**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA**

PAULO MORAES AGNOLLITTO

**Caracterização da Resposta Acústica por Vibro-Acustografia em
Fêmures de Camundongos em um Modelo Experimental *Ex-Vivo***

**Ribeirão Preto
2020**

PAULO MORAES AGNOLLITTO

**Caracterização da resposta acústica por vibro-acustografia em
fêmures de camundongos em um modelo experimental *ex-vivo*.**

“Versão corrigida”

Tese de Doutorado apresentada a Faculdade
de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Marcello Henrique
Nogueira - Barbosa

Ribeirão Preto

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Agnollitto, Paulo Moraes

Caracterização da resposta acústica por vibro-acustografia em fêmures de camundongos em um modelo experimental *ex-vivo*, 2020.

64 p.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Orientador: Nogueira-Barbosa, Marcello Henrique.

1. Vibro-acustografia. 2. Osteoporose.
3. Ultrassom. 4. Camundongo. 5. microCT

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Paulo Moraes Agnollitto

Título: "Caracterização da resposta acústica por vibro-acustografia em fêmures de camundongos em um modelo experimental *ex-vivo*"

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Marcello Henrique Nogueira-Barbosa

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico essa tese aos meus pais, Paulo Agnollitto Netto e Maria Inês Silveira de Moraes Agnollitto, que são responsáveis por toda a minha trajetória de estudos, sempre incentivando o meu crescimento intelectual, assim como minhas atividades laborativas com honestidade e disciplina, desde a minha infância. Sem o apoio deles, eu não chegaria onde cheguei.

Dedico também à minha esposa, Maria Izaura Sedoguti Scudeler Agnollitto, pelo apoio e paciência, sempre compreendendo as dificuldades advindas da carreira acadêmica, como também por estar presente colaborando ativamente na construção dessa etapa.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu chefe e orientador, Professor Doutor Marcello Henrique Nogueira-Barbosa, que me ensinou grande parte do que sei de radiologia musculoesquelética e também de metodologia científica. Pesquisador nato, foi capaz de idealizar este projeto e de me guiar em cada etapa de sua execução, sempre com muita disponibilidade, paciência e atenção.

Muito obrigado.

AGRADECIMENTOS

Ao físico e amigo, Guilherme de Araújo Braz, companheiro na aquisição e no processamento dos dados, sem o qual essa tese não teria acontecido

Aos Professores Doutores Antônio Adilton Oliveira Carneiro e Francisco José Oliveira de Paula pela coorientação nesse projeto de pesquisa. Ambos realizaram contribuições fundamentais para o desenvolvimento desta tese.

Ao Professor Doutor Jorge Elias Junior, por ser um radiologista brilhante e também uma excelente pessoa, na qual me espelho e com a qual aprendi muito, durante minha residência médica.

Ao Professor Doutor Paulo Roberto Barbosa Évora, por ter me aberto as portas do mundo acadêmico, enquanto ainda graduando de medicina, durante a minha iniciação científica em 2007.

Aos meus amigos(as) George Augusto Wellichan, Márcio Wen King Chu, Lucas Lopes Costa, Julio Cesar Nather Junior, Danilo Tadao Wada, Alessandro Spanó Mello, Guilherme Zeri, Renata Cristina Pazziani e Carolina de Freitas Lins por todo companheirismo e pelos bons momentos vividos juntos.

Finalmente, ao casal de padrinhos Julio Cesar Nather e Sandra Silva Domenes Nather, pela vibração, torcida e apoio durante minha graduação e pós-graduação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (**CAPES**) - Código de Financiamento 001.

Um perito é alguém que já cometeu todos os erros que podem ser cometidos em uma área bem restrita.

Niels Bohr

RESUMO

AGNOLLITTO, P. M. **Caracterização da resposta acústica por vibro-acustografia em fêmures de camundongos em um modelo experimental *ex-vivo***. 2020. 64f. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Introdução: O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial da técnica de vibro-acustografia (VA) na detecção de alterações ósseas associadas à osteoporose, utilizando um modelo animal. **Métodos:** O protocolo experimental incluiu três grupos de fêmures de camundongos: a) grupo controle, b) grupo com osteoporose e c) grupo com osteoporose e tratado com pamidronato, uma droga antirreabsortiva óssea. A avaliação óssea pela técnica de VA foi realizada em um tanque acústico. Um transdutor ultrassônico confocal gerou dois feixes focados de alta frequência (MHz), com uma diferença de frequências de 65 KHz entre eles. Esses dois feixes interagem entre si e com a amostra óssea, produzindo uma resposta acústica de baixa frequência que é registrada por um hidrofone. As curvas espectrais da VA foram processadas com a transformada rápida de Fourier, permitindo-se a obtenção de valores numéricos para cada grupo experimental, que carregam propriedades mecânicas das amostras. A aquisição da VA foi repetida três vezes. Utilizamos a microCT como técnica de referência e estimamos a correlação entre VA e parâmetros da microCT. A análise estatística incluiu o Coeficiente de Correlação Interclasse (ICC), comparações múltiplas ANOVA e o coeficiente de correlação de postos de Spearman. **Resultados:** A análise espectral da VA e os valores da área sob a curva (média; desvio padrão) foram, respectivamente, $1,29e^{-07}$ e $9,32e^{-08}$ para o grupo controle, $3,25e^{-08}$ e $2,16e^{-08}$ para o grupo com osteoporose e $1,50e^{-07}$ e $8,37e^{-08}$ para o grupo com osteoporose e tratado com pamidronato. A VA diferenciou os grupos experimentais ($p < 0,01$) e os resultados foram reprodutíveis (ICC = 0,43 [IC 95% = 0,15 - 0,71]). Houve associação estatisticamente significativa entre a VA e micro CT na conectividade ($p < 0,01$; $r = 0,80$) e na densidade de conectividade ($p < 0,01$; $r = 0,76$), e houve uma tendência de correlação entre a VA e o microCT no número de trabéculas (Tb.N) e na separação de trabéculas (Tb.Sp) ($p = 0,06$). **Conclusão:** A VA diferenciou os ossos do grupo controle e do grupo osteoporótico. Além disso, encontramos forte correlação positiva entre a VA e a conectividade óssea mensurada pela microCT.

Palavras-chave: Vibro-acustografia, Osteoporose, Ultrassom, Camundongo, MicroCT.

ABSTRACT

AGNOLLITTO, P. M. *Vibro-acoustography characterization of the acoustic response of mice femora in an experimental ex vivo model*. 2020. 64f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Introduction: This study aimed to evaluate the potential of vibro-acoustography (VA) technique to detect bone alterations associated with osteoporosis, using an animal model. **Methods:** The experimental protocol included three groups of mice: a) control group, b) group with osteoporosis and c) group with osteoporosis and treated with pamidronate, an antiresorptive drug. The evaluation of bone by the VA technique was conducted in an acoustic tank. A confocal ultrasonic transducer generated two high frequency (MHz) focused beams, with a difference frequency of 65 KHz between them. These two beams interact with each other and with the bone sample, producing a low frequency acoustic response registered by a hydrophone. The VA spectral curves were processed with the fast Fourier transform, in order to obtain numerical values that are weighted in the mechanical properties of the samples. VA acquisition was repeated three times. We used microCT as the reference technique and estimated the correlation of VA and microCT parameters. Statistical analysis included Interclass Correlation Coefficient (ICC), ANOVA multiple comparisons and Spearman's rank correlation coefficient. **Results:** VA spectral analysis and area under the curve values (mean; st. desv.) were, respectively, $1.29e^{-07}$ and $9.32e^{-08}$ for the control group, $3.25e^{-08}$ and $2.16e^{-08}$ for the group with osteoporosis; and $1.50e^{-07}$ and $8.37e^{-08}$ for the group with osteoporosis treated with pamidronate. VA differentiate the experimental groups ($p<0.01$) and the results were reproducible (ICC = 0.43 [95%CI = 0.15 – 0.71]). There was a statistically significant relationship between VA and MicroCT in connectivity ($p<0.01$; $r=0.80$) and connectivity density ($p<0.01$; $r=0.76$) and a trend between VA and trabecular number (Tb.N) and trabecular s Tb.Sp ($p=0.06$). **Conclusion:** VA differentiated the bones from the control group and the osteoporotic group. In addition, we found a strong positive correlation between VA and bone connectivity measured by microCT.

Keywords: Vibro-acoustography; Osteoporosis; Ultrasound; Mice; MicroCT

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Representação esquemática demonstrando o arranjo experimental no tanque acústico para a técnica de vibro-acustografia.27
- Figura 2** – Representação esquemática demonstrando o osso (alvo) sendo excitado pelas ondas de ultrassom emitidas pelo transdutor confocal.28
- Figura 3** – Representação esquemática da resposta acústica emitida pelo osso (alvo) sendo captada pelo hidrofone.28
- Figura 4** – Imagens de microCT, em A) ilustrando reconstruções volumétricas com renderização 3D da microarquitetura óssea para cada um dos grupos experimentais e em B) demonstrando cortes axiais dos espécimes correspondentes.....35
- Figura 5** – Imagem em escala de cinzas (a) de um dos espécimes experimentais do grupo controle, produzida pela técnica de vibro-acustografia em, com o espécime correspondente em (b).....40

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Curvas espectrais produzidas pela técnica de vibro-acustografia, representando a média dos três grupos experimentais: grupo controle (GC; linha preta), grupo osteoporótico (GO; linha vermelha) e grupo osteoporótico tratado com pamidronato (GOT; linha azul).33

Gráfico 2 – Boxplot representando a estimativa da área sob a curva dos espectros de vibro-acustografia para cada grupo experimental, mostrando um valor significativamente menor para o grupo de osteoporose ($p < 0,001$).34

Gráfico 3 – Gráficos de dispersão demonstrando correlações estatisticamente significativas entre a vibro-acustografia e o microCT em (a) conectividade ($r=0,80$; $p<0,001$) e (b) densidade de conectividade ($r=0,76$; $p<0,001$), além de tendências de correlação em (c) número de trabéculas ($r=0,52$; $p<0,06$) e (d) separação trabecular ($r=-0,49$; $p<0,06$).36

Gráfico 4 – Gráficos de dispersão demonstrando demais correlações entre a vibro-acustografia e o microCT em (a) BV/TV ($r=0,19$; $p<0,47$) e (b) espessura trabecular de conectividade ($r=-0,34$; $p<0,20$).37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Definição e descrição da microarquitetura óssea trabecular de acordo com <i>Parfitt et al.</i> 1987.	30
Tabela 2: Resultados numéricos para a estimativa da área sob a curva (AUC) das curvas espectrais da Vibro-acustografia.	33
Tabela 3: Parâmetros da microCT. BV/TV (%) significa fração do volume ósseo; Tb. Th (mm) significa espessura trabecular; Tb. N significa o número de trabéculas; Tb Sp. significa separação trabecular; Conn significa conectividade e Conn. D significa densidade de conectividade.	35
Tabela 4: Correlações entre medidas da vibro-acustografia e os parâmetros do microCT.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

VA	Vibro-acustografia
RM	Ressonância Magnética
US	Ultrassonografia
microCT	Micro Tomografia Computadorizada
ICC	Correlação intraclasse, do inglês <i>intraclass correlation</i>
ROI	Região de interesse, do inglês <i>region of interest</i>
DP	Desvio padrão
FOV	<i>Field of view</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Generalidades	17
1.2 Ultrassonografia	18
1.3 Técnicas de elastografia.....	19
1.4 Vibro-acustografia	20
1.5 MicroCT	20
1.6 Osteoporose.....	21
1.7 Justificativa.....	21
 2 OBJETIVOS.....	 23
2.1 Objetivo geral	24
2.2 Objetivos específicos	24
 3 MATERIAIS E MÉTODOS	 25
3.1 Desenho do estudo e animais	26
3.2 Experimentos e Vibro-acustografia	27
3.3 Processamento da resposta acústica obtida pela VA	29
3.4 MicroCT.....	29
3.5 Análise estatística	30
 4 RESULTADOS.....	 32
4.1 Análise Espectral da VA e Diferenciação dos Grupos.....	33
4.2 MicroCT	34
4.3 Correlações entre vibro-acustografia e microCT	35
 5 DISCUSSÃO	 38
 6 CONCLUSÃO	 42
 7 FINANCIAMENTOS.....	 44
 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 46

ANEXOS	55
ANEXO A. Pareceres da Comissão de Ética no Uso de Animais	56
ANEXO B. Resultados parciais da tese apresentados na forma de Tema Livre durante a 48ª Jornada Paulista de Radiologia – JPR 2018. O trabalho foi classificado em 1º lugar na categoria musculoesquelético (MSK) e foi condecorado com certificado de mérito.....	58
ANEXO C. Trabalho apresentado na forma de Tema Livre no 105º encontro anual da Sociedade de Radiologia da América do Norte – RSNA 2019	60
ANEXO D. Artigo com resultados preliminares do uso da técnica de Vibro-Acustografia para avaliação da superfície óssea e de fraturas, publicado na revista <i>Quantitative Imaging in Medicine and Surgery</i>	61
ANEXO E. Artigo com os resultados finais dos experimentos desta tese, submetido para publicação na revista <i>Quantitative Imaging in Medicine and Surgery</i>	62
ANEXO F. Tabela com dados completos da Vibro-acustografia	63
ANEXO G. Tabela com dados completos da microCT	64

1 INTRODUÇÃO

1.1 Generalidades

Os tecidos biológicos possuem propriedades biomecânicas que podem ser analisadas à luz dos conceitos de elasticidade e viscosidade, o primeiro correspondendo à capacidade que um material sólido tem de se deformar e retornar à condição inicial e o segundo, à mesma capacidade exibida por um fluido. Vários modelos biomecânicos foram concebidos para estudar estes materiais, dentre eles, os modelos de Kelvin-Voight (BULÍČEK; MÁLEK; RAJAGOPAL, 2012) e o modelo de Maxwell (GRECO; MARANO, 2015; LEWANDOWSKI; CHORAZYCZEWSKI, 2010), são os mais conhecidos. A maioria dos tecidos biológicos pode ser encarada como materiais viscoelásticos, ou seja, que reúnem propriedades de sólidos e de fluidos. Contudo, os tecidos biológicos possuem propriedades singulares que os diferem grandemente dos materiais inertes, notadamente porque podem se adaptar a diversos tipos de solicitações (“estresses”) alterando sua arquitetura interna e também porque possuem a capacidade de se auto reparar. Além disso estas propriedades tendem a se alterar com o envelhecimento do tecido. Do ponto de vista mecânico, os tecidos biológicos correspondem a materiais compostos, cujos principais componentes responsáveis pelas suas propriedades mecânicas são as fibras de colágeno e as de elastina (ÖZKAYA et al., 2017).

O tecido ósseo é o elemento primário de sustentação do corpo humano, correspondendo ao principal componente do sistema musculoesquelético. Possui funções variadas como proteção de órgãos internos, viabilização de movimentos ao ancorar músculos e tendões, além de participação na homeostase de níveis sérios de cálcio e potássio. O tecido ósseo possui conformação estrutural única que lhe confere propriedades biomecânicas que possibilitam o desempenho das funções supra descritas. Do ponto de vista histológico, o tecido ósseo é constituído por uma matriz orgânica (composta por células, fibras colágenas e outros componentes de tecido conjuntivo) e por uma matriz inorgânica (composta por sais minerais, com destaque para cálcio e fósforo). A matriz orgânica é responsável pela flexibilidade e resistência do tecido ósseo, enquanto a matriz inorgânica é responsável por sua rigidez. Existem dois tipos de arranjo do tecido ósseo, sendo a principal diferença entre eles a densidade aparente: o tecido ósseo cortical, que corresponde a tecido ósseo organizado de maneira densa e o tecido ósseo medular ou esponjoso, que corresponde a tecido ósseo organizado em trabéculas e, portanto, menos denso, ou

mais poroso. Do ponto de vista biomecânico, o tecido ósseo é um material não-homogêneo composto por múltiplas fases sólidas e fluidas. Assim como qualquer outro tecido biológico, as propriedades mecânicas do tecido ósseo podem ser alteradas pelas diversas condições patológicas (ÖZKAYA et al., 2017; SARAF et al., 2007).

1.2 Ultrassonografia

A ultrassonografia é um método de imagem amplamente utilizado para o estudo de tecidos biológicos, devido à sua ampla disponibilidade, baixo custo em comparação com outros métodos de imagem e também por não utilizar radiação ionizante. Além disso, a ultrassonografia permite avaliação em tempo real e fornece cortes seccionais (“tomográficos”) dos diversos tecidos avaliados (CHAN; PERLAS, 2011; COBBOLD, 2007).

A avaliação ultrassonográfica dos tecidos biológicos é feita mais comumente com a técnica convencional (Modo-B – *Brightness*), que está baseada em uma abordagem pulso-eco, em que pulsos de ultrassom são enviados para o alvo através de um transdutor. Os pulsos ultrassonográficos penetram no alvo e devido às diferentes impedâncias acústicas dos componentes dos tecidos biológicos, parte destas ondas são refletidas (na forma e ecos) e parte continua o seu trajeto no meio. Os ecos refletidos de diferentes pulsos primários são processados e se atribui uma escala de tons de cinza para geração da imagem ultrassonográfica, conforme a intensidade do eco retornado. Nesta abordagem, o transdutor ultrassonográfico funciona como o emissor dos pulsos e também como o receptor de ecos. Para isso ocorrer, tais transdutores são compostos por múltiplos cristais piezoelétricos, que estão eletronicamente interconectados e que vibram quando submetidos a uma corrente elétrica. Este efeito ficou conhecido como efeito piezoelétrico e foi originalmente descrito pelos irmãos Curie em 1880, que também descreveram o efeito piezoelétrico reverso, que ocorre quando cristais piezoelétricos emitem uma corrente elétrica, ao receberem vibrações (EDLER; LINDSTRÖM, 2004; HANGIANDREOU, 2003).

A ultrassonografia modo-B, possui alta sensibilidade e especificidade para a avaliação de tecidos moles como o tecido mamário, tireoidiano ou de órgãos intra-abdominais. Tradicionalmente, contudo, é sabido que tecidos que apresentam alta

impedância acústica são um obstáculo para a ultrassonografia convencional (CHO et al., 2004), dentre eles o tecido ósseo. Mesmo assim, vários trabalhos já demonstraram a possibilidade de avaliação do tecido ósseo por meio da ultrassonografia, porém limitando-se ao estudo de sua superfície (BAILLET et al., 2011; GRIFFITH et al., 1999; JIN et al., 2006; LI et al., 2019; RENAUD et al., 2018) ou enfatizando a avaliação de epífises e/ou apófises cartilaginosas na população pediátrica (HRYHORCZUK; RESTREPO; LEE, 2016; MARANHO et al., 2017; MARKOWITZ et al., 1992; TEIXEIRA et al., 2015; VOLPON, 2005).

Desse modo, atualmente, uma avaliação mais abrangente do tecido ósseo por ultrassonografia convencional encontra limitações significativas, devido à alta impedância acústica do osso cortical, que impede a propagação dos pulsos ultrassonográficos (COBBOLD, 2007; MACINTYRE; LORBERGS, 2012; WELLS; LIANG; YOUNG, 2011). No entanto, desenvolvimentos recentes de tecnologias de imagem por ultrassom, como as técnicas de elastografia, estão mudando esse cenário.

1.3 Técnicas de elastografia

As técnicas de elastografia correspondem a um conjunto de técnicas que podem ser aplicadas aos tecidos biológicos, com intuito de se obter informações acerca das diferentes propriedades mecânicas destes tecidos. Especificamente na área médica, estas técnicas podem aferir parâmetros elásticos (“rigidez”) de um tecido, de uma maneira semelhante à palpação manual, com a vantagem de ser um método quantitativo (OPHIR et al., 1991; PARKER; DOYLEY; RUBENS, 2011). Esta capacidade é especialmente útil na área médica, uma vez que mudanças nas propriedades elásticas de um tecido, podem indicar alterações patológicas.

O princípio básico de uma técnica de elastografia é induzir movimento no tecido alvo, a partir de uma fonte externa e então medir o deslocamento provocado, para, a partir deste, estimar parâmetros mecânicos teciduais. Existem inúmeras técnicas de elastografia, diferindo principalmente em como o tecido alvo é excitado e/ou em como a resposta tecidual é adquirida. Na maioria das técnicas de elastografia, uma força conhecida é aplicada ao objeto e o movimento resultante é medido utilizando-se técnicas ultrassonográficas. Outras modalidades de exames de imagem, como a ressonância magnética, podem ser utilizadas para medir tal

deslocamento. Muitas técnicas de elastografia estão em estágios de desenvolvimento, porém algumas delas já atingiram a prática clínica (ALMEIDA et al., 2015; CATHELINE et al., 1999; DOHERTY et al., 2013; SARVAZYAN et al., 2011; SIGRIST et al., 2017; TANG et al., 2015).

Uma parte das técnicas de elastografia é baseada na força de radiação acústica do ultrassom para excitar o alvo, constituindo um uso alternativo da ultrassonografia em relação à técnica convencional (Modo-B), previamente discutido. *Fatemi e Greenleaf* propuseram uma dessas técnicas denominada Vibro-acustografia (FATEMI; GREENLEAF, 1998).

1.4 Vibro-acustografia

A VA é uma das técnicas de elastografia que usa a força de radiação acústica do ultrassom para excitar um alvo. Nesta técnica, dois feixes acústicos confocais (feixes primários) são emitidos em frequências próximas (na ordem de MHz). Estes feixes interagem entre si e criam um feixe acústico secundário de baixa frequência (na ordem de KHz), que por sua vez atinge o objeto alvo. Como resposta, o objeto (ou parte deste) vibra em um padrão sinusoidal específico, determinado por suas propriedades viscoelásticas. Esta resposta acústica do objeto é então captada por um hidrofone e pode ser utilizada para a confecção de imagens do objeto alvo e também para quantificação de parâmetros numéricos relacionados às propriedades mecânicas do alvo (FATEMI; GREENLEAF, 1999). O efeito da radiação acústica dinâmica na região na qual a mesma está sendo aplicada foi recentemente explorado e tais estudos mostraram que a resposta obtida na VA surge a partir da interação não linear do feixe de ultrassom com o meio. *Silva e Mitri* demonstraram que na VA, além da força de radiação, os dois feixes primários interagem entre si, de maneira não linear, dando origem a ondas acústicas com frequências harmônicas às dos feixes primários (SILVA; MITRI, 2011).

1.5 MicroCT

A micro tomografia computadorizada (microCT) é o método padrão ouro para avaliação morfológica e para a mensuração de parâmetros da microarquitetura óssea em estudos pré-clínicos em animais, pois permite a visualização da natureza

tridimensional (3D) da estrutura óssea e também a quantificação altamente precisa dos parâmetros estruturais ósseos. Os principais parâmetros da microCT são volume ósseo trabecular (BV / TV), espessura trabecular (Tb. Th), separação trabecular (Tb. Sp), número de trabéculas (Tb. N), conectividade (Conn.) e densidade de conectividade (Conn. D) para o osso esponjoso; além do volume e da espessura para o osso cortical (CAMPBELL; SOPHOCLEOUS, 2014). A conectividade é uma propriedade tridimensional que descreve as várias conexões entre nós (que são unidades estruturais que representam a confluência de três ou mais trabéculas) e os segmentos de conexão. Conectividade (conn.) é um índice desenvolvido para caracterizar a redundância de conexões trabeculares e é derivado do número de Euler (ODGAARD; GUNDERSEN, 1993), que é uma medida topológica fundamental contando o número de objetos, o número de cavidades medulares completamente cercado por osso e o número de conexões que devem ser quebradas para dividir a estrutura em duas partes. Como depende do tamanho da estrutura, também pode ser expresso na forma de densidade de conectividade (Conn. D), quando dividida pelo volume total (BOUXSEIN et al., 2010; DALLE CARBONARE et al., 2005; DEHOFF; AIGELTINGER; CRAIG, 1972). Em nosso estudo, usamos apenas os parâmetros para o osso esponjoso, uma vez que a osteoporose afeta principalmente essa região do osso.

1.6 Osteoporose

A osteoporose é uma doença osteometabólica com etiologia multifatorial e de alta prevalência na população geral, caracterizada por redução na massa óssea e alterações na microarquitetura óssea (COMPSTON et al., 2017; COSMAN et al., 2014; GOLOB; LAYA, 2015; TARANTINO et al., 2017). A consequência mais importante da osteoporose é uma redução na resistência mecânica dos ossos, o que aumenta o risco de fraturas. Desde 1994, a Organização Mundial da Saúde (OMS) define o diagnóstico operacional da osteoporose com base na medida da densidade mineral óssea (DMO) (COMPSTON et al., 2017; KANIS et al., 2013a, 2013b, 2016; NAYAK et al., 2015). A densitometria óssea por raios-X de dupla energia (DXA) é o método padrão ouro para a mensuração da densidade mineral óssea (DMO) *in vivo* (TELLA; GALLAGHER, 2014). A DXA mensura a atenuação de dois feixes de raios-

X (um com alta e outro com baixa energia) ao atravessar ossos e tecidos moles e dessa maneira consegue quantificar a massa óssea.

A DXA prediz o risco de fraturas com base apenas na mensuração da massa óssea (BERGOT et al., 2002; BROY et al., 2015; SILVA et al., 2015; STEWART; REID; PORTER, 1994), porém podem ocorrer fraturas por fragilidade em indivíduos que mostram um grande espectro de valores de DMO, incluindo indivíduos com DMO dentro dos valores normais. Como alternativa, vários métodos estão disponíveis para avaliar características detalhadas da microarquitetura óssea, mas são invasivos e demorados (histomorfometria óssea) ou caros e envolvem altas doses de radiação ionizante (tomografia computadorizada periférica de alta resolução). A micro tomografia computadorizada (microCT), por outro lado, é o padrão ouro para medições *ex vivo*, mas tem um papel limitado em estudos *in vivo* devido ao pequeno campo de visão e alta dose de radiação ionizante (BOUXSEIN et al., 2010).

1.7 Justificativa

Uma vez que a DXA não é capaz de prever parte substancial dos pacientes que desenvolverão fraturas relacionadas à fragilidade óssea, justificam-se tentativas de desenvolvimento de novos métodos diagnósticos que visem suprir esta lacuna específica. Com base em nossa revisão da literatura e também na experiência do nosso grupo com a VA, decidimos avaliar o potencial desta técnica como alternativa viável à DXA no diagnóstico de osteoporose.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo do nosso estudo foi avaliar o potencial diagnóstico da VA na osteoporose e, para esse fim, avaliamos o tecido ósseo *ex vivo* usando o microCT como padrão de referência.

2.2 Objetivos específicos

2.2 .1) Diferenciar tecido ósseo normal do osteoporótico com a VA.

2.2.2) Avaliar o potencial da VA em monitorar a resposta ao tratamento da osteoporose

2.2.3) Avaliar se os resultados das medidas da VA são reprodutíveis.

2.2.4) Correlacionar os parâmetros da microCT com a VA.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi realizado com fêmures de camundongos (C57B16) crio preservados, que foram utilizados em um estudo experimental prévio (SPIRLANDELI et al., 2017), realizado em nosso laboratório e que foi aprovado pelo Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (protocolo no 111/2011). Nova aprovação do comitê foi dispensada (ANEXO A), uma vez que não foram realizados novos experimentos com animais.

3.1 Desenho do estudo e animais

O desenho do estudo incluiu três grupos de fêmures de camundongos: a) um grupo controle (GC), com seis amostras, b) um grupo com osteoporose induzida (GO), com seis amostras submetidas a injeções intraperitoneais de CCl_4 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos da América) e c) um grupo com indução de osteoporose e tratado com pamidronato (GOT), com 5 amostras submetidas a injeções intraperitoneais de CCl_4 seguidas de tratamento com pamidronato, uma droga antirreabsortiva.

Camundongos machos de cinco semanas de idade, pesando aproximadamente 18 g, foram usados em nossos experimentos. Os animais foram alojados em gaiolas em uma sala com condições controladas de umidade e temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) e com um ciclo artificial de claro / escuro de 12 horas (luzes acesas: 06:00 - 18:00). Os animais tiveram livre acesso à água da torneira e à ração. Para induzir osteodistrofia hepática, os camundongos foram tratados com CCl_4 (1 mL / kg de peso corporal) dissolvido em azeite 1: 4 (v: v) administrado por injeção intraperitoneal duas vezes por semana, conforme adaptado de estudos anteriores nesta linha de investigação (PEREIRA et al., 2009; TAVEIRA et al., 2010). No final do período de 8 semanas das injeções de CCl_4 , aguardou-se um intervalo de 2 semanas para a consolidação da doença hepática. Os camundongos do GOT foram então tratados com uma injeção intraperitoneal de pamidronato dissódico (Eurofarma, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) dissolvido em NaCl 0,9% a 1,25 mg / kg no final da quarta semana. A taxa de mortalidade foi de 25% nos grupos de camundongos que receberam a injeção intraperitoneal de CCl_4 , e essa taxa não foi influenciada pela administração adicional de pamidronato dissódico. No final da décima semana, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical.

3.2 Experimentos e Vibro-acustografia

Os experimentos com VA foram realizados em um tanque acústico com água filtrada, degaseificada e deionizada, sob temperatura controlada (23°C) (Figura 1).

Figura 1 – Representação esquemática demonstrando o arranjo experimental no tanque acústico para a técnica de vibro-acustografia.

Na técnica VA, realizada em modo *toneburst*, um transdutor ultrassônico confocal de dois elementos, com foco de 5 cm, resolução lateral de 0,7 mm e zona focal de 1 cm de comprimento, gera dois feixes focados em alta frequência (3.200 MHz e 3.265 MHz), com uma diferença de frequência de 65 kHz entre eles. Os cristais do transdutor foram excitados por um gerador de função (Modelo 33220A, Keysight, Santa Rosa, Califórnia, Estados Unidos). Os dois feixes interagem entre si e geram um feixe secundário que atingem o alvo (amostra óssea) (Figura 2), produzindo uma resposta acústica de baixa frequência (RA), que é registrada por um hidrofone (Modelo ITC-6050C, International Transducer Corporation, Santa Barbara, Califórnia, Estados Unidos), que tem posição fixa no arranjo experimental.

Figura 2 – Representação esquemática demonstrando o osso (alvo) sendo excitado pelas ondas de ultrassom emitidas pelo transdutor confocal.

Os sinais da RA foram processados para obter valores numéricos que fornecem informações sobre as propriedades mecânicas das amostras (Figura 3). Os experimentos foram repetidos três vezes, em dias diferentes, para testar a reprodutibilidade.

Figura 3 – Representação esquemática da resposta acústica emitida pelo osso (alvo) sendo captada pelo hidrofone.

3.3 Processamento da resposta acústica obtida pela VA

Uma vez adquiridos, os sinais foram processados utilizando um algoritmo escrito em Matlab®. A primeira parte do processamento foi dedicada a encontrar a forma mais efetiva de reduzir os ruídos presentes no sinal adquirido com a aplicação de filtros diferenciais. O próximo passo foi a escolha de uma forma de janelamento do sinal, pois a definição do trecho de sinal acústico utilizado para o processamento é um dos fatores mais críticos para a relação sinal ruído. Escolhido o intervalo do sinal que foi utilizado, realizamos a transformada rápida de Fourier do sinal e escolhemos a frequência com a qual foi realizada a leitura da amplitude do sinal. Para a obtenção de parâmetros numéricos, foi calculada a área sob a curva dos espectros médios de cada grupo experimental, em um intervalo de frequências centrado em 65 KHz e com uma largura de 5 KHz.

3.4 MicroCT

A microCT foi utilizada para avaliar os parâmetros tridimensionais da microarquitetura óssea no fêmur direito dos animais. Após a morte dos animais, os fêmures foram retirados e conservados em álcool (etanol) a 70%. A partir da terceira semana de imersão, os músculos foram retirados e os ossos foram mantidos em álcool a 70% até a realização do exame.

Os espécimes foram escaneados usando um instrumento de microCT de alta resolução (Modelo 1172, SkyScan, Kontich, Antuérpia, Bélgica), composto por um tubo de raios-X de microfoco, com fonte de alta tensão (100keV), um porta amostra com manipulador de precisão e um detector baseado em câmera CCD de 11Mp conectados a um computador de controle e aquisição de dados, interligado em rede a um cluster de computadores com softwares para reconstrução, visualização e quantificação de imagens 2D e 3D.

Os parâmetros morfométricos selecionados para a análise da microarquitetura óssea estão descritos na Tabela 1. Todos os parâmetros foram nomeados de acordo com o sistema de *Parfitt* (PARFITT et al., 1987).

Tabela 1: Definição e descrição da microarquitetura óssea trabecular de acordo com *Parfitt et al.* 1987.

Abreviação	Variável	Descrição	Unidade
BV/TV	Fração de volume ósseo	Razão entre volume ósseo segmentado e volume total da região de interesse	%
Tb. Th	Espessura trabecular	Espessura média das trabéculas avaliada por método 3D direto	mm
Tb. N	Número de Trabéculas	Número médio de trabéculas por unidade de comprimento	1/mm
Tb. Sp	Separação trabecular	Distância média entre trabéculas avaliada usando método 3D direto	mm
Conn. Den	Densidade de Conectividade	Medida do grau de conectividade das trabéculas normalizadas pela TV (volume total da região de interesse)	1/mm ³

Esses parâmetros foram avaliados na porção distal do fêmur, iniciando 0,25 mm proximal à placa de crescimento distal e cobrindo um comprimento total de 1 mm, conforme recomendações específicas (BOUXSEIN et al., 2010), separando-se o osso trabecular e excluindo o osso cortical manualmente. Os ossos foram escaneados com nível de energia de 55 kVp, corrente de tubo de 145 mA e um voxel com 5,0 μm^3 (BOUXSEIN et al., 2010; CAMPBELL; SOPHOCLEOUS, 2014). O equipamento foi submetido a calibração semanal, com *phantoms* apresentando densidades de 0,25 e 0,75 mg / cm³. Para a análise quantitativa da arquitetura trabecular foi utilizado o programa *CT-Analyser* (v. 1.13.2.1) e os resultados foram expressos de acordo com a nomenclatura padrão (BOUXSEIN et al., 2010)

3.5 Análise estatística

Para avaliação estatística, o laboratório de pesquisa contou com assessoria estatística profissional (ProEstat). Os dados foram organizados e analisados utilizando-se os *softwares* SAS (versão 9.2, SAS, Cary, Carolina do Norte, Estados Unidos da América) e R (versão 3.4.1, The R-Project for Statistical Computing, Software de licença aberta).

Os resultados obtidos para os três grupos foram comparados usando ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. A reprodutibilidade das experiências foi avaliada usando o coeficiente de correlação interclasse (ICC), e o coeficiente de Spearman

foi usado para determinar a correlação entre dois parâmetros. Um valor de p menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS

4.1 Análise Espectral da VA e Diferenciação dos Grupos

A curvas espectrais obtidas através da RA média para cada grupo experimental são mostradas no Gráfico 1, enquanto os valores numéricos obtidos pela estimativa da área sob a curva são demonstrados na Tabela 2. Os dados completos para estes cálculos se encontram demonstrados no anexo C.

Gráfico 1 – Curvas espectrais produzidas pela técnica de vibro-acustografia, representando a média dos três grupos experimentais: grupo controle (GC; linha preta), grupo osteoporótico (GO; linha vermelha) e grupo osteoporótico tratado com pamidronato (GOT; linha azul).

Tabela 2: Resultados numéricos para a estimativa da área sob a curva (AUC) das curvas espectrais da Vibro-acustografia.

Grupo	n	Média	Desv. Padrão
CG	6	$1,29e^{-07}$	$9,32e^{-08}$
GO	6	$3,25e^{-08}$	$2,16e^{-08}$
GOT	5	$1,50e^{-07}$	$8,37e^{-08}$

Um boxplot representando os resultados experimentais é mostrado no Gráfico

2.

Gráfico 2 – Boxplot representando a estimativa da área sob a curva dos espectros de vibro-acustografia para cada grupo experimental, mostrando um valor significativamente menor para o grupo de osteoporose ($p < 0,001$).

ANOVA com o pós-teste de Tukey demonstrou que a estimativa da área sob a curva dos espectros de VA representando a média dos grupos foi capaz de diferenciar os três grupos experimentais ($p < 0,001$), e os resultados foram reprodutíveis (ICC = 0,43 [IC 95% = 0,15 - 0,71]).

4.2 MicroCT

Os parâmetros micro arquiteturais testados pela microCT estão listados na Tabela 3. A figura 5 demonstra reconstruções tridimensionais com renderização 3D da microarquitetura óssea nos três grupos experimentais, além de cortes axiais de espécimes correspondentes.

Tabela 3: Parâmetros da microCT. BV/TV (%) significa fração do volume ósseo; Tb. Th (mm) significa espessura trabecular; Tb. N significa o número de trabéculas; Tb Sp. significa separação trabecular; Conn significa conectividade e Conn. D significa densidade de conectividade.

	CG		GO		GOT	
	Média	D. Padrão	Média	D. Padrão	Média	D. Padrão
BV/TV (%)	11,961	3,47	10,398	3,53	12,886	4,44
Tb. Th (mm)	0,054	0,009	0,052	0,006	0,047	0,005
Tb. N (1/mm)	2,287	0,28	1,679	0,14	2,532	0,70
Tb. Sp (mm)	0,174	0,02	0,222	0,03	0,103	0,01
Conn.	598,00	175,11	358,00	136,54	3086,83	1109,78
Conn.D (1/mm³)	264,84	79,13	172,66	51,50	1452,19	504,83

Figura 4 – Imagens de microCT, em A) ilustrando reconstruções volumétricas com renderização 3D da microarquitetura óssea para cada um dos grupos experimentais e em B) demonstrando cortes axiais dos espécimes correspondentes.

4.3 Correlações entre vibro-acustografia e microCT

As correlações entre a VA e microCT estão listadas na Tabela 4. Houve forte correlação entre as medidas da VA e a conectividade pelo microCT ($r = 0,80$; $p < 0,01$) e com a densidade de conectividade ($r = 0,76$; $p < 0,01$), bem como uma correlação moderada entre a VA e o número de trabéculas ($r = 0,52$; $p = 0,06$) e separação trabecular ($r = -0,49$; $p = 0,06$), como mostrado no Gráfico 3. As demais correlações entre a VA e os parâmetros da microCT estão demonstrados no Gráfico 4.

Tabela 4: Correlações entre medidas da vibro-acustografia e os parâmetros do microCT.

	Coefficiente de Spearman (r)	P-valor
BV/TV (%)	0,19	0,47
Tb. Th (mm)	-0,34	0,20
Tb. N (1/mm)	0,52	0,06
Tb. Sp (mm)	-0,49	0,06
Conn.	0,80	<0,01
Conn.D (1/mm³)	0,76	<0,01

Gráfico 3 – Gráficos de dispersão demonstrando correlações estatisticamente significativas entre a vibro-acustografia e o microCT em (a) conectividade ($r=0,80$; $p<0,001$) e (b) densidade de conectividade ($r=0,76$; $p<0,001$), além de tendências de correlação em (c) número de trabéculas ($r=0,52$; $p<0,06$) e (d) separação trabecular ($r=-0,49$; $p<0,06$).

Gráfico 4 – Gráficos de dispersão demonstrando demais correlações entre a vibro-acustografia e o microCT em (a) BV/TV ($r=0,19$; $p<0,47$) e (b) espessura trabecular de conectividade ($r=-0,34$; $p<0,20$).

5 DISCUSSÃO

Nossos resultados mostram que a VA diferenciou o grupo com osteoporose induzida do grupo controle. Além disso, a VA mostrou melhora no grupo com osteoporose induzida e tratamento, o que está de acordo com os parâmetros do microCT. A avaliação quantitativa da área sob a curva dos espectros de VA dos três grupos experimentais apresentou diferença estatisticamente significativa e os resultados da VA foram reproduzíveis. Além disso, houve uma forte correlação entre as medidas da VA e os parâmetros microarquiteturais aferidos pelo microCT, como conectividade ($r = 0,80$; $p < 0,01$) e densidade de conectividade ($r = 0,76$; $p < 0,01$). Também houve uma tendência a uma relação positiva entre o número de trabéculas ($r = 0,52$; $p = 0,06$) e os valores de VA, enquanto uma tendência a uma relação negativa foi observada entre VA e separação trabecular ($r = -0,49$; $p = 0,06$) (ZOU; TUNCALI; SILVERMAN, 2003).

O tempo de aquisição para as medidas quantitativas foi de aproximadamente 5 minutos por amostra, mas isso pode ser reduzido com a implementação da VA em sistemas comerciais (URBAN et al., 2011a) e utilizando-se um transdutor de múltiplos elementos (KAMIMURA et al., 2012). O benefício potencial mais importante do uso da VA para o diagnóstico de osteoporose *in vivo* seria impedir a exposição do paciente à radiação ionizante, que é inerente às técnicas de raios-X, como a DXA.

A VA é uma técnica bastante versátil e também pode ser utilizada para produzir imagens do tecido ósseo. Nosso grupo já tem experiência com este tipo de aplicação da VA, conforme previamente publicado (NOGUEIRA-BARBOSA et al., 2017) – Anexo D. A figura 5 demonstra uma imagem de um osso dos ossos dos camundongos, juntamente com a amostra *a fresco*. O tempo médio de aquisição dessa imagem foi de aproximadamente 5 horas/cm², com aproximadamente 1 hora para processamento dos dados obtidos, usando a mesma configuração experimental

Figura 5 – Imagem em escala de cinzas (a) de um dos espécimes experimentais do grupo controle, produzida pela técnica de vibro-acustografia em, com o espécime correspondente em (b).

Tomados em conjunto, esses resultados mostram o potencial da VA não apenas como uma ferramenta de diagnóstico para osteoporose, mas também como uma ferramenta para controle do tratamento.

Uma desvantagem da VA que merece citação é que para maximizar a resposta acústica obtida, se faz necessária a utilização de uma diferença de frequência (frequência de batimento) entre os feixes primários que seja otimizada para cada objeto alvo e isto pode se tornar uma tarefa exaustiva, uma vez que não é possível saber de antemão qual a melhor frequência de batimento a ser utilizada. Além disso, ao se fixar uma frequência de batimento, informações importantes podem ser perdidas no processo. Devido a esta desvantagem da VA, uma variação da técnica original foi proposta por um dos nossos colaboradores (BRAZ; CARNEIRO, 2020), no laboratório GIIMUS, como parte de sua tese de doutorado. Diferentemente da VA, esta técnica consiste na utilização de apenas um pulso focalizado de ultrassom para excitar o objeto alvo. As etapas seguintes são idênticas às da VA.

A osteodistrofia hepática (OH) foi nosso modelo experimental para o estudo da osteoporose. Neste modelo, a perda de massa óssea é secundária à insuficiência hepática. Ooforectomia bilateral, lesão medular como tetraplegia, imobilização prolongada e manipulação da dieta são os métodos mais comumente utilizados para induzir a osteoporose experimental (ATMACA; AYDIN; MUSAOĞLU, 2013; GUEDES et al., 2019; JEE; MA, 1999; JEE; YAO, 2001; KOMORI, 2015; LELOVAS et al., 2008; MANDARANO-FILHO; BEZUTI; BARBIERI, 2016; VOLPON et al., 2015; ZAMARIOLI et al., 2013). Embora não tenhamos utilizado os modelos mais comuns de osteoporose experimental da literatura, a perda óssea trabecular obtida foi equivalente a esses outros modelos. OH é uma doença osteometabólica que apresenta baixa DMO e alterações na microarquitetura óssea e é um modelo experimental razoável para avaliar a osteoporose (BARBU et al., 2017). Alguns estudos mostraram que a diminuição da formação óssea é o mecanismo predominante na OH (KLEIN et al., 2002), enquanto outros apontam para o aumento da reabsorção óssea como a principal causa de perda óssea (CHEN et al., 1996).

A ultrassonografia quantitativa (QUS) é outra técnica de ultrassom usada para avaliar o tecido ósseo, que tem como base a atenuação da velocidade e da amplitude das ondas de ultrassom (BERNARD et al., 2017; PEREIRA et al., 2019; XU et al., 2016). O QUS não é usado para obter imagens, mas sim para quantificar propriedades mecânicas dos tecidos (BARKMANN, 2008). Desse modo, pode ser usada para diagnosticar a osteoporose (MINONZIO et al., 2019; RINALDO et al., 2018; WÜSTER et al., 2009), porém pode ser usada também para avaliar a consolidação de fraturas (BARBIERI et al., 2012; BEZUTI et al., 2013; MANDARANO-FILHO; BEZUTI; BARBIERI, 2016; MESQUITA; BARBIERI; BARBIERI, 2016; XU et al., 2014). A QUS é uma técnica de baixo custo e que pode ser aplicada em diferentes locais anatômicos, porém, de acordo com as diretrizes oficiais da Sociedade Internacional de Densitometria Clínica (ISCD) (HANS; BAIM, 2017), o único local validado para diagnóstico de osteoporose é o calcâneo.

A VA já foi usada anteriormente para avaliar o tecido ósseo (CALLÉ et al., 2003; KAMIMURA et al., 2013; NOGUEIRA-BARBOSA et al., 2017; RENAUD et al., 2008; URBAN et al., 2011b), porém nestes estudos, a avaliação foi direcionada principalmente para critérios qualitativos do tecido ósseo. Recentemente, *Ghavami e Denis* fizeram uso da VA *in vivo* em humanos, para discriminar osteopenia e osteoporose (GHAVAMI et al., 2019). Contudo, de acordo com nossa revisão bibliográfica, nosso estudo foi a primeira tentativa bem-sucedida de correlacionar a VA com a microCT, que corresponde ao método padrão ouro para diagnóstico de osteopenia/osteoporose em estudos experimentais *ex vivo*.

Nosso estudo tem algumas limitações que merecem citação. Primeiramente, testamos um número relativamente limitado de amostras e o *setup* experimental não é adequado para uso clínico. Além disso, até o presente momento, não há uma análise fenomenológica completa da interação da VA com o tecido ósseo, para explicar, em termos físicos, o que realmente está sendo mensurado, em relação à estrutura interna do tecido ósseo. Nosso grupo está trabalhando em modelos físicos para melhor interpretação desta interação. Contudo, nossos resultados incentivam novos trabalhos para investigar o potencial uso da VA *in vivo* para o diagnóstico de osteoporose.

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados mostraram que a VA foi capaz de diferenciar o tecido ósseo saudável do tecido com osteoporose em um modelo experimental e também foi útil para monitorar a resposta terapêutica neste contexto. A reprodutibilidade da técnica foi razoável e observamos correlações entre as médias da VA e os parâmetros da microarquitetura óssea aferidos pela microCT.

Esses resultados incentivam novos estudos com o objetivo de avaliar o potencial uso da VA para o diagnóstico da osteoporose, como uma alternativa relativamente barata e livre de radiação, em comparação com a DXA.

7 FINANCIAMENTOS

Agradecemos às seguintes fontes de financiamento:

-Finep (concessão 2210/2008)

-Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq
(concessão 305610 / 2017-1)

-FAEPA (concessão 819/2019).

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, T. W. J. et al. Comparison between shear wave dispersion magnetomotive ultrasound and transient elastography for measuring tissue-mimicking phantom viscoelasticity. **IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control**, v. 62, n. 12, p. 2138–2145, dez. 2015.

ATMACA, H.; AYDIN, A.; MUSAOĞLU, R. Experimental model of osteoporosis: comparison between ovariectomy and botulinum toxin a. **Acta ortopedica brasileira**, v. 21, n. 6, p. 340–3, 2013.

BAILLET, A. et al. Comparison of the efficacy of sonography, magnetic resonance imaging and conventional radiography for the detection of bone erosions in rheumatoid arthritis patients: a systematic review and meta-analysis. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 50, n. 6, p. 1137–47, jun. 2011.

BARBIERI, G. et al. A Comparative Analysis between Ultrasonometry and Computer-Aided Tomography to Evaluate Bone Healing. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 30, n. 7, p. 1076–1082, jul. 2012.

BARBU, E.-C. et al. Hepatic Osteodystrophy: A Global (Re)View of the Problem. **Acta Clinica Croatica**, v. 56, n. 3, p. 512–525, set. 2017.

BARKMANN, R. Quantitative Ultrasound. In: **Radiology of Osteoporosis**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008. p. 163–173.

BERGOT, C. et al. Hip fracture risk and proximal femur geometry from DXA scans. **Osteoporosis International**, v. 13, n. 7, p. 542–550, 4 mar. 2002.

BERNARD, S. et al. Ultrasonic computed tomography based on full-waveform inversion for bone quantitative imaging. **Physics in Medicine and Biology**, v. 62, n. 17, p. 7011–7035, 9 ago. 2017.

BEZUTI, M. T. et al. Ultrasonometry evaluation of axial compression osteosynthesis. An experimental study. **Acta ortopedica brasileira**, v. 21, n. 1, p. 46–51, jan. 2013.

BOUXSEIN, M. L. et al. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 7, p. 1468–1486, jul. 2010.

BRAZ, G. DE A.; CARNEIRO, A. A. O. **Implementação de uma modalidade de imagem baseada na emissão acústica em baixa frequência (kHz) de alvos excitados em alta frequência (MHz)**. [s.l.] USP, 2020.

BROY, S. B. et al. Fracture Risk Prediction by Non-BMD DXA Measures: The 2015 ISCD Official Positions Part 1: Hip Geometry. **Journal of Clinical Densitometry**, v. 18, n. 3, p. 287–308, 1 jul. 2015.

BULÍČEK, M.; MÁLEK, J.; RAJAGOPAL, K. R. On kelvin-voigt model and its generalizations. **Evolution Equations and Control Theory**, v. 1, n. 1, p. 17–42, 1 mar. 2012.

CALLÉ, S. et al. Application of Vibro-Acoustography to Tissue Elasticity Imaging. **Acta Acustica (Stuttgart)**, v. 89, n. 6, p. 936–941, 2003.

CAMPBELL, G. M.; SOPHOCLEOUS, A. Quantitative analysis of bone and soft tissue by micro-computed tomography: applications to ex vivo and in vivo studies. **BoneKEY Reports**, v. 3, 20 ago. 2014.

CATHELINE, S. et al. Diffraction field of a low frequency vibrator in soft tissues using transient elastography. **IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control**, v. 46, n. 4, p. 1013–1019, jul. 1999.

CHAN, V.; PERLAS, A. Basics of ultrasound imaging. In: **Atlas of Ultrasound-Guided Procedures in Interventional Pain Management**. [s.l.] Springer, 2011. p. 13–19.

CHEN, C. C. et al. Metabolic bone disease of liver cirrhosis: is it parallel to the clinical severity of cirrhosis? **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 11, n. 5, p. 417–21, maio 1996.

CHO, K.-H. et al. Sonography of bone and bone-related diseases of the extremities. **Journal of Clinical Ultrasound**, v. 32, n. 9, p. 511–521, 1 nov. 2004.

COBBOLD, R. S. C. **Foundations of biomedical ultrasound**. [s.l.] Oxford University Press, 2007.

COMPSTON, J. et al. UK clinical guideline for the prevention and treatment of osteoporosis. **Archives of osteoporosis**, v. 12, n. 1, p. 43, dez. 2017.

COSMAN, F. et al. Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. **Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA**, v. 25, n. 10, p. 2359–81, out. 2014.

DALLE CARBONARE, L. et al. **Bone microarchitecture evaluated by histomorphometry** *Micron*, out. 2005.

DEHOFF, R. T.; AIGELTINGER, E. H.; CRAIG, K. R. Experimental determination of the topological properties of three-dimensional microstructures. **Journal of Microscopy**, v. 95, n. 1, p. 69–91, fev. 1972.

DOHERTY, J. R. et al. Acoustic radiation force elasticity imaging in diagnostic ultrasound. **IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control**, v. 60, n. 4, p. 685–701, abr. 2013.

EDLER, I.; LINDSTRÖM, K. The history of echocardiography. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 30, n. 12, p. 1565–1644, dez. 2004.

FATEMI, M.; GREENLEAF, J. F. Ultrasound-stimulated vibro-acoustic spectrography. **Science (New York, N.Y.)**, v. 280, n. 5360, p. 82–5, 3 abr. 1998.

FATEMI, M.; GREENLEAF, J. F. Vibro-acoustography: An imaging modality based on ultrasound-stimulated acoustic emission. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 12, p. 6603–6608, 8 jun. 1999.

GHAVAMI, S. et al. Pulsed vibro-acoustic method for assessment of osteoporosis & osteopenia: A feasibility study on human subjects. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 97, p. 187–197, 1 set. 2019.

GOLOB, A. L.; LAYA, M. B. Osteoporosis. **Medical Clinics of North America**, v. 99, n. 3, p. 587–606, maio 2015.

GRECO, R.; MARANO, G. C. Identification of parameters of Maxwell and Kelvin–Voigt generalized models for fluid viscous dampers. **Journal of Vibration and Control**, v. 21, n. 2, p. 260–274, 3 fev. 2015.

GRIFFITH, J. F. et al. Sonography compared with radiography in revealing acute rib fracture. **AJR. American journal of roentgenology**, v. 173, n. 6, p. 1603–9, 19 dez. 1999.

GUEDES, P. M. S. G. et al. Undernutrition impairs the quality of growth plate and trabecular and cortical bones in growing rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 34, n. 3, p. e201900301, 18 mar. 2019.

HANGIANDREOU, N. J. **B-mode US: Basic Concepts and New Technology Radiographics**, jul. 2003.

HANS, D.; BAIM, S. Quantitative Ultrasound (QUS) in the Management of Osteoporosis and Assessment of Fracture Risk. **Journal of Clinical Densitometry**, v. 20, n. 3, p. 322–333, 1 jul. 2017.

HRYHORCZUK, A. L.; RESTREPO, R.; LEE, E. Y. Pediatric Musculoskeletal Ultrasound: Practical Imaging Approach. **American Journal of Roentgenology**, v. 206, n. 5, p. W62–W72, 21 maio 2016.

JEE, W. S.; MA, Y. Animal models of immobilization osteopenia. **Morphologie : bulletin de l'Association des anatomistes**, v. 83, n. 261, p. 25–34, jun. 1999.

JEE, W. S.; YAO, W. Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. **Journal of musculoskeletal & neuronal interactions**, v. 1, n. 3, p. 193–207, mar. 2001.

JIN, W. et al. Diagnostic Values of Sonography for Assessment of Sternal Fractures Compared With Conventional Radiography and Bone Scans. **Journal of Ultrasound in Medicine**, v. 25, n. 10, p. 1263–1268, 1 out. 2006.

KAMIMURA, H. et al. Vibroacoustography for the assessment of total hip arthroplasty. **Clinics**, v. 68, n. 4, p. 463–468, 25 abr. 2013.

KAMIMURA, H. A. S. et al. Vibro-acoustography beam formation with reconfigurable arrays. **IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control**, v. 59, n. 7, p. 1421–1431, jul. 2012.

KANIS, J. A. et al. SCOPE: a scorecard for osteoporosis in Europe. **Archives of osteoporosis**, v. 8, n. 1–2, p. 144, 2013a.

KANIS, J. A. et al. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. **Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA**, v. 24, n. 1, p. 23–57, jan. 2013b.

KANIS, J. A. et al. A systematic review of intervention thresholds based on FRAX: A report prepared for the National Osteoporosis Guideline Group and the International Osteoporosis Foundation. **Archives of osteoporosis**, v. 11, n. 1, p. 25, 2016.

KLEIN, G. L. et al. Hepatic osteodystrophy in chronic cholestasis: evidence for a multifactorial etiology. **Pediatric transplantation**, v. 6, n. 2, p. 136–40, abr. 2002.

KOMORI, T. Animal models for osteoporosis. **European Journal of Pharmacology**, v. 759, p. 287–294, 15 jul. 2015.

LELOVAS, P. P. et al. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. **Comparative medicine**, v. 58, n. 5, p. 424–30, out. 2008.

LEWANDOWSKI, R.; CHORAZYCZEWSKI, B. Identification of the parameters of the Kelvin-Voigt and the Maxwell fractional models, used to modeling of viscoelastic dampers. **Computers and Structures**, v. 88, n. 1–2, p. 1–17, 1 jan. 2010.

LI, Y. Q. et al. Multi-layer velocity model based synthetic aperture ultrasound imaging of cortical bone. **Wuli Xuebao/Acta Physica Sinica**, v. 68, n. 18, 20 set. 2019.

MACINTYRE, N. J.; LORBERGS, A. L. Imaging-Based Methods for Non-invasive Assessment of Bone Properties Influenced by Mechanical Loading. **Physiotherapy Canada. Physiotherapie Canada**, v. 64, n. 2, p. 202–15, 2012.

MANDARANO-FILHO, L.; BEZUTI, M.; BARBIERI, C. In vivo standardization of bone ultrasonometry of the clavicle. **Clinics**, v. 71, n. 3, p. 140–144, 25 mar. 2016.

MARANHO, D. A. et al. The pubo-femoral distance decreases with Pavlik harness treatment for developmental dysplasia of the hip in newborns. **Skeletal Radiology**, v. 46, n. 9, p. 1201–1207, 1 set. 2017.

MARKOWITZ, R. I. et al. Sonography of the elbow in infants and children. **AJR. American journal of roentgenology**, v. 159, n. 4, p. 829–33, 19 out. 1992.

MESQUITA, A. Q. DE; BARBIERI, G.; BARBIERI, C. H. Correlation between ultrasound velocity and densitometry in fresh and demineralized cortical bone. **Clinics**, v. 71, n. 11, p. 657, 2016.

MINONZIO, J. et al. Ultrasound-Based Estimates of Cortical Bone Thickness and Porosity Are Associated With Nontraumatic Fractures in Postmenopausal Women: A Pilot Study. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 34, n. 9, p. 1585–1596, 19 set. 2019.

NAYAK, S. et al. Systematic review and meta-analysis of the performance of clinical risk assessment instruments for screening for osteoporosis or low bone density. **Osteoporosis International**, v. 26, n. 5, p. 1543–1554, 3 maio 2015.

NOGUEIRA-BARBOSA, M. H. et al. Preliminary results of vibro-acoustography evaluation of bone surface and bone fracture. **Quantitative Imaging in Medicine and Surgery**, v. 7, n. 5, p. 549–554, out. 2017.

ODGAARD, A.; GUNDERSEN, H. J. G. Quantification of connectivity in cancellous bone, with special emphasis on 3-D reconstructions. **Bone**, v. 14, n. 2, p. 173–182, 1993.

OPHIR, J. et al. Elastography: A Quantitative Method for Imaging the Elasticity of Biological Tissues. **Ultrasonic Imaging**, v. 13, n. 2, p. 111–134, 2 abr. 1991.

ÖZKAYA, N. et al. Mechanical Properties of Biological Tissues. In: **Fundamentals of Biomechanics**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 361–387.

PARFITT, A. M. et al. Bone histomorphometry: Standardization of nomenclature, symbols, and units: Report of the asbmr histomorphometry nomenclature committee. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 2, n. 6, p. 595–610, 1987.

PARKER, K. J.; DOYLEY, M. M.; RUBENS, D. J. Imaging the elastic properties of tissue: the 20 year perspective. **Physics in Medicine and Biology**, v. 56, n. 1, p. R1–R29, 7 jan. 2011.

PEREIRA, D. et al. Effect of intracortical bone properties on the phase velocity and cut-off frequency of low-frequency guided wave modes (20–85 kHz). **The Journal of the Acoustical Society of America**, v. 145, n. 1, p. 121–130, jan. 2019.

PEREIRA, F. A. et al. Etiopathogenesis of Hepatic Osteodystrophy in Wistar Rats with Cholestatic Liver Disease. **Calcified Tissue International**, v. 85, n. 1, p. 75–83, 8 jul. 2009.

RENAUD, G. et al. Non-linear acoustic measurements to assess crack density in trabecular bone. **International Journal of Non-Linear Mechanics**, v. 43, n. 3, p. 194–200, 1 abr. 2008.

RENAUD, G. et al. In vivo ultrasound imaging of the bone cortex. **Physics in Medicine and Biology**, v. 63, n. 12, 12 jun. 2018.

RINALDO, N. et al. Quantitative ultrasonometry for the diagnosis of osteoporosis in human skeletal remains: New methods and standards. **Journal of Archaeological Science**, v. 99, p. 153–161, 1 nov. 2018.

SARAF, H. et al. Mechanical properties of soft human tissues under dynamic loading. **Journal of Biomechanics**, v. 40, n. 9, p. 1960–1967, 1 jan. 2007.

SARVAZYAN, A. et al. AN OVERVIEW OF ELASTOGRAPHY - AN EMERGING BRANCH OF MEDICAL IMAGING. **Current medical imaging reviews**, v. 7, n. 4, p. 255–282, nov. 2011.

SIGRIST, R. M. S. et al. Ultrasound Elastography: Review of Techniques and Clinical Applications. **Theranostics**, v. 7, n. 5, p. 1303–1329, 2017.

SILVA, B. C. et al. Fracture Risk Prediction by Non-BMD DXA Measures: The 2015 ISCD Official Positions Part 2: Trabecular Bone Score. **Journal of Clinical Densitometry**, v. 18, n. 3, p. 309–330, 1 jul. 2015.

SILVA, G. T.; MITRI, F. G. Difference-frequency generation in vibro-acoustography. **Physics in Medicine and Biology**, v. 56, n. 18, p. 5985–5993, 21 set. 2011.

SPIRLANDELI, A. et al. Hepatic Osteodystrophy: The Mechanism of Bone Loss in Hepatocellular Disease and the Effects of Pamidronate Treatment. **Clinics**, v. 72, n. 4, p. 231–237, 2017.

STEWART, A.; REID, D. M.; PORTER, R. W. Broadband ultrasound attenuation and dual energy X-ray absorptiometry in patients with hip fractures: Which technique discriminates fracture risk. **Calcified Tissue International**, v. 54, n. 6, p. 466–469, jun. 1994.

TANG, A. et al. Ultrasound Elastography and MR Elastography for Assessing Liver Fibrosis: Part 2, Diagnostic Performance, Confounders, and Future Directions. **AJR. American journal of roentgenology**, v. 205, n. 1, p. 33–40, jul. 2015.

TARANTINO, U. et al. Clinical guidelines for the prevention and treatment of osteoporosis: summary statements and recommendations from the Italian Society for Orthopaedics and Traumatology. **Journal of Orthopaedics and Traumatology: Official Journal of the Italian Society of Orthopaedics and Traumatology**, v. 18, n. Supl 1, p. 3, 2017.

TAVEIRA, A. T. A. et al. Longitudinal evaluation of hepatic osteodystrophy in children and adolescents with chronic cholestatic liver disease. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 43, n. 11, p. 1127–34, nov. 2010.

TEIXEIRA, S. R. et al. Comparison between Graf method and pubo-femoral distance in neutral and flexion positions to diagnose developmental dysplasia of the hip. **European Journal of Radiology**, v. 84, n. 2, p. 301–306, 1 fev. 2015.

TELLA, S. H.; GALLAGHER, J. C. Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 142, p. 155–170, jul. 2014.

URBAN, M. W. et al. Implementation of vibro-acoustography on a clinical ultrasound system. **IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control**, v. 58, n. 6, p. 1169–81, jun. 2011a.

URBAN, M. W. et al. A Review of Vibro-acoustography and its Applications in Medicine. **Current medical imaging reviews**, v. 7, n. 4, p. 350–359, 1 nov. 2011b.

VOLPON, J. B. et al. The osteogenic effects of swimming on bone mass, strength, and microarchitecture in rats with unloading-induced bone loss. **Microscopy Research and Technique**, v. 78, n. 9, p. 784–791, set. 2015.

VOLPON, M. AVALIAÇÃO ULTRA-SONOGRÁFICA DA EPÍFISE PROXIMAL DO ÚMERO EM CRIANÇAS. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 40, n. 4, 2005.

WELLS, P. N. T.; LIANG, H.-D.; YOUNG, T. P. Ultrasonic imaging technologies in perspective. **Journal of Medical Engineering & Technology**, v. 35, n. 6–7, p. 289–299, 26 out. 2011.

WÜSTER, C. et al. Quantitative ultrasonometry (QUS) for the evaluation of osteoporosis risk: Reference data for various measurement sites, limitations and application possibilities *. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 106, n. 03, p. 277–288, 14 jul. 2009.

XU, K. et al. Axial transmission method for long bone fracture evaluation by ultrasonic guided waves: Simulation, phantom and in vitro experiments. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 40, n. 4, p. 817–827, 2014.

XU, K. et al. Sparse SVD Method for High-Resolution Extraction of the Dispersion Curves of Ultrasonic Guided Waves. **IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control**, v. 63, n. 10, p. 1514–1524, 1 out. 2016.

ZAMARIOLI, A. et al. Standing Frame and Electrical Stimulation Therapies Partially Preserve Bone Strength in a Rodent Model of Acute Spinal Cord Injury. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, v. 92, n. 5, p. 402–410, maio 2013.

ZOU, K. H.; TUNCALI, K.; SILVERMAN, S. G. Correlation and Simple Linear Regression. **Radiology**, v. 227, n. 3, p. 617–628, 1 jun. 2003.

ANEXOS

ANEXO A. Pareceres da Comissão de Ética no Uso de Animais

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

DECLARAÇÃO

Declaramos que o Projeto de Pesquisa intitulado “*Uso das técnicas de acustografia por pulso emissão e de vibroacustografia na avaliação do tecido ósseo*” sob a responsabilidade do **Professor Doutor Marcelo Henrique Nogueira Barbosa** tem por objetivo investigar a possível correlação entre os parâmetros mensurados pela APE e VAC e os parâmetros mensurados pela microtomografia em ossos de camundongos estocados referentes ao Protocolo CEUA/FMRP número 111/2011, aprovado em reunião de 26 de setembro de 2011.

Por não satisfazer à condição de estudo experimental envolvendo animais pertencentes ao *filo Chordata* e *subfilo Vertebrado*, conforme diretriz do CONCEA - Lei nº 11.794 de 08/10/2008, declaramos que **NÃO COMPETE** à Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP emitir parecer acerca dos aspectos éticos relacionados a projetos de pesquisa dessa natureza.

Ribeirão Preto, 18 de agosto de 2017

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA-FMRP-USP

CERTIFICADO COMITE DE ÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 111/2011, sobre o projeto intitulado "*Osteoporose secundária: implicações ósseas, metabólicas e cardiovasculares na doença hepática crônica*", sob a responsabilidade do Professor Doutor Francisco José de Albuquerque de Paula está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi APROVADO em reunião de 26 de setembro de 2011.

(We certify that the protocol nº 111/2011, about "*Secondary osteoporosis: implications for bone, metabolic and cardiovascular diseases in chronic liver disease*", agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the College of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo – Ethical Commission of Ethics in Animal Research (CETEA) in 09/26/2011.

Ribeirão Preto, 26 de setembro de 2011.

Prof. Dr. Márcio Dantas
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal

ANEXO B. Resultados parciais da tese apresentados na forma de Tema Livre durante a 48ª Jornada Paulista de Radiologia – JPR 2018. O trabalho foi classificado em 1º lugar na categoria musculoesquelético (MSK) e foi condecorado com certificado de mérito

TL.15.002

Condecoramos com este CERTIFICADO DE MÉRITO o trabalho

CARACTERIZAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO POR ESPECTROSCOPIA ULTRASSÔNICA,

de autoria de

AGNOLLITTO, P. M.; BRAZ, G. A.; CARNEIRO, A. A. O.; SPIRLANDELI, A. L.; PAULA, F. J. A.; NOGUEIRA-BARBOSA, M.H.,

apresentado durante a 48ª Jornada Paulista de Radiologia (JPR 2018), realizada de 3 a 6 de maio de 2018, no Transamerica Expo Center, em São Paulo, Brasil.

São Paulo, 6 de maio de 2018.

São Paulo, 29 de maio de 2018.

Caro(a) Dr. PAULO AGNOLLITTO:

É com satisfação que a Sociedade Paulista de Radiologia e Diagnóstico por Imagem (SPR) informa que o trabalho inscrito na categoria Temas Livres (TL), de título **CHARACTERIZAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO POR ESPECTROSCOPIA ULTRASSÔNICA**, de autoria de AGNOLLITTO, P. M.; BRAZ, G. A.; CARNEIRO, A. A. O.; SPIRLANDELI, A. L.; PAULA, F. J. A.; NOGUEIRA-BARBOSA, M.H., apresentado durante a 48ª Jornada Paulista de Radiologia (JPR 2018), foi classificado em **1º lugar** na premiação dos melhores Temas Livres da JPR 2018. Como prêmio, o(a) senhor(a) receberá da SPR uma passagem em classe econômica de ida e volta para o RSNA 2018, que acontece de 25 a 30 de novembro, em Chicago, nos EUA. Em breve, um agente da Consultare Eventos (agência de turismo parceira da SPR) entrará em contato com o(a) senhor(a) para acertar detalhes da sua viagem.

Anunciamos também que, além desse prêmio, o trabalho recebeu a menção honrosa *Certificado de Mérito*, cujo certificado está disponível para download no site www.jpr2018.org.br, no Sistema de Submissão de Trabalhos, localizado na página de Painéis e Temas Livres.

A SPR parabeniza os autores deste trabalho e espera condecorar mais trabalhos dessa equipe em 2019, na próxima JPR. Mais informações podem ser acompanhadas pelo site da SPR (www.spr.org.br), pelo Jornal da Imagem e pelas redes sociais.

Em caso de dúvidas, pedimos que entre em contato conosco por e-mail (sprdigital@spr.org.br) ou pelo telefone (11) 5053-6363.

Cordialmente,

Dr. Carlos Homsi

Presidente da SPR

Dr. Renato Adam Mendonça

Diretor Científico da SPR

Presidente da Comissão de Painéis e Temas Livres da JPR

ANEXO C. Trabalho apresentado na forma de Tema Livre no 105º encontro anual da Sociedade de Radiologia da América do Norte – RSNA 2019

820 Jorie Blvd
Oak Brook, IL 60523
TEL 1-630-571-2670
FAX 1-630-571-7837
RSNA.org

31 Jan 2020

To Whom It May Concern:

The presentation below was presented at the RSNA 2019 - 105th Scientific Assembly and Annual Meeting, December 1 to December 6, 2019 at McCormick Place, Chicago, IL.

Public ID: RC304-07

Time: 3 Dec 2019 11:00 AM

Title: Vibro-Acustography Characterization of Bone Tissue in an Experimental Model

Author List: Marcello Nogueira-Barbosa MD, PhD, Paulo Agnollitto MD, Guilherme Braz, Adilton Carneiro PhD, Adriano Spirlandeli, Francisco Paula

Presenter: Marcello Nogueira-Barbosa MD, PhD

For additional information or to view the annual meeting program online, please visit www.rsna.org. Final updates resulting from changes occurring during the Annual Meeting will be available by mid December.

Please contact the RSNA Program Services Department at (877) 776-2227 within the US, or 630-590-7774 outside of the US, or email programs@rsna.org for further assistance.

Sincerely,

Valerie P. Jackson

Valerie P. Jackson, MD
2019 RSNA President

ANEXO D. Artigo com resultados preliminares do uso da técnica de Vibro-Acustografia para avaliação da superfície óssea e de fraturas, publicado na revista *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*

Brief Report

Preliminary results of vibro-acoustography evaluation of bone surface and bone fracture

Marcello H. Nogueira-Barbosa¹, Hermes Ayrto Salles Kamimura², Guilherme Braz², Paulo M. Agnollitto¹, Antonio Adilton Oliveira Carneiro²

¹Radiology Division, Ribeirão Preto Medical School, ²Physics Department, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

Correspondence to: Marcello H. Nogueira-Barbosa. Radiology Division/CCIFM, University of São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, CEP 14048-900, Brazil. Email: marcello@fmrp.usp.br.

Background: Vibro-acoustography (VA) uses two co-focused ultrasound beams with slightly different frequencies. The beams interact and generate a low-frequency focus to excite an object.

Methods: A two-element confocal ultrasound transducer with central frequency at 3.2 MHz was used to generate the low-frequency excitation (30 kHz) and the response of the bone to that excitation was acquired by a dedicated hydrophone. The face of the confocal transducer was positioned parallel to the surface of the bone at a focal length of 7 cm. The hydrophone was fixed to the side of the transducer, out of the path of the ultrasonic beam.

Results: The resulting image clearly showed the bone fracture with resolution of 0.25 mm and high contrast with well-defined borders.

Conclusions: In this paper, we present preliminary results of VA imaging of bone surface and of bone fracture using an experimental set-up. Our results encourage future studies using VA to evaluate bone fractures.

Keywords: Bone; fracture; vibro-acoustography (VA); ultrasound

Submitted Aug 10, 2017. Accepted for publication Sep 03, 2017.

doi: 10.21037/qims.2017.09.05

View this article at: <http://dx.doi.org/10.21037/qims.2017.09.05>

Introduction

Diagnostic ultrasonography is widely used in medicine to image internal structures in the body. The ultrasound penetration and image resolution are frequency-dependent, which impose a trade-off in the frequency selection. Thus, superficial structures such as muscles and tendons can be imaged at higher frequencies (7–18 MHz) with higher resolution than deeper structures such as liver and kidney, typically imaged at 1–6 MHz (1). In addition, the maximum response of quantitative ultrasound methods is usually associated with tissue resonance frequency, for example, soft tissues 30–400 Hz (2) and stiffer structures such as human dentin 0.5–1.4 MHz (3).

Vibro-acoustography (VA) is an imaging technique

that combines multiple co-focused ultrasonic beams with different frequencies at the mega-hertz range to generate high spatial resolution focus of lower frequencies (hertz to kilo-hertz) (4,5). As a result, this technique allows access specific regions at different depths applying selected frequencies such that excited tissue will have maximum response. Assemblies using distinct types of transducers show that it is possible to obtain low frequency foci with lateral resolution of tenths of millimeters (6).

The nonlinear interaction between two ultrasonic beams of near frequencies, equal to $\omega = \omega_0 \pm \Delta\omega/2$ (being $\Delta\omega$ the difference-frequency), gives rise to a pressure field with frequency $\Delta\omega$. The difference-frequency pressure field $P_{\Delta\omega}$ presents contributions from the parametric array (7), the interaction of sound-with-sound (4,7), and induced

ANEXO E. Artigo com os resultados finais dos experimentos desta tese, submetido para publicação na revista *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*

08/05/2020

Gmail - [QIMS] QIMS-20-610 submission acknowledgement

Paulo Agnollitto <agno53@gmail.com>

[QIMS] QIMS-20-610 submission acknowledgement

Editorial Office <qims@amepc.org>

Thu, Apr 23, 2020 at 9:59 PM

To: Paulo Moraes Agnollitto <agno53@gmail.com>

Dear Dr. Agnollitto,

It is our pleasure to receive your manuscript "Ex vivo vibro-acoustography characterization of osteoporosis in an experimental mice model." to Quantitative Imaging in Medicine and Surgery.

Your manuscript ID is: QIMS-20-610

With the online journal management system that we are using, you will be able to track its progress through the editorial process by logging in to the journal web site:

Manuscript URL: <http://qims.amegroups.com/author/submission/41042>

Username: agno

Thank you for contributing your article to Quantitative Imaging in Medicine and Surgery. If you have any questions, please contact us.

Editorial Office

Quantitative Imaging in Medicine and SurgeryEmail: qims@amepc.orgURL: <http://qims.amegroups.com/>

ANEXO F. Tabela com dados completos da Vibro-acustografia

Amostra	Dia 1	Dia 2	Dia 3
G1-1	8,59e ⁻⁰⁸	7,48e ⁻⁰⁸	6,77e ⁻⁰⁸
G1-2	1,25e ⁻⁰⁷	9,87e ⁻⁰⁸	1,04e ⁻⁰⁷
G1-3	9,00e ⁻⁰⁸	7,03e ⁻⁰⁸	6,12e ⁻⁰⁸
G1-4	3,24e ⁻⁰⁷	1,15e ⁻⁰⁷	9,82e ⁻⁰⁸
G1-5	4,93e ⁻⁰⁷	1,03e ⁻⁰⁷	2,84e ⁻⁰⁷
G1-6	2,25e ⁻⁰⁸	2,87e ⁻⁰⁸	7,34e ⁻⁰⁸
G2-1	4,58e ⁻⁰⁸	3,37e ⁻⁰⁸	1,83e ⁻⁰⁸
G2-2	1,16e ⁻⁰⁸	5,87e ⁻⁰⁸	3,75e ⁻⁰⁸
G2-3	2,76e ⁻⁰⁸	1,23e ⁻⁰⁸	1,1e ⁻⁰⁸
G2-4	8,18e ⁻⁰⁹	1,11e ⁻⁰⁸	3,27e ⁻⁰⁸
G2-5	2,03e ⁻⁰⁷	8,70e ⁻⁰⁹	8,12e ⁻⁰⁹
G2-6	3,41e ⁻⁰⁸	1,37e ⁻⁰⁸	9,12e ⁻⁰⁹
G3-1	1,12e ⁻⁰⁷	1,13e ⁻⁰⁷	1,35e ⁻⁰⁷
G3-2	2,39e ⁻⁰⁸	1,41e ⁻⁰⁷	1,76e ⁻⁰⁷
G3-3	4,07e ⁻⁰⁷	9,87e ⁻⁰⁸	3,66e ⁻⁰⁷
G3-4	2,17e ⁻⁰⁷	3,17e ⁻⁰⁸	2,09e ⁻⁰⁷
G3-5	1,96e ⁻⁰⁸	5,17e ⁻⁰⁸	1,46e ⁻⁰⁷

ANEXO G. Tabela com dados completos da microCT

Amostra	BV/TV (%)	Espessura Trabecular (mm)	Número Trabéculas (1/mm)	Separação Trabecular (mm)	Conectividade	Densidade Conectividade
G1-1	15,17518	0,06009	2,5255	0,16435	349	143,01
G1-2	7,02969	0,04304	1,80923	0,17505	622	296,98
G1-3	9,31874	0,05151	2,31241	0,14337	565	268,28
G1-4	15,9992	0,06919	2,32429	0,16728	795	357,31
G1-5	11,06595	0,04716	2,46188	0,21871	785	320,26
G1-6	13,18018	0,05357	-	-	472	203,22
G2-1	11,76428	0,04993	1,74015	0,24644	314	140,56
G2-2	8,14382	0,04728	1,63121	0,19288	319	171,72
G2-3	7,39532	0,06069	1,56403	0,22106	314	152,99
G2-4	9,53326	0,05845	1,5707	0,25211	238	120,44
G2-5	16,9222	0,04565	1,89072	0,19531	628	267,63
G2-6	8,63052	-	-	-	335	182,62
G3-1	18,05585	0,05627	3,20887	0,0906	3870	1686,07
G3-2	12,21433	0,04338	2,81562	0,1249	1893	1050,5
G3-3	8,63466	0,04006	2,1554	0,09886	3974	1761,36
G3-4	7,08627	0,04792	1,47889	0,12898	1487	640,87
G3-5	14,17971	0,04725	-	0,08415	3382	1587,16