

ACOMPANHAMENTO DA CONSOLIDAÇÃO DE FRATURAS PELA  
TRANSMISSÃO AXIAL ULTRASSONORA: EFEITO DA COMPOSIÇÃO E  
MINERALIZAÇÃO DO CALO ÓSSEO

Christiano Bittencourt Machado

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica.

Orientadores: Wagner Coelho de Albuquerque  
Pereira  
Pascal Laugier

Rio de Janeiro

Março de 2011

ACOMPANHAMENTO DA CONSOLIDAÇÃO DE FRATURAS PELA  
TRANSMISSÃO AXIAL ULTRASSONORA: EFEITO DA COMPOSIÇÃO E  
MINERALIZAÇÃO DO CALO ÓSSEO

Christiano Bittencourt Machado

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ  
COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS  
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM  
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA BIOMÉDICA.

Examinada por:

---

Prof. Wagner Coelho de Albuquerque Pereira, D.Sc.

---

Dr. Pascal Laugier, Ph.D.

---

Prof. Marco Antônio von Krüger, Ph.D.

---

Prof. Alberto Schanaider, D.Sc.

---

Prof. Eduardo Tavares Costa, Ph.D.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

MARÇO DE 2011

Machado, Christiano Bittencourt

Acompanhamento da consolidação de fraturas pela transmissão axial ultrassonora: efeito da composição e mineralização do calo ósseo/ Christiano Bittencourt Machado. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2011.

XXIII, 104 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Wagner Coelho de Albuquerque Pereira  
Pascal Laugier

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Biomédica, 2011.

Referências Bibliográficas: p. 76-90.

1. Transmissão axial ultrassonora. 2. Tecido ósseo. 3. Fratura. I. Pereira, Wagner Coelho de Albuquerque *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Biomédica. III. Título.

*A minha esposa Daniela... seu amor e sua confiança me fizeram chegar até aqui.*

*“O coração do homem traça o seu caminho, mas o Senhor  
lhe dirige os passos.” Provérbios 16:9*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, minha rocha e fortaleza, sejam dados toda honra e toda glória por essa conquista.

A minha esposa Daniela, pelo amor, dedicação, incentivo, e sobretudo confiança, que me fizeram suportar os momentos difíceis da jornada. Parte dessa vitória é sua também.

Aos meus pais Aida e Joaquim, meus irmãos Fabrício e Joaquim Jr., minha sogra Elida e todos os meus familiares, pelo constante incentivo e amor incondicional.

Ao meu orientador, Prof. Wagner Coelho, por acreditar em meu potencial e por me dar uma oportunidade única, que com certeza fará a diferença em meu futuro. Muito obrigado.

Direciono igualmente meus agradecimentos à Pascal Laugier, meu orientador, por me receber tão calorosamente no *Laboratoire d’Imagerie Paramétrique*, em Paris. Obrigado também pela confiança, e por disponibilizar todos os recursos necessários para o desenvolvimento de meu trabalho (*J’adresse également mes remerciements à Pascal Laugier, en tant que directeur de thèse, pour me recevoir chaleureusement au Laboratoire d’Imagerie Paramétrique à Paris. Merci pour la confiance et pour offrir tous les ressources nécessaires pour le développement de mon travail*).

Muito obrigado à Frédéric Padilla, como co-orientador de tese, pela eterna disponibilidade e contribuição (*Merci beaucoup à Frédéric Padilla, en tant que co-directeur de thèse, pour la disponibilité et contribution de toujours*).

Agradeço ao amigo Julien Grondin, por ter me auxiliado no trabalho com SimSonic, e pela companhia agradável no “labo” (*Je remercie l’ami Julien, pour m’aider au travail avec SimSonic, et pour la compagnie agréable au labo*).

Agradeço sinceramente Sylvain Hauptert e Dorothée Bossis, pela atenção especial para comigo e minha esposa (*Je tiens à remercier sincèrement Sylvain Hauptert e Dorothée Bossis, pour l’attention spéciale avec moi et ma femme*).

Aos também colegas de “labo”, Thien-Ly, Mathilde, Jacques, Guillaume, Jean-Gabriel, Quentin, Aména, Sara e Josquin, muito obrigado (*Aux autres copains du labo, Thien-Ly,*

*Mathilde, Jacques, Guillaume, Jean-Gabriel, Quentin, Aména, Sara et Josquin, merci beaucoup).*

Obrigado à Maryline Talmant, por oferecer seu conhecimento na área de transmissão axial ultrassonora, no desenvolvimento do meu trabalho (*Merci à Maryline Talmant, pour offrir son expertise sur la transmission axiale ultrasonore, pour le développement de mon travail*).

Obrigado à Mathilde Granke, por ter realizado a análise por microscopia ultrassônica na amostra óssea in vitro (*Merci à Mathilde Granke, pour avoir fait l'analyse de microscopie ultrasonore dans l'échantillon d'os in vitro*).

Ao Prof. Marcel Waks, pela ajuda na preparação das soluções de EDTA (*Au Prof. Marcel Waks, pour l'aide dans la préparation des solutions d'EDTA*).

A Karim Oudina, Universidade Paris VII, por ter gentilmente feito a análise das soluções de EDTA-Cálcio (*A Karim Oudina, Université Paris VII, pour avoir fait gentiment l'analyse des solutions d'EDTA-Calcium*).

Meus agradecimentos à Giacomo Galioto, grande amigo, pelas “deliciosas refeições no Acte V”, e principalmente pela atenção especial para comigo (*Mes remerciements à Giacomo Galioto, un grand ami, pour les délicieux repas au Acte V, et principalement pour l'attention spéciale avec moi*).

Aos amigos e irmãos de fé, Emmanuel e Michelle Fleck, e seus filhos, Gabriel e Joseph. Naquela primeira noite de frio em Paris, vocês me receberam em sua casa sem sequer me conhecer. Reconheço vocês como uma obra de Deus em minha vida (*Je remercie mes amis et frères dans la foi, Emmanuel et Michelle Fleck, et son fils, Gabriel et Joseph. Dans ma première nuit de froid à Paris, vous m'avez reçu chez vous sans me connaître du tout. Je vous reconnais comme une oeuvre de Dieu dans ma vie*).

Ao meu pastor Marcos Tristão, meu muito obrigado pelas orações, que tanto me ajudaram durante esses quatro anos, principalmente no “ano francês”.

Aos meus sempre pastores “franceses”, André Barnes e Philippe Pluchon, pelas orações e pela atenção especial nos momentos difíceis em Paris. Agradeço igualmente a todos os irmãos da Igreja Batista do Centro de Paris (*Je remercie mes pasteurs “français” de*

*toujours, André Barnes et Philippe Pluchon, pour les prières et pour l'attention très spéciale dans les moments difficiles à Paris. Je remercie également à tous les frères de l'Église Baptiste du Centre de Paris).*

Aos professores do Laboratório de Ultrassom da COPPE/UFRJ, Profs. Marco Antônio von Krüger e João Carlos Machado, pelas importantes aulas que me foram ministradas e que muito me foram úteis durante o doutorado.

Aos grandes amigos de sempre, André Alvarenga, Isabela Miller e Daniel Patterson, meu muito obrigado pela amizade, incentivo, gargalhadas e etc.

Aos também amigos Lorena, Maggi, Mayra, Gisele, Kelly, Rodrigo, Thais, Rejane, Vinícius, Bráulio, Tarcísio, Francisco, Guillermo, César “Portuga”, Danilo e Paulo, pelos momentos inesquecíveis no laboratório.

Ao amigo Renato Spranger, muito obrigado.

Aos meus eternos professores, Edil Luis Santos, Carlos Eduardo Brasil Neves e Carlos Alberto Vieira de Melo, pelo incentivo à pesquisa desde minha graduação.

Finalmente, e não menos importante, obrigado à CAPES/Colégio Doutoral Franco Brasileiro, pela bolsa que realizou meu sonho de “estudar na França” em 2009.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

ACOMPANHAMENTO DA CONSOLIDAÇÃO DE FRATURAS PELA  
TRANSMISSÃO AXIAL ULTRASSONORA: EFEITO DA COMPOSIÇÃO E  
MINERALIZAÇÃO DO CALO ÓSSEO

Christiano Bittencourt Machado

Março/2011

Orientadores: Wagner Coelho de Albuquerque Pereira  
Pascal Laugier

Programa: Engenharia Biomédica

Este trabalho avaliou a técnica de transmissão axial ultrassônica (TAU) na caracterização e acompanhamento da consolidação do calo ósseo após fratura, principalmente ao observar o efeito da mineralização do tecido de regeneração, usando-se para tal dados de simulação (modelos numéricos de calos ósseos com variação tecidual diária) e experimentos (fêmur bovino *in vitro*, com um protocolo de desmineralização – processo inverso de consolidação óssea). Os resultados mostraram que as medidas de TAU podem ser influenciadas pelo estágio de regeneração do calo ósseo, particularmente pelo seu grau de mineralização. Atrasos na consolidação, assim como pseudoartroses, podem ser identificadas, mostrando que a TAU pode ser uma ferramenta diagnóstica promissora nas fraturas.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

FRACTURE CONSOLIDATION FOLLOW-UP BY ULTRASOUND AXIAL  
TRANSMISSION: EFFECT OF BONE CALLUS COMPOSITION AND  
MINERALIZATION

Christiano Bittencourt Machado

March/2011

Advisors: Wagner Coelho de Albuquerque Pereira  
Pascal Laugier

Department: Biomedical Engineering

This work assessed the ultrasound axial transmission (UAT) technique in the characterization and follow-up of bone callus consolidation after fracture, mainly observing the effect of the regenerating tissue mineralization degree, using simulation (numerical models of bone callus with daily-variation callus) and experimental (*in vitro* bovine femur, with a demineralization protocol – inverse process of bone consolidation). Results showed that UAT measures can be influenced by the regenerating stage of bone callus, particularly by its mineralization degree. Consolidation delays, as well as pseudoarthrosis, can be identified, showing that UAT may be a promising diagnostic tool for fractures managing.

## Sumário

Lista de Figuras.....	xiii
Lista de Tabelas.....	xviii
Lista de Símbolos.....	xix
<b>CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>I.1. OBJETIVO.....</b>	<b>3</b>
<b>CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>5</b>
<b>II.1. TRANSMISSÃO AXIAL ULTRASSÔNICA (TAU) NA AVALIAÇÃO     DO OSSO CORTICAL.....</b>	<b>5</b>
<b>II.2. TAU NA AVALIAÇÃO DO CALO ÓSSEO.....</b>	<b>9</b>
<b>CAPÍTULO III – O TECIDO ÓSSEO E A RECUPERAÇÃO PÓS- FRATURA.....</b>	<b>14</b>
<b>III.1. O TECIDO ÓSSEO NORMAL.....</b>	<b>14</b>
<b>III.2. A CONSOLIDAÇÃO ÓSSEA PÓS-FRATURA.....</b>	<b>19</b>
<b>CAPÍTULO IV – FUNDAMENTOS TEÓRICOS DA TRANSMISSÃO AXIAL ULTRASSÔNICA.....</b>	<b>24</b>
<b>CAPÍTULO V – MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
<b>V.1. SIMULAÇÕES NUMÉRICAS COM MODELOS DE     REGENERAÇÃO ÓSSEA.....</b>	<b>30</b>
<b>V.1.1. Implementação dos modelos de calos ósseos.....</b>	<b>30</b>
<b>V.1.2. Protocolo de simulação.....</b>	<b>36</b>
<b>V.1.3. Processamento do sinal.....</b>	<b>39</b>
<b>V.1.4. Análise estatística.....</b>	<b>40</b>

<b>V.2. EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>: EFEITO DA</b>	
<b>DESMINERALIZAÇÃO .....</b>	<b>41</b>
<b>V.2.1. Amostra.....</b>	<b>41</b>
<b>V.2.2. Procedimentos experimentais.....</b>	<b>42</b>
<b>V.2.3. Protocolo de simulação do modelo experimental.....</b>	<b>46</b>
<b>V.2.4. Análise estatística.....</b>	<b>49</b>
<b>CAPÍTULO VI – RESULTADOS.....</b>	<b>50</b>
<b>VI.1. SIMULAÇÕES.....</b>	<b>50</b>
<b>VI.2. EXPERIMENTO <i>IN VITRO</i>.....</b>	<b>54</b>
<b>VI.2.1. Análise das soluções de EDTA-Ca<sup>2+</sup> .....</b>	<b>54</b>
<b>VI.2.2. Análise de microscopia acústica (SAM).....</b>	<b>55</b>
<b>VI.2.3. Estimativas do tempo de vôo (TOF).....</b>	<b>57</b>
<b>VI.2.4. Simulações.....</b>	<b>59</b>
<b>CAPÍTULO VII – DISCUSSÃO.....</b>	<b>62</b>
<b>VII.1. SIMULAÇÕES.....</b>	<b>62</b>
<b>VII.2. EXPERIMENTO <i>IN VITRO</i> .....</b>	<b>67</b>
<b>CAPÍTULO VIII – CONCLUSÃO.....</b>	<b>74</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>76</b>
<b>ANEXO (PROPRIEDADES ELÁSTICAS DOS SÓLIDOS).....</b>	<b>91</b>
<b>PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....</b>	<b>102</b>

## Lista de Figuras

Figura II.1 – Ilustração esquemática da medida da velocidade do US ao longo de uma distância longitudinal fixa na camada cortical óssea. Adaptado de [27].....	6
Figura II.2 – Radiografia mostrando os transdutores implantados em um osso fraturado, usados para estimulação óssea e avaliação em TAU [38].....	10
Figura II.3 – Modelo numérico 2D usado: (a) com calo ósseo sem geometria, e (b) com geometria. Adaptado de [40].....	10
Figura II.4 – Modelo numérico 3D usado. Adaptado de [41].....	11
Figura II.5 – Desenho ilustrando o fenômeno de espalhamento/difração da onda lateral ao alcançar o local de fratura: (a) a onda A se propaga em direção à fratura, na placa 1; (b) a onda A é espalhada/difratada na interface osso – fratura, dando origem a onda B; (c) a onda B se acopla na placa 2, dando origem a onda C, de menor energia. Adaptado de [45].....	12
Figura III.1 – Organização estrutural do osso. Adaptado de RHO <i>et al.</i> [58].....	15
Figura III.2 – O osso cortical e trabecular. Adaptado de BOSSY [61].....	16
Figura III.3 – Estrutura do osso cortical: (a) conjunto compacto de ósteons; (b) corte histológico demonstrando a estrutura lamelar concêntrica; e (c) imagem de microscopia acústica à 400 MHz. Adaptado de [61].....	17
Figura III.4 – Osso trabecular de uma mulher com (a) 23 anos e (b) 82 anos [61].....	17
Figura III.5 – Osso trabecular de uma mulher com (a) 55 anos e (b) 90 anos. Imagens obtidas por microtomografia computadorizada [61].....	18
Figura III.6 – Os tipos celulares do tecido ósseo. Adaptado de [59].....	19
Figura III.7 – Análise histológica do calo ósseo: (a) formação óssea intramembranosa; e (b) endocondral, transformando tecido cartilaginoso em tecido ósseo [65].....	20

Figura III.8 – As fases da formação do calo em uma fratura: (a) após um trauma surge o hematoma, e a ossificação intramembranosa se inicia; (b) aumenta em diâmetro e em comprimento, e mostra os primeiros sinais de ossificação endocondral; (c) o calo cresce principalmente por ossificação endocondral em direção a linha de fratura; e (d) cria a ponte de ligação na periferia. Adaptado de [65].....	21
Figura III.9 – (a) Processo de segmentação, definindo a borda externa (verde) e a superfície do periósteo do córtex (vermelho); (b) imagem 3D do volume de interesse estudado [37].....	23
Figura IV.1 – (a) onda esférica produzida no meio 1, fluido, indo em direção ao meio 2 (sólido); (b) ao tocar a interface, produz frentes de onda de compressão refratada e refletida. O ponto I conecta essas frentes, e forma com o centro S o ângulo de incidência $\theta_i$ ; (c) quando $\theta_i > \theta_c$ , forma-se a onda lateral. Adaptado de [61].....	25
Figura IV.2 – Representações da onda direta, refletida e lateral. Adaptado de [47].....	26
Figura IV.3 – Tempos de chegada teóricos para a OD, OR e OL, considerando $c_1 = 1490$ m/s e $c_2 = 2680$ m/s. Adaptado de [47].....	27
Figura IV.4 – Trajetos da OL e da onda refletida do fundo da placa. Adaptado de [48].....	28
Figura V.1 – Dimensões e composição tecidual do calo no 6º dia de regeneração óssea, de acordo com modelo de CARTER <i>et al.</i> [68]. Adaptado de ISAKSSON <i>et al.</i> [81].....	32
Figura V.2 – (A) 13º e 14º dia do modelo M2, mostrando o aumento na concentração de tecido fibroso; (B) 100º dia do modelo M3, mostrando a reabsorção do calo externo e a permanência da região de não-união (círculo verde); (C) 100º dia do	

modelo M4, mostrando a reabsorção intramedular do calo (círculo verde). Adaptações de ISAKSSON <i>et al.</i> [81].....	33
Figura V.3 – Composição total do calo para (a) M1; (b) M2; (c) M3; e (d) M4.....	34
Figura V.4 – Composição de placa do calo para (a) M1; (b) M2; (c) M3; e (d) M4.....	34
Figura V.5 – Protocolo de simulação, com as condições de contorno nos quatro lados e a localização dos transdutores.....	37
Figura V.6 – Propagação da onda de US simulada no SimSonic2D: (A) em $t = 0 \mu\text{s}$ , observa-se o transmissor <i>Tr</i> ; (B) em $t = 6 \mu\text{s}$ , pode-se observar a onda refletida (OR) e a onda lateral (OL); (C) em $t = 11 \mu\text{s}$ , OL atravessa a fratura para encontrar o segundo fragmento ósseo; (D) em $t = 19 \mu\text{s}$ , OL após atravessar a fratura e o calo ósseo.....	38
Figura V.7 – (a) sinal RF após propagação no osso – calo – osso. O círculo mostra a região de interesse; (b) detecção do FAS (seta).....	39
Figura V.8 – Amostra de fêmur bovino <i>in vitro</i> , com o corte realizado pela serra (fratura de 3 mm). A marca verde sobre o osso delimita a localização da sonda de US utilizada.....	41
Figura V.9 – Fatia de osso cortical de 3 mm de espessura.....	42
Figura V.10 – Sonda BeamLip, de 1 MHz, composta de 6 emissores (3 de cada lado da sonda) e 14 receptores. Cortiça separa os emissores dos receptores.....	43
Figura V.11 – Protocolo experimental.....	44
Figura V.12 – Protocolo experimental, mostrando a sonda de ultrassom acima do espaço de fratura contendo a fatia óssea de 3 mm de espessura.....	45
Figura V.13 – Modelo numérico da situação experimental: (A) placa de espessura 5 mm (branco) com uma fratura de 3 mm, e o posicionamento dos transdutores; (B) a fatia óssea modelada dentro da fratura com uma interface de 0,1 mm entre a	

placa e a fatia; (C) em cinza, o tecido desmineralizado no 3° dia de imersão com EDTA.....	48
Figura VI.1 – (A) Tempo de voo do FAS ( $TOF_{FAS}$ ) para M1; (B) Atenuação do FAS ( $SPL_{FAS}$ ) e do máximo do sinal ( $SPL_{MAX}$ ) para M1; (C) $TOF_{FAS}$ para M2; (D) $SPL_{FAS}$ e $SPL_{MAX}$ para M2.....	51
Figura VI.2 – (A) Tempo de voo do FAS ( $TOF_{FAS}$ ) para M3; (B) Atenuação do FAS ( $SPL_{FAS}$ ) e do máximo do sinal ( $SPL_{MAX}$ ) para M3; (C) $TOF_{FAS}$ para M4; (D) $SPL_{FAS}$ e $SPL_{MAX}$ para M4.....	51
Figura VI.3 – Melhores modelos de regressão para cada modelo de calo (variável dependente: $TOF_{FAS}$ ): (A) para M1, $MB_{pl}$ , $IntB_{pl}$ e $Fib_{pl}$ como preditores ( $R^2 = 0,98$ , $RMSE = 0,06$ ); (B) para M2, $Fib_{pl}$ e $MB_{pl}$ como preditores ( $R^2 = 0,94$ , $RMSE = 0,10$ ); (C) para M3, $MB_{pl}$ , $IntB_{pl}$ e $Im_{pl}$ como preditores ( $R^2 = 0,92$ , $RMSE = 0,04$ ); (D) para M4, $MB_{pl}$ , $Fib_{pl}$ e $MC_{pl}$ como preditores ( $R^2 = 0,97$ , $RMSE \approx 0,05$ ).....	54
Figura VI.4 – Concentração (perda) medida e modelada de cálcio ( $[Ca^{2+}]$ ), com os intervalos de confiança (95%) ( $R^2 = 0,99$ , $RMSE = 68,29$ ).....	55
Figura VI.5 – Imagens ópticas da fatia cortical após 12 dias de desmineralização com o protocolo EDTA: (A) vista macroscópica mostrando a frente de desmineralização e o centro ossificado. Abaixo, as vistas microscópicas da estrutura lamelar do centro ossificado (B) e a interface entre o tecido mineralizado e não mineralizado (C).....	56
Figura VI.6 – Imagem SAM da fatia cortical, mostrando o centro ossificado (1) (impedância média = $5,9 \pm 0,4$ MRayl) e a região desmineralizada (2) (impedância média = $1,4 \pm 0,1$ MRayl).....	57

Figura VI.7 – Sinais RF coletados a partir da amostra de osso bovino: (A) intacto, e (B) com fratura de 3 mm. Pode-se notar o atraso no tempo de vôo do FAS (*) no caso de fratura (9,64 $\mu$ s) em relação ao caso intacto (8,40 $\mu$ s).....	57
Figura VI.8 – <i>Boxplots</i> das distribuições do TOF para o osso intacto, fraturado e para cada dia de desmineralização (* - $p < 0,05$ ; ** - $p < 0,001$ ).....	58
Figura VI.9 – Perda de cálcio (mg/L) e $TOF_{FAS}$ ( $\mu$ s) para cada dia de desmineralização: (A) após o 4° dia, o TOF responde com pequenos aumentos e decréscimos, até alcançar um aumento de 9 $\mu$ s no 12° dia; (B) um gráfico log-log entre essas variáveis ( $r_s = -0,55$ , $p = 0,03$ ).....	59
Figura VI.10 – <i>Snapshots</i> da simulação da propagação acústica no 3° dia de desmineralização (osso intacto em cinza escuro; osso desmineralizado em cinza claro; água em preto): (A) $t = 0$ $\mu$ s: o emissor é identificado (1); (B) $t = 4$ $\mu$ s: onda lateral se propagando na interface água-osso (2); (C) $t = 5$ $\mu$ s: a frente de onda se apresenta dentro da fatia (3), e é possível observar a menor inclinação da onda quando atinge o tecido desmineralizado (4); (D) $t = 6$ $\mu$ s: um padrão de interferência entre as ondas incidente e a refletida na interface osso mineralizado/desmineralizado pode ser vista (5), enquanto a frente de onda se propaga já na segunda placa (6); (E) $t = 7$ $\mu$ s: a onda lateral se propagando na segunda placa (7).....	60
Figura VI.11 – TOF experimental e simulado. Em (A), $TOF_{FAS}$ é apresentado em valores absolutos ( $\mu$ s). Em (B), $\partial TOF_{FAS}/\partial t$ é observado do dia 1 ao dia 12.....	61
Figura A.1 – Curva força x deformação dividida nas regiões de deformação elástica e plástica. O “x” marca o ponto onde ocorre fratura. Adaptado de [71].....	92

## Lista de Tabelas

Tabela V.1 – Módulo de Young ( $E$ ) e razão de Poisson ( $\nu_0$ ) para cada tecido, usados por ISAKSSON et al. [81], os valores propostos de densidade ( $\rho_0$ ) e as velocidades transversal ( $c_t$ ) e longitudinal ( $c_l$ ) estimadas.....	35
Tabela V.2 – Módulo de Young ( $E$ ), razão de Poisson ( $\nu_0$ ) e densidade ( $\rho_0$ ) propostos, e as velocidades estimadas transversal ( $c_t$ ) e longitudinal ( $c_l$ ), aplicadas nas simulações.....	36
Tabela V.3. Parâmetros quantitativos usados para modelar o osso cortical bovino e o tecido conectivo inicial (ICT) em simulações 2D.....	48
Tabela VI.1 – Coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis dependentes ( $TOF_{FAS}$ , $SPL_{MAX}$ e $SPL_{FAS}$ ) e a composição do calo total e de placa para todos os quatro modelos numéricos.....	52
Tabela VI.2 – Alguns modelos de regressão multivariados para a composição do calo total e de placa (variável dependente $TOF_{FAS}$ ). $\Delta R^2$ é a variação no valor de $R^2$ comparado ao modelo de regressão com apenas uma variável explanatória.....	53
Tabela A.1 – Relações entre as ondas longitudinais e transversais com as diferentes constantes elásticas [72].....	96

## Lista de Símbolos

$A_{calo}$	Amplitude do sinal após sua propagação através do calo ósseo em transmissão axial
$A_{osso}$	Amplitude do sinal após sua propagação ao longo da placa óssea
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
$c$	Velocidade de propagação da onda de US no meio
$c_l$	Velocidade longitudinal
$c_t$	Velocidade transversal
$c_{ijkl}$	Constantes de rigidez elástica
$d$	Distância da fonte de ultrassom até a interface – transmissão axial
DEXA	<i>Dual-energy X-ray absorptiometry</i>
DMO	Densidade mineral óssea
$e$	Espessura da placa
$E$	Módulo de Young
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
$f_i$	Termo-fonte de força (esquema de Virieux)
$Fib$	Área total de tecido fibroso ( $\text{mm}^2$ ) no calo
$Fib_{pl}$	Área de tecido fibroso ( $\text{mm}^2$ ) na região de placa do calo
FAS	<i>First arriving signal</i>
FDTD	Finite-difference time domain
FFT	<i>Fast Fourier Transform</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
$h$	Resolução espacial do modelo numérico para as simulações

HA	Hidroxiapatita
<i>ImB</i>	Área total de tecido de osso imaturo (mm <sup>2</sup> ) no calo
<i>ImB<sub>pl</sub></i>	Área de tecido de osso imaturo (mm <sup>2</sup> ) na região de placa do calo
<i>ImC</i>	Área total de tecido de cartilagem imatura (mm <sup>2</sup> ) no calo
<i>ImC<sub>pl</sub></i>	Área de tecido de cartilagem imatura (mm <sup>2</sup> ) na região de placa do calo
<i>IntB</i>	Área total de tecido de osso intermediário (mm <sup>2</sup> ) no calo
<i>IntB<sub>pl</sub></i>	Área de tecido de osso intermediário (mm <sup>2</sup> ) na região de placa do calo
ICT	<i>Interconnective tissue</i>
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IL	Interleucina
<i>k</i>	Número de onda
<i>LSC</i>	<i>Least significant change</i>
M1	Modelo numérico do calo segundo Carter et al.
M2	Modelo numérico do calo segundo Claes e Heigele
M3	Modelo numérico do calo segundo Lacroix e Prendergast
M4	Modelo numérico do calo segundo Lacroix e Prendergast ( <i>Deviatoric Strain</i> )
<i>MB</i>	Área total de tecido de osso madura (mm <sup>2</sup> ) no calo
<i>MB<sub>pl</sub></i>	Área de tecido de osso madura (mm <sup>2</sup> ) na região de placa do calo
<i>MC</i>	Área total de tecido de cartilagem madura (mm <sup>2</sup> ) no calo
<i>MC<sub>pl</sub></i>	Área de tecido de cartilagem madura (mm <sup>2</sup> ) na região de placa do calo
MSC	<i>Mesenchymal cell</i>

OL	Onda lateral
$P_{lateral}$	Pressão gerada pela onda lateral
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PML	<i>Perfect Matched Layer</i>
QUS	<i>Quantitative ultrasound</i>
$r$	Distância entre o transmissor e o receptor ao longo da interface (alcance) – transmissão axial
$r_c$	Alcance crítico
$r_{min}$	Alcance mínimo para observação da onda lateral
$R$	Coefficiente de correlação de Pearson
$R^2$	Coefficiente de determinação
RF	Radio-freqüência
RMS	<i>Root mean square</i>
RMSE	<i>Root mean square error</i>
SAM	<i>Scanning acoustic microscopy</i>
SNR	<i>Signal-to-noise ratio</i>
SOS	<i>Speed of sound</i>
SPL	<i>Sound pressure level</i>
$SPL_{FAS}$	<i>Sound pressure level</i> do FAS
$SPL_{MAX}$	<i>Sound pressure level</i> da amplitude máxima do sinal
$t_{OD}$	Tempo de chegada da onda direta
$t_{OL}$	Tempo de chegada da onda lateral
$t_{OR}$	Tempo de chegada da onda refletida
Th	Espessura da trabécula (espalhador)
$Th_{ct}$	Espessura da trabécula (espalhador) constante

$Th_v$	Espessura da trabécula (espalhador) com variação
$Tr$	Transdutor receptor
$Tt$	Transdutor transmissor
TAU	Transmissão axial ultrassônica
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TNF	<i>Tumour necrosis factor</i>
TOF	<i>Time-of-flight</i>
$TOF_{FAS}$	<i>Time-of-flight of the FAS</i>
$\vec{u}$	Vetor deslocamento
US	Ultrassom
$v_{lateral}$	Velocidade da onda lateral
$V_l$	Velocidade de fase da onda longitudinal
$V_s$	Velocidade de fase
VEGF	<i>Vascular-endothelial growth factor</i>
$z$	Distância entre o ponto de observação até a interface – transmissão axial
$Z$	Impedância acústica
$\alpha$	Nível de significância do teste estatístico
$\lambda$	Comprimento de onda
$\lambda_l$	Primeira constante de Lamé
$\lambda_{min}$	Menor comprimento de onda considerado nas simulações
$\theta_c$	Ângulo crítico
$\theta_l$	Ângulo de incidência
$\mu_l$	Segunda constante de Lamé
$\mu CT$	<i>Microcomputed tomography</i>

$\rho$	Densidade
$\tau$	Eixo da resposta do sistema em dado tempo $t$
$\tau_{ij}$	Termo-fonte de tensão (esquema de Virieux)
$\nu_0$	Razão de Poisson
$\omega$	Frequência angular

# CAPÍTULO I

## INTRODUÇÃO

O conceito de ultrassom quantitativo (QUS - *quantitative ultrasound*) surgiu em meados da década de 70, quando a ultra-sonografia em escalas de cinza ganhou popularidade [1], com o intuito de superar as limitações da ultrassonografia (imagens bidimensionais produzidas no modo-B, onde os sinais de eco recebidos em cada posição do feixe de ultrassom são visualizados como pontos específicos na tela do monitor, com o brilho indicando a amplitude do eco, e a posição dos pontos determinada pela orientação do feixe e pelo tempo de chegada dos ecos) [2,3,4].

O operador de ultrassom (US), para obter um diagnóstico por imagem, tem a sua disposição informações qualitativas (contornos dos órgãos, presença de massa parenquimatosa anormal, etc.). Também o *speckle* da imagem possui importante papel, se relacionando com a estrutura celular do tecido [5]. Porém, informações que poderiam ser de suma importância para a elaboração de um correto diagnóstico, tratamento e prognóstico, são raramente detectados, por estarem mascaradas intrinsecamente no sinal de radiofrequência (RF) retro-espalhado. O meio biológico possui uma grande variação em suas características acústicas, sendo difícil tanto a realização de medidas acuradas quanto a descrição dos mecanismos de interação onda-meio, responsáveis pelas características acústicas observadas [6, 7]. WELLS [8] alerta que o operador de ultrasonografia precisa ter um alto nível de habilidade na aquisição e interpretação da imagem, uma vez que a imagem é somente uma representação da realidade.

Nos últimos anos, pesquisadores em todo mundo têm se voltado a aplicação do QUS na avaliação do tecido ósseo. Segundo LAUGIER [9], o QUS fornece um “guarda-chuvas” de técnicas que apresenta potencialmente vários parâmetros

quantitativos. Pelo fato de as características de propagação serem determinadas pelas propriedades estruturais e mecânicas do meio, o QUS poderia em princípio ser uma poderosa ferramenta na avaliação do *status* ósseo. Além disso, clínicos veem o US como uma opção não-ionizante e de menor custo, em relação por exemplo com a densitometria óssea.

Entre os parâmetros até agora aplicados ao tecido ósseo, pode-se destacar o coeficiente de atenuação [10-12], velocidade de propagação do US [13-17], coeficiente de retro-espalhamento [18-20], o espaçamento médio entre espalhadores (MSS – *Mean Scatterer Spacing*), que estima a periodicidade tecidual em tecidos *quasi*-periódicos [21] e parâmetros extraídos da transmissão axial [22,23]. Em sua grande maioria, o principal objetivo das pesquisas foi de se tentar caracterizar a osteoporose, ou mesmo prevenir fraturas na terceira idade, devido a osteopenia [24], uma vez que a osteoporose se trata de uma condição de debilidade do tecido ósseo, onde pode se observar a diminuição tanto na espessura cortical como na espessura trabecular [25].

A transmissão axial ultrassônica (TAU) tem sido amplamente estudada, principalmente na caracterização do osso cortical [26]. Basicamente, ela consiste na colocação de um arranjo linear de transdutores (emissores e receptores) ao longo do eixo ósseo. Os receptores detectam as ondas de US que se propagaram ao longo da camada cortical, e alguns parâmetros podem ser estimados. O primeiro dispositivo comercial de TAU usou um pulso de 250-kHz na camada cortical da região média da tíbia [27]. Atualmente, vários dispositivos podem ser encontrados, com frequências variando de 1 a 2 MHz [28-31], e até a implementação de uma técnica de TAU bi-direcional [28].

O processo de recuperação de fraturas pode levar a diversas complicações como pseudoartroses, consolidações tardias e infecções, para as quais o tratamento representa

custos para a saúde pública [32,33]. Para minimizar essas conseqüências econômicas negativas, é essencial o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas eficientes e de baixo custo. Algumas técnicas já têm sido propostas, desde simples radiografias [34,35] até tomografia computadorizada [34,36,37].

Mais recentemente, a TAU vem sendo proposta para a avaliação do calo ósseo após fratura. Alguns estudos com dados experimentais (*in vitro*) e de simulações demonstram que o tempo de propagação da onda de US, mais especificamente a chamada onda lateral, aumenta consideravelmente após a fratura, vindo a diminuir à medida que o calo ósseo se consolida, porém esse tempo não é sensível às alterações na forma do calo [38-43]. Outros autores também têm proposto o uso da atenuação da energia da onda lateral, uma vez que esse parâmetro se mostra sensível à alterações geométricas do tecido de cicatrização [44-46]. Apesar desses resultados promissores, algumas questões ainda merecem atenção. Não se sabe ao certo como utilizar esses parâmetros em transmissão axial para se acompanhar a evolução do calo ósseo, nem mesmo há estudos *in vivo* sobre a técnica. Ademais, os modelos numéricos usados para as simulações são de certa forma simples em sua concepção.

## **I. 1. OBJETIVO**

O objetivo geral do presente trabalho é avaliar a técnica de transmissão axial ultrassônica na caracterização e acompanhamento da consolidação do calo ósseo após fratura, particularmente observando o efeito do grau de mineralização no espaço de fratura, usando-se para tal resultados de simulação e experimentos.

Como objetivos específicos, destacam-se:

- Realizar simulações da propagação do US em transmissão axial, em modelos numéricos mais complexos e realísticos de calos ósseos;
- Analisar o comportamento dos parâmetros “tempo de vôo” e “atenuação do sinal” de US frente às alterações estruturais e teciduais do calo ósseo;
- Realizar experimentos em transmissão axial em amostra de osso *in vitro*, avaliando o efeito de uma progressiva desmineralização em um modelo de fratura óssea no comportamento das variáveis ultrassônicas analisadas, com a posterior simulação numérica do desenho experimental.

## CAPÍTULO II

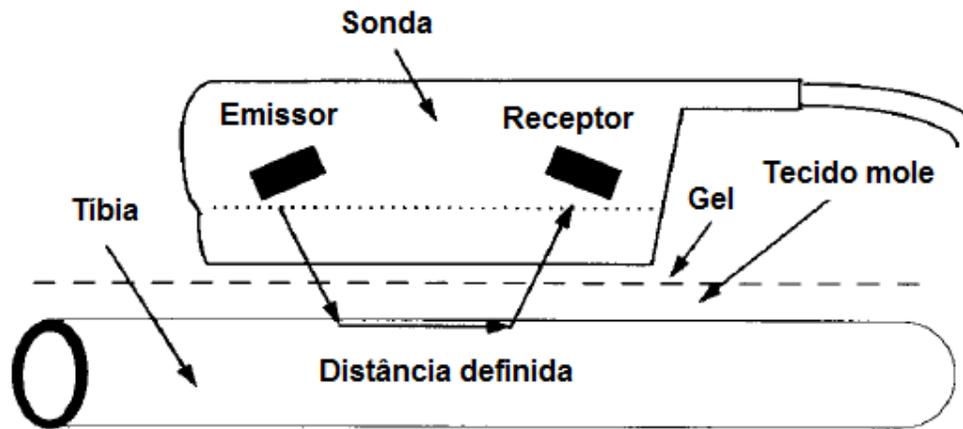
### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### II. 1. TRANSMISSÃO AXIAL ULTRASSÔNICA (TAU) NA AVALIAÇÃO DO OSSO CORTICAL

A onda de US consiste de um distúrbio mecânico que se propaga em um meio, seja ele gasoso, líquido ou sólido, com uma velocidade característica para cada meio. No caso dos tecidos biológicos, assume-se uma velocidade média de 1.540 m/s. As frequências utilizadas na Medicina variam entre 1 a 20 MHz [2-4].

A transmissão axial ultrassônica (TAU) é uma técnica que tem sido proposta para o diagnóstico da osteoporose [26] e, mais recentemente, para a avaliação e acompanhamento da regeneração óssea após fratura [43,44]. Consiste na utilização de transdutores dispostos linearmente, ao longo do eixo ósseo (emissores e receptores). O receptor capta o sinal provindo do emissor, após sua passagem ao longo do eixo. Após essa recepção, técnicas de processamento de sinais são utilizadas com o intuito de se extrair parâmetros quantitativos e posteriormente se caracterizar o meio [28].

O primeiro dispositivo comercialmente usado foi proposto por FOLDES *et al.* [27]. Nele, um pulso de 250 kHz foi aplicado na porção média da tíbia. Uma ilustração esquemática pode ser vista na figura II.1. Foram encontradas boas correlações entre a velocidade do US (SOS – *speed of sound*), medida ao longo do córtex e valores de densidade mineral óssea (DMO), medidas por densitometria óssea (DEXA – *dual-energy X-ray absorptiometry*).



**Figura II.1 – Ilustração esquemática da medida da velocidade do US ao longo de uma distância longitudinal fixa na camada cortical óssea. Adaptado de [27].**

Em 2000, CAMUS *et al.* [47] realizaram uma análise da TAU para a avaliação da condição esquelética, e concluíram que o estudo do campo refletido da interface fluido-sólido para uma onda esférica incidente prediz a existência de uma onda lateral (OL), propagando-se ao longo da superfície da amostra a uma velocidade próxima à longitudinal, além da onda direta refletida e outras. Foi apresentado como se encontrar a distância ideal para se captar o chamado primeiro sinal de chegada (FAS – *First Arriving Signal*), que seria a primeira elevação da amplitude do sinal em relação ao nível de ruído, representando a chegada da OL.

Continuando o estudo anterior, BOSSY *et al.* [48] realizaram simulações 2D (pulso de 1 MHz) para estudar a relação entre a velocidade do ultrassom e a espessura cortical. Foi demonstrado que, para placas espessas (espessura maior que o comprimento de onda longitudinal no osso) e para uma faixa de variação na distância entre os transdutores, o FAS corresponde a onda lateral. Para espessuras menores do que o comprimento de onda, a velocidade SOS diminui dependendo de alguns critérios

de detecção do FAS. E para placas muito finas (espessura menor do que 1/4 do comprimento de onda), a SOS tende à velocidade do modo  $S_0$  de Lamb.

Em outro estudo [26], os autores realizaram simulações 3D e focaram-se nos efeitos da geometria cortical (curvatura, espessura cortical), anisotropia e microporosidade nas medidas de SOS para diferentes frequências. Concluíram que a anisotropia tem um grande impacto nas medidas de SOS em função da espessura cortical. Ademais, a sensibilidade ao longo do eixo ósseo para a microporosidade intracortical foi de  $-20$  m/s por porcentagem de porosidade.

TATARINOV *et al.* [49] usaram *phantoms* de cilindros de diversos materiais (rigidez variada), com poros na camada superficial, em uma tentativa de modelar o eixo de ossos longos. Usando baixa frequência (100 kHz), pode-se avaliar a velocidade das ondas guiadas (ou ondas de Lamb, que são ondas elásticas que se propagam em uma placa elástica sólida de espessura finita, e surgem de múltiplas reflexões e conversão de ondas longitudinais e transversais da superfície superior e inferior da placa [50]), tendo similar dependência na espessura como a onda de Lamb antissimétrica zero. Em uma banda de frequência maior (500 – 1000 kHz), o FAS tinha a mesma velocidade que a longitudinal.

Em um estudo *in vitro* usando a tíbia, TA *et al.* [51] tentaram identificar e analisar a propagação das ondas guiadas. Uma simulação também foi realizada, com um modelo cilíndrico. Segundo os achados, o modo  $L(0,2)$  foi mais dispersivo para o produto frequência x distância de aproximadamente 1,5 MHz mm. Nessa região, o modo  $L(0,2)$  pareceu ser mais sensível às mudanças na espessura cortical, em comparação com os modos  $L(0,3)$  ou  $L(0,1)$ . Finalmente, as velocidades dos modos  $L(0,2)$  e  $L(0,3)$  obtiveram boas correlações com os valores de espessura cortical à 0,5 MHz.

Já em 2006, MOILANEN *et al.* [23], com experimentos em placas e técnicas de processamento de sinais, conseguiram identificar, de forma confiável, os diversos modos de onda. O mesmo grupo [24] ainda propôs o problema inverso: uso das ondas de Lamb na avaliação da espessura cortical em osso rádio humano *in vitro*. Foram encontradas fortes correlações ( $R^2 = 0,73$ ,  $p < 0,001$ ) com a espessura cortical média, e com a espessura cortical local ( $R^2 = 0,81$ ,  $p < 0,001$ ), medidas por tomografia computadorizada quantitativa. No mesmo ano, MOILANEN *et al.* [52,53] desenvolveram modelos ósseos numéricos 2D e 3D, e usaram-no para investigar o impacto de uma geometria óssea mais realística na avaliação da espessura cortical. Mostraram que as velocidades axiais de US de baixa frequência podem ser modeladas por uma teoria de placa simples com um erro aceitável.

Em 2008, MOILANEN *et al.* [54] modelaram o impacto dos tecidos moles nas medidas de transmissão axial em rádio humano. Com simulações e experimentos *in vivo*, verificaram que a presença de uma camada de poucos milímetros de tecido mole dificulta a identificação de modos de onda essenciais para a avaliação.

Mais recentemente, TALMANT *et al.* [28] relataram a primeira avaliação clínica da precisão, mudanças relacionadas a idade, e discriminação de fraturas *in vivo*, usando a técnica de TAU bi-direcional, que consiste no uso de dois emissores, um em cada ponta da sonda, que envia seus respectivos sinais que são captados pelos receptores que estão localizados entre aqueles. O método foi desenvolvido com o objetivo de compensar o erro causado pelas variações da espessura da camada cortical e de tecido mole. Usando o RMS (*root mean square*), os autores encontraram uma variação intraoperador de 15 m/s, e interoperador de 20 m/s, para medidas que apresentaram valores de 3.821 a 4.110 m/s. Além disso, a velocidade do FAS, medida com o

dispositivo a 1 MHz, mostrou ser um bom indicador da condição óssea, tão eficiente quanto a DEXA para discriminação de fraturas.

NAILI *et al.* [55] avaliaram o efeito da absorção acústica heterogênea no tecido ósseo e no tecido mole na resposta ultrassônica em transmissão axial. Usando um modelo bidimensional em simulações numéricas, eles observaram que as propriedades viscoelásticas do osso têm um efeito significativo na velocidade do FAS, enquanto que os tecidos moles não alteraram os resultados.

## II. 2. TAU NA AVALIAÇÃO DO CALO ÓSSEO

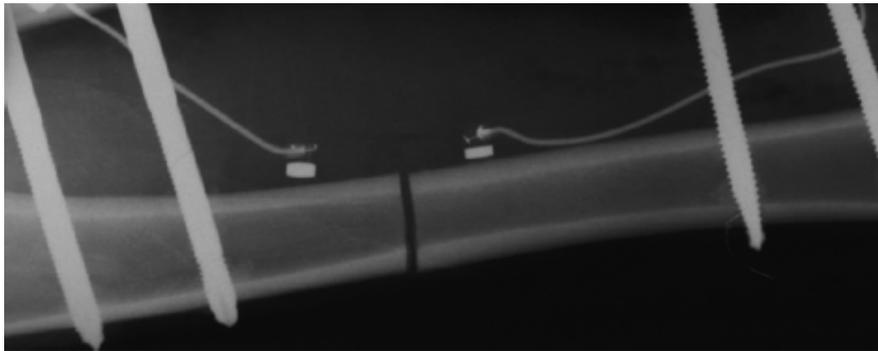
Um importante trabalho foi desenvolvido por LOWET e VAN DER PERRE em 1996 [56], ao apresentar a medida da SOS em ossos longos e em fraturas, usando um *phantom* composto de barras com um espaço entre elas. Mostraram que o tempo de propagação da onda aumentava ao passar pela fratura, além de ser diretamente proporcional ao comprimento desse espaço.

A partir daí, diversos estudos foram realizados, na tentativa de se mostrar a viabilidade da TAU na avaliação da fratura [43].

Nos últimos anos, dois grupos têm se destacado:

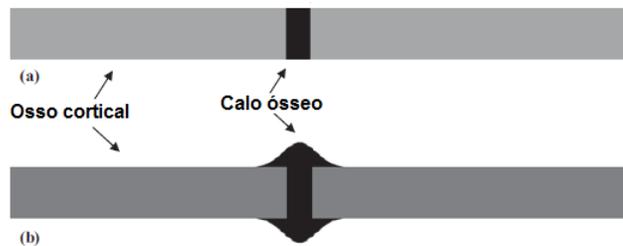
O primeiro deles (PROTOPAPPAS *et al.* [38]; MALIZOS *et al.* [57]) desenvolveu um sistema no qual dois transdutores foram implantados, um em cada fragmento do osso fraturado, em um modelo animal. Os transdutores foram usados tanto para tratamento da fratura com ondas pulsadas de US, como para a avaliação em TAU. Na figura II.2 é mostrada uma radiografia do dispositivo. Foi encontrada uma correlação de 0,74 entre a velocidade (SOS) do faz e o módulo de Young do calo. Ademais, foi observado que, após a fratura, o SOS caiu drasticamente, subindo

lentamente durante o processo de recuperação do calo. Já em casos de não-união (ou pseudoartrose), o SOS não alcançava valores normais.



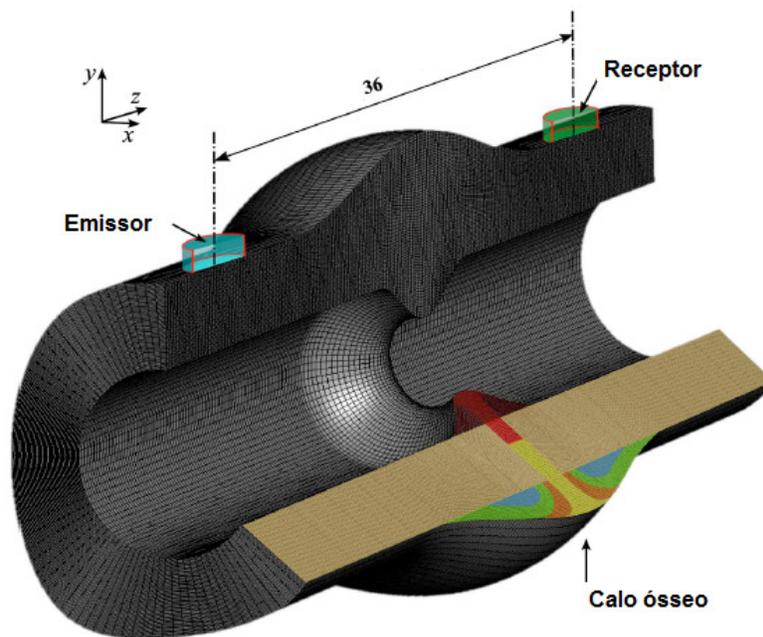
**Figura II.2 – Radiografia mostrando os transdutores implantados em um osso fraturado, usados para estimulação óssea e avaliação em TAU [38].**

Em 2006, o grupo lança mão das simulações, inicialmente em 2D, para estudar a propagação do FAS e das ondas guiadas no osso intacto e após fratura [40]. Um modelo numérico bem simples foi utilizado, onde o calo ósseo foi modelado como um processo de 7 estágios de consolidação (figura II.3), com módulos de Young e Poisson variáveis, de acordo com a etapa de regeneração. Ao realizar as simulações (por elementos finitos) em TAU (em 500 e 1000 kHz), observaram basicamente que: (1) SOS cai drasticamente após o evento da fratura, e retorna ao valor normal à medida que o calo se consolida; (2) a geometria do calo não afeta a SOS; e (3) a variação na geometria do calo altera as curvas de dispersão das ondas.



**Figura II.3 – Modelo numérico 2D usado: (a) com calo ósseo sem geometria, e (b) com geometria. Adaptado de [40].**

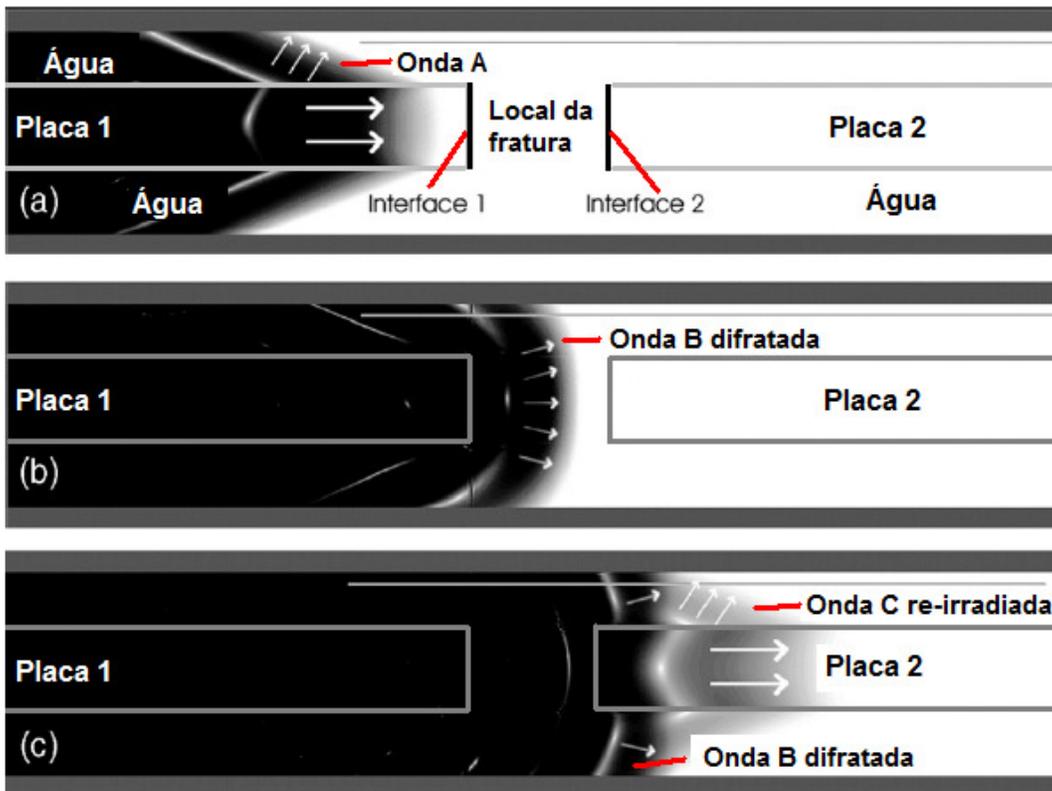
Já em 2007, o grupo elabora um modelo um pouco mais complexo, em 3D, onde o calo ósseo é modelado como uma estrutura composta de seis tipos diferentes de tecido. A regeneração é modelada como um processo de 3 estágios (figura II.4). As mesmas conclusões são tiradas com a avaliação em TAU [41]. VAVVA *et al.* [42] incorporam diferentes condições de contorno no modelo, mostrando que o tecido ao redor da placa óssea não interfere na propagação do FAS, porém afeta os modos de onda de Lamb.



**Figura II.4 – Modelo numérico 3D usado. Adaptado de [41].**

Um outro grupo vem publicando resultados interessantes a respeito da TAU em calos ósseos. DODD *et al.*, em 2007 [45], realizaram um estudo *in vitro* com osso bovino e *phantoms*, e mostraram que a atenuação da energia do FAS, medida com o parâmetro SPL (*Sound Pressure Level*, em dB), aumenta a medida em que o espaço de fratura aumenta. Usando simulações 2D, explicaram o fenômeno, ilustrado na figura II.5. Na figura II.5a, a onda lateral, propagando-se da esquerda para a direita, se

aproxima da interface 1 do local da fratura (onda A). Ao alcançar a interface 1, observa-se um fenômeno de espalhamento/difração da onda (onda B, figura II.5b). Subsequentemente, um pouco da energia da onda se acopla a placa 2, e uma segunda onda lateral irradia novamente para a água (onda C). Uma vez que as simulações não levam em consideração a absorção, os autores afirmaram que a atenuação do FAS seria extremamente dependente de dois fatores: descasamento de impedância entre os dois meios (osso – fratura) e o aumento da distância entre as duas placas.



**Figura II.5 – Desenho ilustrando o fenômeno de espalhamento/difração da onda lateral ao alcançar o local de fratura: (a) a onda A se propaga em direção à fratura, na placa 1; (b) a onda A é espalhada/difratada na interface osso – fratura, dando origem a onda B; (c) a onda B se acopla na placa 2, dando origem a onda C, de menor energia. Adaptado de [45].**

O mesmo grupo verificou a influência da geometria do calo, espessura da placa e frequência do pulso nas estimativas de tempo de voo (TOF – *Time-of-flight*) e atenuação (medida pelo SPL – *Sound Pressure Level*) [40], chegando a conclusões similares de estudos anteriores. Em 2008, desenvolveram um estudo *in vitro*, dessa vez sobre o efeito das fraturas oblíquas, e observaram que, para essas fraturas, o atraso no TOF é maior em relação às fraturas transversas, principalmente considerando pequenos espaços de fratura (1 a 2 mm). Os resultados sugeriram também que a presença de medula óssea não afeta significativamente as medições, tanto de TOF como de SPL [44].

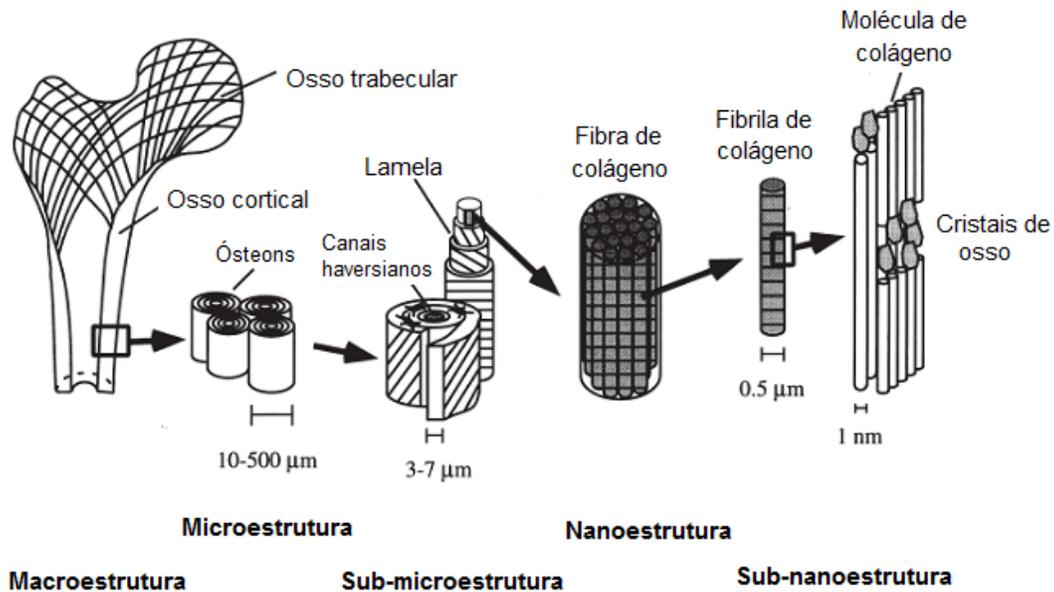
## **CAPÍTULO III**

### **O TECIDO ÓSSEO E A RECUPERAÇÃO PÓS-FRATURA**

Nesse capítulo, serão abordados dois tópicos principais: (1) o tecido ósseo normal; e (2) o processo de recuperação de fraturas (o calo ósseo), juntamente com as ferramentas que se têm atualmente (ou que estão ainda em nível de pesquisa) para o diagnóstico e acompanhamento do tecido cicatricial.

#### **III. 1. O TECIDO ÓSSEO NORMAL**

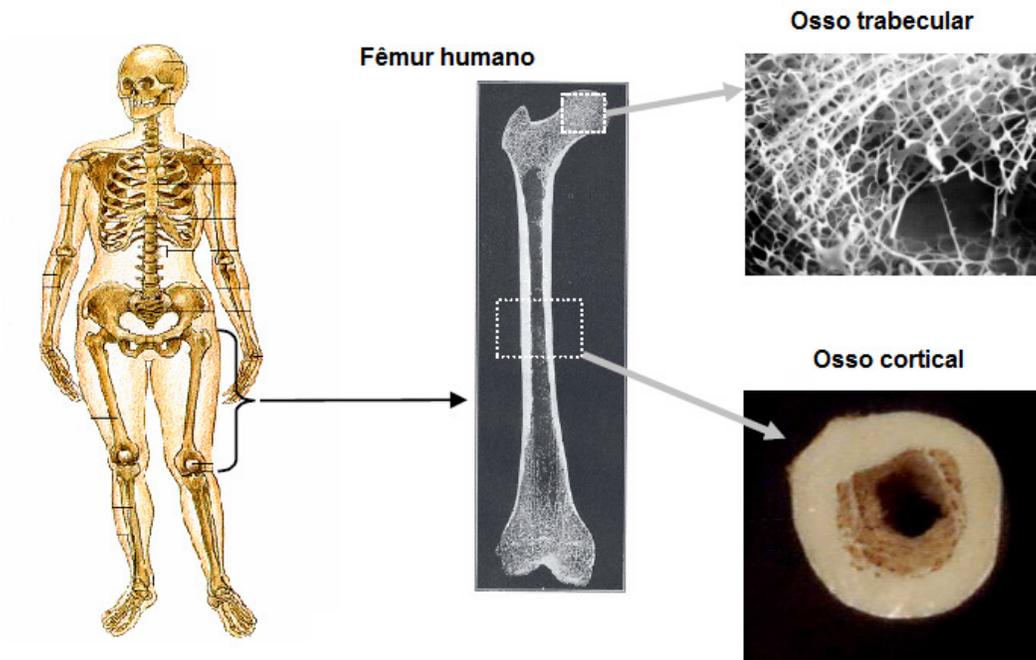
O tecido ósseo possui um arranjo variado de estruturas, que realiza diversas funções mecânicas, biológicas e químicas. Segundo RHO *et al.* [58], essas estruturas podem ser divididas em níveis de organização: (1) a macroestrutura: osso cortical e trabecular; (2) a microestrutura (de 10 a 500  $\mu\text{m}$ ): sistemas Haversianos, osteons, a trabécula; (3) a sub-microestrutura (de 1 a 10  $\mu\text{m}$ ): a lamela óssea; (4) a nanoestrutura (de 100 nm a 1  $\mu\text{m}$ ): fibras colágenas e minerais incrustados; e finalmente (5) a sub-nanoestrutura (menos de 100 nm): estrutura molecular dos elementos constituintes ósseos, como minerais, colágeno, e proteínas orgânicas não-colagenosas (figura III.1).



**Figura III.1 – Organização estrutural do osso. Adaptado de RHO *et al.* [58].**

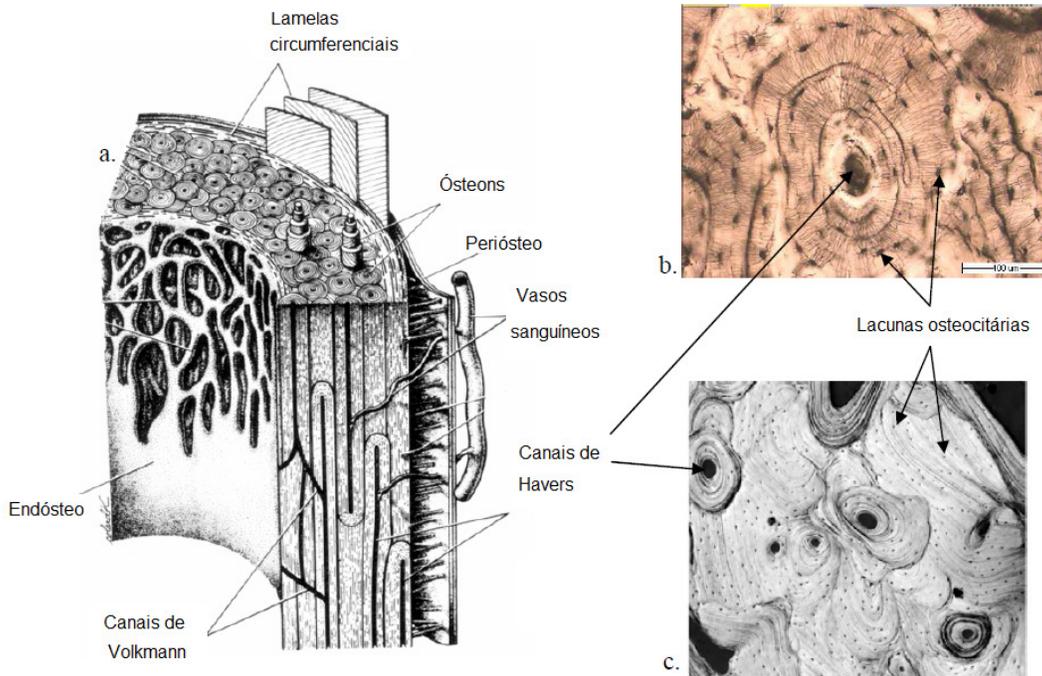
O osso é composto de uma matriz orgânica que é reforçada por um depósito de sais de cálcio. O colágeno tipo I constitui aproximadamente 95% da matriz orgânica; os outros 5% são compostos por proteoglicanas e numerosas proteínas não-colágenas. Os sais cristalinos depositados na matriz orgânica sob controle celular são primariamente o cálcio e o fosfato na forma de hidroxiapatita (HA) [59].

Morfologicamente, há duas formas de osso: o cortical (compacto) ou trabecular (esponjoso) [59,60]. No osso cortical, fibrilas de colágeno reunidas densamente formam lamelas concêntricas, e as fibrilas adjacentes percorrem perpendicularmente como em um tronco de árvore. Já o osso trabecular possui uma estrutura porosa heterogênea. Basicamente, o osso cortical provê funções de proteção e mecânicas, enquanto o trabecular fornece também funções metabólicas (figura III.2).



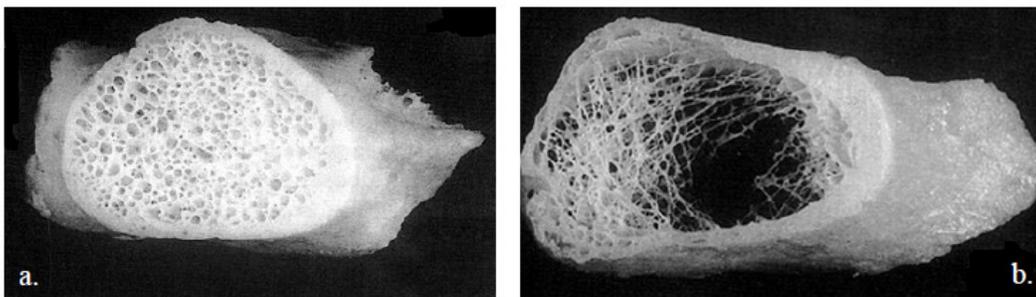
**Figura III.2 – O osso cortical e trabecular. Adaptado de BOSSY [61].**

Em uma abordagem microscópica, o osso cortical se apresenta na forma de um sólido denso. Uma observação à escala de centenas de micra revela uma arquitetura organizada em volta de um elemento estruturante de base, o ósteon ou sistema haversiano. O ósteon se apresenta na forma de um longo cilindro estreito de comprimento da ordem de 10 mm, cujo diâmetro fica entre 100 e 300  $\mu\text{m}$ . Cada ósteon é composto de um canal haversiano central, envolvido por uma série de lamelas concêntricas de matriz óssea, contendo nervos e vasos capilares sanguíneos. O diâmetro dos canais de Havers é da ordem de 50  $\mu\text{m}$ . Os canais de Volkmann conectam, de uma parte, os canais de Havers entre eles, e de outra parte os canais de Havers com as interfaces de osso cortical. Entre as lamelas concêntricas se encontram cavidades onde estão as células (lacunas osteocitárias) de diâmetro de mais ou menos 10 à 20  $\mu\text{m}$ , interconectadas pelas canalículas (figura III.3) [61].

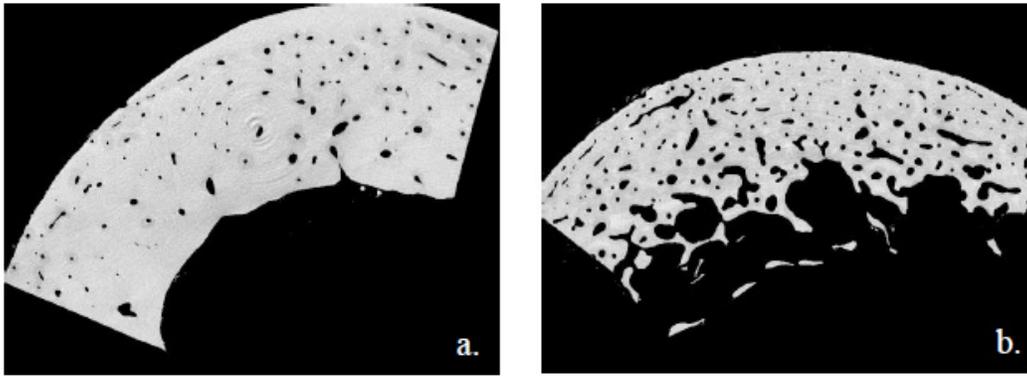


**Figura III.3 – Estrutura do osso cortical: (a) conjunto compacto de ósteons; (b) corte histológico demonstrando a estrutura lamelar concêntrica; e (c) imagem de microscopia acústica à 400 MHz. Adaptado de [61].**

As figuras III.4 e III.5 mostram o osso trabecular e cortical, respectivamente, normal e osteoporótico. A redução na massa óssea é visível, levando a uma diminuição da espessura cortical e também uma redução da quantidade de poros do osso esponjoso.



**Figura III.4 – Osso trabecular de uma mulher com (a) 23 anos e (b) 82 anos [61].**

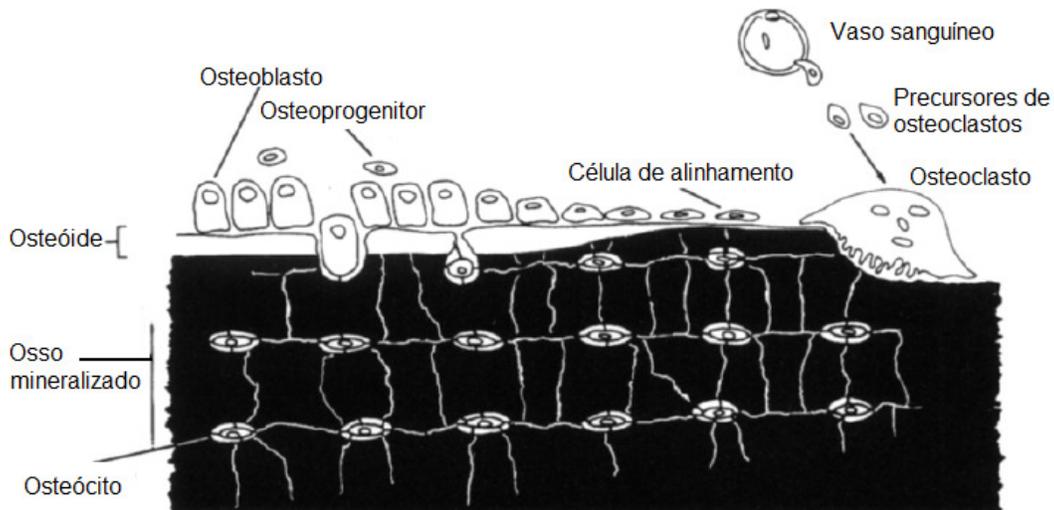


**Figura III.5 – Osso trabecular de uma mulher com (a) 55 anos e (b) 90 anos.**

**Imagens obtidas por microtomografia computadorizada [61].**

Quatro diferentes tipos celulares compõem o osso: osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e células de alinhamento ósseas. Osteoblastos, osteócitos e células de alinhamento são originadas de células osteoprogenitoras, enquanto que osteoclastos surgem da fusão de precursores de células mononucleares, que originam vários tipos de tecido hematopoiéticos [59].

Na figura III.6, observam-se os tipos celulares ósseos. Osteoblastos são responsáveis pela produção de matriz óssea. O osteócito é uma célula madura, dentro da matriz, e é responsável pela manutenção do tecido. As células de alinhamento são alongadas, achatadas e inativas, que cobrem as superfícies ósseas que estão sem atividade (nem em formação, nem em reabsorção). Já os osteoclastos são células grandes e multinucleares, permanecendo ativas, diretamente na superfície do tecido ósseo [59].



**Figura III.6 – Os tipos celulares do tecido ósseo. Adaptado de [59].**

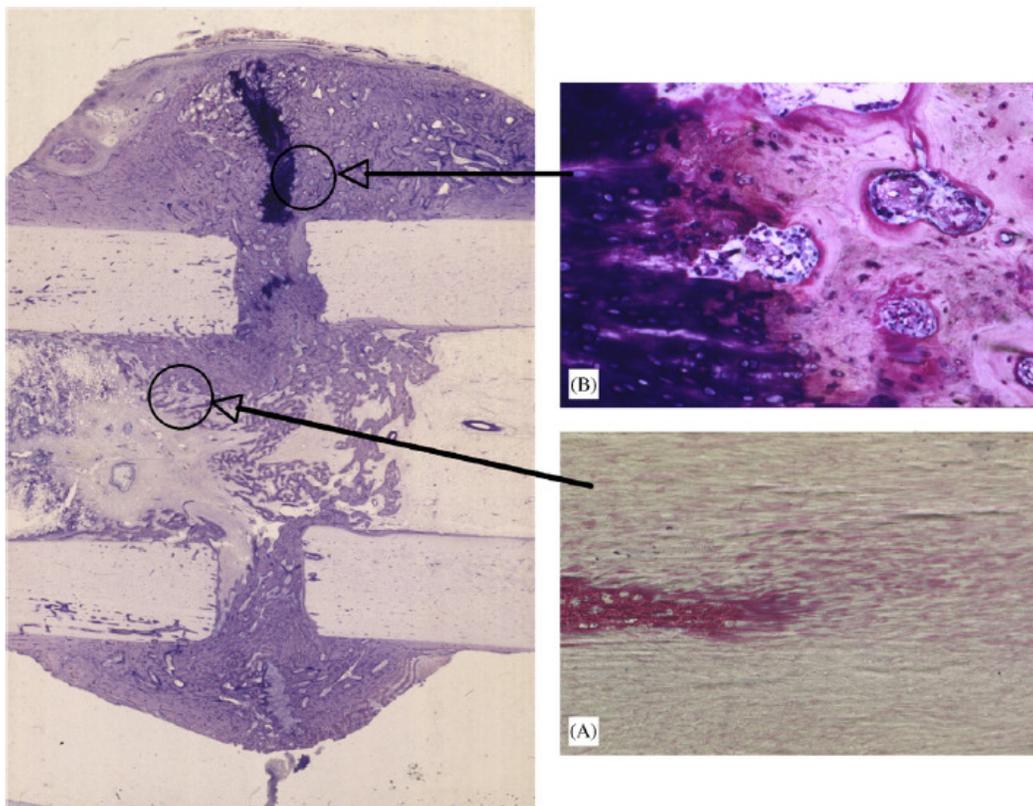
### **III. 2. A CONSOLIDAÇÃO ÓSSEA PÓS-FRATURA**

Após uma fratura, todo o complexo sistema ósseo sofre um desarranjo. O processo de recuperação é bem-orquestrado, resultando em um reparo e restauração da função do osso. Phillips [62] divide a resolução de fraturas em cinco fases temporais: formação de hematoma, inflamação, angiogênese, formação de cartilagem (com subsequente calcificação, remoção da cartilagem e então formação de osso) e remodelação óssea.

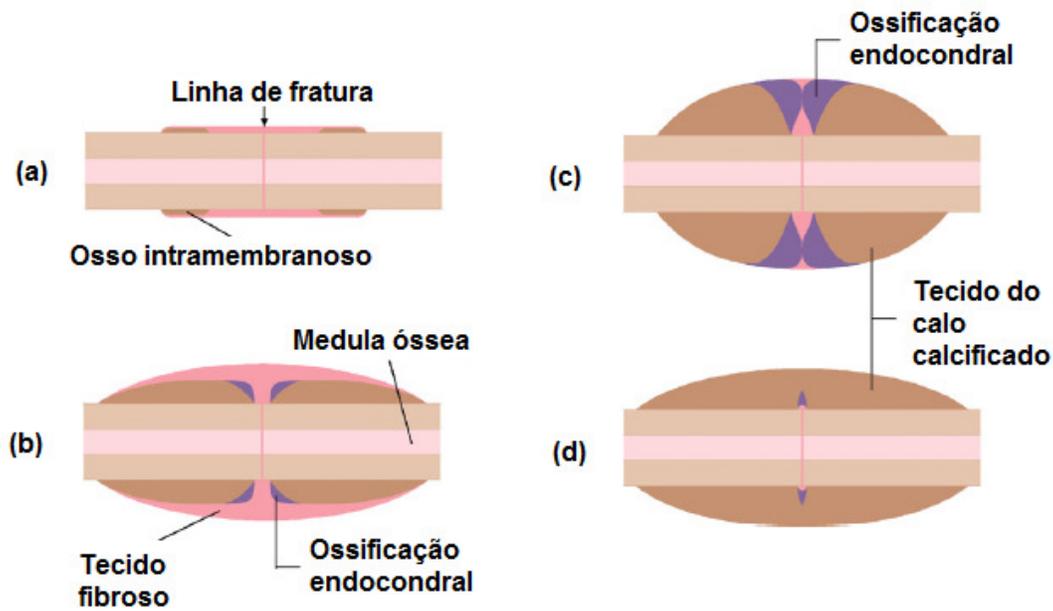
Alguns fatores podem atrasar ou mesmo impedir a união dos fragmentos ósseos, como a severidade e a localização da fratura, a natureza do suprimento sanguíneo para o osso, a extensão da lesão em tecidos moles, perda óssea, contato com o ar e contaminação, ou mesmo presença de tumor. Outros fatores sistêmicos podem estar envolvidos, como alcoolismo, fumo, idade e diabetes [63].

A cura da fratura pode ser também dividida em direta (ou primária) e indireta (ou secundária): (1) a direta, que ocorre quando há redução anatômica dos fragmentos

por fixação interna ou por uma tensão interdiafragmática diminuída. Envolve uma tentativa direta do córtex de reestabelecer novos sistemas haversianos pela formação de discretas unidades de remodelagem, os cones de corte, no intuito de restaurar a continuidade mecânica. Não há a formação de calo ósseo; (2) a indireta, que envolve uma combinação de ossificação intramembranosa (formação direta de osso, sem uma base cartilaginosa) e endocondral (recrutamento, proliferação e diferenciação de células mesenquimais (MSCs) em cartilagem, que se calcifica e eventualmente é substituída por osso) [64]. A Figura III.7 mostra um corte histológico com os dois tipos de ossificação, e a figura III.8 é um esquema ilustrando o processo de ossificação intramembranosa e endocondral.



**Figura III.7 – Análise histológica do calo ósseo: (a) formação óssea intramembranosa; e (b) endocondral, transformando tecido cartilaginoso em tecido ósseo [65].**



**Figura III.8 – As fases da formação do calo em uma fratura: (a) após um trauma surge o hematoma, e a ossificação intramembranosa se inicia; (b) aumenta em diâmetro e em comprimento, e mostra os primeiros sinais de ossificação endocondral; (c) o calo cresce principalmente por ossificação endocondral em direção a linha de fratura; e (d) cria a ponte de ligação na periferia. Adaptado de [65].**

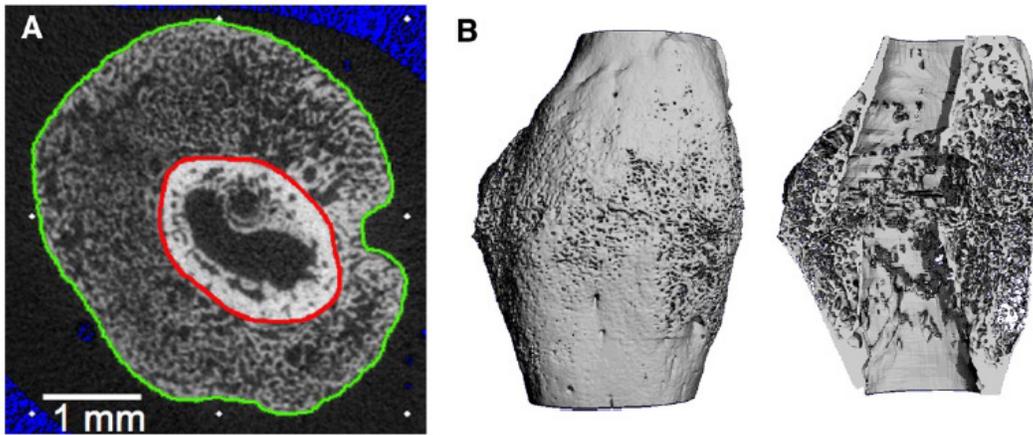
Todas as fases de recuperação necessitam das chamadas “moléculas sinalizadoras”, que regulam a atividade e diferenciação das diversas células envolvidas [66,67]. Essas moléculas, segundo Phillips [62] e Dimitriou *et al.* [64], basicamente são o fator de crescimento de transformação beta (*transforming growth factor*  $\beta$  – TGF $\beta$ ), proteínas morfogenéticas ósseas (*bone morphogenetic proteins* – BMPs), fator de crescimento de fibroblasto (*fibroblast growth factor* – FGF), fator de crescimento semelhante a insulina (*insulin like growth factor* – IGF), fator de crescimento derivado de plaqueta (*platelet-derived growth factor* – PDGF), citocinas (*interleukin-1*, ou IL-1, IL-6, *tumour necrosis factor-alpha* – TNF $\alpha$ ), metaloproteinases, fator de crescimento

endotelial vascular (*vascular-endothelial growth factor* – VEGF), e angiopoietina (1 e 2).

Além da necessidade da presença de todas essas moléculas, há ainda um fator importante na resolução de fraturas, estudado por CARTER *et al.* [68] com elementos finitos: a mecanobiologia da regeneração óssea. A formação óssea ocorre em áreas de baixa a moderada tensão elástica, o tecido fibroso é produzido em áreas de moderada a alta tensão elástica, e a condrogênese é promovida em áreas de estresse por compressão hidrostática (pressão).

Várias técnicas de avaliação têm sido propostas para o diagnóstico e acompanhamento da regeneração óssea. Por exemplo, as radiografias são usadas para dar informações qualitativas sobre a linha de fratura e observar a união dos fragmentos ósseos, ou mesmo quantificar parâmetros da geometria, porém é incapaz de prever a rigidez do calo [34,69]. Um microscópio acústico de alta resolução foi aplicado em ovelhas, obtendo alta acurácia em prever a força de fratura [70]. Finalmente, estudos com microtomografia computadorizada ( $\mu$ CT) têm sido muito explorada, p. ex., na avaliação de tratamentos baseados em US [36], usando uma análise de limiar, e na predição de propriedades mecânicas do calo, usando medidas derivadas da  $\mu$ CT [34,71-73].

Mais recentemente, MORGAN *et al.* [37] conseguiram mostrar que, com alguns parâmetros extraídos das imagens de  $\mu$ CT, como densidade mineral total, volume ósseo e variação da densidade no calo, consegue-se explicar significativamente ( $p < 0,001$ ) até 70% da variação na força e rigidez torsional. Figura III.9 mostra um exemplo de imagem produzida pelos autores, usando um limiar de 25% do valor de cinza máximo (correspondente a uma densidade de  $641,9 \text{ mgHA/cm}^3$ ) para a sua segmentação, com o objetivo de separar o tecido mineralizado do não (ou pouco) mineralizado.



**Figura III.9 – (a) Processo de segmentação, definindo a borda externa (verde) e a superfície do periósteo do córtex (vermelho); (b) imagem 3D do volume de interesse estudado [37].**

# CAPÍTULO IV

## FUNDAMENTOS TEÓRICOS DA TRANSMISSÃO AXIAL ULTRASSÔNICA

Nesse capítulo, serão abordados os princípios teóricos da propagação da onda de ultrassom em transmissão axial. Detalhes sobre as propriedades elásticas dos sólidos estão expostos em anexo, segundo AULD [74].

A transmissão axial ultrassônica (TAU) usa um conjunto de transdutores, um agindo como o emissor, e os outros agindo como receptores. Basicamente, os transdutores são colocados em um arranjo linear, ao longo do eixo ósseo a ser analisado. A partir daí, o receptor capta o sinal que trafega na interface fluido-osso, e parâmetros como a velocidade da onda e a atenuação do sinal podem ser estimados. A seguir, uma explicação mais detalhada do fenômeno, usando como referências os trabalhos de CAMUS *et al.* [47], BOSSY *et al.* [48] e BOSSY [61].

A figura IV.1 ilustra a propagação de uma onda esférica do fluido (meio 1) em direção ao sólido (meio 2), com  $c_1 < c_2$ , e a conseqüente formação da chamada onda lateral (OL). Pode-se determinar um ângulo crítico  $\theta_c$  tal que

$$\text{sen}(\theta_c) = \frac{c_1}{c_2} \tag{IV.1}$$

Quando a onda se impacta com a interface, ela dá origem a uma onda refletida e uma onda refratada (figura IV.1a). Enquanto o ângulo de incidência  $\theta_I$  é menor do que  $\theta_c$ , o ponto *I* que conecta a onda direta a onda refletida também conecta eles com a

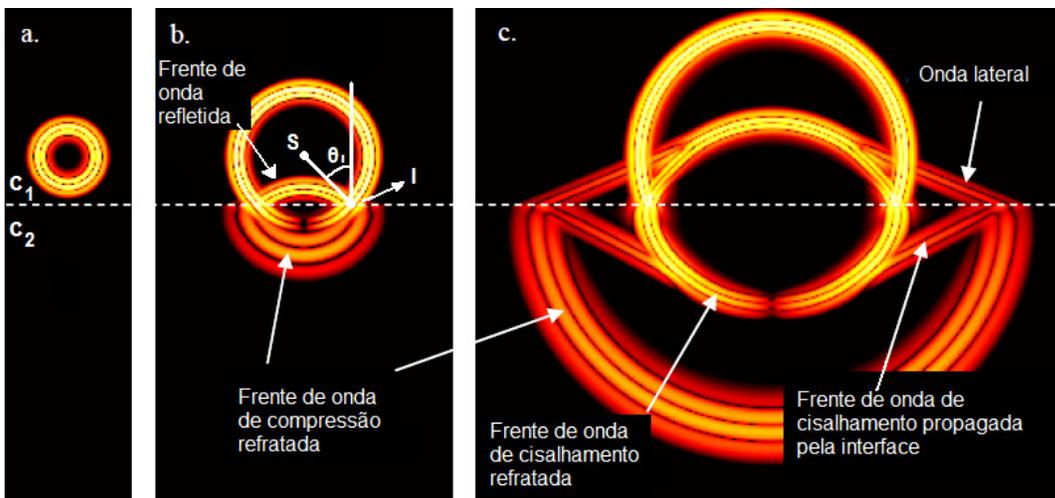
frente de onda refratada. A medida que o tempo passa, o ponto  $I$  se move ao longo da interface com velocidade definida por

$$v(I) = \frac{c_1}{\text{sen}(\theta_I)} \quad (\text{IV.2})$$

com  $v(I) > c_2$ . Quando  $\theta_I > \theta_c$ ,  $v(I)$  se torna menor do que  $c_2$ . Com isso, o ponto  $I$  não conecta mais a onda refratada a onda refletida. A onda que liga a onda refratada a onda refletida ganha o nome de onda lateral, OL (figura IV.1c), e se propaga com velocidade

$v_{lateral}$ :

$$v_{lateral} = \frac{c_1}{\text{sen}(\theta_c)} = c_2 \quad (\text{IV.3})$$



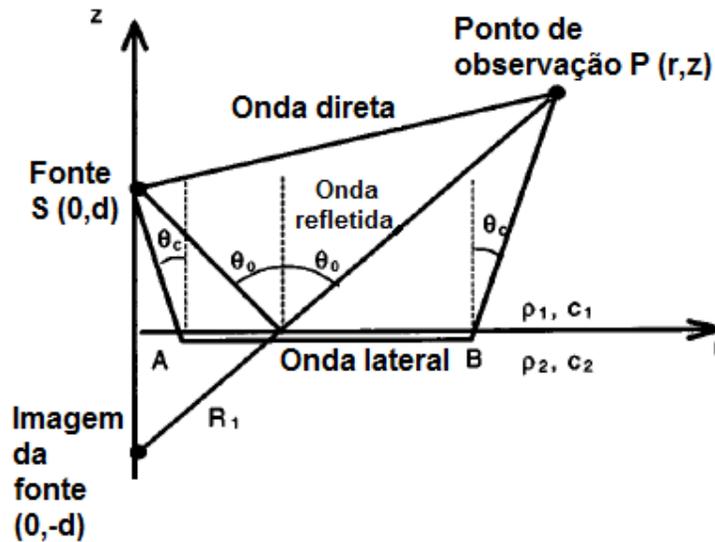
**Figura IV.1 – (a) onda esférica produzida no meio 1, fluido, indo em direção ao meio 2 (sólido); (b) ao tocar a interface, produz frentes de onda de compressão refratada e refletida. O ponto  $I$  conecta essas frentes, e forma com o centro  $S$  o ângulo de incidência  $\theta_I$ ; (c) quando  $\theta_I > \theta_c$ , forma-se a onda lateral. Adaptado de**

[61].

Considerando a figura IV.2, a pressão  $P_{lateral}$  correspondente a OL é

$$P_{lateral} = 2i \frac{c_1}{c_2} \left[ k_1 \frac{\rho_2}{\rho_1} \left( 1 - \frac{c_1^2}{c_2^2} \right) \sqrt{r} \left[ r - (z+d) \tan \theta_c \right]^{3/2} \right]^{-1} \times e^{ik_1(SA+BP+[c_1/c_2]AB)} \quad (IV.4)$$

onde  $SA$  é a distância entre a fonte  $S$  e o ponto  $A$ ,  $BP$  é a distância entre o ponto  $B$  e o ponto de observação  $P$ ,  $AB$  é a distância entre os pontos  $A$  e  $B$  ao longo da interface,  $\rho_1$  e  $\rho_2$  são as densidades dos meios 1 e 2, respectivamente;  $k$  é o número de onda;  $r$  é a distância entre o transmissor e o receptor ao longo da interface (também chamado de alcance);  $d$  e  $z$  são as distâncias, respectivamente, da fonte e do ponto de observação, até a interface. A OL é excitada a um ângulo crítico ( $SA$ ), se propaga ao longo da interface ( $AB$ ) com uma velocidade longitudinal  $c_2$  e irradia de volta para o meio 1 a um ângulo crítico  $BP$ .



**Figura IV.2 – Representações da onda direta, refletida e lateral. Adaptado de [47].**

A OL é observável somente de ou além de um ponto crítico que está localizado a um alcance crítico  $r_c$ , dado por

$$r_c = (z + d) \tan (\theta_c) \quad (IV.5)$$

As equações dos tempos de chegada das ondas direta ( $t_{OD}$ ), refletida ( $t_{OR}$ ) e lateral ( $t_{OL}$ ), são

$$t_{OD} = \frac{[r^2 + (z-d)^2]^{1/2}}{c_1} \quad (IV.6)$$

$$t_{OR} = \frac{[r^2 + (z+d)^2]^{1/2}}{c_1} \quad (IV.7)$$

$$t_{OL} = \frac{r}{c_2} + \frac{(z+d)}{c_1} \left(1 - \frac{c_1^2}{c_2^2}\right)^{1/2} \quad (IV.8)$$

Pode ser mostrado que a OL sempre chega antes da OD somente para valores de  $r$  maiores que um  $r_{min}$  definido por

$$r_{min} = (1 - \psi^2)^{-1/2} [\psi(z+d) + 2(zd)^{1/2}] \quad (IV.9)$$

onde  $\psi = c_1/c_2$ . A Figura IV.3 mostra um gráfico dos tempos de chegada da OD, OR e OL, para uma interface fluido sólido, considerando  $c_1 = 1490$  m/s e  $c_2 = 2680$  m/s.

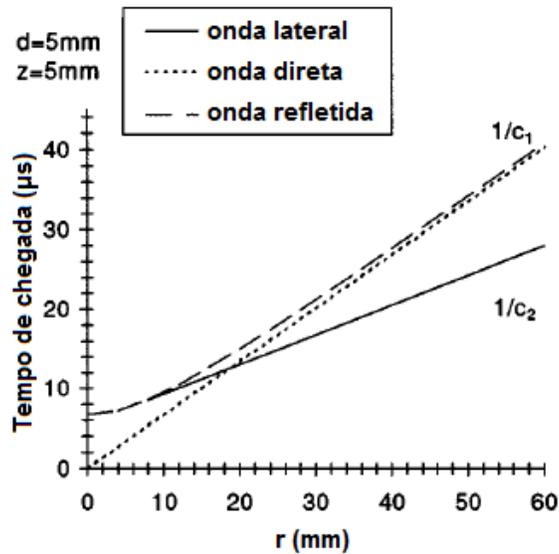


Figura IV.3 – Tempos de chegada teóricos para a OD, OR e OL, considerando  $c_1 = 1490$  m/s e  $c_2 = 2680$  m/s. Adaptado de [47].

Uma extensão do problema foi estudada por BOSSY *et al.* [48]. Considerando dessa vez uma placa sólida infinita imersa em água (água – osso – água). A figura IV.4 demonstra a situação. Agora, é necessário considerar o caminho  $AB'JC'D$ , que envolve apenas ondas longitudinais, e corresponde a uma única reflexão no fundo da placa. Esse trajeto é o mais rápido dentro da placa da fonte ao receptor. Para um dado receptor a uma distância  $r$  da fonte, o ângulo de incidência  $\theta$  de uma onda que segue o trajeto  $AB'JC'D$  e o tempo de vôo (TOF) associado  $t_{AB'JC'D}$  verificam as seguintes equações, que podem ser resolvidas numericamente:

$$t_{AB'JC'D} = \frac{2d}{c_1} \times \frac{1}{\cos(\theta_c)} + \frac{2e}{c_2} \times \frac{1}{\sqrt{1 - \left(\frac{\sin(\theta)}{\sin(\theta_c)}\right)^2}} \quad (IV.10)$$

$$r = 2d \tan(\theta) + 2e \frac{\sin(\theta)}{\sin(\theta_c)} \times \frac{1}{\sqrt{1 - \left(\frac{\sin(\theta)}{\sin(\theta_c)}\right)^2}} \quad (IV.11)$$

onde  $e$  é a espessura da placa de osso.

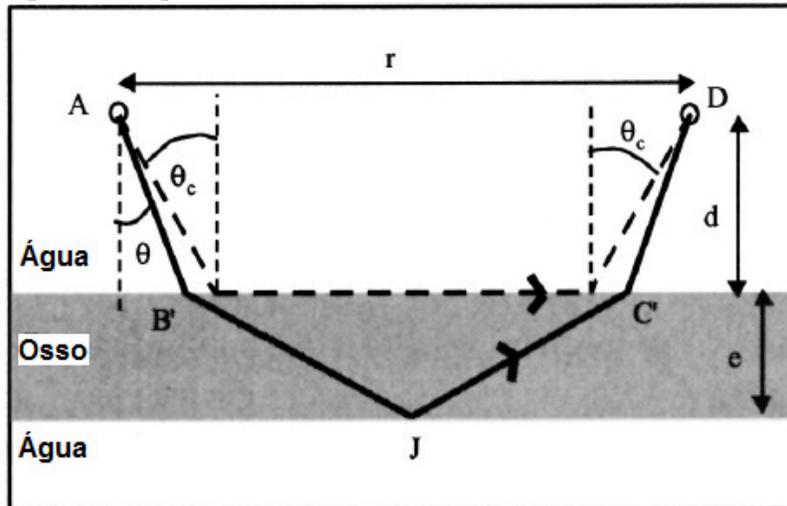


Figura IV.4 – Trajetos da OL e da onda refletida do fundo da placa. Adaptado de [48].

A diferença  $t_{AB'JC'D} - t_{OL}$  depende da distância  $r$  e da espessura  $e$ . Para placas espessas o suficiente (tipicamente  $e > \lambda$ ), a velocidade da OL é independente de  $e$ , para

diversas distâncias  $r$  e vários critérios de detecção da onda. Para placas mais finas (tipicamente  $e \leq \lambda$ ), o padrão da variação da SOS da OL depende do critério de detecção e da distância  $r$ . No entanto, para placas muito finas (tipicamente  $e \leq \lambda/8$ ), e para um critério de detecção de onda independente da amplitude, a SOS se aproxima da velocidade do modo  $S_0$  de Lamb. Segundo BOSSY *et al.* [48], no caso do osso, para espessuras  $e < \lambda/4$ , uma abordagem com ondas de Lamb se faz necessária.

# CAPÍTULO V

## MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo, a metodologia para os estudos de simulação (programa utilizado, modelos numéricos, parâmetros ultrassônicos) e experimento *in vitro* (amostra de osso, dispositivo ultrassônico de transmissão axial, processamento de sinais) será exposta.

### V.1. SIMULAÇÕES NUMÉRICAS COM MODELOS DE REGENERAÇÃO ÓSSEA

#### V. 1. 1. Implementação dos modelos de calos ósseos

Apesar de algumas desvantagens das simulações (necessidade de validação experimental, seleção de um modelo adequado, memória e tempo computacional necessários, etc.), o poder dos métodos computacionais na pesquisa em ultrassom, principalmente aplicados ao osso, têm sido indicado por diversos pesquisadores [75].

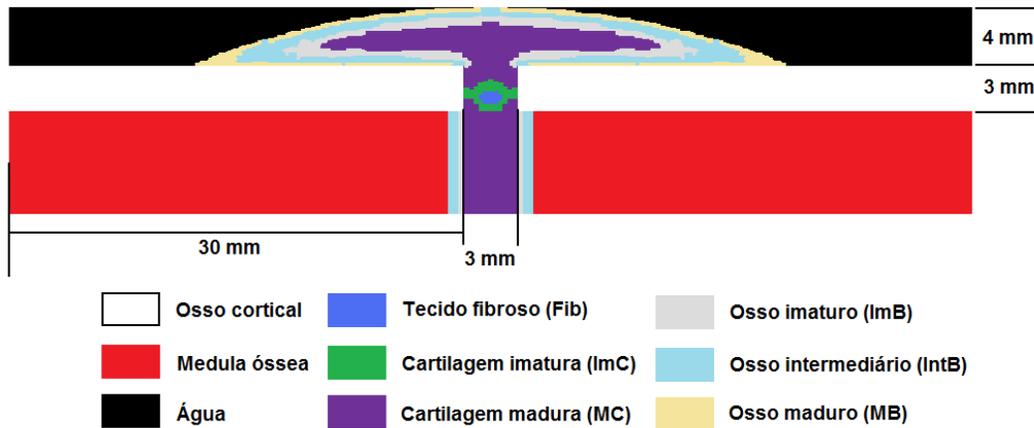
Diversos trabalhos de simulação já trataram da regeneração óssea após fratura, usando diferentes algoritmos [76-85]. Em um deles [81], foram comparadas as habilidades de vários algoritmos de regulação mecânica em descrever a regeneração óssea normal com simulações em 2D, com elementos finitos. Os algoritmos foram: M1 (CARTER *et al.* [68]), M2 (CLAES e HEIGELE [85]), e M3 (LACROIX e PRENDERGAST [83]). Este último também foi aplicado pelos autores usando apenas um estímulo mecânico no calo ósseo: a deformação desviatória (*deviatoric strain* – M4).

O modelo M1 [68] foi baseado na idéia de que altas forças compressivas hidrostáticas têm uma correlação com a condrogênese (formação de cartilagem) e forças mais baixas possuem uma correlação com a osteogênese (formação de osso). Contudo, existiria uma inibição da condrogênese e osteogênese com alta deformação principal. Já em M2 [85], assume-se que a formação de novo osso ocorre nas frentes de osso já existente ou tecido calcificado, e as magnitudes de força e deformação local regulam o tipo de cicatrização óssea, ou seja, intramembranosa ou endocondral.

A hipótese de M3 [83] já indica que uma mecano-regulação da diferenciação do tecido seria guiada por dois estímulos biofísicos: a deformação desviatória e o fluxo de fluidos intersticiais, uma vez que a força e deformação nas células são maiores pelo fluxo de fluido do que pela força do material colagenoso. Este modelo foi capaz de prever a diferenciação tecidual em implantes ósseos.

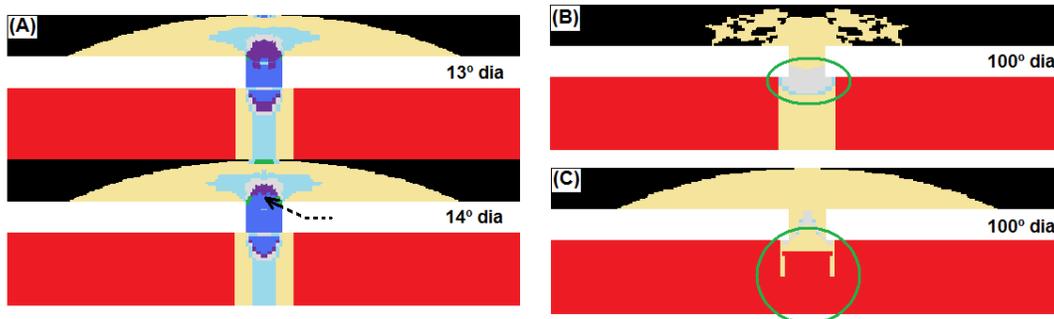
Portanto, para o presente trabalho, foram usados os quatro modelos acima. Os algoritmos foram previamente processados no trabalho de ISAKSSON *et al.* [81], que predisseram a diferenciação tissular durante um regime de carga variável (100 a 600 N, de acordo com o movimento interfragmentário do calo) para simular condições experimentais *in vivo*. Os arquivos contendo as simulações (formato .avi) estão disponíveis na Internet como dados adicionais suplementares.

Nos quatro modelos, o calo possui até seis diferentes tipos de tecido, em diferentes momentos: tecido fibroso (*Fib*), cartilagem imatura (*ImC*), cartilagem madura (*MC*), osso imaturo (*ImB*), osso intermediário (*IntB*) e osso maduro (*MB*), como mostrado na figura V.1. O espaço de fratura possui 3 mm de comprimento. O osso cortical é assumido como sendo uma placa isotrópica com espessura de 3 mm, e a medula óssea está abaixo da placa (em vermelho). A região preta, acima do osso cortical e do calo, é considerada como água.



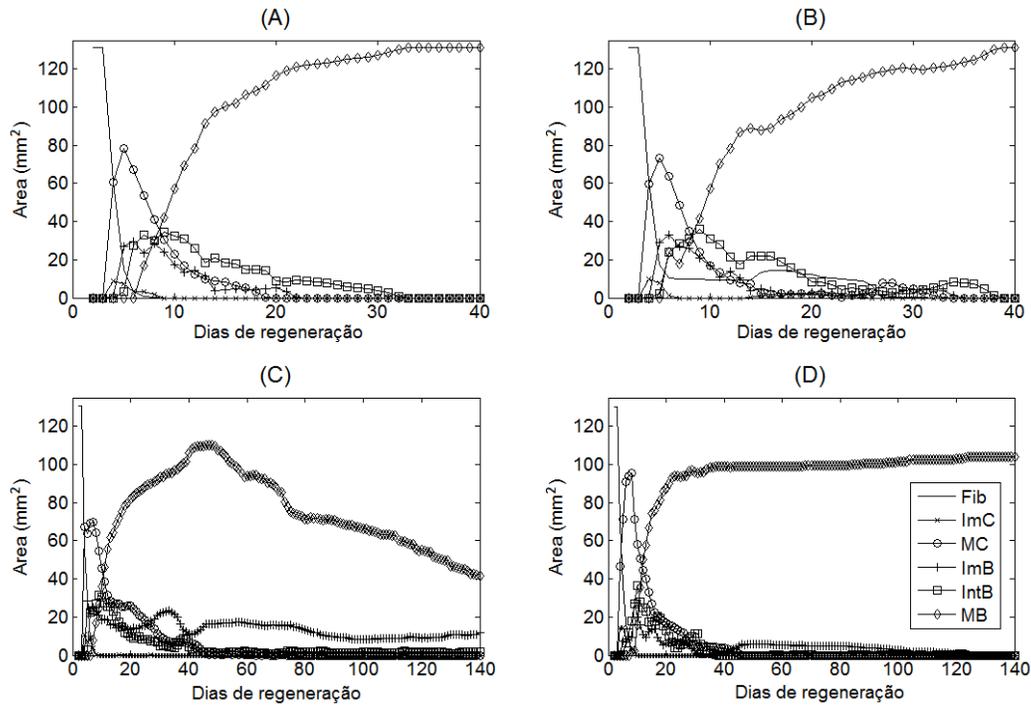
**Figura V.1 – Dimensões e composição tecidual do calo no 6º dia de regeneração óssea, de acordo com modelo de CARTER *et al.* [68]. Adaptado de ISAKSSON *et al.* [81].**

M1 e M2 fornecem 40 dias de regeneração, enquanto que M3 e M4 apresentam 140 dias. Outras observações importantes são [81]: (a) após o 13º dia de regeneração, M2 apresenta um amolecimento temporário (visto como um aumento na concentração de tecido fibroso, figura V.2A; (b) apenas dois modelos, M3 e M4, predizem a reabsorção do calo externo (figura V.2B) e intramedular (figura V.2C), respectivamente; (c) o processo de diferenciação tecidual termina para M3 e uma não-união (pseudo-artrose) é predita (figura V.2B).

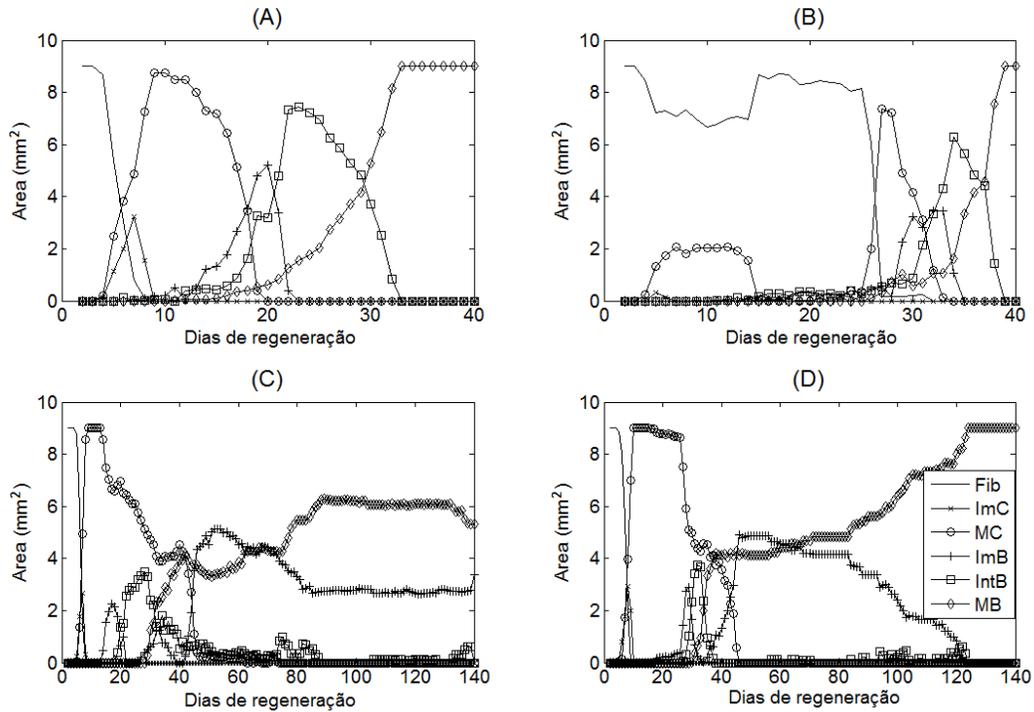


**Figura V.2 – (A) 13º e 14º dia do modelo M2, mostrando o aumento na concentração de tecido fibroso; (B) 100º dia do modelo M3, mostrando a reabsorção do calo externo e a permanência da região de não-união (círculo verde); (C) 100º dia do modelo M4, mostrando a reabsorção intramedular do calo (círculo verde). Adaptações de ISAKSSON *et al.* [81].**

Para a implementação dos dias de regeneração como modelos numéricos para a simulação da propagação do ultrassom, cada quadro foi readaptado (utilização de dois fragmentos ósseos, aumento do comprimento ósseo) e processado com o intuito de receber um número para cada tipo tecidual. Por exemplo, “0” para água, “1” para o osso cortical, e assim por diante. Esse processo torna possível a caracterização do material (densidade, constantes elásticas, etc.) para aplicação no *software* (que exige numeração das regiões). Além disso, a composição do calo foi calculada de duas formas: a composição total do calo (a área em mm<sup>2</sup> da contribuição de cada tecido em toda a região de regeneração) e a composição de placa do calo (a área em mm<sup>2</sup> da contribuição de cada tecido entre os dois fragmentos ósseos na região óssea cortical), como mostram as figuras V.3 e V.4, respectivamente.



**Figura V.3 – Composição total do calo para (a) M1; (b) M2; (c) M3; e (d) M4.**



**Figura V.4 – Composição de placa do calo para (a) M1; (b) M2; (c) M3; e (d) M4.**

A tabela V.1 mostra os valores de módulo de Young ( $E$ ) e razão de Poisson ( $\nu_0$ ) usados por ISAKSSON *et al.* [81], para prever a diferenciação tecidual. Pode-se também observar os valores de densidade  $\rho_0$  (de outras referências), e as velocidades acústicas transversal ( $c_t$ ) e longitudinal ( $c_l$ ) para cada tecido, estimadas pelas equações [4]:

$$c_t = \sqrt{\frac{E}{2\rho_0(1+\nu_0)}} \quad (\text{V.1})$$

e

$$c_l = \sqrt{\frac{E(1-\nu_0)}{\rho_0(1-2\nu_0)(1+\nu_0)}} \quad (\text{V.2})$$

**Tabela V.1 – Módulo de Young ( $E$ ) e razão de Poisson ( $\nu_0$ ) para cada tecido, usados por ISAKSSON *et al.* [81], os valores propostos de densidade ( $\rho_0$ ) e as velocidades transversal ( $c_t$ ) e longitudinal ( $c_l$ ) estimadas.**

Tecido	$E$ (GPa)	$\nu_0$	$\rho_0$ (kg.m <sup>-3</sup> )	$c_t$ (m.s <sup>-1</sup> )	$c_l$ (m.s <sup>-1</sup> )
Osso cortical	15,750	0,325	1500 <sup>g</sup>	1990,54	3909,35
Medula	0,002	0,167	1020 <sup>h</sup>	28,98	45,84
Osso maduro	6,000 <sup>a</sup>	0,325	1250 <sup>h</sup>	1345,85	2643,20
Osso intermediário	2,000 <sup>b</sup>	0,325	1200 <sup>i</sup>	793,05	1557,52
Osso imaturo	1,000 <sup>c</sup>	0,325	1150 <sup>i</sup>	572,83	1125,02
Cartilagem madura	0,500 <sup>d</sup>	0,167	1100 <sup>i</sup>	441,30	697,97
Cartilagem imatura	0,010 <sup>e</sup>	0,167	1080 <sup>i</sup>	62,99	99,62
Tecido fibroso	0,002 <sup>f</sup>	0,167	1059 <sup>g</sup>	28,45	44,99

No trabalho dos autores [81]: <sup>a</sup>  $E > 2$  GPa, <sup>b</sup>  $1 < E < 2$  GPa, <sup>c</sup>  $0.5 < E < 1$  GPa, <sup>d</sup>  $0.01 < E < 0,5$  GPa, <sup>e</sup>  $0,005 < E < 0,01$  GPa, <sup>f</sup>  $0,001 < E < 0,005$  GPa.

<sup>g</sup> Protopoulos *et al.* [40]; <sup>h</sup> Vavva *et al.* [42]; <sup>i</sup> Geddes and Baker [86]; <sup>j</sup> valores hipotéticos.

É importante notar que os valores usados para prever a mecano-regulação do calo fornecem valores baixos de velocidade longitudinal (principalmente para *Fib*, *ImC* e medula óssea) de acordo com a literatura [4], devido a baixos valores de  $\nu_0$  para tecidos moles. Por isso, para a realização das simulações da propagação do ultrassom,

foram usados valores seguindo outras referências. A tabela V.2 mostra os novos valores aplicados aos quatro modelos.

**Tabela V.2 – Módulo de Young ( $E$ ), razão de Poisson ( $\nu_0$ ) e densidade ( $\rho_0$ ) propostos, e as velocidades estimadas transversal ( $c_t$ ) e longitudinal ( $c_l$ ), aplicadas nas simulações.**

<b>Tecido</b>	<b>E (GPa)</b>	<b><math>\nu_0</math></b>	<b><math>\rho_0</math> (kg.m<sup>-3</sup>)</b>	<b><math>c_t</math> (m.s<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>c_l</math> (m.s<sup>-1</sup>)</b>
Osso cortical	15,750	0,3250	1500 <sup>b</sup>	1990,54	3909,35
Medula	0,002	0,4998 <sup>a</sup>	1020 <sup>a</sup>	25,57	1219,14
Osso maduro	6,000	0,4000 <sup>a</sup>	1250 <sup>a</sup>	1309,31	3207,13
Osso intermediário	2,000	0,4300 <sup>d</sup>	1200 <sup>d</sup>	763,38	2178,36
Osso imaturo	1,000	0,4500 <sup>a</sup>	1150 <sup>d</sup>	547,59	1816,14
Cartilagem madura	0,050	0,4700 <sup>a</sup>	1100 <sup>c</sup>	393,20	1652,69
Cartilagem imatura	0,010	0,4993 <sup>a</sup>	1080 <sup>d</sup>	55,57	1486,17
Tecido fibroso	0,003 <sup>a</sup>	0,4998 <sup>a</sup>	1059 <sup>b</sup>	30,73	1465,39

<sup>a</sup> Vavva *et al.* [42]; <sup>b</sup> Protopappas *et al.* [40]; <sup>c</sup> Geddes and Baker [86]; <sup>d</sup> valores hipotéticos.

### V. 1. 2. Protocolo de simulação

Para as simulações numéricas, foi aplicado um método de diferença-finita no domínio do tempo (*finite-difference time domain* - FDTD), por um *software* desenvolvido no *Laboratoire d'Imagerie Paramétrique* (LIP), Paris, França (SimSonic2D) [26], o qual é baseado no esquema de Virieux para discretização de equações acústicas lineares [87], que descrevem o comportamento mecânico de um meio linear, elástico e anisotrópico:

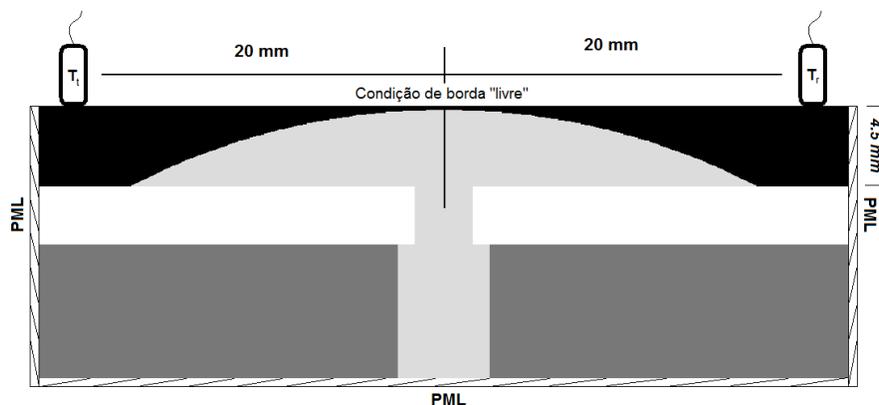
$$\rho(\vec{r}) \times \frac{\partial v_i}{\partial t} = \frac{\partial T_{ij}}{\partial r_j} + f_i \quad (\text{V.3})$$

$$T_{ij} = C_{ijkl}(\vec{r}) \times \frac{\partial u_k}{\partial r_l} + \tau_{ij} \quad (\text{V.4})$$

onde o estado mecânico é caracterizado pelo vetor velocidade de deslocamento  $\vec{v} = \partial \vec{u} / \partial t$  ( $\vec{u}$  sendo o vetor deslocamento),  $T$  é a matriz de tensão, e as propriedades do

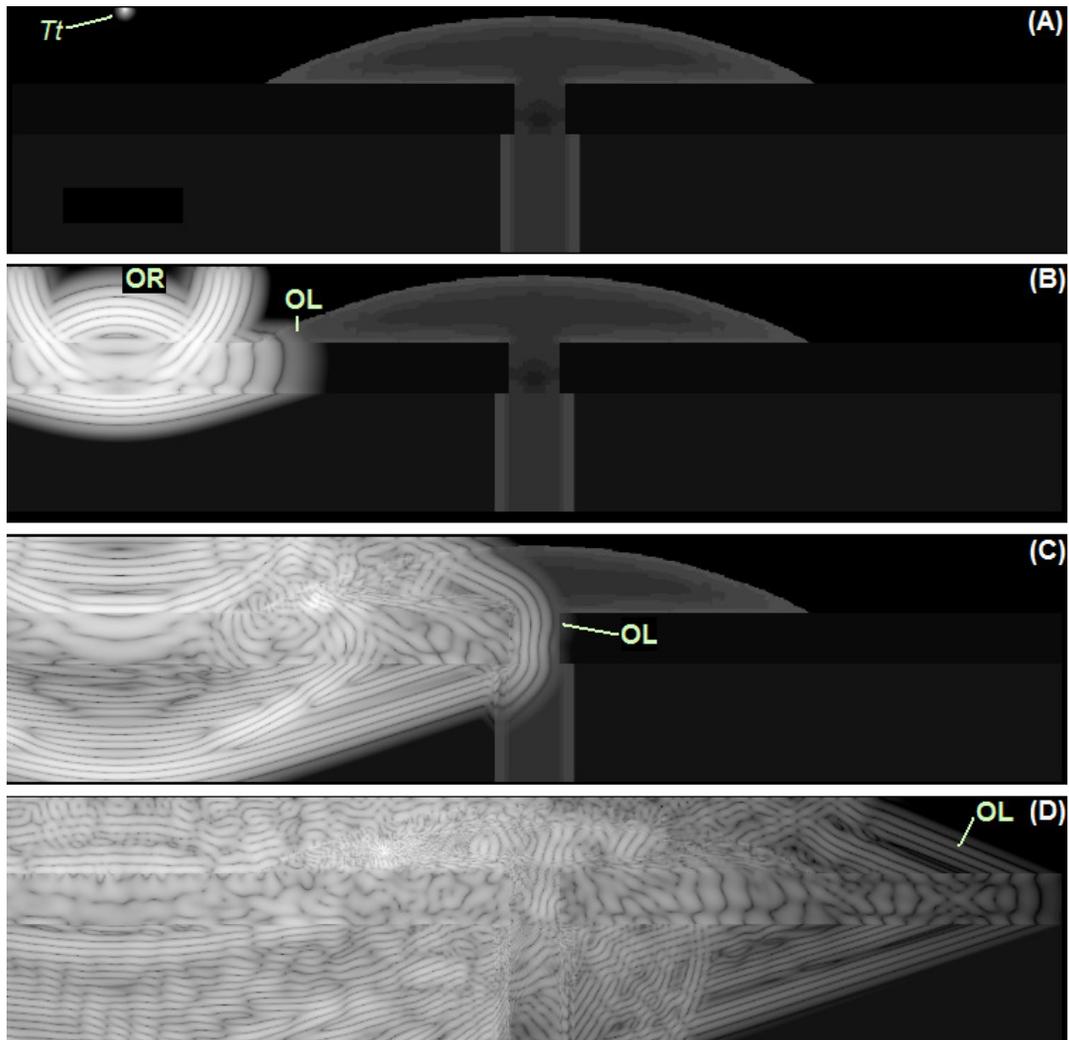
material são definidas pela densidade  $\rho$  e pela matriz de rigidez  $C$ ;  $f$  e  $\tau$  são eventuais termos-fonte de força e de tensão. A equação (V.3) corresponde à lei de Newton, na qual as forças se devem à gradientes de tensão e de um eventual termo-fonte  $f$ , e a equação (V.4) corresponde à lei do comportamento de um meio elástico linear, relacionando linearmente e independentemente o conjunto dos componentes de tensão e deformação.

O protocolo de simulação consistiu na utilização de um transdutor transmissor pontual de 1 MHz ( $T_t$ ) (comprimento do pulso = 4,28  $\mu$ s, banda a 6 dB de 0,70 a 1,51 MHz), colocado a 20 mm do centro da fratura, e um receptor pontual ( $T_r$ ) a 40 mm de  $T_t$ . Para simular uma condição mais realística, os transdutores foram colocados a 0,5 mm a partir do calo (4,5 mm da placa óssea); no limite superior do modelo, utilizou-se uma condição de borda “livre”, com o objetivo de simular um total descasamento de impedância e total reflexão (interface ar – tecido mole), e camadas perfeitamente acopladas (*perfectly matched layers* - PML) foram implementadas para evitar reflexões nas outras três bordas (figura V.5). Foram aplicadas uma duração de simulação de 50  $\mu$ s, e uma resolução espacial de  $h = 0,05$  mm, satisfazendo a condição  $h < \lambda_{min}/15$ , onde  $\lambda_{min}$  é o menor comprimento de onda que se deseja identificar com a simulação.



**Figura V.5 – Protocolo de simulação, com as condições de contorno nos quatro lados e a localização dos transdutores.**

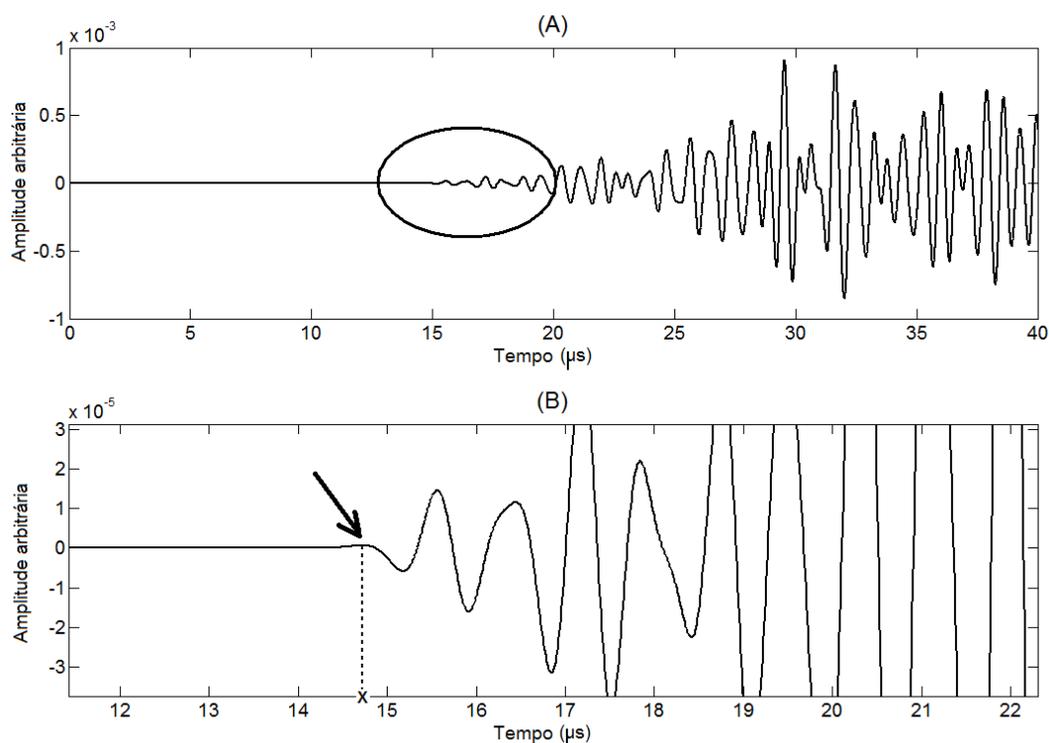
A figura V.6 ilustra a propagação da onda simulada pelo *software*, no 6º dia de regeneração para M1.



**Figura V.6 – Propagação da onda de US simulada no SimSonic2D: (A) em  $t = 0 \mu\text{s}$ , observa-se o transmissor  $Tt$ ; (B) em  $t = 6 \mu\text{s}$ , pode-se observar a onda refletida ( $OR$ ) e a onda lateral ( $OL$ ); (C) em  $t = 11 \mu\text{s}$ ,  $OL$  atravessa a fratura para encontrar o segundo fragmento ósseo; (D) em  $t = 19 \mu\text{s}$ ,  $OL$  após atravessar a fratura e o calo ósseo.**

### V. 1. 3. Processamento do sinal

Para cada dia de regeneração, o sinal de RF foi capturado pelo  $Tr$  (figura V.7a), e então duas variáveis foram extraídas para análise. Primeiramente, o tempo de vôo (*time-of-flight* – TOF) do FAS ( $TOF_{FAS}$ ) foi identificado, de acordo com o procedimento usado por BOSSY *et al.* [48]: FAS é considerado como a primeira contribuição de sinal acima do ruído, com o mesmo período do sinal de excitação; logo,  $TOF_{FAS}$  (em  $\mu s$ ) é definido como a localização temporal do primeiro pico do sinal. Uma interpolação parabólica de 5 pontos foi usada na vizinhança do extremo do sinal (figura V.7b).



**Figura V.7 – (a) sinal RF após propagação no osso – calo – osso. O círculo mostra a região de interesse; (b) detecção do FAS (seta).**

Outra variável de interesse foi a  $SPL$ , proposta por Dodd *et al.* [44]. Ela reflete em dB a perda de energia do sinal após passar pela fratura. Pode ser estimada usando a equação

$$SPL = 20 \log \frac{A_{calo}}{A_{osso}} \quad (V.5)$$

onde  $A_{calo}$  é a amplitude do FAS (para  $SPL_{FAS}$ ) ou a amplitude máxima do sinal (para  $SPL_{MAX}$ ), após sua propagação através do calo ósseo, e  $A_{osso}$  é a amplitude do FAS (ou do máximo do sinal) após sua propagação ao longo da placa óssea, sem descontinuidades.

#### V. 1. 4. Análise estatística

Uma regressão múltipla linear (método *stepwise*) foi realizada para prever as variáveis dependentes  $TOF_{FAS}$ ,  $SPL_{FAS}$  e  $SPL_{MAX}$ , com a composição do calo total ( $Fib$ ,  $ImC$ ,  $MC$ ,  $ImB$ ,  $IntB$ ,  $MB$ ) e de placa ( $Fib_{pb}$ ,  $ImC_{pb}$ ,  $MC_{pb}$ ,  $ImB_{pb}$ ,  $IntB_{pb}$ ,  $MB_{pb}$ ) como variáveis independentes. Foi assumido um nível de significância  $\alpha = 0,05$ . Os coeficientes de regressão foram mostrados em curvas, juntamente com os intervalos de confiança (95%). Testes ANOVA foram implementados para se avaliar se as variáveis independentes são adequadas para o modelo. Os coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis foram computados, e finalmente, o erro médio quadrático (*root mean square error - RMSE*) foi computado usando a equação:

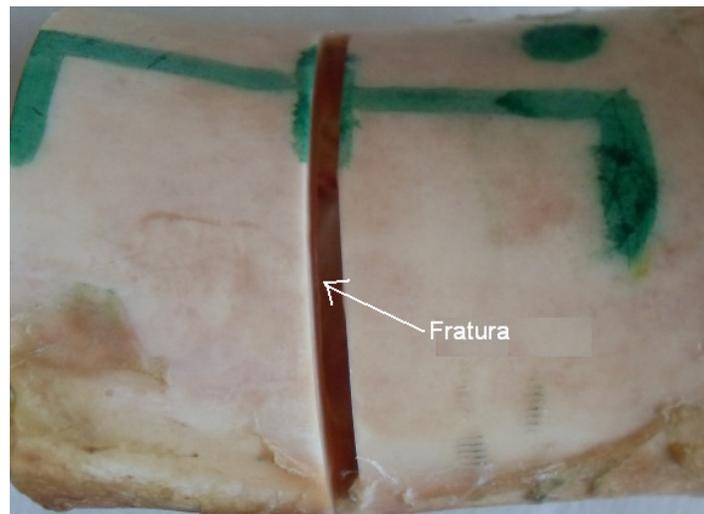
$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (Y_i - \hat{Y}_i)^2} \quad (V.6)$$

onde  $Y_i$  e  $\hat{Y}_i$  são os valores observados (simulação) e preditos, respectivamente, para cada dia de regeneração  $i$ . Para M1 e M2,  $1 \leq N \leq 40$ ; para M3 e M4,  $1 \leq N \leq 140$ . Todos os cálculos estatísticos foram realizados usando-se Matlab<sup>®</sup> v. 7.4 *Statistical Toolbox* (Mathworks Inc., Natick, MA, USA).

## V. 2. EXPERIMENTO *IN VITRO*: EFEITO DA DESMINERALIZAÇÃO

### V. 2. 1. Amostra

Foi utilizada uma amostra de fêmur bovino *in vitro* (região próxima à epífise proximal), sem o conhecimento da procedência do animal. O tecido mole e medula óssea foram completamente removidos por dissecação. Uma fratura de 3 mm foi feita usando uma serra de precisão linear sob irrigação contínua (IsoMet 4000, Buehler® SARL, Dardilly, France; espessura 0,99 mm) até o meio da diáfise óssea (Figura V.8). Esse comprimento de fratura foi escolhido de acordo com estudos de simulação prévios [81]. Após o corte, a mesma serra foi usada para extrair uma fatia de osso cortical de 3 mm de espessura (Figura V.9), afastada 20 mm do espaço de fratura. Essa fatia se encaixa perfeitamente dentro da descontinuidade. Ambos fêmur e fatia óssea foram mantidos sob refrigeração à -20°C até o momento dos experimentos.



**Figura V.8 – Amostra de fêmur bovino *in vitro*, com o corte realizado pela serra (fratura de 3 mm). A marca verde sobre o osso delimita a localização da sonda de US utilizada.**



**Figura V.9 – Fatia de osso cortical de 3 mm de espessura.**

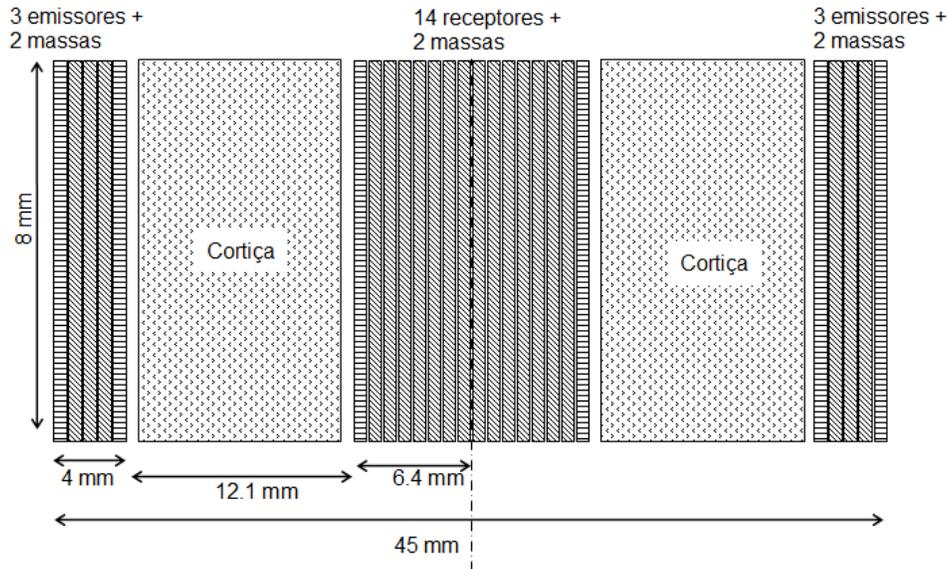
Um processo de desmineralização foi realizado imergindo a fatia de osso cortical em um frasco de 30 ml contendo uma solução de ácido etilenodiamina tetracético dissódio (*ethylenediamine tetraacetic acid* - EDTA *dissodium*; Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Lyon, France), um quelante de cálcio, a 0,376 M, por 24 horas (à 25<sup>0</sup>C). Após cada período de 24 horas, a fatia foi colocada de volta ao espaço de fratura para a realização de medidas em TAU (descritas adiante). Esse procedimento foi feito por 12 dias, como proposto por [88], sempre usando uma nova solução em um frasco limpo. As soluções diárias foram estocadas em um refrigerador a 4°C para a quantificação da concentração de cálcio.

Cada frasco com solução EDTA-Ca<sup>2+</sup> foi analisada usando espectrometria de emissão atômica (ICAP<sup>®</sup> 6500, Thermofischer Scientific; diluição em água a 1/100, acidificação a 1% com ácido nítrico, comprimento de onda de 393,36 nm). Um modelo matemático da curva de perda de cálcio foi estimado usando a *Curve Fitting Toolbox* do programa Matlab<sup>®</sup> para ser aplicado no protocolo de simulação (descrito adiante). A melhor equação de ajuste dos dados foi usada no estudo (maior valor de  $R^2$  com menor valor de *RMSE* - *root mean square error*).

## **V. 2. 2. Procedimentos experimentais**

Para as medições em transmissão axial, foi utilizada a sonda BeamLip de 1 MHz, construída pelo *Laboratoire d'Imagerie Paramétrique* (Paris, França) [28]. O

dispositivo consiste de 6 transdutores emissores, 3 de cada lado da sonda. Os emissores são separados dos receptores (14 no total) por uma faixa de cortiça de 12,1 mm (figura V.10). Cada cerâmica possui 0,8 mm de largura.



**Figura V.10 – Sonda BeamLip, de 1 MHz, composta de 6 emissores (3 de cada lado da sonda) e 14 receptores. Cortiça separa os emissores dos receptores.**

O arranjo de emissores e receptores da sonda foi especialmente desenhado para estudos da avaliação do osso cortical. Para o presente trabalho, foram utilizados sinais gerados somente pelo primeiro emissor (da esquerda para a direita) e coletados pelo último receptor (também da esquerda para a direita), representando uma distância entre emissor e receptor de 28,1 mm.

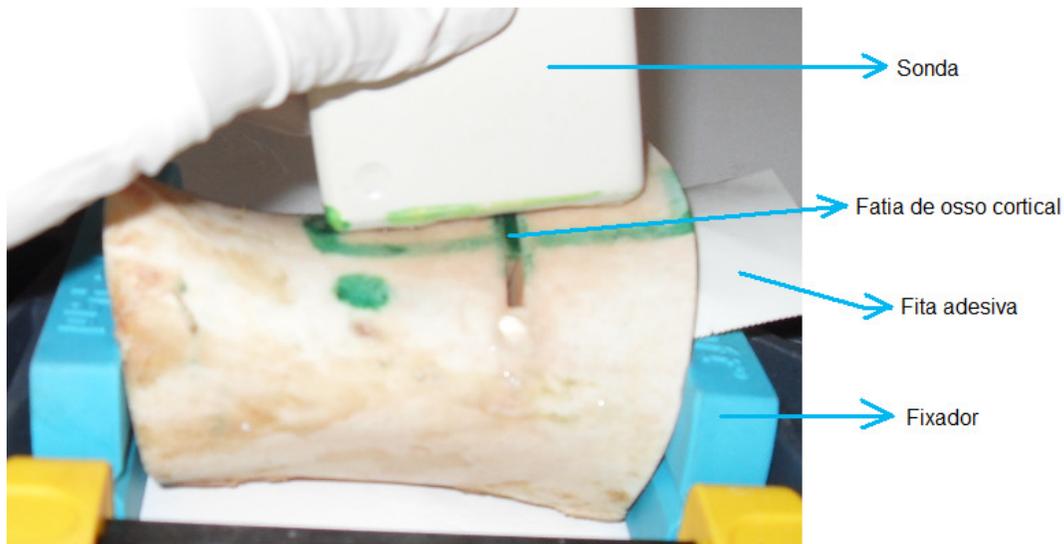
Os sinais de US foram coletados em três configurações experimentais diferentes.

Primeiramente, sinais foram coletados usando a sonda BeamLip na superfície da amostra óssea sem o espaço de fratura, ou seja, antes do corte da serra. O sinal tem 512 pontos, gravados com frequência de amostragem de 25 MHz, correspondendo a uma duração de 20  $\mu$ s. Para cada sinal, o FAS foi detectado, utilizando-se o procedimento

descrito anteriormente (seção V.1.3), e, logo em seguida, o tempo de vôo ( $TOF_{FAS}$ , em  $\mu s$ ) foi identificado.

Após o corte na amostra, o espaço de fratura foi preenchido com gel (uma fita adesiva foi usada no interior para evitar o vazamento do gel pelo canal medular), e a sonda colocada com a sua metade em cima da fratura (mesma localização da sonda usada antes), e mais 30 sinais foram coletados, simulando uma situação de pós-fratura aguda (sangue entre os fragmentos ósseos).

Em um terceiro momento, a fatia de osso cortical de 3 mm de espessura foi colocada no espaço de fratura, e o mesmo procedimento de coleta de sinais foi realizado (figura V.11), recolocando a fatia de osso a cada coleta. Gel foi novamente usado para um melhor acoplamento entre os fragmentos ósseos. Um fixador foi utilizado para evitar movimentos na amostra durante a coleta. Todo o experimento foi realizado sob temperatura ambiente de 25°C, mantida constante por um sistema de regulação do laboratório.

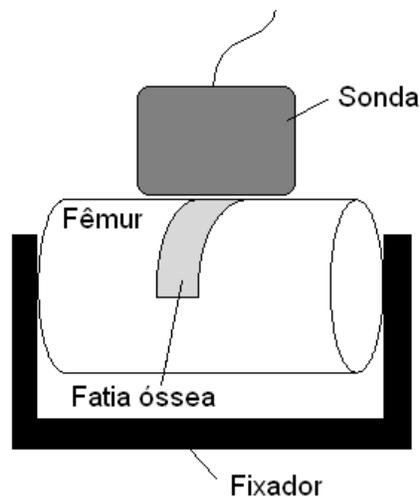


**Figura V.11 – Protocolo experimental.**

Em seguida, o processo de desmineralização teve início. A fatia de osso cortical foi colocada na solução de EDTA (como descrito anteriormente) durante 12 dias. A

cada 24 horas, a fatia era retirada do frasco, recolocada no espaço de fratura, e novas medidas eram realizadas (30 sinais). Assume-se que esse processo possa mimetizar inversamente a mineralização que ocorre no calo ósseo durante o processo de regeneração da fratura.

Resumidamente, em cada configuração, 30 sinais foram coletados, e uma média dos valores de  $TOF_{FAS}$  para cada passo de desmineralização foi estimada. A Figura V.12 mostra o desenho experimental proposto.



**Figura V.12 – Protocolo experimental, mostrando a sonda de ultrassom acima do espaço de fratura contendo a fatia óssea de 3 mm de espessura.**

Após o processo de medidas em UAT, as mudanças na rigidez tecidual induzidas pela desmineralização foram controladas usando-se um microscópio de varredura acústica (*scanning acoustic microscope* - SAM). Para esse fim, uma secção da amostra desmineralizada foi preparada usando a mesma serra de precisão descrita anteriormente. A superfície foi polida usando uma suspensão de diamante policristalino de 3  $\mu\text{m}$ , e depois uma suspensão de alumina de 0,05  $\mu\text{m}$  (*Metadi supreme and Masterprep*, Buehler® GmbH, Düsseldorf, Germany).

O SAM consiste de um escaneamento de alta precisão, tridimensional, com um gerador de pulsos de 200 MHz (Panametrics® 5900PR, Inc., Waltham, USA) e uma

placa de 1 GS s-1 A/D (Agilent Acquiris<sup>®</sup> DP240). Um transdutor focado e esférico de 50-MHz de frequência central foi usado (V605, Valpey Fisher, Hopkinton, USA), fornecendo uma resolução espacial de aproximadamente 30  $\mu\text{m}$ . Antes da coleta de sinais, a amostra foi imersa em um banho de temperatura controlada (25°C) com água destilada. A superfície da amostra foi colocada no plano focal do transdutor e orientada perpendicularmente ao eixo do campo acústico (eixo  $z$ ). Uma varredura modo C de toda a secção foi realizado deslocando o transdutor pelos eixos  $x$  e  $y$  paralelos à superfície da amostra (passos de 10  $\mu\text{m}$ ). Para cada ponto, um sinal de radiofrequência (RF) foi coletado a uma frequência de amostragem de 1 GHz e armazenado com resolução de 8 bit. Os parâmetros do gerador de pulsos, do transdutor e aquisição de dados foram controlados pela plataforma Labview<sup>®</sup> (*National Instruments*, Austin, Texas, USA).

Medidas de impedância acústica ultrassônica foram realizadas de acordo com o procedimento descrito em [89]. Em resumo, o microscópio foi calibrado com um conjunto de quatro materiais de referência homogêneos (PMMA, policarbonato, alumínio, e titânio). Usando a curva de calibração, a amplitude refletida, avaliada pela transformada de Hilbert (envelope) do sinal, foi convertida em um valor de impedância acústica ( $Z$ ).

### **V. 2. 3. Protocolo de simulação do modelo experimental**

Simulações bidimensionais foram realizadas usando o mesmo programa computacional descrito na seção V.1.2 (SimSonic2D). A Figura V.13 mostra o modelo numérico em detalhes, composto de uma placa óssea de 5 mm de espessura, com as propriedades elásticas de osso bovino (isotrópico transversal), de acordo com estudo de LASAYGUES e PITHIOUX [90]. O emissor de 1 MHz e o receptor foram separados de

uma distância de 28 mm, e posicionados a 0,5 mm acima da placa. Água foi usada como meio de acoplamento entre o osso e o transdutor. Um espaçamento de fratura de 3 mm foi então imposto (Figura V.13A). Para modelar a fatia cortical dentro da descontinuidade, as mesmas propriedades foram usadas, com uma interface de 0,1 mm entre a placa e a fatia (Figura V.13B). Posteriormente, uma rotina numérica de desmineralização foi implementada para simular a fatia cortical em diferentes estágios de desmineralização pelo EDTA. A rotina, que consiste em impor valores de rigidez e densidade para modelar os 12 dias de desmineralização, foi elaborada seguindo quatro critérios: (1) somente uma camada superficial (com 1 mm de espessura) foi desmineralizada (como mostrou a imagem de SAM, figura VI.5); (2) o centro ossificado permaneceu inalterado durante a imersão de EDTA; (3) a cada etapa, a mineralização permaneceu uniforme na camada periférica, ou seja, não houve um gradiente de mineralização (o meio é totalmente mineralizado ou desmineralizado); (4) o tecido desmineralizado poderia ser modelado usando o chamado tecido conectivo inicial (*Initial Connective Tissue* - ICT), descrevendo um tecido conectivo não mineralizado, proposto por PROTOPAPPAS *et al.* [41]. Dessa maneira, a camada de desmineralização aumentou progressivamente com espessura crescente da camada desmineralizada periférica, de um dia para outro, seguindo a curva de decaimento temporal de cálcio observado com a análise de espectrometria (ver seção VI.2.1). Os valores dos coeficientes elásticos usados se encontram na tabela V.3.

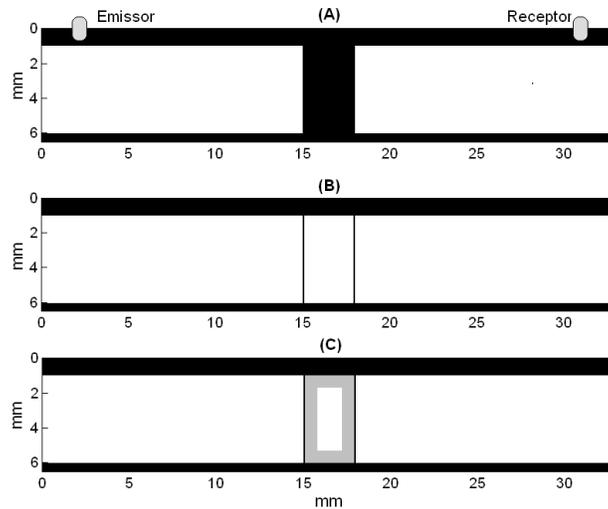
**Tabela V.3. Parâmetros quantitativos usados para modelar o osso cortical bovino e o tecido conectivo inicial (ICT) em simulações 2D.**

Parameters	Bovine cortical bone*	Initial connective tissue†
Density (kg/m <sup>3</sup> )	1800	1050
$C_{11}$ (GPa)	22,000	2,501
$C_{22}$ (GPa)	23,500	2,501
$C_{12}$ (GPa)	7,600	0,001
$C_{33}$ (GPa)	7,500	2,499

\* - Lasaygues and Pithioux [90]

† - Protopappas *et al.* [41]

A Figura V.13 mostra o modelo numérico para o terceiro dia de desmineralização. A resolução espacial foi de 0,02 mm, e a duração de simulação foi de 15  $\mu$ s. PML's também foram implementadas nas bordas superior, inferior e direita. Os dados simulados foram processados da mesma maneira que os dados experimentais.



**Figura V.13 – Modelo numérico da situação experimental: (A) placa de espessura 5 mm (branco) com uma fratura de 3 mm, e o posicionamento dos transdutores; (B) a fatia óssea modelada dentro da fratura com uma interface de 0,1 mm entre a placa e a fatia; (C) em cinza, o tecido desmineralizado no 3<sup>o</sup> dia de imersão com EDTA.**

#### V. 2. 4. Análise estatística

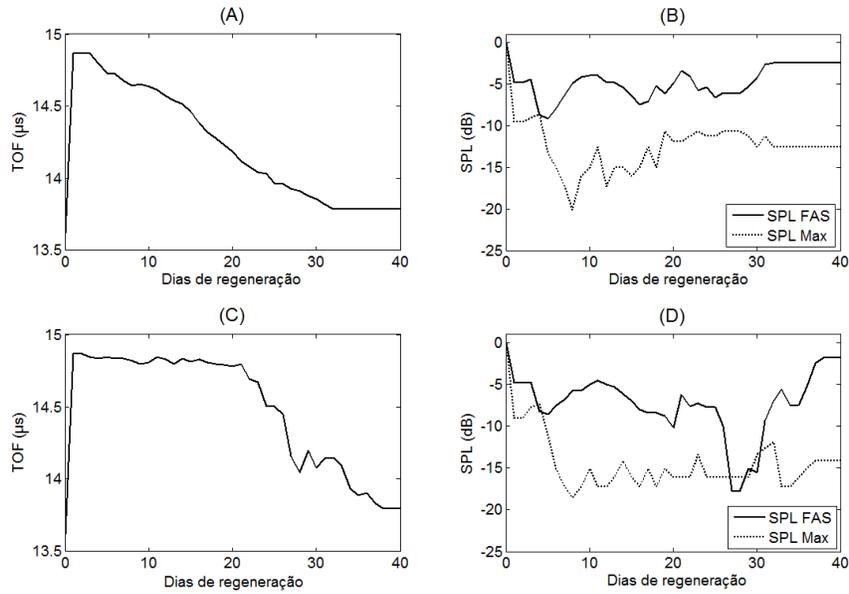
A correlação entre o  $TOF_{FAS}$  experimental, de simulação e a perda de cálcio foi avaliada usando o coeficiente de correlação não paramétrico de Spearman ( $r_s$ ). Testes t de Student foram aplicados para testar a hipótese nula de que: (1) os valores de  $TOF_{FAS}$  do dia seguinte da desmineralização com EDTA foram estatisticamente idênticos aos valores do dia anterior; e (2) as variações diárias experimentais e de simulação do TOF ( $\partial TOF/\partial t$ , onde  $t$  = dia de desmineralização) são de distribuições de médias iguais. Todas as computações estatísticas foram realizadas em Matlab<sup>®</sup>, com nível de significância  $\alpha = 0,05$ .

# CAPÍTULO VI

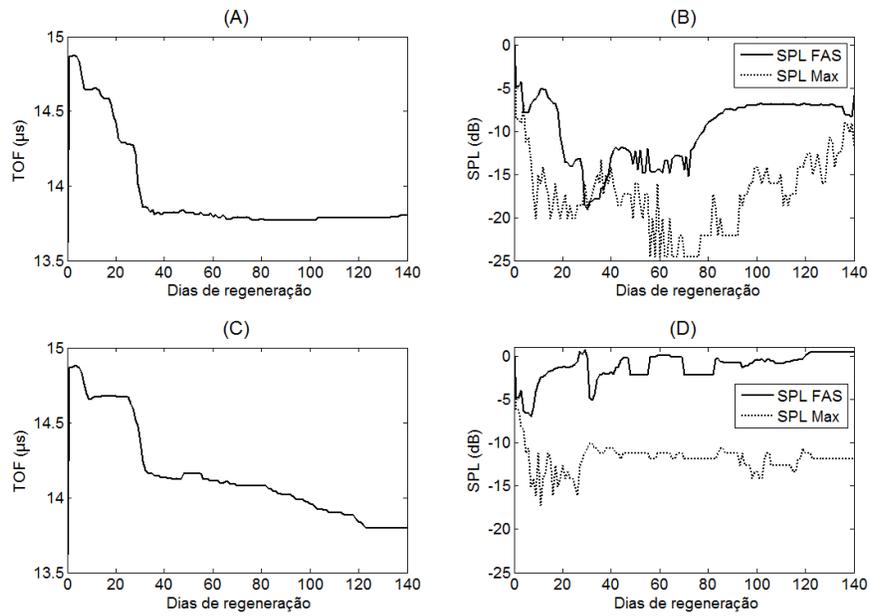
## RESULTADOS

### VI. 1. SIMULAÇÕES

As figuras VI.1 e VI.2 mostram as curvas de tempo de voo do FAS ( $TOF_{FAS}$ ), atenuação do FAS ( $SPL_{FAS}$ ) e do máximo do sinal ( $SPL_{MAX}$ ), para os modelos de 40 dias (M1 e M2) e de 140 dias (M3 e M4), respectivamente. Em todos, foi observado um aumento no  $TOF_{FAS}$ , logo após o evento da fratura. Na figura VI.1A, o  $TOF_{FAS}$  diminuiu continuamente durante a regeneração óssea. Em contraste, para M2 (figura VI.1C),  $TOF_{FAS}$  permaneceu quase que constante até o 21º dia, indicando um atraso na regeneração óssea (se comparado a M1), e logo após houve uma diminuição até alcançar o mesmo valor de M1 no dia 40. As curvas de  $SPL_{FAS}$  e  $SPL_{MAX}$  são similares para ambos os métodos (figuras VI.1B e VI.1D). A atenuação do FAS aumenta após fratura, e lentamente recupera seu valor normal. Para M2 (figura VI.1D), a curva de  $SPL_{FAS}$  cai após o 26º dia. É importante lembrar que esse modelo demonstra um amolecimento do calo, e por isso um atraso na regeneração se comparado com M1. Para M3, o  $TOF_{FAS}$  apresenta uma grande queda até o 30º dia, e então permanece quase que constante até o 140º dia (figura VI.2A). Da mesma maneira, para M4, o  $TOF_{FAS}$  diminui rapidamente até o 31º dia, mas depois mantém uma pequena diminuição (figura VI.2C). Considerando a atenuação da energia, o  $SPL_{FAS}$  apresentou um comportamento decrescente contínuo para M3 (figura VI.2B). Para M4, o comportamento foi similar para a curva de  $SPL$  em M1 (figura VI.2D).



**Figura VI.1 – (A) Tempo de vôo do FAS ( $TOF_{FAS}$ ) para M1; (B) Atenuação do FAS ( $SPL_{FAS}$ ) e do máximo do sinal ( $SPL_{MAX}$ ) para M1; (C)  $TOF_{FAS}$  para M2; (D)  $SPL_{FAS}$  e  $SPL_{MAX}$  para M2.**



**Figura VI.2 – (A) Tempo de vôo do FAS ( $TOF_{FAS}$ ) para M3; (B) Atenuação do FAS ( $SPL_{FAS}$ ) e do máximo do sinal ( $SPL_{MAX}$ ) para M3; (C)  $TOF_{FAS}$  para M4; (D)  $SPL_{FAS}$  e  $SPL_{MAX}$  para M4.**

A tabela VI.1 mostra os valores dos coeficientes de correlação de Pearson ( $R$ ) entre as variáveis dependentes  $TOF_{FAS}$ ,  $SPL_{FAS}$  e  $SPL_{MAX}$ , e as variáveis independentes composição do calo total e de placa, usados nos modelos de regressão. Pode ser observado que o  $TOF_{FAS}$  apresenta melhores correlações com a composição do calo em relação ao  $SPL$ , principalmente com a composição de placa ( $MB$  tem boas correlações com o tempo de vôo –  $R > 0,80$  em todos os quatro modelos numéricos). Na tabela VI.2, são mostradas informações acerca dos modelos de regressão que obtiveram melhores resultados. Valores de  $R^2 > 0,90$  podem ser observados, e o  $MB$  possui um importante papel na predição do tempo de vôo em quase todos os casos. A Figura VI.3 mostra as curvas dos modelos de regressão (2), (3), (5) e (6), com seus respectivos intervalos de confiança (95%).

**Tabela VI.1 – Coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis dependentes ( $TOF_{FAS}$ ,  $SPL_{MAX}$  e  $SPL_{FAS}$ ) e a composição do calo total e de placa para todos os quatro modelos numéricos.**

	<i>Fib</i>	<i>ImC</i>	<i>MC</i>	<i>ImB</i>	<i>IntB</i>	<i>MB</i>	<i>Fib<sub>pl</sub></i>	<i>ImC<sub>pl</sub></i>	<i>MC<sub>pl</sub></i>	<i>ImB<sub>pl</sub></i>	<i>IntB<sub>pl</sub></i>	<i>MB<sub>pl</sub></i>
<b>M1</b>												
$TOF_{FAS}$	0,47 <sup>b</sup>	0,47 <sup>b</sup>	0,66 <sup>c</sup>	0,66 <sup>c</sup>	0,62 <sup>c</sup>	-0,90 <sup>c</sup>	0,58 <sup>c</sup>	0,40 <sup>a</sup>	0,64 <sup>c</sup>	0,12 <sup>ns</sup>	-0,32 <sup>a</sup>	-0,86 <sup>c</sup>
$SPL_{MAX}$	0,39 <sup>a</sup>	0,26 <sup>ns</sup>	-0,12 <sup>ns</sup>	-0,49 <sup>c</sup>	-0,74 <sup>c</sup>	0,06 <sup>ns</sup>	0,46 <sup>b</sup>	-0,16 <sup>ns</sup>	-0,77 <sup>c</sup>	-0,15 <sup>ns</sup>	0,36 <sup>a</sup>	0,21 <sup>ns</sup>
$SPL_{FAS}$	-0,02 <sup>ns</sup>	-0,38 <sup>a</sup>	-0,54 <sup>c</sup>	-0,54 <sup>c</sup>	-0,49 <sup>b</sup>	0,48 <sup>b</sup>	-0,18 <sup>ns</sup>	-0,54 <sup>c</sup>	-0,28 <sup>ns</sup>	-0,27 <sup>ns</sup>	-0,20 <sup>ns</sup>	0,71 <sup>c</sup>
<b>M2</b>												
$TOF_{FAS}$	0,41 <sup>b</sup>	0,34 <sup>a</sup>	0,40 <sup>a</sup>	0,45 <sup>b</sup>	0,56 <sup>c</sup>	-0,69 <sup>c</sup>	0,93 <sup>c</sup>	0,46 <sup>b</sup>	-0,06 <sup>ns</sup>	-0,37 <sup>a</sup>	-0,58 <sup>c</sup>	-0,80 <sup>c</sup>
$SPL_{MAX}$	0,59 <sup>c</sup>	0,56 <sup>c</sup>	0,43 <sup>b</sup>	0,06 <sup>ns</sup>	-0,43 <sup>b</sup>	-0,51 <sup>b</sup>	0,01 <sup>ns</sup>	0,07 <sup>ns</sup>	-0,20 <sup>ns</sup>	0,09 <sup>ns</sup>	-0,11 <sup>ns</sup>	0,02 <sup>ns</sup>
$SPL_{FAS}$	0,21 <sup>ns</sup>	0,04 <sup>ns</sup>	-0,01 <sup>ns</sup>	-0,02 <sup>ns</sup>	0,12 <sup>ns</sup>	-0,17 <sup>ns</sup>	0,18 <sup>ns</sup>	0,08 <sup>ns</sup>	-0,66 <sup>c</sup>	-0,52 <sup>b</sup>	-0,07 <sup>ns</sup>	0,44 <sup>b</sup>
<b>M3</b>												
$TOF_{FAS}$	0,45 <sup>c</sup>	0,46 <sup>c</sup>	0,86 <sup>c</sup>	0,26 <sup>b</sup>	0,75 <sup>c</sup>	-0,42 <sup>c</sup>	0,56 <sup>c</sup>	0,34 <sup>c</sup>	0,70 <sup>c</sup>	-0,65 <sup>c</sup>	0,13 <sup>ns</sup>	-0,86 <sup>c</sup>
$SPL_{MAX}$	0,33 <sup>c</sup>	0,31 <sup>c</sup>	0,25 <sup>b</sup>	-0,23 <sup>b</sup>	0,09 <sup>ns</sup>	-0,58 <sup>c</sup>	0,41 <sup>c</sup>	0,21 <sup>a</sup>	0,03 <sup>ns</sup>	-0,40 <sup>c</sup>	-0,15 <sup>ns</sup>	-0,04 <sup>ns</sup>
$SPL_{FAS}$	0,20 <sup>a</sup>	0,15 <sup>ns</sup>	0,14 <sup>ns</sup>	0,62 <sup>c</sup>	0,14 <sup>ns</sup>	-0,76 <sup>c</sup>	0,22 <sup>b</sup>	0,08 <sup>ns</sup>	-0,15 <sup>ns</sup>	-0,09 <sup>ns</sup>	-0,62 <sup>c</sup>	0,27 <sup>b</sup>
<b>M4</b>												
$TOF_{FAS}$	0,39 <sup>c</sup>	0,42 <sup>c</sup>	0,70 <sup>c</sup>	0,64 <sup>c</sup>	0,67 <sup>c</sup>	-0,75 <sup>c</sup>	0,50 <sup>c</sup>	0,32 <sup>c</sup>	0,73 <sup>c</sup>	-0,21 <sup>a</sup>	0,04 <sup>ns</sup>	-0,96 <sup>c</sup>
$SPL_{MAX}$	0,54 <sup>c</sup>	0,25 <sup>b</sup>	-0,20 <sup>a</sup>	-0,37 <sup>c</sup>	-0,48 <sup>c</sup>	-0,19 <sup>ns</sup>	0,49 <sup>c</sup>	-0,15 <sup>ns</sup>	-0,46 <sup>c</sup>	0,16 <sup>ns</sup>	0,17 <sup>a</sup>	0,08 <sup>ns</sup>
$SPL_{FAS}$	-0,38 <sup>c</sup>	-0,51 <sup>c</sup>	-0,69 <sup>c</sup>	-0,45 <sup>c</sup>	-0,38 <sup>c</sup>	0,76 <sup>c</sup>	-0,57 <sup>c</sup>	-0,53 <sup>c</sup>	-0,27 <sup>b</sup>	0,14 <sup>ns</sup>	-0,15 <sup>ns</sup>	0,62 <sup>c</sup>

<sup>ns</sup>não significante; <sup>a</sup> $p < 0,05$ ; <sup>b</sup> $p < 0,01$ ; <sup>c</sup> $p < 0,001$

**Tabela VI.2 – Alguns modelos de regressão multivariados para a composição do calo total e de placa (variável dependente  $TOF_{FAS}$ ).  $\Delta R^2$  é a variação no valor de  $R^2$  comparado ao modelo de regressão com apenas uma variável explanatória.**

Modelo de calo	Modelo de regressão	<sup>a</sup> Variáveis incluídas	<sup>b</sup> $R^2$	$\Delta R^2$	RMSE
M1	(1)	<i>MB, IntB, ImB</i>	0,92	0,12	0,12
	(2)	<i>MB<sub>pb</sub>, IntB<sub>pb</sub>, Fib<sub>pl</sub></i>	0,98	0,24	0,06
M2	(3)	<i>MB, IntB</i>	0,59	0,11	0,26
	(4)	<i>Fib<sub>pb</sub>, MB<sub>pl</sub></i>	0,94	0,11	0,10
M3	(5)	<i>MC, Fib, IntB</i>	0,92	0,18	0,09
	(6)	<i>MB<sub>pb</sub>, IntB<sub>pb</sub>, ImB<sub>pl</sub></i>	0,92	0,17	0,04
M4	(7)	<i>MB, IntB, Fib</i>	0,67	0,11	0,18
	(8)	<i>MB<sub>pb</sub>, Fib<sub>pb</sub>, MC<sub>pl</sub></i>	0,97	0,06	0,05

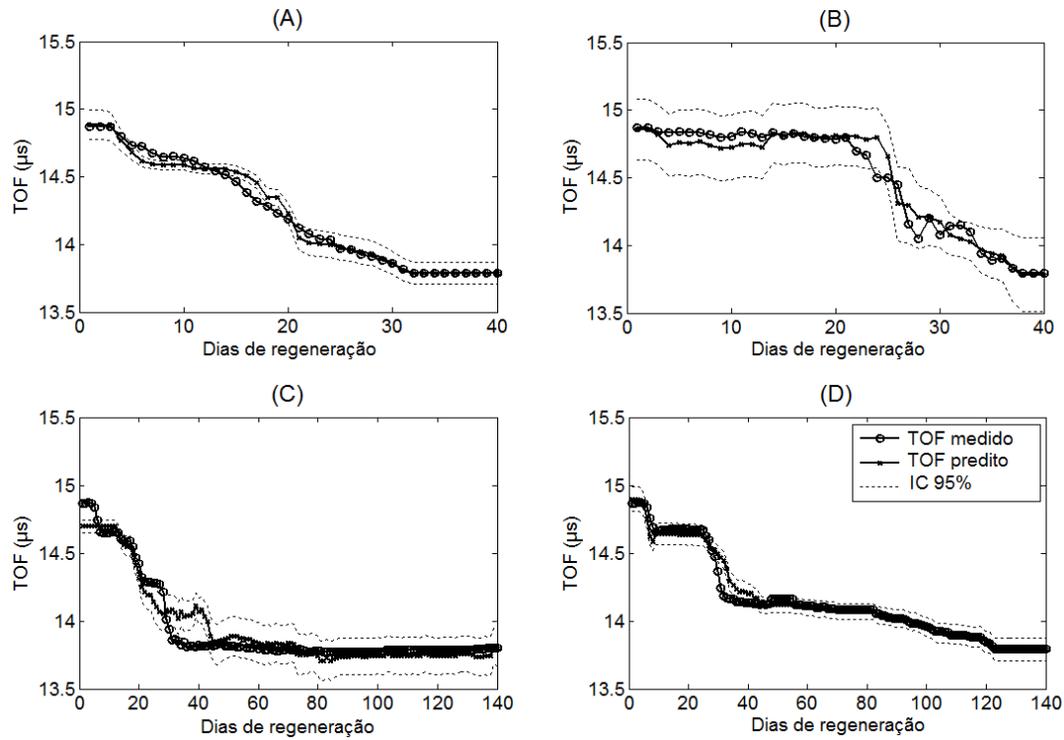
<sup>a</sup> ANOVA mostrou que as variáveis independentes são adequadas para explicar a variável dependente ( $p < 0,05$ );

<sup>b</sup> Todos os valores de  $R^2$  foram obtidos com  $p < 0,01$ .

A composição do calo não pode prever a perda de energia do sinal. O melhor resultado da regressão foi com M1, com 3 variáveis independentes ( $MC_{pb}$ ,  $Fib_{pb}$ ,  $IntB_{pl}$ ) e um  $R^2 = 0,74$ . Todos os outros modelos de regressão obtiveram um  $R^2 < 0,70$ , alcançando valores abaixo de 0,30. Isso indica que, para as simulações numéricas, não é possível explicar a variação da atenuação do sinal usando a composição do tecido de regeneração.

A figura VI.3 mostra as curvas dos melhores modelos de regressão para os quatro modelos de calo ósseo, com seus respectivos intervalos de confiança (95%). É interessante notar que eles tiveram como preditores a composição de placa do calo. Para M1 (figura VI.3A), os preditores foram  $MB_{pb}$ ,  $IntB_{pb}$  e  $Fib_{pl}$  ( $R^2 = 0,98$ ,  $RMSE = 0,05$ ). M2 explicou bem a variação no  $TOF_{FAS}$  (Fig. VI.3B) com as variáveis  $Fib_{pl}$  e  $MB_{pl}$  ( $R^2 = 0,94$ ,  $RMSE = 0,10$ ). Para M3 (figura VI.3C), os tecidos ósseos ( $MB_{pb}$ ,  $IntB_{pb}$  e  $Im_{pl}$ )

explicaram melhor o  $TOF_{FAS}$  ( $R^2 = 0,92$ ,  $RMSE = 0,04$ ) e  $MB_{pl}$ ,  $Fib_{pl}$  e  $MC_{pl}$  foram os melhores preditores para M4 ( $R^2 = 0,97$ ,  $RMSE \approx 0,00$ ).



**Figura VI.3 – Melhores modelos de regressão para cada modelo de calo (variável dependente:  $TOF_{FAS}$ ): (A) para M1,  $MB_{pl}$ ,  $IntB_{pl}$  e  $Fib_{pl}$  como preditores ( $R^2 = 0,98$ ,  $RMSE = 0,06$ ); (B) para M2,  $Fib_{pl}$  e  $MB_{pl}$  como preditores ( $R^2 = 0,94$ ,  $RMSE = 0,10$ ); (C) para M3,  $MB_{pl}$ ,  $IntB_{pl}$  e  $Im_{pl}$  como preditores ( $R^2 = 0,92$ ,  $RMSE = 0,04$ ); (D) para M4,  $MB_{pl}$ ,  $Fib_{pl}$  e  $MC_{pl}$  como preditores ( $R^2 = 0,97$ ,  $RMSE \approx 0,05$ ).**

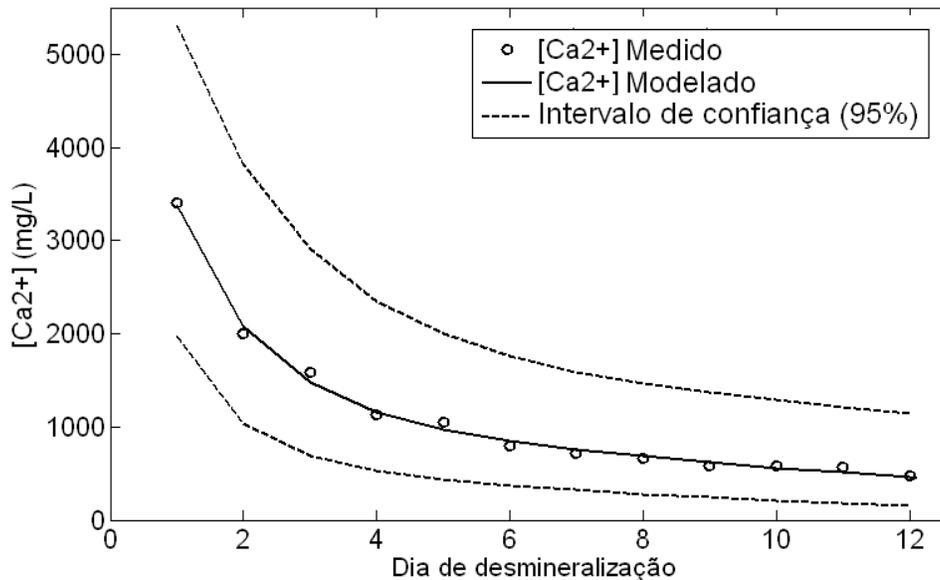
## VI. 2. EXPERIMENTO *IN VITRO*

### VI.2.1. Análise das soluções de EDTA- $Ca^{2+}$

A perda de cálcio  $Ca_p$  obtida pela análise de espectrometria das soluções de EDTA foi modelada usando a seguinte equação:

$$Ca_p(t) = 4800e^{-0,849t} + 1464e^{-0,096t} \quad (\text{VI.1})$$

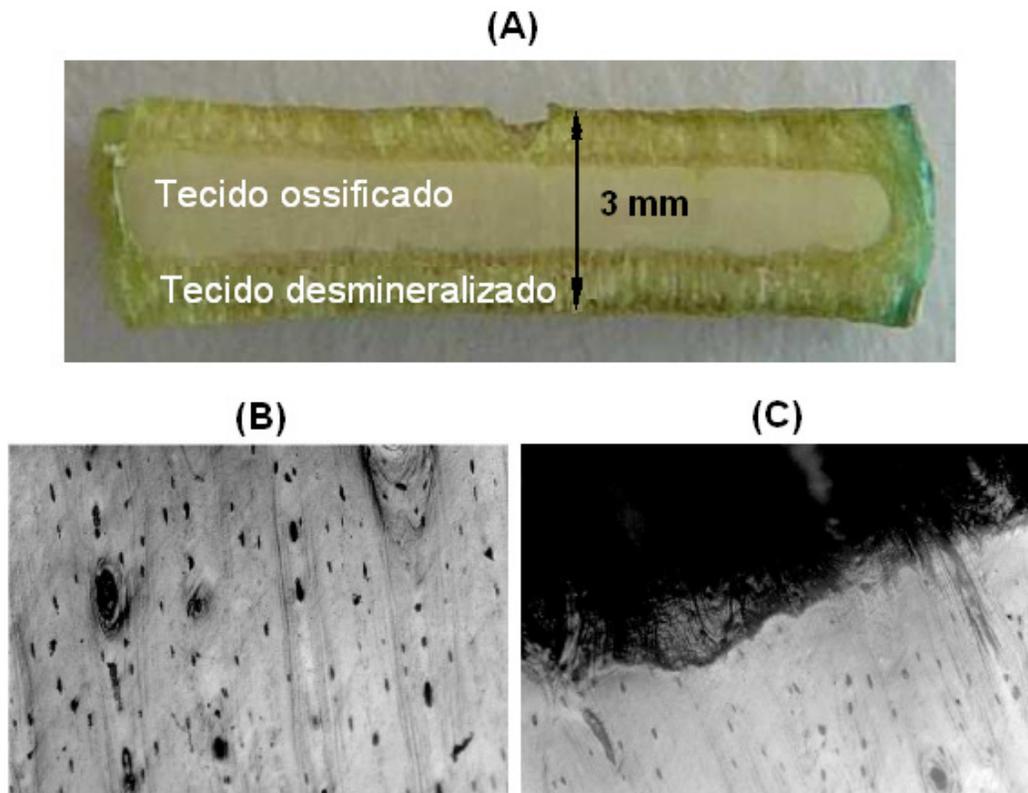
onde  $t$  = dia de desmineralização na solução de EDTA. O valor de  $R^2$  obtido foi de 0,99 ( $RMSE = 68,29$ ). O  $Ca_p$  medido e modelado, assim como o intervalo de confiança (95%), estão demonstrados na figura VI.4.



**Figura VI.4 – Concentração (perda) medida e modelada de cálcio ([Ca<sup>2+</sup>]), com os intervalos de confiança (95%) ( $R^2 = 0,99$ ,  $RMSE = 68,29$ ).**

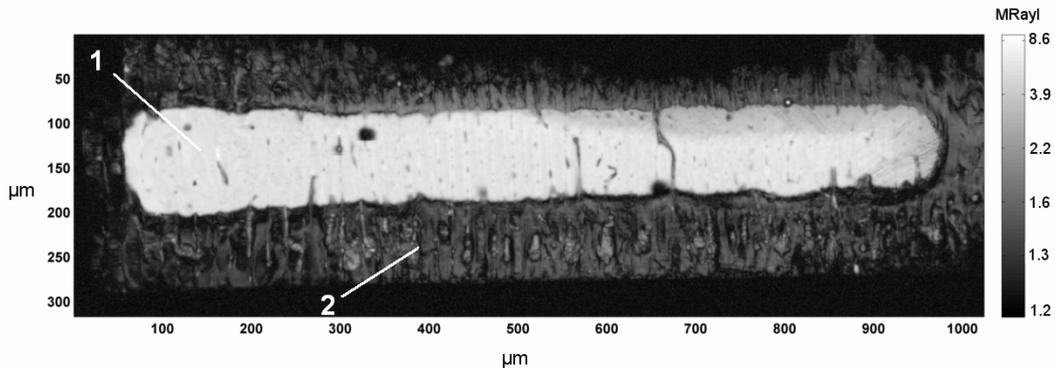
### VI.2.2. Análise por microscopia acústica (SAM)

A Figura VI.5 mostra a fatia após o dia 12 de desmineralização. Na Figura VI.5A, uma frente de desmineralização (contorno externo) e o centro ossificado podem ser observados. O centro ossificado e a interface tecido ossificado-desmineralizado podem ser apreciados com uma imagem microscópica (Figura VI.5B e VI.5C). A espessura inicial da fatia (3 mm) não foi alterada ao final do processo.



**Figura VI.5 – Imagens ópticas da fatia cortical após 12 dias de desmineralização com o protocolo EDTA: (A) vista macroscópica mostrando a frente de desmineralização e o centro ossificado. Abaixo, as vistas microscópicas da estrutura lamelar do centro ossificado (B) e a interface entre o tecido mineralizado e não mineralizado (C).**

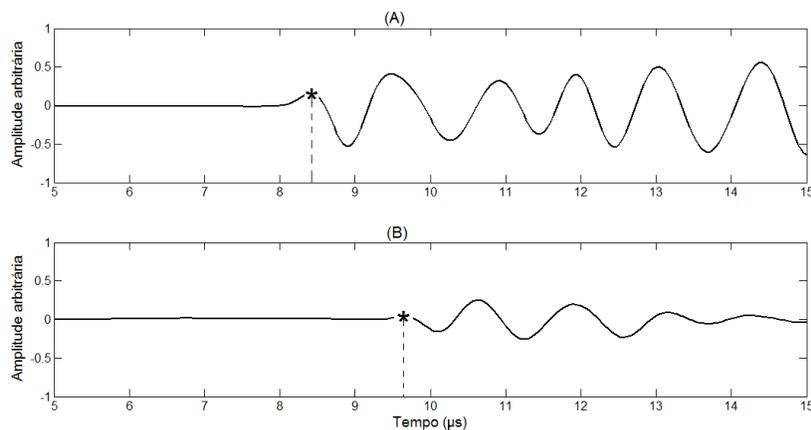
A imagem SAM é apresentada na Figura VI.6, com os valores de impedância acústica ( $Z$ ) em MRayl. A região desmineralizada e o centro ossificado podem ser identificados. A  $Z$  média no centro foi de  $5,9 \pm 0,4$  MRayl, enquanto que a média na região desmineralizada foi de  $1,4 \pm 0,1$  MRayl. A espessura da região de baixa mineralização foi de aproximadamente 1 mm.



**Figura VI.6 – Imagem SAM da fatia cortical, mostrando o centro ossificado (1) (impedância média =  $5,9 \pm 0,4$  MRayl) e a região desmineralizada (2) (impedância média =  $1,4 \pm 0,1$  MRayl).**

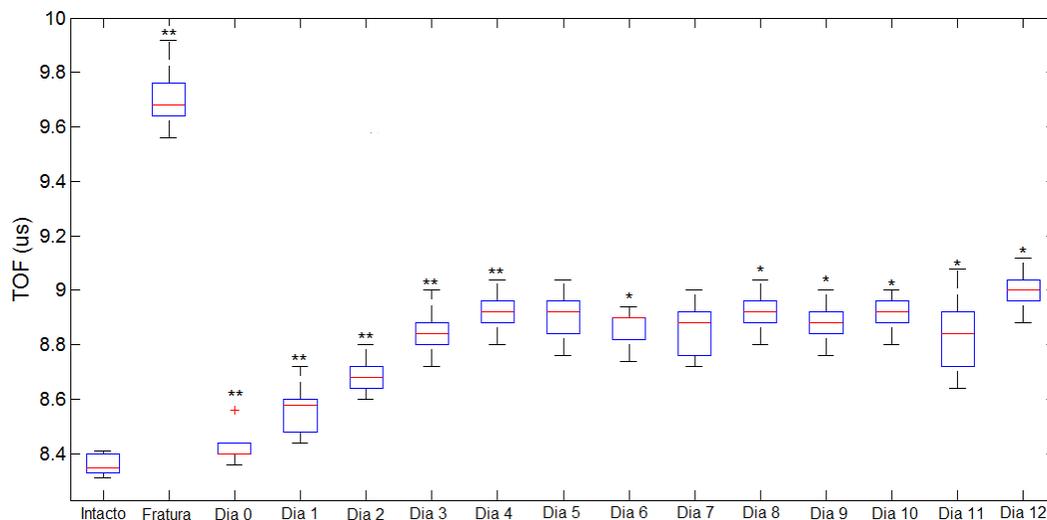
### VI.2.3. Estimativas do tempo de vôo (TOF)

A figura VI.7 mostra exemplos de sinais RF coletados no osso bovino intacto (VI.7A) e após a fratura realizada pela serra, com 3 mm de comprimento (VI.4B). É possível observar que a existência da fratura impõe um atraso no tempo de vôo da onda de US ( $9,64 \mu\text{s}$ ) em relação ao osso intacto ( $8,40 \mu\text{s}$ ).



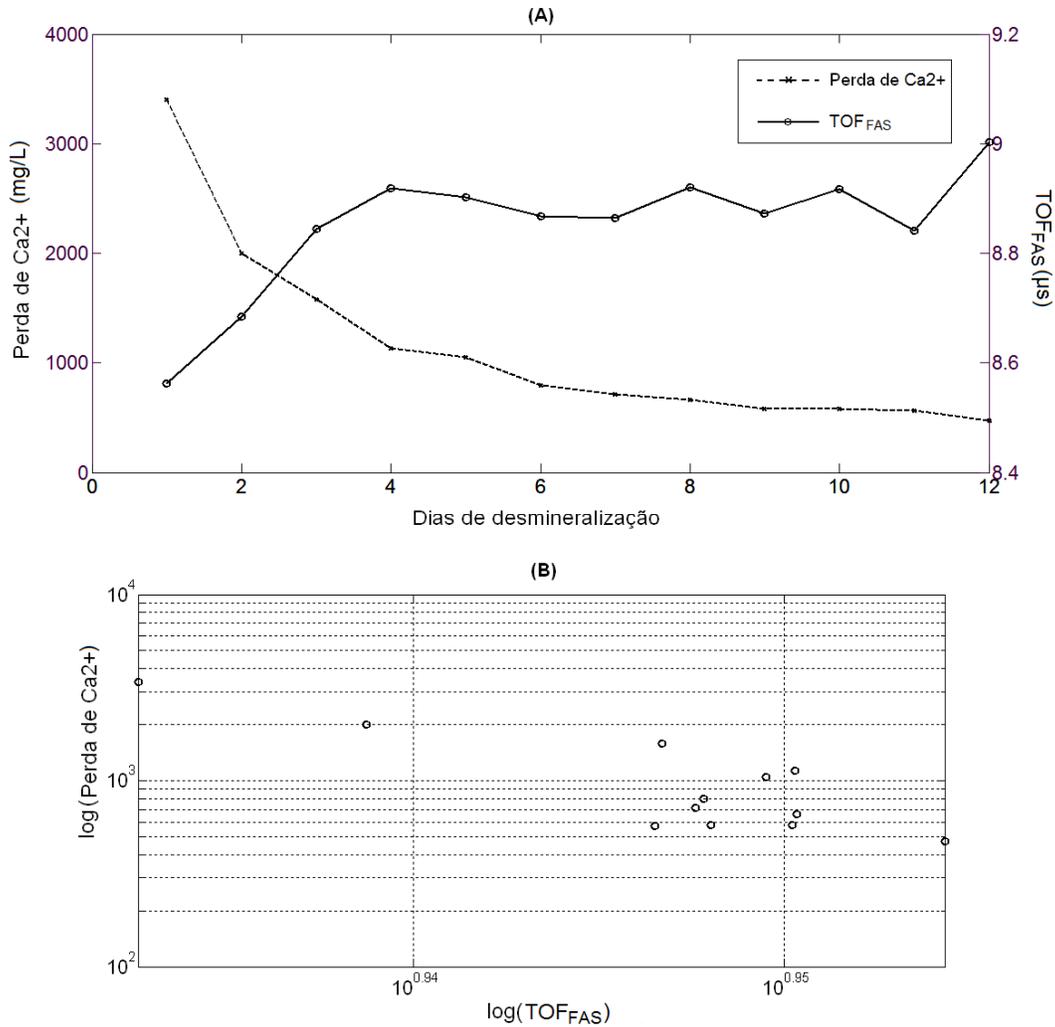
**Figura VI.7 – Sinais RF coletados a partir da amostra de osso bovino: (A) intacto, e (B) com fratura de 3 mm. Pode-se notar o atraso no tempo de vôo do FAS (\*) no caso de fratura ( $9,64 \mu\text{s}$ ) em relação ao caso intacto ( $8,40 \mu\text{s}$ ).**

Na figura VI.8, observam-se os *boxplots* para cada situação experimental (desde o osso intacto até o 12º dia de desmineralização). Um aumento significativo do  $TOF_{FAS}$  pode ser observado logo após a fratura ( $p < 0,001$ ). Quando a fatia cortical mineralizada (considerada como dia 0 na escala temporal) foi colocada no espaço de fratura, o valor médio do  $TOF_{FAS}$  foi similar ao valor obtido para o osso intacto, sugerindo que a interface (0,1 mm na simulação) que existe entre o osso e a fatia não influencia o TOF da propagação de US. Do dia 1 ao dia 4, um aumento nos valores de TOF com a progressiva desmineralização ( $p < 0,001$ ) foi observado. Variações diárias no TOF foram consideradas como estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em cada passo de desmineralização, exceto entre os dias 4 e 5, e dias 6 e 7.



**Figura VI.8 – Boxplots das distribuições do TOF para o osso intacto, fraturado e para cada dia de desmineralização (\* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,001$ ).**

A Figura VI.9 é uma comparação entre o  $TOF_{FAS}$  médio (início no dia zero) e as concentrações da perda de  $Ca^{2+}$ . O aumento do TOF segue marcadamente a diminuição do  $Ca^{2+}$  até o dia 4 (Figura VI.9A). O TOF e a desmineralização apresentou uma correlação moderada ( $r_s = -0,55$ ,  $p = 0,03$ ; Figure VI.9B).

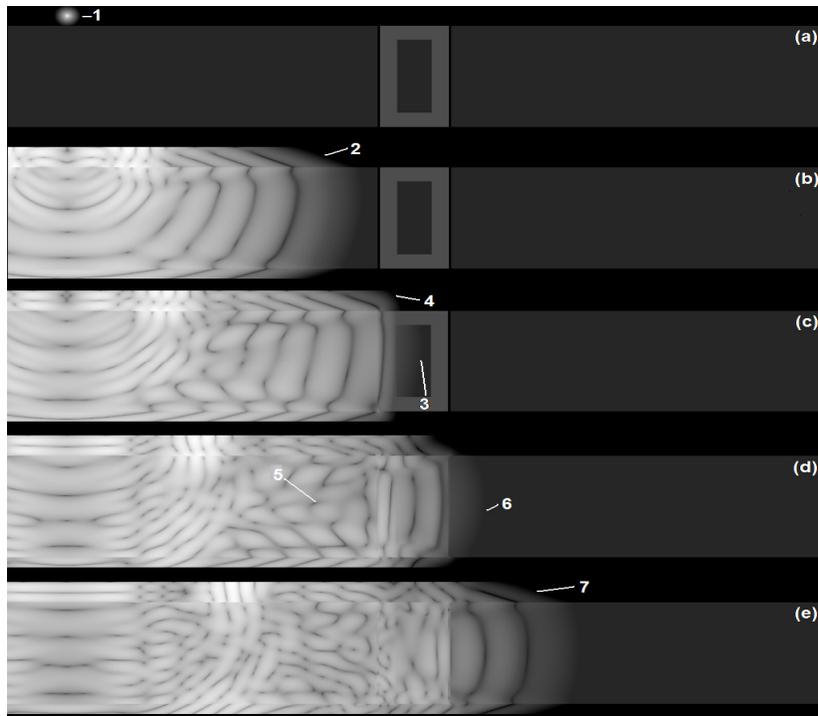


**Figura VI.9 – Perda de cálcio (mg/L) e  $TOF_{FAS}$  ( $\mu$ s) para cada dia de desmineralização: (A) após o 4º dia, o TOF responde com pequenos aumentos e decréscimos, até alcançar um aumento de 9  $\mu$ s no 12º dia; (B) um gráfico log-log entre essas variáveis ( $r_s = -0,55$ ,  $p = 0,03$ ).**

#### VI.2.4. Simulações

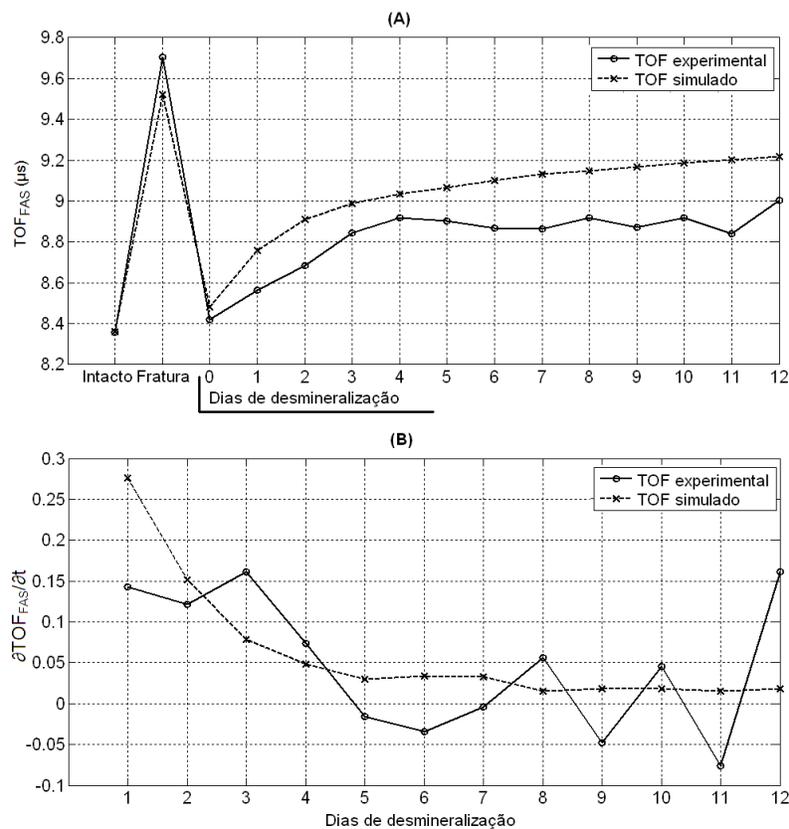
As imagens (*snapshots*) da simulação numérica usando o modelo de terceiro dia de desmineralização são apresentadas na Figura VI.10. Uma onda lateral é produzida com a propagação de US proveniente do emissor (Figura VI.10A), e pode ser vista na

Figura VI.10B. Na Figura VI.10C, a frente de onda pode ser observada dentro da fatia. Um padrão de interferência entre a onda incidente e a onda refletida na interface osso intacto/desmineralizado pode ser visto na Figura VI.10D, assim como a frente de onda entrando na segunda placa após a fratura. Finalmente, na Figura VI.10E, a onda lateral se propaga pela segunda placa.



**Figura VI.10 – Snapshots da simulação da propagação acústica no 3º dia de desmineralização (osso intacto em cinza escuro; osso desmineralizado em cinza claro; água em preto): (A)  $t = 0 \mu\text{s}$ : o emissor é identificado (1); (B)  $t = 4 \mu\text{s}$ : onda lateral se propagando na interface água-osso (2); (C)  $t = 5 \mu\text{s}$ : a frente de onda se apresenta dentro da fatia (3), e é possível observar a menor inclinação da onda quando atinge o tecido desmineralizado (4); (D)  $t = 6 \mu\text{s}$ : um padrão de interferência entre as ondas incidente e a refletida na interface osso mineralizado/desmineralizado pode ser vista (5), enquanto a frente de onda se propaga já na segunda placa (6); (E)  $t = 7 \mu\text{s}$ : a onda lateral se propagando na segunda placa (7).**

A Figura VI.11 mostra os valores de  $TOF_{FAS}$  simulados e experimentais (médias), que obtiveram uma correlação de  $r_s = 0,55$  ( $p = 0,06$ ). Pode-se notar que o  $TOF_{FAS}$  aumenta com a presença de descontinuidade (fratura), enquanto quase recupera seu valor inicial de osso intacto quando a fatia totalmente mineralizada é colocada de volta no espaço. Durante o processo de desmineralização, o  $TOF_{FAS}$  simulado apresenta taxas de aumento pequenas após o terceiro dia, e os valores são sempre maiores do que o caso experimental (Figura VI.11A), apresentando uma forte correlação com a perda de cálcio ( $r_s = -0,99$ ,  $p < 0,001$ ). Quando a variação do  $TOF_{FAS}$  com o tempo é obtida ( $\partial TOF_{FAS}/\partial t$ ), onde  $t =$  dia de desmineralização (Figura VI.11B), percebe-se que não há diferença significativa entre as variações nos valores experimentais e numéricos ( $p < 0,05$ ).



**Figura VI.11 – TOF experimental e simulado. Em (A),  $TOF_{FAS}$  é apresentado em valores absolutos ( $\mu s$ ). Em (B),  $\partial TOF_{FAS}/\partial t$  é observado do dia 1 ao dia 12.**

# CAPÍTULO VII

## DISCUSSÃO

Neste capítulo, as discussões serão expostas, primeiramente para os resultados obtidos com as simulações numéricas com os modelos de calo ósseo, e finalmente para os resultados com os experimentos *in vitro*.

### VII.1. SIMULAÇÕES

Primeiramente, o trabalho aplicou modelos de consolidação óssea de resposta diária para simular a propagação da onda em transmissão axial. A transmissão axial ultrassônica (TAU) tem sido proposta nos últimos anos, por estudos de simulação (com modelos de calos mais simples) e também com experimentos usando *phantoms* simples. As simulações nesses quatro modelos numéricos mais complexos apresentaram informações adicionais acerca da possível habilidade diagnóstica da TAU na avaliação do calo ósseo, durante o processo de regeneração, fornecendo exemplos de situações clínicas comuns, como não-uniões (pseudo-artroses) e atrasos na consolidação.

Um importante resultado é o comportamento decrescente consistente do tempo de vôo do FAS ( $TOF_{FAS}$ ) durante a regeneração óssea para todos os quatro modelos (figuras VI.1A e C; VI.2A e C). Esses achados corroboram o trabalho de PROTOPAPPAS *et al.* [40,41], onde usaram como parâmetro a velocidade de propagação (SOS), ao invés do tempo de vôo (TOF). Esses autores relataram um comportamento crescente da SOS durante a consolidação óssea. DODD *et al.* [44] também encontraram um aumento do TOF com o progressivo aumento no tamanho do espaço de fratura.

Ainda se demonstrou [40,41,46] que a geometria do calo (isto é, o formato externo do tecido de regeneração) não afeta as medidas do tempo de vôo do FAS ( $TOF_{FAS}$ ). No presente estudo, o terceiro modelo (M3) poderia ser um exemplo disso. O modelo apresenta uma reabsorção do calo externo (figura V.2B) que começa no 9º dia, mas é intensificada após o 48º dia (figura V.3C mostra a composição total do calo para esse modelo, e visualiza-se um decréscimo na concentração de osso maduro -  $MB$  após o 48º dia). De acordo com a figura VI.2A, o  $TOF_{FAS}$  permanece quase que constante após o 30º dia, mostrando que a reabsorção do calo (que leva a uma mudança na geometria) não altera o TOF da onda. Uma reabsorção intramedular do calo também parece não ter influência sobre os valores de TOF no quarto modelo (M4). A diminuição gradual no  $TOF_{FAS}$  até o último dia de regeneração (figura VI.2C) pode estar associada a uma grande quantidade de osso imaturo de placa ( $ImB_{pl}$ ) que diminui à medida que  $MB_{pl}$  aumenta após o 60º dia de regeneração (figura V.4D) (essas mudanças ocorrendo entre os fragmentos corticais da fratura, referentes ao trajeto da onda lateral). Além disso, um aumento do tecido da medula na região da reabsorção não afeta o  $TOF_{FAS}$ , como relatado por outros autores [44]. Outro aspecto importante acerca da medida do  $TOF_{FAS}$  é que este parâmetro parece ser sensível somente a mudanças na camada mais superficial do osso cortical. Isso pode ser visto em M3, onde uma não-união na região mais inferior do osso cortical é predita (figura V.2.B). Essa condição permanece até o dia 140 de regeneração. Contudo, os valores de  $TOF_{FAS}$  caracterizam uma condição normal (valores de TOF consistentes para  $MB$ ).

O tempo de propagação da onda pode ser influenciado pelo grau de mineralização do calo, principalmente na camada superficial do osso cortical. Um estudo recente [77] mostrou que altas taxas de formação de tecido ósseo são benéficas para a regeneração. Para todos os modelos, foi observado um aumento na concentração

de *MB* com posterior estabilização e, a partir desse ponto, o  $TOF_{FAS}$  começa a cair. A formação progressiva de tecido ósseo irá aumentar os valores de módulo de Young ( $E$ ) [91], e conseqüentemente irá aumentar os valores de velocidade longitudinal (equação V.2). Além disso, quase todos os modelos de predição tiveram o *MB* como um importante preditor (tabela VI.2). Contudo, valores basais de  $TOF_{FAS}$  não foram alcançados nos últimos dias de regeneração, pela presença de osso maduro, que possui menores valores de  $E$  em comparação com o osso cortical. Isso ocorreu porque foi designado apenas um valor de  $E$  para *MB* (6 GPa), e não uma faixa crescente de valores, como no estudo de ISAKSSON *et al.* [81].

Um atraso na consolidação óssea poderia ser identificado pelo  $TOF_{FAS}$ . Como mostrou a figura V.2A, um aumento na concentração de tecido fibroso entre os fragmentos corticais da fratura no segundo modelo - M2 (atraso na consolidação) teve um importante papel na manutenção do comportamento inalterado da curva de  $TOF_{FAS}$  (figura VI.1C), e a descida esperada da curva se inicia com a diminuição da concentração de tecido fibroso (*Fib*) e aumento do tecido ósseo. Por essa razão, a concentração de tecido fibroso de placa (*Fib<sub>PL</sub>*) foi um importante preditor do  $TOF_{FAS}$ , explicando, sozinho, 87% de sua variação).

Outra variável analisada nas simulações foi a atenuação da energia, medida pelo *Sound Pressure Level (SPL)*. O código de simulação não prevê a absorção de energia, de forma que a redução observada na amplitude da energia é devida principalmente às reflexões nas interfaces entre os diferentes tipos de tecido. DODD *et al.* [45] encontraram uma atenuação na amplitude do FAS com o aumento do espaçamento de fratura (composta por água). Afirmaram que a onda lateral que se propaga ao longo da placa é transmitida no local de fratura e é sujeita ao espalhamento e/ou difração. Uma superposição da onda reirradiada e das ondas difractadas estará presente, e será possível

então detectar isso dependendo da distância transdutor-placa e do ângulo da onda reirradiada. Finalmente, esses dois fatores dependerão da diferença de impedância entre a placa óssea e o tecido de regeneração.

Uma diminuição do  $SPL_{FAS}$  e  $SPL_{MAX}$  foi observada nos primeiros dias após fratura, seguida de diferentes padrões, dependendo do modelo (figuras VI.1 e VI.2).  $SPL_{MAX}$  frequentemente mostrou valores menores do que  $SPL_{FAS}$ , o que pode ser simplesmente explicado pelas suas proporções nas amplitudes do sinal. Três pontos diferentes são expostos aqui: (1) as curvas apresentam uma grande variação nos valores de  $SPL$  após a diminuição inicial. Uma possível razão para isso é que a estrutura interna do calo varie de acordo com cada modelo, levando a diferentes fenômenos de espalhamento/difração dentro da fratura; (2) na figura VI.1D, a curva de  $SPL_{FAS}$  cai após o 26° dia, e depois recupera seu padrão crescente. Isso pode ser explicado pela figura V.4B, que mostra, no mesmo dia, um aumento repentino de cartilagem madura de placa ( $MC_{pl}$ ) e uma diminuição de  $Fib_{pl}$ . Essa alteração poderia ter levado à diferentes padrões de reflexão, e o receptor poderia ter detectado uma perda de energia do sinal. Os valores são rapidamente recuperados à medida que  $MB_{pl}$  aumenta; (3) a diminuição inicial do  $SPL_{FAS}$  em M3 é também notável até o 30° dia (figura VI.2B). Como indicado na literatura [46], a geometria do calo influencia significativamente a amplitude do FAS. Como visto anteriormente (figura V.2B), M3 apresentou uma reabsorção gradual do calo, o que altera sua geometria. À medida que o processo progride,  $SPL_{FAS}$  recupera seus valores de base.

Um estudo mais recente de GHEDUZZI *et al.* [92] confirma os resultados do presente estudo, no tocante à redução da amplitude do FAS, além da descontinuidade da fratura, e as maiores mudanças na amplitude do sinal transmitido ocorrem nos estágios iniciais (estágio inflamatório e formação do calo) e nos estágios de remodelagem óssea.

Ademais, a inclusão de um calo externo causou experimentalmente e numericamente um aumento da perda de energia do sinal.

Os modelos de regeneração da fratura apresentados foram mais detalhadamente estudados pelos mesmos autores que os processaram previamente [81]. Os autores tentaram corroborar os algoritmos de mecano-regulação com dados *in vivo* de outro estudo com outros autores. Comparando qualitativamente lâminas histológicas com resultados de simulações por elementos finitos, observaram que nenhum dos modelos predisse integralmente os padrões de regeneração similares aos observados experimentalmente. O modelo que mais se assemelhou foi o M4. Contudo, os autores apresentaram algumas limitações do estudo *in vivo*, como a ausência de parâmetros histomorfométricos e uma grande variabilidade intra-grupo. Mais recentemente, em um estudo sobre a sensibilidade da diferenciação tecidual e regeneração óssea em relação às propriedades teciduais, os mesmos autores concluíram que a quantidade de osso formado depende da permeabilidade do tecido de granulação, do  $E$  da cartilagem e da permeabilidade do osso imaturo [79]. Todos esses achados indicam a importância de se determinar corretamente as propriedades mecânicas dos diferentes tipos teciduais envolvidos, com o intuito de validar as simulações.

Quanto a TAU, TALMANT *et al.* [28] realizaram um estudo sobre a técnica de transmissão axial bi-direcional *in vivo* em ossos intactos, no qual avaliaram a variabilidade intra- e inter-operador. Para uma velocidade do FAS variando de 3.821 a 4.110 m/s, encontraram uma precisão intra-operador de 0,4% (variabilidade de 15 m/s), e uma precisão inter-operador de 0,5% (variabilidade de 20 m/s). Aplicando o critério de mudança *LSC* (*least significant change*, ou mudança mínima significativa, um parâmetro usado para mostrar qual mudança é estatisticamente significativa, levando-se em consideração as limitações da técnica, e calculado usando a equação  $LSC = 2,8 \times$

erro de precisão [93]), são obtidos valores de 1,12% e 1,40% para as variabilidades intra- e inter-operador, respectivamente. Talvez não seja possível discriminar mudanças diárias no tecido de regeneração (variabilidade diária  $\ll$  1,40%), porém seja possível identificar alguns estágios específicos.

Em suma, os resultados apresentados aqui mostram alguns aspectos importantes sobre a aplicação e viabilidade da TAU como ferramenta de avaliação do processo de regeneração óssea pós-fratura. Foi demonstrado com as simulações que o tempo de vó da onda lateral pode talvez identificar um atraso na regeneração, contudo pode também negligenciar uma pseudo-artrose em camadas mais profundas do calo. A perda de energia do sinal fornece informação importante sobre a geometria do calo (reabsorção tecidual), e talvez possa detectar a diferenciação tecidual em uma situação *in vivo*, onde a absorção da energia ocorre. Importante ressaltar que não foram levadas em consideração variações na espessura cortical e frequência do pulso (o que poderia levar a formação das ondas guiadas), assim como as propriedades anisotrópicas do osso cortical.

Os resultados acima discutidos foram publicados em revista especializada [94].

## **VII.2. EXPERIMENTO *IN VITRO***

Até o presente momento, este é o primeiro trabalho explorando mineralização do calo ósseo e seu efeito na propagação por transmissão axial ultrassônica (TAU). Em uma tentativa de mimetizar inversamente o processo de mineralização do tecido de regeneração no espaço de fratura com uma amostra de tecido ósseo, representativa do caso geral, alguns resultados experimentais e de simulação interessantes podem ser destacados.

Um protocolo de desmineralização baseado no EDTA foi usado nesse estudo. Esse método já tem sido bastante usado para a extração de íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) do tecido ósseo [88,95]. Na Figura VI.4 é possível observar que a perda de  $\text{Ca}^{2+}$  segue uma curva exponencial, como descrito por BOWMAN *et al.* [95], que desenvolveram um estudo em osso cortical usando uma solução de EDTA a 0,5 M, modelando a desmineralização com uma função exponencial decrescente ( $y = \exp(-t/3,5)$ ), onde  $y$  é a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  na solução de EDTA, e  $t$  é o tempo de desmineralização em dias. O protocolo usado nesse trabalho produziu uma perda de  $\text{Ca}^{2+}$  que pode ser melhor modelada usando duas exponenciais ( $R^2 = 0,99$ ).

A imagem de SAM foi capaz de mostrar alguns importantes aspectos sobre a amostra. O tecido desmineralizado pode ser observado na Figura VI.5. Após 12 dias de imersão em solução de EDTA, a fatia óssea apresentou uma camada periférica desmineralizada de aproximadamente 1 mm de espessura, com valores de impedância ( $Z$ ) baixos ( $Z < 2$  MRayl), circundando um centro de tecido mineralizado com  $Z$  médio de 5,9 MRayl (Figura VI.6). Esses achados sugerem que, para amostras de osso cortical com espessura maior do que 1 mm, pode não ser possível a obtenção de uma desmineralização completa a curto prazo, com a solução de EDTA. Ademais, a impedância do centro foi abaixo das apresentadas na literatura. Por exemplo, KOTHA *et al.* [96] encontraram um valor médio de 8,19 MRayl, e ZIMMERMAN *et al.* [97] acharam um valor de 9,29 MRayl, ambos usando SAM à 50 MHz. Uma razão possível seria o corte realizado pela serra, que causa um desarranjo na estrutura lamelar, consequentemente afetando as propriedades mecânicas.

Os resultados resumidos na Figura VI.8 evidenciaram que as estimativas de  $TOF_{FAS}$  são sensíveis ao grau de desmineralização do osso cortical. Em primeiro lugar, a presença de um espaço que mimetiza uma fratura, preenchido por um fluido,

aumentou o valor de tempo de vôo, em concordância com a literatura [45]. Quando a fatia de osso mineralizada foi colocada novamente no espaço de fratura, o TOF quase recuperou seu valor inicial, modificado insignificamente pela presença da interface entre a placa cortical e a fatia. Nos primeiros quatro dias, a desmineralização resultou em um aumento progressivo e significativo do  $TOF_{FAS}$  (e uma diminuição associada da velocidade do FAS, não mostrada), seguindo a rápida perda de cálcio. Essa tendência era esperada, uma vez que valores menores de velocidade longitudinal são obtidos com um grau de mineralização decrescente [98-100]. A partir do dia 4, o  $TOF_{FAS}$  alcançou um platô, apesar de uma perda de cálcio decrescente contínua (Figura VI.9A). Uma possível explicação poderia ser a fraca sensibilidade da TAU em discriminar variações pequenas no conteúdo mineral tecidual. Contudo, os primeiros quatro dias de perda de cálcio poderiam representar a possibilidade de se avaliar a influência do aumento da concentração mineral no tecido de regeneração da fratura [78,83] nas medidas de US. Ao se realizarem simulações numéricas da propagação do US neste presente trabalho, MACHADO *et al.* [94] mostraram que o  $TOF_{FAS}$  pode ser sensível ao aumento do tecido ósseo maduro após o 20º dia de regeneração óssea, o que pode indicar, por exemplo, o início, ou mesmo alguns pontos temporais da regeneração, com objetivos diagnósticos e prognósticos. A mineralização do osso cortical nas camadas mais superficiais afeta a velocidade do FAS, e o tecido ósseo maduro (compondo o calo ossificado) pode explicar sozinho a variação no TOF com um  $R^2 = 0,70$  ( $p < 0,001$ ).

Uma correlação moderada entre a perda de  $Ca^{2+}$  e  $TOF_{FAS}$  pode ser vista na Figura VI.9. Após o 4º dia, pequenas taxas de desmineralização não parecem influenciar as medidas de TOF. Em conjunto com a análise de SAM (Figura VI.6), as estimativas constantes de TOF nos últimos dias da imersão com EDTA podem ser explicadas pelas pequenas taxas de perda de  $Ca^{2+}$ , o que pode indicar pequenas taxas de

desmineralização espacial, influenciando insignificamente as medidas de TOF, considerando a frequência aplicada de 1 MHz.

As simulações computacionais têm sido amplamente aplicadas no campo da caracterização tecidual paramétrica por US para auxiliar os pesquisadores na compreensão dos diferentes fenômenos físicos que permeiam a propagação da onda acústica no meio biológico [75]. No presente trabalho, um modelo simples foi proposto para descrever o FAS se propagando em transmissão axial ao longo do eixo cortical, no qual uma descontinuidade foi introduzida na forma de uma fatia óssea cortical mineralizada. O processo de desmineralização foi modelado com uma camada de tecido conectivo inicial, que cresce progressivamente da periferia ao centro da amostra, com os passos espaciais seguindo a curva exponencial obtida da análise das soluções de EDTA. A interface entre a placa e a fatia também foi considerada. Pode ser observado (Figura VI.11) que o TOF simulado apresentou valores maiores em comparação com os resultados experimentais. Isso pode ser explicado pela simples abordagem numérica, que pode ser altamente sensível às pequenas variações espaciais de desmineralização. Seria possível hipotetizar que a tendência a valores constantes do TOF experimental após o 4º dia de desmineralização seja devida à pouca sensibilidade da técnica ultrassônica em perceber pequenas na desmineralização da amostra, o que poderia ser um ponto interessante para pesquisas futuras. Ao possuir duas camadas com características elásticas diferentes, também existe a possibilidade de a onda verificada nas simulações acima da fatia óssea não ser a onda lateral, e sim algum modo de Lamb. Por outro lado, pelos resultados da derivada de TOF em relação ao tempo são mostrados do dia 1 ao dia 12 (Figure VI.11B), pode-se observar que as taxas de variação dos resultados experimentais e de simulação concordam satisfatoriamente.

A propagação do US pode ser visualizada nos *snapshots* da Figura VI.10. Considerando que a espessura cortical é de 5 mm, e para um comprimento de onda de aproximadamente 4 mm no osso (@1MHz), pode-se dizer que a placa óssea é grande o suficiente, e para uma variação limitada de distância emissor-receptor, o FAS corresponde à onda lateral (Figura VI.10B) [48], se propagando com velocidade de compressão longitudinal  $c$  dada por  $c = \sqrt{c_{33}/\rho}$ , onde  $c_{33}$  é o coeficiente de rigidez para a direção do feixe (o índice 3 representa o eixo ósseo  $z$ ), e  $\rho$  é a densidade. Quando a onda interage com a fatia óssea, fenômenos complexos ocorrem, como reflexões, espalhamento, ou mesmo a formação de ondas de Lamb através da zona desmineralizada, o que provavelmente afeta a propagação da onda lateral. Esses fenômenos são afetados pela perda de  $\text{Ca}^{2+}$ , mas o fato de  $c$  diminuir durante o processo de desmineralização indica que  $c_{33}$  diminui mais rápido do que  $\rho$ . A elucidação desses tópicos pode ser proposta em investigações futuras. Outro ponto importante é a inclinação menor da frente de onda ao passar pelo tecido desmineralizado, devido à menor velocidade longitudinal do meio, consequentemente aumentando o tempo de vôo, fato este percebido pelas mensurações em TAU.

Já foi demonstrado com simulações que o  $TOF_{FAS}$  pode ser sensível às alterações na camada mais superficial do osso cortical [94]. Com um modelo numérico de fratura, no qual uma não-união foi representada na região inferior do osso cortical, o  $TOF_{FAS}$  caracterizou o tecido de regeneração como estando em uma condição normal. Na presente investigação, não foi possível reproduzir essa situação, consequentemente representando outro tópico interessante para ser desenvolvido *a posteriori*.

A diferenciação tecidual que ocorre durante uma fratura é um processo bem conhecido. O calo é uma estrutura formada por diversos tipos de tecidos, incluindo fibrocartilagem, cartilagem, tecido de granulação, osso intramembranoso e cartilagem

calcificada [85]. A formação óssea no calo mole se inicia a certa distância da fratura, na superfície do perióstio e do endóstio do osso cortical. A ossificação segue em direção ao centro da fratura. As ossificações intramembranosa e endocondral podem ser observadas, e somente um pequeno espaço de tecido não-ossificado preenche a fenda do calo no estágio tardio de regeneração [64,65,81]. Mais recentemente, LIU *et al.* [101] analisaram as características da partícula mineral no calo mineralizado em carneiros, mostrando um processo de formação óssea complexo com um tecido ósseo imaturo altamente desordenado, juntamente com a deposição de tecido lamelar. A configuração *in vitro* apresentada no presente trabalho apresentou uma frente de desmineralização exponencial, progredindo da periferia em direção ao centro do osso cortical. Logo, não foi possível generalizar conclusões sobre a formação da ponte óssea externa (*external bone bridging*) ou mesmo sobre a mineralização em direção ao centro do espaço de fratura. No entanto, um aspecto interessante surge, uma vez que o  $TOF_{FAS}$  simulado foi influenciado somente pela espessura do tecido desmineralizado (o único parâmetro que mudou durante as simulações numéricas), em conjunto com uma concordância com dados experimentais, por consequência indicando que a TAU pode talvez conseguir discriminar estágios iniciais da regeneração óssea, marcados por variações minerais espaciais.

A utilização de apenas uma amostra traz uma limitação ao estudo. Não se sabe a procedência do animal de onde foi extraída a amostra óssea. Em estudos futuros podem-se realizar experimentos com um maior número de amostras, permitindo assim uma análise estocástica (resultados probabilísticos) em detrimento dos resultados determinísticos apresentados no presente estudo.

A ausência da geometria do calo também é uma limitação. Porém, usando simulações numéricas, alguns investigadores mostraram que o TOF não é influenciado

por mudanças geométricas no calo [40,94]. Já as ondas guiadas, ou ondas de Lamb [40,41] e a amplitude de energia do FAS [92] podem ser alteradas. Mesmo assim, achados importantes foram alcançados no que concerne ao efeito do grau de mineralização nas medidas de TAU, representando a base para futuros trabalhos na aplicação desta técnica na avaliação e acompanhamento de fraturas ósseas.

## CAPÍTULO VIII

### CONCLUSÃO

Este trabalho desenvolveu um estudo sobre a aplicação da transmissão axial ultrassonora na avaliação das fraturas ósseas, utilizando duas abordagens: simulações computacionais envolvendo modelos numéricos de calos ósseos mais complexos; e uma abordagem experimental, onde se propõe um modelo de desmineralização para avaliar o efeito da concentração de cálcio do tecido ósseo nas estimativas de tempo de vôo da onda de ultrassom, em transmissão axial.

Além de ter corroborado resultados já publicados na literatura, foi possível identificar alguns aspectos inéditos da influência da composição do calo ósseo nas medidas ultrassonoras. Por exemplo, o grau de mineralização influencia o tempo de vôo da onda, o que foi visto tanto no estudo computacional como no estudo *in vitro*. A composição tecidual do calo (proporção de tecido fibroso, cartilaginoso e/ou ósseo), e a presença de alterações patológicas, podem levar a uma variação característica do tempo de vôo, o que pode significar um parâmetro diagnóstico de grande utilidade na prática clínica.

O modelo experimental apresentado nesse trabalho é original. Foi possível avaliar a sensibilidade da técnica em uma situação controlada (a desmineralização diária da fatia óssea cortical). A evolução dos parâmetros de tempo de vôo e atenuação do sinal ultrassonoro pode indicar o progresso do processo de regeneração óssea, o que pode ser utilizado na clínica para o diagnóstico e acompanhamento de pacientes com esse problema.

Estudos futuros são necessários para solucionar algumas questões, como por exemplo qual seria o efeito da presença de tecido mole, ou mesmo da variação da

temperatura ou fluxo sanguíneo dentro da fratura, na avaliação por transmissão axial ultrassonora. Também se sugere o controle da desmineralização utilizando a microscopia ultrassônica após cada fase de desmineralização, para que a informação sobre o gradiente espacial de perda de cálcio da amostra seja usada na análise dos dados, ou mesmo para ser aplicada em novas simulações. A utilização de outros parâmetros, como atenuação, reflexão e análise de ondas guiadas, também é de interesse.

Outras possibilidades seriam: realizar estudos comparativos com radiografias simples, tomografia e densitometria; efetuar estudos com peças cadavéricas mantidas em formol, onde o tecido mole poderia ser rebatido ou não para as medidas de ultrassom; fazer efetivamente o acompanhamento *in vivo* do processo cicatricial de uma fratura.

Os achados apresentados sobre o efeito da mineralização na transmissão axial ultrassonora, juntamente com as simulações realizadas, podem ser entendidos como uma base para estudos futuros da aplicação dessa técnica na avaliação de fraturas ósseas *in vivo*. Acredita-se ainda que seria possível uma aproximação inversa para deduzir características do problema à partir de resultados experimentais, tendo como parâmetros, por exemplo, as concentrações de cada tipo de tecido no calo e características geométricas da fratura.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] SHUNG, K.K., SMITH, M.B., TSUI, B., *Principles of Medical Imaging*, 1 ed. San Diego, California, USA, Academic Press, 1992.
- [2] FISH, P., *Physics and Instrumentation of Diagnostic Medical Ultrasound*, 1 ed. West Sussex, England, John Wiley & Sons, 1990.
- [3] SZABO, T.L., *Diagnostic Ultrasound Imaging: Inside Out*, 1st ed., Burlington, USA, Elsevier Academic Press, 2004.
- [4] COBBOLD, R.S.C., *Foundations of Biomedical Ultrasound*, 1<sup>st</sup> ed., New York, USA, Oxford University Press, 2007.
- [5] HOTTIER, F., BERNATETS, J.L., “Estimation of ultrasonic attenuation in biological tissues”, *Acta Electronica*, v. 26, n. 1-2, pp. 33-58, 1984.
- [6] DUCK, F.A., BAKER, A.C., STANITT, H.C., *Ultrasound in medicine*, 1 ed. Philadelphia, USA, IOP Publishing Ltd., UK, 1998.
- [7] YEH, W.C., HUANG, S.W., LI, P.C., “Liver fibrosis grade classification with B-mode ultrasound”, *Ultrasound in Med. & Biol*, vol. 29, n. 9, pp. 1229-1235, 2003.
- [8] WELLS, P.N.T., “Current status and future technical advances of ultrasonic imaging”, *IEEE Engineering in Medicine and Biology*, pp. 14-20, Set./Out., 2000.

- [9] LAUGIER, P., “Instrumentation for in vivo ultrasonic characterization of bone strength”, *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, vol. 55, n. 6, pp. 1179-1196, 2008.
- [10] LAUGIER, P., DROIN, P., LAVAL-JEANTET, A.M., *et al.*, “In vitro assessment of the relationship between acoustic properties and bone mass density of the calcaneus by comparison of ultrasound parametric imaging and QCT”, *Bone*, vol. 20, n. 2, pp. 157-165, 1997.
- [11] ROUX, C., FOURNIER, B., LAUGIER, P., *et al.*, “Broadband ultrasound attenuation imaging: A new imaging method in osteoporosis”, *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 11, n. 8, pp. 1112-1118, 1996.
- [12] JENSON, F., PADILLA, F., BOUSSON, V., *et al.*, “In vitro ultrasonic characterization of human cancellous femoral bone using transmission and backscatter measurements: Relationships to bone mineral density”, *Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 119, n. 1, pp. 654-663, 2006.
- [13] DROIN, P., BERGER, G., LAUGIER, P., “Velocity dispersion of acoustic waves in cancellous bone”, *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, vol. 45, n. 3, pp. 581-592, 1998.
- [14] NICHOLSON, P.H.F., LOWET, G., LANGTON, J., *et al.*, “A comparison of time-domain and frequency domain approaches to ultrasonic velocity measurements in trabecular bone”, *Physical Medicine and Biology*, vol. 41, n. 11, pp. 2421-2435, 1996.

- [15] STRELITZKI, R., EVANS, J. A., “On the measurement of the velocity of ultrasound in the os calcis using short pulses”, *European Journal of Ultrasound*, vol. 4, n. 3, pp. 205-213, 1996.
- [16] WEAR, K., “The effects of frequency-dependent attenuation and dispersion on sound speed measurements: Applications in human trabecular bone”, *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, vol. 47, n. 1, pp. 265-273, 2000.
- [17] WEAR, K.A., “A method for improved standardization of in vivo calcaneal time-domain speed-of-sound measurements”, *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, vol. 55, n. 7, pp. 1473-1479, 2008.
- [18] JENSON, F., PADILLA, F., LAUGIER, P. “Prediction of frequency-dependent ultrasonic backscatter in cancellous bone using statistical weak scattering model”, *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 29, n. 3, pp. 455-464, 2003.
- [19] CHAFFAÏ, S., ROBERJOT, V., PEYRIN, F., *et al.*, “Frequency dependence of ultrasonic backscattering in cancellous bone: Autocorrelation model and experimental results”, *Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 108, n. 5, pp. 2403-2411, 2000.
- [20] WEAR, K.A., GARRA, R.S., “Assessment of bone density using ultrasonic backscatter”, *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 24, n. 5, pp. 689-695, 1998.

- [21] MACHADO, C.B., MEZIRI, M., PEREIRA, W.C.A., *et al.*, “Characterization of *in vitro* healthy and pathological human liver tissue periodicity using backscattered ultrasound signals”, *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 32, n. 5, pp. 649-657, 2006.
- [22] MOILANEN, P., NICHOLSON, P.H.F., KILAPPA, V., *et al.*, “Assessment of the cortical bone thickness using ultrasonic guided waves: modeling and *in vitro* study”, *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 33, n. 2, pp. 254-262, 2007.
- [23] MOILANEN, P., NICHOLSON, P.H.F., KILAPPA, V., *et al.*, “Measuring guided waves in long bones: modeling and experiments in free and immersed plates”, *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 32, n. 5, pp. 709-719, 2006.
- [24] GLÜER, C.C., “A new quality of bone ultrasound research”, *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, vol. 55, n. 7, pp. 1524-1528, 2008.
- [25] BLAIN, H., CHAVASSIEUX, N., PORTERO-MUZY, F., *et al.*, “Cortical and trabecular bone distribution in the femoral neck in osteoporosis and osteoarthritis”, *Bone*, vol. 43, n. 5, pp. 862-868, 2008.
- [26] BOSSY, E., TALMANT, M., LAUGIER, P., “Three-dimensional simulations of ultrasonic axial transmission velocity measurement on cortical bone models”, *Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 115, n. 5, pp. 2314-2324, 2004.
- [27] FOLDES, A.J., RIMON, A., KEINAN D.D., *et al.*, “Quantitative ultrasound of the tibia: A novel approach for assessment of bone status”, *Bone*, vol 17, n. 4, pp. 363-367, 1995.

- [28] TALMANT, M., KOLTA, S., ROUX, C., *et al.*, “In vivo performance evaluation of bi-directional ultrasonic axial transmission for cortical bone assessment”, *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 35, n. 6, pp. 912-919, 2009.
- [29] BARKMANN, R., KANTOROVICH, E., SINGAL, C., *et al.*, “A new method for quantitative ultrasound measurements at multiple sites: First results of precision and fracture discrimination”, *Journal of Clinical Densitometry*, vol. 3, n. 1, pp. 1-7, 2000.
- [30] BOSSY, E., TALMANT, M., PEYRIN, F., *et al.*, “An in vitro study of the ultrasonic axial transmission technique at the radius: 1 MHz velocity measurements are sensitive to both mineralization and intracortical porosity”, *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 19, n. 9, pp. 1548-1556, 2004.
- [31] MULLER, M., MOILANEN, P., BOSSY, E., *et al.*, “Comparison of three ultrasonic axial transmission methods for bone assessment”, *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 31, n. 5, pp. 633-642, 2005.
- [32] ROSE, F.R.A.J., OREFFO, R.O.C. “Bone tissue engineering: hope vs. hype”, *Biom Biop Res Commun*, vol. 292, n. 1, pp. 1-7, 2002.
- [33] KANAKARIS, N.K., GIANNOUDIS, P.V. “The health economics of the treatment of long-bone non-unions”. *Injury*, vol. 385, suppl. 2, pp. S77-S84, 2007.
- [34] SHELFEBINE, S.J., SIMON, U., CLAES, L., *et al.*, “Prediction of fracture callus mechanical properties using micro-CT images and voxel-based finite element analysis”, *Bone*, vol. 36, n. 3, pp. 480-488, 2005.
- [35] RICHARDSON, J.B., KENWRIGHT, J., CUNNINGHAM, J.L. “Fracture stiffness

measurement in the assessment and management of tibial fractures”. *Clin Biomech*, vol. 7, n. 8, pp. 75-79, 1992.

[36] FREEMAN, T.A., PATEL, P., PARVIZI, J., *et al.*, “Micro-CT analysis with multiple thresholds allows detection of bone formation and resorption during ultrasound-treated fracture healing”, *Journal of Orthopedical Research*, vol. 27, n. 5, pp. 673-679, 2009.

[37] MORGAN, E.F., MASON, Z.D., CHIEN, K.B., *et al.*, “Micro-computed tomography assessment of fracture healing: Relationships among callus structure, composition and mechanical function”, *Bone*, vol. 44, n. 2, pp. 335-344, 2009.

[38] PROTOPAPPAS, V.C., BAGA, D.A., FOTIADIS, D.I., *et al.*, “An ultrasound wearable system for the monitoring and acceleration of fracture healing in long bones”, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 52, n. 9, pp. 1597-1608, 2005.

[39] NJEH, C.F., KEARTON, J.R., HANS, D., *et al.*, “The use of quantitative ultrasound to monitor fracture healing : a feasibility study using phantoms”, *Medical Engineering & Physics*, vol. 20, n. 10, pp. 781-786, 1998.

[40] PROTOPAPPAS, V.C., FOTIADIS, D.I., MALIZOS, K.N., “Guided ultrasound wave propagation in intact and healing long bones”, *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 32, n. 5, pp. 693-708, 2006.

[41] PROTOPAPPAS, V.C., KOURTIS, I.C., KOURTIS, L.C., *et al.*, “Three-dimensional finite element modeling of guided ultrasound wave propagation in intact and healing long bones”, *Journal of the Acoustical Society of America*,

vol. 121, n. 6, pp. 3907-3921, 2007.

- [42] VAVVA, M.G., PROTOPAPPAS, V.C., GERGIDIS, L.N., *et al.*, “The effect of boundary conditions on guided wave propagation in two-dimensional models of healing bone”, *Ultrasonics*, vol. 48, n. 6-7, pp. 598-606, 2008.
- [43] PROTOPAPPAS, V.C., VAVVA, M.G., FOTIADIS, D.I., *et al.*, “Ultrasonic monitoring of bone fracture healing”, *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, vol. 55, n. 6, pp. 1243-1255, 2008.
- [44] DODD, S.P., CUNNINGHAM, J.L., MILES, A.W., *et al.*, “Ultrasound transmission loss across transverse and oblique bone fractures: An in vitro study”, *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 34, n. 3, pp. 454-462, 2008.
- [45] DODD, S.P., CUNNINGHAM, J.L., MILES, A.W., *et al.*, “An in vitro study of ultrasound signal loss across simple fractures in cortical bone mimics and bovine cortical bone samples”, *Bone*, vol. 40, n. 3, pp. 656-661, 2007.
- [46] DODD, S.P., MILES, A.W., GHEDUZZI, S., *et al.*, “Modeling the effects of different fracture geometries and healing stages on ultrasound signal loss across a long bone fracture”, *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering*, vol. 10, n. 5, pp. 371-375, 2007.
- [47] CAMUS, E., TALMANT, M., BERGER, G., *et al.*, “Analysis of the axial transmission technique for the assessment of skeletal status”, *Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 108, n. 6, pp. 3058-3065, 2000.
- [48] BOSSY, E., TALMANT, M., LAUGIER, P., “Effect of bone cortical thickness on velocity measurements using ultrasonic axial transmission: A 2D simulation

study”, *Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 112, n. 1, pp. 297-307, 2002.

[49] TATARINOV, A., SARVAZYAN, N., SARVAZYAN, A., “Use of multiple acoustic wave modes for assessment of long bones: Model study”, *Ultrasonics*, vol. 43, n. 8, pp. 672-680, 2005.

[50] PROSSER, W.H., SEALE, M.D., SMITH, B.T., “Time-frequency analysis of the dispersion of Lamb modes”, *Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 105, n. 5, pp. 2669-2676, 1999.

[51] TA, D., HUANG, K., WANG, W., *et al.*, “Identification and analysis of multimode guided waves in tibia cortical bone”, *Ultrasonics*, vol. 44, sup. 1, pp. e279-e284, 2006.

[52] MOILANEN, P., TALMANT, M., BOUSSON, V., *et al.*, “Ultrasonically determined thickness of long cortical bones: Two-dimensional simulations of in vitro experiments”, *Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 122, n. 3, pp. 1818-1826, 2007.

[53] MOILANEN, P., TALMANT, M., NICHOLSON, P.H.F., *et al.*, “Ultrasonically determined thickness of long cortical bones: Three-dimensional simulations of in vitro experiments”, *Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 122, n. 4, pp. 2439-2445, 2007.

[54] MOILANEN, P., TALMANT, M., KILAPPA, V., *et al.*, “Modeling the impact of soft tissue on axial transmission measurements of ultrasonic guided waves in human radius”, *Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 124, n. 4, pp. 2364-2373, 2008.

- [55] NAILI, S., VU, M.B., GRIMAL, Q., *et al.* “Influence of viscoelastic and viscous absorption on ultrasonic wave propagation in cortical bone: application to axial transmission”. *J Acoust Soc Am*, vol. 127, n. 4, pp. 2622-2634, 2010.
- [56] LOWET, G., VAN DER PERRE, G., “Ultrasound velocity measurement in long bones: measurement method and simulation of ultrasound wave propagation”, *Journal of Biomechanics*, vol. 29, n. 10, pp. 1255-1262, 1996.
- [57] MALIZOS, K.N., PAPACHRISTOS, V.C., PROTOPAPPAS, V.C., *et al.*, “Transosseous application of low-intensity ultrasound for the enhancement and monitoring of fracture healing process in a sheep osteotomy model”, *Bone*, vol. 38, n. 4, pp. 530-539, 2006.
- [58] RHO, J-Y., KUHN-SPEARING, L., ZIOUPOS, P., “Mechanical properties and the hierarchical structure of bone”, *Medical Engineering & Physics*, v. 20, n. 2, pp. 92-102, 1998.
- [59] MARKS, S.C., ODGREN, P.R., *Structure and Development of the Skeleton*, In: BILEZIKIAN, J.P., RAISZ, L.G., RODAN, G.A., *Principles of Bone Physiology: volume I*, 2nd ed., San Diego, USA, Academic Press, 2002.
- [60] KATZ, J.L., *Mechanics of Hard Tissue*, In: PETERSON, D.R., BRONZINO, J.D., *Biomechanics: Principles and Applications*: 1st ed., Boca Raton, USA, CRC Press, 2008.
- [61] BOSSY, E., *Evaluation ultrasonore de l'os cortical par transmission axiale: modélisation et experimentation in vitro et in vivo*, Tese de D.Sc., Université Paris VI, Paris, França, 2003.

- [62] PHILLIPS, A.M., “Overview of the fracture healing cascade”, *Injury*, v. 36S, sup. 3, pp. S5-S7, 2005.
- [63] HADJIARGYROU, M., MCLEOD, K., RYABY, J.P., *et al.*, “Enhancement of fracture healing by low intensity ultrasound”, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, n. 355S, pp. S216-S229, 1998.
- [64] DIMITRIOU, R., TSIRIDIS, E., GIANNOUDIS, P.V., “Current concepts of molecular aspects of bone healing”, *Injury*, v. 36, n. 12, pp. 1392-1404, 2005.
- [65] CLAES, L., WILLIE, B., “The enhancement of bone regeneration by ultrasound”, *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, v. 93, n. 1-3, pp. 384-398, 2007.
- [66] LINKHART, T.A., MOHAN, S., BAYLINK, D.J., “Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF $\beta$  and BMP”, *Bone*, v. 19, n. 1 (sup), p. 1S-12S, 1996.
- [67] BOSTROM, M.P.G., ASNIS, P., “Transforming growth factor beta in fracture repair”, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, n. 355S, p. S124-S131, 1998.
- [68] CARTER, D.R., BEAUPRÉ, G.S., GIORI, N.J., *et al.*, “Mechanobiology of skeletal regeneration”, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, n. 355S, p. S41-S55, 1998.
- [69] WADE, R.H., MOORCROFT, C.I., THOMAS, P.B., “Fracture stiffness as a guide to the management of tibial fractures”, *Journal of Bone and Joint Surgery Br*, vol. 83, n. 4, pp. 533-535, 2001.
- [70] HUBE, R., MAYR, H., HEIN, W., *et al.*, “Prediction of biomechanical stability after callus distraction by high resolution scanning acoustic microscopy”, *Ultrasound*

in *Medicine & Biology*, vol. 32, n. 12, pp. 1913-1921, 2006.

- [71] DEN BOER, F.C., BRAMER, J.A., PATKA, P., *et al.*, “Quantification of fracture healing with three-dimensional computed tomography”, *Archives of Orthopaedics and Trauma Surgery*, vol. 117, n. 6-7, pp. 345-350, 1998.
- [72] JÄMSÄ, T., KOIVUKANGAS, A., KIPPO, K., *et al.*, “Comparison of radiographic and pQCT analysis of healing rat tibial fractures”, *Calcified Tissue International*, vol. 66, n. 4, pp. 288-291, 2000.
- [73] AUGAT, P., MERK, J., GENANT, H.K., *et al.*, “Quantitative assessment of experimental fracture repair by peripheral computed tomography”, *Calcified Tissue International*, vol. 60, n. 2, pp. 194-199, 1997.
- [74] AULD, B.A., *Acoustic Fields and Waves in Solids: Volume I*, 1<sup>st</sup> ed., New York, USA, John Wiley & Sons, 1973.
- [75] KAUFMAN, J. J., LUO, G., SIFFERT, R. S., “Ultrasound simulation in bone”, *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, vol. 55, n. 6, pp. 1205-1218, 2008.
- [76] ISAKSSON, H., VAN DONKELAAR, C. C., ITO, K., “Sensitivity of tissue differentiation and bone healing predictions to tissue properties”, *Journal of Biomechanics*, vol. 42, n. 5, pp. 555-564, 2009.
- [77] ISAKSSON, H., VAN DONKELAAR, C. C., HUISKES, R., *et al.*, “Determining the most important cellular characteristics for fracture healing using design of experiments methods”, *Journal of Theoretical Biology*, v. 255, n. 1, pp. 26-39, 2008.

- [78] ISAKSSON, H., VAN DONKELAAR, C. C., HUISKES, R., *et al.*, “A mechano-regulatory bone-healing model incorporating cell-phenotype specific activity”, *Journal of Theoretical Biology*, v. 252, n. 2, pp. 230-246, 2008.
- [79] GARCÍA-AZNAR, J. M., KUIPER, J. H., GÓMEZ-BENITO, M. J., *et al.*, “Computational simulation of fracture healing: Influence of interfragmentary movement on the callus growth”, *Journal of Biomechanics*, vol. 40, n. 7, pp. 1467-1476, 2007.
- [80] ISAKSSON, H., VAN DONKELAAR, C. C., HUISKES, R., *et al.*, “Corroboration of mechanoregulatory algorithms for tissue differentiation during fracture healing: Comparison with in vivo results”, *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 24, n. 5, pp. 898-907, 2006.
- [81] ISAKSSON, H., WILSON, W., VAN DONKELAAR, C. C., *et al.*, “Comparison of biophysical stimuli for mechano-regulation of tissue differentiation during fracture healing”, *Journal of Biomechanics*, vol. 39, n. 8, pp. 1507-1516, 2006.
- [82] SHEFELBINE, S. J., AUGAT, P., CLAES, L., *et al.*, “Trabecular bone fracture healing simulation with finite element analysis and fuzzy logic”, *Journal of Biomechanics*, vol. 38, n. 12, pp. 2440-2450, 2005.
- [83] LACROIX, D., PRENDERGAST, P. J., “A mechano-regulation model for tissue differentiation during fracture healing: analysis of gap size and loading”, *Journal of Biomechanics*, vol. 35, n. 9, pp. 1163-1171, 2002.
- [84] AMENT, C., HOFER, E.P., “A fuzzy logic model of fracture healing”, *Journal of Biomechanics*, vol. 33, n. 8, pp. 961-968, 2000.

- [85] CLAES, L. E., HEIGELE, C. A., “Magnitudes of local stress and strain along bony surfaces predict the course and type of fracture healing”, *Journal of Biomechanics*, vol. 32, n. 3, pp. 255-266, 1999.
- [86] GEDDES, L. A., BAKER, L. E., “The specific resistance of biological material – a compendium of data for the biomedical engineer and physiologist”, *Medical Biology & Engineering*, vol. 5, n. 3, pp. 271-293, 1967.
- [87] VIRIEUX, J., “P-SV wave propagation in heterogeneous media: Velocity-stress finite-difference method”, *Geophysics*, v. 51, pp. 889-901, 1986.
- [88] SILVA, M. J., BRODT, M. D., WOPENKA, B., *et al.*, “Decreased collagen organization and content are associated with reduced strength of demineralized and intact bone in the SAMP6 mouse”, *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 21, n. 1, pp. 78-88, 2006.
- [89] SAÏED, A., RAUM, K., LEGUERNEY, I., *et al.* “Spatial distribution of anisotropic acoustic impedance assessed by time-resolved 50-MHz scanning acoustic microscopy and its relation to porosity in human cortical bone”. *Bone*, vol. 43, n. 1, pp. 187-194, 2008.
- [90] LASAYGUES, P., PITHIOUX, M. “Ultrasonic characterization of orthotropic elastic bovine bones”. *Ultrasonics*, vol. 39, n. 8, pp. 567-573, 2002.
- [91] MANJUBALA, I., LIU, Y., EPARI, D. R., *et al.*, “Spatial and temporal variations of mechanical properties and mineral content of the external callus during bone healing”, *Bone*, v. 45, n. 2, pp. 185-192, 2009.
- [92] GHEDUZZI, S., DODD, S. P., MILES, A. W., *et al.*, “Numerical and experimental

simulation of the effect of long bone fracture healing stages on ultrasound transmission across an idealized fracture”. *Journal of the Acoustical Society of America*, v. 126, n. 2, pp. 887-894, 2009.

[93] GLÜER, C. C., “Monitoring skeletal changes by radiological techniques”. *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 14, n. 11, pp. 1952-1962, 1999.

[94] MACHADO, C. B.; PEREIRA, W. C. A.; TALMANT, M.; *et al.*, “Computational evaluation of the compositional factors in fracture healing affecting ultrasound axial transmission measurements”. *Ultrasound in Medicine & Biology*, v. 36, n. 8, pp. 1314-1326, 2010.

[95] BOWNMAN, S. M.; ZEIND, J.; GIBSON, L. J., “The tensile behavior of demineralized bovine cortical bone”. *Journal of Biomechanics*, v. 29, n. 11, p. 1497-1501, 1996.

[96] KOTHA, S. P.; DE PAULA, C. A.; MANN, A.B.; *et al.*, “High frequency ultrasound prediction of mechanical properties of cortical bone with varying amount of mineral content”. *Ultrasound in Medicine & Biology*, v. 34, n. 4, pp. 630-637, 2008.

[97] ZIMMERMAN, M. C.; PRABHAKAR, A.; CHOKSHI, B. V.; *et al.*, “The acoustic properties of normal and imbedded bovine bone as measured by acoustic microscopy”. *J Biom Mater Res*, v. 28, n. 8, pp. 931-938, 1994.

[98] TAKANO, Y.; TURNER, C. H.; BURR, D. B. “Mineral anisotropy in mineralized tissues is similar among species and mineral growth occurs independently of collagen orientation in rats: results from acoustic velocity measurements”. *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 11, n. 9, pp. 1292-1301, 1996.

- [99] TATARINOV, A.; PONTAGA, I., VILKS, U. “Modeling the influence of mineral content and porosity on ultrasound parameters in bone by using synthetic phantoms”. *Mech Comp Mater*, v. 35, pp. 147-154, 1999.
- [100] TREBACZ, H.; GAWDA, H. “Velocity of ultrasonic waves in cortical bone after gradual demineralization of bone tissue”. *Archives of Acoustics*, v. 30, pp. 267-270, 2005.
- [101] LIU, Y.; MANJUBALA, I.; SCHELL, H.; *et al.*, “Size and habit of mineral particles in bone and mineralized callus during bone healing in sheep”. *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 25, n.9 , pp. 2029-2038, 2010.

## ANEXO

### PROPRIEDADES ELÁSTICAS DOS SÓLIDOS

Segue-se uma breve revisão das propriedades elásticas dos sólidos, tomando como referência o livro de AULD [74].

A deformação em um corpo acusticamente vibratório é descrita pelo campo de deformação  $\vec{S}(\vec{r},t)$ , que é relacionado ao campo de deslocamento da partícula  $\vec{u}(\vec{r},t)$ , através da seguinte equação tensão-deslocamento:

$$\vec{S}(\vec{r},t) = \nabla_s \vec{u}(\vec{r},t) \quad (\text{A.1})$$

onde  $\nabla_s$  é o operador gradiente simétrico, e possui a seguinte representação matricial:

$$\nabla_s \rightarrow \nabla_{ij} = \begin{bmatrix} \frac{\partial}{\partial x} & 0 & 0 \\ 0 & \frac{\partial}{\partial y} & 0 \\ 0 & 0 & \frac{\partial}{\partial z} \\ 0 & \frac{\partial}{\partial z} & \frac{\partial}{\partial y} \\ \frac{\partial}{\partial z} & 0 & \frac{\partial}{\partial x} \\ \frac{\partial}{\partial y} & \frac{\partial}{\partial x} & 0 \end{bmatrix} \quad (\text{A.2})$$

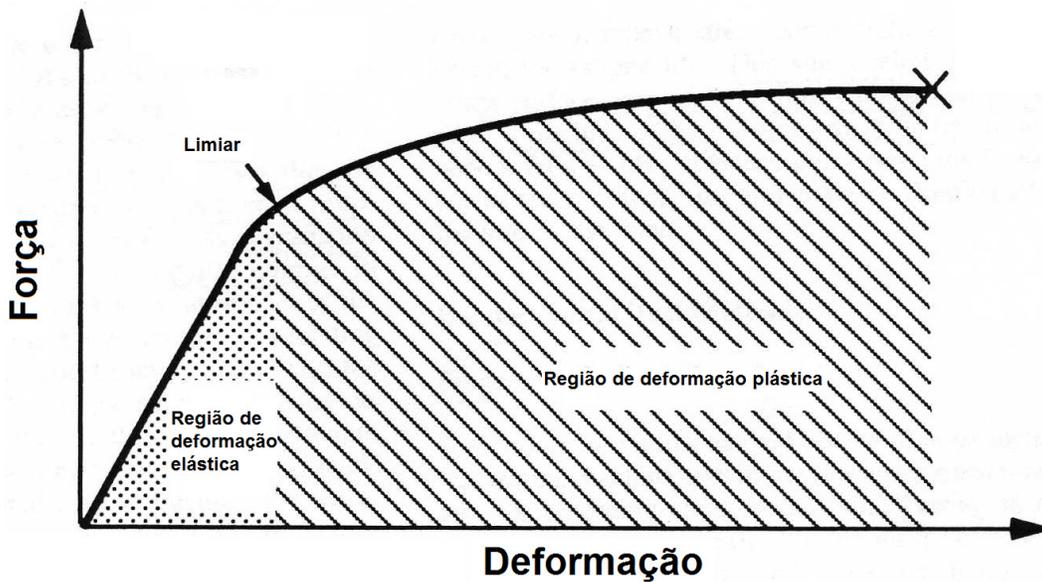
As forças de restauração elástica ( $\vec{T}$ ) em um meio vibratório livre é relacionada através da equação translacional de movimento

$$\nabla \cdot \vec{T} = \rho \frac{\partial^2 \vec{u}}{\partial t^2} - \vec{F} \quad (\text{A.3})$$

onde  $\rho$  é a densidade de massa de equilíbrio do meio, e  $\vec{F}$  é o vetor força aplicada. Para uma região livre de qualquer fonte,  $\vec{F} = 0$ .

Agora é necessário estabelecer uma conexão entre as forças de restauração elásticas e a deformação do material. Para pequenas deformações, é observável

experimentalmente que a deformação é linearmente proporcional a força aplicada (Lei de Hooke). A medida que deformações maiores são impostas, a relação deformação x força se torna cada vez mais não-linear, mas o corpo continua com seu estado original quando a força é removida (deformação elástica). Contudo, se essa deformação passa um certo limite, a deformação não será mais elástica. Além desse limite elástico, o meio se deforma permanentemente (deformação plástica) e eventualmente se quebra (figura A.1). No entanto, para a acústica, a região linear é a mais relevante para a teoria de vibração de baixa amplitude, definida como a Lei de Hooke.



**Figura A.1 – Curva força x deformação dividida nas regiões de deformação elástica e plástica. O “x” marca o ponto onde ocorre fratura. Adaptado de [71].**

A Lei de Hooke diz que a deformação é linearmente proporcional à força aplicada, e vice-versa. A segunda forma é colocada matematicamente escrevendo-se cada componente da força (força de restauração elástica) como uma função linear geral de todos os componentes da força. Por exemplo:

$$\begin{aligned}
 T_{xx} = & c_{xxxx}S_{xx} + c_{xxxy}S_{xy} + c_{xxxz}S_{xz} + c_{xxyx}S_{yx} + c_{xxyy}S_{yy} + c_{xxyz}S_{yz} \\
 & + c_{xxzx}S_{zx} + c_{xxzy}S_{zy} + c_{xxzz}S_{zz}
 \end{aligned}
 \tag{A.4}$$

de uma forma geral tem-se

$$T_{ij} = c_{ijkl} S_{kl} \quad (\text{A.5})$$

$i, j, k, l = x, y, z$

As “constantes de mola microscópicas”  $c_{ijkl}$  em (A.5) são chamadas de constantes de rigidez elástica. Pode-se provar que para um meio de cristal de simetria cúbica,  $c'$  pode ser representada por

$$[c] = \begin{bmatrix} c_{11} & c_{12} & c_{12} & 0 & 0 & 0 \\ c_{12} & c_{11} & c_{12} & 0 & 0 & 0 \\ c_{12} & c_{12} & c_{11} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & c_{44} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & c_{44} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & c_{44} \end{bmatrix} \quad (\text{A.6})$$

Como exemplo dessa aplicação, considere uma onda transversal polarizada no eixo  $x$  e se propagando no eixo  $y$ , com o campo de deformação

$$T_6 = T_{xy} = \text{sen}(\omega t - ky) \quad (\text{A.7})$$

onde  $\omega$  é a frequência angular ( $\omega = 2\pi f$ ) e  $k = 2\pi/\lambda$ , sendo que  $\lambda$  é o comprimento de onda. O campo de deslocamento dessa onda será

$$S_6 = S_{xy} = \frac{k^2}{2\rho\omega^2} \text{sen}(\omega t - ky) \quad (\text{A.8})$$

Esses campos devem se relacionar através da equação constitutiva elástica do meio de propagação

$$\begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ T_6 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} c_{11} & c_{12} & c_{12} & 0 & 0 & 0 \\ c_{12} & c_{11} & c_{12} & 0 & 0 & 0 \\ c_{12} & c_{12} & c_{11} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & c_{44} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & c_{44} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & c_{44} \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ S_6 \end{bmatrix} \quad (\text{A.9})$$

ou

$$T_6 = c_{44}S_6 \quad (\text{A.10})$$

Isso significa que o campo  $T_6, S_6$  constitui uma solução de onda acústica válida somente se

$$c_{44}k^2 = \rho\omega^2 \quad (\text{A.11})$$

A relação (A.11) é chamada de relação de dispersão da onda. A velocidade de fase  $V_s$  para essa onda será

$$V_s = \frac{\omega}{k} = (c_{44}/\rho)^{\frac{1}{2}} \quad (\text{A.12})$$

Agora no caso de uma onda de compressão se propagando no eixo  $y$ , tem-se o deslocamento da partícula

$$\vec{u} = \hat{y} \cos(\omega t - ky) \quad (\text{A.13})$$

e o campo de deformação

$$S_2 = S_{yy} = k \text{sen}(\omega t - ky) \quad (\text{A.14})$$

Considerando o eixo de um cristal cúbico, o campo de força é calculado usando-se (A.14) pela equação constitucional

$$\begin{bmatrix} T_1 \\ T_2 \\ T_3 \\ T_4 \\ T_5 \\ T_6 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} c_{11}c_{12}c_{12} & 0 & 0 & 0 \\ c_{12}c_{11}c_{12} & 0 & 0 & 0 \\ c_{12}c_{12}c_{11} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & c_{44} \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} 0 \\ S_2 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix} \quad (\text{A.15})$$

ou seja,

$$\begin{aligned} T_1 &= c_{12}S_2 = c_{12}k \text{sen}(\omega t - ky) \\ T_2 &= c_{11}S_2 = c_{11}k \text{sen}(\omega t - ky) \\ T_3 &= c_{12}S_2 = c_{12}k \text{sen}(\omega t - ky) \end{aligned} \quad (\text{A.16})$$

Uma vez que o campo de força varia somente no eixo  $y$ , a equação de movimento da onda livre se propagando no eixo  $y$  será

$$\begin{aligned}\frac{\partial}{\partial y}T_{xy} &= -\rho\omega^2 u_x \\ \frac{\partial}{\partial y}T_{yy} &= -\rho\omega^2 u_y \\ \frac{\partial}{\partial y}T_{zy} &= -\rho\omega^2 u_z\end{aligned}\tag{A.17}$$

Entre os componentes de força de (A.16) para a onda de compressão se propagando no eixo  $y$ , apenas  $T_2 = T_{yy}$  entrará nessas equações. Conseqüentemente,

$$\begin{aligned}-\rho\omega^2 u_x &= 0 \\ -\rho\omega^2 u_y &= \frac{\partial}{\partial y}T_{yy} = -c_{11}k^2 \cos(\omega t - ky) \\ -\rho\omega^2 u_z &= 0\end{aligned}$$

e substituição em (A.13) para  $u_y$  mostra que a relação de dispersão

$$c_{11}k^2 = \rho\omega^2\tag{A.18}$$

precisa ser satisfeita. A velocidade de fase da onda longitudinal  $V_l$  será

$$V_l = \frac{\omega}{k} = (c_{11}/\rho)^{\frac{1}{2}}\tag{A.19}$$

Geralmente, as constantes de rigidez de compressão são bem maiores do que as constantes de rigidez transversais.

As características de elasticidade de um sólido também podem ser dadas por parâmetros como as constantes de Lamé ( $\lambda$ ,  $\mu$ ), o módulo de Young ( $E$ ), a razão de Poisson ( $\nu_0$ ) e o módulo de compressão hidrostática ( $\kappa$ ). Todos se relacionam com as ondas longitudinais ou transversais, seguindo as equações na tabela A.1 [72],

considerando  $c_l$  e  $c_t$  as velocidades de propagação longitudinal e transversal, respectivamente.

**Tabela A.1 – Relações entre as ondas longitudinais e transversais com as diferentes constantes elásticas [72].**

	$c_{11}, c_{12}$	$\lambda_l, \mu_l$	$\mu_l, \kappa$	$\mu_l, E$	$\nu_0, E$	$\nu_0, \kappa$
$\rho c_l^2$ (ondas longitudinais)	$c_{11}$	$\lambda_l + 2\mu_l$	$\kappa + \frac{4}{3}\mu_l$	$\frac{\mu_l(4\mu_l - E)}{3\mu_l - E}$	$\frac{E(1-\nu_0)}{(1+\nu_0)(1-2\nu_0)}$	$\frac{3\kappa(1-\nu_0)}{1+\nu_0}$
$\rho c_t^2$ (ondas transversais)	$\frac{c_{11} - c_{12}}{2}$	$\mu_l$	$\mu_l$	$\mu_l$	$\frac{E}{2(1+\nu_0)}$	$\frac{3\kappa(1-2\nu_0)}{2(1+\nu_0)}$

### ONDAS PLANAS EM SÓLIDOS – A EQUAÇÃO DE CHRISTOFFEL

Novamente, o desenvolvimento das equações a seguir terá como base o livro de AULD [74].

Primeiramente, a velocidade da partícula  $\vec{v}$  será descrita como sendo

$$\vec{v} = \frac{\partial \vec{u}}{\partial t} \quad (\text{A.20})$$

Sendo assim, (A.3) se torna

$$\nabla \cdot \vec{T} = \frac{\partial^2 \vec{p}}{\partial t^2} - \vec{F} \quad (\text{A.21})$$

onde  $\vec{p}$  é densidade de momento ( $\text{kg/m}^2\text{s}$ ) e é definida como

$$\vec{p} = \rho \vec{v} \quad (\text{A.22})$$

e a relação deformação-deslocamento

$$\vec{S} = \nabla_s \vec{u} \quad (\text{A.23})$$

se torna

$$\nabla_s \vec{v} = \frac{\partial \vec{S}}{\partial t} \quad (\text{A.24})$$

Agora (A.21) e (A.24) podem ser expressas inteiramente em termos do campo de força  $\vec{T}$  e o campo da velocidade da partícula  $\vec{v}$ , considerando um campo acústico sem perda de energia:

$$\nabla \vec{T} = \rho \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} - \vec{F} \quad (\text{A.25})$$

e

$$\nabla_s \vec{v} = \vec{s} : \frac{\partial \vec{T}}{\partial t} \quad (\text{A.26})$$

Eliminando  $\vec{T}$  [74], pode-se escrever a equação da onda para  $\vec{v}$  :

$$\nabla \cdot \vec{c} : \nabla_s \vec{v} = \rho \frac{\partial^2 \vec{v}}{\partial t^2} - \frac{\partial \vec{F}}{\partial t} \quad (\text{A.27})$$

onde  $\vec{c}$  é a vetor rigidez. A equação (A.27) em forma de matriz se torna

$$\nabla_{iK} c_{KL} \nabla_{Lj} v_j = \rho \frac{\partial^2 v_i}{\partial t^2} - \frac{\partial F_i}{\partial t} \quad (\text{A.28})$$

onde o operador  $\nabla_{iK}$  tem a forma

$$\nabla_{iK} = \begin{bmatrix} \frac{\partial}{\partial x} & 0 & 0 & 0 & \frac{\partial}{\partial z} & \frac{\partial}{\partial y} \\ 0 & \frac{\partial}{\partial y} & 0 & \frac{\partial}{\partial z} & 0 & \frac{\partial}{\partial x} \\ 0 & 0 & \frac{\partial}{\partial z} & \frac{\partial}{\partial y} & \frac{\partial}{\partial x} & 0 \end{bmatrix} \quad (\text{A.29})$$

e o operador  $\nabla_{L_j}$  tem a forma de (A.2). Considerando uma região livre de qualquer fonte

( $\vec{F} = 0$ ), uma onda plana uniforme se propagando na direção  $\hat{I}$  dada por

$$\hat{I} = \hat{x}l_x + \hat{y}l_y + \hat{z}l_z \quad (\text{A.30})$$

tem campos proporcionais a  $e^{i(\alpha t - k\hat{I}\cdot r)}$ . Nesse caso,  $\nabla_{iK}$  e  $\nabla_{L_j}$  são substituídos pelas matrizes  $-ik_{iK}$  e  $-ik_{L_j}$ , respectivamente, onde

$$-ik_{iK} = -ik_{L_j} \rightarrow -ik \begin{bmatrix} l_x & 0 & 0 & 0 & l_z & l_y \\ 0 & l_y & 0 & l_z & 0 & l_x \\ 0 & 0 & l_z & l_y & l_x & 0 \end{bmatrix} \quad (\text{A.31})$$

e

$$-ik_{L_j} = -ik_{L_j} \rightarrow -ik \begin{bmatrix} l_x & 0 & 0 \\ 0 & l_y & 0 \\ 0 & 0 & l_z \\ 0 & l_z & l_y \\ l_z & 0 & l_x \\ l_y & l_x & 0 \end{bmatrix} \quad (\text{A.32})$$

Finalmente, a equação (A.28), para  $\vec{F} = 0$ , se reduz a chamada equação de Christoffel:

$$k^2(l_{iK}c_{KL}l_{L_j})v_j = k^2\Gamma_{ij}v_j = \rho\omega^2v_i \quad (\text{A.33})$$

onde  $\Gamma_{ij}$  é chamada de matriz de Christoffel, e tem a forma

$$\Gamma_{ij} = l_{iK}c_{KL}l_{L_j} \quad (\text{A.34})$$

Os elementos de  $\Gamma_{ij}$  são funções somente da direção de propagação da onda plana e das constantes de rigidez do meio.

A equação de Christoffel se aplica a ondas planas uniformes tanto para meios isotrópicos como para anisotrópicos, diferenciando-se apenas na formulação das condições de rigidez para ambos os casos.

## Sólidos isotrópicos

Em um meio isotrópico os três eixos,  $x$ ,  $y$ ,  $z$  e os três planos  $yz$ ,  $xz$ ,  $xy$  são equivalentes. Consequentemente, a resposta do meio precisa ser a mesma para uma força compressiva aplicada ao longo de qualquer eixo. Pode-se provar que [70], para um meio isotrópico, a matriz de rigidez geral  $[c']$  é obtida:

$$[c'] = \begin{bmatrix} c_{11} & c_{12} & c_{12} & 0 & 0 & 0 \\ c_{12} & c_{11} & c_{12} & 0 & 0 & 0 \\ c_{12} & c_{12} & c_{11} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & c_{44} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & c_{44} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & c_{44} \end{bmatrix} \quad (\text{A.35})$$

Também pode ser mostrado [93] que a condição

$$c_{12} = c_{11} - 2c_{44} \quad (\text{A.36})$$

é requerida para que haja invariância de  $[c']$  com respeito a sua rotação.

As equações (A.35) e (A.36) mostram que um meio isotrópico possui apenas duas constantes elásticas independentes. Estas são frequentemente consideradas como sendo as constantes de Lamé,  $\lambda_l$  e  $\mu_l$ , definidas como

$$\lambda_l = c_{12} \quad (\text{A.37})$$

$$\mu_l = c_{44}$$

Pela tabela A.1, pode-se observar a relação direta entre as constantes de Lamé e as velocidades de ondas de compressão (longitudinal) e de cisalhamento (transversal).

Agora, usando (A.35) e (A.36) na matriz de Christoffel (A.34), e assumindo que  $\hat{I} = \hat{z}$ , a equação de Christoffel (A.33) se reduz a

$$k^2 \begin{bmatrix} c_{44} & 0 & 0 \\ 0 & c_{44} & 0 \\ 0 & 0 & c_{11} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} v_x \\ v_y \\ v_z \end{bmatrix} = \rho \omega^2 \begin{bmatrix} v_x \\ v_y \\ v_z \end{bmatrix} \quad (\text{A.38})$$

e pode ser separada em três equações independentes:

$$k^2 c_{44} v_x = \rho \omega^2 v_x$$

$$k^2 c_{44} v_y = \rho \omega^2 v_y \quad (\text{A.39})$$

$$k^2 c_{11} v_z = \rho \omega^2 v_z$$

### Sólidos anisotrópicos

O tipo mais comum de sólido anisotrópico é aquele representado pelo sistema chamado triclinico. As matrizes de transformação para esse sistema são:

$$1 \rightarrow \begin{bmatrix} 100 \\ 010 \\ 001 \end{bmatrix} \quad (\text{A.40})$$

$$\bar{1} \rightarrow \begin{bmatrix} -10 & 0 \\ 0 & -10 \\ 0 & 0 & -1 \end{bmatrix}$$

Quando essas matrizes são substituídas em (A.34), a equação de Christoffel para cristais triclinicos aparece na forma

$$k^2 \begin{bmatrix} \alpha & \delta & \varepsilon \\ \delta & \beta & \zeta \\ \varepsilon & \zeta & \gamma \end{bmatrix} \begin{bmatrix} v_x \\ v_y \\ v_z \end{bmatrix} = \rho \omega^2 \begin{bmatrix} v_x \\ v_y \\ v_z \end{bmatrix} \quad (\text{A.41})$$

onde

$$\alpha = c_{11} l_x^2 + c_{66} l_y^2 + c_{55} l_z^2 + 2c_{56} l_y l_z + 2c_{15} l_z l_x + 2c_{16} l_x l_y$$

$$\beta = c_{66} l_x^2 + c_{22} l_y^2 + c_{44} l_z^2 + 2c_{24} l_y l_z + 2c_{46} l_z l_x + 2c_{26} l_x l_y$$

$$\gamma = c_{55} l_x^2 + c_{44} l_y^2 + c_{33} l_z^2 + 2c_{34} l_y l_z + 2c_{35} l_z l_x + 2c_{45} l_x l_y$$

$$\delta = c_{16} l_x^2 + c_{26} l_y^2 + c_{45} l_z^2 + (c_{46} + c_{25}) l_y l_z + (c_{14} + c_{56}) l_z l_x + (c_{12} + c_{66}) l_x l_y$$

(A.42)

$$\varepsilon = c_{15}l_x^2 + c_{46}l_y^2 + c_{35}l_z^2 + (c_{45} + c_{36})l_y l_z + (c_{13} + c_{55})l_z l_x + (c_{14} + c_{56})l_x l_y$$

$$\zeta = c_{56}l_x^2 + c_{24}l_y^2 + c_{34}l_z^2 + (c_{44} + c_{23})l_y l_z + (c_{36} + c_{45})l_z l_x + (c_{25} + c_{46})l_x l_y$$

e

$$l_x = k_x / k$$

$$l_y = k_y / k \tag{A.43}$$

$$l_z = k_z / k$$

são os cossenos de direção da direção de propagação. Esse resultado pode ser especializado para outros sistemas de cristais, usando as condições iniciais de rigidez para cada um. Essas condições estão presentes na literatura [74].

# PRODUÇÃO CIENTÍFICA

## 1. Publicação referente à tese:

### 1.1. Artigos publicados em periódico:

**MACHADO, C. B.;** PEREIRA, W. C. A.; TALMANT, M.; PADILLA, F.; LAUGIER, P. Computational evaluation of the compositional factors in fracture healing affecting ultrasound axial transmission measurements. *Ultrasound in Medicine & Biology*, v. 36, n. 8, pp. 1314-1326, 2010.

**MACHADO, C. B.;** PEREIRA, W. C. A.; GRANKE, M.; TALMANT, M.; PADILLA, F.; LAUGIER, P. Experimental and simulation results on the effect of cortical bone mineralization in ultrasound axial transmission measurements: a model for fracture healing ultrasound monitoring. *Bone*, 2011 (aceito para publicação).

### 1.2. Artigos publicados em anais de eventos:

**MACHADO, C. B.;** PEREIRA, W. C. A.; TALMANT, M.; PADILLA, F.; LAUGIER, P. On the Possibility of Delayed Fracture Healing Detection Using Ultrasound Axial, Transmission: Numerical Simulations. MEDICON 2010, 2010, Chalkidiki, Grécia. Proceedings of the 7th European Symposium on Biomedical Engineering - ESBME 2010, 2010.

**MACHADO, C. B.;** TALMANT, M.; PADILLA, F.; PEREIRA, W. C. A.; LAUGIER, P. Numerical simulations on the feasibility of ultrasound axial transmission technique in rats. Anais do XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, Tiradentes, MG, 2010. p. 568-571.

**MACHADO, C. B.;** TALMANT, M.; PADILLA, F.; PEREIRA, W. C. A.; LAUGIER, P. The effect of demineralization on ultrasound axial transmission measurements: a bone fracture approach. Anais do XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, Tiradentes, MG, 2010. p. 572-575.

**MACHADO, C. B.;** PEREIRA, W. C. A.; TALMANT, M.; PADILLA, F.; LAUGIER, P. 2D Ultrasound axial transmission simulations on 40-day fracture healing models. III European Symposium on Ultrasound Characterization of Bone, Bydgoszcz, Polônia, 2009.

## **2. Publicação referente à área de ultrassom:**

### **2.1. Artigo publicado em periódico:**

FERREIRA, M. L.; MATUSIN, D. P.; **MACHADO, C. B.**; SILVA, P. C.; MELLO, N. B.; AMARAL, A. C.; FRANCO, R. S.; PEREIRA, W. C. A.; SCHANAIDER, A. Characterization of pseudarthrosis with ultrasound backscattered signals in rats. *Acta Cirurgica Brasileira*, v. 25, p. 2010-2013, 2010.

### **2.2. Artigos publicados em anais de eventos:**

CORTELA, G. A.; **MACHADO, C. B.**; NEGREIRA, C. A.; PEREIRA, W. C. A. Estimación del cambio de periodicidad en función de la temperatura por metodos espectrales. Anais do XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, Tiradentes, MG, 2010. p. 411-414.

MATUSIN, D. P.; PEREIRA, A. J. F.; **MACHADO, C. B.**; FERREIRA, M. L.; SCHANAIDER, A.; PEREIRA, W. C. A. Caracterização ultrassônica in vivo de osso longo em modelo animal. Anais do XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, Tiradentes, MG, 2010. p. 627-630.

**MACHADO, C. B.**; MÉZIRI, M.; PADILLA, F.; LAUGIER, P.; PEREIRA, W. C. A. Numerical simulations on the effect of pulse frequency for periodicity characterization of trabecular bone. Anais do XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, Tiradentes, MG, 2010. p. 198-201.

ROSA, P. T. C. R.; MATUSIN, D. P.; **MACHADO, C. B.**; PEREIRA, W. C. A. Caracterização da periodicidade de phantom comercial de osso trabecular usando sinais de ultrassom. Anais do XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, Tiradentes, MG, 2010. p. 112-115.

MATUSIN, D. P.; PEREIRA, W. C. A.; **MACHADO, C. B.**; FERREIRA, M. L.; SCHANAIDER, A. Preliminary Study of Pseudoarthrosis Ultrasonic Characterization. IEEE - 2009 International Ultrasonics Symposium, 2009, Roma, Itália. p. 2232-2235.

MÉZIRI, M.; PEREIRA, W. C. A.; **MACHADO, C. B.**; TIAH, N.; BOUZITOUNE, R.; PADILLA, F.; LAUGIER, P. Multi-parametric Study to Identify the Hepatic Fibrosis Stages. IEEE - 2009 International Ultrasonics Symposium, 2009, Roma, Itália. p. 2236-2239.

**MACHADO, C. B.**; MÉZIRI, M.; PEREIRA, W. C. A.; PADILLA, F.; LAUGIER, P. Periodicity Estimation Under Variations of Scatterer Spacings, Thickness and Pulse Frequency: a 2D Simulation Study. IEEE - 2009 International Ultrasonics Symposium, 2009, Roma, Itália. p. 2240-2243.

**MACHADO, C. B.;** MÉZIRI, M.; PEREIRA, W. C. A. Sensitivity of spectral analysis methods for periodicity estimation using simulated backscattered ultrasound signals. XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, 2008, Salvador, BA.

LIMA, A. J. S.; **MACHADO, C. B.;** PEREIRA, W. C. A.; LAUGIER, P. Entropia de Shannon na estimativa da periodicidade de sinais de ultra-som de tecido hepático in vitro. XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, 2008, Salvador, BA.

MATUSIN, D. P.; **MACHADO, C. B.;** KRUGER, M. A. V.; GOMEZ, W.; FERREIRA, M. L.; SCHANAIDER, A.; PEREIRA, W. C. A. Coeficiente de retro-espalhamento de ultra-som em pseudo-artrose in vitro de cobaias. XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, 2008, Salvador, BA.