

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE MATEMÁTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MATEMÁTICA APLICADA

**Característica de Euler-Poincaré para
Estimar a Conectividade da Estrutura do
Osso Trabecular**

por

Katia Arcaro

Dissertação submetida como requisito parcial
para a obtenção do grau de
Mestre em Matemática Aplicada

Prof. Dr. Waldir Leite Roque
Orientador

Porto Alegre, julho de 2009.

CIP - CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

Arcaro, Katia

Característica de Euler-Poincaré para Estimar a Conectividade da Estrutura do Osso Trabecular / Katia Arcaro.— Porto Alegre: PPGMAp da UFRGS, 2009.

104 p.: il.

Dissertação (mestrado) —Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Matemática Aplicada, Porto Alegre, 2009.

Orientador: Roque, Waldir Leite

Dissertação: Matemática Aplicada,
Característica de Euler-Poincaré, osteoporose, microarquitetura trabecular

Característica de Euler-Poincaré para Estimar a Conectividade da Estrutura do Osso Trabecular

por

Katia Arcaro

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Matemática Aplicada do Instituto de Matemática da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a
obtenção do grau de

Mestre em Matemática Aplicada

Linha de Pesquisa: Física Matemática

Orientador: Prof. Dr. Waldir Leite Roque

Banca examinadora:

Prof. Dr. Carlos Antonio de Moura
CComp/IME/UERJ

Prof. Dr. Manuel Menezes de Oliveira Neto
PPGCC/INF/UFRGS

Prof. Dr. Rodolfo Herberto Schneider
PPGGB/IGG/PUCRS

Dissertação apresentada e aprovada em
27 de julho de 2009.

Prof. Dr. Waldir Leite Roque
Coordenador

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de expressar minha gratidão aos meus pais, Lourenço e Izabel, pelo apoio, pelo incentivo e pela confiança; especialmente, por me terem dado autonomia desde os primeiros passos e terem ensinado, acima de tudo, com exemplos; por me terem feito independente, mas aberta a opiniões; destemida, mas precavida; e decidida, mas ponderada; ao meu irmão, Luís Fernando, pelo companheirismo, pela disponibilidade em ajudar-me em momentos difíceis, mas especialmente, pelos preciosos momentos de terapia do riso, que tantas vezes me acalmaram mais ainda do que a própria solução de meus problemas.

Agradeço ao meu esposo, Guilherme, pelos sete anos e meio de amor incondicional, pela paciência, acima de tudo, pela compreensão nos meus maus momentos, pelas incontáveis horas de prazerosas conversas, especialmente as que vieram como bálsamo nos momentos de maior aflição e dúvida; aos seus pais, também, Jairo e Helena, que tanto torceram por mim. À minha psicoterapeuta, Karine Lazzari, que esteve ao meu lado nos momentos de maior dificuldade, ansiedade e incertezas, mostrando-me valores e prioridades preciosos na minha vida.

Agradeço aos meus professores dos ensinos Fundamental e Médio, em especial, às professoras Cleusa Acco Barp, primeira professora da minha vida, que sempre acreditou na “gasguita”, e Maria Helena Granzotto, que foi meu modelo de profissional docente na área da Matemática.

Agradeço a todos os professores com quem tive contato no curso de Licenciatura Plena em Matemática e Física da UCS, não somente como (bons) profissionais, que me confiaram diversas monitorias nas mais diversas disciplinas do curso, bem como bolsas de Iniciação Científica, abrindo portas para meu futuro profissional, mas também, como amigos, que me orientaram e incentivaram em diversas situações de minha vida acadêmica.

Agradeço aos amigos que aproximaram-se de mim na infância, adolescência ou faculdade, e que ainda permanecem ao meu lado, torcendo por mim. Neste momento, parece-me adequado agradecer em especial aos colegas e amigos da UFRGS, tanto os que estiveram ao meu lado na luta pela conquista de um espaço, quanto aos que batalharam junto comigo na aquisição do conhecimento durante este curso.

Agradeço, também, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pelo incentivo, à Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, pela oportunidade e, em especial, ao meu orientador, Prof. Dr. Waldir Leite Roque, pelo apoio a mim prestado durante todo meu percurso, desde a chegada a esta instituição, até a conclusão deste trabalho.

Acima de tudo, agradeço a Deus, por ter permitido e providenciado que cada uma dessas pessoas entrassem na minha vida, e que cada uma dessas oportunidades aparecessem. Por ter-me dado força e coragem para aproveitar o que cada momento da minha vida pôde oferecer-me: da dor e da dificuldade, o aprendizado; da alegria e das conquistas, o impulso para seguir em frente.

Que a cada uma dessas pessoas, eu possa retribuir o bem que me fizeram, mas tenho certeza de que, se as curvas da vida não permitirem, a sabedoria divina o fará por mim.

Sumário

AGRADECIMENTOS	iv
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xviii
LISTA DE SIGLAS	xix
RESUMO	xx
ABSTRACT	xxi
1 INTRODUÇÃO	1
2 ESTEREOLOGIA	3
2.1 Principais Definições	3
2.2 Propriedades Geométricas das Formas de uma Estrutura no Espaço	5
2.3 Caracterização de Microestruturas	6
2.4 Eficiência dos Procedimentos Estereológicos	8
2.5 Procedimentos para Amostragens Isotrópicas, Uniformes e Randômicas (IUR)	9
2.5.1 Grades de pontos-teste	9
2.5.2 Planos Isotrópicos	10
2.5.3 Linhas-teste Isotrópicas	15
2.6 Medições Estereológicas Clássicas	19
2.6.1 Estruturas Bidimensionais: Fração de Área (A_A) via Contagem de Pontos	19
2.6.2 Fração de Volume (V_V) via Contagem de Pontos	20
2.6.3 Estruturas Bidimensionais: Perímetros de Formas (L_A) via Contagem de Interceptos de Linhas	22

2.6.4	Estruturas Tridimensionais: Área de Superfície (S_V) via Contagem de Interceptos de Linha	24
2.6.5	Microestruturas Tridimensionais: Comprimento de Linha (L_V) via Contagem de Pontos na Área (P_A)	26
3	GEOMETRIA DIFERENCIAL E A CARACTERÍSTICA DE EULER-POINCARÉ, CEP	31
3.1	Curvatura K de uma Curva Bidimensional	31
3.2	Curvatura Média, F , de uma Superfície Tridimensional	32
3.3	Curvatura Total de uma Superfície Tridimensional	35
3.4	Curvatura Integral Média, M , de uma Superfície Tridimensional	39
4	O <i>DISECTOR</i>	40
4.1	Formas Tridimensionais: Propriedades Topológicas	40
4.2	Varredura com Linhas-Teste Bidimensionais	44
4.3	Aplicação do <i>Disector</i>	48
4.4	O Fracionador	56
5	ANÁLISE E TRATAMENTO DE IMAGENS	60
5.1	Relações Básicas entre Pixels	60
5.2	Segmentação de Imagens	62
5.2.1	Limiarização	62
5.2.2	Segmentação Orientada a Regiões	65
6	A CONECTIVIDADE TRABECULAR E A APLICAÇÃO DA CARACTERÍSTICA DE EULER-POINCARÉ	69
6.1	Escolha dos Métodos para Tratamento das Imagens	71
6.1.1	Algoritmo de Limiarização <i>InterMeans</i>	72
6.2	Determinação de Parâmetros para Análise Óssea	74

7	RESULTADOS	81
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES	99
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102

Lista de Figuras

- Figura 2.1 Estrutura de cinco fases: uma fase matriz (fundo branco), uma fase granular (vermelho) e outras três fases (amarela, azul e verde) dispostas ao longo do contorno ondulatório da célula [RD99]. 4
- Figura 2.2 Exemplo de microestrutura: metal de duas fases. Azul: fase β ; vermelho: interface $\alpha\beta$; verde: pontos triplos $\alpha\alpha\alpha$; amarelo: ponto triplo $\beta\beta\beta$ [RD99]. 7
- Figura 2.3 Utilização de $m = 3$ protótipos em formato cúbico ($2m$ faces) para amostrar o objeto em 3 distintas direções. Para fixá-lo, pode-se embebê-lo em resina, por exemplo. Note que os 3 objetos tiveram seus eixos naturais posicionados identicamente dentro de cada recipiente. Após, cada protótipo foi seccionado em uma das direções: **a)** teve seções paralelas ao plano xy ; **b)** teve seções paralelas ao plano xz ; e **c)** teve seções paralelas ao plano yz 11
- Figura 2.4 Seções verticais cortadas na direção do eixo natural do espécime (flecha). Cada seção é rotacionada randomicamente em diferentes ângulos azimutais [RD99]. 12
- Figura 2.5 Aplicação do método das seções verticais para o rim de um rato. **a)** Uma direção de referência reconhecível é escolhida no espécime macroscópico e tomada como fixa (a direção vertical). **b)** É feita uma seção paralela à direção vertical, com orientação qualquer. **c)** Após, uma parte do rim é selecionada para sofrer cortes perpendiculares à seção vertical, mas com orientação escolhida com probabilidade ponderada por seno (ou randômica) e uniforme. **d)** As fatias são, então, rotacionadas isotropicamente no plano horizontal. Para análise dos campos amostrais, utilizam-se linhas cicloides (Figura 2.10) [dL03]. 13
- Figura 2.6 O *orientator*. Feita a seção vertical no espécime, realiza-se um corte perpendicular a ele, a seção horizontal, localizando-o ao longo da linha 0-0 com a face resultante da seção vertical voltada para baixo. Gerando-se um número randômico de 0 a 99, seleciona-se a direção de corte, como mostrado. Repetindo-se este processo produz-se planos que são isotrópicos (orientações uniformemente amostradas) [RD99]. 14

- Figura 2.7 Note que a área A , correspondente à colatitude ϕ e à longitude $\Delta\theta$ é muito menor que a área B , correspondente à colatitude $\phi + \Delta\phi$ e à mesma longitude. Isso faz com que pontos próximos dos pólos tenham maior probabilidade de serem amostrados do que pontos próximos ao equador. 16
- Figura 2.8 **a)** Grade radial com ângulo de rotação uniforme. **b)** O mesmo número de linhas-teste, porém, espaçadas segundo o método da ponderação por seno, como alternativa para compensar a amostragem não uniforme das regiões próximas aos pólos (Figura 2.7), que é feita pelas seções verticais com variação uniforme do ângulo de rotação [RD99]. 16
- Figura 2.9 Em **a)**, a esfera de orientações espaçadas segundo o método da ponderação por seno (segunda ilustração da Figura 2.8). Em **b)**, o mesmo número de linhas-teste ilustrando seu amontoamento quando utilizada grade como na primeira ilustração da Figura 2.8, aliada ao método das seções verticais [HR05]. 17
- Figura 2.10 Uma grade de arcos cicloides. Posicionada sobre a seção vertical de uma estrutura (a direção vertical do espécime paralela à direção vertical da figura), as linhas amostram isotropicamente as direções em 3D [RD99]. 18
- Figura 2.11 Estimativa da fração de área de cada uma das fases α , β e γ . Neste caso, uma grade com 25 pontos está disposta sobre a estrutura bidimensional, com 10 pontos acertando a fase α , 8 acertando a fase β e 7 acertando a γ . Utilizando-se (2.2), obtém-se $A_A^\alpha = \frac{10}{25} = 0,4$; $A_A^\beta = \frac{8}{25} = 0,32$ e $A_A^\gamma = \frac{7}{25} = 0,28$ [RD99]. 20
- Figura 2.12 Estimativa da área de um objeto bidimensional. Uma grade com 48 pontos, $l_0 = 5,7\mu m$, está disposta sobre a estrutura bidimensional, com 20 pontos acertando-a. Utilizando-se (2.4), obtém-se $A = (5,7\mu m)^2 \times 20 = 650\mu m^2$ [RD99]. 21
- Figura 2.13 As linhas horizontais da grade quadrada ($L_0 = 23,7\mu m$) interseccionam o contorno das formas em 8 pontos (marcados em azul), enquanto que as verticais, interseccionam 62 vezes. Essa discrepância evidencia a anisotropia da estrutura [RD99]. 23
- Figura 2.14 “Rosa do número de interseções” para uma estrutura anisotrópica bidimensional [RD99]. 23

- Figura 2.15 Estimativa do comprimento total de contornos, L_A , em uma estrutura 2D anisotrópica, utilizando-se uma grade de linhas circulares, com diâmetro $d = 5,9\mu m$ e o equivalente a 8 circunferências. Neste caso, o comprimento total de linhas-teste é de $8\pi d = 148,9\mu m$ e ocorrem 55 interseções entre as linhas-teste e as linhas de contorno, que, através da equação (2.6), estimam o valor de $L_A = \frac{55\pi}{2*148,9} = 0,58 \mu m/\mu m^2$ [RD99]. 24
- Figura 2.16 Cada uma das formas tem direção anisotrópica distinta, de modo que a área de projeção no plano horizontal é proporcional ao número de interseções de cada uma delas com as linhas-teste verticais. 25
- Figura 2.17 Grade com 12 arcos cicloides sobreposta à seção vertical de uma estrutura, onde a direção vertical está indicada por uma flecha. A altura de cada arco é $h = 4,8\mu m$ e, portanto, o comprimento total de linhas da grade é dado por $12*2h = 115,1\mu m$. Neste caso, ocorrem 24 interseções e, portanto, a densidade de superfície estimada por (2.7) é $S_V = \frac{2*24}{115,1} = 0,42\mu m^2/\mu m^3$ [RD99]. 27
- Figura 2.18 A contagem dos pontos triplos na seção plana estima o comprimento das linhas triplas na estrutura celular tridimensional. Neste caso, ocorrem 37 interseções entre o plano-teste, de área $967\mu m^2$, e as linhas triplas. Assim, utilizando-se (2.8), estima-se $L_V = \frac{2*37}{967} = 0,076\mu m/\mu m^3 = 76 km/cm^3$. Da mesma maneira, estima-se o comprimento de linhas triplas em uma estrutura com maior número de fases [RD99]. 28
- Figura 2.19 **a)** Uma linha-teste no plano de projeção representa um plano-teste interseccionando o volume projetado. **b)** Uma linha-teste cicloidal produz um plano-teste cicloidal, que amostra uniformemente o ângulo latitudinal. Note a posição do arco em relação à direção vertical [RD99]. 28
- Figura 2.20 Formas lineares de uma microestrutura vistas como que em uma projeção através de uma seção de espessura $2\mu m$. Neste caso, os planos-teste são representados por suas arestas ($L_0 = 20\mu m$) que aparecem como as 5 linhas verticais e as 5 horizontais da grade. A área total de planos-teste é dada por $A_0 = L_0*2*10 = 400\mu m^2$. Ocorrem 30 interseções entre as formas e as linhas verticais e 12 com as horizontais. Então, a estimativa de L_V é dada por (2.8): $\frac{2*(30+12)}{400} = 0,21\mu m/\mu m^3$ [RD99]. 29
- Figura 3.1 Esquema geométrico da determinação da curvatura, K , de α no ponto P [RD99]. 32

Figura 3.2	Exemplos de elementos de superfícies convexa, côncava e de sela. Note a posição das circunferências que determinam a curvatura [RD99].	35
Figura 3.3	Uma porção da superfície de uma pequena esfera (à direita) é mais curvada que uma porção da superfície de uma esfera de maior raio (esquerda).	37
Figura 4.1	a) Partículas convexas contribuem com dois eventos T_V^{++} . b) Cavidades contribuem com dois eventos T_V^{--} . c) Ocorrências de sela contribuem com dois eventos T_V^{+-}	43
Figura 4.2	a) A imagem circular de partículas convexas, independentemente de seu formato, é de $2\pi rad$, sendo a circunferência toda mapeada apenas uma vez. b) Se o formato do contorno da partícula não for convexo, então parte dela consistirá de segmentos de arcos convexas, e parte, de segmentos de arco côncavos e seções da circunferência unitária serão percorridas mais de uma vez. Elementos convexas excedentes cancelam-se com os côncavos, de forma que a imagem circular é de $2\pi rad$, independentemente do tamanho e do formato da partícula englobada no contorno.	45
Figura 4.3	Contagem dos eventos T_{A+} (vermelho) e T_{A-} (verde) na seção plana de uma estrutura qualquer, através de uma linha horizontal. Pode-se, assim, estimar a curvatura integral média, M , da superfície de interface das duas fases presentes [RD99].	46
Figura 4.4	Contagem do número de objetos (vermelho) e do número de cavidades fechadas (azul) para estimativa direta de M da superfície de interface das duas fases presentes [RD99].	47
Figura 4.5	Ilustração do volume de uma estrutura amostrado pelo <i>disector</i> , evidenciando o espaçamento h entre as seções planas, os eventos de ilha (I), ramificações (B) e cavidades fechadas (H), e mostrando como eles apresentam-se nos planos de referência de e comparação [GBB ⁺ 88].	49
Figura 4.6	Determinação do valor da CEP utilizando a Equação (2.1) para três casos distintos onde aparecem ilhas (I), cavidades (H) e ramificações (B). Note que a análise é feita nos dois sentidos, ou seja, invertem-se os planos de referência e de comparação e, por isso, a divisão por 2 [KG01].	50

Figura 4.7	Ilustração do uso do <i>disector</i> : sobreposição dos planos de referência e de comparação. Formas do tipo 6 são consideradas continuação do mesmo objeto e não caracterizam evento topológico. Eventos dos tipos 3 e 4 representam o início ou o fim de uma forma, dependendo de qual plano é tomado como superior. Eventos dos tipos 1 e 2 representam ramificações simples. O 5º evento revela o fundo de uma cavidade interna fechada [RD99].	51
Figura 4.8	Exemplo de planos de referência e de comparação em um <i>disector</i> . O terceiro quadro mostra a sobreposição de ambos e os eventos topológicos correspondentes. Em vermelho, eventos do tipo T_{++} ; em verde, T_{--} ; e em azul, T_{+-} . Aqui, também é mostrado um exemplo da utilização da área de guarda como artifício para descartar regiões que possivelmente sofreram danos durante o preparo da amostra [RD99].	51
Figura 4.9	Arestas de inclusão e de exclusão para o <i>disector</i> . As formas hachuradas são desconsideradas [RD99].	52
Figura 4.10	Ilustração de um campo de contagem imparcial. A estrutura possui cinco partículas 2D. Utilizando-se esta regra de contagem (com arestas de inclusão e de exclusão) cada uma delas é contada apenas uma vez.	53
Figura 4.11	Por que a altura h do <i>disector</i> precisa ser pequena suficiente para mostrar eventos topológicos relevantes. Em 1-a) vê-se uma conexão extra, que se mostra rompida em 1-b) , o que contribuiria com -1 para a Característica de Euler-Poincaré, CEP , da estrutura (T_{+-}). De 2-b) para 2-c) , vê-se o desaparecimento da cavidade, o que contribuiria com +1 para a CEP da estrutura (T_{--}). Note que a) e d) são idênticos em ambos os casos [KG01].	54
Figura 4.12	À esquerda, está ilustrado o caso onde, ao analisar as seções planas a e b , o observador certamente não contará eventos estereológicos ocorrendo entre eles. À direita, caso onde um objeto pode esquivar-se de ambas as seções planas, não sendo acertado por nenhum deles.	55

Figura 4.13	Exemplo da utilização do fracionador em duas dimensões. O objeto foi cortado em 10 fatias de tamanho e formato desiguais, tendo sido separado em 3 amostras, cada uma representando, portanto, uma fração de $\frac{1}{3}$ do objeto. Para cada amostra, foi feita uma estimativa imparcial do número total de partículas, que é obtida contando-se o número delas na amostra e multiplicando-se pelo recíproco da fração do objeto que a amostra representa. Por exemplo, na terceira amostra, existe um total de 8 partículas, o que resulta em uma estimativa de 24 para o objeto todo. A média das estimativas feitas para cada uma das 3 amostras é 23, o número exato do total de partículas [HR05].	58
Figura 6.1	Ilustração da microarquitetura trabecular, evidenciando seu aspecto poroso. a) Osso sadio. b) Osso cujas trabéculas mostraram-se rompidas e desconectadas por conta da perda de massa. . . .	69
Figura 6.2	Visualização da propagação tubular de uma trabécula.	79
Figura 6.3	Visualização de eventos topológicos que auxiliam no desenvolvimento do algoritmo para o cálculo da <i>CEP</i> [VK96].	80
Figura 7.1	16ª imagem tomográfica da vértebra A11. À direita, a ROI de 59 pixels×42 pixels e sua versão binarizada com o auxílio do algoritmo <i>InterMeans</i>	82
Figura 7.2	Ajuste linear da razão <i>ATT/AI</i> das 6 vértebras do indivíduo A. O primeiro gráfico utiliza todas as imagens disponíveis e, o segundo, padroniza a utilização de 12. Neste caso, a redução no número de imagens utilizadas posicionou os ajustes lineares de <i>ATT/AI</i> deste indivíduo acima de 0,5, o que corresponde a uma ótima relação de área trabecular.	87
Figura 7.3	Ajuste linear da <i>CEP</i> das 6 vértebras do indivíduo A. O primeiro gráfico utiliza todas as imagens disponíveis e, o segundo, padroniza a utilização de 12. Percebe-se que as declividades no segundo gráfico são mais sutis que no primeiro, o que indica que a diferença no número de imagens pode, sim, ter afetado os resultados do primeiro gráfico. Com base no segundo, pode-se concluir que a conectividade do indivíduo A é, no geral, muito boa, uma vez que seus ajustes lineares assumem todos valores negativos. Além disso, algumas das vértebras atingem valores de <i>CEP</i> muito baixos, o que indica que sua rede de trabéculas é bastante interligada. Aliado a isso, os resultados obtidos na Figura 7.2 sugerem uma boa qualidade óssea.	88

- Figura 7.4 Ajuste linear da razão ATT/AI das 6 vértebras do indivíduo B. O primeiro gráfico utiliza todas as imagens disponíveis e, o segundo, padroniza a utilização de 12. Não há grandes diferenças entre os dois gráficos. Ambos apontam para uma baixa área trabecular relativa. 89
- Figura 7.5 Ajuste linear da CEP das 6 vértebras do indivíduo B. O primeiro gráfico utiliza todas as imagens disponíveis e, o segundo, padroniza a utilização de 12. Com exceção da 15^a vértebra, os ajustes das demais não variaram muito de um gráfico para o outro. Analisando-se os valores encontrados, a conectividade do indivíduo B parece não ser satisfatória, já que as retas ajustantes assumem basicamente valores positivos, e atingem valores bastante altos. Este fato, aliado às informações da Tabela 7.2 e da Figura 7.4, reforça o parecer de que B apresenta má qualidade óssea. 90
- Figura 7.6 Ajuste linear da razão ATT/AI das 3 vértebras do indivíduo C. O primeiro gráfico utiliza todas as imagens disponíveis e, o segundo, padroniza a utilização de 12. O segundo gráfico indica que este indivíduo dispõe de uma razão saudável de área trabecular. . . . 91
- Figura 7.7 Ajuste linear da CEP das 3 vértebras do indivíduo C. O primeiro gráfico utiliza todas as imagens disponíveis e, o segundo, padroniza a utilização de 12. Embora com poucas informações sobre o indivíduo C, percebe-se que, apesar de suas DMOs se apresentarem um pouco abaixo do limiar saudável (Tabela 7.2), este apresenta uma conectividade razoavelmente boa em todas as vértebras analisadas, bem como uma boa relação de massa trabecular em relação à massa medular (Figura 7.6). Ou seja, este indivíduo parece ter sofrido perda de massa, mas sua qualidade óssea parece não ter sido afetada. 92
- Figura 7.8 Ajuste linear da razão ATT/AI das 8 vértebras do indivíduo D. O primeiro gráfico utiliza todas as imagens disponíveis e, o segundo, padroniza a utilização de 12. Com exceção de D13, as demais vértebras apresentam ótima relação de área trabecular. 93

- Figura 7.9 Ajuste linear da *CEP* das 8 vértebras do indivíduo D. O primeiro gráfico utiliza todas as imagens disponíveis e, o segundo, padroniza a utilização de 12. Comparando-se ambos os gráficos, percebe-se que as principais diferenças estão nas retas ajustantes de D13 e D14. Mesmo assim, nota-se que os valores da *CEP* deste indivíduo são predominantemente negativos, embora com valores não muito baixos. Isto significa que a conectividade das trabéculas destas vértebras, no geral, são razoavelmente boas, embora as DMOs deste indivíduo tenham tido resultados insatisfatórios (Tabela 7.2). Embora sua razão *ATT/AI* tenha mostrado bons resultados (Figura 7.8), este é um indivíduo que mereceria especial atenção devido a sua perda de massa óssea aliada a conectividade não compensatória dessa defasagem. 94
- Figura 7.10 Ajuste linear da razão *ATT/AI* das 12 vértebras do indivíduo E. O primeiro gráfico utiliza todas as imagens disponíveis e, o segundo, padroniza a utilização de 12. Do primeiro para o segundo gráfico, as principais mudanças ocorreram nos ajustes de E16 e E23. Mesmo assim, a razão *ATT/AI* deste indivíduo sugere que houve grande perda de massa óssea já que, com exceção de E26, os demais ajustes praticamente não passam de 0,5. 95
- Figura 7.11 Ajuste linear da *CEP* das 12 vértebras do indivíduo E. O primeiro gráfico utiliza todas as imagens disponíveis e, o segundo, padroniza a utilização de 12. As DMOs das vértebras deste indivíduo apontam para a normalidade (Tabela 7.2), mas seus valores de *CEP* são demasiadamente elevados sugerindo acentuada perda de conectividade de suas trabéculas. Outro fato importante é o resultado obtido na Figura 7.10, onde o indivíduo E claramente possui muito mais área medular do que área trabecular nas vértebras analisadas. 96
- Figura 7.12 Ajuste linear da razão *ATT/AI* das 10 vértebras do indivíduo Y. O primeiro gráfico utiliza todas as imagens disponíveis e, o segundo, padroniza a utilização de 12. Y1 foi a vértebra que mais apresentou diferenças entre o primeiro e o segundo gráfico. Apenas 3Y pareceu ter uma boa razão *ATT/AI*, já que as demais vértebras apresentaram valores um tanto baixos. 97

- Figura 7.13 Ajuste linear da *CEP* das 10 vértebras do indivíduo Y. O primeiro gráfico utiliza todas as imagens disponíveis e, o segundo, padroniza a utilização de 12. Assim como o indivíduo E, Y possui DMOs satisfatórias (Tabela 7.2), mas, por outro lado, a *CEP* de suas vértebras mostra conectividade bastante baixa e a Figura 7.12 revela razão de área trabecular insatisfatória. 98
- Figura 8.1 Seleção de ROIs de algumas vértebras cuja análise de DMO fornece um diagnóstico demasiadamente superficial, e o risco de fratura do indivíduo pode ser erroneamente apontado. Os sujeitos E e Y, por exemplo, apresentam pouca ou nenhuma perda de massa óssea, mas o estudo da microarquitetura trabecular revelou baixa conectividade e relação de área trabecular insatisfatória para o quadro de ambos. A baixa DMO do paciente C sugere grande perda de massa óssea, mas a análise da *CEP* de suas trabéculas e da relação de área trabecular revelaram uma boa estrutura de sustentação, o que, provavelmente, compensaria a perda de massa óssea na resistência a fraturas. Já o indivíduo D, mostrou uma boa estrutura, com uma conectividade razoável, mas sua DMO mostra que este sofreu acentuada perda de massa óssea. 100

Lista de Tabelas

Tabela 2.1	<i>Possíveis formas encontradas em uma microestrutura de três fases; a da Figura 2.2 possui apenas duas.</i>	6
Tabela 5.1	<i>Exemplo de crescimento de regiões utilizando “pontos-semente”. a) Matriz da imagem 5×5 original; b) resultado da segmentação utilizando uma diferença absoluta de menos de 3 entre os níveis de cinza de intensidade; c) resultado utilizando uma diferença absoluta de menos de 8.</i>	67
Tabela 7.1	<i>Informações disponíveis acerca da origem das vértebras analisadas.</i>	83
Tabela 7.2	<i>Nas duas primeiras tabelas, constam o número de imagens (NI) tomografadas, o tamanho das ROIs em pixels de largura por pixels de altura e os valores de DMO das 45 vértebras de 6 indivíduos, A, B, C, D, E e Y. À direita, as vértebras ordenadas crescentemente quanto aos valores de DMO.</i>	86

LISTA DE SIGLAS

CComp	Programa de Pós-Graduação em Ciências Computacionais
CEP	Característica de Euler-Poincaré
DMO	Densidade Mineral Óssea
DXA	<i>Dual energy X-ray Absorptiometry</i>
IGG	Instituto de Geriatria e Gerontologia
IM	Instituto de Matemática
IME	Instituto de Matemática e Estatística
INF	Instituto de Informática
IUR	Isotrópico, Uniforme e Randômico
PPGCC	Programa de Pós-Graduação em Ciência da Computação
PPGGB	Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica
PPGMAp	Programa de Pós-Graduação em Matemática Aplicada
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
ROI	Região de Interesse
UCS	Universidade de Caxias do Sul
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

RESUMO

A osteoporose é uma degradação óssea prevalente que é caracterizada pela perda de massa óssea e deteriorização da microarquitetura do osso trabecular. A perda da massa óssea é normalmente medida por meio da Densidade Mineral Óssea (DMO), porém é fato que esta medida não é suficiente para identificar completamente a fragilidade óssea e, conseqüentemente, o risco de fratura de um paciente. Portanto, o estudo da estrutura trabecular tornou-se de grande importância. Neste trabalho, é feita uma análise da conectividade trabecular, utilizando-se, para isso, ajustes lineares dos valores da Característica de Euler-Poincaré (*CEP*), calculada para pares de imagens tomográficas. Relacionando os achados com dados clínicos e medidas da DMO, percebeu-se que a *CEP* não está correlacionada aos mesmos, nem diretamente com a razão área trabecular/medula. São ainda abordados aqui conceitos de Estereologia, discutidos alguns de seus métodos, bem como algumas técnicas de processamento de imagens, que são ferramentas de estudo dos parâmetros histomorfométricos utilizados na investigação da microarquitetura trabecular.

ABSTRACT

Osteoporosis is a prevalent bone disorder that is characterized by the loss of bone mass and the deterioration of the trabecular bone microarchitecture. The loss of bone mass is normally measured by the Bone Mineral Density (BMD), however it is known that this measure is not sufficient to fully identify the bone fragility and its consequent fracture risk for a patient. Therefore, the study of the bone structure has become of great importance nowadays. In this work, we investigate the applicability of the Euler-Poincaré Characteristic (*CEP*) to estimate the trabecular bone connectivity, using, for these, pairs of tomographic images. The result will be compared to clinic data and measure of BMD. Was noticed that the *CEP* values are not related with them, even in direct way, with the ratio between trabecular and no trabecular areas. Besides, an introduction to Stereology concepts are provided and some image processing techniques are discussed. These are important tools to the study of histomophometric parameters that are used to investigate the trabecular microarchitecture.

1 INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma doença silenciosa caracterizada pela perda de massa óssea e pela deterioração da microarquitetura do osso trabecular, que levam à fragilidade óssea e aumento do risco de fratura. Com o aumento da expectativa de vida, a osteoporose tornou-se um problema de saúde pública.

A perda da massa óssea é caracterizada em todo o mundo pela medição da densidade mineral óssea (DMO), pelo exame de *Dual energy X-ray Absorptiometry* (DXA), o padrão-ouro para o diagnóstico da osteoporose. Porém, a DMO reflete a quantidade de osso por superfície, e esse é apenas um aspecto da qualidade óssea. Embora seja importante na determinação da resistência mecânica, sabe-se que outros fatores também são importantes para estabelecer o risco de fratura de um paciente, como, por exemplo, a microarquitetura trabecular. O aspecto poroso do osso, onde as trabéculas estão incrustadas em uma medula, oferece uma similaridade com um meio esponjoso. Assim, 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 conseqüente risco de fratura.

A conectividade é uma propriedade geométrica que oferece informações sobre a estrutura do espaço de poro; e a Característica de Euler-Poincaré (CEP) é uma medida geométrica que pode oferecer uma estimativa do grau de sua conectividade. Para uma estrutura tridimensional, a CEP é definida pelo número de partes isoladas menos a conectividade. Como é uma quantidade de dimensão zero, esta deve ser estimada usando um dispositivo 3D [Mou02]. Para tanto, utilizam-se conceitos da estereologia, que é basicamente, uma forma de obter informações quantitativas e qualitativas de um objeto no espaço através de suas imagens em duas dimensões; cada par de imagens forma um *disector* [Ste84]. Além da estereologia, conta-se,

agora, com fortes aliados, tais como potentes microscópios eletrônicos, armazenamento e processamento de imagens, tomografia computadorizada de alta definição e ressonância magnética.

Este trabalho tem por objetivo investigar a aplicabilidade da Característica de Euler-Poincaré na estimativa da conectividade da estrutura do osso trabecular. Tal investigação é parte de um objetivo maior, que é estimar o risco de fratura de pacientes com índices elevados de perda de massa óssea. Para tanto, é feita inicialmente uma explanação sobre estereologia e seus principais métodos, com ênfase no conceito e utilização do *disector* (Capítulo 2); após, é tomada uma abordagem matemática da Característica de Euler-Poincaré, embasada na geometria diferencial (Capítulo 3) e, a seguir, são discutidos algoritmos e métodos de obter-se correta e adequadamente as informações importantes das imagens disponíveis; entre os assuntos abordados estão diferentes técnicas de binarização de imagens, procedimento este que é determinante para a obtenção dos resultados (Capítulo 5). Os Capítulos 6 e 7 são destinados aos estudos de casos e aos resultados que foram obtidos neste trabalho de pesquisa, respectivamente.

2 ESTEREOLOGIA

2.1 Principais Definições

Nesta seção, será apresentada uma introdução aos principais conceitos da Estereologia, os quais serão úteis para o desenvolvimento do trabalho.

A Estereologia estuda as relações geométricas existentes entre a estrutura de um objeto no espaço e imagens suas em duas dimensões, as chamadas *seções planas*. Ou ainda, segundo Gundersen et al. [GBK⁺88], os métodos estereológicos são ferramentas precisas para obter-se informações quantitativas sobre estruturas tridimensionais, baseando-se principalmente em observações feitas em seções bidimensionais.

A geometria das formas vistas na imagem 2D pode ser quantificada pela medida de uma ou mais propriedades, que podem ser definidas individualmente ou em um conjunto de formas.

Microestruturas são corpos não regulares, caracterizados por arranjos não randômicos dos conjuntos das formas que o caracterizam.

Os *elementos básicos da microestrutura* são: objetos 3D com volume, superfícies 2D, formas 1D e formas 0D (pontos no espaço). Quando uma seção plana intercepta formas na microestrutura, a imagem mostra traços dessas formas que têm a dimensão reduzida em um: os objetos 3D mostram-se como formas bidimensionais, formas bidimensionais apresentam-se com uma dimensão, formas em 1D apresentam-se como pontos (0D) e os pontos geralmente não chegam a ser amostrados.

Os elementos físicos que formam uma microestrutura são chamados de *fases*. Cada fase é um conjunto de formas no espaço que tem a mesma formação química

e a mesma estrutura atômica, molecular, cristalina ou biológica. Geralmente denominadas fases α , β , γ etc (Figura 2.1).

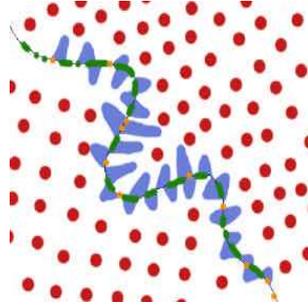


Figura 2.1: Estrutura de cinco fases: uma fase matriz (fundo branco), uma fase granular (vermelho) e outras três fases (amarela, azul e verde) dispostas ao longo do contorno ondulatório da célula [RD99].

Uma amostra a ser analisada é dita *IUR* se ela tiver as seguintes propriedades:

- todas as direções de medida são igualmente representadas (isotrópica);
- todas as porções da estrutura são igualmente representadas (uniforme);
- e
- não existe intenção na escolha das regiões da estrutura a serem analisadas (randômica).

A exatidão nas medidas de uma amostra *IUR* depende exclusivamente de exigências estatísticas.

Algumas vezes é útil tomar amostras ou medir áreas de locais específicos da estrutura (não uniforme e não randômico), ou então, fazer cortes seguindo uma certa orientação (não isotrópico). Por exemplo, ao amostrar uma célula exigindo-se que o núcleo seja analisado, ou quando as partículas de uma estrutura estão aglomeradas mais em uma parte dela do que em outras, ou no caso de tecidos cujas fibras têm orientação conhecida.

2.2 Propriedades Geométricas das Formas de uma Estrutura no Espaço

As propriedades geométricas das formas encontradas em uma estrutura tridimensional podem ser *métricas* ou *topológicas*.

- Propriedades Métricas: volume (V), área de superfície (S), comprimento de linha (L) e curvatura média (H) (ou a curvatura integral média (M)). É útil que estas propriedades apresentem-se normalizadas (por unidade de volume):

V_V - fração de volume de uma fase (adimensional - volume por unidade de volume);

S_V - área de superfície por unidade de volume (m^{-1});

L_V - comprimento de linha por unidade de volume (m^{-2});

M_V - curvatura integral média (m^{-2});

S_S - fração de área de superfície de uma fase (adimensional - área por unidade de área);

L_S - comprimento de linha por unidade de área de superfície (m^{-1});

P_S - número de pontos por unidade de área de superfície (m^{-2});

L_L - fração de comprimento de linha (adimensional);

P_L ou N_L - número de pontos por unidade de comprimento (m^{-1});

P_P - fração de pontos (adimensional).

- Propriedades Topológicas: número por unidade de volume (N_V) e conectividade (C_V); ambas com unidade m^{-3} e independentes do formato ou do tamanho da forma sob análise.

A *conectividade*, C , é o número de conexões no interior da microestrutura e pode ser calculada através da diferença entre as chamadas ramificações (ou *bridges*), B , e as cavidades fechadas (ou *holes*), H : $C = B - H$. Pode ser interpretada como o número máximo de ra-

mificações que podem ser removidas sem separar a estrutura em partes desconexas [CG04].

Chama-se *Característica de Euler-Poincaré*, CEP , de uma estrutura, a diferença entre o número de suas partes conexas e a conectividade global do conjunto de formas que a constituem:

$$CEP = N - C = I + H - B \quad (2.1)$$

onde I são os eventos de ilhas, extremidades de objetos detectadas na estrutura. Este tema será discutido detalhadamente nas Subseções 4.3 e 6.2.

2.3 Caracterização de Microestruturas

Em [RD99] são especificados três aspectos de microestruturas, caracterizados como: *Estado Qualitativo Microestrutural*, *Estado Quantitativo Microestrutural* e *Estado Topográfico Microestrutural*.

- Estado Qualitativo Microestrutural: lista de todas as classes de conjuntos de formas que são encontradas na estrutura, sejam elas 3D, 2D, 1D ou 0D (explicitação das fases e formas presentes, conforme ilustram a Tabela 2.1 e a Figura 2.2).

Classe da forma	Três fases ($\alpha + \beta + \gamma$)
volumes	α, β, γ
superfícies	$\alpha\alpha, \alpha\beta, \alpha\gamma, \beta\beta, \beta\gamma, \gamma\gamma$
linhas triplas	$\alpha\alpha\alpha, \alpha\alpha\beta, \alpha\alpha\gamma, \alpha\beta\beta, \alpha\gamma\gamma, \beta\beta\beta, \beta\beta\gamma, \beta\gamma\gamma, \gamma\gamma\gamma, \alpha\beta\gamma$
pontos quádruplos	$\alpha\alpha\alpha\alpha, \alpha\alpha\alpha\beta, \alpha\alpha\alpha\gamma, \alpha\alpha\beta\beta, \alpha\alpha\gamma\gamma, \alpha\beta\beta\beta, \alpha\gamma\gamma\gamma, \beta\beta\beta\beta, \beta\beta\beta\gamma, \beta\beta\gamma\gamma, \beta\gamma\gamma\gamma, \gamma\gamma\gamma\gamma, \alpha\alpha\beta\gamma, \alpha\beta\beta\gamma, \alpha\beta\gamma\gamma$

Tabela 2.1: *Possíveis formas encontradas em uma microestrutura de três fases; a da Figura 2.2 possui apenas duas.*

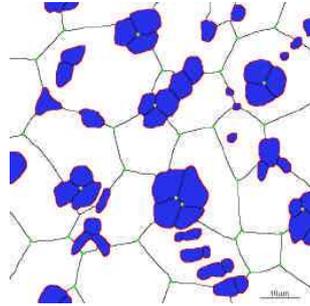


Figura 2.2: Exemplo de microestrutura: metal de duas fases. Azul: fase β ; vermelho: interface $\alpha\beta$; verde: pontos triplos $\alpha\alpha\alpha$; amarelo: ponto triplo $\beta\beta\beta$ [RD99].

- Estado Quantitativo Microestrutural: estima valores das propriedades geométricas (métricas e topológicas) associadas com cada classe de conjunto de formas.
- Estado Topográfico Microestrutural: medida quantitativa de não uniformidades na distribuição e na disposição dos conjuntos de formas que compõem a microestrutura. Destacam-se os *gradientes*, que são as variações de propriedades geométricas com a posição na estrutura, e a *anisotropia*, que é a tendência de serem as formas mais ou menos alinhadas em uma ou mais direções de preferência no espaço. Imaginemos que a superfície das formas de uma estrutura é dividida em elementos de área e que de cada um saia um vetor normal a ele. Se esses vetores puderem ser distribuídos uniformemente sobre a esfera que descreve todas as possíveis orientações no espaço, então o conjunto de formas é chamado *isotrópico*. Se a distribuição de vetores não é uniforme na esfera, então tendem a amontoarem-se em certas direções e o conjunto de formas apresenta anisotropia.

2.4 Eficiência dos Procedimentos Estereológicos

O *desvio padrão* é a base para estimar a exatidão do valor médio calculado e decidir se um número suficiente de campos da estrutura foi analisado. O *valor médio* das contagens em uma amostra estima o *valor esperado* destas para a população inteira de possíveis seções da estrutura analisada. Estas relações de valor esperado na estereologia são poderosas porque não requerem suposições acerca da geometria das formas na estrutura, no entanto, é fundamental que as amostras sejam IUR.

Segundo [Mou02], é preferível escolher a amplificação da amostra e a escala das grades tais que poucas contagens sejam feitas em um grande número de campos amostrais do que um grande número de contagem em uns poucos campos. Esta estratégia não somente aumenta as regiões do espécime que serão amostradas, como também minimiza as chances de erros de contagem.

A exatidão da estimativa de um valor médio é dada pelo intervalo de confiança associado àquele conjunto de amostras:

$$IC = \bar{x} \pm 2\sigma_{\bar{x}}$$

onde $\sigma_{\bar{x}}$ é o erro padrão da média computada para aquele conjunto de amostras.

Por exemplo, um intervalo de confiança de 95% significa que a probabilidade de a média verdadeira da população estar dentro deste intervalo é de 0,95. A exatidão com que a média da população é estimada é então determinada por $\sigma_{\bar{x}}$. Esta propriedade é computada do desvio padrão das medições das amostras, σ_x , dado por

$$\sigma_{\bar{x}} = \frac{\sigma_x}{\sqrt{n}}$$

onde n é o número de campos analisados nas amostras. Quanto menor o intervalo de confiança, mais exata é a estimativa. Segundo [RD99], pode-se aumentar a exatidão de duas maneiras:

- aumentando o número de campos n analisados na amostragem (quadruplicando o número de campos, diminui-se o intervalo de confiança pela metade, e o erro associado à estimativa também reduz-se pela metade); e
- diminuindo-se o desvio padrão do conjunto de amostras, que é uma estimativa da raiz quadrada da variância da população.

2.5 Procedimentos para Amostragens Isotrópicas, Uniformes e Randômicas (IUR)

2.5.1 Grades de pontos-teste

Pontos-teste não têm como ser isotrópicos, uma vez que não têm direção. Além disso, se a estrutura apresenta algum tipo de regularidade, então o uso de uma grade de pontos regular produzirá um resultado tendencioso. O ideal é que a distância entre os pontos da grade seja suficiente para que eles não caiam na mesma região da estrutura.

Além da grade regular de pontos-teste, outra opção é a grade de pontos randômicamente dispostos, o que é mais utilizado no estudo da tendência das formas em uma imagem amontoarem-se ou evitarem-se. O desvio padrão de P_P obtido utilizando-se uma grade randômica é e vezes maior (aproximadamente 2,718) que o desvio padrão utilizando-se uma grade regular. Note que isto não significa que o resultado obtido com pontos randômicos é tendencioso ou errado, apenas que requer maior trabalho, uma vez que mais pontos precisam ser amostrados para que se atinja a precisão na medida equivalente à atingida pelos pontos regularmente dispostos.

2.5.2 Planos Isotrópicos

Linhas-teste são utilizadas para amostrar superfícies e volumes, no entanto, não podem, em geral, ser passadas através da estrutura sem que esta antes seja seccionada em planos, onde as linhas serão dispostas. Como a maioria das estruturas reais não são somente anisotrópicas, como também possuem gradientes, a amostragem uniforme é muito importante e requer técnicas apropriadas.

Utilizando uma série de seções planas paralelas, a amostragem da estrutura limitar-se-á a uma única orientação, uma vez que, fatiado, o objeto não poderá ser reconstituído para ser cortado em outra orientação. Na prática, isto significa que vários espécimes serão necessários para que se obtenha uma certa variedade de orientações, o que requer, por consequência, que a população de espécimes tenha algum eixo de orientação próprio discernível que possa ser utilizado como base para selecionar as orientações a serem utilizadas.

Suponhamos que a população de espécimes a ser amostrada possua um eixo natural. Distribuir as orientações randomicamente e uniformemente no espaço tridimensional para um número arbitrário de orientações não é fácil. No entanto, pode-se utilizar as direções normais às faces de “recipientes” na forma de um dos cinco poliedros regulares: o tetraedro, o cubo, o octaedro, o dodecaedro e o icosaedro, os quais amostram uniformemente $m = 4, 3, 4, 6$ e 10 orientações distintas, respectivamente. Para isso, é necessário embeber em resina, por exemplo, um espécime em cada um dos m protótipos, para que cada espécime amostre uma das m orientações; deve-se observar, ainda, que todos os m espécimes tenham seus eixos naturais identicamente posicionados nos m recipientes, para que, então, possam ser cortados nas direções perpendiculares às distintas $2m$ faces do poliedro escolhido para a amostragem (com exceção do tetraedro, que possui m faces). Ver Figura 2.3 e, para maiores detalhes, consultar [RD99].

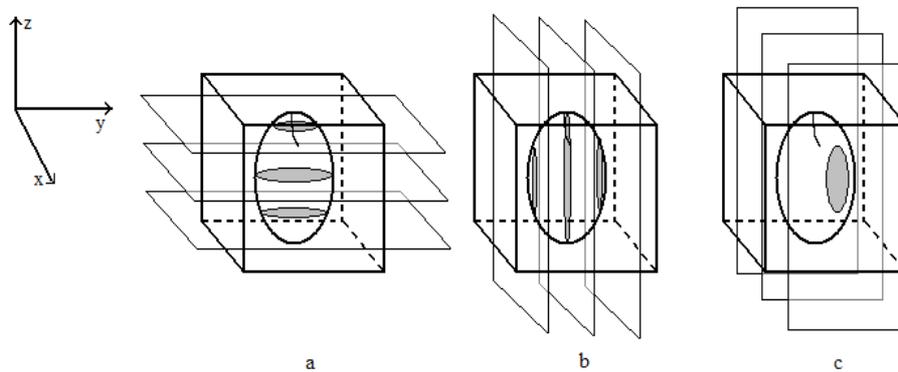


Figura 2.3: Utilização de $m = 3$ protótipos em formato cúbico ($2m$ faces) para amostrar o objeto em 3 distintas direções. Para fixá-lo, pode-se embê-lo em resina, por exemplo. Note que os 3 objetos tiveram seus eixos naturais posicionados identicamente dentro de cada recipiente. Após, cada protótipo foi seccionado em uma das direções: **a)** teve seções paralelas ao plano xy ; **b)** teve seções paralelas ao plano xz ; e **c)** teve seções paralelas ao plano yz .

Este procedimento é adequado quando se dispõe de m espécimes. Quando apenas um espécime precisa ser amostrado isotropicamente com planos, um procedimento equivalente primeiro subdivide o objeto em m porções, para, então, prosseguir com o procedimento descrito anteriormente. O perigo deste procedimento é que a orientação da estrutura dentro do objeto pode variar de acordo com a localização e, já que a orientação amostrada também varia, resultar em uma medição tendenciosa. Para contornar, pode-se amostrar porções correspondentes em alguns espécimes com diferentes orientações.

Se não for necessário que o espécime seja uniformemente amostrado em cada orientação, pode-se cortar a então chamada *seção vertical* na direção do eixo natural do espécime, mas com orientação uniformemente randômica, conforme mostrado na Figura 2.4. Este método tem a vantagem de que cada seção vertical tem todas as orientações de linhas da vertical até o equador. Um plano-teste através de um espécime tem uma única orientação, de modo que, para amostrar diversas

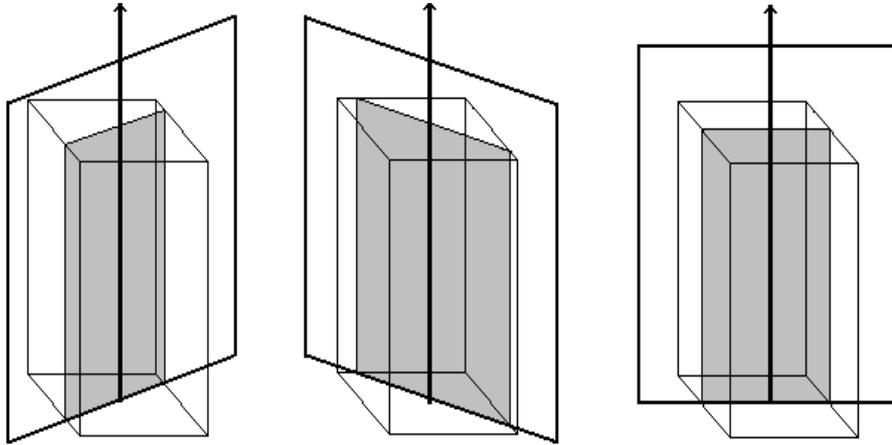


Figura 2.4: Seções verticais cortadas na direção do eixo natural do espécime (flecha). Cada seção é rotacionada randomicamente em diferentes ângulos azimutais [RD99].

orientações, é necessário seccioná-lo várias vezes, o que nem sempre é viável e/ou possível.

Obtida a seção vertical, corta-se uma superfície perpendicular à face obtida com a seção vertical, a seção horizontal, e, a partir de agora, os cortes são feitos em um ângulo randômico uniforme (Figura 2.5).

Obtidas as seções verticais e horizontais, outro caminho é que os próximos cortes sejam feitos em ângulos ponderados por seno. Esta ponderação pode ser obtida gerando-se um número randômico R em $[-1,1]$ e calculando-se $\kappa = \arcsin(R)$, com $\kappa \in [-90^\circ, 90^\circ]$ e representando um ângulo a partir da vertical. Torna-se mais fácil a implementação deste método criando-se uma grade de linhas radiais que não são uniformemente espaçadas, mas sim, com a ponderação por seno. Este procedimento é chamado *orientator* (Figura 2.6) e, obviamente, uma única seção perpassa o objeto inteiramente, não amostrando-o uniformemente no espaço.

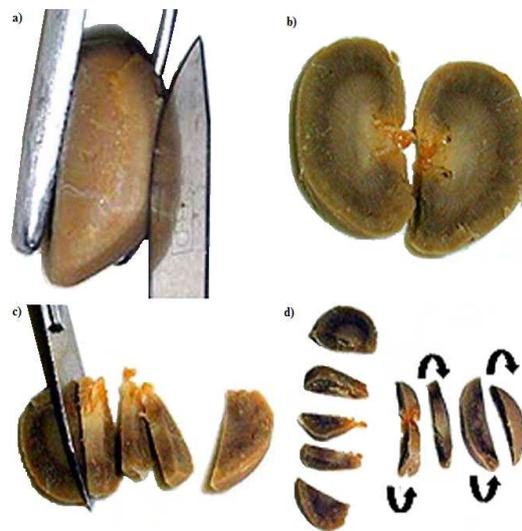


Figura 2.5: Aplicação do método das seções verticais para o rim de um rato. **a)** Uma direção de referência reconhecível é escolhida no espécime macroscópico e tomada como fixa (a direção vertical). **b)** É feita uma seção paralela à direção vertical, com orientação qualquer. **c)** Após, uma parte do rim é selecionada para sofrer cortes perpendiculares à seção vertical, mas com orientação escolhida com probabilidade ponderada por seno (ou randômica) e uniforme. **d)** As fatias são, então, rotacionadas isotropicamente no plano horizontal. Para análise dos campos amostrais, utilizam-se linhas cicloides (Figura 2.10) [dL03].

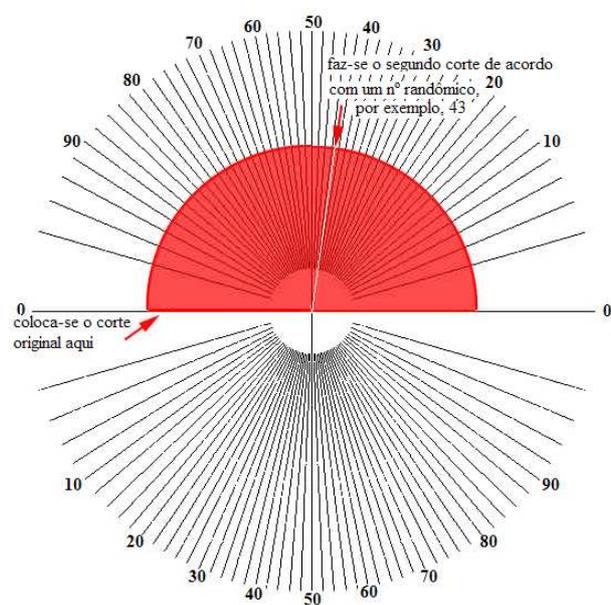


Figura 2.6: O *orientator*. Feita a seção vertical no espécime, realiza-se um corte perpendicular a ele, a seção horizontal, localizando-o ao longo da linha 0-0 com a face resultante da seção vertical voltada para baixo. Gerando-se um número randômico de 0 a 99, seleciona-se a direção de corte, como mostrado. Repetindo-se este processo produz-se planos que são isotrópicos (orientações uniformemente amostradas) [RD99].

2.5.3 Linhas-teste Isotrópicas

Se as seções planas no espécime forem IUR, então, desenhando-se nelas linhas IUR, produzir-se-ão linhas-teste que têm distribuição IUR no espaço tridimensional. Uma grade com tal propriedade pode ser obtida, por exemplo, desenhando-se um conjunto de linhas paralelas, com espaçamento adequado e, a cada amostragem, variando-lhes o espaçamento por uma fração randômica e rotacionando-as por um dado ângulo randômico uniforme entre 0° e 180° . Note que uma grade de linhas radiais com espaçamento angular uniforme posicionada no centro do campo sob análise não se caracteriza como sendo IUR, uma vez que não amostra uniformemente a área (mais linhas amostram o centro que a periferia).

Em todas as seções planas verticais cortadas em diferentes ângulos de rotação, a região em torno dos pólos é densamente amostrada, ao contrário da região próxima ao equador. Isso pode ser visualizado na Figura 2.7, onde a área A obviamente é muito menor que a B , embora ambas correspondam à variação $\Delta\theta$. Para compensar esse “amontoamento” de cortes nesta região, lança-se mão de uma grade de linhas radiais dispostas segundo o método da ponderação por seno, conforme mostra a Figura 2.8. Na Figura 2.9, a esfera de orientações ilustrando tal situação. Para gerar esta grade, o ângulo a partir da vertical é calculado com $\arcsin(R)$, onde R é um número randômico em $[-1,1]$.

Este método é adequado para ser utilizado com estruturas que são randomicamente amostradas, uma vez que o número de linhas, seus espaçamentos e os ângulos na direção horizontal (uniforme) e na direção vertical (ponderado por seno) podem ser calculados com base na precisão requerida. Entretanto, se utilizadas grades de linhas retas, o procedimento requer mais orientações horizontais e, portanto, mais seções verticais, que um outro procedimento semelhante, que utiliza linhas cicloides. Isto, obviamente, não se aplica a experimentos em que comprimentos de intercep-

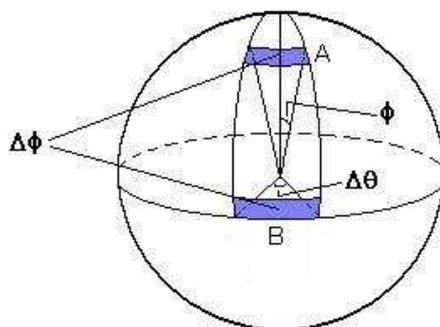


Figura 2.7: Note que a área A , correspondente à colatitude ϕ e à longitude $\Delta\theta$ é muito menor que a área B , correspondente à colatitude $\phi + \Delta\phi$ e à mesma longitude. Isso faz com que pontos próximos dos pólos tenham maior probabilidade de serem amostrados do que pontos próximos ao equador.

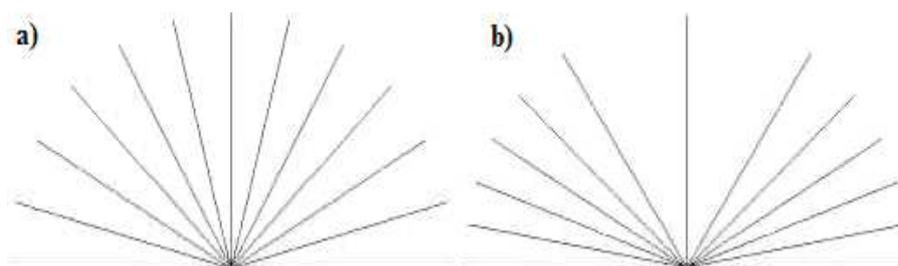


Figura 2.8: **a)** Grade radial com ângulo de rotação uniforme. **b)** O mesmo número de linhas-teste, porém, espaçadas segundo o método da ponderação por seno, como alternativa para compensar a amostragem não uniforme das regiões próximas aos pólos (Figura 2.7), que é feita pelas seções verticais com variação uniforme do ângulo de rotação [RD99].

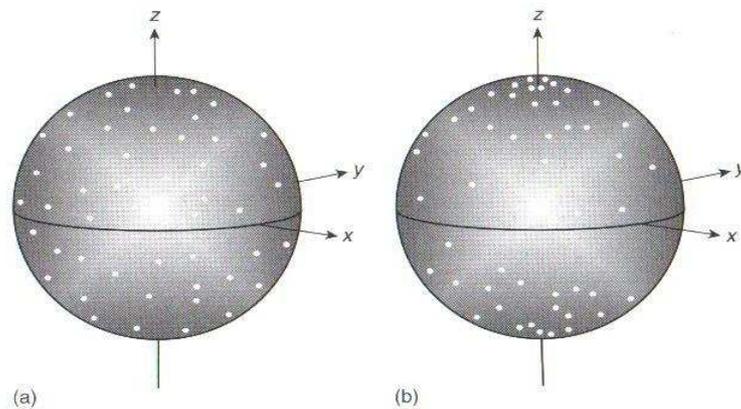


Figura 2.9: Em **a)**, a esfera de orientações espaçadas segundo o método da ponderação por seno (segunda ilustração da Figura 2.8). Em **b)**, o mesmo número de linhas-teste ilustrando seu amontoamento quando utilizada grade como na primeira ilustração da Figura 2.8, aliada ao método das seções verticais [HR05].

tos de linhas serão medidos, mas é apropriado para contagem de interseções entre linhas-teste (cicloides) e superfícies dentro da estrutura.

As cicloides são curvas adequadas a esta aplicação porque elas têm exatamente a ponderação por seno como utilizada para gerar as linhas radiais citadas: é o caminho descrito por um ponto na borda de uma circunferência rolando. Sua equação paramétrica é dada por:

$$x = a(t - \text{sent})$$

$$y = a(1 - \text{cost})$$

onde a é o raio da circunferência e t é um parâmetro real.

Esta curva tem a propriedade que a fração de seu comprimento apontado em uma dada direção decresce conforme a tangente rotaciona a partir da vertical de maneira que é proporcional ao seno do ângulo com a vertical; ou seja: têm distribuição de orientação proporcional ao seno do ângulo que sua tangente faz com o eixo vertical [Lac00]. Além disso, o comprimento de um arco cicloide é o dobro de

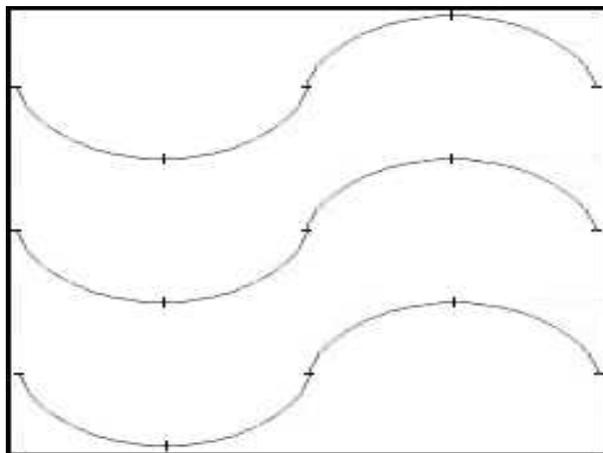


Figura 2.10: Uma grade de arcos cicloides. Posicionada sobre a seção vertical de uma estrutura (a direção vertical do espécime paralela à direção vertical da figura), as linhas amostram isotropicamente as direções em 3D [RD99].

sua altura e ele tem somente uma pequena fração de linha com orientação vertical e consideravelmente grande extensão que está próxima da horizontal e compensa exatamente a tendência vertical das seções planas verticais.

Distribuindo-se uma série de arcos cicloides (em todas as quatro possíveis orientações obtidas pela reflexão) sobre a seção vertical e realocando a grade dessas linhas, obtém-se uma amostra IUR em três dimensões. Note que a grade de cicloides não é quadrada, é mais larga que alta (Figura 2.10); assim, o deslocamento da grade precisa ser feito por uma fração randômica do tamanho dela em cada direção. Usualmente, o tamanho da grade é tal que seja raro mais que uma linha interceptar o mesmo elemento da estrutura.

2.6 Medições Estereológicas Clássicas

2.6.1 Estruturas Bidimensionais: Fração de Área (A_A) via Contagem de Pontos

O evento de interesse que resulta da interação do teste amostral com a estrutura é “pontos que acertam a fase β ”, por exemplo.

$$\langle P_P \rangle^\beta = A_A^\beta \quad (2.2)$$

onde $\langle P_P \rangle^\beta$ é o valor esperado da fração de pontos que acertam a fase β e A_A^β é a fração de área de β na microestrutura. Figura 2.11.

Fazendo-se a contagem para várias amostras pode-se calcular o valor médio de acertos em β , \bar{P} , e um correspondente valor médio da amostra para a fração de pontos:

$$\begin{aligned} \bar{P}_P &= \frac{\bar{P}}{P_T} \\ \langle P_P \rangle^\alpha &= 1 - \langle P_P \rangle^\beta \end{aligned} \quad (2.3)$$

onde (2.3) é válida somente no caso de uma estrutura de duas fases, α e β , e P_T é o número total de pontos da grade.

O método da contagem dos pontos é mais eficiente quando o espaçamento da grade é tal que pontos adjacentes raramente caem dentro da mesma forma, célula ou região da imagem (amostra independente da estrutura). A dimensão da grade não influencia na estimativa da área, mas sim, na exatidão da mesma.

Considere, agora, o problema de estimar a área de um objeto bidimensional:

$$A = l_0^2 \langle P \rangle \quad (2.4)$$

onde l_0 é o espaçamento da grade e $\langle P \rangle$, os pontos que o acertam. Figura 2.12.

A vantagem deste método é que quando os eventos produzidos são todos independentes, o número de pontos que caem sobre a forma de interesse pode estimar

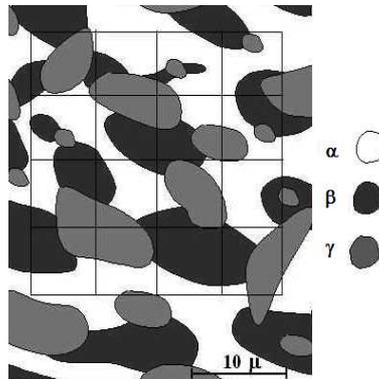


Figura 2.11: Estimativa da fração de área de cada uma das fases α , β e γ . Neste caso, uma grade com 25 pontos está disposta sobre a estrutura bidimensional, com 10 pontos acertando a fase α , 8 acertando a fase β e 7 acertando a γ . Utilizando-se (2.2), obtém-se $A_A^\alpha = \frac{10}{25} = 0,4$; $A_A^\beta = \frac{8}{25} = 0,32$ e $A_A^\gamma = \frac{7}{25} = 0,28$ [RD99].

diretamente a exatidão da medida. Isso porque o desvio padrão de uma medida é dado pela raiz quadrada do número de eventos contados.

2.6.2 Fração de Volume (V_V) via Contagem de Pontos

A fração de volume de uma fase β , V_V^β , pode ser estimada utilizando pontos, linhas ou planos-teste. O mais comum é a contagem de pontos dentro do volume do espécime no espaço. Os testes por pontos são normalmente gerados primeiro seccionando a amostra com um plano e gerando uma grade de pontos na seção plana. O evento de interesse é “pontos que acertam a fase β ”.

$$\langle P_P \rangle^\beta = V_V^\beta \quad (2.5)$$

onde $\langle P_P \rangle^\beta$ é a fração do total de pontos da grade que acertam a fase em questão.

Ainda na Figura 2.11, se, ao invés de considerarmos um objeto bidimensional, considerarmos que esta é uma seção de um objeto tridimensional, e se considerarmos (2.5), temos que $V_V^\alpha = 0,4$; $V_V^\beta = 0,32$ e $V_V^\gamma = 0,28$.

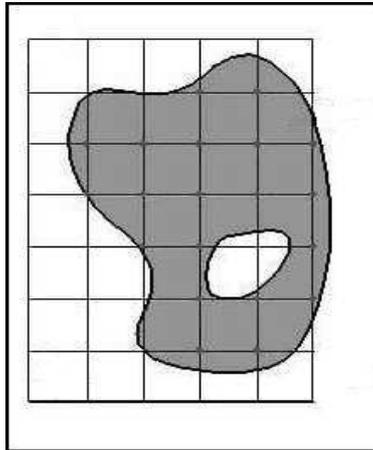


Figura 2.12: Estimativa da área de um objeto bidimensional. Uma grade com 48 pontos, $l_0 = 5,7\mu m$, está disposta sobre a estrutura bidimensional, com 20 pontos acertando-a. Utilizando-se (2.4), obtém-se $A = (5,7\mu m)^2 \times 20 = 650\mu m^2$ [RD99].

Considere uma estrutura de três fases, α , β e γ , onde γ está contida em β . A fração de volume ocupado pelas fases β e γ juntas é dada por $V_V^\beta + V_V^\gamma$. Para obter a fração do volume de β ocupado por γ faz-se $\frac{V_V^\gamma}{(V_V^\beta + V_V^\gamma)}$. Um procedimento *incorreto* seria computar $\frac{P_\gamma}{P_\gamma + P_\beta}$, onde P_γ é o somatório de todos os pontos que caem sobre a fase γ em todos os campos amostrados. Ou seja, o correto é estimar as frações de volume separadamente e depois obter a comparação desejada; isso porque a soma das frações não é igual à fração das somas. Em outras palavras, para obter estimativas válidas, é importante medir as frações de volume das várias fases com respeito à estrutura como um todo e depois manipular estes resultados para obter as medidas dos volumes relativos entre as fases.

Segundo [RD99], os resultados obtidos são muito mais exatos quando utiliza-se uma amostra randomicamente estruturada do que uma randomicamente amostrada, em que a grade de pontos é independentemente alocada no volume.

2.6.3 Estruturas Bidimensionais: Perímetros de Formas (L_A) via Contagem de Interceptos de Linhas

A relação entre o perímetro de formas 2D e a contagem de interceptos de linhas é dada por

$$L_A = \frac{\pi}{2} \langle P_L \rangle \quad (2.6)$$

onde L_A é a razão entre a fração do comprimento total de contornos de todas as formas do espécime e a área que o espécime ocupa e $\langle P_L \rangle$, a razão entre o número de interceptos de linha e o comprimento total de linhas da grade.

Para estruturas isotrópicas, esta grandeza pode ser estimada imparcialmente com um conjunto de linhas-teste horizontais, por exemplo. Estruturas anisotrópicas requerem linhas-teste dispostas em todas as orientações da circunferência. Para isso, pode-se rotacionar a grade com incrementos uniformes a cada medição ou ainda utilizar linhas-teste circulares. O evento de interesse é “interseção das linhas-teste com o contorno da forma”.

Quando P_L difere muito de acordo com a orientação das linhas-teste (Figura 2.13), fica evidente a anisotropia da estrutura (que pode, então, ser quantificada através das medidas de P_L).

Chama-se *rosa do número de interseções* o gráfico em coordenadas polares de P_L em função do ângulo entre as linhas-teste e a horizontal, θ , e provê uma representação gráfica desta anisotropia da estrutura bidimensional (um exemplo na Figura 2.14).

A Figura 2.15 ilustra a utilização do método em uma estrutura anisotrópica. Analogamente, faz-se a estimativa de L_A para uma estrutura isotrópica, mas as linhas-teste podem ter direção única que, ainda assim, proverão uma estimativa imparcial.

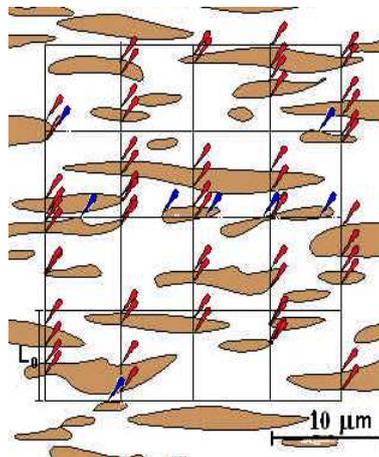


Figura 2.13: As linhas horizontais da grade quadrada ($L_0 = 23,7\mu\text{m}$) interseccionam o contorno das formas em 8 pontos (marcados em azul), enquanto que as verticais, interseccionam 62 vezes. Essa discrepância evidencia a anisotropia da estrutura [RD99].

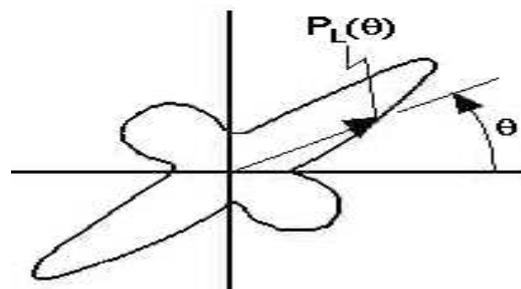


Figura 2.14: “Rosa do número de interseções” para uma estrutura anisotrópica bidimensional [RD99].

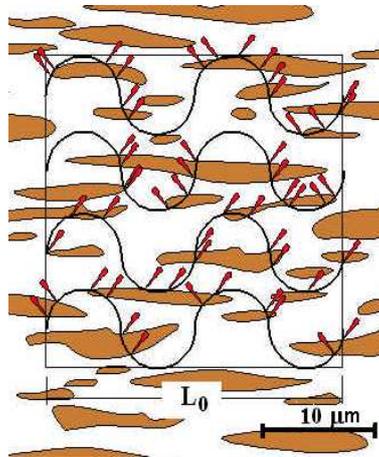


Figura 2.15: Estimativa do comprimento total de contornos, L_A , em uma estrutura 2D anisotrópica, utilizando-se uma grade de linhas circulares, com diâmetro $d = 5,9\mu m$ e o equivalente a 8 circunferências. Neste caso, o comprimento total de linhas-teste é de $8\pi d = 148,9\mu m$ e ocorrem 55 interseções entre as linhas-teste e as linhas de contorno, que, através da equação (2.6), estimam o valor de $L_A = \frac{55\pi}{2 \cdot 148,9} = 0,58 \mu m/\mu m^2$ [RD99].

2.6.4 Estruturas Tridimensionais: Área de Superfície (S_V) via Contagem de Interceptos de Linha

Anteriormente, a estrutura analisada era bidimensional, assim, as propriedades analisadas também eram (perímetro, área). No entanto, se a análise for feita sobre a seção plana de uma estrutura tridimensional, então a contagem de P_L tem outro significado. Para que a estimativa de P_L seja imparcial, é necessário que as linhas-teste sejam escolhidas uniformemente dentre a população de posições e orientações de linhas no espaço tridimensional.

Para uma estrutura tridimensional, uma única orientação de plano de seção é suficiente para estabelecer a natureza de sua anisotropia. O conceito de “rosa do número de interseções” como uma descrição quantitativa da anisotropia da estrutura estende-se para estruturas 3D.

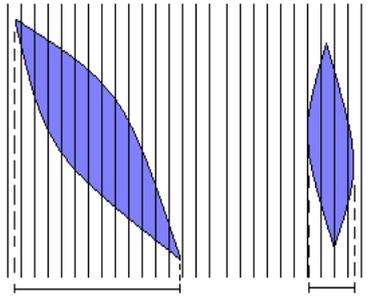


Figura 2.16: Cada uma das formas tem direção anisotrópica distinta, de modo que a área de projeção no plano horizontal é proporcional ao número de intersecções de cada uma delas com as linhas-teste verticais.

Fixando-se uma direção no espaço para as linhas-teste, determinada por (θ, ϕ) , onde θ é a longitude e ϕ é a colatitude, e contando-se diretamente P_L , pode-se estimar a área projetada, $A(\theta, \phi)$, dos elementos de superfície da estrutura no plano perpendicular às linhas-teste. Isto torna-se mais evidente na ilustração da Figura 2.16. Assim, na Figura 2.13, a baixa contagem na direção horizontal indica uma pequena área projetada no plano vertical, e a alta contagem na direção vertical, indica grande área de projeção das formas no plano horizontal.

Desta forma, com linhas-teste não uniformemente distribuídas no espaço, a relação entre densidade de superfície e contagem de interceptos de linha é dada por

$$S_V = \frac{\langle P_L(\theta, \phi) \rangle}{\langle \cos \alpha \rangle}$$

onde α é o ângulo médio entre a direção das linhas-teste e a direção normal a todos os elementos de superfície da estrutura.

No caso de formas bidimensionais, as linhas-teste circulares eram adequadas, o que não ocorre no caso tridimensional, já que as linhas, agora, devem amostrar uniformemente a superfície de uma esfera, e não o perímetro de uma circunferência, como era o caso. Para contornar a situação, utiliza-se o *método de seções verticais* (ver Figura 2.5). Para obter uma amostragem imparcial dentre a população de

orientações de linhas na esfera, a grade de linhas-teste utilizada é a de arcos cicloides (Figura 2.10).

Então: se a seção plana é isotrópica no espaço, as linhas são utilizadas com orientações randômicas uniformemente amostradas. Se a seção plana é uma seção vertical, então as linhas terão orientação ponderada por seno. Se a estrutura for toda ela isotrópica, qualquer direção é adequada.

Dessa forma, se S_V é a fração de área de superfície por unidade de volume (ou também chamada densidade de superfície) de um conjunto de formas bidimensionais que encontram-se no interior de uma estrutura tridimensional, e linhas-teste são superpostas a uma seção plana sua, os eventos de interesse são “interseções das linhas-teste com os traços da superfície revelada na seção da estrutura” (representado por P_L) e a relação é dada por:

$$S_V = 2 \langle P_L \rangle \quad (2.7)$$

Na Figura 2.17 encontra-se um exemplo de sua utilização.

2.6.5 Microestruturas Tridimensionais: Comprimento de Linha (L_V) via Contagem de Pontos na Área (P_A)

O comprimento total de um conjunto de formas unidimensionais pode ser estimado por observações de um conjunto de planos-teste. Formas lineares interseccionam planos em uma série de pontos, que são contados dentro de um campo com área conhecida. A contagem dos pontos P_A , é o número de pontos da estrutura que aparecem na área, normalizado pela divisão pelo valor da área.

Se a coleção de campos inclusos na medição provê uma amostra uniforme da população de posições e orientações de planos no espaço 3D, então esta contagem é uma estimativa imparcial do comprimento de formas lineares por unidade de volume,

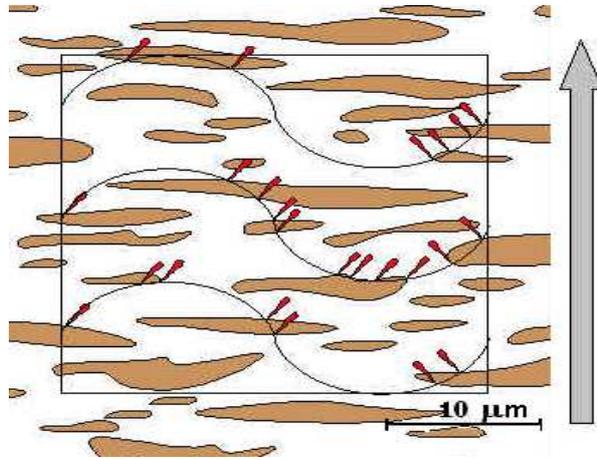


Figura 2.17: Grade com 12 arcos cicloides sobreposta à seção vertical de uma estrutura, onde a direção vertical está indicada por uma flecha. A altura de cada arco é $h = 4,8\mu\text{m}$ e, portanto, o comprimento total de linhas da grade é dado por $12*2h = 115,1\mu\text{m}$. Neste caso, ocorrem 24 interseções e, portanto, a densidade de superfície estimada por (2.7) é $S_V = \frac{2*24}{115,1} = 0,42\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$ [RD99].

L_V :

$$L_V = 2 \langle P_A \rangle \quad (2.8)$$

Em uma estrutura tridimensional de uma fase, os *pontos triplos* que aparecem em uma seção plana provém de *linhas triplas* no espaço, que correspondem às arestas onde três células ou cristais da estrutura, por exemplo, encontram-se (pontos verdes da Figura 2.2). Estes pontos triplos são contados e é calculado o P_A correspondente. A equação (2.8) dá o comprimento das linhas triplas por unidade de volume. Figura 2.18.

Se a amostra for transparente, então as formas lineares podem ser vistas como que projetadas em um plano. As Figuras 2.19 e 2.20 ilustram a estimativa de L_V neste caso.

Se a estrutura linear não for isotrópica, P_A será diferente para diferentes direções de linhas-teste no plano de projeção. Para obter uma amostra imparcial da

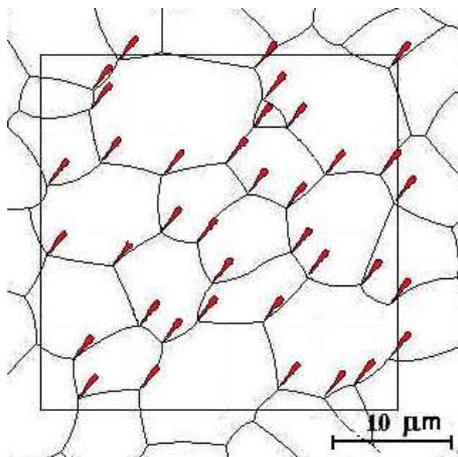


Figura 2.18: A contagem dos pontos triplôs na seção plana estima o comprimento das linhas triplas na estrutura celular tridimensional. Neste caso, ocorrem 37 interseções entre o plano-teste, de área $967\mu m^2$, e as linhas triplas. Assim, utilizando-se (2.8), estima-se $L_V = \frac{2*37}{967} = 0,076\mu m/\mu m^3 = 76 km/cm^3$. Da mesma maneira, estima-se o comprimento de linhas triplas em uma estrutura com maior número de fases [RD99].

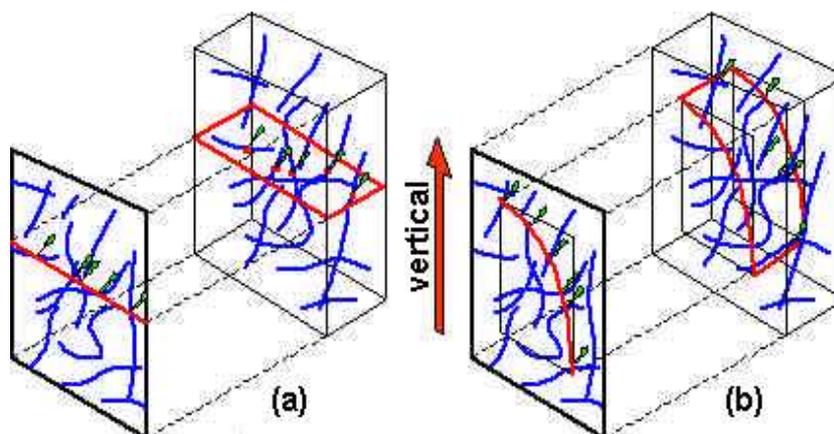


Figura 2.19: a) Uma linha-teste no plano de projeção representa um plano-teste intersecionando o volume projetado. b) Uma linha-teste cicloidal produz um plano-teste cicloidal, que amostra uniformemente o ângulo latitudinal. Note a posição do arco em relação à direção vertical [RD99].

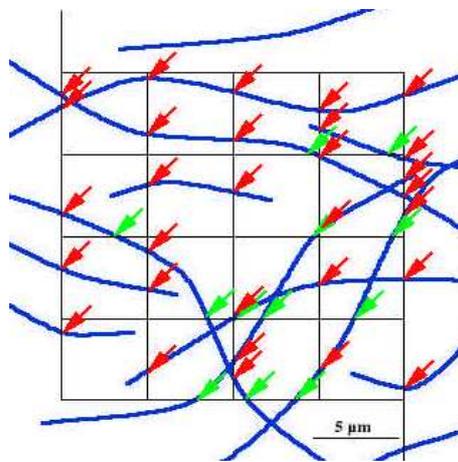


Figura 2.20: Formas lineares de uma microestrutura vistas como que em uma projeção através de uma seção de espessura $2\mu m$. Neste caso, os planos-teste são representados por suas arestas ($L_0 = 20\mu m$) que aparecem como as 5 linhas verticais e as 5 horizontais da grade. A área total de planos-teste é dada por $A_0 = L_0 * 2 * 10 = 400\mu m^2$. Ocorrem 30 interseções entre as formas e as linhas verticais e 12 com as horizontais. Então, a estimativa de L_V é dada por (2.8): $\frac{2*(30+12)}{400} = 0,21\mu m/\mu m^3$ [RD99].

população de orientações de planos no espaço, pode-se lançar mão de um método semelhante ao das seções verticais: escolhe-se uma direção vertical para o espécime e preparam-se fatias de espessura conhecida que contenham esta direção. Utilizam-se, então, linhas-teste em forma de cicloides na imagem projetada. Nesta aplicação, a grade de cicloides precisa ser rotacionada 90° da direção utilizada na amostra de linhas-teste (Seção 2.6.4) porque as normais à curva cicloide (representando as normais ao plano da estrutura) precisam ser ponderadas por seno.

Sob estas condições, tem-se:

$$L_V = 2 \langle P_A \rangle = \frac{2}{t} \langle P_L \rangle \text{ e}$$

$$L_V = \frac{L}{A_0 t}$$

e, portanto, a relação que dá o comprimento das formas unidimensionais é

$$\frac{2}{t} \langle P_L \rangle = \frac{2 \langle P \rangle}{t L_T} = \frac{L}{A_0 t}$$

$$\Rightarrow L = \frac{A_0}{L_T} \langle P \rangle$$

onde L_V é o comprimento da forma por unidade de volume, L é o comprimento da forma 3D, t é a espessura da fatia do espécime, $\langle P_L \rangle$ é o número de interceptos entre a imagem projetada e as linhas-teste cicloidais, A_0 é a área da imagem de projeção, L_T é o comprimento total de linhas cicloides e $\langle P \rangle$ é o valor esperado do número de interseções entre a grade cicloide e a projeção da estrutura no plano.

3 GEOMETRIA DIFERENCIAL E A CARACTERÍSTICA DE EULER-POINCARÉ, CEP

Serão desenvolvidos agora três conceitos básicos em geometria diferencial: *Curvatura Média*, *Curvatura Total* e *Curvatura Integral Média de Superfície* ([dC05], [RD99]) e, a partir deles, será definida a Característica de Euler-Poincaré, CEP, de uma estrutura.

3.1 Curvatura K de uma Curva Bidimensional

Uma *curva parametrizada* é uma aplicação $\alpha : I = (a, b) \subseteq \mathbb{R} \rightarrow \mathbb{R}^3$, $\alpha(t) = (x(t), y(t), z(t))$, com $x(t)$, $y(t)$ e $z(t)$ diferenciáveis. O vetor tangente de α é dado por $\overrightarrow{\alpha'(t)} = (x'(t), y'(t), z'(t))$. Se $\overrightarrow{\alpha'(t)} \neq 0$ então α é dita *regular*. Neste caso, o comprimento de um arco da curva α é dado por [dC05]

$$s(t) = \int_{t_0}^t |\overrightarrow{\alpha'(\tilde{t})}| d\tilde{t}$$

com $t_0 \in I$, e diz-se que α é *parametrizada pelo comprimento de arco* (pca) se $s(t) = t + c$, c uma constante.

Define-se a *curvatura* K de uma curva α pca como o valor numérico $|\overrightarrow{\alpha''(s)}|$. Além disso, define-se o *vetor normal*, \overrightarrow{n} , de α em s como o vetor unitário tal que $\overrightarrow{\alpha''(s)} = K(s)\overrightarrow{n(s)}$.

Para uma curva α qualquer, define-se sua curvatura no ponto P da seguinte maneira: consideremos dois pontos da curva, A e B , conforme a Figura 3.1, e tracemos uma circunferência que passe por A , B e P , com centro O e raio r . Fazendo-se A e B aproximarem-se de P , O desloca-se e r muda. No limite em que A e B tendem a P , o centro O aproxima-se do centro de curvatura no ponto P e o raio r

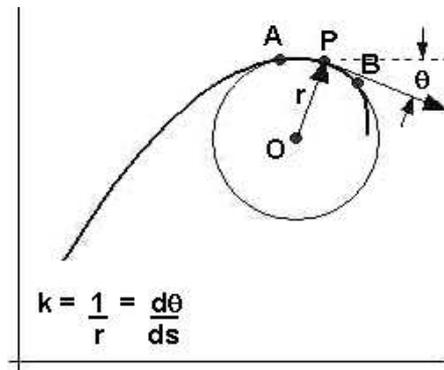


Figura 3.1: Esquema geométrico da determinação da curvatura, K , de α no ponto P [RD99].

aproxima-se do raio de curvatura. Esta circunferência limite, que somente toca α em P é chamado *circunferência osculadora*.

A *curvatura*, K , é a recíproca do raio r , ou é a razão da rotação da tangente à curva em P conforme ele move-se ao longo do comprimento de arco s :

$$K = \frac{1}{r} = \frac{d\theta}{ds}$$

3.2 Curvatura Média, F , de uma Superfície Tridimensional

Sejam S uma superfície suave, $\overrightarrow{X}(u, v)$ uma parametrização sua, conforme definido em Carmo [dC05], $P \in S$ um ponto sobre S e $T_P S$ o plano tangente a S em P . Uma base para $T_P S$ é dada por $B = \{\overrightarrow{X}_u(Q), \overrightarrow{X}_v(Q)\}$, onde $\overrightarrow{X}(Q) = P$.

Definimos, ainda, o vetor unitário normal ao plano tangente $T_P S$ em $P \in S$, como o produto vetorial de \overrightarrow{X}_u por \overrightarrow{X}_v :

$$\overrightarrow{N}(P) = \frac{\overrightarrow{X}_u \wedge \overrightarrow{X}_v}{|\overrightarrow{X}_u \wedge \overrightarrow{X}_v|}(Q) \quad (3.1)$$

com $\overrightarrow{X}(Q) = P$.

Define-se a aplicação $\vec{N} : S \rightarrow S^2$, onde S^2 é a superfície esférica unitária, como a *aplicação de Gauss*. Note que \vec{N} é diferenciável, pois, localmente, \vec{N} é dada por (3.1), que é diferenciável. Além disso, o diferencial $\overrightarrow{dN}_P : T_P S \rightarrow T_{\vec{N}(P)} S^2$ é uma aplicação linear e pode-se mostrar que $T_P S = T_{\vec{N}(P)} S^2$. De fato,

$$T_{\vec{N}(P)} S^2 = \{\overrightarrow{N(P)}\}^\perp = \{\vec{v} \in \mathbb{R}^3 / \langle \vec{v}, \overrightarrow{N(P)} \rangle = 0\} = T_P S$$

onde $\overrightarrow{N(P)}^\perp$ diz respeito ao complemento ortogonal do vetor $\overrightarrow{N(P)}$.

Pode-se mostrar ainda que a aplicação linear $\overrightarrow{dN(P)} : T_P S \rightarrow T_P S$ é autoadjunta [dC05].

Sendo autoadjunta, ela é também normal e, portanto, goza das características destas últimas, donde vem que seus autovetores podem ser arranjados de maneira a formarem uma base ortonormal. Sendo assim, os autovetores de $\overrightarrow{dN(P)}$ associados ao maior e ao menor autovalor são ortogonais.

Seja α uma curva regular na superfície S , que passa por $P \in S$, com curvatura K e cujo vetor normal é \vec{n} . O número $K_n = K \langle \vec{N}, \vec{n} \rangle = K \cos \theta$, onde θ é o ângulo entre \vec{N} e \vec{n} , é definido como a *curvatura normal* de $\alpha \subset S$ em P .

A curvatura normal K_n na direção de $\vec{v} \in T_P S$, $|\vec{v}| = 1$, pode ser obtida fazendo-se a seção normal da superfície S , ou seja, fazendo-se a interseção de S com o plano gerado por $\overrightarrow{N(P)}$ e \vec{v} . A curvatura K da curva α assim obtida é, a menos de sinal, a curvatura normal de S em P na direção de \vec{v} .

Se K_1 e K_2 são autovalores de $-\overrightarrow{dN}_P$ e, \vec{e}_1 e \vec{e}_2 , seus respectivos autovetores, dizemos que K_1 e K_2 são as *curvaturas principais* de S em P e \vec{e}_1 e \vec{e}_2 são as *direções principais*, portanto, perpendiculares entre si.

Sejam S uma superfície suave e $T_P S$ o plano tangente ao ponto $P \in S$. Pode-se determinar vários planos perpendiculares a $T_P S$, todos passando por P . As curvas que resultam da interseção dos planos normais com a superfície possuem, cada uma, uma certa curvatura K . As direções onde ocorrem o maior e o menor valor de K

coincidem com os autovetores de $-\overrightarrow{dN(P)}$ (direções principais) e as curvaturas nessas direções, K_1 e K_2 , portanto, coincidem com os autovalores (curvaturas principais), correspondendo aos raios de curvatura r_1 e r_2 , conforme definidos anteriormente:

$$K_1 = \frac{1}{r_1}$$

$$K_2 = \frac{1}{r_2}$$

Para superfícies suaves com geometria arbitrária, K_1 e K_2 variam suavemente de um ponto para outro e têm uma distribuição de valores sobre a área da superfície.

Essas curvaturas podem receber sinais. Se o vetor de curvatura aponta para o interior da superfície, ela é definida como positiva; se aponta para o exterior, é definida como negativa. Assim:

- Superfície Localmente Convexa (+ +): ambas as circunferências osculadoras estão dentro do objeto.
- Superfície Côncava (- -): ambas fora do objeto.
- Superfície de Sela (+ -): uma dentro e outra fora.

Define-se a *Curvatura Gaussiana* como o produto de K_1 por K_2 :

$$\kappa = \frac{1}{r_1 r_2} = K_1 K_2$$

que coincide exatamente com o determinante da matriz de $-\overrightarrow{dN(P)}$. A curvatura Gaussiana é importante para que se saiba a classificação da superfície sem mesmo conhecer os valores de suas curvaturas principais. Por exemplo, se $\kappa > 0$, sabe-se que a superfície é localmente côncava ou convexa; se $\kappa < 0$, sabe-se que se trata de uma superfície de sela; e se $\kappa = 0$, é uma superfície planar ou cilíndrica.

Em geral, se uma superfície difere de uma forma simples convexa, ou seja, apresenta protuberâncias convexas extras ou covas côncavas, ela precisa possuir placas

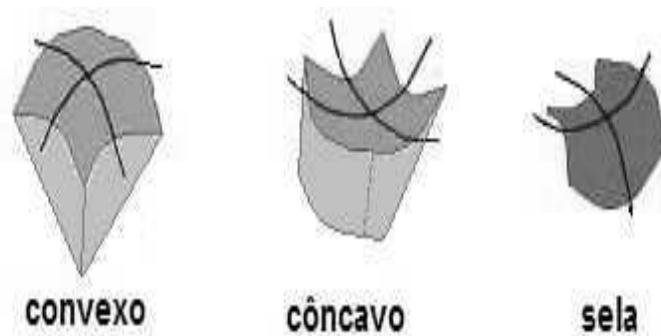


Figura 3.2: Exemplos de elementos de superfícies convexa, côncava e de sela. Note a posição das circunferências que determinam a curvatura [RD99].

de superfície de sela que os conecte suavemente. Em contornos de superfícies de sela, uma das curvaturas muda de sinal (de +- para ++ ou de +- para --), de forma que uma das curvaturas principais passa pelo zero. Tais pontos ocorrem somente ao longo das linhas de contorno das placas de sela (ou em superfícies cilíndricas, onde uma das curvaturas é identicamente nula) e são chamados *pontos parabólicos*.

Duas combinações de curvaturas normais principais têm aplicação difundida em geometria, topologia, física e estereologia: a *curvatura média*, F , e a *curvatura integral média*, M , melhor detalhada na Seção 3.4.

A curvatura média local, F , é dada por:

$$F = \frac{1}{2} \left(\frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2} \right) = \frac{1}{2}(K_1 + K_2)$$

e coincide exatamente com o traço da matriz de $-\overrightarrow{dN}(P)$. Conhecendo-se os valores de κ e F determinam-se os valores exatos de K_1 e K_2 .

3.3 Curvatura Total de uma Superfície Tridimensional

Chama-se uma *célula zero dimensional* um ponto, usualmente chamado *vértice*, v . Uma *célula unidimensional*, topologicamente, é um segmento de reta, usualmente

chamada *aresta*, e . Uma *célula bidimensional* é um *polígono*, que usualmente é chamado *face*, f , mesmo que não seja “face” de objeto algum. Uma *divisão em células* consiste em dividir uma superfície em células. Um polígono com n lados é chamado *n -ágono*. Sabe-se [Wee85] que a área de um triângulo em uma superfície esférica é dada por

$$A_3 = (\gamma_1 + \gamma_2 + \gamma_3) - \pi$$

onde γ_i , $i = 1, 2, 3$, é o i -ésimo ângulo interno do triângulo.

Dividindo-se em $(n - 2)$ triângulos qualquer n -ágono sobre uma superfície esférica, pode-se mostrar que sua área é dada por:

$$A_n = \sum_{i=1}^n \gamma_i - (n - 2)\pi$$

Seja S^2 a esfera unitária e considere qualquer divisão sua em k células com ângulos internos γ_j , $j = 1, 2, \dots, n_k$ e de área A_i cada uma, com $i = 1, 2, \dots, k$. Assim a área da esfera é dada por:

$$\begin{aligned} A_{S^2} &= A_1 + A_2 + \dots + A_k \\ &= \sum_{i=1}^{n_1} \gamma_i - (n_1 - 2)\pi + \sum_{i=1}^{n_2} \gamma_i - (n_2 - 2)\pi + \dots + \sum_{i=1}^{n_k} \gamma_i - (n_k - 2)\pi \\ &= \left[\sum_{j=1}^{n_1} \gamma_j + \sum_{j=1}^{n_2} \gamma_j + \dots + \sum_{j=1}^{n_k} \gamma_j \right] - (n_1 + n_2 + \dots + n_k)\pi + 2k\pi \\ &= 2\pi v - 2\pi e + 2\pi f \\ &= 2\pi(v - e + f) \end{aligned} \tag{3.2}$$

Isso porque a soma de todos os ângulos internos de todas as células obviamente resulta em 2π vezes o número de vértices da divisão em células da esfera e também porque cada aresta de célula é contada duplamente, uma vez que ela é aresta também da célula adjacente.

A derivação da fórmula (3.2) não levou em conta o fato de ser a superfície uma esfera, mas sim, o fato de ter a superfície a geometria *local* de uma esfera unitária.

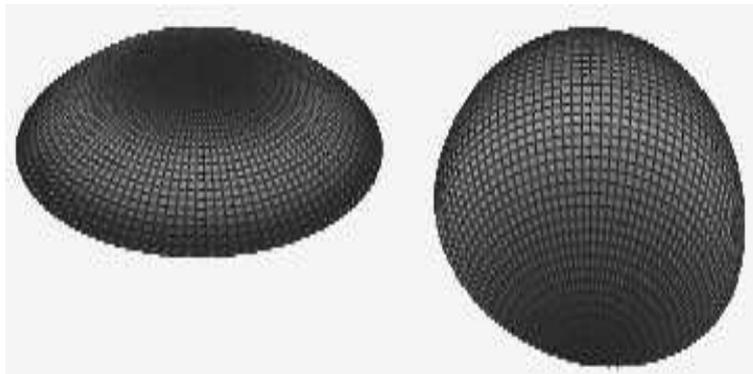


Figura 3.3: Uma porção da superfície de uma pequena esfera (à direita) é mais curvada que uma porção da superfície de uma esfera de maior raio (esquerda).

Esta equação é conhecida como a *fórmula de Gauss-Bonnet* para superfícies com geometria elíptica e a quantidade $(v - e + f)$ é a *Característica de Euler-Poincaré*, *CEP*, das mesmas.

Analogamente, pode-se desenvolver fórmulas de Gauss-Bonnet para superfícies de geometrias hiperbólica e Euclidiana, generalizando-as como segue:

$$\kappa A = 2\pi CEP \quad (3.3)$$

onde *CEP* é a Característica de Euler-Poincaré da superfície, A é sua área e κ é sua curvatura de Gauss, que vale -1, se a superfície tem geometria hiperbólica, 0, se tem geometria Euclidiana e 1, se tem geometria elíptica.

Note que se a esfera não fosse unitária, mas tivesse raio r , sua área seria acrescida r^2 unidades de área. Por outro lado, sua curvatura de Gauss, κ , decresceria r^2 vezes, o que resultaria na invariância de sua CEP. De fato, os raios de curvatura principais da esfera são ambos iguais (r), o que resulta que sua curvatura gaussiana é dada por $\frac{1}{r^2}$. A Figura 3.3 mostra essa relação.

Então, se uma superfície tem área A , Característica de Euler-Poincaré CEP e curvatura gaussiana constante κ , a *fórmula unificada de Gauss-Bonnet para superfícies de curvatura constante* é dada por (3.3).

A fórmula de Gauss-Bonnet pode ser generalizada para ser aplicada a superfícies de curvatura gaussiana que varia irregularmente de ponto para ponto. A idéia é que curvaturas positivas e negativas cancelam-se e a curvatura total da rede é igual a $2\pi CEP$. Não importa qual deformação uma superfície sofra, sua curvatura total nunca muda.

Nesse caso, lança-se mão do conceito de integral para representar a curvatura total sobre a superfície e a fórmula de Gauss-Bonnet torna-se

$$\int \kappa dA = 2\pi CEP$$

Ou seja, utiliza-se uma divisão em células suficientemente boa para aproximar a integral como uma soma:

$$\begin{aligned} \int \kappa dA &= \sum \kappa_i A_i \\ &= \sum [(\alpha_i + \beta_i + \dots + \phi_i) - (n_i - 2)\pi] \\ &= \sum (\alpha_i + \beta_i + \dots + \phi_i) - \pi \sum n_i + 2\pi f \\ &= 2\pi(v - e + f) \\ &= 2\pi CEP \end{aligned}$$

Note que quando κ é constante esta fórmula reduz-se a (3.3).

3.4 Curvatura Integral Média, M , de uma Superfície Tridimensional

Outro ponto de interesse da curvatura média F é o valor da sua integral para a coleção de superfícies que formam uma estrutura, chamado *curvatura integral média*, M . Esta propriedade tem um valor único e invariante para uma superfície fechada.

Consideremos um elemento de superfície com área incremental dS e suponhamos que F seja o valor da curvatura média deste elemento. Computemos o produto FdS para o elemento e adicionemos todos os valores de todos os elementos de superfície que limitam a partícula. A quantidade é definida matematicamente por

$$M = \int \int_S F dS$$

que tem unidade de comprimento, já que F tem (unidade de comprimento)⁻¹ e dS tem (unidade de comprimento)². A integral dupla significa que o valor local incremental FdS é somado sobre a área total da superfície S .

4 O DISECTOR

O *disector* é o volume-teste mais utilizado, selecionando formas de acordo com seu número. Consiste em duas seções paralelas de uma estrutura, com uma pequena distância conhecida entre elas, delimitando um volume conhecido [VK96]. Através da comparação dos dois planos, um chamado *plano de referência* e o outro, *plano de comparação*, é possível fazer inferências não ambíguas sobre como as estruturas que aparecem em cada um estão conectadas no volume entre eles. Na estimativa do número de partículas por unidade de volume (N_V) é viável que se contabilize apenas formas que aparecem no plano de referência e não no de comparação, para que a contagem seja imparcial. Este procedimento leva ao evento de interesse, que é a localização do topo das partículas no interior do volume.

4.1 Formas Tridimensionais: Propriedades Topológicas

Em uma superfície suavemente curvada, todo ponto P tem um plano que é tangente a ela, ao qual está associado um vetor, dito *localmente normal à superfície*. Este vetor representa a orientação local do elemento de superfície em P . Esta orientação pode ser mapeada em longitude e colatitude em um ponto P' na esfera unitária de orientação, com P' chamado *imagem esférica do ponto P na superfície*. P' representa a direção local da superfície. Para uma pequena extensão curvada da superfície, a coleção destas direções normais são mapeadas em uma pequena extensão na esfera unitária, que é a imagem esférica daquela porção. A imagem esférica é uma importante propriedade topológica, já que independe do formato e do tamanho do objeto.

Chama-se *esterorradianos* ou *esferorradianos* a unidade de ângulo representado por uma determinada área na superfície da esfera unitária de orientações,

analogamente ao que representa a unidade *rad* em ângulos sobre planos. A esfera subentende um ângulo de 4π *esterorradianos*.

A *imagem esférica*, Ω , da coleção de direções normais de uma *superfície convexa* cobre a esfera unitária de orientações apenas uma vez. Para todo ponto que representa uma direção na esfera existe um ponto na superfície convexa que tem uma normal naquela direção. Nenhuma direção normal é representada mais de uma vez, de modo que a *imagem esférica de qualquer corpo convexo tem mesma área da esfera unitária: 4π esterorradianos*.

Em qualquer ponto de uma placa convexa, que seja parte de uma superfície convexa, o plano tangente fica no exterior da superfície; em qualquer ponto em uma placa côncava, parte de uma superfície côncava, o plano tangente fica para o lado de dentro da superfície; qualquer ponto de uma placa em forma de sela, parte de uma superfície com um ponto de sela, o plano tangente fica parcialmente interior à superfície. Placas de superfície em forma de sela fazem a transição suave entre elementos côncavos e convexos ou ao redor de cavidades na partícula. Placas de cada classe de superfícies têm seu próprio conjunto de direções normais que podem ser mapeadas na esfera unitária. Se, por convenção, as partes da superfície de uma partícula que podem ser cobertas por placas côncavas e convexas forem contadas positivamente e partes cobertas por placas de selas forem contadas negativamente, então o resultado é a *imagem esférica da rede*, Ω :

$$\Omega_{\text{rede}} = \Omega_{\text{convexa}} + \Omega_{\text{côncava}} - \Omega_{\text{sela}} = 4\pi(1 - C)$$

onde C é a conectividade da partícula, que coincide com o número de cavidades da mesma. Isso porque as placas de elementos de sela que envolvem uma cavidade da partícula (túnel) cobrem exatamente uma vez a esfera unitária de orientações e, portanto, cada cavidade contribui com -4π *esterorradianos* na imagem esférica de rede.

Para uma coleção de N partículas na estrutura, com uma conectividade coletiva de C , a imagem esférica de rede da coleção de formas é:

$$\Omega_{rede} = 4\pi(N - C) \quad (4.1)$$

onde $(N - C)$ é a *Característica de Euler-Poincaré, CEP*, das partículas na estrutura.

Para uma coleção de partículas simplesmente conexas (não necessariamente convexas), não importando suas formas, $C = 0$ e, portanto, a contagem de tangente de rede dá o número de partículas na estrutura. Por outro lado, uma rede toda conectada (apenas uma partícula), $N \ll C$ e a contagem de tangentes de rede (que terá mais vezes tangentes de sela) resultará na conectividade com sinal negativo.

Imagine um plano varrendo o volume contido no *disector* e registrando as ocorrências de tangência local às formas. Existem três classes de eventos de tangência:

- o plano pode ser tangente a uma superfície localmente convexa (ambos os raios de curvatura no interior do objeto). Este é um chamado evento T_{++} e seu número total por unidade de volume é representado por T_V^{++} ;
- o plano pode ser tangente a uma superfície localmente côncava (ambos os raios de curvatura no exterior do objeto). Este é um evento T_{--} e seu número total por unidade de volume é representado por T_V^{--} ; e
- o plano pode ser tangente a uma superfície localmente de sela (os dois raios de curvatura estão em lados opostos do plano). Este é um evento T_{+-} e seu número total por unidade de volume é representado por T_V^{+-} .

Tomando-se como positivas as contagens de tangentes de elementos côncavos e convexas e como negativas as contagens de elementos de sela, tem-se que cada partícula convexa contribui com dois eventos T_V^{++} , cada cavidade contribui com

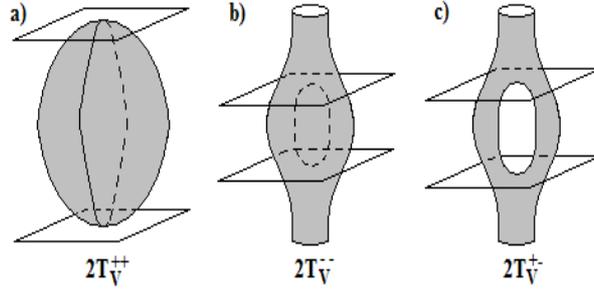


Figura 4.1: **a)** Partículas convexas contribuem com dois eventos T_V^{++} . **b)** Cavidades contribuem com dois eventos T_V^{--} . **c)** Ocorrências de sela contribuem com dois eventos T_V^{+-} .

dois eventos T_V^{--} e cada ocorrência de sela contribui com dois eventos T_V^{+-} (Figura 4.1), de forma que suas contribuições para a imagem esférica da rede são dadas por:

$$\begin{aligned}\Omega_{V^{++}} &= 4\pi \left(\frac{T_V^{++}}{2} \right) = 2\pi T_V^{++} \\ \Omega_{V^{--}} &= 4\pi \left(\frac{T_V^{--}}{2} \right) = 2\pi T_V^{--} \\ \Omega_{V^{+-}} &= -4\pi \left(\frac{T_V^{+-}}{2} \right) = -2\pi T_V^{+-}\end{aligned}$$

Assim, a soma $T_V^{++} + T_V^{--} - T_V^{+-}$ é chamada de *contagem de tangentes de rede* e a imagem esférica da estrutura é dada por:

$$\Omega_{rede} = 2\pi(T_V^{++} + T_V^{--} - T_V^{+-}) \quad (4.2)$$

Por (4.1) e (4.2), a diferença entre o número de formas presentes na estrutura, N , e sua conectividade, ou o número de cavidades fechadas, C , é dada por

$$N_V - C_V = \frac{1}{2}(T_V^{++} + T_V^{--} - T_V^{+-}) \quad (4.3)$$

onde o subscrito V diz respeito a medições por unidade de volume da estrutura.

Segundo [RRN97], em uma partícula, pode-se estimar o volume e a área de superfície dos túneis contidos nela:

$$V_{tuneis} = \frac{V_V}{C}$$

$$S_{tuneis} = \frac{S_V}{C}$$

onde V_V e S_V são a fração de volume e a densidade de superfície da partícula, respectivamente, que podem ser determinados pelos métodos descritos nas Seções 2.6.2 e 2.6.4, e C é a sua conectividade.

4.2 Varredura com Linhas-Teste Bidimensionais

Qualquer ponto P no contorno de uma forma bidimensional possui uma tangente e uma direção perpendicular para fora da forma. Mapeando-se estas direções para uma circunferência unitária, cria-se a *imagem circular*, θ , dos pontos, e um pequeno arco do contorno dS tem uma pequena gama de direções normais, mapeado como um segmento de arco na circunferência unitária, $d\theta$. A imagem circular de uma forma convexa, não importando seu formato, é de $2\pi rad$, sendo a circunferência toda mapeada apenas uma vez (Figura 4.2a)). Se o formato do contorno da partícula não for convexo, então parte dela consistirá de segmentos de arcos convexos, e parte, de segmentos de arco côncavos. Mapeando-se as rotações dos vetores normais ao contorno na circunferência unitária, percebe-se que algumas partes dela serão percorridas mais de uma vez. Entretanto, atribuindo-se valor negativo aos segmentos côncavos na imagem circular, vê-se que os elementos convexos excedentes cancelam-se com os côncavos, de forma que a imagem circular é de $2\pi rad$, independentemente do tamanho e do formato da partícula englobada no contorno (Figura 4.2b)).

Em uma estrutura bidimensional, partículas de uma dada fase são ditas *multiplamente conectadas* se elas têm cavidades. O contorno de cada uma das cavidades,

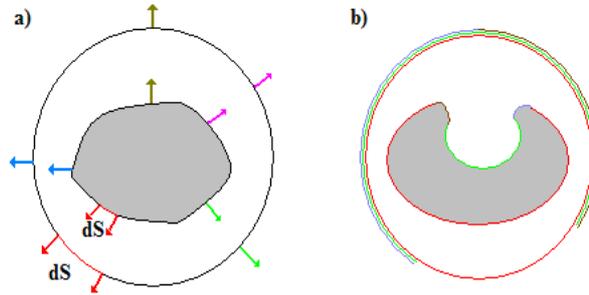


Figura 4.2: **a)** A imagem circular de partículas convexas, independentemente de seu formato, é de $2\pi rad$, sendo a circunferência toda mapeada apenas uma vez. **b)** Se o formato do contorno da partícula não for convexo, então parte dela consistirá de segmentos de arcos convexos, e parte, de segmentos de arco côncavos e seções da circunferência unitária serão percorridas mais de uma vez. Elementos convexos excedentes cancelam-se com os côncavos, de forma que a imagem circular é de $2\pi rad$, independentemente do tamanho e do formato da partícula englobada no contorno.

independentemente de seu formato ou tamanho, contribui para a imagem circular de rede com $-2\pi rad$, por tratarem-se de $2\pi rad$ de arcos côncavos.

Então, a imagem circular de uma partícula bidimensional com C cavidades, bidimensionais é dada por

$$\theta_{rede} = \theta_+ - \theta_- = 2\pi(1 - C)$$

e, para uma coleção de N formas com C cavidades nelas:

$$\theta_{rede} = 2\pi(N - C) \quad (4.4)$$

onde $(N - C)$ é a *Característica de Euler-Poincaré* de uma coleção de partículas bidimensionais.

Pode-se varrer o plano bidimensional com uma linha-teste e fazer a contagem de elementos do contorno que são convexos (T_+) e elementos que são côncavos (T_-) (Figura 4.3). Note que cada partícula convexa contribui para a imagem circular com dois eventos de tangente T_+ e cada cavidade contribui com dois eventos T_- .

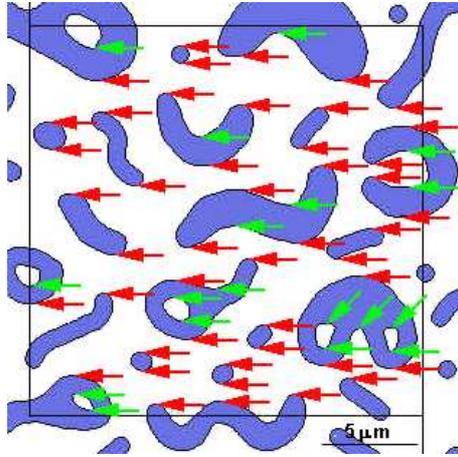


Figura 4.3: Contagem dos eventos T_{A+} (vermelho) e T_{A-} (verde) na seção plana de uma estrutura qualquer, através de uma linha horizontal. Pode-se, assim, estimar a curvatura integral média, M , da superfície de interface das duas fases presentes [RD99].

Dividindo-se esses valores pela área do plano, obtém-se a *contagem de tangentes de área*:

$$\begin{aligned}\theta_{A+} &= 2\pi \left(\frac{T_{A+}}{2} \right) = \pi T_{A+} \\ \theta_{A-} &= -2\pi \left(\frac{T_{A-}}{2} \right) = -\pi T_{A-}\end{aligned}$$

A contagem de tangentes de área dos elementos de contorno de uma coleção de formas em relação à imagem circular delas é dada por

$$\theta_{Arede} = \pi(T_{A+} - T_{A-})$$

ou ainda, utilizando-se (4.4)

$$N_A - C_A = \frac{1}{2}(T_{A+} - T_{A-}) \quad (4.5)$$

onde o subscrito A indica medições por unidade de área dos planos bidimensionais.

Se as formas são convexas, $N_A = \frac{1}{2}T_{A+}$. Se as formas são simplesmente conexas (sem cavidades), então para cada tangente de elemento de contorno côncavo existe

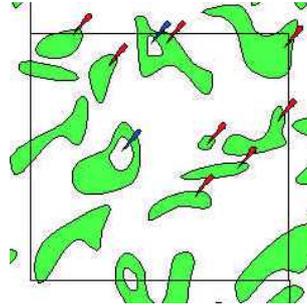


Figura 4.4: Contagem do número de objetos (vermelho) e do número de cavidades fechadas (azul) para estimativa direta de M da superfície de interface das duas fases presentes [RD99].

uma tangente de elemento convexo extra, de modo que, ainda assim, para formas sem cavidades, mas não necessariamente convexas, a Equação (4.5) dá a CEP da coleção de formas.

Se a estrutura bidimensional em questão resulta da interseção de uma estrutura com um plano-teste, então o valor esperado da CEP da seção é uma estimativa da curvatura integral média, M , da correspondente coleção de superfícies de interface entre duas fases no volume de interesse (Figura 4.4):

$$\langle N_A \rangle - \langle C_A \rangle = \frac{1}{2\pi} M_V$$

onde $\langle \rangle$ indica o valor esperado da grandeza.

Aparentemente a contagem de tangentes dá a mesma informação que a contagem de formas e cavidades, no entanto, há argumentos para que se prefira a contagem de tangentes:

- a tangência ocorre em um ponto dentro ou fora do campo amostrado. Partículas podem estar meio dentro e meio fora dele;
- em algumas formas ambas as fases ocupam a mesma fração de área, no entanto, uma das fases “vaga” meio dentro e meio fora do campo amostrado, o que prejudica a exatidão da sua contagem;

- em uma estrutura de três fases, α , β e γ , por exemplo, contornos $\alpha\beta$, $\alpha\gamma$ e $\beta\gamma$ podem ter sua contagem de tangentes de área feitas separadamente, assim como a imagem circular e a curvatura integral média de cada uma delas; e
- já que contagens separadas são obtidas para elementos de contorno côncavos ou convexos, também suas imagens circulares podem ser obtidas separadamente. Embora esta informação não tenha uma relação simples com a geometria da estrutura, ela pode ser utilizada em outras aplicações.

4.3 Aplicação do *Disector*

No *disector*, embora seja caracterizado pela análise de duas seções planas, as inferências são feitas acerca do volume compreendido entre elas, e, por isso, é tido como um volume-teste. Já que volumes não têm orientação, a isotropia da amostra deixa de ser um problema, embora a necessidade de uniformidade e aleatoriedade na sua aplicação ainda permaneça (e pode ser satisfeita pelos métodos já expostos).

O principal uso do *disector* é para determinar o número de objetos por unidade de volume (N_V). A análise de uma estrutura utilizando-se o *disector* independe do formato e do tamanho das formas de interesse, uma vez que elas são contadas por uma característica que ocorre uma e somente uma vez por forma: seu ponto de topo (note que este evento corresponde a uma ocorrência de tangência de elemento convexo).

A aparência das formas nos dois planos do *disector* permite que se façam inferências acerca de qual dos três eventos de tangência ocorreu ou não no volume analisado (Figura 4.5).

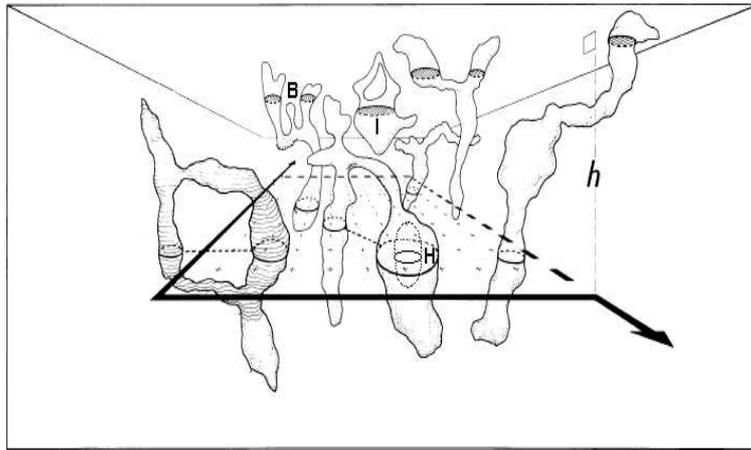


Figura 4.5: Ilustração do volume de uma estrutura amostrado pelo *disector*, evidenciando o espaçamento h entre as seções planas, os eventos de ilha (I), ramificações (B) e cavidades fechadas (H), e mostrando como eles apresentam-se nos planos de referência de e comparação [GBB⁺88].

Existe um pequeno número de eventos topológicos que podem ocorrer e ser detectados pela comparação das seções planas:

1. uma forma pode continuar de um plano para outro sem ocorrência de nenhum evento topológico (o tamanho da interseção pode mudar, mas isso não caracteriza uma mudança topológica);
2. uma forma pode terminar ou começar entre os planos, aparecendo em uma, mas não na outra (o que caracteriza um evento de ilha, I , correspondendo a uma ocorrência de tangente de elemento convexo (T_{++}));
3. uma forma pode ramificar-se e então interseccionar uma única vez um plano e duas (ou mais) o outro (o que caracteriza um evento de ramificação, B , correspondendo a uma ocorrência de tangente de elemento de sela (T_{+-}));
4. vazios dentro de uma forma podem também continuar, começar, terminar ou ramificarem-se (quando uma cavidade começa ou termina, há

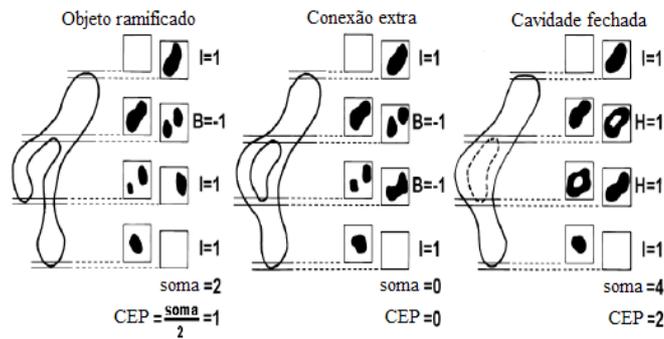


Figura 4.6: Determinação do valor da CEP utilizando a Equação (2.1) para três casos distintos onde aparecem ilhas (I), cavidades (H) e ramificações (B). Note que a análise é feita nos dois sentidos, ou seja, invertem-se os planos de referência e de comparação e, por isso, a divisão por 2 [KG01].

ocorrência de um evento H e, portanto, de uma tangente de elemento côncavo (T_{--}).

Segundo [Mou02], três pré-requisitos devem ser observados para que se evitem tendências na estimativa do número de objetos por unidade de volume (N_V):

- a soma da dimensão do teste utilizado somada à dimensão da propriedade medida precisa ser no mínimo três;
- todo objeto precisa ter igual probabilidade de ser amostrado; e
- toda interseção entre teste e objeto precisa ocorrer de forma randômica.

A Figura 4.6 mostra o cálculo da CEP via interpretação do *disector*, enquanto as Figuras 4.7 e 4.8 mostram exemplos mais práticos de sua utilização.

Para a contagem do número de formas por unidade de volume, eventos dos tipos 3 e 4, mostrados na Figura 4.7, são de interesse. O número desses eventos dividido por 2 (já que contam-se início e fim das formas) e dividido pelo volume entre os planos (área das seções planas vezes o espaçamento entre elas) fornece diretamente

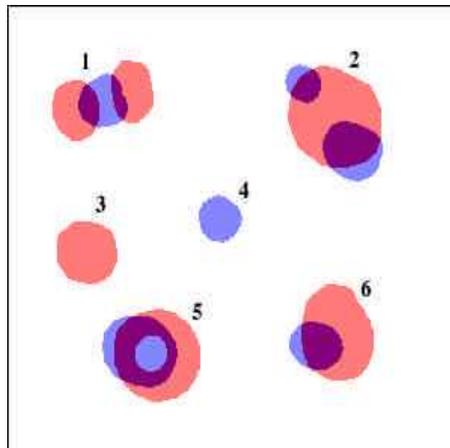


Figura 4.7: Ilustração do uso do *disector*: sobreposição dos planos de referência e de comparação. Formas do tipo 6 são consideradas continuação do mesmo objeto e não caracterizam evento topológico. Eventos dos tipos 3 e 4 representam o início ou o fim de uma forma, dependendo de qual plano é tomado como superior. Eventos dos tipos 1 e 2 representam ramificações simples. O 5º evento revela o fundo de uma cavidade interna fechada [RD99].

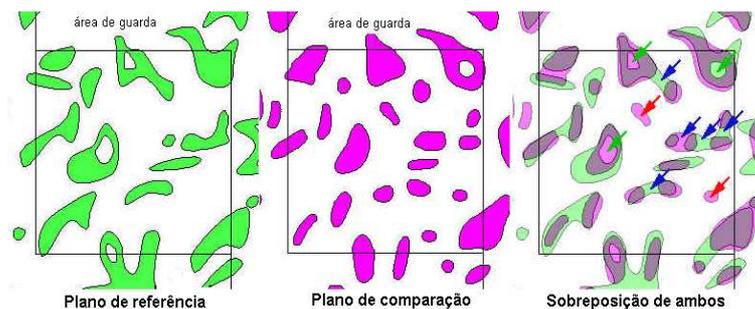


Figura 4.8: Exemplo de planos de referência e de comparação em um *disector*. O terceiro quadro mostra a sobreposição de ambos e os eventos topológicos correspondentes. Em vermelho, eventos do tipo T_{++} ; em verde, T_{--} ; e em azul, T_{+-} . Aqui, também é mostrado um exemplo da utilização da área de guarda como artifício para descartar regiões que possivelmente sofreram danos durante o preparo da amostra [RD99].

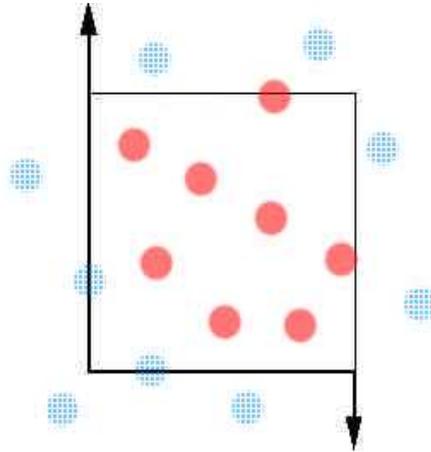


Figura 4.9: Arestas de inclusão e de exclusão para o *disector*. As formas hachuradas são desconsideradas [RD99].

o número de formas por unidade de volume. Conforme já comentado, este valor é imparcial, já que independe do tamanho ou formato do objetos analisados.

O método descrito é de simples utilização para objetos convexos. Quando as formas ramificam-se ou são longas e delgadas, cruzando e recruzando o volume amostrado, surge a necessidade de seguir a extensão das formas para que cada uma delas seja contada somente uma vez. Já que as imagens têm área finita, é preciso atentar ao problema que suas arestas introduzem. Conforme mostra a Figura 4.9, isto é resolvido definindo-se arestas de inclusão e arestas de exclusão em torno da área de contagem, tal que as formas que são interceptadas pelas arestas de exclusão são ignoradas. Obviamente, como exposto anteriormente, é necessário seguir as formas que se ramificam ou se estendem lateralmente para que qualquer cruzamento pelas linhas de exclusão seja detectado; isso porque as arestas de exclusão são estendidas até o infinito, o que permite que objetos de formas irregulares tenham a mesma probabilidade de serem amostrados que os demais objetos.

Note que as arestas de inclusão e de exclusão estão presentes apenas no plano de referência. Bordas podem ser postas no plano de comparação para efeito de

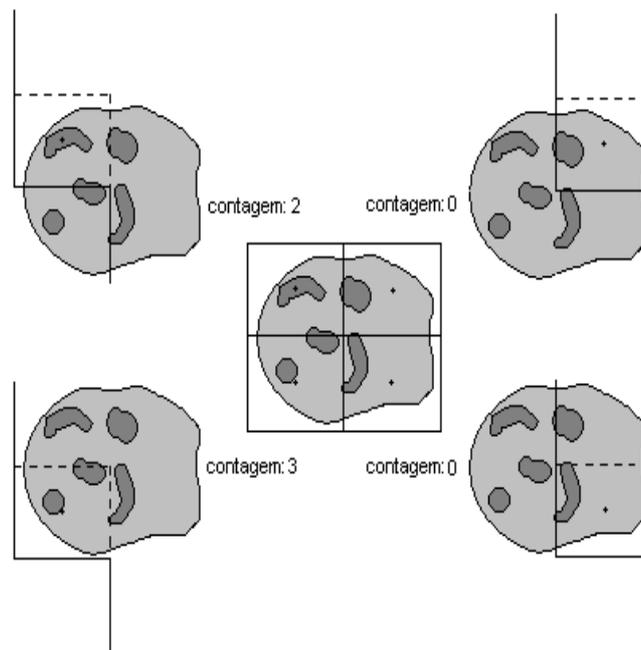


Figura 4.10: Ilustração de um campo de contagem imparcial. A estrutura possui cinco partículas 2D. Utilizando-se esta regra de contagem (com arestas de inclusão e de exclusão) cada uma delas é contada apenas uma vez.

localização, mas não de contagem. Além disso, é impossível uma partícula ser contada em ambas as direções nos planos de referência e de comparação, mesmo quando ambos são invertidos. O funcionamento das arestas de inclusão e de exclusão pode ser visto na Figura 4.10.

Outro cuidado tomado é deixar um espaço acima e abaixo de cada uma das seções planas do *disector* em que a contagem não seja feita, o chamado *volume de guarda*. Ele permite que se evitem os efeitos de aresta que surgem da passagem da lâmina de corte através do objeto durante o preparo das seções. Como a lâmina passa através de um tecido relativamente macio, espera-se que objetos interceptados sejam danificados ou deslocados. Este processo obviamente modifica o número de objetos aparentes na superfície de análise. Na prática, ao analisarem-se seções planas, trabalha-se com a *área de guarda*, conforme ilustrado na Figura 4.8.

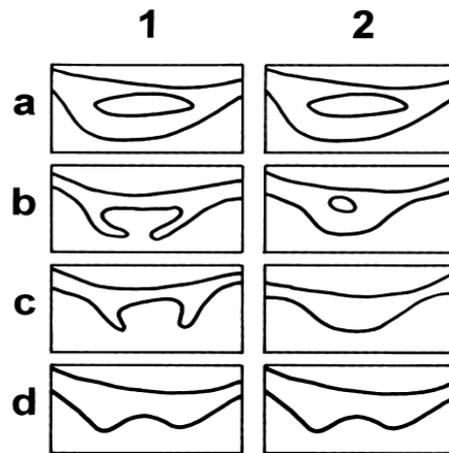


Figura 4.11: Por que a altura h do *disector* precisa ser pequena suficiente para mostrar eventos topológicos relevantes. Em **1-a)** vê-se uma conexão extra, que se mostra rompida em **1-b)**, o que contribuiria com -1 para a Característica de Euler-Poincaré, CEP , da estrutura (T_{+-}) . De **2-b)** para **2-c)**, vê-se o desaparecimento da cavidade, o que contribuiria com $+1$ para a CEP da estrutura (T_{--}) . Note que **a)** e **d)** são idênticos em ambos os casos [KG01].

A exigência de que o espaçamento entre os planos seja pequeno elimina a confusão sobre a conectividade, significando que somente uns poucos eventos topológicos são detectados de maneira que uma grande área ou muitos campos de análise são necessários para que se obtenham contagens suficientes para que se atinja a exatidão estatística satisfatória. No entanto, quando o número de *disectors* é limitado, pode-se aumentar a área das seções planas como recurso para aumentar a exatidão dos valores estimados. Isso pode ser feito aumentando-se o número de campos de contagem por seção, o que torna o processo mais fácil, ao invés de se utilizar apenas um grande campo. O que mais consome tempo no processo de utilização do *disector* é a perfeita sincronização dos planos de referência e de comparação.

A chave para o bom desempenho do *disector* é o espaçamento entre as seções paralelas ser suficientemente pequeno para que a estrutura entre elas seja relativamente simples (usualmente $\frac{1}{4}$ ou $\frac{1}{5}$ do tamanho da menor forma a ser amostrada). Nenhuma forma de interesse pode-se ocultar por inteiro no interior do volume sob

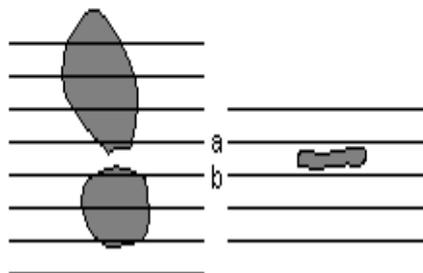


Figura 4.12: À esquerda, está ilustrado o caso onde, ao analisar as seções planas **a** e **b**, o observador certamente não contará eventos estereológicos ocorrendo entre eles. À direita, caso onde um objeto pode esquivar-se de ambas as seções planas, não sendo acertado por nenhum deles.

análise e, além disso, é necessário que seja possível a inferência do que ocorre entre as seções planas a partir da comparação das duas imagens, tal como ramificações, por exemplo (Figura 4.11).

Existem, basicamente, dois erros de contagem que podem ser cometidos na utilização do *disector*. Estes estão ilustrados na Figura 4.12.

Quando os campos de contagem localizam-se parcialmente fora da estrutura analisada, como na Figura 4.10, pode-se lançar mão de um artifício, que consiste em colocar um ponto dentro do campo e julgá-lo, em cada campo, dentro ou fora da estrutura. Se o ponto acerta a estrutura, o volume do *disector* associado é somado ao volume total dos *disectors*, caso contrário, não. No entanto, independentemente de o volume de um *disector* ser ou não somado, as partículas por ele amostradas são todas somadas ao total de partículas da estrutura, de modo que o número de partículas por unidade de volume da estrutura passa a ser estimado pela seguinte relação:

$$N_V = \frac{\sum Q^-}{Ah \sum P}$$

onde A é a área do campo amostrado, h é a altura do *disector*, $\sum Q^-$ é a contagem de partículas em todos os *disectors* e $\sum P$ é a soma de campos associados aos pontos que acertaram a estrutura.

4.4 O Fracionador

Uma estratégia amplamente utilizada para amostrar uniformemente posições na estrutura é o chamado *fracionador*. Ele pode ser implementado juntamente com cada um dos testes estereológicos descritos.

Primeiramente, o espaço de referência contendo os objetos de interesse é exaustivamente seccionado. Do número total de seções, algumas são selecionadas de maneira uniforme e randômica, por exemplo, ordenando-se os pedaços e escolhendo-se um a cada 5, iniciando-se do n -ésimo pedaço, com $0 < n < 5$, um número (natural) randômico.

Se os pedaços forem dispostos para seleção sem qualquer referência à sua posição no espécime, obteve-se uma *amostragem randômica simples*, já que cada um dos pedaços teve igual probabilidade de ser selecionado. Se, por outro lado, os pedaços são postos em alguma ordem com respeito à sua disposição no espécime original (por exemplo, do topo para baixo), então a seleção de uma amostra constitui uma *amostragem randômica sistemática* da população de pedaços.

Esta diferença é importante já que, no primeiro caso, existe alguma chance de que os pedaços sejam todos locais como, por exemplo, do topo do espécime. Já no segundo caso, o conjunto de pedaços selecionados estão uniformemente distribuídos ao longo do corpo do espécime. No entanto, ambas as amostragens provêm uma estimativa imparcial dos valores esperados das propriedades geométricas analisadas, como requerem as relações estereológicas. Entretanto, a experiência têm mostrado que a variância associada com um conjunto de amostras é muito menor para a amostragem randômica sistemática do que para a simples. Este resultado tem implicações práticas no que concerne ao esforço necessário para que uma determinada exatidão nos resultados estatísticos estereológicos sejam atingidos; em outras palavras, com menos contagens a amostragem sistemática fornece a exatidão procurada.

Selecionadas as seções que cederão os campos amostrais, é feita uma amostragem randômica do espaço de referência total em cada uma delas e tomado um volume associado com cada campo amostrado nos pedaços selecionados. A partir daqui, pode-se proceder a contagem de objetos utilizando-se o princípio do *disector*.

Tanto fracionador quanto *disector* podem ser utilizados separadamente para estimar o número de partículas N de uma estrutura. A Figura 4.13 mostra um exemplo bidimensional da estimativa de N feita através do fracionador. Ambos os métodos, fracionador e *disector*, são semelhantes em dois aspectos: utilizam a escala local para estimar o valor total de N da estrutura e, para tanto, ambos utilizam o princípio do *disector*. Considerando-se o primeiro dos aspectos, existem diferenças importantes em como é feita a escala local para a estrutura toda: o fracionador não estima N baseado em todo o volume amostrado e, além disso, esta estimativa não é afetada por mudanças no espaço de referência durante o processo. Em segundo lugar, o fracionador não requer uma estimativa do volume do espaço de referência e não necessita de decisões acerca das bordas do campo amostrado; requer, somente, que os objetos de interesse sejam não ambigualmente reconhecíveis. A única desvantagem potencial do fracionador é que o volume de referência precisa ser exaustivamente seccionado para que se conheça o número total de pedaços ([Mou02]).

Alguns aspectos da utilização do fracionador causam confusão. Em [HR05], encontram-se alguns esclarecimentos:

- é decidida qual fração do objeto é apropriada para ser amostrada e, então, os fragmentos são selecionados (ou com amostragem randômica simples, ou com sistemática), independentemente da fração de fragmentos que será adotada; ou seja, na Figura 4.13, por exemplo, a fração do objeto que foi selecionada pela Amostra 1 é $\frac{1}{3}$, e não $\frac{4}{10}$;
- os fragmentos não precisam ter o mesmo formato ou o mesmo tamanho, embora essa característica reduza a variância da estimativa;

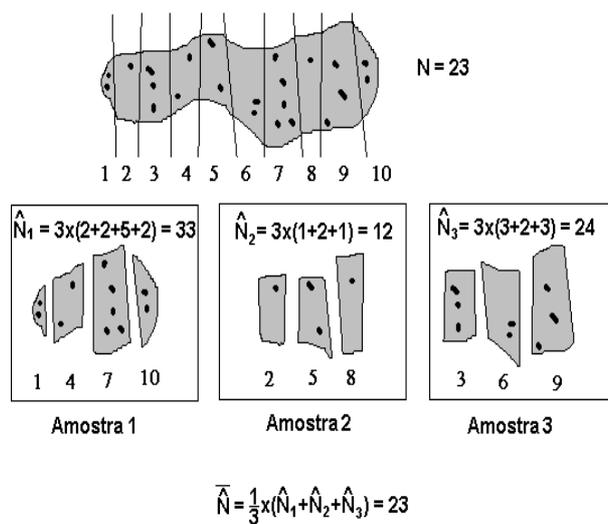


Figura 4.13: Exemplo da utilização do fracionador em duas dimensões. O objeto foi cortado em 10 fatias de tamanho e formato desiguais, tendo sido separado em 3 amostras, cada uma representando, portanto, uma fração de $\frac{1}{3}$ do objeto. Para cada amostra, foi feita uma estimativa imparcial do número total de partículas, que é obtida contando-se o número delas na amostra e multiplicando-se pelo recíproco da fração do objeto que a amostra representa. Por exemplo, na terceira amostra, existe um total de 8 partículas, o que resulta em uma estimativa de 24 para o objeto todo. A média das estimativas feitas para cada uma das 3 amostras é 23, o número exato do total de partículas [HR05].

- o número de fragmentos em cada amostra, em geral, não será o mesmo (por exemplo, na Figura 4.13, a primeira amostra tem um fragmento a mais que as outras);
- a propriedade de imparcialidade do método significa que a média das estimativas será igual ao valor real, o que não significa que cada estimativa é exatamente igual ao valor real. Na prática, a variabilidade do fracionador pode ser mantida sob controle, por exemplo, aumentando-se o número de fragmentos.

Em [Mou02], é apresentada outra forma de estimar N , através da *aproximação de dois estágios* ou *aproximação $N_V \times V_{ref}$* . Este método determina N (o número total de objetos da estrutura analisada) a partir de N_V (o número de objetos por unidade de volume). Nesta formulação, N é dado por

$$N = N_V V_{ref} = \frac{\sum Q^-}{\sum Vol_{dis}} V_{ref}$$

onde $\sum Q^-$ é a soma total da contagem de objetos, V_{ref} é o volume estimado do espaço de referência (estrutura), $\sum Vol_{dis}$ é o volume total dos *disectors* analisados.

O único inconveniente é que N_V e V_{ref} precisam ser medidos em estruturas que tiveram o mesmo processamento, sob a pena de um possível encurtamento ou estiramento em um dos espaços de referência provocar tendências no cálculo de N .

5 ANÁLISE E TRATAMENTO DE IMAGENS

5.1 Relações Básicas entre Pixels

Representar-se-á uma imagem por $f(x, y)$, um pixel em particular, por letras minúsculas, tais como p , q , e um conjunto de pixels de $f(x, y)$, por S .

Um pixel p nas coordenadas (x, y) possui quatro vizinhos horizontais e verticais, chamados *vizinhos-de-4* de p , $N_4(p)$, cujas coordenadas são: $(x+1, y)$, $(x-1, y)$, $(x, y+1)$ e $(x, y-1)$. Cada pixel está a uma unidade de distância de (x, y) , sendo que alguns dos vizinhos de p ficarão fora da imagem digital se este estiver na borda.

Os quatro vizinhos diagonais de p possuem coordenadas $(x+1, y+1)$, $(x+1, y-1)$, $(x-1, y+1)$ e $(x-1, y-1)$ e são denotados por $N_D(p)$. Estes pontos, juntamente com $N_4(p)$ formam a *vizinhança-de-8* de p , $N_8(p)$. Como anteriormente, se p estiver na borda da imagem, alguns de seus vizinhos ficarão fora dela.

Outro conceito importante é o de *conectividade* dos pixels. Este é utilizado no estabelecimento das bordas de objetos e componentes das regiões em uma imagem. Para estabelecer se dois pixels estão conectados, é preciso determinar se eles são de alguma forma adjacentes (*vizinhos-de-4*, por exemplo) e se seus níveis de cinza satisfazem um certo critério de similaridade (digamos, se eles estiverem dentro de uma faixa predefinida que os caracteriza como iguais).

Um pixel p é *adjacente* a um pixel q se eles forem conectados. Um *caminho* de um pixel p com coordenadas (x, y) a um pixel q com coordenadas (s, t) é uma sequência de pixels distintos em coordenadas (x_0, y_0) , $(x_1, y_1), \dots, (x_n, y_n)$ em que $(x_0, y_0) = (x, y)$ e $(x_n, y_n) = (s, t)$, (x_i, y_i) é adjacente a (x_{i-1}, y_{i-1}) , $1 \leq i \leq n$, e n , no caso dos vizinhos-de-4, é o *comprimento do caminho*. Ao utilizar-se vizinhos-de-

8, as distâncias entre pixels consecutivos não é constante, isto é, vale $\sqrt{2}$ se os pixels são vizinhos diagonais, e 1, caso contrário [dFCJ00].

Se p e q forem pixels de um subconjunto S da imagem, então diz-se que p está conectado a q em S se existir um caminho de p a q consistindo unicamente de pixels em S . Para qualquer pixel p em S o conjunto de pixels em S que estão conectados a p é denominado *componente conexo* de S . Componentes conexos distintos estão disjuntos.

Um procedimento importante na análise de imagens é a *rotulação de componentes conexos*. A seguir é mostrado um procedimento simples para fazê-lo [GW00]. Consideremos que uma imagem binária é percorrida pixel por pixel, da esquerda para a direita, de cima para baixo, e assumamos que o interesse está em componentes conectados-de-8. Seja (x, y) o pixel em qualquer passo no processo de varredura e sejam $(x, y + 1)$ e $(x - 1, y)$, respectivamente os vizinhos superior e esquerdo de (x, y) e $(x - 1, y + 1)$ e $(x + 1, y + 1)$ os diagonais superiores esquerdo e direito, respectivamente. A natureza da sequência de varredura garante que, quando chegarmos a (x, y) , os pontos $(x, y + 1)$, $(x - 1, y)$, $(x - 1, y + 1)$ e $(x + 1, y + 1)$ já tenham sido encontrados (e rotulados, se tiverem valor 1). O procedimento é dado como segue: se (x, y) for 0, mova para a próxima posição; se (x, y) for 1 e todos seus quatro vizinhos $(x, y + 1)$, $(x - 1, y)$, $(x - 1, y + 1)$ e $(x + 1, y + 1)$ forem 0, atribua a (x, y) um novo rótulo. Se apenas um dos vizinhos for 1, atribua a (x, y) o seu rótulo. Se dois ou mais vizinhos forem 1, atribua um dos rótulos a (x, y) e anote que os rótulos são equivalentes (isto é, os pontos estão conectados por (x, y)). Após terminar de percorrer a imagem, ordene os pares de rótulos equivalentes em classes de equivalência, atribua um único rótulo a cada classe e percorra a imagem uma segunda vez, trocando cada rótulo pelo atribuído à sua classe de equivalência.

5.2 Segmentação de Imagens

A segmentação de imagens é a divisão de uma imagem em regiões ou categorias, que correspondem a diferentes objetos ou partes de objetos. Todo pixel de uma imagem é alocado em uma dessas categorias. O nível até o qual esta subdivisão deve ser realizada depende do problema a ser resolvido. A importância dessa etapa no processo de análise de imagens é tal que ela pode definir o sucesso ou o fracasso dos passos seguintes [GH95]. Uma boa segmentação é tipicamente aquela em que pixels da mesma categoria têm similar escala de cinza de variados valores e formam uma região conexa e, além disso, pixels vizinhos que estão em diferentes categorias têm valores distintos (similaridades e descontinuidades). Alguns métodos de segmentação de imagens serão abordados aqui. Mais exemplos em [GW00].

5.2.1 Limiarização

De posse de uma imagem $f(x, y)$ composta por objetos iluminados sobre um fundo escuro cujos pixels do objeto e do fundo tenham níveis de cinza agrupados em dois grupos dominantes, uma maneira óbvia de extrair os objetos do fundo é através da seleção de um limiar T que separe os dois grupos. Então cada ponto (x, y) tal que $f(x, y) > T$ é denominado um ponto do objeto; caso contrário, é denominado como sendo um ponto do fundo ([GW00], [GH95]).

Um caso mais geral é quando destacam-se mais de dois grupos dominantes de níveis de cinza, três, por exemplo: dois tipos de objetos iluminados em um fundo escuro. A mesma abordagem básica classifica um ponto (x, y) como pertencendo à classe de um dos objetos se $T_1 \leq f(x, y) \leq T_2$, à classe do outro objeto se $f(x, y) > T_2$ e ao fundo se $f(x, y) < T_1$. Esse tipo de *limiarização multiníveis* é geralmente menos confiável que a de limiar único. A razão é a dificuldade do estabelecimento de múltiplos limiares que isolem efetivamente as regiões de interesse, especialmente quando o número de grupos correspondentes do histograma for grande. Tipicamente,

problemas dessa natureza, se tratados por limiarização, são melhor resolvidos com um limiar único variável.

De acordo com a discussão precedente, a limiarização pode ser vista como uma operação que envolve testes de uma função T da forma

$$T = T[x, y, p(x, y), f(x, y)]$$

onde $f(x, y)$ é o nível de cinza do ponto (x, y) e $p(x, y)$ denota alguma propriedade local desse ponto, por exemplo, o nível de cinza médio em uma vizinhança centrada em (x, y) . Em uma imagem limiarizada $g(x, y)$ é definida como

$$g(x, y) = \begin{cases} 1, & \text{se } f(x, y) > T \\ 0, & \text{se } f(x, y) \leq T \end{cases}$$

Portanto, pixels rotulados como 1 (ou qualquer outro nível de cinza conveniente) correspondem aos objetos, enquanto que aqueles rotulados com 0 correspondem ao fundo.

Quando T depender apenas de $f(x, y)$, o limiar será chamado *global*. Se T depender tanto de $f(x, y)$ quanto de $p(x, y)$, então o limiar será chamado *dinâmico*.

A mais direta de todas as técnicas de limiarização é a *limiarização global simples*, na qual é feito um particionamento do histograma da imagem por um limiar único T . A segmentação é então efetuada varrendo-se a imagem pixel a pixel e rotulando-os como sendo do objeto ou do fundo, dependendo se seus níveis de cinza são maiores ou menores que T . O sucesso deste método depende de quão bem o histograma pode ser particionado e o objetivo da técnica é obter uma imagem binária, de modo que a relação preto-branco possa ser invertida. Em [GW00] há uma argumentação detalhada sobre a importância da iluminação no estabelecimento da forma do histograma em uma imagem resultante.

Uma forma um pouco mais elaborada de escolha de um limiar é a *limiarização ótima*. Suponha que uma imagem contenha apenas duas regiões principais de brilho.

O histograma de tal imagem pode ser considerado uma estimativa da função densidade de probabilidade do brilho $p(z)$. Esta função densidade global é a soma ou mistura de duas densidades unimodais, uma para a região clara e outra para a escura da imagem. Além disso, os parâmetros de mistura são proporcionais às áreas de cada brilho na imagem. Se a forma das densidades for conhecida ou assumida, será possível a determinação de um limiar ótimo (em termos de um erro mínimo) para a segmentação da imagem em duas regiões de brilho.

Suponha que uma imagem contenha dois valores combinados com ruído gaussiano. A função densidade de probabilidade da mistura é

$$p(z) = P_1 p_1(z) + P_2 p_2(z)$$

a qual, no caso gaussiano é

$$p(z) = -\frac{P_1}{\sqrt{2\pi}\sigma_1} \exp\left[-\frac{(z - \mu_1)^2}{2\sigma_1^2}\right] + \frac{P_2}{\sqrt{2\pi}\sigma_2} \exp\left[-\frac{(z - \mu_2)^2}{2\sigma_2^2}\right]$$

onde μ_1 e μ_2 são os dois valores médios dos dois níveis de cinza, σ_1 e σ_2 são os desvios padrões em torno das médias e P_1 e P_2 são as probabilidades a priori dos dois níveis. A restrição $P_1 + P_2 = 1$ deve ser satisfeita, de maneira que a densidade de mistura tenha cinco parâmetros desconhecidos. Se todos eles forem conhecidos, o limiar ótimo pode ser facilmente determinado.

Suponha que as regiões escuras correspondam ao fundo e as claras, aos objetos. Neste caso, $\mu_1 < \mu_2$ e um limiar pode ser definido de maneira que todos os pixels com um nível de cinza abaixo de T sejam considerados pontos do fundo e os com nível de cinza acima, pontos do objeto. A probabilidade de se classificar (erroneamente) um ponto do objeto como sendo de fundo é

$$E_1(T) = \int_{-\infty}^T p_2(z) dz.$$

Similarmente, a probabilidade de se classificar um ponto do fundo como sendo de objeto é

$$E_2(T) = \int_T^{\infty} p_1(z) dz.$$

Portanto, a probabilidade total de erro é

$$E(T) = P_2 E_1(T) + P_1 E_2(T).$$

Encontrar o valor de limiar para o qual o erro seja mínimo requer a diferenciação de $E(T)$ em relação a T (utilizando a regra de Liebnitz) e igualando-se o resultado a 0 obtém-se

$$P_1 p_1(T) = P_2 p_2(T).$$

A aplicação deste resultado à densidade gaussiana, o cálculo de logaritmos e uma simplificação fornece a equação quadrática

$$AT^2 + BT + C = 0$$

onde

$$\begin{aligned} A &= \sigma_1^2 - \sigma_2^2 \\ B &= 2(\mu_1 \sigma_2^2 - \mu_2 \sigma_1^2) \\ C &= \sigma_1^2 \mu_2^2 - \sigma_2^2 \mu_1^2 + 2\sigma_1^2 \sigma_2^2 \log\left(\frac{\sigma_2 P_1}{\sigma_1 P_2}\right). \end{aligned}$$

A possibilidade de duas soluções indica que dois valores de limiar podem ser requeridos na obtenção de uma solução ótima.

Se as variâncias forem iguais, $\sigma^2 = \sigma_1^2 = \sigma_2^2$, então um único limiar será suficiente

$$T = \frac{\mu_1 + \mu_2}{2} + \frac{\sigma^2}{\mu_1 - \mu_2} \log\left(\frac{P_2}{P_1}\right). \quad (5.1)$$

Se as probabilidades a priori forem iguais, $P_1 = P_2$, então o limiar ótimo será a média das médias. O mesmo vale se $\sigma = 0$.

5.2.2 Segmentação Orientada a Regiões

Seja R a região completa da imagem. Pode-se imaginar a segmentação como o processo de particionar R em n regiões R_1, R_2, \dots, R_n , tal que

1. $\bigcup_{i=1}^n R_i = R$,
2. R_i , $i = 1, 2, \dots, n$, é uma região conexa,
3. $R_i \cap R_j = \emptyset$, para todo $i \neq j$,
4. $P(R_i) = \text{VERDADEIRO}$, para $i = 1, 2, \dots, n$ e
5. $P(R_i \cup R_j) = \text{FALSO}$, PARA $i \neq j$,

onde $p(R_i)$ é um predicado lógico sobre os pontos do conjunto R_i .

A condição (1.) indica que a segmentação deve ser completa, ou seja, cada pixel deve pertencer a uma região; a condição (2.) requer que os pixels em uma região sejam conexos (ver Subseção 5.1); (3.) indica que as regiões devem ser disjuntas; (4.) trata das propriedades que devem ser satisfeitas pelos pixels em uma região segmentada, por exemplo, $P(R_i) = \text{VERDADEIRO}$ se todos os pixels em R_i possuírem a mesma intensidade. Finalmente (5.) indica que as regiões R_i e R_j são diferentes no sentido do predicado P .

O predicado P pode definir uma *segmentação por textura*, se utilizar medidas de textura, ou seja, se quantificar propriedades baseadas na média e no desvio padrão de cada região.

Uma ótima técnica de descoberta de regiões diretamente é a chamada *crescimento de regiões por agregação de pixels* ou *região crescente semeada*, que consiste no agrupamento de pixels ou sub-regiões em regiões maiores. A mais simples destas abordagens é a *agregação de pixels*, que começa com um conjunto de pontos “semente” e, a partir deles, crescem as regiões anexando a cada ponto semente aqueles pixels que possuem propriedades similares (como nível de cinza, textura ou cor).

Como ilustração, considere a Figura **a)** da Tabela 5.1, na qual os números dentro das células representam valores de nível de cinza. Serão utilizados os pontos de coordenadas (3,2) e (3,4) como sementes. A utilização de dois pontos iniciais

resulta em uma segmentação consistindo de, no máximo, duas regiões: R_1 , associada à primeira semente e R_2 , associada à segunda. A propriedade P a ser usada para incluir um pixel a uma região é ser a diferença absoluta entre os níveis de cinza daqueles pixels e o da semente menor que um dado limiar T . Qualquer pixel que satisfaça essa propriedade simultaneamente para ambas as sementes é (arbitrariamente) atribuído à região R_1 . A Figura **b)** da Tabela 5.1 mostra o resultado obtido utilizando-se $T = 3$. Neste caso, a segmentação consiste de duas regiões em que os pontos pertencentes a R_1 são denotados por a enquanto os pertencentes a R_2 , por b . Note que qualquer ponto inicial em qualquer uma das regiões levaria ao mesmo resultado. Por outro lado, a escolha de $T = 8$ resultaria em uma única região, conforme mostra a Figura **c)** da Tabela 5.1.

a)	<table style="border-collapse: collapse; text-align: center;"> <tr><td style="border: none;"></td><td style="border: 1px solid black;">1</td><td style="border: 1px solid black;">2</td><td style="border: 1px solid black;">3</td><td style="border: 1px solid black;">4</td><td style="border: 1px solid black;">5</td></tr> <tr><td style="border: 1px solid black;">1</td><td style="border: 1px solid black;">0</td><td style="border: 1px solid black;">0</td><td style="border: 1px solid black;">5</td><td style="border: 1px solid black;">6</td><td style="border: 1px solid black;">7</td></tr> <tr><td style="border: 1px solid black;">2</td><td style="border: 1px solid black;">1</td><td style="border: 1px solid black;">1</td><td style="border: 1px solid black;">5</td><td style="border: 1px solid black;">8</td><td style="border: 1px solid black;">7</td></tr> <tr><td style="border: 1px solid black;">3</td><td style="border: 1px solid black;">0</td><td style="border: 1px solid black;">1</td><td style="border: 1px solid black;">6</td><td style="border: 1px solid black;">7</td><td style="border: 1px solid black;">7</td></tr> <tr><td style="border: 1px solid black;">4</td><td style="border: 1px solid black;">2</td><td style="border: 1px solid black;">0</td><td style="border: 1px solid black;">7</td><td style="border: 1px solid black;">6</td><td style="border: 1px solid black;">6</td></tr> <tr><td style="border: 1px solid black;">5</td><td style="border: 1px solid black;">0</td><td style="border: 1px solid black;">1</td><td style="border: 1px solid black;">5</td><td style="border: 1px solid black;">6</td><td style="border: 1px solid black;">5</td></tr> </table>		1	2	3	4	5	1	0	0	5	6	7	2	1	1	5	8	7	3	0	1	6	7	7	4	2	0	7	6	6	5	0	1	5	6	5
	1	2	3	4	5																																
1	0	0	5	6	7																																
2	1	1	5	8	7																																
3	0	1	6	7	7																																
4	2	0	7	6	6																																
5	0	1	5	6	5																																

b)	<table style="border-collapse: collapse; text-align: center;"> <tr><td style="border: none;"></td><td style="border: 1px solid black;">a</td><td style="border: 1px solid black;">a</td><td style="border: 1px solid black;">b</td><td style="border: 1px solid black;">b</td><td style="border: 1px solid black;">b</td></tr> <tr><td style="border: 1px solid black;">a</td><td style="border: 1px solid black;">a</td><td style="border: 1px solid black;">a</td><td style="border: 1px solid black;">b</td><td style="border: 1px solid black;">b</td><td style="border: 1px solid black;">b</td></tr> <tr><td style="border: 1px solid black;">a</td><td style="border: 1px solid black;">a</td><td style="border: 1px solid black;">b</td><td style="border: 1px solid black;">b</td><td style="border: 1px solid black;">b</td><td style="border: 1px solid black;">b</td></tr> <tr><td style="border: 1px solid black;">a</td><td style="border: 1px solid black;">a</td><td style="border: 1px solid black;">b</td><td style="border: 1px solid black;">b</td><td style="border: 1px solid black;">b</td><td style="border: 1px solid black;">b</td></tr> <tr><td style="border: 1px solid black;">a</td><td style="border: 1px solid black;">a</td><td style="border: 1px solid black;">b</td><td style="border: 1px solid black;">b</td><td style="border: 1px solid black;">b</td><td style="border: 1px solid black;">b</td></tr> </table>		a	a	b	b	b	a	a	a	b	b	b	a	a	b	b	b	b	a	a	b	b	b	b	a	a	b	b	b	b
	a	a	b	b	b																										
a	a	a	b	b	b																										
a	a	b	b	b	b																										
a	a	b	b	b	b																										
a	a	b	b	b	b																										

c)	<table style="border-collapse: collapse; text-align: center;"> <tr><td style="border: none;"></td><td style="border: 1px solid black;">a</td><td style="border: 1px solid black;">a</td><td style="border: 1px solid black;">a</td><td style="border: 1px solid black;">a</td><td style="border: 1px solid black;">a</td></tr> <tr><td style="border: 1px solid black;">a</td><td style="border: 1px solid black;">a</td></tr> <tr><td style="border: 1px solid black;">a</td><td style="border: 1px solid black;">a</td></tr> <tr><td style="border: 1px solid black;">a</td><td style="border: 1px solid black;">a</td></tr> <tr><td style="border: 1px solid black;">a</td><td style="border: 1px solid black;">a</td></tr> </table>		a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	a	a	a	a	a																										
a	a	a	a	a	a																										
a	a	a	a	a	a																										
a	a	a	a	a	a																										
a	a	a	a	a	a																										

Tabela 5.1: *Exemplo de crescimento de regiões utilizando “pontos-semente”. a) Matriz da imagem 5×5 original; b) resultado da segmentação utilizando uma diferença absoluta de menos de 3 entre os níveis de cinza de intensidade; c) resultado utilizando uma diferença absoluta de menos de 8.*

O exemplo anterior, embora simples, mostra algumas dificuldades na utilização desta técnica: seleção das sementes que representam adequadamente as regiões de interesse, bem como a seleção de propriedades apropriadas para a inclusão de pontos nas várias regiões durante o processo de crescimento. A seleção de um ou mais pontos iniciais pode frequentemente basear-se na natureza do problema. Quando a informação a priori não estiver disponível, o procedimento é calcular, em cada pixel, o mesmo conjunto de propriedades que será utilizado para atribuir os pixels às regiões durante o processo de crescimento. Se o resultado de tal cálculo mostrar agrupamentos de valores das propriedades, então os pixels com estas propriedades

que se localizarem mais próximos do centróide poderão ser usados como sementes. No exemplo anterior, um histograma de níveis de cinza mostraria que os pontos com intensidade 1 e 7 são os mais predominantes.

A seleção de critérios de similaridade depende não apenas do problema em consideração, mas também do tipo de dados (imagem) disponíveis (por exemplo, a análise de imageamento por satélite para levantamento de terrenos depende fortemente do uso de cor). Somente a utilização de descritores úteis para a caracterização de regiões, sem levar em consideração a conectividade ou relações de adjacência entre pixels, pode levar a resultados enganosos. Como exemplo, em um arranjo aleatório de pixels com apenas 3 níveis de cinza distintos, o agrupamento de pontos com a mesma intensidade para a formação de regiões sem que se preste atenção à conectividade resultaria em uma segmentação sem sentido dentro da presente discussão.

Um problema adicional no crescimento de regiões é o estabelecimento de uma condição de parada. Basicamente, o crescimento de uma região deveria parar quando nenhum outro pixel satisfizer os critérios de inclusão naquela região. Já que critérios como intensidade, textura e cor são locais em sua natureza (não levam em conta a “história” do processo de crescimento da região), pode-se lançar mão de critérios adicionais que aumentam o poder do algoritmo de crescimento de regiões, como conceitos de tamanho, similaridade entre o pixel candidato e os pixels já agrupados (como a comparação entre a intensidade do pixel candidato e a intensidade média da região) e a forma da região que está crescendo. O uso desses descritores assume a disponibilidade (ao menos parcial) de um modelo de resultados esperados. Mais técnicas de segmentação orientada a regiões disponíveis em [GW00].

6 A CONECTIVIDADE TRABECULAR E A APLICAÇÃO DA CARACTERÍSTICA DE EULER-POINCARÉ

Os tecidos ósseos são compostos principalmente de um osso compacto externo chamado *cortical* e um osso poroso interno, chamado *trabecular* ou *canceloso*. O aspecto poroso oferece uma similaridade com um meio esponjoso, onde as trabéculas estão incrustadas em uma medula. A Figura 6.1a)¹ mostra uma ilustração do osso trabecular sadio.

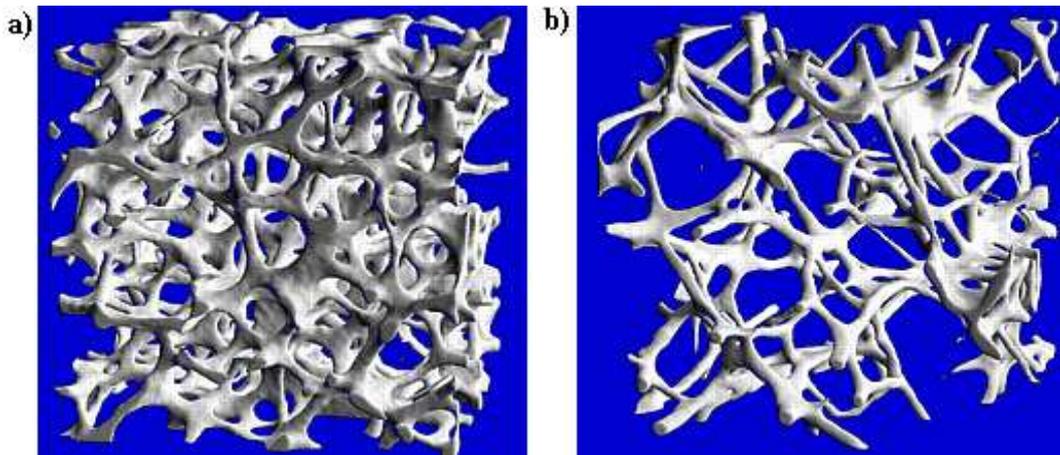


Figura 6.1: Ilustração da microarquitetura trabecular, evidenciando seu aspecto poroso. a) Osso sadio. b) Osso cujas trabéculas mostram-se rompidas e desconectadas por conta da perda de massa.

A osteoporose é definida como uma doença caracterizada pela perda da massa óssea e a deterioração microestrutural do tecido ósseo, levando à perda da rigidez e a crescente fragilidade óssea ([CM01], [RSBR07], [CLP+99]). Clinicamente, a osteoporose é associada a um crescente risco de fraturas nas vértebras e em ossos longos. É reconhecido que perfurações ou rupturas nos pilares de conexão ou afinamento de trabéculas (Figura 6.1b)) podem ocorrer por vários motivos associados à doença.

¹Fonte: http://www.sciencecases.org/osteoporosis/osteoporosis_notes.asp

Devido ao alto custo de tratamento e às dificuldades com os cuidados durante a convalescença, é de suma importância que se identifiquem sujeitos com alto risco de fratura antes de elas acontecerem [CLP⁺99].

Atualmente, a densitometria por raio-X de dupla energia (DXA) é reconhecida como o mais valioso método não invasivo para medir a densidade mineral óssea (DMO); no entanto, existe uma considerável quantidade de indivíduos cujo exame de DXA mostra perda óssea em estágios não críticos mas que vêm a sofrer fraturas, o que leva à conclusão de que somente a DMO não expõe completamente o risco de fratura e existem outros fatores além da perda de massa óssea que desempenham papel crucial. Dentre eles estão a taxa de remodelagem óssea, a distribuição de massa óssea, o grau de mineralização, a microarquitetura trabecular etc [RSBR07]. Segundo estudos desenvolvidos por Chappard [CLP⁺99], fraturas aparecem mais frequentemente em grupos de pacientes com parâmetros 3D alterados, o que mostra a importância da arquitetura na resistência do osso. Cortet et al. [CM01] chegam a afirmar que “a massa e a microarquitetura do osso são parcialmente independentes uma da outra”².

No campo da histomorfometria microscópica, o estudo da microarquitetura óssea é baseado na medida da largura, do número e da separação das trabéculas, bem como de sua organização espacial. Carbonare et al. [CVB⁺05] e Roque et al. [RSBR07] apontam como fatores estruturais determinantes da resistência mecânica óssea a largura e a porosidade do osso cortical; a forma, o número, a largura, a conectividade e a anisotropia do osso trabecular. Em particular, no caso das vértebras, o número das trabéculas horizontais diminui com o passar da idade do indivíduo, enquanto que as trabéculas verticais são reabsorvidas mais lentamente e tendem a aumentar sua largura com a idade. Esse comportamento deve-se, provavelmente, ao fato de que a carga sobre as trabéculas verticais recai de maneira acentuada, estimulando uma hipertrofia compensatória, ou o espessamento desses elementos. Como a

²Tradução nossa.

resistência de uma trabécula vertical é inversamente proporcional ao quadrado do seu comprimento efetivo, segue que a perda de uma simples estrutura horizontal ou de uma amarra cruzada que aumente o comprimento efetivo de uma trabécula vertical por um fator de dois, provocará redução de sua resistência à compressão por um fator de quatro.

6.1 Escolha dos Métodos para Tratamento das Imagens

A tomografia computadorizada, juntamente com técnicas de processamento de imagens, possibilita o desenvolvimento de ferramentas não invasivas para análise da qualidade óssea. Visando isso, o *OsteoImage*, um sistema computacional para processamento das imagens, foi desenvolvido em GTK+ para ambiente Windows. Ele recebe como entrada o conjunto contendo as regiões de interesse (ROIs) das imagens de uma vértebra e, em seguida, binariza automaticamente utilizando o algoritmo *InterMeans* [Nie04], detalhado a seguir. Porém, o software permite que o usuário aplique um valor qualquer ao limiar, ou ponto de corte (*thresholding*), para binarização. Após a binarização, a segmentação orientada a regiões (Subseção 5.2.2) é realizada para determinação dos conjuntos conexos que representam as estruturas ósseas (trabéculas), representadas pelos pixels brancos, e o seu complemento, formado pelos demais tecidos (medula óssea), representadas pelas regiões pretas. A segmentação é realizada por agregação de pixels considerando-se a técnica dos vizinhos-de-8. O sistema determina o número de trabéculas e medulas presentes em cada imagem, as áreas individual e total de trabéculas e medulas, seus perímetros e ainda calcula alguns parâmetros importantes, como a *CEP* do osso trabecular (Seção 2) utilizando-se o conceito de *disector* (Seção 4); isto porque a *CEP* é uma propriedade 0-dimensional e, portanto, conforme exposto na Subseção 4.3, para determiná-la é necessário um teste, no mínimo, tridimensional, que é o caso do *disector*.

6.1.1 Algoritmo de Limiarização *InterMeans*

É feito, inicialmente, um histograma denotado por y_0, y_1, \dots, y_n , onde y_i é o número de pixels na imagem com a escala de cinza i , e n é a escala de cinza máxima (255 em uma imagem de 8 bits). Sejam T o ponto de corte e os seguintes somatórios

$$A_j = \sum_{i=0}^j y_i$$

$$B_j = \sum_{i=0}^j i y_i$$

$$C_j = \sum_{i=0}^j i^2 y_i$$

para $j = 0, 1, \dots, n$.

Escolhe-se T tal que a variância entre classes é maximizada e a variância intra-classe é minimizada. Dado um chute inicial para o valor de T , o algoritmo define as médias dos níveis de cinza nas duas classes:

$$\mu_T = \frac{B_T}{A_T} \tag{6.1}$$

$$\nu_T = \frac{B_n - B_T}{A_n - A_T} \tag{6.2}$$

e escolhe T como sendo o valor de j para o qual

$$A_j(A_n - A_j)(\mu_j - \nu_j)^2$$

é maximizada. Em outras palavras, o algoritmo posiciona T a meio caminho entre as médias das duas classes.

Existe um algoritmo iterativo computacionalmente mais leve que fornece resultado similar ao Algoritmo *InterMeans*. Atribui-se um valor arbitrário a T , a mediana dos valores dos pixels, por exemplo, e calcula-se μ_T e ν_T de ambas as classes, tomando-se $T = \lfloor \frac{\mu_T + \nu_T}{2} \rfloor$ para a próxima iteração, parando somente quando duas iterações consecutivas resultarem no mesmo valor de T . O problema deste algoritmo é que o resultado final pode depender fortemente do valor inicial atribuído a

T [Nie04]. Além disso, a tendência é que T separe mais ou menos o mesmo número de pixels em ambas as categorias [GH95].

Uma variação deste algoritmo toma o histograma, no senso da variabilidade amostral, como

$$y_j = A_n(p_T\varphi_1(j) + q_T\varphi_2(j))$$

para $j = 0, 1, \dots, n$. Aqui p_T e q_T são proporções (tais que somam 1) e φ_1 e φ_2 denotam as densidades de probabilidade das primeira e segunda classes, respectivamente, representadas por distribuições Gaussianas:

$$\varphi_1(j) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma_T^2}} e^{-\frac{(j-\mu_T)^2}{2\sigma_T^2}}$$

$$\varphi_2(j) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\tau_T^2}} e^{-\frac{(j-\nu_T)^2}{2\tau_T^2}}$$

onde μ e ν são as médias da primeira e segunda classes, respectivamente, e σ^2 e τ^2 , as variâncias de ambas. Os pixels são alocados na categoria 1 se $p_T\varphi_1(j) \geq q_T\varphi_2(j)$; caso contrário, são alocados na 2. Substituindo-se $\varphi_l(j)$, $l = 1, 2$ e tomando-se ln, a desigualdade nos traz

$$j^2 \left\{ \frac{1}{\sigma_T^2} - \frac{1}{\tau_T^2} \right\} - 2j \left\{ \frac{\mu_T}{\sigma_T^2} - \frac{\nu_T}{\tau_T^2} \right\} + \left\{ \frac{\mu_T^2}{\sigma_T^2} - \frac{\nu_T^2}{\tau_T^2} + \ln \left(\frac{\sigma_T^2 q_T^2}{\tau_T^2 p_T^2} \right) \right\} \leq 0 \quad (6.3)$$

Sejam ω_0 , ω_1 e ω_2 denotando os três termos de (6.3). Então, o critério para alocar o pixel de valor j na categoria 1 é $j^2\omega_0 - 2j\omega_1 + \omega_2 \leq 0$.

Podem ocorrer três casos:

- se $\omega_0 = 0$ (isto é, se $\sigma_T^2 = \tau_T^2$), o critério simplifica-se, de tal forma que o pixel será alocado na categoria 1 se $2j\omega_1 \geq \omega_2$. Além disso, se $p_T = q_T$ e $\mu_T < \nu_T$, o critério torna-se $j \leq \frac{\mu+\nu}{2}$. Note que este é o critério do Algoritmo *InterMeans*, que implicitamente assume que as duas categorias são de igual tamanho;

- se $\omega_1^2 < \omega_0\omega_2$ então a função quadrática não tem raízes reais e os pixels são classificados como 1, se $\omega_0 < 0$ (isto é, $\sigma_T^2 > \tau_T^2$), ou 2, se $\omega_0 > 0$; e
- no terceiro caso, denote as raízes como T_1 e T_2 , onde $T_1 \leq T_2$ e

$$T_1, T_2 = \frac{\omega_1 \pm \sqrt{\omega_1^2 - \omega_0\omega_2}}{\omega_0}.$$

Os critérios para a categoria 1 são $T_1 < k \leq T_2$, se $\omega_0 > 0$ e $k \leq T_1$ ou $k > T_2$, se $\omega_0 < 0$.

Na prática, os dois primeiros casos não ocorrem com frequência, e se $\mu_T < \nu_T$, a regra simplifica-se para o ponto de corte: categoria 1 se o valor do pixel $k \leq \frac{\omega_1 + \sqrt{\omega_1^2 - \omega_0\omega_2}}{\omega_0}$.

Segundo [YBHL01], que comparou alguns métodos de binarização, o *InterMeans* foi o que produziu melhores resultados. Para este caso, é razoável pensar que as áreas ocupadas por trabéculas e pelo seu complemento não são muito discrepantes, mesmo nos casos com acentuada perda de massa óssea. Como não há disponível qualquer embasamento médico para escolha de outro algoritmo, o uso do *InterMeans* para nosso propósito fica justificado pela discussão na Subseção 5.2.1, referente à Equação (5.1). Além disso, métodos que utilizam limiarização têm a vantagem de permitir a intervenção do usuário. Para detalhes de outros algoritmos, conferir [Nie04].

6.2 Determinação de Parâmetros para Análise Óssea

Para o estudo da qualidade óssea, os algoritmos para o cálculo de vários parâmetros histomorfométricos [CLP⁺99] foram implementados no *OsteoImage*. Um importante parâmetro para avaliação da qualidade da estrutura trabecular é o *Volume do Osso Trabecular*, denotado por BV/TV e definido como

$$BV/TV = 100 \times \frac{TbAr}{MAr + TbAr}$$

onde $TbAr$ indica a área trabecular e MAr , a área de medula; obviamente que sua soma reflete o total de pixels da imagem. Outros parâmetros importantes são: a *espessura trabecular*, denotada por $TbTh$, o *número trabecular*, denotado por TbN e a *separação trabecular*, denotada por $TbSp$, os quais são definidos da forma:

$$TbTh = 1,199 \times \frac{TbAr}{2TbPm}$$

onde $TbPm$ indica o *perímetro da trabécula* e o fator 1,199, obtido experimentalmente, é utilizado para corrigir a inclinação da seção.

$$TbN = TbAr \times \frac{10}{TbTh}$$

expresso em “por milímetro” ($/mm$), não é exatamente o número de trabéculas, mas reflete a probabilidade de uma linha-teste cruzar uma trabécula na seção.

$$TbSp = \frac{1000}{TbN} - TbTh$$

expresso em micrômetro (μm).

Uma característica de grande relevância da estrutura trabecular é a sua conectividade superficial. Em outras palavras, quanto maior a conectividade das trabéculas, maior a amarração da estrutura. Em uma estrutura que apresenta alta conectividade, as formas côncavas das superfícies são abundantes, enquanto que as formas convexas das superfícies são maiores em estruturas com baixa conectividade. Assim, foi definido o *Fator de Forma do Osso Trabecular* ($TBPf$), com base nas operações morfológicas de dilatação e erosão, da forma:

$$TBPf = \frac{TbPm - TbPm_2}{TbAr - TbAr_2}$$

onde $TbPm_2$ e $TbAr_2$, correspondem, respectivamente, aos valores dessas grandezas obtidas após as operações de dilatação e erosão da imagem binarizada por meio de um elemento estruturante. O $TBPf$ informa sobre o grau de conectividade superficial das trabéculas, pois quando o conjunto de trabéculas apresenta alta conectividade, as superfícies côncavas são mais abundantes e a operação de dilatação

aumenta enormemente o perímetro, enquanto a área é apenas moderadamente ampliada. Esta operação se traduz em um baixo valor do TBPf para um conjunto de trabéculas com boa conectividade e um alto valor para trabéculas com acentuada desconectividade. O sistema dispõe de facilidade para cálculo do $TBPf$, utilizando 3 elementos estruturantes (cruz, quadrado, losango).

Outro parâmetro importante que é utilizado para se estimar o grau de conectividade das trabéculas é a Característica de Euler-Poincaré, CEP (Equação (2.1)). Este valor é calculado da forma:

$$CEP = \frac{1}{2}(I + H - B) \quad (6.4)$$

onde I indica o número de eventos de ilhas, H é o número de cavidades fechadas e B , o número de ramificações. O fator $\frac{1}{2}$ atribui-se à contagem feita em ambos os sentidos no *disector* (Figura 4.6). Note que a Equação (6.4) equivale exatamente à Equação (4.3), tendo em vista a discussão sobre a ocorrência de eventos topológicos entre as seções do *disector*, feita nos itens 1 a 4 da Subseção 4.3. Observa-se que valores elevados da CEP indicam que o conjunto de trabéculas apresenta baixa conectividade, enquanto valores baixos indicam uma boa conectividade.

Para adaptar tal propriedade à análise da conectividade das trabéculas em profundidade em uma sequência de *disectors*, é utilizado o procedimento sugerido por [VK96]. Primeiramente, definem-se como *objetos* todas as partes desconexas de um espaço poroso, e como *laço*, uma cavidade dentro de um objeto. Por exemplo, na Figura 6.3, a seção 1 possui 9 objetos e 3 laços, enquanto a seção 2 possui 9 objetos e 2 laços. Informações sobre a conectividade entre duas seções podem ser obtidas através de sua interseção e utilizando o operador lógico “E”. Os números de objetos e laços dentro da imagem resultante (seção $1 \cap 2$ na Figura 6.3) trazem esta informação quando relacionados com os números de objetos e laços dentro das duas imagens originais. Serão denotados por $N_{(i)}$ e $L_{(i)}$ os objetos e laços da imagem i . O objetivo é expressar os eventos topológicos I , B e H da Equação (6.4) em termos de $N_{(i)}$ e $L_{(i)}$, onde $i \in [1, 2, 1 \cap 2]$ para o *disector*.

A contagem do evento I representa o número de objetos que apareceram ou de objetos existentes que desapareceram no volume contido no *disector*. Para auxiliar, será introduzida a quantidade $\widehat{N}_{(i)}$, que define o número de objetos na seção i sem continuação em outra seção (casos **d**), **h**) e **i**) na Figura 6.3). Assim, I é contado simplesmente por

$$I = \widehat{N}_{(1)} + \widehat{N}_{(2)} \quad (6.5)$$

Os eventos topológicos de ramificação B podem ser decompostos em três tipos distintos que são:

- $B_{(1 \rightarrow 2)}$: um objeto na seção 1 ramifica-se em dois (ou mais) objetos na seção 2 (caso **e**) na Figura 6.3);
- $B_{(2 \rightarrow 1)}$: um objeto na seção 2 ramifica-se em dois (ou mais) objetos na seção 1 (caso **b**) na Figura 6.3); e
- $B_{(i)}$: ramificações dentro de uma única seção i (casos **c**) e **i**) na Figura 6.3)

Esses tipos básicos de ramificações podem ser expressos como segue:

$$B_{(1 \rightarrow 2)} = N_{(1 \cap 2)} - (N_{(1)} - \widehat{N}_{(1)}) \quad (6.6)$$

$$B_{(2 \rightarrow 1)} = N_{(1 \cap 2)} - (N_{(2)} - \widehat{N}_{(2)}) \quad (6.7)$$

$$B_{(1)} = \widehat{L}_{(1)} \quad (6.8)$$

$$B_{(2)} = \widehat{L}_{(2)} \quad (6.9)$$

Similar à definição de $\widehat{N}_{(i)}$, $\widehat{L}_{(i)}$ denota o número de laços na seção i sem laço correspondente na seção $1 \cap 2$.

O evento topológico H de uma superfície côncava interceptada pelo disector pode ser decomposto em dois:

- $H_{(1)}$: objeto na seção 1 correspondente a um laço na seção $1 \cap 2$ (caso **g**) na Figura 6.3); e
- $H_{(2)}$: objeto na seção 2 correspondente a um laço na seção $1 \cap 2$.

Assim:

$$H_{(1)} = L_{(1 \cap 2)} - (L_{(1)} - \widehat{L}_{(1)}) \quad (6.10)$$

$$H_{(2)} = L_{(1 \cap 2)} - (L_{(2)} - \widehat{L}_{(2)}) \quad (6.11)$$

A combinação das Equações (6.5)-(6.11) na Equação (6.4) leva a

$$\begin{aligned} CEP &= \frac{1}{2}[I + (H_{(1)} + H_{(2)}) - (B_{(1 \rightarrow 2)} + B_{(2 \rightarrow 1)} + B_{(1)} + B_{(2)})] \\ &= \frac{1}{2}(N_{(1)} + N_{(2)} - 2N_{(1 \cap 2)} + 2L_{(1 \cap 2)} - L_{(1)} - L_{(2)}) \end{aligned}$$

Assim, toda a informação requerida pode ser obtida da representação binária digital de duas seções e de sua interseção através do operador lógico “E”, pela contagem de $N_{(i)}$ e $L_{(i)}$ nas três imagens.

Adaptada para a análise óssea, a equação acima foi implementada no *OsteoImage* como:

$$\begin{aligned} CEP(i, i + 1) &= \frac{1}{2} [\#Grãos(i) + \#Grãos(i + 1) - 2\#Grãoscomuns(i, i + 1) + \\ &2 \#Poroscomuns(i, i + 1) - \#Poros(i) - \#Poros(i + 1)] \quad (6.12) \end{aligned}$$

onde $\#Grãos(i)$ significa o número de grãos presentes na imagem i , que se traduz no número de trabéculas isoladas presentes na imagem i ; idem para $\#Grãos(i + 1)$; $\#Grãoscomuns(i, i + 1)$, significa o número de trabéculas comuns nas imagens i e $i + 1$, ou seja, o número de trabéculas na imagem da fatia i que se propaga para a fatia $i + 1$; $\#Poroscomuns(i, i + 1)$, significa o número de cavidades medulares presentes na fatia i que se propaga para a fatia $i + 1$; $\#Poros(i)$, significa o número de cavidades medulares presentes na fatia i ; idem para $\#Poros(i + 1)$.

Um fato importante na abordagem da *CEP* pelo *OsteoImage*, é que é levada em consideração a propagação vertical das trabéculas (através do cálculo do número de grãos comuns às duas imagens). Isso significa que a presença de “pilares” na microarquitetura trabecular também entra no cálculo da *CEP* da mesma. O software também permite que se visualize essas propagações verticais de trabéculas através das imagens de gargantas tubulares (Figura 6.2).

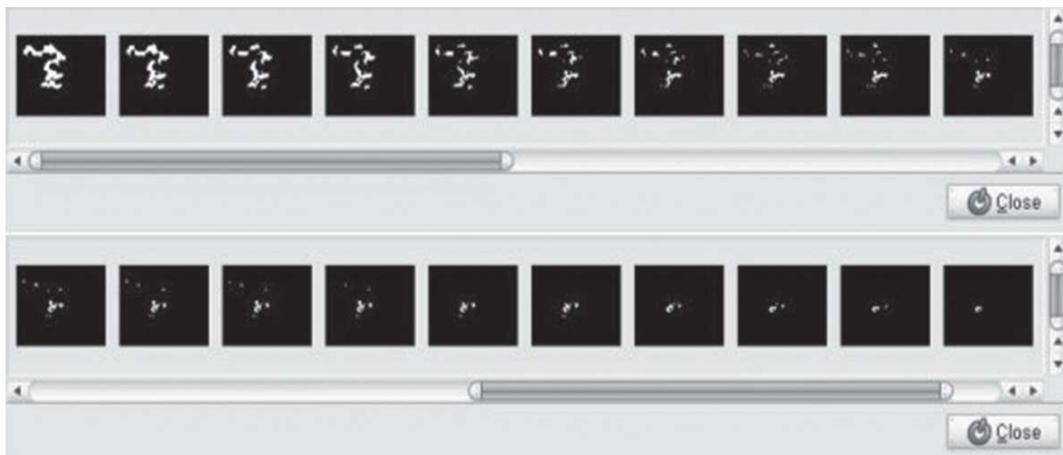


Figura 6.2: Visualização da propagação tubular de uma trabécula.

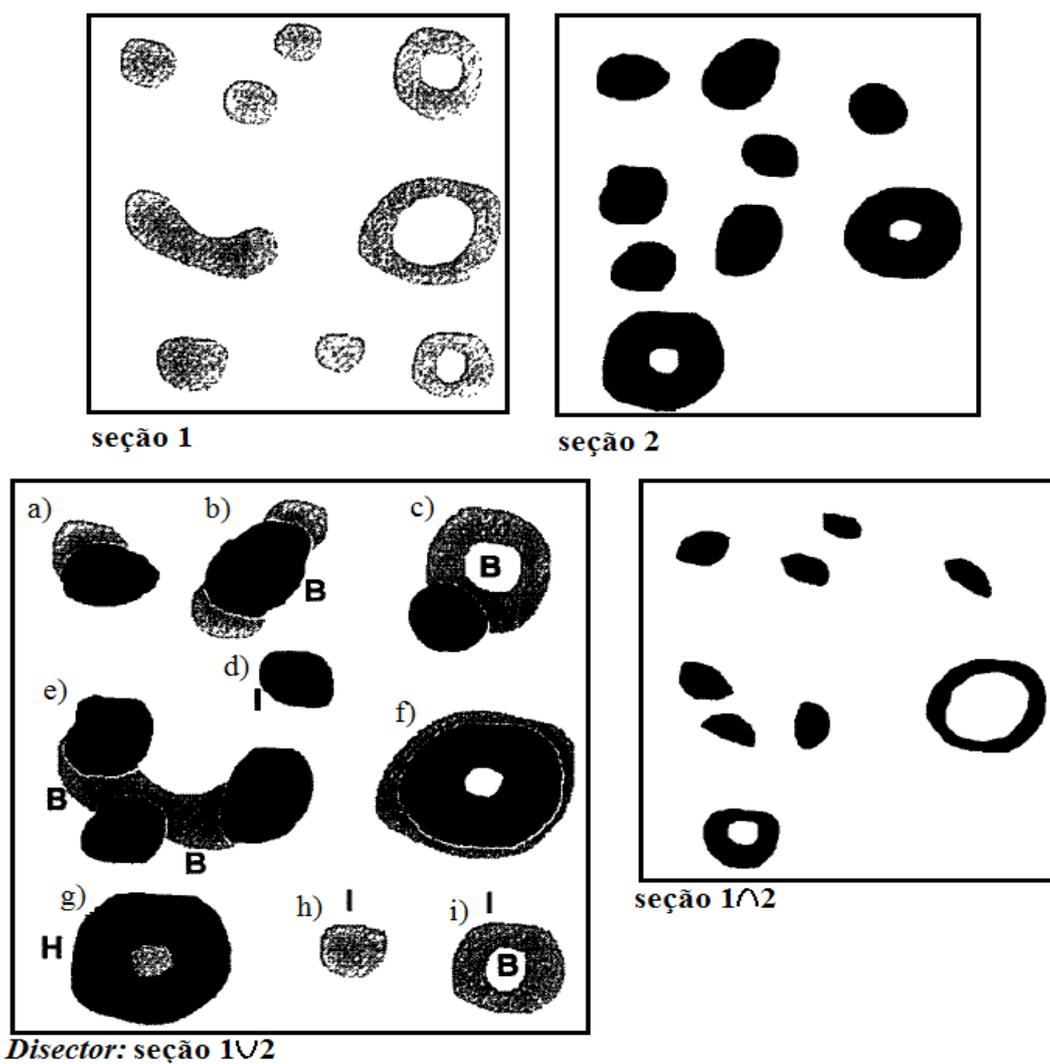


Figura 6.3: Visualização de eventos topológicos que auxiliarão no desenvolvimento do algoritmo para o cálculo da *CEP* [VK96].

7 RESULTADOS

A médio prazo, este estudo objetiva tirar conclusões acerca de amostras *in vivo*, no entanto, este trabalho foi realizado sobre vértebras *in vitro*, obtidas no Instituto Médico Legal (IML) de Porto Alegre. Cada uma delas foi devidamente preparada, tendo resina injetada na cavidade medular e tendo sido envolta em uma substância que simula a atenuação devido aos tecidos moles, para que os exames pudessem ser realizados da maneira mais verossímil possível. Sendo assim, não será feita qualquer inferência acerca da saúde óssea dos sujeitos da pesquisa quando vivos, mas sim, correlações entre sua perda de massa óssea verificada clinicamente via DXA e a análise das imagens disponíveis.

Preliminarmente, foram feitos estudos com apenas cinco amostras de vértebras, cujas origens são completamente desconhecidas, analisando-se e comparando-se medidas de parâmetros disponibilizadas pelo *OsteoImage* e seus valores de DMO. Além de gráficos de ajuste linear para os valores de *CEP* por *disector*, foram feitos outros seis gráficos distintos para cada amostra: Razão de Área Trabecular Total e Área Medular Total por imagem, Espessura Trabecular Média (média dos valores de *TbTh*) por imagem, Área Trabecular Total por imagem (já que para estas cinco vértebras todas as ROIs tinham mesmo número de pixels), Razão entre Área Trabecular Total e Espessura Trabecular Média por imagem, Razão entre Área Trabecular Média e Espessura Trabecular Média por imagem e Razão entre Raio Hidráulico Médio e Espessura Trabecular Média por imagem. O Raio Hidráulico de uma trabécula na imagem bidimensional é o valor do raio que corresponde ao perímetro da mesma caso esta tivesse forma circular. Ao final, concluiu-se que, dentre estes últimos seis parâmetros, o de resultados mais significativos é o que compara a proporção de área trabecular e não trabecular nas imagens.

Escolhidas as ferramentas e de posse das novas amostras, foram realizadas as análises. Ao todo, somam-se 891 imagens de 45 vértebras tomografadas de 6

indivíduos, denominados A, B, C, D, E e Y, onde 92 imagens são de A, 114 de B, 44 de C, 159 de D, 266 de E e 216 de Y. Dessas imagens, as ROIs foram tomadas no interior do corpo vertebral, na porção anterior, próxima à parede cortical, por ser a região mais crítica de perda de massa óssea (Figura 7.1). O tamanho das ROIs variam de vértebra para vértebra, dependendo das condições das imagens disponíveis (Tabela 7.2). A distância entre cada imagem tomografada é de $1000\mu m$, devido à máquina tomográfica ¹ utilizada. Tendo em vista que o comprimento da grande maioria das trabéculas é superior a $5mm$, segue que este é um bom espaçamento para o *disector* (Subseção 4.3).

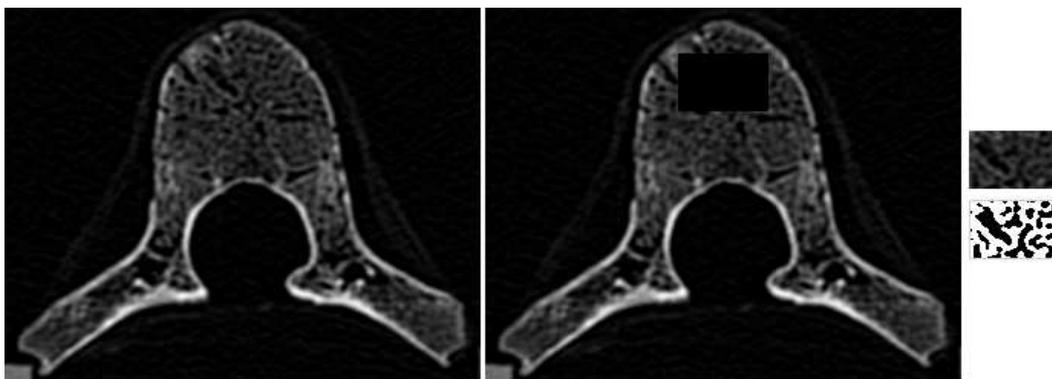


Figura 7.1: 16ª imagem tomográfica da vértebra A11. À direita, a ROI de $59\text{ pixels} \times 42\text{ pixels}$ e sua versão binarizada com o auxílio do algoritmo *InterMeans*.

Estas amostras de vértebras apresentam diferentes níveis de perda de massa óssea, que foram medidos através do exame de DXA ²; as informações disponíveis sobre suas origens encontram-se na Tabela 7.1.

Foram feitos gráficos de ajuste linear de duas propriedades de cada vértebra: a *CEP* (Equação (6.12)), utilizando pares de imagens (*disectors*), e a razão da Área Trabecular Total pela Área da Imagem (ATT/AI). Importante observar que esta última indica diretamente a proporção da imagem que é recoberta por osso

¹ *Siemens*, modelo *Somatom Plus 4*, Hospital São Lucas da PUCRS.

² O densitômetro utilizado é um *Hologic QDR 4500 A*.

Indivíduo	Sexo	Idade
A	indefinido	15 a 17 anos
B	masculino	26 a 50 anos
C	masculino	25 a 45 anos
D	masculino	25 a 40 anos
E	masculino	mais de 50 anos
Y	indefinido	indefinido

Tabela 7.1: *Informações disponíveis acerca da origem das vértebras analisadas.*

trabecular, sendo que medidas acima de 0,5 indicam que mais de 50% da ROI é formada por pixels brancos. Como o número de imagens disponíveis para cada vértebra não é igual, cada gráfico foi feito duas vezes: uma com o número total de imagens, e outra, com as 12 imagens centrais de cada uma das 45 vértebras. Isso porque as vértebras que dispõem de menos imagens podem ter suas características distorcidas ou exageradas pela falta de informação a seu respeito em comparação às informações disponíveis sobre as outras. Na Tabela 7.2, encontram-se o número de imagens (NI) disponíveis para cada vértebra, o tamanho das ROIs em pixels de largura por pixels de altura e os resultados de DMO obtidos por exame de DXA. As denominações de cada amostra foram atribuídas ainda no IML, de forma que não dizem respeito à sua localização na coluna vertebral; as letras correspondem ao indivíduo a que pertencem e os números são uma mera ordenação. À direita, as vértebras dispostas em ordem crescente de valores de DMO.

Fazendo-se uma análise individual de cada uma das 45 vértebras, obtém-se os seguintes resultados:

- A11, A12, A13, A14, A15 e A16: possuem boa relação de área trabecular e valor de *CEP* negativo, embora A11 e A12 os tenham um tanto elevados (Figuras 7.2 e 7.3). Por tratar-se de um adolescente, suas DMOs (Tabela 7.2) não podem ser analisadas sob a mesma ótica de um indivíduo adulto. Sua DMO mostra-se baixa, não como resultado de perda de massa óssea, mas por ainda não ter alcançado o pico de calcificação.

- B11, B12, B15 e B16: relação de área trabecular baixa e valores muito elevados de *CEP* (Figuras 7.4 e 7.5). Além disso, com exceção de B15, as demais vértebras possuem grande perda de massa óssea, mostrada pela DMO (Tabela 7.2).
- B13 e B14: destacam-se por apresentar praticamente 50% de área trabecular e os melhores valores de *CEP* dentre as vértebras analisadas no indivíduo B; tendo em vista o resultado obtido na DMO (Tabela 7.2), estas vértebras aparentemente não sofreram perda de massa, mas sua conectividade mostra-se demasiado baixa.
- C11: boa relação de área trabecular, embora seja a mais baixa registrada no indivíduo C (Figura 7.6). Sua *CEP*, embora negativa, tem valor um tanto elevado, indicando conectividade de razoável a baixa. Além disso, os valores de DMO (Tabela 7.2) mostraram-se demasiadamente baixos, o que indica que houve acentuada perda de massa óssea, ou que o indivíduo não chegou a adquiri-la nas fases mais precoces da vida.
- C12 e C13: ótimas proporções de área trabecular e valores de *CEP* negativos, embora ainda um tanto elevados (Figuras 7.6 e 7.7). Suas DMOs apontam para leve perda de massa óssea (Tabela 7.2).
- D11, D12, D14, D15, D16 e D17: boa relação de área trabecular, e *CEP* com valores razoavelmente bons (Figuras 7.8 e 7.9). D14 e D15 apresentam menor perda de massa óssea que as demais, onde os casos são mais críticos (Tabela 7.2).
- D13 e D18: relação de área trabecular não muito boa em D13, mas boa em D18 (Figura 7.8); *CEP* com valores demasiadamente elevados, indicando má conectividade entre as trabéculas (Figura 7.9). D13 mostra acentuada perda de massa óssea e, D18, apenas leve.

- E11, E13, E14, E15, E16, E21, E22, E23, E24 e E25: relação de área trabecular demasiado baixa (Figura 7.10) e valores de *CEP* muito elevados, especialmente E13, E24 e E25, indicando baixíssima conectividade. De acordo com a Tabela 7.2, estas vértebras não apresentam perda de massa óssea, com exceção de E25, cuja perda mostra-se acentuada.
- E12 e E26: relação de área trabecular de razoável a baixa, mas melhor que as demais vértebras analisadas neste indivíduo; valores de *CEP* também muito elevados, o que indica baixa conectividade das trabéculas (Figuras 7.10 e 7.11). De acordo com a DMO destas vértebras, a primeira não sofreu perda de massa óssea e, a segunda, sofreu perda acentuada. As discrepâncias nesses valores podem ter alguma relação com a história clínica deste sujeito, a qual é desconhecida.
- Y3, Y6, 1Y, 3Y e 5Y: relação de área trabecular razoavelmente boa, mas valores de *CEP* elevados (Figuras 7.12 e 7.13). Pela DMO destas vértebras (Tabela 7.2), pode-se dizer que não sofreram perda de massa óssea.
- Y1, Y4, Y5, 2Y e 4Y: relação de área trabecular ruim, tendo Y5 a pior delas; Y4, Y5 e 2Y registram os piores valores de *CEP* para este indivíduo, no entanto, Y1 e 4Y também apresentam indícios de baixa conectividade (Figuras 7.12 e 7.13). Pelas DMOs, pode-se classificar as perdas de massa óssea de Y1 e 2Y como acentuadas e, nas demais, não houve perda.

Vértebra	NI	ROIs	DMO
A11	13	59 × 42	0.644
A12	16	75 × 41	0.618
A13	15	143 × 42	0.772
A14	16	133 × 45	0.914
A15	18	135 × 50	0.787
A16	14	115 × 47	0.711
B11	19	96 × 42	0.664
B12	21	81 × 52	0.753
B13	21	115 × 42	0.921
B14	19	102 × 49	1.031
B15	17	113 × 47	0.967
B16	17	105 × 52	0.792
C11	14	59 × 47	0.724
C12	14	64 × 51	0.787
C13	16	77 × 44	0.766
D11	18	68 × 60	0.630
D12	18	114 × 39	0.640
D13	21	115 × 38	0.648
D14	18	105 × 53	0.796
D15	22	102 × 43	0.798
D16	20	116 × 46	0.742
D17	20	122 × 49	0.731
D18	22	120 × 49	0.794

Vértebra	NI	ROIs	DMO
E11	17	59 × 41	0.885
E12	19	80 × 41	1.017
E13	18	69 × 49	1.150
E14	19	64 × 51	1.301
E15	21	78 × 42	1.181
E16	22	83 × 42	1.167
E21	24	113 × 56	1.229
E22	24	114 × 56	1.105
E23	26	143 × 43	1,000
E24	26	117 × 46	0.906
E25	26	112 × 49	0.653
E26	24	109 × 41	0.739
Y1	12	66 × 48	0.752
Y3	17	69 × 48	1.106
Y4	18	75 × 43	1.334
Y5	19	97 × 42	1.366
Y6	19	83 × 50	1.124
1Y	24	103 × 43	0.953
2Y	24	107 × 36	0.524
3Y	28	111 × 54	0.932
4Y	29	122 × 62	1.210
5Y	26	110 × 43	1.090

Vértebra	DMO
2Y	0.524
A12	0.618
D11	0.63
D12	0.64
A11	0.644
D13	0.648
E25	0.653
B11	0.664
A16	0.711
C11	0.724
D17	0.731
E26	0.739
D16	0.742
Y1	0.752
B12	0.753
C13	0.766
A13	0.772
A15	0.787
C12	0.787
B16	0.792
D18	0.794
D14	0.796
D15	0.798
E11	0.885
E24	0.906
A14	0.914
B13	0.921
3Y	0.932
1Y	0.953
B15	0.967
E23	1
E12	1.017
B14	1.031
5Y	1.09
E22	1.105
Y3	1.106
Y6	1.124
E13	1.15
E16	1.167
E15	1.181
4Y	1.21
E21	1.229
E14	1.301
Y4	1.334
Y5	1.366

Tabela 7.2: Nas duas primeiras tabelas, constam o número de imagens (NI) tomografadas, o tamanho das ROIs em pixels de largura por pixels de altura e os valores de DMO das 45 vértebras de 6 indivíduos, A, B, C, D, E e Y. À direita, as vértebras ordenadas crescentemente quanto aos valores de DMO.

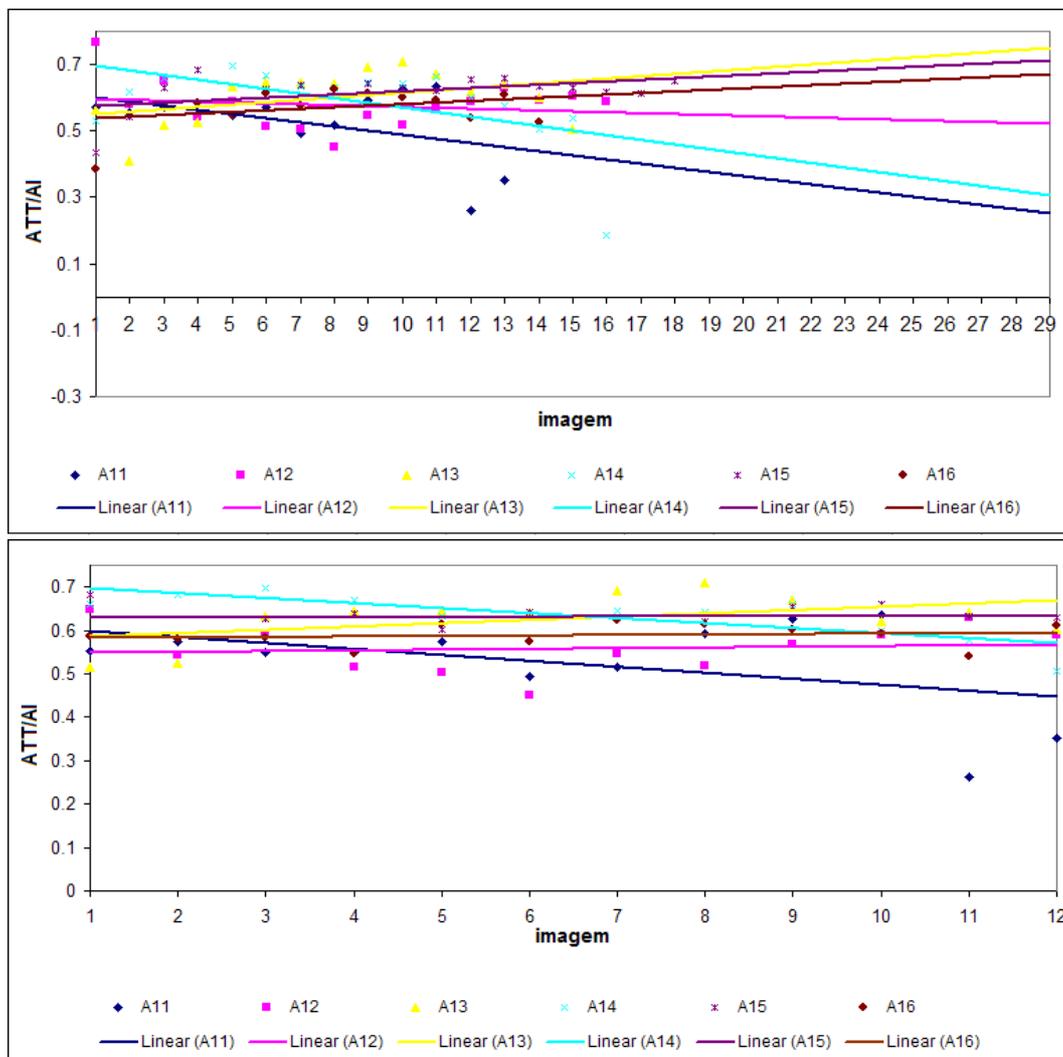


Figura 7.2: Ajuste linear da razão ATT/AI das 6 vértebras do indivíduo A. O primeiro gráfico utiliza todas as imagens disponíveis e, o segundo, padroniza a utilização de 12. Neste caso, a redução no número de imagens utilizadas posicionou os ajustes lineares de ATT/AI deste indivíduo acima de 0,5, o que corresponde a uma ótima relação de área trabecular.

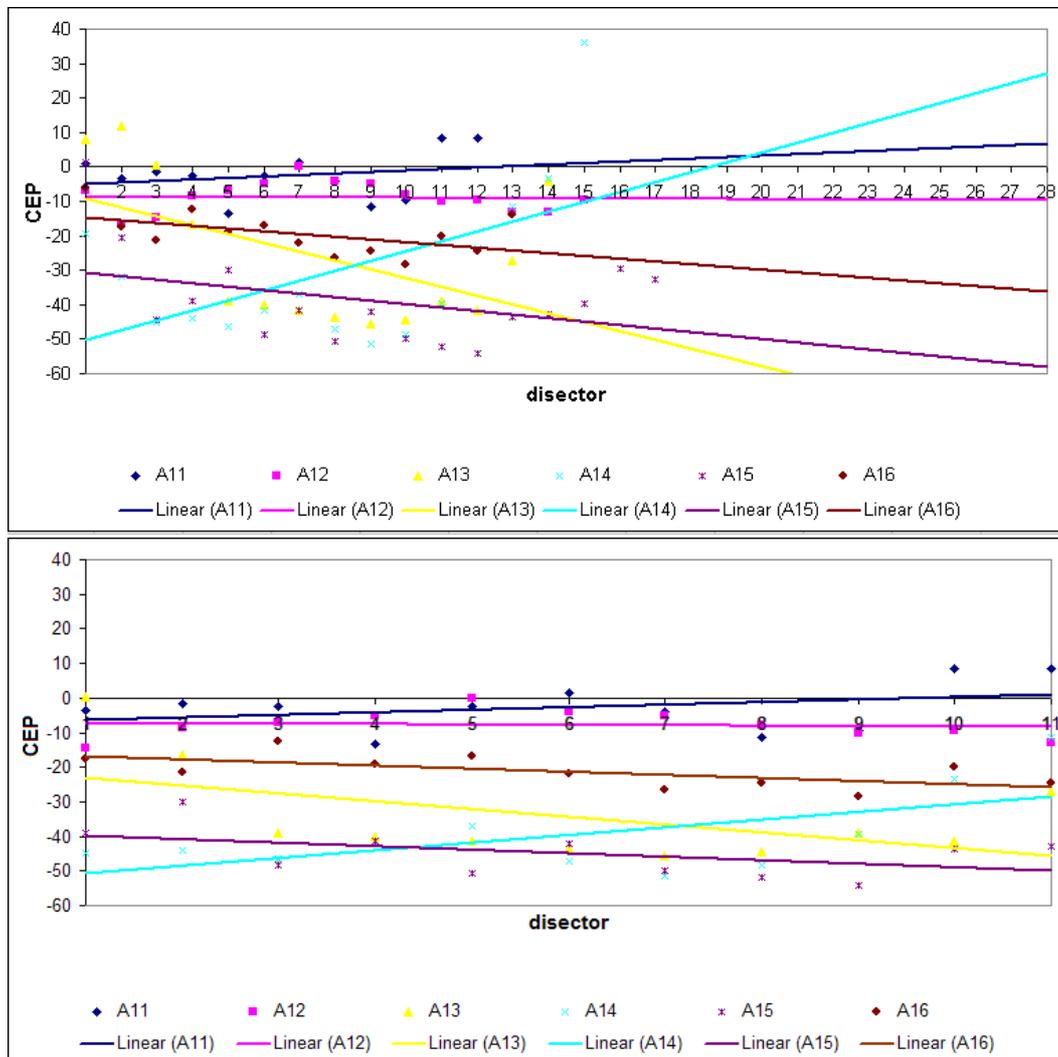


Figura 7.3: Ajuste linear da *CEP* das 6 vértebras do indivíduo A. O primeiro gráfico utiliza todas as imagens disponíveis e, o segundo, padroniza a utilização de 12. Percebe-se que as declividades no segundo gráfico são mais sutis que no primeiro, o que indica que a diferença no número de imagens pode, sim, ter afetado os resultados do primeiro gráfico. Com base no segundo, pode-se concluir que a conectividade do indivíduo A é, no geral, muito boa, uma vez que seus ajustes lineares assumem todos valores negativos. Além disso, algumas das vértebras atingem valores de *CEP* muito baixos, o que indica que sua rede de trabéculas é bastante interligada. Aliado a isso, os resultados obtidos na Figura 7.2 sugerem uma boa qualidade óssea.

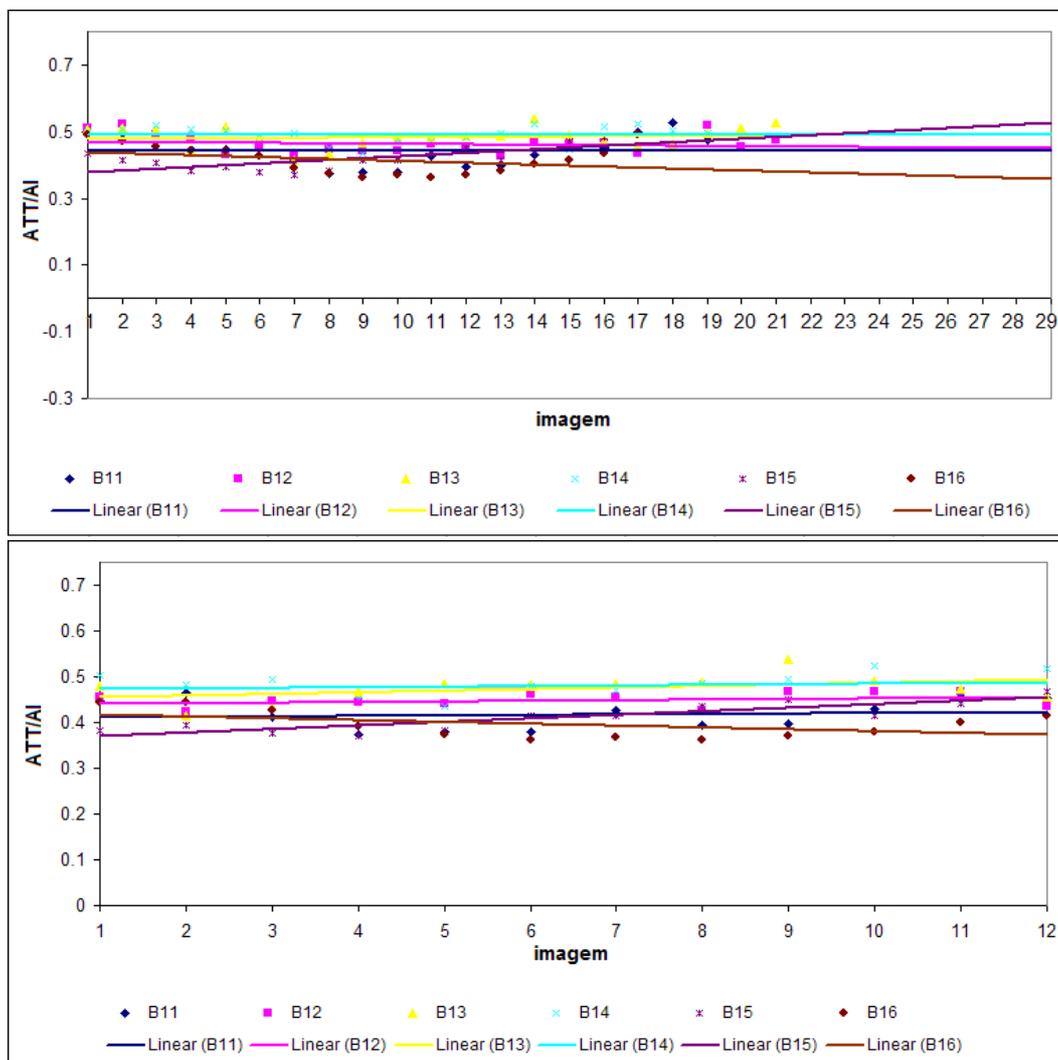


Figura 7.4: Ajuste linear da razão ATT/AI das 6 vértebras do indivíduo B. O primeiro gráfico utiliza todas as imagens disponíveis e, o segundo, padroniza a utilização de 12. Não há grandes diferenças entre os dois gráficos. Ambos apontam para uma baixa área trabecular relativa.

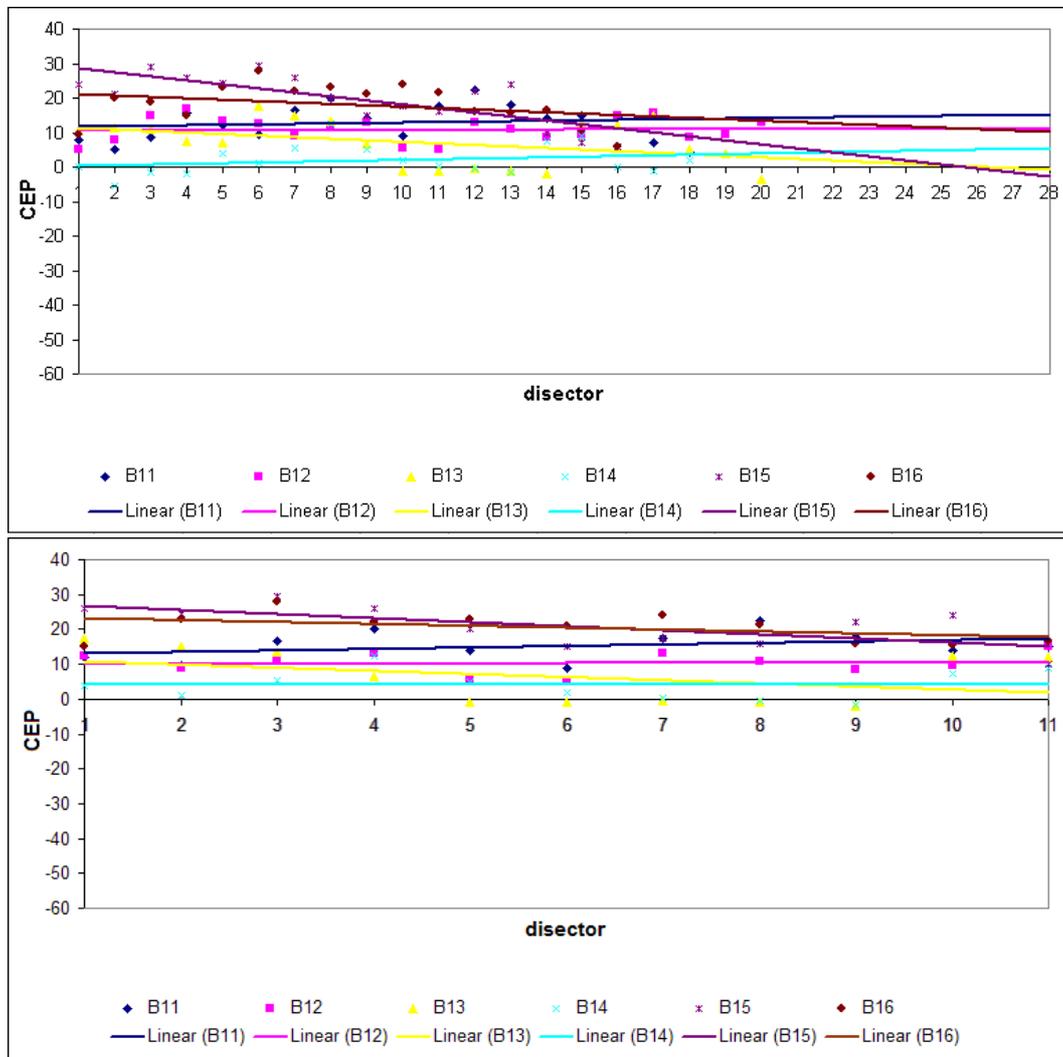


Figura 7.5: Ajuste linear da CEP das 6 vértebras do indivíduo B. O primeiro gráfico utiliza todas as imagens disponíveis e, o segundo, padroniza a utilização de 12. Com exceção da 15^a vértebra, os ajustes das demais não variaram muito de um gráfico para o outro. Analisando-se os valores encontrados, a conectividade do indivíduo B parece não ser satisfatória, já que as retas ajustantes assumem basicamente valores positivos, e atingem valores bastante altos. Este fato, aliado às informações da Tabela 7.2 e da Figura 7.4, reforça o parecer de que B apresenta má qualidade óssea.

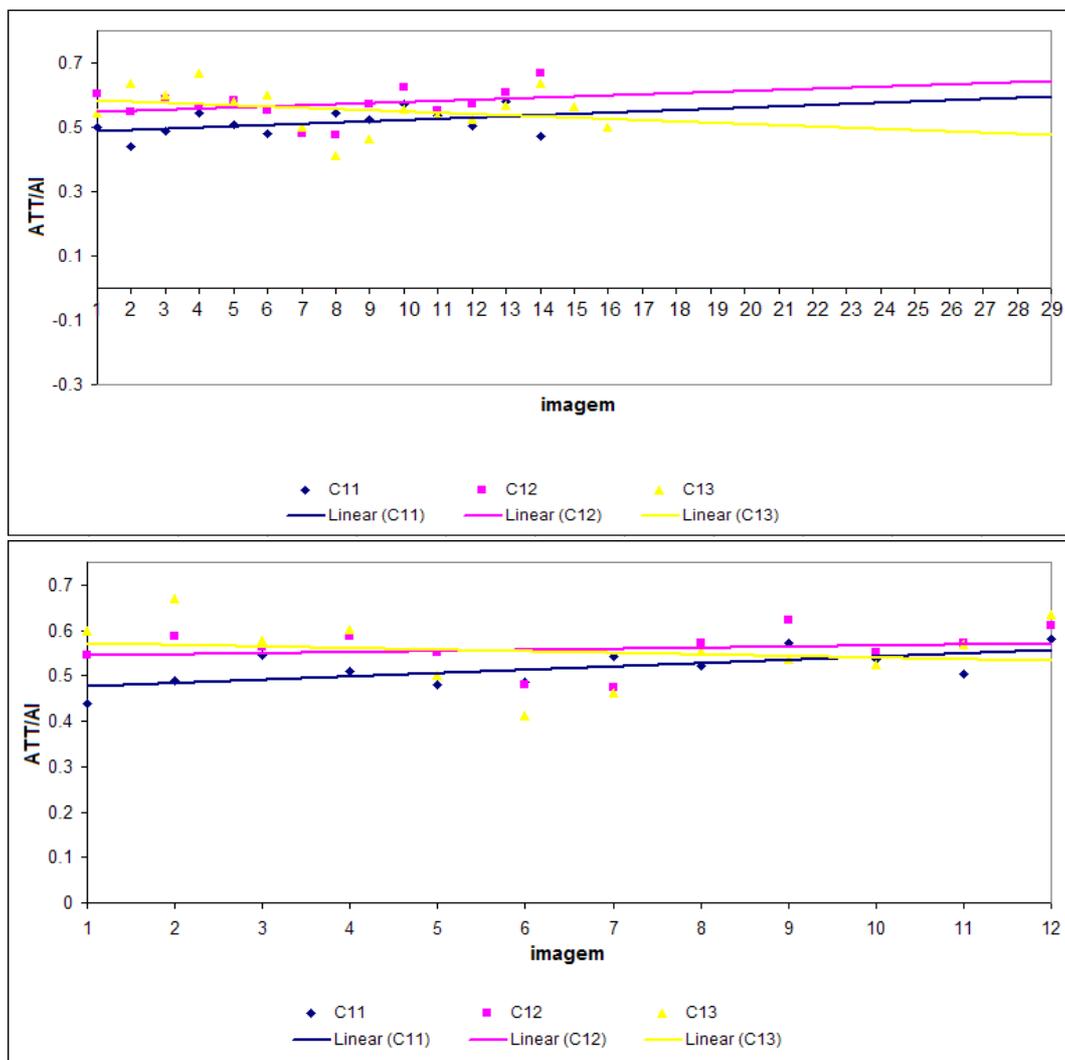


Figura 7.6: Ajuste linear da razão ATT/AI das 3 vértebras do indivíduo C. O primeiro gráfico utiliza todas as imagens disponíveis e, o segundo, padroniza a utilização de 12. O segundo gráfico indica que este indivíduo dispõe de uma razão saudável de área trabecular.

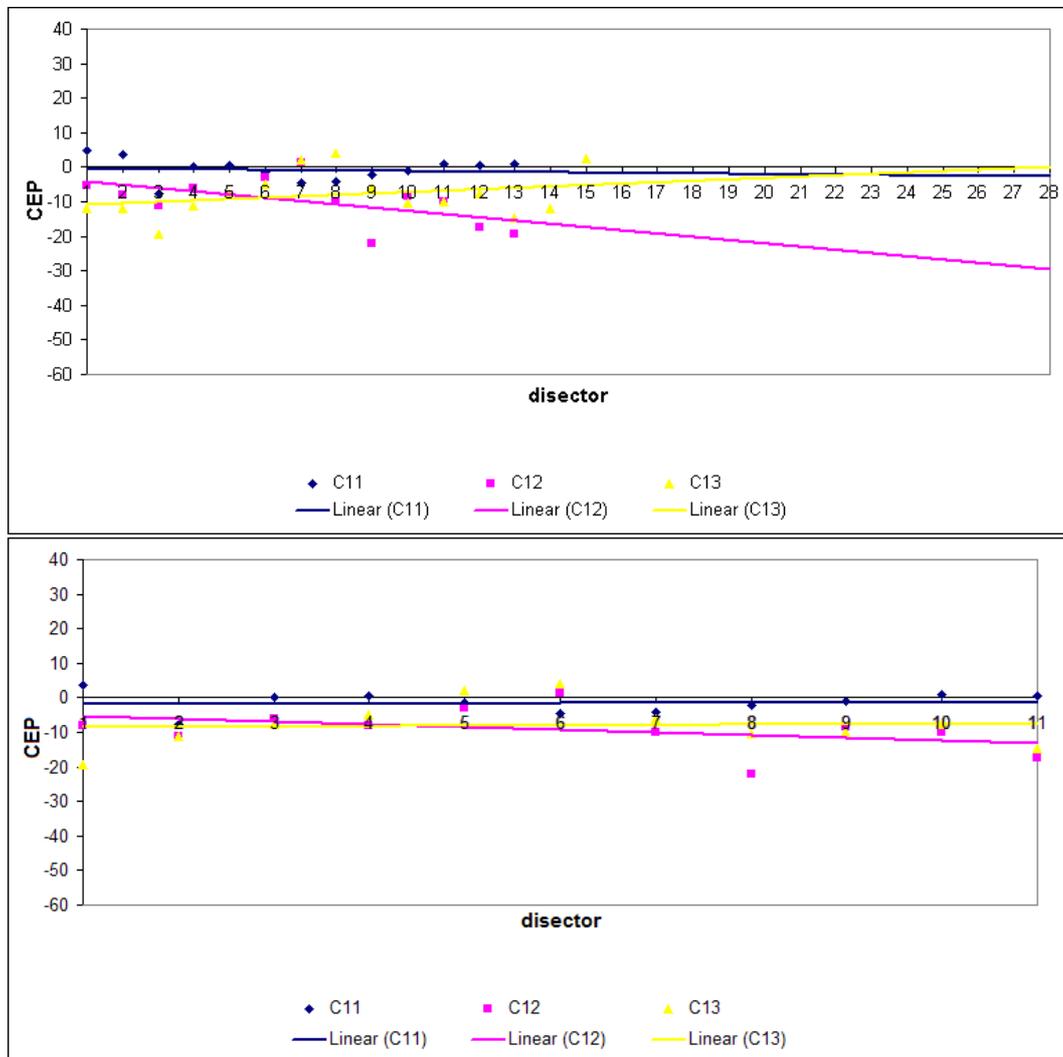


Figura 7.7: Ajuste linear da *CEP* das 3 vértebras do indivíduo C. O primeiro gráfico utiliza todas as imagens disponíveis e, o segundo, padroniza a utilização de 12. Embora com poucas informações sobre o indivíduo C, percebe-se que, apesar de suas DMOs se apresentarem um pouco abaixo do limiar saudável (Tabela 7.2), este apresenta uma conectividade razoavelmente boa em todas as vértebras analisadas, bem como uma boa relação de massa trabecular em relação à massa medular (Figura 7.6). Ou seja, este indivíduo parece ter sofrido perda de massa, mas sua qualidade óssea parece não ter sido afetada.

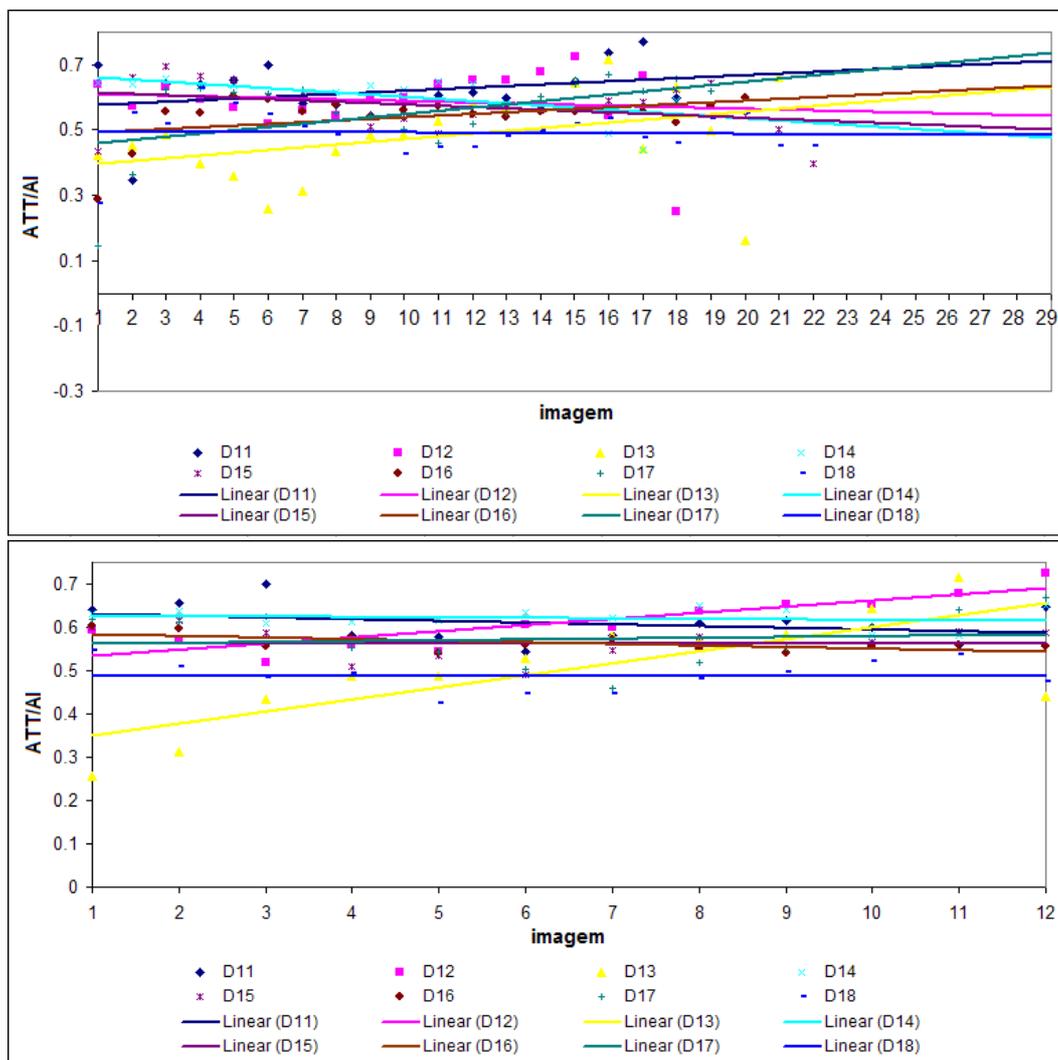


Figura 7.8: Ajuste linear da razão ATT/AI das 8 vértebras do indivíduo D. O primeiro gráfico utiliza todas as imagens disponíveis e, o segundo, padroniza a utilização de 12. Com exceção de D13, as demais vértebras apresentam ótima relação de área trabecular.

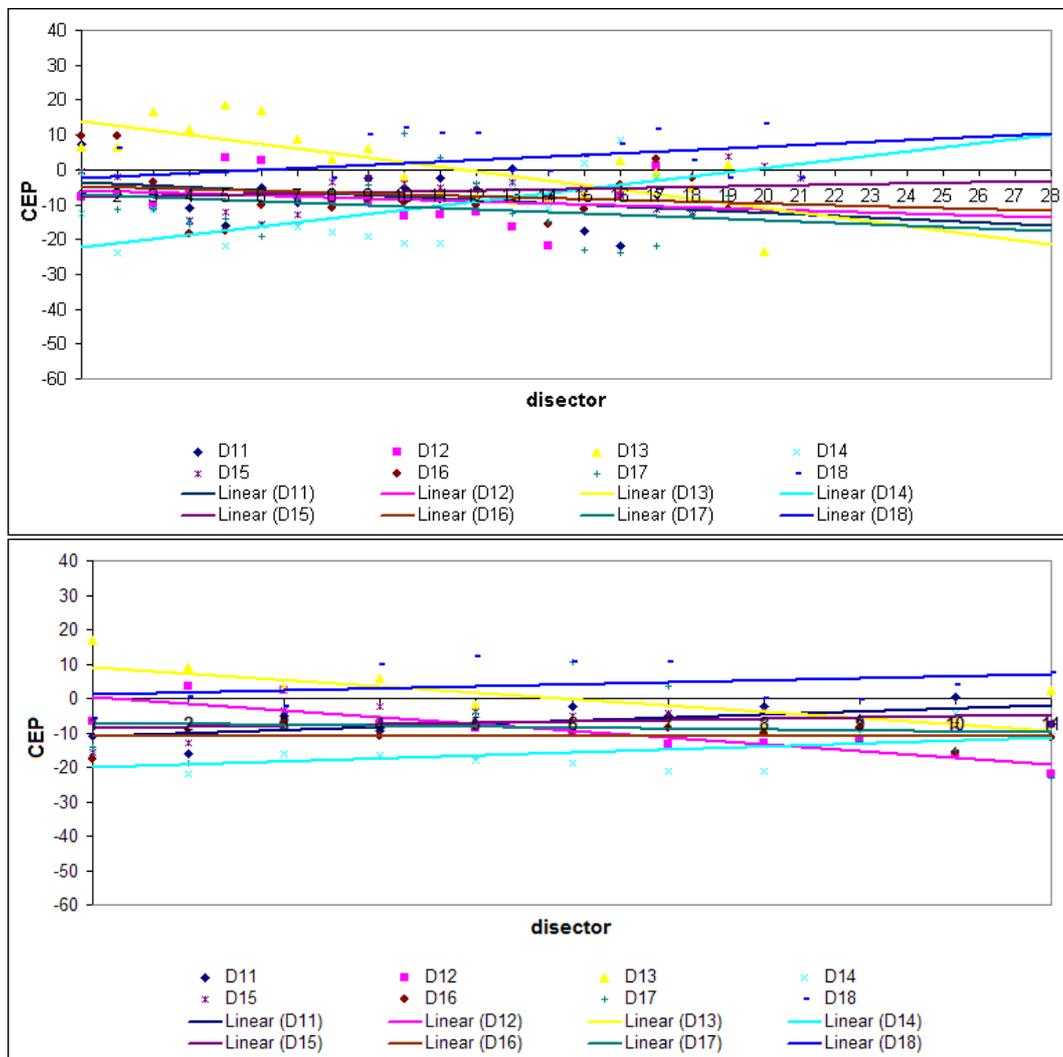


Figura 7.9: Ajuste linear da CEP das 8 vértebras do indivíduo D. O primeiro gráfico utiliza todas as imagens disponíveis e, o segundo, padroniza a utilização de 12. Comparando-se ambos os gráficos, percebe-se que as principais diferenças estão nas retas ajustantes de D13 e D14. Mesmo assim, nota-se que os valores da CEP deste indivíduo são predominantemente negativos, embora com valores não muito baixos. Isto significa que a conectividade das trabéculas destas vértebras, no geral, são razoavelmente boas, embora as DMOs deste indivíduo tenham tido resultados insatisfatórios (Tabela 7.2). Embora sua razão ATT/AI tenha mostrado bons resultados (Figura 7.8), este é um indivíduo que mereceria especial atenção devido a sua perda de massa óssea aliada a conectividade não compensatória dessa defasagem.

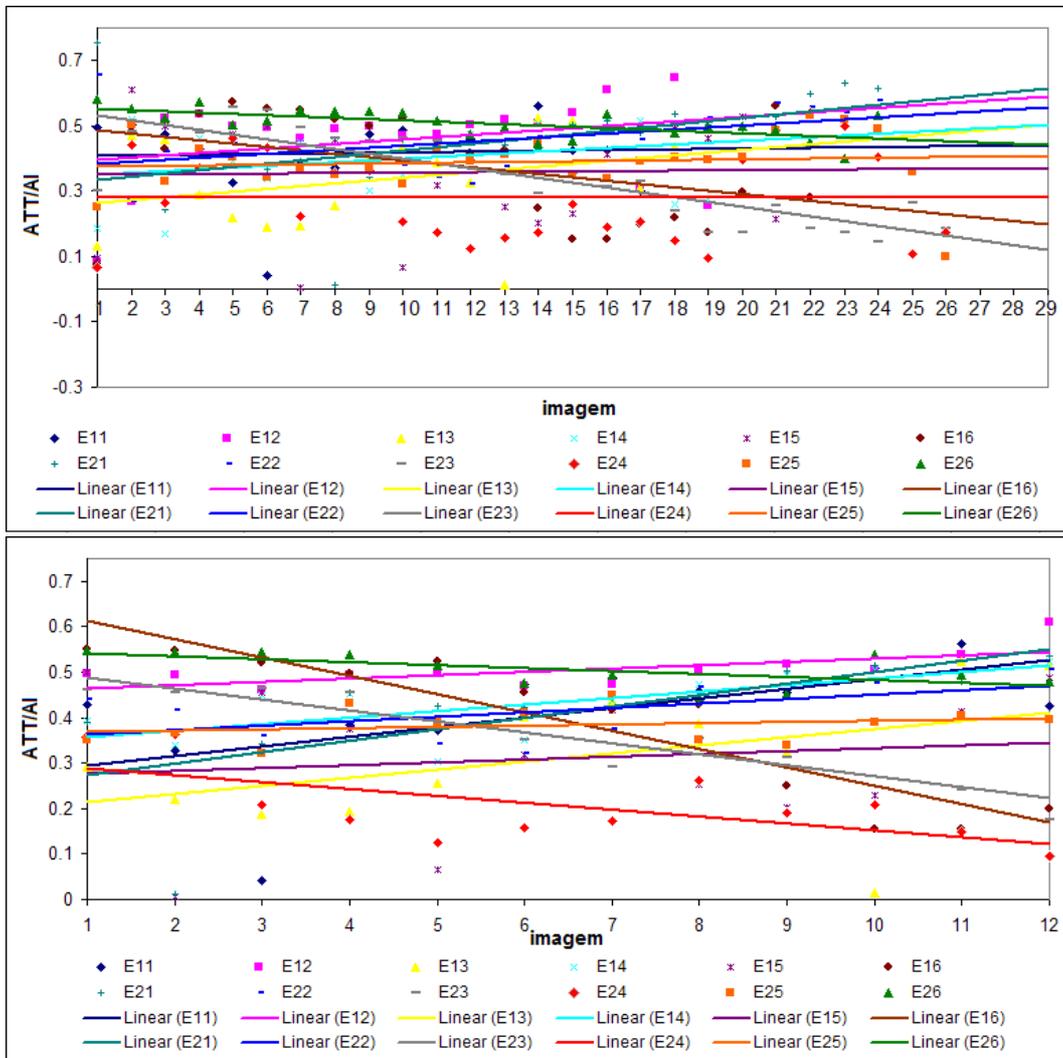


Figura 7.10: Ajuste linear da razão ATT/AI das 12 vértebras do indivíduo E. O primeiro gráfico utiliza todas as imagens disponíveis e, o segundo, padroniza a utilização de 12. Do primeiro para o segundo gráfico, as principais mudanças ocorreram nos ajustes de E16 e E23. Mesmo assim, a razão ATT/AI deste indivíduo sugere que houve grande perda de massa óssea já que, com exceção de E26, os demais ajustes praticamente não passam de 0,5.

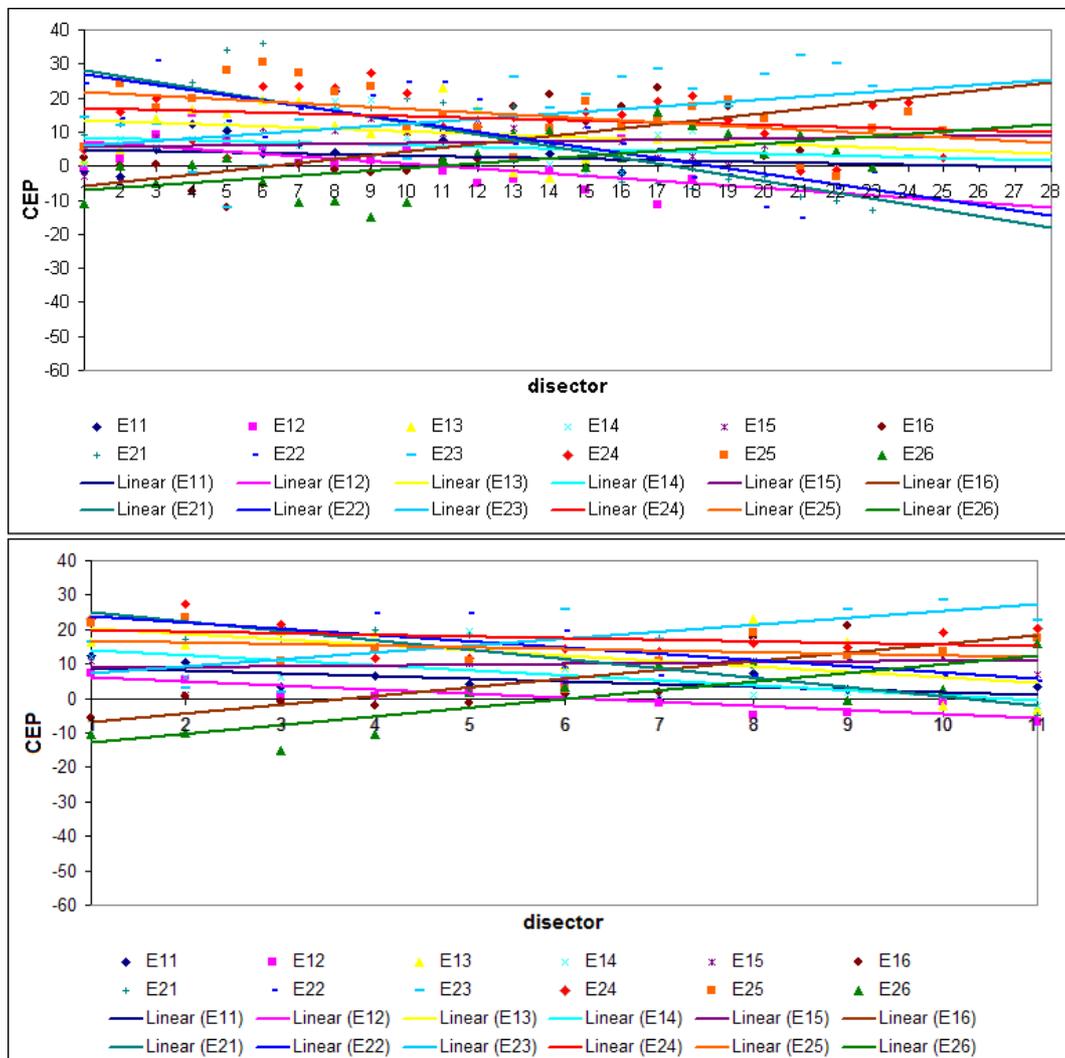


Figura 7.11: Ajuste linear da CEP das 12 vértebras do indivíduo E. O primeiro gráfico utiliza todas as imagens disponíveis e, o segundo, padroniza a utilização de 12. As DMOs das vértebras deste indivíduo apontam para a normalidade (Tabela 7.2), mas seus valores de CEP são demasiadamente elevados sugerindo acentuada perda de conectividade de suas trabéculas. Outro fato importante é o resultado obtido na Figura 7.10, onde o indivíduo E claramente possui muito mais área medular do que área trabecular nas vértebras analisadas.

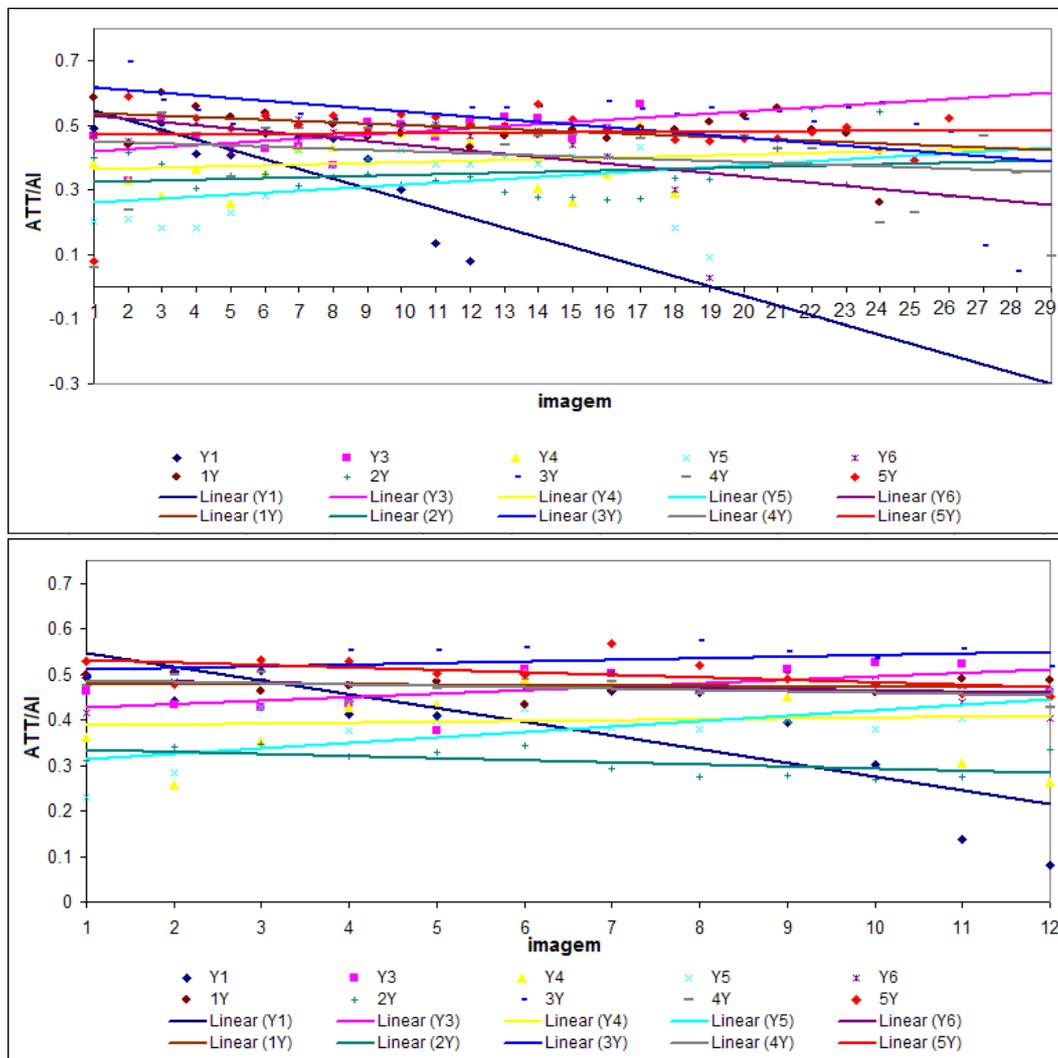


Figura 7.12: Ajuste linear da razão ATT/AI das 10 vértebras do indivíduo Y. O primeiro gráfico utiliza todas as imagens disponíveis e, o segundo, padroniza a utilização de 12. Y1 foi a vértebra que mais apresentou diferenças entre o primeiro e o segundo gráfico. Apenas 3Y pareceu ter uma boa razão ATT/AI , já que as demais vértebras apresentaram valores um tanto baixos.

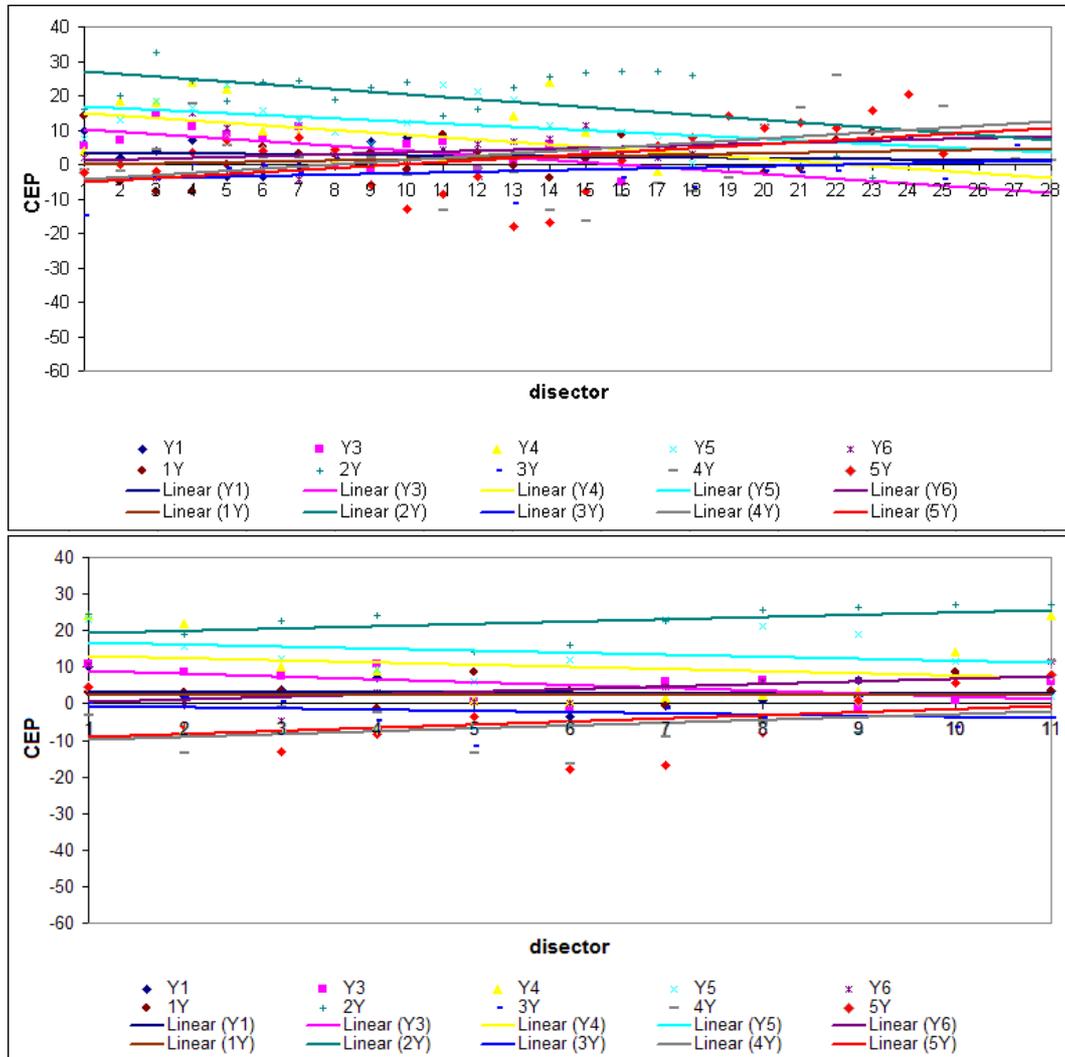


Figura 7.13: Ajuste linear da CEP das 10 vértebras do indivíduo Y. O primeiro gráfico utiliza todas as imagens disponíveis e, o segundo, padroniza a utilização de 12. Assim como o indivíduo E, Y possui DMOs satisfatórias (Tabela 7.2), mas, por outro lado, a CEP de suas vértebras mostra conectividade bastante baixa e a Figura 7.12 revela razão de área trabecular insatisfatória.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

Neste trabalho foram analisadas 45 vértebras, provenientes de 6 indivíduos (*in vitro*), nos mais variados estágios de perda de massa óssea (Tabela 7.2). Após análise da *CEP* para este conjunto de vértebras, observamos que nem sempre os resultados de baixa DMO conduzem necessariamente a uma baixa conectividade trabecular. Ou seja, em amostras cujos resultados de DMO mostraram-se com valores inferiores a $0,7g/cm^2$, indicando acentuada perda de massa óssea, a análise da microarquitetura trabecular apresentou valores de *CEP* que correspondem a uma boa conectividade. Este resultado não é contraditório, já que não há uma correlação direta entre a estimativa de conectividade e a DMO. Em outras palavras, podemos ter uma estrutura trabecular com acentuada conectividade, porém as trabéculas podem ser bastante delgadas, o que pode resultar em uma estrutura com baixa DMO.

Analogamente, vértebras que parecem estar saudáveis pelos exames convencionais (clínico e DMO), mostram uma baixa conectividade de suas trabéculas e predominância de material não trabecular em seu interior. De fato, alguns estudos revelaram casos em que diferenças em parâmetros microestruturais em ossos com mesma massa e volume foram os únicos fatores discriminantes entre sujeitos com ou sem fraturas vertebrais (LEGRAND et al, 2000, *apud* [CVB⁺05]). Em tais casos há baixa conectividade, porém as conexões podem apresentar-se de forma mais robusta. A Figura 8.1 mostra ROIs de vértebras que ilustram essas situações.

Clinicamente, mostra-se de suma importância, a identificação de casos com alta conectividade, mesmo que apresentando resultados insatisfatórios de DMO, uma vez que intervenções medicamentosas são capazes de tornar a estrutura óssea mais robusta e de inibir a reabsorção de trabéculas, embora resultados indiquem que

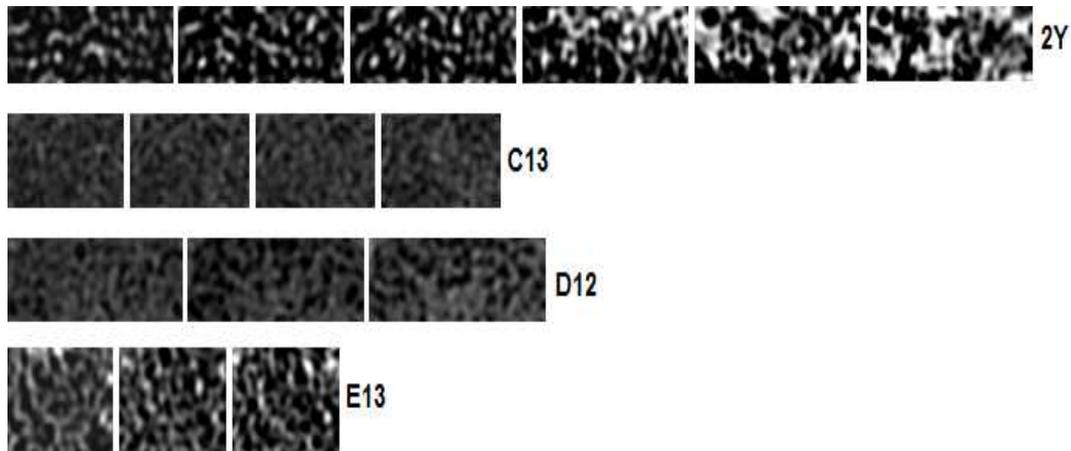


Figura 8.1: Seleção de ROIs de algumas vértebras cuja análise de DMO fornece um diagnóstico demasiadamente superficial, e o risco de fratura do indivíduo pode ser erroneamente apontado. Os sujeitos E e Y, por exemplo, apresentam pouca ou nenhuma perda de massa óssea, mas o estudo da microarquitetura trabecular revelou baixa conectividade e relação de área trabecular insatisfatória para o quadro de ambos. A baixa DMO do paciente C sugere grande perda de massa óssea, mas a análise da *CEP* de suas trabéculas e da relação de área trabecular revelaram uma boa estrutura de sustentação, o que, provavelmente, compensaria a perda de massa óssea na resistência a fraturas. Já o indivíduo D, mostrou uma boa estrutura, com uma conectividade razoável, mas sua DMO mostra que este sofreu acentuada perda de massa óssea.

não são capazes de restaurar conexões que já foram perdidas (JANG et al, 2003, *apud* [CVB⁺05]). Sendo assim, parece ser especialmente útil a identificação de casos nos quais urge a utilização de medicamentos que sejam capazes de manter e fortalecer as conexões trabeculares que ainda restam, antes que estas sejam absorvidas na remodelagem óssea do organismo.

A análise dos resultados dos valores obtidos para a *CEP* nos vários casos mostrou que a mesma não está correlacionada aos valores de DMO, nem diretamente com a razão área trabecular/medula, porém os achados sugerem que a conectividade das trabéculas deve estar correlacionada à resistência óssea a fraturas. Para obtermos tais correlações, se fazem necessários ensaios de compressão sobre as vértebras,

o que as destruirá. Por outro lado, a estimativa de conectividade apenas não é suficiente para indicar com certo grau de exatidão o risco de fratura a que um paciente está submetido, isso porque a forma como ocorre o alinhamento das trabéculas e suas orientações parecem informações fisicamente importantes para o estabelecimento da rigidez da estrutura óssea. Desta forma, como perspectiva de trabalhos futuros, é importante que novos estudos sejam realizados com respeito ao grau de *tortuosidade* e *anisotropia* das trabéculas. Além disso, o estudo apresentado aqui foi conduzido com vértebras provenientes de material coletado sem uma prévia análise clínica dos sujeitos da pesquisa quando *in vivo*, e sem conhecimento da disposição das vértebras na coluna do indivíduo, informação de grande relevância tendo em vista a diferença de peso sustentado por uma vértebra cervical, na altura do pescoço, e por uma lombar, quase no fim da coluna vertebral, por exemplo. Por isso, um estudo mais sistemático deve ser conduzido tendo em mãos a história clínica dos pacientes e a produção de imagens tomográficas de sujeitos *in vivo*.

A realização deste trabalho preliminar evidenciou a aplicação de uma técnica matemática, aliada a técnicas de processamento de imagens, para estimar a conectividade trabecular, a partir de imagens tomográficas, e a relação com a perda de massa óssea observada através da DMO.

Referências Bibliográficas

- [CG04] L. Dalle Carbonare and S. Giannini. Bone microarchitecture as an important determinant of bone strength. *Endocrinol. Invest*, 27:99–105, 2004.
- [CLP⁺99] Daniel Chappard, Erik Legrand, Cristian Pascaretti, Michel F. Baslé, and Maurice Audran. Comparison of eight histomorphometric methods for measuring trabecular bone architecture by image analysis on histological sections. *Microscopy Research and Technique*, 45:303–312, janeiro 1999.
- [CM01] Bernard Cortet and Xavier Marchandise. Bone microarchitecture and mechanical resistance. *Joint Bone Spine*, 68:297–305, 2001.
- [CVB⁺05] L. Dalle Carbonare, M.T. Valenti, F. Bertoldo, M. Zanatta, S. Zenari, G. Realdi, V. Lo Cascio, and S. Giannini. Bone microarchitecture evaluated by histomorphometry. *Micron*, 36:609–616, julho 2005.
- [dC05] Manfredo P. do Carmo. *Geometria diferencial de curvas e superfícies*. Sociedade Brasileira de Matemática, Rio de Janeiro, primeira edição, 2005.
- [dFCJ00] Luciano da Fontoura Costa and Roberto Marcondes Cesar Jr. *Shape Analysis and classification - theory and practice*. CRC Press, Florida, 2000.
- [dL03] Carlos A. Mandarim de Lacerda. Stereological tools in biomedical research. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 75(4):469–486, setembro 2003.
- [GBB⁺88] H.J.G. Gundersen, P. Bagger, T.F. Bendtsen, S.M. Evans, L. Korbo, N. Marcussen, A. Müller, K. Nielsen, J.R. Nyengaard, B. Pakken-

- berg, F.B. Sürensen, A. Vesterby, and M.J. West. The new stereological tools: disector, fracionator, nucleator and point sampled interepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*, 96:857–881, 1988.
- [GBK⁺88] H.J.G. Gundersen, T.F. Bendtsen, L. Korbo, N. Marcussen, A. Müller, K. Nielsen, J.R. Nyengaard, B. Pakkenberg, F.B. Sürensen, A. Vesterby, and M.J. West. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*, 96:379–394, 1988.
- [GH95] C.A. Glasbey and G.W. Horgan. *Image analysis for the biological sciences*, chapter 4 - Segmentation. Wiley, Edinburgh, 1995.
- [GW00] Rafael Gonzalez and Richard Woods. *Processamento de imagens digitais*. Edgard Blücher Ltda, 2000.
- [HR05] C.V. Howard and M.G. Reed. *Umbiased stereology*. BIOS Scientific Publishers, Nova Iorque, segunda edição, 2005.
- [KG01] J.P. Kroustrup and H.J.G. Gundersen. Estimating the number of complex particles using the conneulor principle. *Journal of Microscopy*, 33:314–320, 2001.
- [Lac00] Carlos A. M. Lacerda. Fisiologia e fisiopatologia: estereologia do rim: determinação do v_V , n_V e volume médio do glomérulo. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, 22(2):103–109, janeiro 2000.
- [Mou02] Peter R. Mouton. *Principles and practices of umbiased stereology An introduction for bioscientists*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 2002.

- [Nie04] Antti Niemistö. A comparison of nonparametric histogram-based thresholding algorithms. *Digital Image Processing III*, pages 1–51, outubro 2004.
- [RD99] John Russ and Robert Dehoff. *Practical stereology*. Plenum Press, Nova Iorque, segunda edição, 1999.
- [RRN97] N. Roberts, M. Reed, and G. Nesbitt. Estimation of the connectivity of a synthetic porous medium. *Journal of Microscopy*, 187:110–118, agosto 1997.
- [RSBR07] Waldir L. Roque, Antônio C. A. Souza, Denis X. Barbieri, and Felix C. Rodrigues. Um sistema computacional baseado no processamento de imagens tomográficas para estudo da estrutura trabecular. *VII Workshop de Informática Médica*, páginas 156-165, 2007.
- [Ste84] D.C. Sterio. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *Journal of Microscopy*, 134:127–136, maio 1984.
- [VK96] H.J. Vogel and A. Kretzschmar. Topological characterization of pore space in soil - sample preparation and digital image-processing. *Geoderma*, 73:23–38, 1996.
- [Wee85] Jeffrey R. Weeks. *The shape of space*. Marcel Dekker, Nova Iorque, 1985.
- [YBHL01] Xinmin Yang, Haluk Beyenal, Gary Harkin, and Zbigniew Lewandowski. Evaluation of biofilm image thresholding methods. *Pergamon*, 35:1149–1158, 2001.