Alessandro Márcio Hakme da Silva

**Análise Morfométrica 2D e 3D
de Amostras de Osso Trabecular Utilizando
Microtomografia Tridimensional por Raio-X**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo - como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Bioengenharia.

Área de Concentração: Bioengenharia

Orientador: Prof. Dr. José Marcos Alves

São Carlos

2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

S586a Silva, Alessandro Márcio Hakme da
 Análise morfométrica 2D e 3D de amostras de osso
 trabecular utilizando microtomografia tridimensional por
 raio-X / Alessandro Márcio Hakme da Silva ; orientador
 José Marcos Alves. -- São Carlos, 2009.

 Dissertação (Mestrado-Programa de Pós-Graduação e Área
 de Concentração Interunidades em Bioengenharia) -- Escola
 de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de
 Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos da
 Universidade de São Paulo, 2009.

 1. Osso trabecular. 2. Microtomografia tridimensional
 (μ CT) 3. Análise morfométrica - 2D e 3D. 4. Tensor
 anisotropia. 5. Qualidade óssea. I. Título.

ALESSANDRO MÁRCIO HAKME DA SILVA
MESTRADO EM BIOENGENHARIA

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS
- GRADUAÇÃO INTERUNIDADES BIOENGENHARIA
EESC – FMRP - IQSC DA UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
CIÊNCIAS NA ÁREA DE BIOENGENHARIA.

Aprovado em: 11/09/09

PROF. DR. JOSÉ MARCOS ALVES
(ORIENTADOR)

Escola de Engenharia de São Carlos - USP

Julgamento: aprovado

Assinatura:

PROF. DR. ORIVALDO LOPES DA SILVA

Escola de Engenharia de São Carlos - USP

Julgamento: aprovado

Assinatura:

PROF. DR. MARCELO HENRIQUE
NOGUEIRA BARBOSA

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

Julgamento: aprovado

Assinatura:

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus por me mostrar que deve haver muita humildade, paciência e perseverança nos caminhos a trilhar.

À minha mãe Cecília Hakme, com muito amor, carinho e admiração, por todo seu apoio na caminhada para a execução nestes meses de elaboração da Pesquisa, pois sem a sua confiança e afeto não teria chegado aonde cheguei.

A toda minha família, que sempre acreditou no meu potencial e, em especial, ao meu pai Alício e sua esposa Isabel e às minhas irmãs, Milena e Larissa.

Ao meu cunhado Toni por toda a ajuda emocional nos momentos conturbados.

À minha noiva Thalita Fernandes Alves, por todo seu amor e respeito, e por mostrar sempre uma face mais alegre das situações rotineiras acrescentando a cada dia à minha pessoa profissional a virtude da simplicidade e do companheirismo;

Aos meus amigos Paulo Henrique e Eric Kureck por toda a cooperação ao longo destes anos nos momentos de extrema dificuldade.

Aos meus avós, paternos e maternos, e à minha tia Catarina Hakme, todos falecidos, que contribuíram para o homem que me dediquei a ser.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de mestrado.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão do auxílio à pesquisa # 08/56563-5.

Agradeço à Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo (EESC-USP) e ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia (PPGIB), por disponibilizar toda infra-estrutura para o encaminhamento do trabalho;

Ao Prof. Dr. José Marcos Alves do Departamento de Engenharia Elétrica da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo (EESC-USP) e do Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia da Universidade de São Paulo (PPGIB-USP), pela orientação, companheirismo, amizade, empenho e paciência, essenciais para a concretização da dissertação de mestrado e para o meu desenvolvimento profissional e pessoal;

Ao Prof. Dr. Roberto Guarniero do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IOT-HC-FMUSP) por ser o proponente da solicitação de auxílio à pesquisa FAPESP (# 08/56563-5) relativa ao projeto “Estudo Experimental das Propriedades Elásticas de Ossos Trabeculares Utilizando Ensaio Mecânico e Microtomografia Tridimensional” que inclui a realização dessa dissertação de mestrado;

Ao Eng. Tomaz Puga Leiva do IOT-HC-FMUSP pelo encaminhamento da solicitação de auxílio à pesquisa FAPESP # 08/56563-5 e por disponibilizar a infraestrutura do “Laboratório de Biomecânica” para a realização de atividades experimentais da dissertação de mestrado. Ao técnico César Augusto Martins Pereira pelo ajuda na metodologia de aquisição das amostras ósseas trabeculares;

Ao Dr. Carlos Manoel Pedro Vaz da EMBRAPA – Instrumentação Agropecuária (São Carlos – SP) por disponibilizar o microtomógrafo de raios-X de alta resolução para a realização da dissertação de mestrado. Ao Eng. Paulo Renato Orlandi Lasso e ao Eng. Luiz Matteo pela aquisição e reconstrução das imagens das amostras ósseas trabeculares;

Ao Dr. Orivaldo Lopes da Silva do PPGIB-USP pelas sugestões e análise dos resultados obtidos na dissertação de mestrado e pelo ensinamento de conceitos que foram fundamentais para o meu avanço profissional e pessoal;

Ao biólogo Nelson Ferreira da Silva Júnior do PPGIB-USP pela amizade e prazerosa convivência e por todo o auxílio na obtenção de amostras ósseas trabeculares cilíndricas na oficina mecânica da EESC-USP;

Ao médico veterinário Paulo Henrique Grassano Murta e ao agente de inspeção Nilo Narcizo de Souza pela coleta e doação dos fêmures bovinos utilizados na dissertação;

Ao técnico Mário Gazziro do PPGIB-USP por sugerir e disponibilizar um medidor de temperatura para os procedimentos de aquisição de amostras ósseas trabeculares cilíndricas;

Ao Prof. Dr. José Carlos Pereira do Departamento de Engenharia Elétrica da EESC-USP e do PPGIB-USP pela ajuda na análise dos resultados da dissertação;

Ao Prof. Dr. Ben-Hur Viana Borges do Departamento de Engenharia Elétrica da EESC-USP pela disponibilização dos computadores do seu laboratório para a análise morfométrica 2D e 3D das amostras ósseas trabeculares cilíndricas;

À secretária Janete Ferreira Rodrigues dos Santos do PPGIB-USP por todo o auxílio e paciência nos esclarecimentos de questões administrativas relativas ao Programa;

Ao Prof. Adair Roberto Aguiar pela ajuda na compreensão de conceitos sobre mecânica do contínuo;

Ao chefe da Oficina Mecânica da EESC-USP, Edson Roberto dos Santos, pela disponibilização e auxílio no manuseio da Furadeira Radial CSEPEL para a extração de amostras ósseas trabeculares cilíndricas;

Ao meu amigo e companheiro Saulo Sabino que em todos os momentos apoiou e acreditou no meu potencial;

Ao meu amigo Uziel Paulo da Silva por todos os esclarecimentos e discussões ao longo do mestrado.

Aos meus amigos pós-graduandos Ana Elisa, Flávio Ferraz, Heloyse Kuriki, Endrigo Teixeira, Milena Mioralli, Jéssica Bastos, Vitor Basso, Gabriela Bettio e Jaqueline Crusca por todo companheirismo

“O ser humano vivencia a si mesmo, seus pensamentos como algo separado do resto do universo - numa espécie de ilusão de ótica de sua consciência. E essa ilusão é uma espécie de prisão que nos restringe a nossos desejos pessoais, conceitos e ao afeto por pessoas mais próximas. Nossa principal tarefa é a de nos livrarmos dessa prisão, ampliando o nosso círculo de compaixão, para que ele abranja todos os seres vivos e toda a natureza em sua beleza. Ninguém conseguirá alcançar completamente esse objetivo, mas lutar pela sua realização já é por si só parte de nossa liberação e o alicerce de nossa segurança interior.”

Albert Einstein

RESUMO

Silva, A.M.H. **Análise Morfométrica 2D e 3D de Amostras de Osso Trabecular Utilizando Microtomografia Tridimensional por Raios-X.** 2009. 77f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Ossos trabeculares possuem uma microestrutura porosa e podem ser modelados como um sólido elástico linear, heterogêneo e anisotrópico. A microtomografia tridimensional por raios-x (μ CT) tem sido mundialmente utilizada para a caracterização de osso trabecular em pesquisas relacionadas à qualidade óssea e à doenças do metabolismo ósseo como a osteoporose. Na literatura há poucas investigações comparando as análises morfométricas 2D e 3D de osso trabecular. Nesta investigação amostras de ossos trabeculares cilíndricas extraídas da cabeça femoral bovina foram utilizadas para a comparação dessas análises por μ CT. O software CT-Analyser foi utilizado para medidas em três direções (crânio-caudal, lateral-medial e anterior-posterior) de diversos parâmetros da microestrutura trabecular tais como espessura trabecular, separação trabecular, número trabecular e os autovalores do tensor de anisotropia (**M**). A comparação entre os valores dos parâmetros medidos por análises morfométricas 2D e 3D foi realizada pelo teste-t pareado com nível de significância $p < 0,05$ e por correlação linear de Pearson. Os autovalores da matriz **M** mostram que a microestrutura trabecular bovina tem uma tendência para a simetria transversalmente isotrópica. Os resultados obtidos mostram que a microtomografia tridimensional por raios-X é uma técnica de grande potencial para caracterização da qualidade óssea gerando bons parâmetros para o diagnóstico de doenças do metabolismo ósseo.

Palavras-chaves: Osso trabecular, microtomografia tridimensional (μ CT), análise morfométrica 2D e 3D, tensor anisotropia, qualidade óssea.

ABSTRACT

Silva, A.M.H. **2D and 3D Morphometric Analysis of Trabecular Bone Using X-ray Tridimensional Microtomography (μ CT)**. 2009. 77f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Trabecular bones have a porous microstructure and can be modeled as a linear elastic solid, heterogenous and anisotropic. The x-ray tridimensional microtomography (μ CT) has been worldwide used for the assessment of trabecular bone in investigations related to bone quality and aimed to the diagnostic of bone metabolic diseases such as osteoporosis. In the literature few investigations have compared the 2D and 3D morphometric analysis of trabecular bone. In this investigation cylindrical trabecular bone samples were harvested from bovine head femur to carry out that comparison by μ CT. The CT-Analyser software was used to measure in three directions (superior-inferior, lateral-medial and anterior-posterior) several microstructural trabecular parameters such as trabecular thickness, trabecular separation, trabecular number and the eigenvalues of the fabric tensor (**M**). The comparison between the parameters values measured by 2D and 3D morphometric analysis was performed by the paired-sample t test with a level of significance $p < 0,05$ and the Pearson's linear correlation. The eigenvalues show that the bovine trabecular microstructure has a tendence to transverse isotropy symmetry. The results show that x-ray tridimensional microtomography (μ CT) is a technique of great potential for characterization of generating good bone quality parameters for the diagnosis of diseases of bone metabolism.

Keywords: trabecular bone, 3D x-ray microtomography (μ CT), 2D and 3D morphometric analysis, fabric tensor, bone quality

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagem 3D e seções transversais de uma amostra de osso trabecular obtidas por microtomografia 3D (Goulet et al., 1994).....	19
Figura 2 - Estrutura do osso trabecular do calcâneo humano com predominância de bastonetes (a) e placas (b) (Hildebrant et al., 1999).	21
Figura 3 – Estrutura do osso cortical (Junqueira et. al., 1989).	22
Figura 4 - Etapas da formação e reabsorção óssea (Bartl et al., 2004).	23
Figura 5 - Atenuação de um feixe de fótons por uma amostra (Alves, 1996).	23
Figura 6 - Componentes de um microtomógrafo (Alves, 1996).	24
Figura 7 - Etapas da microtomografia computadorizada por raios-X.....	25
Figura 8 - Phantom de alinhamento e suportes de objetos utilizados em microtomografia (Lasso et al., 2008).	26
Figura 9 – Parâmetros que influenciam a resolução tomográfica.	27
Figura 10 – Desenho esquemático do princípio da determinação de Tb.Th* pela análise 3D (CT- Analyser, 2008).	30
Figura 11 – Desenho esquemático do princípio da determinação de Tb.N* pela análise 3D (CT- Analyser, 2008).	30
Figura 12 – Medição do MIL em duas dimensões (Odgaard, 1997a).....	31
Figura 13 – Representação do MIL em duas dimensões por uma elipse (Cowin et al., 2006).	31
Figura 14 - Representação do MIL em três dimensões por um elipsóide (Goldstein et al.,1993).	32
Figura 15 – Elipses obtidas sobre planos mutuamente ortogonais em três amostras de osso trabecular: a) fêmur distal; b) rádio distal; c) crista do íliaco (Feldkamp et al, 1989)....	33
Figura 16 - Dispositivo de movimentação angular e longitudinal para a extração de amostra cúbica.	36
Figura 17 - Serra circular acoplada a maquina de corte.....	36
Figura 18 – Direção principal de alinhamento das trabéculas do 1º par de fêmures.	37
Figura 19 - Direção principal de alinhamento das trabéculas do 2º par de fêmures.	37

Figura 20 - Direção principal de alinhamento das trabéculas do 3º par de fêmures.	37
Figura 21 – Alinhamento do fêmur.	38
Figura 22 – Marcação das distâncias na cabeça do fêmur.....	38
Figura 23 – Nivelamento da máquina de corte para os quatro primeiros cortes.	39
Figura 24 – Primeiro corte longitudinal na cabeça femoral.	39
Figura 25 – Segundo corte longitudinal na cabeça femoral.	40
Figura 26 – Terceiro corte longitudinal na cabeça femoral após rotação de 90º.....	40
Figura 27 – Quarto corte longitudinal na cabeça femoral.	40
Figura 28 – Primeiro corte transversal.	41
Figura 29 – Segundo corte transversal.	41
Figura 30 – Amostra trabecular cúbica: Cr (direção crânio-caudal), L (direção lateral-medial), A (direção anterior-posterior).	42
Figura 31 – Desenho esquemático da extração dos três cilindros nas três direções principais.	42
Figura 32 – Trefina Cânula de metal para extração dos cilindros de 10 mm x 20 mm..	43
Figura 33 – Furadeira Radial.	43
Figura 34 – Fixação da amostra cúbica na morsa e posicionamento da trefina.	44
Figura 35 – Perfuração da amostra cúbica para extração do cilindro com irrigação contínua e medição da variação de temperatura.	44
Figura 36 – Cilindro ósseo trabecular retirado na direção crânio-caudal.....	45
Figura 37 – Microtomógrafo por raio-X de alta resolução (SkyScan, modelo 1172).	45
Figura 38 – Projeção de uma amostra cilíndrica.	47
Figura 39 – Reconstrução 2D no formato TIFF/16 bits	47
Figura 40 – Desenho esquemático do volume de interesse utilizado nas análises morfométricas.....	48
Figura 41 – Amostra óssea com irregularidade.....	51
Figura 42 - Classificação da Correlação Linear (Santos, 2007 & Murteira, 1993).....	56

Figura 43 – Correlação Tb.Th (3D) x Tb.Th (modelo de placas 2D).	57
Figura 44 - Correlação Tb.Th (3D) x Tb.Dm (modelo cilíndrico 2D).....	57
Figura 45 - Correlação Tb.Sp (3D) x Tb.Sp (modelo de placas 2D).	58
Figura 46 - Correlação Tb.Sp (3D) x Tb.Sp (modelo cilíndrico 2D).....	58
Figura 47 - Correlação Tb.N (3D) x Tb.N (modelo de placas 2D).....	59
Figura 48 - Correlação Tb.N (3D) x Tb.N (modelo cilíndrico 2D).	59
Figura 49 - Correlação Tb.Pf (3D) x Tb.Pf (2D).	60
Figura 50 - Correlação Tb.Dm (modelo cilíndrico 2D) x Tb.Th (modelo de placas 2D).	60
Figura 51 - Correlação Tb.Sp (modelo cilíndrico 2D) x Tb.Sp (modelo de placas 2D).	61
Figura 52 - Correlação Tb.N (modelo cilíndrico 2D) x Tb.N (modelo de placas 2D). ..	61
Figura 53 – Correlação: Autovalores 1 e Autovalor 2.	62
Figura 54 - Correlação: Autovalor 1 e Autovalor 3.	62
Figura 55 - Correlação: Autovalor 2 e Autovalor 3.	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características dos animais abatidos para a coleta dos fêmures bovinos.	35
Tabela 2 - Especificações do Microtomógrafo.....	46
Tabela 3 – Dimensão das amostras cúbicas e variação da temperatura.	49
Tabela 4 - Amostras Ósseas Cilíndricas Extraídas dos Fêmures Bovinos.	50
Tabela 5 – Valores médios dos parâmetros morfométricos (n=6) obtidos nas análises morfométrica 2D e 3D na direção crânio-caudal.....	52
Tabela 6 - Valores médios dos parâmetros morfométricos (n=5) obtidos nas análises morfométrica 2D e 3D na direção lateral-medial.	53
Tabela 7 – Valores médios dos parâmetros morfométricos (n=5) obtidos nas análises morfométrica 2D e 3D na direção anterior-posterior.	54
Tabela 8 – Teste-t pareado ($p<0,05$) dos parâmetros morfométricos (n=16).....	55

LISTA DE SIGLAS

2D - bidimensional

3D - tridimensional

Am 1 - Amostra óssea cilíndrica trabecular bovina do 1º par de fêmures, fêmur direito, da direção crânio-caudal

Am 2 - Amostra óssea cilíndrica trabecular bovina do 1º par de fêmures, fêmur esquerdo, da direção crânio-caudal.

Am 3 - Amostra óssea cilíndrica trabecular bovina do 1º par de fêmures, fêmur esquerdo, da direção lateral-medial.

Am 4 - Amostra óssea cilíndrica trabecular bovina do 1º par de fêmures, fêmur direito, da direção lateral-medial.

Am 5 - Amostra óssea cilíndrica trabecular bovina do 1º par de fêmures, fêmur direito, da direção anterior-posterior.

Am 6 - Amostra óssea cilíndrica trabecular bovina do 1º par de fêmures, fêmur esquerdo, da direção anterior-posterior.

Am 7 - Amostra óssea cilíndrica trabecular bovina do 2º par de fêmures, fêmur direito, da direção crânio-caudal.

Am 8 - Amostra óssea cilíndrica trabecular bovina do 2º par de fêmures, fêmur esquerdo, da direção crânio-caudal.

Am 9 - Amostra óssea cilíndrica trabecular bovina do 2º par de fêmures, fêmur direito, da direção lateral-medial.

Am 10 - Amostra óssea cilíndrica trabecular bovina do 2º par de fêmures, fêmur esquerdo, da direção lateral-medial.

Am 11 - Amostra óssea cilíndrica trabecular bovina do 2º par de fêmures, fêmur direito, da direção anterior-posterior.

Am 12 - Amostra óssea cilíndrica trabecular bovina do 2º par de fêmures, fêmur esquerdo, da direção anterior-posterior.

Am 13 - Amostra óssea cilíndrica trabecular bovina do 3º par de fêmures, fêmur direito, da direção crânio-caudal.

Am 14 - Amostra óssea cilíndrica trabecular bovina do 3º par de fêmures, fêmur esquerdo, da direção crânio-caudal.

Am 15 - Amostra óssea cilíndrica trabecular bovina do 3º par de fêmures, fêmur direito, da direção lateral-medial.

Am 16 - Amostra óssea cilíndrica trabecular bovina do 3º par de fêmures, fêmur esquerdo, da direção lateral-medial.

Am 17 - Amostra óssea cilíndrica trabecular bovina do 3º par de fêmures, fêmur direito, da direção anterior-posterior.

Am 18 - Amostra óssea cilíndrica trabecular bovina do 3º par de fêmures, fêmur esquerdo, da direção anterior-posterior.

CCD - (charge-coupled device) – Dispositivo de Carga Acoplado

CT-Analyser - Software de Análise Morfométrica

DMO - Densidade Mineral Óssea

ROI - Região de interesse do objeto

TC - Tomografia Computadorizada

VOI – Volume de Interesse do Objeto

μCT - Microtomografia de raios-X

LISTA DE SÍMBOLOS

A - Área da seção transversal

B. Ar - Área média de tecido ósseo nas seções transversais da amostra

BS - Área superficial das trabéculas ósseas

BV - Volume ósseo da amostra

BV/TV - Razão entre o volume ósseo e o volume da amostra

BS/BV - Razão entre a área óssea da amostra e o volume ósseo da amostra

BS/TV - Razão entre o volume ósseo da amostra e o volume da amostra

DA - Grau de Anisotropia

$I(\theta)$ - Número de interseções em uma dada direção θ da grade

L - Comprimento da grade

M - tensor de segunda ordem (tensor Anisotropia)

MIL - (mean intercept length) - comprimento médio do número de interseções entre uma grade de linhas paralelas e a interface trabécula/medula óssea

Mp - Mega pixel

n - versor que define a direção sobre a qual se infere o valor de $L(\theta)$

P - Perímetro da seção transversal da amostra óssea

Po - Porosidade

SMI - Índice de modelo estrutural

T. Ar - Área média das seções transversais da amostra

TS - Área superficial da amostra óssea

Tb. N - Número Trabecular

Tb. Pf - Fator Padrão de Osso Trabecular

Tb. Sp - Separação Trabecular

Tb. Th - Espessura Trabecular

TV - Volume da Amostra

SUMÁRIO

1. Introdução	18
2. Objetivos.....	19
3. Revisão de Literatura.....	20
3.1 Tecido Ósseo.....	20
3.2 Microtomografia Computadorizada.....	23
3.3 Análise Morfométrica de Osso Trabecular	27
3.3.1 Análise Morfométrica 2D.....	28
3.3.2 Análise Morfométrica 3D.....	29
4. Material e Métodos	35
4.1 Amostras Ósseas	35
4.2 Quantificação Microestrutural	45
4.3 Análise Estatística.....	48
5. Resultados.....	49
5.1 Extrações dos Cubos e Cilindros Ósseos Trabeculares	49
5.2 Análise Morfométrica 2D e 3D e Análise Estatística	51
5.3 Correlações entre os Parâmetros Morfométricos.....	56
6. Discussão.....	64
7. Conclusão	67
Referências Bibliográficas.....	67
Anexo A (Software CT-Analyser).....	74

1. Introdução

A osteoporose é uma alteração do metabolismo ósseo caracterizada por baixa massa óssea e mudanças na microestrutura do tecido com um comprometimento da resistência mecânica óssea e conseqüente aumento da fragilidade e susceptibilidade à fratura. A sua ocorrência é mais comum em mulheres após a menopausa e em pessoas idosas.

Investigações sobre a microestrutura óssea trabecular resultaram em novos conceitos sobre qualidade óssea e sobre o monitoramento da osteoporose. Técnicas não-invasivas como a tomografia computadorizada e a ressonância magnética nuclear representam um enorme potencial de diagnóstico a ser explorado (Majumdar & Bay, 2000).

A orientação das trabéculas ósseas em uma amostra de osso trabecular varia de acordo com a direção, conforme mostrado na Figura 1. Observa-se que no plano zy há uma orientação preferencial das trabéculas e que nos planos xy e zx não há orientação preferencial (Goulet et al., 1994). Goldstein et al (1993) comprovaram experimentalmente a influência dessa orientação na resistência mecânica: duas amostras ósseas trabeculares com frações de volume ($BV/TV = \text{volume ósseo da amostra} / \text{volume da amostra}$) próximas entre si de 18% e 19%, respectivamente, apresentaram uma resistência mecânica que variou de 30% a uma ordem de magnitude dependendo da direção analisada.

A densidade de amostras de osso trabecular foi relacionada à resistência mecânica observando-se uma forte e positiva correlação entre a densidade e a máxima tensão de ruptura e entre a densidade e a rigidez (Currey, 1969; Carter & Hayes, 1977; Goldstein et al., 1983; Rice et al., 1988; Ciarelli et al., 1991). Apesar da densidade representar uma importante componente da resistência mecânica, ela não é influenciada pela microestrutura do osso trabecular e não explica certas variações observadas nesta resistência, representando assim uma medida parcial de caracterização dessa resistência.

A qualidade óssea é clinicamente monitorada pela medida da densidade mineral óssea (DMO), mas esta medida não é suficiente para identificar completamente a fragilidade óssea e o risco de fratura de um indivíduo (Mccreadie & Goldstein, 2000;

Waldir et al., 2007). A medida de parâmetros microestruturais, denominada de análise morfométrica bidimensional (2D) e tridimensional (3D), deve ser incorporada ao monitoramento da qualidade óssea para uma determinação mais precisa do risco de fratura e para o aprimoramento do diagnóstico da osteoporose.

Figura 1 - Imagem 3D e seções transversais de uma amostra de osso trabecular obtidas por microtomografia 3D (Goulet et al., 1994).

2. Objetivos

A microtomografia 3D por raios-X (μ CT) tem sido mundialmente utilizada para a caracterização de osso trabecular em pesquisas relacionadas à qualidade óssea e a sua relação com alterações do metabolismo ósseo como a osteoporose. São objetivos desta investigação:

- Análise morfométrica 2D e 3D da microestrutura de amostras ósseas trabeculares bovinas utilizando-se μ CT.
- Comparação dos resultados da análise morfométrica 2D e 3D.
- Identificação do tipo de simetria da microestrutura óssea trabecular de fêmur bovino através da medida dos autovalores da matriz de anisotropia **M**.

3. Revisão de Literatura

3.1 Tecido Ósseo

O tecido ósseo 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 estáticos, tais como o próprio peso do corpo, e dinâmicos que lhe são aplicados.

O osso é composto por células (osteócitos, osteoblastos e osteoclastos) e um material intercelular constituído de uma matriz orgânica e uma inorgânica. A matriz orgânica é constituída essencialmente de colágeno (95%) e representa aproximadamente 30% da composição do tecido ósseo. A matriz mineral é constituída essencialmente de cristais de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (95%) e representa aproximadamente 70% da composição do tecido ósseo.

A microestrutura do tecido ósseo varia com a região do esqueleto, podendo ser porosa, denominada osso trabecular, ou compacta, denominada osso cortical. A microestrutura trabecular é composta de trabéculas cujo formato varia entre bastonetes e placas, conforme mostrado na figura 2, e possui uma grande área superficial (Hildebrant et al., 1999). 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 ossos como o calcâneo, o crânio, a pélvis e as vértebras da coluna vertebral. O osso esponjoso compõe 20% do esqueleto.

O osso cortical compõe 80% do esqueleto, é compacto e forma a camada externa dos ossos (figura 3). Nele as fibras colágenas estão distribuídas na forma de lamelas que ficam paralelas umas às outras ou se dispõem em camadas concêntricas em torno de canais com vasos, formando os sistemas de Havers. Entre as lamelas há lacunas onde situam-se os osteócitos. Cada sistema de Havers é constituído por um cilindro longo, paralelo ao eixo longitudinal do osso (diáfise) formado por lamelas concêntricas. No centro desse cilindro existe o canal de Havers que contém vasos, nervos e tecido conjuntivo frouxo. Os canais de Havers comunicam-se entre si, com a cavidade medular e com a superfície externa do osso por meios de canais transversais denominados de canais de Volkmann.

No osso as células são responsáveis por um processo contínuo de remodelação, isto é, de formação e reabsorção óssea. Os osteoclastos absorvem a matriz óssea já existente, enquanto os osteoblastos depositam nova matriz óssea. Esse mecanismo proporciona a contínua renovação e substituição de matriz óssea.

Figura 2 - Estrutura do osso trabecular do calcâneo humano com predominância de bastonetes (a) e placas (b) (Hildebrant et al., 1999).

O tecido ósseo é formado por aposição, isto é, pela deposição adicional de matriz sobre um osso existente. A matriz óssea é secretada por osteoblastos que se encontram na superfície da matriz existente e que sintetizam nova matriz óssea. Alguns osteoblastos permanecem livres na superfície, enquanto outros se tornam gradativamente embebidos em sua própria secreção. Este tecido recém produzido (constituído basicamente de colágeno tipo I) é chamado osteóide. Ele é rapidamente convertido em matriz óssea mineralizada pela deposição de cristais de fosfato de cálcio. Uma vez aprisionado na matriz mineralizada, a célula denominada de osteócito, não tem oportunidade de se dividir, embora continue a secretar mais matriz, em pequenas quantidades, em torno de si mesma. O osteócito ocupa uma pequena cavidade, ou lacuna, na matriz, mas não está isolado na matriz óssea. Os canais muito pequenos, ou canaliculos, irradiam de cada lacuna e contêm processos celulares do osteócito que está nesta lacuna, permitindo-lhe formar junções comunicantes com osteócitos vizinhos (Figura 4). Embora a própria rede de osteócitos não realize a secreção e a reabsorção de quantidades substanciais de matriz, eles são responsáveis por parte do controle das atividades das células que o fazem.

Figura 3 – Estrutura do osso cortical (Junqueira et. al., 1989).

Enquanto a matriz óssea é depositada pelos osteoblastos ela sofre reabsorção pelos osteoclastos que são células multinucleadas.

Os ossos são dotados de uma habilidade notável para adaptar sua estrutura em resposta a carga a que são submetidos. Este comportamento de adaptação sugere que a deposição e reabsorção da matriz são controladas de alguma maneira por deformação mecânica local, mas os mecanismos envolvidos não são ainda compreendidos. Um complexo mecanismo de sinalização ocorre na matriz óssea através da síntese de substâncias quando a matriz é submetida à deformação.

A osteoporose é caracterizada por um desequilíbrio entre os processos de formação e reabsorção óssea.

Figura 4 - Etapas da formação e reabsorção óssea (Bartl et al., 2004).

3.2 Microtomografia Computadorizada

Análises qualitativas e quantitativas da microestrutura de um objeto podem ser realizadas pela técnica de microtomografia computadorizada por raios-X (μ CT).

Quando um feixe de raios-X com intensidade I_0 atravessa um objeto com espessura x , conforme (figura 5), a intensidade de radiação I após a propagação é dada pela equação (1), onde μ é o coeficiente de atenuação do material. Se a trajetória do feixe inclui regiões com diferentes coeficientes de atenuação ($\mu_1, \mu_2, \dots, \mu_n$) então a intensidade I é dada pela equação (2).

Figura 5 - Atenuação de um feixe de fótons por uma amostra (Alves, 1996).

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

$$I = I_0 e^{-\sum_{i=1}^n \mu_i x_i} \quad (2)$$

O interesse de investigar a microestrutura de um objeto resultou no desenvolvimento de algoritmos matemáticos para se determinar a distribuição espacial dos coeficientes de atenuação em cada uma das seções transversais do objeto e reconstruir a imagem das seções transversais conhecendo-se um conjunto de projeções do objeto em várias direções de um feixe de raios X. O algoritmo matemático mais utilizado para a reconstrução das seções quando o feixe de raios-X é cônico, isto é, produzido por uma fonte pontual, é o de Feldkamp e colaboradores (1984). O feixe cônico é utilizado em microtomógrafos de raios-X disponíveis comercialmente.

A figura 6 descreve os componentes de um microtomógrafo: a) fonte de raio-x com um foco de dimensão micrométrica e um feixe cônico. Um filtro metálico de alumínio ou cobre de pequena espessura deve ser colocado na frente da fonte para reduzir o efeito denominado de “endurecimento de feixe”; b) mesa com movimento de precisão rotacional (θ) e translacional (direções X, Y e Z) onde é fixado o objeto a ser analisado; c) detector de radiação (câmera CCD).

Figura 6 - Componentes de um microtomógrafo (Alves, 1996).

A análise morfométrica por μ CT de uma amostra óssea trabecular compreende as seguintes etapas (figura 7):

Figura 7 - Etapas da microtomografia computadorizada por raios-X

a) Obtenção de projeções do objeto em diferentes posições através de rotações com um incremento angular θ . Uma média de projeções é obtida a cada incremento angular. O incremento angular θ determina o número n de projeções (por exemplo, se $\theta=1^\circ$, $n=360$). A amostra deve ser fixada firmemente à um suporte colocado sobre a mesa de modo a impedir qualquer movimento durante a aquisição das projeções. Utiliza-se uma massa de modelar para fixar o objeto no suporte. Na Figura 8 observa-se um phantom utilizado para o alinhamento do objeto e exemplos de suportes. O tamanho do pixel do do detetor e da magnificação das projeções irá determinar a resolução microtomográfica. As variáveis que influem nesta resolução estão ilustradas na figura 9,

sendo D_1 a distância da fonte ao objeto, D_2 a distância da fonte ao detector de radiação, H_1 a altura do objeto e H_2 a altura do objeto projetado no detector de radiação. O fator de magnificação é $M=(D_1+D_2/D_1)$. Se R é a resolução microtomográfica e K é a dimensão do pixel do detector, então a resolução é $R=K/M$.

- b) Reconstrução 2D das seções transversais do objeto utilizando o algoritmo de Feldkamp.
- c) Escolha da região de interesse (ROI) das seções transversais para a análise morfométrica 2D e 3D.
- d) Escolha do volume de interesse (VOI) para a análise morfométrica 2D e 3D.
- e) Segmentação das imagens das seções transversais do objeto através do procedimento de binarização para se determinar os pixels que representam tecido ósseo. Cada pixel da seção transversal possui um valor binário de 8 bits. O seu valor binário é comparado a um valor de referência denominado de “threshold”: a) se o valor do pixel é menor que o do threshold“ o seu valor é convertido em 0 (região da seção transversal que não contém tecido ósseo); b) se o valor do pixel é igual ou maior do que o do threshold“ o seu valor é convertido em 1 (região da seção transversal que contém tecido ósseo).
- e) Análise morfométrica 2D e 3D da amostra óssea.
- f) Reconstrução 3D do VOI.

Figura 8 - Phantom de alinhamento e suportes de objetos utilizados em microtomografia (Lasso et al., 2008).

Figura 9 – Parâmetros que influenciam a magnificação tomográfica.

3.3 Análise Morfométrica de Osso Trabecular

A análise morfométrica de uma amostra de osso trabecular é a medida de parâmetros microestruturais. Ela pode ser realizada por histomorfometria convencional (Parfitt et al., 1987) ou por microtomografia por raio-x (μ CT) utilizando-se uma fonte de radiação com feixe paralelo e monocromático (Kinney JH & Haupt DL, 1995) ou uma fonte de radiação com campo cônico e policromática (Feldkamp et al., 1989). O hardware do μ CT por campo cônico começou a ser desenvolvido na década de 90 (Kuhn et al., 1990; Ruegsegger et al., 1996).

A análise morfométrica por μ CT é realizada utilizando-se a reconstrução 2D das seções transversais da amostra (análise 2D) ou a reconstrução 3D do volume da amostra (análise 3D), conforme descrito por Hildebrand e colaboradores (1999).

Em ambas as análises os seguintes parâmetros são denominados índices primários: área óssea da amostra (BS) definida como a área superficial das trabéculas ósseas, área superficial da amostra (TS), volume ósseo da amostra (BV) e volume da amostra (TV). Para se comparar amostras com diferentes dimensões utilizam-se os seguintes índices normalizados: razão entre a área óssea da amostra e o volume da amostra (BS/TV), a razão entre o volume ósseo da amostra e o volume da amostra (BV/TV) e a razão entre a área óssea da amostra e o volume ósseo da amostra (BS/BV).

3.3.1 Análise Morfométrica 2D

Nesta análise os parâmetros morfométricos são calculados utilizando-se técnicas de estereologia e assumindo-se que a amostra óssea tem uma microestrutura constante composta de placas ou bastonetes (Feldkamp et al., 1989). As equações de cálculo foram inicialmente desenvolvidas para a histomorfometria convencional e continuam sendo utilizadas na análise 2D por μ CT.

Os seguintes parâmetros são medidos apenas na análise 2D: área média de tecido ósseo nas seções transversais da amostra (B.Ar) e área média das seções transversais da amostra (T.Ar). A seguir são definidos os demais parâmetros morfométricos medidos na análise 2D com as respectivas equações de cálculo. Observa-se que o cálculo desses parâmetros, com exceção da porosidade, depende dos índices primários definidos anteriormente (Feldkamp et al., 1989, CT-Analyser, 2008):

Espessura Trabecular (Tb.Th)

É a espessura média das trabéculas. A unidade de medida é o mm. As equações 3 e 4 são utilizadas no cálculo considerando-se o modelo de placa ou cilíndrico, respectivamente, para representar a trabécula:

$$Tb.Th = \frac{2}{(BS / BV)} \quad (3)$$

$$Tb.Dm = \frac{4}{(BS / BV)} \quad (4)$$

Número trabecular (Tb.N)

É o número de trabéculas por unidade de comprimento. A unidade de medida é o mm^{-1} . As equações 5 e 6 são utilizadas no cálculo considerando-se o modelo de placas ou cilíndrico, respectivamente, para representar a trabécula:

$$Tb.N = \frac{BV / TV}{Tb.Th} \quad (5)$$

$$Tb.N = \frac{\sqrt{\left(\frac{4}{\pi}\right) \times \left(\frac{BV}{TV}\right)}}{Tb.Th} \quad (6)$$

Separação Trabecular (Tb.Sp)

É o diâmetro médio das cavidades que contêm a medula óssea. A unidade de medida é o mm. As equações 7 e 8 são utilizadas no cálculo considerando-se o modelo de placa e cilíndrico, respectivamente, para representar a trabécula:

$$Tb.Sp = \frac{1}{Tb.N} - Tb.Th \quad (7)$$

$$Tb.Sp = Tb.Th \times \left(\left[\left(\frac{4}{\pi} \right) \times \left(\frac{BV}{TV} \right) \right] - 1 \right) \quad (8)$$

Porosidade

Nas seções transversais são identificados espaços completamente fechados. A porosidade é a área destes espaços expressa como percentual da área total da seção transversal.

3.3.2 Análise Morfométrica 3D

A análise 3D não se baseia em um modelo estrutural de placas ou bastonetes e a medida de todos os parâmetros, incluindo os índices primários, é realizada diretamente no volume reconstruído da amostra óssea. Os parâmetros medidos na análise 3D são denotados por um asterisco. O índice primário BS^* é calculado usando o método de “Marching Cubes” que triangulariza a superfície óssea da amostra (Lorensen et al., 1987, Muller et al., 1994). O índice BV^* é calculado usando tetraedros construídos na superfície triangularizada (Guilak, 1994). O índice TV^* é determinado através de uma contagem de voxels. Para comparar amostras com tamanhos diferentes são utilizados os índices normalizados BV^*/TV^* , BS^*/TV^* e BS^*/BV^* . O parâmetro $Tb.Th^*$, conforme figura 10, é calculado utilizando-se esferas cujo diâmetro devem preencher a estrutura da trabécula (Hildebrand et al., 1999). No cálculo do parâmetro $Tb.Sp^*$ utiliza-se o mesmo princípio da determinação de $Tb.Th^*$ nos voxels que contêm a medula óssea. O

parâmetro $Tb.N^*$, conforme figura 11, é o inverso da distância entre os eixos médios das trabéculas ósseas.

Figura 10 – Desenho esquemático do princípio da determinação de $Tb.Th^*$ pela análise 3D (CT- Analyser, 2008).

Figura 11 – Desenho esquemático do princípio da determinação de $Tb.N^*$ pela análise 3D (CT- Analyser, 2008).

Anisotropia

Whitehouse (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 (figura 12). 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 $(I(\theta)/L, \theta)$, Whitehouse constatou que estes pontos podem ser interpolados de forma precisa e representados por uma elipse (figura 13).

Figura 12 – Medição do MIL em duas dimensões (Odgaard, 1997a).

Figura 13 – Representação do MIL em duas dimensões por uma elipse (Cowin et al., 2006).

A generalização do conceito da anisotropia estrutural para três dimensões gera um elipsóide, como ilustrado na (figura 14). A equação geral de um elipsóide em um sistema de coordenadas cartesiano com eixos x , y e z é dada pela equação (9):

$$Ax^2 + By^2 + Cz^2 + 2Dxy + 2Exz + 2Fyz = 1 \quad (9)$$

Seja $L(\theta)$ o MIL calculado na direção θ em um plano α com direção qualquer. O plano α intercepta uma amostra 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 $\mathbf{n}$ com direção θ pertencente ao plano α . Seja um vetor com magnitude $L(\theta)$ na direção do vetor unitário $\mathbf{n}$ 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 (9) pode ser reescrita como segue:

$$An_1^2 + Bn_2^2 + Cn_3^2 + 2Dn_1n_2 + 2En_1n_3 + 2Fn_2n_3 = \frac{1}{L^2(\theta)} \quad (10)$$

Figura 14 - Representação do MIL em três dimensões por um elipsóide (Goldstein et al., 1993).

A equação (10) pode ser reescrita como:

$$\begin{bmatrix} n_1 & n_2 & n_3 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} A & D & E \\ D & B & F \\ E & F & C \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} n_1 \\ n_2 \\ n_3 \end{bmatrix} = \frac{1}{L^2(\theta)} \quad (11)$$

onde $\mathbf{M}$ é um tensor de segunda ordem, positivo definido, expresso pela matriz 3x3 da equação 11, e $\mathbf{n}$ é um versor que define a direção sobre a qual se infere o valor de $L(\theta)$. O tensor $\mathbf{M}$, tensor de anisotropia, caracteriza o arranjo geométrico da microestrutura

do meio poroso. Os autovetores de $\mathbf{M}$ fornecem as direções principais do elipsóide, as quais são as orientações preferenciais das trabéculas.

Harrigan (1984) propôs uma técnica experimental de medida de θ (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 figura 15 que os eixos principais das elipses determinam as orientações das trabéculas.

Figura 15 – Elipses obtidas sobre planos mutuamente ortogonais em três amostras de osso trabecular: a) fêmur distal; b) rádio distal; c) crista do íliaco (Feldkamp et al, 1989).

O grau de anisotropia (“Degree of Anisotropy” - DA) é definido conforme a equação (12) utilizando-se os autovalores mínimos e máximos da matriz do tensor $\mathbf{M}$. Os valores para o grau de anisotropia podem variar de 0 (indicando que a estrutura é completamente isotrópica) à 1 (indicando que a estrutura é completamente anisotrópica). As direções principais do elipsóide, que são as orientações preferenciais das trabéculas, dependem da quantidade de autovalores distintos obtidos na análise. Se todos os autovalores de $\mathbf{M}$ forem distintos, o MIL é representado por um elipsóide com os três eixos principais com tamanhos diferentes e o material poroso apresenta uma simetria ortotrópica. Se dois destes autovalores forem iguais entre si, o MIL é representado por um elipsóide com dois eixos principais com tamanhos iguais e o material poroso apresenta uma simetria transversalmente isotrópica. Se todos os

autovalores de **M** forem iguais entre si, o MIL é representado por uma esfera e o material poroso apresenta uma simetria isotrópica (Cowin, 1985; Cowin, 1989).

$$DA = \left(1 - \left[\frac{\text{autovalor mínimo}}{\text{autovalor máximo}} \right] \right) \quad (12)$$

Índice de modelo estrutural (SMI)

O SMI (structure model index) indica a predominância de bastonetes ou placas no osso trabecular. Este parâmetro pode ser utilizado para caracterizar a transição de placas para bastonetes observada na microestrutura trabecular devido à osteoporose. Uma estrutura apenas com placas ou bastonetes terá valores de SMI 0 e 3, respectivamente. O cálculo do SMI é expresso pela equação (13) e é baseado em um processo de dilatação da amostra óssea, 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.

$$SMI = \left(6 \times \left(\frac{S' \times V}{S^2} \right) \right) \quad (13)$$

O cálculo de SMI é influenciado pela fração volumétrica da amostra óssea (BV/TV) podendo apresentar valor negativo (CT-Analyser, 2008).

O seguinte parâmetro microestrutural é medido nas análises 2D e 3D:

Conectividade

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. Uma medida de conectividade, denominada fator padrão de osso trabecular (Tb.Pf), foi proposta por Hahn e colaboradores em 1992. Em uma análise 2D, conforme equação 14, o índice Tb.Pf compara a área (*A*) e o perímetro (*P*) da seção transversal de um sólido binarizado antes e depois (subscrito 1 e 2, respectivamente) de um processo de dilatação. Na

análise 3D as variáveis da área e do perímetro são substituídas por superfície e volume, conforme equação 15.

$$Tb.Pf = \frac{P_1 - P_2}{A_1 - A_2} \quad (14)$$

$$Tb.Pf = \frac{S_1 - S_2}{V_1 - V_2} \quad (15)$$

O cálculo do Tb.Pf é influenciado pela fração volumétrica da amostra óssea (BV/TV). O Tb.Pf informa sobre o grau de conectividade superficial das trabéculas, pois quando o conjunto de trabéculas apresenta alta conectividade, as superfícies côncavas são mais abundantes que as convexas e a operação de dilatação aumenta enormemente o perímetro, enquanto a área é apenas moderadamente ampliada. A prevalência de cavidades fechadas (“enclosed cavities”) e superfícies côncavas podem levar os valores do fator padrão de osso trabecular para termos negativos, bem como os valores do Índice de modelo estrutural (SMI), (CT- Analyser, 2008).

4. Material e Métodos

4.1 Amostras Ósseas

Três pares de fêmures bovinos de animais da mesma raça foram cedidos pela empresa Barra Mansa Comércio de Carnes e Derivados LTDA do município de Sertãozinho – SP. O sexo, a idade e o peso dos animais estão descritos na tabela 1. Os fêmures foram mantidos em freezer à -20°C até serem utilizados para a extração das amostras ósseas trabeculares.

Tabela 1 – Características dos animais abatidos para a coleta dos fêmures bovinos.

Pares de Fêmures	Sexo	Idade aproximada (meses)	Peso (Kg)
1º	Fêmea	36	302
2º	Fêmea	33	286
3º	Fêmea	31	278

A extração das dezoito amostras ósseas de 10 mm de diâmetro, por 20 mm de altura, foi realizada no “Laboratório de Biomecânica” do Instituto de Ortopedia e

Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (IOT-HC-FMUSP) e na oficina mecânica da EESC-USP (OME). Os seguintes procedimentos foram utilizados para a extração das amostras dos fêmures bovinos:

Procedimento 1: Extração de amostra cúbica trabecular

A extração da cabeça femoral de uma amostra cúbica com aproximadamente 30 mm de aresta foi realizada no laboratório de Biomecânica do IOT-HC-FMUSP utilizando-se um dispositivo de movimentação angular e longitudinal e uma serra circular de dimensões 177,8 mm de raio e 3,2 mm de espessura acoplada a uma máquina de corte de 5500 rpm. A máquina foi colocada sobre uma furadeira de bancada para possibilitar o seu deslocamento vertical (figuras 16 e 17). Esse procedimento foi executado em três etapas:

Figura 16 - Dispositivo de movimentação angular e longitudinal para a extração de amostra cúbica.

Figura 17 - Serra circular acoplada a máquina de corte

Etapa 1: Radiografia dos fêmures para a visualização do alinhamento das trabéculas ósseas na direção crânio-caudal (figuras 18, 19 e 20) e alinhamento do fêmur na “garra de parafusos” para os cortes das amostras.

Figura 18 – Direção principal de alinhamento das trabéculas do 1º par de fêmures.

Figura 19 - Direção principal de alinhamento das trabéculas do 2º par de fêmures.

Figura 20 - Direção principal de alinhamento das trabéculas do 3º par de fêmures.

Observa-se que o alinhamento das trabéculas é paralelo à direção da cortical do fêmur. O posicionamento do fêmur para a extração das amostras seguiu o alinhamento do eixo vertical da “garra de parafusos” com a cortical (figura 21).

Figura 21 – Alinhamento do fêmur.

Etapa 2: Marcação de distâncias de aproximadamente 30 mm na cabeça do fêmur (figura 22) em uma direção paralela e perpendicular ao eixo longitudinal do mecanismo de movimentação longitudinal e angular.

Figura 22 – Marcação das distâncias na cabeça do fêmur

A máquina de corte foi nivelada com medidor de nível de precisão (figura 23) para os quatro primeiros cortes (figuras 24, 25, 26 e 27).

Figura 23 – Nivelamento da máquina de corte para os quatro primeiros cortes.

Figura 24 – Primeiro corte longitudinal na cabeça femoral.

Figura 25 – Segundo corte longitudinal na cabeça femoral.

Observação: O disco era centralizado na marcação da cabeça femoral e deslocado 15 mm para cima ou para baixo a fim de se efetuar o próximo corte. Para se controlar a profundidade dos cortes uma circunferência de 147,8 mm de raio foi desenhada como referência sobre a serra.

Figura 26 – Terceiro corte longitudinal na cabeça femoral após rotação de 90°.

Figura 27 – Quarto corte longitudinal na cabeça femoral.

Etapa 3: Execução de dois cortes na cabeça femoral na direção transversal.

A máquina de corte foi girada de 90° e alinhada verticalmente com um esquadro. Os cortes estão mostrados nas figuras 28 e 29. Para a realização do segundo corte o

mecanismo de movimentação longitudinal e de rotação foi deslocado 30 mm na direção da máquina de corte. A amostra cúbica é mostrada na figura 30.

Figura 28 – Primeiro corte transversal.

Figura 29 – Segundo corte transversal.

Figura 30 – Amostra trabecular cúbica: Cr (direção crânio-caudal), L (direção lateral-medial), A (direção anterior-posterior).

Procedimento 2: Extração de amostras cilíndricas de osso trabecular.

Três amostras cilíndricas foram extraídas de cada uma das amostras cúbicas. A extração foi realizada na oficina mecânica da EESC-USP. Os cilindros com 10 mm de diâmetro e 20 mm de altura foram extraídos de cada direção principal do trabeculado, conforme esquematizado na figura 31, utilizando-se uma trefina cânula de metal duro com 10 mm de diâmetro interno, 12 mm de diâmetro externo e 25 mm de altura (figura 32) e uma furadeira radial (figura 33). O passo de penetração e a rotação da furadeira foram escolhidos para minimizar o aumento de temperatura da amostra cúbica e possíveis danos a sua estrutura. A temperatura não deveria ultrapassar 47 °C para se evitar a necrose do tecido ósseo (Eriksson et al.,1984).

Figura 31 – Desenho esquemático da extração dos três cilindros nas três direções principais.

Figura 32 – Trefina Cânula de metal para extração dos cilindros de 10 mm x 20 mm.

Figura 33 – Furadeira Radial.

A extração das amostras cilíndricas foi executada em três etapas:

Etapa 1: Fixação da trefina cânula no mandril da furadeira e ajuste do passo de penetração (0.187 mm) e da rotação (60 rpm) da furadeira.

Etapa 2: Fixação da amostra cúbica na morsa e posicionamento da trefina sobre a amostra (figura 34).

Figura 34 – Fixação da amostra cúbica na morsa e posicionamento da trefina.

Etapa 3: Perfuração da amostra cúbica mantendo-a irrigada com água destilada (Alves, 1996) e monitorando-se a temperatura com um sensor digital de temperatura com potência de saída menor que 1 mW, precisão de $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e comprimento de onda no vermelho de 630 – 670 nm (modelo MT-350, Minipa, Brasil). O procedimento é ilustrado na figura 35.

Figura 35 – Perfuração da amostra cúbica para extração do cilindro com irrigação contínua e medição da variação de temperatura.

Etapa 4: Retirada da amostra cilíndrica da trefina, medição das suas dimensões e armazenamento em recipiente com soro (solução salina com 0.9% de NaCl) mantido em refrigerador até a realização da análise morfométrica por μCT . A figura 36 mostra uma amostra cilíndrica extraída na direção crânio-caudal.

Figura 36 – Cilindro ósseo trabecular retirado na direção crânio-caudal.

4.2 Quantificação Microestrutural

A aquisição das projeções e a reconstrução 2D das amostras cilíndricas trabeculares foram realizadas pelo microtomógrafo de raio-x de alta resolução (modelo 1172, SkyScan, Bélgica) da EMBRAPA Instrumentação Agropecuária (São Carlos-SP), mostrado na figura 37. Para as análises morfométricas 2D e 3D utilizou-se o software CT-Analyser (anexo A) fornecido pelo fabricante do microtomógrafo.

Figura 37 – Microtomógrafo por raio-X de alta resolução (SkyScan, modelo 1172).

A Tabela 2 descreve as especificações do microtomógrafo no procedimento de aquisição das projeções das amostras ósseas para a quantificação microestrutural.

Tabela 2 - Especificações do Microtomógrafo.

Especificações	Unidade	Valor
Câmera Hamamatsu	Mp	10
Voltagem da Fonte de Raio-X	kV	89
Corrente da Fonte de Raio-X	μ A	112
Distância da Fonte ao Objeto	mm	65.107
Distância da Fonte ao Detector de Radiação	mm	216.178
Tamanho do Pixel das Seções Transversais	μ m	6.96
Resolução das Seções Transversais	pixel	2000 x 2000
Tamanho do Pixel da Câmera	μ m	11.59
Fator de Magnificação (M)	-	4.32
Resolução Tomográfica	μ m	2.68
Filtro Alumínio	mm	0.5
Passo de Rotação	graus	0.4

Os seguintes procedimentos foram realizados na quantificação microestrutural:

Procedimento 1: Fixação da amostra cilíndrica em um suporte circular com uma “massa de modelar” para se obter um alinhamento vertical, evitar deslocamentos durante a movimentação angular e manter a amostra no campo visual do detector de radiação.

Procedimento 2: Aquisição das projeções da região central das amostras cilíndricas (figura 38) e reconstrução de 936 seções transversais no formato TIF/16 bits com resolução de 6,96 μ m (figura 39) obtendo-se um conjunto de arquivos de tamanho aproximado de 5 Gb. Com esta resolução a região radiografada foi de 10 mm x 6,57 mm. A reconstrução de toda a amostra óssea (10mm x 20 mm) requereria um tempo para a aquisição das projeções não disponível no agendamento de uso do microtomógrafo.

Figura 38 – Projeção de uma amostra cilíndrica.

Figura 39 – Reconstrução 2D no formato TIFF/16 bits

Procedimento 3: Análise morfométrica 2D e 3D de 201 seções transversais da região central da amostra óssea (figura 40).

Dificuldades de processamento computacional (falta de memória) para a análise 3D das 936 seções transversais resultaram em uma escolha menor do volume de interesse da amostra utilizado nas análises morfométricas.

Figura 40 – Desenho esquemático do volume de interesse utilizado nas análises morfométricas.

Procedimento 4: Reconstrução 3D das amostras

A reconstrução 3D das amostras foi realizada no formato de extensão (.p3g) com um reagrupamento de duas à duas seções transversais a fim de diminuir o tamanho do arquivo da imagem reconstruída.

4.3 Análise Estatística

A análise estatística foi efetuada com o software *Statistica* (versão 8.0). O teste de Correlação de Pearson foi realizado entre as medidas 2D e 3D para os seguintes parâmetros microestruturais: espessura trabecular, número trabecular, separação trabecular e fator padrão trabecular. A correlação de Pearson entre as medidas 2D dos diferentes modelos (placas ou cilíndrico) também foi analisada para estes parâmetros, exceto para a medida do fator padrão trabecular (Tb.Pf).

Além da Correlação de Pearson foi aplicado o teste-t pareado para avaliar o nível de semelhança ou diferença estatística dos seguintes parâmetros obtidos na análise

morfométrica 2D e 3D: espessura trabecular, separação trabecular, número trabecular, fator padrão trabecular e autovalores da matriz **M** (tensor anisotropia).

5. Resultados

5.1 Extrações dos Cubos e Cilindros Ósseos Trabeculares

A tabela 3 mostra as dimensões das amostras cúbicas extraídas dos fêmures bovinos e a variação de temperatura medida no processo de extração dos cilindros ósseos.

Tabela 3 – Dimensão das amostras cúbicas e variação da temperatura.

Amostra Cúbica	Dimensão por Direção (Cr-Ca) x (L-M) x (A-P)	Amostra Cilíndrica	Temperatura (°C) (precisão $\pm 0,5$ °C)	
			Mínima	Máxima
Cubo 1 – 1° Par (fêmur direito)	23 mm x 26 mm x 25 mm	1° Cilindro	18,0	26,0
		2° Cilindro	21,0	33,0
		3° Cilindro	20,0	26,0
Cubo 2 – 1° Par (fêmur esquerdo)	25 mm x 26 mm x 26 mm	1° Cilindro	19,0	42,0
		2° Cilindro	20,0	28,0
		3° Cilindro	20,5	24,0
Cubo 3 – 2° Par (fêmur direito)	21 mm x 21 mm x 23 mm	1° Cilindro	18,0	27,0
		2° Cilindro	18,0	23,0
		3° Cilindro	19,0	21,0
Cubo 4 – 2° Par (fêmur esquerdo)	24 mm x 26 mm x 27 mm	1° Cilindro	18,5	26,0
		2° Cilindro	19,0	32,5
		3° Cilindro	18,0	23,0
Cubo 5 – 3° Par (fêmur direito)	25 mm x 25 mm x 23 mm	1° Cilindro	19,0	25,0
		2° Cilindro	20,5	27,0
		3° Cilindro	20,0	23,0
Cubo 6 – 3° Par (fêmur esquerdo)	23 mm x 25 mm x 22 mm	1° Cilindro	20,0	26,0
		2° Cilindro	19,0	21,0
		3° Cilindro	19,5	21,5

A tabela 4 mostra as dimensões máximas do volume de interesse (VOI) das amostras sem irregularidades na estrutura devido ao processo de usinagem dos cilindros.

Tabela 4 - Amostras Ósseas Cilíndricas Extraídas dos Fêmures Bovinos.

Amostra	Par de fêmures	Localização	Direção Principal	Dimensões Máximas
Am 1	1º Par	fêmur direito	Crânio-Caudal	10 mm x 20 mm
Am 2	1º Par	fêmur esquerdo	Crânio-Caudal	10 mm x 20 mm
Am 3	1º Par	fêmur esquerdo	Lateral-Medial	10 mm x 4 mm
Am 4	1º Par	fêmur direito	Lateral-Medial	10 mm x 12 mm
Am 5	1º Par	fêmur direito	Anterior-Posterior	10 mm x 20 mm
Am 6	1º Par	fêmur esquerdo	Anterior-Posterior	10 mm x 20 mm
Am 7	2º Par	fêmur direito	Crânio-Caudal	10 mm x 15 mm
Am 8	2º Par	fêmur esquerdo	Crânio-Caudal	10 mm x 20 mm
Am 9	2º Par	fêmur direito	Lateral-Medial	10 mm x 9 mm
Am 10	2º Par	fêmur esquerdo	Lateral-Medial	10 mm x 20 mm
Am 11	2º Par	fêmur direito	Anterior-Posterior	10 mm x 1 mm
Am 12	2º Par	fêmur esquerdo	Anterior-Posterior	10 mm x 10 mm
Am 13	3º Par	fêmur direito	Crânio-Caudal	10 mm x 20 mm
Am 14	3º Par	fêmur esquerdo	Crânio-Caudal	10 mm x 20 mm
Am 15	3º Par	fêmur direito	Lateral-Medial	10 mm x 12 mm
Am 16	3º Par	fêmur esquerdo	Lateral-Medial	10 mm x 12 mm
Am 17	3º Par	fêmur direito	Anterior-Posterior	10 mm x 15 mm
Am 18	3º Par	fêmur esquerdo	Anterior-Posterior	10 mm x 12 mm

Nove amostras (Am 3, Am 4, Am 7, Am 9, Am 11, Am 15, Am 16, Am 17, Am 18) apresentaram irregularidades na estrutura devido ao corte da furadeira radial ou ao tamanho do cubo ósseo extraído da cabeça do fêmur (figura 41). O critério de inclusão das amostras nas análises morfométricas foi não apresentar irregularidades entre as seções 368 e 568 (figura 40). A amostra 4 foi descartada por este critério e a amostra 11 por ter apenas 1 mm de altura.

Figura 41 – Amostra óssea com irregularidade.

5.2 Análise Morfométrica 2D e 3D e Análise Estatística

As tabelas 5, 6 e 7 descrevem a média dos parâmetros morfométricos medidos nas análises 2D e 3D em cada direção principal.

A tabela 8 descreve o teste-t pareado, com nível de significância de 0,5% ($p < 0,05$) nas análises 2D e 3D, mostrando o nível de semelhança e diferença estatística entre as medidas. O teste foi aplicado aos seguintes parâmetros morfométricos: espessura trabecular, separação trabecular, número trabecular, fator padrão trabecular e autovalores da matriz **M** (tensor anisotropia).

Tabela 5 – Valores médios dos parâmetros morfométricos (n=6) obtidos nas análises morfométrica 2D e 3D na direção crânio-caudal.

Parâmetro	Abreviação	Unidade	Análise 2D	Análise 3D
Volume da Amostra	TV	mm ³	111,67	111,94
Volume Ósseo da Amostra	BV	mm ³	54,69	54,39
Razão entre Volume Ósseo da Amostra e Volume da Amostra	BV/TV	%	49,05	48,64
Área Superficial da Amostra	TS	mm ²	212,23	212,59
Área Óssea da Amostra	BS	mm ²	886,37	742,24
Razão entre Área Óssea da Amostra e Volume Ósseo da Amostra	BS/BV	1/ mm	16,27	13,7
Área Média das Seções Transversais	T.Ar	mm ²	83,23	-
Área Média de Tecido Ósseo nas Seções Transversais	B.Ar	mm ²	40,81	-
Espessura Trabecular (modelo de placas)	Tb.Th	mm	0,12	0,23
Espessura Trabecular (modelo cilíndrico)	Tb.Dm	mm	0,25	0,23
Separação Trabecular (modelo de placas)	Tb.Sp	mm	0,13	0,43
Separação Trabecular (modelo cilíndrico)	Tb.Sp	mm	0,07	0,43
Número Trabecular (modelo de placas)	Tb.N	1/ mm	3,97	2,14
Número Trabecular (modelo cilíndrico)	Tb.N	1/ mm	3,20	2,14
Fator Padrão Trabecular Médio	Tb.Pf	1/ mm	-12,26	-11,89
Índice de Modelo	SMI	-	-	-2,09
Porcentagem de Porosidade	Po	%	47,99	-
Grau de Anisotropia	DA	-	-	0,32
Autovalor 1	-	-	-	0,59
Autovalor 2	-	-	-	0,56
Autovalor 3	-	-	-	0,56

Tabela 6 - Valores médios dos parâmetros morfométricos (n=5) obtidos nas análises morfométrica 2D e 3D na direção lateral-medial.

Parâmetro	Abreviação	Unidade	Análise 2D	Análise 3D
Volume da Amostra	TV	mm ³	108,37	108,92
Volume Ósseo da Amostra	BV	mm ³	51,10	51,17
Razão entre Volume Ósseo da Amostra e Volume da Amostra	BV/TV	%	47,15	46,98
Area Superficial da Amostra	TS	mm ²	207,88	208,70
Área Óssea da Amostra	BS	mm ²	974,22	825,97
Razão entre Área Óssea da Amostra e Volume Ósseo da Amostra	BS/BV	1/ mm	19,58	16,23
Area Média das Seções Transversais	T.Ar	mm ²	81,49	-
Área Média de Tecido Ósseo nas Seções Transversais	B.Ar	mm ²	38,43	-
Espessura Trabecular (modelo de placas)	Tb.Th	mm	0,11	0,20
Espessura Trabecular (modelo cilíndrico)	Tb.Dm	mm	0,21	0,20
Separação Trabecular (modelo de placas)	Tb.Sp	mm	0,12	0,42
Separação Trabecular (modelo cilíndrico)	Tb.Sp	mm	0,06	0,42
Número Trabecular (modelo de placas)	Tb.N	1/ mm	4,59	2,40
Número Trabecular (modelo cilíndrico)	Tb.N	1/ mm	3,78	2,40
Fator Padrão Trabecular Médio	Tb.Pf	1/ mm	-19,54	-19,25
Índice de Modelo	SMI	-	-	-2,51
Porcentagem de Porosidade	Po	%	44,59	-
Grau de Anisotropia	DA	-	-	0,29
Autovalor 1	-	-	-	0,46
Autovalor 2	-	-	-	0,59
Autovalor 3	-	-	-	0,66

Tabela 7 – Valores médios dos parâmetros morfométricos (n=5) obtidos nas análises morfométrica 2D e 3D na direção anterior-posterior.

Parâmetro	Abreviação	Unidade	Análise 2D	Análise 3D
Volume da Amostra	TV	mm ³	110,00	110,42
Volume Ósseo da Amostra	BV	mm ³	57,90	58,18
Razão entre Volume Ósseo da Amostra e Volume da Amostra	BV/TV	%	52,53	52,68
Area Superficial da Amostra	TS	mm ²	210,82	211,26
Área Óssea da Amostra	BS	mm ²	982,57	823,67
Razão entre Área Óssea da Amostra e Volume Ósseo da Amostra	BS/BV	1/ mm	17,07	14,20
Area Média das Seções Transversais	T.Ar	mm ²	82,71	-
Área Média de Tecido Ósseo nas Seções Transversais	B.Ar	mm ²	43,54	-
Espessura Trabecular (modelo de placas)	Tb.Th	mm	0,12	0,22
Espessura Trabecular (modelo cilíndrico)	Tb.Dm	mm	0,24	0,22
Separação Trabecular (modelo de placas)	Tb.Sp	mm	0,11	0,40
Separação Trabecular (modelo cilíndrico)	Tb.Sp	mm	0,06	0,40
Número Trabecular (modelo de placas)	Tb.N	1/ mm	4,47	2,41
Número Trabecular (modelo cilíndrico)	Tb.N	1/ mm	3,49	2,41
Fator Padrão Trabecular Médio	Tb.Pf	1/ mm	-20,36	-20,20
Índice de Modelo	SMI	-	-	-3,33
Porcentagem de Porosidade	Po	%	45,19	-
Grau de Anisotropia	DA	-	-	0,28
Autovalor 1	-	-	-	0,51
Autovalor 2	-	-	-	0,62
Autovalor 3	-	-	-	0,59

Tabela 8 – Teste-t pareado ($p < 0,05$) dos parâmetros morfométricos ($n=16$).

Grupo 1 vs. Grupo2	Média Grupo 1 ± (desvio padrão)	Média Grupo 2 ± (desvio padrão)	Valor (t)	p
Tb.Th (2D) vs. Tb.Th (3D)	0,12 ± 0,02	0,22 ± 0,03	-11,00	0
Tb.Dm (2D) vs. Tb.Th (3D)	0,23 ± 0,04	0,22 ± 0,03	1,15	0,26
Tb.Th (2D) vs. Tb.Dm (2D)	0,12 ± 0,02	0,23 ± 0,04	-10,98	0
Tb.Sp (mod. de placas - 2D) vs. Tb.Sp (3D)	0,12 ± 0,01	0,42 ± 0,04	-28,09	0
Tb.Sp (mod. cilíndrico - 2D) vs. Tb.Sp (3D)	0,06 ± 0,01	0,42 ± 0,04	-34,17	0
Tb.Sp (mod. de placas - 2D) vs. Tb.Sp (mod. Cilíndrico - 2D)	0,12 ± 0,01	0,06 ± 0,01	14,52	0
Tb.N (mod. de placas - 2D) vs. Tb.N (3D)	4,32 ± 0,59	2,30 ± 0,35	11,73	0
Tb.N (mod. cilíndrico - 2D) vs. Tb.N (3D)	3,47 ± 0,51	2,30 ± 0,35	7,55	0
Tb.N (mod. de placas - 2D) vs. Tb.N (mod. Cilíndrico - 2D)	4,32 ± 0,59	3,47 ± 0,51	4,33	0
Tb.Pf (2D) vs. Tb.Pf (3D)	-17 ± 8	-16 ± 9	-0,09	0,93
Autovalor 1 vs. Autovalor 2	0,52 ± 0,09	0,59 ± 0,07	-2,14	0,04
Autovalor 1 vs. Autovalor 3	0,52 ± 0,09	0,60 ± 0,07	-2,52	0,02
Autovalor 2 vs. Autovalor 3	0,59 ± 0,07	0,60 ± 0,07	-0,44	0,67

5.3 Correlações entre os Parâmetros Morfométricos

A figura 42 descreve a classificação das correlações de Pearson em função do coeficiente de correlação (r). As figuras 43 a 49 mostram as correlações entre as análises 2D e 3D para os seguintes parâmetros morfométricos: espessura trabecular, separação trabecular, número trabecular, fator padrão trabecular. O teste de correlação foi aplicado aos parâmetros morfométricos medidos na análise 2D, como mostram as figuras 50 a 52, correlacionando o modelo de placas e o cilíndrico. Os autovalores da matriz **M** foram correlacionados entre si como mostram as figuras 53 a 55.

Coeficiente de correlação	Correlação
$r = 1$	Perfeita positiva
$0,8 \leq r < 1$	Forte positiva
$0,5 \leq r < 0,8$	Moderada positiva
$0,1 \leq r < 0,5$	Fraca positiva
$0 < r < 0,1$	Ínfima positiva
0	Nula
$-0,1 < r < 0$	Ínfima negativa
$-0,5 < r \leq -0,1$	Fraca negativa
$-0,8 < r \leq -0,5$	Moderada negativa
$-1 < r \leq -0,8$	Forte negativa
$r = -1$	Perfeita negativa

Figura 42 - Classificação da Correlação Linear (Santos, 2007 & Murteira, 1993).

Figura 43 – Correlação Tb.Th (3D) x Tb.Th (modelo de placas 2D).

Figura 44 - Correlação Tb.Th (3D) x Tb.Dm (modelo cilíndrico 2D).

Figura 45 - Correlação Tb.Sp (3D) x Tb.Sp (modelo de placas 2D).

Figura 46 - Correlação Tb.Sp (3D) x Tb.Sp (modelo cilíndrico 2D).

Figura 47 - Correlação Tb.N (3D) x Tb.N (modelo de placas 2D).

Figura 48 - Correlação Tb.N (3D) x Tb.N (modelo cilíndrico 2D).

Figura 49 - Correlação Tb.Pf (3D) x Tb.Pf (2D).

Figura 50 - Correlação Tb.Dm (modelo cilíndrico 2D) x Tb.Th (modelo de placas 2D).

Figura 51 - Correlação Tb.Sp (modelo cilíndrico 2D) x Tb.Sp (modelo de placas 2D).

Figura 52 - Correlação Tb.N (modelo cilíndrico 2D) x Tb.N (modelo de placas 2D).

Figura 53 – Correlação: Autovalores 1 e Autovalor 2.

Figura 54 - Correlação: Autovalor 1 e Autovalor 3.

Figura 55 - Correlação: Autovalor 2 e Autovalor 3.

6. Discussão

Os valores médios das análises morfométricas 2D e 3D das amostras ósseas trabeculares bovinas cilíndricas nas três direções principais, descritas nas tabelas 5, 6 e 7, mostram que houve pequena variação na medida dos parâmetros volume da amostra (TV), volume ósseo da amostra (BV), razão entre volume ósseo da amostra e volume da amostra (BV/TV) e área superficial da amostra (TS). Em cada uma das direções principais a BS/BV apresentou uma diferença significativa entre os valores medidos na análise 2D e 3D, mas a diferença entre esses valores manteve-se bem próxima entre as direções principais.

Não houve uma diferença significativa nos valores da área média das seções transversais (T.Ar) e da área média de tecido ósseo nas seções transversais (B.Ar) entre as direções principais.

Os valores das análises 2D e 3D da espessura trabecular para o modelo de placas (Tb.Th) e da espessura trabecular 3D (Tb.Th*) apresentaram uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0$) quando aplicado o teste-t pareado (Tabela 8) e possuem uma correlação fortemente positiva (figura 43).

Os valores das análises 2D e 3D da espessura trabecular para o modelo cilíndrico 2D (Tb.Dm) e da espessura trabecular 3D (Tb.Th*) não apresentaram uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,26$) quando aplicado o teste-t pareado e possuem uma forte correlação (figura 44).

Os valores da espessura trabecular (Tb.Th) ao se comparar os modelos de placas e cilíndrico na análise 2D apresentaram uma diferença significativa ($p = 0$) quando aplicado o teste-t pareado e uma forte correlação (figuras 50).

Os valores da separação trabecular (Tb.Sp) apresentaram uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0$) quando comparadas as análises 2D e 3D e uma correlação moderadamente positiva (figuras 45 e 46). A correlação é fortemente positiva na análise 2D ao se comparar os modelos de placas e cilíndrico (figura 51).

Os valores do número trabecular (Tb.N) apresentaram uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0$) quando comparadas as análises 2D e 3D e uma

correlação fortemente positiva (figuras 47 e 48). A correlação é fortemente positiva na análise 2D ao se comparar os modelos de placas e cilíndrico (figura 52).

Os valores do fator padrão trabecular (Tb.Pf) apresentaram uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0$) quando comparadas as análises 2D e 3D e uma correlação fortemente positiva (figura 49). Os valores negativos dos parâmetros mostram a prevalência de cavidades medulares fechadas (“enclosed cavities”) e consequentemente superfícies côncavas na estrutura trabecular bovina levando não apenas os valores do fator padrão de osso trabecular para termos negativos, bem como os valores do Índice de modelo estrutural (SMI), isto equivale à uma razão BV/TV próxima ou maior que 50% (Chappard, 2005; Richard, 2008; CT- Analyser, 2008).

O grau de anisotropia (DA) não variou significativamente em cada uma das direções principais. Os autovalores 2 e 3 não apresentaram uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,67$) quando aplicado o teste-t pareado e possuem uma correlação fracamente negativa (figura 55). A diferença é significativa quando são comparados com o autovalor 1 ($p = 0,04$ e $p = 0,02$, respectivamente) e a correlação é moderadamente negativa (figura 53 e 54).

A diferença estatística observada no teste-t pareado mostra que há um autovalor distinto (autovalor 1) entre os autovalores da matriz **M** (tensor anisotropia) e, portanto, a microestrutura óssea trabecular de osso bovino apresenta uma simetria transversalmente isotrópica (Cowin, 1985; Cowin, 1989).

A análise morfométrica 2D é baseada na contagem dos pixels brancos contidos na microestrutura, sendo aplicado a 201 seções transversais. As análises baseadas na técnica 2D dependem muito das imagens escolhidas para a extração dos parâmetros, tornando o método problemático. Esse processo depende do nível de “threshold” utilizado pelo operador, o que sugere um estudo para verificar seu melhor valor. Se a amostra possui um formato da microestrutura que não seja o mesmo ao longo das seções, os resultados podem conduzir a uma falsa conclusão. A segunda análise para o cálculo dos parâmetros, o método 3D, é realizada através da representação do volume da microestrutura por voxels. Quando a histomorfometria é aplicada a uma amostra biológica real (não simulada ou pré-fabricada), observa-se uma grande variação dos valores dos parâmetros quantificados ao longo das seções (Lima et al., 2009). Basear-se numa média dos valores pode não ser a melhor solução. Porém quando o formato da

microestrutura se mantém ao longo das seções, (no caso a região de interesse sendo uma circunferência para todas as seções), podemos perceber que a média dos valores na análise 2D é praticamente a mesma da análise 3D, para os parâmetros: volume tecidual, volume ósseo, percentual de volume ósseo e a área superficial óssea.

A microtomografia tridimensional por raio-X difere da histomorfometria convencional por se ajustar melhor a morfologia da fase de interesse, representando melhor os contornos da superfície e, por conseguinte, do volume. A análise morfométrica 3D fornece toda a informação espacial necessária para que os parâmetros morfométricos sejam calculados, fazendo com que seus valores se ajustem melhor à morfologia da amostra (Lima et al., 2009).

A técnica de microtomografia tem dado contribuições relevantes para se investigar o aprimoramento da caracterização da qualidade óssea (Odgaard, 2001, Dreossi, 2007). No campo da histomorfometria microscópica, o estudo da microarquitetura é baseado na medida da largura, do número e da separação das trabéculas, bem como da sua organização espacial. Seguindo essa linha de investigação, investigações apontam como fatores estruturais determinantes da resistência mecânica óssea: a largura e a porosidade do osso cortical; a forma, o número, a largura, a conectividade e a anisotropia do osso trabecular (Dalle Carbonare; 2005).

Nos últimos anos observou-se que não apenas a densidade mineral óssea, mas também a morfologia da estrutura óssea (simetria) desempenha um importante papel na sua rigidez. Luo et al. (Luo, 1999) demonstrou que a densidade óssea contribui apenas com cerca de 65% da variação da resistência óssea, e que acrescentando à densidade mineral óssea informações da microarquitetura, pode-se aumentar a valor para 90%.

Neste sentido um estudo mais detalhado da morfometria trabecular passou a despertar um grande interesse na comunidade médica (Chapard, 1999) buscando-se medições mais apuradas para melhorar o diagnóstico e tratamento da osteoporose através de recursos mais sensíveis, não invasivos e de resposta mais rápida na avaliação das intervenções terapêuticas (Waldir, 2007).

7. Conclusão

A metodologia empregada mostrou ser bastante interessante para a caracterização do osso trabecular nas três direções possíveis de carregamento da estrutura óssea. Os autovalores da matriz **M** (tensor anisotropia) expressaram uma elevada tendência da microestrutura trabecular bovina para a simetria transversalmente isotrópica. Neste sentido a solução dos problemas computacionais encontrados nessa investigação deve ser o objetivo de futuras investigações sobre análises morfométricas 2D e 3D por μ CT. O uso de menores resoluções tomográficas e/ou maiores passos de rotação no procedimento de aquisição das projeções das amostras ósseas contribuirão para a solução desses problemas.

Os resultados da análise microestrutural 2D e 3D demonstram que em apenas seis dos treze parâmetros analisados não houve diferença na medida bi e tri-dimensional ressaltando o enorme potencial da microtomografia tridimensional por raios-X nas investigações sobre a influência dos parâmetros microestruturais do osso trabecular na qualidade óssea. A reconstrução 3D de objetos é uma importante característica da técnica para visualização tridimensional da microestrutura óssea das amostras.

O microtomógrafo de raio-x de bancada de alta resolução modelo 1172 da SkyScan é um equipamento de fácil utilização e o seu software CT-Analyser calcula diversos parâmetros da microestrutura sendo uma importante ferramenta para investigações sobre a influência da microestrutura na resistência mecânica do osso trabecular, através das correlações dos parâmetros microestruturais com os parâmetros de resistência mecânica. É possível utilizar um módulo de ensaio mecânico acoplado ao microtomógrafo para a determinação dessas correlações visando o aprimoramento da caracterização da qualidade óssea para o diagnóstico de doenças do metabolismo ósseo como a osteoporose.

Referências Bibliográficas

Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. (2004). Histologia: Vida e Morte das células nos tecidos. **Biologia molecular da célula**, 4^a ed., 1304-1305.

Alves, J. M. (1996). **Caracterização do tecido ósseo por ultra-som para diagnóstico de osteoporose**. Tese de Doutorado. Escola de Engenharia de São Carlos, Instituto de Física, Universidade de São Paulo.

Ashman, R.B., Corin, J.D., Turner, C.H. (1987). Elastic properties of cancellous bone: measurement by an ultrasonic technique, **Journal of Biomechanics**, 20 (10):979-986.

Bartl, R., Berta, F. (2004). **Bone a fascinating organ**, In: Osteoporosis - Diagnosis, Prevention and Therapy, Springer Verlag.

Buskirk, W.C.V., Cowin, S.C., Ward, R.N. (1981). Ultrasonic measurement of orthotropic elastic constants of bovine femoral bone, **Journal of Biomechanics Engineering**, 103: 67 – 72.

Carter, D.R., Hayes, W.C. (1977). The compressive behavior of bone as a two-phase porous structure, **Journal of Bone and Joint Surgery**, 59A, 954 – 962.

Chapard, D.; Legrand, E.; Pascaretti, C.; Baslé, M. F; Audran, M. (1999) “Comparison of Eight Histomorphometric Methods for Measuring Trabecular Bone Architecture by Image Analysis on Histological Sections”, **Microscopy Research and Technique**, 45, 303-312.

Ciarelli, M.J.; Goldstein, S.A.; Kuhn, J.L.; Cody, D.D.; Brown, M.B. (1991). Evaluation of orthogonal mechanical properties and density of human trabecular bone from the major metaphyseal regions with materials testing and computed tomography, **Journal of Orthopaedic Research**, 9:674 – 682.

Cowin, S.C. (1985). The Relationship between the elasticity tensor and the fabric tensor, Mechanics of Material. **Mechanics of Materials**, 4, 137-147.

Cowin, S.C.; Mehrabadi, M.M. (1987). On the identification of material symmetry for anisotropic elastic materials, **Quarterly Journal of Mechanics and Applied Mathematics**, 40:451-476.

Cowin, S.C.; Mehrabadi, M.M. (1989). Identification of the elastic symmetry of bone and other materials, **Journal of Biomechanics**, 22(6/7):503-515.

Cowin, S.C.; Doty S.B. (2006). **Modeling Material Microstructures**. In: Tissue Mechanics, Springer.

CT-Analyser (2008): **Bone Biology User Guide**, Skyscan, Belgium.

Currey, J.D. (1969). The mechanical consequences of variation in the mineral content of bone. **Journal of Biomechanics**, 2:1 – 11.

Dalle Carbonare, L.; Valenti, M. T.; Bertoldo, F.; Zanatta, M.; Zenari, S.; Realdi, G.; Lo Cascio, V.; Giannini, S. (2005). “Bone Microarchitecture Evaluated by Histomorphometry”, **Micron**, 36: 609-616.

Dreossi, D.; Cosmi, E. (2007). Numerical and experimental structural analysis of trabecular architecture, **Meccanica**, 42:85-93.

Eriksson, A.R.; Albrektsson, T. (1984). The effect of heat on bone regeneration: an experimental study in the rabbit using the bone growth chamber. **J Oral Maxillofac Surg.**; 42(11):705-11.

Feldkamp, L.A.; Godstein, S.A.; Parfitt, A.M.; Jasion, G.; Kleerekoper, M. (1989). The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. **Journal of Bone and Mineral Research**, 4:3 – 11.

Goldsstein, S.A.; Wilson, D.L.; Sonstegard, D.A.; Matthews, L.S. (1983). The Mechanical properties of human trabecular bone as a function of metaphyseal location. **Journal of Biomechanics**, 16: 959 – 969.

Goulet, R.W.; Goldstein, S.A.; Ciabelli, M.J.; Kuhn, J.L.; Brown, M.B.; Feldkamp, L.A. (1994). The relationship between the structural and orthogonal compressive properties of trabecular bone. **Journal of Biomechanics**, 27: 375-389.

Guilak, F. (1994). Volume and surface area of viable chondrocytes in situ using geometric modeling of serial confocal sections, **Journal of Microscopy**, 173:245-256.

Harrigan, T.; Mann, R.W. (1984). Characterization of Microstructural Anisotropy in Orthotropic Materials using a Second Rank Tensor. **Journal of Materials Science**, 19:761-767.

Hayes, M. (1969). A simple statistical approach to the measurement of the elastic constants in anisotropic media, **Journal of Materials Science**, 4:10-14.

Hildebrand, T.; Laib, A.; Muller, R.; Dequeker, J.; Ruegsegger, P. (1999). 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): 1167-1174.

Feldkamp, L.A.; Davis, L.C.; Kress, J.W. (1984). Practical cone beam algorithm, **Journal of the Optical Society of America**

Feldkamp, L.A.; Goldstein, S.A.; Parfitt, M.; Jasion, G.; Kleerekoper, M. (1989). The direct estimation of the three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography, **Journal of Bone and Mineral Research**, 4 (1):3-11.

Junqueira, L.C.; Carneiro, J.; Kelley, R.O. (1989). In: Bone, **Basic Histology**, Apleton & Lange.

Kinney, J.H.; Lane, N.E.; Haupt, D.L. (1995). In-vivo, three-dimensional microscopy of trabecular bone, **Journal of Bone and Mineral Research**, 10 (2): 264-270).

Kuhn, J.L.; Goldstein, S.A.; Feldkamp, L.A.; Goulet, R.W.; Jasion, G. (1990). Evaluation of a Microcomputed Tomography System to Study Trabecular Bone Structure, **Journal of Orthopaedic Research**, 8:833-842.

Lasso, P. R. O.; Vaz, C. M. P.; Naime, J. M. (2008). Recomendações para utilização do microtomógrafo de raios-X Sky Scan 1172 em ciências agrárias e biológicas. São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 22 p. (**Embrapa Instrumentação Agropecuária. Documentos, 37**)

Lee, C.N.; Rosenfeld, A. (1987). Computing the Euler Number of a 3D image, **Proceedings of the First International Conference on Computer Vision**, 567-571.

LeMaitre, J. (2001), Elastic Properties of Bone Tissue, In: **Handbook of Materials Behavior Models**, 1048-1056.

Lima, I.; Lopes, R.T.; Oliveira, L.F.; Alves, J.M. (2009). Análise de Estrutura Óssea Através de Microtomografia Computadorizada 3D. **Revista Brasileira de Física Médica**, 2 (1), 6-10.

Lorensen, W.E.; Cline, H.E. (1987). Marching cubes: a high resolution 3D surface construction algorithm, **Computer Graphics**, 21:163-169.

Luo, G.; Kinney, J. H.; Kaufman, J. J.; Haupt, D.; Chiabrera, A.; Siffert, R. S. (1999). "Relationship Between Plain Radiographic Patterns and Three-dimensional Trabecular Architecture in The Human", **Osteoporosis Int.**, 9: 339-345.

Majumdar, S.; Bay, B.K (editors). (2000). **Noninvasive assessment of trabecular bone architecture and the competence of bone**, Editora Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Mccreadie, B.; Goldstein, S.A. (2000). Biomechanics of fracture: is bone mineral density sufficient to assess risk? **Journal of Bone and Mineral Research**, 15 (12): 2302-2308.

Muller, R.; Hildebrand, T.; Ruegseger, P. (1994). 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.

Odgaard, A.; Gundersen, H.J.G. (1991). Determination of connectivity in trabecular bone. **The International Society for Stereology**, Irvine, CA, USA.

Odgaard, A. (1997a). Three-dimensional methods for quantification of cancellous bone, **Bone**, 20(4): 315-328.

Odgaard, A.; Kabel, J.; Rietbergen, B.V.; Dalstra, M.; Huiskes, R. (1997b). Fabric and elastic principal directions of cancellous bone are closely related. **Journal of Biomechanics**, 30 (5):487-495.

Odgaard, A. (2001). Quantification of cancellous bone architecture, In: Cowin SC, **Bone Mechanics Handbook**, Informa HealthCare.

Parfitt, A. M. (1983). "Bone Histomorphometry: Techniques and Interpretation. In **The Physiologic and Clinical Significance of Bone Histomorphometric Data**. Ed. R. R. Recker, CRC Press, Boca Raton, USA. 143-224.

Parfitt, A.M.; Drezner, M.K.; Glorieux, F.H.; Kanis, J.A.; Malluche, H.; Meunier, P.J.; Ott, S.M.; Recker, R.R. (1987). Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. **Journal Bone Mineral Research**, 2 (6): 595-610.

Rice, J.C.; Cowin, S.C.; Bowman, J.A. (1988). On the dependence of elasticity and strength of cancellous bone on apparent density. **Journal of Biomechanics**, 21: 155 – 168.

Richard, A. L.; David M.L.C., Sarah A.; and Benedikt, H. (2008). Articular constraint, handedness, and directional asymmetry in the human second metacarpal. **Journal of Human Evolution**, 54 (6): 575-585.

Rietbergen, B.V.; Odgaard, A.; Kabel, J.; Huiskes, R. (1998). Relationships between bone morphology and bone elastic properties can be accurately quantified using high resolution computer reconstructions. **Journal of Orthopaedic Research**, 16: 23-28.

Rodrigues, M. E. S. (2003). **Análise do risco de fratura óssea por ultrasonometria e ensaio mecânico de compressão**. Dissertação Mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

Ruegsegger, R.; Koller, B.; Muller, R. (1996). A microtomographic system for the nondestructive evaluation of bone architecture. **Calcified Tissue International**, 58:24-29.

Waldir, L. R.; Antonio, C. A. S.; Denis, X. B.; Felix, C. R. (2007). Um Sistema Computacional Baseado no Processamento de Imagens Tomográficas para Estudo da Estrutura Trabecular. **VII Workshop de Informática Médica – WIM**. 156-165.

Willians, J.L.; Lewis, J.L. (1982). Properties and anisotropic model of cancellous bone from the proximal tibial epiphysis. **Journal of Biomedical Engineering**, 104: 169 – 173.

Whitehouse, W.J.; Dyson, E.D. (1974). Scanning Electron Microscope Studies of Trabecular Bone in the Proximal End of the Human Femur. **Journal of Anatomy**, 118: 417-444.

Whitehouse, W.J. (1974). The Quantitative Morphology of Anisotropic Trabecular Bone. **Journal of Microscopy**, 101:153-168.

Yang, G.; Kabel, J.; Rietbergen, B.V.; Odgaard, A.; Huiskes. R.; Cowin, S.C. (1999). The anisotropic Hooke's Law for Cancellous Bone and Wood, **Journal of Elasticity**, 53:125-146.

Anexo A (Software CT-Analyser)

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

Etapla 1: Abrir os arquivos de reconstrução 2D do microtomógrafo com formato bmp.

Etapla 2: Analisar as seções transversais reconstruídas.

Etapa 3: Escolher a ROI para a análise morfométrica 2D e o VOI para a análise morfométrica 3D com formato irregular ou regular.

Etapa 4: Binarização.

Etapa 5: Análise Morfométrica 2D.

Etapa 6: Escolha dos parâmetros de interesse da análise morfométrica 3D.

Etapa 7: Reconstrução 3D.