Média	Des. Pad.	Erro padrão da média	Intervalo de confiança (95 %)	Coeficiente de variação
		----- (g/cm <sup>2</sup> ) -----				(%)
FDD	Não	0,12 <b>Db</b>	0,00	0,00	0,00	0,54
	Sim	0,16 <b>Da</b>	0,02	0,01	0,03	11,82
FDE	Não	0,15 <b>CDb</b>	0,03	0,02	0,05	20,69
	Sim	0,15 <b>CDa</b>	0,01	0,00	0,01	4,19
Global	Não	0,16 <b>BCb</b>	0,00	0,00	0,01	2,29
	Sim	0,17 <b>BCa</b>	0,00	0,00	0,00	0,07
TPD	Não	0,17 <b>ABb</b>	0,01	0,01	0,02	6,25
	Sim	0,17 <b>Aba</b>	0,02	0,01	0,03	11,01
TPE	Não	0,18 <b>Ab</b>	0,01	0,00	0,01	2,90
	Sim	0,19 <b>Aa</b>	0,01	0,00	0,01	4,21

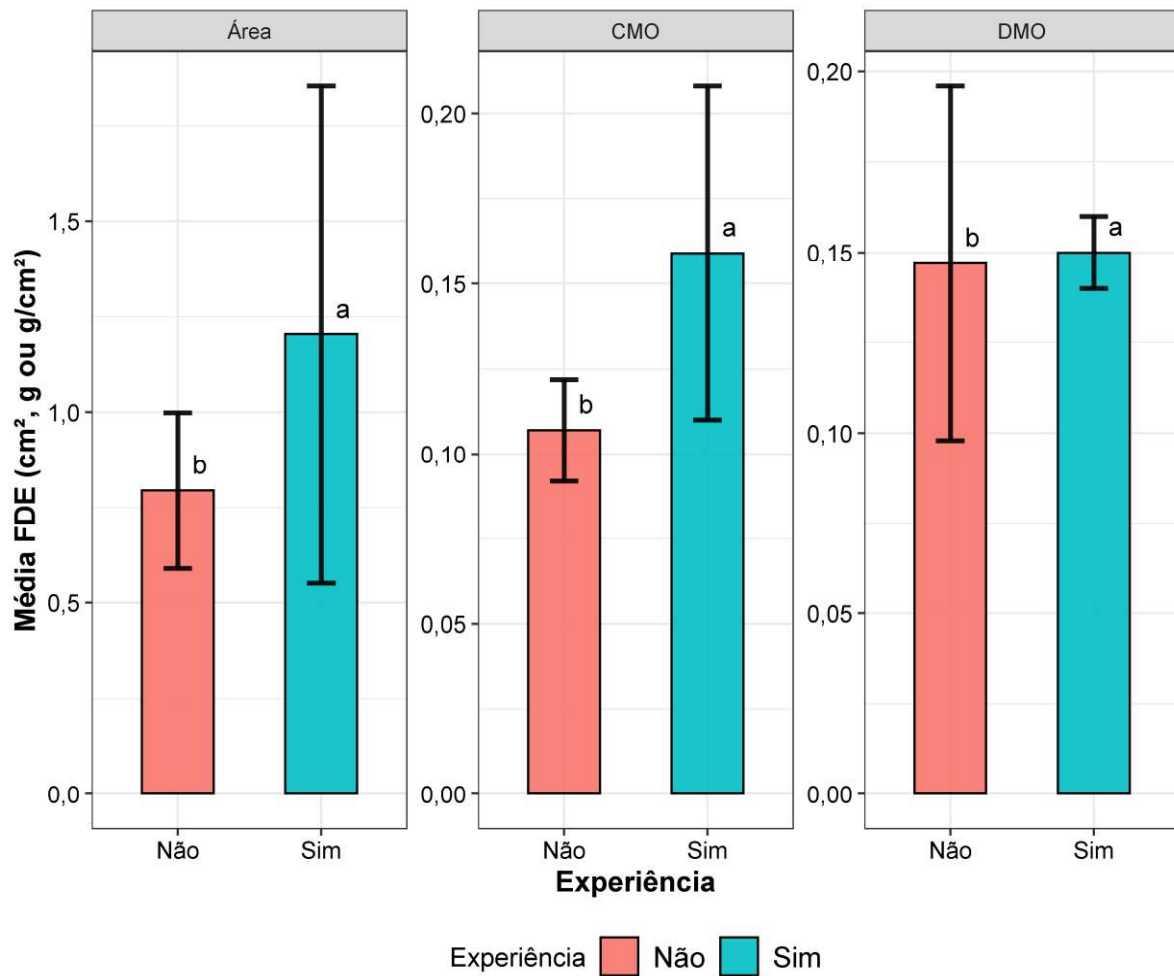
\*Letras maiúsculas comparam regiões e minúsculas comparam níveis de experiência pelo teste de tukey à p<0,05.



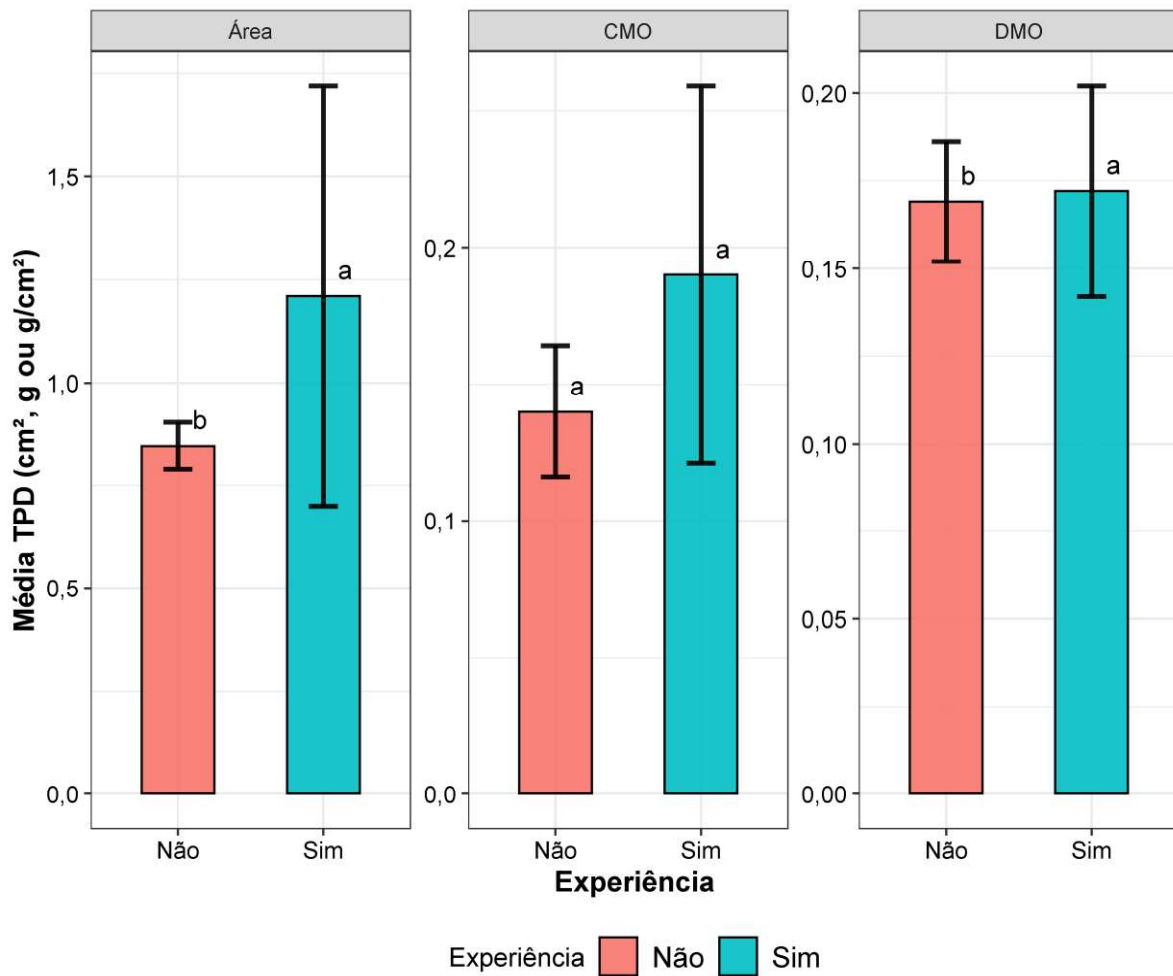
**Figura 7.** Gráfico de barras com média e intervalo de confiança para as variáveis Área (cm<sup>2</sup>), Conteúdo Mineral Ósseo (CMO, g) e Densidade Mineral Óssea (DMO, g/cm<sup>2</sup>) com medidas realizadas no DXA para a região Global (tamanho total da imagem) (as letra comparam medidas realizadas nos dois níveis de experiência pelo teste de tukey à p<0,05)



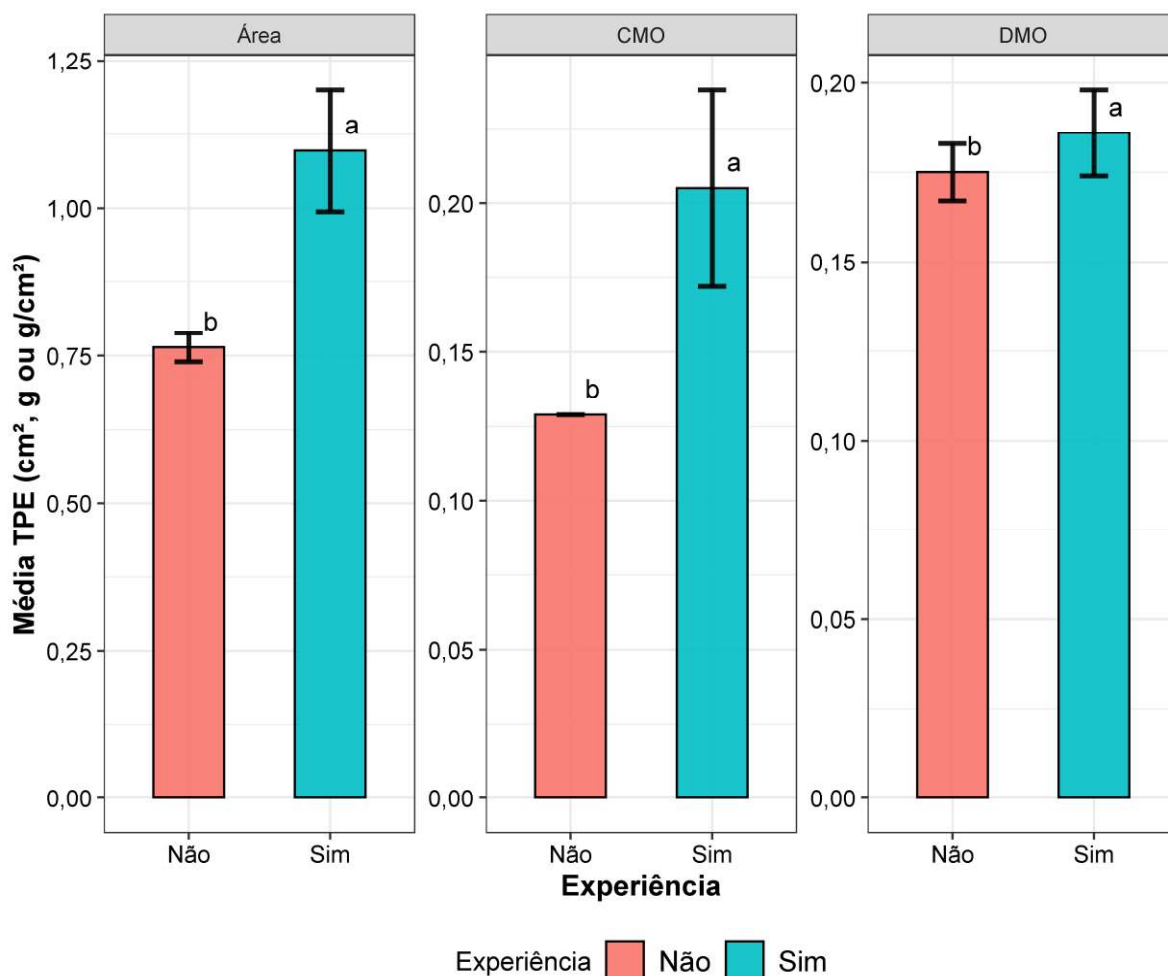
**Figura 8.** Gráfico de barras com média e intervalo de confiança para as variáveis Área (cm<sup>2</sup>), Conteúdo Mineral Ósseo (CMO, g) e Densidade Mineral Óssea (DMO, g/cm<sup>2</sup>) com medidas realizadas no DXA para a região Fêmur Distal Direito (FDD) (as letra comparam medidas realizadas nos dois níveis de experiência pelo teste de tukey à p<0,05)



**Figura 9.** Gráfico de barras com média e intervalo de confiança para as variáveis Área (cm<sup>2</sup>), Conteúdo Mineral Ósseo (CMO, g) e Densidade Mineral Óssea (DMO, g/cm<sup>2</sup>) com medidas realizadas no DXA para a região Fêmur Distal Esquerdo (FDE) (as letra comparam medidas realizadas nos dois níveis de experiência pelo teste de tukey à p<0,05)



**Figura 10.** Gráfico de barras com média e intervalo de confiança para as variáveis Área (cm<sup>2</sup>), Conteúdo Mineral Ósseo (CMO, g) e Densidade Mineral Óssea (DMO, g/cm<sup>2</sup>) com medidas realizadas no DXA para a região Tíbia Proximal Direita (TPD) (as letra comparam medidas realizadas nos dois níveis de experiência pelo teste de tukey à p<0,05)



**Figura 10.** Gráfico de barras com média e intervalo de confiança para as variáveis Área (cm<sup>2</sup>), Conteúdo Mineral Ósseo (CMO, g) e Densidade Mineral Óssea (DMO, g/cm<sup>2</sup>) com medidas realizadas no DXA para a região Tíbia Proximal Esquerda (TPE) (as letra comparam medidas realizadas nos dois níveis de experiência pelo teste de tukey à p<0,05)

## Referências

- Ferreira EB, Cavalcanti PP, Nogueira DA. Package “ExpDes.pt.” Brasil: 2021
- Hope R. Rmisc package | R Documentation; 2013 [cited 2021 Mar 3]. Available from: <https://www.rdocumentation.org/packages/Rmisc/versions/1.5>.
- Peterson RA. Using the bestNormalize Package; 2020 [cited 2021 Mar 3]. Available from: <https://cran.r-project.org/web/packages/bestNormalize/vignettes/bestNormalize.html>.
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2021
- Wickham H, Chang W, Henry L, Pedersen TL, Takahashi K, Wilke C, Woo K, Yutani H, Dunnington D, RStudio Team. Package “ggplot2” - Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics. 2020





[www.rvanalitica.com](http://www.rvanalitica.com)

# RELATÓRIO ESTATÍSTICO

***PROJETO: DUAL ENERGY X-RAY ABSORPTIOMETRY:  
DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO E REPRODUTIBILIDADE DE  
RECOMENDAÇÕES TÉCNICAS PARA OSTEOARTRITE DE RATOS***  
*FASE 2*

Camila Marques de Araújo (ALUNA- Beneficiária)

Prof. Dr. Fernando Augusto Vasilceac (ORIENTADOR - Responsável)

**Responsável técnico pelas análises  
estatísticas:**

Dr. Rafael Vasconcelos Valadares

Empresa RV Analítica, Rua República da  
Bolívia, n. 35, Bairro JK, Montes Claros-  
MG, CEP: 39404-017

Montes Claros,  
Junho de 2021

## Descrição do experimento: fornecida pelos autores

**Objetivo:** desenvolver, validar e tornar reprodutível técnicas e regiões de interesse para utilização do *Dual Energy X-Ray Absorptiometry* (DXA) para análise de joelho de ratos em diferentes tempos da Osteoartrite (AO) confeccionando um guia ao final do estudo.

**Metodologia:** O presente relatório refere-se à seguinte fase: A **Fase 2: Validação** - foi dividida em 2 etapas. **1ª Etapa:** na **Verificação e Avaliações** foram realizados os treinamentos com pesquisadores experientes e inexperientes no uso do DXA para posicionamento do animal e seleção de regiões de interesse. **2ª Etapa: Reprodutibilidade** - nesta etapa um novo grupo realizou as atividades propostas no novo guia de recomendação sem nenhum treinamento.

### 1. Objetivo do relatório estatístico

O presente relatório estatístico teve por objetivo analisar os dados provenientes de medições no DXA da fase 2, considerando-se: a confiabilidade inter e intra-observador de indivíduos treinados e não treinados no DXA das medidas área, CMO e DMO por meio do coeficiente de correlação de Pearson e intervalo de confiança a 95 % de probabilidade.

### 2. Procedimento estatístico

#### 2.1. Delineamento e esquema experimental

O experimento foi realizado no delineamento inteiramente ao acaso (DIC), com esquema fatorial 5x2. Para o primeiro fator, considerou-se o efeito do fator regiões de interesse (5 níveis: Global - Tamanho Total da Imagem; TPE- Tíbia Proximal Esquerda; TPD- Tíbia Proximal Direita; FDE- Fêmur Distal Esquerdo; FDD- Fêmur Distal Direto). No segundo fator, foi estudado o efeito do nível de experiência do usuário que realizava os escaneamentos dos animais no DXA (2 níveis: experiente e inexperiente).

#### 2.2. Análise estatística e visualização dos dados

Os dados foram analisados no software R (R Core Team, 2021), sendo realizados os seguintes procedimentos: pré-processamento, manipulação, análise e produção de gráficos. A confiabilidade intra e inter-observador foi avaliada pelo cálculo do Coeficiente de Correlação Intraclasse (CCI) para a avaliação de dois tipos de confiabilidade: inter e intra-observadores, assim como os valores do limite inferior e superior do intervalo de confiança a 95 % de probabilidade. Foi utilizado o teste paramétrico de Pearson para os resultados das medições de área, conteúdo mineral ósseo e densidade mineral óssea realizadas por indivíduos treinados e não-treinados segundo o protocolo de análise do DXA. Por fim, os dados foram compilados em tabelas e gráficos confeccionados utilizando-se o pacote “ggplot2” em alta resolução (dpi = 600) (Wickham et al., 2020).

### 3. Resultados

A correlação linear de Pearson trata da medida da direção e do grau com que duas variáveis quantitativas se associam linearmente em uma amostra. Os limites inferiores e superiores do intervalo de confiança indicam o grau de representatividade do valor médio da correlação ( $r$ ). O valor do índice de correlação vai de -1 a 1.

No caso do seu uso como medida de confiabilidade, os valores próximos de 1 indicam a concordância de resultados das medições. Valores próximos de -1, indicam que quando alguém mediu que para uma região o valor foi alto, a outra mediu um valor baixo. Então, existe uma tendência decrescente, mas os resultados não concordam. Se os valores são próximos de 0, não há concordância nem tendência nos resultados.

A correlação intra-observador, considerando o nível de experiência com o aparelho DXA, mostra se os resultados das medições dos observadores é coerente entre os usuários do aparelho com o mesmo nível de experiência para a mesma variável resposta (ex.: área). Por exemplo, se quando um usuário experiente mediu um valor elevado de área para uma região e o outro também indicou isso, então a correção é próxima de 1. Se houve concordância para boa parte dos usuários e medições (repetições), então os limites inferiores e superiores do intervalo de confiança têm valores próximos da média da correlação ( $r$ ), sendo próximo de 1.

A correlação chamada de inter-observador, indica a concordância dos resultados de usuários do DXA com níveis de experiência diferente. Essa correlação indica se usuários do aparelho, com e sem treinamentos, tiveram resultados que concordavam quando altos e baixos. Quando a correlação é positiva e próxima de 1, quer dizer que concordavam. Quando a correlação é negativa e próxima de -1, indica que quando um usuário inexperiente media um valor alto para uma região, o usuário treinado poderia estar apresentando o valor baixo, por exemplo. Isso quer dizer que não concordavam, mesmo tendo uma tendência na relação entre os resultados das duas classes de usuários. Quando o valor é próximo de 0, então não existe tendência, nem concordância dos resultados apresentados pelas duas classes de usuários.

Uma observação importante, é que quando temos valores muito baixos concentrados (ex.: variável área das diferentes regiões) e poucos valores muito altos (ex.: variável área do global), então acontece de aumentar “artificialmente” o índice de correlação. Isso aconteceu quando incluímos a medição do global. Isso acaba dificultando nosso entendimento da real confiabilidade das medições utilizando o método proposto para as outras regiões analisadas, cujos resultados foram baixos. Sendo assim, da perspectiva do entendimento da qualidade dos resultados do método, seria melhor apresentar o resultado sem o global ou mostrar os dois resultados, explicando essa questão. Outro ponto importante, é que o número limitado de usuários no ensaio pode comprometer a avaliação de confiabilidade do método. Para melhor compreensão da confiabilidade do método, seria interessante aumentar o número de usuários e repetições para reduzir/diluir erros devidos ao operador, ie, erros que não estão associados ao método em si.

**Tabela 1.** Confiabilidade intra e inter-observador de todas as avaliações realizadas (inclui medições do global)

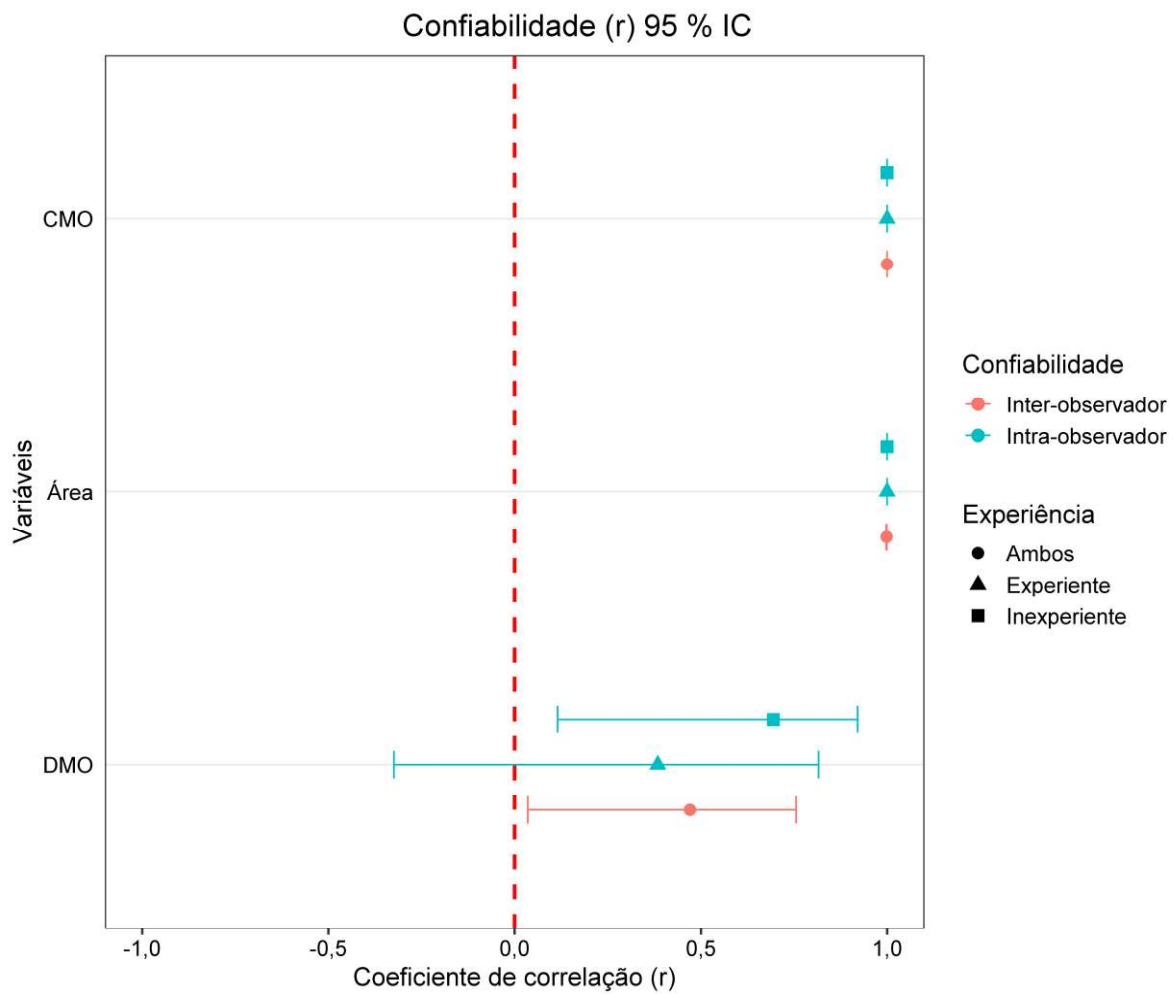
Confiabilidade <sup>1</sup>	Experiência	Variável	r	LIC	LSC
Intra-observador	Experiente	Área	0,9999	0,9998	1,0000
		DMO	0,3842	-0,3238	0,8163
		CMO	1,0000	0,9999	1,0000
	Inexperiente	Área	1,0000	1,0000	1,0000
		DMO	0,6946	0,1155	0,9213
		CMO	1,0000	1,0000	1,0000
Inter-observador	Ambos	Área	0,9991	0,9975	0,9996
		DMO	0,4707	0,0356	0,7558
		CMO	1,0000	0,9999	1,0000

<sup>1</sup> r - índice de correlação de Pearson; LIC – Limite Inferior da Correlação; LSC – Limite Superior da Correlação, que compreende o intervalo de confiança de 95 % dos resultados

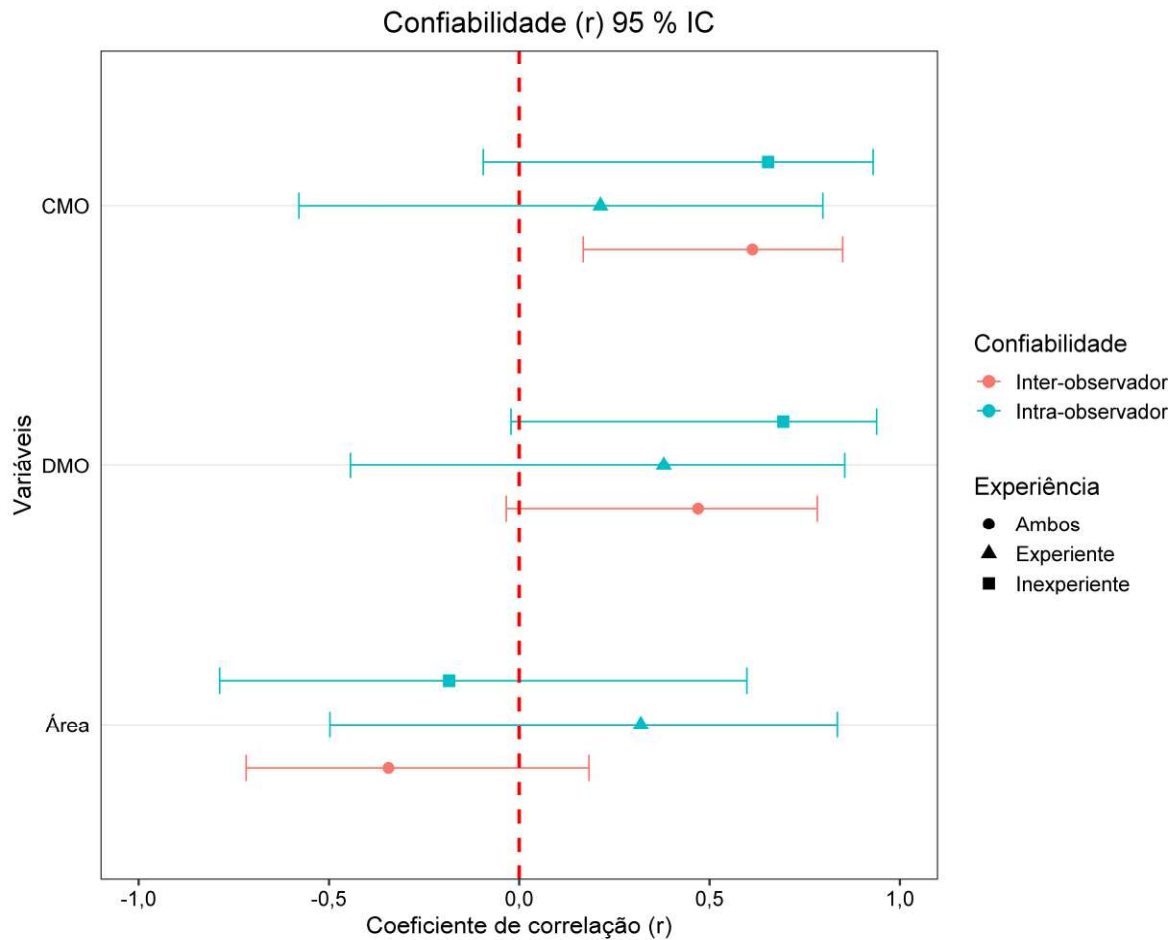
**Tabela 2.** Confiabilidade intra e inter-observador de todas as avaliações realizadas (não inclui medições do global)

Confiabilidade <sup>1</sup>	Experiência	Variável	r	LIC	LSC
Intra-observador	Experiente	Área	0,3193	-0,4972	0,8359
		DMO	0,3800	-0,4434	0,8556
		CMO	0,2132	-0,5784	0,7980
	Inexperiente	Área	-0,1839	-0,7866	0,5983
		DMO	0,6939	-0,0212	0,9393
		CMO	0,6539	-0,0942	0,9300
Inter-observador	Ambos	Área	-0,3434	-0,7171	0,1835
		DMO	0,4698	-0,0337	0,7832
		CMO	0,6129	0,1683	0,8503

<sup>1</sup> r - índice de correlação de Pearson; LIC – Limite Inferior da Correlação; LSC – Limite Superior da Correlação, que compreende o intervalo de confiança de 95 % dos resultados



**Figura 1.** Confiabilidade intra e inter-observador de todas as avaliações realizadas (inclui medições do global). A barra de erro no entorno da média da correlação indica o LIC – Limite Inferior da Correlação; e o LSC – Limite Superior da Correlação, para o intervalo de confiança de 95 % dos resultados



**Figura 2.** Confiabilidade intra e inter-observador de todas as avaliações realizadas (não inclui medições do global). A barra de erro no entorno da média da correlação indica o LIC – Limite Inferior da Correlação; e o LSC – Limite Superior da Correlação, para o intervalo de confiança de 95 % dos resultados

## Referências

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2021

Wickham H, Chang W, Henry L, Pedersen TL, Takahashi K, Wilke C, Woo K, Yutani H, Dunnington D, RStudio Team. Package “ggplot2” - Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics. 2020