

Gabriela Ferreira da Silva

**QUALIDADE ÓSSEA TRABECULAR:
CARACTERIZAÇÃO POR
MICROTOMOGRAFIA 3D
POR RAIO-X**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Escola de Engenharia de São
Carlos da Universidade de São Paulo

Curso de Engenharia Elétrica –
Ênfase em Eletrônica

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Marcos Alves

São Carlos
Dezembro - 2008

Dedicatória

Dedico este trabalho primeiramente à minha família, que sempre me apoiou em minhas decisões, guiando-me para que fossem as melhores, amando-me incondicionalmente e dando-me a segurança de que tanto precisei. Aos meus verdadeiros amigos, os conquistados neste período da Universidade e os que vêm de antes, de minha cidade natal, e que fizeram destes os melhores e mais divertidos anos da minha vida.

Agradecimentos

Agradeço aos professores que me ajudaram a chegar até aqui. À EESC - USP por me oferecer um curso de qualidade. Ao Prof. Dr. José Marcos Alves pela atenção e orientação neste trabalho, ao mestrando Alessandro Márcio Hakme da Silva por ceder as amostras ósseas do seu projeto de pesquisa para uso na minha investigação, pelo apoio no aprendizado do uso do microtomógrafo e do software CT-Analyzer e pela paciência comigo, e ao Prof. Dr. Ben-Hur Viana Borges por disponibilizar a infra-estrutura computacional do seu laboratório para a reconstrução tomográfica e quantificação microestrutural das amostras ósseas.

Resumo

A osteoporose é uma doença do esqueleto caracterizada por baixa massa óssea e deterioração da arquitetura do tecido com conseqüente aumento da fragilidade e susceptibilidade à fratura. O osso trabecular possui maior superfície e metabolismo (formação e reabsorção) mais rápido que o osso cortical. A incidência de fraturas causada pela osteoporose é maior nas vértebras lombares, na extremidade distal do rádio / ulna e na cabeça femoral. A massa óssea explica no máximo 65% da variação na resistência óssea. A forma e distribuição do tecido trabecular no espaço 3D (arquitetura óssea) são responsáveis por cerca de 30 a 50% da resistência mecânica do osso. A arquitetura, quando quantificada através da anisotropia do tecido (fabric), e incorporada na análise da resistência óssea, eleva o entendimento dessa variação. O objetivo desta investigação foi aprender os conceitos básicos sobre as técnicas de monitoramento da qualidade óssea e determinar os índices morfométricos de amostras de osso trabecular bovino utilizando um microtomógrafo por raio-X de bancada de alta resolução.

Palavras chave: Osteoporose, arquitetura óssea, anisotropia, osso trabecular.

Abstract

Osteoporosis is a bone disease that affects all the skeleton. It is characterized by low bone mass and deterioration of the architecture of the tissue with consequent increase of the fragility and chance of succeeding fractures. The trabecular bone has a greater surface and faster metabolism (formation and resorption) than the cortical bone. The incidence of fractures caused by osteoporosis is bigger in the lumbar vertebrae, the distal extremity of the radius/ulna and in the femoral head. The bone mass explains about 65% of the variation in the bone strength. The shape and distribution of the trabecular tissue in the 3D space (bone architecture) are responsible for about 30 to 50% of the mechanics strength of the bone. The architecture, when quantified through the anisotropy of the tissue (fabric), and incorporated in the analysis of the bone strength improves the understanding of that variation. The aim of this investigation was to learn the basic concepts about the assessment of bone quality as well as to carry out morphometric measurements of bovine trabecular bone samples using a portable and high resolution x-ray microtomograph.

Key words: Osteoporosis, trabecular tissue, anisotropy, bone architecture.

Sumário

Dedicatória	i
Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Abstract	iv
Lista de Figuras	vi
Lista de Tabelas	vii
1. Introdução	1
1.1 Tecido Ósseo	1
1.2 Qualidade Óssea	3
2. Objetivos	6
3. Microtomografia Computadorizada (μ CT)	6
3.1 Princípios	6
3.2 Quantificação da Microestrutura	8
3.2.1 Morfometria	8
3.2.2 Conectividade	10
3.2.3 Anisotropia	11
3.2.4 Índice de modelo estrutural (SMI)	13
3.2.5 Porosidade	14
4. Material e Método	14
4.1 Obtenção de Amostras Ósseas Trabeculares	14
4.2 Quantificação Microestrutural	16
5. Resultados	19
6. Discussão e Conclusão	22
7. Bibliografia	23
Anexo	25

Lista de Figuras

Figura 1.1 - Estrutura do osso trabecular do calcâneo humano com predominância de bastonetes (a) e placas (b) (Hildebrant et al., 1999)	2
Figura 1.2 - Colo do fêmur com osso trabecular normal (A) e osteoporótico (B) ; vértebra lombar com osso trabecular normal (C) e osteoporótico (D) ^[2]	2
Figura 1.3 - Imagem 3D e seções transversais de uma amostra de osso trabecular	2
Figura 1.4 - Medida da BMD na coluna vertebral (a) e na cabeça femoral (b)	4
Figura 3.1 – Principais elementos de um microtomógrafo.....	7
Figura 3.2 – Fluxograma da reconstrução tomográfica	7
Figura 3.3 - Magnificação tomográfica	8
Figura 3.4 – Desenho esquemático do princípio da determinação de Tb.Th* pela análise 3D.....	9
Figura 3.5 – Desenho esquemático do princípio da determinação de Tb.N* pela análise 3D.....	10
Figura 3.6 – Medição do MIL em duas dimensões ^[17]	11
Figura 3.7 – Representação do MIL em duas dimensões por uma elipse ^[18]	12
Figura 3.8 - Representação do MIL em três dimensões por um elipsóide ^[5]	12
Figura 3.9 – Elipses obtidas sobre planos mutuamente ortogonais em três amostras de osso trabecular: a) fêmur distal; b) rádio distal; c) crista do ílio ^[9]	13
Figura 4.1 - Equipamento para retirada de amostra cúbica.....	15
Figura 4.2 - Amostra cúbica extraída da região trabecular	15
Figura 4.3 – Extração das amostras cilíndricas.....	15
Figura 4.4 - Microtomógrafo de bancada SkyScan 1172.....	16
Figura 4.5 – Exemplo de projeção da amostra óssea	17
Figura 4.6 – Seção reconstruída	18
Figura 4.7 – VOIs radiografos e reconstruídos.....	18
Figura 5.1 – Resultado da análise 2D da seção 500 (central)	19

Lista de Tabelas

Tabela 4.1 - Especificações do Microtomógrafo SkyScan 1172.....	17
Tabela 5.1 - Análise Microestrutural 2D (6.7 μm de resolução).....	20
Tabela 5.2 - Análise Microestrutural 3D (6.7 μm de resolução).....	21

1. Introdução

1.1 Tecido Ósseo

A osteoporose é uma doença do esqueleto caracterizada por baixa massa óssea e deterioração da arquitetura do tecido ósseo com conseqüente aumento da fragilidade e susceptibilidade à fratura. Na osteoporose há um comprometimento da resistência mecânica óssea. A sua ocorrência é mais comum em mulheres após a menopausa e em pessoas com idade mais avançada.

O esqueleto é responsável pela sustentação do corpo, proteção de órgãos, produção de células vermelhas e brancas do sangue e armazenamento de minerais. Ele deve resistir aos carregamentos externos, tais como o próprio peso do corpo e os esforços dinâmicos. O entendimento da influência da estrutura nas propriedades mecânicas do osso trabecular proporciona o desenvolvimento de técnicas de monitoramento da qualidade óssea, com impacto no tratamento de doenças como a osteoporose.

O osso é um material compósito constituído de componentes orgânicos e inorgânicos. A matriz orgânica é constituída basicamente de colágeno (95%) e de outras proteínas não colagenosas (glicoproteínas, fósforoproteínas, próteolípídeos e mucopolisacárides). A matriz mineral consiste essencialmente de hidroxapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, 95%). Esta substância é inicialmente depositada na matriz orgânica como fosfato de cálcio, mas depois se transforma em cristais de apatita.

A arquitetura do tecido ósseo varia com a região do esqueleto, podendo ser esponjosa, denominada osso trabecular, ou compacta, denominada osso cortical. O osso trabecular possui microestrutura porosa com elevada área superficial. A estrutura porosa é composta de trabéculas cujo formato varia entre bastonetes e placas ^[1], conforme mostrado na Fig. 1.1. A fig. 1.2 ilustra a aparência do osso trabecular normal e osteoporótico no colo do fêmur e vértebras da coluna lombar. O osso trabecular é predominantemente encontrado nas extremidades dos ossos longos protegido por uma camada de osso cortical. É também encontrado na estrutura interna de outros ossos, tais como o calcâneo, o crânio, a pélvis e as vértebras da coluna vertebral.

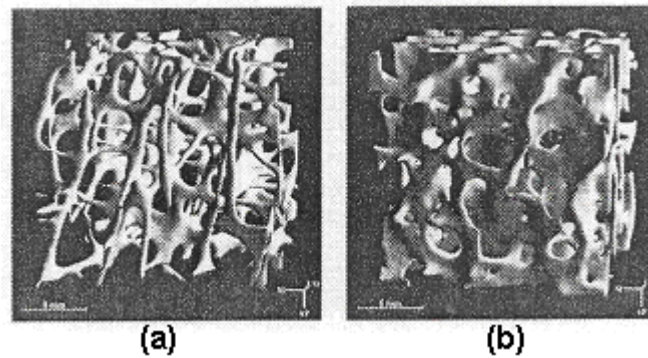


Figura 1.1 - Estrutura do osso trabecular do calcâneo humano com predominância de bastonetes (a) e placas (b) (Hildebrant et al., 1999)

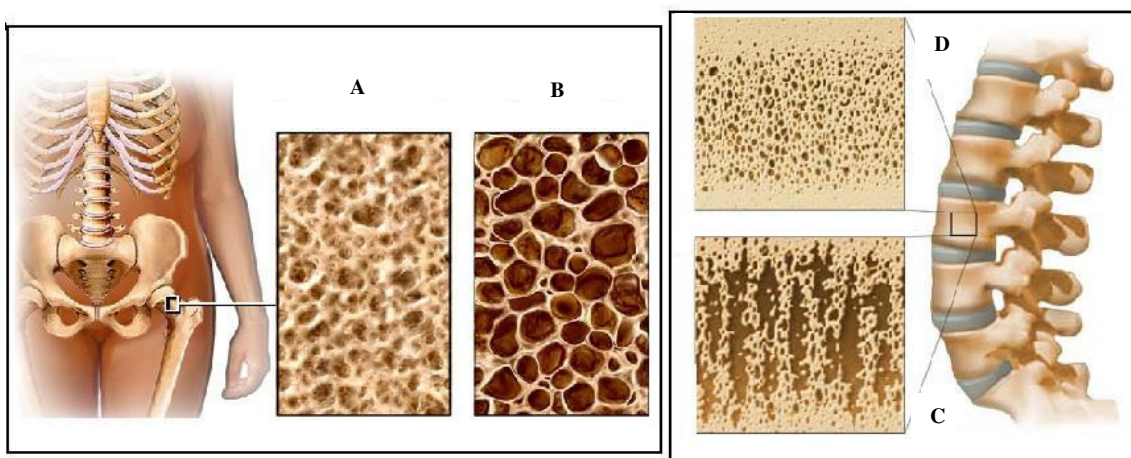


Figura 1.2 - Colo do fêmur com osso trabecular normal (A) e osteoporótico (B) ; vértebra lombar com osso trabecular normal (C) e osteoporótico (D) ^[2]

A orientação das trabéculas ósseas em uma amostra de osso trabecular varia de acordo com a direção ^[3], conforme mostrado na Fig 1.3. Observa-se que no plano zy há uma orientação preferencial das trabéculas e que nos planos xy e zx não há orientação preferencial.

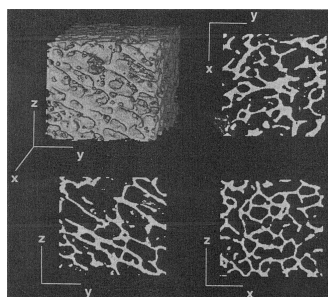


Figura 1.3 - Imagem 3D e seções transversais de uma amostra de osso trabecular

1.2 Qualidade Óssea

A resistência mecânica do osso trabecular foi relacionada à sua densidade [4]. Apesar das medidas de densidade freqüentemente levarem à estimativas razoáveis das propriedades mecânicas, elas não explicam certas variações observadas nestas propriedades, nem dão conta das organizações microestruturais de um osso trabecular, representando assim uma medida escalar incompleta para a previsão das propriedades mecânicas. Goldstein et al (1993) apresenta um exemplo que ilustra este fato. Duas amostras ósseas com frações de volume (BV/TV= Volume de Tecido Ósseo/Volume) próximas entre si de 18% e 19%, respectivamente, apresentaram propriedades mecânicas que variaram de 30% a uma ordem de magnitude, dependendo da direção analisada [5].

Os ossos com maior risco de osteoporose são aqueles que possuem maior quantidade de osso trabecular como as vértebras da coluna vertebral, o colo do fêmur, costelas, pulso e calcânhares.

Na clínica o método mais utilizado para o monitoramento da qualidade óssea utiliza raio-X de baixa intensidade, o DEXA (Dual Energy X-ray Absorptiometry) determina a densidade mineral óssea em uma determinada área (g/cm²). O resultado é expresso através dos parâmetros Z-score e T-score mostrados nas equações 1.1 e 1.2, respectivamente (BMD – densidade mineral óssea; SD - desvio padrão; SI – mesmo sexo e mesma idade; SJ – mesmo sexo e paciente jovem).

$$Z - score(SD) = \frac{(BMD)_{paciente} - \overline{(BMD)}_{SI}}{(SD)_{SI}} \quad (1.1)$$

$$T - score(SD) = \frac{(BMD)_{paciente} - \overline{(BMD)}_{SJ}}{(SD)_{SJ}} \quad (1.2)$$

A qualidade óssea, utilizando-se a BMD, é classificada segundo o valor do T-score: BMD normal (T-score > -1), Osteopenia (-1<T-score<-2.5) e Osteoporose (T-score <-2.5). A figura 1.4 ilustra as regiões em que são medidas a BMD na coluna vertebral e na cabeça femoral.

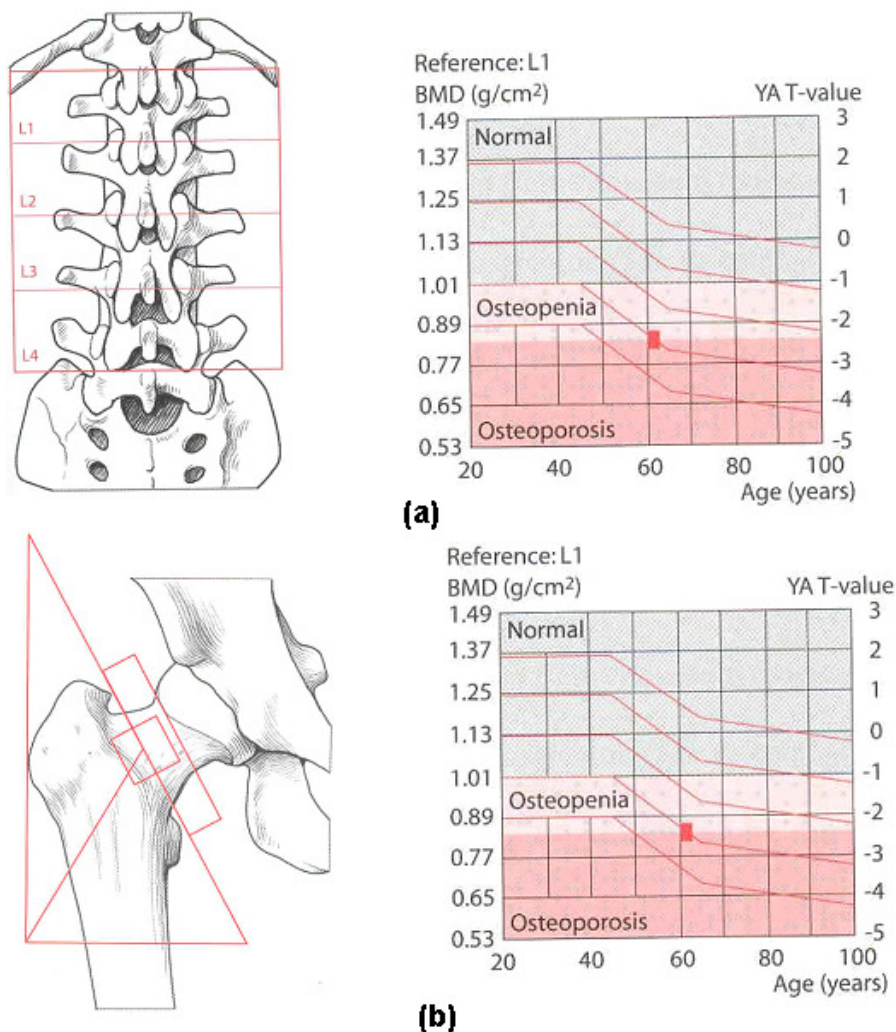


Figura 1.4 - Medida da BMD na coluna vertebral (a) e na cabeça femoral (b)

Alguns fatores podem aumentar a probabilidade de ocorrência de osteoporose:

- a) sexo: em mulheres a osteoporose é duas vezes mais comum que em homens;
- b) Idade: a BMD diminui com a idade;
- c) Etnia: caucasianos e asiáticos têm maior risco de osteoporose que negros e hispânicos;
- d) predisposição genética;
- e) pessoas com menor estrutura são mais susceptíveis;
- f) Fumar;
- g) uso prolongado de remédios com corticóides;
- h) mulheres que já sofreram câncer de mama;
- i) alimentação pobre em cálcio;
- j) falta de exercício;
- k) consumo excessivo de álcool^[2].

Outros métodos de avaliação do tecido ósseo são utilizados^[6]:

- **Radiografia Magnificada:** é uma radiografia das mãos com maior detalhamento.

- **Radiogrametria:** é a determinação da espessura cortical do metacarpo. Não detecta precocemente a osteoporose.
- **Morfometria (MXA – Morphometric X-ray Absorptiometry):** Raio-x do tórax e da coluna lombar são analisadas e o tamanho (altura anterior, posterior medial) e contorno dos corpos vertebrais são determinados por um software. Uma redução de 15% nesses parâmetros caracteriza compressão dos corpos vertebrais.
- **Medidas de Parâmetros do Fêmur Proximal:** alguns parâmetros radiológicos do fêmur proximal, por exemplo, o comprimento do colo do fêmur, têm correlação com o risco de fratura nessa região anatômica.
- **Tomografia Computadorizada:** pode ser realizado apenas com instrumentos modernos de alta resolução, mas expõe o paciente a maiores níveis de radiação.
- **Imagem por Ressonância Magnética:** este método não envolve exposição à radiação e é especialmente adaptado para o exame de medula óssea. É a maneira ideal para se diferenciar entre uma fratura por osteoporose e a de uma devido à metástase.

Biópsias ósseas da crista do íliaco podem ser utilizadas para se investigar a estrutura trabecular analisando-se seções do tecido. Diversos índices são derivados dessa análise e a técnica é denominada histomorfometria 2D. Índices histomorfométricos 3D são obtidos de imagens 2D (reconstruções microtomográficas) através da medida de índices morfológicos primários (BS – superfície óssea trabecular; BV – fração de volume ósseo trabecular; TV – volume da amostra óssea). Esses índices são utilizados para o cálculo de índices histomorfométricos derivados utilizando-se conceitos de estereologia e assumindo-se um modelo estrutural trabecular constante e composto apenas de placas ósseas. A estrutura trabecular, no entanto, se altera devido ao envelhecimento e doenças metabólicas. Os índices derivados calculados são: Tb.Th – espessura trabecular; Tb.Sp – espessura das cavidades contendo medula óssea; Tb.N – número de trabéculas por unidade de comprimento.

Reconstruções tridimensionais permitem a medida direta dos mesmos índices primários e histomorfométricos. Estas medidas não são baseadas em um modelo

estrutural trabecular constante e incluem a conectividade, o grau de anisotropia e o índice de modelo estrutural (SMI), que é uma estimativa da quantidade de placas e bastonetes presentes na estrutura trabecular. A técnica baseada em microtomografia tridimensional por raio-X tem sido investigada em laboratórios dos EUA e Europa para a caracterização da qualidade óssea trabecular visando o diagnóstico da osteoporose^[7].

2. Objetivos

Os objetivos desta investigação são o aprendizado dos conceitos básicos sobre as técnicas de monitoramento da qualidade óssea e a determinação dos índices morfométricos de amostras de osso trabecular bovino utilizando um microtomógrafo por raio-X de bancada de alta resolução.

3. Microtomografia Computadorizada (μ CT)

3.1 Princípios

Imagens tridimensionais de um objeto podem ser adquiridas para análises qualitativas e quantitativas da sua microestrutura pela técnica de microtomografia computadorizada. A figura 3.1 descreve esquematicamente os principais constituintes de um microtomógrafo: a) tubo de raio-x com um foco de dimensão micrométrica e um campo de emissão cônico; b) mesa com movimento de precisão rotacional e translacional (direções X, Y e Z), onde é fixado o objeto a ser analisado; c) detector de radiação. A figura 3.2 descreve as etapas do processo de obtenção da imagem 3D do objeto. As etapas de caracterização compreendem:

- a) obtenção das projeções através da rotação do objeto. O ângulo de rotação determina o número de projeções (por exemplo, se $\theta=1^\circ$, serão obtidas 360 projeções). Uma média das projeções é obtida a cada incremento angular.
- b) pré-processamento e reconstrução 2D das seções do objeto.
- c) segmentação das seções do objeto e reconstrução 3D.
- d) quantificação da microestrutura do objeto utilizando softwares desenvolvidos para essa finalidade.

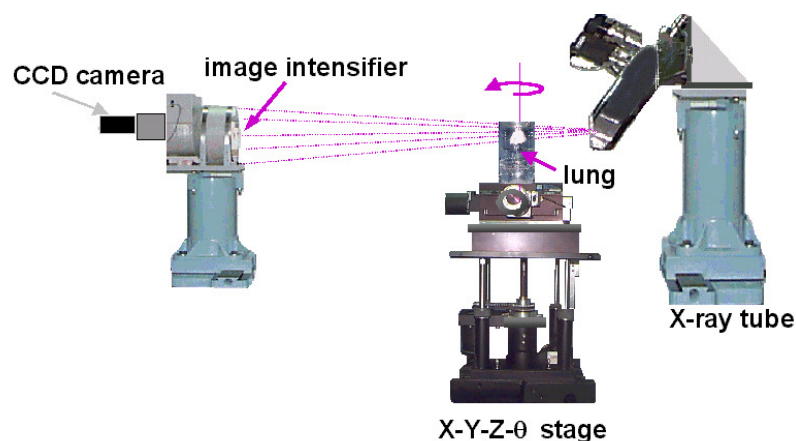


Figura 3.1 – Principais elementos de um microtomógrafo

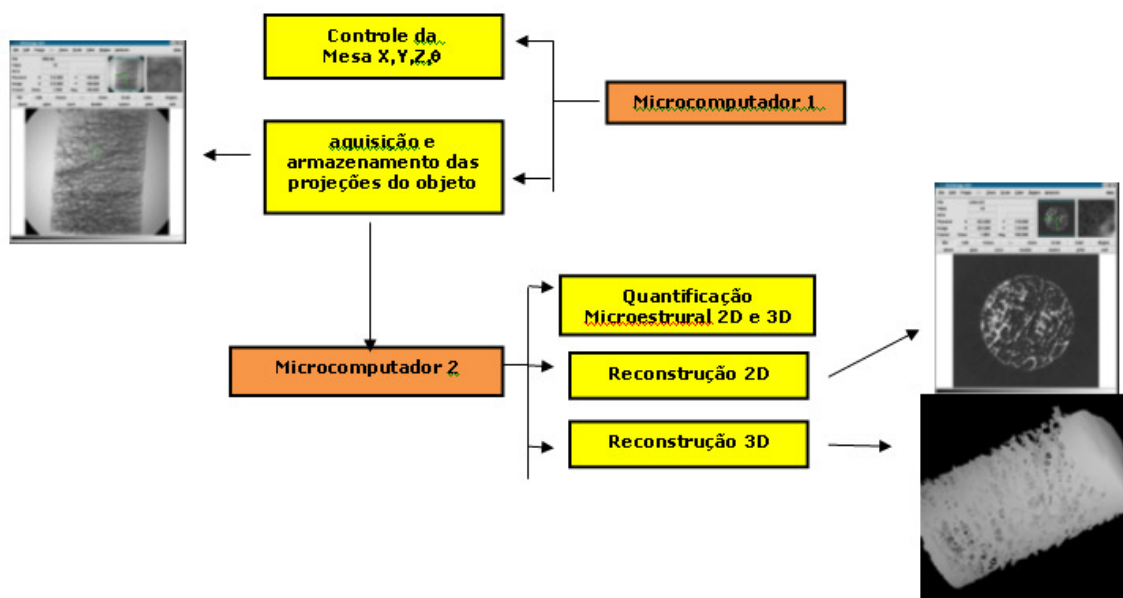


Figura 3.2 – Fluxograma da reconstrução tomográfica

As variáveis que influem na resolução da microtomografia estão mostradas figura 3.3: D_1 é a distância da fonte ao objeto, D_2 é a distância da fonte ao detetor de radiação, H é altura do objeto, D_3 é altura do objeto projetado no detetor de radiação, R é a resolução microtomográfica e K é a dimensão do pixel no detetor. O fator de magnificação é $M=(D_1+D_2/D_1)$. A resolução $R=K/M$.

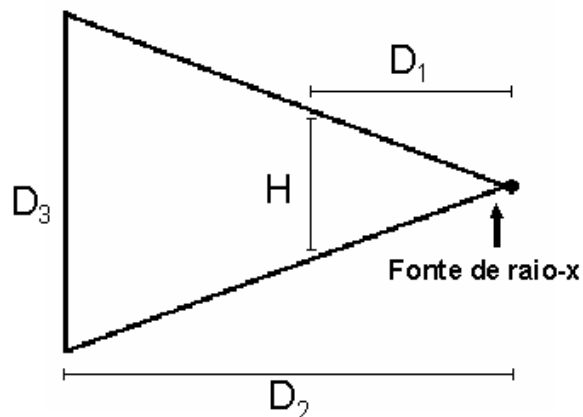


Figura 3.3 - Magnificação tomográfica

3.2 Quantificação da Microestrutura

A quantificação da microestrutura do osso trabecular pode ser realizada utilizando-se seções da amostra óssea obtidas por μ CT (análise 2D) ou o volume do objeto a partir da reconstrução tridimensional obtida por μ CT (análise 3D) ^[8]. Em ambas as quantificações são utilizados os seguintes índices primários: a) área da superfície óssea da amostra (BS); b) volume ósseo da amostra (BV); c) volume total da amostra (TV). Para se comparar amostras com diferentes dimensões utiliza-se índices normalizados obtendo-se BV/TV, BS/TV e BS/BV. A quantificação da microestrutura envolve os parâmetros a seguir descritos:

3.2.1 Morfometria

Análise 2D

Os parâmetros histomorfométricos são calculados assumindo-se que a amostra óssea possui uma microestrutura constante (composta apenas de placas ou bastonetes) e utilizando-se técnicas de estereologia ^[9]. Assumindo-se o modelo de placas, as seguintes equações são utilizadas para determinação dos parâmetros morfométricos ^[9, 10]:

- a) Espessura Trabecular (Tb.Th): é a espessura média das trabéculas.

$$Tb.Th = 2 / (BS/BV) \quad (3.1)$$

- b) Número trabecular (Tb.N): é o número de placas por unidade de comprimento.

$$\text{Tb.N} = (\text{BV/TV})/\text{Tb.Th} \quad (3.2)$$

- c) Espaço trabecular (Tb.Sp): é a espessura média das cavidades com medula óssea.

$$\text{Tb.Sp} = (1/\text{TbN}) - \text{Tb.Th} \quad (3.3)$$

Análise 3D

Imagens tridimensionais obtidas por μCT permitem a determinação dos parâmetros microestruturais no espaço 3D. Estas técnicas não se baseiam na existência de nenhum modelo estrutural e são isentas dos erros devidos ao uso destes modelos. Os índices morfológicos medidos no espaço 3D são denotados por um asterisco. O índice primário BS^* é calculado usando o método de “Marching Cubes” que triangulariza a superfície do tecido ósseo ^[11,12]. O índice BV^* é calculado usando tetraedros correspondentes ao volume relativo à superfície triangularizada ^[13]. O índice TV^* é determinado através de uma contagem de voxels. Para comparar amostras com tamanhos diferentes os índices normalizados BV^*/TV^* e BS^*/TV^* são utilizados. A superfície óssea específica é BS^*/BV^* . Os seguintes conceitos são utilizados para determinação dos parâmetros morfométricos ^[8]:

- a) Tb.Th^* (espessura trabecular): a espessura média das trabéculas é determinada utilizando-se esferas cujo diâmetro deve preencher a estrutura da trabécula, conforme esquematizado na figura 3.4. A espessura média é calculada para se obter Tb.Th ;

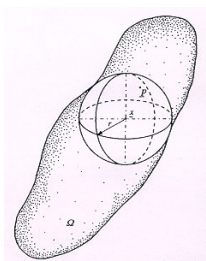


Figura 3.4 – Desenho esquemático do princípio da determinação de Tb.Th^* pela análise 3D

b) Tb.Sp* (espaço trabecular): é a espessura média das cavidades que contém medula óssea. Utiliza-se o mesmo princípio da determinação de Tb.Th. nos voxels que contém a medula óssea.

f) Tb.N* (número trabecular): é o inverso da distância entre os eixos médios das trabéculas ósseas (fig. 3.5).

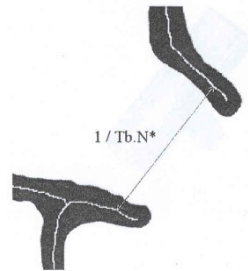


Figura 3.5 – Desenho esquemático do princípio da determinação de Tb.N* pela análise 3D

3.2.2 Conectividade

O parâmetro Euler-Poincare ou “número de Euler” é um indicador de conectividade de uma estrutura 3D^[14,15]. A conectividade é definida como uma medida do grau que uma estrutura está multiplamente conectada, isto é, o número máximo de conexões que podem ser rompidas antes que a estrutura seja separada em duas partes. O número de Euler (χ) para uma estrutura 3D é determinado pela equação 3.5:

$$\chi = \beta_0 - \beta_1 - \beta_2 \quad (3.5)$$

β_0 é o número de partes ósseas não conectadas, (1 é a conectividade e (2 é o número de cavidades com medula óssea totalmente circundadas por osso. O osso trabecular é uma estrutura totalmente conectada ((0 = 1), e com nenhuma cavidade fechada contendo medula óssea ((2 = 0). A expressão acima fica então simplificada:

$$\chi = 1 - \beta_1 \quad (3.6)$$

A análise de Euler é também expressa por densidade de conectividade (Eu.Conn.D, mm⁻³) que é o quociente entre β_1 e o volume da amostra (TV).

Uma outra medida de conectividade denominada “fator padrão de osso trabecular (Tb.Pf)” foi proposta por Hahn e colaboradores em 1992. Em uma análise

2D o parâmetro calcula um índice de relativa convexidade e concavidade da superfície óssea considerando que concavidade indica conectividade (presença de nós) e convexidade indica estruturas desconectadas isoladas (trabéculas ósseas). Em 2D, conforme equação 3.7, o índice Tb.Pf compara área e perímetro (ou volume e superfície na análise 3D) de um sólido binarizado antes e depois (subscrito 1 e 2, respectivamente) de um processo de dilatação. Como resultado, menores valores de Tb.Pf significam estrutura trabecular mais conectada enquanto maiores valores de Tb.Pf significam estrutura trabecular menos desconectada.

$$\text{Tb. Pf} = \frac{P_1 - P_2}{A_1 - A_2} \quad (3.7)$$

3.2.3 Anisotropia

Whitehouse ^[16] (1974) descreveu a medida da anisotropia microestrutural utilizando uma técnica de contagem de interseção. Ele expressou a anisotropia através da medida do comprimento da interseção média (mean intercept length, MIL). O princípio da MIL é a contagem em uma seção plana de osso trabecular do número de interseções entre uma grade de linhas paralelas e a interface trabécula / medula óssea (Fig. 3.6). O MIL é o comprimento médio entre duas interseções sendo calculado pela razão entre o número de interseções em uma dada direção da grade, $I(\theta)$, e o comprimento L total da grade. Ao construir diagramas polares com os pontos (θ, L) , Whitehouse constatou que estes pontos podem ser interpolados de forma precisa e representados por uma elipse (Fig. 3.7).

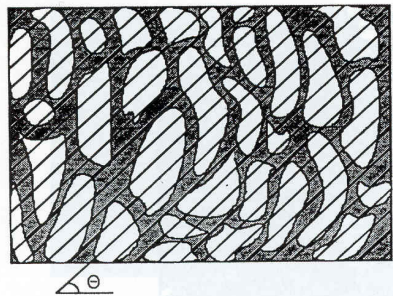


Figura 3.6 – Medição do MIL em duas dimensões ^[17]

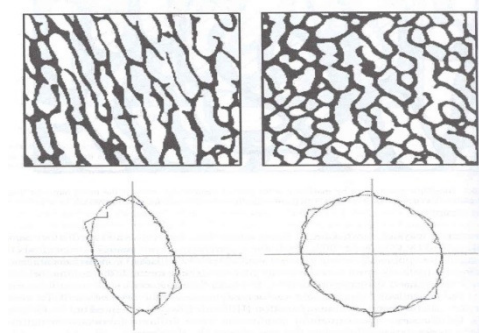


Figura 3.7 – Representação do MIL em duas dimensões por uma elipse ^[18]

A generalização do conceito da anisotropia estrutural para três dimensões gera uma elipsóide, como ilustrado na figura 3.8. A equação geral de uma elipsóide em um sistema de coordenadas cartesiano com eixos x , y e z é dada pela equação 3.7:

$$Ax^2 + By^2 + Cz^2 + 2Dxy + 2Exz + 2Fyz = 1 \quad (3.7)$$

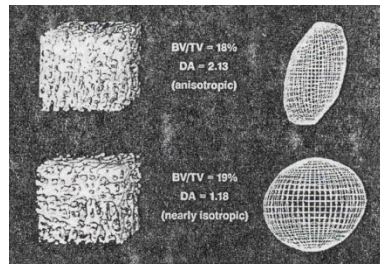


Figura 3.8 - Representação do MIL em três dimensões por um elipsóide ^[5]

Seja $L(\theta)$ o MIL calculado na direção θ em um plano α com direção qualquer. O plano α intercepta uma amostra óssea gerando uma seção. Sejam n_1 , n_2 e n_3 as projeções no sistema de coordenadas x , y e z de um vetor unitário n com direção θ pertencente ao plano α , e seja um vetor com magnitude $L(\theta)$ na direção do vetor unitário n do plano α . As coordenadas do vetor com magnitude $L(\theta)$ nos eixos x , y e z são dadas por: $x = L(\theta) n_1$, $y = L(\theta) n_2$ e $z = L(\theta) n_3$. A equação 3.7 pode ser reescrita como segue:

$$An_1^2 + Bn_2^2 + Cn_3^2 + 2Dn_1n_2 + 2En_1n_3 + 2Fn_2n_3 = \frac{1}{L^2(\theta)} \quad (3.8)$$

A equação 3.8 pode ser reescrita como:

$$\begin{bmatrix} n_1 & n_2 & n_3 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} A & D & E \\ D & B & F \\ E & F & C \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} n_1 \\ n_2 \\ n_3 \end{bmatrix} = \frac{1}{L^2(\theta)} \quad (3.9)$$

Onde M é um tensor de segunda ordem, positivo definido, e n é um versor que define a direção sobre a qual infere-se o valor de $L(\theta)$. O tensor M , tensor de anisotropia, caracteriza o arranjo geométrico da microestrutura do meio poroso. Os autovetores de M fornecem as direções principais do elipsóide, as quais são as orientações preferenciais das trabéculas.

Harrigan & Mann (1984) propuseram uma técnica experimental de medida de $L(\theta)$ em uma direção arbitrária e do MIL em três dimensões. A técnica consiste em obter elipses sobre três planos mutuamente ortogonais da amostra, as quais são as projeções ortogonais de um elipsóide sobre estes planos. Observa-se na Fig. 3.9 que os eixos principais das elipses determinam as orientações das trabéculas.

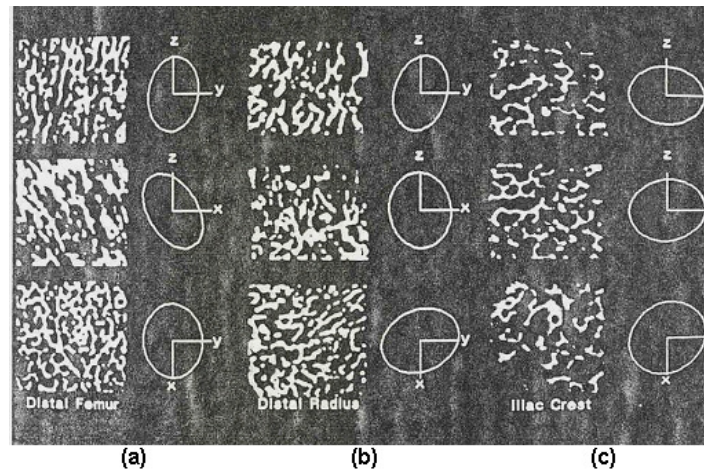


Figura 3.9 – Elipses obtidas sobre planos mutuamente ortogonais em três amostras de osso trabecular: a) fêmur distal; b) rádio distal; c) crista do íliaco ^[9]

O grau de anisotropia (DA) é definido conforme a equação 3.10, utilizando-se o autovalor mínimo e máximo da matriz M .

$$DA = \left(1 - \frac{\text{autovalor}_{\min}}{\text{autovalor}_{\max}}\right) \quad (3.10)$$

3.2.4 Índice de modelo estrutural (SMI)

O SMI (structure model index) indica a predominância de bastonetes ou placas no osso trabecular. Este parâmetro é de muita importância na osteoporose do osso trabecular que é caracterizada pela transição da arquitetura de placas para bastonetes. Uma estrutura apenas com placas ou bastonetes terá valores de SMI 0 e 3, respectivamente. O cálculo da SMI é expresso pela equação 3.11 e é baseado na

dilatação do modelo de voxel 3D, Sendo S a área superficial do objeto antes da dilatação, S' a diferença na área causada pela dilatação e V é o volume inicial sem dilatação.

$$SMI = 6 \times \frac{S' \times V}{S^2} \quad (3.11)$$

3.2.5 Porosidade

A porosidade é medida na análise 2D. Nos objetos binarizados são identificados espaços completamente fechados. A porosidade é a área destes espaços expressa como percentual da área total dos objetos binarizados. Uma medida de porosidade em 3D pode ser obtida por integração desta medida no volume de interesse do objeto.

4. Material e Método

4.1 Obtenção de Amostras Ósseas Trabeculares

Seis amostras de osso trabecular foram obtidas de fêmur bovino, extraído de um animal sacrificado com quatro anos de idade, através do seguinte procedimento executado no “Laboratório de Biomecânica” do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP: a) congelamento dos fêmures; b) retirada em temperatura ambiente de uma amostra cúbica da região trabecular de um par de fêmures do mesmo animal utilizando um mecanismo de movimentação angular e longitudinal e uma serra circular de 1mm de espessura (figuras 4.1 e 4.2); d) extração de três amostras cilíndricas com dimensão de 10mm de raio e 20 mm de altura de cada cubo nas direções principais do trabeculado (fig. 4.3). A primeira direção foi obtida de observação radiográfica do fêmur considerando-se a direção preferencial das trabéculas; e) manutenção das amostras cilíndricas em soro (solução salina com 0.9% de NaCl) até a realização da quantificação estrutural através de microtomografia.



Figura 4.1 - Equipamento para retirada de amostra cúbica



Figura 4.2 - Amostra cúbica extraída da região trabecular

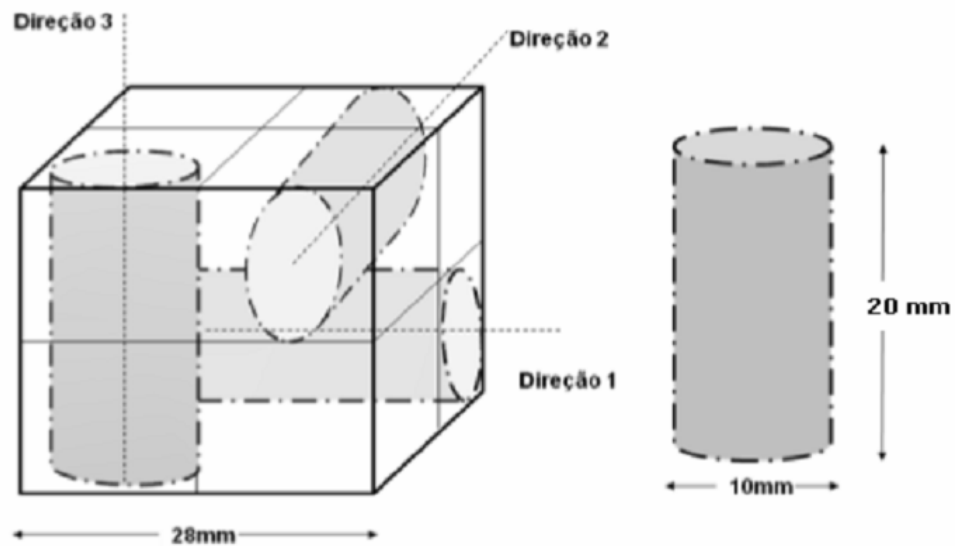


Figura 4.3 - Extração das amostras cilíndricas

4.2 Quantificação Microestrutural

A análise microestrutural das amostras cilíndricas foi realizada no Microtomógrafo 3D de bancada na EMBRAPA Instrumentação Agropecuária de São Carlos (modelo 1172, SkyScan, Bélgica), mostrado na Fig. 4.4. A Tabela 4.1 descreve as características do microtomógrafo. O seguinte procedimento foi utilizado na quantificação microestrutural:

- Cada uma das amostras cilíndricas foi afixada em um template com uma “massa de modelar” a fim de se obter um alinhamento vertical, evitar deslocamentos durante a movimentação angular e manutenção no campo visual do detector de radiação (câmera CCD), conforme ilustrado na figura 4.5. A reconstrução tomográfica utiliza o algoritmo de Feldkamp^[9].
- Foram obtidas 480 projeções geradas e caracterizadas como imagens no formato TIF/16bits com resolução de 6,7 μm para cada píxel. Com esta resolução não foi possível radiografar toda a amostra óssea, conforme fig. 4.5, obtendo-se um arquivo de projeções de tamanho aproximado de 4Gb e um arquivo de reconstrução 3D de aproximadamente 32Gb (formato STL) com 936 secções (fig. 4.6). O uso de uma maior resolução permitiria observar toda a amostra, mas produziria um arquivo muito grande de reconstrução 3D.
- Dificuldades de processamento computacional do arquivo de 32Gb resultaram em uma escolha ainda menor do volume de interesse da amostra utilizado na análise microestrutural (ver anexo), conforme fig. 4.7.

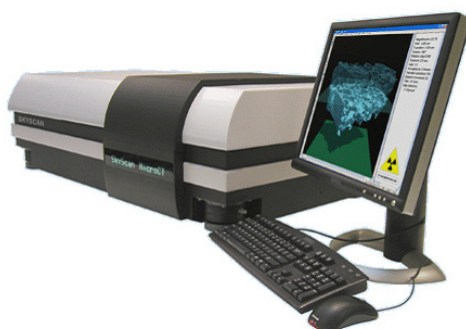


Figura 4.4 - Microtomógrafo de bancada SkyScan 1172

Tabela 4.1 - Especificações do Microtomógrafo SkyScan 1172

Especificações	SkyScan 1172 80kV	SkyScan 1172 100kV
Nível de detalhe	1 μm para 10Mp e 2 μm para 1.3Mp	
Tamanho do Pixel e Magnificação máx.	8 μm	5 μm
Fonte de Raios-X	Tubo selado microfocado, ventilado, vida útil maior que 10000h. Tamanho do ponto < 8 μm @ 8W, 20-80kV, 0-100 μA	
	Tamanho do ponto < 5 μm @ 4W, 20-100kV, 0-250 μA (10W máx.)	
Detector de Raios-X	10 Mp (4000 X 2300) CCD digital 12-bit 1.3 Mp (1280 X 1024) CCD digital 12-bit	
Tamanho máximo do objeto para reconstrução	Câmera de 10Mp: 35mm de diâmetro para varredura standard e 68mm para varredura com offset. Câmera com 1.3 Mp: 20mm de diâmetro para varredura standard e 37mm para varredura com offset.	
Computador para controle, reconstrução 3D e análise de imagem	Computador com processamento paralelo e rápida reconstrução volumétrica para feixe em cone (algoritmo de Feldkamp)	
Segurança de radiação	< 1 $\mu\text{Sv/h}$ em qualquer ponto da superfície do equipamento	
Dimensões / condições de operação	1250X690X360 / 240kg, para 100-130AC - 4A ou 220 - 240 AC - 3A / 50-60Hz (apenas scanner). De -10°C até 50 armazenamento, de 18° até 25° em operação, 70% de umidade máxima (sem condensação).	

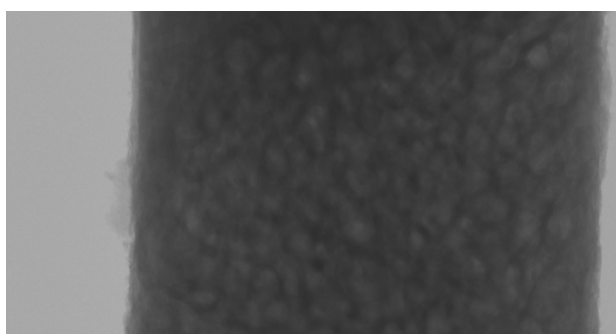


Figura 4.5 – Exemplo de projeção da amostra óssea

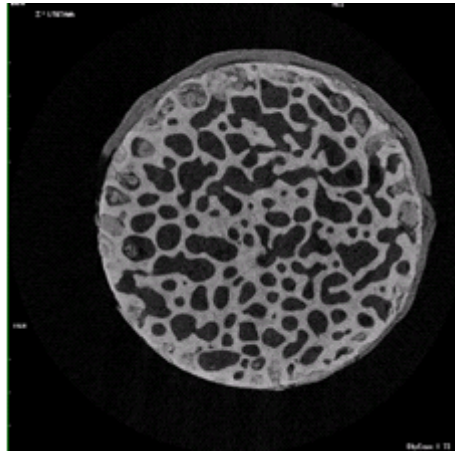


Figura 4. 6 – Seção reconstruída

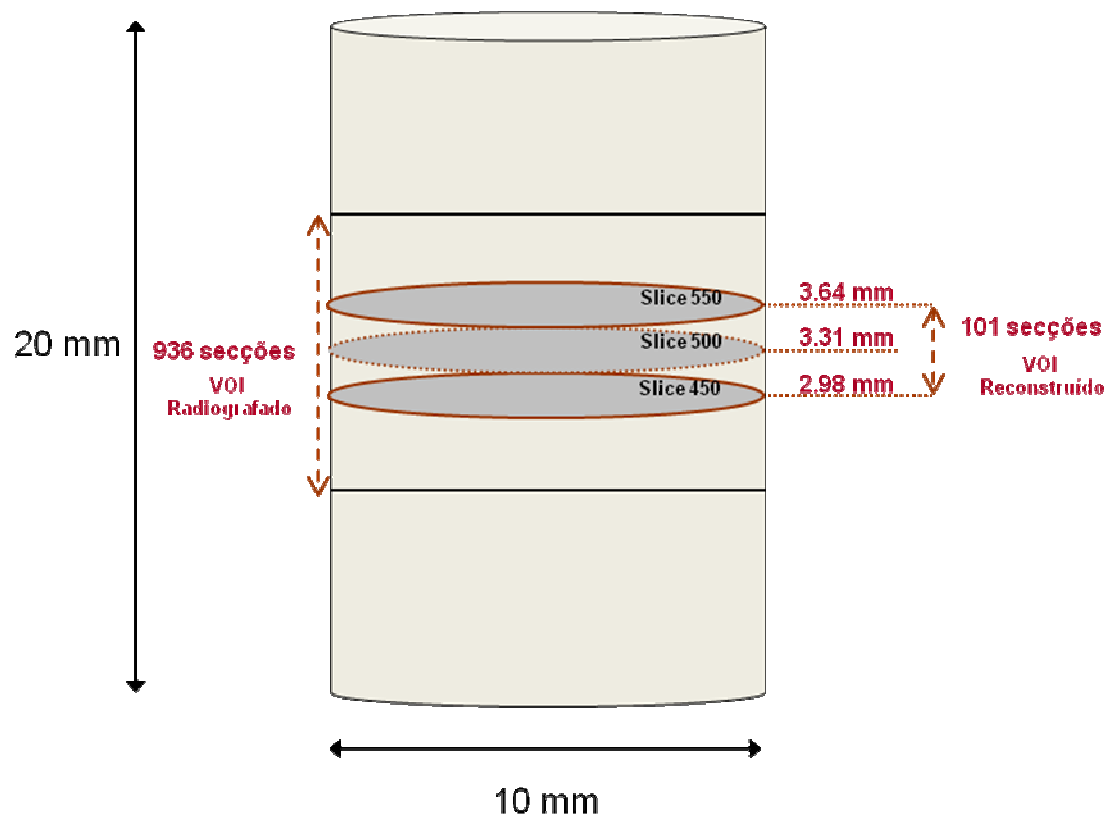


Figura 4.7 – VOIs radiografos e reconstruídos

5. Resultados

A fig. 5.1 ilustra o resultado da análise 2D de uma das amostras ósseas utilizando-se o software CT-Analyser. A tabela 5.1 descreve os resultados das seis amostras ósseas, nas direções principais P_1 , P_2 e P_3 , das seguintes análises 2D: morfometria, conectividade, anisotropia, índice de modelo estrutural e porosidade. A Tabela 5.2 descreve os resultados da análise 3D nas mesmas amostras.

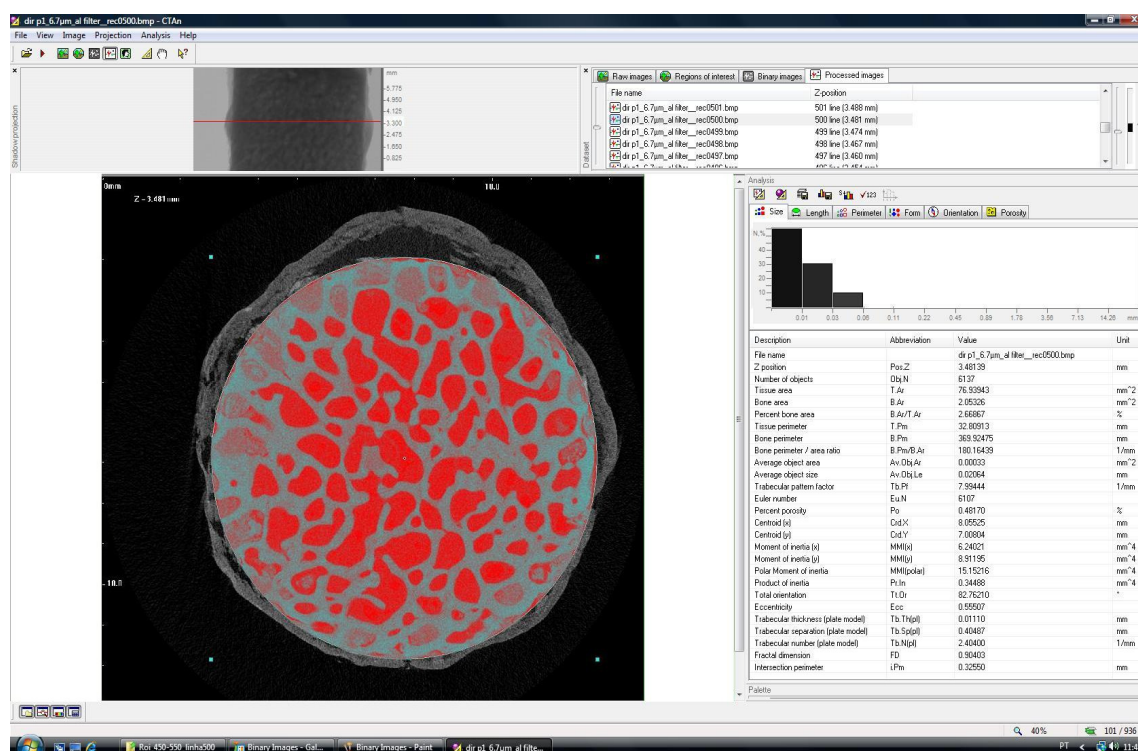


Figura 5.1 – Resultado da análise 2D da seção 500 (central)

Tabela 5.1 - Análise Microestrutural 2D (6.7 µm de resolução) na seção 500

Parâmetros	Abreviação	Amostras Ósseas Direções Principais (P1, P2, P3) Fêmures Esquerdo (E) e Direito (D)						Unidade
		P1 (E)	P1 (D)	P2 (E)	P2 (D)	P3 (E)	P3 (D)	
Tissue Area	T.Ar	76.99	76.94	76.79	77.82	77.72	76.08	mm ²
Bone Area	B.Ar	5.44	2.05	2.58	3.65	1.61	0.87	mm ²
Percent Bone Area	B.Ar/ T.Ar	7.06	2.67	3.36	4.69	2.07	1.15	%
Tissue Perimeter	T.Pm	32.82	32.81	32.77	32.99	32.97	32.61	mm
Bone Perimeter	B.Pm	726.49	369.92	393.21	546.48	329.10	198.36	mm
Trabecular pattern factor	Tb.Pf	6.79	7.99	6.32	5.83	6.65	7.84	1/ mm
Euler Number	Eu.N	6999	6107	5036	6542	6130	4381	-
Percent Porosity	Po	1.94	0.48	0.47	0.62	0.04	0.01	%
Trabecular thickness	Tb.Th	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	mm
Trabecular separation	Tb.Sp	0.19	0.41	0.38	0.27	0.46	0.76	mm
Trabecular Number	Tb.N	4.72	2.40	2.56	3.51	2.11	1.30	1/ mm

Tabela 5.2 - Análise Microestrutural 3D (6.7 μm de resolução)

Parâmetros	Abreviação	Amostras Ósseas Direções Principais (P1, P2, P3) Fêmures Esquerdo (E) e Direito (D)						Unidade
		P1 (E)	P1 (D)	P2 (E)	P2 (D)	P3 (E)	P3 (D)	
Tissue Volume	TV	51.44	54.10	51.31	51.99	51.93	50.83	mm^3
Bone Volume	BV	3.45	1.39	1.46	2.34	0.99	0.49	mm^3
Percent Bone Volume	BV/TV	6.69	2.56	2.84	4.50	1.92	0.98	%
Tissue Surface	TS	175.79	176.81	175.34	177.55	177.34	173.81	mm^2
Bone Surface	BS	594.08	326.19	297.15	455.51	270.96	155.26	mm^2
Bone Surface/Volume Ratio	BS/BV	172.41	235.49	203.79	194.66	271.10	313.06	1/ mm
Bone Surface Density	BS/TV	11.55	6.03	5.79	8.76	5.22	3.05	1/ mm
Trabecular pattern factor	Tb.Pf	23.28	84.03	56.89	45.10	100.60	123.77	1/ mm
Trabecular thickness	Tb.Th	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.02	mm
Trabecular number	Tb.N	2.24	0.95	1.02	1.58	0.80	0.47	1/ mm
Trabecular separation	Tb.Sp	0.31	0.33	0.35	0.32	0.31	0.34	mm
Degree of Anisotropy	DA	0.51	0.52	0.48	0.49	0.49	0.49	-
Eigenvalue 1		0.64	0.69	0.67	0.67	0.65	0.67	-
Eigenvalue 2		0.69	0.65	0.65	0.68	0.68	0.66	-
Eigenvalue 3		0.34	0.33	0.35	0.35	0.34	0.34	-

6. Discussão e Conclusão

A técnica de microtomografia tem dado contribuições relevantes para se investigar o aprimoramento da caracterização da qualidade óssea [21-23]. A microtomografia de alta resolução é uma ferramenta incrível, assim como os softwares para visualização e quantificação microestrutural, para investigações sobre a influência da microestrutura na resistência mecânica do osso trabecular através da correlação dos parâmetros microestruturais com os parâmetros de resistência mecânica (coeficientes elásticos da matriz de rigidez) [24]. A utilização de um módulo de ensaio mecânico acoplado ao microtomógrafo [24] permitirá a determinação dessas correlações, bem como o desenvolvimento de técnicas visando o aprimoramento da caracterização da qualidade óssea para o diagnóstico de doenças do metabolismo ósseo como a osteoporose. O software quantifica diversos parâmetros da microestrutura através de análise microestrutural 2D e 3D.

As amostras ósseas foram extraídas de um par de fêmures de um mesmo animal. A análise microestrutural 3D descrita na tabela 5.2 mostra que houve pequena variação nos parâmetros das amostras ósseas fração de volume (BV/TV), superfície óssea (BS), densidade de superfície óssea (BS/TV), conectividade (Tb.Pf) e número trabecular (Tb.N) entre as amostras cilíndricas extraídas de um mesmo fêmur em direções perpendiculares entre si e entre amostras de fêmures diferentes com a mesma direção. Os parâmetros de espessura trabecular (Tb.Th), separação trabecular (Tb.Sp) e grau de anisotropia (DA) e autovalores não variaram entre as amostras de um mesmo fêmur ou de fêmures diferentes com a mesma direção. Os valores medidos dos autovalores e do grau de anisotropia mostram que as trabéculas das amostras ósseas extraídas dos dois fêmures têm a mesma orientação espacial nas direções principais.

O número de amostras ósseas utilizadas nessa investigação, apesar de pequeno, foi suficiente para demonstrar o enorme potencial da microtomografia de alta resolução nas investigações sobre a influência dos parâmetros microestruturais do osso trabecular na qualidade óssea.

7. Bibliografia

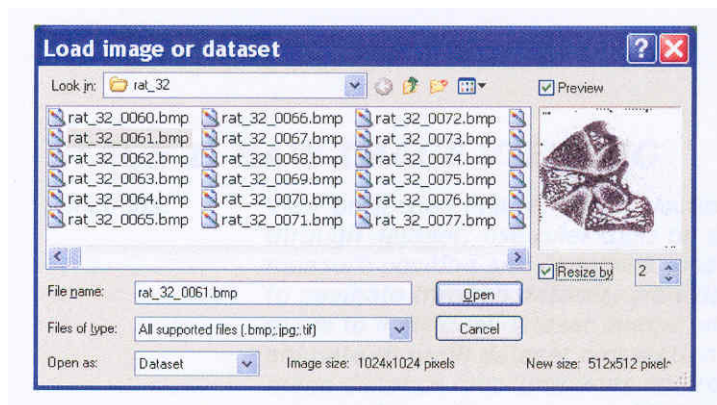
- [1] Hildebrand T, Laib A, Muller R, Dequeker J, Ruegsegger P.. **Direct Three-Dimensional Morphometric Analysis of human cancellous bone: microstructural data from spine, femur iliac crest and calcaneus**, Journal of Bone and Mineral Research, 14(7): 1167-117, 1999.
- [2] <http://www.disaboom.com/Health/osteoporosis>
- [3] Goulet RW; Goldstein SA, Ciabelli MJ, Kuhn JL, Brown MB, Feldkamp LA. **The relationship between the structural and orthogonal compressive properties of trabecular bone**. Journal of Biomechanics, 27: 375-389, 1994.
- [4] Carter DR, Hayes WC. **The compressive behavior of bone as a two-phase porous structure**, Journal of Bone and Joint Surgery, 59A: 954 – 962, 1977.
- [5] Goldstein SA, Goulet R, McCubbrey D. **Measurement and significance of three-dimensional architecture to the mechanical integrity of trabecular bone**, Calcified Tissue International, 53: s127-s133, 1993.
- [6] Bartl R, Frisch B. **Clinical investigation in osteoporosis**, In: Osteoporosis, Prevention and Therapy, Springer, 2004.
- [7] Odgaard A. Quantification of cancellous bone architecture, In: Cowin S, Handbook of Bone Mechanics, CRC Press, 2001.
- [8] Hildebrand T, Laib A, Muller R. Dequeker J, Ruegsegger P. **Direct three-dimensional morphometric analysis of human cancellous bone: microstructural data from spine, femur, iliac crest, and calcaneus**, Journal of Bone & Mineral Research. 14(7):1167-74, 1999.
- [9] Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt M, Jesion G, Kleerekoper M. **The direct estimation of the three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography**, Journal of Bone and Mineral Research, 4 (1):3-11, 1989.
- [10] CT-analyser: bone biology user guide, Skyscan, Belgium, 2008.
- [11] Lorensen WE, Cline HE. **Marching cubes: a high resolution 3D surface construction algorithm**, Computer Graphics, 21:163-169, 1987.
- [12] Muller R, Hildebrand T, Ruegsegger P. **Non-invasive bone biopsy: a new method to analyse and display the three-dimensional structure of trabecular bone**, Physics in Medicine and Biology, 29:145-164, 1994.
- [13] Guilak F. **Volume and surface area of viable chondrocytes in situ using geometric modeling of serial confocal sections**, Journal of Microscopy, 173:245-256, 1994.
- [14] Lee CN, Rosenfeld A. **Computing the Euler Number of a 3D image**, Proceedings of the First International Conference on Computer Vision, 567-571, 1987.
- [15] Odgaard A, Gundersen HJG. **Determination of connectivity in trabecular bone**. The International Society for Stereology, Irvine, CA, USA, 1991.

- [16] Whitehouse WJ, Dyson E D Scanning Electron Microscope **Studies of Trabecular Bone in the Proximal End of the Human Femur**. Journal of Anatomy, 118: 417-444, 1974.
- [17] Odgaard A, Kabel J, Rietbergen BV, Dalstra M, Huiskes R. **Fabric and elastic principal directions of cancellous bone are closely related**. Journal of Biomechanics, 30 (5):487-495, 1997b
- [18] Cowin SC, Doty SB. **Modeling Material Microstructures**. In: Cowin SC, Doty SB, Tissue Mechanics, Springer, 2006.
- [19] Hahan M, Vogel M, Pompesius-Kempa M, Delling G. **Trabecular bone pattern factor – a new parameter for simple quantification of bone microarchitecture**, Bone 13:327-330, 1992.
- [20] Hildebrand T, Ruegsegger P. **Quantification of bone microarchitecture with the structure model index**. Computational Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering, 1: 67-75, 1997.
- [21] Odgaard A, **Quantification of cancellous bone architecture**, In: Cowin SC, Bone Mechanics Handbook, Informa HealthCare, 2001.
- [22] Odgaard A. **Three-Dimensional Methods for Quantification of Cancellous Bone Architecture**, Bone, 20 (4):315-328.
- [23] Dreossi D, Cosmi E. **Numerical and experimental structural analysis of trabecular architecture**, Meccanica, 42:85-93, 2007.
- [24] Hakme AMS, Alves JM, Guarniero R, Leivas TP, Pereira CAM, **Estudo Experimental das Propriedades Elásticas de Ossos Trabeculares Utilizando Ensaios Mecânicos e Microtomografia Tridimensional**, Projeto Interinstitucional, 2008.

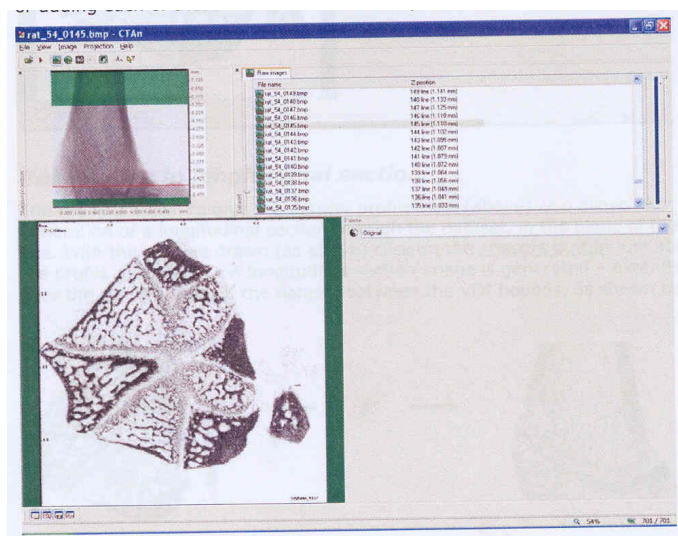
Anexo (Software CT-Analyser)

O uso do software CT-Analyser para quantificação microestrutural envolve as seguintes etapas:

Etapas 1: Abrir os arquivos de reconstrução com formato bmp



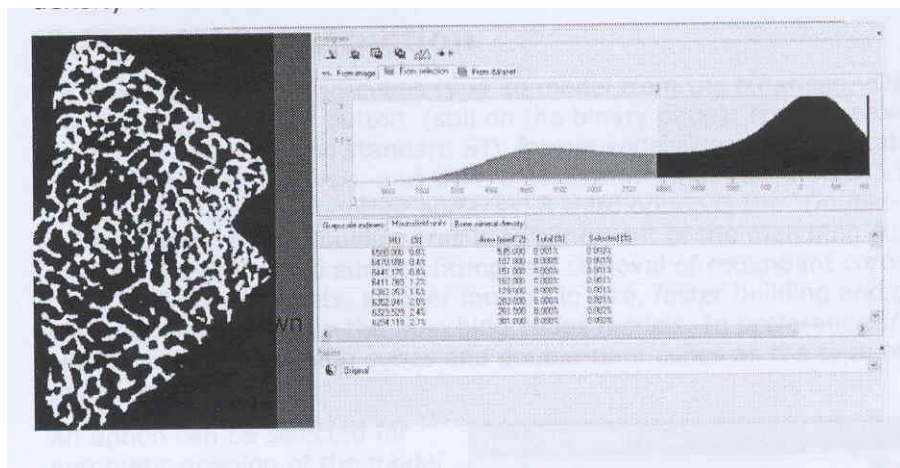
Etapas 2: Observar as seções reconstruídas



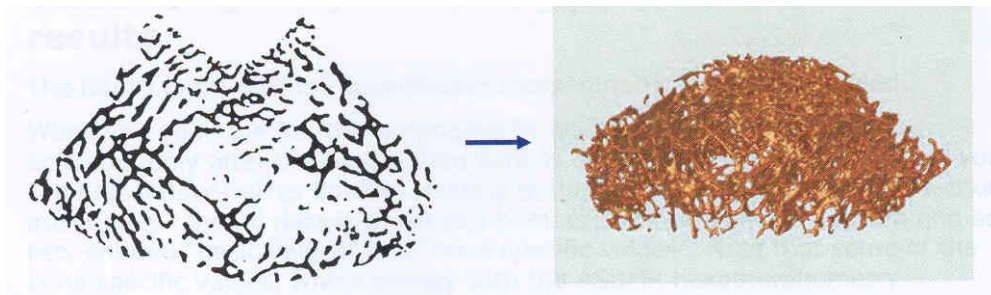
Etapas 3: Escolha da ROI (análise 2D) e do VOI (análise 3D) com formato irregular ou regular



Etapa 4: Binarização, Análise de Densidade e Reconstrução 3D

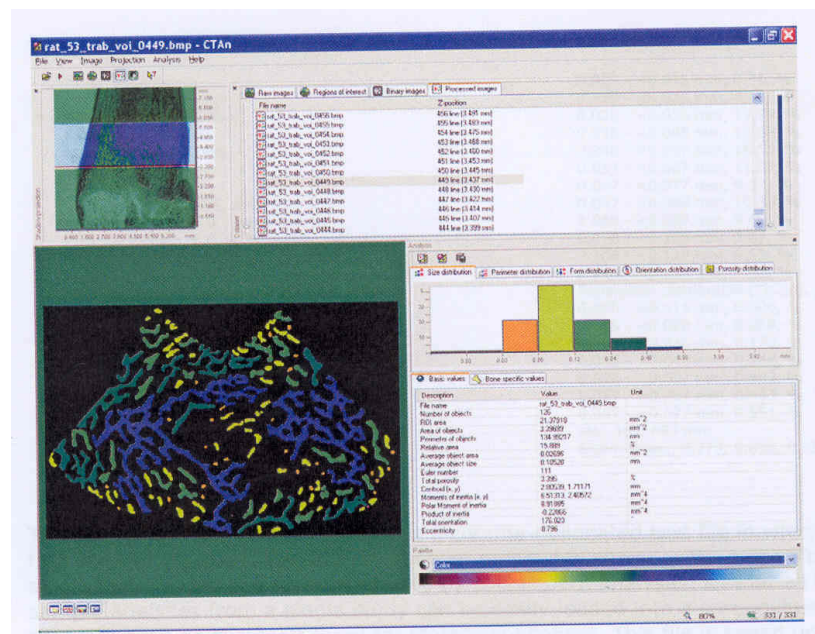


Binarização

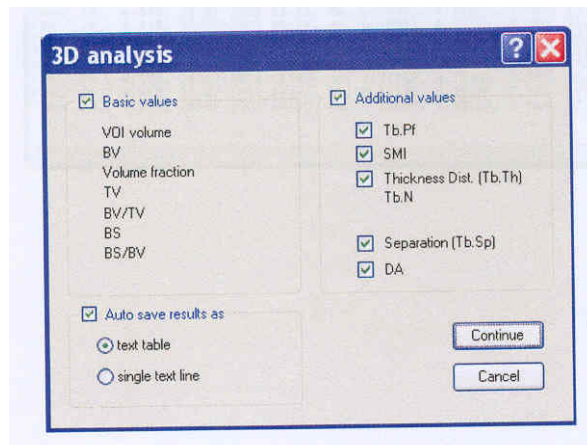


Reconstrução 3D

Etapa 5: Análise Morfométrica 2D ou 3D



Análise 2D



Escolha dos parâmetros de interesse da quantificação 3D

11.02.2004 16:13	
Dataset: mtib_3_	
Description, Value, Unit	
Pixel size, 5.15, μm	
Number of layers, 201,	
From, 1.715, mm	
To, 2.744, mm	
VOI volume, 2.03405, mm^3	0.005 - <0.015 mm, 0.31, %
Volume of objects, 0.13464, mm^3	0.015 - <0.026 mm, 4.66, %
Relative volume, 6.619, %	0.026 - <0.036 mm, 13.99, %
Surface of objects, 8.98988, mm^2	0.036 - <0.046 mm, 16.68, %
Specific surface, 66.76854, 1/mm	0.046 - <0.057 mm, 18.55, %
BV/TV, 0.06619,	0.057 - <0.067 mm, 11.57, %
BS/BV, 66.76854, 1/mm	0.067 - <0.077 mm, 9.32, %
Tb.Pf, 26.02769, 1/mm	0.077 - <0.088 mm, 10.35, %
SMI, 2.485,	0.088 - <0.098 mm, 9.62, %
Mean Tb.Th., 0.05836, mm	0.098 - <0.108 mm, 3.62, %
Tb.N., 1.13427, 1/mm	0.108 - <0.118 mm, 0.53, %
Mean Tb.Sp., 0.36023, mm	0.118 - <0.129 mm, 0.80, %
DA, 3.279 (0.695),	Separation distribution (Tb.Sp), ,
Thickness distribution (Tb.Th), ,	0.005 - <0.015 mm, 0.006, %
	0.015 - <0.026 mm, 0.068, %
	0.026 - <0.036 mm, 0.170, %
	0.036 - <0.046 mm, 0.248, %
	0.046 - <0.057 mm, 0.403, %
	0.057 - <0.067 mm, 0.453, %
	0.067 - <0.077 mm, 0.551, %
	etc... to 0.685 mm
	Eigenvalues:, 0.273, 0.895, 0.353,

Análise 3D