



AVALIAÇÃO DA MICROARQUITETURA ÓSSEA ATRAVÉS DE MICROCT CLÍNICA DE ALTA RESOLUÇÃO (HR-pQCT) EM PACIENTES HIV-POSITIVO

Luis Felipe Cardoso Lima

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Nuclear, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Nuclear.

Orientador: Inayá Corrêa Barbosa Lima

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2017

**AVALIAÇÃO DA MICROARQUITETURA ÓSSEA ATRAVÉS DE MICROCT
CLÍNICA DE ALTA RESOLUÇÃO (HR-pQCT) EM PACIENTES HIV-POSITIVO**

Luis Felipe Cardoso Lima

**DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO
LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE)
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA NUCLEAR.**

Examinada por:

Prof^a. Inayá Corrêa Barbosa Lima, D. Sc.

Prof. Ademir Xavier da Silva., D.Sc.

Dr. Miguel Madeira, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

FEVEREIRO DE 2017

Lima, Luis Felipe Cardoso

Avaliação Da Microarquitetura Óssea Através De MicroCT
Clínica De Alta Resolução (Hr-pQCT) Em Pacientes HIV-
Positivo/Luis Felipe Cardoso Lima. – Rio de Janeiro:
UFRJ/COPPE, 2017.

XV, 103p.: il.; 29,7 cm.

Orientador: Inayá Corrêa Barbosa Lima

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de
Engenharia Nuclear, 2017.

Referências Bibliográficas: p. 74-78.

1. Microtomografia. 2. Análise e Processamento de
Imagens. 3. HIV. I. Lima, Inayá Corrêa Barbosa. II.
Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa
de Engenharia Nuclear. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meu Senhor e Salvador Cristo Jesus, por me sustentar ao longo destes dois anos de mestrado. Não teria chegado tão longe se Ele não tivesse colocado as pessoas certas na minha vida e guiado cada situação conforme O vi fazer, apesar de minha incredulidade.

Agradeço a meus pais, Luis da Silva Lima e Cleoneide Cardoso Lima por serem meus apoiadores, me compreendendo e ajudando, ainda que distantes. E também por minha irmã, Suzane Cristine Cardoso Lima, que assim como meus pais, me ajudou muito, mas especialmente por ter alterado a data da minha passagem de volta para o Rio. Não teria conseguido a paz e descanso para terminar minha dissertação se tivesse voltado mais cedo de Maceió para o Rio de Janeiro.

Agradeço a meus amigos, pois cada um deles, tanto no Rio quanto em Maceió, me ajudaram, com palavras de incentivo, força, compreensão. Mas especialmente, queria agradecer a Renata Martins de Resende dos Santos e Tatiana dos Anjos Oliveira. Elas sabem o quanto me ajudaram e como, e isso basta. Não teria chegado aqui sem a ajuda de ambas. Que a mão do Senhor esteja sobre elas e suas respectivas famílias.

Agradeço as minhas tias, tios e primos no Rio de Janeiro que me acolheram tão bem e foram um apoio fundamental para terminar este mestrado. Agradeço também a meus avós, pois estive na casa deles durante este tempo de mestrado e pelo igual apoio e ajuda ao longo destes dois anos.

Agradeço a minha orientadora, prof.^a Inayá Corrêa Barbosa Lima pelos ensinamentos a mim transmitidos e ser compreensiva com meus atrasos.

Agradeço a toda a equipe de pesquisa da sala de Densitometria Óssea e Microtomografia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho. Foi muito bom participar deste grupo de pesquisa em um ambiente extremamente harmônico. Todos eles sempre me apoiaram bastante. Especificamente, gostaria de citar a Dra. Maria Lúcia Fleiuss de Farias pela preocupação e apoio, além de ter corrigido a parte sobre a Estrutura do Osso. E também por Elizabeth Machado e Felipe Oliveira. Ambos, independentemente, corrigiram

a parte sobre HIV e também fazem parte deste trabalho. E claro, a Francisco Paranhos pelo apoio, amizade e incentivo de sempre. A Ednaura C. S. Batista de Souza, secretária e amiga. Ao Miguel Madeira, chefe do setor, por igualmente me apoiar e me incentivar sempre. A Aline Moraes e demais que lá trabalham, meu muito obrigado.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

**AVALIAÇÃO DA MICROARQUITETURA ÓSSEA ATRAVÉS DE MICROCT
CLÍNICA DE ALTA RESOLUÇÃO (HR-pQCT) EM PACIENTES HIV-POSITIVO**

Luis Felipe Cardoso Lima

Fevereiro/2017

Orientador: Inayá Corrêa Barbosa Lima

Programa: Engenharia Nuclear

Este trabalho investigou a microestrutura óssea de pacientes HIV-positivo através da microtomografia clínica de alta resolução (HR-pQCT). As imagens de microtomografia reconstruídas foram processadas e analisadas a fim de verificar se os grupos paciente e controle possuíam uma diferença significativa para cada parâmetro investigado, tanto para o rádio quanto para a tibia. Os resultados obtidos foram uma diminuição na área de osso da seção transversal do rádio e na área de tecido da seção transversal da tibia na região cortical. Além disso, a Fração de Ganho de Tecido Ósseo (FGTO) se mostrou alterada para a região cortical da tibia.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

BONE MICROARQUITECTURAL EVALUATION THROUGH HIGH-RESOLUTION
CLINICAL MICROCT
(HR-pQCT) IN POSITIVE HIV PATIENTS

Luis Felipe Cardoso Lima

February/2017

Advisor: Inayá Corrêa Barbosa Lima

Department: Nuclear Engineering

The present work investigates the bone microarchitectural of positive HIV patients through the high-resolution clinical microCT (HR-pQCT). The reconstructed images from microtomography were processed and analysed to verify a possible significant difference between control and patient groups for each investigated parameter, both in radius and tibia. The results obtained were a decreasing in bone cross section area for the radius and in tissue cross section area for tibia (cortical region). Besides this, Fraction of Gain in Bone Tissue also had significant alteration for tibia cortical region.

ÍNDICE

1 Introdução	1
2 Revisão Bibliográfica	4
3 Fundamentos Teóricos.....	9
3.1 Tomografia Computadorizada.....	9
3.1.1 Introdução Histórica.....	9
3.1.2 Reconstrução de Imagens.....	15
3.1.3 Artefatos de Reconstrução	16
3.1.4 Interação da Radiação com a Matéria	17
3.1.5 Esquema Geral de um Tomógrafo.....	19
3.1.6 HR-pQCT	20
3.2 Processamento de Imagens.....	28
3.2.1 Imagem Digital.....	29
3.2.2 Histograma	30
3.2.3 Binarização.....	32
3.2.4 Filtragem	34
3.2.4.1 Filtros para Remoção de Ruídos	34
3.2.4.2 Filtros para Realce de Bordas.....	35
3.3 O HIV	36
3.4 Microarquitetura Óssea	39
3.4.1 Estrutura do Osso	39
3.4.2 Parâmetros Ósseos.....	43
3.4.2.1 Fração de Ganho de Tecido Ósseo	43
3.4.2.2 Grau de Anisotropia	45
3.4.2.3 Densidade de Conectividade	46
3.4.2.4 Área da Seção Transversal do Osso	47
3.4.2.5 Área de Tecido da Seção Transversal	48
4 Metodologia	49
4.1 Critérios de Seleção dos Indivíduos	49
4.2 Aquisição dos Exames	50

4.3 Segmentação, Processamento e Análise de Imagens	51
5 Resultados	61
5.1 FGTO da Tíbia	64
5.2 FGTO do Rádio.....	65
5.3 Grau de Anisotropia da Tíbia	66
5.4 Grau de Anisotropia do Rádio.....	67
5.5 Densidade de Conectividade da Tíbia e do Rádio.....	68
5.6 Área da Seção Transversal do Osso para a Tíbia e Rádio	69
5.7 Área de Tecido da Seção Transversal da Tíbia e do Rádio.....	70
6 Conclusão	73
Referências.....	74
ANEXO 1	79
ANEXO 2.....	93
ANEXO 3.....	98
ANEXO 4.....	103

Lista de Figuras

Figura 1. Primeira geração de tomografia computadorizada - para cada rotação do Tubo de raios X e Detector, uma translação é realizada.....	10
Figura 2. Segunda geração de tomografia computadorizada - para cada rotação em um ângulo de 6° do Tubo de raios X e Detector, uma translação é realizada.....	11
Figura 3. Terceira geração de tomografia computadorizada.....	12
Figura 4. Quarta geração de tomografia computadorizada.....	13
Figura 5. Ilustração do caminho oscilatório de um elétron em um sincrotron. À medida que o elétron vai oscilando (caminho laranja) ele vai emitindo radiação (região verde), a qual é utilizada para realizar uma microtomografia da amostra.....	15
Figura 6. Imagem do HR-pQCT (1 ^a geração) em uso na microtomografia da tíbia.....	21
Figura 7. Imagem de uma das 110 fatias obtidas na microtomografia do antebraço na porção imediatamente acima do punho.....	22
Figura 8. Imagem de uma das 110 fatias obtidas na microtomografia da perna na região imediatamente acima do tornozelo.....	23
Figura 9. Exemplos de exames conforme a classificação acima.....	27
Figura 10. À direita, uma tábua de inscrição cuneiforme do antigo Egito pertencente ao acervo do Museu Nacional da UFRJ. Na região dentro do retângulo verde aumentada 800% (esq.) é possível perceber os pixels da imagem.....	29

Figura 11. Ilustração de um histograma com 256 tons de cinza (eixo horizontal). No eixo vertical é a frequência com que esses tons aparecem na imagem.....	31
Figura 12. Osso trabecular (esponjoso) sendo envolvido pelo cortical (mais denso).....	40
Figura 13. No centro está o canal Harvesiano circundado pelo ósteon; este é formado por vários anéis concêntricos de osteócitos (pontos pretos).....	42
Figura 14. Ilustração do conceito de FGTO em um fêmur.....	44
Figura 15. À esquerda é a Área da Seção Transversal da fatia de microtomografia do respectivo osso à direita.....	48
Figura 16. Imagens do “Scout-View”, onde é selecionada a linha que referencia (linha contínua e mais espessa) que determinará a região analisada entre as linhas pontilhadas.....	51
Figura 17. Seleção da região do histograma da imagem original que será convertida para 8 bits com 256 tons de cinza.....	52
Figura 18. Primeira aba para a visualização da sequência de fatias do osso.....	53
Figura 19. Segunda aba com a região de interesse em vermelho circundando o osso.....	54
Figura 20. Aba onde serão realizados o processamento e a análise.....	55
Figura 21. Contorno desenhado com mouse selecionando a região trabecular. A correção do contorno para um melhor ajuste à cortical é possível selecionando o botão destacado em amarelo na figura.....	57
Figura 22. Contorno único desenhado para incluir todas as fatias da cortical.....	60

Figura 23. Região do rádio de um indivíduo do grupo controle.....62

Figura 24. Região da tíbia de um indivíduo do grupo controle.....62

Figura 25. Região da tíbia de um indivíduo do grupo controle.....63

Figura 26. Região da tíbia de um indivíduo do grupo paciente.....63

Lista de Tabelas

Tabela 1. Principais parâmetros ósseos retornados ao usuário do software da Scanco de microtomografia clínica.....	28
Tabela 2. Resumos das médias e desvios de Fração de Ganho de Tecido Ósseo em porcentagem dos grupos Controle e Paciente da Tíbia.....	64
Tabela 3. Resumos das médias de Fração de Ganho de Tecido Ósseo em porcentagem dos grupos Controle e Paciente do Rádio.....	65
Tabela 4. Resumo do Grau de Anisotropia dos grupos Controle e Paciente para a Tíbia.....	66
Tabela 5. Resumo do Grau de Anisotropia dos grupos Controle e Paciente para o Rádio.....	67
Tabela 6. Resumo da Densidade de Conectividade dos grupos Controle e Paciente para Rádio e Tíbia.....	68
Tabela 7. Resumo da Área da Seção Transversal dos grupos Controle e Paciente para a Tíbia.....	69
Tabela 8. Resumo da Área da Seção Transversal dos grupos Controle e Paciente para o Rádio.....	69
Tabela 9. Resumo da Área de Tecido da Seção Transversal dos grupos Controle e Paciente para a Tíbia, nas posições distal e proximal das regiões trabecular e cortical.....	70
Tabela 10. Resumo da Área de Tecido da Seção Transversal dos grupos Controle e Paciente para o Rádio, nas posições distal e proximal das regiões trabecular e cortical.....	71

Lista de Símbolos

aBMD. Do inglês, Bone Mineral Density (BMD) – densidade mineral óssea areal. Parâmetro importante visto que todo osso tem uma porcentagem de massa mineralizada, cuja diminuição representa uma fragilidade óssea maior. Assim, aBMD é a densidade mineral que o osso tem de toda a área que o feixe de raios X atravessa. Sendo assim, ocorre uma superposição de BMD de várias estruturas.

ART. Do inglês, Antiretroviral Therapy, isto é, Terapia de Antirretroviral.

DXL. É a sigla do inglês que representa a densitometria óssea.

FE. Do inglês, Finite Element – Elemento Finito. Técnica que se utiliza de uma pequena amostra de material (reconstruído computacionalmente através de aquisições do objeto real) a fim de estimar o comportamento de todo o material quando submetido a pressões e tensões reais.

HR-pQCT. Do inglês, High Resolution Peripheral Quantitative Computed Tomography – Tomografia Computadorizada Quantitativa Periférica de Alta Resolução.

Baixa Massa Óssea/Osteopenia. Diminuição da BMD, mas não o suficiente para ser considerada osteoporose.

Parâmetros ósseos. Características ósseas que são interessantes para avaliar a saúde de um osso, a saber, porosidade cortical, porosidade trabecular, número de trabéculas, espessura de trabéculas, espessura do osso cortical, dentre outros.

Pixel. Menor unidade que compõe a imagem em 2D.

Rádio. Um dos dois ossos longos no antebraço.

TBS. Do inglês, Trabecular Bone Score. Avaliação trabecular da coluna do indivíduo, sendo um marcador importante para diagnosticar osteoporose.

Tíbia. Um dos dois ossos longos localizado abaixo do joelho e acima do pé (conhecido popularmente por “canela”).

vBMD. É análoga a aBMD, mas aqui é da porção de volume ao invés de ser da área, não ocorrendo a superposição que ocorre na aBMD.

Voxel. Menor unidade que compõe a estrutura de um objeto em 3D.

1 Introdução

A microtomografia (microCT) é uma técnica não-destrutiva para visualizar o interior de estruturas e, por meio dessa imagem do interior do objeto, quantificar parâmetros e variáveis de interesse. A microCT é uma consequência natural da Tomografia Computadorizada, visto que aquela é uma tomografia com um nível de detalhe maior. Assim, todo o interior pode ser mapeado sem causar danos físicos à amostra.

Muitas aplicações decorreram deste método desde o seu advento. Em Petrofísica, por exemplo, se estuda rochas diversas a fim de otimizar e saber a viabilidade da perfuração de poços de petróleo (MACHADO, 2016). A porosidade é um dos parâmetros de interesse da rocha, e com a microtomografia é possível calcular o volume de poros (vazio) naquela rocha. Já em Geologia, a microtomografia permite estudar fósseis de seres vivos e plantas dentro de rochas (BLAZEJOWSKI, 2011). Dessa maneira, a microCT é incomparavelmente mais vantajosa quando comparada com o método tradicional de quebrar a rocha para investigar o fóssil. Este poderia ser danificado irremediavelmente e aquele dado se perder.

Na indústria as aplicações são inúmeras, mas, de forma geral, é verificar se o equipamento construído não contém fissuras internas que podem fragilizar todo o objeto. É o caso das turbinas de aviões e outras partes da aeronave. No caso das turbinas, a microtomografia é muito utilizada para averiguar alguma rachadura causada pela sucção de pássaros (YXLON, 2016)

E claro, na parte médica é fundamental. Desde o advento da tomografia que esta foi utilizada para visualizar órgãos e tumores nos pacientes. Isso ajudava bastante o médico no momento de uma cirurgia ou mesmo para planejar melhor o tratamento do paciente. E a cada nova geração de equipamentos de tomografia, mais detalhes eram captados. Porém, o tempo de aquisição das projeções de tomografia sempre foi um desafio. Quanto mais detalhes a serem captados, maior é o tempo de aquisição. E quanto maior o tempo, mais o paciente se movimenta, tornando imprecisa a reconstrução das projeções de tomografia.

Apesar de atualmente o tempo não ser mais um problema na tomografia convencional, este ainda o é para a microtomografia *in vivo*. Por se tratar de um nível de detalhes da ordem de micrômetros, qualquer movimento impede que esses detalhes micrométricos sejam captados com precisão. E tentando vencer esse obstáculo, de forma inovadora, a Tomografia Periférica de Alta Resolução (HR-pQCT) realiza exames de microtomografia no rádio e tíbia de indivíduos.

Algumas limitações ainda impedem a HR-pQCT de se tornar um exame convencional tais como o preço do próprio equipamento e manutenção e a limitação dos exames ao rádio e tíbia. No entanto, a HR-pQCT é fundamental para a investigação de muitas patologias que influenciam na microarquitetura óssea. Algumas delas podem ser influência da própria patologia como no caso da Acromegalia (MADEIRA, 2013). Outras, são consequência do tratamento, como o câncer de mama (Z CHEN, 2008). E ainda, outras são uma associação da patologia com o tratamento, como no caso de indivíduos HIV-positivo (COMPSTON, 2014).

Este trabalho busca utilizar a HR-pQCT para investigar possíveis alterações ósseas decorrentes da infecção por HIV. A importância deste estudo se torna clara ao se deparar com a quantidade de indivíduos portadores do HIV. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, existem cerca de 36 milhões de pessoas infectadas por HIV no mundo. Na África do Sul os índices são alarmantes, onde a população de indivíduos infectados representa 20% de toda a população do país. (HIV and AIDS in South Africa, 2016).

E dentre os problemas causados pelo vírus e, principalmente, pelos antirretrovirais utilizados, a fragilidade óssea tem sido constatada por diversas pesquisas (BEDIMO e TEBAS, 2013; COMPSTON, 2014). No entanto, vários fatores podem intermediar essa fragilidade óssea, como por exemplo e diminuição de colágeno ou mesmo a baixa absorção de cálcio.

Diante deste quadro, a microtomografia em indivíduos portadores HIV pode esclarecer quais parâmetros ósseos têm sido afetados, levando, consequentemente, a uma maior fragilidade no osso. Através dessas imagens de microtomografia, este estudo investigou as alterações ósseas em pacientes HIV-positivo acima de 50 anos e sob tratamento.

No entanto, devido a vários artefatos que essas imagens podem conter, é necessário realizar um tratamento que retira ruídos e otimiza a segmentação da região de interesse nas mesmas. A isso dá-se o nome de *processamento e análise* dessas imagens.

Este trabalho foi estruturado em seis capítulos, onde este primeiro busca resumir as motivações para o estudo e tudo quanto será discutido nos capítulos subsequentes. O segundo capítulo é somente uma extensão natural deste, resumindo o que a literatura fala sobre a microarquitetura óssea e a influência de patologias na mesma, incluindo a infecção por HIV.

No terceiro capítulo foi feita uma recapitulação de bases teóricas de fundamental importância para a compreensão deste trabalho e importância do mesmo. De início, uma introdução à tomografia computadorizada é realizada, visando explicar de maneira sucinta e clara os detalhes da técnica. Em seguida, o Processamento de Imagens é explicado. Conceitos como imagem digital, histograma, binarização e filtragem foram detalhados. E para finalizar o capítulo, uma explanação sobre o vírus HIV e sobre a microarquitetura óssea.

No quarto capítulo a metodologia aplicada para a obtenção dos resultados foi explicada. Desde a critérios de seleção dos pacientes e aquisição da imagem até os detalhes de processamento da mesma. No quinto capítulo os resultados são apresentados. Os parâmetros investigados foram explicados no final do terceiro capítulo, deixando para apresentar neste capítulo cinco somente os resultados da análise destes parâmetros. E por fim, a conclusão sobre o estudo é apresentado no capítulo seis.

Após esses capítulos, este trabalho é encerrado com a listagem de toda a referência bibliográfica utilizada nestes dois anos de pesquisa, seguido se quatro anexos. O ANEXO 1 referente à estatística, o ANEXO 2 refere-se ao número de aprovação junto ao Comitê de Ética e Pesquisa (CEP), o ANEXO 3 sobre o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado pelos participantes e o ANEXO 4 é sobre as especificações do equipamento.

Por fim, agradecer à equipe do setor de microtomografia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, representadas por Miguel Madeira e Maria Lúcia Fleiuss de Farias e aos pesquisadores Felipe Peres Oliveira e Elizabeth S. Machado, idealizadores do projeto original, visto que este trabalho é uma extensão do projeto original, cuja aprovação junto ao CEP encontra-se no ANEXO 2.

2 Revisão Bibliográfica

FULLER et al. (2015) fizeram uma revisão da técnica de microtomografia hospitalar e suas aplicações. Citaram como a HR-pQCT (High Resolution Peripheral Quantitative Computed Tomography – do inglês, Tomografia Computadorizada Quantitativa Periférica de Alta Resolução) tem sido utilizada em conjunto com a técnica de Elementos Finitos. E além disso discursaram sobre a acurácia das imagens aquisitadas e da reproduzibilidade da técnica.

Sobre as aplicações, citaram como algumas patologias guardam relação com o osso do paciente analisado (rádio e tíbia), tais como osteoporose, osteopenia, artrite reumatoide e osteoartrite. Apesar da HR-pQCT não ser utilizada para o diagnóstico e prognóstico de doenças ósseas, os autores entendem que em um futuro próximo isso deve se tornar realidade. Todavia, eles entendem também que é preciso compreender a correlação dessas alterações na tíbia e rádio com o restante do esqueleto, além de sentirem falta de uma padronização nos métodos de aquisição e análise das imagens da HR-pQCT.

BALA e companheiros (2014) investigaram um grupo de mulheres pós-menopausa portadoras de osteopenia com idade acima de 50 anos. Eles verificaram que as mulheres com registro de fratura prévia do antebraço possuem maior porosidade na cortical e uma fração de osso trabecular menor. Além disso, o parâmetro porosidade cortical por si só já prediz um risco de fratura do antebraço independentemente da densidade mineral óssea de área (aBMD). Dessa forma, foi mostrado que mulheres pós-menopausa com fraturas no antebraço distal possuem deterioração microestrutural.

ZEBAZE e demais pesquisadores (2010) investigaram a estrutura óssea (fêmur e rádio) de cadáveres de mulheres brancas com idades variando de 27-98 anos utilizando a HR-pQCT, microscopia eletrônica e a densitometria. O número total avaliado foi de 122 mulheres pós-morte, sendo 89 delas com idade a partir de 50 anos. Eles procuraram estudar como a porosidade e o remodelamento ósseo da região intracortical estão relacionados com o risco de fratura, já que tais fatores não são levados em conta nos exames convencionais.

Contrariando o que se acreditava, após a menopausa (até cerca de 15 anos após) a perda óssea, tanto trabecular quanto cortical, não é tão acentuada. Assim, nessa quantidade de tempo pós menopausa a queda da produção hormonal e outros fatores proporcionam somente uma pequena perda óssea. A partir dos 65 anos de idade, as mulheres avaliadas tiveram uma perda óssea maior, com a cortical sendo responsável por essa grande perda de massa óssea.

Tal perda óssea cortical se justifica pela maior área de remodelação na intracortical devido à perda de trabecular. Segundo os autores, a resistência óssea diminui devido a restos da região cortical que estão sofrendo remodelação óssea.

TÖPFER et al. (2014), por sua vez, focaram sua atenção na Artrite Reumatoide, uma patologia que causa inflamações nas juntas e também erosões ósseas. Então eles buscaram um método mais automatizado para segmentar e quantificar essas erosões, já que os atuais necessitam de uma intervenção humana maior, requerendo muito mais tempo. Dessa forma, os resultados mostraram diferenças entre o método proposto (AUTO3D) e os métodos atuais (MANUAL e MANUALISM). Os atuais mostram resultados semelhantes, enquanto que o proposto difere de ambos, mas ainda apresentando forte correlação, apontando, segundo os autores, para um provável avanço e precisão na segmentação. Outra vantagem do AUTO3D é a possibilidade de determinar a área da superfície erodida. Assim, o método se mostrou viável e mais vantajoso que os atuais.

Além da Artrite Reumatoide, outras patologias influenciam na microarquitetura óssea, como a Osteogénesis Imperfeita (OI), investigada por KOCIJAN et al. (2015). Tal patologia é causada pela incapacidade do organismo em produzir colágeno normal e de qualidade do tipo I, o que gera uma fragilidade óssea grande, mas sem necessariamente causar uma diminuição da BMD. Os autores utilizaram várias técnicas para estudar a patologia, tais como a densitometria, a DXL, a TBS e a HR-pQCT. Eles pretendiam determinar a microarquitetura óssea e a vBMD através da HR-pQCT, comparando esta técnica com o índice TBS e a DXL. Foram utilizados pacientes caucasianos da Europa central com os tipos I, III e IV de OI.

Dessa forma, utilizando-se dos dados da HR-pQCT, os pesquisadores verificaram se os dados de métodos atualmente utilizados como diagnóstico se relacionam com os dados da

HR-pQCT. Com relação ao TBS, eles encontraram somente correlação com o número de trabéculas e com relação a DXL, correlações foram encontradas com a fração de tecido ósseo (BV/TV) trabecular no rádio, porém com mais significância na tíbia. Além disso, verificou-se que a vBMD na região trabecular sofreu alterações, mas não na região cortical. E, portanto, alterações severas na microarquitetura trabecular e também na sua vBMD são registradas na OI.

O software de análise das imagens da HR-pQCT tem um threshold fixo para o histograma do objeto analisado e, dessa forma, não tem a flexibilidade necessária para uma análise mais precisa das imagens. Assim, VALENTINITSCH e demais (2012) procuraram desenvolver uma nova ferramenta automática de segmentação da imagem, a TIST (do inglês, Threshold Independent Segmentation Tool – isto é, ferramenta de segmentação independente do Threshold). A princípio, essa ferramenta foi treinada com imagens de 14 rádios contendo polimetil-metacrilato (ou acrílico) e, posteriormente, foi usada para a segmentação. Ela se mostrou mais precisa e rápida pela independência que tem do operador do software.

Além do threshold, outra característica que pode atrapalhar a qualidade da análise é o tamanho de voxel (menor unidade que forma uma imagem 3D). Assim, TJONG et ali. (2012) buscaram entender o efeito que os tamanhos de voxel têm comparando as imagens de HR-pQCT com as de microtomografia (microCT), a qual é o padrão ouro para a caracterização da microestrutura óssea pela maior resolução em comparação com a HR-pQCT e também pela ausência de artefatos de movimento. Nesse caso, como foram aquisitadas imagens de amostras ósseas, não houve artefato de movimento.

Com isso, para a estrutura trabecular e cortical, os dados da HR-pQCT com 41 μ m se correlacionaram fortemente com os da microCT. E, como era de se esperar, os dados relativos a HR-pQCT de 123 μ m tiveram fraca correlação com a microCT, enquanto que os dados relativos às aquisições com 82 μ m não perderam tanta qualidade a ponto de prejudicar a análise, mantendo correspondência com a microarquitetura óssea real. Assim, embora não ideal, a aquisição com resolução de 82 μ m consegue representar a estrutura do osso o suficiente para a extração dos parâmetros ósseos.

CALMY et ali. (2013) tentaram identificar modificações na microestrutura óssea causadas pela ação da infecção por HIV e pelo respectivo tratamento. O estudo focou

mulheres pré-menopausa na faixa de 38 a 46 anos com infecção de no mínimo 5 anos e raça caucasiana. O estudo utilizou 22 mulheres HIV+ve e 44 mulheres HIV negativo (-ve). Dessa forma, a partir deste estudo, foi possível verificar que essas mulheres HIV+ve possuem uma diminuição de cerca de 41% de densidade trabecular e de cerca de 13% no número de trabéculas, ambos os parâmetros com relação à tíbia distal. O interessante também é que, apesar de encontradas alterações na BMD, estas não seriam entendidas como merecedoras de tratamento via densitometria óssea. Já com relação à região cortical, as alterações significativas foram na densidade da cortical, mas nenhuma alteração de porosidade cortical foi verificada. Por ser um estudo transversal e tendo limitações de sexo, raça e faixa etária, mais estudos precisam ser realizados a fim de se ter um mapeamento mais completo da ação do vírus HIV e do tratamento na microestrutura óssea de uma forma geral.

YIN et al. (2014) também investigaram a influência da infecção por HIV e do tratamento no osso. Todavia, o estudo transversal se concentrou em indivíduos mais jovens e do sexo masculino. A faixa etária dos pacientes foi de 20 a 25 anos e a raça dos pacientes foi composta de afro-americanos e hispânicos, todos sob tratamento (ART). Tendo em vista que nessa faixa etária os indivíduos atravessam um pico de massa óssea, os pesquisadores resolveram investigar se a infecção e o tratamento influenciavam a estrutura óssea dessas pessoas.

Dessa forma, o que já era afirmado na literatura foi confirmado pelos pesquisadores utilizando a HR-pQCT, além da DXA. Muitos parâmetros ósseos tais como aBMD, vBMD trabecular, e espessura trabecular e cortical estavam abaixo do normal para a idade. Todavia, mais uma vez a porosidade cortical se manteve igual para indivíduos portadores de HIV e sob tratamento. Além disso, foi feita a análise de FE e verificou-se que houve uma diminuição na rigidez óssea tanto no rádio quanto na tíbia. Assim, o estudo mostrou a influência negativa da infecção por HIV e tratamento na microestrutura óssea e rigidez do osso.

Analisando a mesma patologia, BIVER et ali. (2014) focaram em indivíduos em uma faixa etária entre 60 e 70 anos que contraíram o vírus há mais de 5 anos e sob tratamento (ART) de pelo menos um ano. A quantidade de indivíduos controle foi de 112 e indivíduos HIV (-ve) foram 28. Embora com um suplemento de vitamina D adequado, os indivíduos HIV(+ve) revelaram possuir uma densidade óssea total menor, e dessa forma, uma densidade

trabecular menor, além de uma diminuição na área cortical. Tais indivíduos, a menos do colo do fêmur, possuem baixa BMD em todas as regiões analisadas pela densitometria.

Tal estudo pode verificar os efeitos negativos da ação do vírus na estrutura óssea do indivíduo, mas não pode determinar se está relacionado ao vírus propriamente dito, à ART ou a fatores associados ao vírus. Mas, de uma forma geral, o estudo mostra as consequências negativas da infecção na microestrutura óssea, parcialmente captada pela densitometria óssea.

3 Fundamentos Teóricos

3.1 Tomografia Computadorizada

Com um impressionante progresso em cerca de quarenta anos, a tomografia computadorizada se tornou uma técnica com aplicações múltiplas devido a sua capacidade de reconstruir o interior de estruturas de forma não-destrutiva. Tornou-se popular devido a sua aplicação à área médica na realização de exames de diagnóstico.

No entanto, sua aplicação está em inúmeras áreas do conhecimento. Os tomógrafos avançaram para equipamentos mais eficientes, com menor tempo e maior detalhe na imagem captada. De um mesmo princípio básico, foi possível fazer tomógrafos com resolução em micrômetros, a saber, a microtomografia. Atualmente já existem equipamentos com resolução em nanômetros, descortinando a possibilidade de novas descobertas.

3.1.1 Introdução Histórica

Desde a descoberta dos raios X com Wilhelm Röentgen em 1895, ficou evidente o uso da radiação ionizante como técnica não destrutiva para analisar o interior de estruturas. No entanto, a técnica de tomografia por raio-X demoraria muito tempo para vir à tona. A evolução da técnica se deu de forma razoavelmente lenta. O grande problema era reconstruir o interior da estrutura de forma rápida e automatizada. O avanço nos computadores foi tornando cálculos complexos e demorados em algo relativamente simples. Dessa forma, foi possível unir esse avanço computacional com os ocorridos na área de algoritmos de reconstrução. Então, em 1972, o primeiro tomógrafo computadorizado foi inventado por Allan Cormack e Godfrey Hounsfield (BUSHBERG, 2002).

Esse modelo criado por Cormack e Hounsfield foi a primeira geração de aparelhos de tomografia computadorizada. Atualmente já se está na quinta geração desses aparelhos. Além

da natural diferença de componentes eletrônicos entre os equipamentos das diferentes gerações, o que marcou a passagem de uma geração a outra foi a forma como o equipamento realizava o escaneamento do objeto. Na primeira geração, havia uma composição de movimento translacional e rotacional. Além disso, a fonte e o (único) detector estavam alinhados. Era o que se chamava de *pencil beam* porque só havia um único feixe de raios X que atravessavam o objeto atingindo o único detector existente.

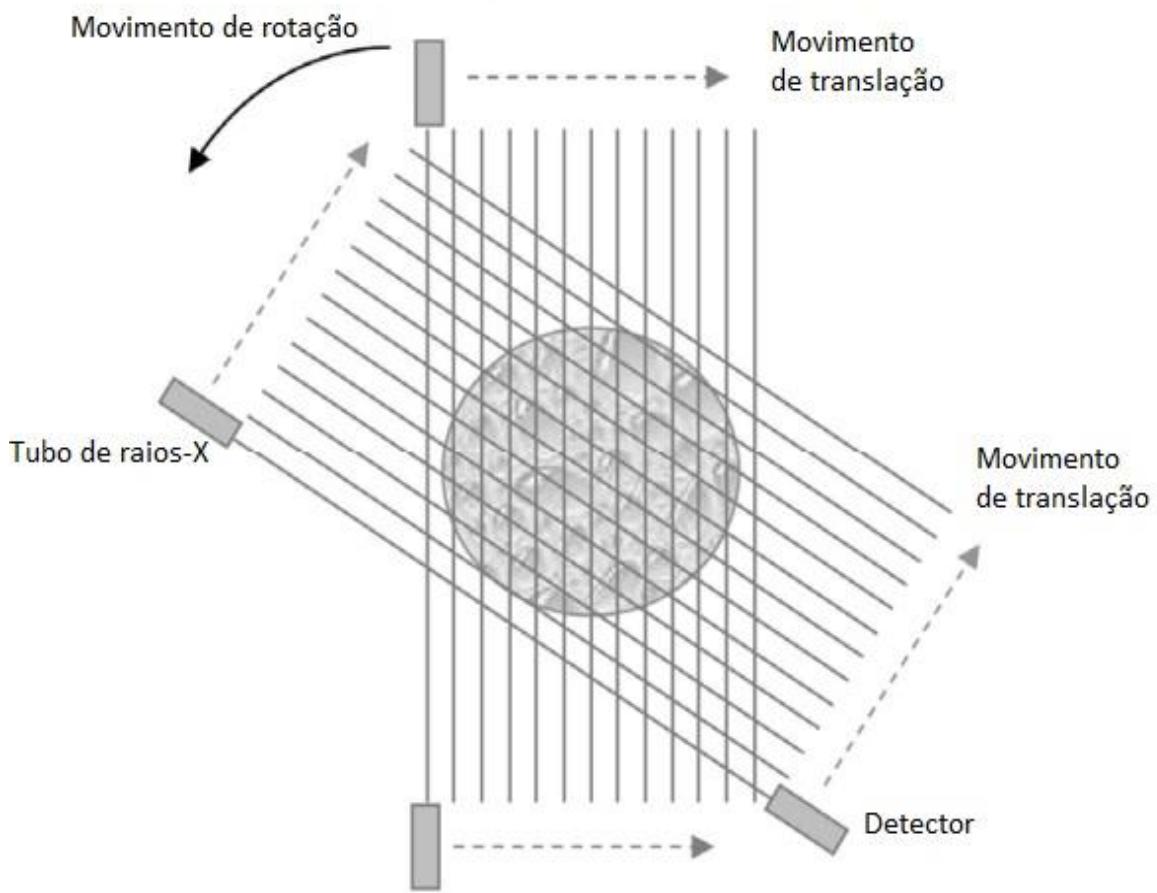


Figura 1. Primeira geração de tomografia computadorizada - para cada rotação do Tubo de raios X e Detector, uma translação é realizada (HSIEH, 2009).

A primeira geração tinha vários problemas e um dos principais era o longo tempo de escaneamento, principalmente em análise *in vivo*, o que tornava imprecisa a reconstrução. Dessa forma, a segunda geração veio para suplantar isso. Ela possuía mais detectores, e o

feixe não era linear, mas atravessava o objeto como um cone, cujo vértice é a fonte. Por isso essa geração é chamada de *cone beam*. Mas a composição de movimento rotacional e translacional ainda permanecia, o que deixava o tempo de escaneamento ainda alto (HSIEH, 2009).

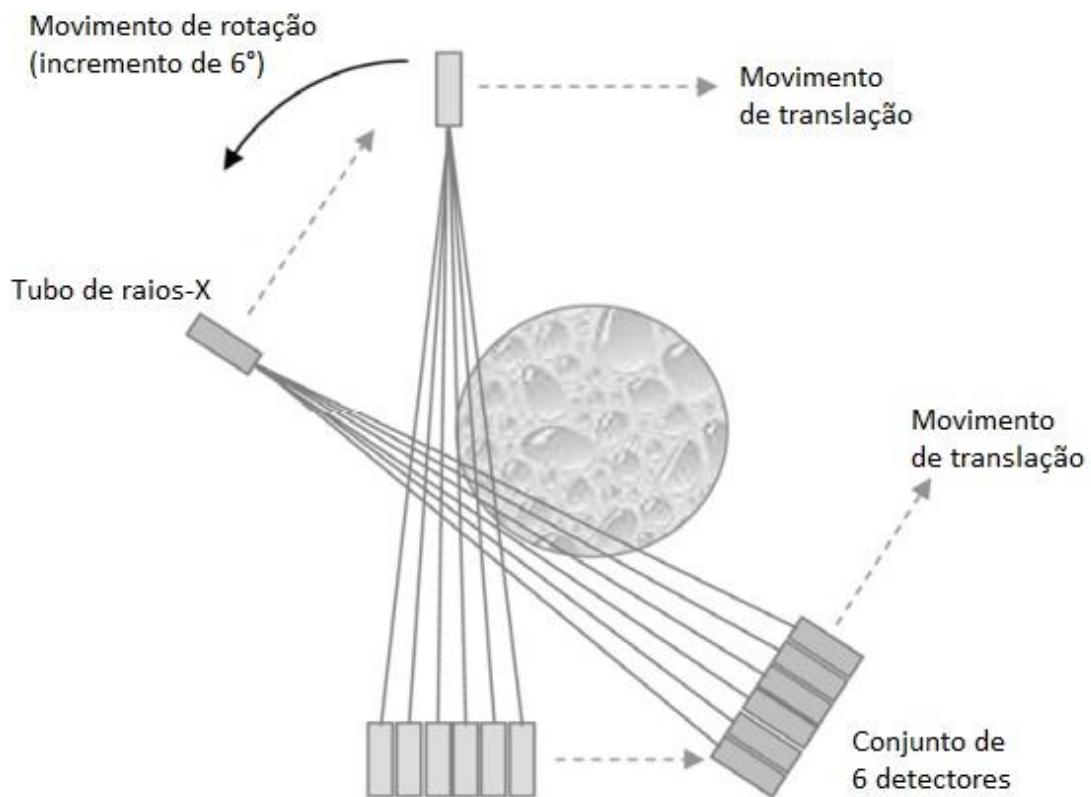


Figura 2. Segunda geração de tomografia computadorizada - para cada rotação em um ângulo de 6° do Tubo de raios X e Detector, uma translação é realizada (HSIEH, 2009).

Veio, então, a terceira geração, a qual tornou o tempo de escaneamento muito mais rápido. Isso foi devido à mudança nos movimentos de fonte e detector. Nesta geração o feixe continuou cônico, mas o movimento de ambos se tornou simultâneo, efetuando um movimento de rotação em torno do objeto. Essa é a geração mais popular, pois, além de um menor tempo (anulando os artefatos de movimento), possuía um menor custo em comparação com a geração seguinte.

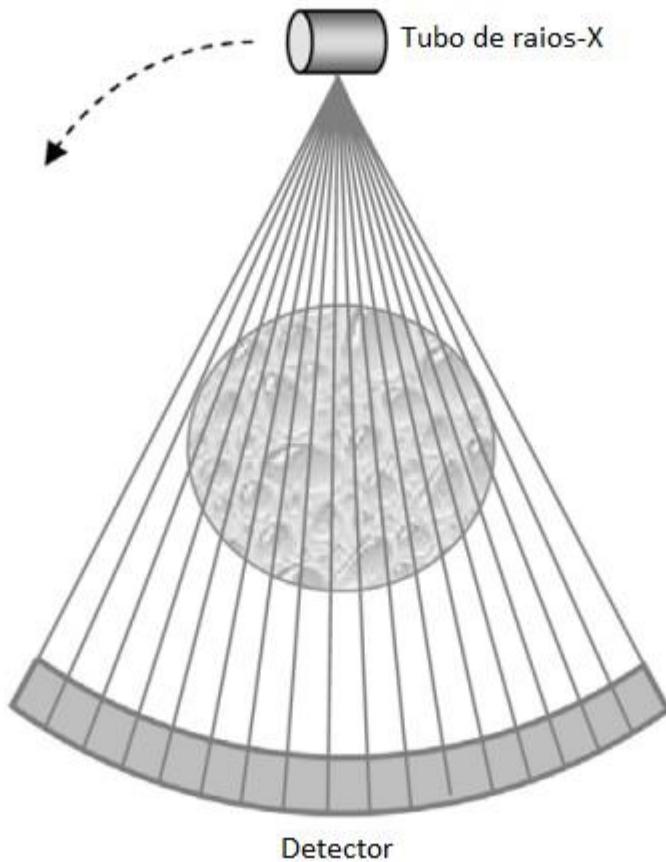


Figura 3. Terceira geração de tomografia computadorizada (HSIEH, 2009).

Na quarta geração o avanço significativo foi eliminar o efeito de *aliasing*, que pode ser entendido como uma falsa correspondência da imagem e o objeto devido ao baixo número de projeções. Para isso, somente a fonte passou a girar em torno do objeto, enquanto que o conjunto de detectores passou a ser um anel em torno do objeto. Assim, em qualquer posição que o feixe passasse, sempre haveria um detector para captar o sinal atenuado. Mas isso claramente aumentou bastante os custos. Para formar esse anel detector seria necessário cerca de 4800 detectores. Dessa forma essa geração não foi muito popular (HSIEH, 2009).

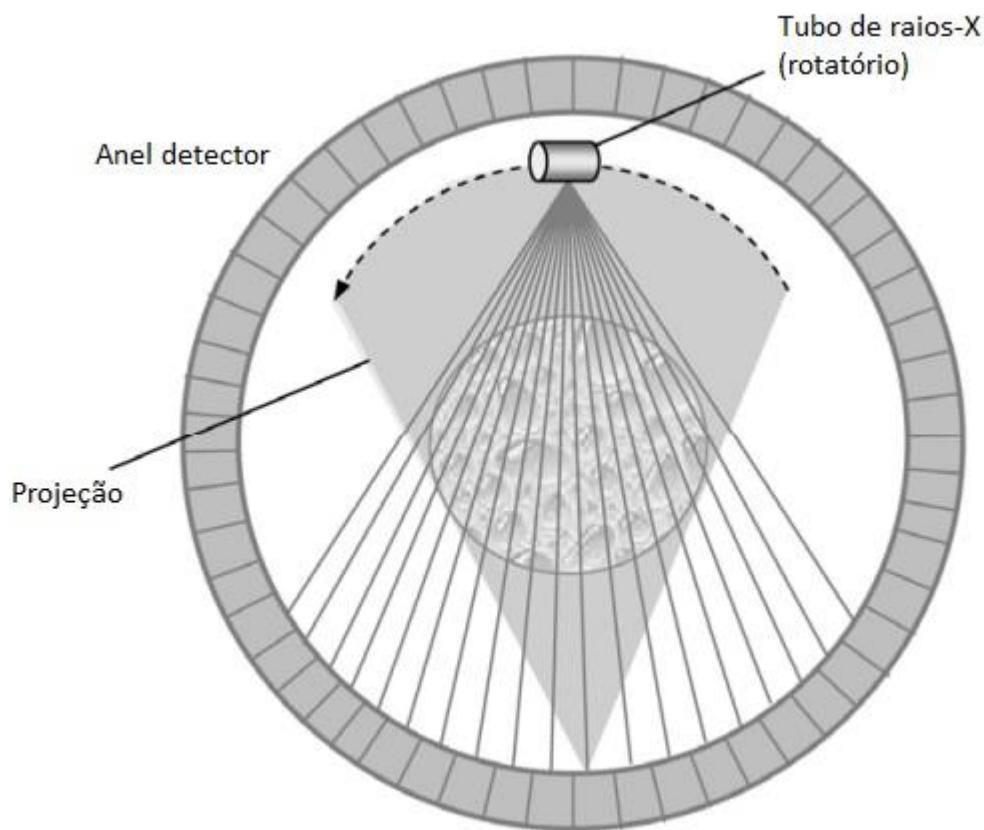


Figura 4. Quarta geração de tomografia computadorizada (HSIEH, 2009).

Essas são as principais gerações de tomógrafo. Isso não significa que não houveram outros modelos. No entanto, os que surgiram se utilizavam de uma composição de tecnologias já existentes, não sendo inovadores a ponto de marcar uma nova geração.

A partir daí o avanço foi muito rápido, chegando-se ao primeiro microtomógrafo no começo de 1982 (ELLIOTT, 1982). Vários algoritmos de reconstrução de imagens também foram desenvolvidos. Dentro tantos, destaca-se o de Feldkamp, criado para a reconstrução de uma geometria de feixe cônicoo. Este destaque se deve não só por sua importância na época, mas também pelo desenvolvimento de outros algoritmos que se basearam nele (FELDKAMP et al, 1984).

As aplicações de microtomografia estão em inúmeras áreas da ciência, desde arqueologia a área médica. Por ser uma técnica com uma alta resolução (da ordem de micrometros), para que seja viável, em termos de tempo de escaneamento da imagem e reconstrução, é necessário que o objeto analisado seja pequeno. Ou então que a resolução seja um pouco maior (mas ainda da ordem de micrometros). Além disso, é necessário que o objeto não se move ao longo do escaneamento (isso evita distorções na aquisição da imagem), o que torna a microtomografia *in vivo* mais difícil.

A radiação utilizada para a técnica pode ser tanto por meio de um equipamento de microtomografia quanto por radiação síncrotron. No primeiro, o princípio de funcionamento é o mesmo de um tubo de raio-X convencional, no qual os elétrons são acelerados e se chocam com um alvo, liberando radiação de Bremsstrahlung. No segundo, o aparato que produz radiação síncrotron possui dimensões bem maiores. Neste tipo de radiação também se utiliza elétrons acelerados, mas eles não se chocam contra alvos para a produção da radiação. Eles se baseiam no princípio do eletromagnetismo de que uma carga acelerada produz radiação. Então o que se faz de forma geral é acelerar elétron a velocidades próximas a da luz e em seguida fazê-lo passar por regiões de campos magnéticos (ímãs) com sentidos opostos intercalados. O caminho dos elétrons tem uma forma oscilatória (ora eles são acelerados para um lado, ora para o outro), liberando radiação à medida que atravessam esses ímãs (WILLMOTT, 2011; EZQUERRA et al, 2009).

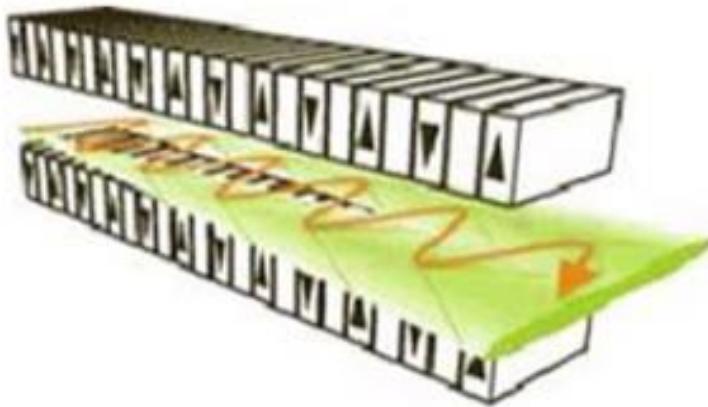


Figura 5. Ilustração do caminho oscilatório de um elétron em um sincrotron. À medida que o elétron vai oscilando (caminho laranja) ele vai emitindo radiação (região verde), a qual é utilizada para realizar uma microtomografia da amostra (EZQUERRA et ali, 2009).

3.1.2 Reconstrução de Imagens

Antes do advento do primeiro equipamento de tomografia se tornar possível, era necessário que se soubesse como recuperar a informação do interior da amostra a partir do fóton atenuado ao atravessar o material. Naturalmente, o processo inverso também faz sentido: a partir da informação do coeficiente de atenuação da amostra, seria possível conhecer o valor da energia do fóton atenuado na saída pela Lei de Lambert-Beer.

Dessa forma, em termos matemáticos, dado o coeficiente de atenuação μ no material, a informação que se tem é o fóton de saída que incidiu no material em um caminho l e formando um ângulo θ com uma linha de base. Essa informação pode ser expressão através da transformação $\mathcal{R}\mu$. Assim, essa ideia pode ser revertida aplicando uma função inversa \mathcal{R}^{-1} em $\mathcal{R}\mu$ a fim de resgatar a informação do coeficiente de atenuação.

Esse é o princípio no qual a transformada de Radon está baseada. Ela permite reconstruir com grande precisão o interior de estruturas através da atenuação sofrida pelos raios ao atravessar o material (HERMAN, 2009).

3.1.3 Artefatos de Reconstrução

Em reconstrução, processamento e análise de imagem, o termo artefato é bastante comum. Ele se refere a características indesejáveis que estão presentes nas imagens, tornando-a menos fiel ao objeto analisado.

Um desses artefatos é chamado *Artefato de Anel* (do inglês, *Ring Artifact*). Como o nome já diz, este artefato é caracterizado por anéis concêntricos nas imagens reconstruídas de tomografia. Ele ocorre porque alguns dos fotodetectores que compõe o painel do detector do aparelho de tomografia quebram. Dessa forma, toda radiação que ali incidir não será aquisitada. O efeito seria como se o material tivesse atenuado completamente o fóton incidido naquela direção. Assim, o resultado é um ponto branco.

Conforme objeto gira para computar todas as projeções, aquele mesmo ponto continuará branco em todas as projeções. Então, ao reconstruir, o efeito será de um anel na fatia de tomografia reconstruída.

Outro artefato decorrente da tomografia é o *Endurecimento de Feixe* (do inglês, *Beam Hardening*). O feixe de raios X é policromático, ou seja, é composto de fótons de várias energias. Assim, ao incidir no material, os feixes menos energéticos irão ser completamente atenuados. O resultado é que na saída o feixe possui uma energia média muito maior que ao entrar no objeto. Assim, diz-se que o feixe foi endurecido.

No entanto, esse efeito prejudica a reconstrução porque um feixe com fótons de várias energias será atenuado de forma diferente para cada direção que o feixe incide no objeto em um mesmo ponto P. Isso torna difícil atribuir um mesmo coeficiente de atenuação para este mesmo ponto P no objeto (HERMAN, 2009).

Uma solução para resolver este problema é endurecer o feixe antes que ele incida no objeto. Para isso, são colocados alguns filtros na saída do feixe do tubo de raios X. Esses filtros são nada mais do que finas folhas de determinado material (como de Alumínio ou Cobre, ou mesmo de ambos). Com isso, o feixe terá uma faixa de energia para os fótons mais estreita, melhorando a precisão da reconstrução.

Um outro artefato é o de *movimento*. Ocorre quando se faz tomografia (ou microtomografia) *in vivo* porque a reconstrução está baseada na premissa de que o objeto não se moverá. E, ao haver movimento, uma região através da qual o feixe de raios X deveria

passar no tempo t , acaba sendo irradiada no tempo t' . Esse deslocamento temporal altera a ordem em que aquela região deveria aparecer no algoritmo de reconstrução.

Assim, visualmente o efeito é como de um quebra-cabeça que perdeu algumas peças e a imagem parece então dividida em duas partes que não se encaixam perfeitamente. A solução para esse artefato é sempre minimizar o tempo da aquisição para reduzir a interferência do movimento na reconstrução.

3.1.4 Interação da Radiação com a Matéria

Diariamente as pessoas estão expostas a vários tipos de radiação eletromagnética: ondas de rádio e televisão, radiação solar, exames de diagnóstico e a própria radiação de fundo emitida naturalmente por elementos radiativos na crosta terrestre e em construções. No entanto, as ondas de rádio e televisão e o espectro visível da radiação solar formam o que se chama de radiação não-ionizante. Essa radiação tem esse nome por não ter energia suficiente para extrair um elétron de um átomo.

Em contraste com esse tipo de radiação, a parte do espectro solar na faixa do ultravioleta e os outros exemplos supracitados são tipos de radiação ionizante. Essa radiação tem um alto risco para as pessoas por ter a capacidade de quebrar ligações moleculares e causar danos biológicos sérios.

A radiação interage com a matéria através de quatro formas diferentes: Efeito Fotoelétrico, Espalhamento Compton, Espalhamento Rayleigh e Produção de Par. Essas interações não ocorrem todas ao mesmo tempo, pois cada uma tem sua relação com a energia do fóton incidente e/ou com a massa atômica do átomo com o qual o fóton interage.

O Efeito Fotoelétrico ocorre em camadas eletrônicas mais internas do átomo. Dada a energia E de um fóton, este, ao interagir com o elétron de uma dessas camadas com energia E' , libera do átomo tal elétron com uma energia cinética $E_k = E - E'$. Como consequência, um vazio deixado nessa camada, que pode ser preenchido de duas formas:

- Elétron de uma camada superior. E com isso, ao sair dessa camada mais externa e ir para a mais interna a fim de ocupar esse vazio, é liberado um fóton com energia igual a diferença entre as energias de ligação do elétron de cada uma dessas duas camadas.

- Elétron de Auger. Também chamado de Efeito de Auger, ocorre quando essa energia proveniente da diferença entre as duas camadas é transferida a outro elétron do átomo, ao invés de ser liberada na forma de um fóton. Assim, esse elétron que recebe tal quantidade de energia é ionizado do átomo com uma energia cinética igual a diferença entre a energia transferida a esse elétron e a energia de ligação do mesmo (SAHA, 2005).

O espalhamento Compton, por outro lado, ocorre em camadas eletrônicas mais externas do átomo. O fóton incidente transfere somente parte de sua energia ao elétron, isto é, $E' = \alpha E$, onde E é a energia total do fóton, E' é parte da energia transferida e α é adimensional e representa o quanto de energia foi transferida (varia de 0 a 1). Assim, a energia cinética do elétron liberado é $E_k = E' - E_b$, onde E_b é a energia de ligação do elétron (SAHA, 2005).

O espalhamento Rayleigh é simplesmente uma mudança na direção de incidência do fóton, sem alterar sua energia (espalhamento elástico).

E por fim, a Produção de Par ocorre quando o fóton incidente interage com o núcleo atômico e produz um par elétron-pósitron. O pósitron criado irá se aniquilar com outro elétron do meio liberando outro fóton. Já o elétron criado irá interagir com outros átomos do meio, podendo excitar ou até ionizar um átomo. A energia mínima para que ocorra produção de par é de 1024MeV, já que a energia de repouso do elétron é 512 keV (metade da energia para a produção de par), igual à energia de repouso do pósitron (SAHA, 2005).

Dessa forma, ao incidir em um objeto, um feixe de radiação está sujeito a esses três efeitos que atenuam os fótons incidentes. A relação entre a intensidade inicial e final dessa radiação incidida para um feixe monocromático é dada pelo decaimento exponencial, que depende da espessura desse objeto, ou seja:

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

Onde I e I_0 são as intensidades final e inicial do feixe de radiação, x é a espessura que o feixe tem de atravessar e μ é o coeficiente de atenuação do objeto dado por:

$$\mu = \delta + \zeta + \xi \quad (2)$$

Onde δ , ζ , ξ são, respectivamente, o coeficiente de atenuação associado ao efeito fotoelétrico, ao efeito Compton e à produção de par (SAHA, 2005).

O coeficiente de atenuação do material ou objeto guarda uma relação muito estreita com a densidade do mesmo. A lei exponencial já envolve uma dimensão, a saber, a distância que o feixe percorre através do material.

O coeficiente de atenuação do objeto é algo muito genérico. Afinal, o que a lei de decaimento exponencial retorna é um coeficiente de atenuação dado um feixe de radiação que atravessou uma distância x e saiu com intensidade I , menor do que a inicial. Sendo assim, esse coeficiente acumula os resultados de atenuação de cada pequena região ao longo desse caminho, obtendo, assim, o resultado desse coeficiente. Essa atenuação tem uma relação com a quantidade de átomos no caminho desse feixe e de qual material pertence determinado átomo.

3.1.5 Esquema Geral de um Tomógrafo

A Tomografia Computadorizada faz uso de princípios do exame de Raios X. Neste, o objeto é colocado em frente a um tubo de raios X que atravessam o objeto. O padrão de atenuação desses fôtons através do objeto é captado em um filme fotossensível, onde as estruturas que estão mesma direção do caminho realizado pelos raios ficam sobrepostas (projeção).

Na Tomografia o que se tem é uma sequência dessas projeções em torno do objeto. Isto é, a cada projeção registrada, o objeto é posto em rotação em um dado incremento ângulo (geralmente menor que 1° para a microtomografia). Essas imagens do objeto possibilitam conhecer o padrão de atenuação dos raios X em diferentes posições. E assim, através de um cálculo inverso, é possível conhecer o quanto cada pequena região interna do objeto (voxel) contribuiu para essa atenuação. A capacidade de atenuação destes elementos de volume é uma medida da densidade daquela região. Dessa forma, o resultado de mapear a densidade

em cada ponto torna possível reconstruir o interior do objeto. A Figura 3 ilustra bem essa descrição.

3.1.6 HR-pQCT

A microtomografia é uma técnica poderosa para avaliar o interior de estruturas sem danificá-las. A alta resolução de pixel (ou tamanho de pixel), da ordem de micrômetros, permite a quantificação de pequenos poros que determinada estrutura possa ter. Naturalmente, quanto maior a resolução de pixel, maior será a capacidade de identificar os poros no objeto e mais próxima do real a quantificação desses poros será. Essas características fazem da técnica de microtomografia um padrão ouro para a caracterização de microestruturas no interior da amostra.

Dentre os vários tipos de amostras que são microtomografadas (e.g., canos, rochas, materiais arqueológicos), uma das mais comuns são amostras de ossos, seja de ratos, macacos ou humanos. Em geral, utiliza-se amostras de ratos para entender como a microestrutura óssea se altera sob diversos fatores, tais como medicamentos ou doenças ósseas. A grande vantagem é poder avaliar o rato em qualquer fase de sua vida. Assim, quando o tempo de interesse desejado pelo pesquisador é atingido, o rato é sacrificado e a região óssea é então posta para análise após a dissecação do rato e limpeza adequada do osso de interesse.

Todavia, o fato de não poder avaliar o osso do ser humano *in vivo* pela própria geometria dos equipamentos é uma desvantagem dos microtomógrafos, já que o progresso de muitas patologias e suas consequências no osso deixam de ser estudados. Dessa forma, surge em 2004 o HR-pQCT (High Resolution peripheral Computed Tomography), que é um microtomógrafo clínico da empresa suíça Scanco Medical que permite a avaliação do rádio e tíbia (extremidades) do paciente *in vivo*.

A primeira geração do equipamento é capaz de avaliar ossos *in vivo* com resolução de pixel de 82 μ m e amostras quaisquer com resolução de pixel de 41 μ m. O tempo para realizar o exame é de 2.8min para a maior resolução de pixel e de quase 9min para a menor. As dimensões são de 1,35x0,9x1,48 (em metros) e o peso é de 450kg. A geometria do feixe é cônica (do inglês, *cone beam*). Detalhes adicionais sobre informações técnicas do equipamento encontram-se no ANEXO 4.



Figura 6. Imagem do HR-pQCT (1^a geração) em uso na microtomografia da tíbia (Clinical MicroCT: SCANCO MEDICAL, 2016).

Já a segunda geração possui uma resolução de pixel *in vivo* de 61 μm e de 30 μm para amostras *ex vivo*. A vantagem é o tempo de aquisição que, apesar de possuir uma resolução de pixel maior, é menor que o da primeira geração. Somente 1.4min para realizar o exame com 110 slices, e 2 min com 168 slices, ambos com uma resolução de pixel de 60 μm . Além disso, esse equipamento possui a vantagem de realizar o exame com um valor de dose absorvida (na região irradiada) menor que 5 μSv . Isso torna dispensável o uso de qualquer vestimenta para proteção contra a radiação no paciente, tanto a liberada diretamente pela fonte quanto a secundária (a espalhada no paciente e nos objetos ao redor).

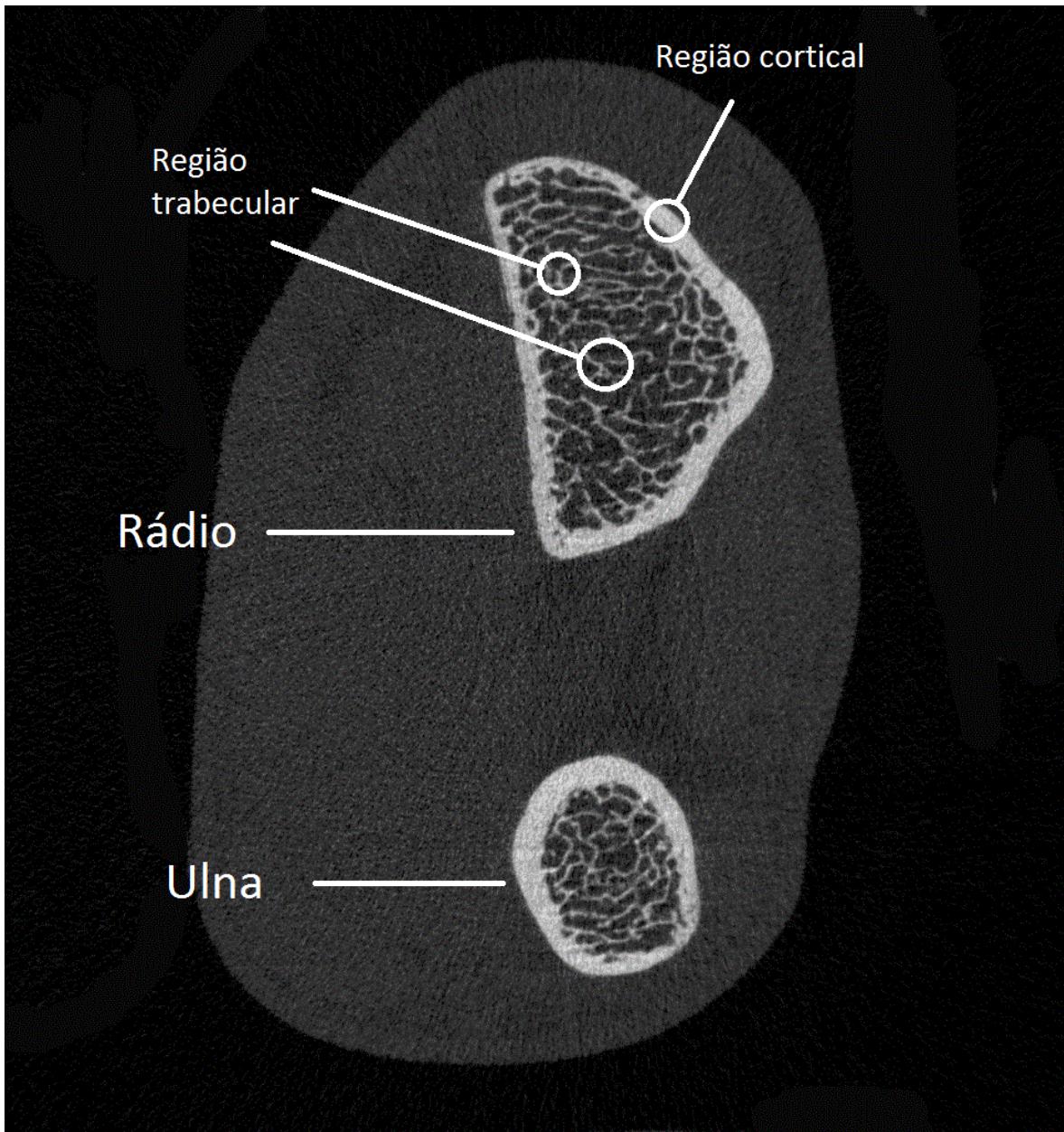


Figura 7. Imagem de uma das 110 fatias obtidas na microtomografia do antebraço na porção imediatamente acima do punho (elaborada pelo autor).

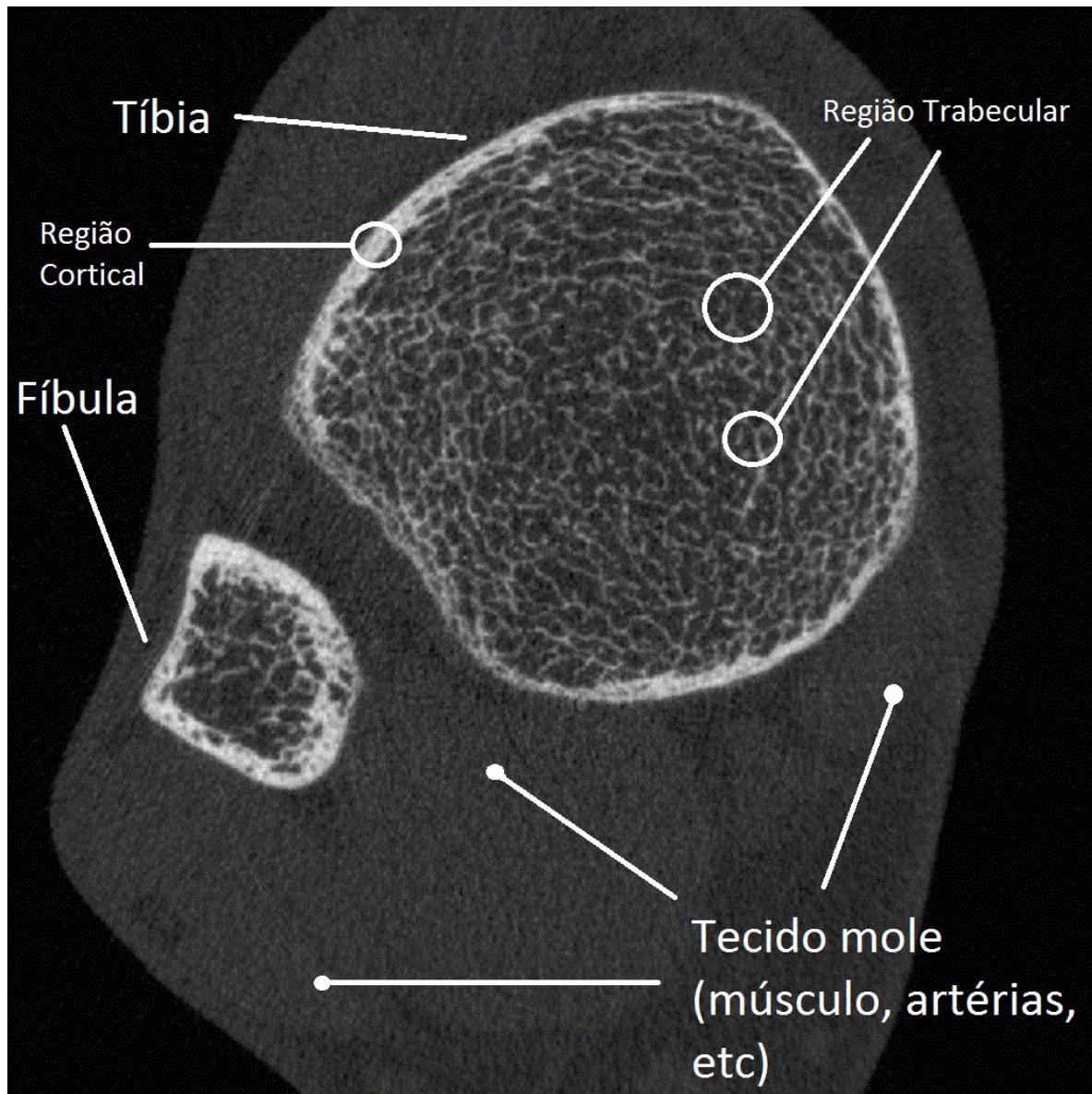


Figura 8. Imagem de uma das 110 fatias obtidas na microtomografia da perna na região imediatamente acima do tornozelo (elaborada pelo autor).

Ademais, o equipamento é blindado, permitindo que os operadores fiquem na sala e sem requerer proteção especial (e.g. avental plumbífero). O equipamento possui somente uma estreita entrada para o membro do paciente e vem acompanhado de moldes para o braço e perna do indivíduo, além de uma cadeira para acomodar o mesmo nas posições adequadas para o exame. O objetivo dos moldes é, naturalmente, garantir que o membro fique em uma

posição adequada para o exame e ao mesmo tempo que minimize o movimento durante a microtomografia. Houveram pequenas mudanças nesses moldes na segunda geração.

Antes de iniciar qualquer exame, faz-se necessário realizar as calibrações preconizadas chamadas de QC1 e QC2 (do inglês, QC é sigla de *Quality Control*). Essas calibrações são controles de qualidade do aparelho necessárias para saber se as medidas realizadas serão precisas. O QC1 é diário e mede a estabilidade da medida da densidade, enquanto que o QC2 é semanal e mede a estabilidade dos parâmetros de arquitetura. Caso haja um desvio maior que 8 mg HA/ccm para mais ou para menos no resultado da calibração QC1, o exame não deve ser realizado. Já para o QC2, esse desvio é de 2% do valor médio para mais ou para menos (SCANCO, 2013a).

Após a aquisição, as projeções levam um tempo para serem reconstruídas. O equipamento vem acompanhado de um software para a reconstrução e análise dos dados relativos ao membro analisado, seja rádio, seja tibia. Enquanto a reconstrução não foi completada, o exame do paciente não pode ser aberto na aba de análise.

Ao selecionar qual imagem de determinado paciente será segmentada, aparece a janela relativa à aba de Análise do Software. O processo de seleção do contorno que circundará o osso é feito manualmente pelo operador. A partir desse contorno inicial para o primeiro *slice*, o equipamento é capaz de iterar sobre os outros slices contornos semelhantes. Algumas vezes, todavia, essa iteração se mostra falha e o programa acaba por incluir (ou excluir) áreas que não são (ou são) osso. Dessa forma, as devidas correções são feitas manualmente pelo operador. Os erros nestas correções são minimizados usando a ferramenta de Zoom, para que se tenha um contorno mais fiel ao osso.

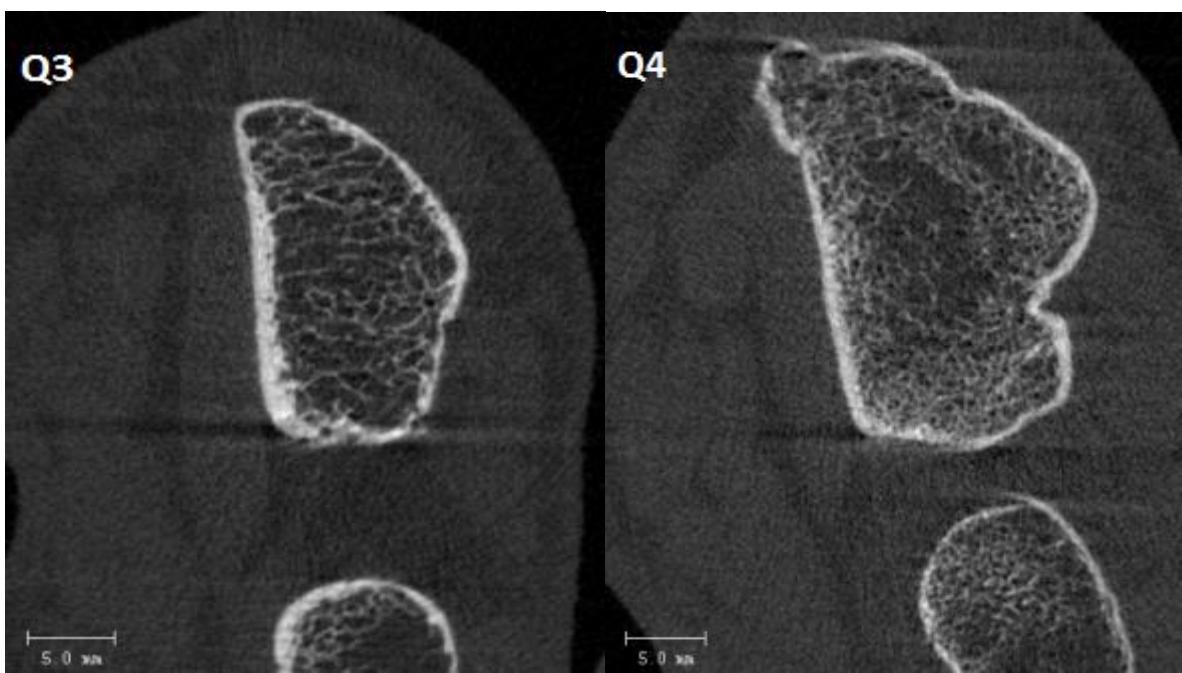
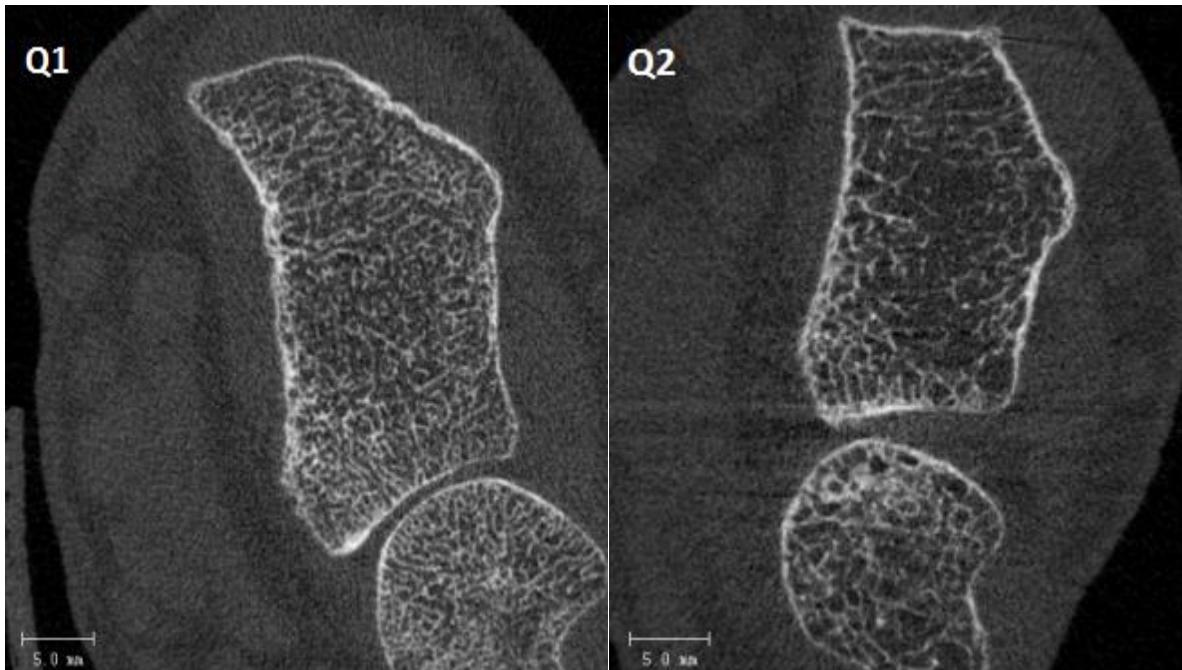
Também é possível realizar a análise da porosidade da região cortical. Para esta análise é necessário realizar um outro contorno interno, a fim de que somente a porosidade da região da cortical seja quantificada.

Os parâmetros determinados na avaliação da microestrutura óssea são muitos, dentre os quais estão a porosidade cortical, porosidade trabecular, espessura da região cortical, espessura das trabéculas, número médio de trabéculas, dentre outros. Esses parâmetros podem sofrer variações caso o paciente tenha se movido significativamente durante o exame, o que impede uma reconstrução precisa, alterando os parâmetros ósseos. É o que se chama de artefato de movimento.

A Scanco possui uma classificação de exame aceitável para que o operador do equipamento possa se guiar durante a realização dos exames. Essa classificação é uma sugestão aos operadores do equipamento para saber como determinar quando um exame deve ser refeito ou não. A classificação sugerida é dividida em cinco:

- Perfeito (Q1). Sem listras horizontais aparentes;
- Boa (Q2). Leves listras horizontais, não muito aparentes;
- Razoável (Q3). Claras linhas horizontais, mas a região cortical ainda permanece razoavelmente conservada;
- Ruim (Q4). Largas linhas horizontais e a região cortical dificilmente se conserva, mostrando uma descontinuidade clara;
- Inaceitável (Q5). Em estado pior que o último citado. Devem ser rejeitadas sempre.

Em geral, os exames aceitos são até a classificação Razoável (SCANCO, 2013b). Abaixo disso a própria segmentação e análise ficam prejudicadas. As figuras a seguir ilustram essa qualidade.



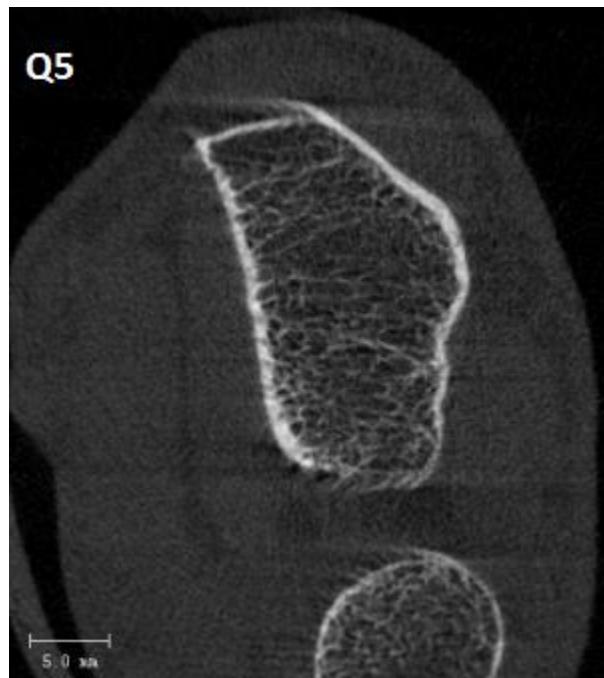


Figura 9. Exemplos de exames conforme a classificação acima (SCANCO, 2013b).

Na análise, muitos parâmetros ósseos importantes são quantificados. Abaixo segue uma tabela com a sigla, significado da sigla e o que está sendo quantificado de alguns dos parâmetros.

Tabela 1. Principais parâmetros ósseos retornados ao usuário do software da Scanco de microtomografia clínica (SCANCO, 2013a).

Sigla	Significado	Descrição
Total-Area	Área Total	Área total do osso
CortArea	Área Cortical	Área da região cortical do osso
TrabArea	Área Trabecular	Área da região trabecular do osso
Ct.Th.	Espessura da Cortical	Espessura média da região cortical óssea
Ct.Pm.	Perímetro da Cortical	Comprimento do contorno que circunda a cortical (perímetro)
BV/TV	Volume do Osso/Volume do Tecido	Fração de tecido ósseo
Tb.N	Número de Trabéculas	Número médio da quantidade de trabéculas
Tb.Th	Espessura das Trabéculas	Espessura média das trabéculas
Tb.Sp	Separação das Trabéculas	Separação média entre uma trabécula e outra

3.2 Processamento de Imagens

Uma imagem, seja ela uma fotografia ou uma fatia de tomografia computadorizada, sempre possui imperfeições. Assim, faz-se necessário estudar a imagem digital de forma que se possa reduzir ou retirar o indesejável dessas imagens. A depender da situação, pode ser mais útil uma imagem mais nítida para determinado objeto da imagem ou até mesmo extrair algum ruído que possa estar presente nela. Para estes e outros objetivos análogos, o processamento da imagem digital é fundamental.

3.2.1 Imagem Digital

Ao se realizar uma microtomografia de alguma amostra, o objeto central de estudo é o conjunto de imagens que se obtém. Nelas está contida a informação sobre a estrutura interna da amostra e é através dessas imagens que se pode caracterizar um dado objeto, quantitativa e qualitativamente.

De uma forma geral, uma imagem real é muito diferente da imagem digital. É através desta que todos os estudos sobre uma dada amostra são realizados. O processo de transformação de uma imagem real para um digital é chamado de *quantização*. Assim, enquanto na imagem original há uma transição contínua de cores quando se sai do ponto (x, y) para $(x + \Delta x, y + \Delta y)$, na imagem digital essa transição é discretizada. Isto é, no deslocamento Δx e Δy de um ponto a outro, essa transição não é mais contínua, e sim discreta, possuindo, assim, um único padrão de cor em cada unidade estrutural básica da imagem, chamados de *pixels*. Dessa forma, o que se tem é uma sequência destes pixels de dimensão Δx por Δy que juntos, em sequência, formam a transição de uma tonalidade para outra de uma maneira menos suave.

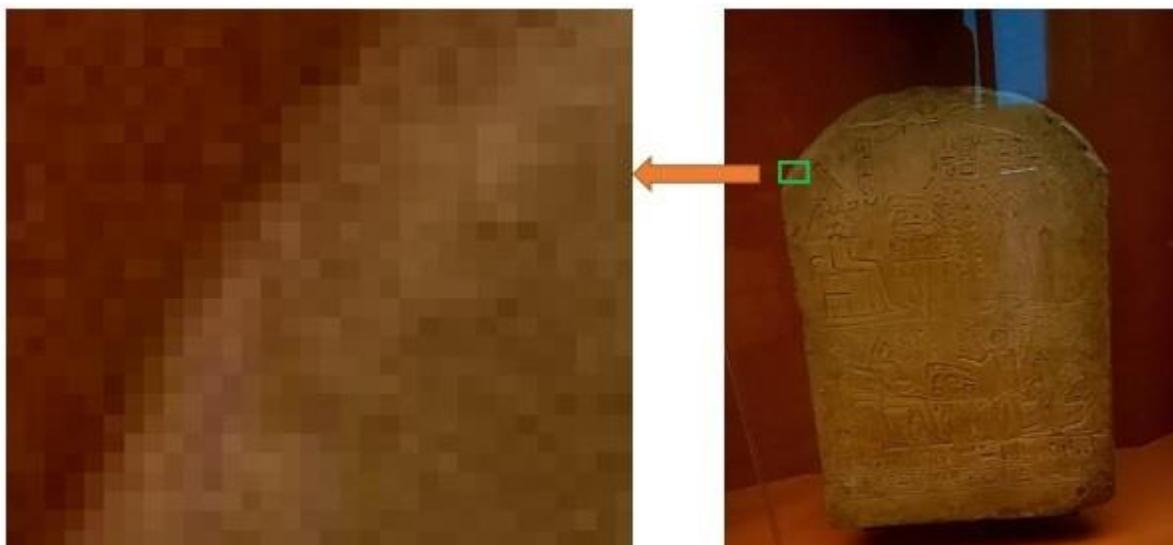


Figura 10. À direita, uma tábua de inscrição cuneiforme do antigo Egito pertencente ao acervo do Museu Nacional da UFRJ. Na região dentro do retângulo verde aumentada 800% (esq.) é possível perceber os pixels da imagem (elaborada pelo autor).

Naturalmente, quanto menor for a dimensão de Δx e Δy , mais suave será essa transição e mais fiel a imagem digital será à imagem real. Além disso, quanto maior for esse nível de detalhe, maior será o espaço em disco que essa imagem ocupará. Esses dois fatores (detalhamento e espaço em disco ocupado) devem ser otimizados a fim de encontrar uma imagem digital que não se distancie tanto da real e que, ao mesmo tempo, seja a menor possível a fim de minimizar o tempo nas operações que serão realizadas nessas imagens.

O pixel, apesar de na maioria das imagens possuir um formato quadrado, não precisa possuir essa forma. Existem outros padrões de pixel (e.g. o hexagonal) que podem igualmente ser esse elemento formador da imagem. Caso seja preferível, é possível converter um padrão de pixel para outro.

Todavia, apesar da importância do pixel no nível de detalhamento de uma imagem, ele por si só não é suficiente para isso. Pode ocorrer, por exemplo, de uma imagem ter um tamanho de pixel muito pequeno, mas ainda assim possuir uma péssima *resolução*. Caso a tonalidade (de cor ou de cinza) dos pixels não seja precisamente definida em relação à imagem real, o resultado visual será uma imagem borrada, como se estivesse desfocada. Diz-se então que a imagem não está bem resolvida. Como as bordas de uma imagem são os limites entre diferentes regiões da imagem, a falta de resolução fica mais perceptível nelas.

Também é possível que a imagem tenha um ótimo tamanho de pixel e esteja bem resolvida, mas a diferença entre as muitas estruturas que compõem a imagem não esteja clara. Neste caso, o que falta a essa imagem é *contraste*. Algo semelhante é quando a tela de um computador está com sua luminosidade baixa, tornando mais difícil a observação do que estiver na tela, apesar do tamanho de pixel e resolução não se alterarem. Dessa forma, o contraste é fundamental para uma imagem digital de qualidade.

3.2.2 Histograma

Independentemente da imagem, seja ela colorida ou em tons de cinza, existe um *histograma* associado a ela. Um histograma, de forma geral, mostra a frequência de alguma variável de interesse para determinados valores da mesma. No caso do histograma da

imagem, a frequência é de cores ou tons de cinza que aparecem na imagem (como as imagens aqui tratadas são em tons de cinza, tudo o que será dito daqui em diante será levado em conta para imagens assim, a menos que se faça uma menção explícita de que a imagem é colorida).

Uma das aplicações imediatas deste histograma é para a seleção de objetos específicos na imagem, os quais se sabe terem valores maiores do que determinado valor, um *limiar* (do inglês, *threshold*) a partir do qual aquela estrutura aparece no histograma. Em geral, esse valor não é previamente conhecido, mas quem lida com a imagem conhece em qual estrutura está interessada. E, a partir disso, irá selecionar a região do histograma em que determinada estrutura aparece.

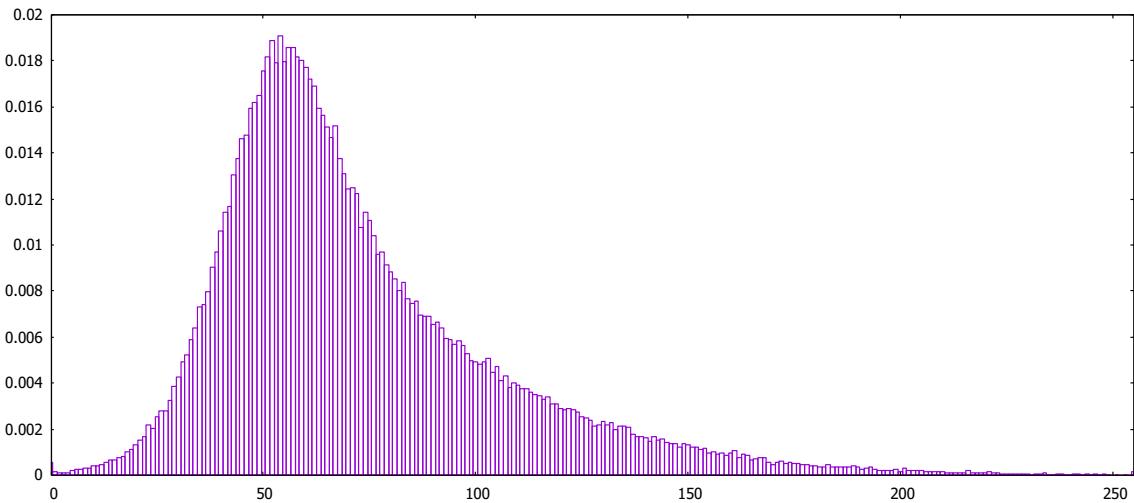


Figura 11. Ilustração de um histograma com 256 tons de cinza (eixo horizontal). No eixo vertical é a frequência com que esses tons aparecem na imagem (elaborada pelo autor).

O histograma de uma imagem tem diversas aplicações. Uma delas é para o diagnóstico em exames de tomografia computadorizada ou radiografia digital. Ao mudar a região de interesse no histograma, o médico pode identificar com mais facilidade se o paciente está com alguma anomalia no tecido de interesse e, com isso, dar um diagnóstico preciso. Outra aplicação é para a quantificação de determinadas estruturas da imagem. Um exemplo prático seria, para o caso de uma fatia de microtomografia, quantificar o volume de

osso de uma amostra que contém materiais de outras densidades, como tecido mole. Assim, o histograma ajuda a selecionar somente o osso nessas fatias de microtomografia.

3.2.3 Binarização

No exemplo citado na subseção anterior, essa quantificação de volume acima só é possível depois do processo de *binarização*. Após a divisão do histograma em duas partes, todos os tons de cinza da região de interesse são transformados em branco, e todos os que estão fora dessa região são transformados em preto. Assim, essa nova imagem em preto e branco é dita estar binarizada. Existem vários métodos para se binarizar uma imagem e alguns deles foram aqui introduzidos por sua importância.

3.2.3.1 Método de Otsu e Variantes

A ideia deste método está baseada na análise de discriminante, onde a variância associada com o tom de cinza médio na imagem é separada em dois outros tipos de variâncias: a variância dentro das classes (a que está associada com a variância dos tons de cinza dentro da classe onde tudo será considerado preto e onde tudo será considerado branco) e a variância entre as classes (associada com a clareza com que essas duas classes, preto e branco, serão separadas). Partindo da ideia de thresholding, Otsu pensou em uma forma de fazer com que a diferença entre dois tons adjacentes fosse maximizada a fim de separar com precisão máxima esses tons próximos. Dessa forma, a variância entre essas classes de tons adjacentes deveria ser maximizada. E a partir disso alguns pixels da imagem serão classificados como pretos e outros como brancos (OTSU, 1979).

Todavia, o fato de maximizar essa variância entre classes (e consequentemente minimizar o erro no processo de binarização) não livra o processo da classificação errada de pixels. Por isso no *método multinível de Otsu* são introduzidas mais classes no processo de thresholding. Dessa forma, o que antes seria classificado como preto ou branco, agora pode

ser classificado como preto, cinza 1, cinza 2 e branco (método de Otsu multinível de 4 níveis nesse exemplo). A vantagem é justamente remover mais erros no processo. A saber, um pixel que seria classificado como preto, agora será classificado como um cinza 1. E, ao binarizar, o pixel não mais será contado como preto, mas como branco, o que muda no resultado final do atributo que se deseja extrair daquela imagem, ou seja, melhores resultados (LIAO, 2001).

Por fim, o método de Otsu bidimensional tem uma leve variação. Ele considera duas variáveis: o tom de cinza do pixel e a média do tom de cinza em torno deste mesmo pixel. No caso é uma região de pixel de raio arbitrário sobre a qual é feita a média associada a esse pixel (essa média é o tom de cinza médio ao redor desse pixel). Então as classes aqui serão justamente o nível de cinza do pixel e a média desse nível associada a esse pixel. Então neste método a variância a ser maximizada será entre essas duas classes (GUO, 2014).

3.2.3.2 Limiar Global

Este método é mais útil quando não se tem uma variação significativa entre a sequência de fatias de uma tomografia. Assim, seleciona-se um limiar global no histograma que será aplicado a todas as imagens.

Naturalmente, por ser uma seleção manual, ela está sujeita a erros. E se o erro for considerável para uma fatia, haverá uma propagação desse erro para as outras fatias, as quais serão binarizada também de forma incorreta. Geralmente esse erro não é sempre tão grande, pois os softwares atuais facilitam a visualização da região incluída na região de interesse do histograma. Isso, por sua vez, ajuda em uma maior precisão dessa binarização.

Além disso, busca-se sempre selecionar a região de interesse do histograma sem incluir objetos que não correspondem com o objeto que se deseja quantificar na imagem. Isso acontece porque um mesmo tom de cinza que pode ser tecido mole, pode corresponder ao osso (para pequenas regiões da imagem). Assim, essa binarização manual busca sempre binarizar aquilo que se tem certeza.

3.2.4 Filtragem

O nome para esta parte do processamento é bastante apropriado. O que se deseja, frequentemente, é “filtrar” uma imagem no sentido de extrair dela determinadas “impurezas”, que nada mais são do que objeto indesejáveis capturados juntamente com o objeto de estudo. E cada imperfeição na imagem requer um filtro específico que irá restaurar a imagem para um estado melhor que o inicial.

Em geral, existem dois tipos de filtros, classificados baseados no seu propósito: um para a remoção de ruídos e o outro para o realce de bordas. O primeiro busca suavizar a imagem, dando a ela uma transição mais suave entre os tons de cinza. O segundo tem por finalidade realçar as bordas, a fim de melhorar a delimitação de determinados objetos na imagem.

3.2.4.1 Filtros para Remoção de Ruídos

É comum encontrar imagens digitais muito ruidosas. Elas aparecem com diversos pontos, geralmente brancos ou pretos, que não batem com o tom de cinza dos pixels da redondeza. A fim de remover tais ruídos, alguns filtros podem ser aplicados a fim de suavizar a imagem, deixando-a mais uniforme.

O *Filtro Média* é bem simples e rápido e, dependendo da aplicação, pode ser bem eficiente. Esse filtro analisa pixel por pixel da imagem e substitui o valor do tom de cinza do pixel em análise pela média dos valores dos pixels da redondeza multiplicado por um fator de peso $W = 1/NM$, onde NxM é a ordem da matriz de pixels que será usada no cálculo da média para um dado pixel. Este filtro é bastante útil, mas acaba retirando valores de alta frequência na imagem. O resultado é a suavização, muitas vezes indesejada, das bordas, e não somente do ruído. Assim, este é um filtro chamado passa-baixa, por é muito eficaz em retirar valores de baixa frequência, suavizando a imagem (SOLOMON et BRECKON, 2011).

O *Filtro Mediana* é semelhante. A diferença é que esse valor de pixel não mais será substituído pela média da matriz de pixel na redondeza, mas pelo valor da mediana desses

pixels. Como a mediana é o valor que divide uma distribuição em partes iguais, esse filtro não criará um tom de cinza, mas usará um valor dos pixels da redondeza. Por isso este filtro acaba sendo mais eficaz do que o Filtro Média. Além de suavizar ruídos, valores de alta frequência são mais bem preservados do que no Filtro Média (SOLOMON et BRECKON, 2011).

3.2.4.2 Filtros para Realce de Bordas

Quando se trata de realce de bordas, alguns filtros se destacam. Um deles é o *Filtro Laplaciano*. Este filtro utiliza a segunda derivada para realçar contornos na imagem. Dessa forma, o Laplaciano é aplicado à imagem. Assim, como resposta dessa aplicação, as regiões mais suaves (com transição suave entre os tons de cinza) terão como resultado um valor nulo ou quase nulo. E as regiões de transição mais rápida, isto é, nos contornos, terão um valor alto como resultado desta aplicação. Assim, a imagem final é dada por:

$$I_{final} = I_{original} - \nabla^2(I_{original}) \quad (3)$$

Onde I_{final} e $I_{original}$ são as imagens final e inicial nesta operação de filtragem e $\nabla^2()$ representa a função Laplaciano. Dessa forma, a imagem final terá maximizada as regiões de contornos subtraindo da imagem original o Laplaciano desta mesma imagem que se tinha a princípio (SOLOMON et BRECKON, 2011).

Além deste, existe outro chamado *Máscara de Nitidez* (do inglês. Unsharpening Mask). Este filtro utiliza um filtro Gaussiano para suavizar a imagem original, cujo resultado é subtraído da imagem original, obtendo assim uma imagem com bordas realçadas. Em operações matemáticas:

$$I_{bordas} = I_{original} - I_{suavizada} \quad (4)$$

Onde I_{bordas} , $I_{original}$ e $I_{suavizada}$ são respectivamente as funções que representam as imagens com bordas realçadas, a original e a suavizada. A partir deste resultado acima que a

imagem original irá ser realçada, pois o resultado da equação acima é somado com a imagem original. Isso resulta em uma imagem com mais destaque nas bordas do que a original. E então:

$$I_{final} = I_{original} + k(I_{bordas}) \quad (5)$$

Onde I_{final} representa a função da imagem final, já realçada. O fator k , que varia de zero a um, é importante para controlar a quantidade de realce que será dado à imagem original. Se a imagem original está muito suave em toda a sua extensão, um valor de k mais alto será requerido para se obter um resultado melhor (SOLOMON et BRECKON, 2011).

3.3 O HIV

Os vírus são organismos com material genético que fora de seus hospedeiros estão adormecidos e não possuem características de um ser vivo, tais como desenvolvimento ou multiplicação. Todavia, nas condições ideais dentre de um hospedeiro, o vírus é ativado e começa a utilizar as células do organismo invadido como meio de reprodução de si mesmo.

A estrutura viral é basicamente composta de ácido nucleico (RNA ou DNA) envolto em uma cápsula proteica (alguns, no entanto, são constituídos somente de ácido nucléico). O ciclo de reprodução viral é dividido em seis fases, que possui uma sequência lógica. De início ocorre a *ligação* do vírus com a célula. Em seguida vem a *inserção* do mesmo na célula, seguido de um *descobrimento* da camada envoltória, liberando o material genético do vírus. Então ocorre a *biossíntese* (multiplicação do material genético) seguida da *reorganização* do material viral. E por fim ocorre a *liberação* do mesmo no meio exterior da célula, produzindo novos vírus que reproduzirão o ciclo em outras células (DIMMOCK et EASTON et LEPPARD, 2016).

O HIV (do inglês, Human Immunodeficiency Virus) tem origem nos primatas. Dessa forma, o HIV é uma zoonose (doença que pode ser transmitida por animais), que teve os primeiros casos registrados no continente africano e em seguida se tornou uma ameaça global. A infecção por HIV começou a se tornar conhecida entre as décadas de 80 e 90 do século passado (DIMMOCK et EASTON et LEPPARD, 2016). Devido ao seu rápido

progresso na infecção e ausência de fármacos que pudessem combatê-lo, em pouco tempo tornou-se uma ameaça biológica mundial.

Com o passar dos anos, pesquisas foram sendo realizadas e foi-se descobrindo a forma como o vírus infecta as pessoas. Dentro do indivíduo, ele ataca principalmente as células T CD4⁺, que são células de defesa do organismo contra ameaças externas (vírus, bactérias, fungos, etc). Essas células possuem receptores que se combinam quimicamente com os receptores do vírus, permitindo ao mesmo se ligar à célula e se fundir com ela. No interior celular, o vírus se desfaz e somente seu RNA permanece, o qual é lido pelos ribossomos que, de forma reversa, geram uma molécula de DNA associado com esse RNA viral (processo de transcriptase reversa).

Esse DNA viral produzido pelo material da própria célula migra para o núcleo celular e é integrado ao DNA humano na célula. Então esse DNA modificado é usado pela célula normalmente, a qual usa suas informações para guiar toda a síntese de proteínas necessárias. No entanto, como está mesclado com o DNA viral, a produção que codificada será de novas proteínas e DNAs associados ao vírus. Assim, é como se o vírus controlasse a célula e utilizasse todas as organelas celulares em benefício próprio (DIMMOCK et EASTON et LEPPARD, 2016).

Por fim, o material genético já multiplicado migra para a superfície, onde os receptores virais ficaram na fusão do vírus com a célula. Esses receptores são então utilizados pelos novos materiais genéticos virais replicados, a fim de formar novos vírus que infectarão outras células, dando continuidade ao processo. Por dia, cerca de 10 bilhões de novos vírus são criados em um indivíduo infectado (JENSEN et JAEGER, 2005).

Caso não seja combatida, a infecção irá continuar a destruir as células de defesa do organismo, fragilizando o sistema imunológico do indivíduo. Quando o número de linfócitos T CD4+ alcançam o valor abaixo de 200 células/ μ l, diz-se que esse indivíduo infectado por HIV está com *aids* (do inglês, *Acquired ImmunoDeficiency Syndrome*).

Atualmente a forma de se combater o vírus é por meio de uma terapia com antirretrovirais – ART (do inglês, *AntiRetroviral Therapy*). Esse tratamento consiste na ingestão de medicamentos que neutralizam processos importantes na fase de multiplicação do vírus, tais como:

- Inibidores de fusão. Inibem a ligação química entre os receptores do vírus e das células de defesa;
- Inibidores de transcriptase reversa: atuam impedindo o processo de produção de DNA viral após a entrada do material genético do vírus na célula;
- Inibidores de protease: impedem a maturação do vírus ao impedir que determinadas enzimas (proteases) recortem as proteínas produzidas pela célula.

O tratamento possui sempre uma combinação de vários ARTs, visto que o vírus se adapta facilmente a um único tipo de medicamento, criando uma resistência ao mesmo. Assim, faz-se uma associação de pelo menos três tipos de ARTs, a fim de tornar praticamente nula a probabilidade de um vírus se adaptar simultaneamente a todos os tipos de medicação (DIMMOCK et EASTON et LEPPARD, 2016).

A fim de verificar a eficácia do tratamento, o indivíduo deve realizar com certa frequência a verificação da *carga viral*. Esta nada mais é do que a contagem de células T CD4+ e de vírus por mililitro de sangue. Quanto maior a quantidade de células T CD4+, menor será a quantidade de vírus presentes nesta amostra. Assim, o objetivo é tornar a carga viral tão baixa quanto possível (indetectável).

Ao contrário do que se pode pensar, a carga viral indetectável em uma amostra não significa ausência de vírus no sangue ou em fluidos corporais. Conforme tem sido verificado (POLITCH et al., 2012), a quantidade de HIV no sémen não foi eliminada, apesar dos indivíduos estarem sob tratamento e com baixa carga viral. Isso confirma mais uma vez que o tratamento melhora a qualidade de vida do paciente, mas não o impede de contaminar outras pessoas, visto que o vírus ainda está presente em seu corpo.

Como toda infecção, o HIV tem suas formas de contágio. Elas são através de:

- Relação sexual (vaginal, anal ou oral)
- Transfusão de sangue
- Seringas utilizadas
- Sangue contaminado
- Durante o nascimento (mãe portadora de HIV)
- Durante a amamentação (leite materno de portadora de HIV)

As pessoas com HIV devem sempre utilizar preservativo em suas relações. Mesmo os indivíduos que possuem parceiro fixo também portador do HIV devem utilizar preservativo, pois o vírus é altamente mutante, o que a longo prazo pode trazer sérios danos aos indivíduos. Elas também não estão aptas a doar sangue, já que pessoas doadoras não devem ser portadoras de nenhuma infecção no momento da doação.

3.4 Microarquitetura Óssea

Assim como os outros órgãos, os ossos do corpo humano são uma estrutura complexa e dependem do bom funcionamento de suas células para se manterem saudáveis. Essas células são responsáveis por manter um crescimento organizado de cada região do osso. Todo esse conjunto de estruturas internas ao osso formam o que se chama de microarquitetura óssea, e seu entendimento é de suma importância para diagnosticar, tratar ou prevenir doenças que atingem a saúde do osso.

3.4.1 Estrutura do Osso

O osso é uma estrutura que está presente por todo o corpo humano e abriga funções vitais para a sobrevivência e adaptação ao meio ambiente. Possui funções variadas, como proteção de órgãos internos, sustentação de todo o corpo humano e abrigo para a medula óssea, a qual é responsável pela fabricação de células sanguíneas importantes. Fica claro, assim, que o osso é mais do que uma simples estrutura rígida, mas carrega dentro de si células importantes para o funcionamento adequado do organismo.

A estrutura óssea na fase adulta do ser humano pode ser dividida em duas partes principais: osso cortical e osso trabecular. Aquele é caracterizado por ser mais denso e rígido e envolve a estrutura externa dos ossos no corpo. A região cortical se desenvolve mais quanto maiores são as tensões e impactos sofridos por aquele osso. O trabecular, por sua vez, consiste em uma estrutura vazada, como um emaranhado de teias de aranha, que preenche o

interior dos ossos. É composta de camadas que se formam paralelamente ao eixo em que as tensões são aplicadas naquele osso.

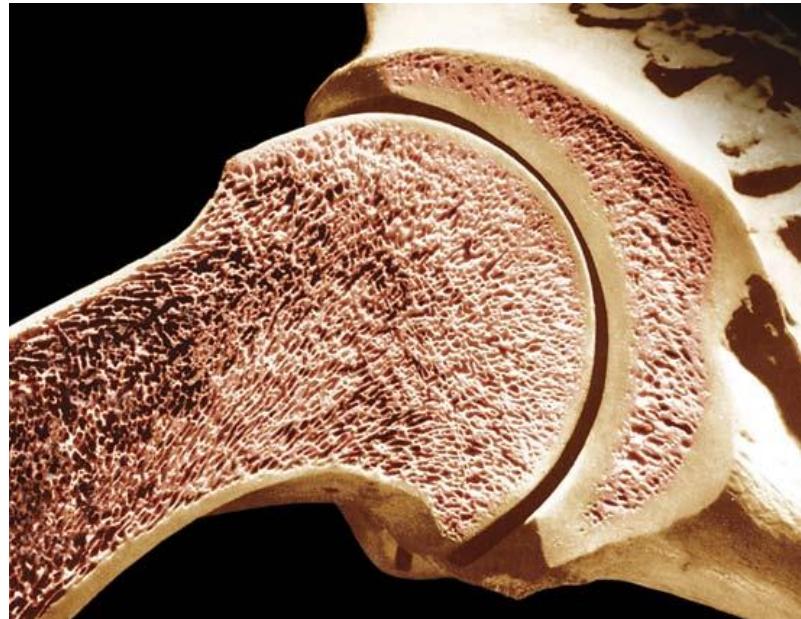


Figura 12. Osso trabecular (esponjoso) sendo envolvido pelo cortical (mais denso) (Compact Bone: ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA, 2016).

Os osteoclastos são células que participam do processo de destruição do tecido ósseo. Cada célula dessa possui em sua maioria de 5 a 20 núcleos, podendo chegar a possuir até 200 núcleos. Elas degradam a matriz colágena e liberam o cálcio do osso e permitem que o tecido ósseo tome nova forma conforme as tensões e pressões recebidas. Essas células dissolvem o tecido ósseo e vão liberando enzimas para remover o colágeno restante na matriz óssea. À medida que vão reabsorvendo o tecido ósseo, moléculas e substâncias ativas para o bom funcionamento do organismo são liberadas na corrente sanguínea (ROGERS, 2011).

Os osteoblastos são responsáveis pelo processo de reconstrução óssea das regiões vazias deixadas pela ação dos osteoclastos. Tais células depositam uma matriz colágena (osteóides) recém-sintetizada e depositada nas lacunas de reabsorção. O colágeno funciona como uma espécie de meio aderente para que minerais como cálcio e fosfato comecem a se cristalizar ao longo do processo, dando rigidez à matriz óssea recém-formada.

Essas duas células exercem um papel fundamental no remodelamento ósseo que ocorre de acordo com as tensões e pressões exercidas sobre o osso. Os osteócitos são osteoblastos que ficaram presos na matriz óssea por meio de sua própria à base de colágeno. São eles os responsáveis por identificar essas variações na tensão recebida pelo osso e, conforme a necessidade, aumentar a matriz óssea (isto é, aumentar a ação dos osteoblastos) ou diminuí-la (aumentar a ação dos osteoclastos) em determinadas regiões do osso.

O corpo humano tem um ápice de ação dos osteoblastos em torno de 20 a 25 anos. Assim, por conta da diminuição da atividade dessas células, os ossos vão perdendo massa e se tornando mais frágeis com o passar da idade, pois a ação dos osteoclastos é maior comparada a dos osteoblastos (ROGERS, 2011).

O processo descrito é chamado remodelação óssea, pois refere-se a uma ação continua de criação de destruição da matriz óssea. Já a modelação óssea está ligada ao crescimento da matriz óssea, aumentando em massa e rigidez a estrutura do osso. Esses dois processos são de fundamental importância, pois, caso não existissem, o osso seria uma estrutura inflexível a mudanças. Isso limitaria a mobilidade humana, além de tornar os ossos mais frágeis a fraturas, já que o tecido não responderia a mudanças de hábito do indivíduo.

Apesar de haver muitas teorias sobre como o osso “entende” a direção que deve ser reforçada baseada nestas forças externas, uma delas é baseada na variação do campo elétrico. Os minerais que compõem o osso são cristais com propriedades elétricas. Segundo esta teoria, as regiões de tensão funcionariam como ânodo, e as de compressão como cátodo. Assim, um sinal elétrico seria responsável por transmitir esse sinal para a região e direção do osso que é mais exigida (ROGERS, 2011). No entanto, a única coisa que é possível afirmar é que de fato o osso tem essa capacidade de responder às mudanças de hábito do indivíduo, alterando sua estrutura conforme as cargas recebidas (PONTZER, 2006).

Na região cortical existem canais chamados de Harvesianos responsáveis por conduzir o fluxo sanguíneo através dos ossos, levando todo o suprimento necessário aos osteócitos, a fim de manter saudável toda a estrutura óssea. Esses canais são circundados pelos ósteons, estrutura cilíndrica formada por vários anéis concêntricos de osteócitos (figura abaixo).

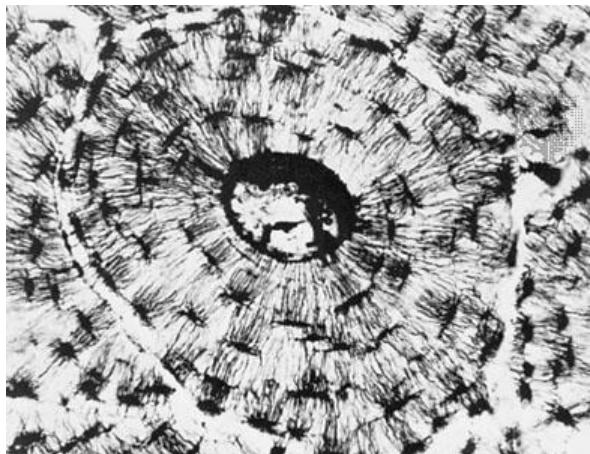


Figura 13. No centro está o canal Harvesiano circundado pelo ósteon; este é formado por vários anéis concêntricos de osteócitos (pontos pretos) (Osteocyte: ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA, 2016).

Com relação a sua composição, os ossos são formados principalmente de colágeno e minerais, sendo a hidroxiapatita o principal. O colágeno é uma das muitas proteínas do corpo e se organiza paralelo ao eixo ósseo na forma de fios longos ou em grupos aglomerados. Sua característica principal é a flexibilidade, que confere ao osso a maleabilidade para se adequar às variadas tensões a qual é submetido (ROGERS, 2011).

Muitas vezes não há deficiência de colágeno, mas pelo fato das proteínas não estarem ligadas umas às outras, o osso perde sua flexibilidade e torna-se mais suscetível a fraturas. Estas, todavia, podem ser causadas também pela deficiência de minerais, os quais conferem rigidez necessária ao osso para suportar as tensões.

O processo de mineralização óssea ocorre com a participação dos osteoblastos. À medida que essas células secretam a matriz colágena. É a partir daí que será gerada toda a matriz óssea. A síntese de colágeno no interior da célula e a formação do colágeno em fios longos dá base para o processo de mineralização. O contato da matriz colágena com o cálcio forma complexos de proteína glicosaminoglicano que se fixa na matriz óssea. A partir de um determinado tamanho dessa matriz em formação, o processo se torna espontâneo e a mineralização tem prosseguimento através do contato destes complexos de glicosaminoglicano com o fósforo e cálcio presentes no sangue (ROGERS, 2011).

A densitometria óssea busca avaliar essa quantidade de minerais presente no osso através do parâmetro BMD (do inglês, Bone Mineral Density). Como a baixa quantidade de

minerais tem uma forte relação com a fragilidade óssea (SPLATE, 2008), a quantificação da BMD é muito importante para avaliar a saúde do osso do indivíduo. Semelhantemente a uma radiografia, na densitometria ocorre uma projeção da densidade óssea. Assim, a densidade mineral óssea de cada osso que o feixe de raios X passou se soma. Isso, em muitos casos, dá como resultado um falso negativo, isto é, acusa uma falsa normalidade na BMD. No entanto, para a maioria dos casos a densitometria dá resultados bastante consistentes.

3.4.2 Parâmetros Ósseos

Ao analisar a estrutura do osso, algumas quantidades, chamadas de parâmetros ósseos, são importantes para verificar a normalidade de toda a matriz óssea. A seguir, alguns desses parâmetros são explicados, a fim de compreender melhor os resultados obtidos.

3.4.2.1 Fração de Ganho de Tecido Ósseo

Analizando o rádio e tibia, nota-se um aumento de massa óssea na extremidade do osso (região distal) em relação ao seu centro (região proximal). Isso porque, apesar do osso cortical (mais denso) ser mais abundante no centro do osso do que na região distal, nesta ocorre um alargamento do osso (como pode ser visto na figura abaixo), o que permite um aumento de tecido ósseo principalmente devido à região trabecular. Naturalmente, a região englobada pelas 110 fatias de microtomografia não é tão grande. No entanto, mesmo nesta pequena região, é possível quantificar um aumento de massa óssea na região distal em relação à proximal em ambos os grupos (controle e paciente).

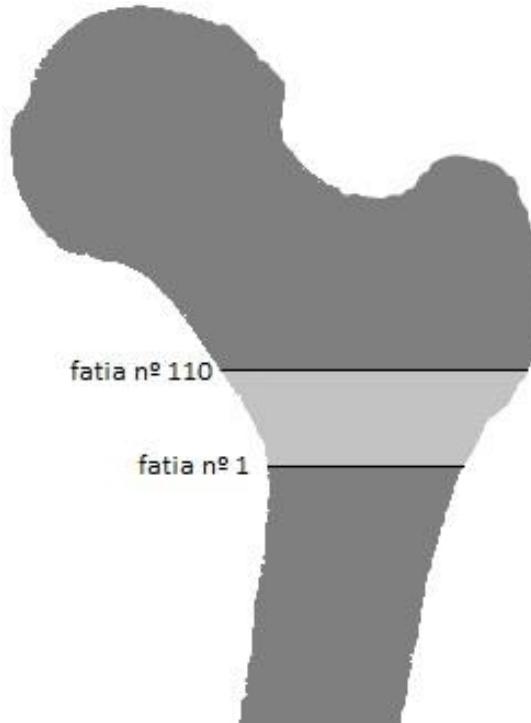


Figura 14. Ilustração do conceito de FGTO em um fêmur (elaborada pelo autor).

Dessa forma, a Fração de Ganhos de Tecido Ósseo (FGTO), ilustrada na figura acima, foi definida como:

$$FGTO = \frac{ATD - ATP}{ATP} \quad (6)$$

Onde ATD é a Área de Tecido Distal (fatia de número 110) e ATP é a Área de Tecido Proximal (primeira fatia). A subtração no numerador mostra o quanto foi ganho de tecido em área da última fatia em relação à primeira. E a divisão sobre a Área de Tecido Proximal mostra o quanto esse ganho de tecido representa em relação à área da fatia proximal. Em porcentagem, temos simplesmente:

$$FGTO(%) = FGTO \times 100\% \quad (7)$$

3.4.2.2 Grau de Anisotropia

A anisotropia é, de forma geral, uma diferença entre as propriedades físicas apresentada por determinado objeto. Um cristal pode, por exemplo, apresentar índices de refração diferentes a depender da direção que o feixe luminoso incide no mesmo. Outro exemplo é a elasticidade de uma estrutura, pois ao se aplicar uma força em uma direção do objeto pode se obter uma elasticidade maior do que ao se aplicar a mesma força em uma direção diferente. Tal conceito é oposto ao de isotropia, quando tais propriedades são as mesmas independentemente da direção estudada.

Expressando esse conceito em termos matemáticos, a anisotropia é um tensor de segunda ordem e representado por uma matriz 3x3. Naturalmente, um objeto totalmente isotrópico é representado pela matriz identidade, pois toda operação aplicada a essa matriz resultará em um mesmo resultado em qualquer direção estudada. Mas para o caso de uma matriz anisotrópica, seus coeficientes matriciais podem assumir valores não-nulos fora da diagonal principal e diferentes da unidade na diagonal principal.

A matriz de anisotropia é ortogonal porque a forma dessa matriz está relacionada com os três eixos ortogonais no objeto. Dessa forma, tal matriz pode ser diagonalizada, cujos elementos da diagonal principal serão os autovalores que descreverão o coeficiente de anisotropia na direção de cada um dos três eixos chamados de principais no objeto.

Assim, por meio desses três autovalores, o Grau de Anisotropia pode ser expresso através de um único número definido como:

$$GA = 1 - \frac{\lambda_{min}}{\lambda_{max}} \quad (8)$$

Onde λ_{min} é o menor autovalor obtido e λ_{max} é o maior, dada uma matriz de anisotropia.

A definição acima é usada pelo software CTAn para calcular a anisotropia de uma dada amostra. Para calcular a anisotropia é o usado o conceito de Comprimento de Interceptação Média (do inglês, *Mean Intercept Length*). A ideia central é traçar uma reta

que intercepta o objeto e dividir o comprimento dessa reta pelo número de vezes que a mesma atravessa uma parte da estrutura do objeto. Em outras palavras, para um objeto binarizado, onde branco é o objeto, o número de vezes é determinado pela quantidade de vezes que a reta encontra um pixel branco (SKYSCAN, 2013b).

Esse procedimento é feito em várias direções. E através do resultado de cada direção é construída a matriz de anisotropia. Computacionalmente, o software engloba o objeto (e.g. amostra de osso) por um elipsoide, onde os três eixos do elipsoide são ortogonais. E dessa forma, é possível diagonalizar a matriz e obter os três autovalores associados a cada eixo. E por fim, o grau de anisotropia é calculado (SKYSCAN, 2013b).

3.4.2.3 Densidade de Conectividade

Quando se trata de estruturas complexas, como o caso da estrutura do osso trabecular, faz-se necessário definir a *conectividade* de uma dada amostra. Esse parâmetro é de fundamental importância, pois duas amostras podem ter a mesma fração de volume, a mesma porosidade, mas uma possuir poros mais conectados uns aos outros do que outra.

Assim, a conectividade pode ser entendida como uma medida da distância que se pode percorrer na amostra em uma direção qualquer partindo de um ponto arbitrário através de caminhos na amostra. Dessa forma, o valor de conectividade não pode variar com a direção, ou seja, é uma grandeza escalar (ODGAARD, 1997).

Topologicamente falando, é preciso definir *tree* como uma rede na qual existe somente um caminho entre dois nós. Assim, essa rede é *simplesmente conexa*. Caso um outro caminho para sair de um nó e chegar a outro seja adicionado, então essa estrutura é chamada de *multiplamente conexa*. Assim, a conectividade pode ser definida como o maior número de caminhos que pode ser retirado da amostra sem que ela seja separada, isto é, suas muitas regiões continuem conectadas minimamente (ODGAARD, 1997).

De forma mais precisa, a conectividade é relacionada com o número de Euler (χ) por:

$$\chi = \beta_0 - \beta_1 + \beta_2 \quad (9)$$

Onde β_0 é o número de partículas de osso. Assim, se o osso está fragmentado em n partes, $\beta_0 = n$. E além disso, β_1 é a conectividade da amostra e β_2 é o número de cavidades completamente rodeadas por osso. É consenso que, como o osso é completamente conectado (ainda que não seja, é uma ótima aproximação), $\beta_0 = 1$. E também, como o número de cavidades (vazios) completamente rodeadas por osso é nula, $\beta_2 = 0$. E então a expressão pode ser simplesmente dada por (ODGAARD, 1997):

$$\chi = 1 - \beta_1 \quad (10)$$

E a partir dessa expressão, a *densidade de conectividade* pode ser expressa como a própria conectividade dividida pelo volume total da amostra:

$$\delta = \frac{\beta_1}{V} \quad (11)$$

Logo, a unidade da densidade de conectividade é o inverso do volume, visto que a conectividade é adimensional.

3.4.2.4 Área da Seção Transversal do Osso

Outro parâmetro investigado foi a área da seção transversal da região da tíbia e rádio tanto na posição distal quanto na proximal. Dessa forma, foi escolhida a primeira e última fatia dentre as 110 obtidas com o objetivo de verificar uma possível alteração na morfologia do osso devido à presença do vírus e/ou antirretroviral.

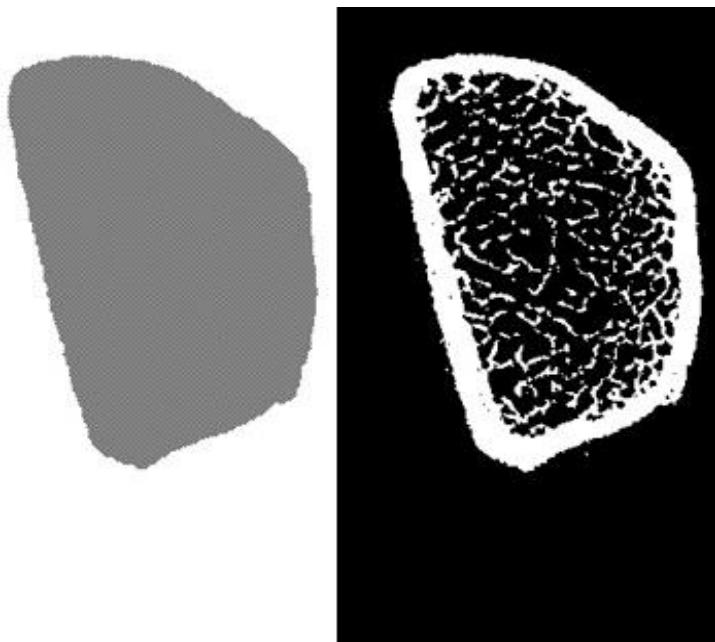


Figura 15. À esquerda é a Área da Seção Transversal da fatia de microtomografia do respectivo osso à direita (elaborada pelo autor).

3.4.2.5 Área de Tecido da Seção Transversal

Em contraste com a Área da Seção Transversal do Osso, a Área de Tecido dá o valor de área do que realmente é tecido ósseo, excluindo as regiões de vazio. Assim, é possível verificar se houve alguma alteração na quantidade de tecido ósseo entre Controles e Pacientes. Na figura acima, a região branca na figura da direita representa essa área de tecido quantificada.

4 Metodologia

4.1 Critérios de Seleção dos Indivíduos

Para este estudo foram formados dois grupos, a saber, indivíduos controle e indivíduos paciente. O primeiro grupo é formado de indivíduos que não são HIV-positivo, enquanto que o segundo, é composto por indivíduos HIV-positivo e que estão sob tratamento há pelo menos um ano e duração mínima da infecção de cinco anos. Os indivíduos são do sexo masculino e acima de 50 anos com IMC (Índice de Massa Corpórea) maior que 18,5. Esses indivíduos não podem fazer uso regular de medicamentos que interfiram na homeostase óssea (e.g. corticoides, hormônios sexuais ou antiepilepticos). Além disso, não devem ter histórico de neoplasia (câncer) nos últimos cinco anos, nem possuir insuficiência renal ou diabetes.

O paciente é então levado para a realização do exame de microtomografia clínica (HR-pQCT). Antes do exame o operador do microtomógrafo pergunta se o paciente já sofreu alguma fratura na região do exame (tibia ou rádio) e com qual mão que escreve. Em caso negativo de fratura, a realização do exame é feita na tibia e rádio do lado oposto ao de escrita. Em caso positivo de uma fratura na região do exame com menos de 5 anos, realiza-se o exame no membro oposto à fratura, pois o osso sofre alteração em sua microarquitetura após uma fratura, alterando, dessa forma, alguns parâmetros ósseos.

O paciente só retira então adereços metálicos do braço e perna onde serão realizados os exames (pulseira, anel, relógio). O molde então é fixado no braço do indivíduo e o exame é realizado. Posteriormente o mesmo é feito com a perna do indivíduo. O operador avisa ao indivíduo que é necessário ficar o mais imóvel possível por quase 3 minutos e não movimentar nenhuma parte do corpo.

A ordem adotada é primeiro o rádio e depois a tibia. Caso as duas primeiras tentativas de exame no rádio falhem, muda-se para a realização do exame na tibia. Após este, volta-se para aquele para uma terceira e última tentativa, pois, caso o paciente mexa, uma tentativa adicional não traria indícios de um bom exame (baseado nas tentativas anteriores). E, além

disso, seria expor o paciente a uma dose de radiação a mais (muito provavelmente, baseado nos exames anteriores, esse paciente continuará a se mexer), o que violaria o princípio ALARA de minimização da dose absorvida pelo paciente. Caso a tibia se movimente as tentativas são seguidas (por ser o último exame, depois do rádio).

4.2 Aquisição dos Exames

Após posicionar o membro do paciente dentro da máquina, o operador deve selecionar a região do osso que será microtomografada. Essa região é determinada através da linha de referência. A região de interesse (das 110 fatias) é escolhida com base em uma geometria existente em cada osso, uma espécie de proeminência que a extremidade de cada rádio tem, uns mais acentuados, outros menos. Essa região fica localizada em torno da terça parte da extremidade como é possível ver logo em seguida na Figura 16. Tal característica facilita a seleção, com uma boa precisão, da faixa de região de interesse em cada paciente. Isso permite uma comparação para determinar alguma possível alteração óssea entre os grupos controle e paciente.

E de forma análoga ao rádio, a tibia também tem uma região comum em cada paciente que é escolhida como referência. Esta região é chamada de platô tibial na extremidade de cada tibia e a Figura 16 abaixo também mostra a linha de referência sobre este vale.

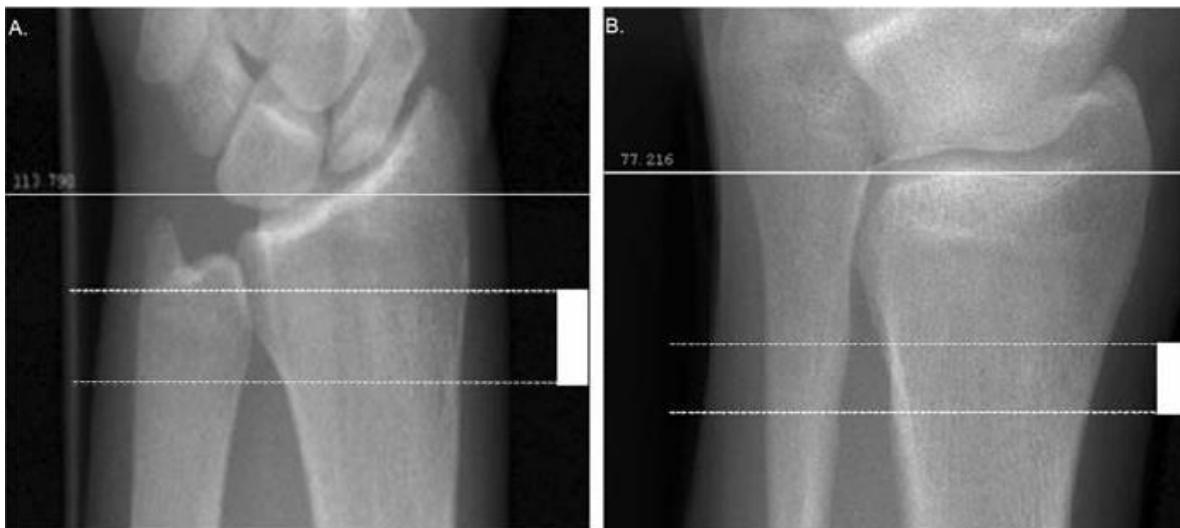


Figura 16. Imagens do “Scout-View”, onde é selecionada a linha que referencia (linha contínua e mais espessa) que determinará a região analisada entre as linhas pontilhadas (MACDONALD et ali, 2011).

Após isso, o exame é realizado e as projeções reconstruídas. E com isso, as 110 fatias são exportadas. Na aba de “Task”, clica-se em “Evaluation 3D” e escolhe-se a opção de exportação para o formato DICOM. Existe também a possibilidade de exportar para o formato TIFF. No entanto, por ser um formato largamente utilizado para imagens médicas, preferiu-se o formato DICOM. Mas, neste caso, qualquer um dos formatos seria indiferente.

4.3 Segmentação, Processamento e Análise de Imagens

Após obter as imagens exportadas em formato DICOM (.dcm), as mesmas passaram por uma série de passos que maximizaram a quantidade de osso selecionada por meio do nível de tom de cinza de cada fatia (histograma). Dessa forma, com as imagens já binarizadas, foram feitas as análises bi e tridimensional dos parâmetros de interesse.

Para realizar o que foi feito acima foi utilizado um único software, CTAn (Computed Tomography Analysis), versão 1.14.4.1, distribuído pela Bruker, empresa que fabrica microtomógrafos e também possui alguns softwares disponíveis (alguns gratuitos e outros somente para teste). Esse software utilizado realiza o processamento e análise das imagens nele inseridas. Ele possui muitas possibilidades no processamento para tornar a análise dos

parâmetros a mais precisa possível. E na análise, vários parâmetros podem ser extraídos da imagem, o que torna o estudo do objeto de interesse muito mais completo.

Ao abrir as imagens, deve-se antes de tudo selecionar o histograma para a conversão para 8 bits. Ou seja, selecionar a região do histograma original (com uma pluralidade muito maior de tons de cinza) que será convertida para uma imagem de 8 bits (isto é, com 256 tons de cinza). Quanto menor a região do histograma selecionada, maior será o contraste, e mais preciso será o processamento da imagem. No entanto, se a seleção omitir uma região não-nula do histograma, informação útil sobre a imagem será perdida, o que aumentará o contraste, mas tornará imprecisa a análise.

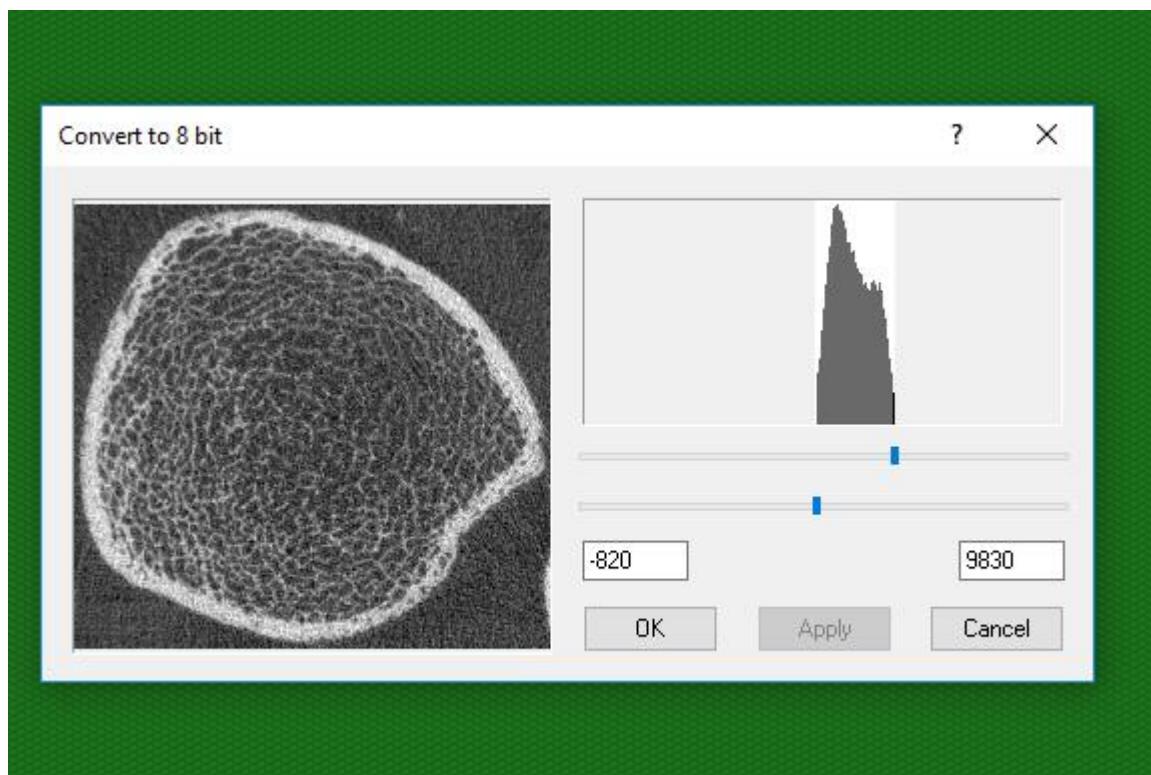


Figura 17. Seleção da região do histograma da imagem original que será convertida para 8 bits com 256 tons de cinza (elaborada pelo autor).

Após clicar em “OK”, abre-se a janela principal do CTAn. Dentre as muitas possibilidades oferecidas pelo software, o interesse é somente em três abas: “*Raw images*”, “*Regions of interest*” e “*Custom processing*”. Na primeira aba é possível ver todas as fatias da imagem

de microtomografia. Na segunda aba é possível selecionar a região de interesse (o rádio, para o braço; e tíbia, para a perna). E na terceira aba é realizado um processamento customizado.

Neste estudo, a primeira aba foi utilizada somente para visualização das fatias do osso. A segunda aba, no entanto, foi importante para selecionar a região de interesse (ROI). Isto é fundamental porque no momento em que for feita a análise é desejável somente o osso de interesse para não haver uma quantificação errônea dos parâmetros.

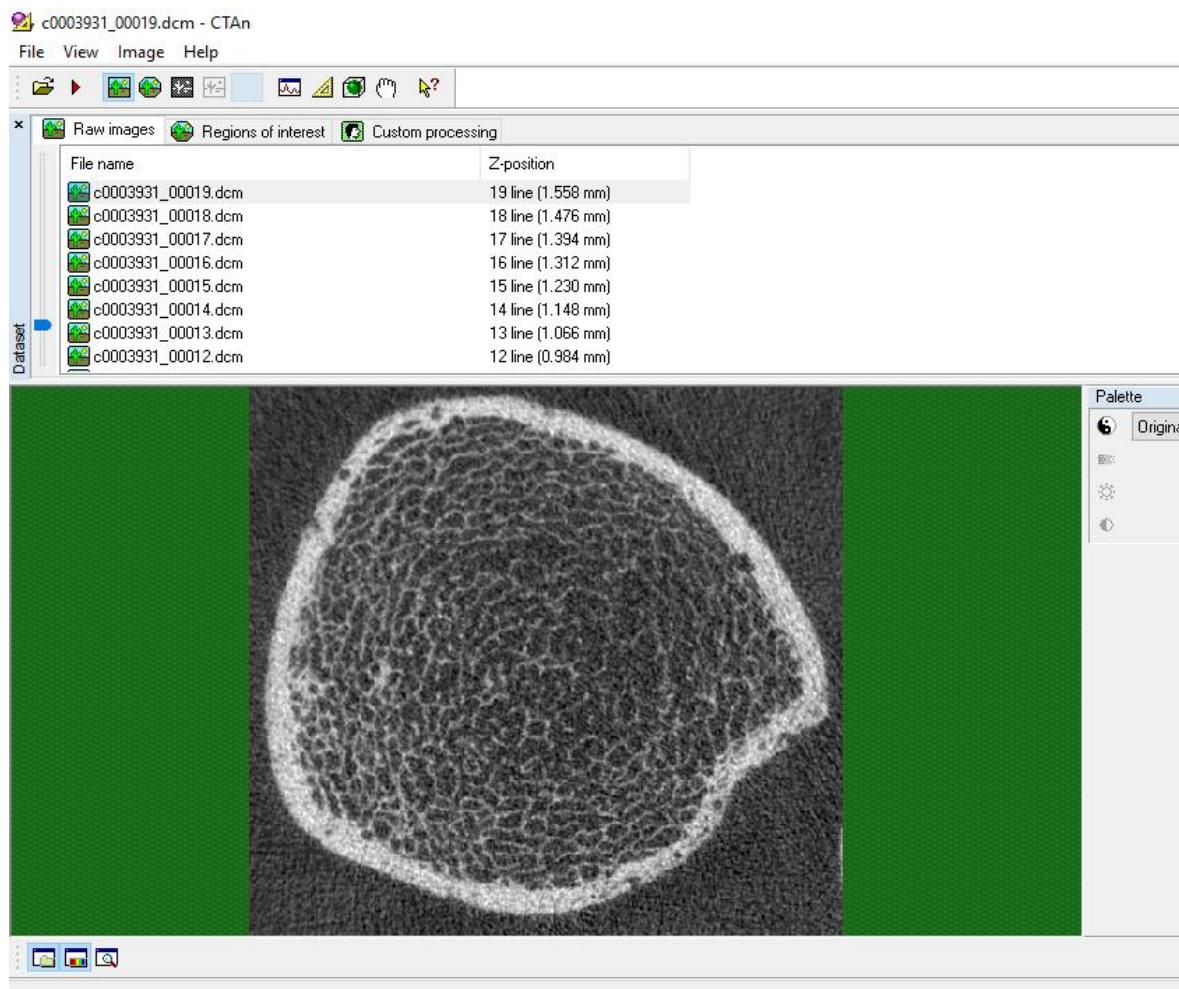


Figura 18. Primeira aba para a visualização da sequência de fatias do osso (elaborada pelo autor).

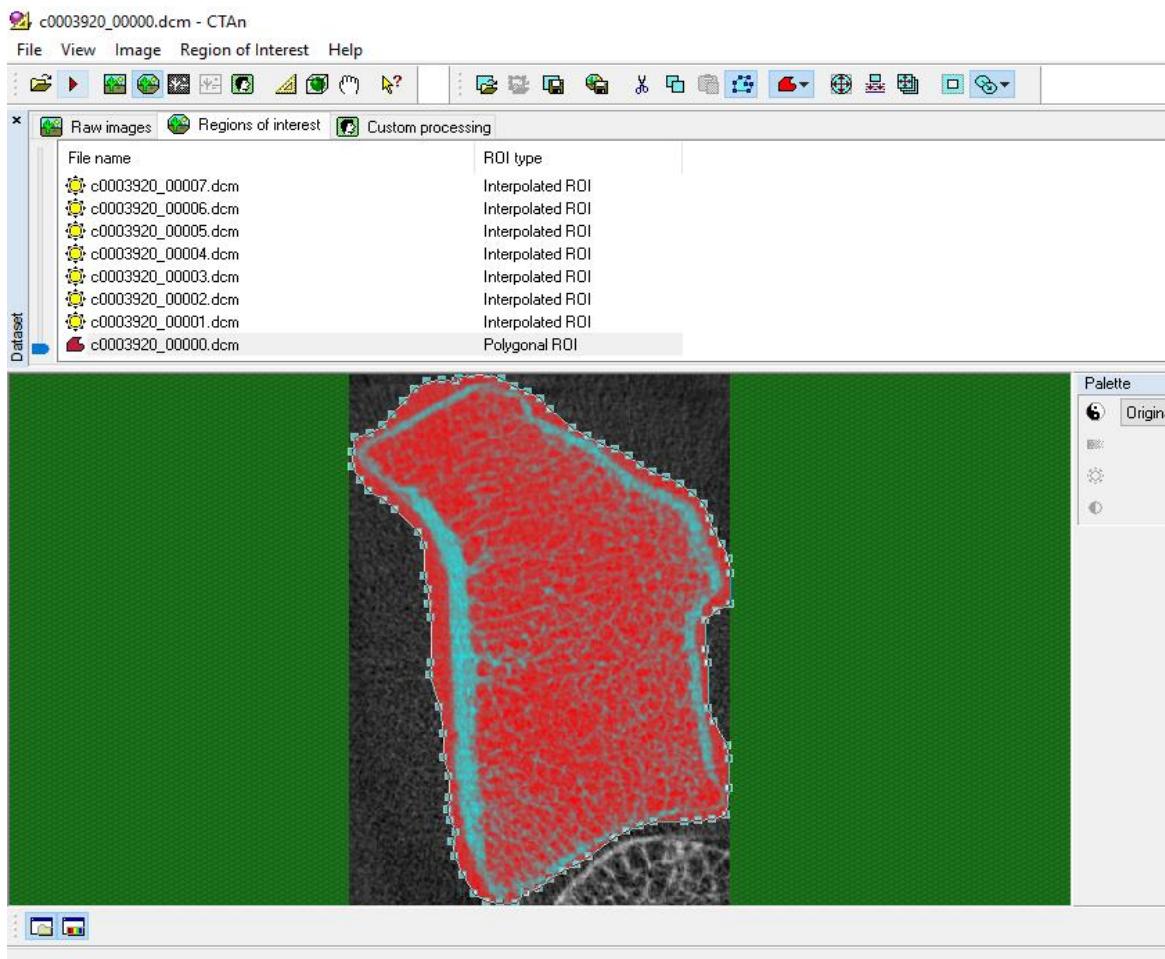


Figura 19. Segunda aba com a região de interesse em vermelho circundando o osso (elaborada pelo autor).

Na figura acima aparece a segunda aba com a seleção do ROI. Como o osso de cada pessoa é diferente, foi necessário contornar manualmente a região de interesse desejada para cada indivíduo. Apesar de cada osso microtomografado possuir 110 fatias, somente é preciso contornar o osso de uma fatia (a da região distal), pois, para as outras, essa região de interesse é simplesmente copiada. E como a região distal possui o osso mais largo, ao copiar essa região inicial em vermelho sobre as outras fatias, mais estreitas, o osso é englobado por essa região de interesse.

Embora o contorno não esteja fiel às fronteiras do osso (conforme é possível ver acima), esse contorno será ajustado de maneira mais precisa às fronteiras do osso em cada uma das 110 fatias no processamento. Esta fase se localiza na terceira aba, onde as imagens

passarão por ajustes (filtros, binarização, eliminação de ruídos) e em seguida pela análise dos parâmetros. Na figura abaixo está a visão geral desta aba.

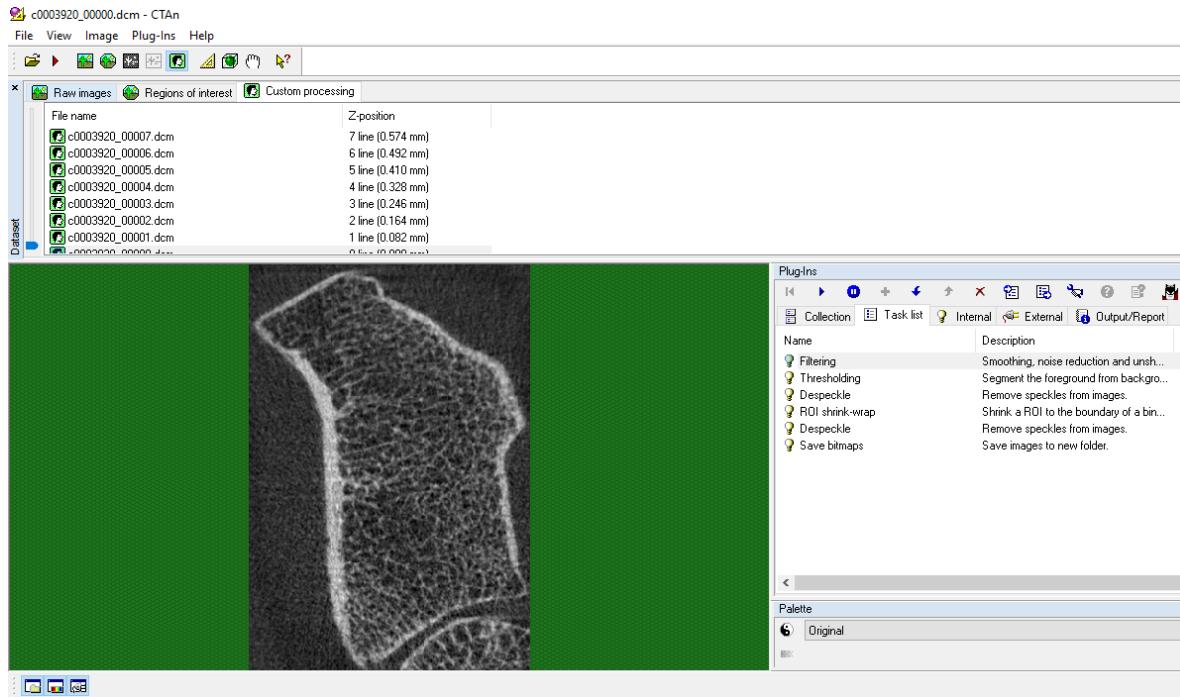


Figura 20. Aba onde serão realizados o processamento e a análise (elaborada pelo autor).

Na sub-aba “*Task list*” estão inclusas todas as ferramentas que serão aplicadas em sequência em todas as fatias. Essas ferramentas foram testadas uma a uma, inclusive a ordem em que elas foram executadas, pois o resultado correto depende disso. Assim, foram utilizadas as seguintes ferramentas:

- *Filtering*. Dentre muitos filtros possíveis, foi escolhido um que realçasse o contraste, visto que a estrutura trabecular é bastante tênue, dificultando a segmentação. O nome do filtro aplicado é “Unsharp mask”. Ele foi aplicado para cada fatia (2D), em uma quantidade de 100% e sem limiar de tom de cinza para sua aplicação, em um raio de 1 pixel.
- *Thresholding*. Essa ferramenta explicita o que é ou não osso através do tom de cinza (binarização). O método para realizar essa separação foi o método de Otsu (Automático) e foi aplicado fatia por fatia (2D) com o fundo preto.

- *Despeckle*. Como a binarização não é perfeita, alguns pixels foram erroneamente classificados como osso (branco). Dessa forma, esta ferramenta é aplicada para retirar esse ruído presente na imagem. Assim, o tipo de ruído a ser removido é “White speckles” aplicado ao volume (3D) para eliminar precisamente o que é ruído. O volume desse ruído foi aplicado para um menor que 1 voxel a toda a imagem.
- *ROI shrink-wrap*. Essa ferramenta itera o ROI contornado manualmente para os limites da região cortical externa. Aplicou-se assim para cada fatia (2D) essa iteração no modo “Stretch over holes” para pixels com diâmetro menor que 2. Esse modo faz com que sejam ignorados pontos isolados, que poderiam aumentar erroneamente a fronteira ao redor do osso.
- *Despeckle*. Tem a mesma função já citada. Mas desta vez foi aplicada somente à região de interesse (ROI) somente que ainda possui ruídos (pontos brancos) externos ao contorno. Como no lado interno do contorno (o osso) não é alterado ao selecionar o ROI para esta ferramenta, o raio do ruído a ser removido pode ser posto tão alto quanto necessário para eliminar todos os ruídos externos a esse contorno. Assim, o raio foi de 500 para garantir que nenhum ruído externo ficaria, aplicado para cada fatia (2D).
- *Save bitmaps*. Imagens são salvas no formato .bmp.

Esse foi a sequência de ferramentas utilizadas para realizar o processamento e análise tanto no rádio quanto na tibia para toda a imagem. No entanto, o processo foi levemente diferente para o rádio. Por conta do contorno irregular da região cortical do rádio em alguns indivíduos, o raio da ferramenta *ROI shrink-wrap* foi alterado. Dependendo do indivíduo, ele variou de 6 a 12 pixels. Mas quanto ao tempo de processamento e análise, ambos foram extremamente rápidos. A duração foi de cerca de 3 minutos em um computador com configurações de uso pessoal (processador Core i3 e 4GB de memória RAM).

Em seguida, para separar a região trabecular da cortical foram utilizadas as imagens salvas na última parte do processamento acima (já binarizadas). A imagem binarizada foi carregada e na aba para traçar o ROI foi feito um contorno da região trabecular. Como o osso vai se tornando mais fino à medida que se vai em direção à região proximal, é necessário

fazer várias regiões de interesse ao longo das 110 fatias a fim de que a interpolação entre dois ROIs seguidos seja precisa. Para a tíbia, um ROI era desenhado a cada 13 fatias e para o rádio, a cada 11 fatias (é número é menor para o rádio porque o osso do rádio muda de espessura mais rápido em relação à tíbia).

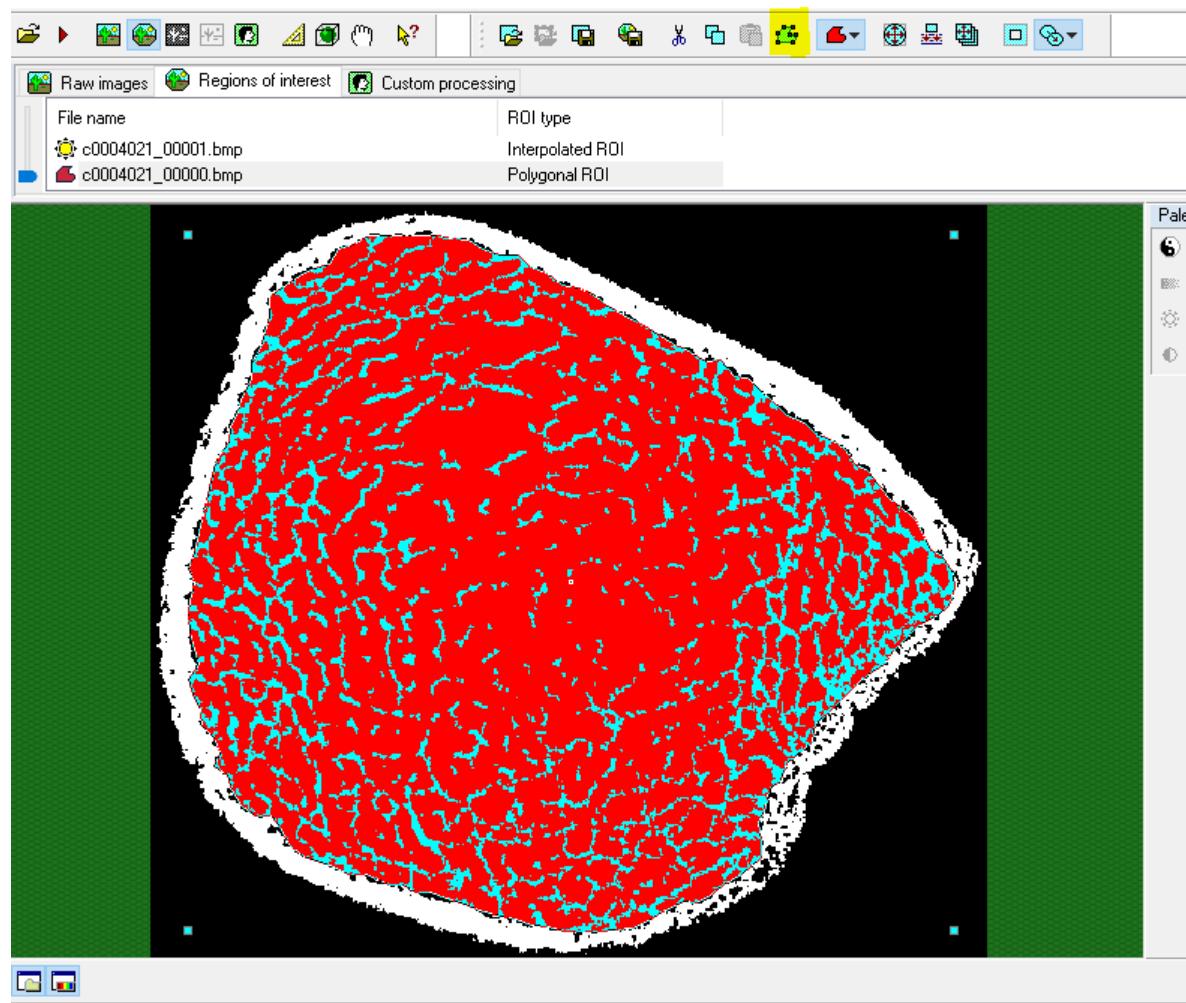


Figura 21. Contorno desenhado com mouse selecionando a região trabecular. A correção do contorno para um melhor ajuste à cortical é possível selecionando o botão destacado em amarelo na figura (elaborada pelo autor).

As expressões que indicam em quais fatias foram desenhadas os ROIs são progressões aritméticas de razão 13 para a tíbia e 11 para o rádio. Assim:

$$a_n = 13(n - 1)$$

$$b_{n'} = 11(n' - 1)$$

O primeiro termo é zero porque a contagem de fatias vai de 0 a 109 (totalizando 110 fatias). Essa expressão vale para $n = 8$ para a_n e para $n' = 9$ para $b_{n'}$, porque acima desses valores de n e n' a fatia onde deveria ser feito o ROI é maior que 109. E como o ROI também é desenhado na última fatia, tem-se no total 9 e 10 fatias para a tíbia e rádio, respectivamente.

Em seguida foi feita a análise com uma Task List para a região trabecular, detalhada abaixo.

- *Thresholding*. Como a imagem já está binarizada, este passo é simbólico. Será somente a separação entre branco e preto.
- *Despeckle*. Remove pequeno pixels da imagem de raio igual ou menor do que dois.
- *2D Analysis*. Esta ferramenta é de análise. Parâmetros bidimensionais de cada fatia são calculados, tais como área de tecido e área da região englobada pelo osso.
- *3D Analysis*. Esta ferramenta também é de análise. Parâmetros tridimensionais são calculados como a anisotropia e a densidade de conectividade.

Após esta “Task List”, uma outra foi realizada para extrair somente a região cortical, visto que a última que foi descrita faz a análise somente da região cortical. Dessa forma, a “Task List” que segue foi realizada.

- *Thresholding*. Novamente uma binarização simbólica.
- *Despeckle*. Remove pequeno pixels da imagem de raio igual ou menor do que dois.

- *Arithmetical Operations.* Esse passo é fundamental para a separação da cortical. A imagem da região de interesse (ROI) é subtraída da imagem completa, restando somente a cortical.
- *Save bitmaps.* Imagens da cortical são salvas no formato .bmp.

Por fim, com as imagens somente da região cortical é feita a análise 2D e 3D. Ao abrir essas imagens da cortical, basta desenhar um ROI único em que todas as fatias estejam incluídas, pois a ferramenta *ROI shrink-wrap* faz os ajustes necessários ao contorno da região. Assim, a “Task List” abaixo para a cortical foi utilizada.

- *Thresholding.* Novamente uma binarização simbólica.
- *Morphological Operations.* Um “opening by reconstruction” é aplicado na imagem, resultando em uma imagem com poros mais bem definidos.
- *Despeckle.* Remove pequeno pixels da imagem de raio igual ou menor do que dois.
- *ROI shrink-wrap.* Análoga à ferramenta acima já utilizada com as mesmas opções selecionadas. A diferença é que o ajuste será feito tanto no lado externo quanto no interno.
- *2D Analysis.* Análise de parâmetros bidimensionais.

Essa foi a sequência utilizada para o processamento e análise das imagens de microtomografia

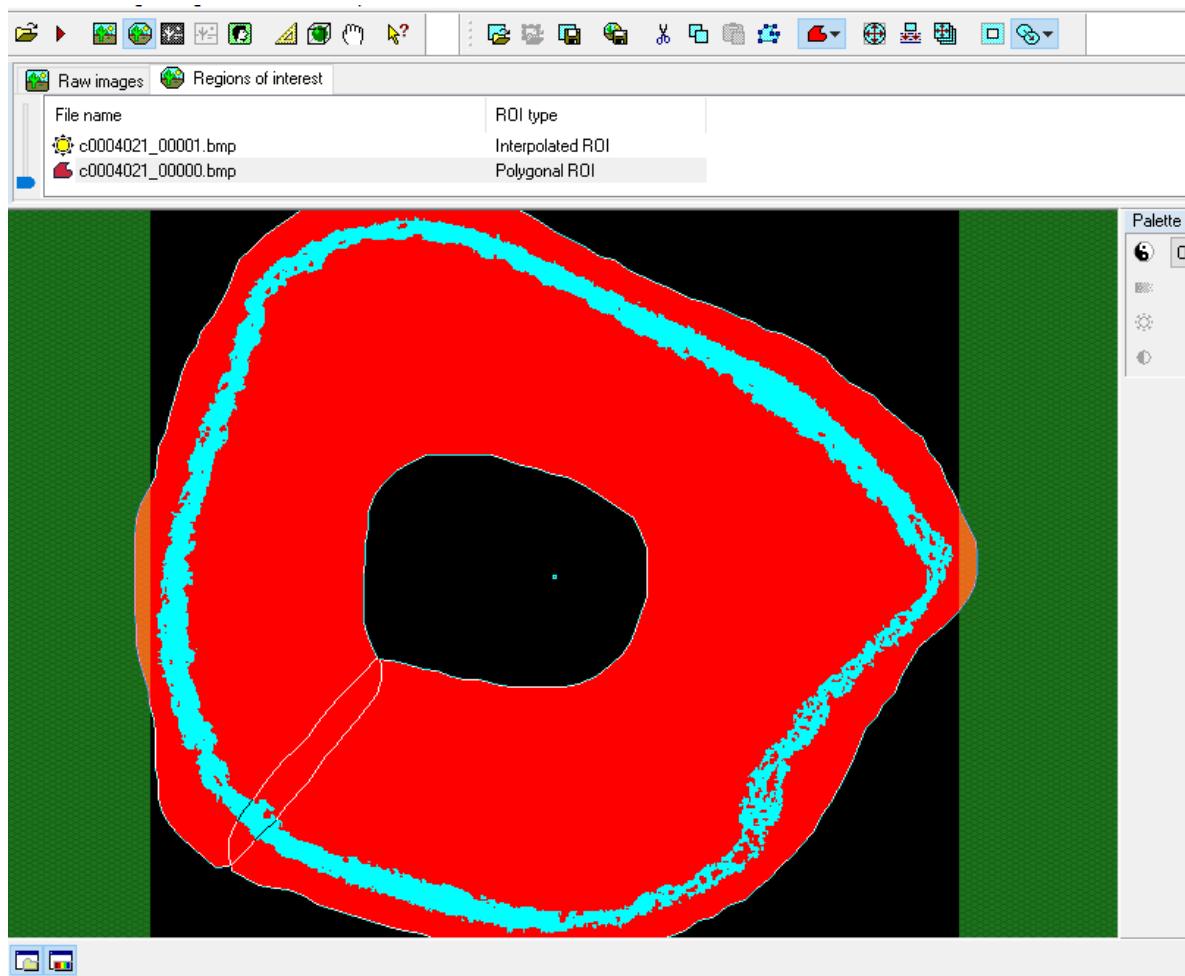


Figura 22. Contorno único desenhado para incluir todas as fatias da cortical (elaborada pelo autor)

Para a análise estatística dos dados foi utilizado o software Excel, da Microsoft Corporation. Como base para realizar os cálculos estatísticos, MONTGOMERY et RUNGER, 2003 foi utilizado. Selecionou-se o Teste-t para amostras cuja variância é desconhecida, mas somente a média. Isso justifica-se porque a variância da amostra é diferente da variância da distribuição estatística. Um guia básico de estatística encontra-se no ANEXO 1.

5 Resultados

Os resultados foram quantificados com base nos seguintes parâmetros:

- Fração de Ganho de Tecido Ósseo (FGTO)
- Grau de Anisotropia
- Densidade de Conectividade
- Área da Seção Transversal do Osso
- Área de Tecido Ósseo

Como para cada parâmetro é feita a quantificação da tíbia e rádio, então no total são 10 parâmetros.

Apesar do próprio software da Scanco emitir um resultado para alguns parâmetros, os que foram listados logo acima não estão incluídos. E por isso todos estes que aqui foram investigados são importantes, pois podem trazer à luz algum resultado relevante que não pode ser obtido utilizando o resultado padrão que é emitido pelo software da Scanco.

Na estatística foi considerado um intervalo de confiança de 95% para uma quantidade de amostras de 38 para o rádio (22 controles e 16 pacientes) e 37 para a tíbia (22 controles e 15 pacientes). Isso porque um dos resultados não pode ser aproveitado para a tíbia. E por serem quantidades de amostras muito próximas, o valor do Teste-t requerido para que houvesse diferença significativa entre o grupo controle e paciente para um dado parâmetro é quase o mesmo: 2,026 para o rádio e 2,028 para a tíbia. Isto é, maior ou igual a esses valores para haver diferença significativa.

Os valores referentes à área nas seções 5.6 e 5.7 referem-se à quantidade de pixels daquela imagem. Dessa forma, a área em micrômetros pode ser convertida multiplicando o total de pixels pela área de um único pixel dada em micrômetro quadrado, milímetro quadrado ou qualquer outra unidade de área conveniente.

Através das fatias de microtomografia foi possível renderizar a região analisada, ilustrando o osso em 3D de um indivíduo do grupo controle e outro do grupo paciente. As imagens abaixo foram renderizadas utilizando uma opção inclusa no software CTAn.

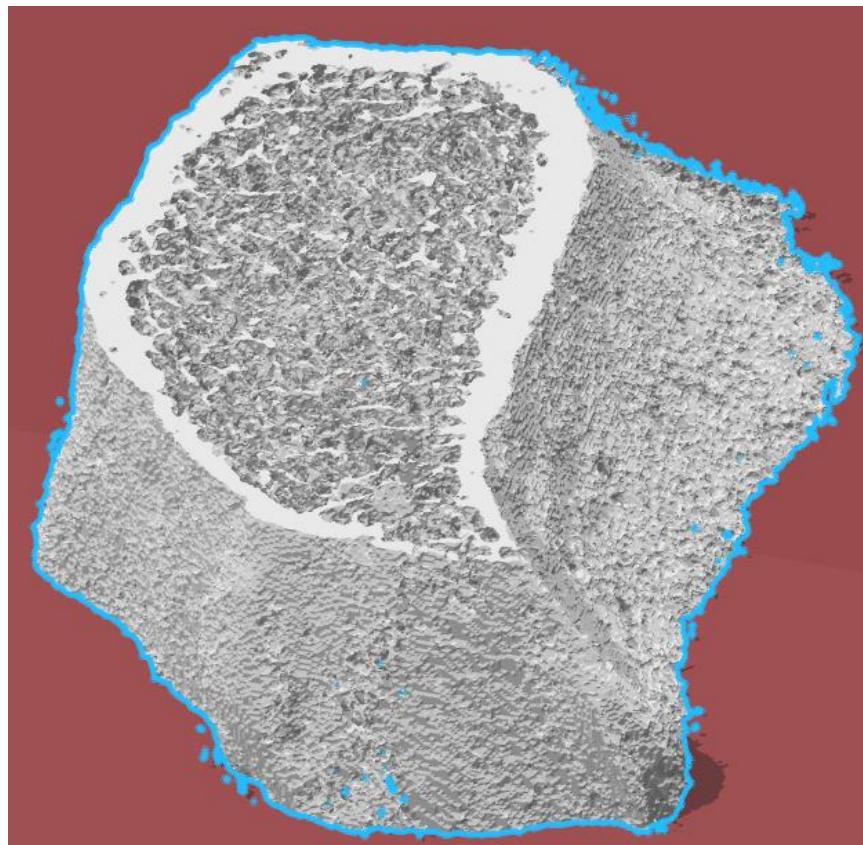


Figura 23. Região do rádio de um indivíduo do grupo controle (elaborada pelo autor).

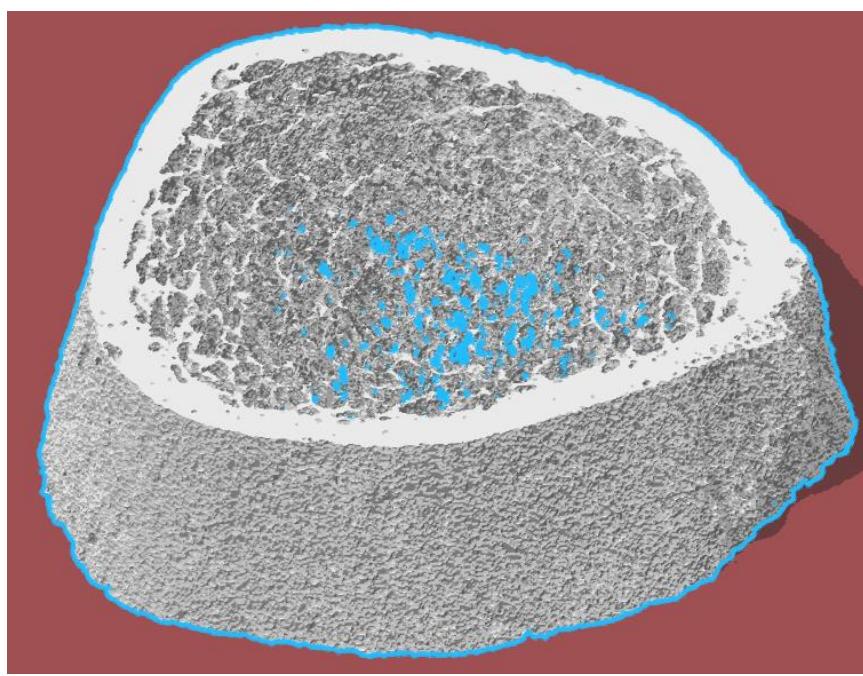


Figura 24. Região da tíbia de um indivíduo do grupo controle (elaborada pelo autor).

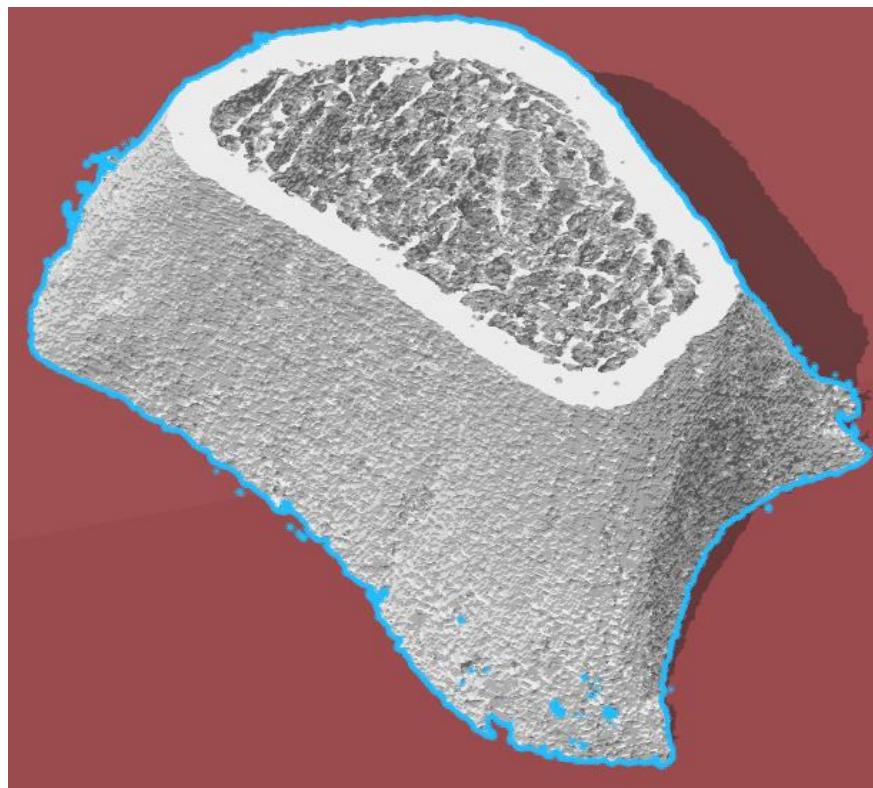


Figura 25. Região do rádio de um indivíduo do grupo paciente (elaborada pelo autor).

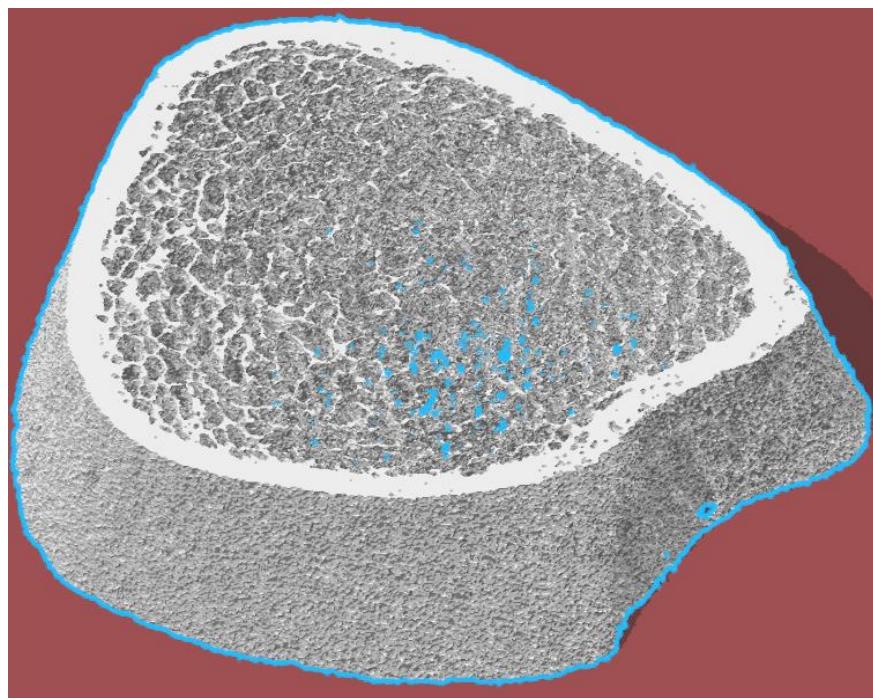


Figura 26. Região da tíbia de um indivíduo do grupo paciente (elaborada pelo autor).

5.1 FGTO da Tíbia

Dessa forma, cada indivíduo analisado (paciente e controle) teve um FGTO correspondente. E no fim foi feita uma média do FGTO do grupo controle e outra do grupo paciente. As médias tiveram certa diferença, assim como seus desvios padrões. A tabela abaixo resume o resultado.

Tabela 2. Resumos das médias e desvios de Fração de Ganho de Tecido Ósseo em porcentagem dos grupos Controle e Paciente da Tíbia.

	Média (Controle)	Desvio (Controle)	Média (Paciente)	Desvio (Paciente)
Trabecular	107,28%	24,40%	117,29%	26,64%
Cortical	-12,92%	-3,88%	-9,22%	-4,46%

Ao realizar a separação entre as regiões trabecular e cortical, obteve-se uma diferença significativa para a FGTO da região cortical, com valor do Teste-t de 2,69, enquanto que para a região trabecular o resultado do Teste-t foi 1,18 e, portanto, não foi expressivo (com base no valor supracitado para se ter diferença significativa, que é de 2,028). Na tabela acima, a FGTO da cortical está negativa porque quando se sai da região proximal para a distal ocorre uma diminuição da região cortical, enquanto que na região trabecular ocorre um aumento de tecido ósseo trabecular.

Esse resultado mostra que, embora não haja diferença significativa no ganho de tecido trabecular, a região cortical do paciente não perde tanta cortical quanto deveria perder (tomando o grupo controle como referência). Isso implica em um osso menos flexível nas extremidades para os indivíduos do grupo paciente.

É importante notar que, por outro lado, o grupo paciente mostrou ter um ganho maior de tecido trabecular em relação ao grupo controle. No entanto, a diferença entre as médias é de cerca de 10%, menor do que o desvio padrão para cada grupo (cerca de 25%). Dessa forma, embora com uma média maior, esse valor não se mostra expressivo. Para se verificar

se a tendência da diferença entre esses ganhos irá aumentar é necessário aumentar o número de indivíduos do grupo controle e paciente.

5.2 FGTO do Rádio

Analogamente, a Fração de Ganho de Tecido Ósseo foi calculada para o rádio. A diferença entre as médias de Paciente e Controle foi maior do que para a tíbia. No entanto, o desvio foi muito maior também. A Tabela 3 abaixo resume os resultados obtidos para o rádio.

Tabela 3. Resumos das médias de Fração de Ganho de Tecido Ósseo em porcentagem dos grupos Controle e Paciente do Rádio.

	Média (Controle)	Desvio (Controle)	Média (Paciente)	Desvio (Paciente)
Trabecular	323,27%	107,47%	372,95%	138,81%
Cortical	-21,68%	-10,49%	-23,84%	-12,16%

Para a região trabecular do rádio o Teste-t retornou um valor de 1,24 e para a cortical, um valor de 0,59. Dessa forma, nenhuma das regiões mostrou diferença significativa entre os grupos. Como a tíbia e rádio são ossos diferentes com funções e cargas diferentes, essa semelhança entre os grupos pode ser entendida. Assim, o resultado mostra que os impactos associados ao vírus e ao tratamento não são significativos para na FGTO do rádio.

5.3 Grau de Anisotropia da Tíbia

Este parâmetro tem uma interpretação importante para avaliar a saúde do osso. Abaixo seguem os resultados obtidos, resumidos na Tabela 4.

Tabela 4. Resumo do Grau de Anisotropia dos grupos Controle e Paciente para a Tíbia.

Média Controle	Desvio Padrão Controle	Média Paciente	Desvio Padrão Paciente
1,220	0,079	1,234	0,088

O resultado acima refere-se à anisotropia do tecido trabecular da tíbia, pois esse é esse tecido que muda o ordenamento do crescimento conforme as cargas por ele sofridas.

Realizando o Teste-t, o valor foi de 0,49 e, assim, abaixo do necessário (que é de 2,028) para se afirmar uma diferença significativa. Este resultado mostra que as trabéculas da tíbia de pacientes HIV-positivo não possuem diferença significativa em termos de anisotropia em relação às de indivíduos sadios. Pela definição de Grau de Anisotropia, incluindo o conceito de MIL, o maior autovalor mostra uma densidade maior de tecido em uma direção, e o menor, uma densidade menor de tecido em outra direção perpendicular.

Sendo assim, expressando o resultado em outros termos, a diferença de deposição de tecido ósseo de uma direção em relação a outra perpendicular não é significativa entre a tíbia de portadores do vírus HIV e a de indivíduos não-portadores do vírus.

Este resultado é bem diferente do obtido para algumas patologias, nas quais ocorre uma descaracterização da estrutura óssea, tais como osteosarcoma (um tipo de câncer de osso), tornando o osso praticamente isotrópico. Já com relação aos indivíduos HIV-positivo, o vírus e/ou o antirretroviral parecem não influir de forma relevante no processo de anisotropia que é natural no osso e que se deve às cargas sofridas pelo mesmo no cotidiano do indivíduo. Ou seja, a remodelação óssea não se mostra alterada no que diz respeito à distribuição do tecido do osso.

5.4 Grau de Anisotropia do Rádio

De maneira semelhante, o Grau de Anisotropia foi calculado para a região trabecular do rádio. A Tabela 5 abaixo resume os resultados.

Tabela 5. Resumo do Grau de Anisotropia dos grupos Controle e Paciente para o Rádio.

Média Controle	Desvio Padrão Controle	Média Paciente	Desvio Padrão Paciente
1,298	0,087	1,288	0,066

É fácil perceber que não houve diferença significativa (o Teste-t foi de 0,38). As médias de paciente e controle se mostraram iguais. E quanto aos desvios, para o grupo paciente, apesar de possuir um número menor de indivíduos ($n=16$), foi ligeiramente menor em relação ao desvio do grupo controle ($n = 22$).

O fato das médias terem sido tão próximas em comparação com as médias da anisotropia para a tíbia tem relação com a carga sofrida pelo braço em comparação com a perna. Enquanto as pernas sustentam o corpo, os braços geralmente fazem esforços menores, sofrendo cargas bem mais modestas. Além disso, os ossos do corpo não são todos iguais, tanto em aspectos físicos quanto biológicos. Dessa forma, é razoável entender essa proximidade entre as médias no grau de anisotropia para o rádio.

5.5 Densidade de Conectividade da Tíbia e do Rádio

Abaixo, a Tabela 6 resume os dados obtidos para a densidade de conectividade.

Tabela 6. Resumo da Densidade de Conectividade dos grupos Controle e Paciente para Rádio e Tíbia.

	Média Controle (10^{-3})	Desvio Padrão Controle (10^{-3})	Média Paciente (10^{-3})	Desvio Padrão Paciente (10^{-3})
Rádio	2,80	0,57	2,63	0,75
Tíbia	2,93	1,06	2,89	1,12

Como é possível ver nos dados, a densidade de conectividade para o rádio não deu uma diferença significativa. As médias e os respectivos desvios estão levemente diferentes. O Test-t deu um valor de 0,78 (isto é, não foi significativo). E para a tíbia houve uma semelhança ainda maior para a densidade de conectividade com um valor ainda menor do Test-t de 0,10.

Este resultado é interessante por mostrar que a conectividade do tecido ósseo não é prejudicada pelo vírus e/ou tratamento com ART. Dessa forma, o desenvolvimento da microestrutura óssea não sofre influência desses fatores, ao menos no aspecto de conexão entre todo o tecido ósseo. E assim, um dado impacto devido a uma carga externa recebido em determinada região é transmitido e distribuído no osso de forma bem semelhante entre os dois grupos, visto que não há diferença estatisticamente significativa para a conectividade do tecido ósseo.

5.6 Área da Seção Transversal do Osso para a Tíbia e Rádio

Com base nos valores obtidos com a análise das imagens, obteve-se a Tabela 7 abaixo que resume os resultados. Conforme já foi dito acima, a área está expressa abaixo em quantidade de pixels classificados como osso. Para facilitar a comparação dos valores, todos foram colocados na ordem de milhões (10^6).

Tabela 7. Resumo da Área da Seção Transversal dos grupos Controle e Paciente para a Tíbia.

	Média Controle	Desvio Padrão Controle	Média Paciente	Desvio Padrão Paciente
Distal	1,488	0,171	1,468	0,215

A partir da análise de diferença significativa entre as médias do Teste-t, obteve-se um valor de 0,311. Dessa forma, pelo menos na tíbia, não houve uma alteração na morfologia do osso.

No entanto, ao analisar o rádio, verificou-se uma diminuição considerável nessa área compreendida pela estrutura óssea. O Teste-t realizado com os valores obtidos para o rádio resultou em um valor de 2,00. Esse valor está bem próximo do necessário para afirmar uma diferença significativa, que é de 2,028. Abaixo, a Tabela 8 resume os resultados para o rádio.

Tabela 8. Resumo da Área da Seção Transversal dos grupos Controle e Paciente para o Rádio.

	Média Controle	Desvio Padrão Controle	Média Paciente	Desvio Padrão Paciente
Distal	8,180	1,146	7,311	1,503

Dessa forma, os indivíduos HIV-positivo sob tratamento obtiveram uma leve redução na área compreendida pela seção transversal do osso (tanto tecido quanto vazio) para o rádio na região distal. E as consequências são, por exemplo, um menor amortecimento nesta região, pois quanto menor a área, maior a pressão sofrida. Isso pode levar a uma incidência maior de fraturas. E esta hipótese coincide com o que a literatura tem verificado sobre fraturas em pacientes HIV-positivo (BEDIMO e TEBAS, 2013; COMPSTON, 2014).

Um osso pode sofrer fratura por várias razões, seja perda de massa óssea, colágeno, dentre outros. E o encolhimento dessa área compreendida pelo osso pode ser uma delas, tendo em vista que as forças externas recebidas irão se distribuir em uma área menor, sobrecarregando, consequentemente, o osso. E com isso, tal diminuição da área do osso pode ser uma das causas que leva a uma maior incidência de fraturas entre indivíduos HIV-positivo.

5.7 Área de Tecido da Seção Transversal da Tíbia e do Rádio

Ao contrário do que se podia esperar, os valores de Área de Tecido da tíbia e rádio foram bem semelhantes para Controles e Pacientes. E de forma análoga, a área está expressa abaixo em quantidade de pixels classificados como tecido. Todos foram colocando na ordem de milhões (10^6).

Tabela 9. Resumo da Área de Tecido da Seção Transversal dos grupos Controle e Paciente para a Tíbia, nas posições distal e proximal das regiões trabecular e cortical.

	Média Controle	Desvio Controle	Média Paciente	Desvio Paciente	Teste-t
Proximal (Trab)	1,353	0,388	1,306	0,481	0,33
Distal (Trab)	2,770	0,731	2,803	0,989	0,12
Proximal (Cort)	2,477	0,339	2,251	0,163	2,39
Distal (Cort)	2,155	0,299	2,041	0,144	1,37

Entre parênteses na Tabela 9 acima “Trab” e “Cort” referem-se às regiões trabecular e cortical, respectivamente. A linha destacada em verde é a região que mostrou uma diferença significativa, com o Teste-t igual a 2,39.

Esse resultado mostra que na Tíbia houve uma diminuição considerável da região cortical. Isto é, os pacientes mostraram ter uma cortical mais fina do que o grupo controle na região proximal da cortical na tíbia. Essa diminuição pode ser devido à perda na área interna da cortical (intracortical), onde a cortical é substituída por região trabecular na região intracortical. Isso não implica em um aumento de região trabecular porque essa transformação de cortical em trabecular ocorre em uma faixa estreita interna da cortical e, portanto, não contribui significativamente para um aumento expressivo.

Tabela 10. Resumo da Área de Tecido da Seção Transversal dos grupos Controle e Paciente para o Rádio, nas posições distal e proximal das regiões trabecular e cortical.

	Média Controle	Desvio Controle	Média Paciente	Desvio Paciente	Teste-t
Proximal (Trab)	0,486	0,165	0,433	0,263	0,77
Distal (Trab)	1,944	0,414	1,770	0,607	1,05
Proximal (Cort)	1,239	0,136	1,188	0,135	1,16
Distal (Cort)	0,969	0,161	0,898	0,139	1,41

Com relação ao rádio, nenhum dos valores se mostrou expressivo no Teste-t, apesar das médias de todos os valores do grupo paciente terem sido sempre menores do que as médias do grupo controle. Assim, a diminuição de área da seção transversal obtida para o rádio pode estar implicando em uma leve diminuição de tecido também, mas não suficiente para ser verificada uma diferença significativa. Isso pode ser devido a um número não tão grande de indivíduos, o que impediu uma verificação dessa diferença significativa. E os valores do Teste-t parecem indicar isso, visto que para três, das quatro regiões analisadas o valor do Teste-t foi maior que 1.

Tanto na Área de Tecido da seção transversal quanto em outros parâmetros não houve uma diferença significativa. E conforme já foi citado, a principal razão é a quantidade de

indivíduos controle e paciente. Como é possível ver nos resultados os dois grupos de comparação mostraram sempre uma certa diferença entre as médias. No entanto, os desvios padrões dos grupos, que são levados em consideração no cálculo do Teste-t, foram muito grandes para determinados parâmetros. E com isso a diferença entre os grupos não pode ser constatada.

Um outro fator que influencia é a variedade DNA/RNA do vírus. Assim como qualquer ser vivo, os vírus também possuem diferenças em seu material genético que podem alterar os efeitos no indivíduo infectado. E associado a isso, a própria terapia com antirretroviral utilizada influencia nos resultados, visto que esta terapia é uma associação de, em geral, três antirretrovirais. Assim, essa combinação de vírus e antirretroviral pode ter determinado a ausência de alguns resultados positivos.

E por fim, um terceiro fator seria o fato dos indivíduos tratados serem acima de 50 anos e já estarem a um bom tempo sob tratamento. Isso implicaria então que o tratamento fornecido a esses indivíduos tem uma qualidade tão boa que os efeitos do vírus e tratamento na microarquitetura óssea foram praticamente anulados.

6 Conclusão

A partir das imagens da HR-pQCT e do processamento e análise dos parâmetros já mencionados foi possível verificar algumas alterações na microestrutura óssea de pacientes HIV-positivo. Estes pacientes mostraram uma Área da Seção Transversal de Osso no rádio menor e uma Área de Tecido da seção transversal da cortical na região proximal da tibia também menor. Isto implica que o indivíduo HIV-positivo tem uma perda de área englobada pelo osso (tecido e vazio) no rádio e uma perda de tecido cortical na região proximal na tibia. Além disso, a FGTO da tibia na região cortical se mostrou alterada, mostrando que os pacientes não perdem tanto tecido cortical quanto deveriam perder na extremidade do osso da tibia.

Nos outros parâmetros investigados, tanto na tibia quanto no rádio, não houve alteração significativa, o que a princípio mostra, pelo menos em alguns parâmetros, que o tratamento e o vírus não afetam tanto a microarquitetura óssea.

O resultado obtido neste trabalho pode contribuir para um melhor entendimento da ação do vírus e antirretroviral nos indivíduos HIV-positivo. É uma explicação possível para a incidência de fraturas nos indivíduos portadores do HIV. A perda de área de osso e de tecido da seção transversal e a FGTO da tibia mostram que a saúde do osso dos pacientes não está tão boa quanto o ideal (grupo controle).

Vale também destacar todo o processamento realizado nas imagens, que objetivou extrair o melhor resultado possível das mesmas. A separação entre as regiões cortical e trabecular se mostrou fundamental para verificar em qual dessas regiões se tem uma maior alteração. E a análise dessas imagens mostra o quão revelador podem ser os parâmetros extraídos de imagens de forma geral, porém, mais especificamente, de imagens de microtomografia

Referências

BALA, Yohann et al. **Cortical Porosity Identifies Women with Osteopenia at Increased Risk for Forearm Fractures.** Journal of Bone and Mineral Research, 2014, Vol.29(6), pp.1356-1362

BEDIMO, Roger; TEBAS, Pablo. **Bone: Increased Fracture Risk With HIV Infection – A Growing Concern.** Nature Reviews Endocrinology, 2013, Vol. 9(5), p. 260.

BIVER, Emmanuel et al. **Microstructural Alterations of Trabecular and Cortical Bone on Long-Term HIV-Infected Elderly Men on Successful Antiretroviral Therapy.** AIDS, 23 Outubro 2014, Vol.28(16), pp.2417-27.

BLAZEJOWSKI, Blazej; BINKOWSKI, Marcin; BITNER, Maria Aleksandra; GIESZCZ, Piotr. **X-ray Microtomography (XMT) Of Fossil Brachiopod Shell Interiors For Taxonomy.** Acta Palaeontologica Polonica, 2011, Vol.56(2), p.439(2).

BOUXSEIN, Mary L. et al. **Guidelines for Assessment of Bone Microstructure in Rodents Using Micro-Computed Tomography.** Journal of Bone and Mineral Research, 2010, Vol.25(7), pp. 1468-1486.

BUSHBERG, Jerrold T. et al. **The Essential Physics of Medical Imaging.** 2 ed. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002.

CALMY, A. et al. **Long-Term HIV Infection and Antiretroviral Therapy Are Associated With Bone Microstructure Alterations in Premenopausal Women.** Osteoporosis international, Junho 2013, Vol.24(6), pp.1843-52.

Centre for Hip Health and Mobility. Inovation.CA. Disponível em: <<https://www.innovation.ca/en/navigator/CentreHipHealthandMobility>>. Acesso em 24 jun. 2016.

Clinical MicroCT. Scanco Medical. Disponível em: <<http://www.scanco.ch/en/applications/clinical.html>>. Acesso em 24 jun. 2016.

Compact Bone. Encyclopaedia Britannica. Disponível em: <<http://global.britannica.com/science/compact-bone>>. Acesso em 24 jun. 2016.

COMPSTON, Juliet. **Osteoporosis and Fracture Risk Associated With HIV Infection and Treatment.** Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, September 2014, Vol.43(3), pp.769-780.

DIMMOCK, N. J. et al. **Introduction to Modern Virology.** 7ed, Reino Unido: Wiley Blackwell, 2016.

DIMMOCK, N. J.; EASTON, A. J.; LEPPARD, K.N. **Introduction to Modern Virology.** 7 ed., Reino Unido: Wiley Blackwell, 2016.

ELLIOTT, J.C.; DOVER, S.D. **X-ray Microtomography.** Journal of Microscopy: 1982, 126:211-213.

EZQUERRA, T.A. et al. **Applications of Synchrotron Light to Scattering and Diffraction in Materials and Life Science.** 1 ed, Heidelberg: Springer, 2009.

FELDKAMP, L.A.; DAVIS, L.C.; KRESS, J.W. **Practical Cone-Beam Algorithm.** Journal of Optical Society of America: 1984, Vol.1(6).

FINZEL, Stephanie et al. **Segmentation and Quantification of Bone Erosions in HR-pQCT datasets of the Metacarpophalangeal Joints of Patients with Rheumatoid Arthritis.** Rheumatology, 2014, Vol. 53(1), pp.65-71.

FISH, Jacob; BELYTSCHKO, Ted. **A First Course in Finite Elements.** Inglaterra: Wiley, 2007.

FULLER, Henrique et al. **Tomografia Computadorizada Quantitativa Periférica de Alta Resolução para Avaliação de Parâmetros Morfológicos e Funcionais Ósseos.** Revista Brasileira de Reumatologia, 2014.

GUO, Wei Ya. **Two-dimensional Otsu's Thresholding Segmentation Method Based on Grid Box Filter.** Optik – International Journal for Light and Electron Optics, 2014, vol. 125(18), pp. 5234-5240.

HERMAN, Gabor T. **Fundamentals of Computerized Tomography: Image Reconstruction from Projections.** 2 ed., Londres: Springer 2009.

HIV and AIDS in South Africa. AVERT. Disponível em: <<http://www.avert.org/professionals/hiv-around-world/sub-saharan-africa/south-africa>>. Acesso em 31 dez. 2016.

HSIEH, Jiang. **Computed Tomography: Principles, Design, Artifacts and Recent Advances.** 2 ed., Washington: Wiley Interscience, 2009.

JESSEN, Heiko; JAEGER, Hans. **Primary HIV Infection: Pathology, Diagnosis, Management.** Alemanha: Thieme, 2005.

KOIJAN, R. et ali. **Bone Structure Assessed by HR-pQCT, TBS and DXL in Adult Patients With Different Types of Osteogenesis Imperfecta.** Osteoporosis International, 2015, Vol.26(10), pp.2431-2440.

LIAO, Ping-Sung et al. **A Fast Algorithm for Multilevel Thresholding.** Journal of Information Science and Engineering, 2001, vol. 17, pp. 713-727.

MACDONALD, Heather M et ali. **Age-Related Patterns of Trabecular and Cortical Bone Loss Differ between Sexes and Skeletal Sites: A Population-Based HR-pQCT Study.** Journal of Bone and Mineral Research, January 2011, Vol.26(1), pp.50-62

MACHADO, A.C. et al. **Porous Media Investigation Before and After Hydrochloric Acid Injection On A Pre-Salt Carbonate Coquinas Sample.** Applied Radiation and Isotopes, April 2016, Vol.110, pp.160-163.

MADEIRA, Miguel et ali. **Acromegaly Has a Negative Influence on Trabecular Bone, But Not on Cortical Bone, as Assessed by High-Resolution Peripheral Quantitative Computed Tomography.** The Journal of clinical endocrinology and metabolism, April 2013, Vol.98(4), pp.1734-41.

MONTGOMERY, Douglas C.; RUNGER, George C. **Applied Statistics and Probability for Engineers.** 3 ed, EUA: John Wiley & Sons, 2003.

ODGAARD, A. **Three-Dimensional Methods for Quantification of Cancellous Bone Architecture.** Bone, 1997, Vol. 20(4), pp. 315-328.

Osteocyte. Encyclopaedia Britannica. Disponível em:
<<http://global.britannica.com/science/osteocyte>>. Acesso em 24 jun. 2016.

OTSU, Nobuyuki. **A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms.** IEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics, 1979, vol. 9(1), pp. 62-66.

POLITCH, A. et al. **Highly Active Antiretroviral Therapy Does Not Completely Suppress HIV in Semen of Sexually Active HIV-Infected Men Who Have Sex With Men.** AIDS, 2012, Vol.26(12), p. 1535-1543.

PONTZER, H., et al. **Trabecular Bone in the Bird Knee Responds with High Sensitivity to Changes in Load Orientation.** The Journal of Experimental Biology 209 (2006), pp.57-65.

ROGERS, Kara et al. **The Human Body: Bone and Muscle Structure, Force, and Motion.** 1 ed, New York: Britannica Educational Publishing and Rosen Educational Services, 2011.

SAHA, Gopal B. **Basics of PET Imaging: Physics, Chemistry, and Regulations.** EUA: Springer, 2005.

SCANCO, 2013a. XtremeCT: User's Guide. Fonte: <http://www.scanco.ch>.

SCANCO, 2013b. SOP XtremeCT Quality Grading Suggestions. Fonte: <http://www.scanco.ch>.

SKYSCAN, 2013a. The User's Guide CT-Analyser. Fonte: <http://www.skyscan.be>.

SKYSCAN, 2013b. Morphometrics Parameters in CT-Analyser. Fonte: <http://www.skyscan.be>.

SOLOMON, Chris; BRECKON, Toby. **Fundamentals of Digital Image Processing: A Practical Approach with Examples in Matlab.** Reino Unido: Wiley Blackwell, 2011.

SPLITE, Heidi. **History: Low BMD Raise Long-Term Fracture Risk.** Ob. Gyn. News, 2008, Vol.43(2), p.26.

STONE, Benjamin et al. **HIV and Bone Disease**. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2010, Vol.503(1), pp.66-77.

TJONG, Willy et ali. **The Effect of Voxel Size on High-Resolution Peripheral Computed Tomography Measurements of Trabecular and Cortical Bone Microstructure**. Medical Physics, April 2012, Vol.39(4), pp.1893-1903.

TÖPFER, Dominique et ali. **Segmentation and Quantification of Bone Erosions in High-Resolution Peripheral Quantitative Computed Tomography Datasets of the Metacarpophalangeal Joints of Patients With Rheumatoid Arthritis**. Rheumatology, 2014, Vol. 53(1), pp.65-71.

VALENTINITSCH, Alexander et ali. **Automated Threshold-Independent Cortex Segmentation by 3D-Texture Analysis of HR-pQCT Scans**. Bone, September 2012, Vol.51(3), pp.480-487.

WILLMOTT, Philip. **An Introduction to Synchrotron Radiation: Techniques and Applications**. 1 ed, United Kingdom: John Wiley and Sons, Ltd, 2011.

YIN, Michael T. et al. **Lower Peak Bone Mass and Abnormal Trabecular and Cortical Microarchitecture in Young Men Infected With HIV Early in Life**. AIDS, 28 Janeiro 2014, Vol.28(3), pp.345-53.

YOUNG, Michelle K. et al. **Low CD4 Count is Associated With An Increased Risk of Fragility Fracture in HIV-Infected Patients**. Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes, July 2011, Vol. 57(3), pp.205-210.

YXLON, 2016. Inspecting Turbine Blades Non-Destructively. Fonte: <http://www.yxlon.com/Applications/Cast-parts/Turbine-blades>.

Z CHEN, M. et al. **Fracture Risk Increases After Breast Or Other Cancer Diagnosis**. Annals of Epidemiology, 2008, Vol.18(9), pp.717.

ZEBAZE, Roger et al. **Intracortical remodelling and porosity in the distal radius and post-mortem femurs of women: a cross-sectional study**. The Lancet, 2010, Vol.375(9727), pp.1729-1736.

ANEXO 1

O anexo que segue é uma introdução básica à estatística (em inglês) do Instituto de Tecnologia de Massachusetts (MIT). Trata-se de uma nota de aula sobre o tema. O arquivo pode ser baixado gratuitamente na página do MIT (link: <<http://www.mit.edu/~6.s085>>, acessado pela última vez em 22 de Março de 2017). O arquivo no formato .pdf correspondente é o intitulado por “*Introduction to Statistics Terminology, Exploratory Data Analysis, and Important Distributions*”.

Chapter 1

Basic statistics

Statistics are used everywhere.

Weather forecasts estimate the probability that it will rain tomorrow based on a variety of atmospheric measurements. Our email clients estimate the probability that incoming email is spam using features found in the email message. By querying a relatively small group of people, pollsters can gauge the pulse of a large population on a variety of issues, including who will win an election. In fact, during the 2012 US presidential election, Nate Silver successfully aggregated such polling data to correctly predict the election outcome of all 50 states!¹

On top of this, the past decade or so has seen an explosion in the amount of data we collect across many fields. For example,

- The Large Hadron Collider, the world's largest particle accelerator, produces 15 petabytes of data about particle collisions every year²: that's 10^{15} bytes, or a million gigabytes.
- Biologists are generating 15 petabytes of data a year in genomic information³.
- The internet is generating 1826 petabytes of data every day. The NSA's analysts claim to look at 0.00004% of that traffic, which comes out to about 25 petabytes per year!

And those are just a few examples! Statistics plays a key role in summarizing and distilling data (large or small) so that we can make sense of it.

While statistics is an essential tool for justifying a variety of results in research projects, many researchers lack a clear grasp of statistics, misusing its tools and producing all sorts of bad science!⁴ The goal of these notes is to help you avoid falling into that trap: we'll arm you with the proper tools to produce sound statistical analyses.

¹ See Daniel Terdiman, "Obama's win a big vindication for Nate Silver, king of the quants," CNET, November 6, 2012

² See CERN's Computing site

³ See Emily Singer, "Biology's Big Problem: There's Too Much Data to Handle," October 11, 2013

⁴See The Economist, "Unreliable research: trouble at the lab", October 19, 2013.

In particular, we'll do this by presenting important statistical tools and techniques while emphasizing their underlying principles and assumptions.

We'll start with a motivating example of how powerful statistics can be when they're used properly, and then dive into definitions of basic statistical concepts, exploratory analysis methods, and an overview of some commonly used probability distributions.

Example: Uncovering data fakers

In 2008, a polling company called Research 2000 was hired by Daily Kos to gather approval data on top politicians (shown below^a). Do you see anything odd?

Topic	Favorable		Unfavorable		Undecided	
	Men	Women	Men	Women	Men	Women
Obama	43	59	54	34	3	7
Pelosi	22	52	66	38	12	10
Reid	28	36	60	54	12	10
McConnell	31	17	50	70	19	13
Boehner	26	16	51	67	33	17
Cong.(D)	28	44	64	54	8	2
Cong.(R)	31	13	58	74	11	13
Party(D)	31	45	64	46	5	9
Party(R)	38	20	57	71	5	9

Several amateur statisticians noticed that within each question, the percentages from the men almost always had the same parity (odd-/even-ness) as the percentages from the women. If they truly had been sampling people randomly, this should have only happened about half the time. This table only shows a small part of the data, but it happened in 776 out of the 778 pairs they collected. The probability of this happening by chance is less than 10^{-228} !

Another anomaly they found: in normal polling data, there are many weeks In Research 2000's data, this almost never happened: they were probably afraid to make up the same number two weeks in a row since that might not "look random". These problems (and others) were caught thanks to statistical analysis!

^aData and a full description at [Daily Kos: Research 2000: Problems in plain sight, June 29, 2010..](#)

1.1 Introduction

We start with some informal definitions:

- **Probability** is used when we have some model or representation of the world and want to answer questions like "what kind of data will this truth produce?"
- **Statistics** is what we use when we have data and want to discover the "truth" or model underlying the data. In fact, some of what we call statistics today used to be called "inverse probability".

We'll focus on situations where we observe some set of particular outcomes, and want to figure out "why did we get these points?" It could be because of some underlying model or truth in the

world (in this case, we're usually interested in understanding that model), or because of how we collected the data (this is called *bias*, and we try to avoid it as much as possible).

There are two schools of statistical thought (see this [relevant xkcd⁴](#)):

- Loosely speaking, the **frequentist** viewpoint holds that the parameters of probabilistic models are fixed, but we just don't know them. These notes will focus on classical frequentist statistics.
- The **Bayesian** viewpoint holds that model parameters are not only unknown, but also random. In this case, we'll encode our prior belief about them using a probability distribution.

Data comes in many types. Here are some of the most common:

- Categorical: discrete, not ordered (e.g., 'red', 'blue', etc.). Binary questions such as polls also fall into this category.
- Ordinal: discrete, ordered (e.g., survey responses like 'agree', 'neutral', 'disagree')
- Continuous: real values (e.g., 'time taken').
- Discrete: numeric data that can only take on discrete values can either be modeled as ordinal (e.g., for integers), or sometimes treated as continuous for ease of modeling.

A **random variable** is a quantity (usually related to our data) that takes on random values⁵. For a discrete random variable, **probability distribution** p describes how likely each of those random values are, so $p(a)$ refers to the probability of observing value a ⁶. The **empirical distribution** of some data (sometimes informally referred to as just the distribution of the data) is the relative frequency of each value in some observed dataset. We'll usually use the notation x_1, x_2, \dots, x_n to refer to data points that we observe. We'll usually assume our sampled data points are *independent and identically distributed*, or i.i.d., meaning that they're independent and all have the same probability distribution.

The **expectation** of a random variable is the average value it takes on:

$$E[x] = \sum_{\text{poss. values } a} p(a) \cdot a$$

⁴ Of course, this comic oversimplifies things: here's (Bayesian) [statistician Andrew Gelman's response](#).

⁵ Formally, a random variable is a function that maps random outcomes to numbers, but this loose definition will suit our purposes and carries the intuition you'll need.

⁶ If the random variable is continuous instead of discrete, $p(a)$ instead represents a *probability density function*, but we'll gloss over the distinction in these notes. For more details, see an introductory probability textbook, such as *Introduction to Probability* by Bertsekas and Tsitsiklis.

We'll often use the notation μ_x to represent the expectation of random variable x .

Expectation is *linear*: for any random variables x, y and constants c, d ,

$$E(cx + dy) = cE[x] + dE[y].$$

This is a useful property, and it's true even when x and y aren't independent!

Intuition for linearity of expectation

Suppose that we collect 5 data points of the form (x,y) : $(1,3), (2,4), (5,3), (4,3), (3,4)$. Let's write each of these pairs along with their sum in a table:

x	y	$x+y$
1	3	4
2	4	6
5	3	8
4	3	7
3	4	7

To estimate the mean of variable x , we could just average the values in the first column above (i.e., the observed values for x): $(1 + 2 + 5 + 4 + 3)/5 = 3$. Similarly, to estimate the mean of variable y , we average the values in the second column above: $(3 + 4 + 3 + 3 + 4)/5 = 3.4$. Finally, to estimate the mean of variable $x+y$, we could just average the values in the third column: $(4+6+8+7+7)/5 = 6.4$, which turns out to be the same as the sum of the averages of the first two columns.

Notice that to arrive at the average of the values in the third column, we could've reordered values within column 1 and column 2! For example, we scramble column 1 and, separately, column 2, and then we recompute column 3:

x	y	$x+y$
1	3	4
2	3	5
3	3	6
4	4	8
5	4	9

The average of the third column is $(4+5+6+8+9)/5 = 6.4$, which is the same as what we had before! This is true even though x and y are clearly not independent. Notice that we've reordered columns 1 and 2 to make them both increasing in value, effectively making them more correlated (and therefore less independent). But, thanks to linearity of expectation, the average of the sum is still the same as before.

In summary, linearity of expectation says that the ordering of the values within column 1, and separately within column 2 don't actually matter in computing the average of the sum of two variables, which need not be independent.

The **variance** of a random variable is a measure of how spread out it is:

$$\text{var}[x] = \sum_{\text{poss. values } a} p(a) \cdot (a - E[x])^2$$

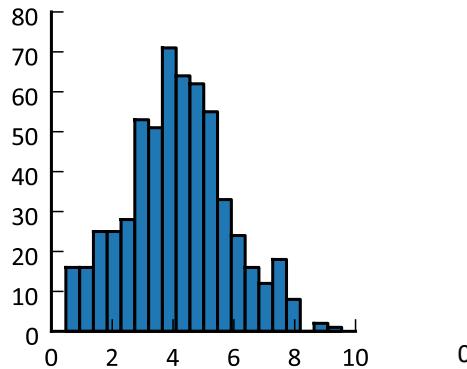
For any constant c , $\text{var}[cx] = c^2 \text{var}[x]$. If random variables x and y are independent, then $\text{var}[x + y] = \text{var}[x] + \text{var}[y]$; if they are not independent then this is not necessarily true!

The **standard deviation** is the square root of the variance. We'll often use the notation σ_x to represent the standard deviation of random variable x .

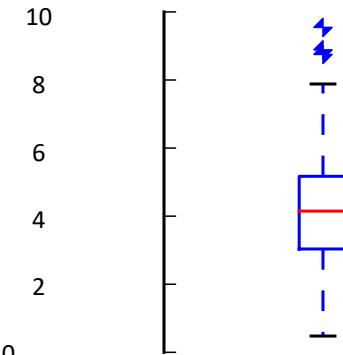
1.2 Exploratory Analysis

This section lists some of the different approaches we'll use for exploring data. This list is not exhaustive but covers many important ideas that will help us find the most common patterns in data.

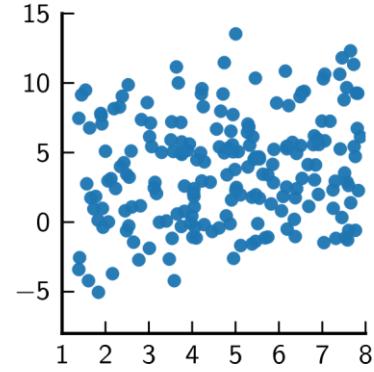
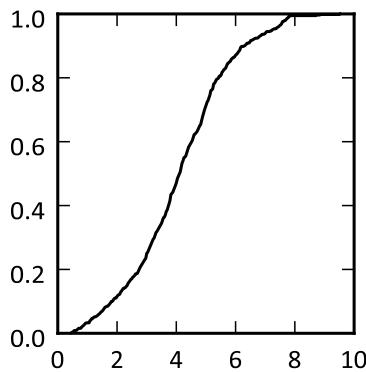
Some common ways of plotting and visualizing data are shown in Figure 1.1. Each of these has its own strengths and weaknesses, and can reveal different patterns or hidden properties of the data.



(a) Histogram: this shows the distribution of values a variable takes in a particular set of data. It's particularly useful for seeing the shape of the data distribution in some detail.



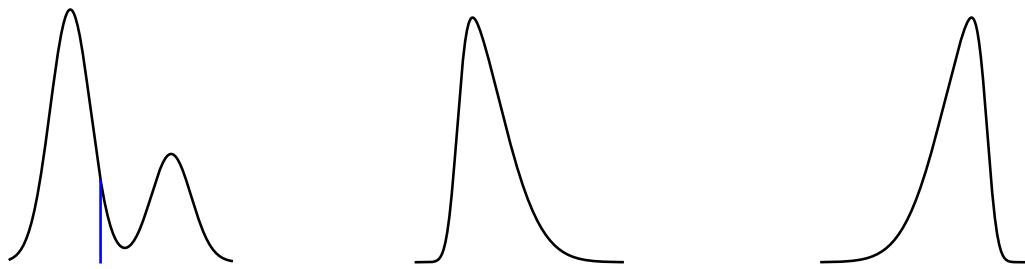
(b) Boxplot: this shows the range of values a variable can take. It's useful for seeing where most of the data fall, and to catch outliers. The line in the center is the median, the edges of the box are the 25th and 75th percentiles, and the lone points by themselves are outliers.



(c) Cumulative Distribution Function (CDF): this shows how much of the data is less than a certain amount. It's useful for comparing the data distribution to some reference distribution.

(d) Scatterplot: this shows the relationship between two variables. It's useful when trying to find out what kind of relationship variables have.

Figure 1.1: Different ways of plotting data



- (a) A distribution with two modes. The mean is shown at the blue line.
(b) A right-skewed distribution (positive skew); the tail of the distribution extends to the right.
(c) A left-skewed distribution (negative skew); the tail of the distribution extends to the left.

Figure 1.2: Different irregularities that can come up in data

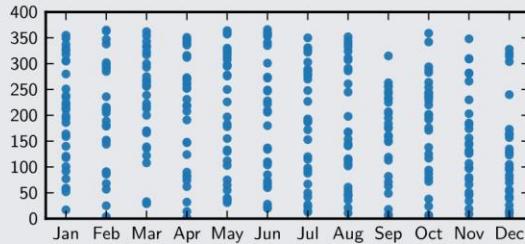
Much of the analysis we'll look at in this class makes assumptions about the data. It's important to check for complex effects; analyzing data with these issues often requires more sophisticated models. For example,

- Are the data *multimodal*? In Figure 1.2a, the mean is a bad representation of the data, since there are two peaks, or modes, of the distribution.
- Are the data *skewed*? Figures 1.2b and 1.2c show the different kinds of skew: a distribution skewed to the right has a longer tail extending to the right, while a leftskewed distribution has a longer tail extending to the left.

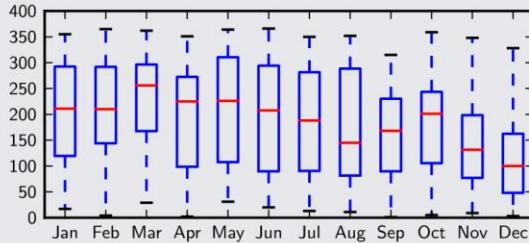
Before we start applying any kind of analysis (which will make certain assumptions about the data), it's important to visualize and check that those properties are satisfied. This is worth repeating: *it's always a good idea to visualize before testing!*

EXAMPLE: VISUALIZING BIAS IN THE VIETNAM DRAFT LOTTERY, 1970

In 1970, the US military used a lottery to decide which young men would be drafted into its war with Vietnam. The numbers 1 through 366 (representing days of the year) were placed in a jar and drawn one by one. The number 258 (representing September 14) was drawn first, so men born on that day would be drafted first. The lottery progressed similarly until all the numbers were drawn, thereby determining the draft order. The following scatter plot shows draft order (lower numbers indicate earlier drafts) plotted against birth month^a. Do you see a pattern?



There seem to be a lot fewer high numbers (later drafts) in the later months and a lot fewer low numbers (earlier drafts) in the earlier months. The following boxplot shows the same data:



It's now clearer that our hunch was correct: in fact, the lottery organizers hadn't sufficiently shuffled the numbers before the drawing, and so the unlucky people born near the end of the year were more likely to be drafted sooner.

^aData from the Selective Service: <http://www.sss.gov/LOTTER8.HTM>

1.2.1 Problem setup

Suppose we've collected a few randomly sampled points of data from some population. If the data collection is done properly, the sampled points should be a good representation of the population, but they won't be perfect. From this random data, we want to estimate properties of the population.

We'll formalize this goal by assuming that there's some "true" distribution that our data points are drawn from, and that this distribution has some particular mean μ and variance σ^2 . We'll also assume that our data points are i.i.d. according to this distribution.

For the rest of the class, we'll usually consider the following data setup:

- We've randomly collected a few samples x_1, \dots, x_n from some population. We want to find some interesting properties of the population (we'll start with just the mean, but we'll explore other properties as well).
- In order to do this, we'll assume that all data points in the whole population are randomly drawn from a distribution with mean μ and standard deviation σ (both of which are usually unknown to us: the goal of collecting the sample is often to find them). We'll also assume that our data points are independent.

1.2.2 Quantitative measures and summary statistics

Here are some useful ways of numerically summarizing sample data:

- **Sample Mean:** $\bar{x} = \hat{\mu} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$
- **Sample Variance:** $\sigma^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$
- **Median:** the middle value when the data are ordered, so that 50% of the data are above and 50% are below.
- **Percentiles:** an extension of median to values other than 50%.
- **Interquartile range (IQR):** the difference between the 75th and 25th percentile
- **Mode:** the most frequently occurring value
- **Range:** The minimum and maximum values

Notice that most of these fall into one of two categories: they capture either the center of the distribution (e.g., mean, median, mode), or its spread (e.g., variance, IQR, range). These two categories are often called **measures of central tendency** and **measures of dispersion**, respectively.

How accurate are these quantitative measures? Suppose we try using the sample mean $\hat{\mu}$ as an estimate for μ . $\hat{\mu}$ is probably not going to be exactly the same as μ , because the data points are random. So, even though μ is fixed, $\hat{\mu}$ is a random variable (because it depends on the random data). On average, what do we expect the random variable $\hat{\mu}_x$ to be? We can formalize this question by asking “What’s the expectation of $\hat{\mu}_x$, or $E[\hat{\mu}_x]$?”

$$\begin{aligned}
\mathbb{E}[\hat{\mu}_x] &= \frac{1}{n} \mathbb{E} \left[\sum_{i=1}^n x_i \right] && \text{(definition of } \hat{\mu} \text{)} \\
&= \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \mathbb{E}[x_i] && \text{linearity of expectation} \\
&= \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \mu = \mu
\end{aligned}$$

This result makes sense: while $\hat{\mu}_x$ might sometimes be higher or lower than the true mean, on average, the bias (i.e., the expected difference between these two) will be 0.

Deriving the formula for the sample variance $\hat{\sigma}^2$ requires a similar (but slightly more complicated) process; we obtain $E[\hat{\sigma}^2] = \sigma^2$. Notice that we divide by $n - 1$ in the denominator and not n . Intuitively, we have to do this because \bar{x} , which is *not* the true mean μ but is instead an estimate of the true mean, is “closer” to each of the observed values of x ’s compared to the true mean μ . Put another way, the distance between each observed value of x and \bar{x} tends to be smaller than the distance between each observed value of x and μ . In the case of expectation, some such errors were positive and others were negative, so they cancelled out on average. But, since we’re squaring the distances, our values, $(x_i - \bar{x})^2$, will be systematically lower than the true ones, $(x_i - \mu)^2$. So, if we divide by n instead of $n-1$, we’ll end up underestimating our uncertainty. For a more rigorous derivation, see the supplementary materials at the course website.

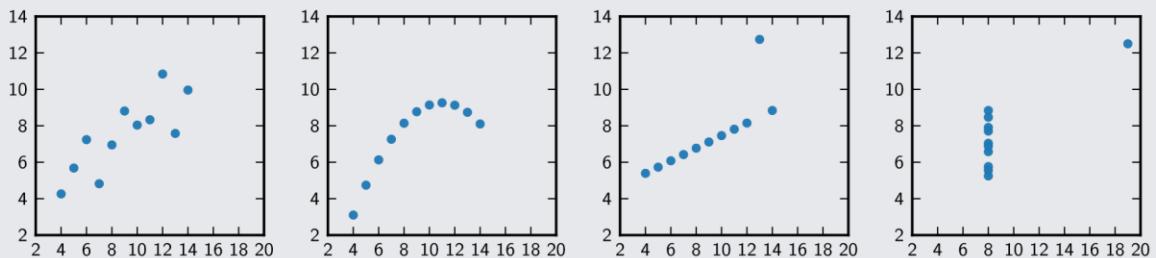
It’s often tempting to compute quantitative measures like mean and variance and move on to analyzing them, but these summary statistics have important limitations, as the next example illustrates.

EXAMPLE: ANSCOMBE'S QUARTET

Suppose I have 4 datasets of (x, y) pairs, and they all have the following properties:

- For random variable x , the estimate \bar{x} for the mean and the estimate $\hat{\sigma}_x^2$ for the variance are 9 and 11 respectively
- For random variable y , the estimate \bar{y} for the mean and the estimate $\hat{\sigma}_y^2$ for the variance are 7.50 and 4.12 respectively
- The correlation between x and y is 0.816. We'll explain precisely what this means in a couple lectures, but roughly speaking, it's a measure of how well y and x predict each other.

At this point, it would be easy to declare the datasets all the same, or at least very similar, and call it a day. But, if we make scatterplots for each of these datasets, we find that they're actually very different:



These datasets were constructed by the statistician Francis Anscombe in 1973 to illustrate the importance of graphing and visualizing data. It's easy to get lost in crunching numbers and running tests, but the right visualization can often reveal hidden patterns in a simple way. We'll see these again in a few lectures when we discuss regression.

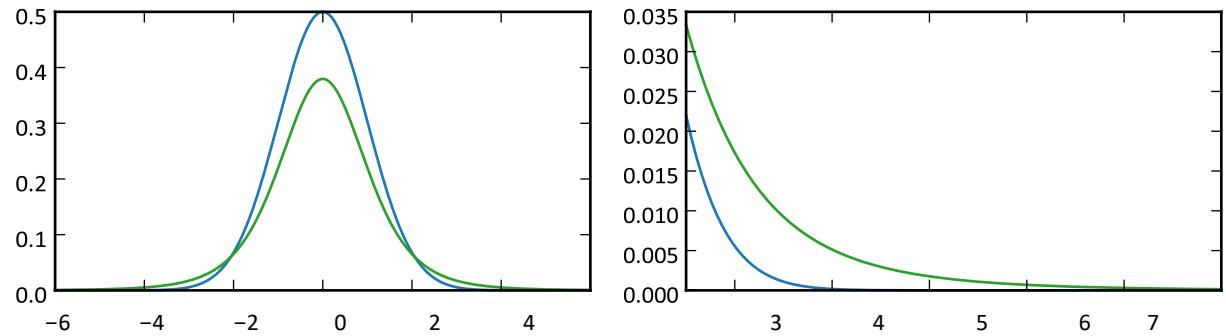


Figure 1.3: The standard normal distribution (blue) and Student t distribution with 5 degrees of freedom (green). The second plot zooms in on the x -axis from 2.5 to 8. Notice that the t distribution has *heavier tails*: that is, the probability of obtaining a value far away from the mean is higher for the t than for the normal.

1.3 Important Distributions

Here are some important probability distributions we'll use to model data. As we use these distributions to model data, we'll want to understand their properties and be able to compute probabilities based on them.

1. **Gaussian/Normal:** This is the common “bell curve” that you’ve probably heard about and seen before. We’ll use it often for continuous data. We say $x \sim N(\mu, \sigma^2)$ to mean that x is drawn from a Gaussian (or Normal) distribution with mean μ and variance σ^2 (or equivalently standard deviation σ). We’ll often use the **standard normal** distribution, or $N(0,1)$ (i.e., mean 0 and variance 1).

Here are some useful facts about Gaussian random variables:

- If $x \sim N(\mu, \sigma^2)$, and we define $y = (x - \mu)/\sigma$, then $y \sim N(0,1)$. y is usually referred to as a *standardized* version of x . We’ll take advantage of this fact in the next lecture.
- They’re very unlikely to be too far from their mean. The probability of getting a value within 1 standard deviation of the mean is about 68%. For 2 standard deviations, it’s about 95%, and for 3 standard deviations it’s about 99%. This is sometimes called the “68-95-99 rule”.
- Computing probabilities with Gaussian random variables only requires knowing the mean and variance. So, if we’re using a Gaussian approximation for some distribution (and we know the approximation works reasonably well), we only have to compute the mean and variance of the distribution that we’re approximating.

Figure 1.3 illustrates the Gaussian distribution along with the Student t distribution (described below).

2. **Bernoulli:** A Bernoulli random variable can be thought of as the outcome of flipping a biased coin, where the probability of heads is p . To be more precise, a Bernoulli random variable takes on value 1 with probability p and value 0 with probability $1-p$. Its expectation is p , and its variance is $p(1-p)$.

Bernoulli variables are typically used to model binary random variables.

3. **Binomial:** A binomial random variable can be thought of as the number of heads in n independent biased coinflips, where each coinflip has probability p of coming up heads. It comes up often when we aggregate answers to yes/no questions. Suppose we have Bernoulli-distributed random variables x_1, \dots, x_n , where each one has probability p of being 1 and probability $1-p$ of being 0. Then $b = \sum_{i=1}^n x_i$ is a binomial random variable. We’ll use the notation $b \sim B(n,p)$ as shorthand for this.

Since the expectation of each flip is p , the expected value of b is np :

$$\mathbb{E}[b] = \sum_{i=1}^n \mathbb{E}[x_i] = \sum_{i=1}^n p = np$$

Since the variance of each flip is $p(1 - p)$ and they're all independent, the variance of b is $np(1 - p)$:

$$\text{var}[b] = \sum_{i=1}^n \text{var}[x_i] = \sum_{i=1}^n p(1 - p) = np(1 - p)$$

- 4. Chi-Squared (χ^2):** We'll sometimes see random variables that arise from summing squared quantities, such as variances or errors. This is one motivation for defining the chi-squared random variable as a sum of several standard normal random variables.

To be a bit more formal, suppose we have x_1, \dots, x_r that are i.i.d., and $x_i \sim N(0,1)$. If we define $y = \sum_{i=1}^r x_i^2$, then y is a chi-squared random variable with r degrees of freedom: $y \sim \chi^2(r)$.

Note that not every sum of squared quantities is chi-square!

- 5. Student t distribution:** When we want to draw conclusions about a Gaussian variable for which the standard deviation is unknown, we'll use a student t distribution (we'll see why in more detail in the next chapter).

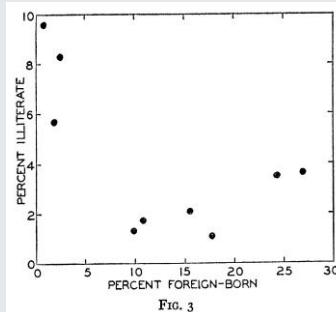
Formally, suppose $z \sim N(0,1)$ and $u \sim \chi^2(r)$. The quantity $t = \frac{z}{\sqrt{u/r}}$ is distributed according to the Student's t -distribution.

Figure 1.3 illustrates the t distribution along with the normal distribution.

Example: Warning of the day: Ecological fallacy

It's important to be careful about aggregate data and individual data. In particular, aggregate data can't always be used to draw conclusions about individual data!

For example, in 1950, a statistician named William S. Robinson looked at each of the 48 states and for each one computed the literacy rate and the fraction of immigrants. These two numbers were positively correlated: the more immigrants a state had, the more literate that state was. Here's a graph of his data:



You might immediately conclude from this that immigrants in 1950 were more literate than nonimmigrants, but in fact, the opposite was true! When he went through and looked at individuals, immigrants were on average *less* literate:

	Foreign Born	Native Born	Total
Illiterate	1304	2614	3918
Literate	11913	81441	93354
Total	13217	84055	97272

The reason he'd made the first finding about the states was that immigrants were more likely to settle in states that already had high literacy rates. So even though they were on average less literate, they ended up in places that had higher literacy rates.^a

In the 2004 U.S. presidential election, George W. Bush won the 15 poorest states, and John Kerry won 9 of the 11 richest states. But, 64% of poor voters (voters with an annual income below \$15,000) voted for Kerry, while 62% of rich voters (with an annual income over \$200,000) supported Bush.^b This happened because income affected voting preference much more in poor states than in rich states. So, when Kerry won rich states, the rich voters in those states were the few rich voters who leaned Democratic. On the other hand, in the poorer states where Bush won, the rich voters leaned heavily Republican and therefore gave him the boost in those states.

Here's a more concrete simple example: suppose we have datasets $x = \{1, 1, 1, 1\}$ and $y = \{2, 2, 2, -100\}$. $\bar{x} = 1$ and $\bar{y} = -23.5$, so in aggregate, $\bar{x} > \bar{y}$. But, the x values are usually smaller than the y values when examined individually.

We'll see this issue come up again when we discuss Simpson's Paradox.

^asee Robinson. Ecological Correlations and Behavior of Individuals. American Sociological Review, 1950.

^bsee statistician Andrew Gelman's book, **Red State, Blue State, Rich State, Poor State**.

ANEXO 2

Este trabalho foi possível graças à colaboração voluntária dos indivíduos analisados. Sendo assim, o trabalho original teve que ser submetido à aprovação do CEP (Comitê de Ética e Pesquisa). Como o presente trabalho é uma extensão do original, não foi necessária uma segunda submissão do mesmo ao CEP. Assim, este anexo traz as informações do projeto original e sua correspondente aprovação pelo CEP. O número de aprovação do trabalho original no CEP é 56789516.2.0000.5257, que aparece no arquivo abaixo designado como CAAE. Detalhes do projeto original estão no documento abaixo.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ALTERAÇÕES DA MICROESTRUTURA ÓSSEA TRABECULAR E CORTICAL EM PACIENTES COM E SEM HIV COM IDADE IGUAL OU MAIOR A 50 ANOS E GENES RELACIONADOS.

Pesquisador: Felipe Peres Oliveira

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

Versão: 2

CAAE: 56789516.2.0000.5257

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina - UFRJ

Patrocinador Principal: FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório

Parcial Detalhe:

Justificativa: Segue o relatório parcial 1 referente ao período de Agosto de 2016 a Janeiro de

Data do Envio: 07/03/2017

Situação da Notificação: Parecer Consustanciado Emitido

DADOS DO

PARECER Número

do Parecer:

1.969.675

Apresentação da Notificação:

Protocolo 150-16 do grupo III. Relatório N1 recebido em 07/03/2017.

Objetivo da Notificação:

Envio de relatório parcial.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não se aplica.

Página 01 de

Continuação do Parecer: 1.969.675

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

Relatório semestral, do período de agosto de 2016 a janeiro de 2017, apresentado com as informações solicitadas pelo formulário “Roteiro para Elaboração de Relatório Final de Estudos Clínicos Unicêntricos e Multicêntricos”, nos itens aplicáveis, como consta no arquivo intitulado “Relatorio_parcial_1_periodo_Agosto_2016_a_Janeiro_2017.docx”, postado em 07/03/2017.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não se aplica.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram encontrados óbices éticos no relatório N1, postado em 07/03/2017.

Considerações Finais a critério do CEP:

1. De acordo com o item X.1.3.b, da Resolução CNS n.º 466/12, o pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais que permitam ao Cep acompanhar o desenvolvimento dos projetos. Esses relatórios devem conter informações detalhadas nos moldes do relatório final contido no Ofício Circular n. 062/2011:

<http://conselho.saude.gov.br/web_comissoes/conep/aquivos/conep/relatorio_final_encerramento.pdf>

2. Eventuais emendas (modificações) ao protocolo devem ser apresentadas de forma clara e sucinta, identificando-se, por cor, negrito ou sublinhado, a parte do documento a ser modificada,

isto é, além de apresentar o resumo das alterações, juntamente com a justificativa, é necessário destacá-las no decorrer do texto (item 2.2.H.1, da Norma Operacional CNS nº 001 de 2013).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Envio de Relatório Parcial	Relatorio_parcial_1_periodo_Agosto_2016_a_Janeiro_2017.docx	07/03/2017 11:17:10	Annie Schtscherbyna Almeida de Assis	Aceito
Envio de Relatório	Relatorio_parcial_1_periodo_Agosto_	07/03/2017	Annie	Aceito

Página 02 de

Continuação do Parecer: 1.969.675

Parcial	2016_a_Janeiro_2017.pdf	11:17:18	Schtscherbyna Almeida de Assis	Aceito
---------	-------------------------	----------	--------------------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 17 de Março de 2017

Assinado por:
Carlos Alberto Guimarães
(Coordenador)

ANEXO 3

Cada participante do projeto assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, declarando a ciência sobre a pesquisa, os detalhes da mesma e confirmando seu consentimento na participação da pesquisa.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PESQUISA: "ALTERAÇÕES DA MICROESTRUTURA ÓSSEA TRABECULAR E CORTICAL EM PACIENTES COM E SEM HIV COM IDADE \geq 50 ANOS E GENES RELACIONADOS"

Este documento lhe dará informações e pedirá o seu consentimento para participar de uma pesquisa acima mencionada que será desenvolvida pela Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Pedimos que leia com atenção as informações a seguir antes de dar seu Consentimento.

1 – EXPLICAÇÃO SOBRE A PESQUISA

A sua avaliação será realizada investigando o que você come e os exercícios físicos que você pratica. Será coletada uma amostra de aproximadamente 15 ml do seu sangue para a análise de substâncias que podem interferir na qualidade do seu osso, como vitamina D, testosterona e CTX (uma substância que ajuda a saber se você está sofrendo perda de osso). Você será submetido a dois exames para avaliar a saúde dos seus ossos, os dois exames não doem.

O objetivo da pesquisa é avaliar o osso de 3 grupos de indivíduos: HIV positivo com carga viral indetectável por mais de um ano, HIV positivo com carga viral detectável há mais de um ano e pacientes HIV negativos, todos do sexo masculino com idade igual ou maior a 50 anos. Pessoas que utilizam medicação para HIV tem maior chance de apresentar perda de massa óssea (osteoporose em casos mais graves). A osteoporose também está relacionada com fatores genéticos e hereditários, então, iremos avaliar também através da amostra do seu sangue se você possui esses fatores hereditários (que são passados de pais para filhos) que podem estar relacionados com a osteoporose. Sendo assim, este estudo tem o intuito de descrever, comparar e enumerar a incidência de osteoporose nesses grupos de pacientes visando entender um pouco mais sobre a osteoporose em pacientes HIV positivos.

2 - RISCOS E DESCONFORTOS

Esclarecemos que o risco decorrente da sua participação no estudo é o mesmo de procedimentos rotineiros de exames de sangue, como mancha roxa no braço, desconforto e tontura. Este exame será realizado por técnico de enfermagem, em uma sala destinada para esta avaliação no Hospital Universitário. Em caso de qualquer alteração, relatada por você, a coleta será imediatamente interrompida. Com relação aos exames que avaliam o osso, eles não doem.

3 - BENEFÍCIOS ESPERADOS

Os resultados obtidos na sua avaliação poderão auxiliar no diagnóstico de alguma alteração no seu osso. Com isso, algumas doenças, como osteoporose,

poderão ser prevenidas e/ou tratadas. A osteoporose é muito comum em indivíduos soropositivos em tratamento, podendo levar a risco de fratura do osso. Estes benefícios poderão ser adquiridos pela orientação quanto às providências a serem tomadas caso seja identificada alguma alteração no seu osso.

4 - QUANTO A PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA

Você não terá nenhum custo financeiro por participar desta pesquisa. Informamos ainda que não há pagamento de qualquer espécie decorrente da sua participação no estudo.

Todos os custos com sua participação, como, por exemplo, com transporte e alimentação, serão pagos pelo pesquisador responsável. Ainda, caso seja do seu interesse, o senhor terá o direito de levar um acompanhante para os dias dos exames, sendo estes custos também pagos pelo pesquisador responsável.

5 - GARANTIA DE CONFIDENCIALIDADE

A sua identificação será mantida como informação confidencial. Os resultados serão publicados e/ou divulgados em congressos, artigos, etc sem revelar a sua identidade. É garantido o total sigilo sobre os dados coletados. O pesquisador se responsabiliza pela guarda e destino do material coletado que não será disponibilizado para qualquer outro uso não autorizado por você.

6 - PERGUNTAS

Você poderá fazer as perguntas que desejar antes, durante e após a coleta de dados. Os resultados das avaliações realizadas e as ações delas decorrentes poderão ser explicados a você sempre que disponíveis e por você solicitado. Quaisquer perguntas sobre os procedimentos da pesquisa ou os resultados são encorajadas. Se tiver alguma dúvida ou pergunta, favor solicitar mais explicações.

7 - LIBERDADE DE CONSENTIMENTO

Caso você não concorde em participar da pesquisa, não haverá nenhum prejuízo para si. Só participarão do trabalho os homens de idade igual ou superior a 50 anos interessados. Você pode se recusar a participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa sem problema algum e sem prejuízos pessoais.

8 – ARMAZENAMENTO TEMPORÁRIO DE AMOSTRAS

Estamos pedindo a sua permissão para guardar a sua amostra de sangue em um laboratório especial com refrigeradores. Seu sangue será guardado nesse local – chamado de repositório, para que possamos juntar um número maior de amostras e então elas serão enviadas ao laboratório para realização de alguns exames do estudo que não são feitos no Hospital Universitário. As amostras serão guardadas sem nenhum nome, apenas com um número especial do estudo. Os

responsáveis pelo repositório e as pessoas que posteriormente usarão essa amostra não saberão o seu nome ou quaisquer outras informações que possam identificá-las. Todas as amostras serão descartadas após o término do estudo.

9- PUBLICAÇÕES

Quanto à publicação dos resultados, o pesquisador responsável compromete-se a (1) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; (2) divulgar os resultados para os participantes da pesquisa e para as instituições onde os dados foram obtidos; (3) anexar os resultados da pesquisa na Plataforma Brasil, garantindo o sigilo relativo às propriedades intelectuais e (4) comunicar às autoridades competentes, bem como aos órgãos legitimados pelo Controle Social, dos resultados e/ou dos achados da pesquisa, sempre que esses puderem contribuir para a melhoria das condições de vida da coletividade, preservando, porém, a imagem e assegurando que os participantes da pesquisa não sejam estigmatizados.

Eu, _____, acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações sobre o estudo acima citado que li ou que foram lidas para mim.

Eu discuti com o pesquisador _____, sobre minha decisão em participar deste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e os esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Voluntariamente autorizo a minha participação neste projeto de pesquisa e poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes e durante o mesmo, sem penalidade ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento nesta Instituição. Todas as páginas desse termo deverão ser rubricadas, devendo a última folha ser assinada por mim e pelo pesquisador responsável. Eu receberei uma via desse documento, devendo a outra ser guardada pelo pesquisador responsável.

Nome do participante

Assinatura do Participante e data

Nome do Pesquisador Responsável

Assinatura do Pesquisador e data

Quaisquer dúvidas sobre a pesquisa poderão ser sanadas com o pesquisador:

Felipe Oliveira, Departamento de Doenças Infecto-parasitárias (DIP), 5º andar Hospital Universitário Clementino Fraga Filho / Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Rua Professor Rodolpho Rocco, nº 255 Ilha do Fundão – Rio de Janeiro – RJ – Brasil CEP: 21941-913

Telefones: (21) 3938-2526 / (21) 975150292 e-mail: felipemb86@yahoo.com.br

Caso você tenha alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com: Comitê de Ética em Pesquisa Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/ Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rua Professor Rodolpho Rocco, nº 255 Sala 1D - 46 – 1º andar Ilha do Fundão – Rio de Janeiro – RJ – Brasil CEP: 21941-913

Telefones: (21) 2562-2480 e-mail: ccp@hucff.ufrj.br

Horário de funcionamento: 8 às 16 horas

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é o órgão que tem como objetivo defender os interesses dos participantes da pesquisa no Brasil, além de contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos.

ANEXO 4

Este anexo traz em resumo as especificações técnicas do microtomógrafo clínico XtremeCT da Scanco.



Specifications:

Field of View:	126 mm
Max. Scan Length:	150 mm
Resolution (10% MTF):	4.8 lp/mm (104 µm)
Voxel Size:	41 - 246 µm
Image Matrix:	1536x1536 (default), up to 3072x3072
Stack Height:	9 mm
Measurement time per stack (100 slices):	2.8 min
For a patient scan with voxel size:	82 µm
Detector Size:	3072 x 255 [pixels], 170 mm x 14.5 mm
X-ray :	60 kVp, 60 W Focal Spot Size: 80 µm Target: W
Effective Dose:	<3 µSv per measurement (ICRP91)
Weight:	450 kg
Size (WxDxH):	1.35 m x 0.9 m x 1.48 m (scanner only)
Included Accessories:	Chair, hand and foot casts, powerful computer workstation and software
Beam Geometry:	Cone Beam

