

Característica de Euler-Poincaré aplicada para identificar baixa densidade óssea a partir de imagens tomográficas de vértebras

Waldir L. Roque⁽¹⁾, Antonio Carlos A. de Souza⁽²⁾ (*In memoriam*), Denis X. Barbieri⁽³⁾

RESUMO

A densidade mineral óssea (DMO) é o exame padrão-ouro para o diagnóstico da osteoporose. No entanto, sabe-se que apenas essa medida não é suficiente para identificar completamente a fragilidade óssea e o conseqüente risco de fratura, tornando-se necessário a investigação da estrutura óssea. **Objetivos:** Avaliar se a característica de Euler-Poincaré (CEP) para analisar a conectividade do osso trabecular poderia fornecer um suporte adicional na identificação da deterioração da estrutura óssea. **Materiais e Métodos:** Analisou-se um conjunto de imagens formando *disectors*, obtidas da tomografia computadorizada de vértebras lombares, a partir dos quais foi estimada a característica Euler-Poincaré (CEP). Para lidar com o processamento de imagens dos *disectors*, foi desenvolvido um programa de computador usando o GTK+ para MS-Windows. Os resultados foram comparados com a DMO. **Resultados:** Verificou-se que a medida da CEP está correlacionada com os resultados obtidos por meio da DMO para as vértebras lombares. Ficou demonstrado também que a área de conectividade das trabéculas que é propagada ao longo dos *disectors* corrobora para assegurar que os resultados da CEP sejam consistentes com a medida da DMO. **Conclusões:** A aplicação da CEP na análise das tomografias vertebrais poderá vir a se constituir num método para avaliar a estrutura óssea trabecular, e sua correlação com a resistência mecânica do osso, sendo necessários porém mais estudos para confirmar esses dados.

Palavras-chave: microarquitetura óssea, osteoporose, característica de Euler-Poincaré, conectividade trabecular, processamento de imagem médica, imagens tomográficas.

INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma doença silenciosa caracterizada pela perda de massa óssea e pela deterioração da microarquitetura óssea trabecular, que levam à fragilidade óssea e aumento no risco de fratura. Com o aumento atual da expectativa de vida, a osteoporose se tornou um problema de saúde pública. Embora a massa óssea seja importante na determinação da resistência mecânica óssea, hoje em dia sabe-se que outros fatores também são importantes para estabelecer o risco de fratura de um paciente. A perda da massa óssea foi caracterizada em todo o mundo pela medição da densidade mineral óssea (DMO), o padrão-ouro para o diagnóstico da osteoporose. Porém, a DMO reflete a

quantidade de osso por área. Esse é somente um aspecto da qualidade óssea. Vários outros fatores também têm um papel nessa qualidade, como a microarquitetura trabecular.¹

Os tecidos ósseos são compostos principalmente de um osso compacto chamado cortical e um osso poroso interno, o osso trabecular ou canceloso. O aspecto poroso desse osso oferece uma similaridade com um meio esponjoso, onde as trabéculas estão incrustadas em uma medula. Além disso, podemos ver as trabéculas como grãos e as cavidades da medula como poros, seguindo a nomenclatura de meios porosos. Sob esse aspecto, a conectividade das trabéculas é um fator muito importante para estabelecer a qualidade do osso e o risco de fratura.²

Recebido em 24/03/2008. Aprovado, após revisão, em 10/01/09. Declaramos a inexistência de conflitos de interesse.

1. PPGMAp, Instituto de Matemática, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

2. Instituto de Geriatria e Gerontologia, Hospital São Lucas, PUCRS, Porto Alegre, Brasil.

3. Doutorado do Instituto de Geriatria e Gerontologia, Hospital São Lucas, PUCRS, Porto Alegre, Brasil.

Endereço para correspondência: Prof. Waldir L. Roque. Programa de Pós-Graduação em Matemática Aplicada, Instituto de Matemática – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. CEP: 91509-900. E-mail: roque@mat.ufrgs.br

A importância da microarquitetura do osso trabecular foi reconhecida na Conferência de Desenvolvimento do Consenso de 1993 em Hong Kong, onde a osteoporose foi considerada como uma alteração que reduz a resistência óssea e aumenta o risco de fratura. Por isso, a força do osso depende da densidade e também da qualidade óssea.³ Como atualmente ainda não há uma ferramenta não-invasiva totalmente válida para medir a força do osso *in vivo*, várias abordagens foram investigadas com base em tomografia computadorizada (TC), ressonância magnética (RM) e ultrassonografia para oferecer informações sobre a qualidade do osso.⁴⁻⁶

Uma maneira de investigar qualitativamente a microarquitetura óssea é calcular alguns índices morfométricos, conhecidos na literatura como morfometria quantitativa, usando os métodos estereológicos.⁷ Vários parâmetros morfométricos são calculados com base nas medidas de área e no perímetro trabecular bidimensional, como espessura, densidade, separação e comprimento esquelético trabecular. Por outro lado, a conectividade do osso trabecular, visto como um meio poroso, é uma propriedade topológica que oferece informações sobre a estrutura do espaço de poro. A característica de Euler-Poincaré (CEP) é uma medida geométrica integral que pode oferecer uma estimativa da conectividade da estrutura do espaço de poro. Um aspecto importante da CEP é que ela não muda sob deformação ou sob mudança de escala de um objeto. Em outras palavras, é uma invariante topológica. Basicamente, a CEP para uma estrutura em 3D é definida pelo número de partes isoladas menos a conectividade.⁸ A CEP é uma quantidade de dimensão zero e, como tal, deve ser estimada usando uma sonda 3D. Não obstante, foi demonstrado que para fins práticos, a sonda 3D pode ser aproximada por um conjunto de duas seções paralelas em 2D, desde que nenhuma alteração na estrutura morfológica apareça entre elas. Essas duas seções formam o chamado *disector*.⁹

Neste artigo, vamos concentrar nossa atenção sobre a aplicação da CEP para calcular a conectividade de duas vértebras lombares, com base em um conjunto de imagens tomográficas computadorizadas que incluem uma série de *disectors*. A ideia central é investigar como as estimativas de conectividade da CEP podem ser usadas para distinguir entre um osso com osteoporose e um saudável, relacionando os achados aos resultados da DMO. Na 2ª seção, apresentamos os materiais e métodos usados neste artigo e descrevemos brevemente como calcular a CEP a partir de imagens digitais; na 3ª seção, apresentamos os resultados principais e comparamos as medidas da CEP com os resultados da DMO para as vértebras correspondentes. A 4ª seção está dedicada às conclusões e aos trabalhos futuros.

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo sobre a conectividade trabecular, duas vértebras lombares *in vitro* foram adequadamente selecionadas e preparadas adequadamente para que representassem clinicamente um osso saudável e outro com osteoporose, de acordo com as medidas da DMO padrão. A Tabela 1 mostra os valores da DMO para essas duas vértebras.

Para um equipamento de DXA Hológico, os valores de referência da DMO para as vértebras *in vitro* indicam que os valores acima de 0,900 g/cm² correspondem a um osso saudável e abaixo de 0,700 g/cm² corresponde a um osso com osteoporose. Os valores entre esse intervalo correspondem a um estado de osteopenia. De acordo com esse critério, a vértebra V1 é de um indivíduo em controle, e a V2 é de um indivíduo com osteoporose (Tabela 1).

Essas vértebras foram varridas por tomografia computadorizada usando o equipamento *Siemens Cardiac Sensation 16*. As imagens foram tomadas com espaçamento de 1.000 μ m entre elas, para cada vértebra. A partir daí, uma sequência de 20 imagens adjacentes foi selecionada com base em uma análise clínica cuidadosa, formando um conjunto de 19 *disectors* (par de imagens sequenciais). Para cada vértebra, a região de interesse (ROI) foi escolhida com 65 x 55 pixels ao agrupar a imagem de aquisição. A ROI foi selecionada sob projeção, extraída a partir do corpo vertebral interior, próximo ao osso cortical. As ROIs escolhidos são as partes clinicamente significativas já que constituem a porção do corpo vertebral que primeiro exibe a perda mais significativa da massa óssea e fissuras, levando a um aumento do risco de fratura. A escala da imagem por pixel corresponde a 230 μ m x 230 μ m.

Processamento de Imagem

Para lidar com o processamento de imagens dos *disectors*, foi desenvolvido um programa de computador usando o *GTK+* para *MS-Windows*. Primeiro, o conjunto de imagens tomográficas é carregado e recortado para produzir o conjunto de 19 *disectors* de imagem para a região de interesse. Essas imagens são binarizadas automaticamente usando o algoritmo

Tabela 1
DMO obtida por densitometria óssea duo-energética (DXA), usando o modelo Hológico QDR-4500A, oferecido pelo Hospital São Lucas, PUCRS

Vértebras	V1	V2
DMO: (g/cm ²)	1,219	0,668

InterMeans⁹ ou pela especificação do usuário ou de um valor específico. Existem outros algoritmos de binarização disponíveis, mas os médicos ainda não estão confiantes sobre qual seria o melhor para um procedimento automático. Para identificar as trabéculas, a imagem é segmentada seguindo o algoritmo padrão vizinhos de 8 *pixels*. Escolhemos os *pixels* brancos para representar as trabéculas e os pretos, seus complementos, como por exemplo, corresponderiam essencialmente ao osso da medula vermelha. Devemos nos referir à trabécula como grão e à medula como poro.

O programa de computador desenvolvido inclui várias funcionalidades que oferecem facilidades para as análises histomorfométricas e estereológicas, como contagem do número de trabéculas e medula em cada imagem, áreas, perímetros, a distribuição da trabécula por área, raios hidráulicos, circularidade trabecular, volume do osso trabecular, número, separação e espessura trabecular, fator padrão do osso trabecular^{11,12} e também a característica de Euler-Poincaré, descrita na subseção a seguir.

Característica de Euler-Poincaré

A característica de Euler-Poincaré (CEP) é uma medida topológica importante de um objeto em 3D já que oferece informações sobre o grau de conectividade de sua estrutura.⁷ Essa medida é invariante sob deformações topológicas. Em termos simples, para uma estrutura poro-espaco em 3D, a CEP é dada em termos de elementos naturais da estrutura, como:

$$CEP = Dv - Cv, \quad (1)$$

onde Dv é o número de partes desconectadas do espaço do poro por unidade de volume, conhecido como número de Betti zero, e Cv é a conectividade por volume da unidade, também conhecido como Genus ou primeiro número de Betti. O número de partes desconectadas corresponde ao número de objetos isolados (ilhas), $\#I$, e a conectividade está expressa em termos do número de túneis (ramos), $\#B$, e o número de cavidades fechadas (orifícios), $\#H$.¹³⁻¹⁵ O número de conectividade corresponde ao número máximo de cortes por um objeto que não produz dois objetos desconectados. Objetos com a mesma conectividade são topologicamente equivalentes, por exemplo, podemos deformar esses objetos para fazer outros mais simples apenas esticando e dobrando, sem precisar cortar. A estimativa da CEP é alta para objetos com menor conectividade e baixa para objetos com alta conectividade.

Como mostram Gundersen *et al.*¹³ e Zhao *et al.*,¹⁶ a CEP pode ser estimada para um objeto em 3D com base em obser-

vações de qualquer alteração topológica das intersecções de um plano em 2D que varre completamente o objeto e, além disso, essa estimativa é independente da direção e orientação da varredura. Em outras palavras, é possível calcular a CEP por um conjunto de *disectors*, observando os padrões de uma fatia e comparando com os padrões das fatias seguintes. Sob esse aspecto, a CEP é dada por:

$$CEP = 1/2 (\#I + \#H - \#B), \quad (2)$$

onde a expressão é dividida por 2 devido ao fato de que a contagem dessas quantidades é feita nas duas direções, simultaneamente. Ao observar as diferenças na aparência da estrutura nas fatias superiores e inferiores, é possível deduzir os eventos topológicos que ocorrem no *disector*.

Na referência 15, foi feita uma dedução detalhada da CEP com base em casos topológicos. Para um *disector* de imagens binárias, por exemplo, D_i , $i = 1, \dots, n-1$, onde n é o número de seções/imagens, a CEP pode ser calculada por:

$$CEP_i = 1/2 (N_i + N_{i+1} - 2N_{i \cap i+1} + 2L_{i \cap i+1} - L_i - L_{i+1}), \quad (3)$$

onde N_i é o número total de objetos desconexos (todas as partes do espaço de poro) vistos em uma única imagem binária i , $N_{i \cap i+1}$ é o número de objetos na seção resultante obtida pela interseção $i \cap i + 1$, L_i é o número total de orifícios em todos os objetos e $L_{i \cap i+1}$ é o número de orifícios na intersecção. A conectividade no *disector* D_i pode ser obtida pela sua intersecção aplicando o operador lógico AND. Em outros termos, reescrevemos a Equação 3 como:

$$CEP_i = 1/2 (\#PoreIm_i + \#PoreIm_{i+1} - 2\#PoreIm_{i \cap i+1} + 2\#HoleIm_{i \cap i+1} - \#HoleIm_i - \#HoleIm_{i+1}), \quad (4)$$

onde $\#PoreIm_i$ significa o número de poros na imagem i , $\#PoreIm_{i \cap i+1}$ significa o número de poros comuns das imagens i e $i+1$ e uma descrição semelhante para os orifícios.

Para se ter uma estimativa imparcial da CEP, os efeitos de borda devem ser considerados. Para isso seguimos a estrutura de contagem bidimensional imparcial padrão definida nas referências.^{13,14} O *disector* usado em nosso trabalho é uma sonda tridimensional com base em imagens binárias obtidas depois do processamento das imagens da TC. Como tal, podemos definir em um meio poroso, nossa escolha por um poro ou grão, de acordo com nosso próprio interesse. Além disso, todas as quantidades estereológicas, e também as CEP, podem ser estimadas para os dois, poros e grãos.

RESULTADO

Como indicamos, o estudo de caso foi fundamentado em dois conjuntos de 20 imagens selecionadas a partir das vértebras V1 e V2, cujos DMO estão na Tabela 1. As Características de Euler-Poincaré foram calculadas para o conjunto de 19 *disectors* de cada vértebra. Os valores da CEP estão na Tabela 2.

Observando os valores da CEP para a vértebra V2, podemos ver que são sempre mais altas se comparado com os mesmos *disectors* da vértebra V1. Esse resultado mostra uma melhor conectividade das trabéculas para a vértebra V1 do que para as da V2. Agora, considerando os valores da DMO dados na Tabela 1, podemos deduzir que as estimativas da CEP são consistentes com os achados da DMO. Como é esperado, os valores mais altos da CEP indicam uma conectividade mais baixa, que pode ser uma consequência de um número mais baixo e de uma menor espessura das trabéculas, levando a um espaço maior a ser ocupado pela medula. Isso é assegurado pela baixa medida da DMO para V2. Por outro lado, os valores mais baixos da CEP indicam uma conectividade mais alta das trabéculas, que podem deixar menos espaço para ser ocupado pela medula. Isso pode ser uma consequência de um número maior e de uma maior espessura das trabéculas por volume. Isso é assegurado por uma medida maior da DMO para V1.

Considerando uma lista formada pelos valores da CEP para o indivíduo de controle V1 (x_1) e para o indivíduo com osteoporose V2 (x_2), o modelo de regressão linear múltipla para o grupo é calculado por:

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 x_{1i} + \beta_2 x_{2i} + \beta_3 x_{1i} x_{2i} + \varepsilon_i \quad (5)$$

onde y_i , $i = 1, \dots, 38$; são os valores da CEP, β_0 é o intercepto de controle, β_1 é a inclinação para o indivíduo de controle, x_{1i} é o número do *disector* na lista, $\beta_0 + \beta_2$ é o intercepto do indivíduo com osteoporose, x_{2i} é uma variável 'dummy' com valor 0 (zero) para o indivíduo de controle, 1 (um) para o indivíduo com osteoporose; $\beta_1 + \beta_3$ é a inclinação para indivíduo com osteoporose e ε_i é o erro aleatório.

De acordo com esse modelo, os cálculos mostraram que a contribuição de β_3 é estatisticamente insignificante, já que o valor-P obtido foi 0,22719. Assim, omitimos a contribuição β_3

na Equação 5. A Figura 1 mostra a representação dos valores da CEP e a regressão linear múltipla correspondente para as vértebras V1 e V2. Como a contribuição da inclinação dada por β_3 foi estatisticamente insignificante, as duas linhas retas na Figura 1 têm a mesma inclinação.

Na Tabela 3, são dados as estimativas dos coeficientes, o erro padrão, o valor T e o valor P . Os resultados do valor P mostram que o grupo de controle e o do grupo com osteoporose são estatisticamente diferentes em termos de interceptos. Em outras palavras, os dados da CEP podem realmente discernir entre um indivíduo de controle e um com osteoporose. Como uma análise extra, calculamos os valores das áreas totais para as trabéculas conectadas que se propagam pelos *disectors*, para as vértebras V1 e V2. Os valores estão na Tabela 4.

Observando atentamente os valores apresentados na Tabela 4, podemos ver que as áreas propagadas para a vértebra V1 são sempre maiores que aquelas para a vértebra V2. Como a V1 tem maior conectividade, espera-se que haja um número maior e mais espessura das trabéculas e, como consequência, a área trabecular de cada fatia de V1 seja maior que a área trabecular de cada fatia de V2.

A Figura 2 mostra os pontos das áreas propagadas conectadas para as trabéculas das vértebras V1 e V2. Os valores são consistentes com os resultados das medidas da DMO.

A Figura 3 mostra os pontos das áreas propagadas da garganta (propagação tubular das trabéculas conectadas) para as trabéculas das vértebras V1 e V2. Esses resultados também estão de acordo com os cálculos da CEP.

A Figura 4 ilustra a propagação da conectividade da área para uma única trabécula e a Figura 5 mostra a propagação da traqueia para a mesma trabécula ao longo das fatias.

DISCUSSÃO

A densidade mineral óssea (DMO) é considerada o padrão-ouro internacional para o diagnóstico da osteoporose. Não obstante, as medidas de densidade óssea pelo uso de equipamentos de densitometria de energia dupla mostraram ser limitados na diferenciação de indivíduos com e sem fraturas vertebrais. Durante os últimos anos, observou-se que não somente a densidade, mas também a qualidade da estrutura óssea tem um

Tabela 2

Valores da CEP dos 19 *disectors* para as vértebras V1 e V2

<i>Disector</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
CEP V1	9,5	11	13,5	18,5	13	7,5	11	5	10,5	15,5	0	-4,5	-2	2,5	3,5	0	0	4	12,5
CEP V2	30	34,5	36,5	37	34,5	34,5	24	32	38,5	36	34	38,5	31,5	29	30	27,5	26	27,5	33,5

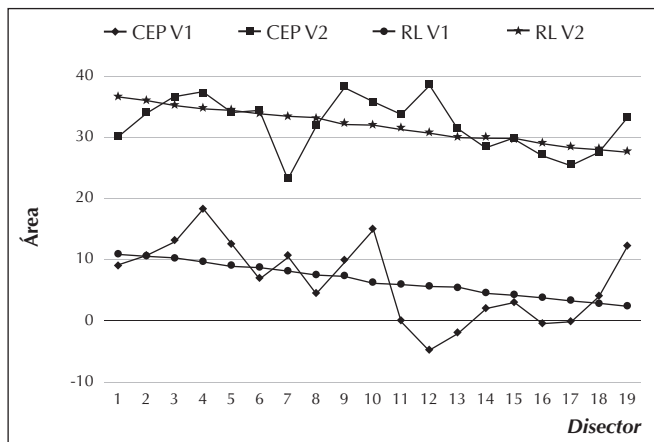


Figura 1. Valores da CEP e regressão linear múltipla para as vértebras V1 e V2.

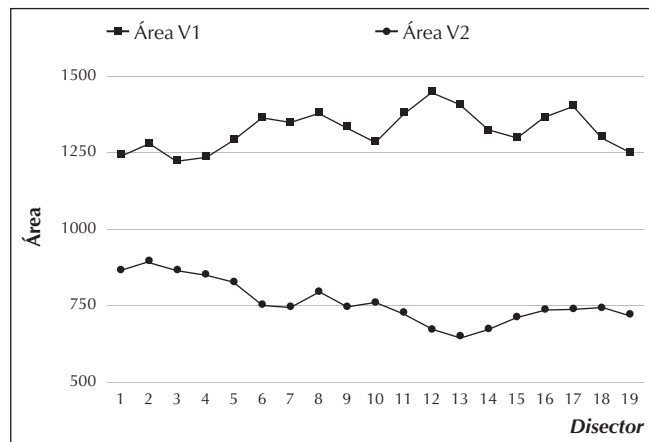


Figura 2. Pontos das áreas propagadas conectadas das trabéculas das vértebras V1 e V2.

Tabela 3

Cálculos estatísticos para a CEP das vértebras V1 e V2

Coefficiente	Estimativa	Erro padrão	Valor T	Pr (> t)
β_0	11.6228	1.8357	6.331	2.83e-07
β_1	-0.4728	0.1451	-3.258	0.0025
β_2	25.4737	1.5898	16.023	<2e-16

papel importante na resistência do osso. Como consequência, o estudo detalhado da microarquitetura trabecular começou a chamar a atenção da comunidade médica. A ideia é procurar uma melhor acurácia nas medidas para melhorar o diagnóstico e o tratamento da osteoporose com recursos não invasivos e mais sensíveis que podem dar uma resposta rápida na avaliação das intervenções terapêuticas.

Neste artigo, discutimos a aplicação da característica de Euler-Poincaré (CEP) para analisar a conectividade do osso trabecular a partir de imagens digitais e para analisar a perda de massa óssea, comparando os resultados com as medidas da densidade mineral óssea (DMO) para duas vértebras lombares. As vértebras *in vitro* foram clinicamente escolhidas de modo que uma era de um indivíduo saudável e outra de um indivíduo com osteoporose, de acordo com as avaliações da DMO e clínicas. Para essas duas vértebras, um conjunto de imagens tomográficas por computador foi realizado, depois selecionado

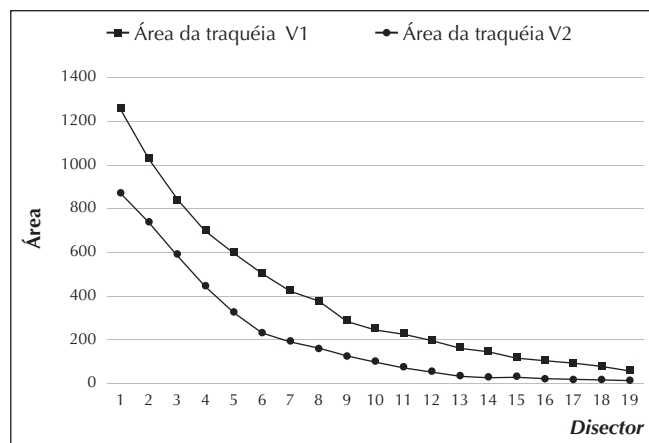


Figura 3. Pontos das áreas propagadas da garganta das trabéculas das vértebras V1 e V2.

e, a partir daí, escolhidas as regiões de interesse (ROI), para finalmente compor um conjunto de 19 *disectors* registrados para cada uma das duas vértebras (V1 e V2).

A CEP é uma medida topológica conhecida tendo sido aplicada em outras áreas. Ela afirma que são esperados valores elevados quando a estrutura tem uma baixa conectividade e valores baixos quando a estrutura tem uma elevada conectividade. Usando um programa de computador desenvolvido nesse projeto para calcular quantidades histomorfométricas

Tabela 4

Áreas propagadas das trabéculas conectadas pelos 19 *disectors* para as vértebras V1 e V2

Disector	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
CEP V1	1246	1284	1234	1237	1298	1374	1352	1389	1336	1297	1387	1457	1415	1329	1304	1373	1412	1309	1258
CEP V2	871	901	865	853	823	751	738	802	738	753	728	667	646	668	712	741	745	735	725

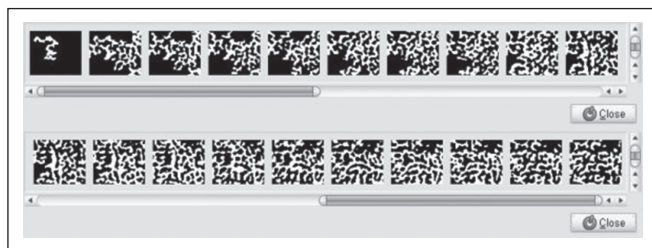


Figura 4. Tela da propagação da conectividade para uma única trabécula ao longo das fatias.

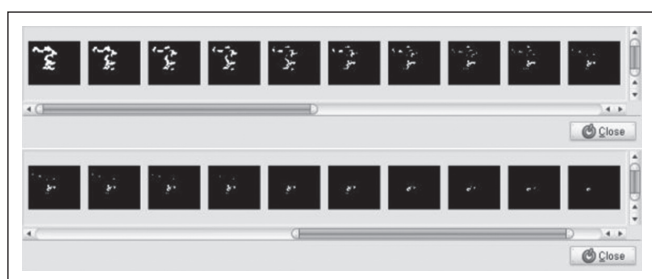


Figura 5. Área de propagação da garganta para uma única trabécula ao longo das fatias.

e estereológicas, a CEP foi calculada para os *disectors* de V1 e V2 e os valores estão apresentados na Tabela 2. Na Figura 1, a CEP mostra que a vértebra V1 tem uma conectividade muito maior do que a apresentada pela V2. Esse resultado está em pleno acordo com as medidas da DMO apresentadas na Tabela 1. Embora tenhamos somente um estudo de caso para dois indivíduos, um de controle e outro com osteoporose, a análise estatística realizada em termos de uma regressão linear múltipla mostrou que os dois grupos exibem um comportamento diferente para os interceptores (Figura 1 e Tabela 3). Em outras palavras, os dados da CEP mostraram ser completamente diferentes para os dois casos. O leitor pode perceber que apenas uma medida da DMO é necessária para identificar se um indivíduo tem ou não osteoporose.

Um artigo recente¹⁷ de Pothuau *et al.* discutiu a aplicação da análise gráfica do esqueleto da microarquitetura do osso trabecular e indicou a diferença entre as estimativas da CEP para seis indivíduos que tinham osteoporose e seis com osteoartrite. Em seu trabalho, o cálculo da CEP foi efetuado usando

uma técnica diferente da aplicada neste artigo; além disso, suas estimativas foram utilizadas para comparar os indivíduos com osteoporose e osteoartrite. Nosso objetivo aqui era investigar se a CEP era capaz de fazer a distinção entre um indivíduo com osteoporose e um saudável, considerando sua relação com a DMO, que atualmente é o padrão-ouro para o diagnóstico da osteoporose. Além disso, para dar suporte aos nossos resultados, a área total de conectividade propagada junto com os *disectors* para as vértebras V1 e V2, e também a área total da garganta foram calculadas e mostraram evidência de que o número de trabéculas e sua espessura para V1 são maiores que para V2 (Figura 2), o que oferece um suporte de fato aos resultados expressos pelas medidas DMO e CEP.

CONCLUSÃO

Está claro que esses resultados preliminares não podem ser considerados totalmente conclusivos, mas parecem promissores. Sob esse aspecto, parece adequado que uma pesquisa mais sistemática seja realizada para ver se a CEP pode realmente ser aplicada como uma medida capaz de discernir completamente o nível de deterioração da estrutura óssea trabecular e também encontrar a correlação com a resistência mecânica do osso para possivelmente prever o risco de fratura de um indivíduo. Para isso, é importante que os resultados sejam comparados com alguns parâmetros morfológicos, como espessura óssea trabecular (Tb.Th), separação óssea trabecular (Tb.Sp) e fator de padrão ósseo trabecular (TbPf). Esses e outros parâmetros já estão implementados no programa de computador e uma nova investigação com um conjunto maior de amostras de ossos está em andamento.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de expressar nossa gratidão ao Prof. Dr. Antonio Carlos Araújo de Souza pela oportunidade que tivemos em colaborar com ele neste projeto. Infelizmente, ele foi um dos passageiros vítimas do acidente fatal ocorrido com o avião da TAM vôo JJ 3054 em São Paulo, no dia 17 de julho de 2007. Nosso agradecimento também ao Dr. Flávio Ziegelmann pelas discussões sobre o modelo de regressão linear múltipla e para os revisores que deram sugestões para melhorar este artigo.

REFERÊNCIAS

REFERENCES

1. Bouxsein ML. Bone quality: Where to go from here? *Osteoporos Int* 2003;14:S118-27.
2. Cortet B, Marchandise X. Bone microarchitecture and mechanical resistance. *Joint Bone Spine* 2001;68:297-305.
3. Dalle Carbonare L, Giannini S. Bone microarchitecture as an important determinant of bone strength. *J Endocrinol Invest* 2004;27:99-105.
4. Lespessailles E, Chappard C, Bonnet N, Benhamou CD. Imaging techniques for evaluating bone microarchitecture. *Joint Bone Spine* 2006;73:254-61.

5. Cadossi R, de Terlizzi F, Canè V, Fini M, Wüster C. Assessment of Bone Architecture with Ultrasonometry: Experimental and Clinical Experience. *Horm Res* 2000; 54(suppl1):9-18.
6. Faulkner K, Popock N. Future Methods in the Assessment of Bone Mass and Structure. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2001;15:359-83.
7. Mouton PR. Principles and Practices of Unbiased Stereology. An Introduction to Bioscientists, The John Hopkins University Press, Baltimore, USA, 2002.
8. Thurston WP. Three-Dimensional Geometry and Topology, Princeton University Press, Princeton, USA, 1997.
9. Stereo DC. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microscopy* 1984;134(4):127-36.
10. Glasbey CA. An analysis of histogram-based thresholding algorithms. *CVGIP: Graphical Models and Image Processing* 1993;55:532-7.
11. Dalle Carbonare L, Valenti MT, Bertoldo F, Zanatta M, Zenari S, Realdi G, *et al.* Bone microarchitecture evaluated by histomorphometry. *Micron* 2005;36:609-16.
12. Chappard D, Legrand E, Pascaretti C, Baslé MF, Audran M. Comparison of eight histomorphometric methods for measuring trabecular bone architecture by image analysis on histological sections. *Microsc Res Tech* 1999;45:303-12.
13. Gundersen HJG, Boyce RW, Nyengaard JR, Odgaard A. The conneulor: Unbiased estimation of connectivity using physical disectors under projection. *Bone* 1993;14:217-22.
14. Kroustrup JP, Gundersen HJG. Estimating the number of complex particles using the conneulor principle. *J Microscopy* 2001;203:314-20.
15. Vogel H-J and Kretzchmar A. Topological characterization of pore space in soil - sample preparation and digital image processing. *Geoderma* 1996;73:23-38.
16. Zhao HQ and MacDonald IF. An unbiased and efficient procedure for 3-d connectivity measurement as applied to porous media. *J Microscopy* 1993;172:157-62.
17. Pothuaud L, Porion P, Lespessailles E, Benhamou CL, Levitz P. A new method for threedimensional skeleton graph analysis of porous media: Application to trabecular bone microarchitecture. *J Microscopy* 2000;199:149-61.