

ACTUALIZACIONES / *Reviews*

EL TEJIDO ÓSEO ESPONJOSO Y SU EVALUACIÓN POR MEDIO DE IMÁGENES

Rodolfo C. Puche*

Laboratorio de Biología Ósea. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario

Resumen

Este artículo describe la importancia fisiológica del hueso trabecular y la estrecha relación existente entre su estructura y función. Se comparan las tecnologías que producen imágenes de alta calidad requeridas por el diagnóstico médico: densitometría ósea dual (DXA), espectroscopia infrarroja y espectro analizado por la transformada de Fourier (FT IR), resonancia magnética de alta resolución (HR-MRI), tomografía computarizada cuantitativa multicorte (MSCT), microtomografía computarizada (μ CT), resonancia magnética de estado sólido (^{31}P NMR), tomografía computarizada cuantitativa periférica (pQCT), microtomografía computarizada asociada a sincrotrón (SR-CT) y microscopía electrónica de barrido (SEM). Se describe con mayor detalle el TBS (*Trabecular bone score*), evaluación del tejido esponjoso vertebral mediante el análisis de las imágenes obtenidas por DXA.

Palabras clave: hueso trabecular, calidad ósea, imágenes digitales, transformada de Fourier, fractales y *trabecular bone score*.

Summary

TRABECULAR BONE AND ITS EVALUATION THROUGH IMAGES

This article describes the physiological importance of trabecular bone and the close association between its function and structure. The available technologies that provide high quality images required for medical diagnosis are compared: Dual energy X-ray absorptiometry (DXA), Infrared spectroscopy and analysis of spectra through the Fourier Transform (FT IR), high resolution Nuclear magnetic resonance (HR-MRI), Multislice computed tomography (MSCT), X-ray microtomography (μ CT), Solid state Nuclear magnetic resonance (^{31}P NMR), Peripheral quantitative computed tomography (pQCT), Synchrotron radiation computed tomography (SR-CT), scanning electron microscope (SEM). Details are given for the assessment of vertebral trabecular bone through the Trabecular bone score (TBS) define by analysis of DXA images.

Key words: trabecular bone, bone quality, digital images, Fourier Transform, fractals, trabecular bone score.

* Dirección postal: Laboratorio de Biología Ósea. Facultad de Ciencias Médicas. Santa Fe 3100. Rosario. Argentina. Correo electrónico: rodolfopuche@ciudad.com.ar



El fascinante hueso trabecular

El hueso trabecular ocupa, aproximadamente, el 20% de la masa esquelética de un ser humano adulto. Está compuesto por una red interconectada de placas y barras que reciben el nombre de trabéculas. El hueso esponjoso se encuentra principalmente cerca de los extremos de los huesos largos, distribuye las cargas mecánicas desde las superficies articulares hasta el hueso cortical. Es el constituyente principal que absorbe las cargas de las vértebras.

La densidad mineral relativa del hueso (relativa respecto de los valores más altos) varía entre 0,05-0,7 para el hueso trabecular y entre 0,7-1,0 para el cortical.¹ La densidad relativa de una celda abierta, con estructura de barras, es generalmente menor de 0,13, mientras que en una celda cerrada con estructura de placas es mayor de 0,2. Los valores intermedios se dan en una combinación entre barras y placas. El cambio de densidad relativa modifica el módulo de elasticidad y afecta la rigidez del tejido. A densidades relativas bajas, las celdas forman una red abierta de barras; conforme aumenta la densidad relativa, se acumula más material en las paredes de las celdas y la estructura se transforma en una red más cerrada de placas.

La densidad relativa, arquitectura y función del hueso en una posición determinada dependen de la magnitud de las cargas a las que está sometida. Las imágenes muestran que, en regiones de bajos esfuerzos, se desarrollan estructuras de celdas abiertas con bajas densidades relativas, mientras que las de mayores densidades y celdas cerradas se desarrollan en regiones sometidas a altos esfuerzos.

El tejido óseo trabecular contribuye a disminuir la masa del esqueleto con reducida

pérdida de su resistencia a la fractura. En el hueso trabecular, las células óseas se sitúan entre lamelas o en la superficie de la trabéculas, donde pueden ser influenciadas por componentes de la médula. Por su amplia superficie, expuesta a la circulación, parece ser metabólicamente más activo y de respuesta más rápida a las cargas que el hueso cortical.

La estrecha relación entre la forma de una estructura y su función

El análisis de las formas constituye una parte muy importante del diagnóstico en todas las ciencias de la salud. La estrecha relación entre forma y función ha convertido la idea de forma en uno de los conceptos fundamentales en todas las ciencias biológicas.

Reconocemos la forma de un objeto*, sobre la base de exposiciones múltiples y previas de objetos conocidos. Así terminamos acumulando modelos mentales de esos objetos. Por ello, nuestra identificación o clasificación siempre tendrá alguna cuota de subjetividad.

El ojo humano es capaz de detectar diferencias sutiles entre dos formas (la del objeto presente y la definida previamente como normal o de referencia). Conviene recordar que los procesos implicados en la recepción, reconocimiento y especialmente en la integración de estímulos visuales son aún imperfectamente conocidos.

La habilidad humana de discriminar entre formas tomando nota de las diferencias en tamaño, perfil, color, trama, textura, etc. está tan integrada que nuestra respuesta es a menudo automática o inconsciente.

No podemos confiar exclusivamente en nuestros ojos. Somos sensibles a diferencias en contraste (sobrestimaremos el tamaño si el contraste es alto), a cambios en perspectiva

* Se utiliza el término "objeto" con el propósito de generalizar. Según el interés del lector puede reemplazarse por estructura, silueta, corte histológico, radiografía, etcétera

y profundidad, a la orientación de la iluminación (preferimos la iluminación desde arriba). Además, tendemos a completar la imagen con aquello que pensamos que debe estar en ella. Para complicar el diagnóstico, las estructuras biológicas exhiben un espectro continuo de modificaciones.

Thompson² definió una serie de conceptos que han pasado a ser clásicos: “El estudio de la forma puede ser meramente descriptivo analítico. Se comienza por describir la silueta de un objeto con palabras coloquiales y se termina utilizando el preciso lenguaje de las matemáticas. El segundo método sigue al primero en estricto orden científico y de continuidad histórica”.

Bastará que el lector recuerde haber visto imágenes de ilusiones ópticas para aceptar que no podemos confiar exclusivamente en nuestros ojos y comenzará a explicarse por qué el análisis de las formas utiliza actualmente “el preciso lenguaje de las matemáticas”, como lo enunció Thompson en 1915.

¿Qué método elegir?

Es una pregunta de difícil respuesta. Depende de una serie de factores que explican la extraordinaria diversidad de investigaciones básicas y clínicas de la literatura:

- a) El interesado ¿es un investigador básico o clínico (interesado especialmente en el conocimiento de la biología del tejido o interesado principalmente en el diagnóstico y prevención)?
- b) ¿Cuál es la tecnología disponible para obtener imágenes del tejido?
- c) ¿Se usará una técnica no invasiva aplicable a los pacientes o una técnica invasiva que requiere material *ex vivo*?
- d) ¿Qué costo tienen los equipos? ¿Cuál es el costo de su operación?
- e) ¿Cómo y quién analizará las imágenes?
- f) ¿Se ha demostrado la eficacia clínica del método elegido?

Los lectores de *Actualizaciones en Osteo-*

logía son testigos del constante avance en la tecnología destinada a producir mejores imágenes. Debe ser evidente que la calidad de las imágenes es función de las características de la radiación, la dosis de esta que puede recibir el paciente y el entorno del hueso (el antebrazo y el calcáneo han sido objeto de intensas investigaciones por tener poco tejido blando cercano).

El costo y la disponibilidad de los instrumentos contribuyen a la diversidad de informes publicados: los investigadores utilizan los recursos disponibles, aplican a las imágenes obtenidas alguno de los análisis de imágenes y efectúan la comparación entre sujetos normales y la patología de su interés.

Los equipos que producen directamente imágenes digitales constituyen un gran avance porque, al obviar el uso de placas radiosensibles y su revelado, se reducen las variaciones de la calidad de las imágenes, lo que termina siendo clave para su análisis.

Definición de las formas de una determinada fracción de tejido óseo

El análisis de las formas encontradas al estudiar el tejido óseo ha avanzado hasta incluir el concepto de “calidad ósea”. Este concepto surgió como respuesta al hecho de que la cantidad de hueso (un descriptor de la forma), evaluada mediante la densidad mineral ósea (DMO, g/cm²), es una variable con conocidas limitaciones como predictor del riesgo de fractura.

Las investigaciones (básicas y clínicas) sobre la calidad del hueso tienen como objetivo ahondar en el conocimiento del tejido y perfeccionar el manejo clínico de los pacientes.

Es conocido que el monto de la masa ósea está fuertemente asociado a la fortaleza de los huesos. No obstante, por sí sola no es suficiente para determinar la fortaleza ósea,^{3,4} ni predecir su fractura,^{5,6} o evaluar el éxito terapéutico.⁷ La calidad del hueso es un importante factor para determinar su



resistencia⁸⁻¹⁰ y (además de la cantidad) es función de la:

- Microarquitectura ósea (trama trabecular).
- Propiedades materiales (grado de mineralización de la matriz).
- Acumulación de daño (microfracturas).
- Características genéticas del colágeno.
- Actividad metabólica (tasas de reabsorción y formación óseas).

Recursos tecnológicos que proveen imágenes de hueso trabecular

La Figura 1 exhibe en escala logarítmica los diferentes recursos disponibles, en función de la resolución de sus imágenes.

- Radiografía convencional y digital. Es extensamente disponible y útil para huesos periféricos recubiertos por escaso tejido blando (antebrazo, calcáneo). Los análisis de la

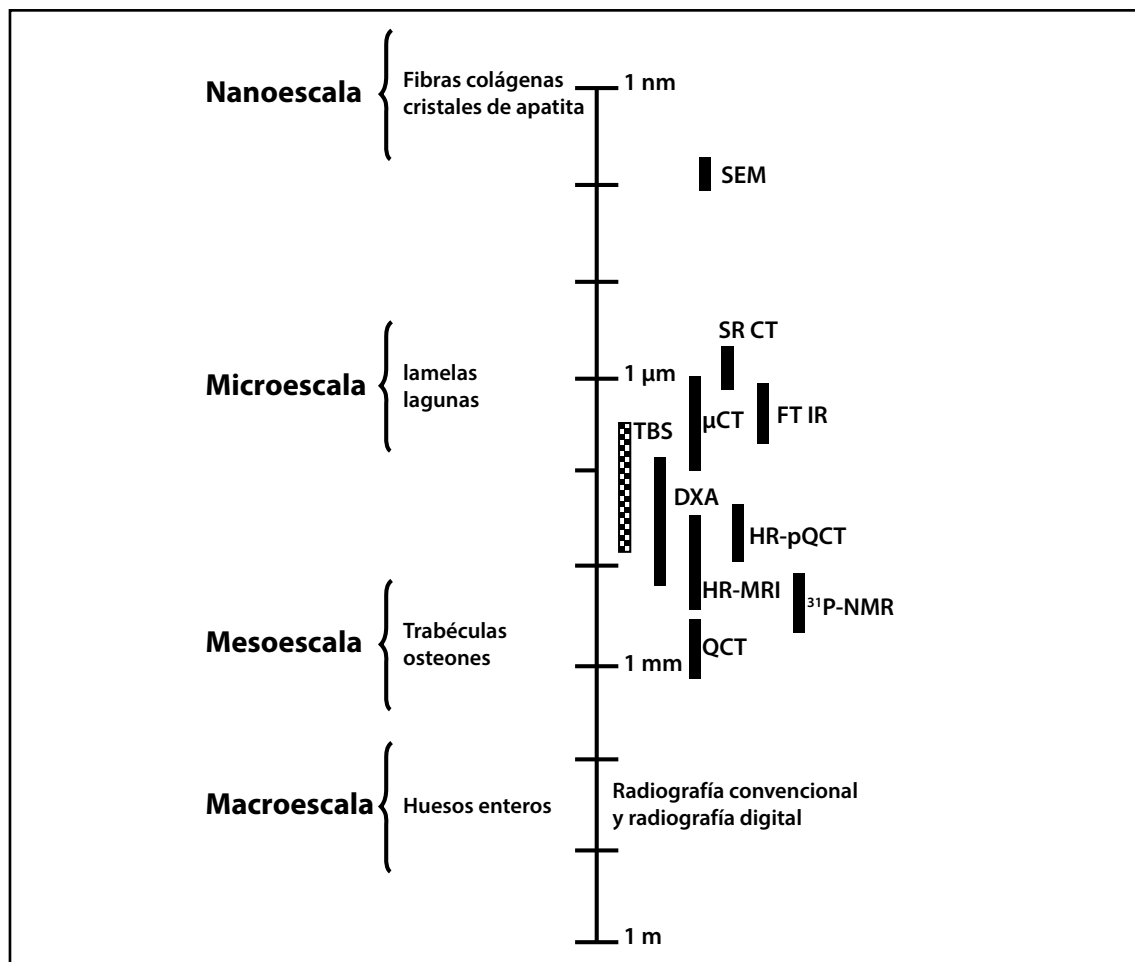


Figura 1. Instrumentos productores de imágenes de hueso trabecular (barras solidas) en función de sus resoluciones: DXA (densitometría ósea dual), FT IR (Espectroscopia Infrarroja y espectro analizado por la Transformada de Fourier), HR-MRI (Resonancia magnética de alta resolución), μCT (Micro-tomografía computarizada), ³¹P NMR (Resonancia magnética de estado sólido), HR pQCT (Tomografía computarizada cuantitativa periférica, de alta resolución), SR CT (Sincrotrón asociado a micro-tomografía computarizada), SEM (Microscopía electrónica de barrido). Barra de escaques: TBS (*Trabecular bone score*). Se ha omitido la referencia de la MSCT (Tomografía computarizada cuantitativa multicorte) porque su resolución es inferior a μCT y es de reciente aparición en la literatura. Adaptado de Ref. 10.

textura de radiografías del ilíaco se correlacionan con información obtenida con micro-CT.¹¹

- Tomografía computarizada cuantitativa multicorte (MSCT). Un estudio inicial con la TC de 64 cortes ha mostrado su utilidad para evaluar la geometría ósea en tres dimensiones: distinguir el hueso cortical del trabecular, producir valores de DMO volumétrica y la reconstrucción de la microarquitectura de cuerpos vertebrales.¹²

- Tomografía computarizada cuantitativa periférica (pQCT). En un estudio con pacientes de insuficiencia renal crónica, los análisis de la textura de radiografías de radio y tibia se correlacionaron de manera significativa (aunque modesta) con información de la microarquitectura trabecular obtenida por pQCT.¹³

- Resonancia magnética de alta resolución. (HR-MRI). No utiliza radiación ionizante para producir imágenes sino un fuerte campo magnético y una serie de pulsos de radiofrecuencia para generar las imágenes del hidrógeno (¹H, elemento diamagnético) aportado principalmente por el agua contenida en el tejido óseo. Los resonadores magnéticos convencionales no producen imágenes del tejido óseo por el bajo contenido de agua de este. La resolución es baja *in vivo* y requiere largo tiempo de escaneado.

- Microtomografía computarizada (μ CT). Utiliza material de biopsia y puede caracterizar la microarquitectura trabecular con una resolución de 1-6 μ m, sobre un cilindro óseo de aproximadamente 1 cm de diámetro y 1,5 cm de largo. Permite obtener parámetros morfológicos del hueso trabecular tales como fracción de hueso por unidad de volumen de tejido, número, grosor, separación y conectividad entre trabéculas y DMO volumétrica verdadera.

- Sincrotrón asociado a microtomografía computarizada (SR CT). Se obtuvo una mejora en la tecnología μ CT cuando se usó el sincrotrón como fuente de rayos X. El sincrotrón acelera electrones radialmente por medio de un campo magnético circular. La trayectoria en espiral hace que los electrones se acele-

ren hasta adquirir la frecuencia de los rayos X (*synchrotron radiation*). La fuente radiante, colimada y filtrada, permite obtener imágenes con resolución de 1 μ m, medir gradientes de mineralización trabecular, analizar zonas en reabsorción, microfracturas, conectividad trabecular, anisotropía y forma de las trabéculas (travesaños o placas).¹⁴

- Resonancia magnética de estado sólido (NMR). De los elementos contenidos en el tejido óseo, son de interés el ¹H y ³¹P. Los espectros NMR varían al modificar la frecuencia de los pulsos de radiofrecuencia y la información obtenida puede emplearse para caracterizar cambios de la química mineral en función del tiempo.^{15,16}

- Espectroscopia infrarroja y espectro analizado por la transformada de Fourier (FT IR). Esta metodología requiere cortes ultrafinos de tejido (2 μ m). La radiación infrarroja incidente excita (hace vibrar) los enlaces químicos del mineral y de las proteínas de la matriz. Este fenómeno se produce, para cada tipo de enlace, en una determinada longitud de onda de la radiación. El análisis del espectro producido sirve para definir la composición del tejido.^{17,18}

- Microscopia electrónica de barrido (SEM). Sirve para caracterizar la morfología de las superficies de muestras de tejido, que debe ser deshidratado y recubierto con material conductor.

- La densitometría ósea (DXA) emplea una tecnología de rayos X que se ha constituido en el método estándar para medir la densidad mineral ósea. Por su disponibilidad y extenso uso en el diagnóstico osteológico, nos ocuparemos más adelante del análisis de las imágenes de tejido trabecular que se obtienen con esta tecnología.

Morfometría

La morfometría¹⁹ (definición cuantitativa de una estructura) elimina la subjetividad, asegura la reproducibilidad y extiende los límites de detección de las diferencias, aplicadas a



conjuntos de datos: distancias, ángulos y cocientes entre estos.

El *Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee*²⁰ ha definido las variables primarias de histomorfometría ósea para microscopía 2D, tal como la emplea el patólogo al analizar cortes finos de tejido óseo no descalcificado, incluido en un plástico. Este tratamiento asegura la indeformabilidad de las estructuras que serán estudiadas y medidas en el microscopio. Las variables son a) área (volumen[#] óseo, de osteoide, mineralizado, vacío, de médula ósea, fibrótico, celular, citoplásmico, nuclear), b) longitud (interfase ósea, superficie ósea, de osteoide, quiescente, en reabsorción, mineralizada, cubierta por osteoblastos, marcada con uno o dos marcadores fluorescentes, cubierta por osteoclastos, en reversión), c) distancias (espesor cortical, espesor mineralizado, del osteoide, del marcador, de las trabéculas, del intersticio) y d) número (de osteoblastos, osteoclastos, osteocitos, núcleos, canales, costuras).

Con la información de las variables primarias, el patólogo puede derivar índices estructurales y cinéticos, con los que definirá la actividad metabólica de la zona de la que se extrae el material: índices estructurales (número de trabéculas, separación trabecular); índices cinéticos (tasa de aposición mineral, de aposición ajustada, de aposición de osteoide, de formación de mineral, de formación ósea, de reabsorción ósea, tiempo que requiere la mineralización del osteoide, de maduración de osteoide, de formación, de reabsorción, de reversión, de remodelado, término de vida de las unidades multicelulares básicas (BMU), período de quiescencia y frecuencia de activación). Para estimar las tasas de los procesos de reabsorción y formación óseas se

requiere definir el inicio y el final del período de estudio mediante la marcación de las superficies óseas con fluorocromos.

Los análisis morfométricos estructurales pueden aplicarse a imágenes digitales obtenidas en el microscopio óptico o radiológicas o tomográfico-computarizadas del hueso trabecular. La información contenida en las imágenes puede ser extraída mediante programas de computación que facilitan la tarea.

La textura de las imágenes

La información contenida en las imágenes digitales puede ser analizada globalmente sobre la base de su "textura".

Hay varias definiciones de textura. Quizá lo mejor sea ofrecerlas al lector (que sin duda tiene una idea intuitiva de textura) para que el concepto se extienda al análisis de las imágenes.

Es una característica de la imagen para dividirla en regiones de interés y/o clasificar esas regiones y/o comparar regiones (o muestras de la imagen) y/o extraer detalles de ellas.

Es información sobre el arreglo espacial de colores o intensidades en una imagen.

No puede definirse en un punto sino en la región de interés (ROI).

Estos detalles de la textura se encuentran en el tono (intensidad de los píxeles en la textura) y la estructura (relación espacial entre texturas de una imagen).

Hay por lo menos 4 enfoques para el análisis de la textura:

- Estructural: morfología matemática.²¹
- Espectral: análisis de las frecuencias de la textura (transformada de Fourier y derivados de ella).²²
- Basado en modelos: captura del proceso que ha generado la textura (fractales).²³
- Estadística: propiedades que gobiernan la

[#] La transformación de una superficie en un volumen se basa en un teorema de Estereología Microscópica.

distribución de los valores de niveles de grises.²⁴

Análisis espectral de la textura

La transformada de Fourier de una imagen contiene el espectro de las frecuencias que la componen, que el ojo humano percibe como colores o tonos de gris.

La transformada de Fourier es muy popular en el análisis de imágenes porque produce una descripción unívoca de su tamaño, silueta y estructura. Permite la recreación visual de la imagen con gran precisión y es eficaz en términos de computación (permite la reducción del conjunto de datos sin pérdida significativa de la precisión, y que dicha información sea recuperable).²⁵ Con las palabras “bone image Fourier”, PubMed registra 190 trabajos publicados entre 1984 y 2013.

Análisis basados en modelos. Fractales.

Un fractal es un objeto geométrico que puede dividirse en fracciones, cada una de las cuales es una copia de tamaño reducido del objeto. El objeto geométrico tiene estas características: a) es muy irregular para ser descrito en términos de la geometría clásica, b) posee estructura fina a escala arbitrariamente pequeña y c) tiene una definición simple y recurrente (autosimilaridad). Es evidente que las imágenes de hueso trabecular satisfacen las tres características.

Dimensión fractal. El cálculo de la dimensión fractal²⁶ puede efectuarse con el método de conteo de cajas o “box counting”. El programa de análisis cubre la imagen con una cuadrícula (cajas) y cuenta el número de ellas que cubren la imagen. Aplica, sucesivamente, cuadrículas más pequeñas con lo cual aumenta el número de cajas necesarias para cubrir la imagen. En escala doble logarítmica, los datos definen una línea recta: el número de cajas (ordenada) en función del tamaño de las cajas (abscisa). El valor de la pendiente define la dimensión fractal: un número con decimales.

Una imagen digital pequeña B&W, de

600×500 píxeles contiene 300.000 puntos, cada uno de los cuales es revisado más de 1.000 veces por el algoritmo de cálculo. El uso de una computadora moderna con un programa de análisis fractal de imágenes²⁶ permite obtener rápidamente el valor de la dimensión fractal de una imagen. El lector observará que el análisis de una imagen termina en un número, que simplifica la comparación entre imágenes semejantes.

El análisis por fractales está en plena evolución. Actualmente el programa aludido cuenta el número de cajas negras (NB), blancas (NW) y grises (NBW) y provee tres dimensiones fractales (análisis multifractal) DB y DW, que caracterizan los planos blanco y negro, y DBW, que caracteriza el borde B&W.

Con las palabras “bone image fractals”, PubMed registra 69 trabajos publicados entre 1993 y 2012.

Análisis estadístico de la textura (basado en la distribución de los valores y distribución de los niveles de grises).

A partir del conocimiento de que la DMO no es suficiente para definir la calidad del tejido, el desarrollo de una técnica que permitiera conocer el estado de la estructura trabecular se constituyó en un desafío. En opinión de este revisor, el hallazgo de una metodología de aplicación clínica, eficaz, no invasiva, que utilice equipamiento disponible, parece haberse aproximado al objetivo: el *Trabecular bone score* (TBS).

El TBS se obtiene a partir del análisis de la distribución de los niveles de gris de los píxeles de las imágenes obtenidas por DXA.²⁷ Es un parámetro cuantitativo de la textura de las imágenes de los cuerpos vertebrales en proyección anteroposterior. Las imágenes pueden ser evaluadas por un programa de análisis (TBS iNsight®).

La Figura 2 exhibe la imagen de un cuerpo vertebral en proyección anteroposterior obtenida por DXA y una fracción de la imagen de un cuerpo vertebral normal (abajo izquier-



da) y otro osteoporótico (abajo derecha). El programa de análisis contiene un algoritmo que evalúa los niveles de gris de cada uno de los píxeles de la imagen. El “color” de los píxeles de la imagen va de blanco (cuando el haz de rayos X fue atenuado en su trayectoria por tejido calcificado) a negro (cuando el haz no fue atenuado). En un hueso osteoporótico, el mismo examen mostrará menos píxeles claros (tejido calcificado) y más espaciados. Un valor elevado de TBS indica que

el tejido contiene muchas trabéculas, bien conectadas y con poco espacio entre ellas. A la inversa, un valor bajo indica pocas trabéculas, poco conectadas y con amplio espacio entre ellas.

La eficacia del TBS fue comprobada al comparar imágenes 2D obtenidas por proyección de la estructura trabecular 3D obtenida por μ CT. La correlación fue elevada y poco afectada por la degradación en la resolución de las imágenes y la presencia de ruido.²⁸ Se

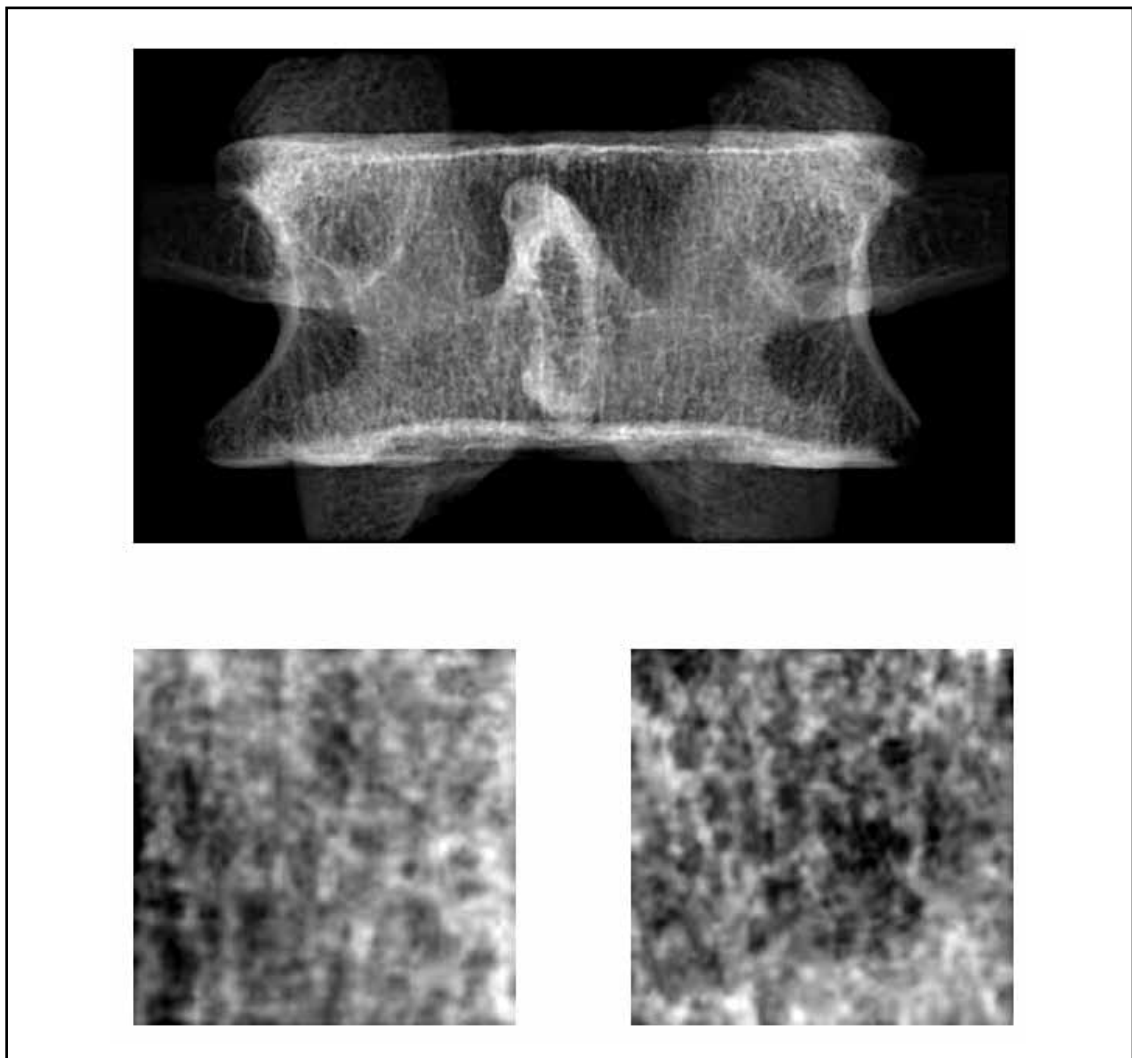


Figura 2. Imagen de un cuerpo vertebral en proyección anteroposterior obtenida por DEXA y una fracción de la imagen de un cuerpo vertebral normal (abajo izquierda) y otro osteoporótico (abajo derecha).

ha demostrado que el TBS está fuertemente correlacionado con el número y la conectividad de las trabéculas y negativamente correlacionado con el espacio entre ellas.^{29,30} Además, el TBS agrega valor y poder a la diferenciación entre sujetos con DMO semejantes pero con diferente microarquitectura trabecular.³⁰

En un estudio realizado con la participación de 29.407 sujetos de 50 o más años, se investigó la incidencia de fracturas osteoporóticas no traumáticas posteriores a una medición de DMO. Valores significativamente bajos de TBS y DMO se encontraron en mujeres con fracturas osteoporóticas de columna o cadera (todos $p < 0,0001$). Según los resultados obtenidos, el TBS es capaz de predecir las fracturas con independencia de la DMO. El empleo de los dos criterios mejora el valor predictivo en mujeres posmenopáusicas.³¹ Resultados optimistas se informaron a partir de un estudio de 560 mujeres posmenopáusicas³² y en una investigación de casos (241 mujeres posmenopáusicas, 50-80 años de edad) y controles destinada a determinar si TBS y DMO, solos o combinados, son útiles para predecir el riesgo de fracturas vertebrales.³³ La combinación de TBS y DMO perfecciona ligeramente la capacidad de predicción de fractura de la DMO de cadera.³⁴ El TBS no parece útil para predecir el comportamiento biomecánico del tejido.³⁵

El párrafo anterior describe una serie de investigaciones clínicas, habituales para asignar valor a la información contenida en las imágenes. Esta revisión concluirá con una breve referencia al análisis de la estructura del

tejido esponjoso efectuada con el Método de Elementos Finitos.

A partir de las imágenes en alta resolución, obtenidas generalmente *ex vivo*, es posible reconstruir modelos del tejido en tres dimensiones, susceptibles de análisis ulteriores. El análisis por elementos finitos (FEA) es un método que conecta las ecuaciones aplicables a elementos simples de múltiples subdominios llamados elementos finitos, para obtener una aproximación a la ecuación compleja de un dominio mucho más amplio. La caracterización de la estructura trabecular por FEA permite evaluar el deterioro de la microarquitectura, estimar el riesgo de fractura y complementar la información obtenida por DXA.

Con las imágenes, los investigadores construyen *un modelo*: una malla de elementos finitos (hexaédricos, cúbicos, etc.), que reproduce la estructura tridimensional del tejido. Con la información de esta malla teórica se alimenta un programa de computación que simula el comportamiento mecánico de la microarquitectura en condiciones de compresión o tensión y que termina emitiendo un informe sobre las peculiaridades de la estructura. El método ha evolucionado hasta haberse propuesto uno "a la medida de", susceptible de ser aplicado a cada paciente.³⁶

Conflicto de intereses

El autor declara no tener conflictos de intereses.

(Recibido: abril de 2013.

Aceptado: junio de 2013)



Referencias

1. Jee W. The skeletal tissues. In: Cell and tissue biology. A text book of histology. Baltimore: Urban and Schwarzenberg; 1988.
2. Thompson DW. Morphology and mathematics. *Tran Roy Soc Edinburgh* 1915; 50:857-98, citado en Lestrel PE. Fourier descriptors and their applications in biology. Edinburgh: Cambridge University Press; 1997.
3. Johnell O, Kanis JA, Oden A, et al. Predictive value of BMD for hip and other fractures. *J Bone Miner Res* 2005; 20:1185-94.
4. Rice JC, Cowin SC, Bowman JA. On the dependence of the elasticity and strength of cancellous bone on apparent density. *J Biomech* 1988; 21:155-68.
5. Hordon LD, Raisi M, Aaron JE, Paxton SK, Beneton M, Kanis JA. Trabecular architecture in women and men of similar bone mass with and without vertebral fracture: I. Two-dimensional histology. *Bone* 2000; 27:271-6.
6. McClung MR. Do current management strategies and guidelines adequately address fracture risk? *Bone* 2006; 38:S13-7.
7. Compston J. How to manage osteoporosis after the menopause. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2005; 19:1007-19.
8. Seeman E, Delmas PD. Bone quality--the material and structural basis of bone strength and fragility. *N Engl J Med* 2006; 354:2250-61.
9. Chesnut CH 3rd, Rosen CJ. Bone Quality Discussion Group. Reconsidering the effects of antiresorptive therapies in reducing osteoporotic fracture. *J Bone Miner Res* 2001; 16:2163-72.
10. Donnelly E. Methods for assessing bone quality. *Clin Orthop Rel Res* 2011; 469:2128-38.
11. Guggenbuhl P, Bodic F, Hamel L, Baslé MF, Chappard D. Texture analysis of X-ray radiographs of iliac bone is correlated with bone micro-CT. *Osteoporos Int* 2006; 17:447-54.
12. Showalter C, Clymer BD, Richmond B, Powell K. Three-dimensional texture analysis of cancellous bone cores evaluated at clinical CT resolutions. *Osteoporos Int* 2006; 17:259-66.
13. Bacchetta J, Boutroy S, Vilayphiou N, et al. Assessment of bone microarchitecture in chronic kidney disease: a comparison of 2D bone texture analysis and high-resolution peripheral quantitative computed tomography at the radius and tibia. *Calcif Tissue Int* 2010; 87:385-91.
14. Ito M, Ejiri S, Jinnai H, et al. Bone structure and mineralization demonstrated using synchrotron radiation computed tomography (SR-CT) in animal models: preliminary findings. *J Bone Miner Metab* 2003; 21:287-93.
15. Kuhn LT, Grynepas MD, Rey CC, Wu Y, Ackerman JL, Gluimcher MJ. A comparison of the physical and chemical differences between cancellous and cortical bovine bone mineral at two ages. *Calcif Tissue Int* 2008; 83:146-54.
16. Wu Y, Hrovat MI, Ackerman JL, et al. Bone matrix imaged in vivo by water and fat suppressed proton projection MRI (WASPI) of animal and human subjects. *J Magn Reson Imaging* 2010; 31:954-93.
17. Boskey A, Mendelsohn R. Infrared analysis of bone in health and disease. *J Biomed Opt* 2005; 10:031102.
18. Carden A, Morris MD. Application of vibrational spectroscopy to the study of mineralized tissues (review). *J Biomed Opt* 2000; 5:259-68.
19. Weibel ER. Stereological principles for morphometry in electron microscopy. *Int Rev Cytol* 1969; 26:235-302.
20. Parfitt AM, Drezler MK, Glorieux FH, et al. Bone Histomorphometry: Standardization of Nomenclature, Symbols, and Units. *J Bone Min Res* 1987; 2:595-610.
21. Goutsias J, Heijmans HM. Nonlinear multiresolution signal decomposition schemes--part I: morphological pyramids. *IEEE Trans Image Process* 2000; 9:1862-76.
22. Ferreira T, Rasband W. The Image. J User Guide - Version 1.43, Apr 2010 <http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/user-guide.pdf>.
23. HarfA versión 5.5L http://www.fch.vutbr.cz/lectures/imagesci/includes/harf_a_download.inc.php
24. Serra N (1982), citado por Branchet MC, Boisnic S, Frances C, Lesty C, Robert L. Morphometric

- analysis of dermal collagen fibers in normal human skin as a function of age. *Arch Gerontol Geriatr* 1991; 13:1-14.
25. Lestrel PE. Fourier descriptors and their applications in biology. Edinborough: Cambridge University Press; 1997.
26. Zmeskal O, Veselý M, Nezádál M, Buchnicek M. Fractal Analysis of image structures. Harmonic and Fractal Image Analysis 2001; 1:3-5. http://www.fch.vutbr.cz/lectures/imagesci/download_ejournal/01_O.Zmeskal.pdf
27. Hans DD, Barthe NN, Boutroy SS, Pothuau LL, Winzenrieth RR, Krieg MA. Correlations Between Trabecular Bone Score, Measured Using Anteroposterior Dual-Energy X-Ray Absorptiometry Acquisition, and 3-Dimensional Parameters of Bone Microarchitecture: An Experimental Study on Human Cadaver Vertebrae. *J Clin Densitom* 2011; 14:11.
28. Winzenrieth R, Michelet F, Hans D. Three-Dimensional(3D)MicroarchitectureCorrelations with 2D Projection Image Gray-Level Variations Assessed by Trabecular Bone Score Using High-Resolution Computed Tomographic Acquisitions: Effects of Resolution and Noise. *J Clin Densitom* 2012; 15:257-9.
29. Didier H, Barthe N, Boutroy S, Pothuau L, Winzenrieth R, Krieg MA. Correlations Between Trabecular Bone Score, Measured Using Anteroposterior Dual-Energy X-Ray Absorptiometry Acquisition, and 3-Dimensional Parameters of Bone Microarchitecture: An Experimental Study on Human Cadaver Vertebrae. *J Clin Densitom* 2011;14:302-12.
30. Piveteau T, Winzenrieth R, Didier H. Assessment of correlations between 3D μ CT microarchitecture parameters and TBS: Effects of resolution and correlation with TBS DXA measurements. *J Clin Densitom* 2011; 14:169.
31. Didier H, Goertzen AL, Krieg MA, Leslie WD. Bone microarchitecture assessed by TBS predicts osteoporotic fractures independent of bone density: The Manitoba study. *J Bone Min Res* 2011; 26:2762-9.
32. Boutroy S, Hans D, Sornay-Rendu E, Vilayphiou N, Winzenrieth R, Chapurlat R. Trabecular bone score improves fracture risk prediction in non-osteoporotic women: the OFELY study. *Osteoporos Int* 2013; 24:77-85.
33. Winzenrieth R, Dufour R, Pothuau L, Hans D. A retrospective case-control study assessing the role of trabecular bone score in postmenopausal Caucasian women with osteopenia: analyzing the odds of vertebral fracture. *Calcif Tissue Int* 2010, 86:104-9.
34. Del Rio LM, Winzenrieth R, Cormier C, Di Gregorio S. Is bone microarchitecture status of the lumbar spine assessed by TBS related to femoral neck fracture? A Spanish case-control study. *Osteoporos Int* 2013; 24:991-8.
35. Roux JP, Wegrzyn J, Boutroy S, Bouxsein ML, Hans D, Chapurlat R. The predictive value of trabecular bone score (TBS) on whole lumbar vertebrae mechanics: an ex vivo study. *Osteoporos Int* 2013; 24:1073-8.
36. Keyak JH, Meagher JM, Skinner HB, Mote CD. Automated three-dimensional finite element modelling of bone: a new method. *J Biomed Eng* 1990; 12:389-97.