

ANÁLISE DE ESTRUTURA ÓSSEA ATRAVÉS DE MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA 3D

I. Lima¹, R.T. Lopes¹, L.F. Oliveira², J.M. Alves³

¹Laboratório de Instrumentação Nuclear - COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ/Brasil

²Departamento de Física Aplicada e Termodinâmica – IF/UERJ, Rio de Janeiro, RJ/Brasil

³Escola de Engenharia de São Carlos, USP, São Carlos, SP/Brasil

Recebido em 17 de junho de 2005; aceito em 14 de outubro de 2005.

Resumo. Este trabalho apresenta uma análise da estrutura interna de amostras ósseas através da técnica de microtomografia computadorizada 3D (3D- μ TC). A compreensão da estrutura óssea é particularmente importante quando relacionada ao diagnóstico de osteoporose, pois a mesma implica em uma deterioração da arquitetura do tecido ósseo com conseqüente aumento da fragilidade e susceptibilidade à fratura. Os ensaios foram realizados utilizando amostras ósseas de calcâneo humano e fêmur de rato Wistar, sendo que as microtomografias foram obtidas por meio de um sistema radiográfico, em tempo real, com um tubo de raios X microfoco. Com base nos princípios da estereologia, foram avaliados cinco parâmetros: a razão entre o volume de tecido ósseo e o volume total da amostra, o número de trabéculas existente na amostra, a razão entre a superfície óssea e o volume do osso, a espessura das trabéculas e a separação trabecular. As quantificações foram realizadas com o auxílio de um programa especialmente desenvolvido para este propósito no Laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN) da COPPE - UFRJ. Este programa utiliza as reconstruções 3D como entrada e gera uma tabela de dados contendo as quantificações desejadas. Os resultados das quantificações dos parâmetros avaliados para a amostra de calcâneo humano são apresentados nas tabelas 1 e 2 e a sua visualização tridimensional está ilustrada na Figura 5. Para a amostra de fêmur de rato Wistar são apresentadas a reconstrução 2D e a visualização 3D nas Figuras 6 e 7, respectivamente. Os resultados obtidos mostram que a microtomografia 3D por raios X é uma técnica que pode ser potencialmente utilizada para análise de microestruturas ósseas.

Palavras-chaves: osteoporose, 3D- μ TC, osso trabecular, quantificação óssea, visualização 3D.

Abstract. This work shows the analysis of the internal structure of the bones samples through 3D micro tomography technique (3D- μ TC). The comprehension of the bone structure is particularly important when related to osteoporosis diagnosis because this implies in a deterioration of the trabecular bone architecture, which increases the fragility and the possibility to have bone fractures. Two bone samples (human calcaneous and Wistar rat femur) were used, and the method was a radiographic system in real time with an X Ray microfoco tube. The quantifications parameters are based on stereological principles and they are five: a bone volume fraction, trabecular number, the ratio between surface and bone volume, the trabecular thickness and the trabecular separation. The quantifications were done with a program developed especially for this purpose in Nuclear Instrumentation Laboratory - COPPE/UFRJ. This program uses as input the 3D reconstructions images and generates a table with the quantifications. The results of the human calcaneous quantifications are presented in tables 1 and 2, and the 3D reconstructions are illustrated in Figure 5. The Figure 6 illustrate the 2D reconstructed image and the Figure 7 the 3D visualization respectively of the Wistar femur sample. The obtained results show that the 3D- μ TC is a powerful technique that can be used to analyze bone microstructures.

Keywords: osteoporosis, 3D- μ TC, trabecular bone, bone quantification, 3D visualization.

1. Introdução

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 (Alves et al., 2000). A arquitetura trabecular é composta de placas ou bastões interconectados (microestrutura ou forma de distribuição do tecido no espaço), sendo um importante fator na ocorrência das fraturas devido

à osteoporose (Kanis, 1994). Em idosos, observa-se uma maior fragmentação óssea, fazendo com que sua resistência mecânica também diminua. Esse decréscimo na resistência mecânica do osso é maior do que aquela esperada pela simples perda da densidade óssea, uma vez que a mesma é acompanhada por mudanças estruturais que também contribuem para a diminuição da resistência óssea. Em muitos países, observa-se que a incidência de fraturas nas mulheres é o dobro que em relação aos homens.

Os equipamentos de raios X podem ser classificados de acordo com o diâmetro do foco do tubo de raios X. Em um sistema hospitalar convencional a largura é da ordem de décimos de milímetro, enquanto que em um sistema microfoco é da ordem de poucas dezenas de milímetro. O principal efeito causado pela extensão do foco é o surgimento de penumbra, responsável pela perda de resolução na imagem final. Logo, para examinar objetos com estruturas muito pequenas, como o osso trabecular, é necessário que o foco do tubo de raios X seja o menor possível, como no sistema microfoco (Rodrigues *et al.*, 1995). Este sistema vem sendo utilizado em ensaios não evasivos, principalmente para avaliação de microestruturas (Lima, 2002). Uma outra vantagem do sistema microfoco é a possibilidade de obter magnificações maiores que as dos raios X convencionais, com um ganho efetivo de resolução espacial.

Através da técnica de microtomografia computadorizada por raios X em tempo real e de conceitos de estereologia (Feldkamp *et al.*, 1989), realizou-se uma investigação da estrutura óssea em amostra de calcâneo humano e de fêmur de rato Wistar.

2. Material e métodos

O sistema tomográfico utilizado nesse estudo (Figura 1) é composto por três partes. A primeira parte consiste de um tubo de raios X microfoco de tamanho focal é de 60 μm ($\pm 5\%$) cujas especificações são: janela de berílio com 0,5 mm de espessura, alvo cilíndrico de tungstênio, tensão de operação variando de 40 a 160kV, corrente elétrica com valores de 0,03 a 1,10 mA. A segunda é um sistema de manipulação com um centralizador acoplado a um servo motor (braço mecânico), que além de indicar a posição correta do corpo de prova, ainda o movimentava vertical, horizontal e longitudinalmente. A terceira é um sistema de detecção que possui um tubo intensificador de imagem (Thomson) com tela fluoroscópica, acoplado a uma câmara de vídeo tipo CCD.

Após a captura das imagens radiográficas, ocorrem três processos: reconstrução, quantificação dos parâmetros requeridos e visualização tridimensional.

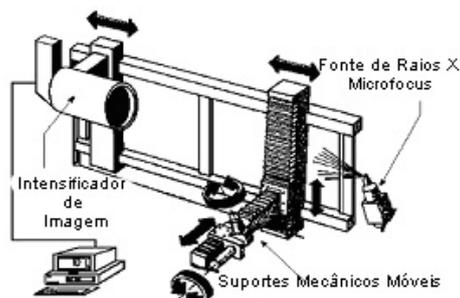


Figura 1. Sistema tomográfico.

A quantificação dos parâmetros da arquitetura do osso trabecular pode ser realizada por técnicas destrutivas, como a histomorfometria convencional, ou não-destrutivas, como a ressonância magnética e a microtomografia por raios X (Oliveira *et al.*, 2001).

Na quantificação histomorfométrica são utilizados cinco parâmetros para a caracterização das estruturas ósseas: a razão entre o volume do tecido ósseo e o volume total da amostra (BV/TV - %), o número de trabéculas ósseas por milímetro de tecido, sendo também um índice que expressa a densidade trabecular (TbN - 1/mm), a razão entre a medida da área superficial do osso e o seu volume (BS/BV - %), a espessura trabecular (TbTh - mm) e a separação trabecular (TbSp - mm).

A microtomografia pode ser considerada um método alternativo capaz de fornecer as informações volumétricas necessárias para a execução dessa quantificação, através de um processo não destrutivo da amostra óssea. Depois do processo de reconstrução, é possível realizar a quantificação em todos os tomogramas com o auxílio de um programa desenvolvido no LIN especialmente para essa finalidade. A Figura 2 mostra os passos utilizados pelo programa de quantificação e a Figura 3 a interface do mesmo.

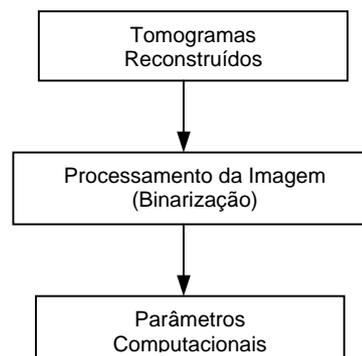


Figura 2. Esquema representativo do processo de quantificação.



Figura 3. Interface do programa de quantificação juntamente com um exemplo de reconstrução de uma amostra de fêmur de rato Wistar.

Para diferenciar o osso do restante do tecido, deve-se binarizar a imagem. Esse processo, mencionado na Figura 2, consiste na escolha de um valor limiar para os pixels ("threshold"), que será aplicado à imagem. Todos os pixels cujos valores forem maiores ou iguais aos do limiar serão convertidos em um valor denominado saturado. Em uma imagem digital com resolução de 8 bits, este valor saturado vale 255. De forma análoga, todos os pixels com valores inferiores aos do limiar serão convertidos em 0. O resultado é uma imagem em preto e branco, onde a fase branca corresponde ao tecido ósseo e a fase preta ao restante do tecido (não quantificado). Os parâmetros obtidos dependem muito dos valores de "threshold" utilizados nas imagens binarizadas (Figura 4).

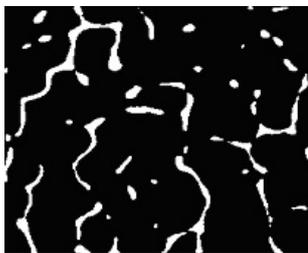


Figura 4. Exemplo de uma imagem binarizada.

2.1. Quantificação 2D

É possível realizar quantificações 2D e/ou 3D. A bidimensional realiza as quantificações tomograma a tomograma, formando um conjunto de planos paralelos entre si através da tomografia 3D, com a utilização de feixe cônico.

Com os tomogramas binarizados faz-se uma relação com os parâmetros histomorfométricos, onde são utilizadas informações sobre pontos brancos e pretos da imagem, tal como está apresentado nas equações (1) e (2):

$$BV/TV=Pp \quad (1)$$

$$TbN=PI \quad (2)$$

Onde:

Pp é a fração de pontos que se encontram dentro do osso;

PI é o número de interseções de linhas de teste com a interface entre tecido "mole" e osso, dividido pelo comprimento total de linhas de teste.

Nesse tipo de quantificação, a partir dos parâmetros primários Pp e PI, os demais parâmetros podem ser obtidos seguindo-se as equações (1), (2), (3), (4) e (5) (Parfit et al., 1987). Portanto, não há informação individual de BV, BS e TV.

$$TbTh = 2 / (BS/BV) \quad (3)$$

$$TbN = (BV/TV) / TbTh \quad (4)$$

$$TbSp = (1/TbN) - TbTh \quad (5)$$

2.2. Quantificação 3D

A segunda forma de cálculo (3D) é realizada através da representação do volume da microestrutura por voxels (ou pixels tridimensionais). O uso de modelos pré-configurados de voxels facilita o cálculo das áreas e dos volumes (Oliveira et al., 2003). Os parâmetros primários na quantificação 3D são BS, BV e TV. A superfície e o volume totais são contabilizados diretamente da microestrutura, somando-se as áreas e os volumes de cada modelo encontrado no volume de dados. A partir do valor da superfície total (BS), do volume total da fase de interesse (BV), e do volume total da amostra (TV - total de voxels do volume de dados) podem-se calcular os demais parâmetros seguindo as relações apresentadas nas equações anteriores.

Para a análise das estruturas ósseas foram feitas tomografias nas seguintes condições: a distância utilizada entre a fonte de raios X e a amostra foi de 147mm e de 978mm entre a amostra e o intensificador de imagem, o que corresponde a um fator de magnificação de 7,7. O valor de "threshold" utilizado foi de 92 (toda a escala é 255). Foram adquiridas 360 projeções obtidas a cada 2° de rotação da amostra. A reconstrução digital bidimensional das seções transversais do corpo de prova baseado no algoritmo criado por (Feldkamp et al., 1997). A primeira amostra foi retirada de calcâneo humano limpo e desidratado proveniente de um cadáver com idade desconhecida. A empresa OrthoLogic Corporation, após o uso em outros estudos (Alves, 1996), doou e aprovou a sua utilização em ensaios posteriores. A segunda foi doada pelo Instituto de Nutrição da UFRJ, e a utilização do fêmur de animal foi aprovada pela comissão de ética da referida Universidade.

3. Resultados e discussão

Para a amostra de calcâneo humano, os resultados das quantificações são os apresentados nas Tabelas 1 e 2 e a visualização tridimensional na Figura 5.

Os resultados das quantificações através das técnicas 2D e 3D não apresentaram uma diferença estatisticamente significativa, quando aplicado o teste t com $\alpha=0,05$, e possuem uma alta correlação $r=0,9885$. O método de quantificação 2D é baseado na contagem dos pixels brancos contidos na microestrutura e nas suas bordas, sendo aplicado a todas as seções. A segunda forma de cálculo, o método 3D, é realizada através da representação do volume da microestrutura por voxels. As análises baseadas na técnica 2D dependem muito das imagens escolhidas para a extração dos parâmetros, tornando o método problemático. Se a amostra possui uma

microestrutura que não seja homogênea ao longo das seções, os resultados podem conduzir a uma falsa conclusão. 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. Basear-se numa média dos valores pode não ser a melhor solução. A tomografia tridimensional fornece toda a informação espacial necessária para que os parâmetros espaciais BV/TV e BS/BV sejam calculados diretamente do volume de dados, fazendo com que seus valores se ajustem melhor à morfologia da amostra. Este método difere do primeiro ao se ajustar melhor a morfologia da fase de interesse, representando melhor os contornos da superfície e, por conseguinte, do volume.

A qualidade da visualização está diretamente ligada ao processo de aquisição, pois a separação dos diversos objetos dentro da reconstrução depende da qualidade da radiação e da resolução do sistema.

Tabela 1: Resultados das quantificações 2D obtidos para a amostra de calcâneo humano.

Parâmetros	Unidades	2D
BV/TV	(%)	9,0
BS/BV	(mm ² mm ⁻³)	41,7
Tb.Th	(mm)	0,048
Tb.N	(mm ⁻¹)	1,9
Tb.Sp	(mm)	0,5

Tabela 2: Resultados das quantificações 3D obtidos para a amostra de calcâneo humano.

Parâmetros	Unidades	3D
TV	(mm ³)	2,26
BV	(mm ³)	16,5
BS	(mm ²)	335,1
BV/TV	(%)	7,3
BS/BV	(mm ² mm ⁻³)	20,3
Tb.Th	(mm)	0,098
Tb.N	(mm ⁻¹)	0,7
Tb.Sp	(mm)	1,3

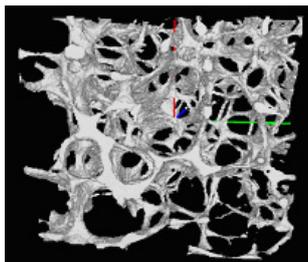


Figura 5. Visualização tridimensional da amostra de calcâneo humano.

Como pode ser visualizada nas Figuras 6 e 7, a estrutura óssea da cabeça do fêmur de rato Wistar é extremamente complexa e irregular em seu formato, sendo necessário um estudo cuidadoso da região a ser quantificada. Com isso, não houve uma quantificação eficaz. A escolha da região a ser quantificada se torna difícil, uma vez que há uma grande área com pontos pretos (não pertencentes à imagem), fornecendo uma falsa quantificação. Esse problema está sendo estudado e o programa de quantificação implementado para que seja possível a solução dessa questão. A reconstrução 2D e a visualização tridimensional dessa amostra mostram o poder de resolução da microtomografia computadorizada 3D para tal estrutura.

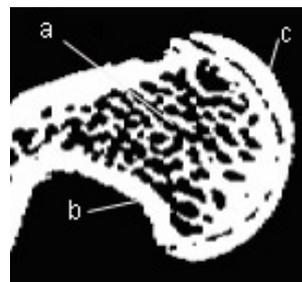


Figura 6. Visualização bidimensional da amostra de fêmur (cabeça) de rato Wistar, (a) região trabecular, (b) região da cortical, (c) cartilagem.

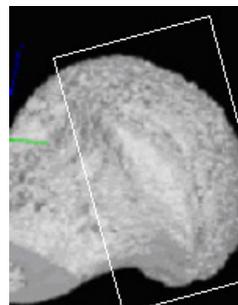


Figura 7. Visualização tridimensional da amostra de fêmur de rato Wistar. Região em destaque representa a cabeça femoral.

4. Conclusão

A histomorfometria digital apresentada é capaz de produzir os resultados desejados assim que a imagem tomográfica é introduzida no programa de quantificação. Esse último processo depende do nível de "threshold" utilizado pelo operador, o que sugere um estudo para verificar seu valor ótimo.

A 3D- μ CT mostrou ser uma técnica muito eficaz para o estudo de estruturas complexas, como a avaliação dos ossos porosos (calcâneo humano e fêmur de rato Wistar). Isso é particularmente importante, pois esse tipo de análise é muito complicado uma vez que o diâmetro trabecular em ratos ($\leq 100\mu\text{m}$) é menor do que em humanos ($\geq 120\mu\text{m}$). As visualizações 3D auxiliam no entendimento da morfologia das amostras analisadas, ajudando a obter

informações sobre as conexões internas e a forma de ligação das trabéculas. Com isso é possível fazer o levantamento de toda a estrutura inspecionada e verificar características básicas, tais como espessura e volume trabecular ósseos, o que é especialmente relevante quando o interesse está voltado para o estudo de doenças que envolvem arquitetura óssea, tal como a osteoporose.

Agradecimentos

Este trabalho foi parcialmente financiado pelo CNPq. Os autores gostariam de agradecer especialmente à professora Dra. Maria das Graças, do Instituto de Nutrição – CCS/UFRJ, pela doação da amostra de fêmur de rato Wistar.

Referências

- Alves et al. (2000), Microtomografia 3D por Raios X para a Caracterização de Osso Trabecular, *Anais do CBEB*, 2, p 1141-1145.
- Alves JM.(1996), Caracterização de Tecido Ósseo por Ultra-Som para o Diagnóstico de Osteoporose. *Tese de Doutorado*, IFSC-USP, SP, Brasil, 250p.
- Feldkamp LA et al. (1989), The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *Journal of Bone and Mineral Research*. 4(1), p.3-11.
- Feldkamp LA et al. (1987), Practical cone beam reconstruction. *J Optical Soc Am*. 1A,p.612-619.
- Kanis J.A. and World Health Organization. (1994). Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report. *Osteoporosis International*. 4(1), p.368-381.
- Lima, I. (2002), Quantificação Histomorfométrica 2D a partir de Tomografia Computadorizada 3D, *Tese de Mestrado*, UFRJ, COPPE, RJ, Brasil, 103p.
- Oliveira L F et al. (2001), Analysis of complex structures using a 3D X-ray tomography system with microfocus tube, *Proceedings of Spike: Development in X-ray Tomography III*. 4503(1), p. 231-221.
- Oliveira L F et al. (2003), 3D X-ray tomography to evaluate volumetric objects. *Nuclear Instruments And Methods In Physics Research A - Accelerators, Spectrometers, Detectors And Associated Equipment*. 505(1-2), p. 573-576.
- Parfit et al. (1987), Bone Histomorphometry: Standardization of Nomenclature, Symbols, and Units. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2(6), p.595-610.
- Rodrigues J. L. e Lopes R. T. (1995), Tomografia Computadorizada em END: Avaliação de Parâmetro de Qualidade. *Anais do III ENAN*. I (1) p. 586-591.