



Universidade Federal  
do Rio de Janeiro

---

Escola Politécnica

# ANÁLISE DEGENERATIVA DA ESTRUTURA ÓSSEA EM PEIXES ATRAVÉS DA TÉCNICA DE MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA POR RAIOS X

Igor Pires da Rocha

Projeto de Graduação apresentado ao Curso de Engenharia Nuclear da Escola Politécnica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Engenheiro.

Orientador: Inayá Corrêa Barbosa Lima

Rio de Janeiro

Agosto de 2018

# ANÁLISE DEGENERATIVA DA ESTRUTURA ÓSSEA EM PEIXES ATRAVÉS DA TÉCNICA DE MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA POR RAIOS X

Igor Pires da Rocha

PROJETO DE GRADUAÇÃO SUBMETIDO AO CORPO DOCENTE DO CURSO DE ENGENHARIA NUCLEAR DA ESCOLA POLITÉCNICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE ENGENHEIRO NUCLEAR.

Examinada por:

---

Prof. Inayá Corrêa Barbosa Lima

---

D.Sc. Simone Pennafirme

---

Prof. Ademir Xavier da Silva

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

AGOSTO DE 2018

Rocha, Igor Pires

Aplicações da m-CT na Engenharia Nuclear/ Igor Pires da Rocha. – Rio de Janeiro: UFRJ/ Escola Politécnica, 2018.

XIII, 83 p.: il.; 29,7 cm

Orientador: Inayá Corrêa Barbosa Lima

Projeto de Graduação – UFRJ/ Escola Politécnica/ Curso de Engenharia Nuclear, 2018.

Referências Bibliográficas: p. 84 - 88

1. Raios X. 2. Microtomografia. 3. Engenharia. 4. Nuclear. I. Lima, Inayá. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola Politécnica, Curso de Engenharia Nuclear. III. Título.

*“O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder entusiasmo.”*

*Winston Churchill*

# AGRADECIMENTOS

Os primeiros a serem lembrados por mim quando penso em gratidão, aonde quer que eu vá, são meus pais. Jorge Gomes da Rocha e Eliane do Carmo Siciliano Pires, vos agradeço por toda educação e valores que me passaram, me estimulando, incentivando e me ensinando a nunca desistir dos meus sonhos. Dedico este trabalho a vocês.

Gostaria de agradecer também aos meus irmãos Rafael e Tatiana pelo companheirismo e conselhos recebidos durante toda minha vida.

Agradeço ao meu afilhado Pedro Henrique e a minha linda sobrinha Elisa, que apesar da pouca idade, me ensina a cada dia tentar ser uma pessoa melhor.

Meus sinceros agradecimentos aos meus avós, tios, primos e madrinha Maria da Conceição Garcia Torres por sempre me escutarem e tentarem me ajudar da melhor forma possível.

Aos melhores amigos que a UFRJ me deu, Ana Carolina Coppe, André Rebello, Camila Mello, Mariana Romeiro e Thais Fernandes, agradeço imensamente por todo o tempo que passamos juntos na faculdade e fora dela. Sou grato pelo companheirismo, ajuda, conselhos, dicas e principalmente por me fazerem rir nos momentos difíceis.

Agradeço a minha melhor amiga Fernanda Rezende pela amizade de 20 anos e por torcer sempre pelo meu crescimento e acreditar no meu potencial.

Gostaria de agradecer imensamente à minha orientadora e prof<sup>a</sup>. Inayá Lima por todo o conhecimento que me foi passado e pela ajuda incansável que recebi. São poucos aqueles que conseguem transmitir conhecimento de forma clara e eficiente e serei eternamente grato pela paciência que teve na realização deste trabalho.

Agradeço a todo pessoal do LIN (Laboratório de Instrumentação Nuclear), a equipe de M-CT e ao prof. Ricardo Tadeu Lopes por me ajudarem, ensinarem e darem a oportunidade de conhecer na prática um pouco do que se pode fazer em Engenharia Nuclear.

Gostaria de agradecer também a todos os professores do Departamento de Engenharia Nuclear pelos ensinamentos transmitidos aos quais serei eternamente grato.

Gostaria de agradecer ao corpo de funcionários do PEN (Programa de Engenharia Nuclear), em especial à Suzana, pela simpatia, bom humor e presteza.

Por último e não menos importante, agradeço a Deus por ter me dado pais tão bons e amorosos e por ter me dado lucidez nos momentos de adversidade.

Resumo do Projeto de Graduação apresentado à Escola Politécnica/ UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Engenheiro Nuclear.

## ANÁLISE DEGENERATIVA DA ESTRUTURA ÓSSEA EM PEIXES ATRAVÉS DA TÉCNICA DE MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA POR RAIOS X

Igor Pires da Rocha

Agosto / 2018

Orientador: Inayá Corrêa Barbosa Lima

Curso: Engenharia Nuclear

A técnica de microtomografia computadorizada (m-CT) por transmissão de raios X vem sendo utilizada na Engenharia Nuclear como método investigativo da estrutura interna de objetos de modo não-destrutivo. Seu uso ocorre através da transdisciplinaridade entre várias áreas de estudo como odontologia, paleontologia, biologia, entre outras.

O equipamento utilizado no presente estudo foi um microtomógrafo de alta resolução espacial com potência de até 8W, range de energia que varia de 40 a 130kV e corrente elétrica variável de 0 a 100 $\mu$ A. O sistema apresenta detector do tipo flat panel e com matriz 2240x2240, com o tamanho de pixel variando de 0 a 50 $\mu$ m e com 12bits de range dinâmico. O equipamento é da marca SkyScan/Bruker, modelo 1173 e é do Laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN), pertencente ao Programa de Engenharia Nuclear (PEN) da COPPE/UFRJ.

Foram feitas análises da estrutura interna de 06 amostras ósseas de espécies de peixes de sambaquis das costas brasileiras com o objetivo de detectar casos de osso hiperostótico. Os parâmetros morfológicos inspecionados foram BV (volume de osso), TV (volume total da amostra) e BV/TV (volume de osso/volume total da amostra).

Com base nos resultados obtidos, foi possível detectar osso hiperostótico, além da caracterização das regiões interna e cortical de cada amostra. A m-CT comprovou sua eficiência na visualização e caracterização de estrutura interna e apresentou vantagem por ser não destrutiva, preservando a integridade das amostras.

Abstract of Undergraduate Project presented to POLI/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Nuclear Engineer.

## DEGENERATIVE ANALYSIS OF BONE STRUCTURE IN FISH THROUGH X-RAY COMPUTERIZED MICROTOMOGRAPHY TECHNIQUE

Igor Pires da Rocha

August / 2018

Advisor: Inayá Corrêa Barbosa Lima

Course: Nuclear Engineering

The X-ray computerized microtomography technique (m-CT) has been used in Nuclear Engineering as an investigative method of the internal structure of objects in a non-destructive way. Its use occurs through transdisciplinarity among several areas of study such as dentistry, paleontology, biology, among others.

The equipment used in the present study was a microtomograph with high spatial resolution with power of 8W, range of energy ranging from 40 to 130kV and electric current variable from 0 to 130 $\mu$ A. The system features a 2240x2240 matrix and a flat panel detector. The pixel size ranges from 0 to 50 $\mu$ m and has 12bits os dynamic range. The equipment belongs to SkyScan/Bruker, model 1173, and is from the Laboratory of Nuclear Instrumentation (LIN), belonging to the Program of Nuclear Engineering (PEN), at COPPE/UFRJ.

The internal structure of 06 bones samples of fish species of the Brazilian coasts were analysed with the objective of detecting cases of hyperostosis. The inspected morphological parameters were BV (bone volume), TV (total volume) and BV/TV (bone volume/total volume).

With the results obtained, it was possible to detect cases of hyperostotic bones, besides the caracterization of the internal and cortical regions of each sample. The m-CT proved its efficiency in the visualization and caracterization of internal structure and presented advantage by being non-destructive, preserving the integrity of the samples.



# SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>4</b>
<b>CAPÍTULO III – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>16</b>
III.1 – Raios X .....	16
III.2 – Produção de Raios X .....	18
III.3 – Interação da Radiação X com a Matéria .....	23
III.3.1 – Efeito Fotoelétrico .....	23
III.3.2 – Efeito Compton .....	26
III.4 – Detectores de Radiação .....	30
III.4.1 – Fatores para Escolha do Detector de Radiação .....	31
III.4.2 – Eficiência dos Detectores de Radiação .....	32
III.4.3 – Sensibilidade dos Detectores de Radiação .....	33
III.4.4 – Detectores Flat Panel .....	34
<b>CAPÍTULO IV – TOMOGRAFIA E MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA</b> .....	<b>38</b>
IV.1 – Tomografia Computadorizada .....	38
IV.1.1 - 1ª Geração .....	39
IV.1.2 - 2ª Geração .....	41
IV.1.3 - 3ª Geração .....	43
IV.1.4 - 4ª Geração .....	44
IV.2 – Microtomografia Computadorizada .....	45
IV.2.1 – Princípios da m-CT e Aquisição .....	46
IV.2.2 – Reconstrução .....	48
IV.2.3 – Processamento de Imagem e Análise de Dados .....	52
IV.2.4 – Limiarização .....	54
IV.2.5 – Visualização .....	55
<b>CAPÍTULO V – MÉTODOS EXPERIMENTAIS E MATERIAIS DE ESTUDO</b> .....	<b>56</b>
V.1 – Microtomografia Computadorizada por Transmissão de Raios X .....	56
V.2 – Processo Degenerativo Ósseo em Peixes .....	60
<b>CAPÍTULO VI – RESULTADOS</b> .....	<b>65</b>

VI.1 – Quantificação .....	65
VI.2 – Visualização .....	68
VI.2.1 – Radiografia e Seção Transversal 2D .....	68
VI.2.2 – Visualização em 3D .....	73
<b>CAPÍTULO VII – CONCLUSÃO .....</b>	<b>82</b>
<b>CAPÍTULO VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>84</b>
<b>ANEXO A .....</b>	<b>89</b>

# CAPÍTULO I

## INTRODUÇÃO

A Engenharia Nuclear é o ramo da Engenharia que busca desenvolver novas tecnologias na área de aplicação da Energia Nuclear e na geração de energia. Dentro desse campo, diversas áreas são foco de estudo, abrangendo desde a exploração de minérios para uso na geração de energia assim como o processo de geração em si, além da operação dos reatores nucleares, gestão e controle dos materiais radioativos e na aplicação da energia nuclear nos mais diversos ramos da indústria, como na medicina, irradiação de alimentos, entre outras.

A descoberta dos raios X ocorreu em 1895, pelo cientista Wilhelm Conrad Röntgen e desde então se tornou fundamental para a área médica, biológica e indústria, entre outras partes do campo do saber. Desde então, por ter capacidade alta de penetração na matéria e ter habilidade de gerar imagens de dentro de um objeto inspecionado, os raios X são ferramenta fundamental tanto como base de técnicas indispensáveis à medicina, como método de investigações científicas, graças a sua gama de tecnologias desenvolvidas (fluorescência, radiografia, microtomografia, entre outras).

Assim como a tomografia tradicional, uma das aplicações com uso dos raios X é a microtomografia computadorizada por transmissão de raios X (m-CT). O conceito básico por traz dessas técnicas é que os mesmos interajam com o objeto de análise e gere imagens. Imagens sequenciais são compiladas de forma a criar representações que podem ser processadas digitalmente para executar um grande leque de visualizações e análises.

A m-CT é utilizada para inspecionar a estrutura interna de um material de modo que não inviabilize o mesmo, ou seja, é uma técnica não-destrutiva. Suas vantagens são que é

uma técnica precisa, rápida, não necessita de preparação da amostra, proporcionando imagens fieis do objeto estudado.

Tendo em vista essas vantagens, a m-CT se tornou uma técnica bastante difundida e é usada em diversos ramos da indústria e nas mais diferentes áreas de pesquisa. Os alvos são arqueologia e paleontologia (relacionados a estrutura e integridade de fósseis), assim como na área geológica e de exploração de petróleo (no que se refere a caracterização de rochas, por exemplo), na área da biologia e saúde (como análise de ossos de animais), além de outras.

O objeto a ser analisado (ou corpo de prova, como também é conhecido) é colocado entre a fonte de raios X e o detector. O primeiro processo consiste na aquisição, ou seja, processo pelo qual a radiação interage com o corpo de prova e é detectada, formando projeções. Estas projeções após serem adquiridas, sofrerão o segundo processo, que é a reconstrução, etapa baseada num algoritmo matemático de Feldkamp (1984). Após reconstruídas, podem ser finalmente visualizadas como imagens bidimensionais (2D) ou tridimensionais (3D). Dado essa estrutura reconstruída, a visualização, que constitui a terceira etapa, tem como objetivo a análise em si do corpo de prova, permitindo a caracterização da estrutura interna e quantificações através do processamento de imagem.

Como a imagem final é a que será analisada e processada, sua qualidade é de extrema importância e por isso diversos mecanismos são utilizados para que ela fique a melhor possível. Como os feixes de raios X são provenientes de tubos de raios X, eles são policromáticos e interagem de modo diferente com a matéria. Tendo isto em vista, os fótons de alta energia atravessam o corpo de prova enquanto os de baixa energia são absorvidos, o que prejudica a qualidade da imagem. A fim de eliminar os fótons de baixa energia, aumentando a qualidade das imagens geradas, utilizam-se filtros metálicos na saída do tubo de raios X. Durante a reconstrução, é possível também estabelecer vários ajustes para que as imagens adquiram boa qualidade para diagnóstico, sendo eles: ajustes através de

correções de alinhamento, correção de artefatos de anéis, suavização da imagem, entre outros.

Para que as avaliações quantitativas sejam possíveis é necessário transformar a imagem em escala de cinza para uma imagem binária (preto e branco). Esse processo é conhecido como binarização em que é escolhido um valor de limiar (TH), o que é um grande desafio da m-CT pois é referente ao limiar de interesse escolhido através do ponto de vista humano para definir o nível “ótimo” no processo de binarização.

O objetivo deste trabalho é aplicar a técnica de microtomografia ao estudo de processos degenerativos ósseos de uma colônia de fósseis de peixes de sambaquis da costa brasileira. Diante da falta de conhecimento do processo degenerativo ósseo em peixes, através da m-CT analisou-se o osso hiperostótico em espécimes arqueológicas para a obtenção de morfologia de alta resolução e reconstrução microestrutural.

Este trabalho contém, a seguir, a revisão bibliográfica sobre a técnica de m-CT e sobre a aplicação mencionada acima, seguindo depois para sua fundamentação teórica. Posteriormente, é descrito como funciona a técnica, com definição das etapas de aquisição, reconstrução e visualização, seguindo para a aplicação e análise do estudo sobre degeneração óssea em peixes. Por fim, serão apresentadas as conclusões obtidas através dos resultados apresentados.

# CAPÍTULO II

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

ALVES *et al* (2015) descreve a m-CT como técnica não destrutiva que depende da interação e da atenuação da radiação ao passar por uma amostra de interesse. Os avanços tecnológicos nos tubos de raios X com tamanhos menores de foco e com a introdução de detectores *flat panel* tornaram a resolução em microescala possível. O resultado da m-CT é uma imagem em escala de cinza que representa a composição interna de um objeto, permitindo análise tridimensional (3D) de parâmetros que tinham limitações nas avaliações bidimensionais (2D). Considerando que a m-CT fornece muitas de imagens, as estatísticas são superiores a qualquer outra técnica de inspeção não destrutiva.

Um tipo de análise quantitativa de estruturas anatômicas de madeira é a microtomia que produz micrografias óticas de pequenas partes da amostra, porém é altamente demorada e ainda pode causar danos ao corpo de prova, tornando esta abordagem impraticável para os que necessitam de análises em um curto período de tempo. Por outro lado, a técnica de microtomografia computadorizada por raios X se mostrou eficiente, rápida e não invasiva na caracterização da anatomia da madeira (STEPPE *et al*, 2004). No estudo, amostras de madeira do caule de árvore faia, da espécie *Fagus sylvatica* L com 2 anos de idade e de carvalho, da espécie *Quercus robur* L com 3 anos de idade foram submetidas a análise usando a técnica de m-CT. O objetivo era conseguir observar a estrutura porosa difusa da faia e difusa anelar do carvalho. A técnica foi capaz de mapear as seções transversais em 2D das 2 espécies com resolução micrométrica, além disso foi possível calcular através do software m-CTanalysis o diâmetro interno dos vasos, a área superficial dos vasos, a densidade dos vasos e porcentagem de espaço vazio (porosidade). As inspeções visuais das imagens geradas pela m-CT e os resultados obtidos revelaram boa correspondência com os dados previamente coletados através da técnica de microtomia, além de confirmar maior

rapidez e alta resolução nas imagens 3D da estrutura interna de ambas as espécies de árvores.

A m-CT foi desenvolvida especialmente para inspecionar estruturas pequenas e está presente em análises na área geológica e petrofísica (MACHADO *et al*, 2015). O estudo levou em consideração rochas reservatório (*carbonate rocks*) e sua relevância no cenário brasileiro no que se refere à produção de petróleo. Essas rochas são originais de bacias sedimentares e lagos hipersalinos e através do uso da m-CT buscou-se identificar e caracterizar sua estrutura e estabelecer um paralelo entre este método e a técnica usada na indústria petrofísica conhecida como "*thin section*". As imagens de m-CT foram obtidas através de um microtomógrafo de alta energia do modelo Skyscan/Bruker 1173, com parâmetros de 130kV, 61 $\mu$ A e tamanho de pixel da ordem de 20 $\mu$ m. Para a maioria das amostras foram identificadas estruturas similares pelos 2 métodos comparativos, com exceção de 2 amostras em que a m-CT devido ao baixo contraste e condições do material devido ao seu local de origem não detectou partes da estrutura da rocha. Apesar da limitação em relação ao baixo contraste em certas estruturas minerais, a técnica de m-CT se mostrou ferramenta útil para caracterização de rochas reservatório, ilustrando-as através de imagens 3D e de não as inutilizar por ser uma técnica de inspeção não destrutiva.

OLIVEIRA *et al* (2012) escaneou amostras de rochas reservatório com condições de 130kV E 61 $\mu$ A e para reduzir fótons de baixa energia que prejudicam a qualidade da imagem usou 2 filtros (Alumínio 1mm e Cobre 0,2mm). As rochas tiveram parâmetros quantificados através da obtenção de sua porosidade e distribuição do tamanho do poro. Foram geradas também imagens 3D com alta resolução espacial e foi possível criar um diagrama de distribuição dos tamanhos dos poros. Este trabalho concluiu que a técnica de microtomografia computadorizada por raios X é eficiente, possibilita imagens tridimensionais com resolução elevada e permite distinguir através da distribuição dos poros diferentes fases minerais.

Compostos poliméricos também foram objeto de estudo através da técnica de m-CT. SCHINLLING *et al* (2005) pesquisou danos internos em fibras de compostos poliméricos em

que falhas na estrutura de vidros/epóxi foram representadas por pixels pretos (estrutura vazia). Devido ao baixo contraste, o uso de corantes foi necessário em algumas amostras, facilitando o processo de detecção. Através da técnica de m-CT foi possível dimensionar essas falhas, assim como visualizá-las e localizá-las, conforme mostrado na figura 1. Apesar da necessidade em alguns corpos de prova o uso de corante, a técnica foi considerada eficiente no âmbito de caracterizar e localizar microfalhas.

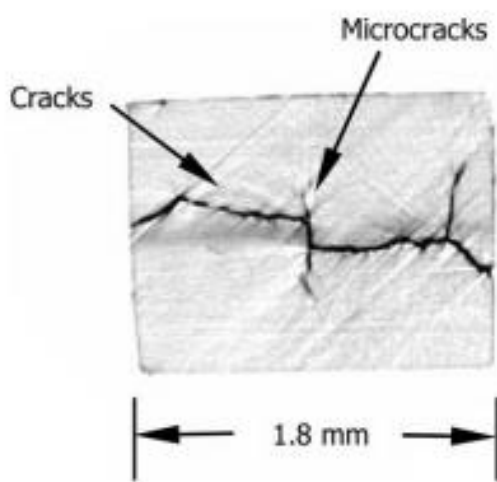


Figura 1: Imagem de m-CT de seção transversal de uma amostra de composto polimérico onde pode-se observar falhas (cracks) e microfalhas (microcracks). SCHINLLING *et al* (2005).

JAQUES *et al* (2014) com o intuito de detectar microfalhas em amostras de rochas provenientes do estado de Santa Catarina, Brasil, usou a técnica de microtomografia computadorizada por raios X. Buscou-se através das imagens detectar falhas na superfície das rochas, entre elas estrias, rugosidade e desníveis. As amostras foram colocadas dentro de tubos de acrílico e os espaços vazios preenchidos com esponjas (material de baixa densidade) para que elas ficassem imóveis. Foram escaneadas imagens através do microtomógrafo do modelo GE MS8x-130 com condições de aquisição de 130keV de tensão e 190 $\mu$ A de corrente. O tamanho de pixel foi de 20 $\mu$ m e usou-se filtro de cobre. Os autores concluíram que a técnica de m-CT é ferramenta útil para detectar microfalhas em superfícies minerais onde a alta escala de detalhes permitiu detectar e caracterizar a presença de cada



tipo de falha (estrias, rugosidade e desnível). Ressaltou-se ainda a possibilidade de detecção da direção em que as estrias se movimentavam devido à alta resolução.

LIMA *et al* (2007) relata que a m-CT, nos dias atuais, é um exemplo do progresso das técnicas de inspeção por raios X, no que se refere a resolução, da ordem de microns ( $10^{-6}$  m). Baseadas nesta técnica e junto a conhecimentos matemáticos e morfológicos, é possível investigar a configuração interna de amostras complexas, como ossos e implantes de titânio, por exemplo.

SANTOS (2015) conclui em seu trabalho que o uso da técnica de m-CT possui diversas vantagens por ser uma técnica de ensaios não destrutíveis, não havendo necessidade de preparo do corpo de prova e que tem como resultados imagens com alto poder de resolução permitindo visualizações de microestruturas. Concluiu também que é capaz de se obter uma variedade grande de parâmetros quantitativos, sendo muito útil no estudo de caracterização de estruturas e materiais, possibilitando estudos comparativos. A técnica de m-CT se mostrou bastante eficaz quanto a sua transdisciplinaridade, ou seja, o fato dela ser eficiente para diversos ramos da indústria, como por exemplo biologia, odontologia, indústria petrolífera, geologia, entre outros.

Há uma grande variedade de materiais e estruturas aos quais a técnica de m-CT pode ser empregada. MIZUTANIA e SUZUKIB (2012) relatam que na área biológica essa técnica tem permitido visualizações tridimensionais de uma pluralidade de materiais, sendo eles de origem humana, insetos, ratos, entre outros. A capacidade e acurácia da técnica em visualizar com alta resolução materiais leves (baixo número atômico) e tecidos finos confirmam a eficácia em analisar e observar o interior de estruturas de diferentes tipos de material.

LIMA *et al* (2008) descreve a m-CT como uma tomografia médica tradicional, onde é possível criar seções transversais de objetos tridimensionais. Na tomografia médica, a resolução é da ordem de  $60\mu\text{m} \times 60\mu\text{m} \times 1\text{mm}$  comparada ao sistema da m-CT que, graças ao microfoco do tubo de raios X, apresenta resolução da ordem de  $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$

dependendo do tamanho do corpo de prova. As projeções das estruturas são reconstruídas através do algoritmo matemático de Feldkamp e depois visualizadas em imagens 3D.

SILVA (2007) explica em seu trabalho que as propriedades de um certo material são influenciadas por sua estrutura. As rochas têm em sua estrutura os mecanismos de sua formação, na biologia a estrutura de órgãos e tecidos está ligada à sua funcionalidade. As estruturas em sua maioria são opacas, ou seja, a opacidade impede a visualização de seu interior. A observação destas estruturas ocorre através de seções de corte ou por reconstrução a partir de fatias finas. O método por fatias finas consiste em fatiar a estrutura e depois tentar reconstruí-la tridimensionalmente. A questão abordada em seu trabalho era como caracterizar uma estrutura em 3D através de suas fatias em 2D, e este método de transformar aspectos bidimensionais em tridimensionais reais denominou-se estereologia. O autor, portanto, definiu estereologia como conjunto de procedimentos baseados em geometria e probabilidade que a partir de medições e/ou contagens de elementos estereológicos de uma imagem plana de uma estrutura tridimensional, gera informações sobre a estrutura geral da amostra. As características estruturais as quais podem ser determinadas pela estereologia são volumes, áreas, comprimentos, entre outros.

O objetivo do estudo de BARBIER *et al*, 1999 foi aplicar a tecnologia de m-CT em ossos de rato, o que antes era bastante complicado devido às dimensões do animal serem muito pequenas (diâmetro trabecular nos ossos dos ratos é menor que 100 $\mu$ m) e concluiu-se que a técnica de m-CT permite uma resolução menor do que a espessura da trabécula, oferecendo imagens reais em 3D. Estas imagens em 3D foram as primeiras imagens publicadas de um osso da vértebra de um rato, mostrando a capacidade do sistema em analisar microestruturas de modo eficiente e não destrutivo.

Nesse trabalho foram utilizados 03 (três) parâmetros usados para quantificar ossos através da técnica de m-CT e eles são baseados em conceitos estereológicos. O primeiro é conhecido como BV/TV que é a razão entre o volume de osso presente na amostra e o volume total da mesma. O segundo é conhecido como número trabecular, TbN. O terceiro se refere a

razão entre a superfície de osso e volume de osso, escrita como BS/BV. O quarto se refere à espessura trabecular, TbTh enquanto o quinto é a separação trabecular, TbSp.

VIDAL *et al* (2014) analisou 06 (seis) amostras de ratos de mesmo sexo e idade. As amostras foram escaneadas no sistema Skyscan 1174 m-CT, com um filtro de alumínio de 0,5mm, operando com voltagem de 50kV e 40W de potência. Os tamanhos de pixel variaram entre 33,3 $\mu$ m, 15,0 $\mu$ m e 9,5 $\mu$ m, totalizando 18 aquisições. Todas as imagens foram reconstruídas da mesma maneira, assim como os mesmos coeficientes de atenuação e condições de binarização e valor de *threshold* (TH). Comparações entre os parâmetros morfométricos vistos acima foram feitas e após concluiu-se que os valores dos parâmetros variam conforme variam os tamanhos de pixel, pois conforme aumenta o tamanho do pixel, a imagem é afetada, como por exemplo, no que se relaciona a perda de detalhes, alterando os valores dos parâmetros.

LIMA *et al* (2006) discute em seu trabalho que uma das aplicações da m-CT é na área biomédica no que se refere à caracterização de ossos para diagnósticos de osteoporose e realça a importância da binarização no processo. Cada imagem gerada representa a estrutura óssea que contém informações que podem ser atenuadas e quantificadas conforme parâmetros específicos. O coeficiente de atenuação da água (CT) é usado como parâmetro, ou seja, se o material tem CT positivo, representando estrutura densa, aparecendo com pixels claros, caso contrário, aparecerá com pixels pretos. Para isso, o processo de binarização tem extrema importância, onde um valor limiar de TH é escolhido para separar o que é osso (pixels brancos) de não osso (pixels pretos). Se o valor de TH é alto, a estrutura óssea fica superdimensionada, caso seja muito pequeno, perde-se informação, concluindo que este processo tem grande importância pois reflete diretamente nos resultados, como pode ser visto na figura 2.

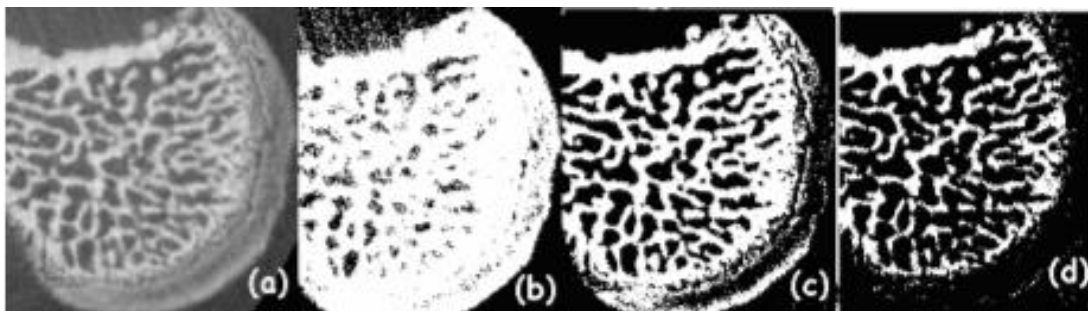


Figura 2: Exemplos de valores de threshold. (a): imagem original; (b): alto valor de TH; (c): melhor valor de TH; (d): baixo valor de TH (LIMA et al, 2006)

Com um desafio ainda maior, MARTÍN-BADOSA *et al* (2003) propuseram investigar casos de osteoporose em camundongos, que apresentam espessura óssea menor do que a de ratos, requerendo resoluções ainda maiores. Desejou-se calcular parâmetros como BV/TV, TbN, BS/BV, TbTh e TbSp, além de separar as estruturas em cortical (osso rígido) e trabecular (placas, arcos e cartilagem). A espessura cortical é da ordem de 130 $\mu$ m, porém a espessura trabecular de camundongos por ser bem fina (ordem de 30 $\mu$ m) revela a necessidade de resoluções bem altas. Um total de 16 ossos femorais foram analisados com tamanho de pixel de 6,65 $\mu$ m. Os resultados se mostraram eficientes originando imagens em 3D em alta resolução em que os parâmetros desejados foram calculados e foi possível separar as regiões cortical e trabecular com eficiência, conforme mostra a figura 3.

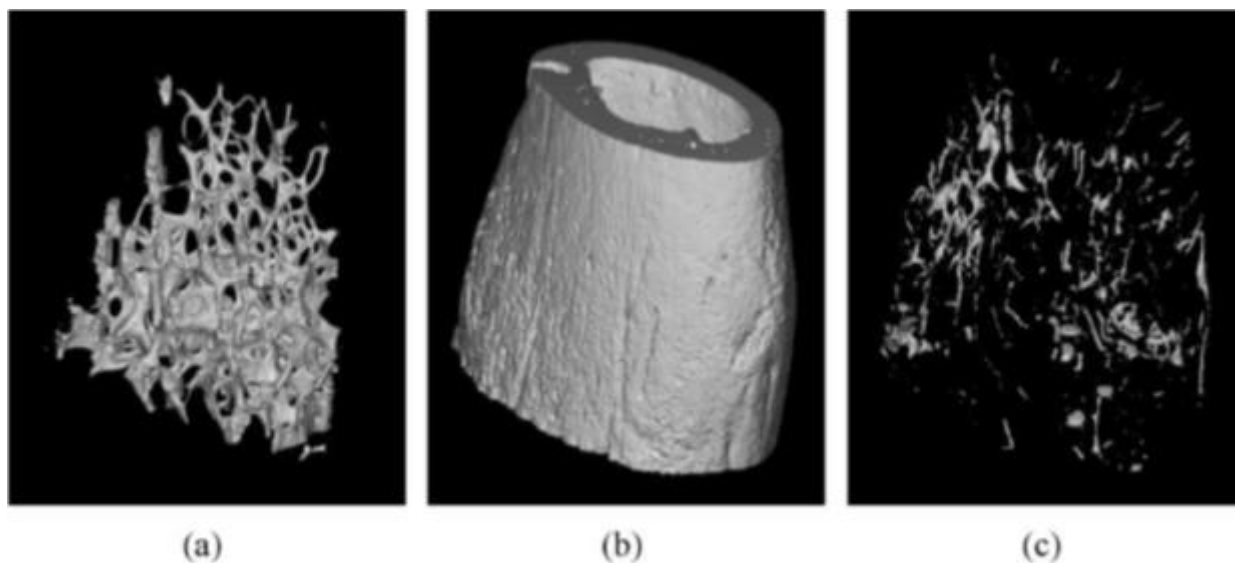


Figura 3: Imagens em 3D do (a): osso trabecular, (b): osso cortical, (c): espaço poroso - BADOSA et al (2003).

Em um estudo relacionando o tamanho e formato do crânio de primatas de pequeno porte com o tamanho do cérebro, ARISTIDE *et al* (2015) usou a técnica de microtomografia computadorizada para analisar e quantificar o formato dos crânios. Um total de 142 amostras de crânios foram escaneadas no *scanner* Skyscan/Bruker 1173, com 55kV e 8W. O tamanho de pixel variou entre 45 e 67 $\mu$ m. As imagens em 3D foram geradas e para se obter uma estimativa bem precisa entre o formato do crânio e o volume de massa cerebral usou-se um valor de *threshold* em que era possível separar claramente o que era osso do que era espaço vazio. Finalmente, através do software Meshlab obteve-se o volume correspondente ao espaço cerebral, concluindo que o espaço reservado ao cérebro tem influência direta com o tamanho do crânio.

RODRIGUES *et al* (2015) usa a técnica de m-CT para analisar casos de fraturas não-unidas e sua recuperação, ou seja, falhas na consolidação óssea em um local de fratura. Seis ratos de 3 meses de idade, pesando entre 350-400g foram submetidos a fraturas em seu fêmur esquerdo. Após cirurgia para curar a fratura e período de recuperação adequado, as amostras ósseas foram submetidas para análise através da técnica de microtomografia computadorizada por raios X. Usou-se o scanner Skyscan/Bruker 1173 com voltagem de 70kV

e corrente de 114 $\mu$ A, usou-se um filtro de Alumínio de 1,0mm e matriz de 2240x2240 pixel, com tamanho de pixel de 9,91 $\mu$ m. As projeções foram obtidas a passos angulares de 0,3° e 180° de rotação. As projeções foram reconstruídas através do software Nrecon Skyscan 1.6.9.4 e InstaRecon 1.3.9.2. As análises ocorreram através de visualização das amostras em 3D através do software Skyscan CTvox 3.0. Observou-se através das visualizações em 3D que cada amostra de fêmur apresentou fratura não-unida. A alta resolução permitiu visualizar também linhas que representam pequenas fraturas em cada parte das fraturas não-unidas.

PAULUS *et al* (2000) diz em seu trabalho que nos últimos 30 anos as tecnologias de diagnósticos por imagem revolucionaram a medicina. Nos anos mais recentes, a microtomografia de alta resolução se tornou uma ferramenta útil no estudo de animais de pequeno porte, primeiramente no que se relaciona a parte óssea devido ao alto contraste entre tecido mole e tecido calcinado (osso), mas também se mostrou bastante eficiente em análises entre tecidos com contrastes médios. Analisando 2 tipos de câncer em estruturas de densidade diferentes (pulmão e osso), concluiu-se que a m-CT e os avanços em seus hardware e software permitiram que esta técnica se tornasse uma nova e efetiva ferramenta no estudo para casos de câncer em animais, promovendo imagens com alta resolução, resultados rápidos e boa sensibilidade no que se diz respeito às diferenças de tecido mole ou calcificado.

Juntamente com a radiografia e tomografia, SWAIN e XUE (2009) observaram que a técnica de microtomografia computadorizada ganhou espaço por ser uma técnica eficaz e não invasiva e observaram seus avanços desde quando era voltada para diagnósticos médicos. Eles usaram a m-CT em estudos odontológicos e compararam as imagens em 3D com as 2D geradas pela radiografia e observaram que a resolução das imagens geradas pela tomografia tradicional não era tão alta. Foram analisadas as medidas dos dentes, morfologias de raízes e canais dentários e estudo de espessura do esmalte do dente. Foi concluído que a técnica fornece imagens com alta resolução e é capaz de fazer análises qualitativas e quantitativas em diversas áreas da odontologia.

MAGWAZA e OPARA (2014) investigaram a estrutura interna de uma romã usando a técnica de CT. O objetivo era observar, caracterizar, analisar e quantificar a estrutura interna de uma fruta romã sem abri-la comparando a técnica a uma em que a fruta necessitou ser aberta (destruindo o corpo de prova). As condições de aquisição foram de 200kV de voltagem e corrente de 100 $\mu$ A, sendo escaneadas em um tomógrafo VTomeX L240. Foi calculado através das imagens geradas em 3D os volumes referentes ao espaço ocupado por ar ( $7,82 \pm 1,09$ mL), albedo ou bagaço ( $167,29 \pm 16,54$ mL) e arils ou semente comestível ( $182,11 \pm 17,04$ mL) estimados por contribuir respectivamente em 2,22%, 46,86% e 50,92% no volume total da fruta. No modo destrutivo, os volumes de albedo e arils foram de  $166,08 \pm 14,69$ mL (46,07% do volume total) e de  $170,58 \pm 14,25$ mL (47,32% do volume total), respectivamente, resultado similar ao do ensaio não destrutivo. A diferença de 6,61% referente ao ensaio destrutivo pode ter sido referente ao espaço ocupado pelo ar, o qual não pode ser quantificado ao abrir a romã. O trabalho demonstrou que a capacidade de analisar imagens de modo não destrutivo fez diferença no cálculo das partes da fruta em comparação ao volume total da mesma e ainda ressaltou a alta eficiência na quantificação das estruturas em questão.

LIMA *et al* (2007) investiga em seu trabalho através da técnica de m-CT-3D o uso de implantes de titânio. Foi feita análise visual bi e tridimensional e parâmetros morfométricos (BV/TV, BS/BV, TbTh, TbSp, TbN e anisotropia) foram calculados. Para uma fixação adequada dos implantes, o material precisa ter superfície porosa o suficiente e a microtomografia se mostrou eficaz em caracterizar com alta resolução esta estrutura porosa e complexa. O maior problema encontrado foi reconstruir as pequenas conexões da estrutura com clareza devido as dimensões muito pequenas dos poros. Devido a essa baixa espessura da estrutura, os fótons mais energéticos passavam praticamente direto sem serem absorvidos, comprometendo a qualidade e por isso, o sistema foi calibrado para operar com voltagem de 55kV e corrente de 0,27mA para se obter o melhor contraste possível. Este tipo de análise é usada na indústria metalúrgica para quantificar o nível de orientação dos grãos dentro de ligas e metais. Apesar das dificuldades encontradas, resultados coerentes foram

obtidos ilustrando que a m-CT-3D é uma técnica que pode ser usada para análise microestrutural e pode ser empregada também na área metalúrgica.

Envelhecer é um processo natural que afeta todos os seres vivos do planeta, que por consequência leva a degeneração fisiológica e anatômica (ANDREW, 2013). Nos vertebrados, o envelhecimento aparece em indivíduos com tempo de vida acima do tempo de vida média, porém nos peixes, o processo de envelhecimento é considerado uma curiosidade. Dados anatômicos e teratológicos revelam que a condição degenerativa do osso hiperostótico aumenta em peixes senis (SMITH-VANIZ e CARPENTER, 2007).

A espessura óssea é resultado da ossificação periosteal, acompanhada por uma reabsorção dos tecidos ósseos. Este fenômeno dá origem a ossos esponjosos que compõe a estrutura inchada e porosa circundada por um osso laminar cortical compacto. Todo osso considerado inchado é considerado um osso hiperostótico (AGUILERA, 1988). A hiperostose em peixes é frequentemente observada na crista supra-occipital do crânio, ponta ventral do cleitro, basipterígio, pterigóforos dorsais e anais, costelas pleurais e epipleurais e nas espinhas hematal e neural das vértebras.

A estrutura óssea nos peixes fornece rigidez e apoio, de modo que um sistema ósseo e muscular saudável é essencial para nadar, capturar presas e evitar predadores. Os peixes idosos são propensos a hiperostose. A patologia nas costelas pleurais, por exemplo, reduz a flexibilidade e ação síncrona da musculatura axial. Ossos hiperostóticos afetam a relação geométrica entre músculos e ligamentos, as propriedades mecânicas dos ossos e a resistência a tração dos músculos nadadores (AGUILERA, 1988).

O osso consiste principalmente de fibras de colágeno, osteocélulas e componentes minerais (COHEN *et al*, 2012). Ossos hiperostóticos são resultado de uma modificação orgânica microestrutural devido a degradação do colágeno. Ossos com hiperostose aumentam de tamanho em conjunto com o crescimento e envelhecimento do peixe (AGUILERA, 1988). Estes ossos podem ser identificados visualmente através de radiografias



que mostram deformações na estrutura óssea e podem ser confirmados através da densidade óssea.

# CAPÍTULO III

## FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### III.1 - RAIOS X

No final de 1895, o físico experimental Wilhelm Conrad Röntgen (figura 4) apresentou, através de sua publicação, a primeira descrição qualitativa dos raios X (MARTINS, R. A., 1998). Em seu trabalho, Röntgen não informou como descobriu, apenas informou como percebeu a presença dos raios X. Por esse trabalho, Röntgen recebeu o 1º Prêmio Nobel de Física, em 1901. O físico descreveu que ao passar corrente por um tubo de Crookes coberto com blindagem de papelão preto, observou numa folha de papel presente na mesa de trabalho a marca de uma linha preta.

LIMA e AFONSO (2009) expõem em seu trabalho que Röntgen descreveu algumas das propriedades que havia acabado de descobrir: *“Ela produzia luminescência em certos materiais fluorescentes, sensibilizava chapas fotográficas, mas em si era invisível ao olho humano, não parecia sofrer refração, nem reflexão e nem polarização. Não se tratava de luz (por ser invisível e atravessar grandes espessuras de madeira ou papel), não era igual aos raios catódicos (não sofria desvio com ímãs e tinha poder de penetração muito superior), nem os raios ultravioleta ou infravermelho (pelo seu poder de penetração).”*

Ainda em seu trabalho, MARTINS, R. A. (1998) relata que Röntgen procurava determinar as propriedades na nova radiação e ao estudá-la, pôde descobrir algumas propriedades básicas. Ele observou que se propagavam em linha reta e produzia sombras retangulares, penetravam grandes espessuras em vários tipos de material, mas observou que quanto mais denso eles eram (metais como o chumbo, por exemplo), mais fortemente os raios X eram absorvidos.

O físico pesquisou intensamente as propriedades dos raios X. Expondo diversos materiais de diferentes densidades a fim de mensurar seu poder de penetração e com o auxílio de um detector fluorescente e com a ajuda de sua esposa que disponibilizou sua mão ornamentada com um anel, realizou a primeira radiografia, mostrada na figura 5. (BUSHBERG *et al*, 2002).



*Figura 4: Wilhelm Conrad Röntgen, fotografia tirada em 1896.*



*Figura 5: Radiografia da mão da esposa de Röntgen, considerada a primeira radiografia da história.*

### III.2 - PRODUÇÃO DE RAIOS X

Após o descobrimento dos raios X, suas aplicações e características se tornaram assuntos de interesse. Os raios X são radiação eletromagnética e sua produção se deve principalmente às emissões de radioisótopos e às transições dos elétrons nos átomos através de equipamentos que emitem a radiação X. Esses equipamentos podem produzir os raios X quando elétrons acelerados se chocam em alta velocidade em um alvo metálico.

Este trabalho estuda a técnica de microtomografia computadorizada por raios X e devido a isto, este tópico apresentará somente a produção de radiação X por tubos geradores, que é o tipo de produção que é empregada na técnica.

Em 1895, Röntgen descobriu os raios X que foram produzidos quando um raio catódico atingiu um alvo sólido (KAPLAN, 1977). Ele descobriu que um tubo de raios catódicos produzia fluorescência numa tela (revestida de platinocianeto de bário) que se encontrava a certa distância do tubo. O efeito foi registrado como proveniente da radiação que vinha das paredes do tubo de raios catódicos. Descobriu-se também que a radiação X era capaz de enegrecer placas fotográficas e produzir ionização no gás ao qual passasse. Esta capacidade de ionização do gás foi usada para medir a intensidade da radiação. Constatou-se também que os raios X eram capazes de percorrer distâncias em linha reta sem sofrer desvios oriundos de campos elétricos e/ou magnéticos.

Os raios X são considerados radiação eletromagnéticas e sua geração é devido à desaceleração de elétrons rápidos ( $e$  carga de  $1,602 \times 10^{-19}$  C e  $m_e$  massa de  $9,109 \times 10^{-31}$  kg) quando estes interagem com um alvo metálico (BUZUG, 2008).

Na prática, os raios X são produzidos à baixa pressão, em um tubo de raios catódicos, o qual um alvo metálico (anodo) é situado do lado oposto do catodo. O anodo serve como alvo dos elétrons emitidos do catodo e das fontes de raios X. Geralmente, o catodo é um arame metálico que quando aquecido a uma determinada temperatura emite

termoelétrons. O anodo, ou anticatodo como também é conhecido, é geralmente metal de alta massa atômica, como o tungstênio, por exemplo (KAPLAN, 1977).

A corrente de elétrons que vem do catodo é gerada através da emissão de elétrons térmicos de fio aquecido até a temperatura de aproximadamente 2400~2700K. Deste modo, a energia de ligação dos elétrons do fio é superada e eles ficam livres (BUZUG, 2008). Ao aplicar um campo elétrico, estes elétrons são acelerados e se chocam com o anodo, onde a energia cinética se converte em energia eletromagnética, os raios X (cerca de 1%) e em energia térmica (cerca de 99%). A radiação proveniente desse choque dos elétrons com o alvo metálico (anodo) consiste de ondas com comprimentos que variam entre  $10^{-8}$  e  $10^{-13}$ m.

A energia da radiação X produzida dependerá da velocidade  $v$  do elétron (esta velocidade depende da diferença de potencial  $U_a$  entre o catodo e o anodo). Através do princípio da conservação de energia pode-se escrever a equação 1:

$$eU_a = \frac{1}{2} m_e v^2 \quad (\text{Equação 1})$$

A figura 6 ilustra um tubo de raios X. Os elétrons térmicos escapam de um filamento (catodo) quando este é aquecido. Os elétrons são acelerados quando submetidos a um campo elétrico entre o catodo e o anodo. A radiação X surge quando esses elétrons são desacelerados ao se chocarem com o metal do anodo.

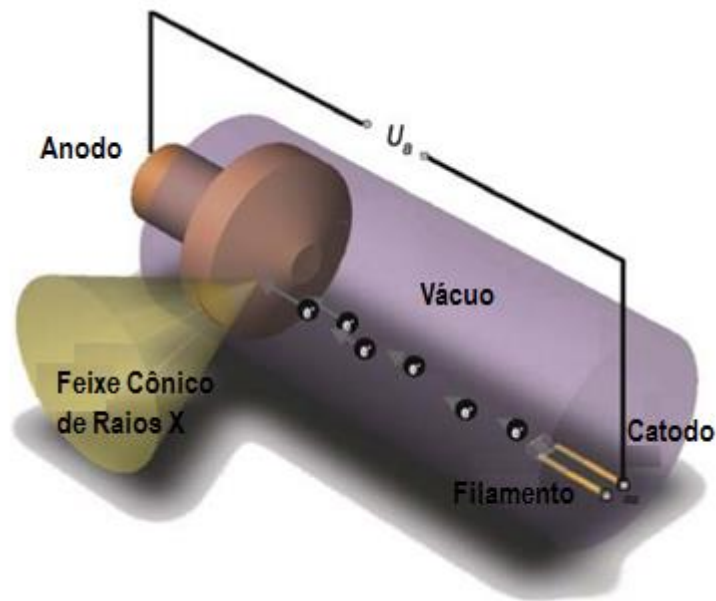


Figura 6: *Tubo de Raios X*, (adaptado de BUZUG, 2008).

Com a chegada dos elétrons acelerados no anodo, eles sofrem desaceleração pelas forças elétricas (Coulombianas) dos elétrons presentes na eletrosfera do material do anodo (BUZUG, 2008). Sabe-se que a aceleração e desaceleração de partículas carregadas, como os elétrons, cria um dipolo elétrico e geram ondas eletromagnéticas. Geralmente, vários fótons surgem devido à desaceleração de um único elétron, mas pode ocorrer que toda a energia do elétron ( $eU_a$ ) se transforme em um único fóton, o que é definido como energia máxima ( $E_{max}$ ) dos raios X, determinado através da equação 2.

$$eU_a = hv_{max} = E_{max} \quad \text{(Equação 2)}$$

A energia máxima ( $E_{max}$ ) é alcançada quando o comprimento de onda é mínimo ( $\lambda_{min}$ ), conforme mostrado na equação 3, onde  $h$  é a constante de Planck ( $6,626 \times 10^{-34}$  J.s) e  $c$  é a velocidade da luz ( $2,998 \times 10^8$  m/s).

$$\lambda_{\min} = \frac{hc}{eU_a} \quad (\text{Equação 3})$$

Quando ocorre um processo em que elétrons são retirados da eletrosfera do átomo, o espaço vago deixado por ele é preenchido por elétrons de camadas superiores. Ao passar de um orbital superior para um inferior, ou seja, deixar um orbital em que possui menor energia de ligação para um com maior energia de ligação (por estar mais perto do núcleo), o excesso de energia é liberado por meio de radiação eletromagnética (TAUHATA, 2003). A energia desta radiação é igual a diferença de energia entre o estado inicial e o final.

Os fótons emitidos podem revelar detalhes da estrutura eletrônica do elemento químico e sendo assim, seu elemento de origem pode ser identificado. Por essa peculiaridade, deu-se o nome de raios X característicos. Esta radiação X característica depende da diferença de níveis presente na eletrosfera e por isso, apresentam espectro de energia discreto. Seu range de energia está relacionado a energia de ligação de diversos níveis da eletrosfera e, portanto, podem variar de alguns eV a dezenas de keV.

A dependência dos níveis energéticos faz com o que espectro de energia da radiação liberada seja discreto e possa ser representado pela equação 4, onde os fótons emitidos podem ser caracterizados com comprimentos de onda definidos (TAUHATA, 2003). Os índices *i* e *j* representam na equação 4 os diferentes níveis de energia.

$$\lambda = \frac{hc}{E_i - E_j} \quad (\text{Equação 4})$$

Por outro lado, os elétrons ao serem desacelerados (ou freados) devido a interação deles com o campo elétrico e os elétrons do anodo, perdem energia cinética, mudam

de direção e emitem a diferença de energia sob a forma de ondas eletromagnéticas (TAUHATA, 2003). Essas ondas eletromagnéticas são chamadas de raios X de frenamento ou *Bremsstrahlung*. Sua energia está diretamente ligada a energia incidente e com o ângulo de saída. A energia da radiação produzida pode variar de zero a um valor máximo, com espectro de energia contínuo.

Como na produção dos raios X são gerados também radiação X característica (devido a interação do elétron com o anodo), estes somam-se ao espectro contínuo referente ao de frenamento e aparecem como picos destacados neste espectro.

A figura 7 ilustra o espectro de raio X como sobreposição do espectro contínuo (frenamento ou *Bremsstrahlung*) com o espectro característico (discreto) de um material. A distribuição dos níveis de energia dos elétrons de cada átomo é uma peculiaridade desse átomo, sendo assim, a energia de um raio X emitido pode identificar o átomo que o emitiu.

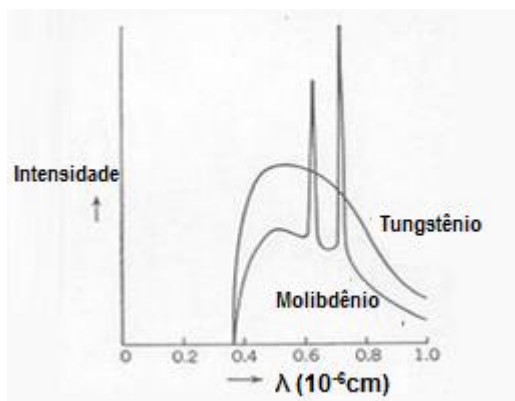


Figura 7: Espectro de raios X do Tungstênio e do Molibdênio, com a sobreposição do espectro discreto (picos) sobre o contínuo de *Bremsstrahlung*. Para o tungstênio só aparece o *Bremsstrahlung* nas energias representadas. Já para o molibdênio aparecem tanto espectro contínuo como o discreto. (adaptado de Curso de Formação de Professores, USP – 2009)



### III.3 – INTERAÇÃO DA RADIAÇÃO X COM A MATÉRIA

Os raios X por serem radiação eletromagnética e possuírem caráter ondulatório, serem eletricamente neutros e não possuírem massa, podem penetrar em um material percorrendo grandes distâncias antes de sofrer a primeira interação (TAUHATA, 2003). Os principais modos de interação, excluindo as reações nucleares são o efeito fotoelétrico, o efeito Compton e a produção de pares.

Como nos microtomógrafos o intervalo de energia permite apenas que os raios X interajam através do efeito fotoelétrico e do efeito Compton e assim, somente estas 2 interações serão abordadas neste tópico.

#### III.3.1 – EFEITO FOTOELÉTRICO

Dada a energia de um raio X incidente sendo **E**, onde esta energia pode ser escrita através da equação 5, resultado da multiplicação da constante de Planck **h** pela frequência **v** do fóton.

$$E = hv \quad \text{(Equação 5)}$$

Se toda essa energia **E** for absorvida por um átomo e se a energia de ligação **B** for menor que **hv**, um elétron (geralmente da camada K ou L) será ejetado do átomo ao qual o fóton incidiu (BUZUG, 2008). O elétron ejetado sai com energia **T** igual a diferença da energia **E** do fóton incidente e a energia de ligação **B**, como mostrado na equação 6. O elétron ejetado também é conhecido como fotoelétron.

$$T = E - B = (hv) - B \quad \text{(Equação 6)}$$

Quando este elétron é ejetado, surge uma vacância na eletrosfera. Esta vacância é ocupada por elétrons de outros níveis superiores de energia. Como resultado deste preenchimento, a energia envolvida é liberada através de um ou mais raios X característicos (TAUHATA, 2003).

Caso a energia da radiação de sucessivos preenchimentos de elétrons em vacâncias for alta o suficiente para expulsar outro elétron de camadas mais externas, este elétron é denominado elétron de Auger (BUZUG, 2008). Os elétrons de Auger são consideradas partículas monoenergéticas.

O coeficiente de absorção do fóton  $\alpha$  depende da sua energia incidente  $E$  ( $h\nu$ ) e número atômico  $Z$  do material absorvedor. Demonstrou-se experimentalmente (BUZUG, 2008) que este coeficiente de absorção pode ser representado conforme a equação 7.

$$\alpha = k \frac{\rho}{A} \frac{Z^4}{(h\nu)^3} \quad (\text{Equação 7})$$

Na equação 7, o coeficiente  $\alpha$  depende da constante  $k$  referente à camada de energia envolvida, a densidade  $\rho$  e a massa atômica  $A$ . Deste modo, a absorção pode ser aproximada conforme a equação 8.

$$\alpha \propto Z^4 \lambda^3 \quad (\text{Equação 8})$$

Para baixas energias de fótons incidentes (da ordem de 50keV para alumínio e 500keV para chumbo, por exemplo), o efeito fotoelétrico é o principal contribuinte para o coeficiente de absorção (KAPLAN, 1977).

O efeito fotoelétrico é predominante para baixas energias e para elementos químicos de elevado número atômico  $Z$ . A probabilidade de ocorrência aumenta com  $Z^4$  e decresce rapidamente com o aumento da energia (TAUHATA, 2003).

A figura 8 ilustra o efeito fotoelétrico.



Figura 8: Representação do efeito fotoelétrico, (TAUHATA, 2003).

A direção de saída do fotoelétron em relação à direção do fóton incidente varia com a energia. Para baixas energias o elétron pode sair com ângulo de  $70^\circ$  (devido a efeito do campo elétrico e magnético que exercem influência sobre o fotoelétron). Já para energias altas, a probabilidade de o elétron sair na direção e sentido do fóton é alta.

Para elétrons do mesmo átomo, a probabilidade de ocorrência do efeito fotoelétrico é maior para os que possuem maior energia de ligação, isto é, os elétrons das camadas K, L e M. A maioria das interações (cerca de 80%) ocorrem na camada K, quando a energia de incidência  $E$  é maior que a energia de ligação na camada K,  $B_K$ . A figura 9 representa a curva que caracteriza o decréscimo da probabilidade de interação devido o aumento de energia do fóton. Esta curva contínua sofre um pico, chamado de pico de absorção K, que é quando a energia do fóton alcança a energia de ligação  $B_K$ . Este efeito também pode ocorrer na camada L quando o fóton atinge a energia de ligação  $B_L$ . (TAUHATA, 2003).

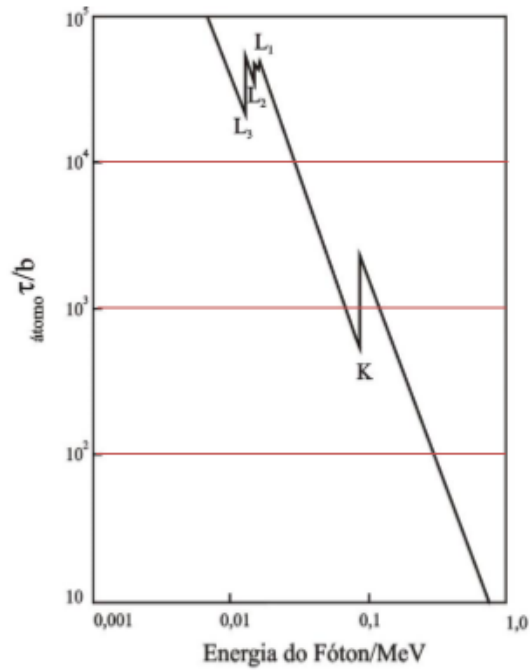


Figura 9: Representação dos picos de absorção K e L no chumbo devido ao efeito fotoelétrico, em função da energia da radiação, (TAUHATA, 2003).

### III.3.2 – EFEITO COMPTON

No efeito Compton, o fóton incidente sofre espalhamento, conforme mostrado na figura 10, por um elétron de baixa energia de ligação. Este elétron recebe somente parte da energia do fóton, sendo ejetado do átomo em outra direção e com menor energia (TAUHATA 2003).

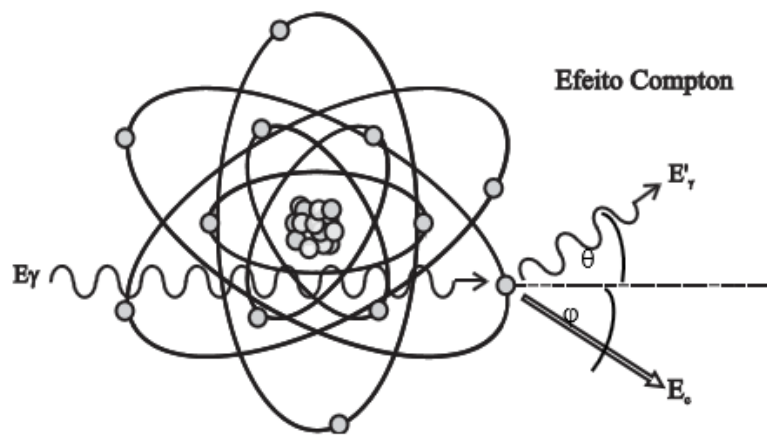


Figura 10: Representação do Efeito Compton, (TAUHATA, 2003).

A probabilidade do efeito Compton ocorrer varia com o número de elétrons disponíveis como alvos de espalhamento e aumenta linearmente com o número atômico  $Z$  (KNOLL, 2000).

Com o aumento da energia da radiação eletromagnética incidente, o espalhamento Compton, como também é conhecido, substitui o efeito fotoelétrico como principal interação da radiação X com a matéria (KAPLAN, 1977).

Um fóton de radiação X com energia  $h\nu$  ao colidir com um elétron com energia de ligação muito menor do que a do fóton, sofrerá uma colisão Compton (BUZUG, 2008). O fóton após sofrer a colisão continua a viajar pela matéria, porém possui agora menor energia do que a inicial e com um ângulo  $\Theta$  em relação sua direção inicial. O elétron que foi atingido é espalhado com um ângulo  $\Psi$ .

A energia do fóton espalhado  $E'$  depende da energia do fóton incidente  $E$  e do ângulo de espalhamento  $\Theta$ , em relação à direção do fóton incidente, dada pela equação 9. A energia se torna máxima quando  $\Theta=0^\circ$  e mínima quando  $\Theta=180^\circ$ .

$$E' = \frac{E}{1 + (1 - \cos \theta) \frac{E}{m_e c^2}} \quad (\text{Equação 9})$$

Na descrição da Física Quântica, a interação do fóton com o elétron, é tratada no formato de probabilidades de interação (TAUHATA, 2003). O espalhamento Compton pode ser descrito como resultado de dois processos, com diferentes estados intermediários:

*“1) O fóton incidente  $E = hv$  é totalmente absorvido pelo elétron, que então atinge um estado intermediário de momento  $hv/c$ . Na transição para o estado final, o elétron emite o fóton  $E' = hv'$ .”*

*“2) O elétron que emitiu o fóton  $hv'$  atinge um estado intermediário com momento  $(-hv/c)$ , ficando então presentes dois fótons  $hv$  e  $hv'$ . Na transição para o estado final, o fóton  $hv$  é então absorvido pelo elétron.”*

Existem casos em que há interações de fótons de baixa energia com elétrons muito ligados ao átomo, de modo que o átomo todo absorve o recuo e o fóton praticamente não perde energia, só muda de direção. Esse tipo de interação é denominado espalhamento Compton coerente ou efeito Rayleigh, e a direção de espalhamento predominante é para a frente. O efeito Rayleigh tem maior probabilidade de ocorrência para baixas energias dos fótons e para valores altos de  $Z$  (TAUHATA, 2003).

A figura 11 ilustra a probabilidade de ocorrência dos efeitos fotoelétrico e Compton, além do processo de produção de par que não foi abordado, mostrando a dependência da energia do fóton incidente e do número atômico do material absorvedor.

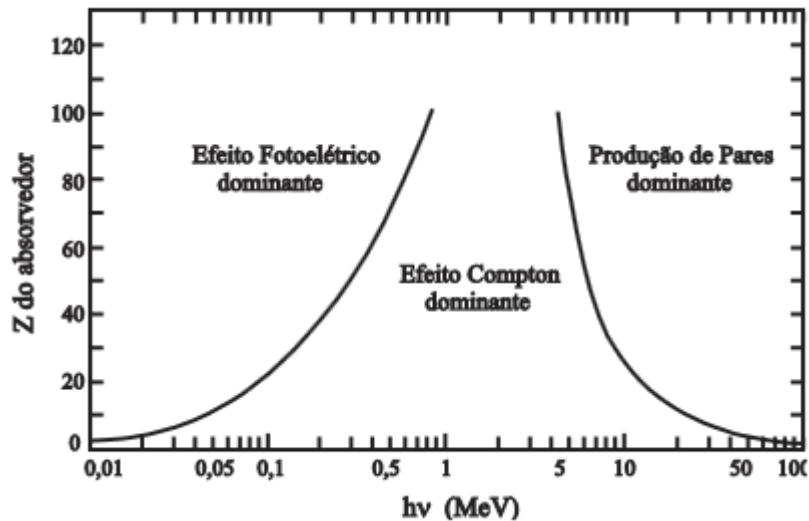


Figura 11: Influência do número atômico do absorvedor e da energia do fóton incidente na probabilidade de ocorrer certo tipo de interação da radiação eletromagnética com a matéria, (TAUHATA, 2003).

O efeito fotoelétrico predomina para os materiais que recebem energias de fótons com baixas energias, mas à medida que a energia cresce, o efeito fotoelétrico diminui ao ponto que efeito Compton se torna o efeito predominante. Com o aumento da energia, o efeito de produção de par se torna predominante.

A figura 12 representa a probabilidade de ocorrer os diferentes tipos de interação da radiação eletromagnética, no carbono e no chumbo, respectivamente, para diferentes energias do fóton incidente.

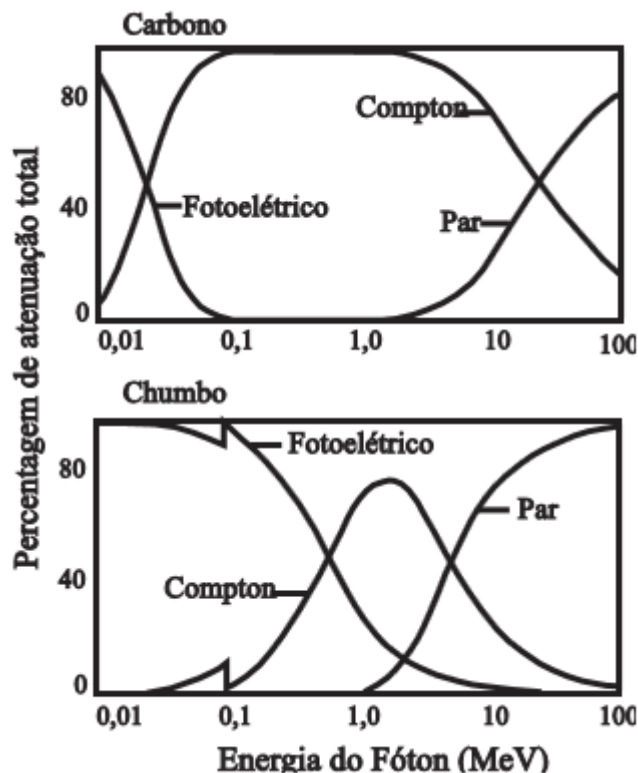


Figura 12: Influência de diferentes energias na probabilidade de ocorrer efeito fotoelétrico, Compton ou produção de par no Carbono e no Chumbo, (TAUHATA, 2003).

### III.4 – DETECTORES DE RADIAÇÃO

A radiação ionizante, como os raios X, interage com o meio transferindo sua energia para ele, e esta transferência ocorre basicamente pelo processo de ionização, da onde se origina o nome deste tipo de radiação.

O detector de radiação é um dispositivo que ao entrar em contato com a radiação vai ser capaz de indicar sua presença (TAUHATA, 2003). Geralmente um detector é constituído de um material sensível à radiação e um sistema que transforma os sinais (efeitos) que a radiação causou neste material sensível em uma grandeza de medição.

Existem vários processos pelos quais as radiações podem ser detectadas, como por exemplo a geração de luz, sensibilização fotográfica, geração de cargas elétricas, entre outros. Neste trabalho serão abordados os fatores de escolha de um detector, sua eficiência e sensibilidade. Além destes tópicos, será estudado com um maior aprofundamento o detector



plano tipo *Flat Panel*, este que constitui a grande maioria dos detectores utilizados nas técnicas de tomografia e microtomografia computadorizada.

### III.4.1- FATORES PARA ESCOLHA DO DETECTOR DE RADIAÇÃO

Para que um detector seja adequado para medir a radiação a qual foi submetido, é necessário que apresente algumas características, tais como:

i. Tipo de Radiação: Devido ao fato dos diferentes tipos de radiação (partículas carregadas leves ou pesadas, eletromagnética ou nêutrons) interagirem de maneira diferente com a matéria, a escolha do detector deve levar em conta o tipo de radiação a qual ele pretende mensurar.

ii. Precisão, exatidão e resolução: O objetivo da utilização do detector deve ser bem definido. Estes fatores estão associados as incertezas das medições e dependendo do objetivo, valores de incerteza altos não são aceitos.

iii. Intervalo de tempo de interesse: O fator tempo é levado em conta, como por exemplo se deseja uma medição instantânea ou uma medição acumulada. Para cada caso, um tipo de detector específico é mais indicado que outro.

iv. Tipo de informação desejada: O tipo de resposta que o detector apresenta após a medição é essencial para a escolha ideal do detector a ser usado e do mecanismo pelo qual a informação é coletada. Alguns apresentam informações quanto a energia detectada, enquanto outros quanto ao número de contagem, por exemplo.

v. Operação e custo: Fatores como a disponibilidade, custo do detector, facilidade de manuseio e de manutenção são fatores importantes para a escolha do detector.

vi. Condição de trabalho: A escolha do detector deve levar em consideração o meio a qual ele está exposto. Se for para trabalho de campo, por

exemplo, opta-se por um detector robusto, pouco sensível à choques mecânicos, enquanto que para detectores medidores que operam dentro de um laboratório, essas características não são necessárias.

Existem vários processos pelos quais os diferentes tipos de radiação interagem com um meio material e a escolha do detector a ser usado é influenciada pelos fatores apresentados. A escolha de um determinado tipo de detector tem que ser aquela em que atenda a todos estes fatores da melhor maneira possível.

### III.4.2 – EFICIÊNCIA DOS DETECTORES DE RADIAÇÃO

Considerando que cada registro causado pela radiação com a matéria possa ser representado por um sinal (podendo ser sinal luminoso, pulso, entre outros), a eficiência de um detector de radiação pode ser vista de 2 maneiras:

i) Eficiência Absoluta ( $\epsilon_{ABS}$ ):

$$\epsilon_{ABS} = \frac{\text{NÚMERO DE SINAIS REGISTRADOS}}{\text{NÚMERO DE RADIAÇÕES EMITIDAS PELA FONTE}} \quad (\text{Equação 10})$$

A eficiência absoluta de um detector está relacionado com as características de construção dele e também é influenciada pela fonte de radiação, como por exemplo a distância a qual está sendo emitida, o tipo de feixe (colimado ou radial) e até mesmo o meio entre a fonte e o detector.

ii) Eficiência Intrínseca ( $\epsilon_{INT}$ ):

$$\epsilon_{INT} = \frac{\text{NÚMERO DE SINAIS REGISTRADOS}}{\text{NÚMERO DE RADIAÇÕES INCIDENTES NO DETECTOR}} \quad (\text{Equação 11})$$

A eficiência intrínseca de um detector é influenciada por fatores como o número atômico do material sensível à radiação no detector, o tipo e a energia da radiação incidente, o estado físico do material sensível, entre outras características relacionadas as propriedades físico-químicas dos seus materiais constituintes.

### **III.4.3 – SENSIBILIDADE DOS DETECTORES DE RADIAÇÃO**

Dada uma radiação incidente, a sensibilidade de um detector é a sua capacidade em gerar um sinal utilizável proveniente desta radiação. Ela está diretamente ligada ao volume de material sensível e a massa do detector, assim como a seção de choque para reações de ionização, já que estes fatores estão diretamente ligados à probabilidade da radiação incidente provocar ionização. As seções de choque para este tipo de interação geralmente são muito pequenas, portanto um volume e uma massa maior são necessários para conseguir uma taxa de interação razoável.

Outro fator que afeta a sensibilidade é o material envólucro do volume sensível à radiação no detector. Este material acaba absorvendo parte da radiação incidente e somente radiação com energia suficiente para atravessar a espessura deste envólucro poderá ser detectada.

A sensibilidade também é afetada pelo ruído intrínseco do detector que está sempre presente, havendo radiação ou não. A ionização deve apresentar quantidade mínima capaz de gerar um sinal que possa ser processado. Esta quantidade é dependente da eletrônica envolvida no detector assim como seu ruído, que é a flutuação na corrente ou tensão. O sinal gerado pela radiação incidente deve ser maior que o nível de ruído para ser detectado.

#### III.4.4 – DETECTORES FLAT PANEL

Os detectores flat panel, ou detectores tipo plano, originalmente foram criados para serem empregados juntamente a técnica de radiografia digital, mas seu sistema foi difundido para o emprego na tecnologia de m-CT.

Em meados da década de 1990, estudos mostraram a viabilidade de usar matrizes de filmes finos de silício amorfo para adquirir uma imagem por raios X de projeção bidimensional (SEIBERT, 2006).

Os detectores flat panel são compostos por sensores que contém um fotodiodo e um transistor de filmes fino (TFT – thin film transistor) e ambos são feitos de silício amorfo (a-Si) em um substrato de vidro. A matriz de pixels é coberta com uma camada de material sensível a radiação X (geralmente iodeto de cério – CsI). A base contém substrato de vidro com matriz contendo 2048x2048 sensores, cada um medindo 200 $\mu$ m (BUZUG, 2008).

A arquitetura básica de um dispositivo TFT/a-Si é organizada como uma grande matriz com fileiras e colunas de elementos detectores, como mostra a figura 13. Dentro de cada elemento detector estão presentes o TFT, um eletrodo e um capacitor de coleta de carga. A conexão entre estes elementos ocorre através de portas (gates). Quando esta porta para o TFT está fechada, o que é durante a exposição aos raios X, a radiação interage com a matéria (cintilador) e produz fótons de luz. Quando a exposição chega ao fim, uma linha de cada vez é ativada de modo que os fótons interajam com o arranjo TFT de modo a ativar todos os TFTs conectados ao longo da linha. Ocorre então produção de carga que fica armazenada no capacitor que posteriormente flui dos capacitores pelos transistores e desce para os amplificadores de carga. (SEIBERT, 2006).

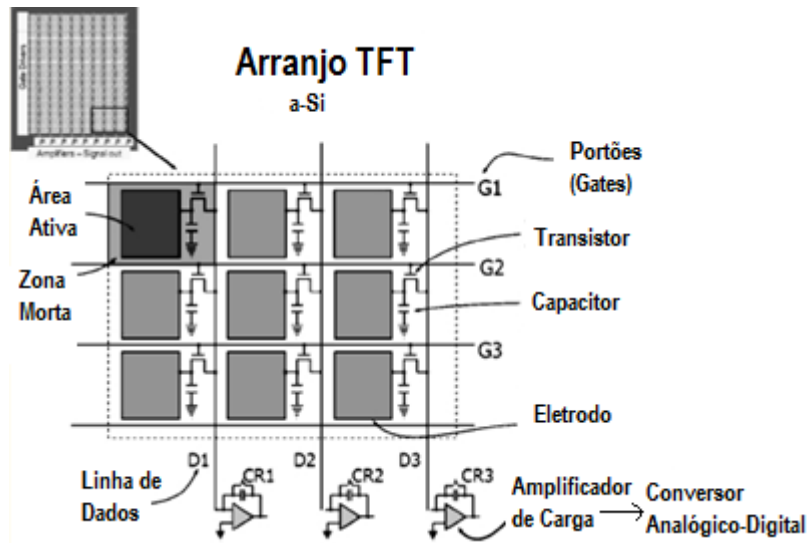


Figura 13: Composição de uma matriz de TFT/a-Si, (adaptado de SEIBERT, 2006).

O processamento de sinais ocorre no interior do detector quando a radiação X é convertida em luz através de materiais cintiladores. Os fótons de luz são levados para os fotodiodos onde são absorvidos e produzem carga elétrica proporcional à intensidade da radiação. Esta carga elétrica é então transformada em sinal analógico e com a ajuda de conversores e amplificadores, o sinal analógico se transforma em sinal digital, gerando imagem digital (BUZUG, 2008). A figura 14 ilustra a conversão de sinal em um detector flat panel.

Apesar do arranjo TFT e a eletrônica associada serem comuns aos detectores flat panel, existem diferenças na detecção dos raios X dependendo do material cintilador que é escolhido para absorver a radiação e produzir fótons de luz. Os detectores indiretos usam material cintilador de fósforo, que absorve os raios X e produz um número proporcional de fótons de luz que vão interagir com o arranjo TFT e produzirão carga correspondente no capacitor do elemento (SEIBERT, 2006), como esquematizado na figura 15. Os fósforos podem ser ou não estruturados, como o CsI e  $Gd_2O_2S$ , respectivamente. Os benefícios dos não estruturados são seu custo baixo e características físicas inertes, porém apresentam baixa eficiência de absorção. Os estruturados apresentam boa eficiência de resolução e

proporciona alta resolução, porém são materiais muito frágeis. Devido à boa absorção e a boa resolução, o fósforo estruturado (CsI) é amplamente empregado.

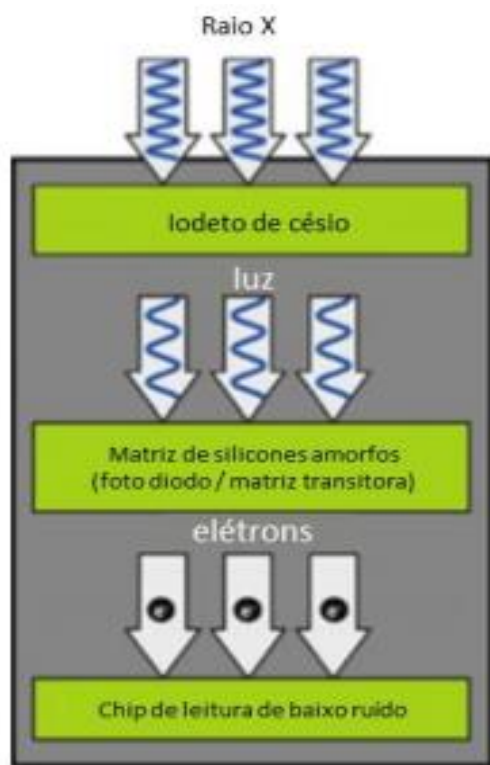


Figura 14: Ilustração do processo de detecção de sinal em um detector flat panel (adaptado de BUZUG, 2008).

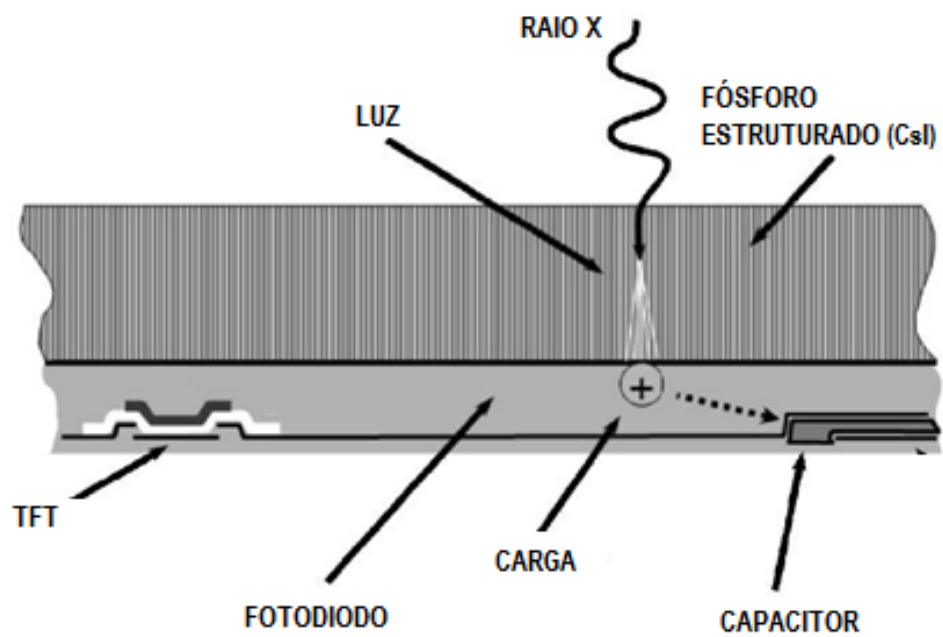


Figura 15: Ilustração da seção transversal de um detector flat panel utilizando como cintilador o CsI. A radiação X é convertida primeiramente em luz, viaja através da estrutura do fósforo estruturado até o fotodiodo acoplado ao sistema TFT, onde será gerado carga proporcional que será armazenada no capacitor, (adaptadp de SEIBERT, 2006).

# CAPÍTULO IV

## TOMOGRAFIA E MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA

### IV.1 – TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA

Desde a descoberta dos raios X pelo cientista Röntgen, eles vinham sendo utilizados nos diagnósticos médicos através de técnicas de radiografia e radioscopia. Com o passar do tempo e os avanços tecnológicos junto a introdução de aparelhos mais potentes e de qualidade, a chegada do computador foi fundamental para um novo passo no uso da radiação X. O computador entrou como ferramenta para realizar cálculos matemáticos a partir das atenuações dos fótons de raios X.

Em 1921 o cientista Bocage desenvolveu um sistema de tomografia, onde um conjunto de radiografias juntas revela uma seção fina do corpo. Este sistema era composto por um tubo de raios X e um detector. O corpo a ser estudado foi colocado entre o tubo e o detector. Para conseguir obter os detalhes em uma fatia de CT, foi necessária uma reconstrução matemática da imagem de modo a ser possível relacionar a atenuação dos feixes de raios X com a densidade do material (FRIENDLAND e THURBER, 1996).

Os cientistas Ambrose e Hounsfield em 1972 (CARVALHO, 2007) apresentaram um novo método para o uso da radiação X. O objetivo deles era medir discontinuidades de densidades do cérebro através de imagens. Neste trabalho, seriam realizadas diversas medidas de transmissão dos fótons de raios X em diversos ângulos diferentes. O computador entrou como ferramenta de cálculo para os coeficientes de absorção da radiação X pelos diferentes tecidos compostos pelo cérebro. Cada valor de coeficiente de absorção foi apresentado como ponto luminoso de intensidade diferente, variando do branco ao preto e



valores intermediários (cinza) de acordo com a densidade de cada tecido. Observou-se que todos os pontos juntos formaram uma imagem axial correspondente do cérebro que poderia ser estudada e avaliada.

A técnica de tomografia pode ser dividida em 2 partes que se complementam. A primeira delas envolve o processo de interação dos raios X com a matéria, ou seja, o escaneamento do objeto. A segunda parte ocorre como processamento dos dados, ou seja, o computador através de algoritmos matemáticos processa os dados obtidos na primeira etapa e gera imagens tomográficas axiais do objeto analisado. A segunda etapa também é conhecida como reconstrução.

O desenvolvimento de um algoritmo matemático ideal para reconstrução de imagens de CT foi de extrema importância. Atualmente a maioria das imagens são obtidas através de uma técnica conhecida como retroprojeção filtrada (FRIENDLAND e THURBER, 1996).

Historicamente, quatro gerações de CT surgiram. Suas classificações foram devidas ao modo como os detectores e os tubos de raios X foram construídos e como eles funcionavam durante o escaneamento. A seguir, serão apresentadas as 4 diferentes gerações de CT e suas características.

#### **IV.1.1 - 1ª GERAÇÃO**

O sistema da primeira geração de CT ficou conhecido como “feixe de lápis” pois consistia em um tubo de raios X que emitia um único feixe de radiação, semelhante a uma agulha. Esse feixe vinha de um cone de raios X e atravessava um colimador. No lado oposto do tubo de raios X, um único detector era disposto. Este detector se movia de forma sincronizada e linear com o tubo (BUZUG, 2008). A representação de um tomógrafo de primeira geração pode ser vista na figura 16.

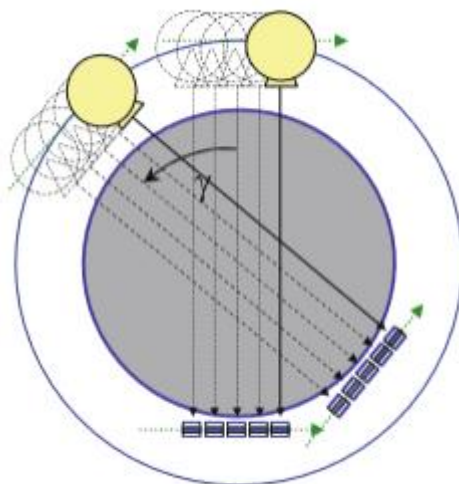


Figura 16: Representação de um tomógrafo de 1ª geração, (BUZUG, 2008).

Dependendo das diferentes densidades do corpo de prova a ser submetido à técnica de CT, os diferentes valores de atenuação dos raios X eram medidos pelo detector e gravadas digitalmente.

Cada deslocamento do tubo e do detector em ângulos  $\gamma$  (conforme ilustrado na figura 18) gerava uma radiografia simples e unidimensional. Para se obter uma imagem global do objeto, cada ponto dele deveria ser escaneado por todos os lados, desse modo, o tubo de raios X e o detector eram rotacionados  $180^\circ$  (BUZUG,2008).

O primeiro tomógrafo foi construído pela companhia EMI (*Electric and Musical Industries*) e foi baseado neste princípio. Em 1972, os cientistas Hounsfield e Cormack realizaram o primeiro escaneamento e no ano de 1979 ambos ganharam o prêmio Nobel de medicina pela invenção (BUZUG, 2008). A figura 17 mostra o Scanner EMI (imagem superior) usado por eles e a primeira imagem gerada que durou 9 dias para ser reconstruída (imagem inferior).

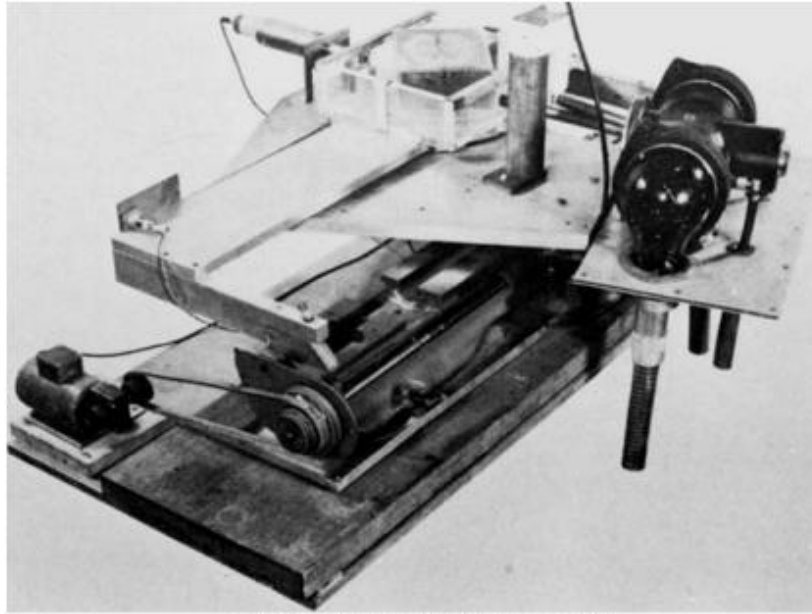


Figura 17: Scanner EMI (superior) e primeira imagem gerada (inferior), (BUZUG, 2008).

#### IV.1.2 – 2ª GERAÇÃO

A segunda geração consistia em um tubo de raios X que emitia feixe em formato de leque e um pequeno detector com 30 elementos que formavam uma matriz. Como a abertura angular para o feixe sair em formato de leque ainda era muito pequena ( $10^\circ$ ), tanto o tubo quanto o detector ainda necessitavam se mover linearmente (BUZUG, 2008). O esquema de um sistema CT de segunda geração é ilustrado na figura 18.

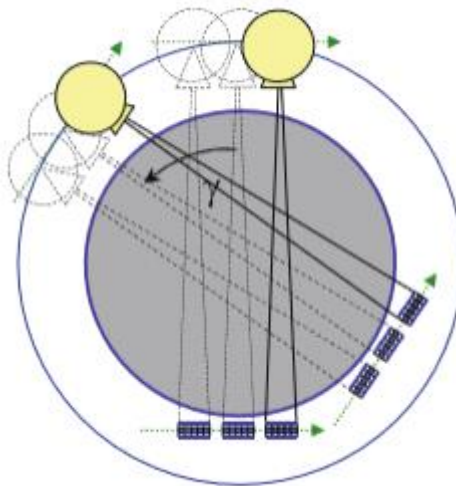


Figura 18: Representação de um tomógrafo de 2ª geração, (BUZUG, 2008).

Estas modificações permitiram redução no tempo de escaneamento para alguns minutos por fatia (*slice*) e a matriz de detectores passou a ser capaz de medir diferentes valores de densidade ao mesmo tempo.

Mesmo com estas modificações, o campo de medida ainda era muito restrito, além dos longos períodos de aquisição. A primeira e a segunda geração de tomógrafos eram restritas para mapear imagens cranianas (BUZUG, 2008). O espaço útil para aquisição era tão restrito que só um corpo de prova de tamanho semelhante a cabeça humana, por exemplo, poderia ser escaneado, enquanto que para outras regiões como o tórax, por exemplo, além do tamanho, o simples movimento do diafragma na respiração e o movimento natural dos órgãos interferiam na qualidade da imagem reconstruída. A figura 19 permite se ter uma ideia aproximadamente do tamanho do campo de medida para tomógrafos de 1ª e 2ª geração.



*Figura 19: Paciente sendo submetida à técnica de CT. O campo de medida é indicado pela seta (adaptado de BUZUG, 2008).*

#### **IV.1.3 – 3ª GERAÇÃO**

O principal objetivo da terceira geração foi reduzir o tempo de aquisição para menos de 20s. Este tempo dava margem para que um paciente pudesse prender a respiração e assim pudessem adquirir imagens do abdômen, por exemplo, com mínimo erro (BUZUG, 2008). Para isso, os tubos tiveram seus ângulos de saída do feixe de raios X aumentados de 10° (2ª geração) para uma faixa de 40° a 60°, além dos detectores passarem de 30 elementos (2ª geração) para detectores constituídos de 400 a 1000 elementos, como exemplificado na figura 20. Com estas mudanças, passou a ser possível medir o campo inteiro simultaneamente, reduzindo o tempo de aquisição consideravelmente.

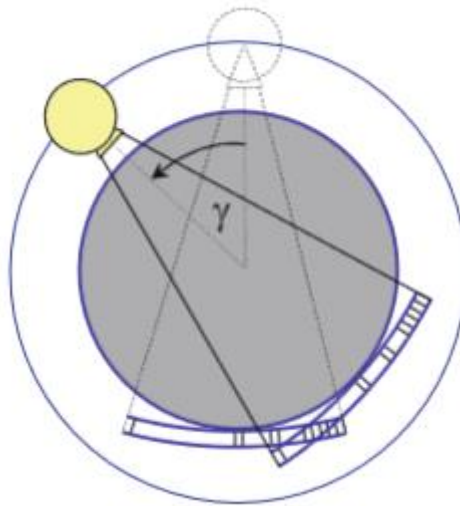


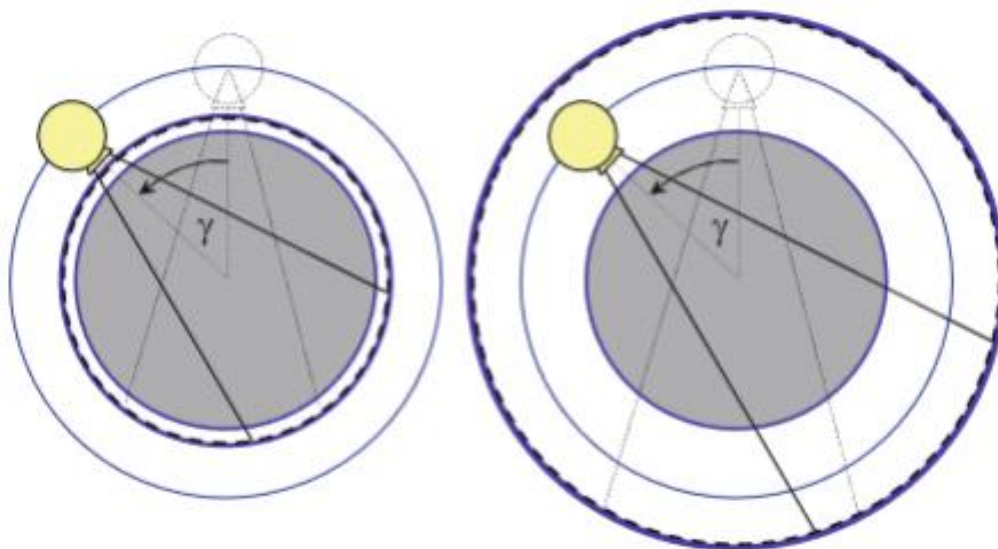
Figura 20: Representação de um tomógrafo de 3ª geração, (BUZUG, 2008).

Como consequência de todas as modificações, a terceira geração de CT abandonou o deslocamento linear do tubo de raios X, o que contribuiu também para a redução do tempo de aquisição. Atualmente a maioria dos *scanners* são de terceira geração (BUZUG, 2008).

Os aparelhos de 3ª geração apresentam tipicamente erros de imagem conhecidos como “artefatos de anel” (que serão abordados mais a fundo nos próximos tópicos deste trabalho). Estes erros ocorrem geralmente quando a matriz de detectores está mal calibrada.

#### IV.1.4 – 4ª GERAÇÃO

A 4ª geração de tomógrafos manteve os tubos de raios X iguais ao da geração anterior. O ângulo de saída se manteve o mesmo e a rotação em torno do campo de medida sem deslocamento linear também permaneceram idênticos. A maior diferença ocorreu quanto às mudanças aplicadas ao detector. Este passou a ser constituído de 5000 elementos, ser estacionário e em formato de anel, de modo que o tubo de raios X rotacionasse ao seu redor, internamente ou externamente, conforme esquematizado na figura 21.



*Figura 21: Representação de um tomógrafo de 4ª geração. Na esquerda o tubo de raios X rotaciona externamente aos detectores em formato anelar, enquanto que na direita o tubo rotaciona internamente ao anel de detectores, (BUZUG, 2008).*

Nos casos em que o tubo de raios X está fora do anel de detectores, algumas medidas preventivas tiveram que ser tomadas para que a radiação não os atravessassem. Deste modo, os detectores foram acoplados de maneira a ficarem inclinados para longe do caminho do tubo. Esta medida permite que os raios X atravessem somente o paciente e a mesa de apoio dele, não atravessando o detector (BUZUG, 2008).

## **IV.2 – MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA**

Ao fim da década de 80 surge a m-CT. Essa técnica nada mais é do que a tomografia com um tamanho de pixel menor, tipicamente usada para microscopias comerciais 3D não destrutivas (BUZUG, 2008). Diferentemente da tomografia com foco em diagnósticos médicos, os scanners de m-CT são comumente usados para teste e análises de materiais dos mais diversos tipos, como rochas, ossos, dentes, entre outros.

#### IV.2.1 – PRINCÍPIOS DA m-CT E AQUISIÇÃO

A m-CT é uma técnica que permite a visualização de seções transversais (cortes internos) de um objeto de forma não destrutiva. Seu funcionamento baseia-se no princípio de que os materiais ao absorverem os raios X provenientes do tubo, os absorverão de forma diferenciada dependendo de sua composição e densidade (FERNANDES, 2014).

Os objetos a serem analisados são dispostos no centro do microtomógrafo, de modo que fiquem posicionados entre o tubo e o intensificador de imagem e o detector, como mostrado na figura 22. Deste modo, os raios X emitidos atravessam o corpo de prova, no sentido longitudinal. Após a interação dos raios X com a matéria, a radiação não atenuada é captada pelo intensificador de imagens e em seguida, por um detector (BELINI *et al*, 2011).

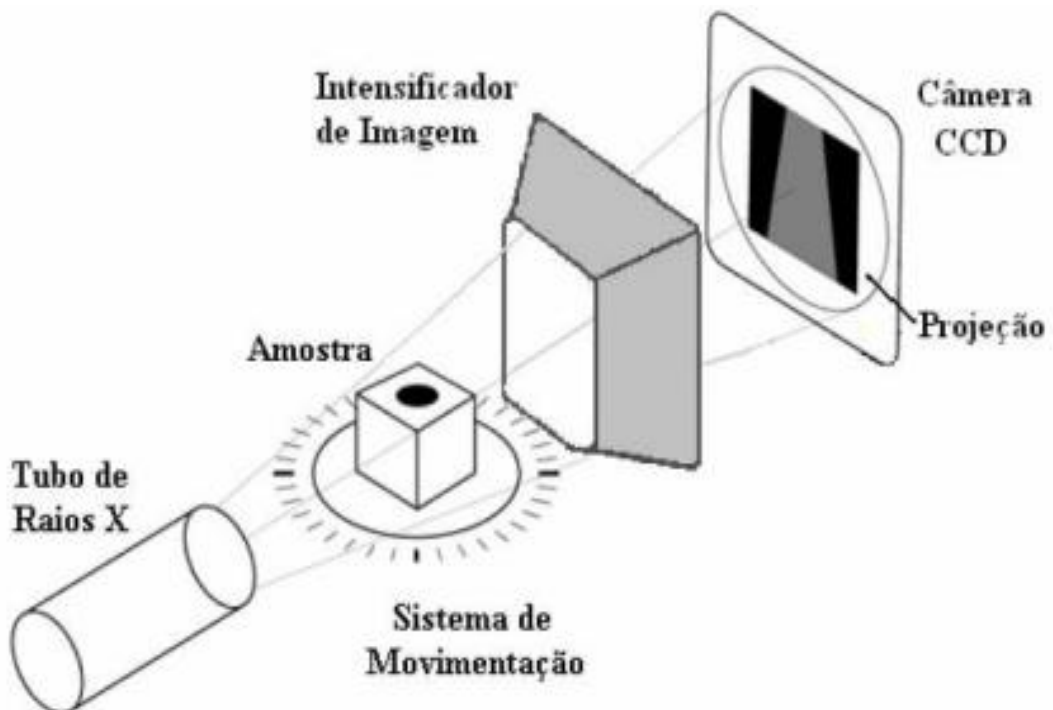


Figura 22: Princípio de funcionamento da M-CT e seus componentes. Destaque para a amostra que é disposta entre o tubo de raios X e o intensificador de imagem e o detector, (BELINI *et al*, 2011).



O escaneamento é feito de modo que as amostras rotacionam 360° ou 180° a passos angulares pré-definidos pelo operador, onde cada passo angular realizado, uma radiografia é tirada (LIMA *et al*, 2007). Após a rotação ser realizada por completo, as radiografias adquiridas são salvas e o processo de reconstrução se inicia, onde os sinais eletrônicos são transformados em sinais digitais pelo detector.

Os feixes de raios X são provenientes dos tubos e por cauda disto, são policromáticos, ou seja, o feixe possui fótons de energias variadas. Na aquisição, os fótons de baixa energia acabam contribuindo negativamente na qualidade da imagem, pois são absorvidos pela amostra. A absorção desses fótons gera um efeito de borda, conhecido como endurecimento de feixe (MACHADO, 2015). Como solução, usam-se filtros na saída do tubo (geralmente de alumínio ou cobre), o que permite a passagem dos fótons de alta energia e filtragem dos de baixa energia. Os filtros apesar de solução simples para o problema de endurecimento de feixes, são responsáveis por uma redução na intensidade de sinais, portanto a escolha do material e espessura do filtro são de grande importância na aquisição.

Existem outras duas maneiras de minimizar o endurecimento de feixes, são eles o método de linearização e o método de dupla energia. No primeiro, o endurecimento de feixe é responsável por uma descontinuidade na curva linear que relaciona a absorção com a espessura do material, e através da linearização desta curva, corrige-se os efeitos causados pelo endurecimento de feixes. Sua desvantagem é que somente pode ser usado para matérias compostos de um único material. Já pelo segundo método, materiais com mais de um elemento podem ter o efeito de endurecimento de feixe corrigidos. Após calibração prévia do microtomógrafo, este método se baseia na composição e densidade do material. Como o nome diz, ele leva em consideração dois valores de energia diferentes (2 espectros), o que permite que materiais com coeficiente de atenuação parecidos sejam diferenciados (JOVANOVIC *et al*, 2013).

## IV.2.2 – RECONSTRUÇÃO

O processo de reconstrução tem como objetivo criar a representação 3D do corpo de prova com base em todas as suas projeções que colocadas em sequência, formariam esta representação. Esta teoria é baseada no trabalho de Radon.

Os feixes mais utilizados na m-CT são de geometria cônica, conforme ilustrado na figura 23, que mostra também um detector flat panel.

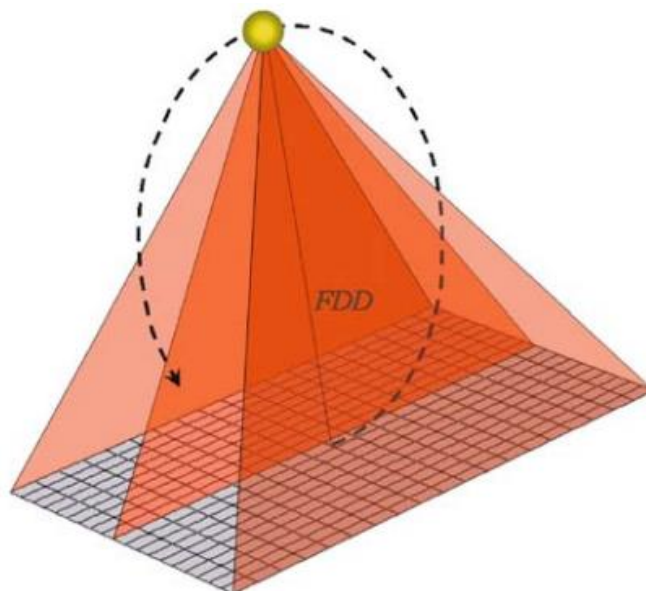


Figura 23: Geometria cônica de feixes junto com um detector do tipo flat panel, (BUZUG, 2008).

O processo de reconstrução é baseado em um caminho matemático onde os coeficientes de atenuação  $f(x,y)$  são obtidos. Este coeficiente pode ser visto através da equação 12, onde  $I_0$  é a intensidade do feixe incidente e  $I$  é a intensidade do feixe transmitido.

$$I = I_0 \cdot e^{-\int f(x,y)dl} \quad \text{(Equação 12)}$$

Como os feixes de raios X provenientes dos tubos são policromáticos, a Equação 12 pode ser reescrita de forma a ser acrescentado os níveis de energia dos fótons:

$$I = \int_0^{E_{\text{máx}}} I_0 \cdot e^{-\int f(x,y,E) dE} \quad (\text{Equação 13})$$

A equação 13 pode ser reescrita de modo que a transformada de Radon possa ser obtida. Nesta equação, a intensidade da radiação registrada pelo detector pode ser expressa por uma integral de linha dos coeficientes de atenuação. A equação 14 representa a transformada de Radon ( $\mathbf{P}(\Theta, t)$ ), onde  $x \cos \theta + y \sin \theta = t$ .

$$\int f(x, y, E) dE = -\ln(I/I_0) = P(\Theta, t) \quad (\text{Equação 14})$$

Esta transformada precisa ser invertida, de modo a termos a transformada inversa. O método mais comum na técnica de m-CT é a de retroprojeção filtrada (LIMA, 2002). Primeiramente coloca-se a transformada de Radon em coordenadas polares e depois utiliza-se o teorema da fatia de Fourier. Seja  $\mathbf{F}(\mathbf{u}, \mathbf{v})$  a transformada de Fourier de uma imagem  $\mathbf{f}(\mathbf{x}, \mathbf{y})$ , então:

$$F(u, v) = \iint f(x, y) e^{-2j\pi(ux + vy)} dx dy \quad (\text{Equação 15})$$

Uma amostra, ao ser colocada num scanner de m-CT, sofre rotação de passos angulares até completarem 180° ou 360°. Deste modo, com diferentes projeções em

diferentes ângulos,  $F(\mathbf{u},\mathbf{v})$  será conhecida por completo no plano  $uv$ , logo  $f(\mathbf{x},\mathbf{y})$  pode ser achada através da inversão da transformada de Fourier.

$$F(x,y) = \iint F(u,v)e(j2\pi(ux + vy))dudv \quad (\text{Equação 16})$$

A figura 24 representa a relação do espaço do objeto, do espaço Radon e do espaço Fourier e suas correlações.

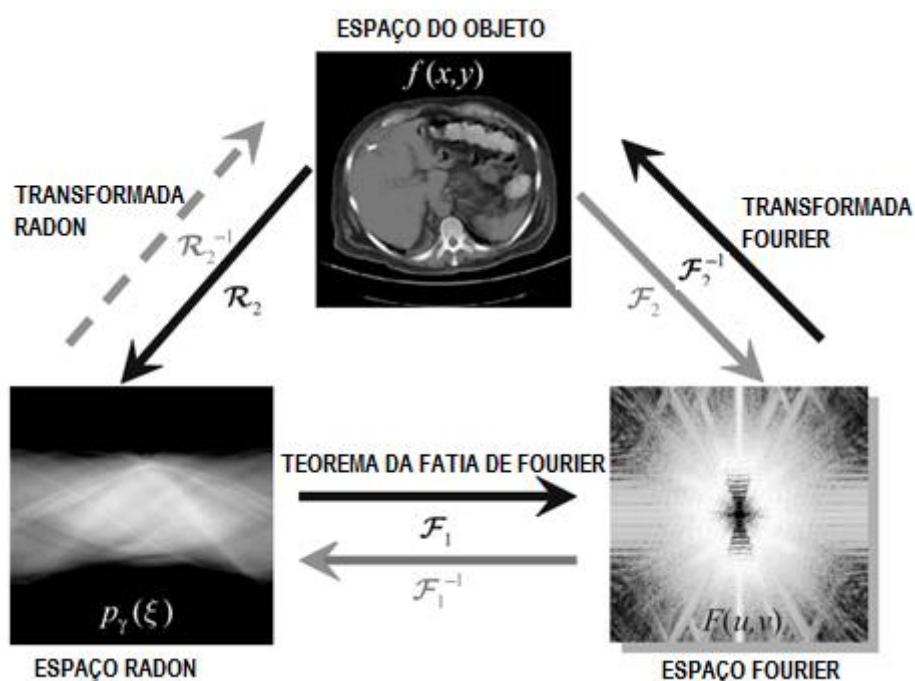


Figura 24: Representação da correlação entre espaço do objeto, espaço Radon e espaço Fourier, (adaptado de BUZUG, 2008).

Na prática, são feitas aproximações no algoritmo que é dividido em três etapas: Reescalamento (ajuste de dimensões no espaço de reconstrução, já incluso no modelo matemático), Filtragem (uso da função filtro) e Retroprojeção (projeções são retroprojetadas no plano imagem, corrigindo valores de  $f(x,y)$ ) (LIMA, 2002).

Durante o processo de reconstrução, as imagens devem apresentar melhor qualidade possível para diagnóstico e, para isso, existem parâmetros que são empregados para se obter

esta melhor qualidade desejada. São eles: Suavização, Compensação de desalinhamento, Endurecimento de feixe e Artefato de anel. Abaixo são descritos cada um destes parâmetros de acordo com a SKYSCAN (2011), empresa responsável pelo software de reconstrução das amostras inspecionadas neste trabalho.

Suavização (*Smoothing*): Utilizado para suavizar cada pixel conforme o pixel adjacente. Capaz de reduzir ruído, mas pode ocorrer da imagem ficar borrada para valores muito discrepantes.

Compensação de desalinhamento (*Misalignment compensation*): Função responsável para compensar desalinhamentos ocorridos durante a etapa de aquisição. É de grande importância pois um erro de alinhamento pode causar sombreamento na estrutura, borrando a imagem reconstruída.

Endurecimento de feixe (*Beam Hardening*): Função capaz de reduzir o efeito causado pelo fenômeno de endurecimento de feixe.

Artefato de anel (*Ring artefact*): Função capaz de minimizar os efeitos causados por pixels defeituosos, que são perceptíveis na imagem como círculos (anéis). Através da média ponderada dos pixels vizinhos perfeitos, este efeito pode ser corrigido. A imagem 25 caracteriza os artefatos de anel numa imagem de m-CT.

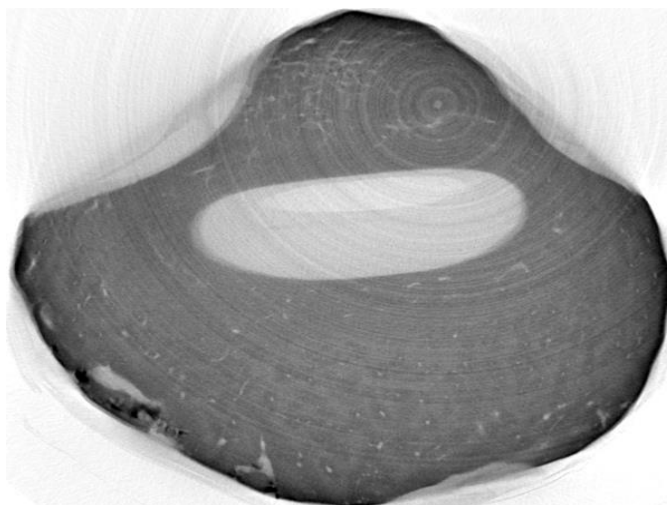


Figura 25: Artefatos de anel aparentes numa imagem de m-CT, (SIJBERS e POSTNOV, 2004).

Para cada escolha de valor destas funções, o software responsável pela reconstrução gera pré-visualizações para que o operador escolha aquela que melhor pode ser comparada com a imagem original.

### **IV.2.3 – PROCESSAMENTO DE IMAGEM E ANÁLISE DE DADOS**

O processamento de imagem tem como objetivo primordial a otimização da informação visual. Quanto melhor qualidade na hora de visualizar a representação em 3D do corpo de prova, mais fiel e mais fácil será a interpretação humana e análise de dados.

Após a aquisição da imagem digital, existe uma etapa importante que é considerada um pré-processamento que tem como objetivo melhorar esta imagem da melhor maneira possível (remoção de ruídos e aprimoramento no contraste, por exemplo).

Os valores de  $f(x,y)$  dentro de uma fatia axial são distribuídos continuamente em valor e espaço e devem ser medidos. Os dados adquiridos devem ser digitalizados (aquisição) e depois reconstruídos, e seus valores quantificados. Este processo pode ser descrito como uma cadeia de transmissão de sinais. Esta cadeia é dividida em 5 camadas. São elas: Camada física ou camada de imagem de raio-X; Camada do detector; Camada Eletrônica ou de digitalização; Camada de reconstrução; e Camada representativa ou camada de processamento de imagem (BUZUG, 2008). A figura 26 representa as etapas presentes em cada camada.

A primeira camada descreve a característica do feixe de radiação X. As etapas H1 e H2 descrevem a entrada dos valores contínuos de  $f(x,y)$ , onde a natureza do sinal permanece inalterada. A interação da radiação com o objeto sofre do efeito de endurecimento de feixe, e é representada pela etapa H3. A etapa H4, já presente na segunda camada, representa o sinal que é colimado e subdividido e depois é transformado fisicamente, esta transformação

é a etapa H5 (os fótons de raios X são detectados por um cristal cintilador e convertidos em sinal elétrico). Na camada eletrônica ou de digitalização, o sinal elétrico que acabou de ser originado é discretizado (H6) e logo depois quantificado por um conversor analógico-digital (H7). Na quarta camada, a de reconstrução ou algoritmo, o sinal é convertido em imagem digital, e a etapa H8 é onde escolhe-se a região de interesse a ser analisada (*ROI – Region Of Interest*), assim como as propriedades especiais (filtros) para melhor qualidade de imagem (H9). A última camada do processamento de imagem é responsável por modelar o tipo de representação da imagem desejada. Um exemplo é a escolha do nível de cinza (H10), onde os pixels e seus níveis de cinza representam estruturas mais densas do que outras. A etapa H11 é a visualização, etapa final.

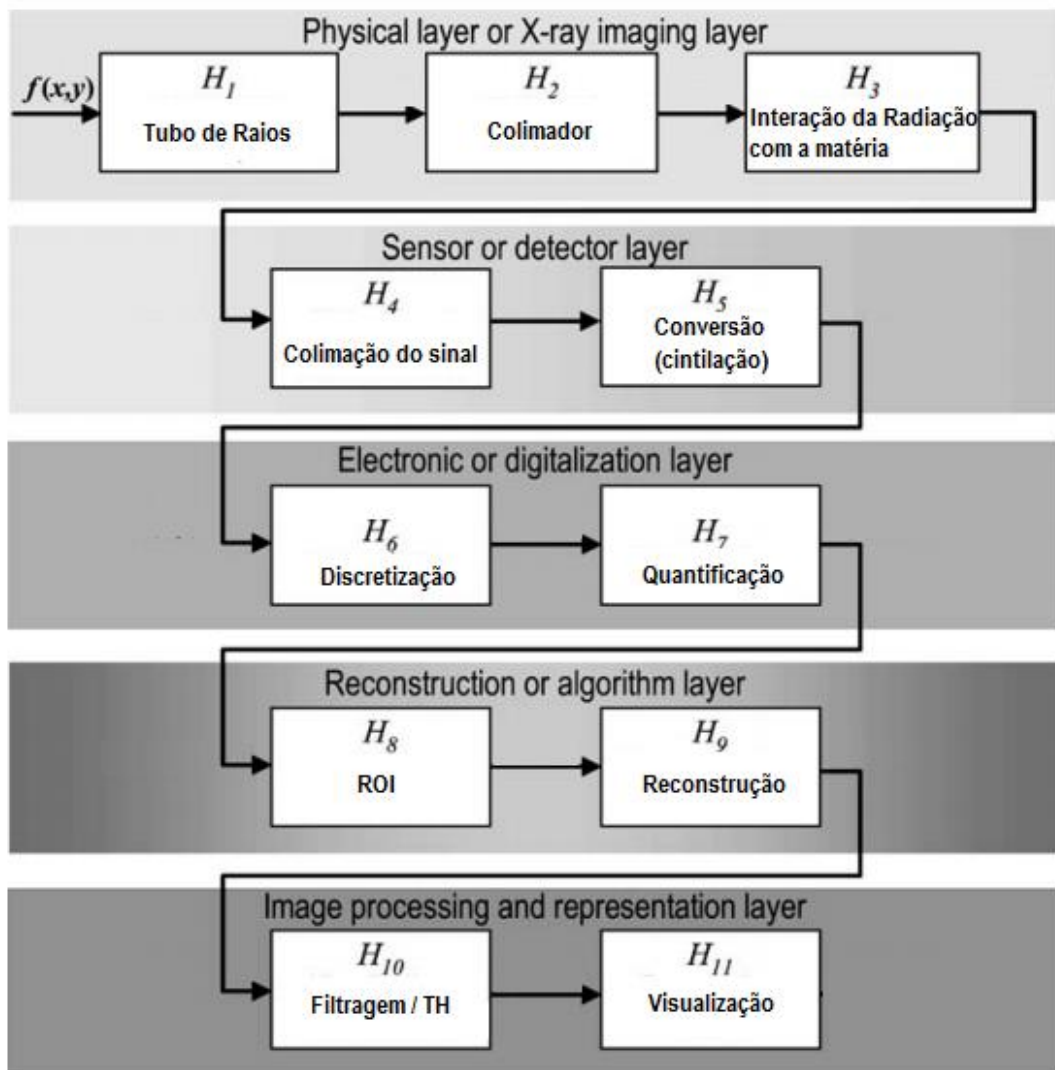


Figura 26: Etapas de cada camada relacionadas ao processamento de imagem (adaptado de BUZUG, 2008).

#### IV.2.4 – LIMIAZIZAÇÃO

O processo de limiarização, também conhecido como *Threshold* (TH) ou binarização, consiste na escolha dos níveis de cinza. Para que as avaliações quantitativas sejam possíveis é necessário transformar a imagem de escala de cinza para uma imagem binária (preto e branco).

A escolha do valor de TH tem grande influência nos cálculos através da microtomografia computadorizada (HARA, 2002). Escolhido um valor limiar (TH), as estruturas que correspondem a valores abaixo deste valor ficam pretas e as com valores acima, ficam brancas. Quanto mais próximo do branco, mais densa pode ser considerada a estrutura, assim que quanto mais preta, menos densa.

A escolha do valor ideal limiar deve ser feita de modo que a estrutura da imagem não seja quantificada erroneamente. Um valor alto demais ou baixo demais pode afetar drasticamente nos níveis de cinza, o que afeta diretamente na quantificação da estrutura, como por exemplo, a fração de volume de osso (BV/TV). A escolha do valor de TH pode ser realizado de 3 maneiras. São elas: Limiarização visual, Limiarização da derivada igual a zero e Limiarização OTSU.

A limiarização visual é considerada o método mais usado atualmente. O operador varia o valor limiar e simultaneamente compara a imagem original com a imagem em escala de cinza. É um método incerto pois depende do bom senso do operador em achar a imagem original fiel o bastante à imagem em escala de cinza. SALES (2010) descreve que uma proposta é definir um valor de TH mínimo e outro máximo de modo que a comparação destes 2 valores com a imagem original não ocorra grandes modificações. Tendo estes 2 valores definidos, o valor de TH ideal seria a média entre eles.

O método da limiarização da derivada igual a zero consiste na relação entre valores de TH com valores de fração de volume de osso (BV/TV). Estes valores de BV/TV são



calculados através da escolha do TH. Com os valores de TH e os valores obtidos de BV/TV é criado um gráfico em que a curva gerada representa a relação entre eles. Em um determinado ponto desta curva, se a derivada  $\partial(BV/TV) / \partial(TH)$  for igual a zero, o valor de TH naquele ponto pode ser considerado o ideal (BARBIER *et al*, 1999).

O método OTSU é baseado numa normalização do histograma como função de probabilidade discreta, onde o TH ideal pode ser considerado como a maximização da variância desta função probabilidade.

#### IV.2.5 – VISUALIZAÇÃO

A visualização é considerada a etapa final da m-CT. A representação pode ser bidimensional ou tridimensional, conforme necessidade da aplicação, que também dispõe de ferramentas em que a representação do objeto pode ser amplamente modificada (como adição de cores ou uso da ferramenta *zoom*, por exemplo) de modo que a mesma se apresente a melhor possível conforme objetivo pretendido. A figura 27 ilustra o crânio de rato visto em 2D e em 3D.

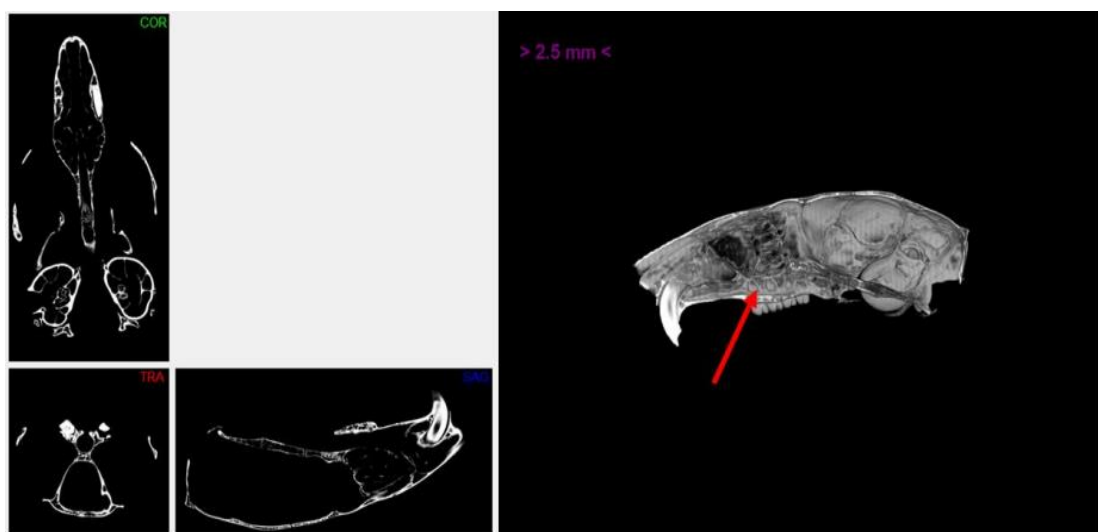


Figura 27: Vista bidimensional dos cortes coronal (verde), sagital (azul) e transversal (vermelho) e vista tridimensional da estrutura interna de um crânio de rato, (SANTOS, 2015).

# CAPÍTULO V

## MÉTODO EXPERIMENTAL E MATERIAIS ESTUDADOS

Serão abordados neste capítulo os materiais e métodos que foram utilizados neste trabalho através da técnica de microtomografia computadorizada.

### V.1 – MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA POR TRANSMISSÃO DE RAIOS X

Através da técnica de m-CT, amostras de ossos de peixes foram analisadas com o objetivo de estudar seu processo degenerativo ósseo. A caracterização e os resultados das amostras serão abordados no próximo capítulo.

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN), do Programa de Engenharia Nuclear (PEN) da COPPE/UFRJ.

O equipamento de m-CT utilizado é da marca SkyScan/Bruker, modelo 1173. O aparelho apresenta tubo de raios X microfocado com anodo de tungstênio, potência de até 8W, range de energia que varia de 40 a 130kV e corrente elétrica variável de 0 a 100 $\mu$ A. O sistema apresenta um detector tipo flat panel com matriz de 2240x2240 pixels, com tamanho de pixel variando de 0 a 50 $\mu$ m e com 12bits de range dinâmico. Por ser um microtomógrafo de bancada, o modelo 1173 permite a inspeção de amostras com comprimento máximo de 200mm e diâmetro máximo de 140mm. A figura 28 é a representação gráfica do microtomógrafo da SkyScan, modelo 1173.



Figura 28: Microtomógrafo SkyScan, modelo 1173 (SkyScan).

O tubo de raios X transmite feixes cônicos. A amostra, presente entre o tubo e o detector, é rotacionado a  $180^\circ$  ou  $360^\circ$  a passos angulares fixos e pré-definidos pelo operador. A cada passo angular dado, uma projeção é gerada. Cada projeção é armazenada em arquivo em formato \*.TIFF.

Após aquisição, a reconstrução é realizada. O software utilizado é o NREcon (versão 1.6.4.1), plataforma InstaRecon (1.3.5.0), baseado no algoritmo de Feldkamp (Feldkamp, Davis e Kress, 1984). O pacote de software de reconstrução consiste de dois programas: o NRecon que é o programa de interface e o InstaRecon que é o mecanismo de reconstrução. O valor de limiarização (TH) foi definido pelo método visual e durante a reconstrução, algumas funções, vistas no capítulo anterior, podem ser utilizadas para melhoramento da qualidade da imagem, são elas: *Smoothing*, *Beam Hardening*, *Ring Artefacts* e *Misalignment Compensation*. Após a reconstrução, as imagens estão prontas para serem analisadas, processadas e quantificadas.

Na aquisição, as amostras foram escaneadas no equipamento de m-CT de alta resolução da SkyScan/Bruker, modelo 1173. Para que um estudo comparativo entre as

amostras pudesse ser feito, o tamanho de pixel de 14,8 $\mu$ m foi mantido em todas as amostras. A fim de eliminar os fótons de baixa energia, foi utilizado um filtro de alumínio (Al) de 1,0mm de espessura na saída do tubo de raios X. As demais condições experimentais de aquisição foram tensão de 55kV, corrente de 14,5 $\mu$ A e matriz de detecção de 2240x2240 pixels. O passo angular pré-definido foi de 0,8° e a amostra rotacionou 360°. A cada radiografia, foram adquiridos 5 quadros com compensação de possível movimentação das amostras num nível de 25 (total de 100).

Após a aquisição, as imagens obtidas foram reconstruídas através do software NREcon (versão 1.6.4.1), plataforma InstaRecon (1.3.5.0), baseado no algoritmo de Feldkamp (FELDKAMP *et al*, 1984). As funções *Smoothing*, *Beam Hardening* e *Ring Artefacts* foram diferentes para cada amostra, levando em consideração suas grandes diferenças de densidade e composição. Após a reconstrução, os resultados são imagens 2D da seção transversal das amostras em níveis de cinza (estes níveis estão relacionados com a densidade das mesmas), de forma que materiais mais densos aparecem com níveis mais brancos de cor que o materiais menos densos (níveis de coloração mais escuro).

A figura 29 apresenta através de imagens 2D da seção transversal da região central das amostras como cada função disponível no processo de reconstrução foi usada para cada uma das 6 amostras.

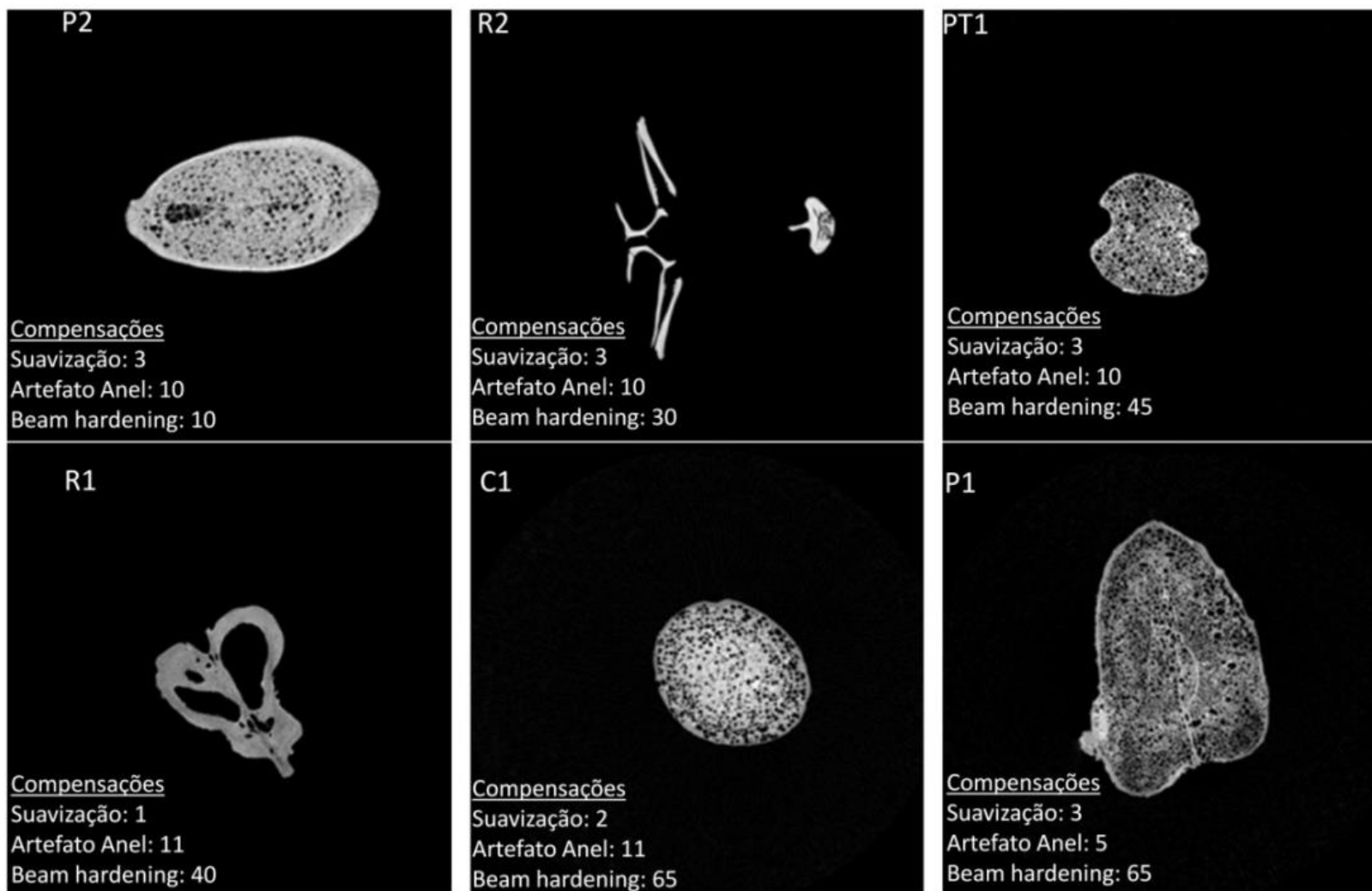


Figura 29: Seções transversais em 2D e funções Smoothing, Beam Hardening e Ring Artefacts especificadas para cada amostra. Amostra P2: Suavização 3, Artefato de Anel 10 e Beam Hardening 10; Amostra R2: Suavização 3, Artefato de Anel 10 e Beam Hardening 30; Amostra PT1: Suavização 3, Artefato de Anel 10 e Beam Hardening 45; Amostra R1: Suavização 1, Artefato de Anel 11 e Beam Hardening 40; Amostra C1: Suavização 2, Artefato de Anel 11 e Beam Hardening 65; Amostra P1: Suavização 3, Artefato de Anel 5 e Beam Hardening 65.

## V.2 – PROCESSO DEGENERATIVO ÓSSEO EM PEIXES

Existem diversas e abundantes espécies de peixes tropicais presentes como fósseis nos sambaquis da costa brasileira. A maioria das espécies foi identificada através de sua estrutura óssea. Dentro dos diversos materiais encontrados, uma excepcional abundância de ossos espessos, inchados e hiperostóticos foi encontrada em todas as coletas realizadas em sambaquis da costa do Rio de Janeiro (AGUILERA *et al*, 2016).

Além do envelhecimento, as influências da temperatura podem ser fator determinante na modificação microestrutural óssea (BELEM *et al*, 2013). A diagenese, patologia altamente ligada às condições climáticas também é responsável por modificações na estrutura óssea. A região de Cabo Frio, sudeste brasileiro, de onde foram retiradas as amostras nos sambaquis, tem características de ocorrências sazonais de ressurgência costeira. Este fenômeno está ligado às frias águas centrais do sul do oceano Atlântico (6-18°C) que interagem com as correntes de água quente brasileira (14,3-25,2°C). Como resultado, a água da região apresenta ampla gama de temperaturas.

Embora houveram propostas anteriores para se estudar a hiperostose e suas origens, o presente trabalho analisou a doença através de uma técnica moderna (a m-CT) com o objetivo de entender as mudanças estruturais ósseas que ocorrem durante o processo de envelhecimento dos peixes. Nesse estudo, foi documentado o processo degenerativo ósseo em fósseis de peixes encontrados em sambaquis pré-históricos da costa brasileira e com os resultados das análises, buscou entender a relação entre as mudanças estruturais presentes nos ossos com o meio ambiente em que se viviam as espécies.

Os fósseis de peixe são oriundos de sambaquis brasileiros, localizados no estado do Rio de Janeiro. Os sambaquis são o de Manitiba, Beirada, Ponte do Girau e Usiminas, conforme indicado na figura 30. Os ossos hiperostóticos foram identificados macroscopicamente da coleção zooarqueológica do Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro (MN-UFRJ).

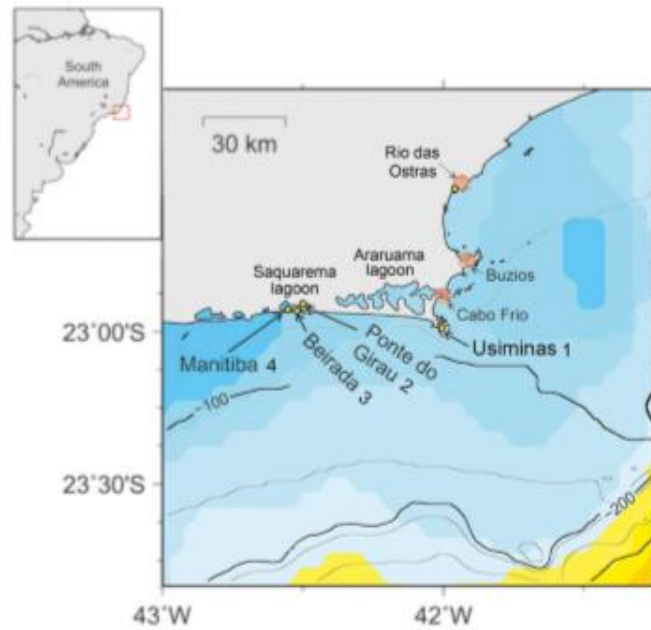


Figura 30: Localização dos sambaquis na costa do estado do Rio de Janeiro, Brasil. Em destaque os sambaquis de Manitoba, Beirada, Ponte do Girau e Usiminas, (AGUILERA et al, 2017).

Foram feitas análises em 06 (seis) amostras ósseas de peixes, algumas com e outras sem apresentar hiperostose, sendo duas da espécie *Chaetodipterus faber* (amostras P1 e P2, ossos supraocipitais), duas da espécie *Centropomus papallelus* (amostra R1 e R2, crânio e parte ocipital do crânio, respectivamente) e duas amostras de espécies desconhecidas (amostras C1 e PT1, costela pleural e osso pterigióforo, respectivamente).

De posse das imagens de m-CT foi possível realizar quantificações de alguns parâmetros morfológicos. Neste estudo, foram avaliados o volume total (TV, mm<sup>3</sup>), o volume de osso existente nas amostras (BV, mm<sup>3</sup>) e o percentual de osso existente dentro do volume analisado (BV/TV, %). Para tal utilizou-se o programa CT-Analyser versão 1.11.8.0 (CT-An). Todas estas quantificações foram executadas a partir da escolha de uma região de interesse a ser estudada (ROI – *Region of Interest*).

A seleção desta região de interesse é de extrema importância para obtenção de dados fiéis às amostras em sua realidade. Para cada uma das 6 amostras estudadas, o ROI foi

escolhido para quantificações da região cortical. Após as quantificações desta região, para uma nova análise, foi escolhido um segundo ROI, este abrangendo a estrutura interna, sem a casca, composta de tecido esponjoso.

A figura 31 mostra, através de imagens das seções transversais em 2D das amostras C1, P1, P2 e PT1, a escolha e o formato de cada ROI.



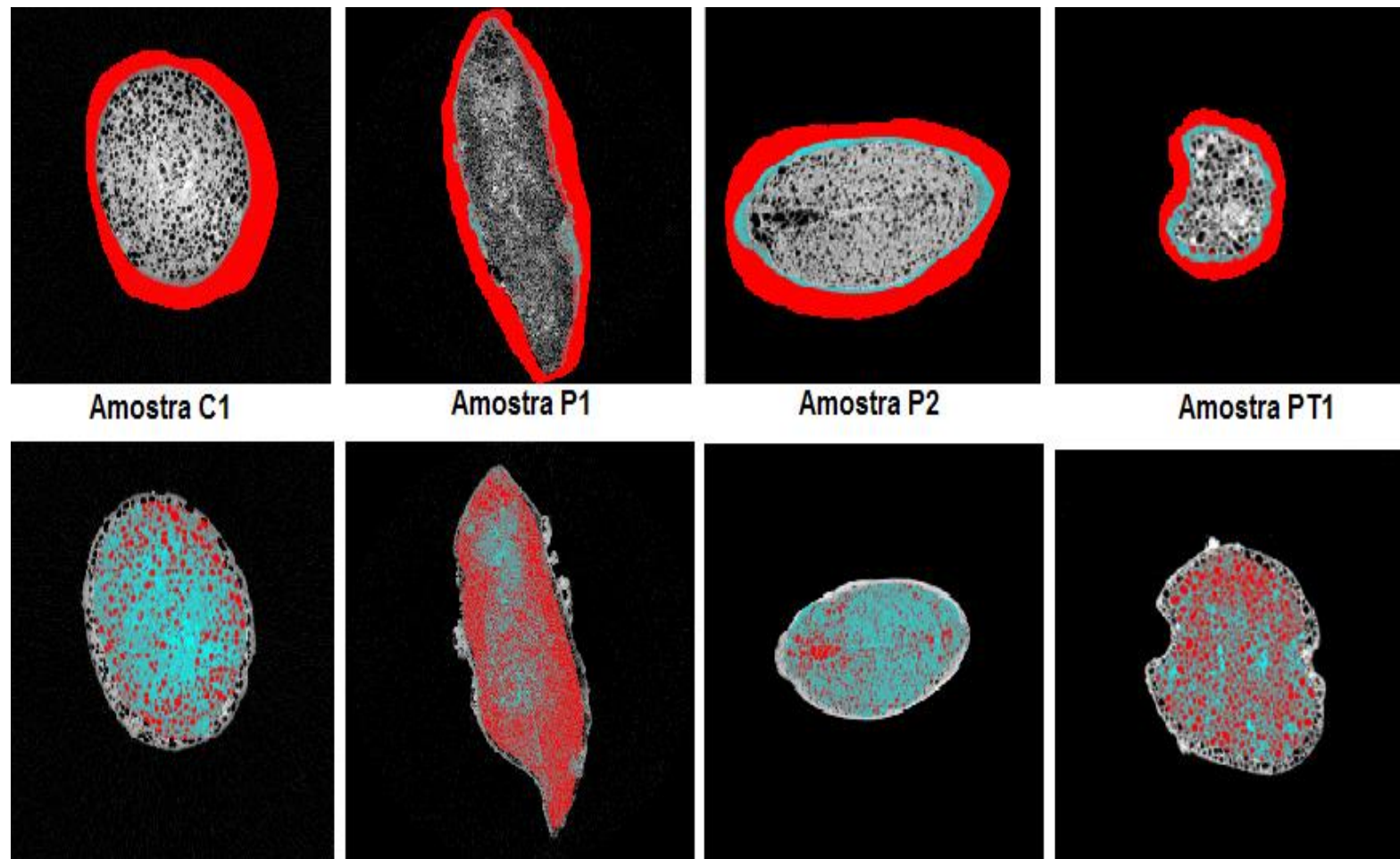


Figura 31: Imagens das seções transversais em 2D das amostras C1, P1, P2 e PT1. Na primeira fileira pode-se observar o ROI da região cortical ("casca") enquanto que a segunda fileira observa-se o ROI abrangendo apenas a estrutura interna.

Para que estas avaliações quantitativas fossem possíveis, foi necessário transformar a imagem de escala de cinza para uma imagem binária (preto e branco), onde o valor de limiar (TH – *Threshold*) representa que valores abaixo deste TH aparecem como pixels pretos e valores acima, pixels brancos. Neste trabalho, os pixels brancos corresponderam a material ósseo enquanto que os pixels pretos corresponderam à fase vazia, ou seja, sem material ósseo.

A análise dos resultados obtidos assim como a visualização da estrutura óssea das amostras em 3D foram a última etapa deste trabalho e serão apresentadas no próximo capítulo.

# CAPÍTULO VI

## RESULTADOS

### VI.1 – QUANTIFICAÇÃO

A tabela 1 a seguir apresenta os resultados das quantificações dos parâmetros volume total (TV, mm<sup>3</sup>), volume de osso existente nas amostras (BV, mm<sup>3</sup>) e o percentual de osso existente dentro do volume analisado (BV/TV, %) para a região cortical e região interna de cada uma das amostras. As amostras R1 e R2 apresentaram estrutura particular e após análise, sua estrutura foi considerada toda cortical.

Com base nos resultados obtidos e presentes na tabela 1, foi possível construir o gráfico apresentado na figura 32 que relaciona para cada amostra o percentual de osso (BV/TV) presentes nas amostras na região cortical e interna.

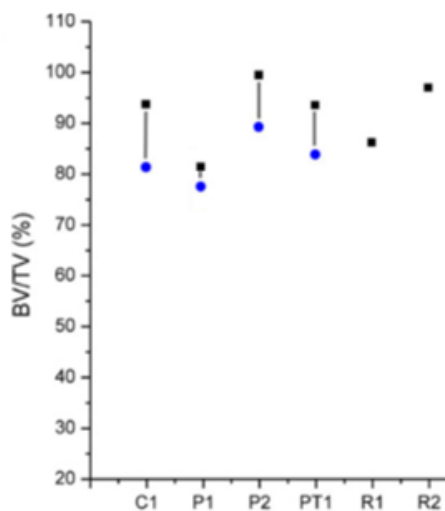


Figura 32: Percentual de osso (BV/TV) para as amostras C1, P1, P2, PT1, R1 e R2 das regiões cortical (círculo-azul) e interna (quadrado-preto).

AMOSTRA	C1	P1	P2	PT1	R1	R2
ESPÉCIE	Desconhecida	<i>Chaetodipterus faber</i>	<i>Chaetodipterus faber</i>	Desconhecida	<i>Centropomus parallelus</i>	<i>Centropomus parallelus</i>
OSSO	Costela Pleural	Supraocipital	Supraocipital	Pterigióforo	Crânio	Crânio (região ocipital)
CONDIÇÃO	Zooarqueológica com Hiperostose	Zooarqueológica com Hiperostose	Moderna com Hiperostose	Zooarqueológica com Hiperostose	Zooarqueológica com Hiperostose	Moderna com Hiperostose

**REGIÃO CORTICAL**

VOLUME DE OSSO (mm <sup>3</sup> ) BV	276	1342	121	66	680	1163
VOLUME TOTAL (mm <sup>3</sup> ) - VT	295	1674	122	71	790	1201
VOLUME OSSO/ VOLUME TOTAL (%) BV/TV	94	80	99	93	86	97

AMOSTRA	C1	P1	P2	PT1	R1	R2
<b>REGIÃO INTERNA</b>						
<b>VOLUME DE OSSO (mm<sup>3</sup>) BV</b>	1948	4660	390	541	---	---
<b>VOLUME TOTAL (mm<sup>3</sup>) - VT</b>	2397	5995	437	647	---	---
<b>VOLUME OSSO/ VOLUME TOTAL (%) BV/TV</b>	81	78	89	84	---	---

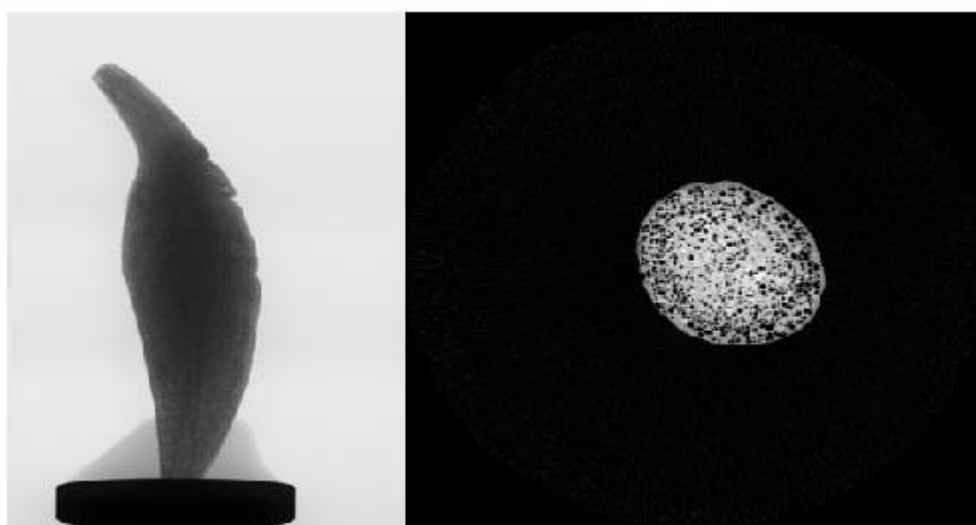
Tabela 1: Valores das quantificações dos parâmetros BV (volume de osso), TV (volume total) e BV/TV (volume de osso/volume total) das amostras C1, P1, P2, PT1, R1 e R2 e suas regiões cortical e interna.

A técnica de m-CT demonstrou-se útil na quantificação de parâmetros morfológicos de amostras ósseas de peixe, sendo capaz de calcular destas amostras o volume de osso (BV), o volume total (TV) e o percentual de volume de osso por volume total (BV/TV). Através dos resultados destes parâmetros pode-se concluir que, através da figura 34, que, com exceções das amostras R1 e R2, os índices BV/TV entre as regiões cortical e interna tiveram índices entre 1.03 e 1.15. Para a região cortical, a amostra P2 apresentou maior valor de índice BV/TV com 99%, enquanto a amostra P1 foi a com menor índice, 80%. Para a região interna esponjosa, a amostra P2 e P1 também apresentaram maior e menor índice BV/TV, respectivamente, com valores de 89% e 78%.

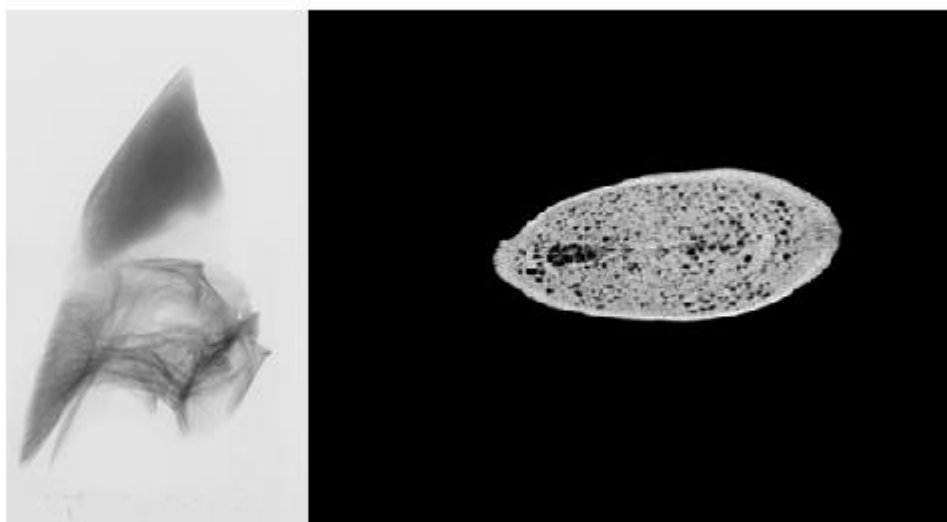
## VI.2 – VISUALIZAÇÃO

### VI.2.1 – RADIOGRAFIA E SEÇÃO TRANSVERSAL 2D

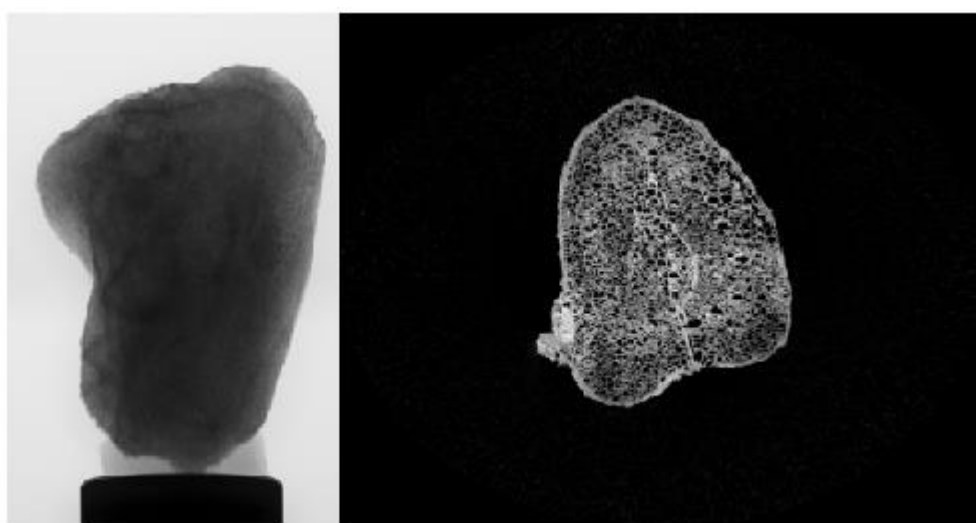
As figuras 33-38 apresentam as radiografias e seções transversais em 2D, respectivamente, para cada amostra completa.



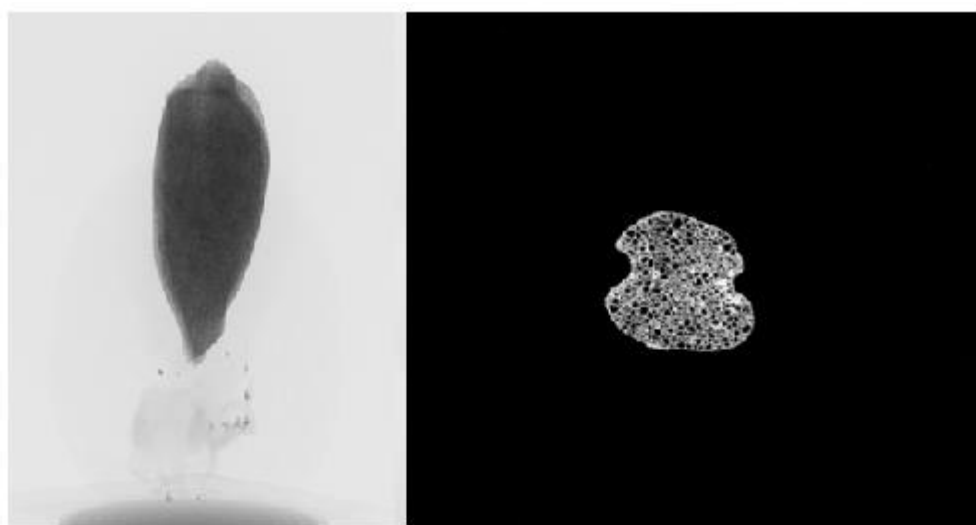
*Figura 33: Radiografia e seção transversal em 2D da amostra C1.*



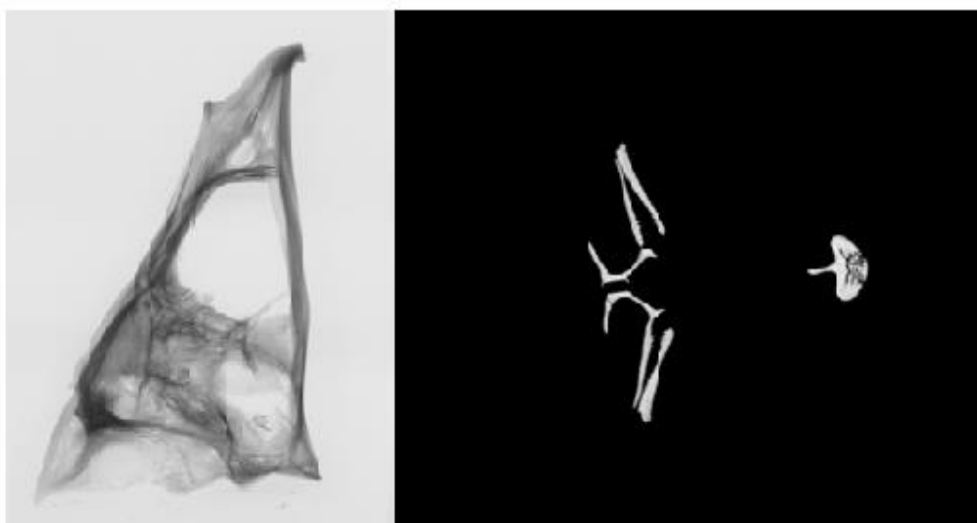
*Figura 34: Radiografia e seção transversal em 2D da amostra P1.*



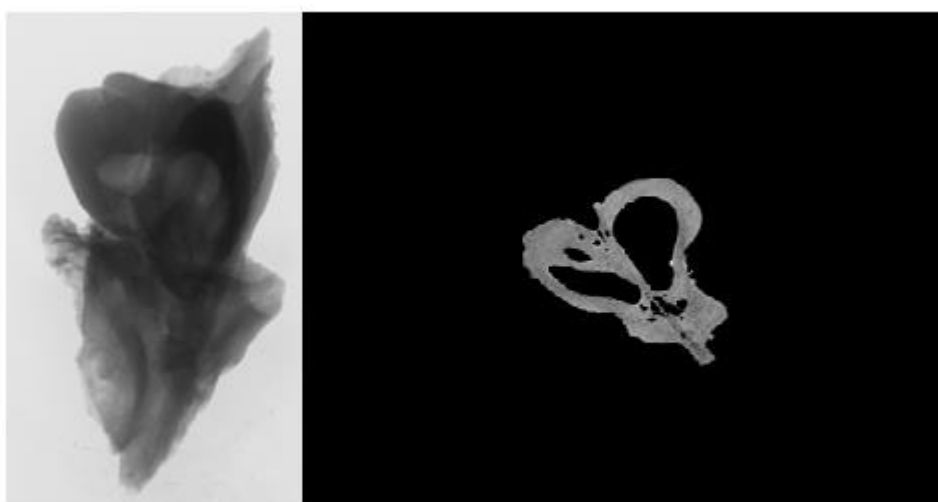
*Figura 35: Radiografia e seção transversal em 2D da amostra P2.*



*Figura 36: Radiografia e seção transversal em 2D da amostra PT1.*



*Figura 37: Radiografia e seção transversal em 2D da amostra R1.*



*Figura 38: Radiografia e seção transversal em 2D da amostra R2.*

As figuras 39-44 apresentam as seções transversais em 2D das regiões cortical (“casca”) e região interna (tecido esponjoso) das amostras C1, P1, P2 e PT1. As amostras R1 e R2 não apresentaram estrutura interna, resultando numa seção transversal apenas da região cortical.



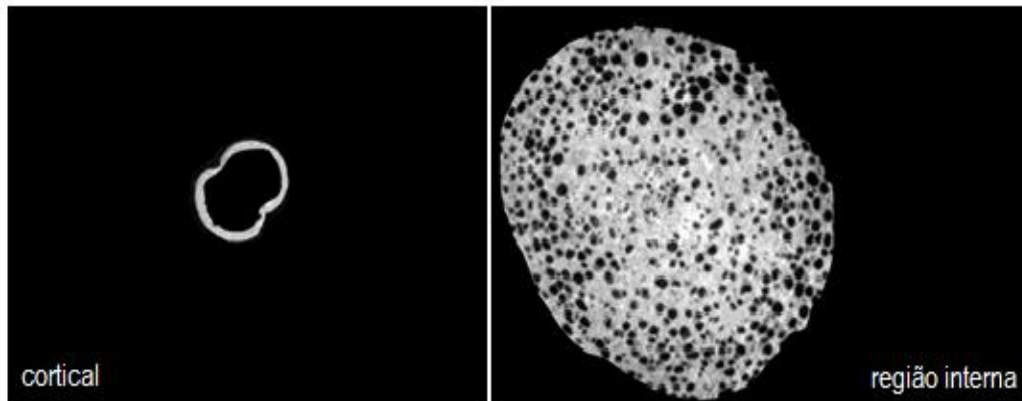


Figura 39: Seção transversal em 2D da região cortical e da região interna da amostra C1.

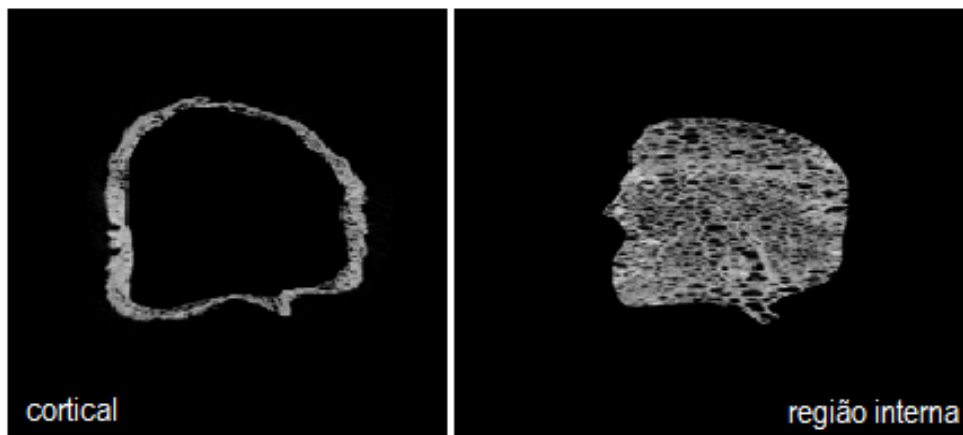


Figura 40: Seção transversal em 2D da região cortical e da região interna da amostra P1.

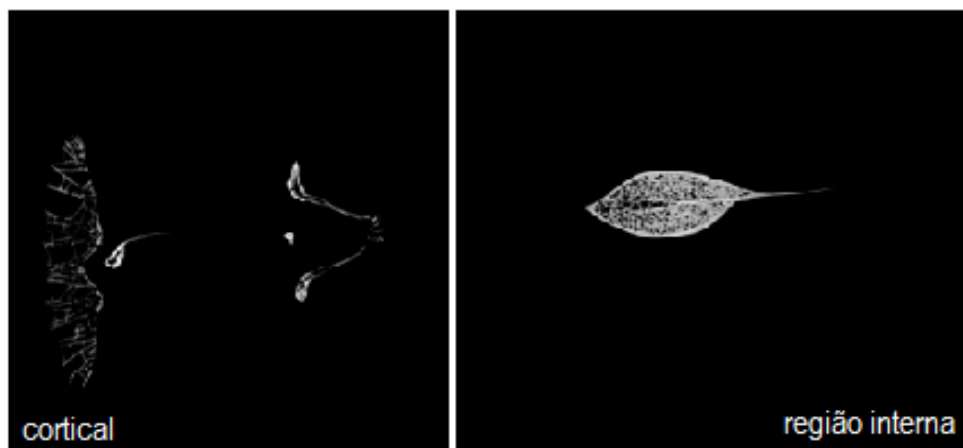


Figura 41: Seção transversal em 2D da região cortical e da região interna da amostra P2.

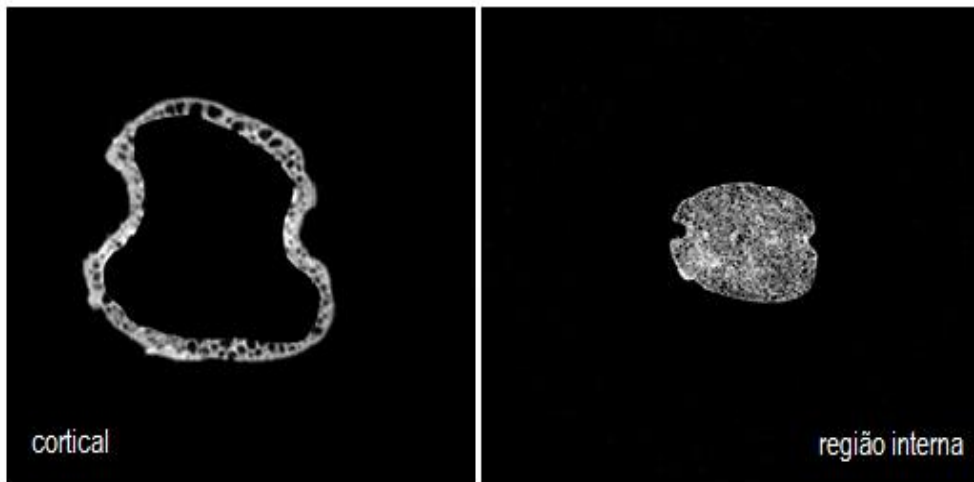


Figura 42: Seção transversal em 2D da região cortical e da região interna da amostra PT1.

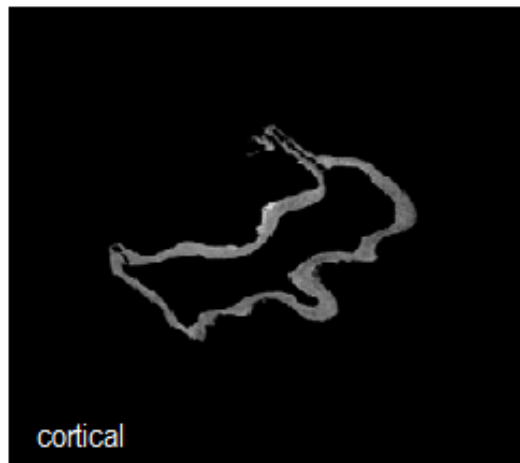


Figura 43: Seção transversal em 2D da região cortical da amostra R1.

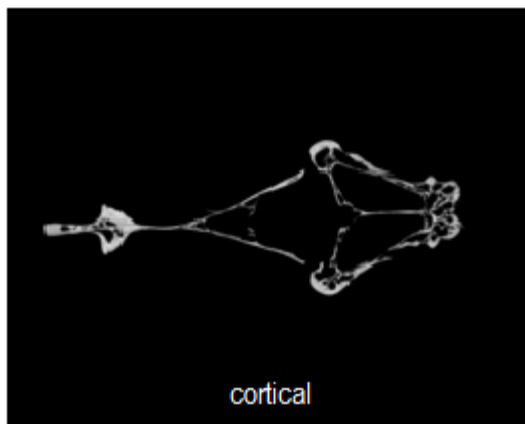


Figura 44: Seção transversal em 2D da região cortical da amostra R2.

## **VI.2.2 – VISUALIZAÇÕES EM 3D**

As figuras 45-50 apresentarão com escala de 2,5mm as visualizações tridimensionais (3D) das 6 amostras. As figuras 51-56 representam as visualizações em 3D das regiões cortical e interna das amostras C1, P1, P2 e PT1. As amostras R1 e R2 terão apenas região cortical apresentada devido sua estrutura óssea.

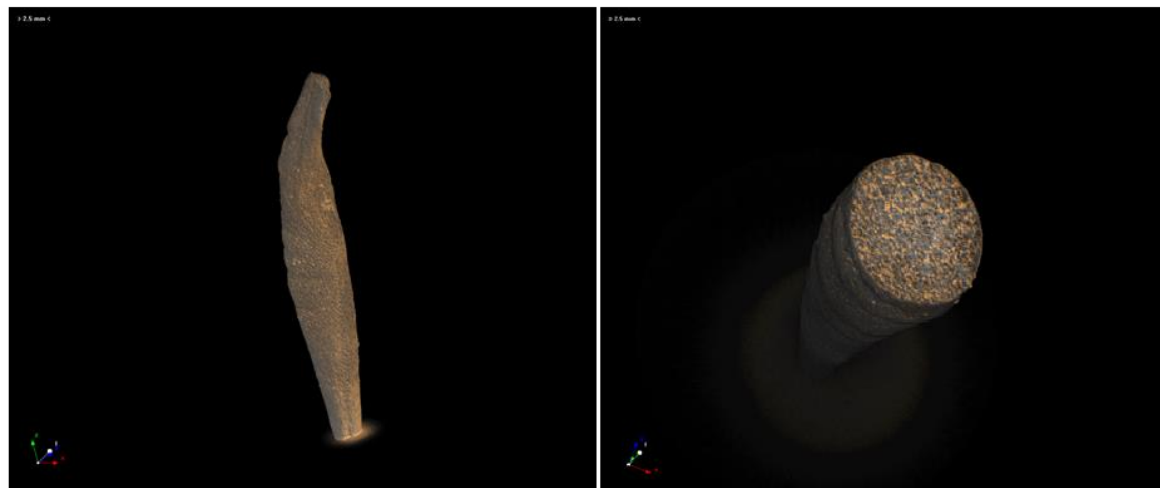


Figura 45: Representação 3D da amostra C1. Na primeira a amostra encontra-se inteira; na segunda a amostra encontra-se fatiada para visualização interna.

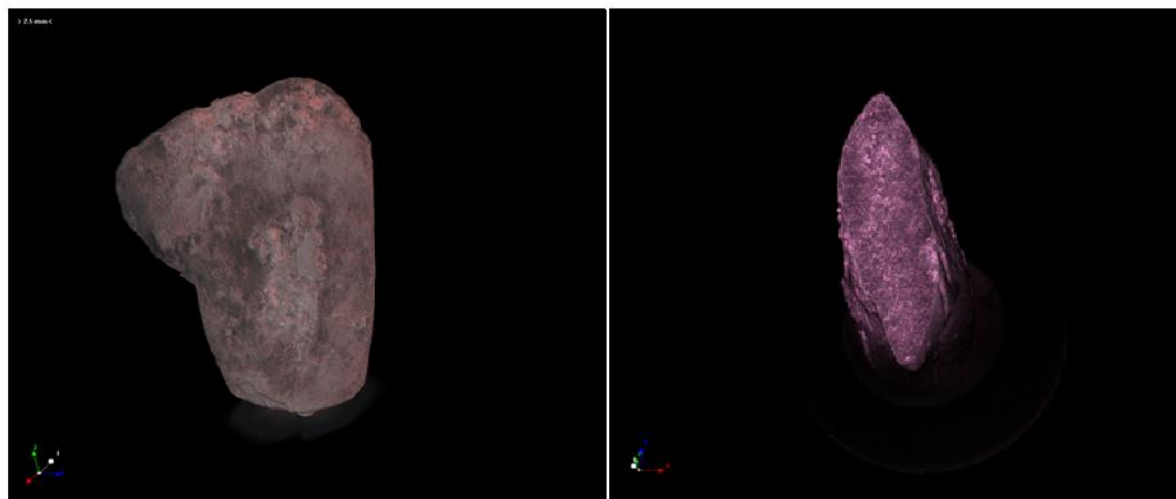


Figura 46: Representação 3D da amostra P1. Na primeira a amostra encontra-se inteira; na segunda a amostra encontra-se fatiada para visualização interna.

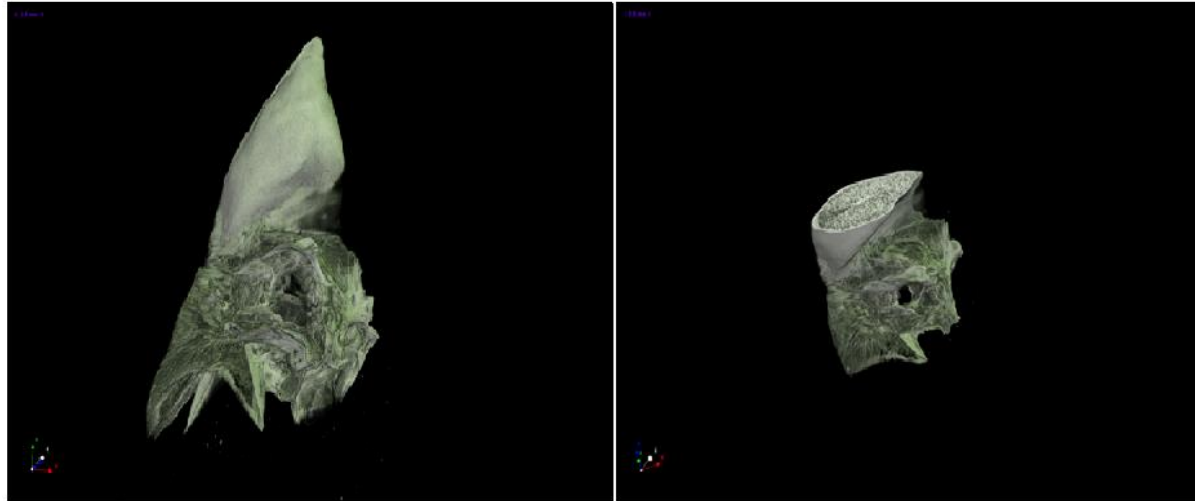


Figura 47: Representação 3D da amostra P2. Na primeira a amostra encontra-se inteira; na segunda a amostra encontra-se fatiada para visualização interna.

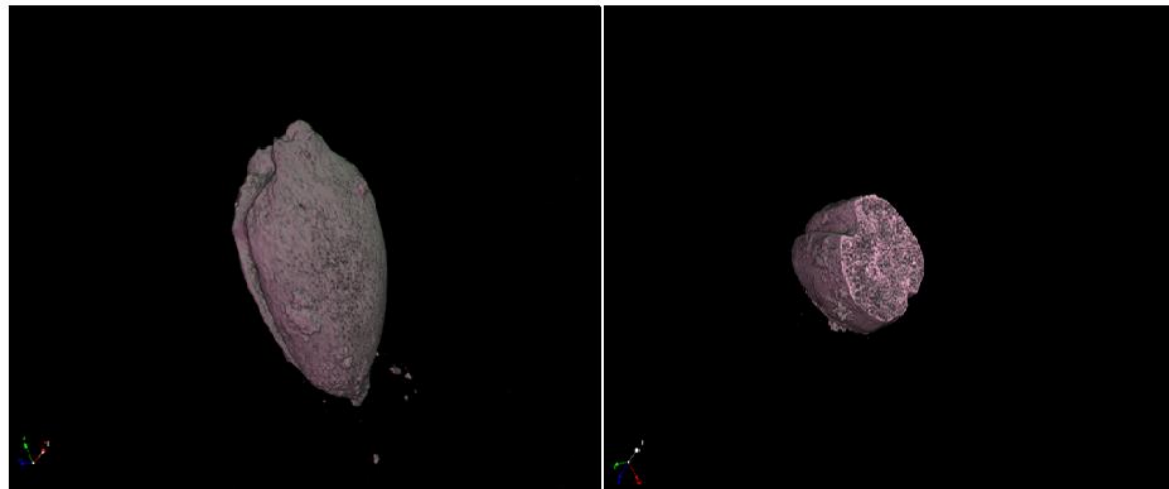
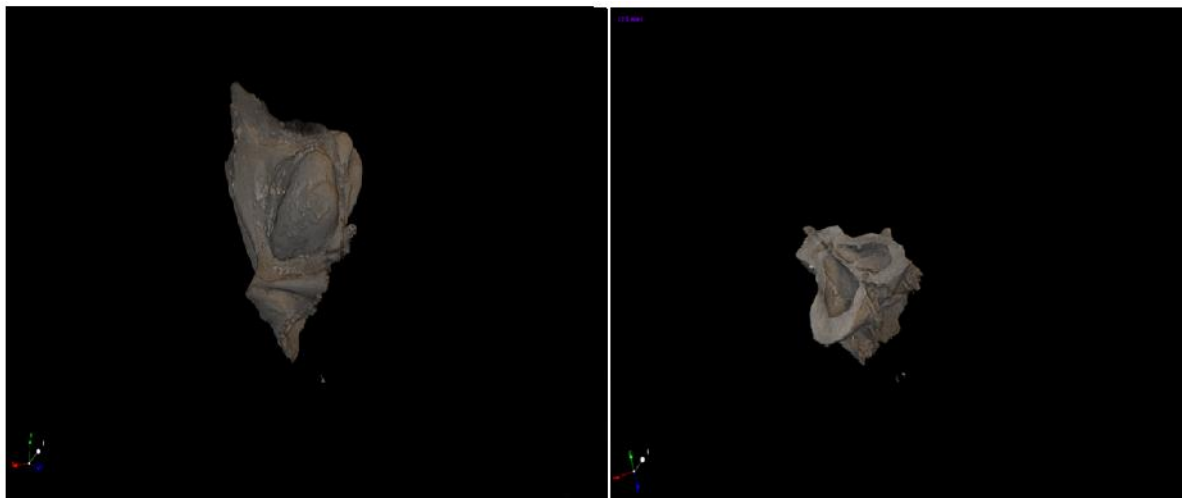
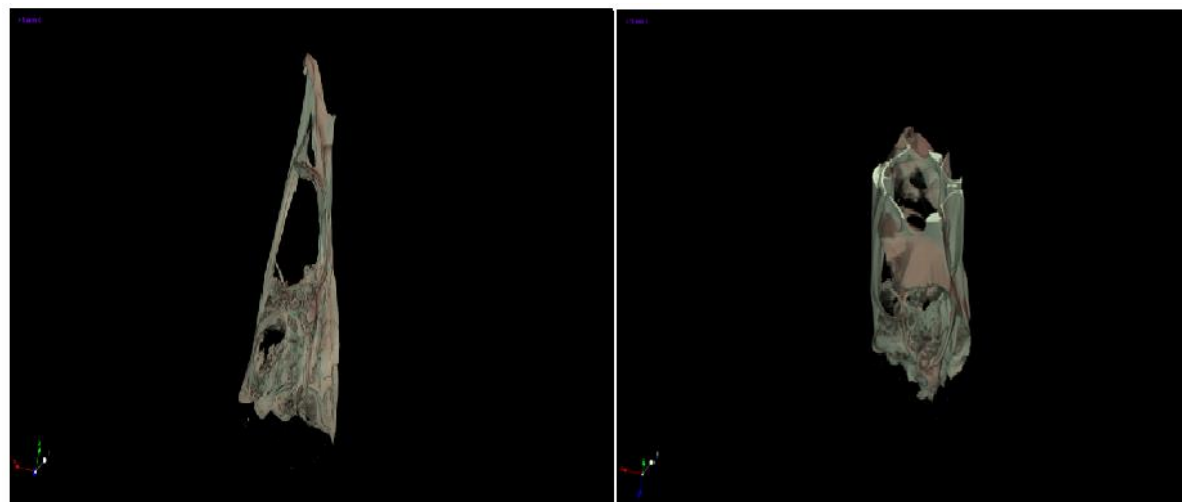


Figura 48: Representação 3D da amostra PT1. Na primeira a amostra encontra-se inteira; na segunda a amostra encontra-se fatiada para visualização interna.



*Figura 49: Representação 3D da amostra R1. Na primeira a amostra encontra-se inteira; na segunda a amostra encontra-se fatiada para visualização interna.*



*Figura 50: Representação 3D da amostra R2. Na primeira a amostra encontra-se inteira; na segunda a amostra encontra-se fatiada para visualização interna.*

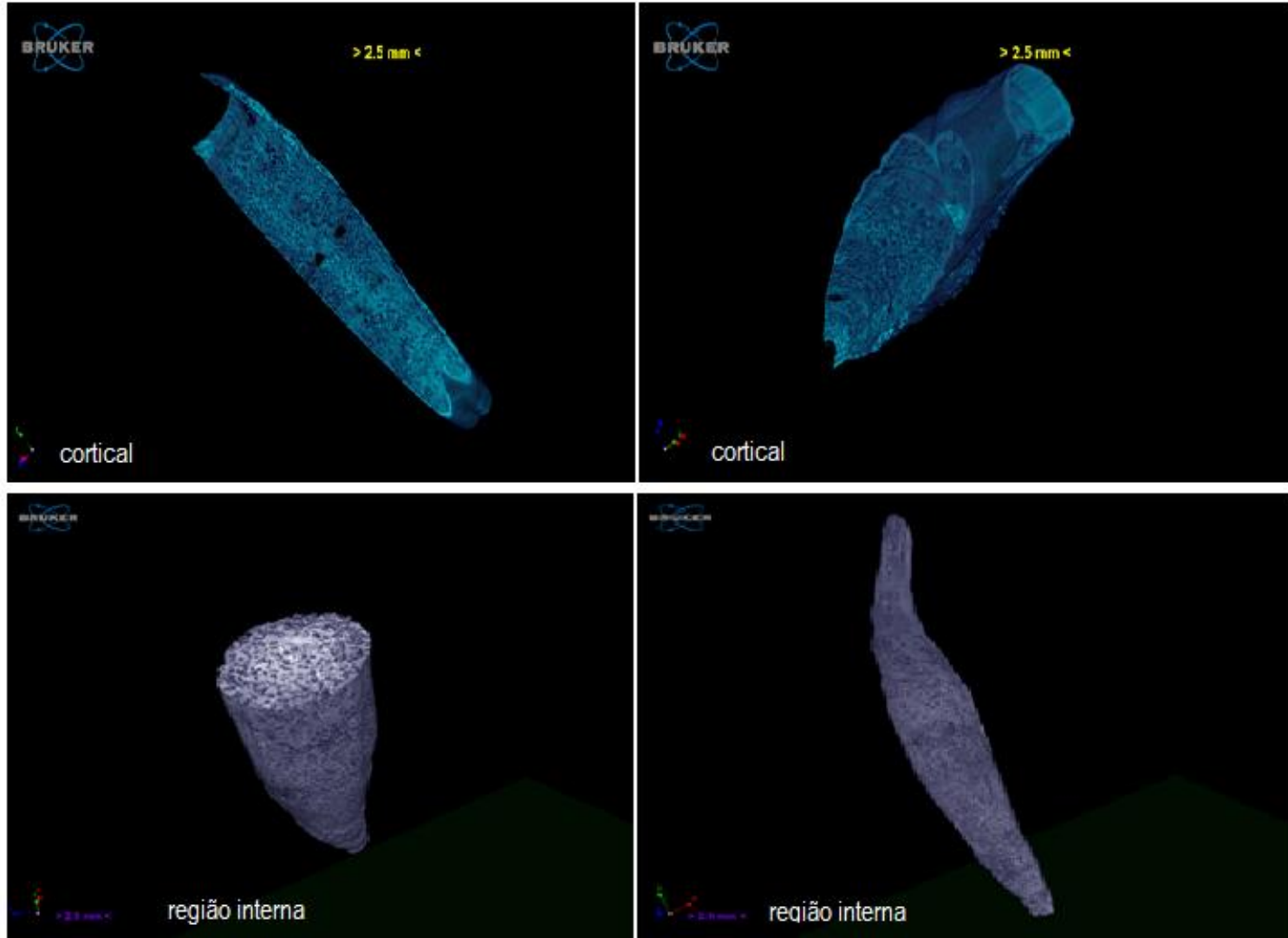


Figura 51: Representação 3D da região cortical e da região interna da amostra C1.

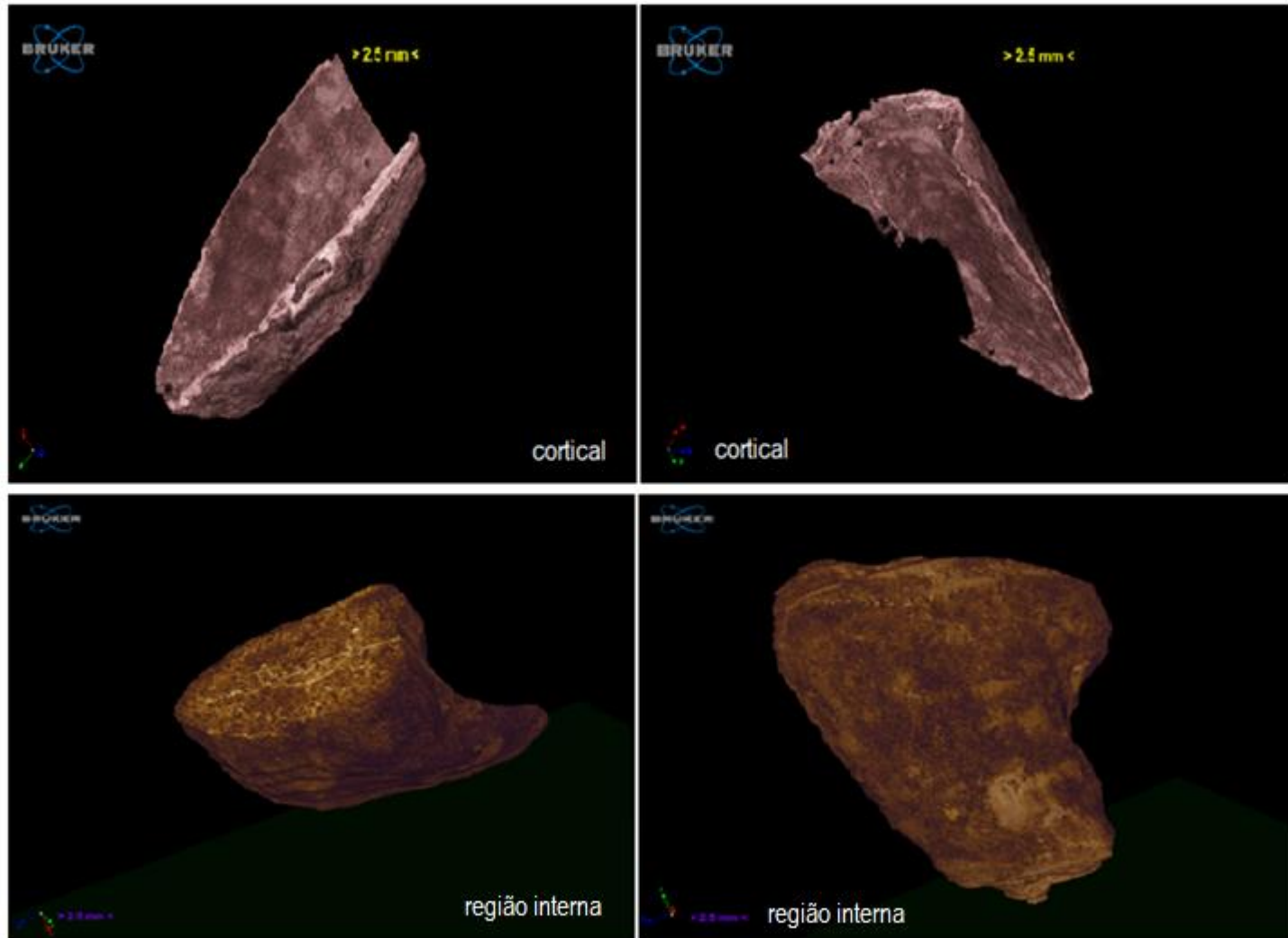


Figura 52: Representação 3D da região cortical e da região interna da amostra P1.



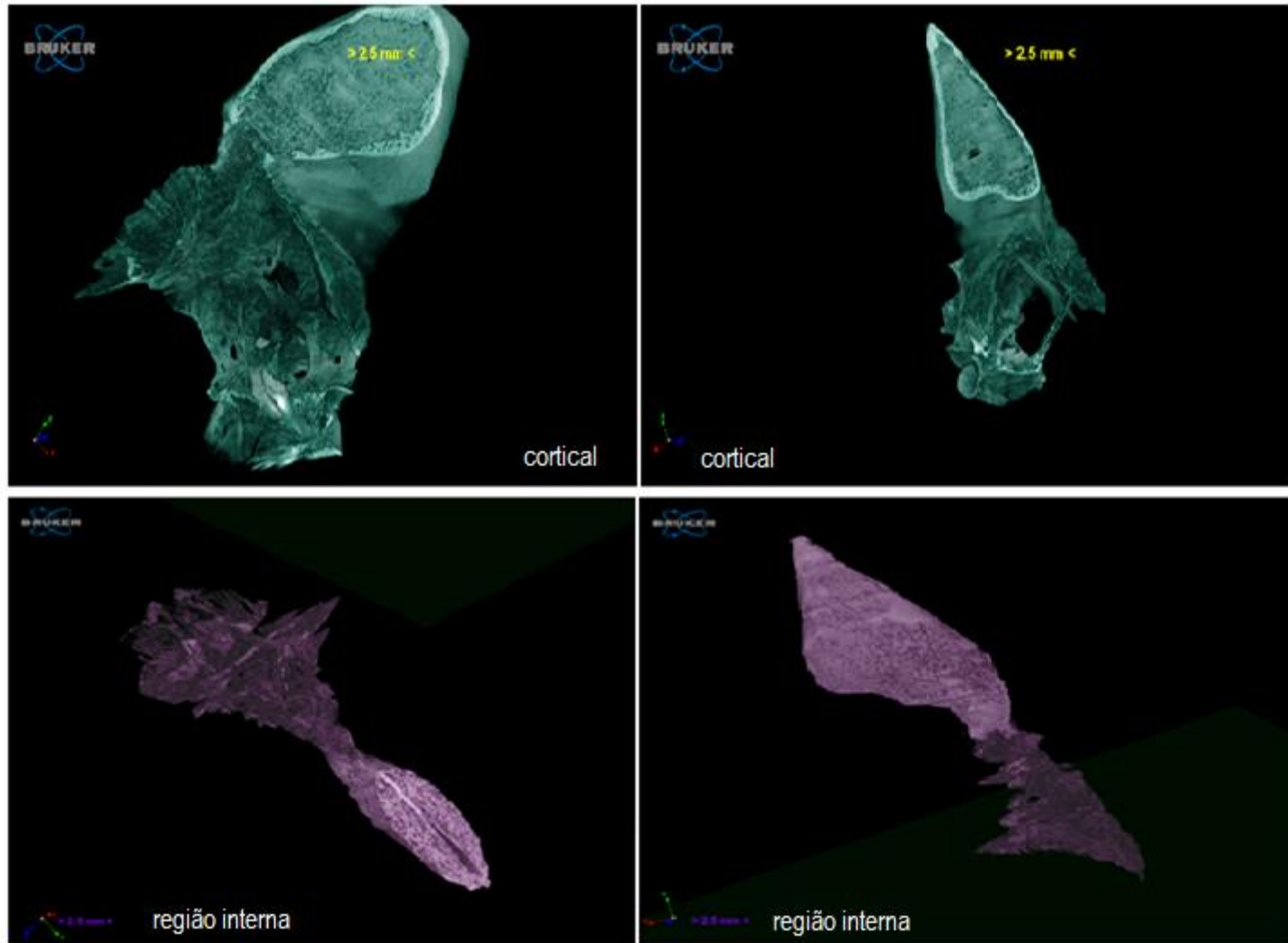


Figura 53: Representação 3D da região cortical e da região interna da amostra P2.

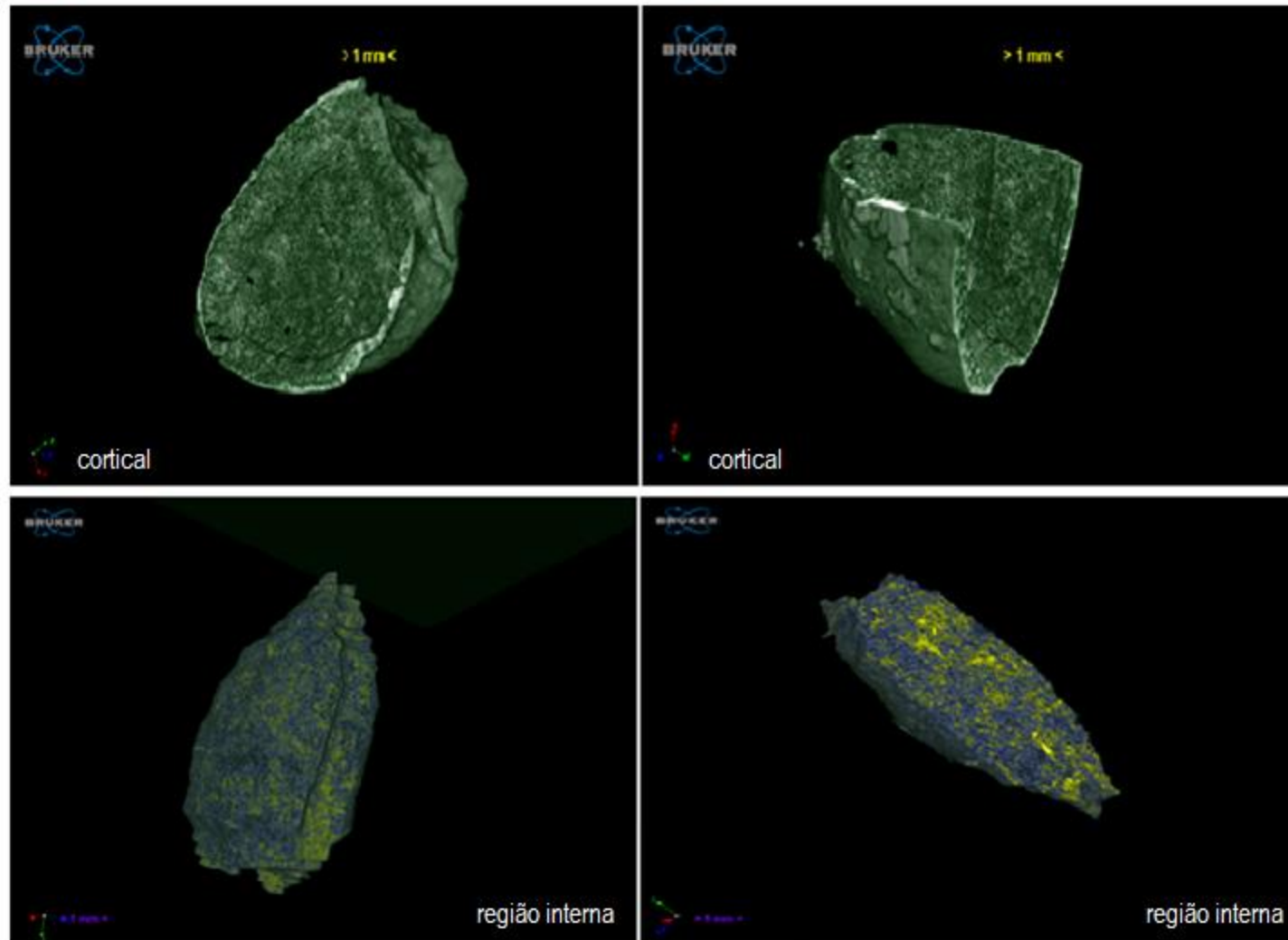


Figura 54: Representação 3D da região cortical e da região interna da amostra PT1.

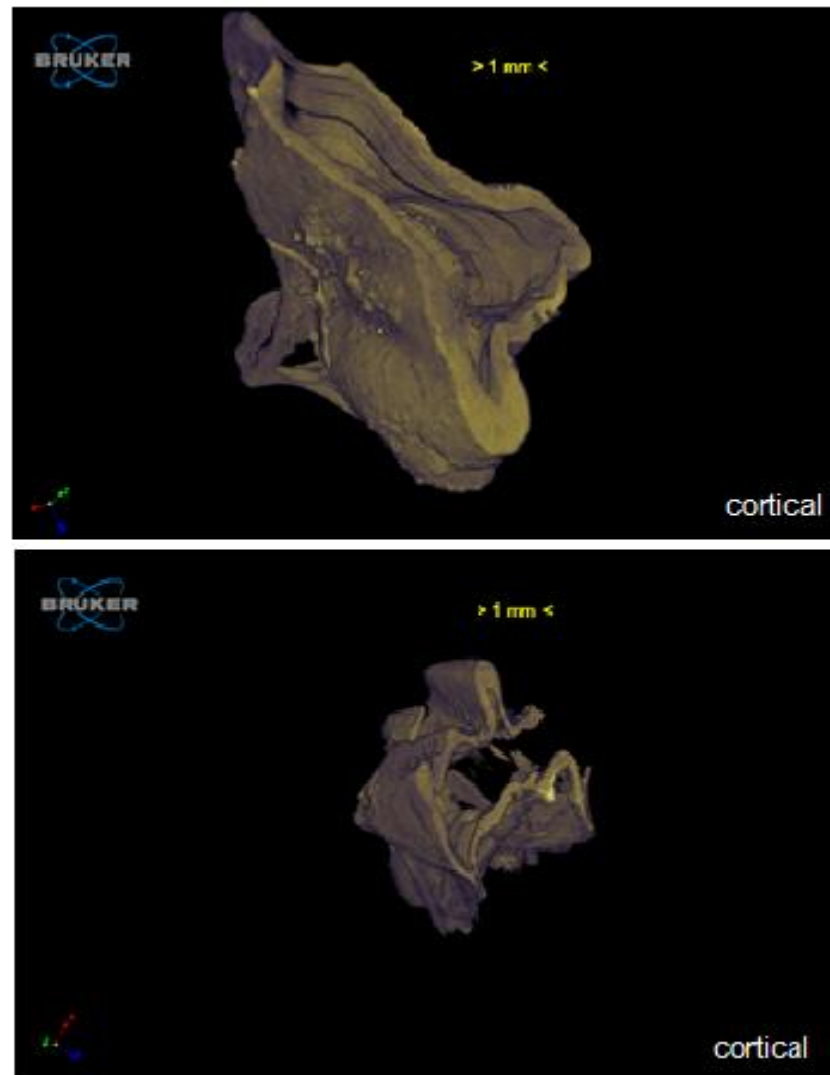


Figura 55: Representação 3D da região cortical e da região interna da amostra R1.

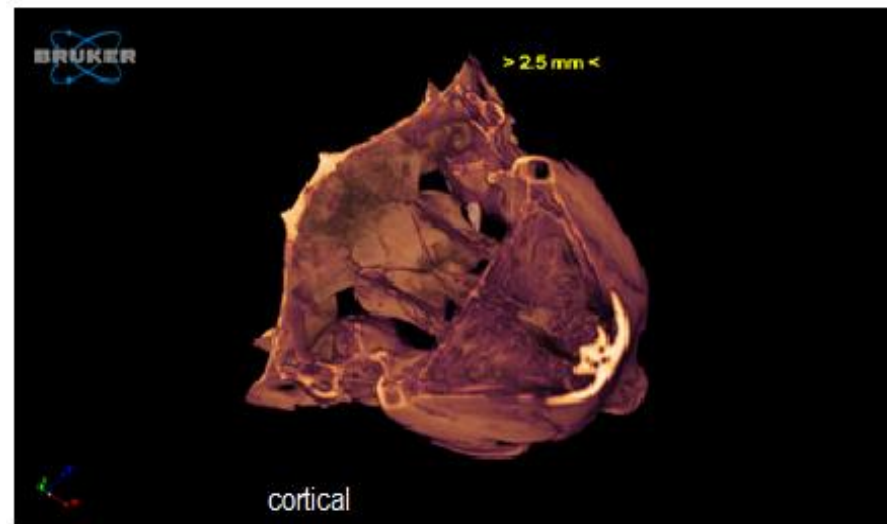
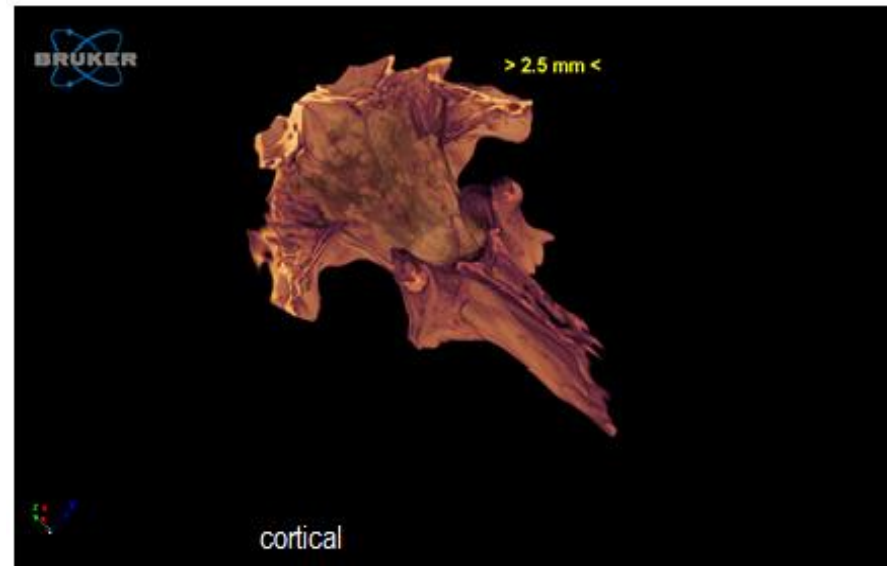


Figura 56: Representação 3D da região cortical da amostra R2.

# CAPÍTULO VII

## CONCLUSÃO

A técnica de microtomografia computadorizada por raios X mostrou-se bastante útil e eficiente para estudo de caracterização interna de amostras em que a caracterização e visualização da estrutura óssea de peixes era de extrema importância.

A geração de imagens de seção transversal bidimensionais (2D) e tridimensionais (3D) enriqueceu ainda mais o estudo das amostras, uma vez que, com uma riqueza de detalhes de escala micrométrica, permitiu a visualização de características que não podiam ser vistas a olho nu. Através destas visualizações foi possível perceber que 2 das 6 amostras (R1 e R2) possuíam região óssea particular (apenas região cortical), enquanto que as outras 4 (C1, P1, P2 e PT1) apresentavam tanto região cortical quanto região interna de característica esponjosa.

A alta densidade óssea (BV/TV) é um índice comprobatório de que as amostras ósseas apresentam hiperostose.

A m-CT comprovou sua eficiência na visualização e caracterização de estrutura interna e apresentou vantagem por ser não destrutiva, preservando a integridade das amostras (essencial por se tratar de fósseis zoológicos vindos de museu). Por não precisar de preparação prévia das amostras a serem analisadas, conclui-se também que esta é uma vantagem que pode ser atribuída à técnica de m-CT.

# CAPÍTULO VIII

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILERA, O. (1988). Anormalidades esqueléticas en *Micropogonias furnieri*, *Cynoscion acoupa*, *Macrodon*, *ancylodon* y *Pachypops fourcroi* (Pisces: Sciaenidae) de Venezuela. **Memoria de la Sociedad de Ciencias Naturales La Salle**, v129, 55 –83.

AGUILERA, O., BELEM, A. L., ANGELICA, R., MACARIO, K., CRAPEZ, M., NEPOMUCENO, A., SILVA, E. (2016). “Fish bone diagenesis in Southeastern Brazilian shell mounds and its importance for paleoenvironmental studies”. **Quaternary International**, 391, 18 –25.

AGUILERA, O., ROCHA, I. LOPES, M. S., LIMA, I., LOPES, R. T., MACHADO, A. S., GUIMARÃES, R. B., CRAPEZ, M. A. C., TENÓRIO, M. C., NEPOMUCENO, A., 2017. “The bone degenerative processes in senile fishes from Holocene Brazilian shell mounds”. **Journal of Fish Diseases**, v40, pp 1869 – 1881.

ALVES, H., LIMA, I., DE ASSIS, J. T., NEVES, A. A., LOPES, R. T., 2015, “Mineralogy evaluation and segmentation using dual-energy microtomography”, **X-Ray Spectrom**, v44, pp. 99 - 104.

ANDREW, W. (2013). “The anatomy of aging in man and animals”. New York, NY: **Medical Books LTD**.

ARISTIDE, L., REIS, S. F., MACHADO, A. C., LIMA, I., LOPES, R. T., PEREZ, S. I., 2015, “Encephalization and Diversification of the cranial base in platyrrhine primates”, **Journal of Human Evolution**, pp 1-12.

BARBIER, A., MARTEL, C., DE VERNEJOU, M. C., TIRODE, F., NYS, M., MOCAER, G., MORIEUX, C., MURAKAMI, H., LACHERETZ, F., 1999, “The Visualization and Evaluation of Bone Architecture in the Rat Using Three-Dimensional X-Ray Microcomputed Tomography”, **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v17, pp 37-44.

BELEM, A. L., CASTELAO, R. M., & ALBUQUERQUE, A. L. S. (2013). “Controls of subsurface temperature variability in a western boundary upwelling system”. **Geophysical Research Letters**, v40, pp. 1362–1366.

- BELINI, U. L., FILHO, M. T., LASSO, P. R. O., MUÑIZ, G. I. B., 2001, “Potencialidade da microtomografia de raios X (microCT) para a caracterização anatômica da madeira de folhosas tropicais”. **Revista Madeira – Arquitetura e Engenharia**, pp. 69-77.
- BUSHBERG, J. T., SEIBERT, J. A., LEIDHOLDT, E. M. JR., BOONE, J. M., 2002, **The Essential Physics Medical Imaging**. 2ed. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins.
- BUZUG, T. M., 2008, **Computed Tomography from Photon Statistics to Modern Cone-Beam CT**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- CARVALHO, A. C. P., 2007, “História da Tomografia Computadorizada”, **História da Radiologia**, v29, pp. 61-66.
- COHEN, L., DEAN, M., SHIPOV, A., ATKINS, A., MONSONEGO-ORNAN, E., & SHAHAR, R. (2012). “Comparison of structural, architectural and mechanical aspects of cellular and acellular bone in two teleost fish”. **The Journal of Experimental Biology**, 215, 1983–1993.
- FELDKAMP, L. A., DAVIS, L. C., KRESS, J. W., 1984, “Practical cone-beam algorithm”, **Journal Optical Society of America**, v.1, pp. 612 – 619.
- FERNANDES, P. G., 2014, *Aplicação da Microtomografia Computadorizada para a Análise Morfométrica Bi e Tridimensional na Avaliação da Perda Óssea Experimental em Ratos*. Tese, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.
- FRIEDLAND, G. W., THURBER, B. D., 1996, “The birth of CT”, **American Roentgen Ray Society**, v. 167, pp. 1365 – 1370.
- HARA, T., TANCK, E., HOMMINGA, J., 2002, “The influence of microcomputed tomography threshold variations on the assessment of structural and mechanical trabecular bone properties”, **Bone**, v. 31, n. 1, pp. 107.
- JACQUES, P. D., NUMMER, A. R., HECK, R. J., MACHADO, R., 2014, “The use of microtomography in structural geology: A new methodology to analyse fault faces”, **Journal of Structural Geology**, v. 66, pp. 347 – 355.
- JOVANOVIĆ, Z., KHAN, F., ENZMANN, F., KERSTEN, M., 2013, “Simultaneous segmentation and beam-hardening correction in computed microtomography of rock cores”, **Computers & Geosciences**, v.56, pp.142 – 150.
- KAPLAN, I., 1977, **Nuclear Physics**, 2ªed, Massachusetts, Addison Wesley Publishing Company.

KNOLL, G. F., 2000, **Radiation Detection and Measurement**. 3ed. John Wiley & Sons, Inc.

LIMA, I. C. B., 2002, *Quantificação Histomorfométrica 2D a partir de tomografia computadorizada 3D*, M. Sc, Dissertação, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

LIMA, I., ANJOS, M. J., FARIAS, M.I.F., PARCEGONI, N., ROSENTHAL, D., DUARTE, M. E. I., LOPES, R. T., 2008, "Bone diagnosis by X ray techniques", **European Journal of Radiology**, v. 68S, pp. S100 - S103.

LIMA, I. C. B., OLIVEIRA, L. F., LOPES, R. T., 2006, "Bone Architecture Analyses of Rat Femur with 3D Microtomographic Images", **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v269, N3, pp 639-642.

LIMA, I., GIRALDES, L. N., PEREIRA, L. C., OLIVEIRA, M. V., LOPES, R. T., 2007, "Characterization of titanium implant through Micro CT", **Nuclear Instruments & Methods in Physics Research**, v. 579, pp. 309 – 312.

LIMA, R. S., & AFONSO, J. C., 2009, "Raios X: Fascinação, Medo e Ciência", **Química Nova**, v32, N1, pp 263-270.

MACHADO, A. C., OLIVEIRA, T. J. I., CRUZ, F. B., LOPES, R. T., LIMA, I., 2015, "X ray microtomography on hydrochloric acid propagation in carbonate", **Applied Radiation and Isotopes**, v.96, pp. 129 – 134.

MAGWAZA, L. S., & OPARA, U. L., 2014, "Investigating Non-Destructive Quantification and Characterization of Pomegranate Fruit Internal Structure Using X-Ray Computed Tomography", **Postharvest Biology and Technology**, v95, pp 1-6.

MARTÍN-BADOSA, E., ELMOUTAOUAKKIL, A., NUZZO, S., AMBLARD, D., VICO, L., PEYRIN, F., 2003, "A Method for the Automatic Characterization of Bone Architecture in 3D mice Microtomographic Images", **Computerized Medical Imaging and Graphics**, v27, pp 447-458.

MARTINS, R. A., 1998, "A Descoberta dos Raios X: O Primeiro Comunicado de Roentgen", **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 20, n. 4, pp. 373 – 391.

MIZUTANIA, R., SUZUKI, Y., 2012, "X-ray microtomography in biology", *Micron*, v.43, pp. 104 – 115.

OLIVEIRA, M. F. S., LIMA, I., BORGHI, L., LOPES, R. T., 2012, "X ray microtomography application in pore space reservoir rock", **Applied Radiation and Isotopes**, v. 70, pp. 1376 – 1378.



PAULUS, M. J., GLEASON, S. S., KENNEL, S. J., HUNSICKER, P. R., JOHSON, D. K., 2000, "High Resolution X-ray Computed Tomography: An Emerging Tool for Small Animal Cancer Research.", **Neoplasia**, v. 2, pp. 62 – 70.

RODRIGUES, M. R., FERNANDES, R. M. P., SENOS, R., SCORALICK, A. C. D., BASTOS, A. L., SANTOS, T. M. P., VIANA, L. P., LIMA, I., GUZMAN-SILVA, M. A., KFOURY-JUNIOR, J. R., 2015, "Novel Rat Modelo of Nonunion Fracture with Vascular Deficit", **Injury**, v46, pp 649-654.

SALES, E. S., 2010, *Estudo da qualidade óssea através das técnicas de microtomografia e microfluorescência de raios X*. D.Sc. Dissertação, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

SANTOS, T. M. P., 2015, *A Transdisciplinalidade da Microtomografia Computadorizada*. Projeto de Graduação, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

SCHILLING, P. J., KAREDLA, B. R., TATIPARTH, A. K., VERGES, M. A., HERRINGTON, P. D., 2005, "X-ray computed microtomography of internal damage In fiber reinforced polymer matrix composites.", **Composites science and technology**, v.65, pp. 2071 – 2078.

SEIBERT, J. A., 2006, "Flat-Panel Detectors: How Much Better are They?", **Pediatric Radiology**, v36, pp 173-181.

SIJBERTS, J., POSTNOV, A. A., 2004, "Reduction of Ring Artefacts in High Resolution micro-CT Reconstructions", **Physics in Medicine and Biology**, v49.

SILVA, A. G. P., 2007, **Curso de Introdução à Estereologia**, Universidade Federal do Norte Fluminense, Brasil.

SMITH-VANIZ, W. F., & CARPENTER, K. E. (2007). Review of the crevalle jacks, *Caranx hippos* complex (Teleostei: Carangidae), with a description of a new species from West Africa. **Fishery Bulletin**, 105, 207 –233.

STEPPE, K., CNUUDE, V., GIRARD, C., LEMEUR, R., CNUUDE, J.P., JACOBS, P., 2004, "Use of X-ray computed microtomography for non-invasive determination of wood anatomical characteristics." **Journal of Structural Biology**, v.148, pp. 11 – 21.

SWAIN, M V., XUE, J., 2009, "State of the art of Micro-CT Applications in Dental Research.", **International Journal of Oral Science**, v.1, n.4, pp. 177 – 188.

TAUHATA, L., SALATI, I. P. A., DI PRINZIO, R., DI PRIZIO, A. R., 2003, **Radioproteção e Dosimetria: Fundamentos**. 5ed.

VIDAL, F., ASSIS, J. T., LOPES, R. T., LIMA, I., 2014, "2D/3D Quantification of bone morphometric parameter changes using X ray microtomography with different pixel sizes", **Radiation Physics and Chemistry**, v. 95, pp. 227 – 229.

# ANEXO A

A seguir será apresentado o trabalho que foi resultado do presente estudo.

Received: 6 February 2017 | Revised: 24 April 2017 | Accepted: 25 April 2017  
DOI: 10.1111/jfd.12662

ORIGINAL ARTICLE

WILEY *Journal of Fish Diseases*

## The bone degenerative processes in senile fishes from Holocene Brazilian shell mounds

O Aguilera<sup>1</sup> | I Rocha<sup>2</sup> | M S Lopes<sup>1</sup>  | I Lima<sup>2</sup> | R T Lopes<sup>2</sup> | A S Machado<sup>2</sup> | R B Guimarães<sup>3</sup> | M A C Crapez<sup>1</sup> | M C Tenório<sup>4</sup> | A Nepomuceno<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biologia Marinha, Programa de Pós-graduação em Biologia Marinha e Ambientes Costeiros, Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, RJ, Brazil

<sup>2</sup>Nuclear Instrumentation Laboratory, Nuclear Engineering Program/COPPE, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil

<sup>3</sup>Instituto de Física, Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, RJ, Brazil

<sup>4</sup>Departamento de Antropologia, Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil

### Correspondence

Mariana S. Lopes, Pós-graduação em Biologia Marinha, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brazil.  
Email: lopes\_mariana@id.uff.br

### Funding information

CAPEX (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), Grant/Award Number: 23069.042879/11-39; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, Grant/Award Number: E-26/111.278/2014; Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação da Universidade Federal Fluminense, Grant/Award Number: 46094044157201296

### Abstract

Zooarchaeological collections from shell mounds in Rio de Janeiro (2,470–4,632 cal BP) contain a high prevalence of swollen fish bones belonging to the Atlantic spade-fish (*Chaetodipterus faber*), crevalle jack (*Caranx hippos*) and fat snook (*Centropomus parallelus*). Given the lack of knowledge of the bone degenerative process in senile fishes, this study analysed hyperostotic bone in zooarchaeological and modern specimens to obtain high-resolution morphology and microstructure reconstruction. We used microCT as well as X-ray diffraction to characterize the crystallographic changes associated with fish senility. Our results showed that trabecular microstructures in hyperostotic bones were consistent with estimated values of the per cent bone volume-to-total volume ratio (BV/TV) and were greater than 60% in cortical bone. Hyperostotic bones indicated a high radiograph density, and X-ray diffractograms showed a decrease in hydroxyapatite [ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ] and calcite ( $\text{CaCO}_3$ ) neocrystallization. These crystalline and density changes revealed an advanced stage of fish senile and indicate the vulnerability of ageing fish populations.

### KEYWORDS

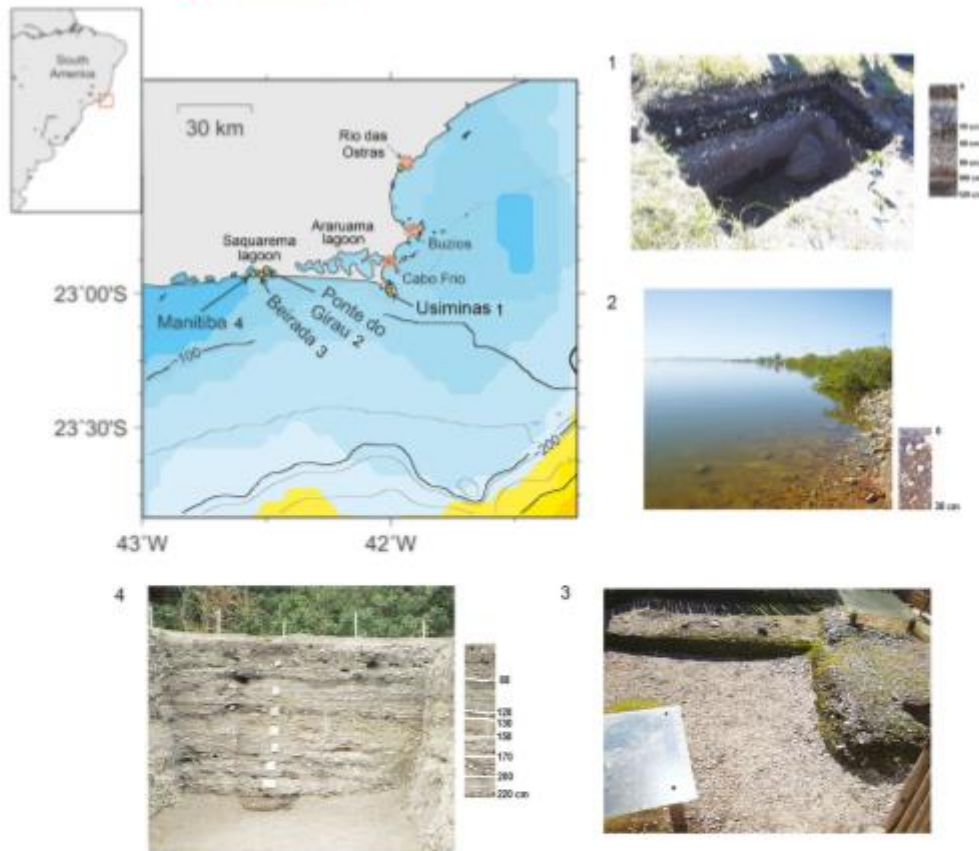
diffraction X-ray, Holocene, hyperostosis, microCT, shell mounds

## 1 | INTRODUCTION

Fish assemblages from Holocene Brazilian shell mounds are composed of diverse and abundant tropical fish species (Gonzalez, 2005, 2014; Klöcker, Villagrán, Giannini, Peixoto, & DeBlasis, 2010; Kneip, 2001). Most of them were identified by fish bones and otoliths, shark teeth and vertebrae, and ray tooth plates and caudal spines (Lopes et al., 2016). Taxonomical analysis requires the accurate identification of certain bones such as the skull, jaw, pharyngeal tooth, pectoral girdle and vertebrae. Fish bones and otoliths are used as a substrate for radiocarbon dating and isotope analyses for  $\delta^{18}\text{O}$ -derived temperatures (Aguilera et al., 2016; Alves et al., 2015;

Andrews, Kalish, Newman, & Johnston, 2011; Ghosh, Eiler, Campana, & Feeney, 2007; Petchey & Higham, 2000; Piner & Wischniowski, 2004; Szpak, 2011; West, Wischniowski, & Johnston, 2012). Therefore, mineralogical integrity precludes the selection of samples for complex and expensive geochemical analysis.

Within the diverse archaeo-ichthyological materials, an exceptional abundance of thick, swollen and hyperostotic bones were found in every collection from the Rio de Janeiro shell mounds. These findings were previously recorded by Kneip (1995, 2001) and Tenório, Afonso, and Pinto (2010). Historical chronicles from Soares de Sousa in 1587 (Soares de Sousa, 1851) report the presence of fishes with hyperostotic bones from the north-eastern Brazilian coast.



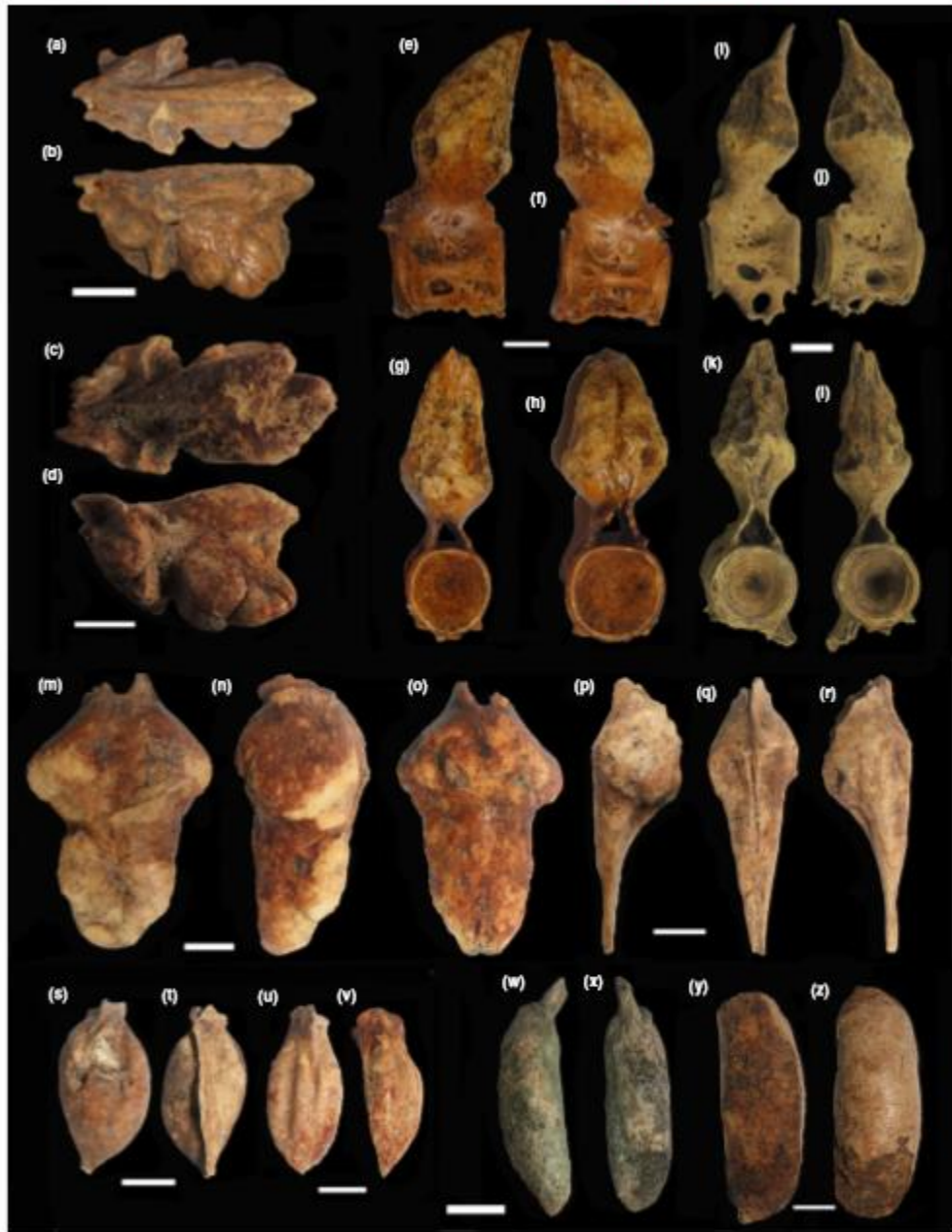
**FIGURE 1** Study area in the south-eastern Brazilian coast showing the shell mound locations. (1) Usiminas; (2) Ponte do Girau; (3) Beirada; and (4) Maniitaba. Map: A. Belém; photographs: 1. R. Sousa; 2. L. Costa; 3. O. Aguilera; 4. L. Kneip (MNUFRJ files) [Colour figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

Prehistoric settlements in the South American Pacific coastal plain also show the presence of fishes with hyperostotic bones (Béarez, 1997).

Ageing is a natural process that affects all living organisms and leads to physiological and anatomical degeneration (Andrew, 2013). In vertebrates, ageing manifests in adult individuals above the

corresponding mean average life span. The fish ageing process has been considered a curiosity since the illustration and description of the hyperostotic skull of *Chaetodipterus faber* by Gregory (1933). Anatomical and teratological data reveal that the degenerative condition of hyperostotic bone increases in senile fishes but often go undetected. These osseous excrescences are frequent in large

**FIGURE 2** Small-scale fat snook (*Centropomus parallelus*), partial skull of zooarchaeological specimens with chronic hyperostosis in the supraoccipital bone. (a–b) MNUFRJ-ZA-387, Usiminas; (c–d) MNUFRJ-ZA-531, Maniitaba shell mound. (a and c) dorsal view; (b and d) left lateral view. Creville jack (*Caranx hippos*), vertebrae. (e–h, i) MNUFRJ-ZA-413; (f–j) MNUFRJ-ZA-414, Usiminas shell mound. (e and i) left lateral view; (f and j) right lateral view; (g and k), anterior view; (h and i) posterior view. Unspecific hyperostotic pterygiophores from zooarchaeological specimen. (m–v) MNUFRJ-ZA-526; (p–r), MNUFRJ-ZA-527; (s–t) MNUFRJ-ZA-528; (u–v) MNUFRJ-ZA-529, Maniitaba shell mound. (m), posterior view; (n and r) right lateral view; (p) left lateral view; (o, s and u) anterior view. Unspecific hyperostotic pleural ribs from a zooarchaeological specimen. (w–x) MNUFRJ-ZA-530, Beirada shell mound; (y–z) MNUFRJ-ZA-411, Usiminas shell mound. (w, x, y and z) lateral view. Scale bar, 10 mm. Photographs: O. Aguilera and M. Lopes [Colour figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]



specimens, adults and ageing fishes (Smith-Vaniz & Carpenter, 2007; Smith-Vaniz, Kaufman, & Glowacki, 1995; Vazzoler, 1971). The physiological mechanism of calcium metabolism in teleost, specifically during skeletal ageing, remains unknown. Thus, the question "Why do swollen fish bones exist?" was a topic of continuous debate during the last century (Bartosiewicz, 2014; Gervais, 1875; Smith-Vaniz et al., 1995; Von den Driesch, 1994). In general, the age and longevity of fish are remarkable (Bowker, 1995; Cailliet & Andrews, 2008). The life spans of small fish have an annual limit, whereas the life spans of large fish are greater (Andrew, 2013). For example, the bass grouper, *Polyprion americanus*, can live for 75 years (Wakefield, Newman, & Boddington, 2013), and the yellow-edge grouper, *Epinephelus flavolimbatus*, can live for 85 years (Cook, Fitzhugh, & Franks, 2009).

Bone thickness results from periosteal ossification, which is generally accompanied by a resorption of bone tissues. This phenomenon gives rise to spongy bones that constitute the swollen structure, which is surrounded by compact laminar bone. The entire swollen bone is considered hyperostotic (Aguilera, 1988; Desse, Meunier, Peron, & Laroche, 1981; Gervais, 1875; Meunier, Gaudant, & Bonelli, 2010; Von den Driesch, 1994).

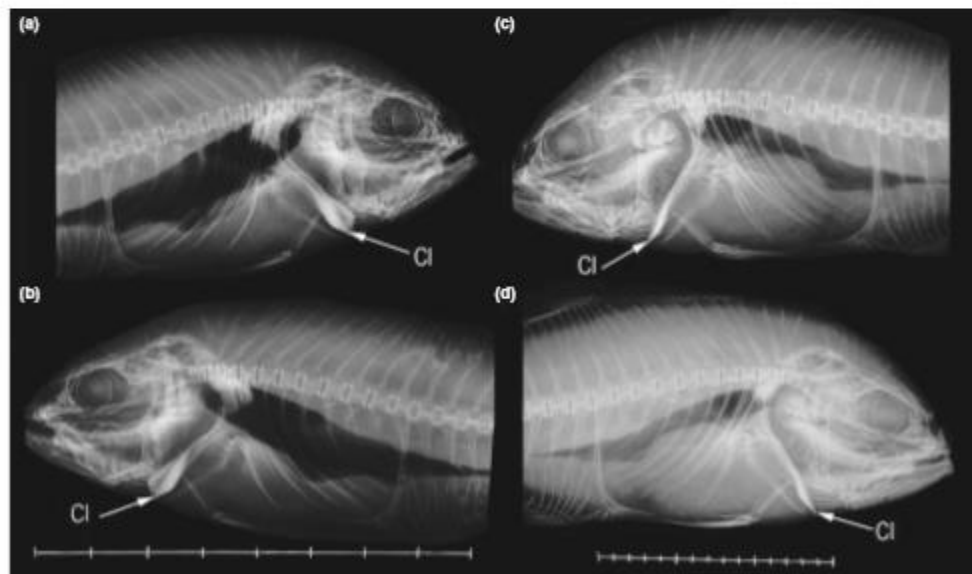
Hyperostosis in teleostean fish is often observed in the supraorbital crest of the skull, ventral tip of the cleithrum, basipterygium, dorsal and anal pterygiophores, pleural and epipleural ribs, and in the haemal and neural spines of vertebrae (Aguilera, 1988; Aguilera & Urdaneta, 1992; Meunier et al., 2010). Natural populations of

tropical and subtropical fishes with commercial importance exhibit hyperostosis (Appendix S1). In the zooarchaeological literature regarding Brazilian shell mounds, swollen fish bones were identified as belonging to the crevalle jack, or "xaréu" (*Caranx hippos*), and Atlantic spadefish "ensada" (*Chaetodipterus faber*).

The ageing process in fish is difficult to study in the wild and is thus poorly understood. Although there have been earlier proposals to study hyperostosis and its origins, this is the first time that modern techniques and analyses were employed to understand the structural changes that occur during the teratological developmental process. In this study, we document the degenerative bone process in senile fishes from prehistoric Brazilian shell mounds (2,470–4,632 cal BP) to better understand the qualitative and quantitative structural changes that occur in pristine environments.

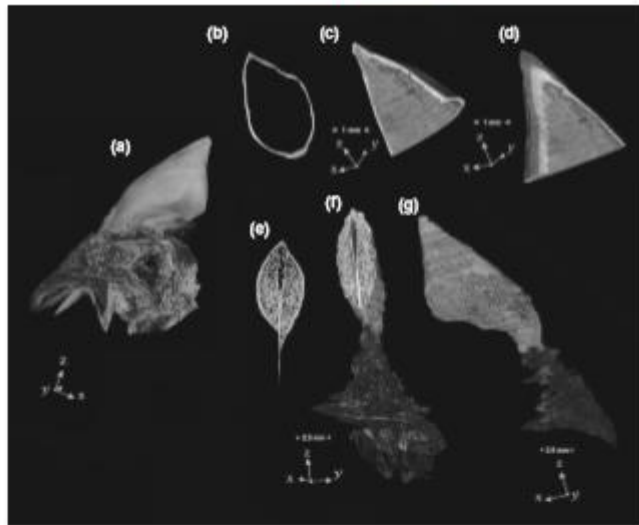
## 2 | MATERIALS AND METHODS

Fish skeletal remains came from shell mounds, which were located in Rio de Janeiro State, Brazil (Figure 1). The shell mounds include Maritiba (3,655–3,922 cal a BP), Beirada (3,211–4,632 cal a BP), Ponte do Girau (3,442–4,102 cal a BP) and Usiminas (2,470–3,390 cal a BP; see Guimarães, 2011; Kneip, 2001; Tenório et al., 2010). Hyperostotic bones were identified macroscopically in the zooarchaeological collections of the National Museum at the Federal University of Rio de Janeiro (MN-UFRJ).

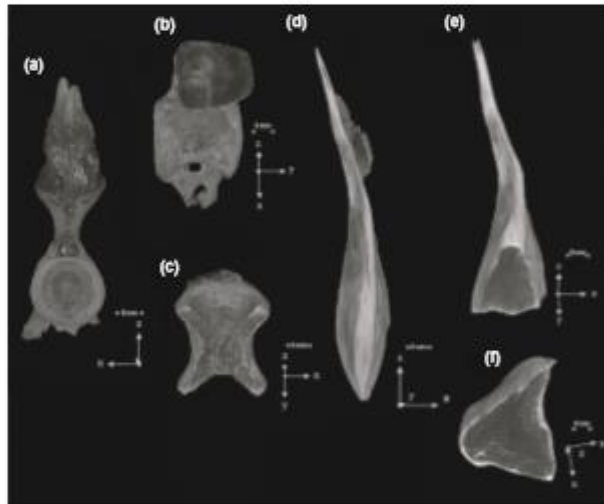


**FIGURE 3** Digital X-ray radiography of horse-eye jack, *Caranx latus*: (a–b), UFF-ECOPECSA-OST-02; (c–d), UFF-ECOPECSA-OST-03 from both body sides. Arrow indicates hyperostotic bones. Cl, cleithrum. Scale bar segments, 10 mm. Radiographs: G. Gonçalves Ferreira

**FIGURE 4** Atlantic spadefish (*Choetodipterus foberi*), UFF-ECOPESCA-OST-04, chronic hyperostotic supraoccipital bone. (a) left lateral view; (b) cortical contour of bone; (c and d) two sections of the cortical supraoccipital apex; (e) cross section of sponge bone; (f) posterior view of the inner spongy bone into the supraoccipital crest; (g) right lateral view of the inner spongy bone into the supraoccipital crest. Image: R.T. Lopes



**FIGURE 5** Zooarchaeological vertebrae of crevalle jack, *Caranx latus*, MNUFRU-ZA-414, chronic hyperostotic neural spine; (a) anterior view; (b) lateral view and cross section of swollen neural spine; (c) cross section of centrum vertebrae. Modern cleithrum of horse-eye jack, *Caranx latus*, with distal hyperostotic region, UFF-ECOPESCA-OST-03; (d) anterior view; (e) anterior view of proximal section and cross section of middle part; (f) cross section of distal tip. Image: R.T. Lopes



Qualitative macromorphological evaluation was performed on thousands of disarticulated fish bones from the shell mound collections. Several diagnostic bones are illustrated in Figure 2.

We analysed modern and archaeological fish with normal and hyperostotic bones from samples of crevalle jack (*Caranx hippos*), horse-eye jack (*Caranx latus*), Atlantic spadefish (*Choetodipterus foberi*) and small-scale fat snook (*Centropomus parallelus*), and unspecific pterygiophores and pleural ribs.

Since G. N. Hounsfield received the Nobel Prize in Medicine in 1979, computed tomography (CT) X-ray imaging has become an important tool and has inspired new technologies, such as X-ray computed microtomography (microCT; Lima et al., 2011; Machado, Oliveira, Cruz, Lopez, & Lima, 2015). In this technique, small X-ray tube focal points can attain higher spatial resolution (Vidal, de Assis, Lopes, & Lima, 2014) which permits a more refined and detailed investigation.

**TABLE 1** MicroCT results of cortical and inner spongy fish bones

ID	C1	P1	P2	PT1	R1
Catalogue number	MNUFRJ-ZA-655	MNUFRJ-ZA-656	UFF-ECOPECA-OST-04	MNUFRJ-ZA-657	MNUFRJ-ZA-387
Species	Unknown	<i>Chaetodipterus faber</i>	<i>Chaetodipterus faber</i>	Unknown	<i>Centropomus parallelus</i>
Bone	Pleural ribs	Supraoccipital	Supraoccipital	Pterygiophores	Skull
Condition	Zooarchaeological with hyperostosis	Zooarchaeological with hyperostosis	Modern with hyperostosis	Zooarchaeological with hyperostosis	Zooarchaeological with hyperostosis
<b>Cortical Region</b>					
Bone volume, BV, mm <sup>3</sup> , Total	276	1,342	121	66	680
Total volume, TV, mm <sup>3</sup>	295	1,674	122	71	790
Bone volume Density, BV/TV, %	94	80	99	93	86
<b>Spongy region</b>					
Bone volume, BV, mm <sup>3</sup> , Total	1,948	4,660	390	541	–
Total volume, TV, mm <sup>3</sup>	2,397	5,995	437	647	–
Bone volume Density, BV/TV, %	81	78	89	84	–
ID	R2	Cle1	Cle2	Vert1	Vert1
Catalogue number	UFF-ECOPECA-OST-05	MNUFRJ-ZA-658	UFF-ECOPECA-OST-03	MNUFRJ-ZA-414	MNUFRJ-ZA-414
Species	<i>Centropomus parallelus</i>	<i>Caranx</i> sp.	<i>Caranx latus</i>	<i>Caranx hippos</i>	<i>Caranx hippos</i>
Bone	Skull (occipital region)	Cleithrum	Cleithrum	Neural spine of vertebrae	Centrum vertebrae
Condition	Modern without hyperostosis	Zooarchaeological with hyperostosis	Modern with hyperostosis	Zooarchaeological with hyperostosis	Zooarchaeological without hyperostosis
<b>Cortical Region</b>					
Bone volume, BV, mm <sup>3</sup> , Total	1,163	2,144	1,081	28	2,142
Total volume, TV, mm <sup>3</sup>	1,201	2,650	1,139	40	3,504
Bone volume Density, BV/TV, %	97	81	95	71	61
<b>Spongy region</b>					
Bone volume, BV, mm <sup>3</sup> , Total	–	5,899	2,244	763	–
Total volume, TV, mm <sup>3</sup>	–	7,898	4,541	1,229	–
Bone volume Density, BV/TV, %	–	75	49	62	–

X-ray diffraction is a technique widely used for the characterization of structural properties, crystalline phases (including bone), and the degeneration and deformation of bone at the tissue level (Tadano & Giri, 2011).

X-ray radiography of modern large specimens of horse-eye jack, *Caranx latus* (one specimen measured 550 mm and another was 770 mm of total body length), and Atlantic spadefish, *Chaetodipterus faber* (470 mm TL), from the north coast of Rio de Janeiro State was conducted using the Polydors digital model lx-50 calibrated at 50 kV, 9.30 mAs and 14.4 ms (Figure 3).

3D high-resolution microCT images of hyperostotic bones were obtained from a desktop system (Bruker Skyscan 1173), which was calibrated to operate at 55 kV voltage and 145  $\mu$ A current with a flat-panel detector matrix of 2,240  $\times$  2,240 pixels. A pixel size of 14.8  $\mu$ m was used with a scanning step rotation along the z-axis of 0.8° over 360°.

The longest axis (thicker section) of each sample was aligned perpendicular to the rotational axis of the equipment, which provides

the shortest X-ray path through the material. Importantly, this allows different degrees of beam hardening. Sets of microCT projections were reconstructed based on a mathematical process called filtered back projection (Feldkamp, Davis, & Kress, 1984). To improve image quality, we compensated for beam hardening and ring artefacts, which are inherent to the scanning procedure (Machado et al., 2015). Cortical and spongy bones were distinguished and separated by delimiting a specific area of interest. The microCT evaluation was performed separately for each type of bone. The global segmented method (Vidal et al., 2014) was applied to obtain the BV/TV ratio (bone volume (BV)-to-total volume (TV) ratio) in 3D, based on a surface-rendered volume model (Lorensen & Line, 1987; Odgaard, 1997). Next, we used grey image levels to separate bone and non-bone (background).

The crystalline structure of the bone was analysed by X-ray powder diffraction. The diffractometer was a Bruker AXS D8 Advance (Cu K $\alpha$  radiation with a nickel filter K $\beta$ ) in a Bragg-Brentano geometry with a ( $\theta/\theta$ ) configuration. The diffraction patterns were collected



**TABLE 2** X-ray diffractometric analyses in modern and archaeological bones

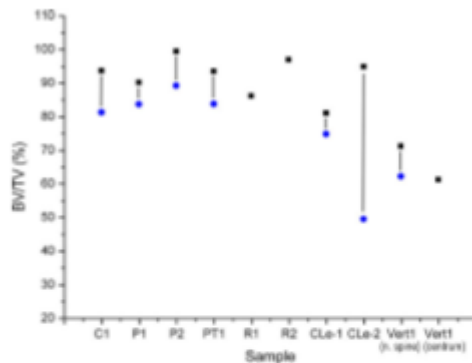
Species, Bone, Catalogue	ID	Structure	Crystallinity	Crystalline phase	Weight per cent	Spatial group	Crystalline system
<i>Chaetodipterus faber</i>	A3a	Spongy	75%	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	99	P63/m	Hexagonal
Modern skull				CaCO <sub>3</sub>	1	R-3c	Trigonal
UFF-ECOPESCA-OST-01	A3b	Cortical	93%	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	86	P63/m	Hexagonal
				CaCO <sub>3</sub>	14	R-3c	Trigonal
<i>Chaetodipterus faber</i>	A2a	Spongy	80%	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	100	P63/m	Hexagonal
Modern cleithrum	A2b	Cortical	85%	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	98	P63/m	Hexagonal
UFF-ECOPESCA-OST-01				CaCO <sub>3</sub>	2	R-3c	Trigonal
<i>Chaetodipterus faber</i>	A4a	Spongy	94%	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	100	P63/m	Hexagonal
Archaeological cleithrum	A4b	Cortical	92%	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	98	P63/m	Hexagonal
MNUFRJ-ZA-658				CaCO <sub>3</sub>	2	R-3c	Trigonal
<i>Chaetodipterus faber</i>	A1A3	Spongy	99%	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	98	P63/m	Hexagonal
Archaeological cleithrum				CaCO <sub>3</sub>	2	R-3c	Trigonal
MNUFRJ-ZA-659	A2A4	Cortical	100%	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	100	P63/m	Hexagonal
<i>Chaetodipterus faber</i>	A1a	Spongy	75%	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	98	P63/m	Hexagonal
Modern anal pterygiophore				CaCO <sub>3</sub>	2	R-3c	Trigonal
UFF-ECOPESCA-OST-01	A1b	Cortical	87%	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	97	P63/m	Hexagonal
				CaCO <sub>3</sub>	3	R-3c	Trigonal
<i>Corax hippos</i>	A5a	Spongy	97%	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	76	P63/m	Hexagonal
Archaeological neural spine				CaCO <sub>3</sub>	24	P21/c	Monoclinic
Archaeological neural spine	A5b	Cortical	95%	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	94		Hexagonal
				CaCO <sub>3</sub>	6		Monoclinic
Archaeological centrum of vertebrae	A5c	Cortical	95%	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	92	P63/m	Hexagonal
MNUFRJ-ZA-414				CaCO <sub>3</sub>	3	R-3c	Trigonal
				CaHPO <sub>4</sub>	5	P1	Triclinic
Unidentified	A6	Spongy	89%	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	93	P63/m	Hexagonal
Archaeological pleural ribs				CaCO <sub>3</sub>	7	R-3c	Trigonal
Archaeological pleural ribs	A5	Cortical	93%	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	99	P63/m	Hexagonal
MNUFRJ-ZA-660				CaCO <sub>3</sub>	1	R-3c	Trigonal

in a flat geometry. Each modern hyperostotic structure was separated into cortical and spongy bone subsamples. These parts were ground using liquid nitrogen in a mortar agate. Samples that were high in oil and organic material were dried in a muffle at 230°C for 24 hr and then pulverized again in a mortar agate. Archaeological fish bones were crumbled without pretreatment and were pulverized into two samples, including cortical bones and spongy bones. Each powder sample was packed into a portable sample disc for analysis. The instrumental conditions were as follows: scan range (°2θ), 5–90°; voltage, 40 kV; amperage, 40 mA; step size, 0.0194°; time per step, 1 s; divergent slit, 0.6 mm; and sample rotation velocity, 15 revolutions per minute (rpm), using a PSD detector (Bruker AXS LynxEye model). Data acquisition was performed with DGRD Diffrac.suite software and processed with Diffrac-EVA software. Crystallographic phase identification was performed using the standard comparative diffractogram from ICDD-PDF (International Center for Diffraction Data-Powder Diffraction File). The XRPD data were refined using the Rietveld method (Rietveld, 1967) with the GSAS-II (Larson & Von Dreele, 2004) and TOPAS 4.2 (Bruker AXS) software. The

analysis consisted of semiquantitative estimations, which were expressed as a percentage of the diffracted peak with the highest intensity (or principle). The map in the figure was produced with GMT 5.0 (Generic Mapping Tools) and ODV (Ocean Data View), under General Public Licenses.

### 3 | RESULTS

The results of the macroscopic assessment of chronic hyperostotic bones as well as the microCT and digital radiography are presented in Figures 2–5 and Video S1. The microCT results from the cortical and inner spongy bones are presented in Table 1, and the X-ray diffractometric analyses are presented in Table 2. The X-ray diffractometric analyses of the zooarchaeological samples revealed a second crystalline phase, consisting of calcite, which is not present in normal bone samples. Comparative crystallograms of bony fish from modern and zooarchaeological sites are shown in Figures 7–10.



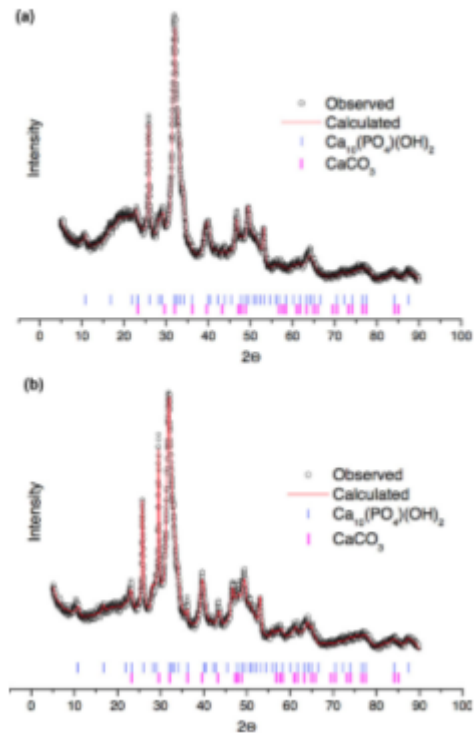
**FIGURE 6** Object volume of bone,  $Obj.V/TV$ , based in trabecular microstructures of cortical (square) and inner spongy bones (circle). C1 (MNUFRJ-ZA-655): unspecific zooarchaeological hyperostotic pleural ribs; P1 (MNUFRJ-ZA-656): zooarchaeological hyperostotic skull (supraoccipital) of *Chaetodipterus faber*; P2 (UFF-ECOPECA-OST-04): hyperostotic modern skull (supraoccipital) of *Chaetodipterus faber*; PT1 (MNUFRJ-ZA-657): unspecific zooarchaeological hyperostotic pterygiophore; R1 (MNUFRJ-ZA-387): zooarchaeological hyperostotic skull of *Centropomus parallelus*; R2 (UFF-ECOPECA-OST-05): modern and normal skull of *Centropomus parallelus*; Cle1 (MNUFRJ-ZA-658): zooarchaeological hyperostotic cleithrum of *Caranx* sp.; Cle2 (UFF-ECOPECA-OST-03): modern hyperostotic cleithrum of *Caranx latus*; Vert1 (MNUFRJ-ZA-414): zooarchaeological hyperostotic neural spine of *Caranx hippos*. The interest zone of the spongy bone in R1 and Vert1 cannot be distinguished and delimited clearly. Spongy zone in normal bone (R2) is absent [Colour figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

The cleithrum of modern *Caranx latus*, or Cle2, was the skeletal element with the highest hyperostotic ratio in both cortical and spongy bone regions, with BV/TV (bone volume (BV)-to-total volume (TV) ratio) equal to 94.8% and 49.4%, and a BV/TV index (cortical/spongy bone) of 1.91. The remaining structures found in modern and zooarchaeological bones have BV/TV indices between 1.03 and 1.15.

The posterior region of swordspine snook skulls in the zooarchaeological collections displayed swelling in the prootic, basioccipital, supraoccipital and exoccipital bones (R1). The cortical bone in both zooarchaeological and modern *C. parallelus* had a BV/TV ratio of 86.1% and 96.8%, respectively. However, we could not distinguish the zone of interest in the spongy bone in the zooarchaeological skull. Here, the calculated values of swollen bones were related to cortical bone thickness and were not representative of the spongy region. Spongy zones were absent in normal bone (without excrescences).

The difference between hyperostotic and normal bone is important to determine bone densitometry and crystallographic phases within the zone of interest, which includes compact cortical bone and trabecular spongy bone. Therefore, statistical tests were unnecessary.

X-ray diffractograms of hyperostotic bones in modern and archaeological senile fish exhibit a neocrystallization of calcite in bones naturally composed of hydroxyapatite. The neocrystallization in the

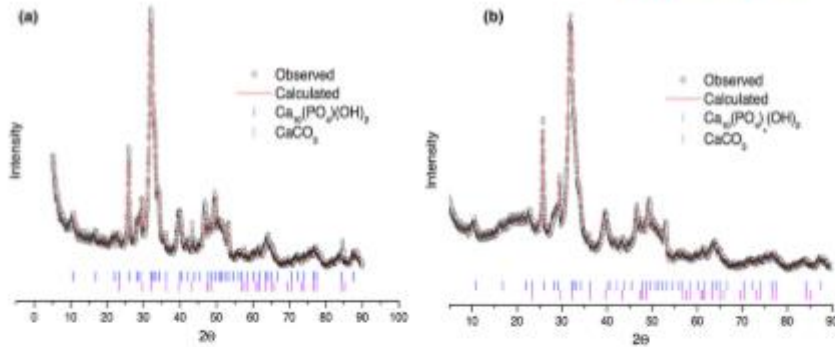


**FIGURE 7** Diffractogram of modern hyperostotic skull (supraoccipital bone) of *Chaetodipterus faber*, UFF-ECOPECA-OST-01. (a) spongy bone; (b) cortical bone. Graph: R.B. Guimarães [Colour figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

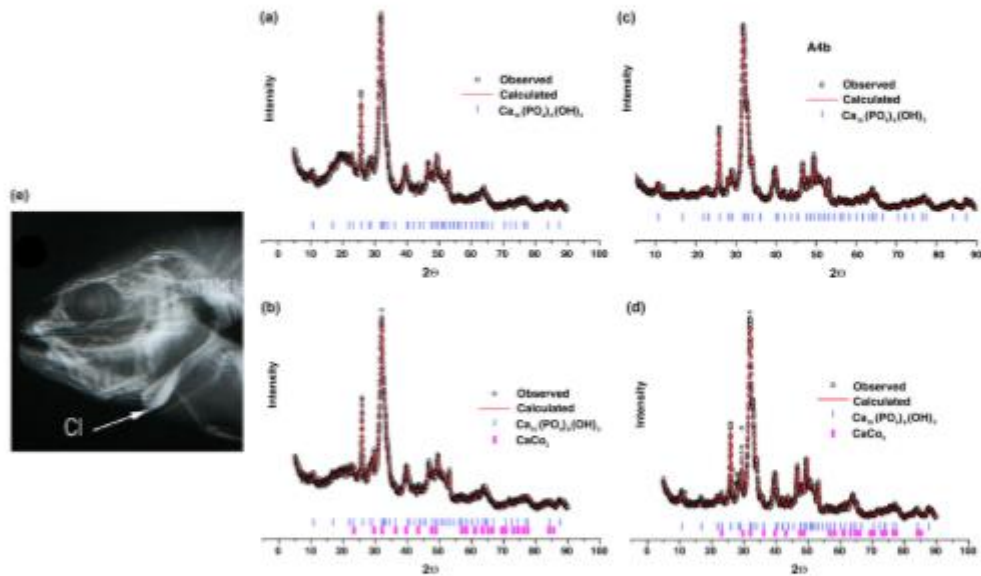
cortical and the spongy bones is approximately two weight per cent (wp), except in the cortical bone of the modern Atlantic spadefish skull, in which the apatite/calcite ratio is 86 wp of  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ /14 wp of  $CaCO_3$ . In the archaeological samples of spongy bone from the neural spine in *Caranx hippos*, our data reveal higher ratios of 76 wp of  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ /24 wp of  $CaCO_3$  and 93 wp of  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ /7 wp of  $CaCO_3$  in the unspecific pleural ribs. In addition, the vertebral centrum of *C. hippos* exhibited a distinctive crystallogram print that had a ratio of 92 wp of  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ /3 wp of  $CaCO_3$ /5 wp of  $CaHPO_4$  and followed the hexagonal, trigonal and triclinic crystalline system, respectively (Table 2).

#### 4 | DISCUSSION

Bone consists mainly of collagen fibres, osteocel and mineral components. Studies on the bone tissue of neoteleostean fishes with acellular bones (which do not contain osteocytes) and basal fishes with cellular bones have been controversial (Cohen et al., 2012; Hughes,



**FIGURE 8** Diffractogram of modern hyperostotic anal pterygiophore of *Chaetodon faber*, UFF-ECOPECA-OST-01. (a) spongy bone; (b) cortical bone. Graph: R.B. Guimarães [Colour figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

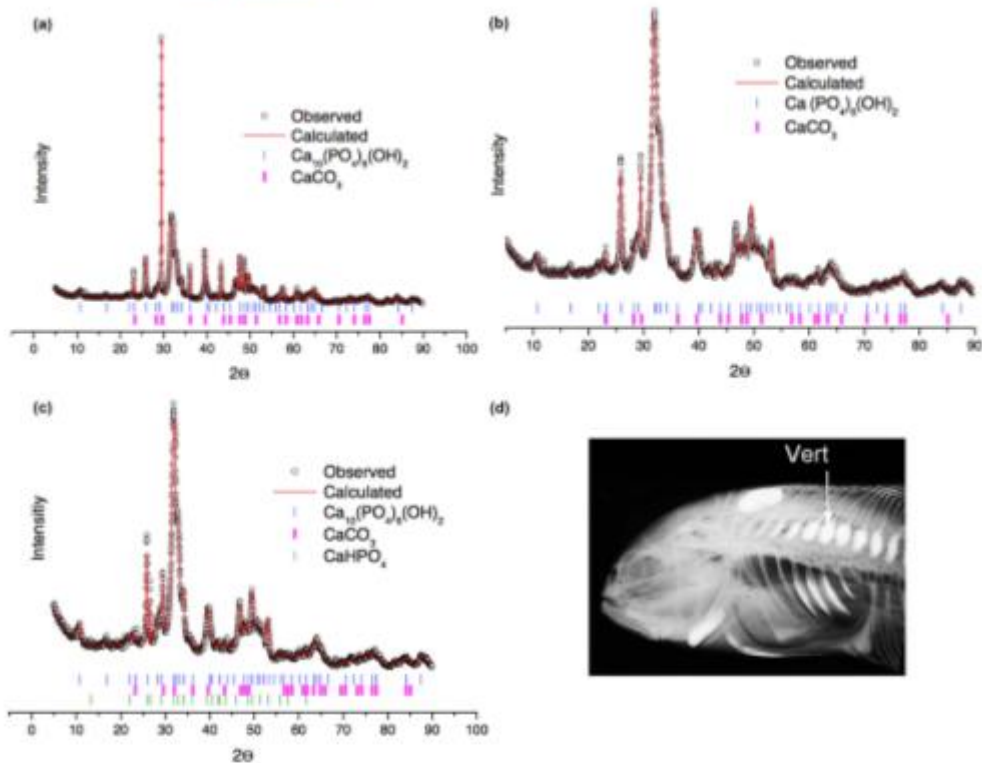


**FIGURE 9** Diffractogram of hyperostotic cleithrum of modern *Caranx latas*, UFF-ECOPECA-OST-03, and zooarchaeological hyperostotic cleithrum of *Caranx* sp., MNUFRJ-ZA-658. (a) modern spongy bone; (b) modern cortical bone; (c) zooarchaeological spongy bone; (d) zooarchaeological cortical bone; (e) radiograph of cleithrum in lateral view. Radiograph: G. Gonçalves Ferreira; graph: R.B. Guimarães [Colour figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

Basecett, & Moffat, 1994; Moss, 1965; Shahar & Dean, 2013; Weiss & Watabe, 1979). However, little is known about teratological process associated with hyperostosis bones. The mineral composition is represented by the concentration of calcium hydroxyapatite [ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ], and the mineralization process is highly dependent on the availability of phosphate. Phosphate is generated by phosphatase enzymes and is essential for the mineralization of the

extracellular matrix within the skeleton. These enzymes release phosphate from phosphorylated proteins and cleave pyrophosphate into two phosphate groups. This process stimulates phosphorylation, as pyrophosphate is a mineralization inhibitor (Huesa et al., 2011).

Hyperostotic bones in fish result from a modification to the organic microstructure during the degradation of collagen and the partial dissolution of hydroxyapatite in the matrix, followed by



**FIGURE 10** Diffractogram of zooarchaeological hyperostotic neural spine of *Caranx hippos*, MNUFRJ-ZA-413. (a) spongy bone; (b) cortical bone; (c) cortical bone of centrum vertebrae; (d) radiograph of *Caranx hippos*. Radiograph courtesy of Smith-Vaniz (modified from Smith-Vaniz & Carpenter, 2007; Figure 9B, USNM 132964); graph: R.B. Guimarães [Colour figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

calcite neocrystallization. A significant increase in periosteal ossification is accompanied by a reabsorption of bone tissue resulting in numerous vascular cavities; additionally, the spongy inner bone is surrounded by cortical laminar bone (Aguilera, 1988; Desse et al., 1981; Gervais, 1875; Meunier et al., 2010). Hyperostotic bones increase in size in conjunction with the growth and age of the fish (Aguilera, 1988; Desse et al., 1981; Gaudie & Czochanska, 1990; Meunier & Gaudant, 1987; Smith-Vaniz & Carpenter, 2007; Vazzoler, 1971), and these neoformations do not follow a regular pattern. However, Smith-Vaniz and Carpenter (2007) observed regular hyperostotic bone development in the *Caranx hippos* species group.

Excellent X-ray radiographic images of hyperostotic bones (Jawad, 2013; Smith-Vaniz & Carpenter, 2007) showed affected swollen bone, such as in Figure 2.

Hyperostotic bone can be distinguished from normal bone by high radiograph densities. Radiological density is a consequence of changes in the crystalline structure and could be erroneously interpreted as osteoid osteona. Moreover, the direct morphological

evaluations show hyperostotic structures known as "swollen bone." The high bone density shown by radiography and microCT reveals a partial loss of hydroxyapatite and calcite neocrystallization and is in agreement with the X-ray diffraction results (Table 2, Figures 5–10). Zooarchaeological fish bones from the shell mounds show evidence of hyperostosis and the diagenesis process (Aguilera et al., 2016), which is induced by bacterial activity, low pH, leaching and carbonate neocrystallization. Diagenesis, which depends primarily on climate conditions (Marean, 1991), can be recognized by geochemical alterations that occur at different stages after burial (Aguilera et al., 2016; Quattropani, Charlet, De Lumley, & Menu, 1999; Tuross, Behrersmeyer, Eanes, Fisher, & Hare, 1989).

Unfortunately, the physiological mechanisms of fish bone hyperostosis remain unknown. However, the abundance of hyperostotic bones in shell mounds indicates that senile fish were highly abundant in precolonial fisheries.

The multifactorial origin of fish hyperostosis compiled by Meunier et al. (2010) included factors such as neutral buoyancy,

ageing, environmental induction, metabolic abnormality, physiological stress, ionic excess, fungi, tumorous phenomenon and genetics. Fossil records of fish with hyperostotic bones (Aguilera & Rodrigues de Aguilera, 1999; Fierstine, 1968; Meunier et al., 2010; Purdy et al., 2001; Schüller, Kohring, & Erlangen, 1992; Tyler, Purdy, & Oliver, 1992) excluded environmental degradation by anthropological activities.

The skeletal system in fish provides rigidity and support. A healthy skeletal and muscular system is essential for swimming as well as catching prey or avoiding predators. Elderly fish are often prone to hyperostosis. For example, hyperostotic bones in pterygiophores affect the differential tension in the erector, depressor and lateralis muscles that are associated with fin spines and soft rays. Hyperostosis in the pleural ribs or the neural and haemal spines in the vertebrae reduces flexibility and the synchronic action of axial musculature. We sought to determine whether random and anomalous hyperostosis was a normal feature of the skeletal system or whether it was a bone disorder that worsened with age. Hyperostotic bones change the geometric spatial relationships between muscles and ligaments, the mechanical properties of the bones and the tensile strength of swimming muscles.

A combination of environmental stress and the burial diagenesis process can modify bone microchemistry and isotope homeostasis. This is important because the Cabo Frio region of south-eastern Brazil (where the shell mounds are located) is characterized by seasonal occurrences of coastal upwelling. This oceanographic phenomenon is associated with deep and cold South Atlantic Central Water (SACW, temperature range: 6–18°C) interacting with the warm Brazil Current (BC, temperature range: 14.3–25.2°C). As a result, the coastal water around Cabo Frio exhibits a wide range of temperatures (Belem, Castelao, & Albuquerque, 2013; Cordeiro et al., 2014; Venancio et al., 2014).

Further research is necessary to understand fish physiology and the mechanism responsible for bone metabolism.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), FAPERJ (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, APQ1, Process E-26/111.278/2014 to OA) and PROPP-UFF (Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação da Universidade Federal Fluminense, Process 4609404415/201298 to OA). The authors would like to thank T. Lima, R. Souza, E. Silva, F. Tuna, A. Camardella and W. Soares for assistance in the shell mound repository of MN-UFRJ and UFF laboratorial facilities. They thank G. Gonçalves Ferreira and the radiologist team of Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (UFRJ) for the digital radiographic images of *Caranx latus* and W.F. Smith-Vaniz for the permission to use the radiographic image of *Caranx hippos* published in Smith-Vaniz and Carpenter (2007). They would also like to thank R. Sousa, L. Costa and the Museu Nacional UFRJ for the permission to use the photographs in Figure 1 and A. Belem for the elaboration of the map in Figure 1. Special thanks go

to W.F. Smith-Vaniz and the anonymous reviewers for the positive corrections, comments and discussions that helped to improve the manuscript.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

OA, MC and ML conceived and designed the experiments. OA, ML, IL, RL, RG, MC and AN performed the experiments. OA, ML, IL, IR and RG analysed the data. IR, IL, AM, RG, MCT and AN contributed reagents/materials/analysis tools. OA and ML wrote, revised and edited the manuscript.

#### REFERENCES

- Aguilera, O. (1988). Anomalías esqueléticas en *Micropogonias furnieri*, *Cynoscion ocaupa*, *Macraron*, *ancylodon* y *Pachypops fourcei* (Pisces: Sciaenidae) de Venezuela. *Memoria de la Sociedad de Ciencias Naturales La Salle*, 129, 55–83.
- Aguilera, O., Belem, A. L., Angelica, R., Macario, K., Crapez, M., Nepomuceno, A., ... Silva, E. (2016). Fish bone diagenesis in Southeastern Brazilian shell mounds and its importance for paleoenvironmental studies. *Quaternary International*, 391, 18–25.
- Aguilera, O., & Rodrigues de Aguilera, D. (1999). Anomalías esqueléticas en peces fósiles del Mioceno Temprano (Formación Cantaura) de Venezuela. *Memoria de la Fundación La Salle de Ciencias Naturales*, 151, 45–52.
- Aguilera, O., & Urdaneta, H. (1992). Tumores y anomalías esqueléticas en los peces del Occidente de Venezuela. *Acta Biologica Venezuelica*, 13, 83–95.
- Alves, E., Macario, K., Souza, R., Pimenta, A., Douka, K., Oliveira, F., ... Angulo, R. (2015). Radiocarbon reservoir corrections on the Brazilian coast from pre-bomb marine shells. *Quaternary Geochronology*, 29, 30–35.
- Andrew, W. (2013). *The anatomy of aging in man and animals*. New York, NY: Medical Books LTD.
- Andrews, A. F., Kalish, J. M., Newman, S. J., & Johnston, J. M. (2011). Bomb radiocarbon dating of three important reef-fish species using Indo-Pacific  $\delta^{14}\text{C}$  chronologies. *Marine and Freshwater Research*, 62, 1259–1269.
- Bartosiewicz, L. (2014). *Shuffling eggs, lame ducks: The archaeology of animal disease*. László Bartosiewicz; with a contribution on avian palaeopathology by Erika Gál. Oxford: Osbow Books.
- Béarez, P. H. (1997). Las piezas esqueléticas diagnósticas en arqueología del litoral Ecuatoriano. *Boletín de l'Institut Français D'études Andines*, 26, 11–20.
- Belem, A. L., Castelao, R. M., & Albuquerque, A. L. S. (2013). Controls of subsurface temperature variability in a western boundary upwelling system. *Geophysical Research Letters*, 40, 1362–1366.
- Bowker, D. W. (1995). Modelling the patterns of dispersion of length at age in teleost fishes. *Journal of Fish Biology*, 46, 469–484.
- Caillet, G. M., & Andrews, A. H. (2008). Age-validated longevity of fishes: Its importance for sustainable fisheries. In K. Tsukamoto, T. Kawamura, T. Takesuchi, T. D. Beard Jr & M. J. Kaiser (Eds.), *Fisheries for global welfare and environment* (pp. 103–120). Yokohama: 5th World Fisheries Congress.
- Cohen, L., Dean, M., Shipov, A., Atkins, A., Monsonego-Oman, E., & Shahr, R. (2012). Comparison of structural, architectural and mechanical aspects of cellular and acellular bone in two teleost fish. *The Journal of Experimental Biology*, 215, 1983–1993.
- Cook, M., Fitzhugh, G. R., & Franks, J. S. (2009). Validation of yellow edge grouper, *Epinephelus flavoimbatus*, age using nuclear bomb-produced radiocarbon. *Environmental Biology of Fishes*, 86, 461–472.
- Cordeiro, L. G. M. S., Belem, A. L., Boukoubassi, I., Rangei, B., Sifeddine, A., Capilla, R., & Albuquerque, A. L. S. (2014). Reconstruction of