

---

## QUALIDADE ÓSSEA TRABECULAR: CARACTERIZAÇÃO POR MICROTOMOGRÁFIA 3D POR RAIOS-X

J.M. Alves<sup>(1)</sup>, R.H. Johnson<sup>(2,5)</sup>, J.J. Kaufman<sup>(3)</sup>, K. Powell<sup>(4)</sup>, R.C. Molthen<sup>(2,5)</sup>, S.T. Haworth<sup>(5)</sup>,  
G. Hernandez<sup>(5)</sup>, C.A. Dawson<sup>(5)</sup>, C.R. Wilson<sup>(6)</sup>, R.S. Siffert<sup>(7)</sup>

<sup>(1)</sup>Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos,  
Departamento de Engenharia Elétrica, São Carlos, SP, Brasil

<sup>(2)</sup>Marquette University, Department of Biomedical Engineering,

Zablocki Veterans Affairs Medical Center, Pulmonary Physiology Group, Milwaukee, WI, EUA

<sup>(3)</sup>Mount Sinai School of Medicine & CyberLogic Inc., New York, NY, EUA

<sup>(4)</sup>The Cleveland Clinic Foundation, Lerner Research Institute,

Department of Biomedical Engineering, Cleveland, OH, EUA

<sup>(5)</sup>Zablocki Veterans Affairs Medical Center, Pulmonary Physiology Group, Milwaukee, WI, EUA

<sup>(6)</sup>Medical College of Wisconsin, Department of Radiology, Milwaukee, WI, EUA

<sup>(7)</sup>Department of Orthopedics, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY, EUA

e-mail: jomalves@sc.usp.br

**Abstract:** A new technique based on three-dimensional x-ray microtomography has been investigated in some laboratories in the USA and Europe for the assessment of trabecular bone quality and it was used in this study. A scientific exchange between research institutions from the USA and Brazil is on going with the aim of sharing knowledge in this scientific field. As part of the results from this exchange, this study describes a technique based on the direct 3D analysis of human calcaneus samples to measure morphologic indexes. The indexes values from this study are close to the ones measured by other investigators.

**Key Words:** bone quality, 3D x-ray microtomography, osteoporosis

### Introdução

Um intercâmbio científico<sup>[1,2]</sup> iniciado em 1996 entre laboratórios do Brasil (USP-São Carlos/EESC; USP-São Paulo/FM; UFRJ-COPPE/LIN) e dos EUA (Marquette University / Biomedical Engineering Department; Zablocki Veterans Affairs Medical Center, Milwaukee, WI) tem como objetivo criar no Brasil uma infraestrutura para caracterização da qualidade óssea visando o aprimoramento do diagnóstico de osteoporose, utilizando microtomografia 3D por raios-x. A infraestrutura para gerar microtomografia 3D por raios-x é disponível no Brasil através do uso de fontes de raios-X policromáticas (UFRJ/LIN, Laboratório de Instrumentação Nuclear, Rio de Janeiro, RJ) ou monocromáticas (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron-CNPq, Campinas, SP). No Brasil, no entanto, há uma carência de pesquisadores dedicados ao desenvolvimento de programas para a quantificação da

qualidade óssea através de parâmetros morfológicos (histomorfometria), topológicos (conectividade) e de anisotropia (direcionalidade) da arquitetura do osso trabecular<sup>[3,4]</sup>. Uma das conseqüências do intercâmbio mencionado será a utilização de engenharia reversa de programas<sup>[5]</sup> em códigos de linguagem C para a quantificação da qualidade óssea desenvolvidos nos EUA (The Cleveland Clinic Foundation, Biomedical Engineering Department, Cleveland, OH).

O procedimento padrão para se investigar a estrutura trabecular é baseado no uso de seções 2D extraídas de biópsias ósseas. Índices histomorfométricos 3D são obtidos de imagens 2D (histomorfometria convencional ou reconstruções microtomográficas) através da medida de índices morfológicos primários (BS – superfície óssea trabecular; BV – fração de volume ósseo trabecular; TV – volume da amostra óssea). Esses índices são utilizados para o cálculo de índices histomorfométricos derivados utilizando-se conceitos de estereologia<sup>[6,7,8]</sup> e assumindo-se um modelo estrutural trabecular constante e composto apenas de placas ósseas. A estrutura trabecular, no entanto, se altera devido ao envelhecimento e doenças metabólicas. Os índices derivados calculados são: Tb.Th – espessura trabecular; Tb.Sp – espessura das cavidades contendo medula óssea; Tb.N – número de trabéculas por unidade de comprimento.

Reconstruções tridimensionais permitem a medida direta dos mesmos índices primários e histomorfométricos. Estas medidas não são baseadas em um modelo estrutural trabecular constante<sup>[9,10]</sup> e incluem a conectividade, o grau de anisotropia e o índice de modelo estrutural (SMI), que é uma estimativa da quantidade de placas e bastonetes presentes na estrutura trabecular.

A 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. A incidência de fraturas causada pela osteoporose é maior nas vértebras lombares, na extremidade distal do rádio/ulna e na cabeça femural. A casuística de fraturas nas mulheres é o dobro da dos homens em muitos países. A Organização Mundial de Saúde define osteoporose a partir da medida da densidade mineral óssea (DMO), denominada de densitometria óssea.

A massa óssea explica no máximo 65% da variação na resistência óssea. A forma e distribuição do tecido trabecular no espaço 3D (arquitetura óssea) é responsável por cerca de 30 à 50% da resistência mecânica do osso. A arquitetura, quando quantificada através da anisotropia do tecido (fabric), e incorporada na análise da resistência óssea, eleva o entendimento daquela variação<sup>[11,12]</sup>.

O objetivo desse estudo foi o fortalecimento do intercâmbio científico mencionado e a determinação de índices morfológicos da estrutura trabecular de amostras ósseas extraídas de calcâneo humano, utilizando-se microtomografia 3D por raio-X e algoritmos para a medida direta desses índices no espaço 3D.

## Materiais e Métodos

Amostras de osso trabecular foram extraídas de calcâneo humano e mantidas em congelador até a realização de microtomografia por raio-X. Foram utilizadas 15 amostras de osso trabecular sem as corticais ósseas e 8 amostras com as corticais ósseas com comprimento entre 1.4 cm e 2.2cm e diâmetro de 1.5 cm.

As figuras 1a e 1b mostram as imagens de duas amostras extraídas do calcâneo, com e sem as corticais ósseas, respectivamente.

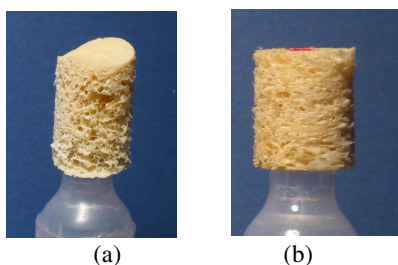


Fig. 1 – (a) amostra #109; (b) amostra #10

As etapas da caracterização das amostras ósseas por microtomografia 3D por raio-X compreenderam: (a) obtenção das projeções em microtomógrafo com fonte microfoco de raio-x no “Zablocki Veterans Affairs Medical Center, Pulmonary Physiology Group”, (Milwaukee, WI, EUA). As projeções da amostra óssea são obtidas girando-se a amostra com incrementos de 1° e com ângulos variando de 1° à 360°. A média de 30 projeções foi obtida a cada incremento angular; (b) pré-processamento das projeções e reconstrução 2D da

amostra em microcomputador com sistema operacional Linux na “Marquette University, Department of Biomedical Engineering” (Milwaukee, WI, EUA) utilizando-se o algoritmo de Feldkamp<sup>[13]</sup>; (c) segmentação e reconstrução 3D da amostra em microcomputador com sistema operacional Windows com o programa Analyze 5.0 (Mayo Clinic Foundation, Biomedical Imaging Resource, Rochester, MN, EUA)<sup>[14-16]</sup>; (e) quantificação da estrutura trabecular das amostras em microcomputador com sistema operacional Linux utilizando-se algoritmos em linguagem C para a medida direta dos índices morfológicos. Os algoritmos foram desenvolvidos na “The Cleveland Clinic Foundation, Lerner Research Institute, Department of Biomedical Engineering” (Cleveland, OH, EUA).

As figuras 2a e 2b mostram o microtomógrafo por raio-X. O microtomógrafo é constituído de tubo de raio-x com um foco de 3µm (Fein-Focus FXE 100.50), uma mesa com controles de precisão dos movimentos x,y,z e θ da amostra, um intensificador de imagem com uma abertura de 17.8 ou 23 cm (North American Imagin AI-5830-HP) e uma câmera CCD (Silicon Mountain Design 1M15). O campo emitido pela fonte de raio-x é cônico.

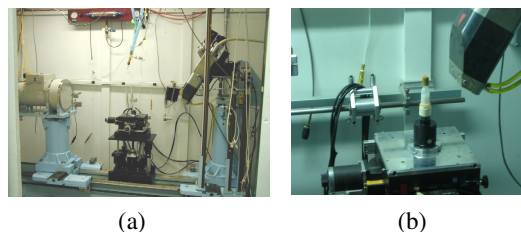


Fig. 2 – (a) Microtomógrafo (fonte de raio-X, mesa controladora e intensificador de imagem; (b) amostra óssea na mesa controladora e fonte de raio-X.

A região volumétrica de interesse (ROI) para a medida dos índices morfológicos foi inicialmente programada para incluir toda a amostra óssea. A região utilizada, no entanto, foi cúbica pois a medida de conectividade e superfície óssea são enormemente simplificados se um cubo é utilizado e, assim sendo, os demais parâmetros foram medidos utilizando-se a mesma ROI. Uma outra razão para o uso de uma região cúbica é que a amostra óssea é não uniforme nas suas extremidades, comumente apresentando fraturas ou amassamentos. Conseqüentemente, é mais aconselhável utilizar-se uma região menor e não todo o volume da amostra. O volume da ROI foi mantido constante (0.72 cm<sup>3</sup>) para permitir a comparação dos parâmetros morfológicos. A resolução utilizada variou entre 39,23 µm e 61,71 µm. Índices morfológicos medidos no espaço 3D são denotados por um asterisco. Os seguintes índices foram medidos: (a) BS\* (superfície óssea), foi calculada usando o método de “Marching Cubes” que triangulariza a superfície do tecido mineralizado<sup>[17,18]</sup>; (b) BV\* (fração de volume ósseo), foi calculado usando tetraedros correspondentes ao volume relativo a superfície triangularizada<sup>[19]</sup>; (c) TV\*

(volume total da amostra). Para comparar amostras com tamanhos diferentes os índices normalizados  $BV^*/TV^*$  e  $BS^*/TV^*$  são utilizados. A superfície óssea específica é  $BS^*/BV^*$ ; (c)  $Tb.Th^*$  - a espessura média das trabéculas foi determinada utilizando-se esferas cujo diâmetro deve preencher a estrutura trabecular, conforme esquematizado na figura 3. A espessura média de todos os voxels da amostra óssea é calculada para se obter  $Tb.Th$ ; (d)  $Tb.Sp^*$  - é a espessura média das cavidades que contem medula óssea. Utiliza-se o mesmo princípio da determinação de  $Tb.Th$ . nos voxels que contém a medula óssea; (e)  $Tb.N^*$  - é o inverso da distância média entre os eixos médios da estrutura óssea.

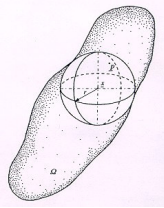


Fig. 3 - Desenho esquemático do princípio da determinação de  $Tb.Th$  em uma trabécula pelo método direto.

### Resultados

Na figura 3 são mostradas as reconstruções tridimensionais de amostras de calcâneo humano, com e sem cortical óssea, respectivamente.

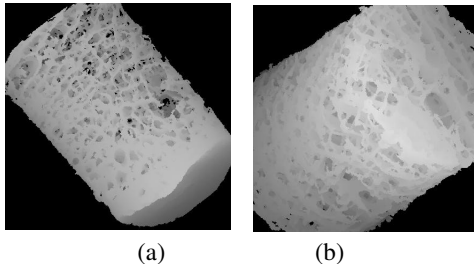


Fig. 3 - imagens 3D reconstruídas: (a) amostra #109; (b) amostra #10.

Os intervalos de valores dos índices morfológicos e os coeficientes de correlação entre os índices, medidos nas regiões volumétricas de interesse das amostras de calcâneo humano, estão descritos nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1 - Intervalo de Valores

Índice Morfológico	Neste estudo ROI cúbica (8,9 x 8,9 x 8,9 mm <sup>3</sup> )	Outro Estudo <sup>[9]</sup> ROI cúbica (4 x 4 x 4 mm <sup>3</sup> )
$Tb.Th^*(cm)$	0,0174 - 0,0333	0,0102 - 0,0169
$Tb.Sp^*(cm)$	0,0455 - 0,0968	0,0456 - 0,0982
$Tb.N^*(cm^{-1})$	7,7308 - 14,229	9,98 - 20,90

Tabela 2 - Coeficientes de Correlação ( $r^2$ )

Índices Morfológicos	Valores deste estudo	Valores de outro estudo <sup>[9]</sup>
$Tb.Th^* \times BV^*(\%)*$	0,594	0,359
$Tb.Sp^* \times BV^*(\%)*$	0,408	0,368
$Tb.N^* \times BV^*(\%)*$	0,113	0,353
$BS^* \times BV^*(\%)*$	0,353	-
$(BS^*/BV^*) \times BV^*(\%)*$	0,349	-

### Discussão

Os coeficientes de correlação ( $r^2$ ) entre os índices morfológicos e os valores obtidos dos índices  $Tb.Th^*$ ,  $Tb.Sp^*$  e  $Tb.N^*$  no estudo aqui descrito estão próximos dos relatados na literatura<sup>[9]</sup>. Essas medidas são afetadas por fatores como preparação e conservação das amostras e segmentação das reconstruções<sup>[20]</sup>. A reconstrução 3D das ROIs das amostras, e a eventual presença de vazios ósseos nessas regiões, contribuirá para um melhor entendimento dos valores obtidos. Medidas de conectividade e anisotropia nas mesmas ROIs estão sendo realizadas e permitirão uma caracterização mais ampla da qualidade óssea.

O uso de reconstruções 3D da microestrutura trabecular em estudos in-vitro<sup>[21]</sup> e clínicos<sup>[22]</sup> demonstraram o potencial do uso conjunto da microtomografia 3D e da modelagem por elementos finitos para a determinação da resistência mecânica e para a investigação de novos critérios para a determinação do risco de ocorrência de fraturas causadas pela osteoporose.

A simulação da propagação do ultra-som em ROIs de amostras ósseas com a utilização de programas comerciais<sup>[23-25]</sup> representa uma ferramenta poderosa para se investigar o potencial da técnica de ultrasonometria óssea em calcâneo para o diagnóstico de osteoporose.

O intercâmbio científico aqui descrito é essencial para que se crie no Brasil uma infraestrutura capaz de formar profissionais para o uso de novas técnicas de caracterização da qualidade óssea.

### Referências

- [1] Lima I.C.B., Oliveira L.F., Alves J.M., Jorgetti V., Lopes R.T.. Quantificação de Parâmetros Histomorfométricos e da Anisotropia de Osso Trabecular Através de Microtomografia 3D por Raio-X, XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, 9 - 12 Setembro, São José dos Campos, SP, 2002
- [2] Alves J.M., Oliveira L.F., Lopes R.T., Johnson R.H., Ryaby J.T., Kaufman J.J., Microtomografia Tridimensional por Raio-X para a Caracterização de Osso Trabecular. Anais do XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, Florianópolis, 11 à 13 de Setembro, de 2000, pg. 1141 - 1145, 2000.

- [3] Martin-Badosa E., Elmoutaouakkil<sup>a</sup>, Nuzzo S., Amblard D., Vico L., Peyrin F., A method for the automatic characterization of bone architecture in 3D mice microtomographic images, *Computerized Medical Imaging and Graphics*, 27:447-458, 2003.
- [4] Odgaard A., Three-Dimensional Methods for Quantification of Cancellous Bone Architecture, *Bone*, 20(4):315-328, 1997.
- [5] Magalhães RGC, Engenharia Reversa de Programas em Linguagem C para Quantificação da Qualidade Óssea, Mestrado em desenvolvimento, Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia – USP, 2004.
- [6] Weibel E.R., Stereological Methods, Vol. 2: Theoretical Foundations, Academic Press, London, 1980.
- [7] Parfitt A.M., Mathews C.H.E., Villanueva A.R., Kleerekoper M., Frame B., Rao D.S., Relationships between surface, volume, and thickness of iliac trabecular bone in aging and in osteoporosis, *Calcified Tissue International*, 72:1396-1409, 1983.
- [8] Parfitt A.M., Drezner M.K., Glorieux F.H., Kanis J.A., Malluche H., Meunier P.J., Ott S.M., Recker R.R., Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols and units, *Journal of Bone and Mineral Research*, 2 (6): 595 – 610, 1987.
- [9] Hildebrand T., Laib A., Muller R., Dequeker J., Ruegsegger P., Direct three-dimensional morphometric analysis of human cancellous bone: microstructural data from spine, femur, iliac crest, and calcaneus, *Journal of Bone and Mineral Research*, 14(7):1167-74, 1999.
- [10] Hildebrand T., Ruegsegger P., A new method for the model-independent assessment of thickness in three-dimensional images, *Journal of Microscopy* 185:67-75, 1997.
- [11] Turner C.H., Cowin S.C., Dependence of elastic constants of an anisotropic porous material upon porosity and fabric, *Journal of Materials Science*, 22:3178-3184, 1987.
- [12] Van Rietbergen B et al. Relationships between bone morphology and bone elastic properties can be accurately quantified using high resolution computer reconstructions, *Journal of Orthopaedic Research*, 16(1):23-28, 1998.
- [13] Feldkamp LA, Davis LC, Kress JW, Practical cone-beam algorithm, *Journal of Optical Society of America*, 1:612-619, 1984.
- [14] Robb, R.A., The Biomedical Imaging Resource at Mayo Clinic. Guest Editorial. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 20(9):854-867, 2001.
- [15] Robb, R.A. and Barillot, C., *Interactive display and analysis of 3-D medical Images*. IEEE Transactions on Medical Imaging 8(3):217-226, 1989.
- [16] Robb, R.A., Hanson, D.P., Karwowski, R.A., Larson, A.G., Workman, E.L., and Stacy, M.C., ANALYZE: a comprehensive, operator-interactive software package for multidimensional medical image display and analysis, *Computerized Medical Imaging and Graphics* 1989; 13:433-454.
- [17] Lorensen WE, Cline HE, Marching cubes: a high resolution 3D surface construction algorithm, *Computer Graphics*, 21:163-169, 1987.
- [18] Muller R, Hildebrand T, Ruegsegger P, Non-invasive bone biopsy: a new method to analyse and display the three-dimensional structure of trabecular bone, *Physics in Medicine and Biology*, 29:145-164, 1994.
- [19] Guilak F, Volume and surface area of viable chondrocytes in situ using geometric modeling of serial confocal sections, *Journal of Microscopy*, 173:245-256, 1994.
- [20] Hara T., Tanck E., Homminga J. Huiskes R., The influence of microcomputed Tomography Threshold Variations on the Assessment of Structural and Mechanical Trabecular Bone Properties, *Bone*, 31(1):107-109.
- [21] Pistoia W, Van Rietbergen B, Eckstein F, Lill C, Lockmiller EM, Ruegsegger P, Prediction of distal radius failure with  $\mu$ FE models based on 3D pQCT scans. In: Majumdar S, Bay BK (editors), *Noninvasive assessment of trabecular bone architecture and the competence of bone*, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, pg. 143-151, 2001.
- [22] Newitt D.C., Majumdar S., Van Rietbergen B., Von Ingersleben G., Harris S.T., Genant H.K., Chesnut C., Garnero P., MacDonald B, In vivo assessment of architecture and micro-finite element analysis derived indices of mechanical properties of trabecular bone in the radius, *Osteoporosis International*, 13:6-17, 2002.
- [23] Luo G, Kaufman JJ, Chiabrera A, Bianco B, Kinney JH, Haupt D, Ryaby JT, Siffert RS. Computational Methods for Ultrasonic Bone Assessment, *Ultrasound in Medicine and Biology*, 25 (5): 823 – 830, 1999.
- [24] Kaufman J.J., Luo G., Kinney J.H., Siffert R.S., Three-Dimensional Ultrasound Simulation in Human Calcaneal Trabecular Bone, *Meeting of the American Society of Bone and Mineral Research*, 2001.
- [25] Software Wave3000, CyberLogic Inc, New York, NY, EUA ([www.cyberlogic.org](http://www.cyberlogic.org)), 2004.

#### Agradecimentos

À CAPES, pelo financiamento de um estágio de pós-doutoramento (processo BEX0226/02-5), e por contribuir para o fortalecimento de um intercâmbio científico de interesse do Brasil.

#### Homenagem Póstuma

Ao Dr. Christopher A. Dawson, pesquisador emérito do Zablocki Veterans Affairs Medical Center, Pulmonary Physiology Group, Milwaukee, WI, EUA, pela sua capacitação científica, liderança, dedicação à ciência e humildade.