



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

TÍTULO

*Caracterización de la micro-arquitectura de tejido óseo de interés preclínico en ratas sanas de experimentación mediante imágenes de micro-Tomografía Computarizada con Rayos X*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

***FÍSICO***

PRESENTA:

**ROBERTO ADRIÁN DE LOS SANTOS IRRA**

DIRECTOR DE TESIS:

**DR. LUIS ALBERTO MEDINA VELÁZQUEZ**



Ciudad de México

noviembre 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*Este trabajo va dedicado a las dos personas más importantes de mi vida, aquellas que siempre han estado y seguirán conmigo siendo mis tutores en la vida*

*Mi mamá Judith Irra Beltán  
Mi papá Roberto De Los Santos Díaz*

*Papás, aunque el camino recorrido hasta ahorita ha sido un "sube y baja", este es solamente uno de los muchos logros que aún me quedan por alcanzar.*

# *Agradezco...*

A mi tutor, el Dr. Luis Alberto Medina Velázquez por su tiempo, paciencia, valiosos consejos y su gran apoyo por haber pulido este trabajo. Por haberme dado la oportunidad de trabajar en el laboratorio de Física Médica del Instituto Nacional de Cancerología y ver como se desempeña la labor de un Físico Médico en el área clínica y de investigación. Lo admiro como persona y como investigador.

A la Dra. Janeth Serrano Bello por todo el apoyo brindado, conocimientos, dedicación, su tiempo en la revisión de este trabajo y por haber aportado el modelo animal utilizado en este trabajo.

A todos mis compañeros del laboratorio de Física Médica, en especial al M. en C. Sirio Bolaños Puchet y al M. en I. Pavel Rodríguez Figueroa por todas las explicaciones y consejos que me brindaron.

Al Proyecto PAPIIT IN 209916 por haber otorgado el apoyo financiero que sirvió como incentivo para la elaboración de este trabajo de investigación.

A los miembros del comité sinodal, Dra. María Ester Brandan Siqués, M. en C. Patricia Raquel Avilés Mandujano y M. en C Jorge Patricio Castillo López por brindar su tiempo en la revisión de este trabajo.

Al Ingeniero Emilio Giménez por las explicaciones y la retroalimentación a este trabajo del funcionamiento del módulo de microCT del equipo Albira.

Por último, más que agradecer quiero decir...LO LOGRÉ FÁTIMA, me costó mucho trabajo, pero nunca me di por vencido. Este trabajo es el resultado anhelado desde hace ya nueve años de convivencia y de apoyo mutuo. Antes todo se quedaba en nuestros pensamientos, ahora se ha convertido en realidad. El amor y la amistad que me haz brindado en esta etapa importante de mi vida fue mi inspiración para obtener las fuerzas para superarme día con día.

# Índice general

<b>Resumen</b>	<b>III</b>
<b>1. Antecedentes</b>	<b>1</b>
1.1. Planteamiento y Justificación . . . . .	3
1.2. Objetivos . . . . .	4
<b>2. Introducción</b>	<b>5</b>
2.1. Composición del Tejido Óseo . . . . .	5
2.2. Clasificación de los Huesos . . . . .	6
2.3. Morfometría Ósea . . . . .	7
2.4. Medición del Grosor y Separación Trabeculares (Tb.Th y Tb.Sp) . . . . .	9
2.5. Análisis de la morfometría de hueso trabecular a partir del <i>plugin</i> BoneJ . . . . .	10
2.6. Visualización de hueso por medio de imágenes de microCT	13
2.7. Número CT en una imagen de microCT . . . . .	13
2.8. Factores que influyen en los estudios de micro-arquitectura ósea a partir de imágenes de microCT . . . . .	14
2.8.1. Factores Físicos . . . . .	15
2.8.2. Procesamiento de la imagen . . . . .	17
2.9. Calidad de la imagen en microCT . . . . .	21
<b>3. Materiales y Método</b>	<b>22</b>
3.1. Modelo Animal . . . . .	22
3.2. Adquisición de imágenes de microCT . . . . .	23

3.3. Curva patrón para el cálculo de la concentración de hidroxapatita [HA] . . . . .	24
3.4. Estimación de la hidroxapatita [HA] en las imágenes de las ratas . . . . .	25
3.5. Caracterización de la micro-arquitectura ósea . . . . .	25
3.5.1. Evaluación de la calidad en las imágenes por medio del cociente contraste a ruido [CNR] . . . . .	26
3.6. Análisis Estadísticos . . . . .	26
<b>4. Resultados</b>	<b>27</b>
4.1. Curvas de referencia para el cálculo de la concentración de hidroxapatita [HA] . . . . .	27
4.2. Cálculo de la concentración de hidroxapatita [HA] a partir de las imágenes de microTomografía . . . . .	29
4.3. Evaluación de la micro-arquitectura ósea en hueso trabecular . . . . .	38
4.3.1. Calidad de la imagen a partir del cálculo del cociente contraste a ruido (CNR) . . . . .	38
4.3.2. Cálculo de los parámetros morfométricos (Tb.Th, Tb.Sp) . . . . .	46
<b>5. Análisis y Discusión</b>	<b>56</b>
5.1. Curvas patrón . . . . .	56
5.2. Cálculo de [HA] a partir de las imágenes de microCT . . . . .	56
5.3. Análisis de la micro-arquitectura ósea en hueso trabecular . . . . .	61
5.3.1. Análisis de la calidad de la imagen a partir del CNR . . . . .	61
5.3.2. Análisis del grosor y separación trabeculares . . . . .	62
<b>Conclusiones</b>	<b>65</b>
<b>Apéndice</b>	<b>67</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>96</b>

# Índice de abreviaturas

HA: Hidroxiapatita.

[HA]: Concentración de hidroxiapatita.

DMO: Densidad mineral ósea.

Tb.Th: Grosor trabecular.

Tb.Sp: Separación trabecular.

CT (Computed Tomography): Tomografía Computarizada.

microCT: Micro-Tomografía Computarizada.

*FBP (Filtered Back Projection)*: Proyección filtrada trasera.

kVp: Kilovoltaje pico.

mA: Miliamperes.

HD-HV (High Dose-High Voltage): Alta dosis-alto voltaje.

LD-HV (Low Dose-High Voltage): Baja dosis-alto voltaje.

HD-LV (High Dose-Low Voltage): Alta dosis-bajo voltaje.

LD-LV (Low Dose-Low Voltage): Baja dosis-bajo voltaje.

CNR (Contrast to Noise Ratio): Cociente contraste a ruido.

ROIs: Regiones de interés.

# Resumen

**Introducción:** El estudio de la micro-arquitectura ósea en modelos animales se basa en el cálculo de parámetros morfométricos de hueso cortical y trabecular, así como de la densidad mineral ósea (DMO) en términos de la concentración de hidroxapatita [HA]. Una técnica utilizada para visualizar este tipo de estructuras es la micro-Tomografía Computarizada (microCT), la cual juega un papel importante en el campo de la investigación preclínica, siendo de gran interés obtener información de la micro-arquitectura ósea de animales sanos de experimentación (ratas y ratones) que permita su comparación con modelos experimentales de alguna enfermedad, por ejemplo osteoporosis y cáncer. En este trabajo se presentan los resultados de la caracterización de la micro-arquitectura de tejido óseo de interés preclínico en ratas sanas utilizando imágenes de microCT.

**Método:** Se tomaron imágenes de microCT en ratas sanas de la cepa *Wistar* (n=9), organizadas en tres grupos en función de su peso: grupo A (250 - 300 g), grupo B (300 - 400 g) y el grupo C (400 - 500 g). Se calculó la concentración de hidroxapatita [HA], el espacio y grosor trabecular (Tb.Th y Tb.Sp) en los huesos de calvaria, mandíbula, cabeza de fémur y la 5ta vértebra lumbar. Los estudios de microCT se realizaron con el módulo microCT de un equipo de imagen molecular *Albira ARS* (Oncovisión/Bruker, España). Las imágenes se obtuvieron utilizando diferentes combinaciones de voltaje y corriente (45 y 35 kVp, 0.4 y 0.2 mA), cada una a 600 proyecciones. Las imágenes fueron reconstruidas usando los algoritmos de reconstrucción *FBP* y *CT High* con tamaño de pixel de 125  $\mu\text{m}$  y 35  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Por último, la caracterización de la micro-arquitectura ósea en hueso trabecular (Tb.Th y Tb.Sp) se realizó utilizando el *plugin* BoneJ del programa ImageJ.

**Resultados:** En el cálculo de la concentración de hidroxapatita [HA] no se observaron diferencias *intra-grupales* estadísticamente significativas en calvaria y mandíbula en los tres grupos de ratas. Por otro lado, se presentaron diferencias *inter-grupales* estadísticamente significativas asociadas con la variabilidad biológica en términos de la diferencia de

edad y peso. En el caso de cabeza de fémur y la 5ta vértebra lumbar se observaron diferencias *intra-grupales* estadísticamente significativas en el Grupo C (peso > 400 g) debido a la atenuación de la radiación en el tejido blando y en hueso, dando como resultado una disminución en los valores de pixel en las imágenes reconstruidas. En los estudios que involucraron la reconstrucción de *CT High*, se observó que los parámetros de adquisición de HD-HV (45 kVp a 0.4 mA) resultaron en la mejor calidad de las imágenes para visualizar la micro-arquitectura ósea, realizando el análisis con dichos parámetros; sin embargo la reconstrucción de las imágenes con un tamaño de pixel de 35  $\mu\text{m}$  resultó en una sobreestimación en los valores de grosor y separación trabeculares (Tb.Th y Tb.Sp) asociados con una mala segmentación en las imágenes.

**Conclusión:** El equipo de microCT Albira *ARS* permite realizar estudios de cuantificación de concentración de hidroxapatita [HA] en tejido óseo. Sin embargo, no es óptimo para realizar estudios cuantitativos *in-vivo* de micro-arquitectura ósea de valores de grosor y separación trabeculares (Tb.Th y Tb.Sp), debido a la limitada resolución espacial al reconstruir las imágenes con un tamaño de voxel/pixel de 0.035 mm. Por otro lado, la evaluación cualitativa de las imágenes de estudios *in-vivo* en ratas *Wistar*, indicó que el tejido trabecular puede ser visualizado en adquisiciones con alta energía y corriente (45 kVp a 0.4 mA).

# Capítulo 1

## Antecedentes

---

Este trabajo se realizó en colaboración con el Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos del Posgrado de Odontología de la UNAM, para estudiar y caracterizar la micro-arquitectura de tejido óseo de interés preclínico utilizando un modelo animal de ratas sanas de la cepa *Wistar*.

La caracterización de la micro-arquitectura ósea se realiza mediante cálculos de parámetros morfométricos correspondientes a hueso esponjoso (trabecular) y denso (cortical), siendo estos estándares universales [Bouxsein et al., 2010] en la evaluación de la “calidad” de la estructura ósea. En investigación preclínica se realizan estudios *in vivo* usando la técnica de micro-Tomografía Computarizada (microCT) a partir de modelos experimentales en roedores o estudios *ex-vivo* usando biopsias de huesos humanos o de roedores [Muller et al., 1998].

La técnica de microCT es muy utilizada, al ser no invasiva en estudios *in vivo*, pudiendo reutilizar muestras de tejidos óseos (*post-mortem*) para estudios posteriores. Por ejemplo, Ho.et.al. [Ho et al., 2013] obtuvieron parámetros de hueso trabecular comparando imágenes de un microCT y un tubo dental de rayos-X de haz de cono (CBCT, por sus siglas en inglés), creando bloques de estructuras de hueso trabecular con células óseas sintéticas a partir de grupos con diferentes densidades óseas.

Existen muchos parámetros estructurales que sirven para representar la micro-arquitectura de hueso, los más reportados para el estudio de hueso trabecular son la fracción de volumen de hueso (BV/TV), el grosor trabecular (Tb.Th), la separación trabecular (Tb.Sp) y el número trabecular (Tb.N). Estos últimos indican respectivamente el espesor promedio que posee la estructura del hueso trabecular, la distancia promedio que existe entre las cavidades de una trabécula a otra y el número de trabéculas por unidad de longitud que es delimitado por una región de interés (ROI) de una sección de hueso.

En 2010, Bouxsein et.al. [Bouxsein et al., 2010] reportan una guía detallada en la que señalan los parámetros físicos que se deben tomar en consideración para realizar estudios *in-vivo* de micro-arquitectura ósea usando un equipo de microCT. Estos incluyen el tamaño de voxel, el cual describe la unidad discreta de cuantificación en las imágenes tridimensionales y el voltaje eléctrico aplicado al tubo de rayos-X, que determina las energías máxima y promedio de los fotones emitidos.

Para evaluar la calidad del hueso en términos de su densidad mineral ósea (DMO), dada generalmente en  $\text{mg}/\text{cm}^3$  de Hidroxiapatita (HA), se recomienda el uso de un maniquí que contenga valores de referencia de HA equivalentes a hueso, con el que es posible obtener un patrón de referencia (o calibración) que puede ser utilizado para evaluar la calidad de hueso mediante imágenes de microCT. Por ejemplo, la utilización de imágenes microCT en modelos con defectos óseos en calvarias de ratas permiten obtener información cuantitativa del proceso de remineralización así como regeneración ósea al evaluar micro-arquitectura así como concentraciones de hidroxiapatita ([HA]) regeneradas [Bouxsein et al., 2010].

La calidad del hueso es evaluada por medio de valores de DMO, sin embargo esta sola no resulta suficiente para identificar el grado de rigidez que posee el hueso para soportar esfuerzos externos provocadores de fracturas. En consecuencia, parámetros morfométricos asociados con la micro-arquitectura ósea, calculados con imágenes de microCT, deben ser incorporados para realizar un análisis más detallado. El interés en

la obtención de estos parámetros morfométricos radica en el uso de algoritmos matemáticos complejos que describan las diversas estructuras que componen al hueso de estudio.

El microCT juega un papel importante en el campo de la investigación preclínica en el área de medicina regenerativa, ya que permite diseñar y evaluar estructuras tridimensionales, llamadas andamios, a partir de imágenes digitales. Estos andamios se diseñan poniendo especial énfasis en su porosidad y conectividad, ya que estos parámetros influyen en la proliferación celular de tejido óseo que permitirá la regeneración de hueso en zonas donde haya ocurrido una lesión de tamaño crítico, el cual se define como la lesión más pequeña que no sana espontáneamente en un periodo largo de tiempo, incluso durante el lapso de vida [Li et al., 2015].

## 1.1. Planteamiento y Justificación

Investigaciones preclínicas para estudios de regeneración ósea promovida por andamios en defectos de tamaño crítico, requieren la obtención de información cualitativa y cuantitativa de la micro-arquitectura ósea de huesos de interés (calvaria, mandíbula, vértebra y cabeza de fémur) en ratas sanas a partir de imágenes digitales en tres dimensiones.

El desarrollo de esta tesis consta en adquisiciones de imágenes por microCT para evaluar la calidad del tejido óseo en ratas sanas, calculando valores que sirvan como referencia para investigaciones futuras relacionadas con regeneración ósea al evaluar concentraciones de hidroxapatita [HA], así como analizar parámetros de micro-arquitectura ósea asociados con grosores y separaciones trabeculares en diferentes huesos, utilizando un equipo comercial de microCT Albira *ARS*.

## 1.2. Objetivos

Los objetivos de este trabajo son los siguientes:

### Objetivo General

**Caracterizar la micro arquitectura de tejido óseo de interés preclínico en ratas sanas de experimentación utilizando imágenes de micro-Tomografía Computarizada (microCT).**

### Objetivos Específicos

- Caracterizar la respuesta de un equipo de microCT, en términos del número CT como función de la concentración de hidroxapatita [HA].
- Estimar la concentración de hidroxapatita [HA], en función del peso de la rata, en los tejidos óseos de calvaria, mandíbula, cabeza de fémur y la 5ta vértebra lumbar.
- Determinar los parámetros morfométricos de micro-arquitectura ósea a partir del grosor y separación trabecular.

# Capítulo 2

## Introducción

---

### 2.1. Composición del Tejido Óseo

El esqueleto humano está formado por más de 200 huesos de diferentes tamaños y formas que determinan la movilidad, soporte y estructura a los organismos; también se encargan en dar protección a órganos sensibles como el cerebro, corazón, espina dorsal y ojos.

Los huesos juegan un papel muy importante en la bioquímica de los organismos, sirviendo como un reservorio de calcio el cual es esencial para la correcta conducción nerviosa y la acción muscular. Por otro lado, la presencia de calcio en la sangre está estrechamente controlado y regulado por los huesos, ya que si los niveles de sangre caen por debajo de un nivel normal, el calcio de los huesos es liberado para mantener un nivel adecuado, y es excretado si sus niveles son demasiado altos [Wilson, 2003].

El tejido óseo contienen células especializadas que ayudan a su crecimiento y constante regeneración, estas células son [F.M. UNAM, 2016]:

- Osteocitos: Estos son responsables del mantenimiento de la matriz ósea, se ubican en cavidades rodeadas por material intercelular calcificado. Su nutrición la realizan a partir de canales pequeños

que penetran la matriz ósea conectando los osteocitos vecinos entre sí y con canales vasculares que penetran el hueso o algunos que se ubican en membranas conjuntivas que revisten la superficie del hueso. Estos se encuentran a milímetros de distancia de torrentes sanguíneos.

- Osteoblastos: Se encargan de sintetizar y secretar la parte orgánica de la matriz ósea durante su formación. Se ubican siempre en la superficie del tejido óseo.
- Osteoclastos: Estos son responsables de la reabsorción del tejido óseo, participan en el proceso de remodelación ósea.

Los huesos a la vez están formados por cristales minerales aproximadamente de volúmenes iguales, teniendo forma de barras con diámetros y longitudes de entre 2 y 7 nm y 5 a 10 nm, respectivamente. Estos cristales están formados por un compuesto químico llamado hidroxapatita (HA), compuesto fundamentalmente por calcio y fosfato.

## 2.2. Clasificación de los Huesos

Los huesos están constituidos en su mayoría por fosfato de calcio y colágena, siendo un mineral y una proteína que les proporcionan fuerza y dureza así como una estructura suave. Esta combinación hace que los huesos sean fuertes y flexibles para soportar esfuerzos o tensiones externas. Existen dos tipos de huesos como se observa en la Figura 2.1, hueso cortical o denso y hueso trabecular o esponjoso [[Pub Med Health, 2016](#)].

El hueso cortical es denso y compacto, este forma la capa externa del hueso brindándole firmeza. El hueso trabecular forma la capa interna del hueso y tiene una superficie esponjosa la cual le brinda soporte y flexibilidad, éste se encuentra al final de los huesos largos del esqueleto apendicular y axial [[blogspot.mx, 2016](#)].

El arreglo espacial entre las cavidades del hueso trabecular es complejo y ayuda en su conjunto a la contribución para una mayor fuerza en un elemento de masa pequeña, brindando así mayor rigidez al hueso. La



Figura 2.1: Representación de hueso cortical y trabecular en cabeza de fémur [Pub Med Health, 2016].

caracterización de la estructura del hueso trabecular ha sido utilizada en estudios morfométricos de análisis histológicos.

### 2.3. Morfometría Ósea

Es un método utilizado en la evaluación de la estructura de hueso trabecular y cortical, a partir de calcular valores morfométricos correspondientes, por ejemplo, a la densidad volumétrica ósea (BV/TV) o la densidad superficial ósea (BS/TV). Con estos se puede obtener medidas de la micro-arquitectura ósea de hueso trabecular, por ejemplo, el grosor trabecular (Tb.Th), separación trabecular (Tb.Sp) y el número trabecular (Tb.N) entre otros [B Cube AG, Switzerland, 2016], Figura 2.2.

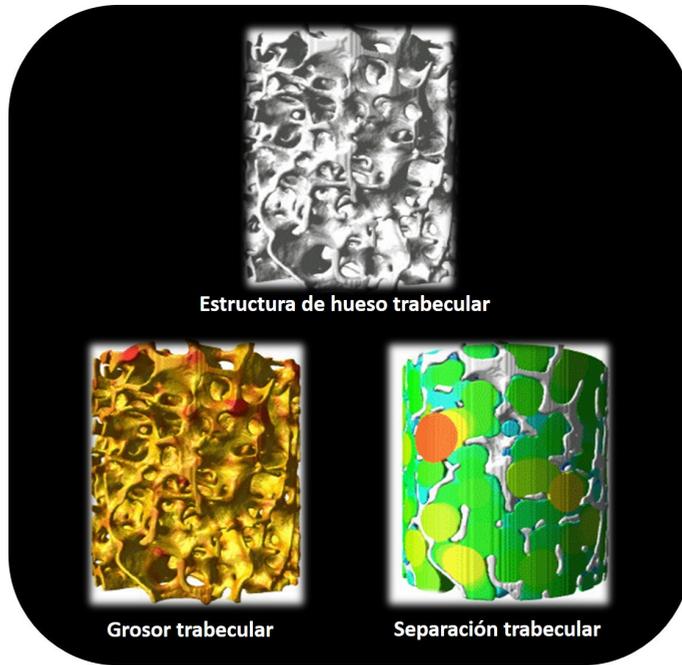


Figura 2.2: Imagen que representa el grosor y la separación de una estructura de hueso trabecular. Tomado y modificado de [B Cube AG, Switzerland, 2016].

Los valores morfométricos asociados con hueso trabecular más reportados son los siguientes [Bouxsein et al., 2010]:

- Grosor trabecular (Tb.Th): Como se observa en la Figura 2.2, este parámetro se refiere al espesor promedio que posee la estructura del hueso trabecular.
- Separación trabecular (Tb.Sp): Este parámetro se refiere a la distancia promedio que existe entre las cavidades de una trabécula a otra.
- Número trabecular (Tb.N): Se refiere a la cantidad de trabéculas que existen en una cierta región de interés de hueso trabecular por unidad de longitud.

Para la obtención de estos valores se utilizan imágenes digitales en tres dimensiones obtenidas con un equipo de microCT. En estas imágenes se pueden calcular los valores de interés midiendo distancias en el espacio entre y sobre las trabéculas como se describe a continuación.

## 2.4. Medición del Grosor y Separación Trabeculares (Tb.Th y Tb.Sp)

El cálculo de la micro-arquitectura ósea se realiza con base a la implementación de algoritmos computacionales que presentan algunos programas (*softwares*) especiales para el análisis de morfometría ósea. Para el caso de hueso trabecular, estos realizan ajustes esféricos en las imágenes reconstruidas de microCT sobre la estructura y a través de las cavidades trabeculares para la obtención de su grosor y separación, respectivamente. El valor del grosor y la separación trabecular corresponde al promedio total de los diámetros de las esferas ajustadas sobre la estructura trabecular y a través de las cavidades de las trabéculas, como se muestra en la Figura 2.3

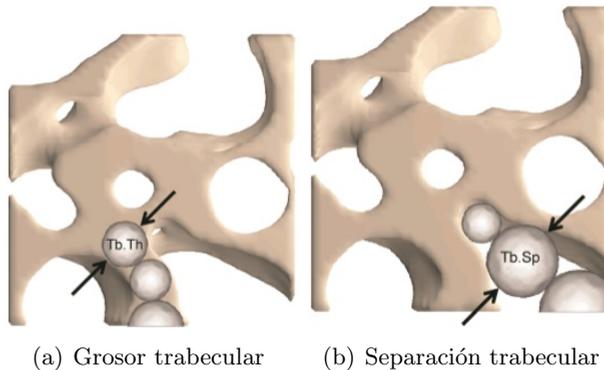


Figura 2.3: Imagen que ilustra el ajuste esférico para la obtención de los valores de grosor trabecular (a) y separación trabecular (b) sobre una representación de estructura de hueso trabecular. Tomado y editado de [Bouxsein et al., 2010].

## 2.5. Análisis de la morfometría de hueso trabecular a partir del *plugin* BoneJ

Existen varios programas (*softwares*) que realizan el cálculo de los parámetros morfométricos asociados con hueso cortical y trabecular, sin embargo, muchos al ser comerciales fueron de difícil acceso para su uso en este trabajo. Uno de los programas de análisis más utilizados, debido a su uso libre, para los cálculos de la morfometría ósea es el *plugin* del software ImageJ, llamado BoneJ [Doubé et al., 2010]. Este permite obtener valores morfométricos de hueso cortical y trabecular contando con diversas herramientas que son utilizadas para explicar a detalle la forma y componentes estructurales del hueso.

Doubé et al. [Doubé et al., 2010] propusieron un procedimiento para la obtención de los valores morfométricos asociados a hueso trabecular a partir de imágenes de microCT, partiendo de la selección de una región de interés (ROI) sobre la estructura de hueso trabecular, Figura 2.4.

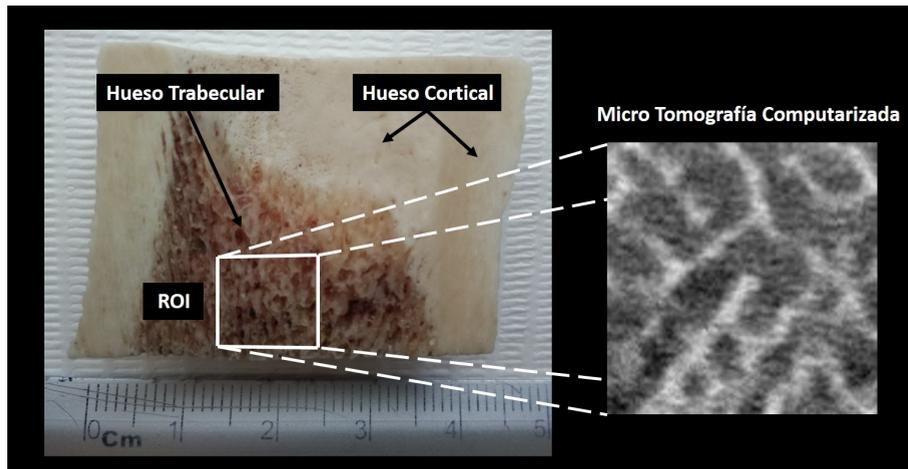


Figura 2.4: Imagen representativa que muestra un corte de un estudio de microCT a partir de la selección de una Roi sobre la estructura trabecular de un hueso arbitrario de animal [Fuente directa].

El BoneJ utiliza las imágenes de microCT binarizadas para realizar los cálculos de los valores morfométricos. De manera general las técnicas de binarización de imágenes digitales están basadas en el cálculo de un valor llamado  $T$  o valor umbral  $T$ , este valor es el adecuado entre todos los valores de grises que presenta la imagen que permite una óptima separación entre los valores de grises correspondientes al objeto de estudio (foreground) y el fondo (background) de la imagen [Cattaneo et al., 2011], obteniendo como resultado una binarización en las imágenes (0 asociado al fondo y 1 asociado a hueso trabecular), Figura 2.5.

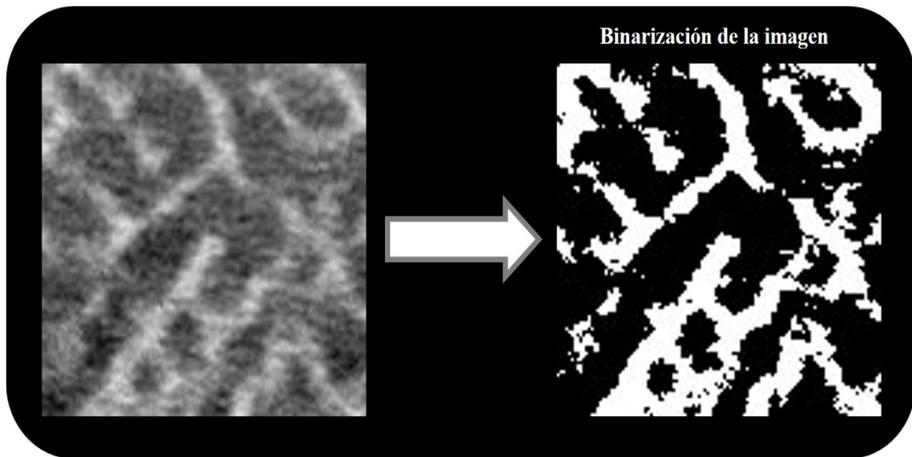


Figura 2.5: Imagen representativa que muestra la binarización en la imagen de microCT [Fuente directa].

Una vez binarizada la imagen, el *plugin* BoneJ realiza el cálculo de los parámetros morfométricos correspondientes a hueso trabecular ajustando esferas como se muestra en la Figura 2.6.

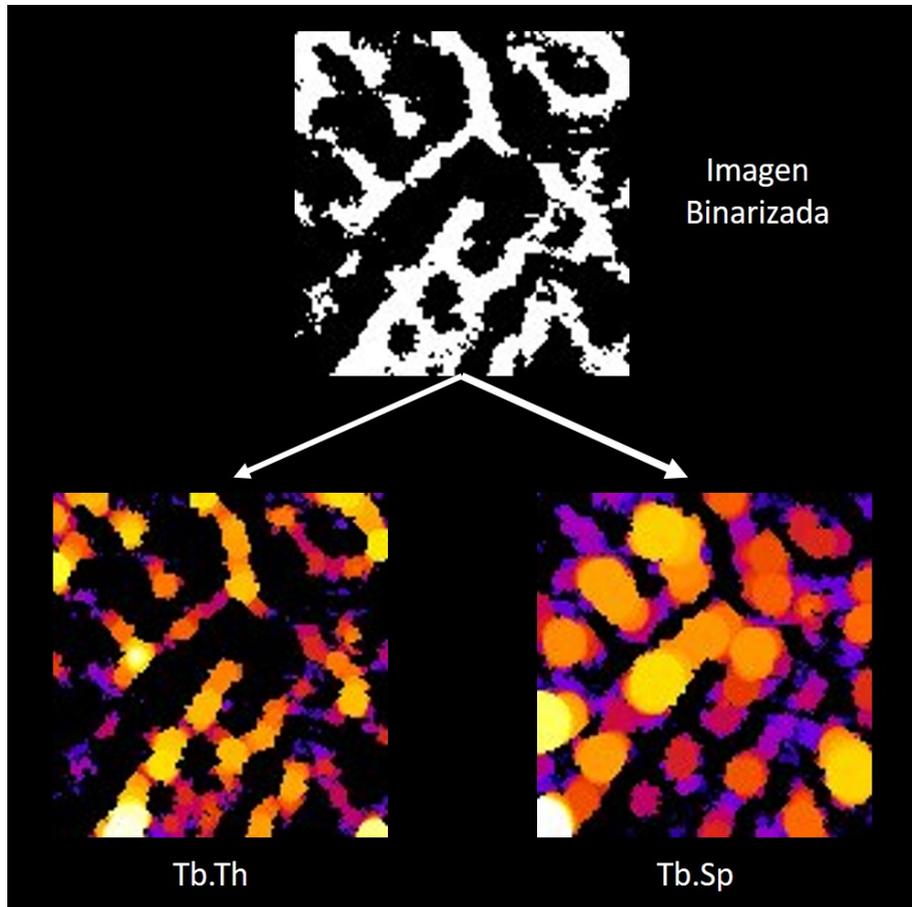


Figura 2.6: Imagen representativa que ilustra el ajuste de esferas, sobre y dentro de las cavidades del hueso trabecular, usando el *plugin* BoneJ para la obtención de los valores asociados con el grosor y la separación trabecular (Tb.Th y Tb.Sp) [Fuente directa].

## 2.6. Visualización de hueso por medio de imágenes de microCT

El principio físico del funcionamiento de un microCT es el mismo que de un CT convencional de uso clínico, obteniendo imágenes digitales en tres dimensiones, las cuales son adquiridas en diferentes proyecciones alrededor del objeto de estudio al detectar la radiación transmitida a través de éste (ver Apéndice A). Un gran número de investigadores realizan estudios preclínicos para evaluar variaciones en los parámetros morfométricos de la micro-arquitectura ósea en el hueso trabecular debido, por ejemplo, a patologías óseas como la incidencia de osteoporosis, en estudios relacionados con la regeneración ósea a partir de modelos en defectos de tamaños críticos así como en cambios asociados con el envejecimiento, etc, [Bouxsein et al., 2010], [Hsu et al., 2016], [Liu et al., 2015], [Andrade et al., 2013], [Liu et al., 2016].

## 2.7. Número CT en una imagen de microCT

La imagen reconstruida de microCT es adquirida cuando existe un número suficiente de interacciones registradas sobre el detector de rayos-X. La imagen resultante representa un mapa de la distribución de los diferentes coeficientes lineales de atenuación en los tejidos involucrados (ver Apéndice B).

Por otro lado, en cada proyección que constituye a la imagen de microCT se visualizan varias estructuras con diferentes propiedades de atenuación, al reconstruir la imagen por medio del algoritmo de reconstrucción se les asignan diferentes valores numéricos a cada pixel/voxel. Estos están relacionados con los coeficientes lineales de atenuación correspondiente con los diferentes tejidos que componen al objeto de estudio, Figura 2.7, [Khan, 2010], [Bushberg and Boone, 2011a].

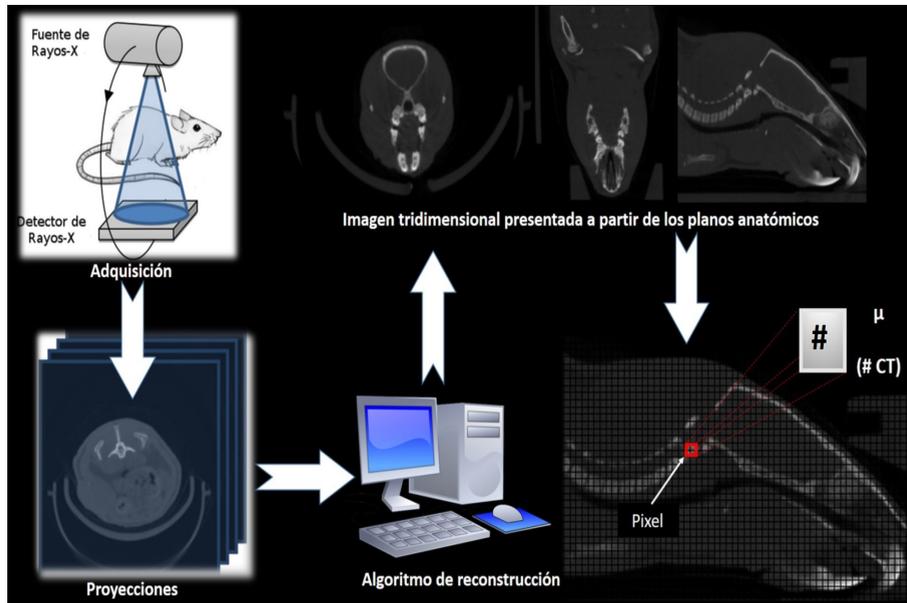


Figura 2.7: El número CT es el valor numérico que es asignado a cada pixel de la imagen de microCT, el cual se encuentra relacionado con la composición interna de los diferentes tejidos que posee el objeto de estudio a partir del coeficiente lineal de atenuación. Imagen tomada y editada de [López, 2016].

## 2.8. Factores que influyen en los estudios de micro-arquitectura ósea a partir de imágenes de microCT

Bouxsein et al. [Bouxsein et al., 2010] hacen mención a diferentes factores de importancia en las adquisiciones de las imágenes por microCT; así como en su procesamiento para estudios que involucren la evaluación de la micro-arquitectura ósea.

### 2.8.1. Factores Físicos

#### Energía del haz de rayos-X

Ésta define la penetrabilidad de los rayos-X como resultado de la atenuación de la radiación, ya sea por absorción o dispersión, que se presenta al atravesar el material. Los equipos de microCT operan en el rango de energías asociadas a potenciales que van de los 20 kVp hasta los 100 kVp. En las interacciones de los rayos-X a bajas energías (< 50 keV) predomina el efecto fotoeléctrico (ver Apéndice B.4, Figura B.6), el cual depende de la energía de los rayos-X ( $E$ ) como también de la composición interna del material ( $Z$ , número atómico, permitiendo diferenciar en la imagen tejido blando y hueso).

#### Intensidad

La información contenida dentro de cada voxel de la imagen está limitada por el cociente de señal a ruido (SNR), el cual depende del número de fotones incidentes en el sistema de detección de rayos-X así como de la sensibilidad de los dispositivos cargados acoplados (CCD) que componen al detector. La corriente producida dentro del tubo de rayos-X es del orden de  $\mu\text{A}$ , siendo ésta la que determinará la intensidad de rayos-X y el ruido aleatorio en las imágenes, un aumento en la corriente del tubo se verá reflejado en el incremento de producción de rayo-X al aumentar el número de fotones emitidos. Otro factor que influye en la intensidad es el tiempo por cada proyección, el cual determina el tiempo total de producción de los rayos-X a lo largo de una adquisición por microCT, éste a la vez es conocido como tiempo de exposición. Entre más prolongado sea este tiempo el ruido en la imagen reconstruida disminuirá ya que aumentará la cantidad de rayos-X que inciden sobre el detector.

#### Endurecimiento del haz de rayos-X

El espectro de emisión de rayos-X de los equipos de microCT es polienergético, y en ocasiones se asume que el espectro de energía incidente sobre el objeto de estudio es equivalente al espectro de energía detectado [Bouxsein et al., 2010]. Sin embargo, la absorción y dispersión a

través del objeto resulta en una mayor atenuación de los fotones de bajas energías del haz, permitiendo el paso de los de altas energías. Este efecto da como resultado un “endurecimiento energético” del haz de radiación. Al endurecerse el haz de radiación dentro del objeto de estudio puede modificar el contraste, afectando en la calidad de las imágenes reconstruidas.

### Resolución espacial asociada al tamaño del voxel en la imagen

El tamaño de voxel es un parámetro de suma importancia a la hora de realizar adquisiciones por microCT, siendo éste el que determina la resolución digital que permite el equipo. Tamaños de voxel de entre 10 a 20  $\mu\text{m}$ , no afectan la evaluación en estructuras del hueso cortical o trabecular en humanos o en animales grandes, los cuales tienen grosores relativamente grandes (100 a 200  $\mu\text{m}$ ) [Bouxsein et al., 2010]. Sin embargo, ese tamaño de voxel puede tener efectos significativos en el análisis de hueso trabecular de animales pequeños, como ratones y ratas. Bouxsein *et. al* [Bouxsein et al., 2010] mencionan que al realizar adquisiciones de microCT, utilizando una baja resolución espacial (tamaño de voxel  $> 100 \mu\text{m}$ ), para analizar estructuras trabeculares en roedores con dimensiones aproximadamente de 20 a 60  $\mu\text{m}$ , puede resultar en una sobre-estimación asociado a los cálculos de la densidad mineral ósea (DMO) así como en el cálculo del grosor trabecular, Figura 2.8, esto es debido al efecto de volumen parcial, el cual se refiere al efecto cuando los voxels de la imagen son lo suficientemente grandes como para abarcar varios tipos de tejidos de distintas densidades, como huesos o tejido blando de diferentes órganos [Bushberg and Boone, 2011b]. Este efecto ocurre generalmente en imágenes que no son reconstruidas en alta resolución (tamaño de voxel mayor a las dimensiones de la estructura del objeto a estudiar).

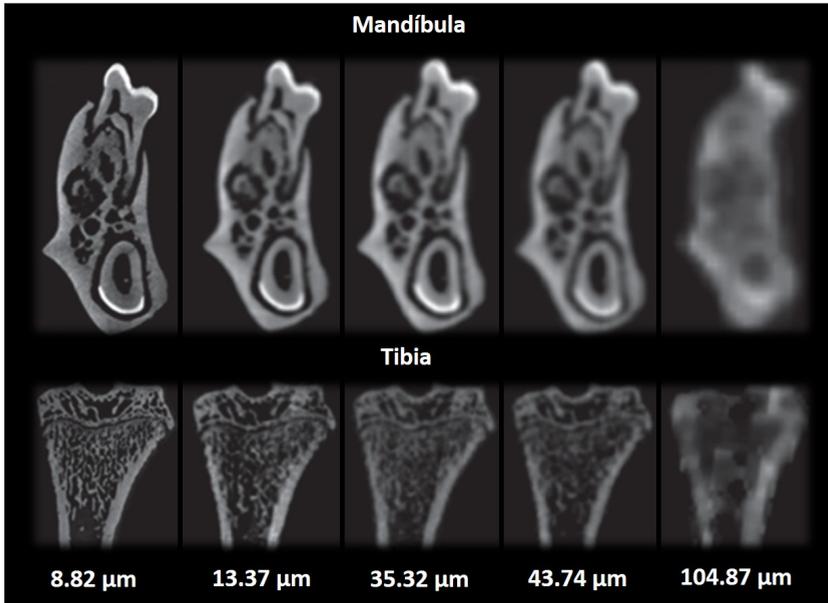


Figura 2.8: Imagen representativa que ilustra la degradación de las imágenes reconstruidas al realizar adquisiciones de microCT con diferentes tamaños de voxel (8.82, 13.37, 35.32, 43.74, 104.84  $\mu\text{m}$ , respectivamente) evaluando la micro-arquitectura ósea de una mandíbula y tibia de rata. Tomado y editado de [Liu et al., 2016].

## 2.8.2. Procesamiento de la imagen

### Binarización

La binarización es un proceso crítico a la hora de obtener los cálculos de la micro-arquitectura ósea, permitiendo diferenciar entre estructuras óseas calcificadas y no calcificadas. Para realizar una correcta binarización es necesario adquirir las imágenes con una alta resolución, evitando una sobre-estimación en los valores asociados al cálculo de la estructuras de hueso trabecular, como se observa en las Figuras 2.9 y 2.10. Es esencial comparar las imágenes reconstruidas por microCT con sus correspondientes segmentadas, corroborando con esto que la forma de la

estructura del hueso extraída del proceso sea una buena representación de la estructura de la imagen original [Bouxsein et al., 2010].

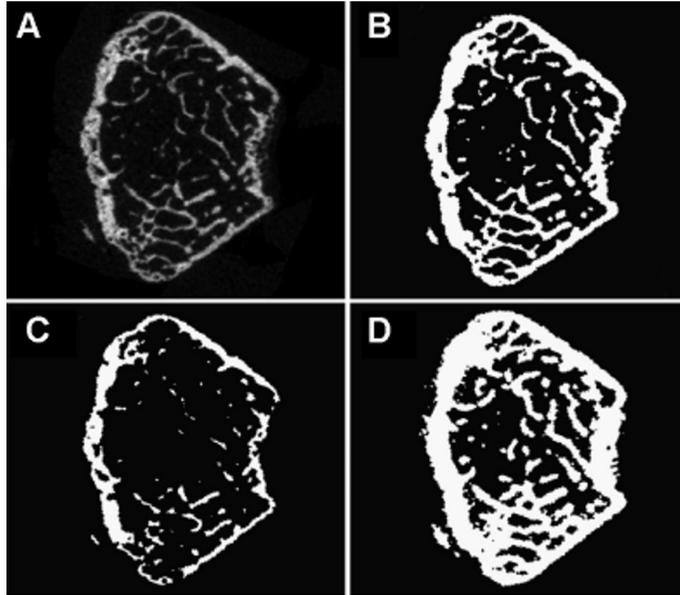


Figura 2.9: Imagen representativa que muestra la binarización de una imagen. A) Representa la imagen original, B) representa la binarización adecuada de la imagen, C) representa la pérdida de la estructura trabecular de la imagen original, D) representa un *sobre-engrosamiento* de la estructura trabecular debido a una mala binarización de la imagen por su baja resolución. Tomada de [Bouxsein et al., 2010].

En la Figura 2.10 se muestra un ejemplo de los efectos producidos en el proceso binarización de la imagen al variar el kilovoltaje y el tamaño de voxel. Se observa que al variar el voltaje y dejando el tamaño de voxel fijo, sus respectiva binarización no presentan un cambio significativo en comparación con la binarización de las imágenes adquiridas con el mismo voltaje pero variando los tamaños de voxel.

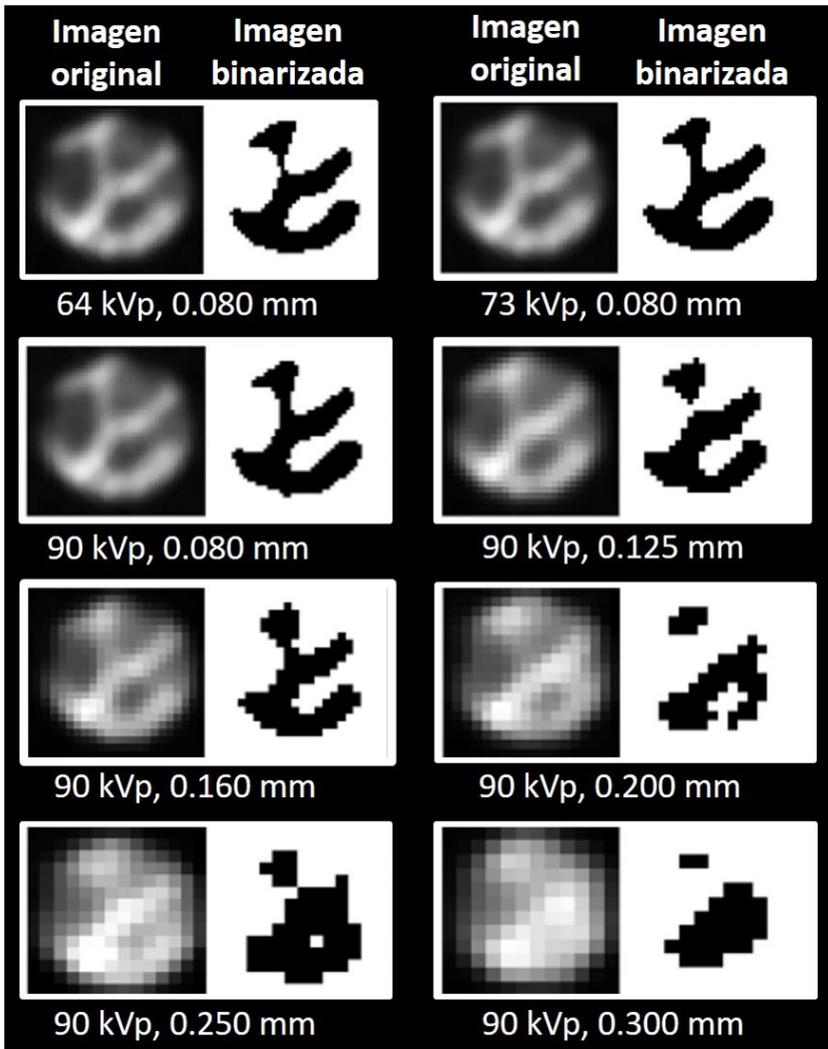


Figura 2.10: Imagen representativa que ilustra la degradación del proceso de binarización de una imagen de estructura de hueso trabecular a partir de reconstrucciones a diferentes voltajes y tamaños de voxel. Tomada y editada de [Pauwels et al., 2015].

### Selecciones de regiones de interés (ROIs)

Un recurso importante en el proceso de segmentación es la selección de una región de interés, utilizando un método de contorno en el que se define el área de la sección de hueso trabecular a estudiar en cada proyección. Otra manera es utilizando regiones de interés uniformes, a partir de selección de regiones circulares o cuadradas, que engloben la mayor parte de hueso trabecular. Sin embargo, éstas no permiten una diferenciación adecuada de hueso trabecular y cortical debido a la forma y ubicación anatómica que se llegase a presentar en el espécimen (Figura 2.11), [Bouxsein et al., 2010].

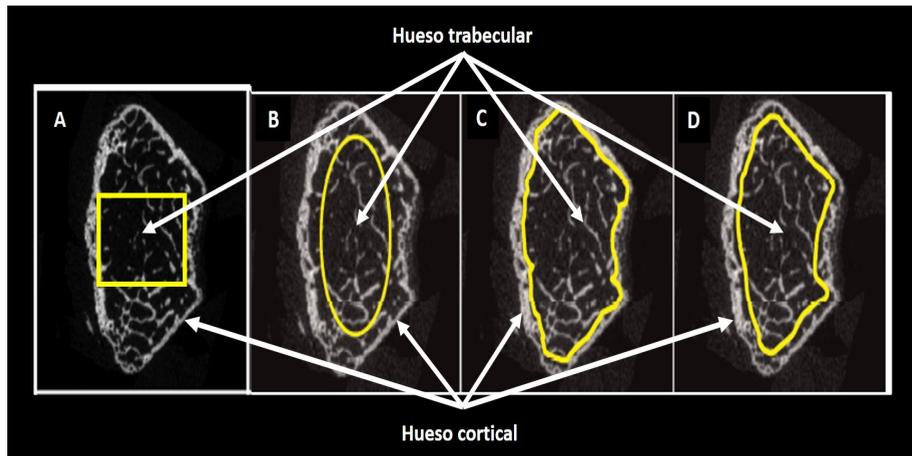


Figura 2.11: Imagen representativa que muestra las diferentes regiones de interés que se pueden considerar al realizar estudios de micro-arquitectura en hueso trabecular. Se observa que al seleccionar regiones de formas simples, como el caso de A) o B), no se delimita correctamente el hueso trabecular debido a las diferentes formas anatómicas que se presenten. En comparación con las regiones de C) y D), las cuales tienen una mejor delimitación en hueso trabecular al tomar un área mayor que abarca toda la estructura. Tomado y editado de [Bouxsein et al., 2010].

## 2.9. Calidad de la imagen en microCT

### Resolución espacial en término del tamaño de voxel de la imagen

La resolución espacial describe el nivel de detalle con el que se puede observar un objeto dentro de una imagen; visto de otra manera, representa la distancia máxima en la que se pueden visualizar dos objetos distinguibles e independientes. La relación entre resolución espacial y tamaño de voxel dependen de diferentes factores, por ejemplo, la atenuación que se presenta al atravesar el objeto de estudio, el ruido generado por el sistema de detección, el algoritmo de reconstrucción, la forma y el tamaño de la mancha focal del tubo de rayos-X, la apertura del detector, la geometría de escaneo y el tamaño de voxel de las imágenes. Es por esto que por simplicidad, al referirse a la resolución espacial se reporta el tamaño de voxel de las imágenes reconstruidas [Bouxsein et al., 2010].

### Cociente Contraste a Ruido (CNR)

El CNR se refiere a la variación del contraste de la intensidad de la señal producida por un objeto independiente dentro de una imagen en presencia de ruido. Por otro lado, el contraste se define como la diferencia que hay entre los valores promedio de pixel en la imagen que involucren regiones de interés (ROIs) del objeto de estudio respecto con los del fondo. El CNR se definiéndose a partir de la ecuación (2.1), [Bushberg and Boone, 2011c]:

$$CNR = \frac{(\bar{x}_s - \bar{x}_{bg})}{\sigma_{bg}} \quad (2.1)$$

donde  $\bar{x}_s$  y  $\bar{x}_{bg}$  representan los valores promedio del número de pixel que están contenidas dentro de una región de interés del objeto de estudio y del fondo de la imagen respectivamente,  $\sigma_{bg}$  representa la desviación estandar asociada al fondo.

## Capítulo 3

# Materiales y Método

---

### 3.1. Modelo Animal

Se utilizaron ratas macho de la cepa *Wistar* ( $n=9$ ), provenientes del Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM, las cuales se distribuyeron en tres grupos de estudio en función de su peso. Grupo A) 250 - 300 g; Grupo B) 300 – 400 g; Grupo C) 400 – 500 g. Durante los estudios las ratas se mantuvieron en condiciones libres de patógenos, con acceso a agua y alimento *ad libitum* manteniendo la temperatura y humedad adecuadas de 27°C. Todos los estudios que involucraron a los animales se realizaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana para el uso y cuidado de animales de experimentación (NOM-062-ZOO-1999).



Figura 3.1: Rata *Wistar* [K-Bits, 2018].

### 3.2. Adquisición de imágenes de microCT

Las imágenes de este trabajo se obtuvieron con el módulo microCT del equipo de imagen trimodal microPET/SPECT/CT Albira ARS (Oncovisión/Bruker, España), ubicado en la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, INCan/UNAM del Instituto Nacional de Cancerología. El módulo microCT consta de un tubo de rayos X Apogee 5500 (Oxford Instruments, Reino Unido) con ánodo de tungsteno y filtro interno de 0.5 mm de aluminio; utilizando los voltajes de operación de 35 y 45 kVp y corrientes de 0.2 y 0.4 mA. Cuenta con un detector de panel plano (Hamamatsu C7942CA-ck12) [Oncovisión/Bruker, 2013]; [Berumen-Murillo, 2016] (ver Apéndice C). Las adquisiciones se obtuvieron en la modalidad de 600 proyecciones, en esta modalidad se tiene una matriz de 1200 x 1200 píxeles, el tamaño de cada pixel es del orden de  $125 \times 125 \mu\text{m}^2$ . Durante las adquisiciones, los animales fueron anestesiados por vía inhalatoria con isoflurano (Lisorane, Baxter International Inc.) en una concentración de 2% en oxígeno. Las regiones de interés para el análisis de la micro-arquitectura ósea fueron la calvaria, mandíbula, cabeza de fémur y la 5ta vértebra lumbar, como se observa en la Figura 3.2.

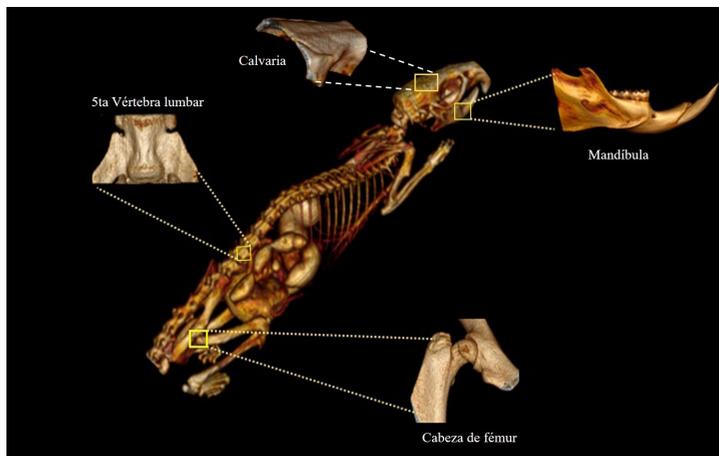


Figura 3.2: Huesos seleccionados para el cálculo de la micro-arquitectura ósea [Fuente directa].

### 3.3. Curva patrón para el cálculo de la concentración de hidroxiapatita [HA]

Se utilizó un maniquí modelo CIRS 090 MicroMouse<sup>TM</sup> el cual está compuesto por dos arreglos de barras de HA cilíndricas con diámetros diferentes, Figura 3.3.

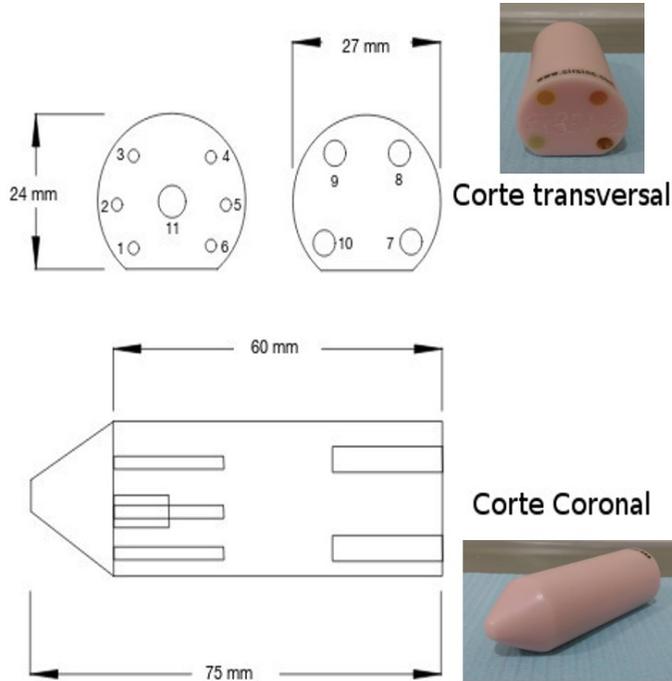


Figura 3.3: Composición interna del maniquí de HA [CIRS, 2013].

Las barras 1 a 6 tienen dimensiones de 20 mm de largo y 2 mm de diámetro; sus concentraciones de HA son de 0, 50, 100, 250, 500 y 700 mg/cm<sup>3</sup> respectivamente. Las barras 7 a 10 tienen 20 mm de largo y 4 mm de diámetro, con concentraciones de 0, 50, 250 y 750 mg/cm<sup>3</sup> de HA. El fabricante especifica que el cuerpo del maniquí está hecho de un material epóxico simulando una densidad equivalente a tejido blando. Para el cálculo de las curvas de referencia se realizaron las adquisiciones utilizando las barras de HA con 4mm de diámetro, evitando así el efecto

del endurecimiento del haz de radiación dentro del cuerpo del animal [Bruker, 2017]. Se seleccionaron ROIs circulares de 1 mm de diámetro en cada una de las barras de HA, propagadas 20 cortes sobre el plano transversal.

### 3.4. Estimación de la hidroxiapatita [HA] en las imágenes de las ratas

Se utilizó el software  $\pi$ .PMOD Technologies (versión 2.95) [PMOD Technologies, 2016], seleccionando regiones de interés (ROIs) en las imágenes de microCT en los huesos de la calvaria, mandíbula, cabeza de fémur y la 5ta vértebra lumbar. La estimación de la [HA] para estos huesos de estudio se hizo mediante las imágenes de las ratas con base en las curvas de referencia obtenidas con el procedimiento descrito en la sección pasada.

Las imágenes de microCT correspondientes a estas dos primeras secciones fueron reconstruidas y analizadas usando el algoritmo de reconstrucción *FBP* (Filtered Backprojection) (ver Apéndice D).

### 3.5. Caracterización de la micro-arquitectura ósea

Para el análisis de los parámetros morfométricos de hueso trabecular se utilizó el software ImageJ (versión 1.51k) [ImageJ, 2016] mediante el *plugin* BoneJ (versión 1.4.2) [BoneJ, 2016]. Este es una herramienta para el análisis y estudio de imágenes de hueso dando información sobre geometría y forma trabecular, así como el análisis que engloba estructura ósea. Para esto se trabajó con las imágenes de microCT reconstruidas a partir del algoritmo de *CT High* (ver Apéndice D) ya que las imágenes presentan una mejor resolución digital teniendo un tamaño de voxel de  $35 \mu\text{m}$ . En esta sección fueron seleccionadas ROIs cuadradas de  $0,5x0,5x0,5\text{mm}^3$  en calvaria y de  $1,0x1,0x1,0\text{mm}^3$  para el resto de los huesos de estudio.

### 3.5.1. Evaluación de la calidad en las imágenes por medio del cociente contraste a ruido [CNR]

Con base a los trabajos realizados por Pauwels *et. al*, se evaluó el CNR de las imágenes de microCT reconstruidas con el algoritmo de *CT High* a partir de la expresión (3.1):

$$CNR = \frac{|MGV_i - MGV_{fondo}|}{\sqrt{\sigma_i^2 + \sigma_{fondo}^2}} \quad (3.1)$$

donde  $MGV_i$  representa el valor promedio de pixel dentro de una ROI conteniendo al objeto de estudio y  $MGV_{fondo}$  el valor promedio de pixel de una ROI conteniendo el fondo de la imagen;  $\sigma_i^2$  y  $\sigma_{fondo}^2$  representan sus desviaciones estándares respectivamente [Pauwels *et al.*, 2014].

## 3.6. Análisis Estadísticos

Se usó el software IBM<sup>®</sup> SPSS Statistics versión 22; realizando un análisis de varianza (ANOVA) verificando la existencia de diferencias significativas *inter-grupales* e *intra-grupales* que esten asociadas al cálculo de la DMO así como de los parámetros relacionados con la microarquitectura ósea en los huesos de estudio tanto en hueso cortical y trabecular en los diferentes grupos de ratas, además del cálculo relacionado con el CNR en las imágenes reconstruidas mediante el algoritmo de *CT High*.

Para esto, fueron utilizadas pruebas *post hoc* por corrección de *Bonf-feroni*, seleccionando el punto de corte con un valor de significancia de  $p=0.05$ . Los valores reportados en este trabajo están dados por sus valores promedio  $\pm$  sus desviaciones estándares. Por otro lado, se utilizaron diagramas de cajas y bigotes (ver Apéndice E) para representar la distribución de los resultados asociados con la variabilidad bilógica (diferencias entre peso y edad) del modelo animal usado.

# Capítulo 4

## Resultados

### 4.1. Curvas de referencia para el cálculo de la concentración de hidroxiapatita [HA]

A continuación, la Figura 4.1 muestra las ROIs creadas en las imágenes de microCT del maniquí de hidroxiapatita (HA) para la obtención de las curvas de referencia para el cálculo de la HA usando las barras de 4 mm diámetro del maniquí de HA.

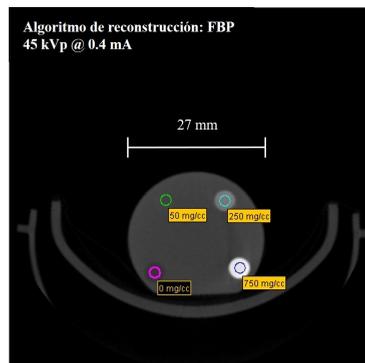


Figura 4.1: El volumen de las ROIs fue de 1 mm de diámetro propagadas 20 proyecciones equivalentes a 3 mm a través del corte axial. Las ROIs se escogieron con un diámetro menor que las barras de HA, con el fin de evitar efectos de borde.

A partir de los valores conocidos de densidad mineral ósea (DMO) del maniquí, dados en mg de HA/cc, las curvas de referencia para el cálculo de la DMO se muestran en la Figura 4.2.

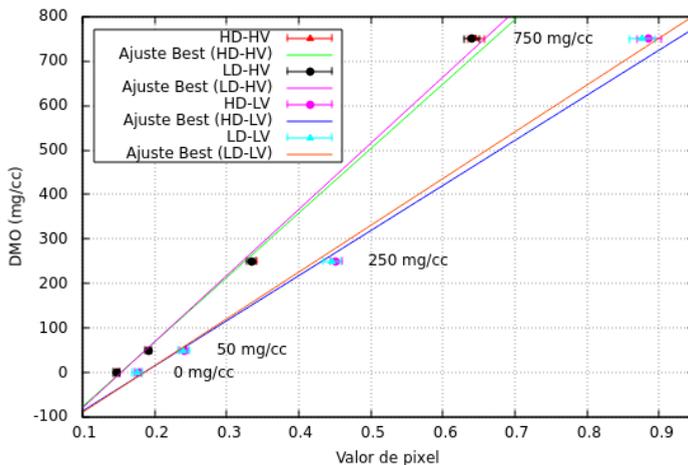


Figura 4.2: Curvas de referencia correspondientes a alto y bajo voltaje (HV y LV) para concentraciones de 0, 50, 250 y 750 mg de HA/cc.

A continuación se muestran las ecuaciones asociadas a los diferentes parámetros de adquisición de corriente y voltaje (HD-HV; LD-HV; HD-LV y LD-LV) para el cálculo de la DMO:

$$DMO = 1449 * valordepixel - 221 \quad (4.1)$$

$$DMO = 1487 * valordepixel - 228 \quad (4.2)$$

$$DMO = 1014 * valordepixel - 188 \quad (4.3)$$

$$DMO = 1051 * valordepixel - 195 \quad (4.4)$$

los valores de  $r$  fueron de 0.998 y 0.997 para HV y LV respectivamente.

Con base en estas ecuaciones se realizó el cálculo de la concentración de hidroxiapatita [HA] en función de los valores de pixel en las imágenes de microCT en cada hueso de estudio de las ratas.

#### 4.2. Cálculo de la concentración de hidroxiapatita [HA] a partir de las imágenes de microTomografía

A continuación se muestran las ROIs seleccionadas para el cálculo de la [HA] en los huesos corticales y trabeculares para la calvaria, mandíbula, cabeza de fémur y la 5ta vértebra lumbar, siendo propagadas en un total de 20 cortes en las imágenes de microCT. Las imágenes mostradas a continuación son representativas de los parámetros de adquisición en HD-HV (45 kVp a 0.4 mA), reconstruidas con el algoritmo de reconstrucción *FBP*. Cabe mencionar que no fue posible visualizar el hueso trabecular en la calvaria debido a las limitaciones en el tamaño de pixel/voxel de  $125 \mu\text{m}$ , Figura 4.3.



Figura 4.3: Imagen representativa que muestra la ROI creada en las imágenes en la calvaria de la rata para el cálculo de [HA].

Las ROIs de hueso cortical y trabecular en la mandíbula, Figura 4.4, fueron seleccionadas en diferente región; la primera fue seleccionada en la zona trasera de la zona molar debido a que esta zona posee una mayor densidad, la segunda se seleccionó con base en el análisis de hueso

trabecular en mandíbula de ratas realizados por Hsu *et.al* y Liu *et.al*, [Hsu et al., 2016], [Liu et al., 2015].

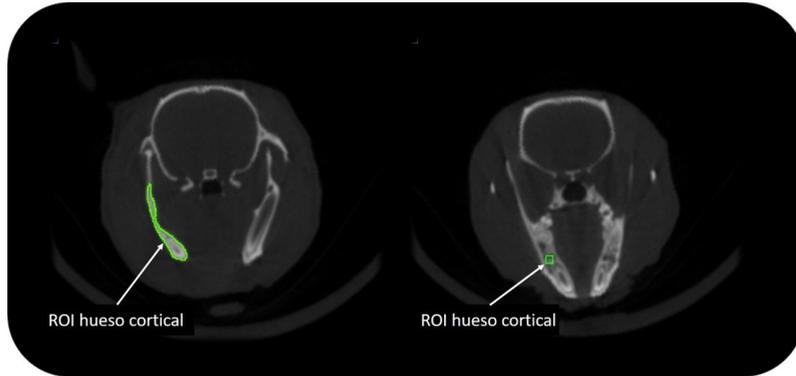


Figura 4.4: Imagen representativa que muestra la ROI creada en las imágenes sobre en la mandíbula de la rata para el cálculo de [HA].

Las ROIs correspondientes a hueso cortical y trabecular en la cabeza de fémur se muestran en la Figura 4.5.

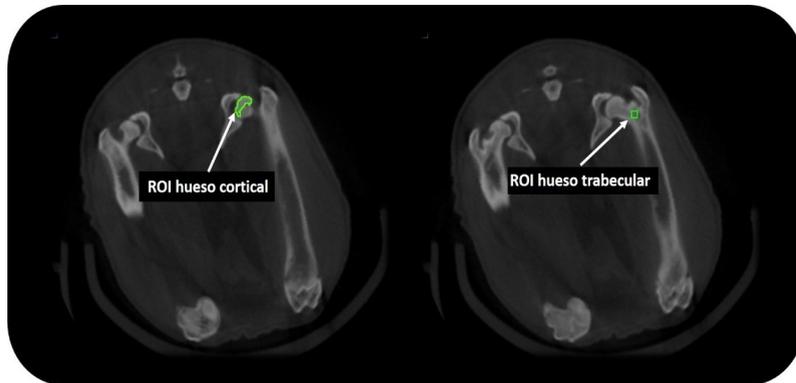


Figura 4.5: Imagen representativa que muestra la ROI creada en las imágenes sobre en la cabeza de fémur de la rata para el cálculo de [HA].

Las ROIs correspondientes a hueso cortical y trabecular en la 5ta vértebra lumbar se muestran en la Figura 4.6.

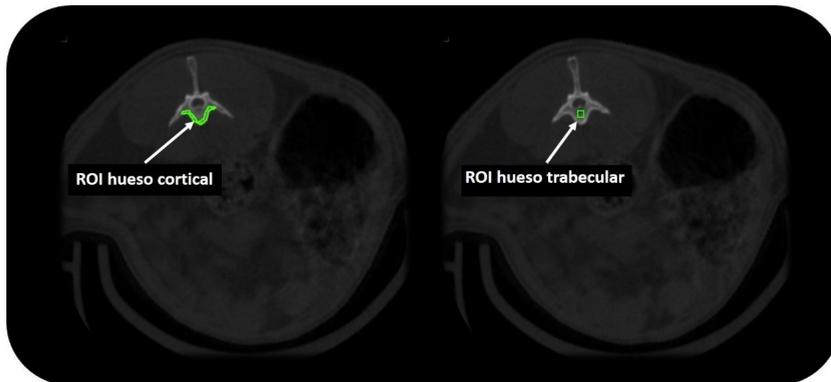


Figura 4.6: Imagen representativa que muestra la ROI creada en las imágenes sobre en la 5ta vértebra lumbar de la rata para el cálculo de [HA].

A continuación, en la Figura 4.7 se muestran los resultados obtenidos en el cálculo de la [HA] para hueso cortical en la calvaria, en donde se observaron diferencias *inter-grupales* (grupo A vs. B y C) estadísticamente significativas asociadas con los valores promedio de [HA] calculados en los tres grupos, con un valor de significancia de  $p < 0.05$ . Cabe mencionar que no se observaron diferencias significativas *intra-grupales*.

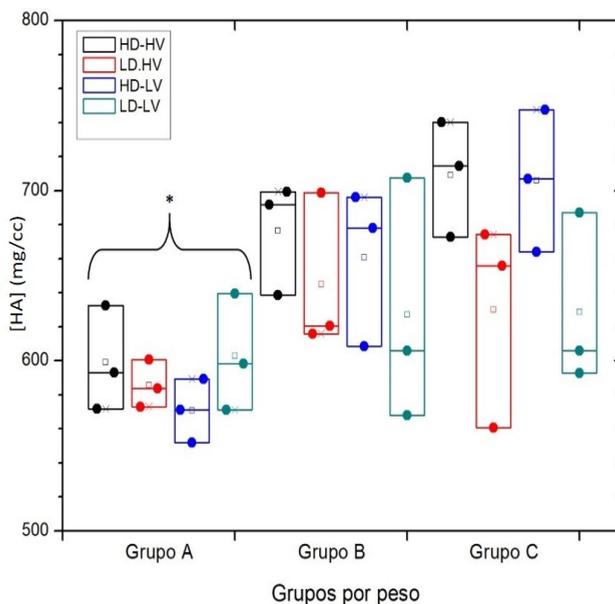


Figura 4.7: Resultados de [HA] en la calvaria para los tres grupos. Se observa la distribución de datos dentro de las cajas correspondientes a los diferentes parámetros de adquisiciones de corriente y voltaje, mostrándose el valor asociado a la media de la distribución (símbolo:  $\triangle$ ). El símbolo (\*) indica diferencia estadísticamente significativa con respecto a los otros grupos, con valor de  $p < 0.05$ .

En la Figura 4.8 se muestran los resultados asociados al cálculo de [HA] en hueso cortical y trabecular en la mandíbula, donde se observaron diferencias *inter-grupales* (grupo A vs. B y C en hueso cortical y grupo grupo B vs. A y C en hueso trabecular) estadísticamente significativas asociadas con el valor promedio de la [HA] calculados en los tres grupos con un valor de significancia de  $p < 0.05$ . Por otro lado, no se presentaron diferencias significativas *intra-grupales* tanto en hueso cortical como trabecular.

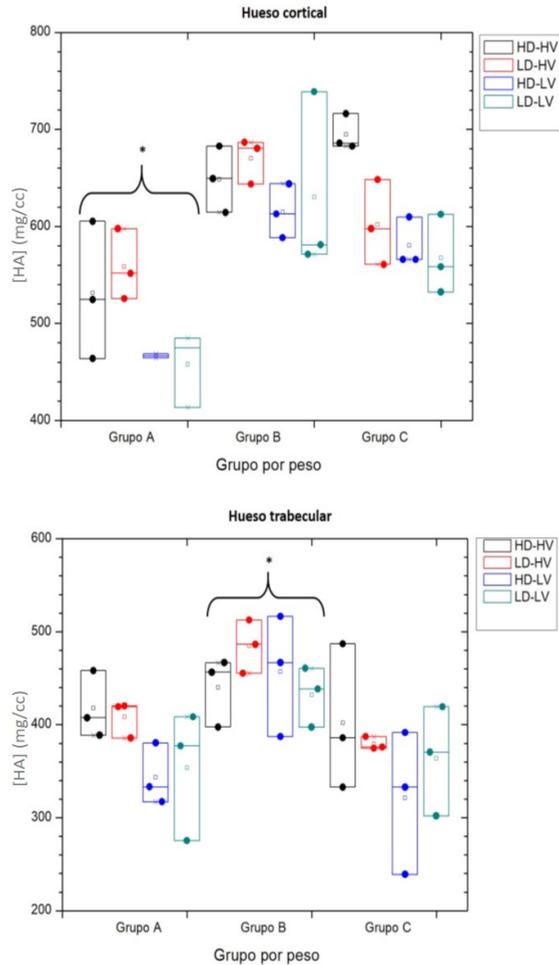


Figura 4.8: Resultados de [HA] asociados a hueso cortical y trabecular en la mandíbula para los tres grupos. Se observa la distribución de datos dentro de las cajas correspondientes a los diferentes parámetros de adquisiciones de corriente y voltaje, mostrándose el valor asociado a la media de la distribución (símbolo:  $\Delta$ ). El símbolo (\*) indica diferencia estadísticamente significativa con respecto a los otros grupos, con valor de  $p < 0.05$ .

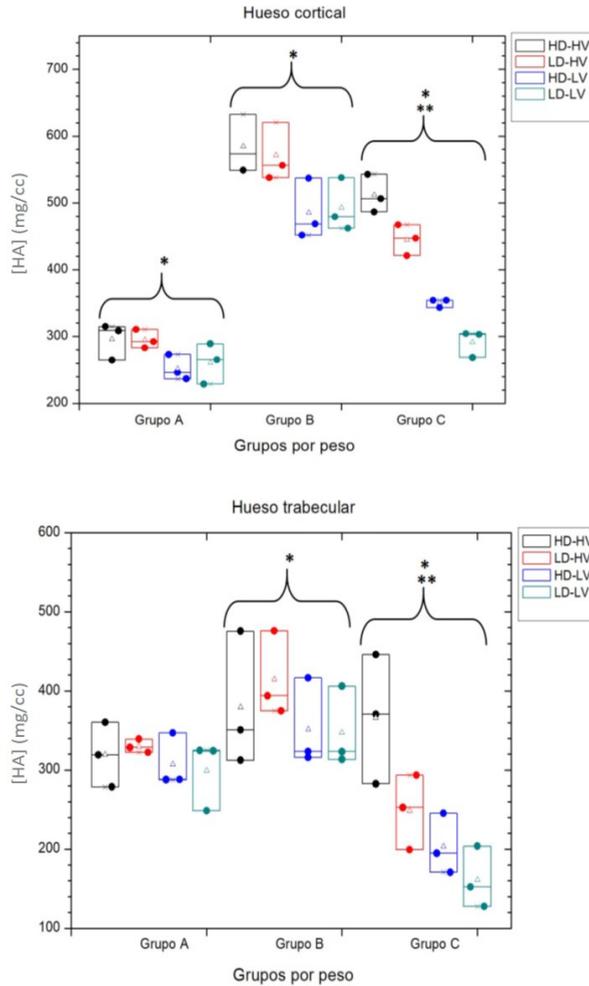


Figura 4.9: Resultados de [HA] asociados a hueso cortical y trabecular en la cabeza de fémur para los tres grupos. Se observa la distribución de datos dentro de las cajas correspondientes a los diferentes parámetros de adquisiciones de corriente y voltaje, mostrándose el valor asociado a la media de la distribución (símbolo:  $\Delta$ ). El símbolo (\*) indica diferencia *inter-grupales* estadísticamente significativa y (\*\*) diferencias *intra-grupales* ( $p < 0.05$ ).

En la Figura 4.9 se muestran los resultados asociados al cálculo de [HA] en hueso cortical y trabecular en la cabeza de fémur, en donde se observaron diferencias *inter-grupales* estadísticamente significativas en hueso cortical en los tres grupos y en hueso trabecular (grupo B y C vs. A), asociadas con los valores promedio de [HA] calculados en los tres grupos con un valor de significancia de  $p < 0.05$ . Además, se observaron diferencias *intra-grupales* (grupo C vs. A y B) significativas en hueso cortical y trabecular en los diferentes parámetros de adquisición de corriente y voltaje.

Por último, en la Figura 4.10 se muestran los resultados correspondientes al cálculo de [HA] en hueso cortical y trabecular para la 5ta vértebra lumbar, en donde se observaron diferencias *inter-grupales* estadísticamente significativas (grupo A y B vs. C para hueso cortical y grupo B vs. A y C para hueso trabecular), con un valor de significancia de  $p < 0.05$ . Además se observaron diferencias *intra-grupales* significativas (grupo C vs. A y B) en hueso cortical en los diferentes parámetros de adquisición de corriente y voltaje.

En la Tabla 4.1 se muestran los valores promedio y sus desviaciones estándares correspondientes a los resultados del cálculo de [HA] por grupos para hueso cortical y trabecular.

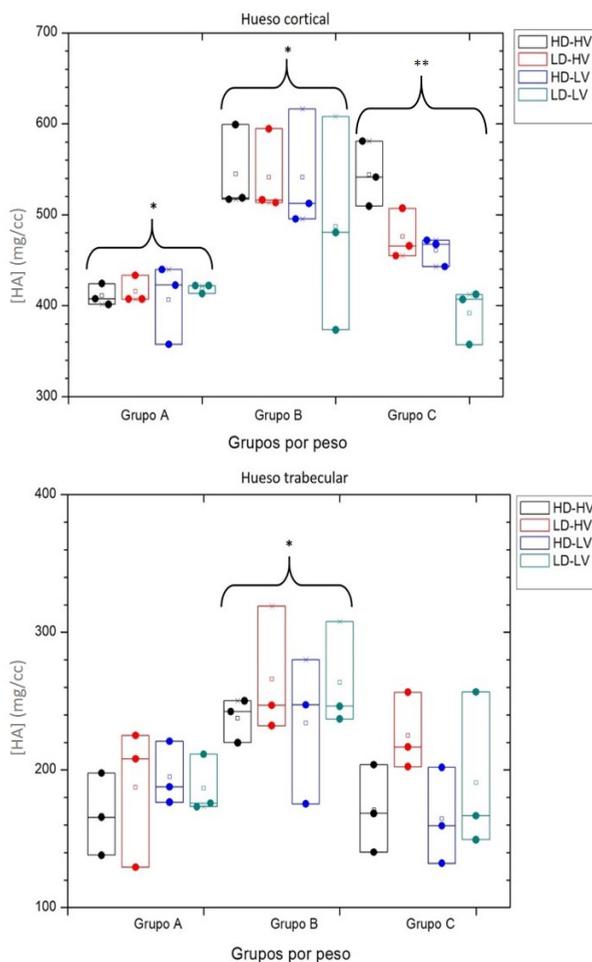


Figura 4.10: Resultados de [HA] asociados a hueso cortical y trabecular en la 5ta vértebra lumbar para los tres grupos de diferente peso. Se observa la distribución de datos dentro de las cajas correspondientes a los diferentes parámetros de adquisiciones de corriente y voltaje, mostrándose el valor asociado a la media de la distribución (símbolo:  $\triangle$ ). El símbolo (\*) indica diferencia intergrupales estadísticamente significativa y (\*\*) diferencias intra-grupales ( $p < 0.05$ ).

Tabla 4.1: Valores promedio y sus desviaciones estándares correspondientes a los resultados del cálculo de la [HA] en los diferentes huesos para cada grupo.

Grupos	[HA] (mg/cc) hueso cortical			[HA] (mg/cc) hueso trabecular		
	A	B	C	A	B	C
Calvaria	590±15	652±21	669±45	-	-	-
Mandíbula	503±49	641±24	608±58	381±38	453±23	371±46
Cabeza de fémur	276±23	534±52	400±98	314±14	373±31	248±84
5ta vértebra lumbar	413±6	529±28	468±62	184±12	250±17	188±27

Las diferencias significativas *intra-grupales* observadas en la cabeza de fémur y en la 5ta vértebra lumbar, asociadas con ratas del grupo C, podría deberse a una consecuencia del efecto de la atenuación de los rayos-X debido al aumento en la masa corporal (por tejido blando y grasa) que se observa en las ratas de mayor peso, como se muestra en la Figura 4.11.

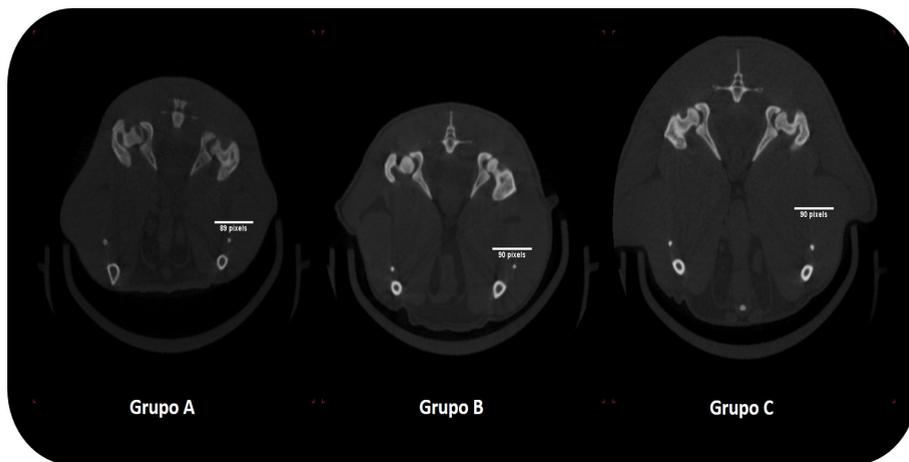


Figura 4.11: Imagen representativa que muestra una comparación en el aumento de la masa corporal (tejido blando y grasa). Se observa un aumento significativo de masa en las ratas del grupo C), que cubre en su totalidad el campo de visión (FOV). Imágenes adquiridas con las modalidades de HD-HV (45 kVp a 0.4 mA) y reconstruidas con *FBP* con un tamaño de voxel de 125  $\mu\text{m}$ .

### 4.3. Evaluación de la micro-arquitectura ósea en hueso trabecular

#### 4.3.1. Calidad de la imagen a partir del cálculo del cociente contraste a ruido (CNR)

La Figura 4.12 muestra las ROIs utilizadas para el cálculo del CNR en las imágenes reconstruidas mediante el algoritmo *CT High* a partir de los diferentes parámetros de adquisición de corriente y voltaje.

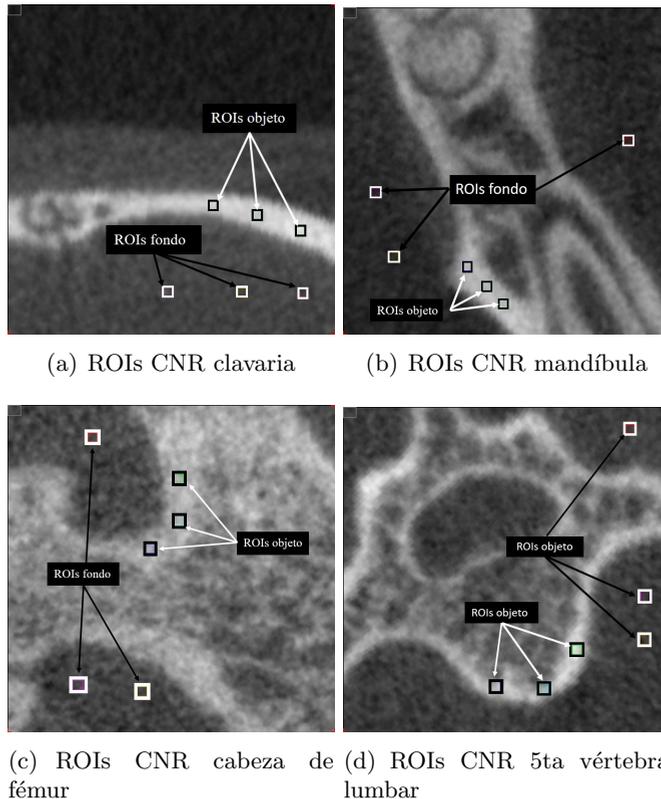


Figura 4.12: ROIs usadas para el cálculo del valor de CNR en las imágenes para calvaria; mandíbula; cabeza de fémur y la 5ta vértebra lumbar. Las dimensiones escogidas fueron de  $0,5 \times 0,5 \text{ mm}^2$  para las ROIs correspondientes al objeto y fondo.

A continuación se presentan los resultados correspondientes a los valores promedio de CNR en las imágenes de la calvaria, Figura 4.13, en la cual se observaron diferencias *intra-grupales* estadísticamente significativa asociadas con los valores promedio de pixel de las ROIs en los grupos A, B y C usando el parámetro de adquisición de HD-HV (45 kVp a 0.4 mA), con un valor de significancia de  $p < 0.05$ .

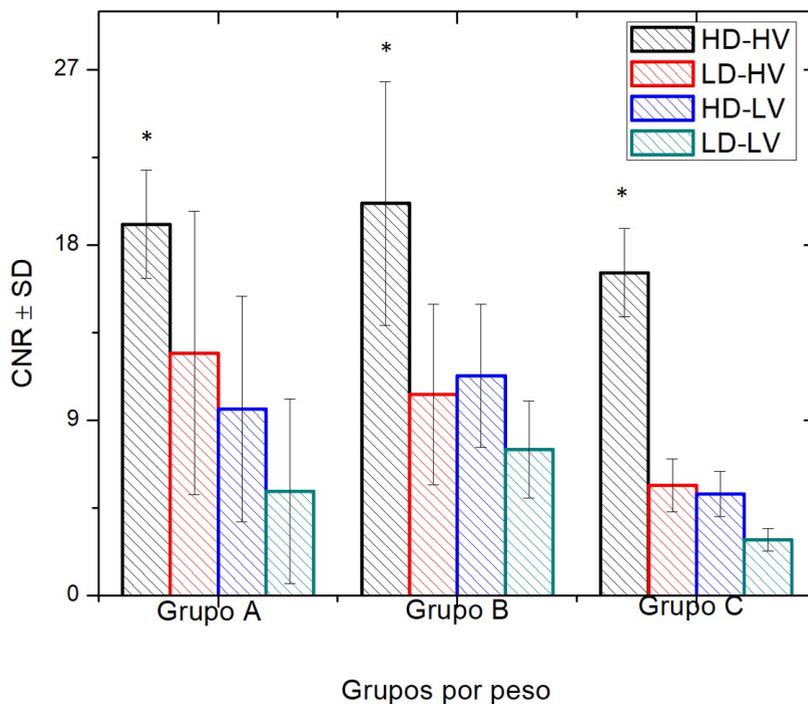


Figura 4.13: Resultados correspondientes al cálculo del CNR en la calvaria en los tres grupos. El símbolo (\*) representa las diferencias *intra-grupales* significativas ( $p < 0.05$ ) en el parámetro de adquisición de HD-HV.

En la Figura 4.14 se muestran los resultados del CNR en las imágenes de la calvaria, asociados con la Figura 4.13 a partir de los parámetros de adquisición (HD-HV, LD-HV, HD-LV, LD-LV).

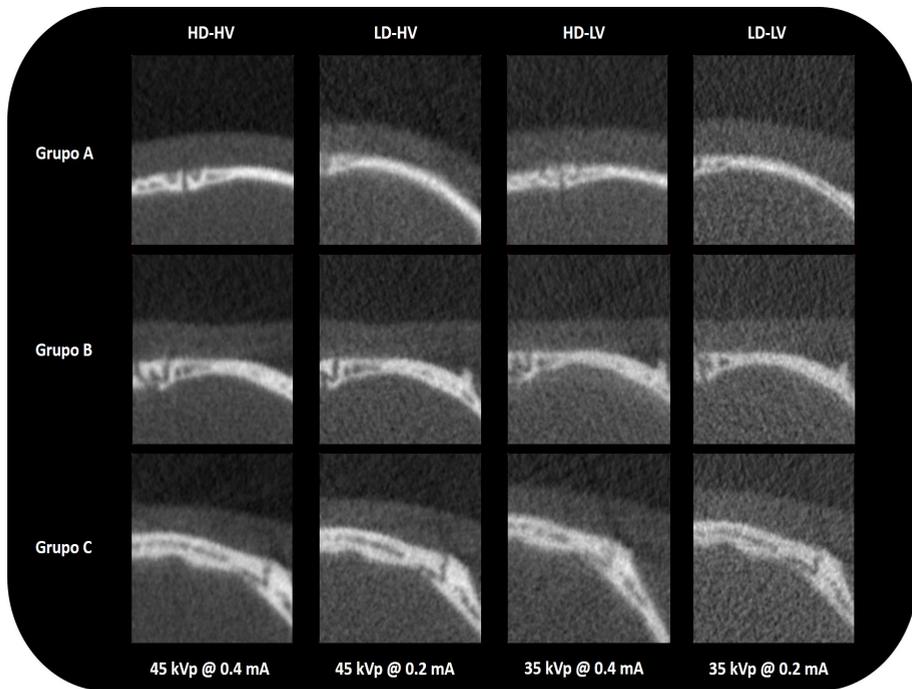


Figura 4.14: Resultado que muestra el cambio en el CNR en las imágenes de la calvaria, adquiridas con las modalidades de HD-HV, LD-HV, HD-LV y LD-LV. Las imágenes mostradas son las más representativas de cada grupo asociadas a los valores de CNR. La imagen de óptima calidad, relacionada con la que posee el valor mayor de CNR, es la adquirida con la modalidad de HD-HV (45kVp a 0.4mA).

A continuación se presentan los resultados correspondientes a los valores promedio de CNR en la mandíbula, Figura 4.15, en la cual se observaron diferencias *intra-grupales* estadísticamente significativa asociadas con los valores promedio de pixel de las ROIs en los grupos A, B y C para la modalidad de adquisición HD-HV (45 kVp a 0.4 mA), con un valor de significancia de  $p < 0.05$ .

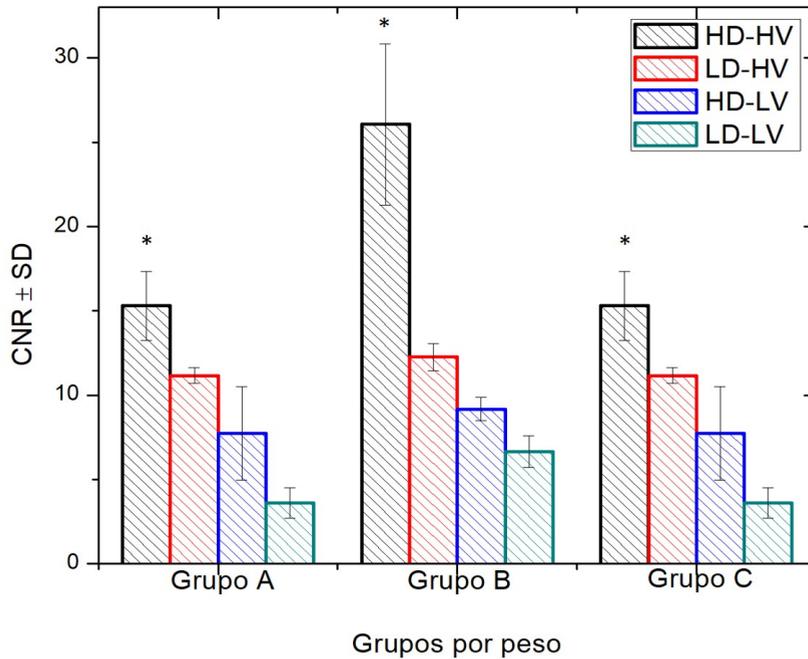


Figura 4.15: Resultados correspondientes al cálculo del CNR en la mandíbula en los tres grupos. El símbolo (\*) representa diferencias *intra-grupales* con valor de  $p < 0.05$  en el parámetro de adquisición de HD-HV.

En la Figura 4.16 se muestran los resultados del CNR en las imágenes de la mandíbula, asociados con la Figura 4.13 a partir de los parámetros de adquisición (HD-HV, LD-HV, HD-LV, LD-LV).

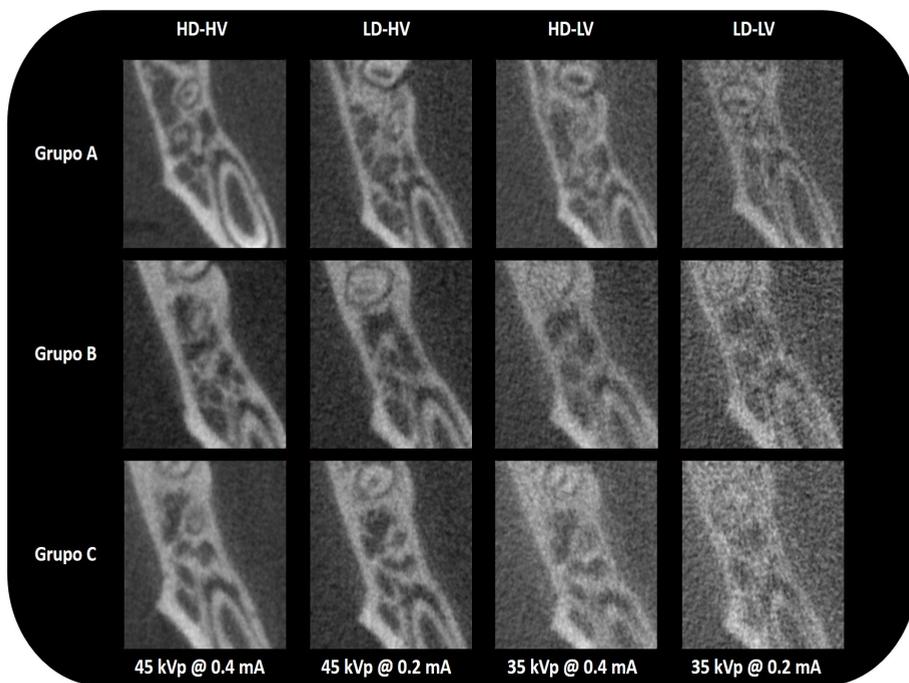


Figura 4.16: Resultado que muestra el cambio en el CNR en las imágenes de la mandíbula, adquiridas con las modalidades de HD-HV, LD-HV, HD-LV y LD-LV. Las imágenes mostradas son las más representativas de cada grupo asociadas a los valores de CNR. La imagen de óptima calidad, relacionada con la que posee el valor mayor de CNR, es la adquirida con la modalidad de HD-HV (45kVp a 0.4mA).

A continuación se presentan los resultados correspondientes a los valores promedio de CNR en la cabeza de fémur, Figura 4.17, en la cual se observaron diferencias *intra-grupales* estadísticamente significativa asociadas con los valores promedio de pixel de las ROIs en los grupos A, B y C para la modalidad de adquisición HD-HV (45 kVp a 0.4 mA), con un valor de significancia de  $p < 0.05$ .

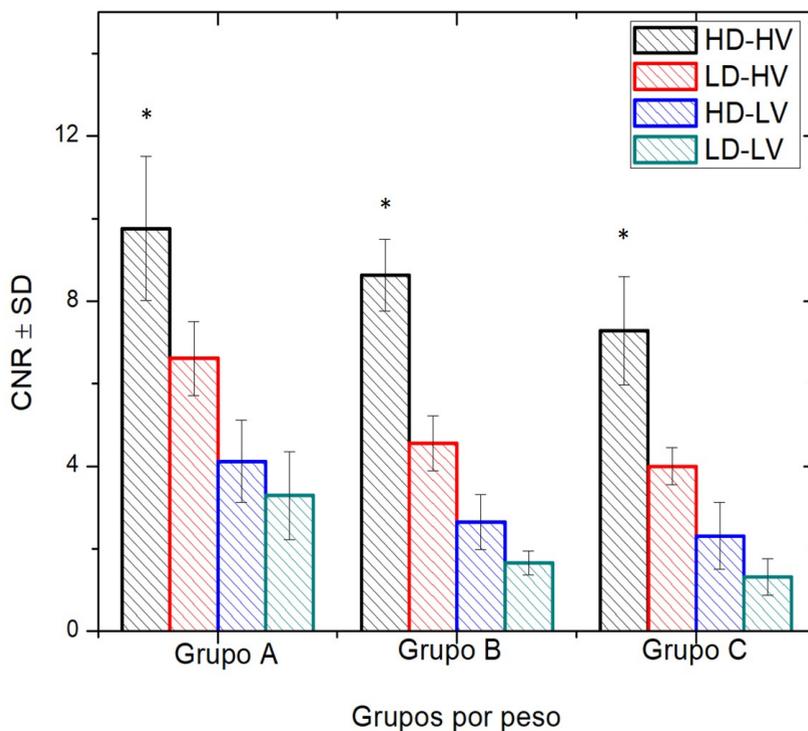


Figura 4.17: Resultados correspondientes al cálculo del CNR en la cabeza de fémur en los tres grupos. El símbolo (\*) representa diferencia intra-grupal con valor de  $p < 0.05$  en el parámetro de adquisición de HD-HV.

En la Figura 4.16 se muestran los resultados del CNR en las imágenes de la cabeza de fémur, asociados con la Figura 4.13 a partir de los parámetros de adquisición (HD-HV, LD-HV, HD-LV, LD-LV).

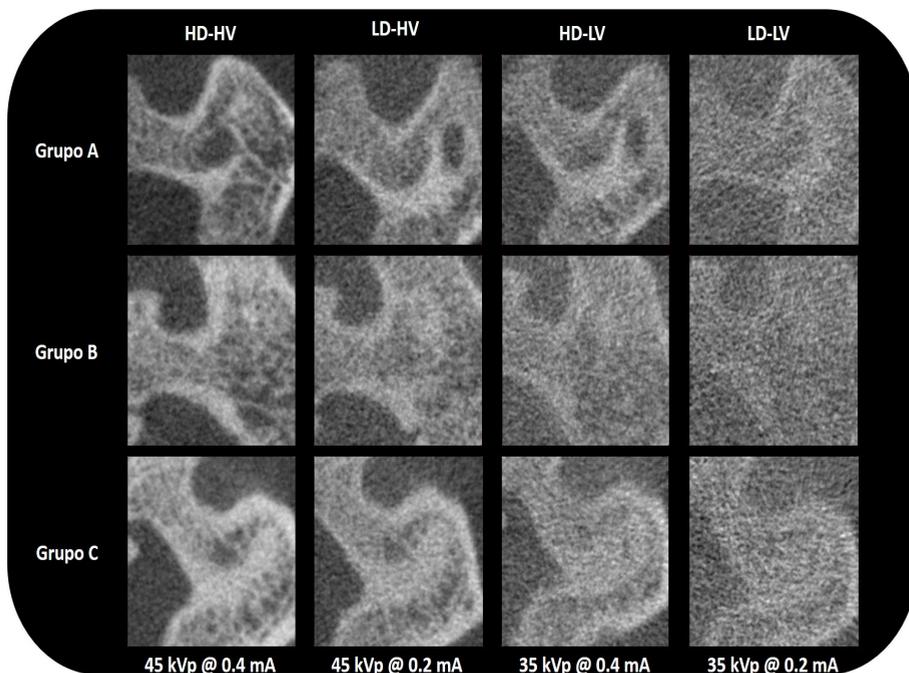


Figura 4.18: Resultado que muestra el cambio en el CNR en las imágenes de la cabeza de fémur, adquiridas con las modalidades de HD-HV, LD-HV, HD-LV y LD-LV. Las imágenes mostradas son las más representativas de cada grupo asociadas a los valores de CNR. La imagen de óptima calidad, relacionada con la que posee el valor mayor de CNR, es la adquirida con la modalidad de HD-HV (45kVp a 0.4mA).

Por último, en la Figura 4.19 se presentan los resultados correspondientes a los valores promedio de CNR en la 5ta vértebra lumbar, en la cual se observaron diferencias *intra-grupales* estadísticamente significativa asociadas con los valores promedio de pixel de las ROIs en los grupos A, B y C para la modalidad de adquisición HD-HV (45 kVp a 0.4 mA), con un valor de significancia de  $p < 0.05$ .

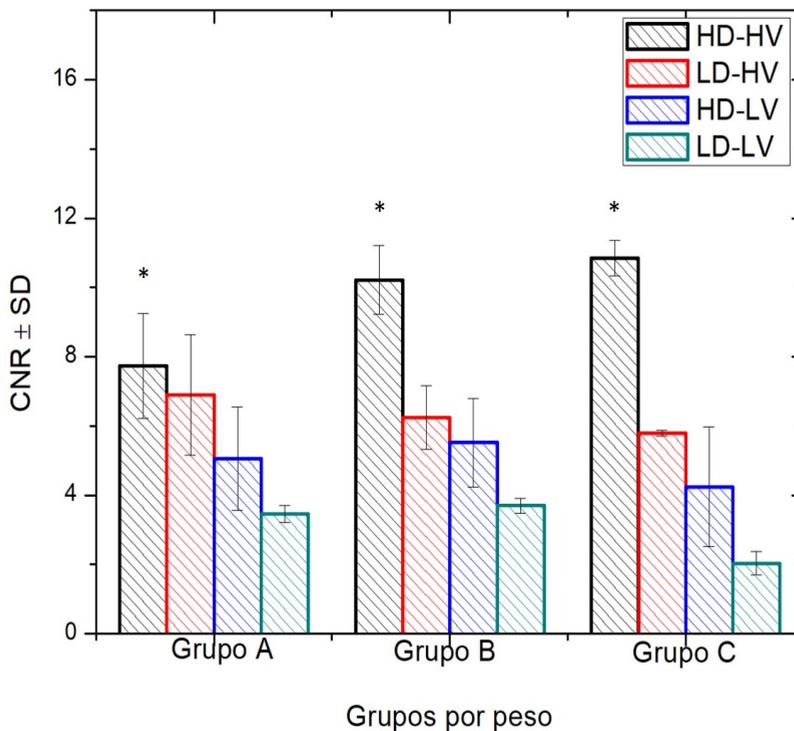


Figura 4.19: Resultados correspondientes al cálculo del CNR en la 5ta vértebra lumbar en los tres grupos. El símbolo (\*) representa diferencia intra-grupal con valor de  $p < 0.05$  en el parámetro de adquisición de HD-HV.

En la Figura 4.16 se muestran los resultados del CNR en las imágenes de la 5ta vértebra lumbar, asociados con la Figura 4.13 a partir de los parámetros de adquisición (HD-HV, LD-HV, HD-LV, LD-LV).

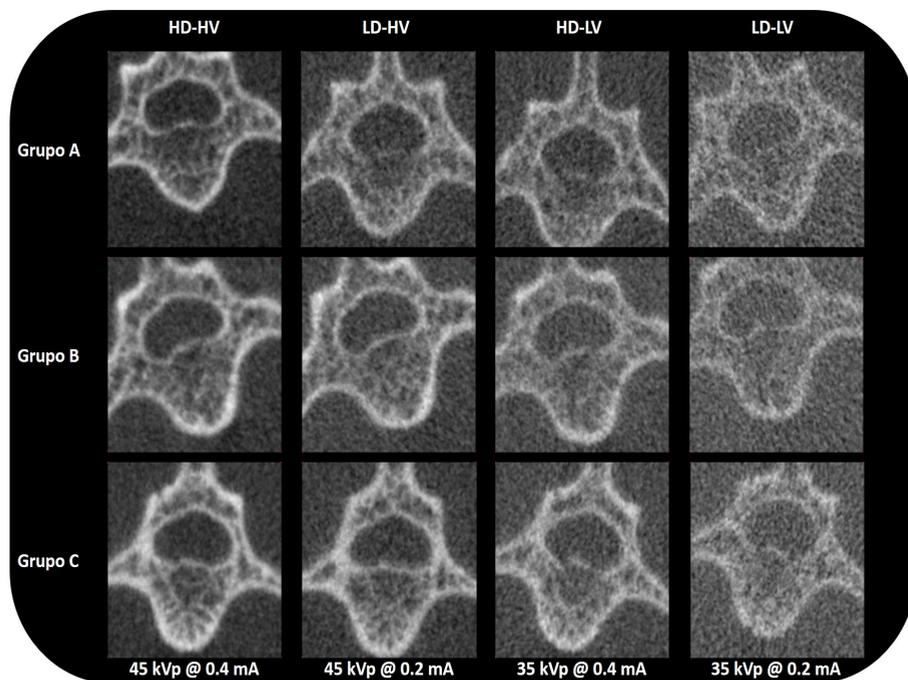


Figura 4.20: Resultado que muestra el cambio en el CNR en las imágenes de la 5ta vértebra lumbar, adquiridas con las modalidades de HD-HV, LD-HV, HD-LV y LD-LV. Las imágenes mostradas son las más representativas de cada grupo asociadas a los valores de CNR. La imagen de óptima calidad, relacionada con la que posee el valor mayor de CNR, es la adquirida con la modalidad de HD-HV (45kVp a 0.4mA).

#### 4.3.2. Cálculo de los parámetros morfométricos (Tb.Th, Tb.Sp)

Por medio del cálculo del CNR en las imágenes reconstruidas con el algoritmo de *CT High*, se observó que los valores de corriente y voltaje con los que se obtiene un mejor valor de CNR es en la modalidad de HD-HV (45 kVp a 0.4 mA). Por ello, los parámetros morfométricos asociados con la micro-arquitectura ósea fueron calculados a partir de las imágenes adquiridas con la modalidad de HD-HV (45 kVp a 0.4mA).

En la Figura 4.21 se muestran las regiones de interés usadas para el cálculo de los parámetros morfométricos.

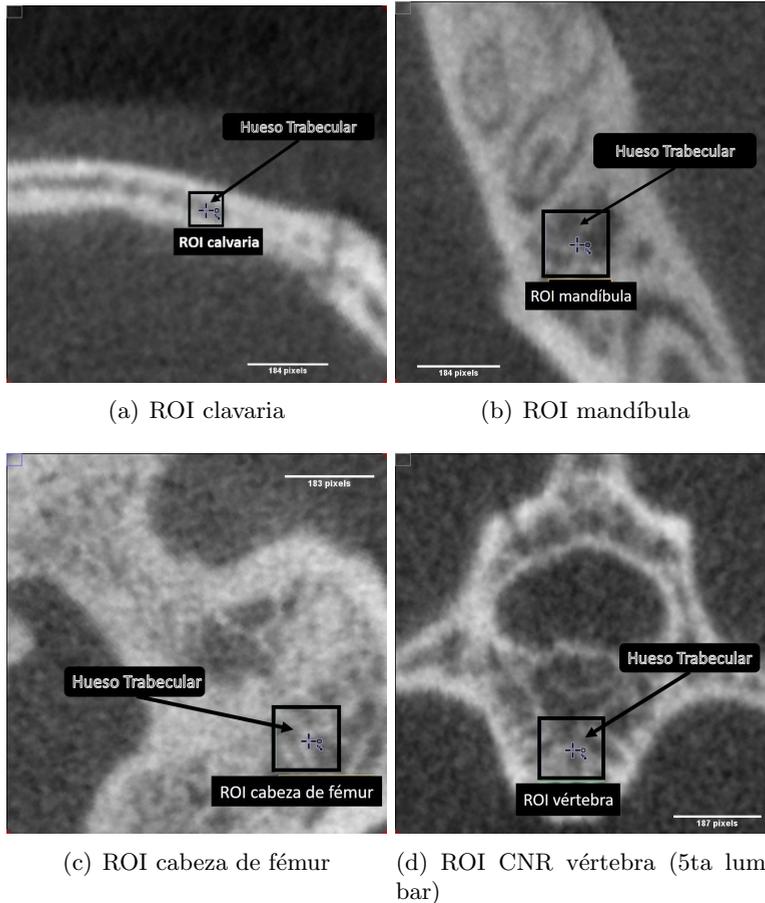


Figura 4.21: Regiones de interés seleccionadas para el cálculo de los parámetros morfométricos en las imágenes para calvaria; mandíbula; cabeza de fémur y la 5ta vértebra lumbar, reconstruidas a partir del algoritmo *CT High* a partir de la modalidad de HD-HV (45 kVp @ 0.4 mA) con tamaño de pixel de  $35 \mu\text{m}$ . Los volúmenes de las ROIs fueron de  $0,5 \times 0,5 \times 0,5 \text{mm}^3$  para calvaria y de  $1 \times 1 \times 1 \text{mm}^3$  para el resto.

A continuación se muestran los resultados correspondientes al grosor y separación trabecular (Tb.Th y Tb.Sp) en la calvaria, Figura 4.22, donde no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, asociadas con los valores trabeculares promedio calculados, los cuales se muestran en la Tabla 4.2.

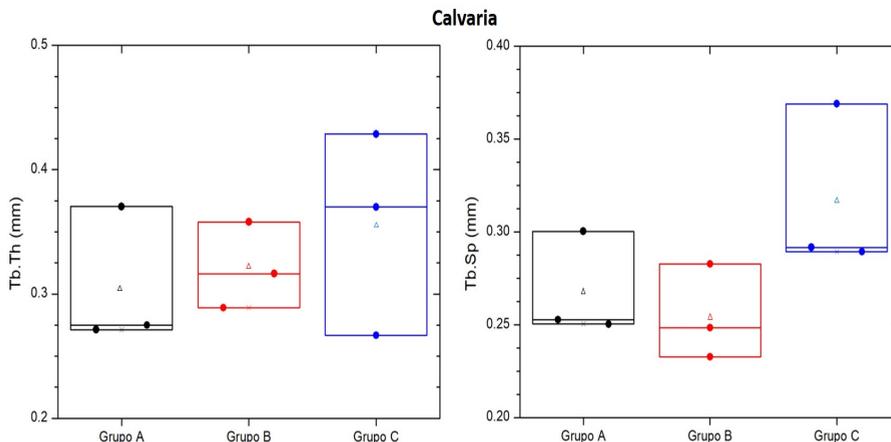


Figura 4.22: Resultados correspondientes al grosor y separación trabecular (Tb.Th y Tb.Sp) en calvaria en los tres grupos. El símbolo ( $\Delta$ ), dentro de los diagramas de caja, representa la media asociada con la distribución de los datos, los cuales no presentan diferencias significativas *inter-grupales*.

Tabla 4.2: Valores promedio y sus desviaciones estándar correspondientes al grosor y separación trabecular (Tb.Th y Tb.Sp) en calvaria.

Grupos	Tb.Th (mm)	SD	Tb.Sp (mm)	SD
A	0.306	0.050	0.268	0.028
B	0.321	0.035	0.255	0.026
C	0.355	0.083	0.317	0.045

A continuación se muestra la Figura 4.23, presentándose el resultado de la binarización de la imagen de microCT en la ROI de calvaria, usando la herramienta de *Optimise Threshold* del *plugin* BoneJ.

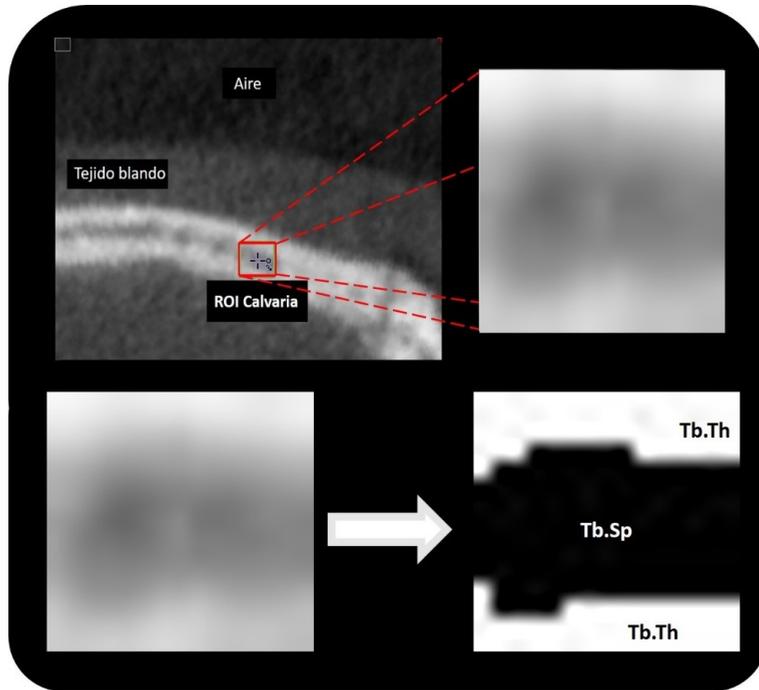


Figura 4.23: Imagen representativa de un *CT High* de calvaria que muestra la comparación, en una respectiva proyección, entre la ROI con su respectiva binarización, mostrándose los sitios correspondientes al cálculo de Tb.Th y Tb.Sp. En la imagen original se alcanza a visualizar una abertura dentro de la cual se cree que exista la presencia de hueso trabecular.

A continuación se muestran los resultados correspondientes al grosor y separación trabecular (Tb.Th y Tb.Sp) en la mandíbula, Figura 4.24, donde no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, asociadas con los valores trabeculares promedio calculados, los cuales se muestran en la Tabla 4.3.

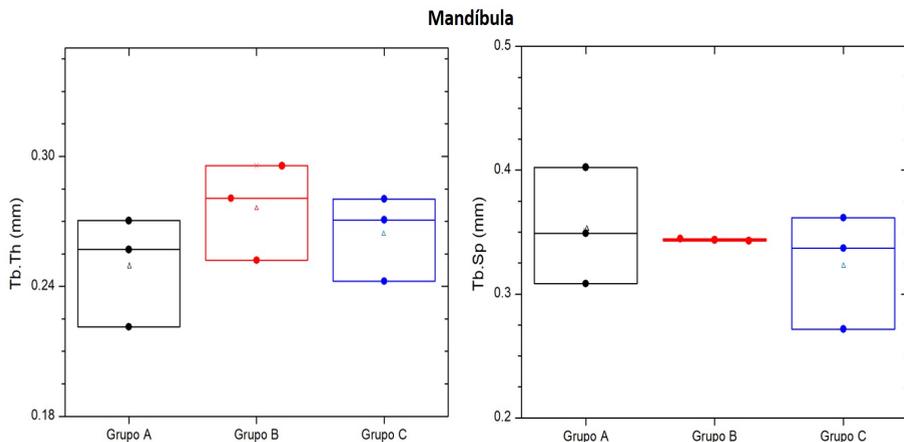


Figura 4.24: Imagen que muestra los resultados de grosor y separación trabecular (Tb.Th y Tb.Sp) en mandíbula para los tres grupos. El símbolo ( $\Delta$ ), dentro de los diagramas de caja, representa la media asociada con la distribución de los datos, los cuales no presentaron diferencias significativas *inter-grupales*.

Tabla 4.3: Valores promedio y sus desviaciones estándar correspondientes al grosor y separación trabecular en mandíbula.

Grupos	Tb.Th (mm)	SD	Tb.Sp (mm)	SD
A	0.250	0.025	0.353	0.047
B	0.276	0.022	0.344	0.001
C	0.264	0.020	0.323	0.047

A continuación se muestra la Figura 4.25, presentándose el resultado de la binarización de la imagen de microCT en la ROI de la mandíbula, usando la herramienta de *Optimise Threshold* del *plugin* BoneJ.

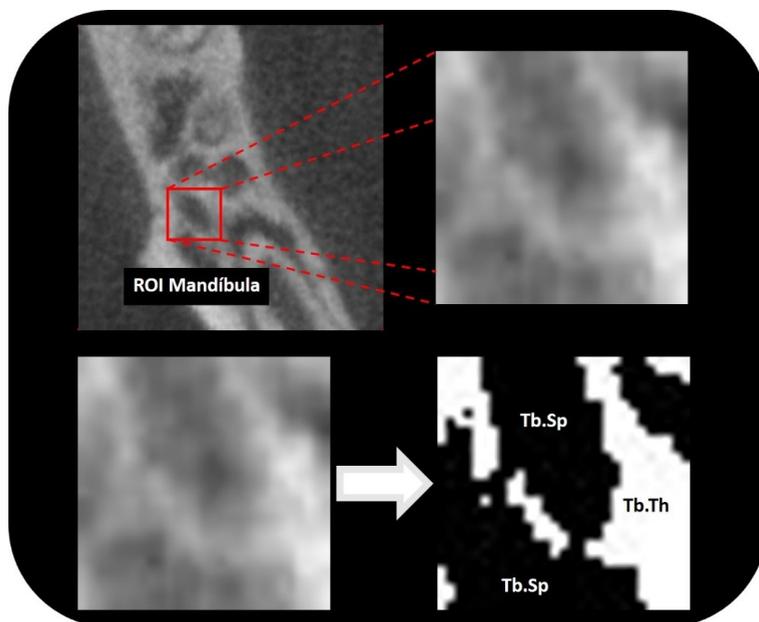


Figura 4.25: Imagen representativa de un *CT High* de mandíbula que muestra la comparación, en una respectiva proyección, entre la región de interés (ROI) con su respectiva binarización; mostrándose los sitios correspondientes al cálculo de Tb.Th y Tb.Sp.

A continuación se muestran los resultados correspondientes al grosor y separación trabecular (Tb.Th y Tb.Sp) en la cabeza de fémur, Figura 4.26, donde se presentaron diferencias (*inter-grupales*) estadísticamente significativas (grupo C vs A y B) asociados a los valores promedio del grosor trabecular (Tb.Th) calculados, con un valor de significancia de  $p < 0.05$ , los cuales se muestran en la Tabla 4.4.

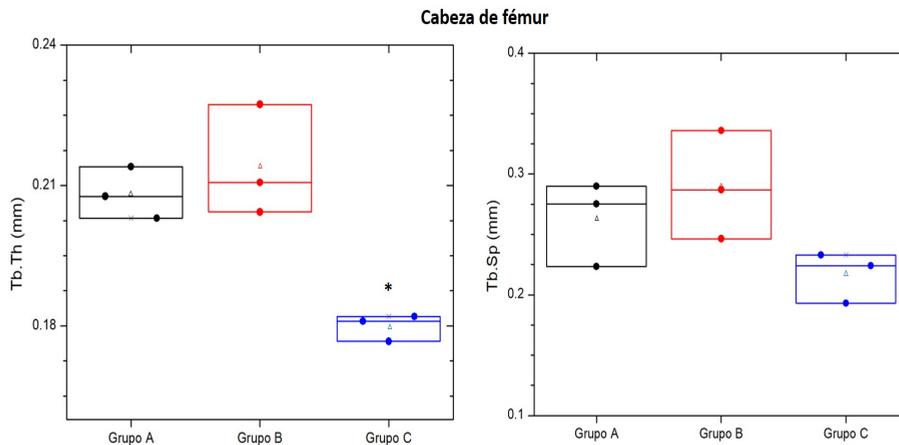


Figura 4.26: Imagen que muestra los resultados de grosor y separación trabecular (Tb.Th y Tb.Sp) en la cabeza de fémur para los tres grupos. El símbolo ( $\Delta$ ), dentro de los diagramas de caja, representa la media de la distribución de los datos y el asterisco (\*) representa las diferencias (*inter-grupales*) significativas con valor de  $p < 0.05$ .

Tabla 4.4: Valores promedio y sus desviaciones estándar correspondientes al grosor y separación trabecular en cabeza de fémur.

Grupos	Tb.Th (mm)	SD	Tb.Sp (mm)	SD
A	0.208	0.010	0.263	0.035
B	0.214	0.014	0.290	0.045
C	0.180	0.003	0.217	0.021

A continuación se muestra la Figura 4.27, presentándose el resultado de la binarización de la imagen de microCT en la ROI de la cabeza de fémur usando la herramienta de *Optimise Threshold* del *plugin* BoneJ.

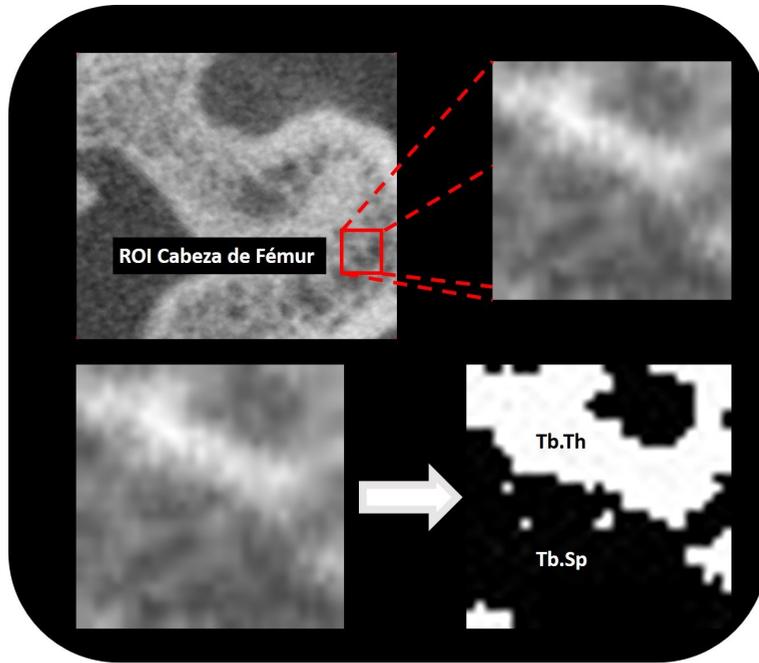


Figura 4.27: Imagen representativa de un *CT High* de cabeza de fémur que muestra la comparación, en una respectiva proyección, entre la región de interés con su respectiva binarización; mostrándose los sitios de cálculo de Tb.Th y Tb.Sp.

Por último, se muestran los resultados correspondientes al grosor y separación trabecular (Tb.Th y Tb.Sp) en la 5ta vértebra lumbar, Figura 4.28, donde no se observaron diferencias (*inter-grupales*) estadísticamente significativas asociadas con los valores promedio de grosor y separación trabeculares calculados, los cuales se muestran en la Tabla 4.5.

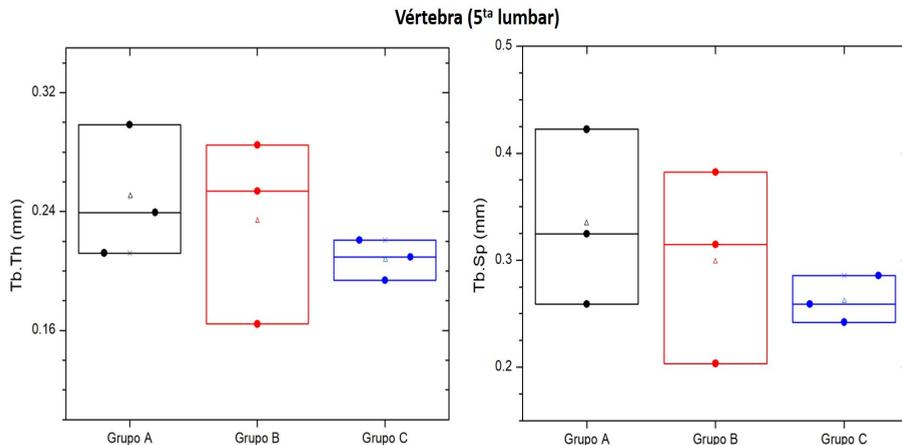


Figura 4.28: Imagen que muestra los resultados de grosor y separación trabecular (Tb.Th y Tb.Sp) en la 5ta vértebra lumbar para los tres grupos. El símbolo ( $\Delta$ ), dentro de los diagramas de caja, representa la media de la distribución de los datos.

Tabla 4.5: Valores promedio y desviaciones estándar correspondientes al grosor y separación trabecular en la 5ta vértebra lumbar

Grupos	Tb.Th (mm)	SD	Tb.Sp (mm)	SD
A	0.250	0.056	0.335	0.082
B	0.234	0.061	0.300	0.090
C	0.208	0.022	0.262	0.022

En la Figura 4.27 se presenta el resultado de la binarización de la imagen de microCT en la ROI de la 5ta vértebra lumbar, usando la herramienta de *Optimise Threshold* del *plugin BoneJ*.

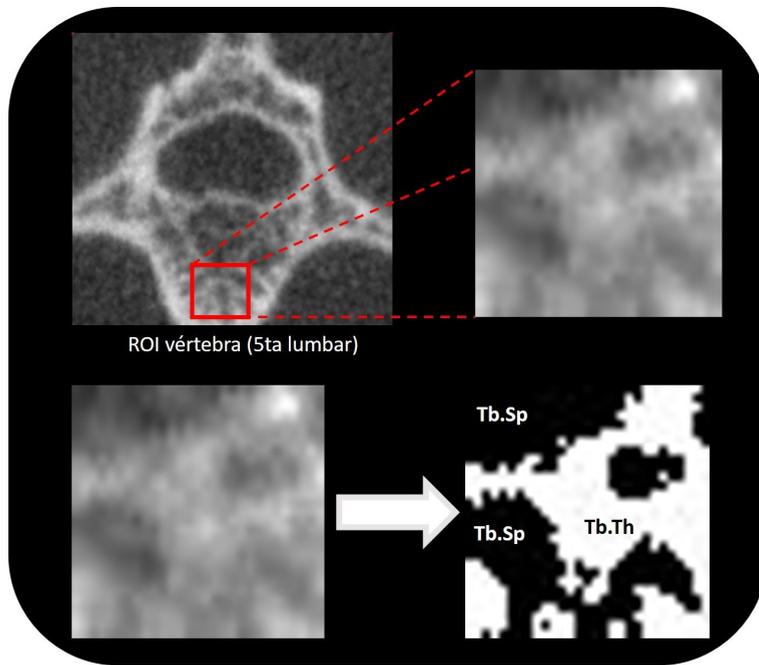


Figura 4.29: Imagen representativa de un *CT High* de la 5ta vértebra lumbar que muestra la comparación de una ROI en una proyección y su respectiva binarización, mostrándose los sitios de cálculo para Tb.Th y Tb.Sp.

# Capítulo 5

## Análisis y Discusión

---

### 5.1. Curvas patrón

En la Figura 4.2, se observó que para un valor de [HA] conocido se le asocian diferentes valores de pixel en las imágenes reconstruidas, relacionadas con la diferencia de energía correspondiente con los voltajes de 35 (LV) y 45 (HV) kVp, independientemente de las corrientes usadas en el tubo de rayos-X. Los valores de pixel en las imágenes adquiridas con 45 kVp son menores que los valores de pixel de las imágenes adquiridas con 35 kVp, teniendo una mayor atenuación debido al aumento en la probabilidad de interacción de la radiación. Cualquier valor de concentración de hidroxapatita [HA] que se quiera conocer, en función del valor de pixel que se mida en las imágenes de microCT a partir de esta calibración, es calculada considerando la corrección por atenuación dentro de las dimensiones equivalentes del maniquí, asociadas a las energías correspondientes con los voltajes de 35 y 45 kVp.

### 5.2. Cálculo de [HA] a partir de las imágenes de microCT

En la Figura 5.1 se muestra regiones de baja calcificación en las imágenes de cabeza de fémur en ratas del grupo A, resultando en valores

de [HA] menores en comparación con los grupos B y C. Esto se debe a que el crecimiento del fémur en ratas jóvenes no ha alcanzado una madurez que implique la total calcificación del hueso.



Figura 5.1: Imagen de microCT representativa de ratas del grupo A, que muestra las regiones de bajas calcificación en las zonas de cabeza de fémur. Imagen adquirida con las modalidades HD-HV (45kVp a 0.4 mA) [Fuente directa].

Por otro lado, en el grupo C se observó una disminución en los resultados asociados a los valores de [HA] en cabeza de fémur y la 5ta vértebra lumbar, ya que al adquirir las imágenes con diferentes energías (45 keV y 35 keV kV) la atenuación de la radiación en las ratas será mayor al haber un incremento en el tejido blando. En la Figura 5.3 se muestra el resultado del factor de atenuación correspondiente con las diferentes energías efectivas calculadas para los diferentes valores de kVp utilizados, se consideró un grosor del tejido blando variando de 0.5 cm hasta 12 cm y dejando fijo un valor de grosor de hueso cortical (0.5 cm). El factor de atenuación se calculó a partir de la expresión (5.1):

$$\ln \frac{I_0}{I(x)} = \mu_{adiposo} * x_{adiposo} + \mu_{hueso} * x_{hueso} \quad (5.1)$$

donde el primer miembro de la ecuación representa la fracción de atenuación entre la intensidad inicial y la intensidad transmitida del haz,  $\mu_{adiposo}$  y  $\mu_{hueso}$  son los coeficientes de atenuación lineal del tejido adi-

poso y el hueso,  $x_{adiposo}$  y  $x_{hueso}$  corresponden a sus respectivos grosores.

Debido a que el equipo de microCT posee un espectro polienergético de emisión de rayos-X, se calcularon los coeficientes lineales de atenuación, Figura 5.2, para tejido blando y hueso cortical ( $\mu_{adiposo}$  y  $\mu_{hueso}$ ) [NIST, 2016b], utilizando las energías efectivas ( $E_{eff}$ ) calculadas previamente para este equipo [Rueda, 2017]:

$$E_{eff} \text{ (HD-HV 45 kVp a 0.4 mA)} = 16.98 \pm 1.30 \text{ keV};$$

$$E_{eff} \text{ (LD-HV 45 kVp a 0.2 mA)} = 16.19 \pm 0.80 \text{ keV};$$

$$E_{eff} \text{ (HD-LV 35 kVp a 0.4 mA)} = 15.17 \pm 1.15 \text{ keV};$$

$$E_{eff} \text{ (LD-LV 35 kVp a 0.2 mA)} = 13.89 \pm 0.82 \text{ keV},$$

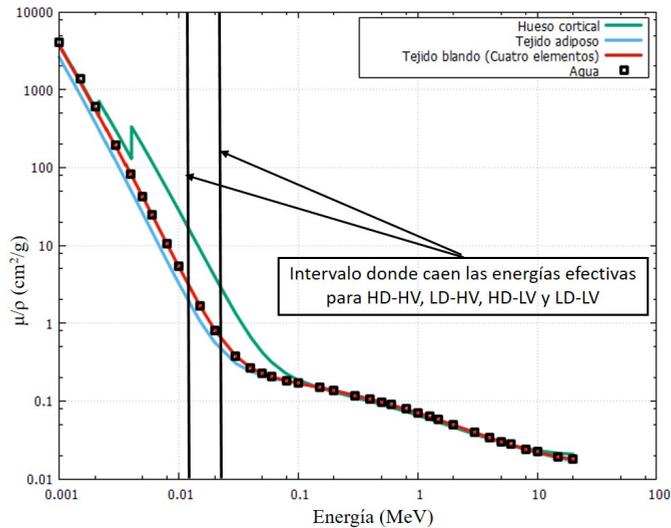


Figura 5.2: Imagen que muestra los coeficientes lineales de atenuación másicos para hueso cortical; tejido adiposo; tejido adiposo compuesto por cuatro elementos y agua en función de la energía para el cálculo del factor de atenuación [Fuente directa].

La Figura 5.3 muestra la razón de cambio del factor de atenuación asociado al aumento del tejido adiposo en las ratas. Se determinó que este

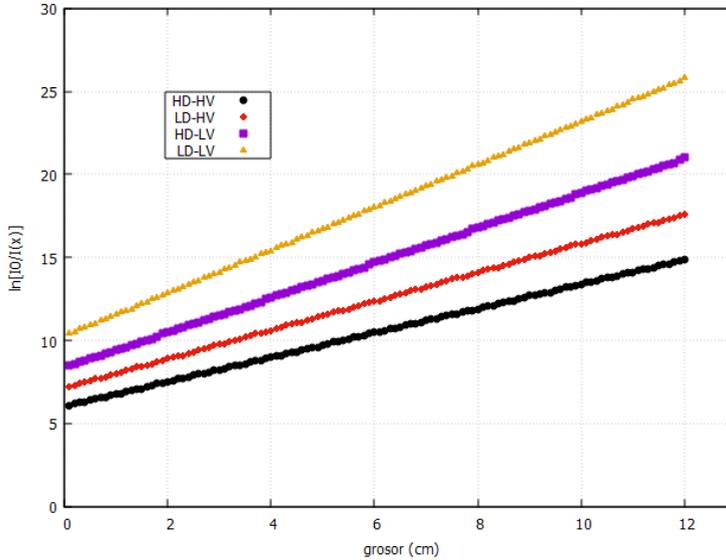


Figura 5.3: Imagen que muestra el cálculo del factor de atenuación para las modalidades de adquisición (HD-HV; LD-HV; HD-LV y LD-LV), fijando el grosor de hueso cortical ( $x_{hueso} = 0.5\text{cm}$ ) y variando el grosor de tejido adiposo a partir de 0.5 cm hasta 12 cm [Fuente Directa].

valor, para las diferentes modalidades de adquisición (HD-HV/LD-HV, HDHV/HD-LV y HD-HV/LD-LV), corresponde al 85 %, 72 %, 59 %, respectivamente. Se observó que a partir de un cierto grosor de las ratas, el cálculo de la [HA] utilizando el maniquí de referencia no alcanza a compensar la corrección por atenuación producida en las adquisiciones de las imágenes con diferentes valores de kilovoltajes (35 y 45 kV).

Por otro lado, en la Figura 5.4 se grafica las secciones eficaces de Fotoeléctrico ( $\tau$ ) y Compton ( $\sigma$ ) en un rango de energías de 10 keV a 1 MeV, mostrando el comportamiento de la interacción de la radiación, ya sea por absorción o dispersión, para tejido blando de cuatro elementos [ICRU Four-Components (NIST)], hueso cortical; músculo esquelético; tejido adiposo y sangre [ICRU-44 (NIST)] [NIST, 2016a].

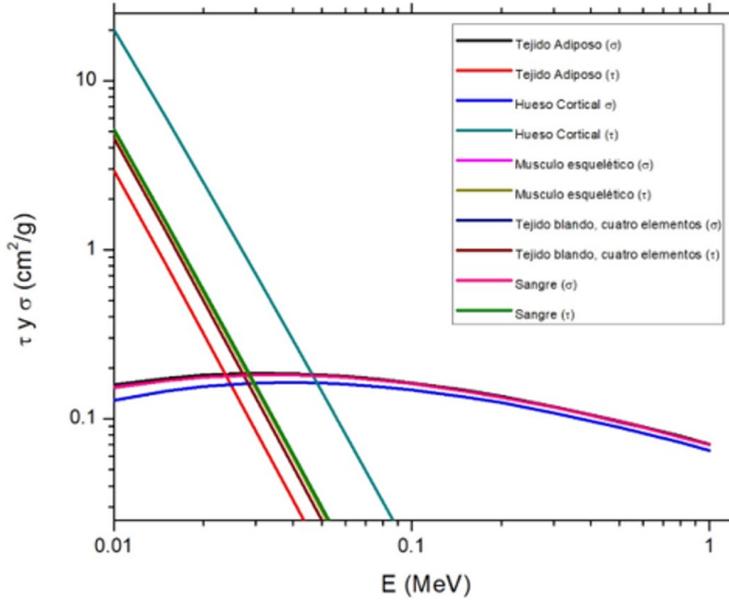


Figura 5.4: Imagen representativa de las secciones eficaces para el efecto Fotoeléctrico ( $\tau$ ) y Compton ( $\sigma$ ) en el rango de energías de 10 keV a 1 MeV para los componentes asociados al tejido blando de cuatro elementos, hueso cortical, músculo esquelético, tejido adiposo y sangre [Fuente Directa].

Se observa que en el rango de energías efectivas para los diferentes parámetros de adquisición de HD-HV, LD-HV, HD-LV y LD-LV, la radiación es absorbida a través del cuerpo de las ratas mayoritariamente en los huesos ( $Z_{eff}(HA) = 16.11$  [Saito and Sagara, 2017]), teniendo poca contribución del efecto Compton asociada con la radiación dispersa.

### 5.3. Análisis de la micro-arquitectura ósea en hueso trabecular

#### 5.3.1. Análisis de la calidad de la imagen a partir del CNR

A partir de la Figura 5.2 se observa que entre menor sea la energía de los rayos-X la probabilidad de interacción será mayor que en el caso de altas energías, ésto dentro del rango de las energías efectivas correspondientes con los diferentes parámetros de adquisición utilizados en este trabajo. El valor del contraste del objeto de estudio en las imágenes reconstruidas será mayor al realizar las adquisiciones en bajas energías, ya que habrá una mayor atenuación al tener una probabilidad de interacción alta. Sin embargo, el contraste puede disminuir debido a la presencia del ruido en las imágenes de microCT, el cual es definido como la desviación estándar de una cierta función aleatoria  $F(N)$  como se muestra en la ecuación (5.2), [Berumen-Murillo, 2016]:

$$\sigma(F(N)) = \sqrt{\text{var}[F(N)]} = \frac{1}{\sqrt{N}} \quad (5.2)$$

donde  $N$  representa el número de fotones que inciden sobre el detector de rayos-X y  $\text{var}$  representa la varianza de la función aleatoria  $F(N)$ . a partir de esta expresión se observa que el ruido en las imágenes reconstruidas aumentará al disminuir el número de fotones detectados.

En el caso de las imágenes adquiridas usando 45 kVp a 0.4 mA (HD-HV) se obtuvo un valor mayor en el cálculo del CNR, en comparación con los demás parámetros (LD-HV, HD-LV, LD-LV), esto debido a que los rayos-X son más penetrantes al atravesar el hueso y el tejido blando, detectando una cantidad mayor de rayos-X transmitidos al ser menos atenuados por el cuerpo del animal, más aún, en la Figura 5.5 se muestran los espectros filtrados a la salida del tubo de rayos-X para los kilovoltajes de 45 y 35 kVp.

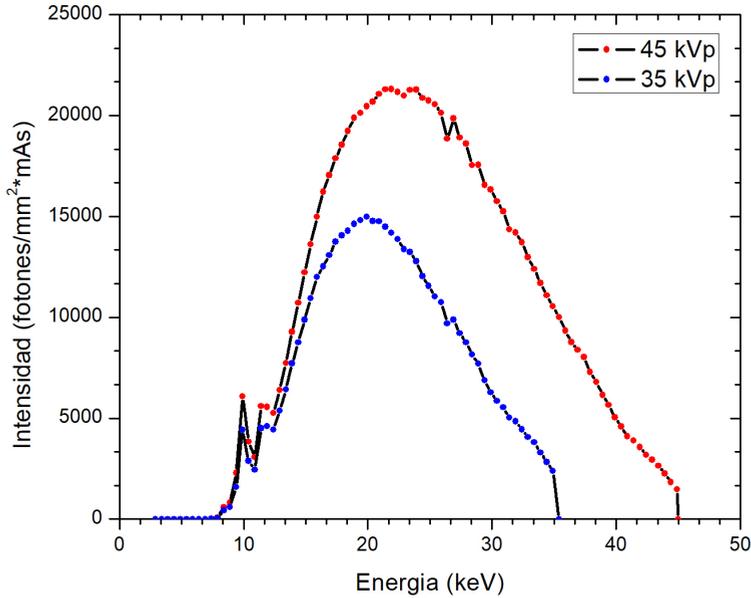


Figura 5.5: Simulación de los espectros de rayos-X correspondientes a los kilovoltajes de 35 y 45 kVp del equipo de microCT, filtrados por 0.5mm de Al en la salida del tubo de rayos-X, tomado y editado de [Rueda, 2017].

Con esto se observa que al adquirir las imágenes a 35 kVp la intensidad de los rayos-X es menor comparada con la intensidad de 45 kVp, por lo que al ser atenuados en la rata no llegan suficientes fotones al detector, aumentando el ruido en las imágenes reconstruidas (ecuación (5.2)). En el apéndice F. se muestran las gráficas asociadas al comportamiento del contraste y el ruido en las imágenes reconstruidas para los diferentes huesos de cada grupo.

### 5.3.2. Análisis del grosor y separación trabeculares

La principal limitante que se presentó en esta sección fue la resolución espacial en las imágenes reconstruidas mediante el algoritmo de *CT High*, con tamaño de pixel de 0.035 mm, dando como resultado una

sobre-estimación en los valores de Tb.Th y Tb.Sp de las trabéculas al realizar la binarización de las imágenes.

Bouxsein *et al.*, [Bouxsein et al., 2010] menciona que la segmentación de la imagen debe realizarse comparando una proyección (si no es que todas) de la imagen del estudio de microCT con su correspondiente imagen ya segmentada, asegurando con esto que el proceso de binarización extraiga una buena representación de la estructura ósea a analizar. Si la imagen no está binarizada correctamente se pueden obtener errores de interpretación en los valores de Tb.Th y Tb.Sp, teniendo un sobre-engrosamiento de las estructuras trabeculares. Langton [Langton and Njeh, 2016] menciona que una binarización global aplica el mismo valor umbral a todos los cortes de la imagen de microCT, funcionando de mejor manera en imágenes adquiridas con alta resolución y alto contraste, tal es el caso de la binarización usando el *Optimize Threshold* del BoneJ. En este trabajo, las imágenes de microCT no fueron adquiridas en alta resolución (1000 proyecciones), fueron adquiridas a 600 proyecciones con el fin de disminuir el tiempo de exposición de los rayos-X sobre los animales. Trabajos previos, realizados con este equipo de microCT, reportan dosis impartida sobre la superficie de ratones (BALB/c) con diferentes tiempos de exposición [Rueda, 2017]. Realizando adquisiciones a 400, 600 y 1000 proyecciones (Standar, Best y High Resolution, respectivamente), adquiriendo las imágenes con los mismos parámetros de corriente y voltajes utilizados en este trabajo.

En la evaluación de micro-arquitectura ósea, Feldkamp *et al.*, [Feldkamp et al., 1989] realizaron estudios en muestras pequeñas de trabéculas obtenidas de biopsias de tibias y vértebras de humanos con un tamaño de voxel en las imágenes de 60  $\mu\text{m}$ . Por otro lado, Langton et al. han reportado [Langton and Njeh, 2016] que una resolución de 60  $\mu\text{m}$  de tamaño de voxel en las imágenes reconstruidas es aceptable para la evaluación de grosores y separaciones trabeculares en humanos, siendo a la vez ineficiente en estudios que involucren modelos de animales pequeños (ratas y ratones). Otros investigadores [Kinney et al., 1995], [Bouxsein et al., 2010] han reportado que los valores promedio de grosor y separación trabecular en animales pequeños son aproximadamente del

orden de  $50 \mu\text{m}$  y  $150 \mu\text{m}$ .

Es importante hacer notar que antes de realizar cualquier proceso de binarización en las imágenes, se necesita realizar las adquisiciones con la máxima resolución espacial, asociada con un valor de voxel/pixel menor en comparación con las dimensiones del objeto al que se quiera realizar los estudios de microCT. Esto permite garantizar mediciones cuantitativas de los valores de grosor y separación trabeculares, evitando así una sobre-estimación de estos valores a la hora de efectuar el análisis.

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, se hizo evidente la limitante resolución espacial que presentaban las imágenes de microCT con un tamaño de voxel/pixel de  $0.035 \text{ mm}$  en *CT High* del equipo Albira *ARS*, la cual afectó los análisis de micro-arquitectura ósea. Por otro lado, si se quiere realizar adquisiciones de microCT *in-vivo* que involucren reconstrucciones de *CT High* para visualizar estructuras óseas en ratas, se recomienda utilizar los parámetros de adquisición de HD-HV ( $0.4 \text{ mA}$  a  $45 \text{ kVp}$ ), obteniendo con esta modalidad valores mayores de CNR en las imágenes reconstruidas.

# Capítulo 6

## Resumen y Conclusiones

---

### Resumen de resultados

- Se obtuvo una respuesta lineal del equipo en el cálculo de las curvas de referencia de concentración de hidroxiapatita [HA] en el rango de 0, 50, 250 y 750 mg/cc.
- En el cálculo de la [HA], para el caso de cabeza de fémur y la 5ta vértebra lumbar se observaron diferencias intra-grupales al Grupo C (pesos  $\geq 400$  g), debido al endurecimiento del haz al adquirir las imágenes en baja energía (LV-35kVp).
- Se observó que los parámetros de adquisición de las imágenes de microCT en HD-HV (45 kVp @ 0.4 mA) el valor de CNR es mayor en las imágenes reconstruida, visualizando mejor el hueso trabecular.
- Las imágenes al ser reconstruidas con un tamaño de pixel de 0.035 mm resultó en una sobre-estimación de los valores de grosor y separación trabeculares (Tb.Th y Tb.Sp) asociados con una mala segmentación en las imágenes.

# Conclusión General

El equipo de microCT *Albira ARS* permite realizar estudios de cuantificación de concentración de hidroxapatita en tejido óseo. Sin embargo, no es adecuado para realizar estudios cuantitativos *in-vivo* de microarquitectura ósea de los parámetros morfométricos de grosor y separación trabecular (Tb.Th y Tb.Sp) debido a su limitada resolución espacial en las imágenes reconstruidas con tamaños de pixel de  $35\ \mu\text{m}$ . Por otro lado, la evaluación cualitativa de las imágenes, de estudios *in-vivo* en ratas *Wistar*, indicó que el tejido trabecular puede ser visualizado de mejor manera al realizar las adquisiciones con alta energía y corriente (45 kVp a 0.4 mA).

# Apéndice

## A.

### A.1 Imagen por la técnica de Tomografía y micro-Tomografía Computarizada

En la actualidad el diagnóstico a partir de imágenes médicas ha tenido un desarrollo tecnológico de gran demanda gracias a las aportaciones de los nuevos conocimientos científicos del área, desde el descubrimiento de los rayos-X en 1895 por Wilhelm Roentgen y la creación de la primera radiografía de mano; siendo la primera imagen médica anatómica humana.

En la imagen médica del cuerpo humano se requiere un cierto tipo de energía capaz de penetrar a través de los diferentes tejidos que lo forman; cada uno con distintas densidades. Es por ello que para diagnóstico se utiliza radiación electromagnética en forma de fotones, las técnicas que utilizan este principio son los rayos-X ya sea para adquirir una radiografía o una Tomografía Computarizada (CT, por sus siglas en inglés).

La energía que es requerida para generar imágenes médicas no solamente se espera que penetre en los tejidos humanos, si no que a la vez exista interacción con éstos. No se podrá generar imagen alguna al no presentarse dichas interacciones; obteniendo así información no útil respecto a la anatomía interna de la parte del cuerpo que se quiera estudiar. La imagen médica utilizando la técnica de CT estuvo clínicamente disponible a partir de 1970 y fue la primera técnica que requiere el uso de una

---

computadora para visualizar la imagen, es por ello que se considera una técnica no invasiva.

Los equipos de CT constan de una fuente generadora de rayos-X y un sistema de detección basado en la transmisión de los rayos-X a través del objeto de estudio. Las imágenes hechas por CT son producidas al momento que los rayos-X atraviesan alguna cierta parte del cuerpo en ángulos diferentes al rotar el generador junto con el detector alrededor del objeto de estudio como se muestra en la Figura A.1.

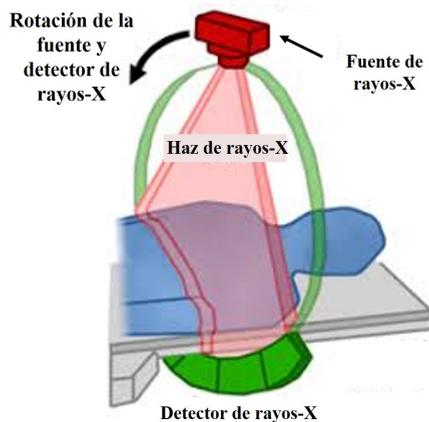


Figura A.1: Características de la técnica de imagen por CT [FDA, 2018].

Los estudios por CT constan de varios cortes diferentes e individuales del sitio de interés; obteniendo como resultado una imagen por medio de un algoritmo matemático de reconstrucción a partir de las interacciones recolectadas por el sistema de detección. La ventaja del CT es la habilidad que tiene en reconstruir imágenes digitales anatómicas en tres dimensiones, las cuales se presentan en tres cortes o planos anatómicos diferentes llamados coronal o frontal; axial o transversal y sagital, Figura A.2.

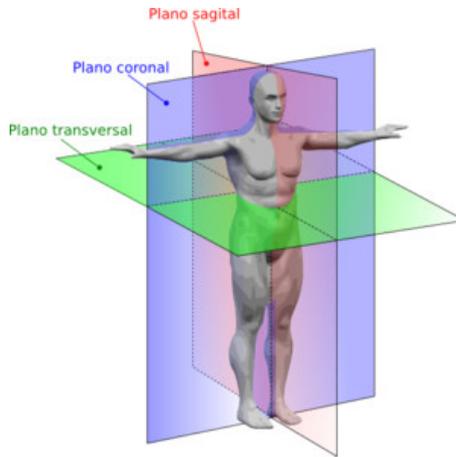


Figura A.2: Planos anatómicos [medicinaedith, 2016].

Los equipos de CT modernos pueden adquirir imágenes con un tamaño de corte de 0.50 a 0.60 mm de espesor a lo largo de 50 cm en 5 segundos. Esta tecnología puede detectar anomalías en el cuerpo humano asociadas a masas tumorales; fracturas de huesos; hematomas subdurales; aneurismas entre otras patologías [Bushberg and Boone, 2011c].

Además, esta técnica proporciona un mayor contraste en hueso que en tejido suave, por ello han aparecido nuevas mejoras que ayuden a estudiar de mejor manera la estructura ósea. En los años 80's la aplicación de la tecnología del CT fue extendida del área clínica al área de la investigación. El primer sistema de microCT fue concebido y construido por Jim Elliott, [Microctworld, 2018]. Las primeras imágenes digitales mediante estudios de microCT fueron hechas por [Elliott JC and Dover SD, X-ray microtomography. J. Microscopy, 1982, 126:211-213.]; siendo la primera publicación que involucraba el uso de un equipo de microCT con un sistema de detección de  $50 \mu\text{m}$ , reconstruyendo cortes de pequeños caracoles tropicales. Por otro lado, Feldkamp *et.al* fueron los primeros en construir un equipo de micro CT con el propósito para la evaluación de micro estructura ósea en tres dimensiones de hueso trabecular en ratas de laboratorio y otro tipo de animales pequeños [Feldkamp et al., 1989].

---

Con la presentación de los equipos comerciales de microCT en 1994 [Stauber and Müller, 2008], [Rüeggsegger et al., 1996]; esta técnica comenzó a ser un estándar en las investigaciones relacionadas con estructura ósea.

Hoy en día los equipos de microCT proporcionan una gama amplia en técnicas de adquisición de imágenes dirigidas a muchas aplicaciones, las cuales van desde mediciones *in-vivo* o *ex-vivo*; hasta la evaluación de tejido óseo en escalas micrométricas basados en estudios de animales pequeños de experimentación. Al igual que el CT, el microCT consta de una fuente emisora de rayos-X y un sistema de detección; detectando estructuras en el rango de escalas micrométricas debido a la diferencia en las dimensiones que presentan las muestras de estudio, Figura A.3.

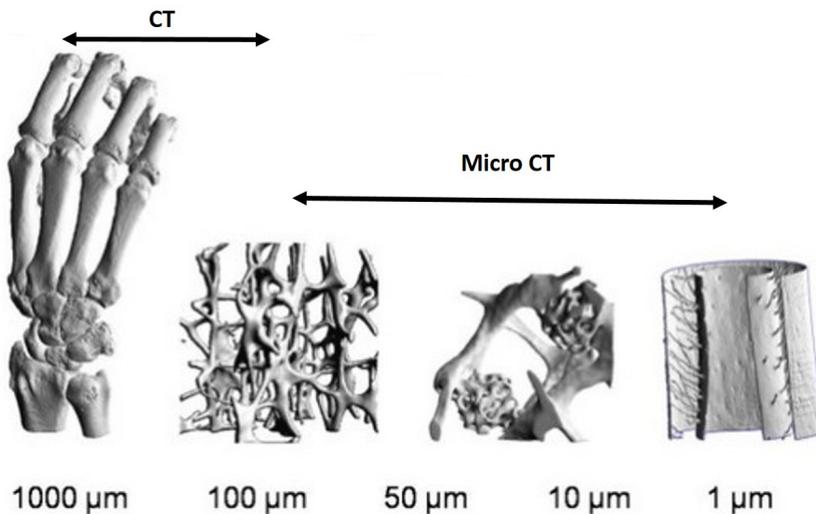


Figura A.3: Imagen representativa que ilustra el rango en las distintas escalas de detección de un CT y un microCT. Izquierda a derecha: mano de humano, hueso trabecular de humano y huesos de roedores. Tomado y editado de [B Cube AG, Switzerland, 2016].

---

## A.2 Descripción del sistema de los equipos de microCT

### A.2.1 Sistemas de escaneo

El funcionamiento del sistema de escaneo del microCT se clasifica en dos categorías como se observa en la Figura A.4. La primera está basada en la rotación de la camilla, donde el ruedor gira en la camilla mientras la fuente y el sistema de detección de rayos-X permanecen fijos; adquiriendo la información a través de diferentes proyecciones a distintos ángulos. Los equipos de microCT que adquieren usando éste proceso son equipos de primera generación. En la segunda, el animal se recuesta sobre una camilla fija; mientras que la fuente y el sistema de detección rotan alrededor del animal, adquiriendo de igual manera la información a través de diferentes proyecciones a distintos ángulos. Los equipos que usan éste proceso son equipos de tercera generación; perteneciendo la gran mayoría de los equipos microCT comerciales a ésta generación.

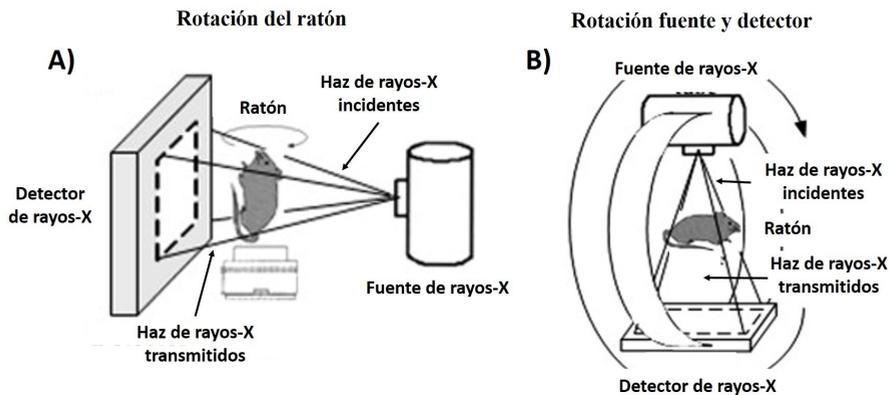


Figura A.4: Sistema de escaneo de equipos de microCT . A) primera generación y B) tercera generación. Tomado y modificado de[Li et al., 2008].

Li *et. al* menciona que los equipos de tercera generación pueden garantizar como resultado una imagen de alta resolución espacial comparado con los equipos de primera generación ya que el animal puede permanecer inmóvil; reduciendo de manera significativa el movimiento *per-se*

---

asociado al tejido blando del animal durante adquisiciones de tiempos largos [Li et al., 2008] .

### A.3 Ventajas en el uso de equipos de microCT

Los sistemas de detección de los equipos de micro CT pueden detectar estructuras del orden de alcanzan micrómetros ( $\mu\text{m}$ ), siendo suficiente para la visualización y estudio de estructuras trabeculares en huesos de animales pequeños con espesores aproximadamente de 30 a 50  $\mu\text{m}$  [Bouxsein et al., 2010].

Las ventajas que se tienen al usar ésta técnica de imagen digital al realizar estudios con estructura ósea son:

- Es una técnica no invasiva.
- Permite hacer cuantificaciones directas en imágenes tridimensionales de morfología trabecular; tales como su grosor y separación.
- Se puede seleccionar y analizar a la vez un volumen de interés significativamente grande en comparación con modelos histológicos bidimensionales.
- Las cuantificaciones se pueden realizar con un rendimiento mucho más rápido que en un análisis histológico de los parámetros morfométricos; utilizando huesos no descalcificados o a partir de estudios *in-vivo*.
- La evaluación de la morfología al reutilizar los objetos de estudio para otros ensayos posteriores.

### A.4 Aplicaciones de un equipo de microCT

Existen diferentes estudios de los cuales se pueden hacer uso de imágenes por microCT, Clark et. al mencionan algunas aplicaciones usando equipos microCT en el área de investigación [Clark and Badaea, 2014].

---

## **Imágenes de Hueso**

Se han realizado estudios de hueso en roedores debido a su alta resolución espacial y alto contraste en imágenes de tejidos calcificados, más aún la creación del microCT fue debida a estudios referentes a micro-arquitectura ósea y densidad ósea.

## **Imagen Pulmonar**

La imagen pulmonar de animales pequeños ha sido un desafío debido a su tamaño y a su rápido movimiento respiratorio. A partir de ésta se pueden estudiar diferentes modelos de enfermedades respiratorias tales como enfisema y fibrosis pulmonar.

## **Imágenes de Corazón**

Estos estudios han servido para visualizar la circulación coronaria en tres dimensiones en los corazones de roedores jóvenes y envejecidos; usando materiales radio-opacos. En estos estudios se requiere el uso de agentes de medio de contraste para poder discriminar entre el miocardio y la sangre.

## **Imágenes de Tumores**

Para estos estudios el microCT ha sido de gran ayuda para la detección y seguimiento de masas tumorales, así como la obtención de imágenes de angiogénesis tumoral, las cuales requieren el uso de medios de contraste para la visualización de la vasculatura tumoral.

## **Imágenes por medio de equipos trimodales microPET/SPECT/CT**

Otra característica importante que complementa los estudios por microCT es al juntar ésta con otras técnicas de imagen molecular como el caso de la tomografía por emisión de positrones (PET) o la tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT); analizando imágenes tridimensionales combinadas o fusionadas de manera simultánea obteniendo información estructural y metabólica a la vez.

---

## B.

### B.1 Producción de rayos-X

Los rayos-X son producidos por la interacción de partículas cargadas con la materia, convirtiendo parte de su energía cinética en radiación electromagnética (fotones). El dispositivo que produce este tipo de radiación en el rango de energías usadas para diagnóstico es el tubo de rayos-X, Figura B.1; éste consta de electrodos que producen electrones (cátodo) y un blanco (ánodo) de cierto material, principalmente Tungsteno (W;  $Z=74$ ). Estos están situados dentro de una cubierta de metal o vidrio sellada al vacío. El tubo consta a la vez de una fuente externa de alto voltaje que acelera las partículas cargadas hacia el cátodo, estas componentes funcionan en conjunto para crear un haz de rayos-X con una cierta intensidad y penetrabilidad [Bushberg and Boone, 2011c].

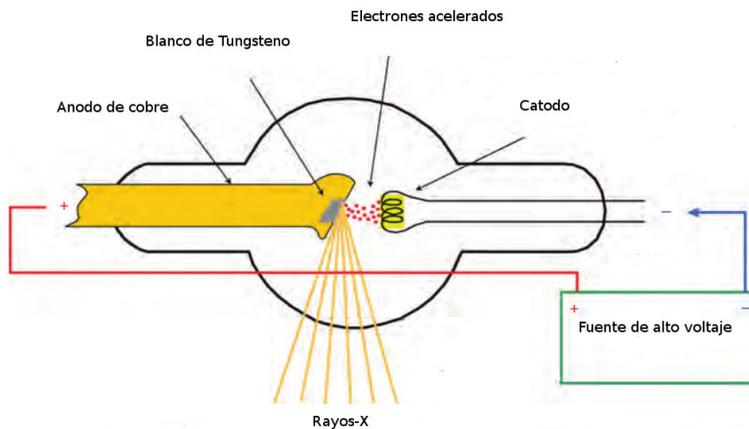


Figura B.1: Estructura interna de un tubo de rayos-X. Tomado y modificado de [Bushberg and Boone, 2011c].

---

## B.2 Tipos de rayos-X

### Rayos-X de frenado (Bremsstrahlung)

La palabra Bremsstrahlung viene del alemán bremsen (frenar) y strahlung (radiación); radiación de frenado. Los electrones producidos en el cátodo son acelerados hacia el ánodo por medio de una diferencia de potencial; adquiriendo una energía cinética igual al producto del valor de su carga eléctrica y el potencial de aceleración. Una pequeña fracción de los electrones inciden dentro de las proximidades de los átomos del ánodo sintiendo la presencia de fuerzas Coulombianas; atrayendo a los electrones cambiando su trayectoria y siendo desacelerándolos de forma abrupta, produciendo una disminución en su energía cinética al transformarla en radiación electromagnética en forma de fotones de frenado (Bremsstrahlung) [Bushberg and Boone, 2011c].

La cantidad de energía perdida por los electrones y por lo tanto la energía de los rayos-X resultantes son determinadas por el parámetro de impacto entre los electrones incidentes y los núcleos atómicos del ánodo, debido a que la fuerza Coulombiana es proporcional al inverso del cuadrado de la distancia. En la Figura B.2 se muestra un ejemplo de la energía resultante de los rayos-X de frenado al variar el parámetro de impacto entre los electrones incidentes sobre los átomos del ánodo [Bushberg and Boone, 2011c].

Entre más cercana sea la interacción entre los electrones y los átomos del material del ánodo los rayos-X de frenado resultaran con mayor energía. Aproximadamente el 3% de los electrones acelerados producirán radiación de frenado, el resto transferirá su energía al ánodo disipándose en calor.

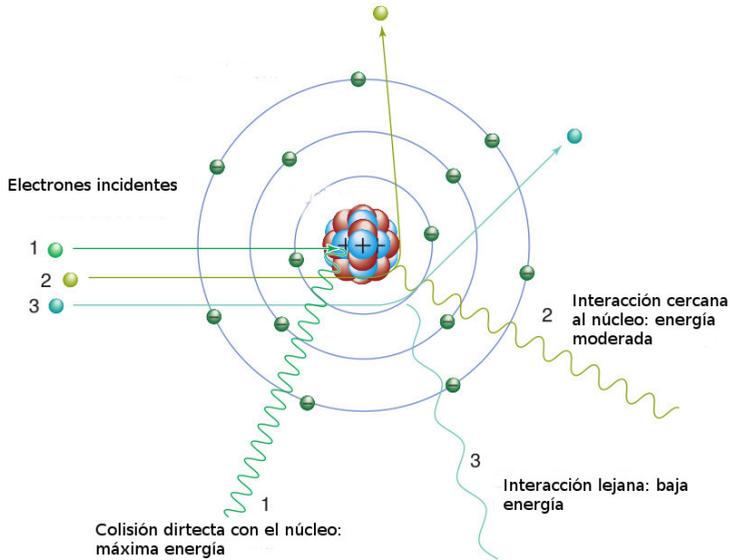


Figura B.2: Producción de rayos-X de frenado (Breemstrahlung). Si el parámetro de impacto es mayor que el radio nuclear, resultarán fotones de frenado de baja energía (3). A una distancia más cercana del núcleo atómico (2) la fuerza Coulombiana será más fuerte causando una mayor desaceleración en los electrones, produciendo fotones de mayor energía. Si se llegase a tratar de un impacto directo con el núcleo atómico (1); toda la pérdida en la energía cinética del electrón resultará en fotones de los más energéticos. Tomado y modificado de [Bushberg and Boone, 2011c].

## Espectro de Bremsstrahlung

El espectro de Bremsstrahlung representa la probabilidad de distribución de los rayos-X de frenado en función de su energía (keV). En la Figura B.3 se muestra un ejemplo de espectro de Bremsstrahlung generado con una energía máxima de 90 keV. El espectro no filtrado muestra una relación lineal inversa entre el número de fotones producidos (intensidad relativa) en función de la energía máxima, determinada por el voltaje de aceleración (kVp) aplicado al tubo de rayos-X, mientras que el espectro filtrado elimina los rayos-X de bajas energías siendo la

---

intensidad relativa aumentada a un valor aproximadamente un tercio de la energía máxima.

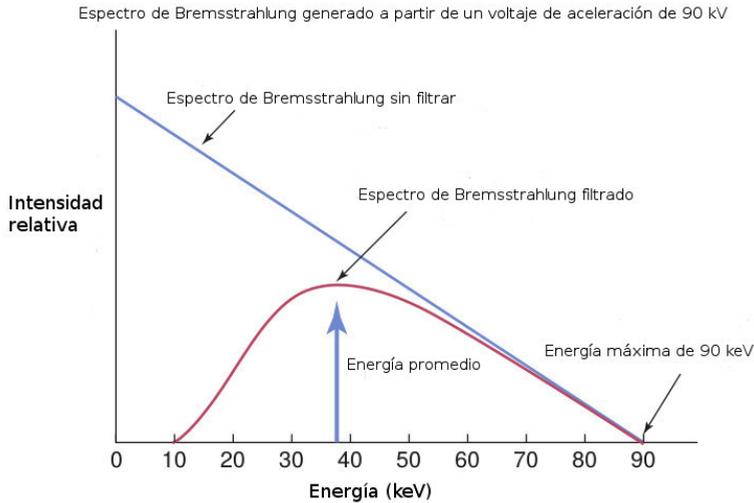


Figura B.3: Espectro de rayos-X de frenado. Tomado y modificado de [Bushberg and Boone, 2011c].

## Rayos-X Característicos

Se llaman característicos ya que son propios de cada elemento químico, por lo que su producción depende del material con que esté hecho el blanco del ánodo y de la energía adquirida por los electrones a partir del voltaje aplicado al tubo de rayos-X. Cada elemento químico posee un determinado número de electrones distribuidos en capas electrónicas (K, L, M, etc), las cuales poseen una cierta energía de ligadura (BE, por sus siglas en inglés) propia en cada capa. Las capas que poseen mayor energía de ligadura corresponden a las más cercanas al núcleo atómico siendo la capa K la más energética [Bushberg and Boone, 2011c].

Este tipo de rayos-X se produce cuando los electrones al ser acelerados a través del tubo de rayos-X inciden sobre el blanco; interaccionando

---

sobre las capas electrónicas de los átomos. Si la energía de un electrón supera el valor de la energía de ligadura propia de cada capa electrónica, se logrará arrancar mediante un proceso de colisión un electrón ligado a dicha capa, produciéndose una vacancia. Dicha vacancia se llenará con otro electrón proveniente de capas externas; esta transición electrónica dará como resultado la emisión de radiación electromagnética en forma de un fotón llamado fotón característico, Figura B.4. La energía a la cual salen emitidos estos fotones será la diferencia entre los valores de las energías de ligadura de las cuales se produjo la transición electrónica [Bushberg and Boone, 2011c].

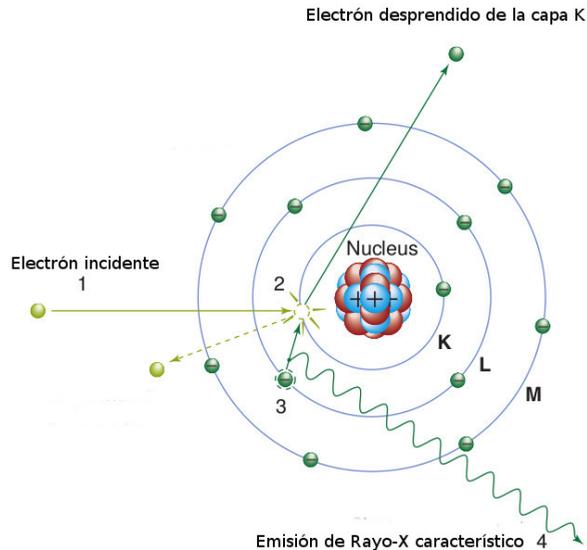


Figura B.4: El electrón al ser acelerado incide sobre las capas electrónicas de los átomos del ánodo (1). Si su energía es mayor que la energía de ligadura de las capas electrónicas, al colisionar con un electrón atómico de alguna cierta capa lo arrancará dejando una vacancia (2). Para llenar dicha vacancia se producirá una transición electrónica entre capas adyacentes o no adyacentes (3). Dicha transición resultará en la emisión de un rayo-X característico (4). Tomado y modificado de [Bushberg and Boone, 2011c].

---

Las transiciones electrónicas pueden producirse de capas adyacentes o no adyacentes, teniendo como resultado la producción de picos característicos de diferentes energías superpuestos en el espectro de Bremsstrahlung como se muestra en la Figura B.5.

Para referirse cuando se realizó una transición electrónica de capas adyacentes o no adyacentes se usa como notación  $\alpha$  y  $\beta$  respectivamente. Por ejemplo cuando se produce una transición de la capa L a la capa K, se designa como un rayo-X característico  $K_\alpha$  y  $K_\beta$ , cuando la transición se realiza de las capas M, N u O hacia la capa K. En términos de energía, las transiciones  $K_\beta$  son más energéticas que las  $K_\alpha$  debido a los valores que presentan sus energías de ligadura [Bushberg and Boone, 2011c].

## Espectro de emisión de Rayos-X

El espectro de rayos-X es la superposición de los picos característicos con el espectro de Bremsstrahlung filtrado como se muestra en la Figura B.5.

La energía en el espectro de rayos-X está asociada con la diferencia de potencial que acelerará los electrones producidos en el cátodo. La intensidad relativa se asocia a la probabilidad de producción de rayos-X; refiriéndose a la corriente producida por el flujo de electrones incidiendo sobre el ánodo. Si la corriente aumenta habrá una mayor afluencia de electrones interaccionando en el ánodo y la producción de rayos-X será mayor, lo que implicará que la intensidad relativa se verá incrementada [Bushberg and Boone, 2011c].

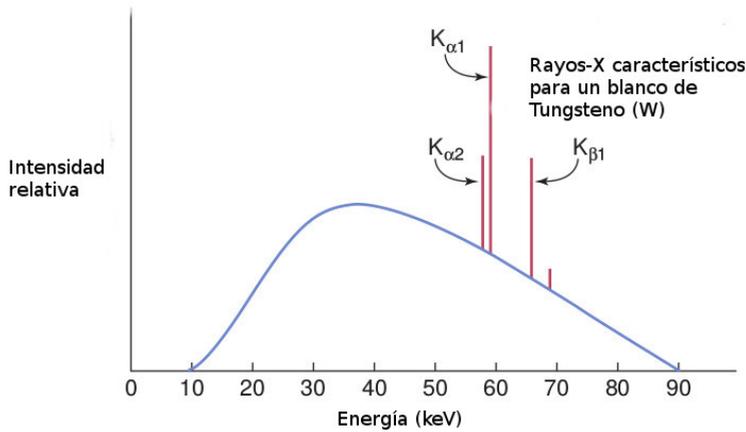


Figura B.5: Ejemplo de un espectro de rayos-X monoenergético filtrado con ánodo de Tungsteno y energía máxima de 90 keV. Los picos característicos aparecen a ciertas energías características asociadas al Tungsteno, visualizando las transiciones  $K_{\alpha}$  y  $K_{\beta}$ . Tomado y modificado de [Bushberg and Boone, 2011c].

### B.3 Algunos efectos físicos que modifican el espectro de emisión de rayos-X

El espectro de emisión del tubo de rayos-X es descrito en términos de la cantidad; calidad y exposición. Con calidad se refiere a la penetrabilidad del haz, con cantidad al número de fotones que componen el haz y con exposición a la proporcionalidad en la fluencia energética del haz. Algunos factores que afectan el espectro de rayos-X son [Bushberg and Boone, 2011c]:

- Material del ánodo:** Éste afecta la eficiencia en la producción de Bremsstrahlung siendo proporcional al número atómico ( $Z$ ); ya que los electrones incidentes presentan una mayor interacción radiactiva con materiales de  $Z$  alta. Por lo que, el material que compone al ánodo afecta en la cantidad de fotones producidos por Bremsstrahlung y en la calidad de la radiación característica.

- 
- **Voltaje (kV):** Determina la energía máxima en el espectro de Breemstralung; afectando la calidad del haz. La eficiencia en la producción de rayos-X está directamente relacionada con el voltaje aplicado al tubo. Dentro del rango de energías usadas para diagnóstico; la exposición es aproximadamente proporcional al cuadrado del kilovoltaje (kV), como se muestra en la ecuación (B.1):

$$E \propto (kV)^2 \quad (\text{B.1})$$

Al haber un incremento en el kVp habrá un incremento en la producción de rayos-X así como en la calidad y cantidad del haz. Por ello, al haber un cambio en el voltaje debe ser compensado realizando un cambio correspondiente en la corriente del tubo de rayos-X así como en el tiempo de exposición (mAs).

- **Corriente (mA):** Es proporcional al número de electrones que fluyen del cátodo al ánodo dentro del tubo de rayos-X por unidad de tiempo. La exposición del haz, para un valor de kV dado, es proporcional a la corriente del tubo. El tiempo de exposición se define como el tiempo total en el que los rayos-X son producidos. La cantidad de rayos-X es directamente proporcional al producto de la corriente en el tubo y el tiempo de exposición (mAs).

## B.4 Interacción de partículas no cargadas con la materia

La radiación electromagnética (fotones) al incidir sobre la materia tiene varios procesos físicos de interacción descritos por medio del efecto Fotoeléctrico; efecto Compton; Producción de Pares; efecto Rayleigh y la Fotodesintegración. Debido a que la radiación es la transferencia de energía a través de partículas cargadas u ondas electromagnéticas, siendo los efectos Fotoeléctrico, Compton y Producción de Pares los que describen la transferencia de la energía de los fotones a través del medio al cual inciden, ionizando la materia de forma indirecta. La probabilidad de que se presenten alguno de éstos efectos físicos depende del número

atómico del material ( $Z$ ) y la energía de los fotones incidentes, como se muestra en la Figura B.6, en la cual se observa que la aparición del efecto Fotoeléctrico está asociada con bajas energías y elementos que de bajo número atómico y conforme se incrementa la energía el efecto predominante será el Compton. A partir de una energía umbral de 1.022 MeV se tendrá la producción de Pares (electrón ( $e^-$ )/positrón( $e^+$ )).

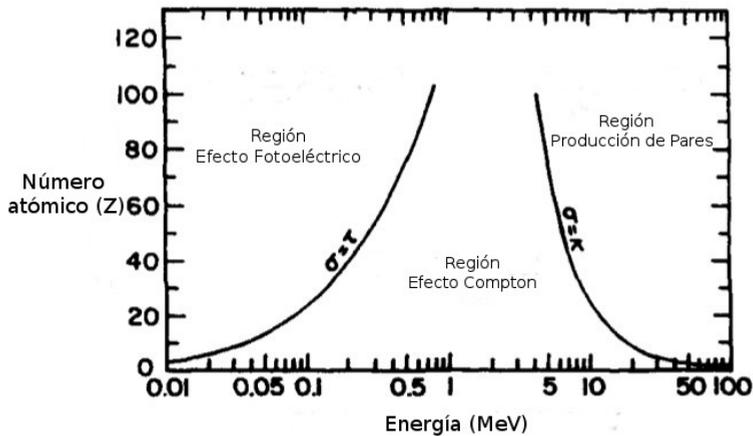


Figura B.6: Regiones que predominan los efectos Fotoeléctrico; Compton y Producción de Pares.  $\sigma = \tau$  representa la igualdad en la probabilidad de las secciones eficaces asociadas con el efecto Fotoeléctrico y Compton;  $\sigma = \kappa$  representa la igualdad en la probabilidad de las secciones eficaces asociadas con efecto Compton y Producción de pares. Tomado y editado de [Attix, 2008].

### Efecto Fotoeléctrico ( $\tau$ )

Este es un proceso de absorción en el cual un electrón, de la nube electrónica de un átomo, absorbe toda la energía de un fotón ( $h\nu$ ) incidente. El fotón desaparece cediéndole toda la energía al electrón; la cual es usada para desprenderlo del átomo, Figura B.7. El fotón será emitido con una energía cuya expresión está dada por la ecuación (B.2) [Cherry et al., 2012a].

---

$$E_{e^-} = h\nu - BE \quad (\text{B.2})$$

donde  $BE$  es el valor de la energía de ligadura asociada a la capa electrónica de la cual fue desprendido el electrón.

El electrón no será arrancado de su capa electrónica a no ser que la energía del fotón incidente sea mayor que la energía de ligadura de dicha capa. Por lo tanto, si se tienen fotones mucho más energéticos se pueden desprender electrones de capas más internas al núcleo atómico.

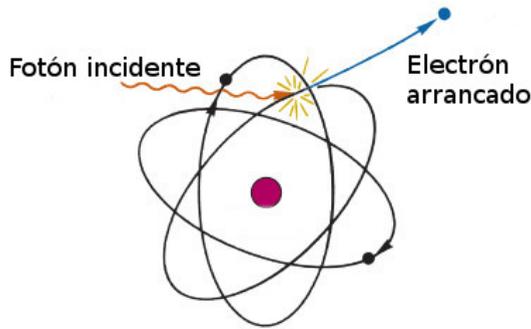


Figura B.7: El efecto Fotoeléctrico es un proceso de absorción, ya que el electrón absorbe toda la energía del fotón. Tomado y editado de [Cherry et al., 2012a].

### Efecto Compton ( $\sigma$ )

Este es un proceso de dispersión debido a que el fotón incidente colisiona con electrones de capas más externas del núcleo atómico (electrones débilmente ligados) cediéndoles parte de su energía. Por conservación de energía/momento se obtendrá como resultado la dispersión del electrón y fotón; el cual es emitido a una energía menor que la incidente y dispersado a un cierto ángulo  $\theta$  como se ve en la Figura B.8. La energía del fotón dispersado está dada por la ecuación (B.3) [Cherry et al., 2012b].

$$h\nu' = \frac{h\nu}{1 + \varepsilon(1 - \cos\theta)} \quad (\text{B.3})$$

donde  $\varepsilon = \frac{h\nu}{m_e c^2}$  y  $h\nu$  es la energía del fotón incidente.

A partir de la ecuación B.3 se observa que la energía del fotón dependerá del ángulo al cual es dispersado. Para valores de  $\theta = \pi$  y  $\theta = 0$  la energía será máxima y mínima, respectivamente.

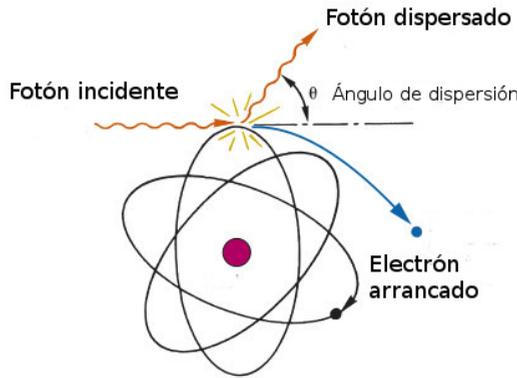


Figura B.8: En este proceso el fotón incidente no desaparece, éste interacciona con electrones débilmente ligados cediéndole parte de su energía saliendo dispersado a una energía menor y a un ángulo  $\theta$ . Tomado y editado de [Cherry et al., 2012b].

## Producción de Pares ( $\kappa$ )

En este proceso el fotón incide sobre el núcleo atómico de una partícula cargada interaccionando con su campo eléctrico; el fotón desaparece al utilizar su energía para crear un electrón ( $e^-$ ) y un positrón ( $e^+$ ), Figura B.9. La energía en reposo del electrón y positrón es de 0.511 MeV, por lo cual la energía mínima del fotón incidente debe de ser de 1.022 MeV para que ocurra la producción de pares. Por conservación la energía del fotón incidente está dada por la ecuación (B.4) [Cherry et al., 2012c].

---

$$E_0 = E_{e^-} - E_{e^+} + 1,022 \quad (\text{B.4})$$

donde  $E_{e^-}$  y  $E_{e^+}$  son las energías del electrón y positrón respectivamente.

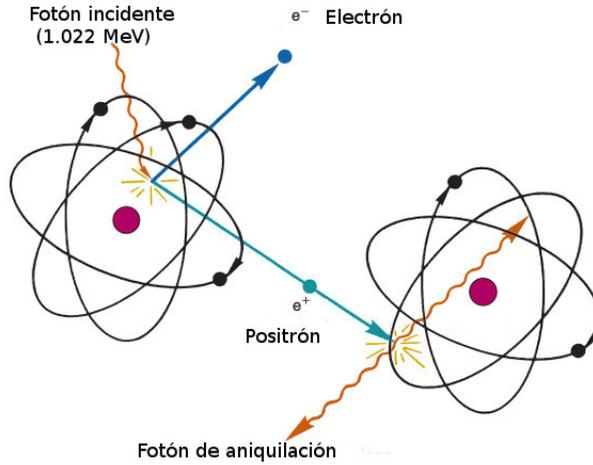


Figura B.9: La energía mínima para que exista la producción de pares es de 1.022 MeV; el positrón interactúa con electrones de la materia creando un proceso de aniquilación, emitiendo fotones antiparalelos con energías de 511 keV [Cherry et al., 2012c].

---

## B.5 Atenuación de los fotones con la materia

Al incidir la radiación electromagnética a través de un material con un cierto grosor  $x$ , la probabilidad que ocurra alguno de los tres efectos mencionados dependerá de la energía inicial de los fotones, la composición electrónica o número atómico ( $Z$ ) del material y de su grosor  $x$ . La atenuación es la disminución de la intensidad inicial de los fotones al atravesar el material con cierto grosor  $x$ , decayendo de manera exponencial debido a las dispersión o absorción que se presenten al atravesar el material, la ley de atenuación exponencial está dada por la ecuación (B.5):

$$I(x) = I_0 e^{-\mu x} \quad (\text{B.5})$$

donde  $I$  representa la intensidad de los fotones después de haber atravesado el material con grosor  $x$ ,  $I_0$  la intensidad inicial y  $\mu$  representa el coeficiente lineal de atenuación; cabe mencionar que ésta ley de atenuación solamente es válida en casos para haces de radiación monoenergéticos y filtrados [Bushberg and Boone, 2011d].

El coeficiente lineal de atenuación  $\mu$  representa la probabilidad de interacción, dependiendo de la energía de los fotones incidentes así como del número atómico del material como se ve en la ecuación (B.6):

$$\mu = \mu(E, Z) \quad (\text{B.6})$$

si se divide el coeficiente de atenuación lineal entre la densidad del material se obtiene el coeficiente lineal másico de atenuación:  $\mu_m = \frac{\mu}{\rho}$ .

Las interacciones más importantes de los fotones con la materia son debidas al efecto Fotoeléctrico ( $\tau$ ), Compton ( $\sigma$ ) y Producción de Pares ( $\kappa$ ), el coeficiente de atenuación lineal engloba a los tres efectos a partir de la ecuación (B.7).

$$\mu = \tau + \sigma + \kappa \quad (\text{B.7})$$

Las magnitudes relativas de  $\tau$ ,  $\sigma$  y  $\kappa$  varían de igual manera con el número atómico ( $Z$ ) y la energía de los fotones ( $E$ ) de la siguiente manera

---

[Cherry et al., 2012c], [Bushberg and Boone, 2011d]:

- La componente del efecto Fotoeléctrico decrece rápidamente al incrementar la energía de los fotones y crece rápidamente al incrementar el número atómico, esto es:

$$\tau \propto \frac{Z^3}{E^3} \quad (\text{B.8})$$

Ésta a la vez se incrementa de manera abrupta a energías correspondientes a los valores asociados a las energías de ligadura de cada capa electrónica, el efecto fotoeléctrico predomina para bajas energías y en materiales con  $Z$  alta, Figura B.6. La presencia del efecto fotoeléctrico a partir de imágenes creadas con de la transmisión de rayos-X es la ausencia de fotones dispersados. El hecho que la probabilidad de interacción del efecto fotoeléctrico sea proporcional al inverso del cubo de la energía ( $1/E^3$ ) explica, en parte, la degradación de la imagen en términos del contraste al haber un aumento en la energía de los rayos-X [Bushberg and Boone, 2011d].

- El efecto Compton es un efecto de dispersión que predomina mayormente en las interacciones de los rayos-X con tejido blando en el rango de energías usadas para diagnóstico a partir de 26 KeV; predominando hasta energías asociadas a los 30 MeV. En imágenes realizadas por la transmisión de rayos-X los fotones dispersados serán mayormente detectados por el sistema de detección; resultando en una degradación en el contraste de la imagen por el aumento de ruido [Bushberg and Boone, 2011d].
- La Producción de Pares no ocurre en el rango de energías usadas en diagnóstico médico; llegando a ser los fotones no significantes hasta que alcancen una energía mínima de 1.022 MeV [Bushberg and Boone, 2011d].

---

## B.6 Calidad del haz de rayos-X

### Energía Efectiva y Capa Hemirreductora

Para casos de haces polienergéticos, los cuales están compuestos por diferentes espectros de energías, se hace mención a la energía efectiva ( $E_{eff}$ ); la cual se refiere a la energía asociada a un haz monoenergético que posee la misma capa hemirreductora de un haz polienergético.

La capa hemirreductora (HVL, half layer value) es el grosor  $x$  que debe de tener un cierto material para reducir la intensidad inicial  $I_0$  de una haz de rayos-X monoenergético a la mitad, se obtiene a partir de la ecuación (B.9):

$$HVL = \frac{\ln 2}{\mu} \tag{B.9}$$

donde  $\mu$  es el coeficiente lineal de atenuación [Bushberg and Boone, 2011d].

---

## C.

### C.1 Características del equipo comercial Albira *ARS* (Oncovisión/Bruker, España)

En este equipo se pueden realizar estudios preclínicos con las técnicas de tomografía por emisión de positrones (PET); tomografía por emisión de fotón único (SPECT) y tomografía computarizada (CT) en modelos para animales pequeños, ratas y ratones principalmente. Es por ello que éste se caracteriza por ser un equipo trimodal. En la Figura C.1 se muestra una imagen del equipo Albira *ARS* así como su composición interna, Figura C.2.



Figura C.1: Equipo trimodal microPET/SPECT/CT Albira *ARS* (Oncovisión, España/Bruker) [Rueda, 2017].

El módulo de microCT del equipo Albira está constituido de un tubo de rayos-X Apogee modelo XTF5011 serie 5000 de la compañía Oxford Instruments; el cual produce un haz con geometría cónica. El tubo consta de un ánodo de tungsteno (W) y un filtro interno de 0.5 mm de aluminio (Al) con un valor de mancha focal de  $35\mu\text{m}$ . Los voltajes de operación provistos por el fabricante son 30, 35, 40 y 45 kVp con valores de corrientes disponibles de 0.2, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 mA, [Berumen-Murillo, 2016]. Las ventajas en el uso de este tubo de rayos-X radica en el valor de mancha focal; haciéndolo adecuado para estudios

---

de microCT en animales pequeños donde la resolución espacial es un parámetro importante a considerar, además de que se puede seleccionar los valores de voltaje y corriente antes de realizar cualquier adquisición.

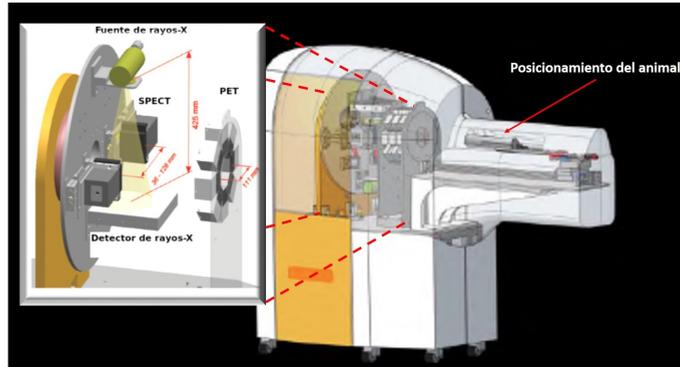


Figura C.2: Composición interna equipo Albira ARS. [Rueda, 2017]

El sistema de detección del microCT consta de un panel plano Hamamatsu, Photonics C7942CA-ck12. El cual al incidirle rayos-X son detectados por cristales de centelleo acoplados a un arreglo bidimensional de fotodiodos. El área sensible del detector es de  $12 \times 12 \text{ cm}^2$  y posee una matriz de  $2400 \times 2400$  pixeles con un tamaño de pixel de  $25 \mu\text{m}$  [Berumen-Murillo, 2016], [Rueda, 2017].

La fuente de rayos-X como el sistema de detección están localizan en geometría isocéntrica; coincidiendo el eje de rotación del sistema fuente/detector con respecto a la camilla, teniendo un campo de visión (FOV) de 64 mm aproximadamente.

Dentro del software de la base de datos del equipo se encuentran distribuidos los valores de voltaje y corriente seleccionando combinaciones de estos antes de realizar adquisiciones. En este trabajo las combinaciones seleccionadas fueron de 45 kVp a 0.4 mA; 45 kVp a 0.2 mA; 35 kVp a 0.4 mA y 35 kVp a 0.2 mA etiquetadas dentro del software de adquisiciones como HD-HV; LD-HV; HD-LV y LD-LV respectivamente.

---

El equipo puede realizar adquisiciones con diferente número de proyecciones, etiquetadas por modalidades en Fast; Low; Estándar; Good; Best; High Resolution (HR) con valores de 120; 180; 250; 400; 600 y 1000 proyecciones respectivamente. Con el fin de reducir el tiempo de exposición de la radiación sobre los animales se utilizó la modalidad Best; adquiriendo los estudios a 600 proyecciones sobre 360°.

---

## D.

### D.1 Algoritmos de reconstrucción del equipo Albira *ARS*

El software del equipo consta de dos algoritmos de reconstrucción llamados *FBP* (Filtered Back Projection) y *CT High*, realizando reconstrucciones diferentes dependiendo de lo que se quiera visualizar y analizar.

El algoritmo *FBP* reconstruye la imagen a partir de una matriz con dimensiones de  $x = 558$ ;  $y = 558$  y  $z = 516$  voxeles, permitiendo seleccionar el tamaño de voxel a  $500 \mu\text{m}$ ;  $250 \mu\text{m}$  y  $125 \mu\text{m}$  etiquetados por Low; Medium y High respectivamente, aplicando esta selección únicamente en las modalidades de Fast; Low; Estándar; Good y Best las cuales abarcan una matriz de detección en el detector de rayos-X de  $1200 \times 1200$  pixeles.

Para la modalidad de High Resolution la matriz de detección del detector es de  $2400 \times 2400$  pixeles con 1000 proyecciones; reconstruyendo a un tamaño de voxel de  $50 \mu\text{m}$  obteniendo mayor información al reconstruir las imágenes con mejor resolución espacial. La desventaja de ésta radica en el aumento del tiempo de exposición de la radiación sobre el animal, ya que las adquisiciones de los estudios tienen una duración aproximada de 30 minutos.

Por otro lado, el algoritmo de *CT High* reconstruye la imagen partiendo de una selección previa de coordenadas del sitio de interés en la imagen reconstruida con *FBP*; realizando una reconstrucción modificando la

---

dimensión de la matriz de la imagen a  $x = 172$ ;  $y = 173$  y  $z = 230$  voxeles, obteniendo una imagen con tamaño de voxel de  $35 \mu\text{m}$ . Esta reconstrucción realiza una reducción digital en la matriz de voxeles de la imagen reconstruida en *FBP*, realizando un análisis más localizado dependiendo de las dimensiones del hueso a visualizar. Se opta por esta reconstrucción si el objeto a analizar no se puede visualizar con *FBP*. En la Figura D.1 se muestran los resultados de las reconstrucciones en *FBP* y *CT High*.

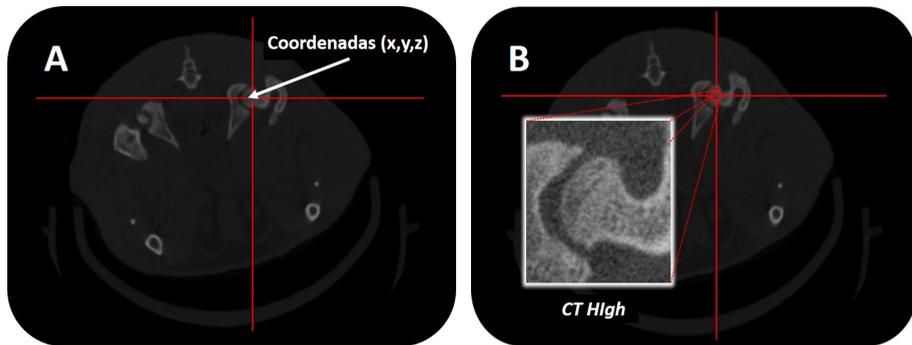


Figura D.1: Imagen que muestra los resultados de las reconstrucciones mediante el algoritmo *FBP* (A) y *CT High* (B). El *CT High* reconstruye una sección de la imagen a partir del *FBP* con un tamaño de pixel de  $35 \mu\text{m}$ ; visualizando estructuras con mayor detalle. Imágenes representativas adquiridas con las modalidades HD-HV (45 kVp a 0.4 mA) [Fuente directa].

---

## E.

### E.1 Composición de un diagrama de cajas y bigotes

En este tipo de diagrama los datos experimentales se encuentran distribuidos alrededor de la mediana de la distribución; contenidos dentro de cajas o cuartiles Figura E.1. Estos diagramas son usados para representar la distribución de datos asociados a estudios que dependen de variabilidades biológicas.

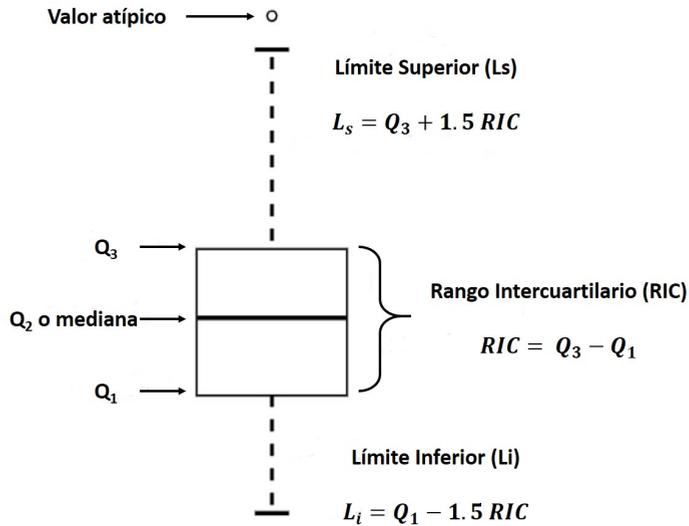


Figura E.1: Características de un diagrama de caja o bigote [Fuente directa].

Donde  $Q_1$  y  $Q_3$  representan los valores de los cuartiles inferior y superior asociados con los valores mínimos y máximos en los datos;  $Q_2$  es el cuartil con el valor asociado a la mediana de la distribución de datos. Los límites inferiores y superiores representan el rango de variación en los datos; distribuyéndose 1.5 veces el rango intercuartilario ( $RIC$ ) por arriba y por debajo de los cuartiles  $Q_3$  y  $Q_1$  respectivamente. Se les denomina valores atípicos a los datos que caen por fuera de los límites superiores e inferiores.

## F.

A continuación se muestran las gráficas de contraste y ruido en las imágenes reconstruidas con el algoritmo de *CT High* correspondientes a la calvaria, mandíbula, cabeza de fémur y la 5ta vértebra lumbar, adquiridas con los distintos parámetros de corriente y voltaje (HD-HV, LD-HV, HD-LV y LD-LV). Se observó que el contraste es mayor en bajas energías (35 kVp) debido a una mayor probabilidad de interacción de la

---

radiación (Figura 5.2).

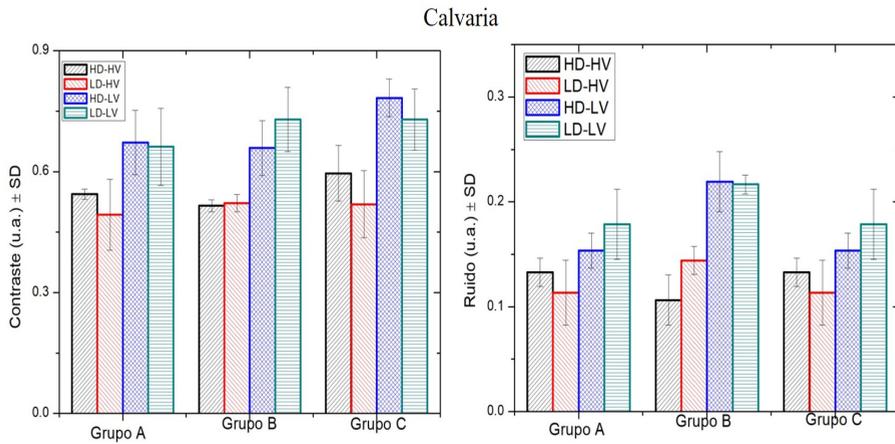


Figura F.1: Valores del contraste y ruido en las imágenes de la calvaria.

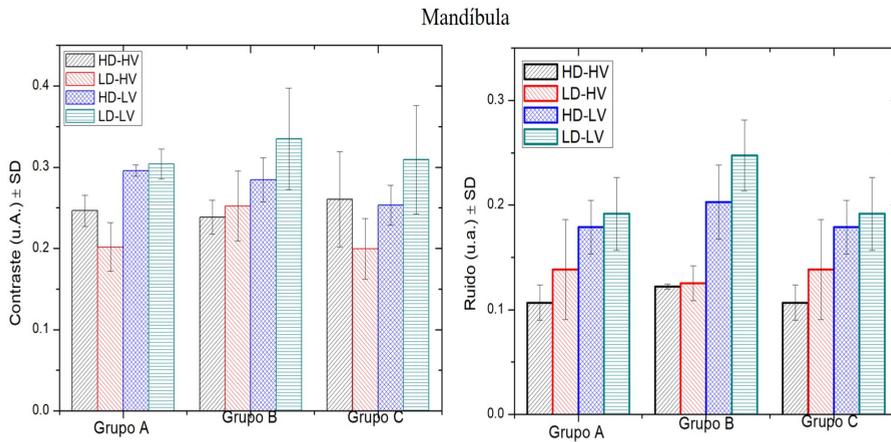


Figura F.2: Valores del contraste y ruido en las imágenes de la mandíbula.

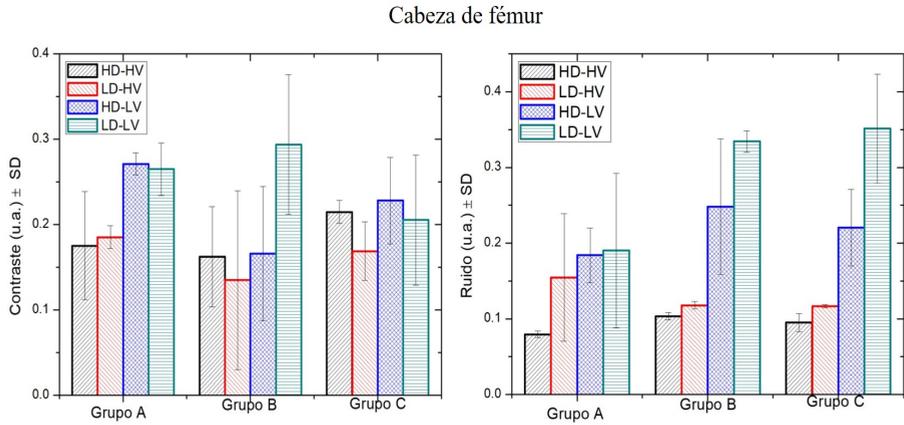


Figura F.3: Valores del contraste y ruido en las imágenes de la cabeza de fémur.

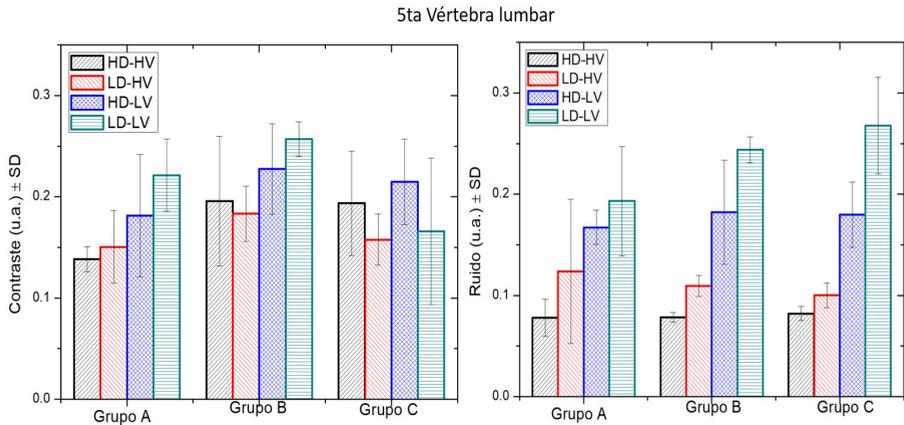


Figura F.4: Valores del contraste y ruido en las imágenes de la 5ta vértebra lumbar.

Sin embargo, los valores del ruido aumentan en las imágenes adquiridas en bajas energías asociadas con el kilovoltaje de 35 kVp, ya que al haber una baja fluencia de fotones que se tiene en comparación con la de 45 kVp (Figura 5.5), el ruido en las imágenes reconstruidas aumenta al incidir una cantidad menor de fotones en el detector de rayos-X, ecuación (5.2).

# Bibliografía

- [Andrade et al., 2013] Andrade, C., Nogueira, L., Salata, C., da Silva, C., Ferreira-Machado, S., de Almeida, C., Almeida, A., Colaço, M., Alessio, R., Braz, D., et al. (2013). Analysis of femur head microstructure in ovariectomized rats. *Journal of Instrumentation*, 8(07):C07007.
- [Attix, 2008] Attix, F. H. (2008). *Introduction to radiological physics and radiation dosimetry*. John Wiley & Sons.
- [B Cube AG, Switzerland, 2016] B Cube AG, Switzerland (2016). [http://www.b-cube.ch/index.php?option=com\\_content&view=article&id=22&Itemid=20](http://www.b-cube.ch/index.php?option=com_content&view=article&id=22&Itemid=20), febrero de 2016.
- [B Cube Switzerland, 2016] B Cube Switzerland (2016). [http://www.b-cube.ch/index.php?option=com\\_content&view=article&id=22&Itemid=20](http://www.b-cube.ch/index.php?option=com_content&view=article&id=22&Itemid=20), mayo de 2016.
- [Berumen-Murillo, 2016] Berumen-Murillo, F. (2016). Caracterización de un micro-tomógrafo de rayos-x para estudios preclínicos usando resta de imágenes con medio de contraste. Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM.
- [blogspot.mx, 2016] blogspot.mx (2016). <http://explorando-elcuerpohumano.blogspot.mx/2010/09/esqueleto-apendicular-y-axial.html>, mayo de 2016.
- [BoneJ, 2016] BoneJ (2016). <http://bonej.org/>.
- [Bouxsein et al., 2010] Bouxsein, M. L., Boyd, S. K., Christiansen, B. A., Guldberg, R. E., Jepsen, K. J., and Müller, R. (2010). Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *Journal of bone and mineral research*, 25(7):1468–1486.

- 
- [Bruker, 2017] Bruker (2017). *HU and BMD calibration in Bruker-MicroCT CT-analyser Method Note*. Bruker.
- [Bushberg and Boone, 2011a] Bushberg, J. T. and Boone, J. M. (2011a). *The essential physics of medical imaging*, chapter 1, pages 1–6. Lippincott Williams & Wilkins.
- [Bushberg and Boone, 2011b] Bushberg, J. T. and Boone, J. M. (2011b). *The essential physics of medical imaging*, chapter 10, page 368. Lippincott Williams & Wilkins.
- [Bushberg and Boone, 2011c] Bushberg, J. T. and Boone, J. M. (2011c). *The essential physics of medical imaging*, chapter 4. Lippincott Williams & Wilkins.
- [Bushberg and Boone, 2011d] Bushberg, J. T. and Boone, J. M. (2011d). *The essential physics of medical imaging*, chapter 6. Lippincott Williams & Wilkins.
- [Cattaneo et al., 2011] Cattaneo, C. A., Larcher, L., Ruggeri, A., Herrera, A., and Biazoni, E. (2011). Métodos de umbralización de imágenes digitales basados en entropía de shannon y otros. *Machine learning*, 20(3):2785–2805.
- [Cherry et al., 2012a] Cherry, S. R., Sorenson, J. A., and Phelps, M. E. (2012a). *Physics in Nuclear Medicine E-Book*, chapter 6, page 74. Elsevier Health Sciences.
- [Cherry et al., 2012b] Cherry, S. R., Sorenson, J. A., and Phelps, M. E. (2012b). *Physics in Nuclear Medicine E-Book*, chapter 6, page 75. Elsevier Health Sciences.
- [Cherry et al., 2012c] Cherry, S. R., Sorenson, J. A., and Phelps, M. E. (2012c). *Physics in Nuclear Medicine E-Book*, chapter 6, page 77. Elsevier Health Sciences.
- [CIRS, 2013] CIRS (2013). *Tissue Simulation & Phantom Technology, Micro-Mouse & Water-Filled Mouse Phantoms and MicroCT Rods*. CIRSINC.
- [Clark and Badea, 2014] Clark, D. and Badea, C. (2014). Micro-ct of rodents: state-of-the-art and future perspectives. *Physica medica*, 30(6):619–634.
- [Doube et al., 2010] Doube, M., Kłosowski, M. M., Arganda-Carreras, I., Cordelières, F. P., Dougherty, R. P., Jackson, J. S., Schmid, B., Hutchinson, J. R., and Shefelbine, S. J. (2010). Bonej: free and extensible bone image analysis in imagej. *Bone*, 47(6):1076–1079.

- 
- [FDA, 2018] FDA (2018). <https://www.fda.gov/radiation-emittingproducts/radiationemittingproductsandprocedures/medicalimaging/medicalx-rays/ucm115317.htm>.
- [Feldkamp et al., 1989] Feldkamp, L. A., Goldstein, S. A., Parfitt, M. A., Jesion, G., and Kleerekoper, M. (1989). The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *Journal of bone and mineral research*, 4(1):3–11.
- [F.M. UNAM, 2016] F.M. UNAM (2016). [http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/doc/tutorial/tejidos\\_archivos/page2755.htm](http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/doc/tutorial/tejidos_archivos/page2755.htm), febrero 2016.
- [Goldman, 2007] Goldman, L. W. (2007). Principles of ct and ct technology. *Journal of nuclear medicine technology*, 35(3):115–128.
- [Ho et al., 2013] Ho, J.-T., Wu, J., Huang, H.-L., Chen, M. Y., Fuh, L.-J., and Hsu, J.-T. (2013). Trabecular bone structural parameters evaluated using dental cone-beam computed tomography: cellular synthetic bones. *Biomedical engineering online*, 12(1):115.
- [Hsu et al., 2016] Hsu, P.-Y., Tsai, M.-T., Wang, S.-P., Chen, Y.-J., Wu, J., and Hsu, J.-T. (2016). Cortical bone morphological and trabecular bone microarchitectural changes in the mandible and femoral neck of ovariectomized rats. *PloS one*, 11(4):e0154367.
- [ImageJ, 2016] ImageJ (2016). <https://imagej.nih.gov/ij/>.
- [K-Bits, 2018] K-Bits (2018). <http://www.k-bits.com/2013/05/28/porque-usamos-ratas-para-la-investigacion/>.
- [Khan, 2010] Khan, F. M. (2010). *The physics of radiation therapy*. Lippincott Williams & Wilkins.
- [Kinney et al., 1995] Kinney, J., Lane, N., and Haupt, D. (1995). In vivo, three-dimensional microscopy of trabecular bone. *Journal of Bone and Mineral Research*, 10(2):264–270.
- [Langton and Njeh, 2016] Langton, C. M. and Njeh, C. F. (2016). *The physical measurement of bone*. CRC Press.
- [Li et al., 2008] Li, H., Zhang, H., Tang, Z., and Hu, G. (2008). Micro-computed tomography for small animal imaging: technological details. *Progress in natural science*, 18(5):513–521.
- [Li et al., 2015] Li, Y., Chen, S.-K., Li, L., Qin, L., Wang, X.-L., and Lai, Y.-X. (2015). Bone defect animal models for testing efficacy of bone substitute biomaterials. *Journal of Orthopaedic Translation*, 3(3):95–104.
-

- 
- [Liu et al., 2016] Liu, H., Li, W., Liu, Y., and Zhou, Y. (2016). Bone micro-architectural analysis of mandible and tibia in ovariectomised rats: A quantitative structural comparison between undecalcified histological sections and micro-ct. *Bone and Joint Research*, 5(6):253–262.
- [Liu et al., 2015] Liu, J., Jin, Z.-l., and Li, Q. (2015). Effect of occlusal hypo-function and its recovery on the three-dimensional architecture of mandibular alveolar bone in growing rats. *journal of surgical research*, 193(1):229–236.
- [López, 2016] López, J. P. C. (2016). Optimización de resta por energía-dual de imágenes tomográficas preclínicas con medio de contraste. Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM.
- [medicinaedith, 2016] medicinaedith (2016). <http://medicinaedith.blogspot.mx/2010/07/terminologia-y-planos-anatomicos.html>, febrero de 2016.
- [Microctworld, 2018] Microctworld (2018). <http://microctworld.net/the-history-of-microct/>, febrero 2018.
- [Muller et al., 1998] Muller, R., Van Campenhout, H., Van Damme, B., Van der Perre, G., Dequeker, J., Hildebrand, T., and Ruegsegger, P. (1998). Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. *Bone*, 23(1):59–66.
- [NIST, 2016a] NIST (2016a). <https://physics.nist.gov/cgi-bin/xcom/data.pl>.
- [NIST, 2016b] NIST (2016b). <https://physics.nist.gov/physrefdata/xray/masscoef/tab4.html>.
- [Oncovisión/Bruker, 2013] Oncovisión/Bruker (2009-2013). *Manuales de usuario del equipo Albira ARS*. Oncovisión GEM Imaging.
- [Parkinson and Fazzalari, 2013] Parkinson, I. H. and Fazzalari, N. L. (2013). Characterisation of trabecular bone structure. In *Skeletal Aging and Osteoporosis*, pages 31–51. Springer.
- [Pauwels et al., 2015] Pauwels, R., Faruangsang, T., Charoenkarn, T., Ngonphloy, N., and Panmekiate, S. (2015). Effect of exposure parameters and voxel size on bone structure analysis in cbct. *Dentomaxillofacial Radiology*, 44(8):20150078.
- [Pauwels et al., 2014] Pauwels, R., Silkosessak, O., Jacobs, R., Bogaerts, R., Bosmans, H., and Panmekiate, S. (2014). A pragmatic approach to determine the optimal kvp in cone beam ct: balancing contrast-to-noise ratio and radiation dose. *Dentomaxillofacial Radiology*, 43(5):20140059.
-

- 
- [PMOD Technologies, 2016] PMOD Technologies (2016). <https://www.pmod.com/web/>.
- [Pub Med Health, 2016] Pub Med Health (2016). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/pmht0022808/>, mayo de 2016.
- [Rueda, 2017] Rueda, A. N. (2017). Caracterización dosimétrica de la unidad microct de un sistema trimodal de adquisición de imagen micropet/spect/ct. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM.
- [Rüeggsegger et al., 1996] Rüeggsegger, P., Koller, B., and Müller, R. (1996). A microtomographic system for the nondestructive evaluation of bone architecture. *Calcified tissue international*, 58(1):24–29.
- [Saito and Sagara, 2017] Saito, M. and Sagara, S. (2017). A simple formulation for deriving effective atomic numbers via electron density calibration from dual-energy ct data in the human body. *Medical physics*, 44(6):2293–2303.
- [Silva et al., 2014] Silva, A. M. H. d., Alves, J. M., Silva, O. L. d., and Silva Junior, N. F. d. (2014). Two and three-dimensional morphometric analysis of trabecular bone using x-ray microtomography ( $\mu$ ct). *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica*, 30(2):93–101.
- [Stauber and Müller, 2008] Stauber, M. and Müller, R. (2008). Micro-computed tomography: a method for the non-destructive evaluation of the three-dimensional structure of biological specimens. In *Osteoporosis*, pages 273–292. Springer.
- [Texas-Geosciences, 2016] Texas-Geosciences, U. (2016). <http://www.ctlab.geo.utexas.edu/publications/>.
- [Wilson, 2003] Wilson, C. R. (2003). Essentials of bone densitometry for the medical physicist. In *American Association of Physicists in Medicine 2003 Annual Meeting*.