



**COPPE/UFRJ**

DESENVOLVIMENTO DE UM ALGORITMO PARA QUANTIFICAÇÃO DE  
MICROESTRUTURAS EM TOMOGRAFIAS 3D DE OBJETOS COMPLEXOS  
OBTIDAS COM RADIAÇÃO SÍNCROTRON

Christiano Jorge Gomes Pinheiro

Tese de Doutorado 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 Doutor em Engenharia Nuclear.

Orientador(es): Prof. Delson Braz

Prof<sup>a</sup>. Regina Cély Barroso

Rio de Janeiro  
Novembro/2008

DESENVOLVIMENTO DE UM ALGORITMO PARA QUANTIFICAÇÃO DE  
MICROESTRUTURAS EM TOMOGRAFIAS 3D DE OBJETOS COMPLEXOS  
OBTIDAS COM RADIAÇÃO SÍNCROTRON

Christiano Jorge Gomes Pinheiro

TESE 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 DOUTOR EM  
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA NUCLEAR.

Aprovada por:

---

Prof. Delson Braz, D.Sc.

---

Prof<sup>a</sup>. Regina Cély Barroso, D.Sc.

---

Prof. Edgar Francisco Oliveira de Jesus, D.Sc.

---

Prof. Luis Fernando de Oliveira, D.Sc.

---

Prof. Nilson Costa Roberty, D.Sc.

---

Prof. Sidnei Paciornik, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

NOVEMBRO DE 2008

Pinheiro, Christiano Jorge Gomes

Desenvolvimento de um algoritmo para quantificação de microestruturas em tomografias 3D de objetos complexos obtidas com radiação sincrotron/ Christiano Jorge Gomes Pinheiro. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2008.

XV, 111 p.: il.; 29,7 cm.

Orientador: Delson Braz

Regina Cély Barroso

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Nuclear, 2008.

Referencias Bibliográficas: p. 89-100.

1. Tomografias 3D. 2. Radiação Sincrotron. 3. Histomorfometria. I. Braz, Delson *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Nuclear. III. Título.

*“O temor ao SENHOR é o princípio da sabedoria, porém os loucos desprezam a sabedoria e o ensino”. (Provérbios 1:7)*

Fonte: Bíblia Sagrada, A Palavra de DEUS.

## Agradecimentos.

### Agradeço a DEUS:

- pela salvação em JESUS CRISTO, meu salvador e Senhor;
- pelo Seu ESPÍRITO SANTO que me orienta em todo momento da minha vida;
- por tudo que tenho e tudo que sou, esta tese não seria possível se não fosse da Sua vontade;
- pela vida da minha esposa, Luciana Itália Pinheiro. Tu tens sido uma benção na minha vida. Eu Te Amo!
- pela vida do Bispo Carlos Alberto José e sua esposa Ilma Marques José. Obrigado pelas orações, por palavras de vida Cristã, por incentivos para estudar e por serem meu pai e minha mãe da fé!
- pela vida de meu orientador Professor Delson Braz e minha orientadora Professora Regina Cély Barroso, a dedicação e o carinho de vocês foram meus maiores incentivos para realização desta tese. Muito Obrigado;
- pela vida do Professor Luis Fernando Oliveira. Obrigado pelo amigo e orientador que tens sido na vida de muitos estudantes;
- pela vida dos meus familiares, Andréa, Wellington, Luiza, Rita, Petrônio e Paloma;
- pela vida dos meus amigos, Nívia Villela, Ana Paula, Carla Lemos, Edson Cardoso, Mônica, Liebert, André; Professor Ademir, Robson Castro;
- pela vida dos meus irmãos em Cristo, Ricardo César, Everton, Sandra Braga, Robson Nascimento e esposa Andréa (Rosinha), Walmir, Silas, Lorena, Fernanda, Eloá e de toda família ICNV (Igreja Cristã de Nova Vida) Nilópolis;
- pela vida dos professores e funcionários do Programa de Engenharia Nuclear da COPPE/UFRJ.
- pelo grupo SYRMEP do laboratório Elettra, Dra. Giuliana Tromba, Dr. Diego Dreossi, Dr. Nicola Sodini, Dr. Luigi Rigon, Dr. Half Menck, Dra. Fulvia Arfelli, Dra. Lucia Mancini, e Dr. Joseph Kaiser;

- pelos meus pais que agora dormem em Cristo. Obrigado pelos ensinamentos de humildade e perseverança. *in memoriam*: Manasés Santos Pinheiro e Rosa Maria Gomes Pinheiro.

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

DESENVOLVIMENTO DE UM ALGORITMO PARA QUANTIFICAÇÃO DE  
MICROESTRUTURAS EM TOMOGRAFIAS 3D DE OBJETOS COMPLEXOS  
OBTIDAS COM RADIAÇÃO SÍNCROTRON

Christiano Jorge Gomes Pinheiro

Novembro/2008

Orientadores: Delson Braz

Regina Cély Barroso

Programa: Engenharia Nuclear

A análise histomorfométrica associada à microtomografia com radiação síncrotron (SR- $\mu$ TC) fornece alta qualidade na quantificação de diversos materiais permitindo reconstruir imagens 3D com uma alta razão sinal-ruído. Esta tese tem como objetivo geral o desenvolvimento de um algoritmo para calcular os parâmetros histomorfométricos de imagens 3D obtidas usando radiação síncrotron. O algoritmo foi desenvolvido de modo a obter resultados sem a utilização de filtros morfológicos e incluindo o cálculo da conectividade, o que representando uma importante evolução na análise estrutural de diversos materiais. O algoritmo foi utilizado nas análises de estruturas complexas de imagens obtidas na linha de Física Médica do laboratório de luz síncrotron Elettra, em Trieste, Itália. Com o objetivo de mostrar sua versatilidade, o algoritmo, foi testado em diversas aplicações e seus resultados foram comparados com outros dois algoritmos conhecidos, sendo um deles comercial. O índice da conectividade permite avanços na análise da microarquitetura e da microestrutura de diversos objetos, com relação à quantificação de canais e poros. O desenvolvimento do algoritmo com extração 3D de dados para obtenção dos parâmetros histomorfométricos, foi considerado válido, através dos resultados satisfatórios obtidos na comparação com os resultados dos outros algoritmos.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

DEVELOPMENT OF AN ALGORITHM FOR QUANTIFICATION OF  
MICROSTRUCTURES IN COMPLEX OBJECTS FROM 3D SYNCHROTRON  
RADIATION MICROTOMOGRAPHIC IMAGES

Christiano Jorge Gomes Pinheiro

November/2008

Advisors: Delson Braz  
Regina Cély Barroso  
Department: Nuclear Engineering

Histomorphometric analysis associated to micro-computed tomography using synchrotron radiation (SR- $\mu$ TC) provides a high quality of quantification. Due to high signal-to-noise ratio and high resolution, SR- $\mu$ TC is considered as the gold standard for 3D micro-architecture imaging. The main purpose of this study was to assess histomorphometric parameters from 3D SR- $\mu$ TC images, using a novel algorithm, called Conect, which was developed to compute the histomorphometric parameters directly from 3D data without any morphological filters. Moreover, a new procedure to assess the connectivity was introduced. The quantification of 3D complex structures, using Conect algorithm, includes the extraction of parameters from the 3D images that were previously obtained at the Medical Physics Beamline at the Elettra Synchrotron Facility, Trieste, Italy. The algorithm was evaluated with different samples. The data obtained with Conect were compared to those obtained by using two other algorithms: one commercial and one homemade. Connectivity is a topological variable that quantifies the number of loops or interconnections in a structure. The relationships between parameters calculated from our algorithm and those from the other ones were examined. Significant correlations between the quantitative traditional parameters were found.



# Índice

|                                                            |    |
|------------------------------------------------------------|----|
| <b>Capítulo 1</b> .....                                    | 1  |
| 1.1 Introdução.....                                        | 1  |
| 1.2 Algoritmos de quantificação.....                       | 3  |
| 1.3 Objetivos.....                                         | 4  |
| <b>Capítulo 2</b> .....                                    | 6  |
| <b>Fundamentos Teóricos</b> .....                          | 6  |
| 2.1 Radiação síncrotron .....                              | 6  |
| 2.2 Reconstrução de imagens tomográficas .....             | 10 |
| 2.3 Imagens digitais.....                                  | 18 |
| 2.3.1 Representação da informação de imagem.....           | 18 |
| 2.3.2 Vizinhança de um pixel .....                         | 19 |
| 2.3.3 Voxel e sua vizinhança .....                         | 21 |
| 2.3.4 Segmentação de imagem digital .....                  | 23 |
| 2.3.5 Filtros para processamento e análise de imagens..... | 26 |
| 2.4 Quantificação histomorfométrica 3D.....                | 27 |
| 2.5 Conectividade .....                                    | 32 |
| 2.5.1 Equação de euler para poliedros. ....                | 32 |
| 2.5.2 O cálculo da conectividade .....                     | 34 |
| <b>Capítulo 3</b> .....                                    | 39 |
| <b>Materiais e Métodos</b> .....                           | 39 |
| 3.1 Características da linha SYRMEP .....                  | 40 |

|                                                            |           |
|------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2 Parâmetros experimentais.....                          | 43        |
| 3.3. Aquisição das imagens .....                           | 45        |
| 3.4. Reconstrução das imagens .....                        | 45        |
| 3.4.1. Normalização das imagens.....                       | 46        |
| 3.4.2. Determinação do centro de rotação.....              | 48        |
| 3.4.3.Reconstrução dos volumes .....                       | 50        |
| 3.5 Metodologia para Segmentação das Imagens.....          | 52        |
| <b>Capítulo 4</b> .....                                    | <b>54</b> |
| <b>Resultados</b> .....                                    | <b>54</b> |
| 4.1 Algoritmo.....                                         | 54        |
| 4.1.1 Cálculo dos Parâmetros Histomorfométricos .....      | 55        |
| 4.1.2 Algoritmo da conectividade.....                      | 57        |
| 4.1.3 Algoritmo da separação de poros .....                | 63        |
| 4.2 Aplicações.....                                        | 65        |
| 4.2.1 Extração de dados em amostras complexas.....         | 65        |
| 4.2.1.1 Análise dos Resultados das Amostras Complexas..... | 70        |
| 4.2.1.2 Conectividade $X_{BS/BV}$ .....                    | 71        |
| 4.2.2 Osso cortical.....                                   | 72        |
| 4.2.2.1 Primeiro grupo .....                               | 73        |
| 4.2.2.2 Segundo grupo.....                                 | 79        |
| <b>Capítulo 5</b> .....                                    | <b>85</b> |
| 5.1 Conclusões.....                                        | 85        |

|                                    |     |
|------------------------------------|-----|
| <i>5.2 Trabalhos futuros</i> ..... | 86  |
| <i>Capítulo 6</i> .....            | 89  |
| <i>Referências</i> .....           | 89  |
| <i>Anexos</i> .....                | 101 |

# Índice de Figuras

|                                                                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 2.1</b> - Efeito dos Dispositivos de Inserção n Forma do Feixe de Radiação Síncrotron.....                                         | 8  |
| <b>Figura 2.2</b> - Sistema de Coordenadas Cartesianas Usado para Definir a Distribuição Espacial da Radiação Emitida em um Síncrotron ..... | 9  |
| <b>Figura 2.3</b> - Geometria laminar, sobre o Plano da Órbita, de um Feixe de Luz Síncrotron.....                                           | 9  |
| <b>Figura 2.4</b> - Geometria de Atenuação .....                                                                                             | 10 |
| <b>Figura 2.5</b> - Geometria de Formação das Projeções .....                                                                                | 11 |
| <b>Figura 2.6</b> - Representação de Pixel .....                                                                                             | 19 |
| <b>Figura 2.7</b> – Vizinhos Horizontais e Verticais de um Pixel $p$ no Ponto $(x,y)=(0,0)$ .....                                            | 19 |
| <b>Figura 2.8</b> – “4-vizinhos” de $p$ , $N_D(p)$ , para $p$ em $(x,y) = (0,0)$ .....                                                       | 20 |
| <b>Figura 2.9</b> – $N_8(p)$ : Vizinhança dos 8 Pixels de $p$ em $(x,y) = (0,0)$ .....                                                       | 20 |
| <b>Figura 2.10</b> - Representação de Voxel.....                                                                                             | 21 |
| <b>Figura 2.11</b> - Cubo Demonstrando o Conceito de Voxels.....                                                                             | 22 |
| <b>Figura 2.12</b> – Conjunto $N_6(q)$ Contém Ponto Central $q$ e os Vizinhos U,D,L,R,N e S..                                                | 22 |
| <b>Figura 2.13</b> - Método do Vale com Histograma Particionado por dois Limiares .....                                                      | 24 |
| <b>Figura 2.14</b> – Efeito do Processo de Binarização.....                                                                                  | 25 |
| <b>Figura 2.15</b> – Imagem de uma Grade Acoplada à Objetiva de um Microscópio.....                                                          | 27 |
| <b>Figura 2.16</b> – Posicionamento de uma Grade sobre uma Seção Transversal da Fatia de um Osso Cortical.....                               | 28 |
| <b>Figura 2.17</b> – Imagem de um Cubo com uma Casca e um Canal .....                                                                        | 33 |
| <b>Figura 2.18</b> - Ilustração do Cálculo do Número de EULER Tridimensional para Objetos Digitalizados.....                                 | 35 |
| <b>Figura 3.1</b> - Esquema da Linha SYRMEP.....                                                                                             | 40 |

|                                                                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 3.2</b> - Principais Componentes do set-up Tomográfico Montado na Sala Experimental.....                                                  | 42 |
| <b>Figura 3.3</b> – Espectro da Radiação na Sala Experimental SYRMEP Calculada para uma Intensidade de Corrente de 200 mA e Energia de 2.0 GeV..... | 43 |
| <b>Figura 3.4</b> – Todas as Imagens são de 16bits e Foram Visualizadas Utilizando o Programa Syrmep_Tomo_Project.....                              | 47 |
| <b>Figura 3.5</b> – O quadro na Imagem Flat Mostra uma Região com uma Flutuação na Sensibilidade dos Fotoelementos .....                            | 48 |
| <b>Figura 3.6</b> – Escolha do Centro de Rotação das Fatias de Esponja.....                                                                         | 49 |
| <b>Figura 3.7</b> – Fatias Reconstruídas Antes e Depois da Escolha do Centro de Rotação Considerado Ideal .....                                     | 49 |
| <b>Figura 3.8</b> – Imagem de uma Fatia de Tibia de Rato com 8 bits .....                                                                           | 50 |
| <b>Figura 3.9</b> – Imagem de uma Pilha de Fatias do Objeto com Radiação de Fundo .....                                                             | 51 |
| <b>Figura 3.10</b> – Imagem de um Volume Ósseo sem Radiação de Fundo .....                                                                          | 51 |
| <b>Figura 3.11</b> – Fatia de Chocolate Binarizada.....                                                                                             | 53 |
| <b>Figura 4.1</b> – No $R^3$ , o Conjunto $N6(q)$ Contém o Ponto Central $q$ e os Pontos Marcados $U, D, L, R, N$ e $S$ .....                       | 55 |
| <b>Figura 4.2</b> – Fatia da Pedra Pome.....                                                                                                        | 65 |
| <b>Figura 4.3</b> – Volume Reconstruído de uma Amostra de Esponja Plástica.....                                                                     | 67 |
| <b>Figura 4.4</b> – Fatia 0028 da Pedra Vulcânica.....                                                                                              | 68 |
| <b>Figura 4.5</b> – Fatia Número 0100 da Amostra de Chocolate Aerado .....                                                                          | 69 |
| <b>Figura 4.6</b> – Gráfico da Relação Índice de Conectividade Versus $BS/BV$ .....                                                                 | 72 |
| <b>Figura 4.7</b> – Radiografia da Tibia de um Rato.....                                                                                            | 74 |
| <b>Figura 4.8</b> – Imagem de uma Área de Osso Cortical da Amostra 24 Visualizada no Microscópio SEM do Elettra.....                                | 75 |
| <b>Figura 4.9</b> – Uma Fatia Binarizada da Amostra 24.....                                                                                         | 75 |

|                                                                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 4.10</b> – <i>Histograma da Fatia Binarizada</i> .....                                                                                                               | 76 |
| <b>Figura 4.11</b> – <i>Volume da Amostra 24 com os 3 sub-volumes Escolhidos Delimitados Pelas Molduras Vermelhas</i> .....                                                    | 76 |
| <b>Figura 4.12</b> – <i>Volume Reconstruído da Amostra C2</i> .....                                                                                                            | 80 |
| <b>Figura 5.1</b> – <i>Exemplo do processo de esqueletização na imagem de um osso cortical onde é possível visualizar os canais</i> .....                                      | 87 |
| <b>Figura 5.2</b> – <i>Imagem de uma Fatia de Tibia de Rato Antes (a) e Depois de ser Tratada com Rede Neural em duas Diferentes Metodologias de Treinamento (b e c)</i> ..... | 88 |

# Índice de Tabelas

|                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Tabela 2.1 – Relação das Equações que Quantificam a Relação Superfície-Volume</i> ..... | 29 |
| <i>Tabela 3.1 – Parâmetros do ELETTRA nos Modos de Operação a 2,0 e 2,4GeV</i> .....       | 43 |
| <i>Tabela 4.1 – Parâmetros Histomorfométricos e Conectividade da Pedra Pome</i> .....      | 66 |
| <i>Tabela 4.2 - Parâmetros Histomorfométricos e Conectividade da Esponja</i> .....         | 67 |
| <i>Tabela 4.3 - Parâmetros Histomorfométricos da Pedra Vulcânica</i> .....                 | 68 |
| <i>Tabela 4.4 - Parâmetros Histomorfométricos do Chocolate Aerado</i> .....                | 69 |
| <i>Tabela 4.5 – Características das Amostras do Grupo 1 (Osso Cortical)</i> .....          | 74 |
| <i>Tabela 4.6 – Resultados Obtidos para a Amostra 24</i> .....                             | 77 |
| <i>Tabela 4.7 – Resultados Obtidos para a Amostra 25</i> .....                             | 77 |
| <i>Tabela 4.8 – Resultados Obtidos para a Amostra 31</i> .....                             | 77 |
| <i>Tabela 4.9 – Resultados Obtidos para a Amostra 32</i> .....                             | 78 |
| <i>Tabela 4.10 – Resultados Obtidos para a Amostra 39 (Controle)</i> .....                 | 78 |
| <i>Tabela 4.11 – Resultados Obtidos para a Amostra 41</i> .....                            | 78 |
| <i>Tabela 4.12 – Característica das Amostras do Grupo 2 (Osso Cortical)</i> .....          | 79 |
| <i>Tabela 4.13 – Resultados Obtidos para a Amostra C1</i> .....                            | 81 |
| <i>Tabela 4.14 – Resultados Obtidos para a Amostra C2</i> .....                            | 81 |
| <i>Tabela 4.15 – Resultados obtidos para a amostra Pb1</i> .....                           | 81 |
| <i>Tabela 4.16 – Resultados obtidos para a amostra Pb2</i> .....                           | 82 |
| <i>Tabela 4.17 – Resultados Obtidos para a Amostra F1</i> .....                            | 82 |
| <i>Tabela 4.18 – Resultados Obtidos para a Amostra F2</i> .....                            | 82 |
| <i>Tabela 4.19 – Resultados Obtidos para a Amostra PbF1</i> .....                          | 83 |
| <i>Tabela 4.20 – Resultados Obtidos para a Amostra PbF2</i> .....                          | 83 |

# ***Capítulo 1***

## ***1.1 Introdução***

No mundo moderno as análises de microestrutura e microarquitetura dos mais diversos materiais tornaram-se uma grande aliada na caracterização de metais, rochas, ossos, dentes, alimentos e outros. Esta caracterização pode ser feita com auxílio de diversos tipos de técnicas e análises de quantificação existente. Para realização desta tese foi destacada a análise morfométrica. A quantificação histomorfométrica é uma adaptação da quantificação estereológica aplicada à histologia.

A estereologia é a ciência das relações geométricas entre a estrutura real em três dimensões (3D) e a imagem da estrutura real em duas ou três dimensões (RUSS *et al.*, 1999). A estereologia inicialmente aplicada em secções histológicas tem o padrão na obtenção de informações de muitos tecidos, em especial o tecido ósseo. Muitos pesquisadores sugerem que a perda da resistência do osso trabecular e o aumento no risco de fraturas ósseas não se devem apenas à perda da densidade do osso trabecular, mas também à perda de elementos estruturais (KLEEREKOPER *et al.*, 1985, GOLDSTEIN *et al.*, 1987, PARFITT, 1987, MOSEKILDE, 1988, 1989, 1993, CIARELLI *et al.*, 1991, DELLING & AMLING, 1995, MAJUMDAR *et al.*, 1998, GOMBERG *et al.*, 2000). Com isso, a primeira abordagem para a avaliação quantitativa da estrutura do osso trabecular foi a quantificação histomorfométrica, baseada em medidas diretas e indiretas da largura, separação e número de trabéculas (WAKAMATSU *et al.*, 1969; WHITEHOUSE, 1974; AARON *et al.*, 1987). O objetivo da histomorfometria é a determinação de parâmetros 3D de estruturas presentes em uma secção transversal a partir de parâmetros 2D.



Devido ao interesse clínico inicial do estudo dos elementos estruturais do osso, a análise da microarquitetura óssea foi estudada com a obtenção de dados tridimensionais (3D) de modo não destrutivo usando a técnica da microtomografia computadorizada ( $\mu$ TC) (MATSUMOTO *et al.*, 2005; Dalle CARBONARE *et al.*, 2005). Inúmeros autores têm publicado trabalhos utilizando microtomografia para quantificação de parâmetros de estruturas 3D do osso (ODGAARD, 1997; BADOSA *et al.*, 2003; WEISS *et al.*, 2003; KETCHAM, 2005; THOMSEN *et al.*, 2005). Esta é uma técnica relativamente recente que permite a obtenção de imagens 3D da microestrutura de materiais.

A técnica da microtomografia tem sido realizada usando fontes de raios X microfoco (FELDKAMP *et al.*, 1989, MULLER *et al.*, 1997, BORAH *et al.*, 2001) e também usando fontes de radiação síncrotron (BONSE *et al.*, 1994, PEYRIN *et al.*, 1998, SALOME *et al.*, 1999, KINNEY *et al.*, 2000, NUZZO *et al.*, 2002, ITO *et al.*, 2003, SONE *et al.*, 2004). A utilização da radiação síncrotron (RS) combinada com a microtomografia computadorizada ( $\mu$ TC) tem possibilitado novas descobertas na análise 3D de estruturas complexas tais como: filtros cerâmicos, ligas metálicas, alimentos e dos ossos trabecular e cortical (GRODZINS, 1983, DILMANIAN, 1992, BONSE *et al.*, 1996, PEYRIN *et al.*, 2000). As propriedades naturais de colimação e a alta intensidade do fluxo de fótons da RS, mesmo após a monocromatização do feixe, permitem a SR- $\mu$ TC reconstruir imagens 3D com uma alta razão sinal-ruído (NUZZO *et al.*, 2001 e 2002, SONE *et al.*, 2004).

Em 1987, PARFITT *et al.* apresentaram uma padronização dos termos, símbolos e unidades utilizados na histomorfometria e as equações básicas a partir dos quais os demais parâmetros foram deduzidos.

Em 1989, FELDKAMP *et al.*, apresentam um método para obtenção dos parâmetros histomorfométricos a partir de imagens tomográficas. Apesar de haver objetivado primeiro o acesso direto a microestrutura 3D, o método ofereceu diversas vantagens quando comparado ao método histomorfométrico convencional já que as fatias são obtidas de forma não destrutiva formando um conjunto de planos paralelos entre si.

A análise histomorfométrica associada à microtomografia com radiação síncrotron (SR- $\mu$ TC), fornece uma alta qualidade da imagem. Menos artefatos são obtidos do que as imagens geradas usando uma fonte de raios X *microfocus*, por exemplo. Esta descoberta tem permitido que a análise estrutural usando radiação síncrotron seja expandida não apenas na área biomédica como também em diversas outras áreas, dentre as quais são citadas a ciência dos materiais, geologia e a engenharia.

Uma segunda análise estrutural foi abordada nesta tese. Complementando a análise histomorfométrica, a conectividade permite uma diferente visualização e compreensão das estruturas dos objetos. FELDKAMP *et al.*, 1989, desenvolveram uma metodologia para utilizar o número de Euler 3D  $N^{(3)}$  como uma medida de conectividade. O número de Euler é uma quantidade topológica e, como tal, não trás informações sobre o posicionamento das conexões, suas dimensões ou as propriedades físicas do material que compõe a conexão. Sendo assim, por si só não pode ser esperado que ele seja um indicador de propriedades mecânicas. Por outro lado, tem sido promissor o uso da conectividade em diversas áreas de pesquisa, principalmente na quantificação de poros (KABEL, J. *et al.*, 1999, VOGEL, H. & ROTH, K., 2000, FOLLET, H. *et al.*, 2004, Do-GYOON KIM *et al.*, 2004, Dalle CARBONARE *et al.*, 2005, SAMOUELIAN, A. *et al.*, 2007).

## ***1.2 Algoritmos de Quantificação***

Os algoritmos de quantificação de imagens são comerciais ou privados, ou seja, desenvolvidos para atender as necessidades de determinados grupos de pesquisas (WHITEHOUSE *et al.*, 1974, VESTERBY *et al.*, 1989, HAHN *et al.*, 1992, LE *et al.*, 1992, WEINSTEIN e MAJUMDAR, 1994, OLIVEIRA *et al.*, 2003, VGStudioMAX, 2004, KETCHAM, 2005, SKYSCAN, 2004, ). Os comerciais são em sua maioria caros e com os parâmetros pré-definidos. Os algoritmos privados também são construídos de acordo com a necessidade da análise a ser feita pelo grupo que o desenvolveu, restringindo a sua utilização. Essa discussão revela uma das desvantagens desses

algoritmos e um dos problemas enfrentados pelos grupos de pesquisa que necessitam calcular parâmetros que não são fornecidos em um único algoritmo, obrigando-os ao desenvolvimento de seu próprio algoritmo.

Outra grande desvantagem de tais algoritmos é a extrapolação de dados a partir de informação 2D, para obter informação 3D das tomografias. A extrapolação de dados a partir de informação 3D é anunciada como uma evolução na quantificação histomorfométrica. Em 2003, OLIVEIRA buscando soluções para este problema, escreveu um algoritmo que calcula o volume das microestruturas por *voxels*, utilizando os modelos pré-configurados de *voxels* que facilitam o cálculo das áreas e dos volumes na imagem. Baseando-se nas noções de topologia, calculou a conectividade tridimensional a partir de uma seção bidimensional, utilizando os dados tridimensionais disponíveis na tomografia, assim como fez FELDKAMP *et al.*, em 1989.

## ***1.3 Objetivos***

Esta tese tem como objetivo geral o desenvolvimento de um algoritmo para calcular os parâmetros histomorfométricos de imagens 3D obtidas usando radiação síncrotron, visando reduzir gastos. Este algoritmo foi escrito de modo a obter os parâmetros histomorfométricos com extrapolação dos dados 3D e resultados sem a utilização de filtros morfológicos. No algoritmo foi incluído o cálculo da conectividade, reavaliando e estruturando os primeiros cálculos de OLIVEIRA (2003). Sendo assim, no resultado final foi possível obter um índice da conectividade que permitiu uma melhor compreensão física dos valores obtidos e novas análises da microarquitetura e da microestrutura de diversos objetos, com relação à quantificação de canais e poros.

Este algoritmo, chamado *Conect*, foi utilizado nas análises de microestrutura e microarquitetura de estruturas complexas de imagens obtidas na linha de Física Médica SYRMEP do laboratório de luz síncrotron Elettra, em Trieste, Itália. Com o objetivo de mostrar sua versatilidade, o *Conect* foi testado em diversas aplicações:

- Geologia: estudo das rochas vulcânicas, buscando um melhor entendimento do solo de regiões próximas a vulcões (BAIS *et al.*, 2003, HUSEN *et al.*, 2004, KETCHAM *et al.*, 2005, LOUIS *et al.*, 2005);
- Engenharia de alimentos: análise de alimentos (queijos, chocolates, pão, café e etc.) (FALCONE *et al.*, 2006). A microestrutura dos produtos alimentares determina em grande medida o desenvolvimento das propriedades físicas, textural e sensorial destes produtos (Van DALEN *et al.*, 2003);
- Engenharia de tecidos: análise, principalmente, dos tecidos ósseos (CANCEDDA *et al.*, 2007, CHESNUT III *et al.*, 2001);
- Engenharia dos materiais: análise de espumas, ligas, cerâmicas, materiais biomédicos para implantes (BARUCHEL *et al.*, 2006, ADRIEN *et al.*, 2007, MADI *et al.*, 2007, ISAAC *et al.*, 2008, MARMOTTANT *et al.*, 2008, TESEI *et al.*, 2005).

A validação dos resultados obtidos pelo *Conect* foi realizada por comparação com resultados obtidos usando dois algoritmos, sendo um comercial e outro desenvolvido por um grupo de pesquisa. O algoritmo comercial utilizado é um algoritmo de reconstrução de imagens para visualização 3D chamado *VG Studio Max* (VGStudioMAX, 2004), o qual possui uma função específica para cálculo de parâmetros histomorfométricos. O outro algoritmo, chamado *DSc*, foi desenvolvido por OLIVEIRA no Laboratório de Instrumentação Nuclear da COPPE/UFRJ (OLIVEIRA *et al.*, 2003). A escolha destes algoritmos se deve ao fato deles calcularem os parâmetros histomorfométricos primários extraíndo-os diretamente dos dados 3D. A validação foi feita aplicando os três algoritmos em diversas imagens microtomográficas obtidas na linha SYRMEP.

No próximo capítulo, será apresentada a fundamentação teórica necessária para o bom entendimento desta tese. A metodologia utilizada para aquisição e análise das imagens será apresentada no Capítulo 3. O algoritmo desenvolvido, os resultados da sua utilização em diferentes áreas de aplicação e a sua validação serão apresentados no Capítulo 4. O Capítulo 5 apresentará as conclusões obtidas através da análise dos resultados e proporá trabalhos futuros.

## ***Capítulo 2***

### ***Fundamentos Teóricos***

Uma partícula carregada acelerada, viajando em uma trajetória curva, emitirá radiação. Movendo-se em velocidades relativísticas, esta radiação é emitida como um estreito cone tangente ao percurso da partícula. A radiação síncrotron é gerada quando elétrons relativísticos são acelerados (ou mudam de direção) em um campo magnético (ATTWOOD, 2007, MARGARITONDO, 1988).

#### ***2.1 Radiação Síncrotron***

Nos laboratórios de radiação síncrotron os elétrons são inseridos em pacotes em um anel de armazenamento a vácuo e forçados por um forte campo magnético a viajar em uma órbita circular fechada com velocidades relativísticas. Os elétrons são primeiramente produzidos e pré-acelerados em um sistema de injeção adequado, o acelerador linear conhecido como LINAC (*LINear ACcelerator*), sendo então, injetados e acelerados nos anéis de armazenamento através do síncrotron injetor (*booster*). Nesse ponto os elétrons estão circulando em órbitas fechadas mantidas por um sofisticado sistema magnético.

Os componentes básicos do sistema magnético são dipolos que curvam a trajetória do elétron na órbita fechada. Como o elétron perde energia por radiação síncrotron, sua circulação pelo anel requer uma injeção de energia equivalente para cada volta. Esta injeção é feita com uma cavidade de radiofrequência. Com vácuo, os elétrons armazenados no anel podem circular por períodos de tempo muito longo,

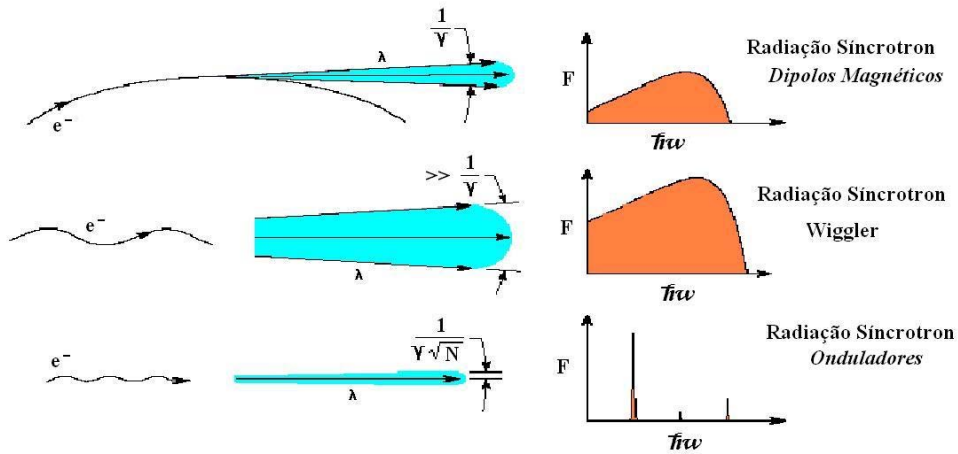
excedendo um dia em muitos casos (WINICK, 1980, MARGARITONDO, 1988, THOMLINSON, 1994, MARGARITONDO, 2001, ATTWOOD, 2007).

A radiação síncrotron é basicamente produzida por 3 tipos de estruturas magnéticas: dipolos magnéticos, onduladores, e *wigglers*. Os dipolos magnéticos provocam uma curva na trajetória do elétron, emitindo uma radiação tangente a essa trajetória. Muitas das linhas de luz (*beamlines*) do Elettra recebem seus raios X dos dispositivos *wigglers* e onduladores.

Os onduladores são estruturas magnéticas periódicas com um fraco campo magnético. A periodicidade causa uma oscilação harmônica ao elétron quando ele se move na direção axial, resultando em um movimento caracterizado por ondulações. O fraco campo magnético permite que a amplitude desta ondulação seja pequena. Assim, a radiação resultante é um cone muito estreito. Combinando-se com um feixe de elétrons confinado hermeticamente, a radiação passa a ter pequena divergência angular e uma abertura espectral estreita (MARGARITONDO, 1988, ATTWOOD, 2007).

Os *wigglers* são a versão de campo magnético forte dos onduladores. Devido ao campo mais forte, a oscilação da amplitude e, concomitantemente, a potência da radiação é maior. Com isso o cone da radiação é mais amplo em relação ao cone gerado pelos onduladores. O *wiggler* consiste de uma série de imãs periódicos colocados em uma secção reta do anel por onde passam os elétrons. Por causa da ação do seu campo magnético, os elétrons são forçados a oscilar em torno dessa secção reta, resultando em um fluxo de raios X muito alto ao longo do percurso (MARGARITONDO, 1988, ATTWOOD, 2007).

Na figura 2.1 é possível ver a ação sobre a forma do feixe de radiação síncrotron devido aos três tipos de dispositivos de inserção: dipolo magnético, onduladores e *wiggler*.



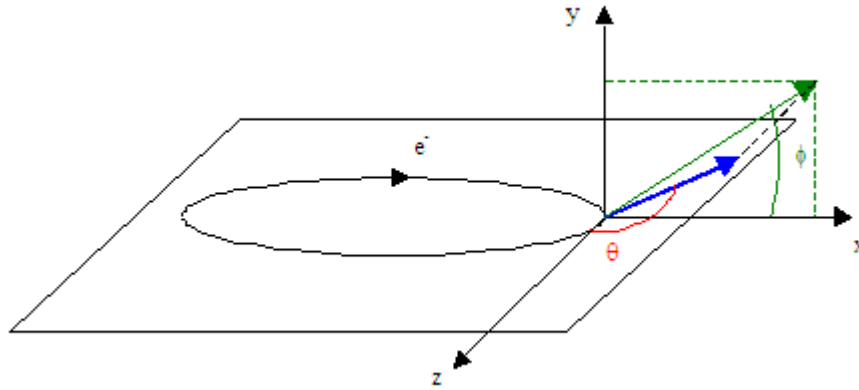
**Figura 2.1** – Efeito dos dispositivos de inserção na forma do feixe de radiação síncrotron (ATTWOOD, 2007).

Os feixes de raios X duros ( $E > 5\text{keV}$ ) de uma máquina de radiação síncrotron são extremamente intensos, colimados e apresentam um alto grau de coerência longitudinal. Além disso, com a utilização de um cristal monocromador é possível obter feixes praticamente monocromáticos de energia selecionável em um amplo espectro energético. O feixe é, por sua natureza, laminar, com alguns milímetros de altura e alguns décimos de centímetros de largura sobre o plano do objeto, sendo ideal para sistemas de imagem por varredura. As características geométricas do feixe podem ser modificadas utilizando-se cristais assimétricos, ou de outra ótica, de modo a adaptar-se às exigências específicas da pesquisa a ser realizada. No estado atual, os feixes de luz síncrotron representam “o estado da arte” para imagens com raios X duros (ARFELLI, 2000, LEWIS, 2004).

No síncrotron, os pacotes de elétrons são acelerados com velocidades próximas à da luz em uma órbita quase circular com o objetivo de irradiar energia. A potência emitida por unidade de ângulo sólido por uma carga ultra relativística ( $\gamma \gg 1$ ) sujeita a uma aceleração ortogonal à sua velocidade instantânea é dada por (JACKSON, 1975):

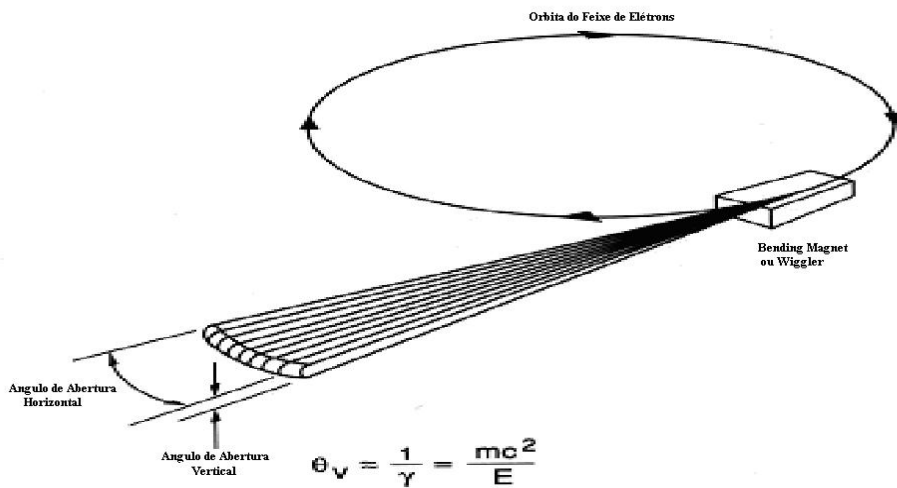
$$\begin{aligned} \frac{dP}{d\Omega}(t') &= \frac{e^2 \cdot \dot{v}^2}{4 \cdot \pi \cdot c^3} \cdot \frac{1}{(1 - \beta \cdot \cos\theta)^3} \cdot \left[ 1 - \frac{\sin^2 \theta \cdot \cos^2 \varphi}{\gamma^2 \cdot (1 - \beta \cdot \cos\theta)^2} \right] \\ &\cong \frac{2 \cdot e^2 \cdot \dot{v}^2}{\pi c^3} \gamma^6 \cdot \frac{1}{(1 + \gamma^2 \cdot \theta^2)^3} \cdot \left[ 1 - \frac{4 \cdot \gamma^2 \cdot \theta^2 \cdot \cos^2 \varphi}{(1 + \gamma^2 \cdot \theta^2)^2} \right] \end{aligned} \quad (2.1)$$

onde  $e$  é a carga do elétron,  $c$  é a velocidade da luz,  $v$  e  $\dot{v}$  são a velocidade e a aceleração do elétron respectivamente,  $\beta = v/c$  e  $\gamma = (1 - \beta^2)^{-1/2}$  e, por último, os ângulos  $(\theta, \varphi)$  estão relacionados a um sistema cartesiano no qual a velocidade e a aceleração instantâneas percorrem os eixos  $z$  e  $x$  respectivamente (Figura 2.2).



**Figura 2.2** - Sistema de coordenadas cartesianas usado para definir a distribuição espacial da radiação emitida em um síncrotron.

A distribuição dada pela equação 2.1 não é fortemente dependente de  $\varphi$  (RIGON, 1997) e é fortemente direcionada para frente. Em uma primeira aproximação, a energia é irradiada em um cone centrado em torno da velocidade instantânea e de semi-abertura  $1/\gamma$ . Para uma energia de 2 GeV (Elettra) é possível obter feixes de radiação extremamente colimados de 0,25mrad (Figura 2.3).



**Figura 2.3** – Geometria laminar, sobre o plano da órbita, de um feixe de luz síncrotron.



## 2.2 Reconstrução de Imagens Tomográficas

Um feixe monoenergético com uma intensidade incidente  $I_0$  (fóton/s) que atravessa um comprimento  $x$  do material tem uma intensidade de saída dada pela equação de Beer-Lambert:

$$I = I_0 \exp(-\mu x) \quad 2.2$$

onde  $\mu$  é o coeficiente de atenuação do material que depende da energia dos fótons incidentes e do material que o feixe atravessa.

Se o material é heterogêneo o produto  $\mu x$  é substituído por uma integral de linha e a intensidade de saída do feixe torna-se uma função da posição (Figura 2.4). Desta forma, a atenuação é expressa por uma função  $\mu(x,y)$  e a intensidade de saída do feixe é expresso por:

$$I(x) = I_0(x) \exp\left(-\int_L \mu(x,y) dy\right) \quad 2.3$$

onde  $L$  é o comprimento do material atravessado pelo feixe na direção do eixo  $y$ . Uma linha que atravessa  $\mu(x,y)$  é chamada de raio.

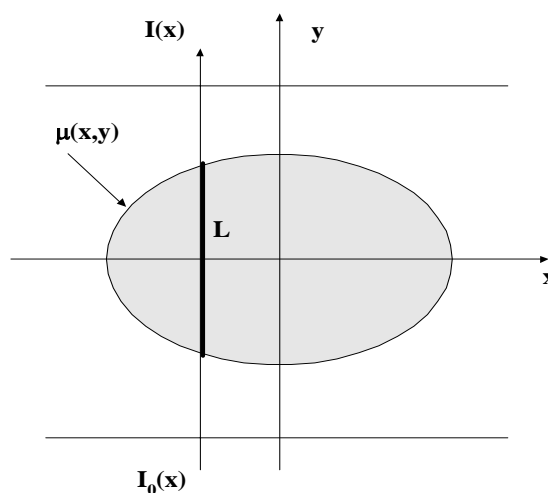


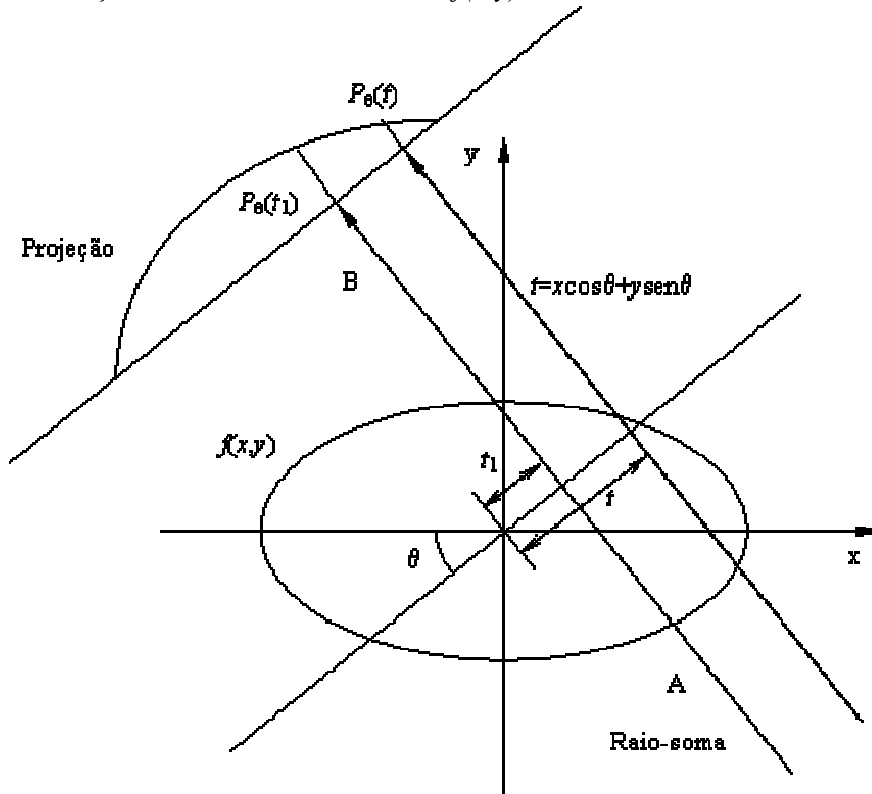
Figura 2.4 - Geometria de atenuação.

Pode-se reescrever a equação 2.3 da seguinte forma:

$$P(x) = \ln \frac{I_0(x)}{I(x)} = \int_L \mu(x,y) dy \quad 2.4$$

Esta equação descreve matematicamente o termo designado por raio-soma, que é definido como a integral da função  $\mu(x,y)$  ao longo de um raio. Se uma série de linhas paralelas é medida, um perfil de intensidade é obtido, o qual é chamado de projeção (KAK & SLANEY, 2001).

De uma forma geral, seja  $f(x,y)$  uma função bidimensional, onde as linhas que a cortam (em qualquer direção) são chamadas de raios, e a integral de linha ao longo destes raios são as integrais de raio ou raios-soma. Um conjunto de raios-soma, paralelos ou divergentes, forma uma projeção  $P(t)$ , figura 2.5. Torna-se familiar que se  $\mu(x,y)$  é uma função bidimensional tal como  $f(x,y)$  no modelo matemático.



**Figura 2.5** - Geometria de formação das projeções.

No caso de raios paralelos, um raio-soma contido em uma projeção pode ser descrito matematicamente por

$$P_\theta(t) = \int_{AB} f(x,y) ds \quad (2.5)$$

onde  $AB$  define a linha ao longo do qual a integral será calculada,  $t$  é a posição do raio-soma dentro da projeção,  $ds$  é o passo infinitesimal ao longo do raio e  $\theta$  é a inclinação da linha  $AB$  em relação ao sistema de coordenadas  $XY$ , a partir do eixo  $y$  (figura 2.5). Este raio  $AB$  é expresso algebricamente pela equação

$$t = x \cos \theta + y \sin \theta \quad (2.6)$$

Em outras palavras, para um dado ângulo  $\theta$ , somente as coordenadas  $x$  e  $y$  que satisfizerem a equação acima é que estarão sobre a linha  $AB$ , e mais, somente os pontos  $f(x,y)$  com tais coordenadas irão contribuir com a integral de linha  $P_\theta(t)$ . Desta forma, a equação 2.5 pode ser re-escrita:

$$P_\theta(t) = \int_{AB} f(x, y) ds = \int_{-\infty-\infty}^{\infty\infty} \int_{-\infty-\infty}^{\infty\infty} f(x, y) \delta(x \cos \theta + y \sin \theta - t) dx dy \quad (2.7)$$

pois se  $x$  e  $y$  estão sobre  $AB \Rightarrow x \cos \theta + y \sin \theta - t = 0 \Rightarrow \delta(x \cos \theta + y \sin \theta - t) = \delta(0) = 1$  que implica em

$$\int_{-\infty-\infty}^{\infty\infty} \int_{-\infty-\infty}^{\infty\infty} f(x, y) \delta(x \cos \theta + y \sin \theta - t) dx dy = \int \int f(x, y) dx dy \quad (2.8)$$

A função  $P_\theta(t)$  como função somente de  $t$  (para um dado valor fixo de  $\theta$ ) define a projeção paralela de  $f(x,y)$  para um ângulo  $\theta$ . A função bidimensional  $P_\theta(t)$  (com  $t$  e  $\theta$  variando) é conhecido como coeficiente da transformada de Radon de  $f(x,y)$  (BARROSO, 1997). Uma projeção tomada ao longo de um conjunto de raios paralelos é chamada de projeção paralela. Raios-soma divergentes também podem ser tomados para formar uma projeção. Tais projeções são chamadas de projeções de feixe em leque e neste caso, cada raio-soma, contido na projeção em leque, corresponderá a um ângulo  $\theta$  diferente, isto é, cada raio-soma terá uma inclinação em relação ao eixo  $y$ .

Retornando ao problema de determinação dos coeficientes de atenuação, tem-se que cada raio-soma é resultado da integral dos coeficientes de atenuação ao longo de um raio. Se o corpo de prova é transladado ao longo de uma trajetória perpendicular ao feixe de radiação e, a intervalos regulares deste deslocamento levantarmos os valores de  $I$ , então poder-se-á calcular os raios-soma correspondentes a cada intervalo e formar uma projeção paralela. Se o instrumento de medida for extenso e constituído de vários

elementos detectores independentes, pode-se levantar os valores de  $I$  e gerar uma projeção em leque. Estas projeções, paralelas e em leque, serão utilizadas para calcular os coeficientes de atenuação (ou os parâmetros desejados) do corpo de prova através do teorema da fatia de Fourier cujo resultado é equivalente a uma “transformada inversa” de Radon. Inicia-se o teorema formulando a transformada de Fourier da função bidimensional  $f(x,y)$  e da projeção  $P_\theta(t)$ .

$$F(u, v) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x, y) e^{-j2\pi(ux+vy)} dx dy \quad (2.9)$$

$$S_\theta(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} P_\theta(t) e^{-j2\pi\omega t} dt \quad (2.10)$$

Igualando-se a variável  $v$  da transformada  $F(u,v)$  a zero, notar-se-á que a expressão final se resume na transformada da projeção inicial ( $\theta = 0$ ) como se segue.

$$\begin{aligned} F(u,0) &= \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x, y) e^{-j2\pi ux} dx dy \\ &= \int_{-\infty}^{\infty} \left[ \int_{-\infty}^{\infty} f(x, y) dy \right] e^{-j2\pi ux} dx \\ &= \int_{-\infty}^{\infty} P_0(t) e^{-j2\pi ut} dt = S_0(\omega) \end{aligned} \quad (2.11)$$

As variáveis  $(u,v)$  e  $(\omega,\theta)$  estão relacionadas entre si através de simples funções trigonométricas.

$$\begin{aligned} u &= \omega \cos \theta \\ v &= \omega \sin \theta \end{aligned} \quad (2.12)$$

Assim, representar a transformada de  $f(x,y)$  por  $F(u,v)$  ou por  $F(\omega,\theta)$  tem o mesmo efeito, e mais,  $F(u,0) = F(\omega,0) = S_0(\omega)$ . Resta mostrar que o resultado anterior é válido para qualquer  $\theta \neq 0$ . Para isso, substituem-se as variáveis  $x$  e  $y$  por duas outras –  $t$  e  $s$  – que são variáveis de um sistema de coordenadas cartesianas girado de um ângulo  $\theta$  que coincide com o sistema de coordenadas das projeções. Verificando-se a figura 2.5, onde se apresenta pictoricamente uma projeção paralela, vê-se que a coordenada  $s$  coincide com a direção do raio-soma e que a coordenada  $t$  corresponde ao eixo perpendicular aos mesmos raios-soma – e que é paralela a direção da projeção. Desta forma,  $(t,s)$  e  $(x,y)$  estão ligadas através de uma matriz de rotação.

$$\begin{bmatrix} t \\ s \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \cos \theta & \text{sen } \theta \\ -\text{sen } \theta & \cos \theta \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} x \\ y \end{bmatrix} \quad (2.13)$$

ou seja, qualquer ponto  $(x,y)$  de  $f(x,y)$  possui coordenadas  $(t,s)$  calculadas por meio da matriz de rotação acima. Reescrevendo a equação do raio-soma em função das novas variáveis  $t$  e  $s$  têm que

$$P_{\theta}(t) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t,s) ds \quad (2.14)$$

e a transformada de Fourier da projeção é:

$$S_{\theta}(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} P_{\theta}(t) e^{-j2\pi\omega t} dt = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(t,s) ds e^{-j2\pi\omega t} dt \quad (2.15)$$

Retornando para o sistema de coordenadas  $(x,y)$  e substituindo  $t$  por  $x\cos\theta+y\text{sen}\theta$ , conclui-se que

$$\begin{aligned} S_{\theta}(\omega) &= \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x,y) e^{-j2\pi\omega(x\cos\theta+y\text{sen}\theta)} dx dy \\ &= F(u,v) \text{ para } u = \omega\cos\theta, v = \omega\text{sen}\theta \\ &= F(\omega,\theta) \end{aligned} \quad (2.16)$$

Por fim, se as informações de cada projeção  $P_{\theta}(t)$  estão disponíveis, pode-se calcular sua transformada  $S_{\theta}(\omega)$  que, como deduzido acima, equivale à transformada  $F(\omega,\theta)$ . Como  $F(\omega,\theta)$  e  $F(u,v)$  são equivalentes, calcula-se a função  $f(x,y)$  original através de uma simples transformação inversa.

$$f(x,y) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} F(u,v) e^{j2\pi(ux+vy)} dudv \quad (2.17)$$

Voltando mais uma vez ao problema da determinação dos coeficientes de atenuação, se além de se transladar o corpo de prova, ele for o girado de um passo angular  $\Delta\theta$  ao final de cada uma das translações, formam-se as projeções  $P_{i\Delta\theta}(t)$  necessárias para se reconstruir a informação original do corpo de prova.

Um fato interessante deve ser notado quando se reconstruiu a função  $f(x,y)$ : como os raios-soma de cada projeção são paralelos, ao comparar-se as projeções de um

ângulo  $\theta$  e  $\theta+180^\circ$ , percebe-se que estas projeções possuem os mesmos valores porém em ordem inversa. Isto significa que não há necessidade de se utilizar todas as projeções ao longo dos  $360^\circ$  em torno do corpo de prova, mas somente metade delas. Isso pode ser visto abaixo.

$$\begin{aligned}
 f(x, y) &= \int_0^{2\pi} \int_0^\infty F(\omega, \theta) e^{j2\pi\omega(x \cos \theta + y \sin \theta)} \omega d\omega d\theta \\
 &= \int_0^\pi \int_0^\infty F(\omega, \theta) e^{j2\pi\omega(x \cos \theta + y \sin \theta)} \omega d\omega d\theta \\
 &\quad + \int_0^\pi \int_0^\infty F(\omega, \theta + \pi) e^{j2\pi\omega(x \cos(\theta+\pi) + y \sin(\theta+\pi))} \omega d\omega d\theta
 \end{aligned} \tag{2.18}$$

$$F(\omega, \theta + \pi) = F(-\omega, \theta) \tag{2.19}$$

Uma vez estabelecida a necessidade de se usar somente as projeções contidas entre 0 e  $\pi$ , pode-se partir para a equação de reconstrução propriamente dita. Uma vez que  $F(\omega, \theta)$  é igual a  $S_\theta(\omega)$ , substitui-se a primeira pela segunda na equação da transformada inversa.

$$\begin{aligned}
 f(x, y) &= \int_0^\pi \left[ \int_{-\infty}^\infty F(\omega, \theta) |\omega| e^{j2\pi\omega(x \cos \theta + y \sin \theta)} d\omega \right] d\theta \\
 &= \int_0^\pi \left[ \int_{-\infty}^\infty S_\theta(\omega) |\omega| e^{j2\pi\omega(x \cos \theta + y \sin \theta)} d\omega \right] d\theta
 \end{aligned} \tag{2.20}$$

Deve-se lembrar sempre que o “filtro”  $|\omega|$  surgiu devido a mudança do sistema de coordenadas (de coordenadas retangulares para polares). O termo entre colchetes deve ser interpretado como a transformada inversa do produto de dois espectros de frequência, um espectro correspondendo a transformada da projeção  $P_\theta(t) - S_\theta(\omega)$  – e outro correspondendo ao espectro do filtro  $|\omega|$ . O inverso do produto de dois espectros é igual à convolução entre as respectivas inversas. Esta propriedade será usada na implementação do algoritmo de reconstrução 2D-feixe paralelo.

Desta forma, nomeando a inversa do produto dos espectros de  $Q_\theta(t)$ , chega-se a uma forma compacta da equação de reconstrução

$$Q_\theta(t) = \int_{-\infty}^\infty S_\theta(\omega) |\omega| e^{j2\pi\omega t} d\omega \quad t = x \cos \theta + y \sin \theta$$

$$f(x, y) = \int_0^{\pi} Q_{\theta}(x \cos \theta + y \sin \theta) d\theta \quad (2.21)$$

Esta forma de representação possui uma vantagem, pois indica quais passos e em que ordem elas devem ser realizados para que a implementação do processo de reconstrução seja factível.

Por fim, como os computadores trabalham com funções e representação discreta é necessário substituir as integrais por somatórios, limitar os espectros em frequência e interpolar valores, e tudo isso irá introduzir erros na reconstrução da função  $f(x, y)$ . Como mencionado, a implementação do algoritmo de reconstrução tirará proveito do fato da inversa do produto no domínio das frequências serem a convolução entre as inversas de cada um dos espectros. Seja então  $H(\omega)$  o espectro  $|\omega|$ .

$$Q_{\theta}(t) = \int_{-\infty}^{\infty} S_{\theta}(\omega) H(\omega) e^{j2\pi\omega t} d\omega \quad (2.22)$$

Um primeiro problema é limitarmos a banda de  $|\omega|$ . Isto pode ser realizado multiplicando-se o espectro  $|\omega|$  por uma “janela” (função “box”)  $b_{\Omega}(\omega)$  de largura bem definida  $\Omega$ .

$$\Omega = \frac{1}{2\tau} \text{ ciclos / cm} \quad (2.23)$$

$$H(\omega) = |\omega| b_{\Omega}(\omega) \therefore b_{\Omega}(\omega) = \begin{cases} 1, & |\omega| \leq \Omega \\ 0, & \text{caso contrário} \end{cases} \quad (2.24)$$

A inversa de  $H(\omega)$  é uma série cujos termos são potências da função sinc( $t$ ). Truncando esta série em seus dois primeiros termos, a transformada inversa de  $H(\omega)$ ,  $h(t)$  será:

$$\begin{aligned} h(t) &= \int_{-\infty}^{\infty} H(\omega) e^{j2\pi\omega t} d\omega \\ &= \frac{1}{2\tau^2} \frac{\text{sen } 2\pi t / 2\tau}{2\pi t / 2\tau} - \frac{1}{4\tau^2} \left( \frac{\text{sen } \pi t / 2\tau}{\pi t / 2\tau} \right)^2 \end{aligned} \quad (2.25)$$

É necessário discretizar os valores de  $t$ . Se os valores de  $t$  forem múltiplos inteiros de  $\tau$ , então a função  $h(t)$  para  $t = n\tau$  será:

$$h(n\tau) = \begin{cases} 1/4\tau^2, & n = 0 \\ 0, & n \text{ par} \\ -1/n^2\pi^2\tau^2, & n \text{ ímpar} \end{cases} \quad (2.26)$$

O próximo passo é discretizar a função  $Q_\theta(t)$  rescrita na forma de convolução, substituindo-se as variáveis  $t$  e  $t'$  por  $n\tau$  e  $k\tau$ , e a integral pelo somatório. Na expressão discreta (com somatório), o diferencial integral  $dt'$  é trocado por  $\tau$ .

$$Q_\theta(t) = \int P_\theta(t')h(t-t')dt' \Rightarrow Q_\theta(n\tau) = \tau \sum_{k=-\infty}^{\infty} P_\theta(k\tau)h(n\tau - k\tau)$$

Por fim, limita-se o intervalo sobre o qual operará o somatório, isto é, o índice  $k$  deixa de assumir valores infinitos para assumir uma faixa de valores.

$$Q_\theta(n\tau) = \tau \sum_{k=0}^{N-1} P_\theta(k\tau)h(n\tau - k\tau)$$

e igual à:

$$\tau \sum_{k=0}^{N-1} h(k\tau)P_\theta(n\tau - k\tau), \quad n = 0, \dots, N-1 \quad (2.27)$$

Estas são as equações utilizadas na implementação do algoritmo de reconstrução. O algoritmo final torna-se portanto:

- Convoluir todas as projeções com o filtro  $h(t)$ .

$$Q_\theta(n\tau) = \tau \sum_{k=0}^{N-1} P_\theta(k\tau)h(n\tau - k\tau) \quad (2.28)$$

- Retroprojetar os valores das projeções filtradas que estejam sobre a reta  $a$ .

$$f(i\Delta x, j\Delta y) = \Delta\theta \sum_{l=0}^{L-1} Q_{l\Delta\theta}(a) \quad (2.29)$$

onde  $a = i\Delta x \cos(l\Delta\theta) + j\Delta y \sin(l\Delta\theta)$



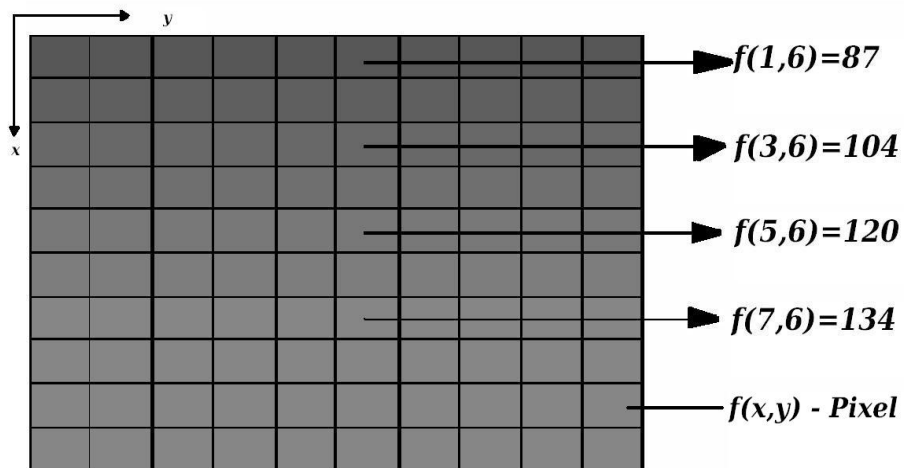
## ***2.3 Imagens Digitais***

### ***2.3.1 Representação da Informação de Imagem***

A imagem é uma função bidimensional, descrita por  $f(x,y)$ . Para ser adequada ao processamento computacional, uma função  $f(x,y)$  precisa ser digitalizada tanto espacialmente quanto em amplitude. A digitalização das coordenadas espaciais  $(x,y)$  é denominada “amostragem da imagem” e a digitalização da amplitude é chamada quantização em níveis de cinza (GONZALES & WOODS, 1992).

O processamento de imagens digitais trabalha com a representação matricial de uma imagem. A figura 2.6 permite visualizar uma imagem monocromática em forma de matriz  $N \times M$  onde  $N$  e  $M$  valem, respectivamente 10 e 10. Em uma imagem monocromática, o valor  $f(x,y)$  de cada *pixel* representa a intensidade luminosa do ponto  $(x,y)$  que varia entre o preto e branco. A quantidade de tons de cinza intermediários depende do número de intervalos de quantização da intensidade luminosa.

Como a representação digital da imagem é própria da computação, o número de intervalos de quantização é normalmente uma potência  $2^b$ , onde  $b$  é o número de *bits* de quantização ou profundidade da imagem. Por exemplo, em uma imagem de 8 *bits*, tem-se  $2^8$  intervalos de quantização, onde a luminosidade varia desde o preto (que recebe o valor 0) até o branco (que corresponde ao valor máximo  $2^8-1=255$ ).



**Figura 2.6** - Representação de pixel

### 2.3.2 Vizinhança de um Pixel

Para entender a vizinhança de um *pixel*, considere o *pixel*  $p$  na coordenada  $(x,y)$  que possui 2 vizinhos na direção vertical e 2 vizinhos na direção horizontal cujas coordenadas são dadas por  $(x+1,y)$ ,  $(x-1,y)$ ,  $(x,y+1)$ ,  $(x,y-1)$ . Assumindo  $(x,y)$  como o ponto  $(0,0)$ , a disposição da vizinhança pode ser vista na figura 2.7. Nesta figura, o conjunto de *pixels*, chamado “4-vizinhos” de  $p$ , é denominado  $N_4(p)$ .

|          |          |         |
|----------|----------|---------|
|          | $(-1,0)$ |         |
| $(0,-1)$ | $(x,y)$  | $(0,1)$ |
|          | $(1,0)$  |         |

**Figura 2.7** – Vizinhos horizontais e verticais de um *pixel*  $p$  no ponto  $(x,y)=(0,0)$ .

Os quatro vizinhos das diagonais de  $p$  têm coordenadas  $(x+1,y+1)$ ,  $(x+1,y-1)$ ,  $(x-1,y+1)$ ,  $(x-1,y-1)$  e podem ser visualizados na figura 2.8. Este conjunto é denominado

$N_D(p)$  e representa os “4-vizinhos diagonais” de  $p$ . A união dos conjuntos  $N_4(p)$  e  $N_D(p)$  constitui os “8-vizinhos” de  $p$  e chamado de  $N_8(p)$  como na figura 2.9.

|           |         |          |
|-----------|---------|----------|
| $(-1,-1)$ |         | $(-1,1)$ |
|           | $(x,y)$ |          |
| $(1,-1)$  |         | $(1,1)$  |

**Figura 2.8** – “4-vizinhos” de  $p$ ,  $N_D(p)$ , para  $p$  em  $(x,y) = (0,0)$ .

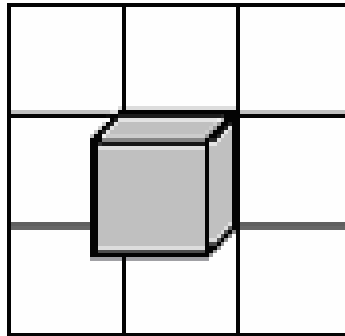
|           |          |          |
|-----------|----------|----------|
| $(-1,-1)$ | $(-1,0)$ | $(-1,1)$ |
| $(0,-1)$  | $(x,y)$  | $(0,1)$  |
| $(1,-1)$  | $(1,0)$  | $(1,1)$  |

**Figura 2.9** –  $N_8(p)$ : vizinhança dos 8 pixels de  $p$  em  $(x,y) = (0,0)$ .

A conectividade entre *pixels* é um conceito importante usado no estabelecimento de fronteiras de objetos e componentes de regiões de uma imagem. Para determinar se dois *pixels* estão conectados, deve-se determinar se estes são adjacentes (pertencem à vizinhança imediata em  $N_8(p)$ ) e se seus níveis de cinza satisfazem a algum critério de similaridade. Admitindo  $V$  o conjunto de valores de cinza  $V = \{V_1, V_2, V_3, \dots, V_n\}$  usados para definir a conectividade, dois *pixels*  $p$  e  $q$  serão “4-conectados” se seus valores pertencem a  $V$  e  $q$  pertence a  $N_4(p)$ . Analogamente, define-se “8-conectados” aqueles *pixels*  $p$  e  $q$  cujos valores pertencem a  $V$  e  $q$  estão em  $N_8(p)$ .

### 2.3.3 Voxel e sua Vizinhança

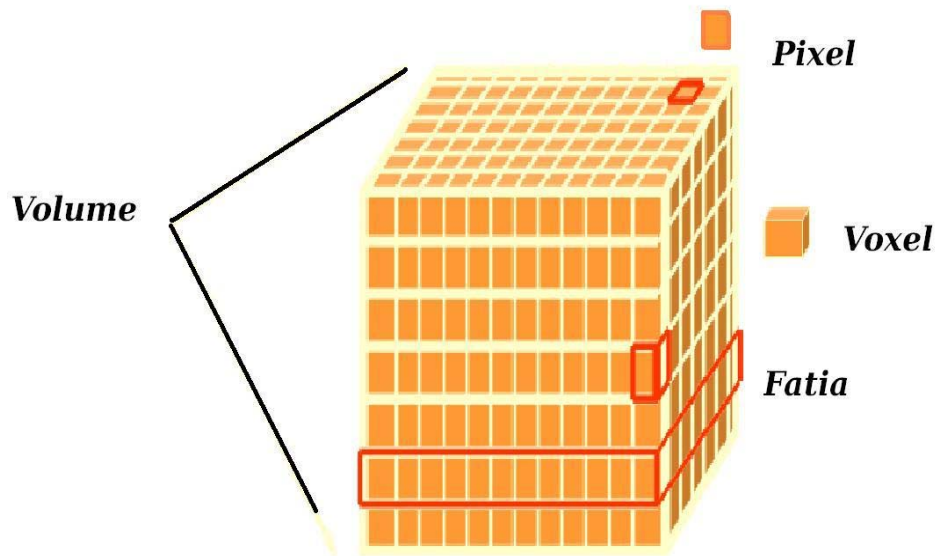
Em uma representação tridimensional de imagens, situação característica nas análises de imagens tomográficas, o modelo de matriz bidimensional é substituído pelo modelo de matriz volumétrica onde *pixels* ganham a dimensão de profundidade espacial. Este *pixel* volumétrico recebe o nome de *voxel* (figura 2.10). Na tomografia, cada imagem reconstruída é vista como uma coleção de *voxels* cujas dimensões no plano da imagem correspondem às dimensões horizontais dos *pixels* e a profundidade corresponde à espessura da imagem.



**Figura 2.10** - Representação de voxel

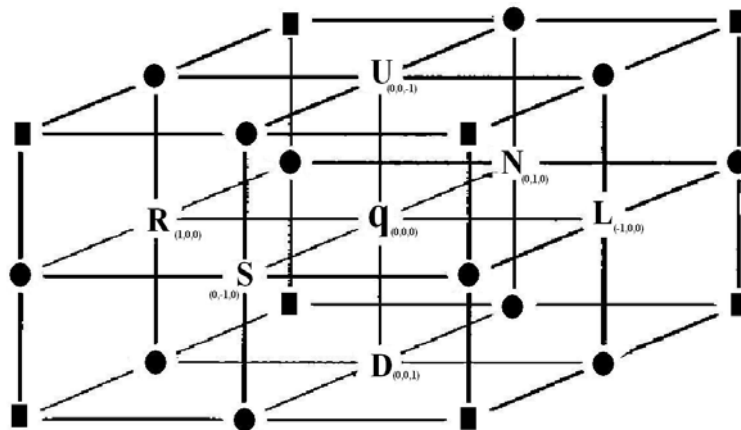
A função de imagem  $f$  não é mais uma função bidimensional, tornando-se tridimensional,  $f(x,y,z)$ , onde  $x$ ,  $y$  e  $z$  são as coordenadas espaciais e  $f$  representa a intensidade luminosa desse *voxel*. A figura 2.11 ilustra como um cubo é construído usando-se o conceito de *voxel*.

Este conceito é muito importante para uma boa interpretação do algoritmo proposto. A abordagem dos elementos de imagem como *pixels* ou *voxels* dependerá do processamento desejado da informação contida no conjunto de dados: se o tratamento for dos planos de imagem individuais, os elementos são tratados como *pixels*; se os mesmos forem analisados como pertencentes a um universo 3D, eles serão tratados como *voxels*.



**Figura 2.11** - Cubo demonstrando o conceito de *Voxels*.

A figura 2.12 permite uma visualização das vizinhanças de um *voxel*. Tomando o  $q$  na posição  $(0,0,0)$  das coordenadas  $(x,y,z)$ , os pontos U, D, N, S, R e L são ditos pela topologia digital, “6-vizinhos” do *voxel*  $q$ . Levando em consideração os *voxels* representados na mesma figura por círculos pretos e somando aos 6-vizinhos do *voxel*  $q$ , determina-se os “18-vizinhos” do *voxel*  $q$ . Numa última análise da topologia digital é possível observar os 26-vizinhos do *voxel*  $q$ , somando os “18-vizinhos” do *voxel*  $q$  com os *voxels* representados por retângulos pretos.



**Figura 2.12** – O conjunto  $N_6(q)$  contém o ponto central  $q$  e os vizinhos U,D,L,R,N e S.

## 2.3.4 Segmentação de Imagem Digital

A análise de imagens digitais utiliza diversas ferramentas e a segmentação é aplicada quando se faz necessário definir objetos de interesse na imagem. A segmentação subdivide uma imagem em suas partes ou objetos constituintes. O nível até o qual essa subdivisão deve se realizada, bem como a técnica utilizada, depende do problema que está sendo resolvido (PRATT, 2001).

Os algoritmos de segmentação permitem diferenciar dois ou mais objetos e distinguir partículas entre si e da imagem de fundo. Esta distinção permitirá ao programa interpretar *pixels* contíguos e agrupá-los em regiões. Os algoritmos de segmentação para imagens monocromáticas são geralmente baseados em uma das seguintes propriedades básicas de valores de níveis de cinza: descontinuidade e similaridade. Na descontinuidade, o particionamento da imagem está baseado nas mudanças bruscas dos níveis de cinza. As principais áreas de interesse são: a detecção de pontos isolados, detecção de linhas e bordas na imagem. Já na similaridade, os métodos principais se baseiam na limiarização (*thresholding*) e no crescimento de regiões.

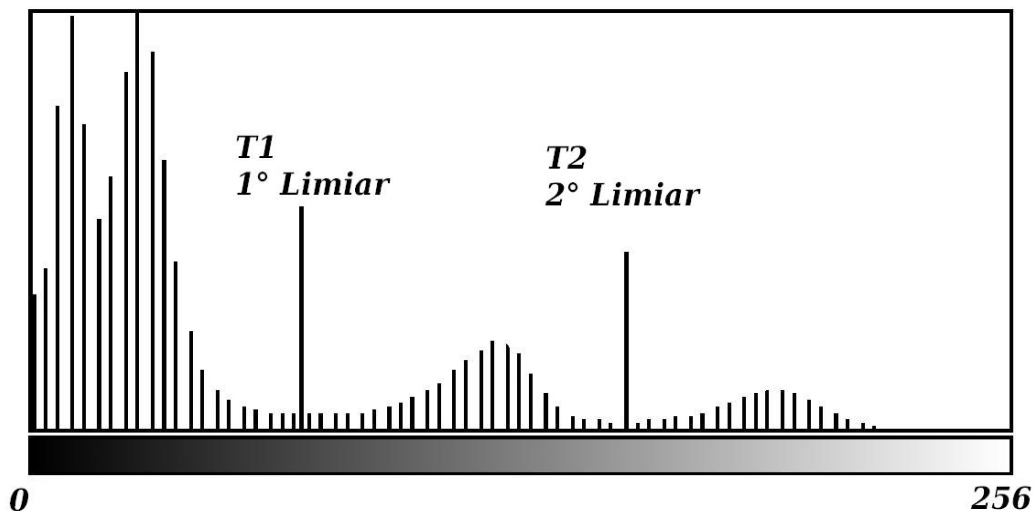
A limiarização analisa a similaridade dos níveis de cinza da imagem extraíndo os objetos de interesse através da seleção de um limiar  $T$  que separa os agrupamentos de níveis de cinza. Uma imagem limiarizada  $g(x,y)$  é definida como:

$$g(x,y) = 1 \text{ se } f(x,y) \geq T \text{ ou } g(x,y) = 0 \text{ se } f(x,y) < T \quad (2.30)$$

onde,  $f(x,y)$  corresponde ao nível de cinza do ponto e  $T$  é um valor de tom de cinza predefinido denominado limiar. Os *pixels* rotulados com 1 correspondem aos objetos de interesse e os rotulados com 0 correspondem ao fundo de imagem isto é, tudo que não é objeto de interesse. Este processo pode ser aplicado às imagens tomográficas no contexto da representação volumétrica da informação, ou seja, no processamento dos *voxels*.

A seleção do limiar de tom de cinza  $T$  pode ser obtida através de um histograma que é um gráfico de distribuição do número de *pixels* na imagem para cada nível de cinza. Nele pode-se observar a distribuição dos valores dos *pixels* na imagem e um valor de limiar que venha distinguir a distribuição correspondente à fase de interesse em relação ao fundo (*background*) restante.

Uma das dificuldades da limiarização de uma imagem é a escolha do melhor valor de limiar para separação dos *pixels* da imagem. Existem diversos métodos para determinação do limiar como, por exemplo, o método do vale. O vale em um histograma corresponde à região onde a contagem de ocorrência de *pixels* reduz-se significativamente em relação às contagens vizinhas. Na figura 2.13, observa-se dois vales, T1 e T2, que podem ser utilizados para o estabelecimento do valor de limiar.



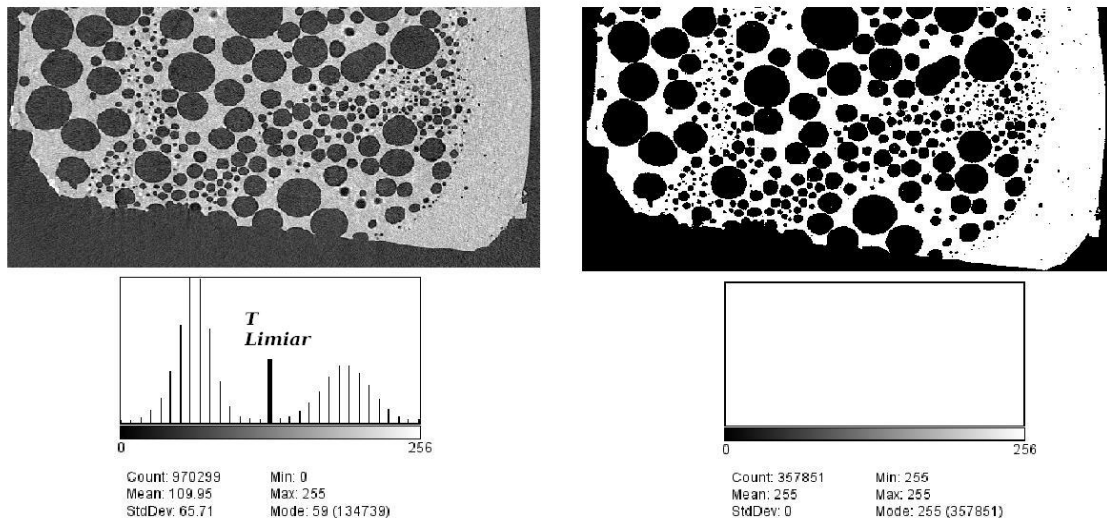
**Figura 2.13** - Método do vale com histograma particionado por dois limiares.

Quando o feixe é monoenergético e os coeficientes de atenuação das fases componentes da microestrutura não são muito próximas, as distribuições de cada fase ficam bem destacadas umas das outras, facilitando a escolha do limiar. No entanto, quando o feixe é polienergético, as distribuições se confundem e a escolha torna-se crítica, mesmo quando a amostra possui uma única fase já que a distribuição da fase de interesse e a radiação de fundo se confundem.

A segmentação por limiarização é efetuada varrendo a imagem, *pixel a pixel*, e rotulando cada *pixel* como sendo pertencente ao objeto ou ao fundo, dependendo do

nível de cinza do *pixel* analisado ser maior ou menor que  $T$  (GONZALES & WOODS, 1992, PRATT, 2001, JAHNE, 2001).

A figura 2.14 mostra o processo de binarização da amostra utilizando o método do vale para escolha do limiar  $T$ . De acordo com o histograma da esquerda, o limiar está posicionado no centro da distribuição, entre a distribuição da esquerda (que quantifica a presença de *pixels* com tons de cinza mais escuro) e a distribuição da direita (que representa os *pixels* com tons de cinza mais claro). Após o processo de binarização, todos os valores à direita de  $T$  assumem o valor 255 (branco) e todos os valores à esquerda de  $T$ , assumem o valor 0 (preto).



**Figura 2.14** – Efeito do processo de binarização. (a) Imagem antes da processo de binarização. (b) histograma mostrando o limiar escolhido. (c) imagem binarizada.



## ***2.3.5 Filtros para Processamento e Análise de Imagens***

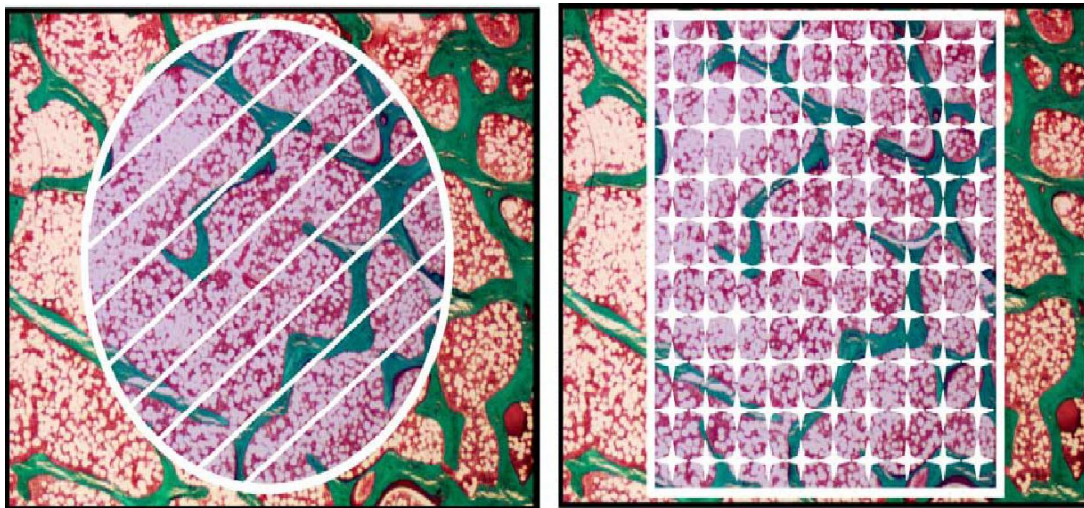
O uso de máscaras espaciais para processamento de imagens é usualmente chamado de *filtragem espacial* e as máscaras são chamadas *filtros espaciais*. A filtragem digital é um conjunto de técnicas destinadas a corrigir e realçar uma imagem. Dentre os filtros espaciais existem os filtros de suavização que são usados para borramento e redução de ruído (GONZALES & WOODS, 1992, PRATT, 2001, JAHNE, 2001).

Tendo como objetivo a redução de ruído em vez do borramento de uma imagem, uma abordagem alternativa consiste no uso de *filtros por mediana*. Nestes filtros o nível de cinza de cada *pixel* é substituído pela mediana dos níveis de cinza na vizinhança daquele *pixel*, ao invés da média. O filtro por média além de atenuar os ruídos, provoca borramento em todos os detalhes finos da imagem. Para calcular a filtragem por mediana em uma vizinhança de um *pixel*  $p$ , deve-se selecionar o valor do *pixel* e de seus vizinhos, após isso determinar a mediana e, finalmente, atribuir o valor da mediana ao equivalente de  $P$  na imagem resultante. A mediana de um conjunto  $N$  de números ordenados em ordem de grandeza é o valor do ponto central, se a cardinalidade de  $N$  for ímpar ou a média aritmética dos dois valores centrais se a cardinalidade de  $N$  for par. Em uma vizinhança 3x3 a mediana corresponde ao quinto maior valor, já em uma vizinhança 5x5 a mediana corresponderá ao décimo terceiro maior valor (GONZALES & WOODS, 1992).

## 2.4 Quantificação Histomorfométrica 3D

A quantificação histomorfométrica é uma adaptação da quantificação estereológica aplicada à Histologia. O objetivo da quantificação estereológica é a determinação de parâmetros tridimensionais (3D) de estruturas presentes em uma seção transversal a partir de parâmetros bidimensionais (2D). Para tanto, uma restrição imposta a esta quantificação é que a estrutura analisada seja isotrópica, ou seja, que a ocorrência da estrutura na seção transversal seja aleatória e homogênea.

Uma das operações mais simples na estereologia é a contagem de pontos. O termo pontos de teste se refere a todos os pontos que são contados com relação a alguma característica (fase) da microestrutura contida na seção plana e são, por exemplo, interseções das linhas de uma grade. O método é especialmente efetivo no delineamento de fases finamente disperso tais como pequenas partículas. Utiliza-se uma grade acoplada à objetiva de um microscópio ou a superposição da grade sobre uma fotografia (figura 2.15).

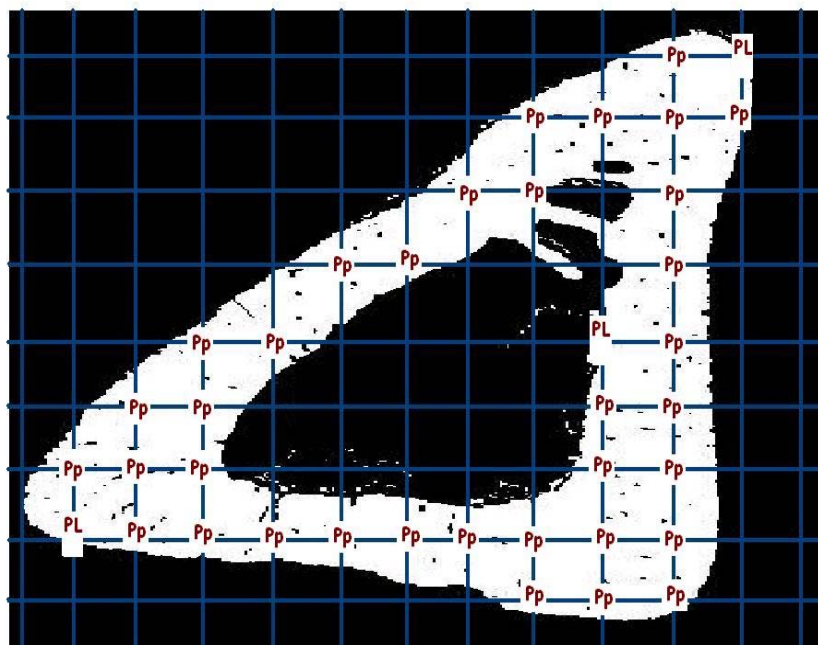


**Figura 2.15** – Imagem de uma grade acoplada à objetiva de um microscópio (Dalle CARBONARE, 2005).

Para entendimento destes métodos, usa-se uma rede de pontos disposta uniformemente sobre a área da microestrutura da amostra. O número de pontos desta

grade que caem sobre a área da fase de interesse é contado. O número total de pontos  $P$  caindo sobre a fase de interesse é então dividido pelo número total de pontos da grade multiplicado pelo total de áreas esquadrihadas, referenciada pelo símbolo  $P_p$ .

Uma segunda medida muito usada na quantificação estereológica é o número de pontos (interseções) por unidade de comprimento de linhas de teste, referenciado por  $P_L$ . Colocando um arranjo de linhas de teste apoiado sobre a área da microestrutura da seção, os pontos geralmente consistem das interseções obtidas pelas linhas de teste com as bordas das superfícies da fase de interesse. Quando a grade é acoplada à objetiva, as medidas de  $P_L$  são feitas diretamente na amostra vista sob o microscópio contando-se as interseções e dividindo-se pelo comprimento total das linhas da grade (figura 2.16).



**Figura 2.16** – Exemplo de posicionamento de uma grade sobre uma seção transversal da fatia de um osso cortical.

Na quantificação estereológica as operações básicas são realizadas em seções bidimensionais, e envolvem a contagem de pontos, linhas e áreas. Estes são os chamados parâmetros básicos. A partir destes parâmetros, outros podem ser determinados. Os parâmetros básicos quantificados pela Estereologia são:  $V_v$  que é fração do volume (volume por unidade de volume) de uma fase e  $S_v$  que é a área superficial de uma superfície. Superpondo uma grade retangular sobre a seção transversal analisada,  $V_v$  é o número de pontos contados da interseção das linhas da

grade sobre toda seção analisada.  $S_V$  é o número de pontos contados da interseção de linhas da grade sobre as superfícies da seção analisada (UNDERWOOD, 1970, DeHOFF, 1983, ELIAS, 1983, PARFITT, 1983, OLIVEIRA *et al.*, 2003).

A literatura clássica sobre estereologia, UNDERWOOD (1970) relaciona o valor de  $V_V$  com  $P_P$  com sendo a mesma probabilidade de um determinado ponto de uma grade estar contido na fase de interesse, ou seja:  $V_V = P_P$ .

Além da medida de fração de volume, a estereologia quantifica também a razão entre a superfície e o volume  $S_V$ . UNDERWOOD (1970) ainda cataloga três situações diferentes de quantificação em função da disposição das fases dentro da seção da amostra: quantificação de fases contínuas, partículas dispersas na seção e partículas isoladas. A tabela 2.1 apresenta as equações referentes às situações mencionadas a cima.

Tabela 2.1. Relação das equações que quantificam a relação superfície-volume.

| Situação             | Razão $S_V$ |
|----------------------|-------------|
| Fases contínuas      | $2P_L$      |
| Partículas dispersas | $2P_L$      |
| Partícula isolada    | $2P_L/P_P$  |

Na histomorfometria convencional, os dois parâmetros básicos  $V_V$  e  $S_V$ , quando relacionados à quantificação óssea, recebem as nomenclaturas de BV/TV (*bone volume per total volume*) e BS/BV (*bone surface per bone volume*), ou seja, fração de volume ósseo pelo volume total da imagem e razão da superfície óssea pelo volume ósseo, respectivamente. Outros parâmetros são deduzidos a partir deles e expressam quantificações tais como: largura média de conexão, separação média entre conexões e densidade média de conexões referenciadas por  $Tb_{Th}$ ,  $Tb_{Sp}$  e  $Tb_N$  respectivamente.

Na quantificação estereológica moderna, os parâmetros básicos  $P_P$  e  $P_L$  são obtidos de forma otimizada. Ao invés de usar um microscópio com uma régua graduada, ou até mesmo uma grade, acoplado à objetiva, captura-se a imagem com uma câmera de vídeo, analógica ou digital, e depois digitaliza-se esta imagem. No computador, utilizando ferramentas de processamento de imagens, pode-se manipular a imagem da amostra e extrair tanto os parâmetros básicos como os derivados. A

vantagem deste processo está na acurácia da quantificação, não em termos de realidade tridimensional (os parâmetros continuam sendo extraídos de imagens), mas em termos de refinamento das medidas. Isto pode ser entendido melhor imaginando o processo de contagem de pontos da grade que estão dentro da fase de interesse. Quanto mais refinada a grade, mais precisa é a contagem. Assim, na imagem digital, a resolução da grade é a própria resolução do *voxel*.

Em 1989, FELDKAMP *et al.*, apresentam um método de levantamento dos parâmetros histomorfométricos usando imagens tomográficas. Embora o objetivo final fosse o acesso direto à microestrutura tridimensional, o método oferecia diversas vantagens quando aplicado ao método histomorfométrico convencional. As fatias podem ser obtidas de forma não destrutiva formando um conjunto de planos paralelos entre si através da tomografia 3D usando feixe cônico. O trabalho extenuante do observador de preparar, examinar e trocar as lâminas é substituído pelo processamento em dados tomográficos, realizado por um computador.

Binarizar a imagem, a fim de diferenciar a fase de interesse do restante da imagem, é a primeira tarefa a ser realizada. A binarização consiste na escolha de um valor limiar que será aplicado à imagem. Todos os *pixels* com valor maior ou igual ao do limiar são convertidos em um valor chamado de saturado. Em uma imagem digital com resolução de 8 bits, este valor saturado vale 255. De maneira análoga, todos os *pixels* que tiverem valor inferior ao do limiar, serão convertidos em 0. O resultado é uma imagem com tons de cinza que variam do preto (0) ao branco (255).

A escolha de um valor de limiar é crítico neste método, pois depende das características do sistema tomográfico, em especial, das características energéticas do feixe de raios X. Tal situação é minimizada com a utilização de feixes de raios X de fontes de radiação síncrotron. Uma ferramenta útil na escolha do limiar é o histograma da imagem. No histograma, pode-se observar a distribuição dos valores dos *pixels* da imagem e buscar um valor que melhor distingue a distribuição correspondente à fase de interesse do restante da imagem. A característica energética do feixe interfere na qualidade do histograma. Quando o feixe é monoenergético, como na radiação síncrotron, e os coeficientes de atenuação das fases componentes da microestrutura não são muito próximos, as distribuições de cada fase ficam bem destacadas umas das

outras, o que facilita a escolha do limiar. No entanto, quando o feixe é polienergético, as distribuições se confundem e a escolha torna-se crítica – mesmo quando a amostra possui uma única fase (a distribuição da fase e o "background" se confundem).

Após binarizar a imagem, FELDKAMP *et al.* (1989), calcularam os parâmetros básico  $P_P$  e  $P_L$ , obtendo-os para todas as fatias da reconstrução 3D.  $P_P$  e  $P_L$  foram obtidos diretamente da imagem binária da seguinte forma: o total de *pixels* brancos (que correspondem à fase de interesse) dividido pelo total de *pixels* da imagem é o valor de  $P_P$ . Usando um processo de detecção de borda, determinaram o perímetro da fase de interesse, e do total de *pixels* brancos (que compõem a borda) dividido pelo total de *pixels* da imagem, determinaram  $P_L$ . O valor de  $BV/TV$  é equivalente a  $P_P$  e  $BS/BV$  é  $2P_L/P_P$ , seguindo a metodologia apresentada pela quantificação estereológica.

A tomografia tridimensional fornece toda a informação espacial necessária para que os parâmetros espaciais  $BV/TV$  e  $BS/BV$  sejam calculados diretamente do volume de dados. Podem-se aplicar diversos métodos de extração de valores sendo um deles uma simples extensão do método já utilizado nas seções bidimensionais.

O primeiro método continua baseado na contagem dos *voxels* brancos contidos na microestrutura e nas suas bordas, sendo aplicado a todo volume da imagem, isto é, ao invés de se contar somente os *pixels* de uma imagem, fatia por fatia, avalia-se a soma total de todos os *voxels* brancos contidos no volume de dados. A soma de todos os *voxels* brancos contidos na microestrutura equivale ao volume da fase de interesse (BV). A soma de todos os *voxels* brancos contidos nas bordas da imagem forma o total de pontos presentes na superfície da fase de interesse (BS). Dividindo ambas as somas pelo total de *voxels* presente no volume de dados (TV), têm-se os valores de  $BV/TV$  e  $BS/BV$ .

Na histomorfometria 3D digital, o volume da estrutura BV e a área da superfície BS são extraídos diretamente do volume reconstruído TV. BV é o número de pontos (*voxels*) pertencentes ao objeto analisado e BS é o correspondente a todos os *voxels* pertencentes apenas as bordas das superfícies do objeto analisado. Isto é, BV é o volume de matéria dentro da amostra analisada e BS é a área correspondente à superfície livre da amostra em contato com o espaço vazio (amostra com uma

substância), ou a área total da interface (superfície de separação) entre dois materiais. Assim, o parâmetro BS/BV indica o grau de fragmentação da amostra e o parâmetro BV/TV indica a densidade de matéria no volume selecionado.

## ***2.5 Conectividade***

### ***2.5.1 Equação de Euler para Poliedros.***

Os poliedros regulares são conhecidos pelo menos desde a Grécia antiga. Quando no final do século VI a.C., a Jônia (região da atual Turquia) é invadida e submetida a tributos pelos persas. Nesse período, muitos filósofos exilaram-se nas cidades protegidas da ameaça persa, notadamente no sul da Itália e na Sicília, região dominada pela Grécia, favorecendo assim aos gregos. Como exemplo, tem-se o caso de Pitágoras. Os pitagóricos procuravam números em tudo o que existia na natureza. Na aritmética, com a descoberta dos números racionais; na geometria, com o famoso teorema que apresenta a relação entre os quadrados sobre os lados do triângulo retângulo; ou ainda com a descoberta de pelo menos três poliedros regulares: o tetraedro, o cubo e o dodecaedro (SIMAAN & FONTAINE, 2003). Por esta razão o nome dos poliedros regulares mais complexos são aqueles puramente gregos. Apesar do fato de serem conhecidos por perto de dois milênios, aparentemente, ninguém reparou o fato de que a soma do número de faces  $F$  e o número de vértices  $V$  menos o número de arestas  $A$  é igual a dois para todos eles:

$$V - A + F = 2 \quad (2.31)$$

O valor de  $(V-A+F)$  é usualmente representado pela letra grega Chi ( $\chi$ ). Com isso,  $\chi(\text{cubo})=2$ .

Foi o matemático suíço Leonhard Euler quem reorganizou e publicou esta observação. Do ponto de vista topológico, os sólidos mais simples são aqueles maciços,

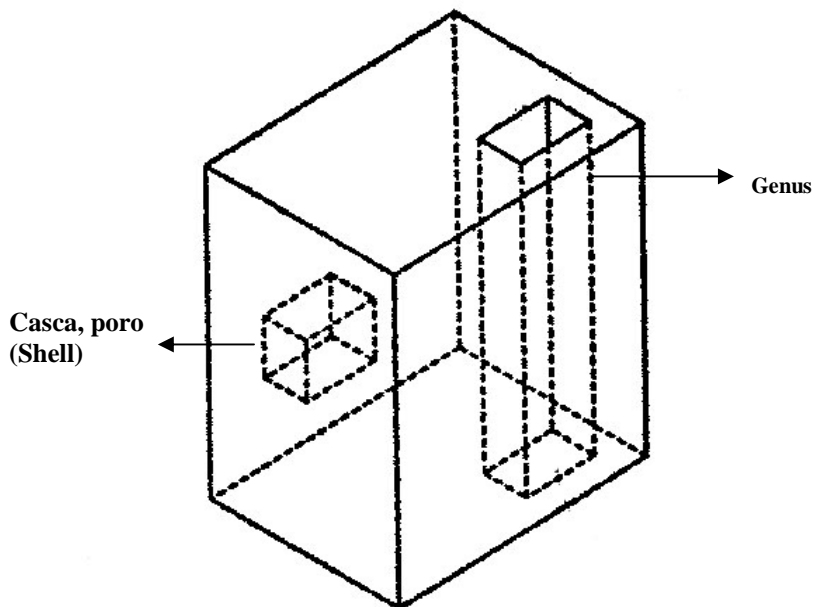
sem buracos ou espaços vazios no seu interior. A cada sólido maciço é relacionado um número e esse número é conhecido como característica de Euler ( $\chi$ ) (HOFFMANN, 1989). O valor 2 é dito ser a característica de Euler ( $\chi$ ) de cada poliedro. Este valor não é alterado pelo alongamento ou encolhimento de qualquer lado ou face. Isto significa que a característica de Euler é uma invariante topológica.

Considerando a possibilidade de que um sólido tenha um buraco, como exemplo um disco com um furo no seu centro, ou um toro, a equação 2.31 deve ser re-escrita para considerar essas degenerências que são laços formados como anéis fundidos no volume, por exemplo, a alça de um cadeado. A degenerência na topologia recebe o nome de GENUS e este fator altera a equação de Euler-Poincaré para:

$$V-A+F-2(I-G)=0 \quad (2.32)$$

onde  $G$  corresponde ao número do genus. Por exemplo, o toro é genus 1 e o número 8 possui genus 2. Um volume sem degenerência é genus 0, como no caso do cubo (*voxel*).

Além das degenerências um sólido também tem a possibilidade de apresentar espaços vazios internos. Estes espaços vazios são delimitados por múltiplas faces distintas, e são chamados de *Shells* (casca ou poros). O número de *Shells* será denotado por  $S$ . Na figura 2.17, o cubo apresenta uma casca interna (um *Shell*) e um canal atravessando-o da superfície superior até a superfície inferior.



**Figura 2.17** – Imagem de um cubo com uma casca e um canal (HOFFMANN, 1989).



Extensões têm sido feitas de modo a levar em conta a existência de buracos e canais no interior de um sólido. Acrescentando  $L$  como o número total de contornos (*loops*), a equação de Euler-Poincaré completa pode ser escrita como:

$$V - A + F - (L - F) - 2(S - G) = 0 \quad (2.33)$$

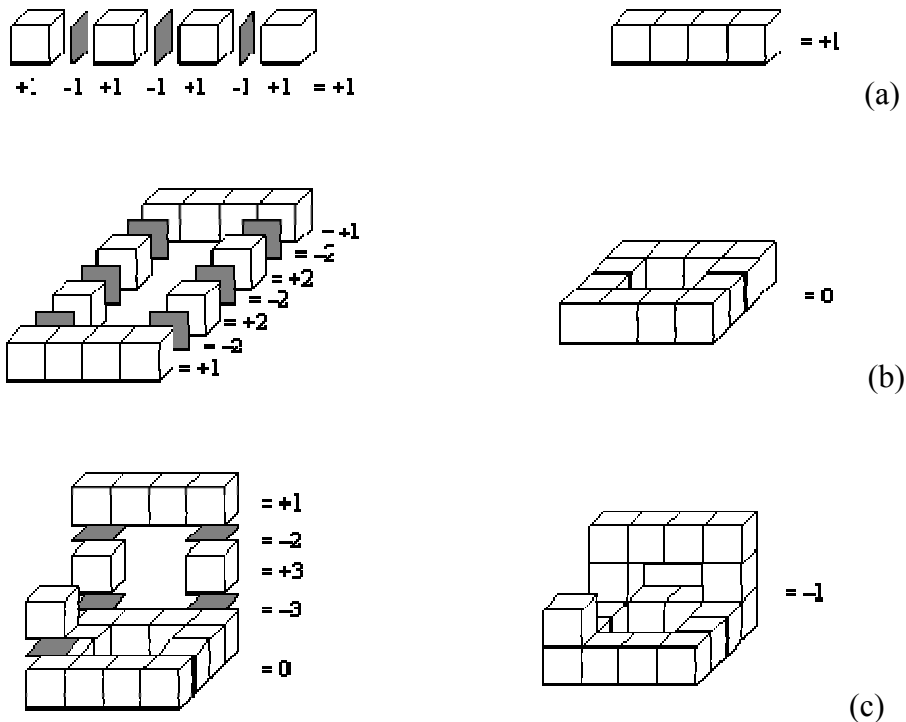
onde  $L$  (*loops*) é o número de contornos do sólido,  $S$  (*Shell*) é o número de poros (casas externas e internas) no objeto.

## 2.5.2 O cálculo da Conectividade

A conectividade não é um parâmetro histomorfométrico, mas, é um parâmetro capaz de caracterizar as estruturas de um objeto complexo. Devido à grande dificuldade em quantificar estruturas com superfícies complexas, o cálculo da conectividade é visto como uma alternativa para análise dessas estruturas.

Em 1989, FELDKAMP *et al.* determinaram pela primeira vez em osso trabecular humano a conectividade no volume da imagem e a correlacionaram com índices histomorfométricos bi-dimensionais. Eles utilizaram tomografia computadorizada para obter imagens 3D da estrutura óssea *in vitro* e indicaram o valor da conectividade 3D como o número de Euler, representado por  $N^{(3)}$ . Para uma estrutura de rede aberta, o número de Euler é calculado pelo número de nós  $n$  e o número de ramificações  $b$ :  $N^{(3)} = n - b$ . No caso de uma rede na qual pelo menos um caminho entre dois nós quaisquer, a quantidade  $1 - N^{(3)}$  pode ser interpretada como o número máximo de ramificações que podem ser removidas sem quebrar a estrutura da rede em outras partes. Uma estrutura altamente conectada, como um osso trabecular saudável, tem um número de Euler milhares de vezes negativo em um volume de  $1\text{cm}^3$ . A quebra de uma simples conexão aumenta o número de Euler de 1, porém, a adição de uma conexão o diminuirá de 1.

Feldkamp fazendo uso de uma propriedade que diz: “O número de Euler da união de dois conjuntos é igual a soma dos números de Euler individuais menos o conjunto formado por suas interseções”, determina que o número de Euler para um voxel (imagina-se um cubo) é 1 e que as conexões válidas são apenas aquelas realizadas a partir das faces do cubo. Dois cubos encostados com uma aresta em comum não configura uma conexão bem como dois cubos que partilham um único vértice em comum. Através da figura 2.18, pode-se notar que dois cubos conectados via face possuem também um número de Euler de valor 1. Numa forma mais geral, o número de Euler de uma linha de cubos é igual ao número de conjuntos de blocos conectados. O número de Euler de um arranjo 2D de cubos é construído a partir dos números de Euler das linhas que o constituem menos o total de suas interseções. Finalmente, o número de Euler de um arranjo 3D segue o mesmo procedimento, ou seja, é calculado a partir do número de Euler das seções 2D menos as interseções criadas pela união das mesmas. Um grupo de cubos conectados, sem interrupções apresenta resultado +1, indicando que eles representam um único cubo com dimensão maior.



**Figura 2.18.** - Ilustração do cálculo do número de Euler tridimensional para objetos digitalizados (FELDKAMP *et al.*, 1989).

Na figura 2.18a, o conjunto de *voxels* colocados lado a lado separados por uma interface somam +1. O segundo conjunto (figura 2.18b) forma um anel, contido num plano, e os subconjuntos somam 0. O zero desse conjunto indica a existência de um toro (anel), ou genus. A figura 2.18c mostra um conjunto de *voxels* formando um objeto 3D somando -1. Esse valor -1, indica a existência de dois toros, ou dois genus. Seguindo esta lógica, o valor absoluto do número de Euler indica o número de toros mais um. Em termos matemáticos, cada toro representa o aumento do genus do objeto tridimensional.

FELDKAMP *et al.* (1989) demonstraram que o número de Euler para um cubo é +1. Para um cubo, considerando que  $(L - F) = 0$  e  $S = 1$ , a equação 2.33 pode ser re-escrita:

$$\frac{V - A + F}{2} = 1 - G \quad (2.34)$$

Isto é, um cubo que possui 8 vértices, 12 arestas e 6 faces, apresenta um resultado +1. No final o resultado é  $+1=1-G$ , com o valor de  $G$  igual a 0.

Dez anos depois de Feldkamp, ODGAARD (1999) calculou a conectividade com o número de Euler ( $\chi$ ), usando a equação de Euler-Poincaré.

$$\chi = \beta_0 - \beta_1 - \beta_2 \quad (2.35)$$

ODGAARD considera  $\beta_0$  como o número de partes separadas do osso,  $\beta_1$  é a conectividade  $\beta_2$  é o número de cavidades de medula óssea totalmente cercada por osso. Ele também considera que, o osso trabecular como uma estrutura conectada ( $\beta_0=1$ ), não há cavidades medulares fechadas ( $\beta_1=0$ ). Normalizando tudo pelo volume total ( $V$ ), determinou a densidade da conectividade expressa por:

$$\beta_{1V} = \frac{1 - \chi}{V} \quad (2.36)$$

onde  $1-\chi$  equivale a  $1-(V-A+F)$ .

Em 2001, VOGEL & ROTH estudando a estrutura porosa dos solos, calculou a conectividade utilizando o número de Euler ( $\chi$ ) através da equação:

$$\chi_V = \frac{N - C + H}{V} \quad (2.37)$$

Onde  $N$  representa o número de objetos isolados,  $C$  é o número de conexões ou contornos que frequentemente é referenciado como conectividade ou genus e  $H$  sendo o número bolhas internas. Com relação à equação clássica de Euler, VOGEL & ROTH

utilizam  $\chi = \text{vértices} - \text{arestas} + \text{faces} - \text{volumes}$  e introduziram uma função da conectividade na qual é definido como número de Euler em dependência do tamanho mínimo de poro.

COOPER *et al.*, em 2002 apontam a esqueletização como uma alternativa ao cálculo da conectividade. Usando a teoria do número de Euler (E), eles equacionaram  $E = \text{número de componentes} - \text{número de buracos} + \text{número de cavidades}$ , onde o número de componentes refere-se ao número de elementos distintos desconectados, buracos são regiões que transpassam o objeto e cavidades são buracos encapsulados no interior do objeto que não estão conectados com o meio externo. Nesse trabalho, eles relatam a dificuldade de se quantificar os canais presentes no osso cortical devido as suas inúmeras formas e sugerem o parâmetro Conectividade do canal cortical (*Ca.ConnD*) sendo o número de interseções de canais por unidade de volume.

MARTIN-BADOSA *et al.*, em 2003 desenvolveram um método para caracterizar a arquitetura de ossos de ratos microtomografados usando radiação síncrotron, com *voxels* de tamanho igual a 6,65 $\mu\text{m}$ . Eles utilizaram a conectividade como parâmetro de interesse para caracterizar as propriedades mecânicas do osso trabecular. Calcularam a conectividade através do número de Euler ( $\chi$ ), expresso na equação 2.35.

Do-GYOON KIM *et al.*, em 2004 investigaram as condições patológicas no osso usando a densidade da conectividade (*-Euler/Vol*). A conectividade da rede trabecular foi obtida baseando-se na equação de Euler-Poincaré independente de assumir o modelo de placa.

$$\text{Densidade da conectividade (mm}^{-3}\text{)} = \frac{(1 - E)}{V} \approx \frac{-E}{V} \quad (2.38)$$

onde (1 - E) representa o número máximo de ramificações que podem ser removidos sem quebrar a estrutura em partes separadas.

Em 2005, Dalle CARBONARE expressou o número de Euler (E) pelo volume de tecido (*E/TV*). Sendo o número de buracos menos o número de componentes conectados, na qual pode ser interpretado como o número máximo de ramificações que

poderiam ser removidos sem quebrar a rede em diferentes partes. O número total de perfil trabecular é indicado com  $n$ , enquanto o número de cavidades medulares com  $m$ .

$$E = n - m \quad (2.39)$$

Baixos valores de  $E$  indicam um osso mais conectado. Valores negativos são obtidos para estruturas altamente conectadas.

Apesar da utilização da equação de Euler-Poincaré em muitos trabalhos, nenhum deles faz análise levando em consideração ou quantificando explicitamente os canais e ou poros (espaços vazios no interior da amostra) existentes. Esse problema pode ser facilmente resolvido isolando na equação 2.34,  $S$  e  $G$ .

No capítulo 3 serão apresentados todos os materiais e métodos desta tese.

## ***Capítulo 3***

### ***Materiais e Métodos***

Este trabalho foi realizado na linha de luz SYRMEP (SYnchrotron Radiation for MEDical Physics) no Laboratório de Radiação Síncrotron ELETTRA, Itália. O principal objetivo do projeto SYRMEP é a investigação e desenvolvimento de técnicas inovadoras para imagem médica (ABRAMI *et al.*, 2005). As pesquisas realizadas na linha podem ser divididas em três áreas:

- Radiologia médica (incluindo estudos para aplicações clínicas);
- Ciência dos materiais (utilizando *set-ups* tomográficos ou planares); e
- Desenvolvimento de novas técnicas de imagem e instrumentação.

O algoritmo de análise 3D desenvolvido neste trabalho foi aplicado em amostras diversas obtidas utilizando o *set-up* tomográfico disponível na linha. Neste capítulo serão apresentadas as características da linha de luz e a metodologia utilizada para aquisição, processamento e quantificação das imagens.

### 3.1 Características da Linha SYRMEP

A fonte de luz da linha SYRMEP é o primeiro magneto curvante da seção 6 do ELETTRA (linha de luz 6.1). Na configuração utilizada para a realização de experimentos *in vitro*, os ambientes da linha são: sala ótica (SO), sala experimental (SS) e sala de controle (SC). A sala ótica compreende os elementos da ótica da linha, como o monocromador, o sistema de delimitação do feixe (fendas), o sistema de filtros para a redução da intensidade do feixe, etc. A sala experimental abriga a amostra, o detector e os seus respectivos sistemas de movimentação, os quais são acionados remotamente pelos responsáveis que operam na sala de controle. A figura 3.1 mostra o esquema da linha que transporta o feixe do magneto curvante à estação experimental, que é o local no qual se realiza o experimento fazendo incidir o feixe sobre a amostra que se deseja estudar.

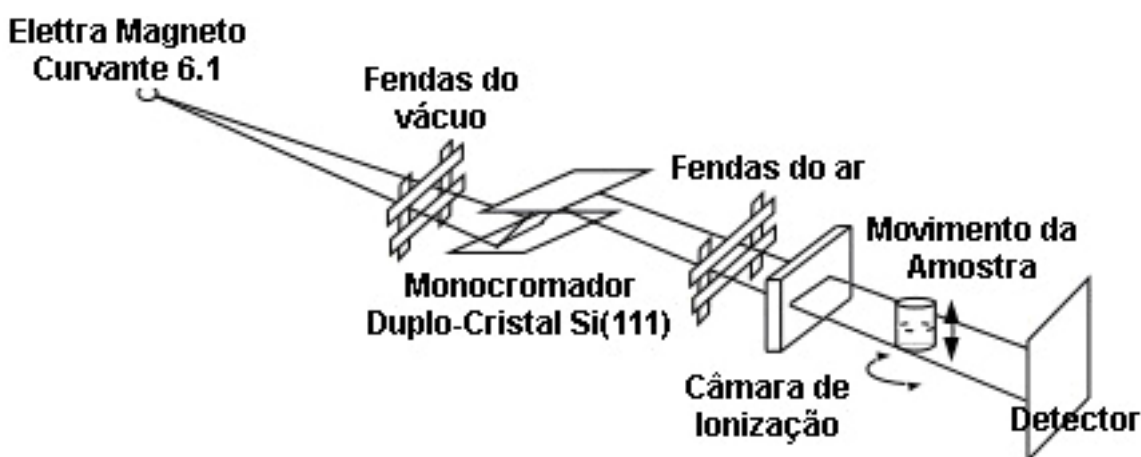


Figura 3.1. Esquema da linha SYRMEP.

Na sala ótica, o primeiro elemento é uma janela de berílio que separa o vácuo da linha ( $\sim 10^{-7}$  Torr) do vácuo do anel ( $\sim 10^{-10}$  Torr) e filtra o feixe atenuando a radiação de energia inferior a 8 keV. Sucessivamente, o sistema de fendas do vácuo permite selecionar a seção transversal do feixe através do movimento de motores com precisão micrométrica. O feixe atinge, então, um monocromador de silício (111) *channel-cut*, colocado a 16 m da fonte, que permite selecionar a energia do feixe de raios X no intervalo de 8 a 35 keV com uma resolução em energia da ordem de 0,2% (BRAVIN *et al.*, 1998). A vantagem da geometria *channel-cut* consiste em fornecer o feixe

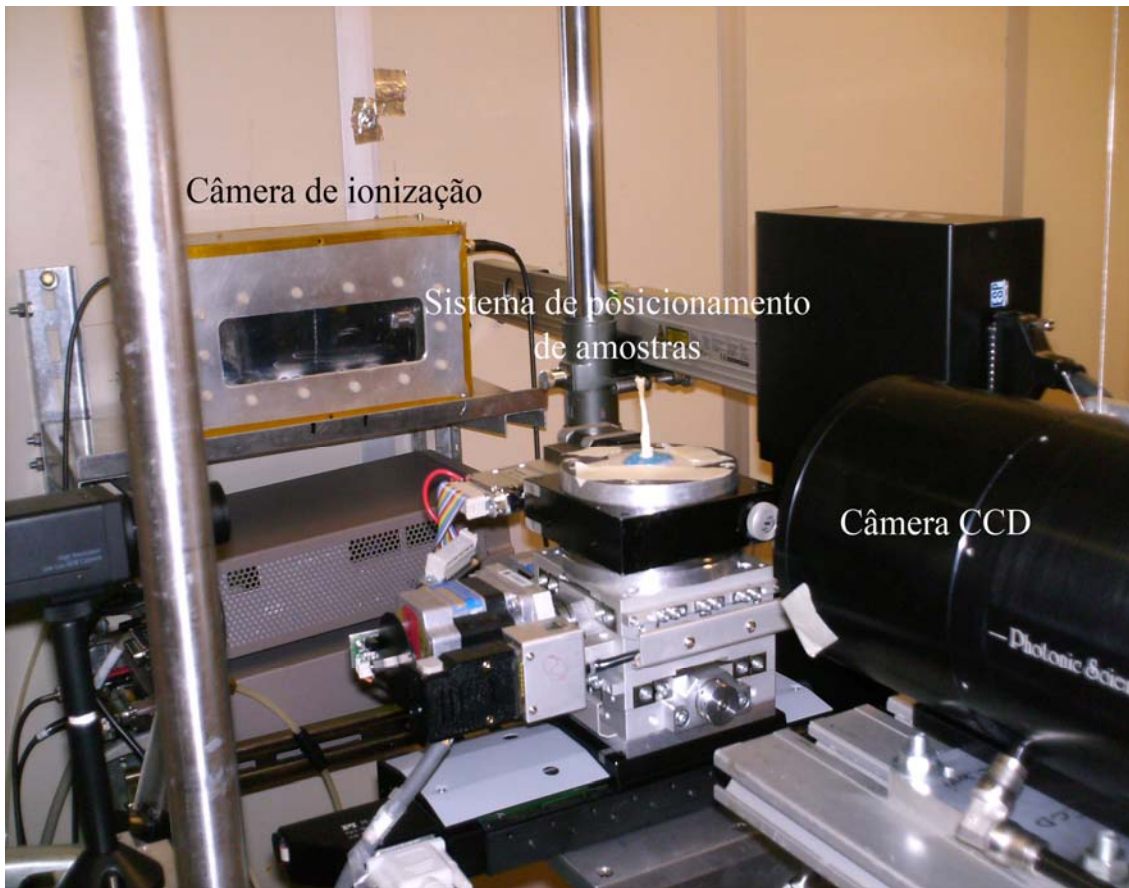
monocromático emergente paralelo ao feixe policromático incidente, de modo que a altura do feixe permanece praticamente constante quando se varia a energia. Uma janela de berílio separa a parte em vácuo da linha da parte final no ar, introduzindo o feixe monocromático na estação experimental, a cerca de 22m da fonte. A dimensão desse feixe é 100mm de altura no plano horizontal e um perfil gaussiano com FWHM (largura a meia altura) da ordem de 4mm sobre o plano vertical.

Depois de atravessar a segunda janela de berílio, a radiação encontra um sistema de filtros que podem ser utilizados para atenuar a intensidade do feixe. O sistema consiste de sete folhas de alumínio puro que permitem a combinação de espessuras diversas, de modo a obter a espessura desejada. Este sistema permite a rápida inserção/exclusão de filtros através de um comando eletro-pneumático. Quando o feixe é interceptado pelas folhas de alumínio, a radiação sofre espalhamento em relação à direção de propagação. Um sistema de fendas no ar feito de uma liga de tungstênio permite uma alta absorção da radiação, de modo a garantir a proteção adequada da radiação espalhada.

Finalmente, o feixe se dirige em direção à parede que separa a SO da SS, onde existe uma abertura que permite a entrada do feixe aproximadamente a 23m da fonte. Nesta sala se desenvolvem as atividades experimentais, estando disponíveis: câmeras de ionização para controlar a intensidade da radiação, sistema de posicionamento de amostra que permite a aquisição de imagens planares e tomográficas, câmeras CCD (*Charge Coupled Device*). O feixe é fixo e a aquisição das imagens é possível pelo movimento do objeto em frente ao feixe laminar.

A câmera de ionização (Figura 3.2) colocada antes da mesa posicionadora de amostra é usada para determinar a exposição e, conseqüentemente, a dose depositada na amostra. A mesa posicionadora possui dois motores para realizar movimentos micrométricos de translação vertical e horizontal que permitem o posicionamento da amostra em relação ao feixe estacionário (TZAPHLIDOU, 2005).





**Figura 3.2.** Principais componentes do *set-up* tomográfico montado na Sala Experimental.

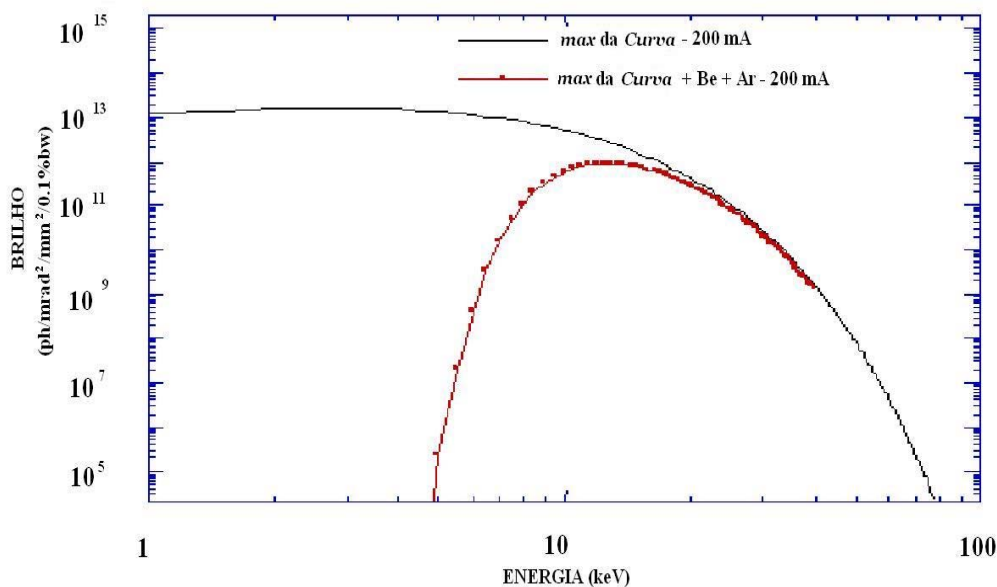
Neste sistema de posicionamento da amostra, um suporte rotacional com resolução de  $(10^{-3})^\circ$  permite a realização das tomografias, de modo que o detector é fixo em frente ao feixe, enquanto o objeto gira em passos discretos em frente a ele. O sistema de detecção usado foi uma câmera CCD Hystar de 16-bits, com  $2048 \times 2048$  pixels<sup>2</sup>, tamanho de pixel de  $14 \times 14 \mu\text{m}^2$ . (POLACCI *et al.*, 2006; TESEI *et al.*, 2005).

## 3.2 Parâmetros Experimentais

A tabela 3.1 mostra alguns parâmetros do laboratório de luz síncrotron Elettra nos dois modos de operação: 2,0 GeV e 2,4 GeV. O campo magnético indicado refere-se à linha SYRMEP. A figura 3.3 mostra o espectro da linha SYRMEP calculada por uma intensidade de corrente de 200mA e energia de 2,0GeV no anel (BRAVIN, 1998).

**Tabela 3.1** – Parâmetros do Elettra nos modos de operação a 2,0 e 2,4GeV.

| Parâmetro                        | Valor Nominal     | Valor Nominal     |
|----------------------------------|-------------------|-------------------|
| Energia dos Elétrons             | 2,0 GeV           | 2,4 GeV           |
| Corrente no anel                 | 300 mA            | 140 mA            |
| Fator relativístico ( $\gamma$ ) | 3914              | 4697              |
| Campo magnético                  | 1,2 T             | 1,5 T             |
| Energia crítica                  | 3,2 keV           | 5,5 keV           |
| FWHM vert. Fonte                 | 100 $\mu\text{m}$ | 70 $\mu\text{m}$  |
| FWHM horiz. Fonte                | 870 $\mu\text{m}$ | 330 $\mu\text{m}$ |



**Figura 3.3** – Espectro da radiação na sala experimental SYRMEP calculada para uma intensidade de corrente de 200 mA e energia de 2.0 GeV no anel (BRAVIN, 1998).

Antes de começar a aquisição das imagens tomográficas é necessário escolher os parâmetros experimentais: tamanho do feixe laminar, energia do feixe e distância amostra-detector. O sistema de controle da linha (*Beamline Control System*) – mini BCS – permite total aquisição de dados e controle remoto do tamanho do feixe e da energia escolhida.

A dimensão do feixe laminar é definido pelos sistemas de fendas do vácuo e do ar ou um sistema de fendas micrométricas de tungstênio. Os sistemas de fendas são constituídos de quatro lâminas independentes chamadas *Left*, *Right*, *Up* e *Down*. O tamanho do feixe é definido pelas dimensões do sistema de fendas do vácuo e do ar que o delimitam antes de atingir a amostra.

A energia do feixe pode ser escolhida dentro da faixa de 8,5 a 35keV através do posicionamento remoto do duplo-cristal monocromador. O ângulo de Bragg dos dois cristais de Si(111) e o posicionamento relativo do segundo cristal em relação ao primeiro são escolhidos de modo a selecionar a energia do feixe. Os motores Berger controlam tanto o movimento dos sistemas de fendas de vácuo e de ar quanto o ângulo de Bragg do duplo-cristal monocromador. Os valores de energia em keV estão relacionados a valores para os motores Berger e AML. Desta forma, definindo-se a energia, os motores são automaticamente acionados para os valores correspondentes.

A distância amostra-detector pode variar de 0,1 a 1,0 m, de forma a possibilitar a realização de imagens tanto por transmissão quanto por contraste de fase, através do movimento manual do detector sobre um trilho. Neste trabalho, todas as imagens foram obtidas com uma distância amostra-detector igual a 0,1 m. O tamanho do feixe e a energia variam para cada grupo de amostra analisado.

### ***3.3. Aquisição das Imagens***

O primeiro passo para aquisição das imagens é a centralização das amostras no suporte de modo a otimizar a utilização do campo de vista da CCD. Para realização do alinhamento do centro da amostra e do detector, uma amostra padrão em forma de prisma é utilizada. Uma primeira imagem planar da amostra é feita com o objetivo de avaliar a região definida para análise e a intensidade do fluxo de radiação que atingem a CCD.

Todos os parâmetros a serem utilizados para aquisição das imagens tais como, área de captura, tempo de exposição e número de projeções são controlados pelo programa *Image Pro Plus v.5.1*. Todas as imagens foram obtidas em um intervalo angular entre 0 e 180 graus. Para cada amostra microtomografada foram obtidas 1440 imagens ou projeções, com passo angular igual a  $0,125^\circ$ . A área de captura e tempo de exposição variaram em função da amostra estudada. O tempo de aquisição foi otimizado para cada amostra em função do decaimento do fluxo do feixe, mantendo-se fixa a intensidade medida no centro da amostra.

### ***3.4. Reconstrução das Imagens***

O processo de reconstrução das imagens foi realizado utilizando o programa *SYRMEP\_TOMO\_PROJECT*, desenvolvido pelo grupo *SYRMEP* utilizando o *IDL* (*Interactive Data Language*) que é um ambiente computacional completo para análise interativa e visualização de dados. O *SYRMEP\_TOMO\_PROJECT* elabora as projeções através do método de retroprojeção filtrada com os seguintes procedimentos:

- mostrar uma única projeção normalizada. Para cada projeção um mapa de intensidades é gravado no plano *xy* do detector;
- seleccionar interativamente uma fatia do qual se deseja construir o sinograma;

- selecionar o filtro ao qual as fatias serão submetidas (*ramlak*, *shepp\_logan*, *kernel width*, *rem ring*, *rem zinger*). Neste trabalho o filtro utilizado foi o *Shepp-Logan*;
- otimizar o valor para o centro de rotação de modo a obter um sinograma melhor centrado em relação ao eixo de rotação minimizando assim, o aparecimento de artefatos nas fatias reconstruídas. Esse procedimento é muito importante na construção de uma boa imagem e quantificação;
- nesse ponto todos os sinogramas podem ser construídos, assim como as fatias. As fatias reconstruídas são tratadas para a reconstrução 3D, onde as fatias 2D são visualizadas como uma pilha (*Stack*).

### 3.4.1. Normalização das Imagens

Todas as imagens obtidas serão normalizadas a partir da relação:

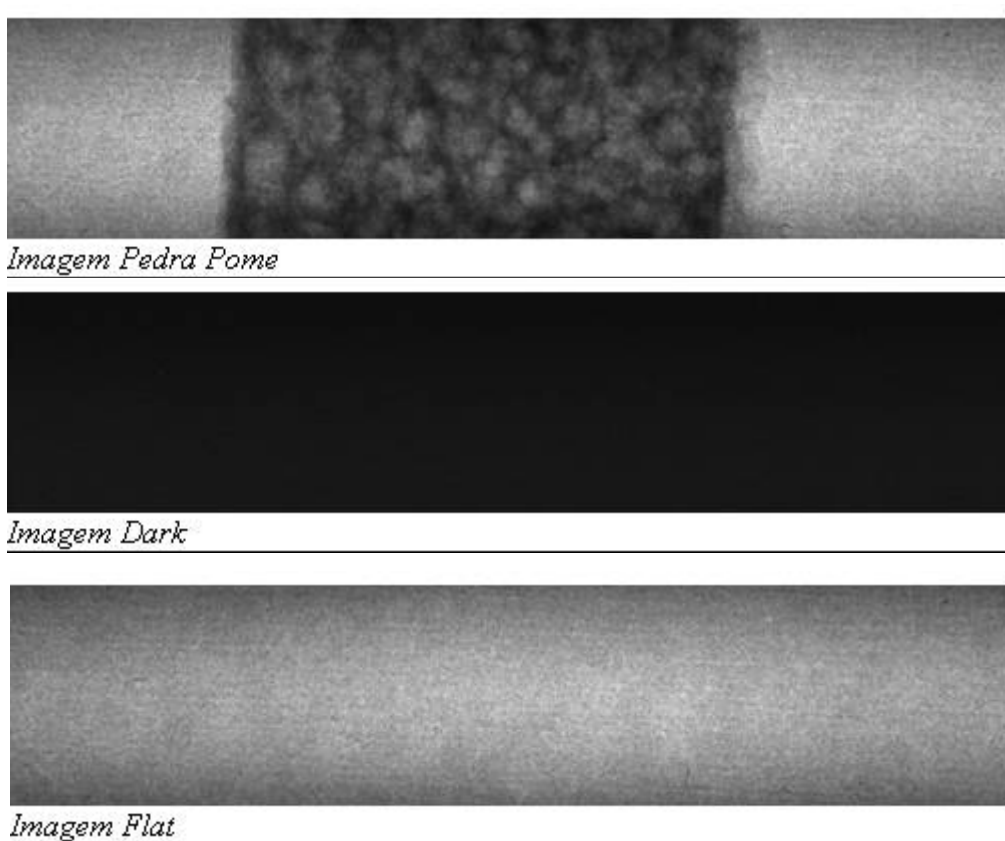
$$I_{Normalizada} = \frac{I_{Amostra} - I_{Dark}}{I_{Flat} - I_{Dark}} \quad 3.1$$

onde:  $I_{Amostra}$  é a imagem da amostra capturada pela câmera CCD após definidos todos os parâmetros experimentais;

$I_{Dark}$  é a imagem capturada pela câmera CCD com o *shutter* fechado (sem feixe);

$I_{Flat}$  é a imagem capturada pela câmera CCD com o *shutter* aberto e sem a amostra na frente do feixe.

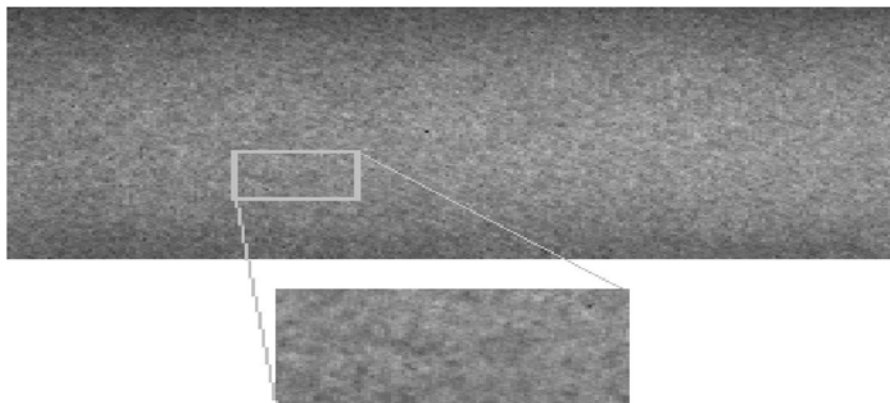
A figura 3.4 mostra um exemplo de cada uma dessas imagens planares.  $I_{Dark}$  e  $I_{Flat}$  são imagens médias calculadas a partir de um conjunto de 5 imagens obtidas antes e 5 depois da aquisição de todas as projeções.



**Figura 3.4** – Todas as imagens são de 16bits e foram visualizadas utilizando o programa *SYRMEP\_Tomo\_Project*.

A normalização das imagens utilizando as imagens *dark* e *flat* tem como objetivo corrigir as flutuações no feixe de raios X e a não homogeneidade de cada pixel do detector. As variações na imagem *flat* incluem o efeito de não uniformidades no feixe incidente e a resposta não uniforme da câmera CCD.

Na figura 3.5 pode-se ver, em detalhe, a área de uma dada imagem *flat* mostrando variações nos níveis de cinza que correspondem às flutuações da sensibilidade dos fotoelementos da câmera. Quantitativamente, a equação 3.1 corrige tais efeitos com os operadores aritméticos de subtração e divisão (GONZALES & WOODS, 1992).



**Figura 3.5** – O quadro na imagem *flat* mostra uma região com uma flutuação na sensibilidade dos fotoelementos.

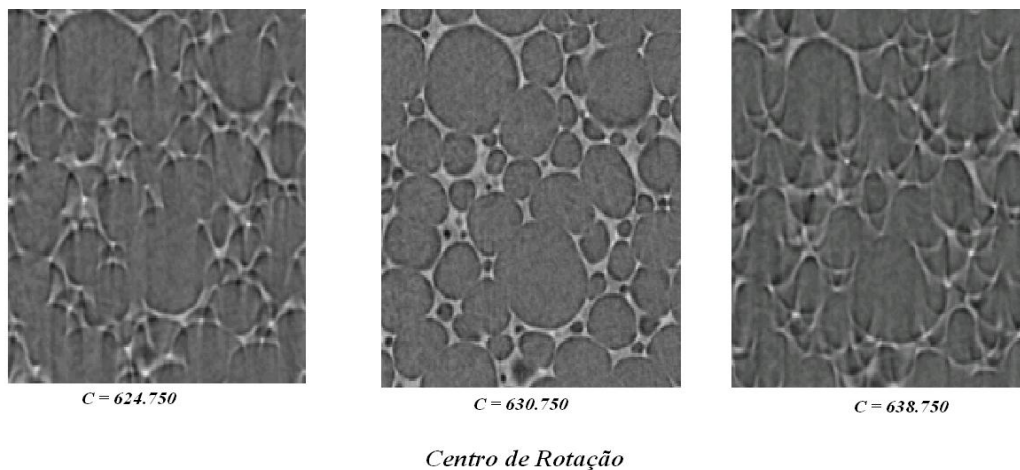
### ***3.4.2. Determinação do centro de rotação***

No processo de reconstrução dos volumes, um dos passos mais importantes é a escolha do centro de rotação dos sinogramas das microtomografias. A reconstrução das fatias é obtida montando-se sinogramas com as linhas de mesma altura de cada projeção 2D. Com exceção do sinograma central (plano perpendicular ao eixo de rotação), os demais sinogramas contêm projeções unidimensionais de dados que não estão no mesmo plano. Isto implica na reconstrução de imagens com distorção. Assim, quanto mais distante da linha central, maior é a distorção na reconstrução.

A escolha de um centro de rotação errado leva à reconstrução de uma imagem com muitos artefatos, principalmente de distorções na imagem. Esta situação dificulta a reconstrução de uma imagem nítida e conseqüentemente prejudica os resultados da quantificação histomorfométrica. Baixa nitidez na imagem quantifica as superfícies

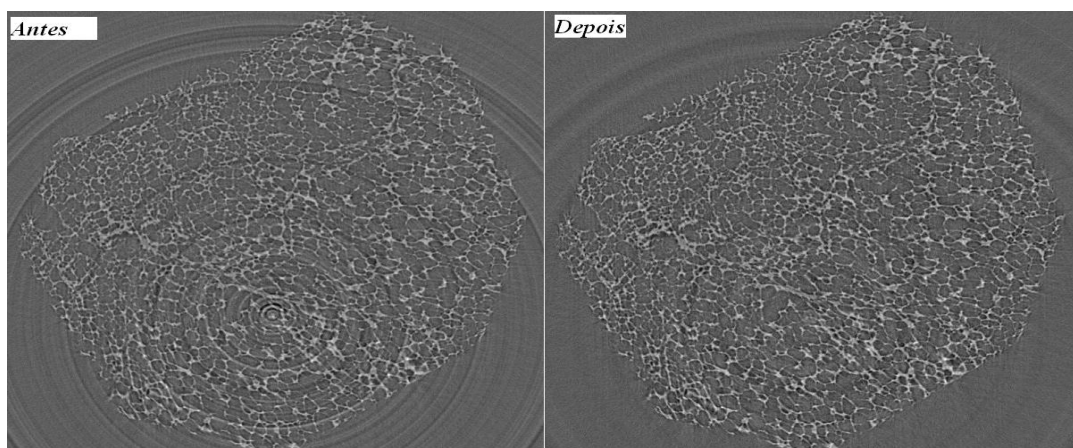
super-estimando ou sub-estimando seus valores, além de proporcionar graves erros na análise de conectividade.

A figura 3.6 apresenta três fatias de esponja, sendo que as duas fatias laterais possuem centro de rotação com escolhas fora do que seria ideal, e a fatia central possui um centro de rotação ideal ou próximo do valor ideal ( $C=630.750$ ). A fatia centralizada na imagem teve uma excelente redução de artefatos, e maior nitidez dos buracos na esponja.



**Figura 3.6** – Demonstração de escolhas de centro de rotação das fatias de esponja.

A figura 3.7 mostra as fatias antes (esquerda) e depois (direita) da escolha do centro de rotação ideal para este tipo de amostra. Os artefatos em forma de anel são devidos a desvios ou a não linearidades na resposta do detector.

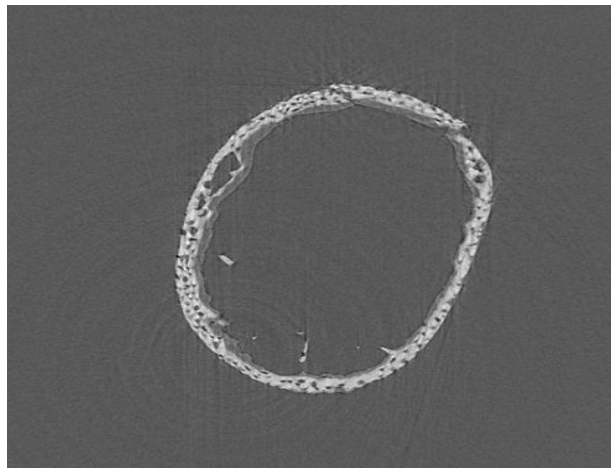


**Figura 3.7** – Fatias reconstruídas antes (esq.) e depois (dir.) da escolha do centro de rotação considerado ideal.



### ***3.4.3.Reconstrução dos Volumes***

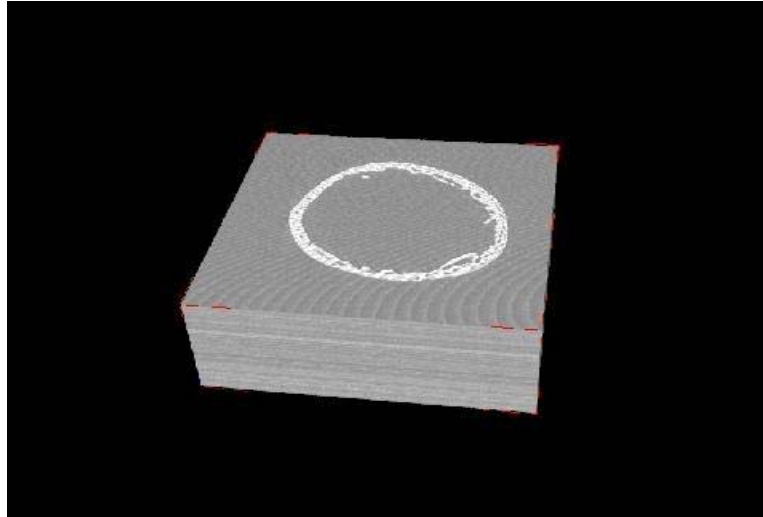
O processo de reconstrução das imagens consiste da soma das contribuições de cada projeção nos dados da matriz 2D para cada ponto na reconstrução do conjunto 3D. O resultado deste procedimento é uma estimativa do coeficiente de atenuação linear para cada ponto de uma malha específica na reconstrução 3D. Na figura 3.8 podemos ver a imagem de uma fatia.



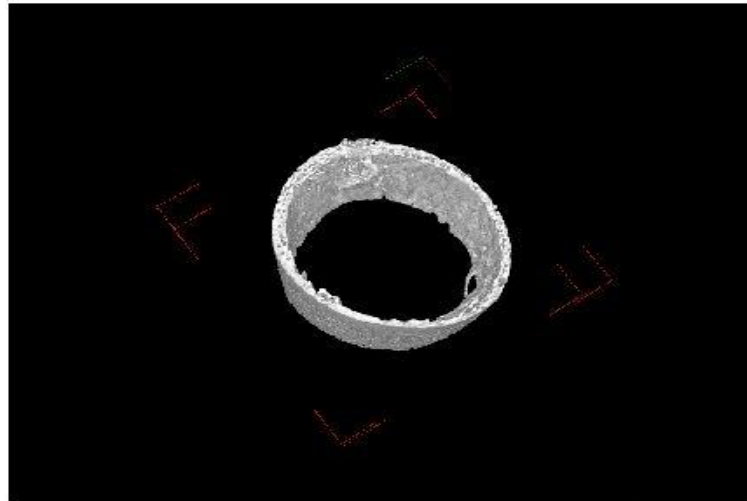
**Figura 3.8** – Imagem de uma fatia de tibia de rato com 8 bits.

Nas figuras 3.9 e 3.10 temos o conjunto de imagens que formam o volume ósseo microtomografado. No primeiro volume (figura 3.9) observamos toda a pilha (*stack*) de imagens do objeto junto com a radiação de fundo (*background*).

No segundo volume (fig. 3.10) temos apenas a pilha de fatias que representam o objeto, tal procedimento é feito excluindo a radiação de fundo usando o limiar (*threshold*) num histograma da imagem, fornecido pelo programa *VG Studio Max*.



**Figura 3.9** – Imagem de uma pilha de fatias. Volume do objeto com radiação de fundo.



**Figura 3.10** – Imagem de um volume ósseo sem radiação de fundo.

O primeiro passo depois de reconstruídas as fatias, antes da quantificação histomorfométrica foi habilitar as imagens para um formato que possibilite sua leitura pelo algoritmo Conect, assim como o DSc e o *VG Studio Max*. Todas as fatias tiveram seus volumes reconstruídos no formato *.raw*. Imagens desse formato contêm todos os dados que são obtidos diretamente do sensor de imagem da câmera antes do programa da câmera aplicar ajustes como nitidez e etc. Armazenar imagens no formato *.raw* da câmera permite alterar ajustes, como balanço do branco, após a imagem ter sido feita. No código, estas imagens ficarão armazenadas numa matriz 3D, na verdade um vetor de matrizes 2D. Cada posição do vetor indica uma imagem (um plano, uma seção transversal reconstruída). A maioria dos profissionais usa o formato *.raw* porque ele

oferece o maior flexibilidade. Terminada as construções de fatias e volume o passo seguinte será a preparação da amostra, binarizando e eliminando sinais espúrios, para quantificação da mesma.

### ***3.5 Metodologia para Segmentação das Imagens***

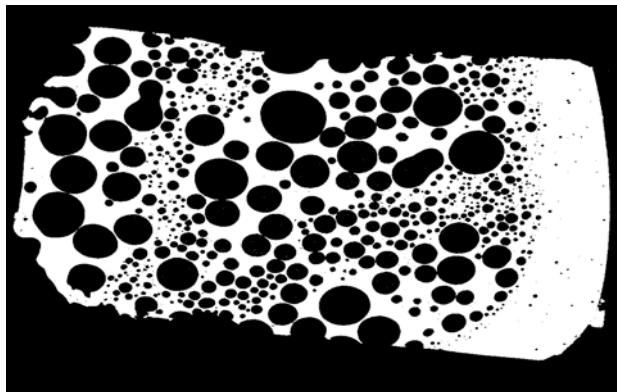
Depois de todas as imagens serem reconstruídas o próximo passo é a binarização, mas devido a não uniformidade dos volumes reconstruídos houve a necessidade da utilização de um filtro mediana em todas as imagens, sua escolha deve-se a sua técnica de suavização produzindo um menor efeito de borramento na imagem, diferentemente do filtro média.

Trabalhar com uma imagem apresentando apenas duas fases (preto ou branco) é essencial para realizar a quantificação. A binarização consiste na escolha de um valor limiar que será aplicado à imagem, resultando em uma imagem em preto e branco, onde a fase branca corresponde ao tecido ósseo e a fase preta é o restante do tecido (não quantificado), conforme explicado no capítulo 2.

Como cada algoritmo tem a sua própria maneira de binarizar uma imagem, a fim de minimizar as imperfeições nas limiarizações, a escolha do limiar (*threshold*) foi feita de uma única maneira para os três programas. Esta é uma das tarefas mais difíceis e importantes na preparação de imagem, pois depende das características do sistema tomográfico, em especial, das características energéticas do feixe de raios X.

A escolha do limiar foi feita para cada fatia do volume reconstruído eliminando o máximo possível os sinais espúrios e os efeitos de fase. As fatias foram quantificadas

usando 256 níveis de cinza da imagem. O limiar separou osso da radiação de fundo, binarizando os pixels da imagem com valores 0 (preto) e 255 (branco). Na figura 3.11 é possível ver a fatia de chocolate binarizada.



**Figura 3.11** – Fatia de chocolate binarizada.

No capítulo 4 serão apresentadas as aplicações e os resultados obtidos.

## ***Capítulo 4***

### ***Resultados***

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos. Em primeiro lugar o algoritmo *Conect*, desenvolvido para quantificação de amostras diversas do laboratório de radiação síncrotron Elettra. Em segundo lugar são apresentados os resultados das aplicações dos algoritmos *Conect*, *DSc* e *VG Studio Max*. A utilização desses dois últimos algoritmos tem como objetivo validar o algoritmo *Conect*, comparando os resultados.

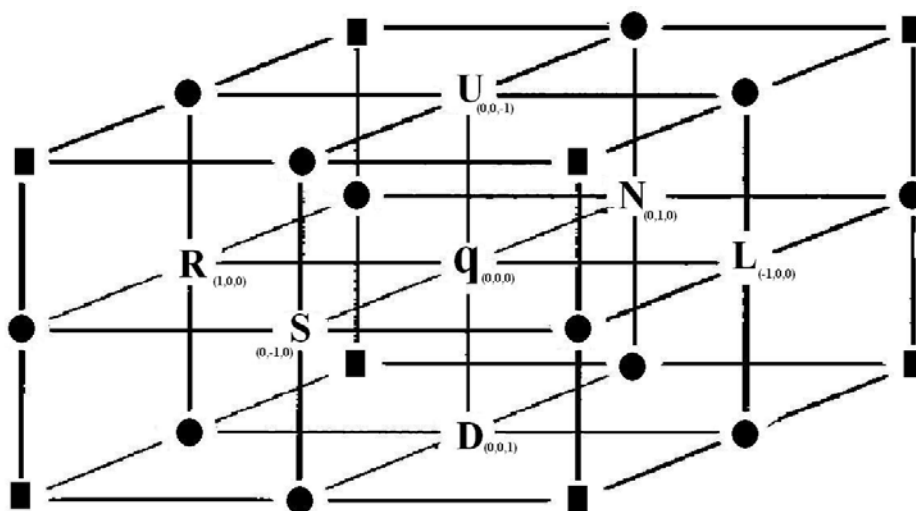
#### ***4.1 Algoritmo***

Os dados de entrada para o *Conect* são: a largura, a altura e o número de imagens contidos no arquivo *.raw*. O volume total da imagem TV, definido pelo produto entre largura, altura e planos de uma imagem, será o primeiro parâmetro a ser calculado pelo algoritmo. O modo como este parâmetro será calculado é comum para os três programas em análise.

## 4.1.1 Cálculo dos Parâmetros Histomorfométricos

As amostras analisadas serão amostras complexas tridimensionais formadas por uma distribuição de matéria e vazios. Considerando uma imagem binarizada, um *voxel*  $q$  branco significa presença de matéria. Em contrapartida, um *voxel*  $q$  preto indica uma região de vazio. O algoritmo conta o número de *voxels* brancos na coleção inteira de imagens. A soma de todos os *voxels* brancos equivale ao volume de matéria (BV). A soma de todos os *voxels* brancos que pertençam às superfícies que delimitam discontinuidades matéria-vazio equivale às superfícies de interesse (BS).

A figura 4.1 mostra como o algoritmo proposto analisa a vizinhança do *voxel*  $q$  conectado aos seus 6 vizinhos: U (acima), D (abaixo), N (norte), S (sul), L (esquerda), R(direita). Essa configuração é conhecida como 6-conectado. Para cada imagem reconstruída, o algoritmo varrerá desde a primeira até a última linha procurando por *voxels* brancos. Todos os *voxels* brancos serão computados em BV. Se o *voxel* for branco e possuir algum vizinho preto então, será caracterizado como borda e computado também em BS.



**Figura 4.1** – No  $\mathbb{R}^3$ , o conjunto  $N_6(q)$  contém o ponto central  $q$  e os pontos marcados U,D,L,R,N e S.

A histomorfometria tradicional é baseada nas seções bi-dimensionais (FELDKAMP, 1988) da reconstrução 3D. A versão final do algoritmo *Conect* calcula BV e BS diretamente do volume 3D, diminuindo o tamanho do código e o tempo

computacional em relação a outros algoritmos. A seguir, o algoritmo dos parâmetros BV/TV e BS/BV.

---

---

*Algoritmo PARAMETROS\_BV\_BS*

---

---

entradas:

ponto { matriz 3D, imagens reconstruídas }  
total\_imagens { total de imagens }  
total\_linhas { total de linhas em cada imagem }  
total\_colunas { total de colunas em cada imagem }; saída:  
BV { total de pontos da amostra }  
BS { total de pontos na superfície, fronteira da amostra }

---

---

BV = 0; BS = 0

preto = 0; branco = 255 { se for imagem de 8bits }

para i de 1 até total\_imagens-1 fazer { total menos 1 }

para j de 1 até total\_linhas-1 fazer { total menos 1 }

para k de 1 até total\_colunas-1 fazer { total menos 1 }

se (ponto(i,k,j)=branco) entao

BV = BV+1 { já começa a contar os pontos da amostra }

se (ponto(i,k,j+1)=preto ou ponto(i,k+1,j)=preto ou

ponto(i+1,k,j)=preto) entao

BS = BS+1

fim se

senão { ponto(i,k,j) é preto }

se (ponto(i,k,j+1)=branco ou ponto(i,k+1,j)=branco ou

ponto(i+1,k,j)=branco) entao

BS = BS+1

fim se

fim para

fim para

fim para

```

para i de 1 até total_imagens fazer
  para j de 1 até total_linhas fazer
    se (ponto(i,total_colunas,j)=branco) então
      BV = BV+1
    fim se
  fim para
fim para
para i de 1 até total_imagens fazer
  para k de 1 até total_colunas fazer
    se (ponto(i,k,total_linhas)=branco) então
      BV = BV+1
    fim se
  fim para
fim para
para j de 1 até total_linhas fazer
  para k de 1 até total_colunas fazer
    se (ponto(total_imagens,k,j)=branco) então
      BV = BV+1
    fim se
  fim para
fim para

```

---

***Fim PARAMETROS\_BV\_BS***

---

### ***4.1.2 Algoritmo da Conectividade***

De acordo com a discussão teórica apresentada no capítulo 2, o cálculo da conectividade vem da geometria analítica, baseando-se na equação de Euler-Poincaré (eq. 2.33). A conectividade se relaciona com o parâmetro BS/BV, pois ambos são



parâmetros relativos e indicam mudanças na estrutura da amostra analisada. Devido à grande dificuldade em quantificar estruturas com superfícies complexas, o cálculo da conectividade é visto como uma alternativa para análise dessas superfícies. A conectividade, que não depende de nenhum parâmetro espacial, indica se um objeto é mais poroso ou se possui maior número de canais em sua estrutura, além de quantificar a fração de poros por *voxel*.

O algoritmo foi dividido em duas partes. A primeira parte traz todo o cálculo da conectividade. Para o cálculo da conectividade 3D por análise de voxels, o termo  $(L-F)$  na equação 2.29 é igual a zero, pois nesse caso, o número de contornos sempre será igual ao número de faces. Assim, a equação de Euler-Poincaré (eq. 2.33) pode ser reescrita como:

$$\frac{(V - A + F)}{2} = (S - G) \quad (4.1)$$

Com essa equação é possível quantificar um objeto calculando-se  $(S-G)$ , uma vez que, esse índice informa se a estrutura do objeto é composta por um número maior de poros ou de canais. A conectividade nada mais é do que o resultado do segundo termo,  $(S-G)$ , da equação 4.1. Amostras com maior número de poros dão resultados positivos, pois  $S$  será maior do que  $G$  e amostras com maior número de canais em relação ao número de poros apresentarão resultados negativos. Um poro é sempre computado como +1 para  $S$  e um canal como +1 para  $G$ . Portanto, se a amostra possui maior número de canais na sua estrutura, o valor da conectividade será negativo. A seguir o algoritmo para calcular a conectividade é apresentado.

---



---

### *Algoritmo da Conectividade*

---



---

#### **algoritmo Euler\_por\_linha**

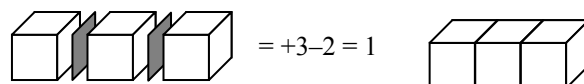
entradas:

mat: matriz de inteiros

lin: número de linhas

col: número de colunas

saídas:



```

vet: vetor com número de Euler por linha
variáveis locais:
j, k: contadores
face_comum: número de interfaces
volume: número de elementos volumétricos
para j de 1 até lin fazer { se o primeiro elemento da linha pertence a amostra }
se (mat(j,1)≠0) então
volume ← 1; senão
volume ← 0; fim se
{ zera o contador de interfaces }
face_comum ← 0;
para k de 2 até col fazer
{ se o elemento testado pertence a amostra, contar }
se (mat(j,k)≠0) então
volume ← volume + 1;
{ e se o anterior também, contar interface }
se (mat(j,k-1)≠0) então
face_comum ← face_comum - 1;
fim se
fim se
fim para
{ número de Euler é número de elementos menos número de interfaces}
{ número de Euler por linha}
vet(j) ← volume + face_comum;
fim para
fim algoritmo Euler_por_linha

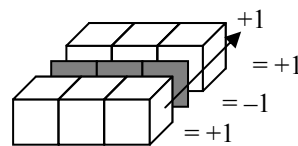
```

### **algoritmo Euler\_por\_plano**

```

entradas:
mat: matriz de elementos
lin: número de linhas
col: número de colunas
vet: vetor com número de Euler por linha
saídas

```



num: número de Euler por plano

variáveis locais:

j, k: contadores

face\_comum: número de interfaces

aresta\_comum: número de arestas comuns

{ inicializa número de Euler com o dado correspondente a primeira linha }

num  $\leftarrow$  vet(0);

para j de 2 até lin fazer

{ se há interface comum nos elementos anteriores }

se (mat(j-1,1) e mat(j,1)) então

face\_comum  $\leftarrow$  1

senão

face\_comum  $\leftarrow$  0

fim se

{ inicializa contador de arestas comuns }

aresta\_comum  $\leftarrow$  0

para k de 2 até col fazer

{ se há interface entre os elementos atuais, contar interface }

se (mat(j-1,k) && mat(j,k)) então

face\_comum  $\leftarrow$  face\_comum + 1

{ se há interface entre os elementos anteriores também, contar aresta comum }

se (mat(j-1,k-1) e mat(j,k-1)) então

aresta\_comum  $\leftarrow$  aresta\_comum - 1

fim se

fim se

fim para

{ número de Euler é o número de Euler da linha menos interfaces menos arestas }

{ número de Euler para o plano }

num  $\leftarrow$  num + vet(j) - (face\_comum + aresta\_comum)

fim para

fim algoritmo Euler\_por\_plano

### algoritmo Interfaces\_entre\_planos

entradas:

vol1: matriz de elementos de um plano

vol2: matriz de elementos do outro plano adjacente

lin: número de linhas

col: número de colunas

saídas:

map: matriz com as interfaces entre planos

variáveis locais:

j, k: contadores

para j de 1 até lin fazer

para k de 1 até col fazer

{ se elemento do plano anterior e elemento atual possuem interface }

se (vol1(j,k)≠0 e vol2(j,k)≠0) então

map(j,k) ← 1 { mapeia interface }

senão

map(j,k) ← 0 { não mapeia interface }

fim se

fim para

fim para

fim algoritmo Interfaces\_entre\_planos

### algoritmo Conectividade

entradas:

vol: matrizer das imagens

lin: número de linhas

col: número de colunas

plan: número de imagens

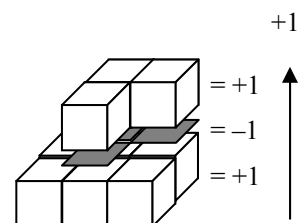
saídas:

nEuler: número de Euler para o volume

variáveis locais:

i, j, k: contadores

v1: vetor com números de Euler de cada linha



v2: número de Euler do plano  
 m1: vetor de números de Euler de cada linha de interface  
 m2: número de Euler das interfaces  
 map: mapa com as interfaces entre os planos  
 alocar espaço para v1[lin]  
 alocar espaço para m1[lin]  
 alocar espaço para map[lin,col]  
 Euler\_por\_linha(vol(1),lin,col,v1)  
 Euler\_por\_plano(vol(1),lin,col,v1,v2)  
 nEuler  $\leftarrow$  v2  
 para i de 2 até plan fazer  
   Interfaces\_entre\_planos(vol(i-1),vol(i),lin,col,map);  
   Euler\_por\_linha(map,lin,col,m1);  
   Euler\_por\_plano(map,lin,col,m1,m2);  
   Euler\_por\_linha(vol(i),lin,col,v1);  
   Euler\_por\_plano(vol(i),lin,col,v1,v2);  
   nEuler  $\leftarrow$  nEuler + v2 - m2;  
 fim para  
 liberar v1  
 liberar m1  
 liberar map  
 fim algoritmo Conectividade

---



---

***Fim da Conectividade***

---



---

### 4.1.3 Algoritmo da Separação de Poros

A segunda parte do algoritmo da conectividade, conhecido como *separação de poros*, tem o objetivo de isolar os poros do volume reconstruído da amostra e quantificá-los. No processo de separação dos poros, a primeira tarefa foi criar uma casca de cor cinza (limiar 127) em torno do volume reconstruído. Após a criação da casca, o algoritmo faz uma varredura de todas as colunas, linhas e planos da imagem, em movimentos de ida e volta, procurando por *voxels* pretos em contato com os *voxels* cinza da casca. Cada *voxel* preto em contato com um *voxel* cinza é transformado em um novo *voxel* cinza.

O algoritmo avalia os *voxels* pela topologia do 6-conectado (figura 4.1). Sendo um *voxel* vizinho ao *voxel* central  $q$  igual à cinza. O algoritmo faz o *voxel*  $q$  assumir coloração cinza e desloca para outro *voxel* a posição central do cubo. No caso dos 6 *voxels* vizinhos do *voxel* central  $q$  serem brancos ou pretos nada acontece. O algoritmo repete o procedimento até que todos *voxels* preto que esteja ligado a pelo menos um *voxel* cinza, tenha sua tonalidade modificada para cinza. Desta forma todos os canais, que atravessam pelo menos uma das superfícies externas do objeto no volume reconstruído, assumem o novo valor de limiar 127, ou seja, seus *voxels* tornam-se cinza.

Partindo do princípio que todos os poros estão posicionados no interior das amostras, o *voxel* ou os *voxels* que formam os poros estão sempre “encapsulados”, circundados por *voxels* branco que compõem a amostra no volume reconstruído. Assim os *voxels* brancos impedem que os poros entrem em contato com a casca cinza. Como resultado, nenhum poro entra em contato com *voxels* de cor cinza e permanecem como estão, *voxels* preto.

A partir desse ponto, a imagem apresenta o fundo (Bg da imagem) e os canais presentes no objeto, todos na coloração cinza (limiar 127). A imagem ainda apresenta o próprio objeto na cor branca, limiar 255 e os poros no interior objeto com coloração preta. O próximo passo é a inversão da imagem, usando o limiar 127, tornando preto todo *voxel* acima deste valor e branco todo *voxel* abaixo de 127. No final desse processo

de inversão da imagem, apenas os poros contidos no interior do objeto serão visíveis, pois serão *voxels* brancos, os demais *voxels* da imagem serão preto.

Agora que na imagem binarizada existem apenas *voxels* branco, representando os poros, o objetivo é quantificá-los. A quantificação é feita utilizando o algoritmo da conectividade, o resultado obtido no final será igual ao número de poros presentes no interior do objeto. Surge então um novo parâmetro que a partir de agora será denominado *número de poros* (nP).

## 4.2 Aplicações

Com intuito de avaliar a eficiência do algoritmo *Conect*, os resultados obtidos através da aplicação em imagens com diversos níveis de complexidade foram comparados com aqueles obtidos usando o *DSc* e o *VG Studio Max*. As amostras utilizadas têm estruturas 3D complexas e características diversas, são elas: pedra pome, esponja plástica, rocha vulcânica, chocolate aerado, e osso cortical.

### 4.2.1 Extração de Dados em Amostras Complexas.

- **Amostra 1: pedra pome:**

A figura 4.2 mostra uma fatia da pedra pome microtomografada. Por apresentar arquitetura extremamente porosa, a pedra pome é um bom teste para análise de fragmentação e conexão das estruturas, além da análise da porosidade.



**Figura 4.2** – Fatia da pedra pome.



A pedra pome foi tomografada com energia de 17 keV e posicionada a uma distância amostra-detector igual a 10cm. As fatias da microtomografia da pedra pome, possuíam dimensões iguais a 1167x1167 pixels, num total de 151 fatias. O volume foi subdividido em volumes com dimensões iguais a 200x200 pixels em 100 fatias. O limiar utilizado na binarização das fatias foi de 130 e escolhido através do histograma da imagem. A tabela 4.1 apresenta os resultados da quantificação histomorfométrica e da conectividade.

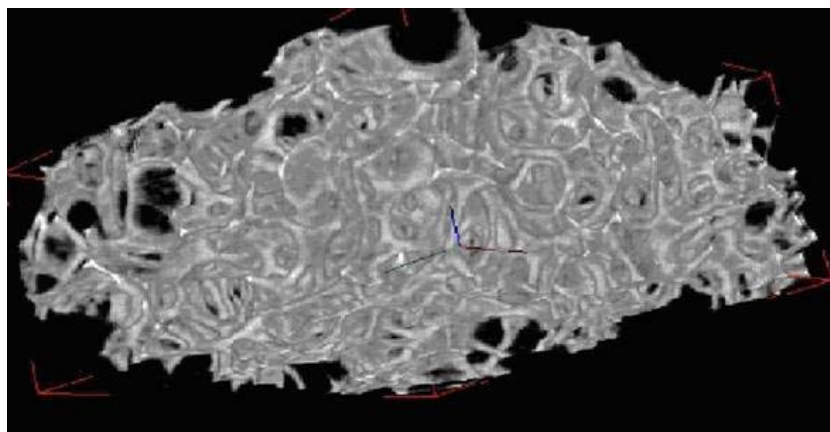
**Tabela 4.1** – Parâmetros histomorfométricos e conectividade da pedra pome.

| <b>Parâmetros<br/>Histomorfométricos</b>     | <b>Programa 1<br/>DSc</b> | <b>Programa 2<br/>VG Max</b> | <b>Programa 3<br/>Conect</b> |
|----------------------------------------------|---------------------------|------------------------------|------------------------------|
| <b>TV</b>                                    | 4000000                   | 4000000                      | 4000000                      |
| <b>BV</b>                                    | Não disponível            | 1616061                      | 1616061                      |
| <b>BS</b>                                    | Não disponível            | Não disponível               | 553739                       |
| <b>BV/TV (%)</b>                             | 19,3 (*40,4)              | 40,4                         | 40,4                         |
| <b>BS/BV (mm<sup>2</sup>/mm<sup>3</sup>)</b> | 0,875 (*0,343)            | 0,389                        | 0,342                        |
| <b>Conectividade</b>                         | X                         | X                            | 5847                         |
| <b>nP</b>                                    | X                         | X                            | 24352                        |

\*os valores marcados com asteriscos são obtidos da extrapolação 2D do DSc.

- **Amostra 2: esponja plástica:**

A segunda amostra analisada foi uma esponja plástica (figura 4.3), dividida em sub volumes, 100 fatias de tamanhos iguais a 200x200 pixels, a fim de verificar flutuações estruturais na mesma. O limiar utilizado na binarização das fatias foi de 130, escolhido através do histograma da imagem. Uma esponja pode ser entendida como um objeto sólido, flexível e que apresenta grande capacidade de reter líquidos, devido a grande presença de orifícios vazios por toda a sua extensão. A tabela 4.2 apresenta os resultados histomorfométricos e da conectividade.



**Figura 4.3** – Volume reconstruído de uma amostra de esponja plástica.

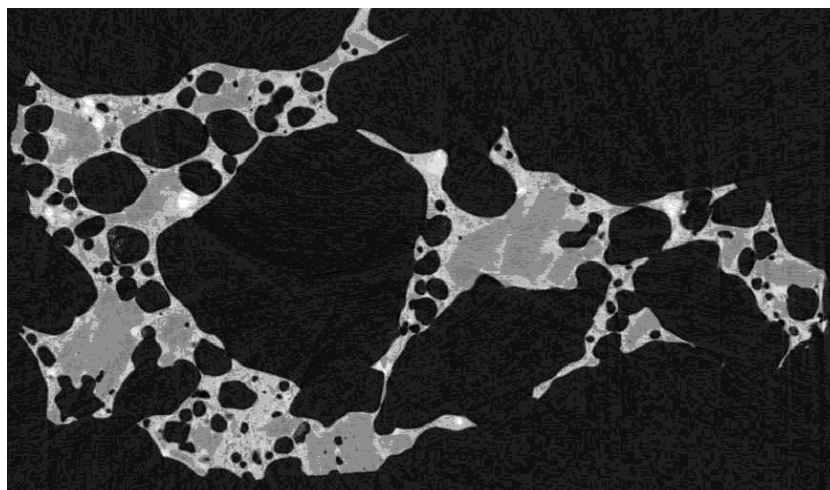
**Tabela 4.2** - Parâmetros Histomorfométricos e conectividade da esponja.

| <b>Parâmetros Histomorfométricos</b>         | <b>Programa 1 DSc</b> | <b>Programa 2 VG Max</b> | <b>Programa 3 Conect</b> |
|----------------------------------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|
| <b>TV</b>                                    | 4000000               | 4000000                  | 4000000                  |
| <b>BV</b>                                    | Não disponível        | 506755                   | 506755                   |
| <b>BS</b>                                    | Não disponível        | Não disponível           | 267595                   |
| <b>BV/TV (%)</b>                             | 8,5 (*12,7)           | 12,7                     | 12,7                     |
| <b>BS/BV (mm<sup>2</sup>/mm<sup>3</sup>)</b> | 0,938 (*0,545)        | 0,491                    | 0,528                    |
| <b>Conectividade</b>                         | X                     | X                        | -1032                    |
| <b>nP</b>                                    | X                     | X                        | 32                       |

\*os valores marcados com asteriscos são obtidos da extrapolação 2D do DSc.

- **Amostra 3: pedra vulcânica:**

O volume reconstruído da terceira amostra analisada, uma pedra vulcânica, apresenta 200x200 pixels e 100 fatias. A figura 4.4 mostra uma fatia (0028) do volume da pedra vulcânica reconstruído. O limiar utilizado na binarização do volume foi de 130. A tabela 4.3 apresenta todos os dados da análise histomorfométrica e conectividade da pedra vulcânica.



**Figura 4.4** – Fatia 0028 da pedra vulcânica.

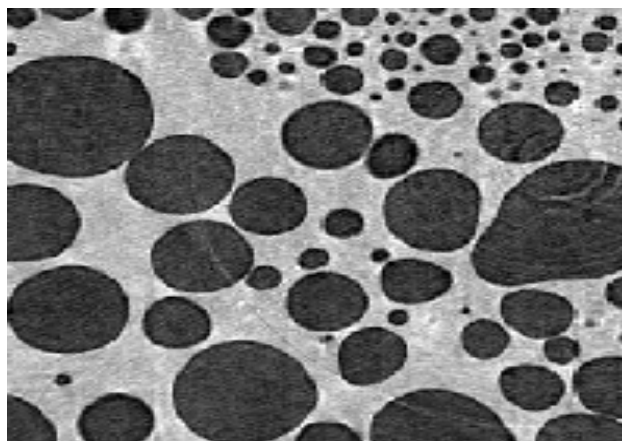
**Tabela 4.3** - Parâmetros Histomorfométricos da pedra vulcânica.

| <b>Parâmetros<br/>Histomorfométricos</b>     | <b>Programa 1<br/>DSc</b> | <b>Programa 2<br/>VG Max</b> | <b>Programa 3<br/>Conect</b> |
|----------------------------------------------|---------------------------|------------------------------|------------------------------|
| <b>TV</b>                                    | 4000000                   | 4000000                      | 4000000                      |
| <b>BV</b>                                    | Não disponível            | 1271115                      | 1271115                      |
| <b>BS</b>                                    | Não disponível            | Não disponível               | 203148                       |
| <b>BV/TV (%)</b>                             | 29,3(*31,8)               | 31,8                         | 31,8                         |
| <b>BS/BV (mm<sup>2</sup>/mm<sup>3</sup>)</b> | 0,237(*0,190)             | 0,220                        | 0,159                        |
| <b>Conectividade</b>                         | X                         | X                            | 37                           |
| <b>nP</b>                                    |                           |                              | 212                          |

\*os valores marcados com asteriscos são obtidos da extrapolação 2D do DSc.

- **Amostra 4: chocolate aerado:**

A quarta amostra foi um pedaço de chocolate aerado. Na figura 4.5 é possível ver a fatia de número 100 da amostra de chocolate tomografada. As 200 fatias com tamanhos iguais a 1089x891, também foram divididas em 2 subvolumes de 200x200 pixels em 100 fatias. O limiar utilizado na binarização do volume foi de 130. A tabela 4.4 mostra os dados médios da análise do chocolate aerado.



**Figura 4.5** – Fatia número 0100 da amostra de chocolate aerado.

**Tabela 4.4** - Parâmetros Histomorfométricos do chocolate aerado.

| <b>Parâmetros<br/>Histomorfométricos</b>     | <b>Programa 1<br/>DSc</b> | <b>Programa 2<br/>VG Max</b> | <b>Programa 3<br/>Conect</b> |
|----------------------------------------------|---------------------------|------------------------------|------------------------------|
| <b>TV</b>                                    | 4000000                   | 4000000                      | 4000000                      |
| <b>BV</b>                                    | Não disponível            | 1870480                      | 1870480                      |
| <b>BS</b>                                    | Não disponível            | Não disponível               | 324051                       |
| <b>BV/TV (%)</b>                             | 10,7(*46,8)               | 46,8                         | 46,8                         |
| <b>BS/BV (mm<sup>2</sup>/mm<sup>3</sup>)</b> | 0,651(*0,164)             | 0,179                        | 0,173                        |
| <b>Conectividade</b>                         | X                         | X                            | 1194                         |
| <b>nP</b>                                    | X                         | X                            | 936                          |

\*os valores marcados com asteriscos são obtidos da extrapolação 2D do DSc.

### ***4.2.1.1 Análise dos Resultados das Amostras Complexas.***

Como os números de linhas, colunas e planos do volume analisado são dados de entrada (*input*), os três algoritmos calculam o produto desses números iniciais para determinar o volume total (TV) de cada imagem 3D.

Analisando o primeiro parâmetro histomorfométrico, BV/TV, verifica-se que o algoritmo *Conect* apresentou resultado muito preciso em comparação aos programas *DSc* e *VG Studio Max*. Com relação ao algoritmo *DSc* o parâmetro extraído da extrapolação 3D apresentou resultado divergente com os demais algoritmos. Sendo assim, foi necessário recorrer aos resultados da extrapolação 2D.

Os valores obtidos para parâmetro BS/BV, que calcula o quanto fragmentado está um objeto, não foram exatos. Esse fato se deve a complexidade para calcular superfícies complexas. O número de superfícies na estrutura interna de um objeto aumenta com o aumento das rupturas ou fragmentações no objeto. Vale ressaltar que os resultados do algoritmo *DSc* são obtidos extração de dados 2D. Analisando estatisticamente a diferenças dos resultados entre os três algoritmos, pode-se afirmar que os mesmos estão dentro de uma flutuação estatística considerada aceitável.

Usando a conectividade como um segundo recurso de análise estrutural de objetos, o *Conect* apontou resultados com valores positivos e negativos para a conectividade nas diversas amostras analisadas. Os valores positivos da conectividade indicam que a amostra possui muito mais poros do que canais. Assim, a pedra pome que possui uma estrutura visivelmente muito porosa (figura 4.2), apresentou um valor

elevado da conectividade (5847). Esta análise foi reforçada com o valor obtido para o número de poros presentes na amostra, nP igual a 24352.

O chocolate aerado, também obteve resultado positivo da conectividade (1194). Este valor aponta para uma estrutura com maior número de poros em relação ao número de canais. O número de poros nP é igual a 936.

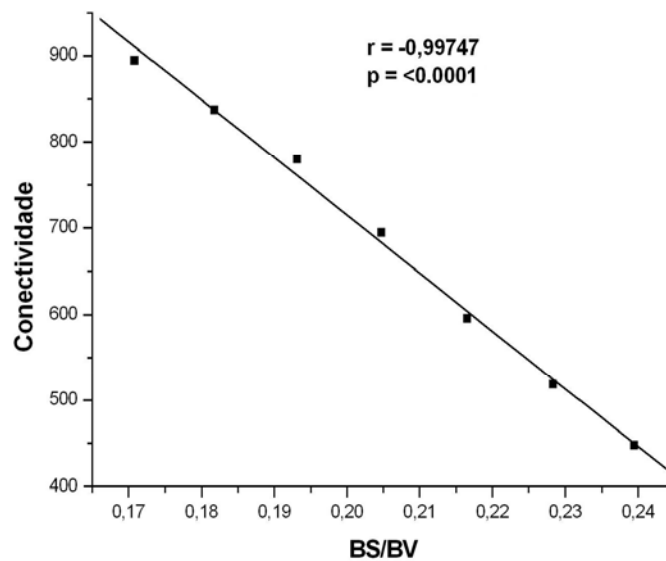
O resultado negativo da esponja (-1032) indica uma estrutura com muito mais canais em relação ao número de poros. O número de poros ajudou na confirmação desta análise, pois o seu valor foi extremamente baixo, nP igual a 32.

A pedra vulcânica apresentou um resultado para conectividade igual a 37. Este valor indica que a amostra possui um número de poros muito próximo do número de canais. Porém, observando uma das fatias (figura 4.4) do volume reconstruído da pedra vulcânica é possível ver grandes buracos na amostra. Provavelmente esses buracos foram formados no momento do desprendimento da pedra na montanha, isto pode ter sido determinante no número de poros e canais presentes na amostra. 212 é número de poros dessa amostra.

### ***4.2.1.2 Conectividade X BS/BV.***

Com o intuito de verificar a correlação entre a conectividade e o parâmetro BS/BV, um ensaio controlado no conjunto de imagens da pedra pome foi realizado. A primeira quantificação foi feita com o volume total da pedra pome. Numa segunda quantificação, o volume sofreu uma alteração. A fatia de número 10 foi totalmente pintada de preto, ou seja, seu limiar foi alterado para zero, dividindo o volume em duas partes. A seguir o volume foi quantificado. Dividir o volume em duas partes, tinha como objetivo aumentar o número de superfícies da amostra e conseqüentemente o

parâmetro BS/BV, além de verificar alterações estruturais com relação ao número de poros e canais. Em seguida, foram pintadas as fatias 30, 50, 70, 100 e 140. A cada nova fatia pintada, era feita uma quantificação. Na figura 4.6 é possível ver a relação linear entre a conectividade e o parâmetro histomorfométrico BS/BV ( $r = 0,997$ ). Numa análise do gráfico observa-se que aumentando o número de superfícies nesta amostra menor é a conectividade.



**Figura 4.6** – Gráfico da relação Índice de conectividade versus BS/BV.

## ***4.2.2 Osso Cortical***

O tecido ósseo, em nível macroscópico, pode ser dividido em: osso cortical e osso trabecular. O osso trabecular constitui cerca de 20% da massa esquelética e é encontrado nos corpos vertebrais, nas epífises dos ossos longos e nos ossos chatos. Sendo formado por uma rede de trabéculas interconectadas que lhe dá maior resistência à compressão, apresenta relação superfície/volume maior do que a do osso cortical, e

mesmo contribuindo com apenas 20% na formação do esqueleto, possui cerca de 80% da superfície disponível. O osso cortical, que é responsável por 80% da massa esquelética, está presente nas epífises dos ossos longos e é encontrado como revestimento de todos os ossos do organismo.

As fraturas causadas por osteoporose constituem um dos maiores problemas de saúde pública associada com custos econômicos e humanos. Nos últimos 20 anos, os estudos desse tipo de fratura foram focalizados no osso trabecular. Entretanto, a perda de osso cortical pode também contribuir para fraturas (BOUSSON *et al.*, 2004). A análise da estrutura e da arquitetura do osso cortical, seja com histomorfometria, esqueletização, etc., tem sido a mais recente tentativa dos cientistas em solucionar problemas relacionados à osteoporose e a outras doenças ósseas (COOPER *et al.*, 2003, BAGI *et al.*, 2006).

A seguir serão apresentados os resultados obtidos para dois grupos de amostras:

- O primeiro grupo de amostras consistia de tíbias de ratos que apresentavam diabetes experimental.
- O segundo grupo de amostras consistia de fêmur de ratos que foram contaminados com chumbo e flúor.

### ***4.2.2.1 Primeiro Grupo***

As características dessas amostras estão descritas na Tabela 4.5. A figura 4.7 mostra a imagem de uma radiografia de uma tíbia. A área tomografada está abaixo da linha de crescimento do osso. Todas as imagens foram obtidas com 1440 projeções à 21 keV.



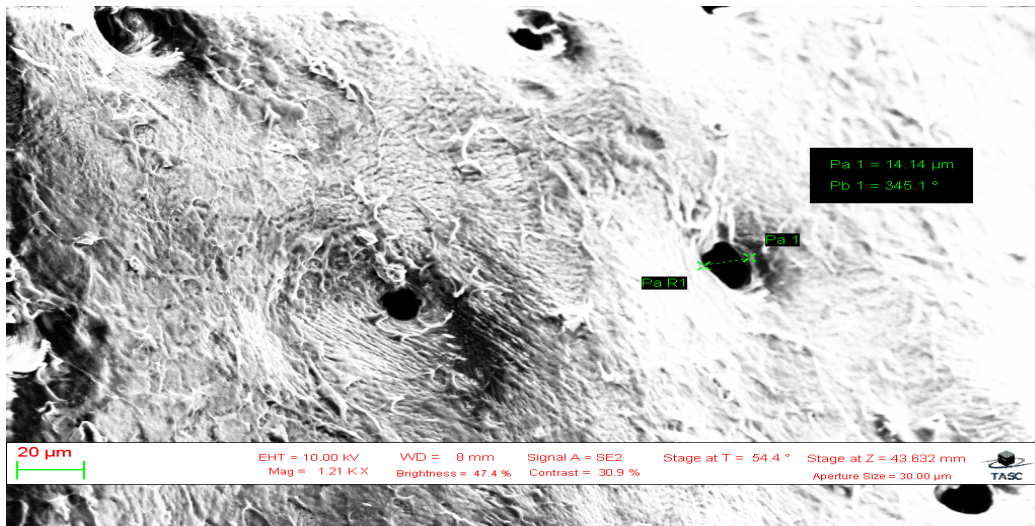
**Tabela 4.5** – Características das amostras do grupo 1 (osso cortical).

| <b>Amostra</b> | <b>Idade (meses)</b> | <b>Tempo de diabetes (meses)</b> | <b>Sexo</b> |
|----------------|----------------------|----------------------------------|-------------|
| 39             | 10                   | Controle                         | M           |
| 31             | 6                    | 3                                | M           |
| 32             | 7                    | 5                                | M           |
| 25             | 9                    | 5                                | F           |
| 24             | 9                    | 6                                | F           |
| 41             | 10                   | 7,5                              | M           |



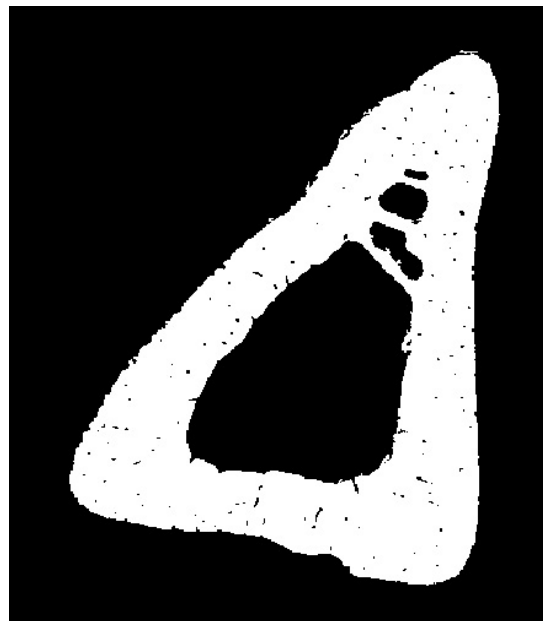
**Figura 4.7** – Radiografia da tíbia de um rato.

A figura 4.8 mostra a imagem do osso cortical, de uma das amostras analisadas, utilizando microscópio eletrônico de varredura (SEM - *Scanning Electron Microscopy*), no ELETTRA. A imagem mostra a presença de canais característicos do osso cortical (COOPER *et al.*, 2003).



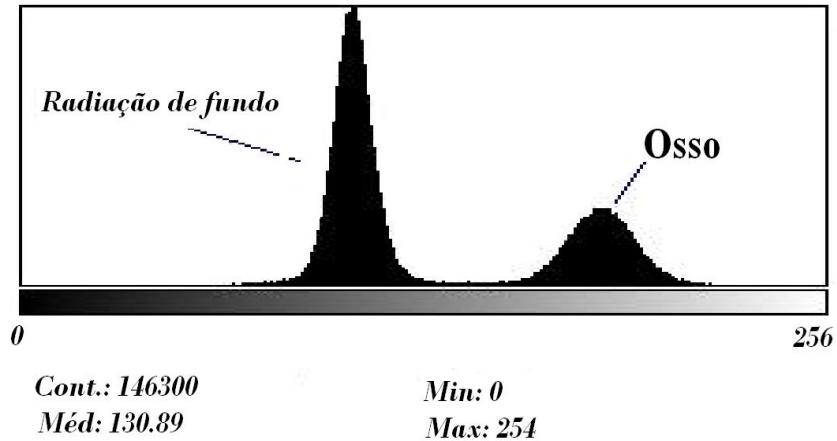
**Figura 4.8** – Imagem de uma área de osso cortical da amostra 24 visualizada no microscópio SEM do Elettra.

Todas as imagens foram obtidas durante a realização do projeto 2006159/SYRMEP “*Avaliação quantitativa da perda mineral óssea usando espalhamento coerente e microtomografia histomorfométrica 3D*”. Como exemplo, a figura 4.9 mostra uma fatia binarizada da amostra 24.



**Figura 4.9** – Uma fatia binarizada da amostra 24.

A figura 4.10 mostra o histograma da mesma fatia. O limiar escolhido foi igual a 130 em uma escala de zero a 255.



**Figura 4.10** – Histograma da fatia binarizada.

Com o objetivo de avaliar as possíveis variações estatísticas na estrutura das amostras, 3 sub-volumes, com dimensões iguais a 40 linhas x 60 colunas x 120 fatias, foram escolhidos para quantificação da amostra. Os valores calculados para os parâmetros histomorfométricos são resultados da média dos valores obtidos para os 3 sub-volumes. Como exemplo, a figura 4.11 mostra os sub-volumes escolhidos dentro do volume reconstruído da amostra 24.



**Figura 4.11** – Volume da amostra 24 com os 3 sub-volumes escolhidos delimitados pelas molduras vermelhas.

As tabelas 4.6 a 4.11 apresentam os valores médios encontrados para os parâmetros TV, BV, BS, BV/TV, BS/BV e conectividade para todas as amostras

analisadas. Os valores encontrados através do algoritmo *Conect* foram comparados com os valores encontrados usando o *DSc* e o *VG Studio*. Os valores marcados com asteriscos (\*) são obtidos da extrapolação de dados 2D pelo programa *DSc*.

**Tabela 4.6** – Resultados obtidos para a amostra 24.

| <b>Parâmetros<br/>Histomorfométricos</b>  | <b>Programa 1<br/>DSc</b> | <b>Programa 2<br/>VG Max</b> | <b>Programa 3<br/>Conect</b> |
|-------------------------------------------|---------------------------|------------------------------|------------------------------|
| TV                                        | 288000                    | 288000                       | 288000                       |
| BV                                        | Não disponível            | 224235                       | 224235                       |
| BS                                        | Não disponível            | Não disponível               | 53808                        |
| BV/TV (%)                                 | 77,1(*77,8)               | 77,9                         | 77,9                         |
| BS/BV (mm <sup>2</sup> /mm <sup>3</sup> ) | 0,082(*0,098)             | 0,115                        | 0,239                        |
| Conectividade                             | X                         | X                            | -202                         |
| nP                                        | X                         | X                            | 116                          |

**Tabela 4.7** – Resultados obtidos para a amostra 25.

| <b>Parâmetros<br/>Histomorfométricos</b>  | <b>Programa 1<br/>DSc</b> | <b>Programa 2<br/>VG Max</b> | <b>Programa 3<br/>Conect</b> |
|-------------------------------------------|---------------------------|------------------------------|------------------------------|
| TV                                        | 288000                    | 288000                       | 288000                       |
| BV                                        | Não disponível            | 233141                       | 233141                       |
| BS                                        | Não disponível            | Não disponível               | 65926                        |
| BV/TV (%)                                 | 79,9 (*81,0)              | 81,0                         | 81,0                         |
| BS/BV (mm <sup>2</sup> /mm <sup>3</sup> ) | 0,091(*0,203)             | 0,120                        | 0,283                        |
| Conectividade                             | X                         | X                            | -200                         |
| nP                                        | X                         | X                            | 231                          |

**Tabela 4.8** – Resultados obtidos para a amostra 31

| <b>Parâmetros<br/>Histomorfométricos</b>  | <b>Programa 1<br/>DSc</b> | <b>Programa 2<br/>VG Max</b> | <b>Programa 3<br/>Conect</b> |
|-------------------------------------------|---------------------------|------------------------------|------------------------------|
| TV                                        | 288000                    | 288000                       | 288000                       |
| BV                                        | Não disponível            | 259133                       | 259133                       |
| BS                                        | Não disponível            | Não disponível               | 46904                        |
| BV/TV (%)                                 | 88,1 (*90,0)              | 90,0                         | 90,0                         |
| BS/BV (mm <sup>2</sup> /mm <sup>3</sup> ) | 0,127(*0,127)             | 0,139                        | 0,181                        |
| Conectividade                             | X                         | X                            | -211                         |
| nP                                        | X                         | X                            | 234                          |

**Tabela 4.9** – Resultados obtidos para a amostra 32.

| <b>Parâmetros<br/>Histomorfométricos</b>     | <b>Programa 1<br/>DSc</b> | <b>Programa 2<br/>VG Max</b> | <b>Programa 3<br/>Conect</b> |
|----------------------------------------------|---------------------------|------------------------------|------------------------------|
| <b>TV</b>                                    | 288000                    | 288000                       | 288000                       |
| <b>BV</b>                                    | Não disponível            | 198762                       | 198762                       |
| <b>BS</b>                                    | Não disponível            | Não disponível               | 97176                        |
| <b>BV/TV (%)</b>                             | 67,6 (*69,0)              | 69,0                         | 69,0                         |
| <b>BS/BV (mm<sup>2</sup>/mm<sup>3</sup>)</b> | 0,101(*0,11)              | 0,128                        | 0,288                        |
| <b>Conectividade</b>                         | X                         | X                            | -156                         |
| <b>nP</b>                                    | X                         | X                            | 288                          |

**Tabela 4.10** – Resultados obtidos para a amostra 39 (controle).

| <b>Parâmetros<br/>Histomorfométricos</b>     | <b>Programa 1<br/>DSc</b> | <b>Programa 2<br/>VG Max</b> | <b>Programa 3<br/>Conect</b> |
|----------------------------------------------|---------------------------|------------------------------|------------------------------|
| <b>TV</b>                                    | 288000                    | 288000                       | 288000                       |
| <b>BV</b>                                    | Não disponível            | 181137                       | 181135                       |
| <b>BS</b>                                    | Não disponível            | Não disponível               | 95114                        |
| <b>BV/TV (%)</b>                             | 61,4(*62,9)               | 62,9                         | 62,9                         |
| <b>BS/BV (mm<sup>2</sup>/mm<sup>3</sup>)</b> | 0,103(*0,111)             | 0,136                        | 0,190                        |
| <b>Conectividade</b>                         | X                         | X                            | -185                         |
| <b>nP</b>                                    | X                         | X                            | 87                           |

**Tabela 4.11** – Resultados obtidos para a amostra 41.

| <b>Parâmetros<br/>Histomorfométricos</b>     | <b>Programa 1<br/>DSc</b> | <b>Programa 2<br/>VG Max</b> | <b>Programa 3<br/>Conect</b> |
|----------------------------------------------|---------------------------|------------------------------|------------------------------|
| <b>TV</b>                                    | 288000                    | 288000                       | 288000                       |
| <b>BV</b>                                    | Não disponível            | 205618                       | 205618                       |
| <b>BS</b>                                    | Não disponível            | Não disponível               | 92571                        |
| <b>BV/TV (%)</b>                             | 69,6(*71,4)               | 71,4                         | 71,4                         |
| <b>BS/BV (mm<sup>2</sup>/mm<sup>3</sup>)</b> | 0,114(*0,221)             | 0,136                        | 0,250                        |
| <b>Conectividade</b>                         | X                         | X                            | -161                         |
| <b>nP</b>                                    | X                         | X                            | 232                          |

Apesar da grande complexidade da estrutura do osso cortical, os resultados do parâmetro BV/TV foram iguais nos três algoritmos. Nesta análise, foram levadas em conta a extração de dados 2D do algoritmo *DSc*.

Os valores obtidos para o parâmetro BS/BV servem como um indicador da complexidade para se quantificar o osso cortical. Uma possível explicação para valores tão divergentes, deve-se ao fato que o algoritmo *Conect* considera qualquer *voxel* branco solto na imagem como uma nova superfície do volume, super estimando o valor do parâmetro BS/BV.

A conectividade de todas as amostras desse grupo foi negativa, indicando maior número de canais em relação ao número de poros para o osso cortical. O número de poros das amostras de osso cortical variaram de 87 à 288. A quantificação dos poros está levando em consideração canais que foram fechados por motivo de idade ou da doença presente nos ratos, uma vez que uma das conseqüências do diabetes é a osteoporose.

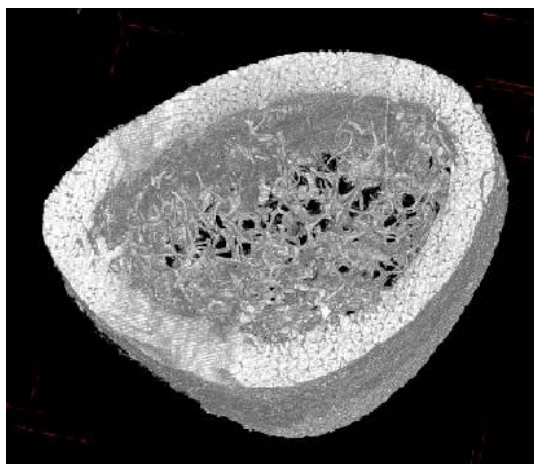
### 4.2.2.2 Segundo Grupo

As amostras de fêmur contaminadas com chumbo, flúor, flúor mais chumbo e de controle foram obtidas através de dois grupos de ratos sacrificados em dois momentos diferentes. O primeiro sacrifício foi realizado no desmame, ou seja, 21 dias após o nascimento dos animais. O segundo sacrifício foi realizado dois meses após o desmame, totalizando 81 dias após o nascimento. As características das amostras estão apresentadas na tabela 4.12.

**Tabela 4.12** – Característica das amostras do grupo 2 (osso cortical).

| <b>Contaminante</b> | <b>1º sacrifício</b> | <b>2º sacrifício</b> |
|---------------------|----------------------|----------------------|
| Controle            | C1                   | C2                   |
| Chumbo (Pb)         | Pb1                  | Pb2                  |
| Flúor (F)           | F1                   | F2                   |
| Pb + F              | PbF1                 | PbF2                 |

Todas as imagens foram obtidas com 1440 projeções a 21 keV durante a realização do projeto 2007834/SYRMEP “Dose-efeito de procedimentos de radioterápicos na estrutura óssea usando micro-CT”. Como exemplo, a figura 4.12 mostra o volume reconstruído da amostra C2.



**Figura 4.12** – Volume reconstruído da amostra C2.

A mesma metodologia utilizada para o primeiro grupo, para avaliar as possíveis variações estatísticas, foi aplicada. Três sub-volumes com dimensões 44 linhas x 71 colunas x 102 fatias foram escolhidos para quantificação, com limiar igual a 117. Os valores calculados para os parâmetros histomorfométricos são resultados da média dos valores obtidos para os 3 sub-volumes.

As tabelas 4.13 a 4.20 apresentam a comparação entre os valores encontrados para TV, BV, BS, BV/TV, BS/BV e conectividade usando o *Conect* e aqueles obtidos usando o *DSc* e o *VG Studio*, para todas as amostras analisadas. Os valores marcados com (\*) são obtidos da extrapolação de dados 2D pelo programa *DSc*.

**Tabela 4.13** – Resultados obtidos para a amostra C1.

| <b>Parâmetros<br/>Histomorfométricos</b>     | <b>Programa 1<br/>DSc</b> | <b>Programa 2<br/>VG Max</b> | <b>Programa 3<br/>Conect</b> |
|----------------------------------------------|---------------------------|------------------------------|------------------------------|
| <b>TV</b>                                    | 318648                    | 318648                       | 318648                       |
| <b>BV</b>                                    | Não disponível            | 102468                       | 102468                       |
| <b>BS</b>                                    | Não disponível            | Não disponível               | 93523                        |
| <b>BV/TV (%)</b>                             | 28,9 (*32,1)              | 32,1                         | 32,1                         |
| <b>BS/BV (mm<sup>2</sup>/mm<sup>3</sup>)</b> | 0,432 (*0,542)            | 0,333                        | 0,913                        |
| <b>Conectividade</b>                         | X                         | X                            | -94                          |
| <b>nP</b>                                    | X                         | X                            | 31                           |

**Tabela 4.14** – Resultados obtidos para a amostra C2.

| <b>Parâmetros<br/>Histomorfométricos</b>     | <b>Programa 1<br/>DSc</b> | <b>Programa 2<br/>VG Max</b> | <b>Programa 3<br/>Conect</b> |
|----------------------------------------------|---------------------------|------------------------------|------------------------------|
| <b>TV</b>                                    | 318648                    | 318648                       | 318648                       |
| <b>BV</b>                                    | Não disponível            | 278125                       | 278125                       |
| <b>BS</b>                                    | Não disponível            | Não disponível               | 87041                        |
| <b>BV/TV (%)</b>                             | 84,1 (*87,3)              | 87,3                         | 87,3                         |
| <b>BS/BV (mm<sup>2</sup>/mm<sup>3</sup>)</b> | 0,180 (*0,309)            | 0,174                        | 0,313                        |
| <b>Conectividade</b>                         | X                         | X                            | -32                          |
| <b>nP</b>                                    | X                         | X                            | 226                          |

**Tabela 4.15** – Resultados obtidos para a amostra Pb1.

| <b>Parâmetros<br/>Histomorfométricos</b>     | <b>Programa 1<br/>DSc</b> | <b>Programa 2<br/>VG Max</b> | <b>Programa 3<br/>Conect</b> |
|----------------------------------------------|---------------------------|------------------------------|------------------------------|
| <b>TV</b>                                    | 190564                    | 190564                       | 190564                       |
| <b>BV</b>                                    | Não disponível            | 61770                        | 61770                        |
| <b>BS</b>                                    | Não disponível            | Não disponível               | 52060                        |
| <b>BV/TV (%)</b>                             | 24,8 (*32,4)              | 32,4                         | 32,4                         |
| <b>BS/BV (mm<sup>2</sup>/mm<sup>3</sup>)</b> | 0,928 (*0,826)            | 0,707                        | 0,843                        |
| <b>Conectividade</b>                         | X                         | X                            | -164                         |
| <b>nP</b>                                    | X                         | X                            | 77                           |



**Tabela 4.16** – Resultados obtidos para a amostra Pb2.

| <b>Parâmetros<br/>Histomorfométricos</b>     | <b>Programa 1<br/>DSc</b> | <b>Programa 2<br/>VG Max</b> | <b>Programa 3<br/>Conect</b> |
|----------------------------------------------|---------------------------|------------------------------|------------------------------|
| <b>TV</b>                                    | 190564                    | 190564                       | 190564                       |
| <b>BV</b>                                    | Não disponível            | 172708                       | 172708                       |
| <b>BS</b>                                    | Não disponível            | Não disponível               | 31202                        |
| <b>BV/TV (%)</b>                             | 89,6 (*90,6)              | 90,6                         | 90,6                         |
| <b>BS/BV (mm<sup>2</sup>/mm<sup>3</sup>)</b> | 0,050 (*0,160)            | 0,075                        | 0,181                        |
| <b>Conectividade</b>                         | X                         | X                            | 120                          |
| <b>nP</b>                                    | X                         | X                            | 286                          |

**Tabela 4.17** – Resultados obtidos para a amostra F1.

| <b>Parâmetros<br/>Histomorfométricos</b>     | <b>Programa 1<br/>DSc</b> | <b>Programa 2<br/>VG Max</b> | <b>Programa 3<br/>Conect</b> |
|----------------------------------------------|---------------------------|------------------------------|------------------------------|
| <b>TV</b>                                    | 318648                    | 318648                       | 318648                       |
| <b>BV</b>                                    | Não disponível            | 90710                        | 90710                        |
| <b>BS</b>                                    | Não disponível            | Não disponível               | 82404                        |
| <b>BV/TV (%)</b>                             | 24,8 (*28,5)              | 28,5                         | 28,5                         |
| <b>BS/BV (mm<sup>2</sup>/mm<sup>3</sup>)</b> | 0,500 (*0,560)            | 0,372                        | 0,908                        |
| <b>Conectividade</b>                         | X                         | X                            | -127                         |
| <b>nP</b>                                    | X                         | X                            | 38                           |

**Tabela 4.18** – Resultados obtidos para a amostra F2.

| <b>Parâmetros<br/>Histomorfométricos</b>     | <b>Programa 1<br/>DSc</b> | <b>Programa 2<br/>VG Max</b> | <b>Programa 3<br/>Conect</b> |
|----------------------------------------------|---------------------------|------------------------------|------------------------------|
| <b>TV</b>                                    | 318648                    | 318648                       | 318648                       |
| <b>BV</b>                                    | Não disponível            | 256703                       | 256703                       |
| <b>BS</b>                                    | Não disponível            | Não disponível               | 114987                       |
| <b>BV/TV (%)</b>                             | 78,0 (*80,6)              | 80,6                         | 80,6                         |
| <b>BS/BV (mm<sup>2</sup>/mm<sup>3</sup>)</b> | 0,159 (*0,271)            | 0,156                        | 0,348                        |
| <b>Conectividade</b>                         | X                         | X                            | -20                          |
| <b>nP</b>                                    | X                         | X                            | 128                          |

**Tabela 4.19** – Resultados obtidos para a amostra PbF1.

| <b>Parâmetros<br/>Histomorfométricos</b>     | <b>Programa 1<br/>DSc</b> | <b>Programa 2<br/>VG Max</b> | <b>Programa 3<br/>Conect</b> |
|----------------------------------------------|---------------------------|------------------------------|------------------------------|
| <b>TV</b>                                    | 318648                    | 318648                       | 318648                       |
| <b>BV</b>                                    | Não disponível            | 69572                        | 69572                        |
| <b>BS</b>                                    | Não disponível            | Não disponível               | 64082                        |
| <b>BV/TV (%)</b>                             | 19,5 (*21,8)              | 21,8                         | 21,8                         |
| <b>BS/BV (mm<sup>2</sup>/mm<sup>3</sup>)</b> | 0,38 (*0,445)             | 0,310                        | 0,921                        |
| <b>Conectividade</b>                         | X                         | X                            | -27                          |
| <b>nP</b>                                    | X                         | X                            | 3                            |

**Tabela 4.20** – Resultados obtidos para a amostra PbF2.

| <b>Parâmetros<br/>Histomorfométricos</b>     | <b>Programa 1<br/>DSc</b> | <b>Programa 2<br/>VG Max</b> | <b>Programa 3<br/>Conect</b> |
|----------------------------------------------|---------------------------|------------------------------|------------------------------|
| <b>TV</b>                                    | 318648                    | 318648                       | 318648                       |
| <b>BV</b>                                    | Não disponível            | 261966                       | 261962                       |
| <b>BS</b>                                    | Não disponível            | Não disponível               | 104831                       |
| <b>BV/TV (%)</b>                             | 79,3 (*82,2)              | 82,2                         | 82,2                         |
| <b>BS/BV (mm<sup>2</sup>/mm<sup>3</sup>)</b> | 0,170 (*0,296)            | 0,170                        | 0,300                        |
| <b>Conectividade</b>                         | X                         | X                            | -19                          |
| <b>nP</b>                                    | X                         | X                            | 135                          |

Neste segundo grupo de amostras foi possível observar que a idade pode ser um fator diferencial da densidade óssea. Observando cada par de amostras do primeiro e do segundo sacrifício, verifica-se que o parâmetro BV/TV triplicou seu valor para as amostras do segundo sacrifício (maior tempo de vida). Os resultados do parâmetro BS/BV reforçam a idéia de como é difícil quantificar osso cortical.

Os resultados negativos da conectividade indicam uma estrutura com número de canais superior ao de poros. Vale ressaltar que grandes partes dos canais presentes no osso cortical apresentam dimensões abaixo dos 10µm, não sendo, portanto, visíveis nestas imagens geradas no laboratório Elettra. Outro ponto importante a ser analisado é que as amostras do segundo grupo, com maior tempo de vida, obtiveram valores de conectividade maior em relação às amostras do primeiro grupo. A esse comentário soma-se o número de poros. As amostras do segundo grupo obtiveram maior quantidade

de poros. Deve ser ressaltado que a amostra Pb2, obteve um valor da conectividade positivo e igual a 120 e, como consequência, maior quantidade de poros.

No capítulo 5 será apresentada a conclusão do trabalho desta tese.

## Capítulo 5

### 5.1 Conclusões

As imagens obtidas com microtomografias utilizando radiação síncrotron, em especial do laboratório Elettra, são o grande diferencial desta tese. As imagens apresentam maior definição e menos artefatos em relação às imagens obtidas por “microfocus”. As excelentes características de feixe monocromático, aliado à resolução da radiação síncrotron, permitiram uma melhor análise das mais complexas amostras. Entretanto, o osso cortical requer resolução espacial ainda maior do que a obtida na linha SYMERP. Uma maior resolução espacial permitiria a visualização dos canais Haversian e Volkmanns (COOPER *et al.*, 2003), presentes nos ossos corticais, além de um estudo mais apurado da sua formação em estruturas ainda menores.

O desenvolvimento do algoritmo *Conect* para obtenção dos parâmetros histomorfométricos 3D, foi realizado e validado através dos resultados satisfatórios obtidos na comparação com os resultados dos algoritmos *DSc* e *VG Studio*. Pode ser verificado que o parâmetro BS/BV apresentou flutuações estatísticas entre os três algoritmos, principalmente para amostras de osso cortical. Essas flutuações foram geradas a partir da complexidade estrutural desse tipo de amostra, e também dos diferentes métodos de cálculo de superfícies apresentado pelos três algoritmos.

A correlação encontrada entre o índice de conectividade e o parâmetro BS/BV ( $r=0,997$ ) serve como evidência da validade do cálculo do índice de conectividade como alternativa na análise estrutural dos objetos. O algoritmo *Conect* permite uma melhor análise do cálculo com o número de Euler, contribuindo para uma interpretação estrutural mais apurada, informando se um objeto é mais poroso ou se possui maior número de canais. O algoritmo traz uma evolução quanto ao cálculo da conectividade

propondo uma metodologia para identificação e separação dos poros na amostra. O processo de separação de poros visa fazer a quantificação da porosidade de um objeto, fornecendo o número de poros na amostra. Essa proposta abriu um leque de possibilidades de trabalhos futuros, desde a quantificação dos poros até a análise apurada dos canais presentes numa amostra.

## ***5.2 Trabalhos Futuros***

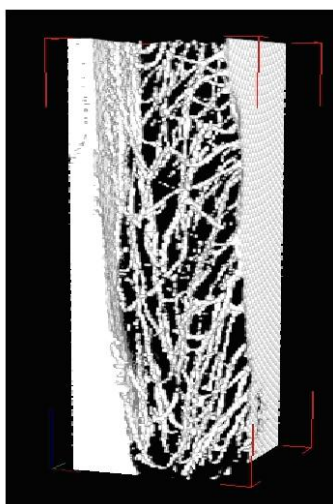
A primeira sugestão baseia-se na utilização da técnica de esqueletização da imagem de modo a obter outros parâmetros 3D que ainda hoje são obtidos bi dimensionalmente. Existem diversos processos de *esqueletização*. Afinamento é um dos processos e funciona com a redução de um objeto para uma versão simplificada que ainda retém as características essenciais do objeto original. A versão afinada da forma é chamada de *esqueleto* (GONZALES & WOODS, 1992).

Para calcular a largura de conexão (TbTh), usa-se equações de extrapolação 2D sobre os parâmetros BS e BV 3D. O ideal seria extrair TbTh diretamente do volume (TbTh 3D). Um caminho para isso é a esqueletização do objeto. O *esqueleto* do objeto é um grafo. Grafo tem nós e entre nós existem conexões. Superpondo *esqueleto* e objeto é possível ter a localização das conexões. Assim, sabendo-se quantas conexões existem e onde elas estão torna-se possível calcular a largura de cada uma delas. A média das larguras é o TbTh 3D.

Outro ponto é que até agora não se quantificou o comprimento das conexões. Com o grafo, tem-se a localização dos nós. A distância entre os nós é o comprimento da conexão. Isso pode ser outro parâmetro: comprimento médio das conexões (TbLe 3D). O espaçamento entre conexões (TbSp) pode ser calculado usando a esqueletização também. Com os nós do grafo, pode-se obter o ponto médio entre eles. Com o ponto médio de todas as conexões, pode-se medir a menor distância entre cada par de pontos médios. A média das menores distâncias entre conexões é TbSp 3D.

O esqueleto de um objeto também pode ser definido em termos da Transformação do Eixo Medial (*Medial Axis Transformation*) - MAT, também conhecida como *Symmetry Axis Transform* - SAT, proposta por BLUM em 1967, outro processo para obter um esqueleto pode ser determinado por *peeling* (LAM *et al.*, 1992), ou por um algoritmo de obtenção do esqueleto de regiões binárias, proposto por ZHANG & SUEN (1984), consistindo de erosão progressiva e seletiva do objeto.

Utilizando a erosão progressiva e a corrosão das extremidades de uma borda (ZHANG & SUEN, 1984) foram obtidos resultados preliminares com osso cortical da tibia de um rato (figura 5.1). Para visualização dos canais foi necessária a inversão da imagem.

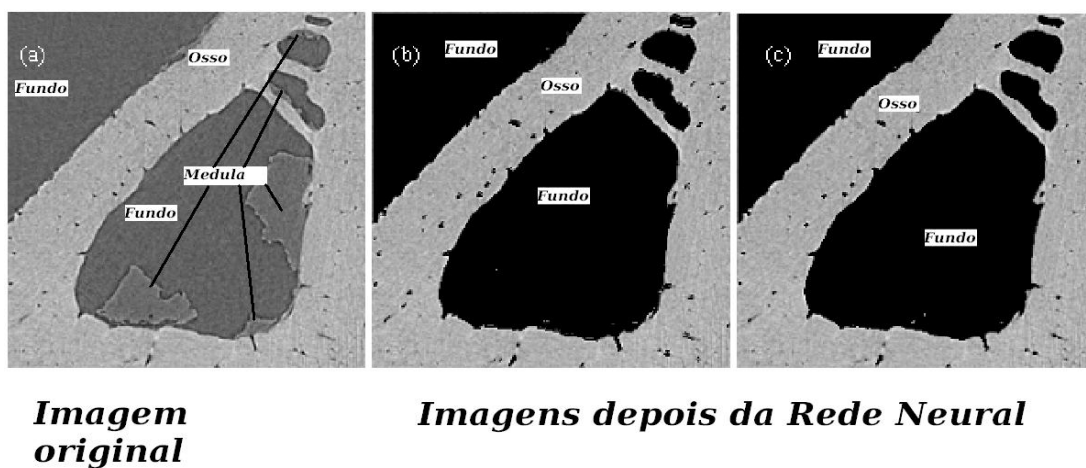


**Figura 5.1** – Exemplo do processo de esqueletização na imagem de um osso cortical onde é possível visualizar os canais.

Uma segunda proposta de trabalho futuro é a utilização de redes neurais a fim de eliminar sinais espúrios e manter o maior número de informações possível do objeto na imagem de modo a gerar resultados satisfatórios em uma quantificação. As imagens com apenas duas fases de tons de cinza e sem a presença de sinais espúrios apresentam resultados mais satisfatórios. Porém, em muitos casos as imagens possuem mais de duas fases e muitos sinais espúrios. Para solucionar o problema de diversas fases uma das soluções é a subtração de imagens. Com relação aos sinais espúrios, uma das soluções é a utilização de filtros morfológicos, erosão e dilatação. Estes filtros funcionam

basicamente removendo e acrescentando *pixels* na imagem binarizada. A erosão remove todos os *pixels* de uma imagem num raio previamente determinado. A dilatação acrescenta *pixels* na imagem. O problema de se utilizar um filtro morfológico está na perda de informação da imagem.

Alguns trabalhos já estão sendo desenvolvidos com a utilização de redes neurais e são apresentados nos anexos desta tese. A figura 5.2 mostra a imagem da tíbia de um rato (osso cortical) microtomografada na linha SYRMEP do Elettra e a mesma imagem depois de ser tratada com rede neural em duas diferentes metodologias de treinamento.



**Figura 5.2** – Imagem de uma fatia de tíbia de rato antes (a) e depois de ser tratada com rede neural em duas diferentes metodologias de treinamento (b e c).

Devido às características do feixe de raios X produzido por radiação síncrotron, as imagens apresentam efeitos de fase. Esse efeito produz uma maior ênfase nas bordas das amostras. Este fato pode ser positivo no auxílio a quantificação das bordas de uma imagem, mas pode também ser extremamente negativo, como vemos na figura 5.2 (a). Pode-se observar que as bordas da medula e o fundo da imagem possuem o mesmo nível de tons de cinza do osso, tornando-a um sinal espúrio na minha imagem. Num processo de quantificação, essa borda será incorporada aos valores de BV e BS superestimando os resultados. A proposta da rede neural é eliminar apenas a medula e suas bordas e nenhum outro ponto pertencente ao osso.

## Capítulo 6

### Referências

AARON, J.E., Makins, N.B., Sagreiya, K. “The Microanatomy of Trabecular Bone Loss In Normal Aging Men And Women”. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 215, 260–271, 1987.

ABRAMI, A., Arfelli, F., Barroso, R. C., *et al.* “Medical Applications of Synchrotron Radiation at the SYRMEP beamline of ELETTRA”. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research A*, v. 548, pp. 221-227, 2005.

ADRIEN, J., Maire, E., Gimenez, N., Sauvart-Moynot, V.. “Experimental Study of The Compression Behaviour of Syntatic Foams by in Situ X-ray Tomography”. *Acta Materialia* 55 1667-1679, 2007.

ALS-NIELSEN, J. and McMorrow, D. ”Elements of modern X-ray Physics”, *Ed. John Wiley & Sons, Ltd, England, 2001.*

ALTMAN, S. J., Peplinski, W. J., Rivers, M. L. “Evaluation of Synchrotron X-Ray Computerized Microtomography For The Visualization of Transport Process in Low-Porosity Materials”. *Journal of Contaminant Hydrology* 78:167-183, 2005.

ALVES, J. M., Oliveira, L. F., Lopes, R. T., Johnson, R. H., Ryaby, J. T., Kaufmann, J. “Microtomografia 3D por Rios-X para Caracterização de Osso Trabecular”, In: *Proceedings do XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica*, v.2, pp. 1141-1145, Florianópolis, SC, 2000.

APPOLONI, C. R., Fernandes, C. P., Rodrigues, C. R. O. “X-Ray Microtomography Study of a Sandstone Reservoir Rock”. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A* 580: 629-632, 2007.

ARFELLI, F. *et al.*, “Mammography with Synchrotron Radiation: Phase-Detection Techniques”. *Radiology* 215, 286-293, 2000.

ATTWOOD, D. “Soft X-Rays and Extreme Ultraviolet Radiation: Principles an Applications”. *Cambridge University Press, 2007*



AUZERAIS, F. M., Dunsmuir, J., Ferreol, B. B., Martys, N., Olson, J., Ramakrishnan, T. S., Rothman, D. H., Schwartz, L. M. “Transport In Sandstone: A Study Based On Three Dimensional Microtomography”. *Geophys. Res. Lett.* 23 (7), 705– 708 1996.

BADOSA, E. M., *et al.* “A Method for the Automatic Characterization of Bone Architecture in 3D Mice Microtomographic Images”, *Computerized Medical Imaging and Graphics* 27 447-458, 2003.

BAIS, G., Bruno, P. P. G., Di Fiore, V., Rapolla, A. “Characterization of Shallow Volcanoclastic Deposits by Turning Ray Seismic Tomography: an application to the Naples urban area”. *Journal of Applied Geophysics* 52: 11-21, 2003.

BARROSO, R.C. “Tomografia Computadorizada Seletiva Usando Efeitos de Interferência em Difração de Raios X”. *Tese de DSc.*, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, 1997.

BARUCHEL, J., Cloetens, P., Hartwig, J., Schlenker, M. “X-Ray Imaging With Hard Synchrotron Radiation”. *SNLS Lectures*, 2001.

BARUCHEL, J., Buffiere, J. Y., Cloetens, P., Di Michiel, M., Ferrie, E., Ludwig, W., Maire, E., Salvo, L.. “Advances in Synchrotron Radiation –Microtomography”. *Scripta Materialia* 55 41-46, 2006.

BEERS, Y. “The Role of The Larmor Radiation Formula in The Classical Theory of Electromagnetic Radiation”. *IEEE Antennas and Propagation Magazine*, vol. 41, No. 6, Dec. 1999.

BENTZ, D. P., Quenard, D. A., Kunzel, H. M., Baruchel, J., Peyrin, F., Martys, N. S., Garboczi, E. J. “Microstructure And Transport Properties Of Porous Building Materials: II. Three-Dimensional X-Ray Tomographic Studies”. *Mat. Struct.* 33 (227), 147– 153, 2000.

BLUM, H. “A transformation for extracting new descriptors of form. In *Models for the Perception of Speech and Visual Form*”. W. Whaten-Dunn (Ed.) MIT Press: Cambridge, MA, pp. 362–380 1967.

BONSE, U., Busch, F., Gunnewig, O., Beckmann, F., Pahl, R., Delling, G., Hahn, M., Graeff, W. “3D Computed X-ray Microtomography of Human Cancellous Bone at 8 Microns Spatial and  $10^{-4}$  Energy Resolution”. *Bone* 25: 25-38, 1994.

BONSE, U., Busch, F. “X-ray Computed Microtomography (microCT) Using Synchrotron Radiation (SR)”. *Prog. Biophysics Molecular Biology* 65: 133-169, 1996.

BORAH, B., Gross, G. J., Dufresne, T. E., Smith, T. S., Cockman, M. D., Chmielewski, P. A., Lundy, M. W., Hartke, J. R., Sod, E. W. “Three-dimensional Microimaging (MRmicrol and microCT), Finite Element Modeling, and Rapid Prototyping Provide Unique Insights Into Bone Architecture in Osteoporosis”. *The Anatomical Record (New Anat.)* 265: 101-110, 2001.

BOUSSON, V. *et al.* “Cortical Bone in the Human Femoral Neck: Three-Dimensional Appearance and Porosity Using Synchrotron Radiation” *Journal of Bone and Mineral Research* 19 794-801, 2004.

BRAVIN, A., Arfelli, F., Tromba, G. *et al.*, “SYRMEP Front-end and Read-out Electronics”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* vol. 409, Issues 1-3, 21 pages 351-353, 1998.

BRAVIN, A., Arfelli, F., Tromba, G. *et al.*, “At The Frontiers Of Digital Mammography, SYRMEP”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* vol. 409, Issues 1-3, 21 pages 529-533, 1998.

BRACEWELL, R. “The Fourier Transform and Its Applications”. (*Hardcover*) *Third Edition*, 1986.

BROOKES, M., Revell, W. J.. “Blood Supply of Bone: Scientific Aspects”. *London: Springer-Verlag*, 1998.

CANCEDDA, R., Cedola, A., Giuliani, A., Komlev, V., Lagomarsino, S., Mastrogiacomo, M., Peyrin, F., Rustichelli, F.. “Bulk and Interface Investigations of Scaffolds and Tissue Engineered Bones by X-ray Microtomography and X-ray Microdiffraction”. *Biomaterials* 28 2505-2524, 2007.

CACIUFFO, R., Melone, S., Rustichelli, F. and Boeuf, A. “Monochromators For X-Ray Synchrotron Radiation”, *Phys. Reports* **152**, pp. 1-71, 1987.

CHAPPARD, D., Legrand, E., Haettich, B., Chales, G., Auvinet, B., Eschard, J-P., Hamelin, J-P., Basle, M-F., Audran, M. “Fractal dimension of trabecular bone: comparison of three histomorphometric computed techniques for measuring the architectural two-dimensional complexity”. *Journal Pathol.* **195**: 515–521, 2001.

CHESNUT III., C.H., Rosen, C.J. “Reconsidering The Effects Of Antiresorptive Therapies In Reducing Osteoporotic Fracture”. *Journal of Bone and Mineral Research* 16, 2163–2172, 2001.

CIARELLI, M.J., Goldstein, S.A., Kuhn, J.L., *et al.* “Evaluation Of Orthogonal Mechanical Properties And Density Of Human Trabecular Bone From The Major Metaphyseal Regions With Materials Testing And Computed Tomography”. *Journal Orthop. Res.* 9, 674–682, 1991.

CLOETENS, P., Baruchel, J., Peyrin, F., *et al.* “Observation Of microstructure and Damage in Materials by Phase Sensitive Radiography and Tomography”. *Journal Applied Physics* vol. 81, No. 9, 1997.

COKER, D. A., Torquato, S. “Morphology And Physical Properties Of Fontainebleau Sandstone Via A Tomographic Analysis”. *Journal Geophys. Res.* 101 (B8), 17497–17506, 1996.

- COLES, M. E., Hazlett, R. D., Muegge, E. L., Jones, K. W., Andrews, B., Dowd, B., Siddons, P., Peskin, A., Spanne, P., Soll, W. “Developments In Synchrotron X-Ray Microtomography With Applications To Flow In Porous Media”. *SPE Reserv. Evalu. Eng.* 1 (4), 288– 296, 1998a.
- COLES, M. E., Hazlett, R. D., Spanne, P., Soll, W. E., Muegge, E. L., Jones, K. W. “Pore Level Imaging Of Fluid Transport Using Synchrotron X-Ray Microtomography”. *Journal Pet. Sci. Eng.* 19 (1–2), 55– 63, 1998b.
- COOPER, D. M. L., Turinsky, A. L., Sensen, C. W., Hallgrimsson, B. “Quantitative 3D Analysis of the Canal Network in Cortical Bone by Micro-Computed Tomography”, *The Anatomical Record*, (PART B: New Anat.) 274B:169-179, 2003.
- DALLE CARBONARE, L., Valenti, M. T., Bertolo, F., Zanatta, M., Zenari, S., Realdi, G., Lo Cascio, V., Giannini, S. “Bone Microarchitecture Evaluated by Histomorphometry”. *Micron* 36: 609-616, 2005.
- DAVID, C., Robion, P., Menéndez, B. “Anisotropy of Elastic, Magnetic and Microstructural Properties of the Callovo-Oxfordian Argillite”. *Physics and Chemistry of the Earth* 32:145-153, 2007.
- DAVIS, T. J., Gao, D., Gureyev, T. E. “Phase-Contrast Imaging of Weakly Absorbing Materials Using Hard X-Rays“ *Nature* 373 595-598, 1995.
- DeHOFF, R. T. “Quantitative Serial Sectioning Analysis: Preview”. *Journal Microsc* 131:259-263, 1983.
- DELLING, G. & Amling, M. “Biomechanical Stability Of The Skeleton – It Is Not Only Bone Mass, But Also Bone Structure That Counts”. *Nephrol.Dial. Transplant.* 10, 601–606, 1995.
- DILMANIAN, F. A. “Computed Tomography with Monochromatic X rays”. *Am Journal Physiol Imaging* 7: 175-193, 1992.
- Di MICHIEL, M., Tromba, G., Arfelli, F. “Low Dose Phase Contrast X-Ray Medical Imaging“ *Physiscs in Medicini and Biology* 43 2845-2852, 1998.
- ELIAS, H., Hyde, D. M. “A Guide to Pratical Stereology”. *Karger, Basel*, 1983.
- ESPESO, J. I., Cloetens, P., Baruchel, J. *et al.* “Conserving The Coherence and Uniformity Of Third-Generation Synchrotron Radiation Beams: The Case Of ID19, a ‘Long’ Beamline at The ESRF”. *Journal of Synchrotron Radiation* 5, 1243-1249, 1998.
- FALCONE, P. M., Baiano, A., Conte, A., Mancini, L., Tromba, G., Zanini, F., Del Nobile, M. A. “Imaging Techniques for the Study of Food Microstructure: A Review”. *Advances in Food and Nutrition Research* 51:205-263, 2006.
- FELDKAMP, L. A., Davis, L. C., Kress, J. W.. “Practical cone beam algorithm”, *Journal of Optical Society of America*, v. 1, n. 6, pp. 612-619, 1984.

FELDKAMP, L. A., Goldstein, S. A., Parfitt, A. M., Jasion, G., Kleerekoper, M. “The Direct Examination of Three-Dimensional Bone Architecture In Vitro by Computed Tomography”, *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 4, n. 1, pp. 3-11, 1989.

FOLLET, H. *et al.*, “Relationship Between Compressive Properties of Human os Calcis Cancellous Bone and Microarchitecture Assessed From 2D and 3D Synchrotron Microtomography”. *Bone* 36 340-351, 2005.

GOLDSTEIN, S.A. “The Mechanical Properties Of Trabecular Bone: Dependence On Anatomic Location And Function”. *Journal Biomechanical*. 11/12 1055–1061, 1987.

GOMBERG, B.R., Saha, P.K., Wehrli, F.W. “Three-dimensional Digital Topological Characterization of Cancellous Bone Architecture”. *International Journal of Imaging System and Technology* v.11 issue 1 81-90, 2000.

GONZALES, R. C., Woods, R. E. “Digital Image Processing”. *Addison-Wesley Publishing Company, INC.*, 1992.

GRODZINS, L.. “Optimum Energies for X-ray Transmission Tomography of Small Samples: applications of synchrotron radiation to computerized tomography I”. *Nuclear Instruments Methods* 206: 541-545, 1983.

GUNNEWIG, O. “3D-Mikrotomographische Strukturuntersuchung und –Darstellung Von Knochenbiopsien Mit Konventionellen Rontgenquellen und Synchrotronstrahlung”, *Tesis*, Germany, 1996.

HAHN, M., Vogel, M., Pompesius-Kempa, M., Delling, G. “Trabecular Bone Pattern Factor—A New Parameter For Simple Quantification Of Bone Microarchitecture”. *Bone* 13, 327–330, 1992.

HAZLETT, R. D. “Simulation Of Capillary-Dominated Displacements In Microtomographic Images Of Reservoir Rocks”. *Transp. Porous Media* 20 (1–2), 21–35, 1995.

HERMAN, G. T. “Image Reconstruction from Projections”, *Real-time Imaging*, v. 1, pp 3-18, 1995.

HERMAN, G. T., Gordon, R., Johnson, S. A. “Image reconstruction from projections”, *Scientific American*, v. 233, n. 4, pp 56-68, 1975

HOFFMANN, C. M. “Geometric and Solid Modeling: An Introduction”. *Morgan Kaufmann Publishers, Inc.* San Mateo, California 94403. 1989.

HUSEN, S., Smith, R. B., Waite, G. P. “Evidence for Gas and Magmatic Sources Beneath the Yellowstone Volcanic Field From Seismic Tomography Imaging”. *Journal of Volcanology and Geothermal Research* 131:397-410, 2004.

HWU, Y., Tsai, W. L., Lai, B., Je, J. H., Fecher, G. H., Bertolo, M. and Margaritondo, G. “Using Photoelectron Emission Microscopy With Hard X-Rays“. *Surface Science* vol. 480, issue 3,1 pages 188-195, 2001.

ISAAC, A., Sket, F., Reimers, W., Camin, B., Sauthoff, G., Pyzalla, A. R.. "In Situ 3D Quantification of The Evolution of Creep Cavity Size, Shape and Spatial Orientation Using Synchrotron X-Ray Tomography". *Materials Science and Engineering A* 478: 108-118, 2008.

ITO, M., Ejiri, S., Jinnai, H. Kono, J., Ikeda, S., Nishida, A., Uesugi, K., Yagi, N., Tanaka, M., Hayashi, K. "Bone Structure and Mineralization Demonstrated Using Synchrotron Radiation Computed Tomography (SR-CT) in Animal Models: preliminary findings". *Journal Bone Miner Metab* 21:287-293, 2003

JACKSON, J. D. "Classical Electrodynamics", Second Edition *John Wiley & Son, Inc*, New York, 1975.

JAHNE, B. "Digital Image Processing", 5<sup>th</sup> revised and extended edition, *Springer*, 2001.

JIANG, Y., Zhao, J., Genant, H. K.. "Macro and Microimaging of Bone Architecture". *Principles of Bone Biology*, 2<sup>nd</sup> ed. New York: *Academic Press*. P 1599-1623.

KABEL, J. *et al.*, "Connectivity and the Elastic Properties of Cancellous Bone". *Bone* vol. 24 No. 2 115-120, 1999.

KALENDER, W. A. "X-Ray Computed Tomography". *Physics in Medicine and Biology* 51:R29-R43, 2006.

KAK, A. C., Slaney, M. "Principles Of Computerized Tomographic Imaging". *New York: IEEE Press*, 1988.

KETCHAM, R. A.. "Three Dimensional Grain Fabric Measurements Using High Resolution X Ray Computed Tomography". *Journal of Structural Geology* 27: 1217-1228, 2005.

KETCHAM, R. A., Iturrino, G. J. "Nondestructive High-resolution Visualization and Measurement of Anisotropic Effective Porosity in Complex Lithologies Using High-resolution X-Ray Computed Tomography". *Journal of Hydrology* 302: 92-106, 2005.

KIM, Do-GYOON, *et al.*, "The Effect of Microcomputed Tomography Scanning and Reconstruction Voxel Size on the Accuracy of Stereological Measurements in Human Cancellous Bone". *Bone* 35 1375-1382, 2004.

KINNEY, J. H., Lane, N. E., Haupt, D. L. "In Vivo, Three-Dimensional Microscopy of Trabecular Bone", *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 10, n. 2, 264-270, 1995.

KINNEY, J. H., Haupt, D. L., Balooch, M., Ladd, A. J., Ryaby, J. T., Lane, N. E. "Three-Dimensional Morphometry Of The L6 Vertebra in The Ovariectomized Rat Model Of Osteoporosis: Biomechanical Implications". *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 15, 1981-1991, 2000.

KLEEREKOPER, M., Villanueva, A.R., Stanciu, J., Parfitt, A.M., "The Role of Three-dimensional Trabecular Microstructure in the Pathogenesis of Vertebral Compression Fractures" *Bone and Mineral Research Laboratory*, vol 37, No. 6, 594-597, 1985.

KNOTHE, T. M. L. "Whither Flows The Fluid in Bone?" An Osteocyte's Perspective. *Journal of Biomechanics* 36: 1409-1424, 2003.

LAM, L., Lee, S.W., Suen, C.Y. "Thinning methodologies: A comprehensive survey". *IEEE Trans PAMI* 14:869-885 1992.

LAUTERBORN, W., Kurz, T. "Coherent Optics: Fundamentals and Applications". *Second Edition Springer* 1995.

LEAHY, R., Byrne, C. "Editorial: Recent Development In Interactive Image Reconstruction For PET and SPECT", *IEEE Transaction on Medical Imaging*, v. 19, pp. 257-260, 2000.

LE, H.M., Holmes, R.E., Shors, E.C., Rosenstein, D.A. "Computerized Quantitative Analysis of the Interconnectivity of Porous Biomaterials". *Acta Stereologica* 11 (1), 267-272, 1992.

LEWIS, R. A. "Medical Phase Contrast X-Ray Imaging: Current Status and Future Prospects". *Physics Medicine and Biology* 49:3573-3583, 2004.

LOPES, R. T., De Souza, S. M. F. M., Oliveira, L. F., De Jesus, E. F. O. "Aplicação Da Tomografia Computadorizada 3D Com Raios X Microfoco No Exame De Peças Arqueológicas", In: *A Arqueologia no Novo Milênio, Sociedade de Arqueologia do Brasil*, pp. 68-69, RS, Brasil, 2001.

LOUIS, F. I., Clark, R. A., Loius, I. F., Makropoulos, C. C. "Nondestructive Imaging of Small Size Voids at Akrotiri Archaeological Site, Thera Island, Greece, by Seismic Inversion Techniques". *Journal of Applied Geophysics* 57:306-326, 2005.

LUIGGI, R. "Nuove Modalità per la Produzione di Immagini Digitali Con Luce di Sincrotrone Mediante Cristallo Analizzatore", *Tesis*, 1987.

MADI, K., Forest, S., Boussuge, M., Gailliègue, S., Lataste, E., Buffière, J. Y., Bernard, D., Jeulin, D. "Finite Element Simulations of The Deformation of Fused-Cast Refractories Based on X-Ray Computed Tomography". *Computational Materials Science* 39: 224-229, 2007.

MAJUMDAR, S., *et al.* "High-resolution Magnetic Resonance Imaging: Three-Dimensional Trabecular Bone Architecture and Biomechanical Properties". *Bone* 22, 445-454, 1998.

MARGARITONDO, GIORGIO. "Introduction to Synchrotron Radiation". University of Wisconsin – Madison, NY, Oxford – *Oxford University Press*, 1988.

MARGARITONDO, GIORGIO. "*Journal of Alloys and Compounds*". **328** (1-2), 35-41, 2001.

MARMOTTANT, A., Salvo, L., Martin, C. L., Mortensen, A.. “Coordination Measurements in Compacted NaCl Irregular Powders Using X-Ray Microtomography”. *Journal of the European Ceramic Society* 28: 2441-2449, 2008.

MATSUMOTO, T., *et al.* “Monochromatic Synchrotron Radiation  $\mu$ CT Reveals Disease-Mediated Canal Network Rarefaction in Cortical Bone of Growing Rat Tibiae”. *Journal Applied Physiology* 100: 274-280, 2006.

McCALDEN, R. W., McGeough, J. A., Barker, M. B., Court-Brown, C. M.. “Age-related Changes in The Tensile Properties of Cortical Bone. The Relative Importance of Changes in Porosity, Mineralization, and Microstructure”. *Journal Bone Joint Surgery Am* 8: 1193-1205, 1993.

MORTON, E. J., Webb, S., Bateman, J. E., Clarke, L. J., Shelton, C. G. “Three-Dimensional X Ray Microtomography for Medical and Biological Applications”. *Physics in Medicine and Biology*, v. 35, pp. 805-820, 1990.

MOSEKILDE, L. “Age-related Changes in Vertebral Trabecular Bone Architecture-assessed by a new method”. *Bone* 9 (4) 247-50, 1988.

MOSEKILDE, L. “Sex Differences in Age-Related Loss of Vertebral Trabecular Bone Mass and Structure-Biomechanical Consequences”. *Bone* 10 (6) 425-32, 1989.

MOSEKILDE, L. “Vertebral Structure and Strength in Vivo and in Vitro”. *Calcified Tissue International* 53 121-126, 1993.

MULLER, R., Ruegsegger, P. “Micro-tomographic Imaging for the Non-destructive Evaluation of Trabecular Bone Architecture”. *Study Health Technology Inform* 40: 61-79, 1997.

NEVES, S. G., “Classificação e Identificação de Impressões Digitais”. *Tese de Mestrado*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1996.

NUZZO, S., Peyrin, F., Bardosa, M. E., Proust, L. M. H., Boivin, G. “Assessment Of Bone Mineral Content From 3D Synchrotron Radiation Microtomography Images”. *IEEE Transaction on Nuclear Science*, v. 48, n. 3, pp. 859-863, 2001.

NUZZO, S., Peyrin, F., Cloetens, P., Baruchel, J., Boivin, G.. “Quantification of The Degree of Mineralization of Bone in Three Dimensions Using Synchrotron Radiation Microtomography”. *Medical Physics* 29: 2672-2681, 2002.

NUZZO, S., Lafage-Proust, M. H., Martin Bardosa, G., Thomas, T., Alexandre, C., Peyrin, F. “Synchrotron Radiation Microtomography Allows the Analysis of Three-dimensional Microarchitecture and Degree of Mineralization of Human Iliac Crest Biopsy Specimens: effects of etidronate treatment”. *Journal of Bone and Mineral Research* 17: 1372-1382, 2002.

ODGAARD, A., Gundersen, H. J. “Quantification of Connectivity In Cancellous Bone, With Special Emphasis On 3-D Reconstructions”. *Bone* 14 (2): 173-182, 1993.

- ODGAARD, A. “Three-Dimensional Methods for Quantification of Cancellous Bone Architecture”. *Bone* **20** (6): 315-328, 1997.
- OLIVEIRA, L. F., *et al.*, “3D X-ray Tomography to Evaluate Volumetric Objects”. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research A* 505 – 573-576, 2003
- OLIVEIRA, L. F., *et al.*, “3D Histomorphometric Quantification From 3D Computed Tomography”. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research A*. 525 - 406-411, 2004.
- OLSON, J. F., Rothman, D. H. “Two-Fluid Flow In Sedimentary Rock: Simulation, Transport And Complexity”. *Journal Fluid Mech.* 341, 343– 370, 1997.
- PARFITT, A. M. “The Stereologic Basis Of Bone Histomorphometry. Theory Of Quantitative Microscopy and Reconstruction Of The Third Dimension”. *In: Recker R (ed) Bone Histomorphometry, Techniques and Interpretations. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 53-87, 1983.*
- PARFITT, A. M., Drezner, M. K., Glorieux, F. H., Kanis, J. A., Malluche, H., Meunier, P. J., Ott, S. M., Recker, R.R. “Bone Histomorphometry: Standardization Of Nomenclature, Symbols And Units”. *Journal of Bone and Mineral Research* **2** (6): 595-610, 1987.
- PEYRIN, F., Salome, M., Cloetens, P., Laval-Jeantet, A. M., Ritman E., Ruegsegger, P. “Micro-CT Examinations of Trabecular Bone Samples at Different Resolutions: 14, 7 and 2 micron level”. *Technology Health Care* 6:391-401, 1998.
- PEYRIN, F., Salome, M., Nuzzo, S., Cloetens, P., Laval-Jeantet, A. M., Baruchel, J.. “Perspectives in Three-dimensional Analysis of Bone Samples Using Synchrotron Radiation Microtomography”. *Cellular Molecular Biology (Noisy-legrand)* 46: 1089-1102, 2000.
- POLACCI, M., Baker, D. R., Mancini. L., Tromba, G., Zanini, F. “Three-Dimensional Investigation of Volcanic Textures by X-Ray Microtomography and Implications for Conduit Processes”. *Geophysical Research Letters*, v.33, pp. L13312, 2006.
- PRATT, W. K. “Digital Image Processing” *Third Edition John Wiley & Sons, Inc.*, 2001
- RIGON, L. “Nuove Modalità per la Produzione di Immagini Digitali con Luce di Sincrotrone Mediante Cristallo Analizzatore”, *Tesis*, 1997.
- RIGON, L., Zhong, Z., Arfelli, F., Menk, R. H. and Pillon, A. “Diffraction Enhanced Imaging Utilizing Different Crystal Reflections at ELETTRA and NSLS”, *Proc. SPIE*, vol.4682, p. 255, 2002
- ROBLING, A. G., Stout, S. D.. “Morphology of The Drifting Osteon”. *Cells Tissues Organs* 164: 192-204, 1999.



- ROSENFELD, A., Kak, A: C. “Digital Picture Processing”. New York, *Academic Press*, 1982.
- RUSS, J. C., Dehoff, R. T.. “Practical Stereology”. *Second Edition, Published by Plenum Press*, New York, NY (ISBN 0-306-46476-4), 1999.
- SALOME, M., Peyrin, F., Cloetens, P., Odet, C., Laval-Jeantet, A. M., Baruchel, J., Spanne, P. “A Using Synchrotron Radiation Microtomography System for the Analysis of Trabecular Bone Samples”. *Medical Physics* 26: 2194-2204, 1999.
- SALTYKOV, S. A. “Stereometric Metallography”. *Second Ed., Moscow Metallurgizdat*, 1958.
- SAMOUELIAN, A., Vogel, H. –J., Ippisch, O. “Upscaling Hydraulic Conductivity Based on the Topology of the sub-scale Structure“. *Advances in Water Resources* 30 1179-1189, 2007.
- SCHENA, G., Fravetto, S., Santoro, L., Pasini, A., Bettuzzi, M., Casali, F., Mancini, L. “Detecting Microdiamonds in Kimberlite Drill-hole Cores by Computed Tomography”. *Int. Journal Miner. Process.* 75:173-188, 2005.
- SCHWARTZ, L. M., Auzeais, F., Dunsmoir, J., Martys, N., Bentz, D. P., Torquato, S. “Transport And Diffusion In Three-Dimensional Composite Media”. *Physica, A* 207, 28– 36, 1994.
- SEGER, M. M. “Three-Dimensional Reconstruction Form Cone-Beam Data Using An Efficient Fourier Technique Combined With A Special Interpolation Filter”, *Physics in Medicine and Biology*, v.43, pp. 951-959, 1998.
- SIMAAN, A.; Fontaine, J. “A Imagem do Mundo dos Babilônios a Newton”. *Companhia das Letras*, 2003.
- SIETSEMA, W. K. “Animal Models of Cortical Porosity”. *Bone* 4: 297S-305S, 1995.
- SMITH, B D. “Image Reconstruction from Cone-beam Projection: Necessary and Sufficient Conditions and Reconstruction Methods”, *IEEE Transaction on Medical Imaging*, v. 4, pp. 14-28, 1985.
- SONE, T., Tamada, T., Jo, Y., Miyoshi, H., Fukunaga, M.. “Analisys of Three-dimensional Microarchitecture and Degree of Mineralization in Boné Metástase From Protaste Câncer Using Synchrotron Microcomputed Tomography. *Bone* 35: 432-438, 2004.
- SONG, S. R., Jones, K. W., Lindquist, W. B., Dowd, B. A., Sahagian, D. L. “Synchrotron X-Ray Computed Microtomography: Studies On Vesiculated Basaltic Rocks”. *Bull. Volcanol.* 63 (4), 252–263, 2001.
- SPANNE, P., Thovert, J. F., Jacquin, C. J., Lindquist, W. B., Jones, K. W., Adler, P. M. “Synchrotron Computed Microtomography Of Porous Media: Topology And Transports”. *Phys. Rev. Lett.* 73 (14), 2001–2004, 1994.

STOUT, S. D., Brundsen, B. S., Hildebolt, C. F., Commean, P. K., Smith, K. E., Tappen, N. C.. "Computer-assisted 3D Reconstruction of Serial Sections of Cortical Bone to Determine the 3D Structure of Osteons". *Calcified Tissue International* 65: 280-284, 1999.

STRUCTURAL parameters measured by the Skyscan™ CT-analyser software, (<http://www.skyscan.be/home.htm>) 2004.

TAM, K. C. "Three-dimensional Computerized Tomography Scanning Method and System for Large Objects with Smaller Area Detector". *US Patent* 5 390 112, 1995.

TESEI, L., Casseler, F., Dreossi, D., Mancini, L., Tromba, G., Zanini, F. "Contrast-enhanced X-Ray Microtomography of the Bone Structure Adjacent to Oral Implants". *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A* 548:257-263, 2005.

THOMSEN, J.S., *et al.* "Stereological Measures of Trabecular Bone Structure: Comparison of 3D Micro Computed Tomography with 2D Histological Sections in Human Proximal Tibial Bone Biopsies". *Journal of Microscopy* v. 218 171-179, 2005.

THOMLINSON, W. C. "Medical Applications Of Synchrotron Radiation At The National Synchrotron Light Source" in *Synchrotron Radiation in Biosciences*, Oxford Science Publications, 1994.

TUY, H K, "An Inversion Formula for Cone-beam Reconstruction", *SIAM Journal of Applied Mathematics*, v. 43, pp. 546-552, 1983.

TZAPHLIDOU, M., Speller, R., Royle, G., Griffiths, J., Olivo, A., Pani, S., Longo, R. "High Resolution Ca/P Maps of Bone Architecture in 3D Synchrotron Radiation Microtomographic Images". *Applied Radiation and Isotopes*, v. 62, pp. 569-575, 2005.

UNDERWOOD, E. E. "Quantitative Stereology". *Addison-Wesley, Reading, MA*, 1970.

Van DALEN, G., Blonk, H., Van Aalst, H., Hendriks, C. L.. "3-D Imaging of Foods Using X-Ray Microtomography". *G.I.T. Imaging & Microscopy* pp 18-21, 03/2003.

VESTERBY, A., Gundersen, H.J.G., Melsen, F. "Star Volume Of Marrow Space And Trabeculae of the First Lumbar Vertebra: Sampling Efficiency And Biological Variation". *Bone* 10 7-13, 1989.

VG Studio MAX 1.2.1. Analysis and Visualization of Voxel Data. Manual of Users ([www.volumegraphics.com](http://www.volumegraphics.com)), 2004.

VOGEL, H., -J., ROTH, K."Quantitative Morphology and Network Representation of Soil Pore Structure". *Advances in Water Resources* 24 233-242, 2001.

XIAO, Q. & Raafat, H., "Combining Statical and Structural Information for Fingerprint Image Processing, Classification and Identification" *Pattern Recognition*, 335-354, 1991.

- ZACHARIASEN, W. H. "Theory of X-ray Diffraction in Crystals". *New York: Dover*, p. 141, 1945.
- ZHANG, T. Y. & Suen, C. Y., "A Fast Parallel Algorithm for Thinning" *Digital Patterns*, 1984.
- ZHAO, S., Wang, G.. "Feldkamp-type cone-beam tomography in the wavelet framework", *IEEE Transaction on Medical Imaging*, v. 19, pp. 922-929, 2000.
- ZHONG, Z., Thomlinson, W., Chapman, D. and Sayers, D. "Implementation Of Diffraction-Enhanced Imaging Experiments: at the NSLS and APS" *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A* **450** 556, 2000.
- WAKAMATSU, E., Sisson, H.A. "The cancellous bone of the iliac crest". *Calcified Tissue Research* 4, 147-161, 1969.
- WARREN, B. E. "X-Ray Diffraction", *Addison-Wesley, Reading, MA* 1969.
- WEINSTEIN, R.S., Majumdar, S. "Fractal Geometry And Vertebral Compression Fractures". *Journal of Bone and Mineral Research* 9, 1797-1802, 1994.
- WEISS, P., *et al.* "Synchrotron X-ray Microtomography (on a micron scale) Provides Three-dimensional Imaging Representation of Bone Ingrowth in Calcium Phosphate Biomaterials". *Biomaterials* 24 4591-4601, 2003.
- WHITEHOUSE, W.J. "The Quantitative Morphology Of Anisotropic Trabecular Bone". *Journal of Microscopy* 101, 153-168, 1974.
- WILDENSCHILD, D., Hopmans, J., Vaz, C., Rivers, M., Rikard, D., Christensen, B. "Using X-Ray Computed Tomography In Hydrology: Systems, Resolutions, And Limitations". *Journal Hydrol.* 267 (3-4), 285- 297, 2002.
- WILKINS, S. W., Gureyev, T. E., Gao, D., Pogany, A. and Stevenson, A.W. "Phase-Contrast Imaging Using Polychromatic Hard X-Rays" *Nature* **384** 335-8 1996
- WINICK, H. e Doniach, S. "An Overview of Synchrotron Radiation Research," *in Synchrotron Radiation Research*, New York and London, Plenum Press, pp. 1-10, 1980.
- WIKIPEDIA. [http://pt.wikipedia.org/wiki/Tomografia\\_computadorizada](http://pt.wikipedia.org/wiki/Tomografia_computadorizada) . 2008.

**Nuclear Science Symposium, Medical Imaging Conference and 16<sup>th</sup> Room  
Temperature Semiconductor Detector Workshop - 19 - 25 October 2008 Dresden,  
Germany - <http://www.nss-mic.org/2008/NSSMain.asp>**

HISTOMORPHOMETRIC ANALISYS OF COMPLEX STRUCTURES USING  
SYNCHROTRON RADIATION COMPUTER MICROTOMOGRAPHY (SR- $\mu$ CT)

**C.Pinheiro<sup>1,2</sup>; R.Barroso<sup>2</sup>; L.Oliveira<sup>2</sup>; G.Tromba<sup>3</sup>; D.Dreossi<sup>3</sup>; J.Correia<sup>1</sup>,  
D.Brazl**

<sup>1</sup>Nuclear Instrumentation Laboratory – COPPE – Federal University of Rio de Janeiro, Brazil

<sup>2</sup>Physics Department - State University of Rio de Janeiro, Brazil

<sup>3</sup>Sincrotrone Elettra – Beamline SYRMEP – Trieste, Italy.

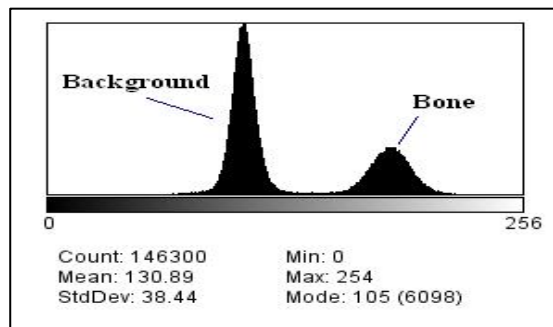
## **SUMMARY**

The second generation of synchrotron radiation sources offer a much higher brilliance compared to X-ray tubes, such that the investigation of samples at the micro and even sub micrometer level becomes feasible. The monochromaticity avoids beam hardening and therefore turns a reconstructed tomogram in a quantitative mapping of X-ray attenuations.  $\mu$ CT is one of the most advanced techniques in the field of non-destructive evaluation tests. The X-rays produced by the source hit on the sample and travelling through structures with different density are differently absorbed and the emerging radiation is then collected on the detector plane located on the other side of the sample. The histomorphometric analysis have been used to evaluate different complex structures which have inner connected structures. Actually the histomorphometric analysis have been studied to quantify the cortical bone or vascular canal network structure [1,2]. The 3D histomorphometry corresponds to an evolution of conventional method that is based on 2D analysis [3,4]. Four cortical tibia samples of rats had been used to evaluate the histomorphometric quantification. All the samples were cut in the same point, in the diaphysial region, about 1cm below growth line. In the figure 1 it is possible to see exactly point in tibia bone.



*Figure 1 – Diaphysial region at the rat tibia, about 1 cm below the growth line.*

The experiment was performed in the setup to microtomography on SYRMEP (SYnchrotron Radiation for MEDical Physics) beamline at the Elettra Synchrotron in Trieste, Italy. After to microtomography each sample, it was made the processing of the image using TOMO\_SYRMEP\_PROJECT, written in IDL language, to reconstruct one slice of image, with less artifacts so as possible, and the volume. The next step was using one program to separate cortical bone from other structure in the bone choosing one threshold using the histogram of volume. The figure 2 shows the histogram of bone image with 8-bit.



*Figure 2 – Histogram of bone image, each slice was quantified using 256 image gray levels.*

After choose the threshold bone image was binarized in 0 (black) and 255 (white). This process was necessary to certify that only bone was processed like 255 (white) in the reconstructed volume and this way no mask the results in histomorphometric analysis. The algorithm counts white voxels in the reconstructed image (3D volume), in horizontal, vertical, diagonal and perpendicular directions. Noting always their connections with a slice above and below in order of the volume reconstructed. In the figure 3 it is possible to see one slice of the image after binarization. To calculate the BV/TV was first fixed one valor to parameter TV, it was obtained making calculating the product of width, height and number of images.



*Figure 3 – Slice of binary image ready to histomorphometric analysis.*

As a first goal, the program to calculate 3D histomorphometric parameters has been able to quantify and characterize the cortical bone. Preliminary result was obtained to

BV/TV and BS/BV parameters. Actually other parameters have been tested in the program to analyzer connectivity.

#### **REFERENCES**

- [1] Cooper, D.L, et al., The Anatomical Record (Part B: Neew Anat.) 274B: 169-179. 2003.
- [2] Badosa, E.M.,et al, Radiology 229:921-928. 2003.
- [3] Oliveira, L.F.,et al, Nucl. Instrum. Methods A. 525 (2004) 406-411.
- [4] Feldkamp, L.A., et al, Journal Bone and Miner. Res., vol 4 N 1 (1989) 3.

**Nuclear Science Symposium, Medical Imaging Conference and 16<sup>th</sup> Room  
Temperature Semiconductor Detector Workshop - 19 - 25 October 2008 Dresden,  
Germany - <http://www.nss-mic.org/2008/NSSMain.asp>**

ARTIFICIAL NEURAL NETWORKS APPLIED TO BONE RECOGNITION FOR  
HISTOMORPHOMETRIC ANALYSIS OF X-RAY COMPUTER  
MICROTOMOGRAPHY IMAGING

**Christiano J. G. Pinheiro<sup>1,2</sup>; Delson Braz<sup>1</sup>; Anderson A. M. Meneses<sup>2</sup>; Roberto Schirru<sup>2</sup>; Regina C. Barroso<sup>3</sup>; Luis F. Oliveira<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Nuclear Instrumentation Laboratory – COPPE – Federal University of Rio de Janeiro, Brazil

<sup>2</sup>Processes Monitoring Laboratory – COPPE – Federal University of Rio de Janeiro, Brazil

<sup>3</sup>Physics Department – State University of Rio de Janeiro, Brazil

**SUMMARY**

X-ray Computer Tomography has allowed recent advances on medical imaging in biological tissue [1]. The measurements and calculations of bone mass and histomorphometric analysis for cancer and osteoporosis patients may be performed with the non-invasive and non-destructive Computer Tomography, while traditional techniques may need biopsies and other techniques that demand time and complex procedures. The image processing of X-ray Computer Microtomography comprises the usage of filters and binarization for subtract background and marrow pixels, which causes loss of information. In this paper we describe the usage of Artificial Neural Networks (ANNs) [3, 4] in order to recognize bone mass in images without treatment, subtracting background and marrow without loss of information caused by the image manipulation, part of a research on histomorphometry analysis. Figure 1a depicts the image of a rat tibia used in the computational experimentations. It was obtained by X-Ray Computer Tomography at the Synchrotron Radiation for Medical Physics (SYRMEP) beamline of the ELETTRA Laboratory at Trieste, Italy, using the Phase Contrast technique.

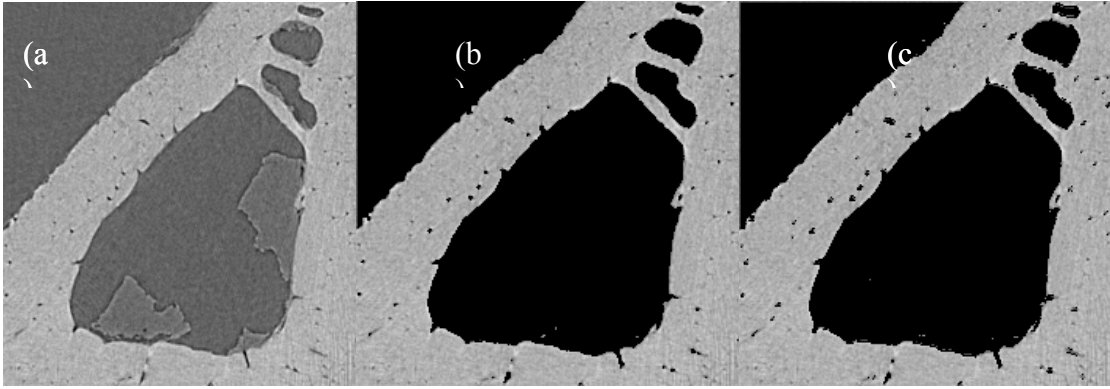


Figure 1 – (a) Rat tibia obtained by X-Ray microtomography with phase contrast technique: light grayscale shades correspond to bone, dark grayscale shades to background and intermediate grayscale shades to marrow. (b) Image obtained by an ANN with Gradient Descent with Momentum training algorithm. (c) Image obtained by an ANN with Gradient Descent with variable learning rate training algorithm.

We have performed the bone classification with a Multilayer Perceptron (MLP) ANN with error back-propagation [2], supervised learning with Gradient Descent (GD) and Gradient Descent with Momentum (GDM) training algorithms. The ANN had one hidden layer with five neurons and the output layer had three neurons. We have used 27 training patterns each of them with 3x3 pixels subimages. In order to verify the accuracy of the results in preliminary tests, we have used as a metric the area under the Receiver Operating Characteristic (ROC) [4] Curve. The areas under ROC curve for these tests are in table 1.

| <b>Training Type</b>                          | <b>AUC - Bone</b> | <b>AUC -<br/>Background</b> | <b>AUC - Marrow</b> |
|-----------------------------------------------|-------------------|-----------------------------|---------------------|
| <b>Gradient<br/>Descent</b>                   | 1.000             | 0.993                       | 0.795               |
| <b>Gradient<br/>Descent with<br/>Momentum</b> | 1.000             | 0.944                       | 0.961               |

**Table 1. Area under the ROC Curve for Gradient Descent and Gradient Descent with Momentum trainings.**

These results allowed us to infer that the quality of the recognition is correlated to the training type. Thus for obtaining images subtracting background and marrow, we have used ANNs trained with the GDM and the GD with a variable learning rate (GDVLR) algorithms. The obtained images are depicted in figures 1b and 1c. In general, the images obtained by the ANN trained with GDVLR algorithm presented more fidelity to the original image.

The training algorithms and the ANN architecture used in the research yielded preliminary results that demonstrate the viability of using ANNs for histomorphometric analysis. The quality and characteristics of the synchrotron radiation X-ray Computer Microtomography are compatible with the ANN-based proposed methodology of recognizing bone subimages. The image analysis with ANN has prevented the loss of information due to image operations such as filtering or binarization and has demonstrated an outstanding performance for bone subimages recognition. Other



computational experiments with different learning algorithms and other ANN architectures will be performed before the final submission date.

#### **REFERENCES**

- [1] G.N. Hounsfield. "Computerized transverse axial scanning (tomography)". Br. J. Radiol. 46 (1973) 1016-1022.
- [2] D. E. Rumelhart, G.E. Hinton, R. J. Williams. "Learning representations by back-propagating errors," Nature 323 (1986).
- [3] M. Egmont-Petersen, D. de Ridder, H. Handels. "Image processing with neural networks - a review". Pattern Recognition 35 (2002) 2279-2301.
- [4] M. Egmont-Petersen, D. de Ridder, H. Handels. "Recognition of radiopaque markers in X-ray images using a neural network as a nonlinear filter". Pattern Recognition Letters 20 (1999) 521-533.

**7<sup>th</sup> International Topical Meeting on Industrial Radiation and Radioisotope  
Measurement Application  
Prague, Czech Republic, 22-27 June 2008 - IRRMA 7 Abstract**

**Microtomography for 3D Histomorphometric Quantification of Fragmented  
Object**

C.J.G.Pinheiro<sup>1</sup>, D.Braz<sup>1</sup>, R.C.Barroso<sup>2</sup>, L.F.Oliveira<sup>2</sup>, G.Tromba<sup>3</sup>, D.Dreossi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>UFRJ (COPPE/PEN), <sup>2</sup>Universidade Estadual do Rio de Janeiro, <sup>3</sup>Sincrotrone Elettra

The aim is quantify fragmented object (cortical bone) using a new 3D histomorphometric algorithm based on stereologic concepts. Histomorphometry was originally applied to biologic samples and has been used to quantify complex structures. The BV/TV and BS/TV parameters form the base of the histomorphometric analysis. The first parameter is sample volume to total volume (BV/TV). The second parameter is defined surface to volume of the sample (BS/BV) allows understand how many the sample is more fragmented than other sample.

X-ray micro tomography is a non-destructive technique which provides 3D information of materials. The basis of this technique is X-ray radiography, when an X-ray beam is sent on a sample. After this the transmitted beam is recorded on a detector (CCD). This way, the microtomography consists of recording a large number of radiographs. Synchrotron radiation (SR) combined with  $\mu$ CT is a very powerful tool available to obtain three-dimensional imaging of complex internal geometries and materials. The properties of synchrotron radiation can be summarized like: very high intensity; a broad and continuous spectrum from infrared to x-rays; natural collimation; small source size; high polarization and pulsed time structure. The histomorphometry based on the principles of quantitative histology and stereology, evaluates microarchitecture two-dimensionally, even if these measures appear well correlated to 3D structure and properties of bone. The histomorphometric analysis try to relate values obtained from the images with 3D structure of the object. The 3D histomorphometry, obtained of the microtomography, corresponds to an evolution of conventional method based on 2D analysis. This work was used a different method to obtain the 3D histomorphometry parameter. The volume and surface/volume ratio have been obtained directly of the 3D reconstructed data. Feldkamp, 1989, just extrapolates the quantification from 2D to 3D domain, despite of the 3D nature of the data.

As a first goal, the algorithm using 3D histomorphometry is capable to distinguish the materials with similar or different structure, like bone quantity and bone fragmentation, characterizing cortical bone. However, the 3D  $\mu$ CT technique had better evolution with synchrotron radiation who has the spectrum of X-ray very homogeneous.

**References**

- [1] Oliveira,Luis F.,et al, Nucl. Instrum. Methods A. 525 - 406-411, 2004.
- [2] Oliveira, Luis F.,et al, Nucl. Instrum. Methods A 555 – 573-576, 2003.
- [3] Pinheiro, Christiano G., et al – in press (2008).
- [4] Feldkamp, L.A., et al, J.Optical Soc. Am 1A:612-619, 1984.
- [5] Feldkamp, L.A.: et al, J. Bone and Miner. Res. Vol 4 num 1, 1989.

## QUANTIFICACAO DE OSSO CORTICAL USANDO LUZ SÍNCROTRON.

Pinheiro, C<sup>1</sup>; Braz, D<sup>1</sup>, Oliveira, J<sup>1</sup>, Zambrana, L<sup>2</sup>, Tromba, G.<sup>3</sup>, Dreossi, D<sup>3</sup>, Barroso, R<sup>4</sup>, Oliveira, L<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro (LIN/COPPE), Rio de Janeiro, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Estácio de Sá, Rio de Janeiro, Br. <sup>3</sup>Sincrotrone Elettra, Trieste,

Italia <sup>4</sup>Universidade Estadual do Rio de Janeiro (IF/UERJ), Rio de Janeiro, Br.

**Introdução:** A microtomografia utilizando radiação síncrotron é uma poderosa técnica de imagem para objetos com geometrias internas complexas, e juntamente com os parâmetros histomorfométricos em terceira dimensão (3D) é possível obter uma boa quantificação de estruturas complexas como filtros cerâmicos e objetos trabeculares, como osso trabecular e atualmente osso cortical. Os parâmetros histomorfométricos diretos são: volume do objeto por volume total reconstruído (BV/TV), superfície do objeto por volume do objeto (BS/BV) e outros. A histomorfometria tenta relacionar valores obtidos das imagens com as estruturas tridimensional do objeto. Neste trabalho, objetivamos demonstrar a utilidade de nosso algoritmo, que foi escrito com o objetivo de fazer cálculos histomorfométricos mais eficientes, levando-se em consideração os efeitos de fase usando a radiação síncrotron, para quantificação e caracterização do osso cortical.

**Método:** Na linha SYRMEP do laboratório Sincrotrone Elettra, especialmente feita para estudos de física médica, utiliza técnicas como absorção, contraste de fase e DEI, microtomografamos ossos de ratos e para captura das imagens foi utilizada uma câmera CCD. Foram feitas 900 projeções com passos de 0.5 graus cada. Construído o volume, as imagens foram segmentadas, primeiro binarização e depois filtros, afim de que nenhum sinal espúrio atrapalhasse a quantificação. Em seguida foi utilizado nosso algoritmo escrito em c/c++, baseia-se na contagem de pontos brancos que representam o volume do objeto (BV) e pontos pretos que representam o background. Assim, a soma de pontos pretos e brancos nos dá o volume total reconstruído (TV). Para um melhor controle do material analisado os ossos foram marcados com a nomenclatura CDRL 1, 2, 3 e assim por diante e foram comparados de acordo com similaridades e desigualdades no volume ósseo visíveis.

**Resultados:** Na tabela apresentamos os resultados dos ossos CDRL1 e CDRL2, ambos com visibilidades idênticas, no volume (BV) e na área superficial (BS).

| Sample | BV/TV (%) | SDv    | BS/BV (mm <sup>2</sup> /mm <sup>3</sup> ) | SDv |
|--------|-----------|--------|-------------------------------------------|-----|
| CDRL 1 | 62,35     | 0,0081 | 0,297                                     | NS  |
| CDRL 2 | 63,33     | 0,0041 | 0,289                                     | NS  |

**Discussão e Conclusões:** Com o objetivo de ver a capacidade do programa em informar aquilo que o visual nos revela, concluímos que o programa apesar de estar em fase de ajuste já nos apresenta resultados até então confiáveis no que se refere à quantificação e caracterização de osso cortical. Outros parâmetros poderam ser adicionados ao programa em caráter de cálculo direto como os parâmetros BV e BS, com o intuito de uma caracterização ainda mais sofisticada do que a existente.

**Agradecimentos:** CNPq, Sincrotrone Elettra e aos orientadores.

**Referências:** [1] OLIVEIRA, L et al, Nucl.Instrum.Methods A. 525 406-411, (2004).

[2] FELDKAMP, L. et al, J.Optical Soc.Am 1A:612-619, (1984).

**XI Encontro de Modelagem Computacional**  
**Escola de Engenharia Industrial Metalúrgica de Volta Redonda/UFRJ, 17 a 19 de**  
**Novembro de 2008**

**REDES NEURAS ARTIFICIAIS APLICADAS AO RECONHECIMENTO DE**  
**TECIDO ÓSSEO EM IMAGENS MÉDICAS PARA APOIO AO DIAGNÓSTICO**  
**CLÍNICO**

**Anderson A. Meneses<sup>1,2,3</sup>, Christiano J. G. Pinheiro<sup>4,5</sup>, Roberto Schirru<sup>1</sup>, Regina C. Barroso<sup>5</sup>, Delson Braz<sup>4</sup>, Luis Fernando Oliveira<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Monitoração de Processos – Engenharia Nuclear/COPPE – UFRJ Brasil

<sup>2</sup>Faculdade da Fundação Educacional de Macaé

<sup>3</sup>Universidade Severino Sombra

<sup>4</sup>Laboratório de Instrumentação Nuclear – Engenharia Nuclear/COPPE – UFRJ

<sup>5</sup>Departamento de Física Aplicada e Termodinâmica – UERJ

**Resumo.** *Histomorfometria óssea é uma importante análise na prevenção e tratamento de cancer e osteoporose, fornecendo informação quantitativa para diagnóstico clínico. A Microtomografia Computadorizada por Raios X é uma técnica de imagens não-destrutiva e não-invasiva com uma alta resolução que permite imagens ampliadas. Na análise histomorfométrica de tais imagens, é possível usar técnicas de tratamento tais como filtros morfológicos e binarização. Tais técnicas, no entanto, podem causar perda de informação relevante para a quantificação da massa óssea. Neste trabalho é descrita a aplicação de Redes Neurais Artificiais (RNA) para reconhecimento de tecido ósseo como parte de uma pesquisa sobre análise histomorfométrica em imagens cuja aquisição foi feita no Laboratório ELETTRA, em Trieste, Itália, na linha de pesquisa SYRMEP (Synchrotron Radiation for Medical Physics – Radiação Síncrotron para Física Médica). Nestes testes iniciais, uma RNA Perceptron Multi-Camadas (PMC) Feed-Forward (FF) com algoritmo de aprendizagem de Retro-Propagação de Erro foi utilizada na tarefa de reconhecimento. A adequação da classificação de subimagens foi mensurada através de Curvas ROC (Receiving Operating Characteristic). Para este tipo de RNA obtivemos uma area sob a curva de 1.000, o que significa que a arquitetura e o treinamento da RNA se mostraram adequados para a tarefa de reconhecimento de tecido ósseo. As imagens obtidas também são mostradas neste trabalho. Os resultados dos testes demonstraram a viabilidade de aplicação metodológica de Redes Neurais Artificiais e sua adequação às características das imagens obtidas por Microtomografia Computadorizada por Raios X, para evitar perdas ocasionadas por outras técnicas de manipulação e tratamento de imagens.*

**Palavras-chave:** *Redes Neurais Artificiais, Microtomografia Computadorizada por Raios-X, Histomorfometria Óssea*

#### **REFERÊNCIAS**

Carbonare, L. D., Vallenti, M. T., Bertoldo, F., Zanatta, M., Zenari, S., Realdi, G., Cascio V. L., Giannini, S.,(2005); “Bone microarchitecture evaluated by histomorphometry”. Micron 36, 609-616.

Egmont-Petersen, M., Ridder, D., Handels, H., (2002); “Image processing with neural networks - a review”. Pattern Recognition 35, 2279-2301.

Egmont-Petersen, M., Ridder, D., Handels, H., (1999); “Recognition of radiopaque markers in X-ray images using a neural network as a nonlinear filter”. Pattern Recognition Letters 20, 521-533.

Haykin, S., (2005); *Neural Networks: a Comprehensive Foundation*. Índia: Pearson Education.

Hounsfield, G.N., (1973); "Computerized transverse axial scanning (tomography)". Br. J. Radiol. 46, 1016-1022.

Rumelhart, D. E., Hinton, G.E., Williams, R. J., (1986); "Learning representations by back-propagating errors," Nature 323.

Stampanoni, M., Wyss, P., Abela, R., Borchert, G., Vermeulen, D., Sennhausen, U., Rüeeggsegger, P., (2000); "Computer Microtomography". SLSAR 2000.



## ELETTRA SINCROTRONE

### **Activity Report**

**Period: January to December 2007**

### **3D Histomorphometric Quantification of Cortical Bone Architecture Using MicroCT with Synchrotron Radiation**

**Fellow: *Christiano Jorge Gomes Pinheiro***

**Home Advisors: *Dr. Regina Cely Barroso (ICTP Associate)*  
*and Dr. Delson Braz***

**Host Advisors: *Dr. Giuliana Tromba, Elettra*  
*Dr. Diego Dreossi, Elettra***