

DETERMINAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DA DENSIDADE MINERAL ÓSSEA (BMDD) DO TECIDO ÓSSEO CORTICAL USANDO ANÁLISE QUANTITATIVA DE IMAGENS DE ELÉTRONS RETROESPALHADOS (QBEI-MEV).

Sadala, G.F.M.¹; Silva, C.E.R.¹; Graça, G.R.A.¹; Dos Santos, C.T.¹; Rangel, F.L.C.¹; Fernandes, W.G.¹; Archanjo, B.S.²; Monteiro, M.J.¹;

¹ Divisão de Ensaio em Materiais e Produtos, Instituto Nacional de Tecnologia, Rio de Janeiro (RJ), Brasil

² Divisão de Materiais, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, Duque de Caxias (RJ), Brasil

E-mail: cristiane.evelise@int.gov.br

Resumo. O objetivo deste trabalho foi a implementação do método de análise de imageamento quantitativo de elétrons retroespalhados - qBeI/MEV para entender a distribuição da densidade mineral óssea (DDMO) que é a principal determinante da qualidade biomecânica do tecido ósseo. Foram usadas amostras de tecido ósseo cortical bovino e a desmineralização foi induzida utilizando EDTA 0.1 M e pH 11, com 0, 2, 4 h de desmineralização. As amostras foram desidratadas e embutidas. Para calibração do nível de cinza das imagens foram utilizados os padrões de Alumínio, Z=13 e Carbono, Z=6. As imagens do tecido ósseo cortical foram feitas nas mesmas condições de brilho e contraste destes padrões e foram processadas utilizando o software ImageJ. Para analisar a confiabilidade do método e do equipamento foram feitas 5 imagens afastadas a 5 µm uma da outra, com tempo de varredura de 30 µs. A DDMO foi determinada em % p/p Ca. Alta reprodutibilidade foi encontrada, mostrada pela sobreposição exata de todos os cinco histogramas gerados e com desvio padrão do % p/p de Ca máximo de 0.1 %. No tempo de desmineralização analisado, não foi encontrada diferença entre as amostras devido a desmineralização ter ocorrido superficialmente.

Palavras-chave: Osteoporose, DDMO, Microestrutura, Desmineralização.

1. INTRODUÇÃO

A osteoporose, doença osteometabólica caracterizada pela desmineralização óssea, está associada ao aumento do risco de fratura. A resistência à fratura dos ossos está relacionada com o grau de deformação dos elementos existentes nas múltiplas escalas do tecido ósseo, sendo um importante indicativo da qualidade óssea. Fatores sinérgicos, tais como composição do tecido, arranjo de características estruturais e grau de dano são responsáveis pela qualidade óssea (COWIN, 2003). O tecido ósseo é um composto de matriz e mineral com cerca de 23 % de fase matriz ou orgânica e 77% fase mineral ou inorgânica (CARTER *et al*, 1978). O diagnóstico da osteoporose baseia-se na avaliação quantitativa da densidade mineral óssea (DMO), normalmente utilizando métodos radiológicos ou microrradiográficos tais como absorptometria de dupla emissão de raios-X (DEXA) e tomografia quantitativa computadorizada. Este método pode ser usado para monitorar o conteúdo mineral em uma determinada porção do osso, mas não pode diferenciar entre alterações no volume ósseo ou no grau de mineralização da matriz óssea e microestrutura. Uma das várias características de qualidade óssea conhecidas por reger a resistência mecânica do tecido ósseo é a quantidade de mineral junto com sua distribuição dentro da matriz do tecido ósseo (CURREY, 1984, FOLLET *et al*, 2004). No entanto, elevações no conteúdo mineral levam à fragilidade e diminuem a resistência mecânica óssea (BONFIELD e CLARK, 1973; CURREY, 1969). Existem observações conflitantes da alteração da mineralização óssea como consequência do envelhecimento. Estudos em ossos humanos saudáveis, que encontraram aumento da mineralização com o envelhecimento (CURREY *et al*, 1996, VADJA e BLOEBAUM, 1999), indicam uma alteração nas propriedades do tecido com o aumento do nível mineral no envelhecimento, enquanto nenhuma correlação foi encontrada em outros estudos (BLOEBAUM *et al*, 2004 E ROSCHGER *et al*, 1998). Em contraposição à DMO, a distribuição da densidade mineral óssea (DDMO), medida por imagens de elétrons

retroespalhados (MEV) de forma quantitativa (qBEI, sigla em inglês), é capaz de medir diferenças em graus de mineralização. O método qBEI baseia-se na detecção de elétrons retroespalhados em uma região próxima à superfície da amostra atingida pelo feixe de elétrons primário de um microscópio eletrônico de varredura (MEV). No caso do tecido ósseo, onde a matriz orgânica (H, C, N, O, P, S) e mineral (Ca, P, O, H, C, Mg) são os componentes essenciais, a concentração de cálcio, o constituinte com maior número atômico ($Z = 20$), influencia predominantemente a intensidade dos elétrons retroespalhados (BE, sigla em inglês). Comparável ao método microrradiográfico mais comum (ROSCHEGGER, *et al*, 1998) mas com uma resolução muito melhor, as mudanças relativas nas concentrações minerais locais podem ser visualizadas no tecido ósseo cortical e esponjoso. Enquanto as imagens qBEI são tomadas em uma camada superficial de 0,5 mm de espessura da amostra, a microrradiografia baseia-se na absorção de raios-X em seções de osso de 100 mm de espessura. A pequena espessura da amostra é uma das principais vantagens do qBEI, pois evita a maior parte dos erros do efeito de projeção que podem ocorrer na investigação do osso trabecular pela microrradiografia.

Dentro do Projeto Interdisciplinar para Estudo da Desmineralização Óssea e validação de uma técnica para diagnóstico por Ultrassom Quantitativo (QUS), livre de radiação ionizante e de mais baixo custo e acessível, várias técnicas estão sendo utilizadas para estudar a correspondência das etapas de desmineralização ao diagnóstico e risco de fratura. Uma delas e que será o foco deste artigo é o método qBEI. Estudar a DDMO poderá ajudar no entendimento da interação entre as ondas ultrassônicas e o meio complexo (heterogêneo e viscoelástico) o qual poderá nos levar a novos desenvolvimentos no domínio das técnicas ultrassônicas aplicadas à caracterização da desmineralização do tecido ósseo cortical e diagnóstico da osteoporose e predição de fratura.

2. MATERIAIS E MÉTODOS.

2.1 Materiais

Foram avaliados o tecido ósseo cortical bovino fresco de fêmures de bois de diferentes origens e raças. As amostras foram limpas para remoção de tecidos moles usando 30 vol. de peróxido de hidrogênio e, posteriormente, foram cortados na região da diáfise média para obtenção dos corpos de prova.

2.2 Desmineralização

A desmineralização óssea foi quimicamente induzida. O agente químico utilizado foi 0,1M EDTA pH 11. A pesquisa na qual este projeto está inserido prevê tempos de imersão de 1 h + 1 h + 2 h + 4 h + 4 h + 6 h + 6 h nas primeiras 24 horas, a fim de avaliar lentamente o processo. Após as primeiras 24 horas, as amostras serão então desmineralizadas em tempos de imersão de 24h. Todo o processo será realizado em 5 dias ou 11 etapas de desmineralização. No presente artigo, preparamos e analisamos amostras de tecido ósseo com tempos de desmineralização de até 4h.

2.3 Preparação das amostras

As amostras foram preparadas para o MEV através da desidratação do tecido utilizando 90/10 de acetona/água e, após, percentuais de acetona/resina SPURR para infiltração e emblocamento da amostra a fim de evitar áreas esbranquiçadas durante a incidência do feixe

de elétrons. Depois da cura da resina em temperatura de 70°C, por aproximadamente 20h, as superfícies das amostras foram preparadas através de sequências de lixamento e polimento.

2.4 Calibração das tonalidades de cinza x concentração de cálcio

Roschger, em seu artigo que valida o método qBEI, realizou a calibração da técnica analisando dois padrões de elementos puros no MEV e relacionando os seus números atômicos com as tonalidades médias de cinza (G.L) que as imagens BSE dos mesmos possuíam quando analisadas sob aquelas condições de tensão e corrente no microscópio. Traçando uma reta que ligava esses dois pontos, ele conseguiu relacionar qualquer elemento a uma tonalidade específica de cinza, por meio da equação dessa reta gerada. Essa hipótese foi testada com outros elementos e comprovada no mesmo artigo (Roschger, 1998).

Desta forma, a partir da calibração com os elementos Carbono (Z=6, G.L= 25) e Alumínio (Z=13, G.L= 225), encontrou-se para a hidroxiapatita, com Z=14,06, o valor de 255. Uma imagem digital de 8 bits possui 256 intensidades diferentes de cinza, onde o 0 é o tom mais escuro (preto) e o 255 é o mais claro (branco).

A calibração foi realizada selecionando uma região de cada elemento e encontrando a tonalidade média de cinza. A partir dessas informações, relacionamos cada elemento puro, de respectivo número atômico com o seu valor de tonalidade. Na Figura 2 (a) e (b) as duas regiões analisadas estão destacadas em amarelo.

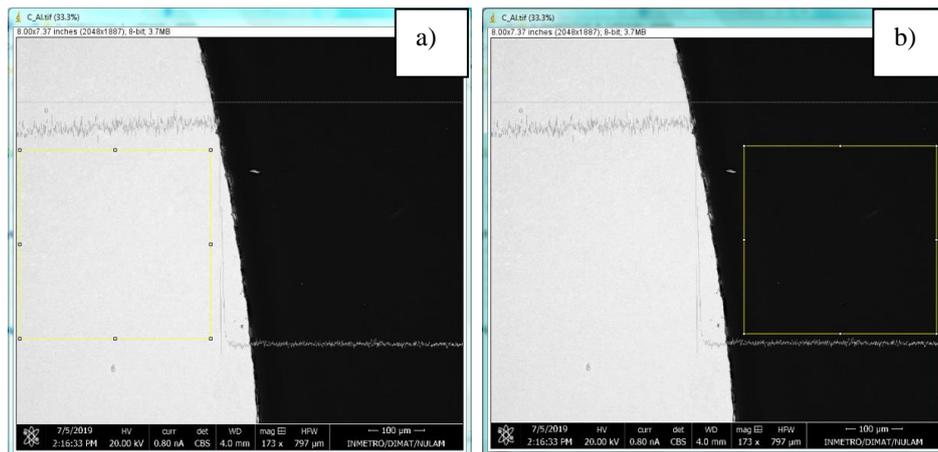


Figura 2: (a) Região do Al usado na calibração, (b): Região do C usado na calibração.

A partir dessas regiões, um histograma que relaciona a quantidade de pixels e a intensidade de cinza dos mesmos foi gerado através do software ImageJ e a intensidade média foi descoberta a partir daí. Os histogramas se encontram nas Figuras 3 (a) e (b).

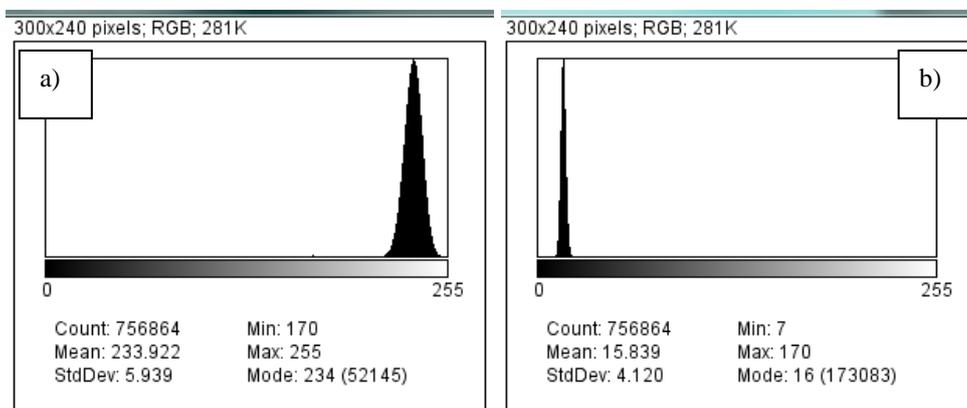


Figura 3: Histogramas (a) região de Al, (b) região de C.

O nível de cinza médio de cada elemento puro foi de 233,92 para o Al e 15,84 para o C. Utilizando esses dois parâmetros como coordenadas do ponto, foi possível traçar uma reta ligando as tonalidades de cinza aos seus respectivos números atômicos, como mostram a Fig. 4.

Essa equação nos dá informações sobre o seu ângulo de inclinação com o eixo X, por meio de seu coeficiente angular (a), e também sobre o ponto onde a reta corta o eixo Y, através do coeficiente linear (b). Esses dois parâmetros foram calculados pelo próprio programa, com $r=1$. A partir dessas informações, foi possível descobrir a equação da nossa reta de calibração e utilizá-la para descobrirmos qual seria a tonalidade de cinza da hidroxiapatita.

$$y(x) = ax+b \rightarrow y(x) = 0,032x + 5,49 \quad (1)$$

Sabendo que o número atômico médio da hidroxiapatita é de 14,06, calcularemos qual seria a tonalidade de cinza em uma região com 100% H.A substituindo na Eq. (1).

$$14,06 = 0,032x + 5,49$$
$$x = 267.8$$

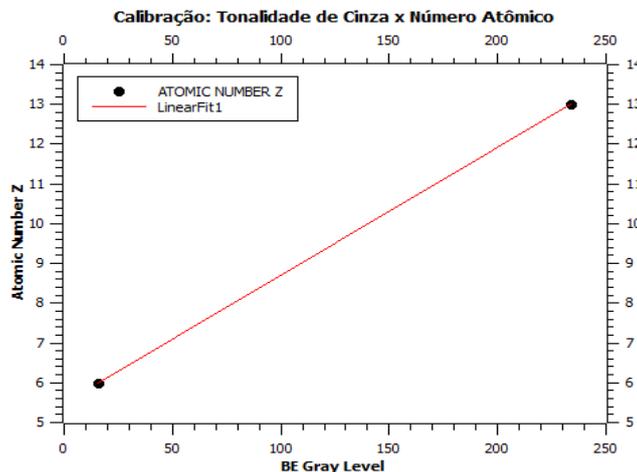


Figura 4: Geração da reta de calibração de tonalidade de cinza x número atômico.

Uma imagem digital de 8 bits de iluminação, como já foi dito, possui seus valores de intensidade variando de 0 a 255 tons de cinza. A intensidade 267.8 encontrada não existe dentro deste padrão. Uma das possíveis explicações para isso é que, segundo Roschger (1998), o uso de elementos ou compostos isoladores como Al_2O_3 , MgO ou materiais embebidos em resina, podem ser críticos, devido à possível geração de cargas espaciais internas que influenciam o coeficiente de retroespalhamento, mesmo quando revestido de carbono.

Desta forma, foi usada a calibração teórica usada por Roschger (H.A: $Z= 14,06$ e $G.L.=255$) em seu artigo de validação da técnica para analisarmos outros parâmetros do método. Futuramente, voltaremos a pesquisar as melhores condições de contraste e brilho para a análise no MEV-FEG de modo que a calibração se torne válida e os resultados confiáveis, e usar um padrão de carbono e alumínio sem revestimento. Os resultados finais foram encontrados utilizando esse valor de calibração teórica.

Conseguimos analisar no INMETRO nesse primeiro contato duas amostras de osso bovino segundo as mesmas condições dos padrões. Uma que não havia passado por nenhuma fase de desmineralização em EDTA e a outra que havia sido desmineralizada por 4h no

mesmo ácido. Todas elas foram analisadas sob as condições de: 20KV, 0.8nA, WD de 3.9mm e magnificação de 350x.

2.5 Parâmetros analisados na DDMO.

Segundo Roschger (1998) uma DDMO possui tais elementos característicos, como mostra a Fig. 1:

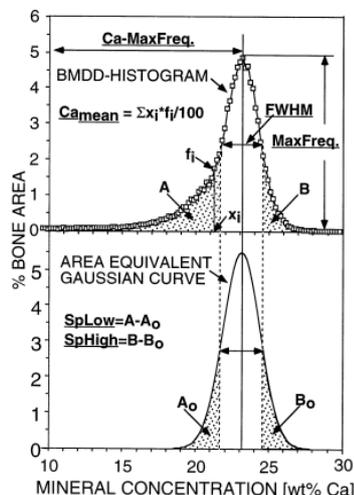


Figura 1: Elementos característicos de uma DDMO segundo Roschger (1998).

Estes parâmetros foram obtidos após as imagens BSE serem processadas utilizando uma macro desenvolvida em Image J e posteriormente ajustadas por uma função gaussiana. Alguns parâmetros serão extraídos da gaussiana, sendo eles: “Área do tecido ósseo”, que é a área integrada embaixo da curva, “FWHM” (Full Width Half Maximum), que é a largura a meia altura, um parâmetro importante para verificar se as larguras entre as gaussianas coincidem, “Máxima frequência de Ca”, que indica o máximo percentual de área óssea ocupada pela maior frequência de concentração mineral de cálcio e o “Centro de gravidade”, que indica a concentração de cálcio mais frequente na amostra.

4. RESULTADOS

Amostra de 0h

De uma mesma amostra, três imagens BSE de diferentes regiões, denominadas 1, 2 e 3 foram feitas, como mostra a Fig. 5. As áreas pretas circulares são poros característicos da hierarquia do tecido ósseo cortical, enquanto as demais são trincas provenientes do processo de preparação. As regiões mais esbranquiçadas são características de mais presença de minerais. As imagens foram processadas usando uma macro desenvolvida em ImageJ e, a partir desses resultados, foram ajustadas por uma função gaussiana com $r^2=0,99$, que nos forneceu as características da DDMO, como mostrado na Fig. 6. Os resultados encontrados estão na Tabela 1, podendo ser visto a “Área do tecido ósseo”, a “FWHM”, a “Máxima frequência de Ca”, e o “Centro de gravidade” ou “Concentração mineral de Ca”. A região 1, apresentou maior concentração em peso de Ca que as demais regiões analisadas, cerca de 25,23 %p/p (Tab. 1), e, comparando a imagem da Região 1 com as demais, pôde-se verificar que essa apresentou áreas mais esbranquiçadas, como mostrado na Fig. 5 (a). Também foi observada na Tab. 1 menor área de tecido ósseo analisada, que corrobora a presença de maiores trincas, como mostradas na Fig.5 (a). Analisando a Fig. 6 e Tab. 1 encontramos um deslocamento da curva da região 1 para direita e maior largura (FWHM) do espectro em relação as demais regiões. Uma ressalva a ser feita é que a corrente não foi medida durante o tempo de ensaio e para maior confiabilidade dos resultados será necessário o uso de um pico

amperímetro, pois uma variação de corrente de 0,4 pA pode ser comprometedora para a variação da largura do histograma e, conseqüentemente, dos resultados finais (Roschger, 1998). Outra observação a ser considerada é aumentar o número de regiões analisadas dentro de um tempo ótimo de análise, onde a variação de corrente não aconteça.

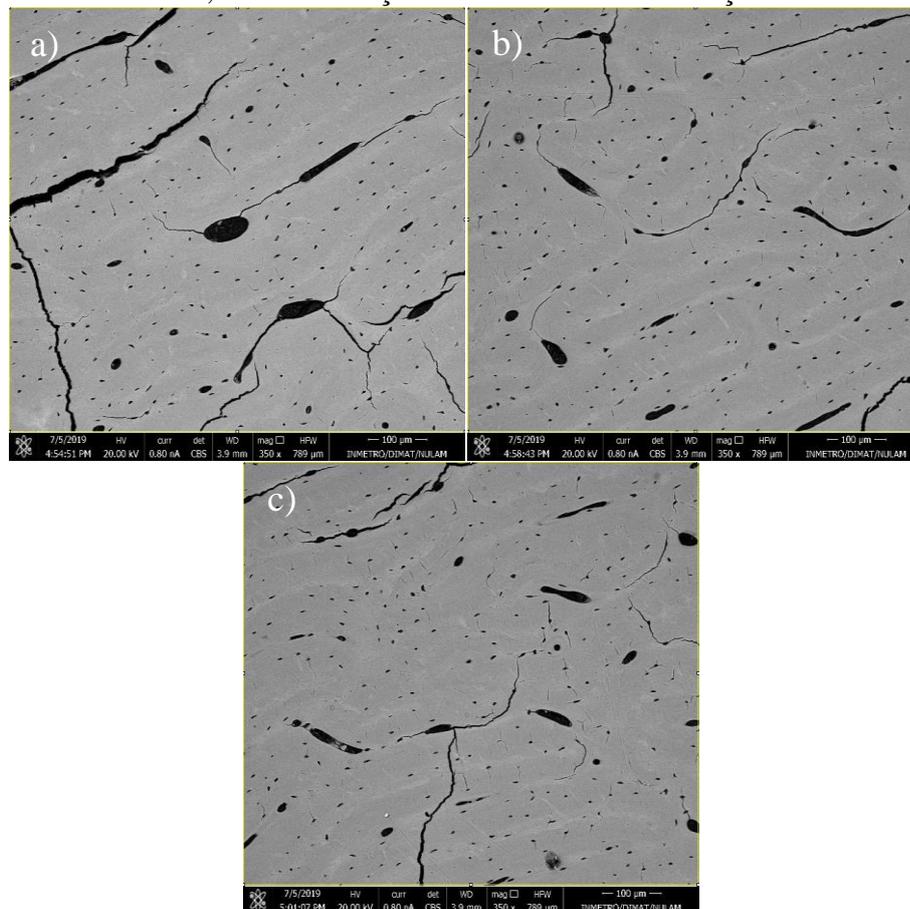
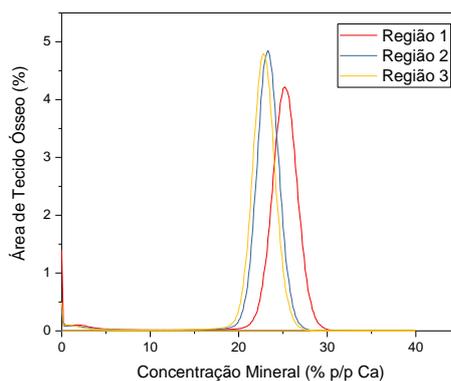


Figura 5: Região (a) 1, (b) 2 e (c) 3 de uma amostra óssea sem desmineralizar.



Figuras 6: DDMOs das Regiões 1, 2 e 3 de uma amostra óssea sem desmineralizar.

Região	Área Tecido ósseo %	FWHM	Frequência Máxima de Ca. (%)	Concentração mineral (%p/p Ca)	Area IntgP
1	14,48	3,25	4,19	25,23	100
2	14,85	2,90	4,80	23,30	100
3	14,70	2,91	4,74	22,83	100
Média/Desv.Pad.	14,68±0,19	3,02±0,20	4,58±0,34	23,79±1,27	-

Tabela 1: Resultados obtidos das 3 gaussianas provenientes de DDMO de diferentes regiões de uma mesma amostra sem desmineralizar.

Amostra com 4h de desmineralização em EDTA

Diferentemente da amostra de 0h, analisamos 5 regiões distintas de uma mesma amostra, que levou aproximadamente 15 min. de análise. Nosso objetivo era verificar a estabilidade da corrente do equipamento e confiabilidade de reprodução da técnica e dos resultados. Tais regiões se encontram nas Fig. 7. As imagens aparentam mais homogeneidade na sua cor, nas regiões analisadas. O que também pode ser corroborado pela sobreposição dos espectros mostrados na Fig. 8.

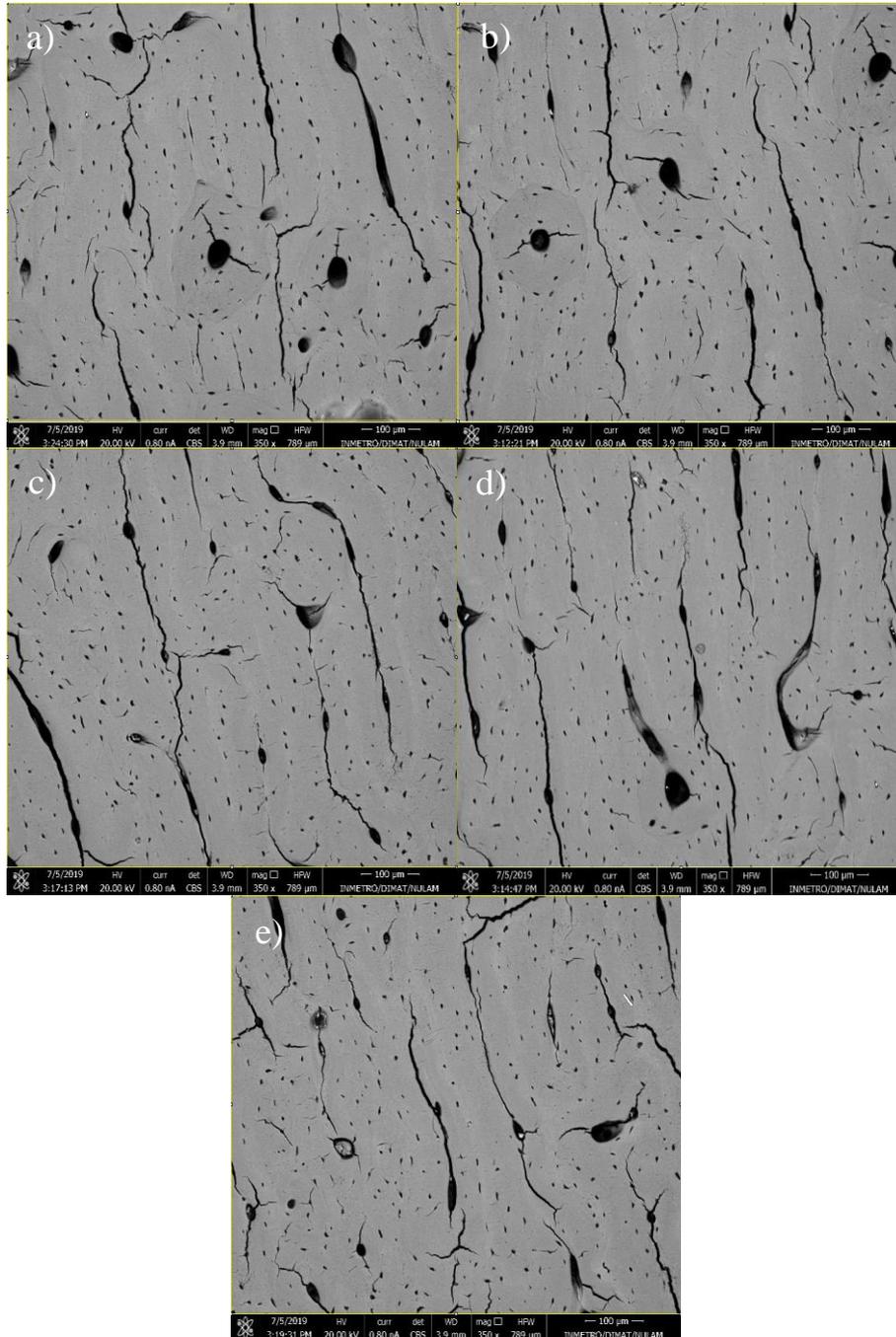


Figura 7: Regiões (a) 1, (b) 2, (c) 3, (d) 4 e (e) 5 da amostra óssea desmineralizada por 4h.

Como feito anteriormente, as imagens foram processadas usando uma macro desenvolvida em Image J e a partir desses resultados, foram ajustadas por uma função gaussiana com $r^2=0,99$, que nos forneceu as características da DDMO, como mostrado na Fig. 8.

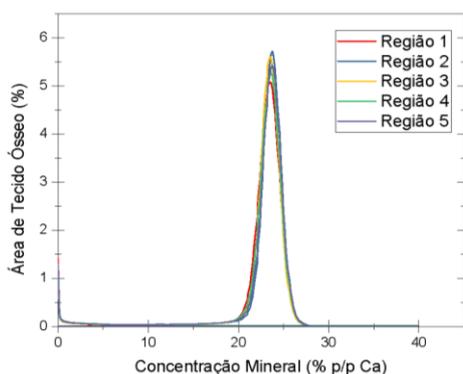


Figura 8: DDMOs de 5 diferentes regiões de uma mesma amostra.

Na Tab. 2 podem ser vistos os resultados que são: a “Área do tecido ósseo”, a “FWHM”, a “Máxima frequência de Ca”, e o “Centro de gravidade” ou “Concentração mineral de Ca”. Analisando a largura do espectro (FWHM), podemos observar que a variação dos resultados encontrados foi bem pequena, mostrando um desvio padrão de 0,11%. Isto significa que pelo menos durante o período analisado existiu estabilidade de corrente do equipamento utilizado, o que é importante para confiabilidade dos resultados encontrados. Também foi analisado os dados de corrente na amostra, retirados dos parâmetros de microscopia, e a média das 5 amostras foi de $-1.15e-09 \pm 8.56e-11$, mostrando boa estabilidade durante o período analisado.

O percentual em peso de Ca foi de 23,60% com desvio de 0,10%, similar aos da amostra que estava sem desmineralizar que foi de $23,79 \pm 1,27$ % p/p. Desta forma, como esperado, no tempo de desmineralização analisado não foi possível ver diferença de mineralização entre as amostras, devido à desmineralização ter ocorrido muito na superfície da amostra. Uma análise de superfície será realizada para evidenciar a variação mineral durante o processo nos períodos iniciais de desmineralização.

Região	Área Tecido ósseo %	FWHM	Frequência Máxima de Ca. (%)	Concentração mineral (%p/p Ca)	Area IntgP
1	14,21	2,67	5,00	23,48	100
2	14,15	2,41	5,51	23,54	100
3	14,72	2,42	5,51	23,67	100
4	14,00	2,54	5,17	23,59	100
5	13,97	2,46	5,34	23,72	100
Média/Desv.Pad.	14,20±0,30	2,5±0,11	5.31±0,22	23,60±0,10	-

Tabela 2: Resultados obtidos das 5 gaussianas provenientes de DDMOs de diferentes regiões de uma mesma amostra com 4h de desmineralização.

5. CONCLUSÕES

No presente artigo que teve como objetivo principal implementar uma metodologia para entender a desmineralização através da análise de imagens de elétrons retroespalhados obtidas por MEV e a distribuição mineral óssea nestas amostras, concluiu-se que:

Os parâmetros tais como a estabilidade de corrente, o controle topográfico da amostra e do recobrimento e o tempo de varredura são importantes para se obter resultados reprodutíveis, pois esses parâmetros influenciam na largura do histograma.

A calibração qualitativa feita no INMETRO usando o software do equipamento não obteve o valor esperado da literatura, desta forma foram utilizados os valores teóricos validados por Roschger para a calibração da técnica.

Com as imagens obtidas no INMETRO a DDMO foi determinada em % p/p Ca. Foi encontrada alta reprodutibilidade do método, o que pode ser visto pela sobreposição exata de todos os cinco histogramas gerados. O desvio padrão do % p/p de Ca máximo foi de 0.1 % para a amostra de 4h. Isto significa que pelo menos durante o período analisado existiu estabilidade de corrente do equipamento utilizado, o que é importante para confiabilidade dos resultados encontrados.

No tempo de desmineralização analisado não foi possível ver diferença de mineralização entre as amostras, devido à desmineralização ter ocorrido superficialmente. Isso implica que se façam análises com amostras com maior tempo de desmineralização futuramente.

Os parâmetros de análise no MEV-FEG devem ser determinados de acordo com o equipamento em uso, pois são decisivos para uma boa qualidade dos resultados obtidos. Porém, é importante registrar que somente por meio da nossa vasta revisão da literatura que foi possível encontrar os melhores parâmetros para nosso projeto.

Este é um estudo em andamento e preliminar, outras considerações serão levadas em conta em trabalhos futuros.

AGRADECIMENTOS

Pelo apoio do Laboratório de Microscopia do Inmetro, Faperj, CNPq.

REFERÊNCIAS

- BLOEBAUM R. D., LUNDEEN G. A., SHEA J. E., and WHITAKER E. L. *Age-related mineralization heterogeneity changes in trabecular bone of the proximal femur*. *Anat. Rec. - Part A Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.*, vol. 281, no. 2, pp. 1296–1302, 2004.
- BONFIELD W. and CLARK E. A. *Elastic deformation of compact bone*. *J. Mater. Sci.*, vol. 8, no. 11, pp. 1590–1594, 1973.
- CARTER DR, SPENGLER DM. *Mechanical properties and composition of cortical bone*. *Clin Orthop*. 1978;135:192–217.
- COWIN, S. & Telega, J. *Bone Mechanics Handbook*, 2nd Edition. *Appl. Mech. Rev.* 56, B61 (2003).
- CURREY J. D. *Effects of Differences in Mineralization on the Mechanical Properties of Bone*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 304, n. 1121, pp. 509–518, 1984.
- CURREY J. D. *The mechanical consequences of variation in the mineral content of bone*. *J. Biomech.* vol. 2, no. 1, pp. 1–11, 1969.
- CURREY J. D., Brear K., and Zioupos P. *The effects of ageing and changes in mineral content in degrading the toughness of human femora*. *J. Biomech.*, vol. 29, no. 2, pp. 257–260, 1996.
- FOLLET H., BOIVIN G., RUMELHART C., and MEUNIER P. J. *The degree of mineralization is a determinant of bone strength: A study on human calcanei*. *Bone*, vol. 34, no. 5, pp. 783–789, 2004.
- ROSCHGER P. et al. *Validation of Quantitative Backscattered Electron Imaging for the Measurement of Mineral Density Distribution in Human Bone Biopsies*. *October*, vol. 23, no. 4, pp. 319–326, 1998.
- ROSCHGER, P. et al. *Constant mineralization density distribution in cancellous human bone*. *Bone*, v. 32, n. 3, p. 316–323, 2003.
- ROSCHGER,P. et al. *Bone mineralization density distribution in health and disease*. *Bone*, v. 42, n. 3, p. 456–466, 2008.
- SHBOUL, M. et al. *Bone matrix hypermineralization associated with low bone turnover in a case of Nasu-Hakola disease*. *Bone*, v. 123, n. October 2018, p. 48–55, 2019.
- VAJDA E. G. and Bloebaum R. D. *Age-related hypermineralization in the female proximal human femur*. *Anat. Rec.*, vol. 255, no. 2, pp. 202–211, 1999.

QUANTITATIVE BACKSCATTERED ELECTRON IMAGING (QBEI) FOR DETERMINING OF BONE MINERAL DENSITY DISTRIBUTION (BMDD) OF CORTICAL TISSUE BONE.

Sadala, G.F.M.¹; Silva, C.E.R.¹; Graça, G.R.A.¹; Dos Santos, C.T.¹; Rangel, F.L.C.¹;
Fernandes, W.G.¹; Archanjo, B.S.²; Monteiro, M.J.¹;

¹ Divisão de Ensaaios em Materiais e Produtos, Instituto Nacional de Tecnologia, Rio de Janeiro (RJ), Brasil

² Divisão de Materiais, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, Duque de Caxias (RJ), Brasil
E-mail:cristiane.evelise@int.gov.br

Resumo. *The main of this work was to implement the method of Quantitative Backscattered Electron Imaging - qBei / SEM to understand of the bone mineral density distribution (BMDD), which is the main determinant of biomechanical quality of bone tissue. Bovine cortical bone tissue was used and demineralization was induced using 0.1 M EDTA and pH 11, with demineralization time of 0 and 4 h. The samples were dehydrated and embedded. For gray level calibration of the images, the Aluminum, Z = 13 and Carbon, Z = 6 standards were used. As cortical bone tissue images were made under the same brightness and contrast conditions of these standards and were processed using ImageJ software. To analyze the use of the method and equipment were made 5 separate images at 5 μm, another with 30 μs variation time. A BMDD was specified in% w / w Ca. High reproducibility was found, shown in the exact exposure of all five histograms generated and with a standard deviation of max w / w% of 0.1%. In the analyzed demineralization time, no differences were found between the values due to the superficial demineralization.*

Keywords: *Osteoporosis, BMDD, Microstruture, Desmineralization.*