

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

**Identificação inversa do módulo de elasticidade  
longitudinal do tecido ósseo cortical de modelos  
animais: ratos *Sprague Dawley* e *Wistar***

Dissertação de Mestrado em Engenharia Mecânica

**Sara Daniela Oliveira Sousa**

Orientação:

José Joaquim Lopes Morais

Fábio André Magalhães Pereira



**Vila Real, 2018**



UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA

**Identificação inversa do módulo de elasticidade longitudinal do tecido ósseo cortical de modelos animais: ratos *Sprague Dawley* e *Wistar***

Sara Daniela Oliveira Sousa



Dissertação apresentada à Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Mecânica, realizada sob a orientação científica do Professor Catedrático José Joaquim Lopes Morais do Departamento de Engenharias da Escola de Ciências e Tecnologia da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro e Co-orientação científica do Doutor Fábio André Magalhães Pereira.

Abril de 2018



*Aos meus pais  
e namorado*



*“Only two things are infinite,  
the universe and the human stupidity,  
and I’m not sure about the former”*

*Albert Einstein*



# Agradecimentos

Gostaria de aproveitar esta secção para agradecer a todos os intervenientes nesta dissertação, assim como, a todos os que foram importantes ao longo do percurso académico.

Começo por agradecer ao Professor José Morais, pela orientação desta dissertação, por todo o apoio e disponibilidade. Ao Doutor Fábio Pereira, como coorientador e amigo, agradeço pelo acompanhamento, disponibilidade diária e momentos de descontração. Ao Professor Bruno Colaço pela disponibilidade e colaboração.

Aos meus pais, por tudo, não há palavras suficientes para descrever todo o apoio que me deram desde sempre.

À minha família que me acompanhou e ajudou ao longo do percurso.

Ao Nuno Pereira, meu namorado, por toda a companhia, amizade e paciência, por todos os bons momentos e pelas conquistas que alcançamos juntos.

Aos amigos e colegas, que me acompanharam nestes anos, em especial às de longa data, Marina, Monika, Silvi, e Tânia, por estarem sempre presentes, apesar dos percursos de vida diferentes. Também ao José Vieira e à Beatriz Almeida, pela companhia e bons momentos partilhados, e à Daniela Silva pela companhia e motivação nestes últimos meses.



# Resumo

O principal objetivo deste trabalho é a identificação do módulo de elasticidade longitudinal do tecido ósseo cortical de pequenos roedores, através do ensaio de flexão em três pontos realizados diretamente em fêmures. Em concreto, foi comparada a eficácia de dois métodos de identificação do módulo de elasticidade longitudinal: o método direto (baseada na teoria de vigas de Bernoulli-Euler) e o método inverso (baseada na simulação por elementos finitos). Nos métodos diretos foram analisadas três variantes, que se distinguem entre si pela forma da secção transversal da diáfise: (1) secção aproximada por um anel circular; (2) secção aproximada por um anel elítico; (3) secção real. Na metodologia inversa foram analisadas duas variantes: (1) determinação de  $E_L$  admitindo que a rigidez varia linearmente com essa propriedade (método inverso proporcional); (2) determinação de  $E_L$  através de um algoritmo de otimização que minimiza a diferença entre a rigidez experimental e a rigidez numérica (método inverso de otimização). Nas simulações por elementos finitos do ensaio de flexão foram usados modelos geométricos realistas das diáfises, construídos com base em imagens fotográficas. Além dos ensaios de flexão, foram realizados ensaios de compressão em segmentos de diáfise excisados dos fêmures após o ensaio de flexão. Os ensaios de compressão foram feitos com a finalidade de ver em que medida podem ser uma alternativa ao ensaio de flexão em três pontos.

Este trabalho incidiu sobre ratos (espécie *Rattus norvegicus*) usados como modelos animais em estudos sobre a insuficiência renal crónica (ratos da estripe *Wistar*) e sobre cancro da mama (ratos da estripe *Sprague Dawley*). No modelo animal usado para o estudo da insuficiência renal crónica (modelo animal RMR) foi possível concluir que os grupos com redução de massa renal apresentam uma ligeira diminuição da área da secção transversal da diáfise, assim como dos parâmetros mecânicos estruturais; o tratamento com ácido quetomólico A não parece afetar esses parâmetros. No modelo usado para o estudo do cancro de mama (modelo animal MNU), verifica-se uma diminuição da área da secção transversal da diáfise nos grupos com cancro; também se verifica uma diminuição das propriedades mecânicas estruturais dos grupos com cancro, mas essa redução é atenuada pelo exercício físico. Por fim, concluímos que o módulo de elasticidade do tecido ósseo cortical não é afetado, quer no modelo animal RMR (pela redução de massa renal ou administração do tratamento com ácido quetomólico A), quer no modelo animal MNU (pela indução de cancro de mama ou a prática de exercício físico).



# Abstract

The aim of this work is the identification of the longitudinal elastic modulus of cortical bone tissue of small rodents through the three-point bending test, performed directly on femurs. In particular, the efficiency of two methods used to identify the longitudinal elastic modulus were compared: the direct method (based on Bernoulli-Euler beam theory) and the inverse method (based on finite element simulation). In the direct methods, three variants were analyzed, which are distinguished by the cross-sectional shape of the diaphysis: (1) cross-sectional approach by a circular ring; (2) cross-sectional approach by an elliptical ring; (3) real section. In the inverse methods, two variants were analyzed: (1) determination of  $E_L$  assuming that the stiffness varies linearly with this property (inverse proportional method); (2) determination of  $E_L$  through an optimization algorithm that minimizes the difference between experimental stiffness and numerical stiffness (inverse method of optimization). In finite element simulations of the bending test, realistic geometric models of the diaphysis were used, based on photographic images. Besides the bending tests, compression tests were performed on diaphysis segments, excised from the femurs after the bending test. The compression tests were performed to evaluate if it could be an alternative to the three-point bending test.

This work focused on rats (*Rattus norvegicus* species) used as animal models in studies of chronic kidney disease (*Wistar* stripe rats) and of breast cancer (*Sprague Dawley* stripe rats). In the animal model used for the study of chronic kidney disease (RMR animal model) it was possible to conclude that the groups with renal mass reduction present a slight decrease in the cross-sectional area of the diaphysis, as well as the structural mechanical parameters; the treatment with chaethomellic acid A does not seem to affect these parameters. In the model used for the study of breast cancer (MNU animal model), there is a decrease in the cross-sectional area of the diaphysis in the cancer groups; there is also a decrease in the structural mechanical properties of the cancer groups, but this decrease is reduced by practicing exercise. Finally, we concluded that the modulus of elasticity of cortical bone tissue is not affected, either in the RMR animal model (by reduction of renal mass or administration of treatment with chaethomellic acid A) or in the MNU animal model (by the induction of breast cancer or practice of exercise).



# Índice

Agradecimentos .....	iii
Resumo .....	iv
Abstract.....	v
Índice de figuras .....	viii
Índice de tabelas .....	xiii
Nomenclatura .....	xv
<b>CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1-1</b>
1.1 Generalidades.....	1-1
1.2 Objetivo do trabalho.....	1-2
1.3 Organização da dissertação .....	1-2
<b>CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>2-1</b>
2.1 Introdução .....	2-1
2.2 Estrutura e composição do tecido ósseo cortical .....	2-1
2.3 Materiais elásticos.....	2-5
2.4 Identificação das propriedades elásticas do tecido ósseo cortical.....	2-6
2.5 Variabilidade das propriedades elásticas do tecido ósseo cortical.....	2-11
<b>CAPÍTULO 3 – TRABALHO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>3-1</b>
3.1. Introdução .....	3-1
3.2. Modelos animais .....	3-1
3.2.1. Modelo de redução de massa renal.....	3-2
3.2.2. Modelo do cancro da mama .....	3-3
3.3. Ensaio de flexão .....	3-4
3.3.1. Provetes .....	3-4
3.3.2. Ensaio mecânicos .....	3-8
3.4. Ensaio de compressão .....	3-9
3.4.1. Provetes .....	3-9
3.4.2. Ensaio mecânicos .....	3-11
<b>CAPÍTULO 4 – ENSAIOS DE FLEXÃO .....</b>	<b>4-1</b>
4.1 Introdução .....	4-1
4.2 Análise por elementos finitos do ensaio de flexão em três pontos .....	4-2
4.2.1. Modelo de elementos finitos .....	4-2
4.2.2. Identificação de $E_L$ pela teoria de vigas de Bernoulli-Euler .....	4-4

4.2.3. Identificação inversa de $E_L$ .....	4-15
4.2.4. Validação do modelo geométrico baseado em fotografia .....	4-17
4.3 Análise e discussão dos resultados experimentais: modelo animal RMR ....	4-19
4.3.1. Parâmetros geométricos dos fêmures .....	4-20
4.3.2. Parâmetros mecânicos estruturais dos fêmures .....	4-22
4.3.3. Tensão de cedência do tecido ósseo cortical .....	4-28
4.3.4. Módulo de elasticidade longitudinal do tecido ósseo cortical.....	4-31
4.4 Análise e discussão dos resultados experimentais: modelo animal MNU....	4-32
4.4.1. Parâmetros geométricos dos fêmures .....	4-34
4.4.2. Parâmetros estruturais dos fêmures .....	4-37
4.4.3. Tensão de cedência do tecido ósseo cortical .....	4-41
4.4.4. Módulo de elasticidade longitudinal do tecido ósseo cortical.....	4-44
4.5 Conclusões .....	4-46
<b>CAPÍTULO 5 – ENSAIOS DE COMPRESSÃO.....</b>	<b>5-1</b>
5.1 Introdução .....	5-1
5.2 Análise por elementos finitos do ensaio de compressão.....	5-1
5.2.1. Modelo de elementos finitos .....	5-1
5.2.2. Identificação de $E_L$ .....	5-4
5.3 Análise e discussão dos resultados experimentais: modelo animal RMR .....	5-7
5.4 Análise e discussão dos resultados experimentais: modelo animal MNU....	5-11
5.5 Conclusões .....	5-15
<b>CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES.....</b>	<b>6-1</b>
6.1 Introdução .....	6-1
6.2 Ensaio de flexão .....	6-1
6.3 Ensaio de compressão.....	6-4
<b>Referências.....</b>	<b>7-1</b>

# Índice de figuras

<b>Figura 2.1</b> – Estrutura de um osso longo: fémur. (Diaquino, 2011) .....	2-2
<b>Figura 2.2</b> – Organização estrutural do tecido ósseo (Rho et al., 1998). .....	2-3
<b>Figura 2.3</b> – Microestrutura do tecido ósseo cortical com as três direções anatómicas identificadas (Dias et al., 2005): longitudinal (L) , radial (R) e transversal (T). .....	2-4
<b>Figura 2.4</b> – Representação do ensaio de flexão em 3 pontos (A) aproximando a geometria do fémur a uma viga oca e (B) com a geometria real (Lenthe et al., 2008). .....	2-9
<b>Figura 2.5</b> – Ensaio mecânico acompanhado com correlação digital de imagem (Diaquino, 2011). .....	2-10
<b>Figura 2.6</b> – Evolução da força máxima da tibia ao longo da idade, em ensaios de flexão. Este estudo foi realizado em mulheres, sendo que depois do período de menopausa a força máxima da tibia diminui 25%. (Vilayphiou et al., 2016). .....	2-12
<b>Figura 2.7</b> – Força máxima e deformação na rotura de fémures e de tíbias do grupo de ratos de controlo (C) e do grupo de ratos diabéticos (D). (Reddy et al., 2001) .....	2-14
<b>Figura 3.1</b> – Aspeto de fémur de rato ( <i>Sprague-dawley</i> ). .....	3-5
<b>Figura 3.2</b> – Levantamento fotográfico da forma e das dimensões do fémur: (a) fotografia no plano lateral-medial; (b) fotografia duma secção transversal. ....	3-5
<b>Figura 3.3</b> – Modelo geométrico da diáfise de um fémur: (a) modelo baseado em fotografia; (b) modelo baseado em tomografia axial computadorizada. ....	3-6
<b>Figura 3.4</b> – Tomografia axial computadorizada das diáfises: (a) aspeto geral do TAC; (b) imagem da secção medial da diáfise. ....	3-7
<b>Figura 3.5</b> – Ensaio de flexão em três pontos: (a) aspeto geral do ensaio; (b) detalhe das amarras e do posicionamento do fémur. ....	3-8
<b>Figura 3.6</b> – Fémur de rato e esquema do ensaio de flexão em três pontos. ....	3-9
<b>Figura 3.7</b> – (a) Corte do provete de compressão a partir de um fémur fraturado no ensaio de flexão; (b) aspeto de um provete de compressão. ....	3-10
<b>Figura 3.8</b> – Secções extremas dos provetes de compressão: (a) secção medial; (b) secção distal. ....	3-11

<b>Figura 3.9</b> – Modelo geométrico de um segmento de diáfise femoral, baseado em fotografia.....	3-11
<b>Figura 3.10</b> – Ensaio de compressão: (a) aspeto geral da montagem experimental; (b) detalhe do provete de compressão com o padrão <i>speckle</i> .....	3-12
<b>Figura 3.11</b> – Ensaio de compressão: (a) provete com padrão <i>speckle</i> grosseiro; (b) provete com superfície curva; (c) provete com faces de apoio inadequadas. ....	3-14
<b>Figura 4.1</b> – Simulação por elementos finitos do ensaio de flexão: (a) malha de elementos finitos e condições de fronteira; (b) deformada e campo dos deslocamentos $u_z$ . ....	4-3
<b>Figura 4.2</b> – Curva $P$ - $\delta$ do fémur usado para a calibração do módulo de elasticidade longitudinal (rato 13, do grupo SO).....	4-4
<b>Figura 4.3</b> – Modelos geométricos da secção transversal da diáfise: (a) modelo real; (b) modelo circular; (c) modelo elítico. ....	4-5
<b>Figura 4.4</b> – Esquema da secção transversal das diáfises: centroide ( $C$ ), referencial global ( $Cxy$ ), referencial principal ( $CI2$ ) e eixo neutro ( $nn$ ). ....	4-7
<b>Figura 4.5</b> – Comparação dos valores de $Y$ obtidos pelos métodos diretos: (a) grupo SO (grupo de controlo do modelo RMR); (b) grupo “controlo sedentário” (grupo de controlo do modelo MNU). ....	4-11
<b>Figura 4.6</b> – Comparação dos valores de $E_L$ obtidos pelos métodos diretos e pelo método inverso: (a) grupo SO (grupo de controlo do modelo RMR); (b) grupo “controlo sedentário” (grupo de controlo do modelo MNU).....	4-14
<b>Figura 4.7</b> – Fluxograma do algoritmo de otimização para identificação do módulo de elasticidade longitudinal. ....	4-16
<b>Figura 4.8</b> – Comparação entre as curvas $P$ - $\delta$ do modelo de elementos finitos baseado em imagem fotográfica e do modelo baseado em imagem de TAC: (a) fémur 1; (b) fémur 2. ....	4-18
<b>Figura 4.9</b> – Parâmetros geométricos da secção transversal dos fémures do modelo animal RMR: (a) área; (b) momentos principais de 2ª ordem, no centroide; (c) ângulos $\alpha$ e $\beta$ . ....	4-21
<b>Figura 4.10</b> – Modo de rotura dos provetes. ....	4-23

<b>Figura 4.11</b> – Curvas <i>força-deslocamento</i> do grupo SO (grupo de controlo do modelo animal RMR). .....	4-23
<b>Figura 4.12</b> – Identificação dos parâmetros característicos das curvas <i>força-deslocamento</i> . .....	4-24
<b>Figura 4.13</b> – Parâmetros estruturais dos fémures do modelo animal RMR: (a) rigidez elástica; (b) força de cedência; (c) força máxima; (d) energia de rotura. ....	4-25
<b>Figura 4.14</b> – Rigidez do modelo animal RMR: (a) variação com a área $A$ da secção transversal; (b) variação com o momento de 2ª ordem $J_{xx}$ . .....	4-27
<b>Figura 4.15</b> – Força de cedência do modelo animal RMR: (a) variação com a área $A$ da secção transversal; (b) variação com o momento de 2ª ordem $J_{xx}$ . ....	4-28
<b>Figura 4.16</b> – Tensões de cedência do tecido ósseo cortical do modelo animal RMR. .	4-29
<b>Figura 4.17</b> – Tensão de cedência ( $Y'$ ) do modelo animal RMR: (a) variação com a área $A$ da secção transversal; (b) variação com o momento de 2ª ordem $J_{xx}$ . .....	4-30
<b>Figura 4.18</b> – Módulo de elasticidade longitudinal do tecido ósseo cortical do modelo animal RMR. ....	4-32
<b>Figura 4.19</b> – Módulo de elasticidade longitudinal (método inverso proporcional) do modelo animal RMR: (a) variação com a área $A$ da secção transversal; (b) variação com o momento de 2ª ordem $J_{xx}$ . .....	4-33
<b>Figura 4.20</b> – Parâmetros geométricos da secção transversal dos fémures do modelo animal MNU: (a) área; (b) momentos principais 2ª ordem, no centroide; (c) ângulos $\alpha$ e $\beta$ . ....	4-35
<b>Figura 4.21</b> – Curvas <i>força-deslocamento</i> do grupo “controlo sedentário” (grupo de controlo do modelo animal MNU). .....	4-37
<b>Figura 4.22</b> – Parâmetros estruturais dos fémures do modelo animal MNU: (a) rigidez elástica; (b) força de cedência; (c) força máxima; (d) energia de rotura. ....	4-38
<b>Figura 4.23</b> – Parâmetros estruturais dos fémures do modelo animal MNU: (a) rigidez elástica; (b) força de cedência; (c) força máxima; (d) energia de rotura. ....	4-39
<b>Figura 4.24</b> – Rigidez do modelo animal MNU: (a) variação com a área $A$ da secção transversal; (b) variação com o momento de 2ª ordem $J_{xx}$ . .....	4-40

<b>Figura 4.25</b> – Força de cedência do modelo animal MNU: (a) variação com a área $A$ da secção transversal; (b) variação com o momento de 2ª ordem $J_{xx}$ . .....	4-41
<b>Figura 4.26</b> – Tensões de cedência do tecido ósseo cortical do modelo animal MNU. .	4-42
<b>Figura 4.27</b> – Tensão de cedência ( $Y'$ ) do modelo animal MNU: (a) variação com a área $A$ da secção transversal; (b) variação com o momento de 2ª ordem $J_{xx}$ . .....	4-43
<b>Figura 4.28</b> – Módulo de elasticidade longitudinal do modelo animal MNU. ....	4-45
<b>Figura 4.29</b> – Módulo de elasticidade longitudinal (método inverso proporcional) do modelo animal MNU: (a) variação com a área $A$ da secção transversal; (b) variação com o momento de 2ª ordem $J_{xx}$ . .....	4-46
<b>Figura 5.1</b> – Simulação por elementos finitos do ensaio de compressão: (a) malha de elementos finitos e condições de fronteira; (b) deformada e campo dos deslocamentos $u_z$ . .....	5-2
<b>Figura 5.2</b> – Curva $P$ - $\delta$ experimental do fémur usado na construção do modelo de elementos finitos e curva obtida por simulação. ....	5-3
<b>Figura 5.3</b> – Modelo simplificado do ensaio de compressão (baseado em Xavier et al, 2012). ....	5-4
<b>Figura 5.4</b> – Grandezas ( $P, \delta, l, A_1$ e $A_2$ ) e região de interesse ( $RI$ ) utilizadas na identificação de $E_L$ a partir do ensaio de compressão. ....	5-5
<b>Figura 5.5</b> – Curvas tensão-deformação do modelo de elementos finitos do ensaio de compressão. ....	5-7
<b>Figura 5.6</b> – Curvas <i>tensão-deformação</i> do grupo SO do modelo animal RMR: (a) deslocamento do atuador; (b) correlação digital de imagem. ....	5-8
<b>Figura 5.7</b> – Curvas <i>tensão-deformação</i> e identificação do módulo de elasticidade longitudinal. ....	5-9
<b>Figura 5.8</b> – Módulos de elasticidade dos ensaios de compressão dos fémures do modelo animal RMR: (a) deslocamento do atuador ( $E_L^{\delta,EXP}$ ); (b) correlação digital de imagem .....	5-10

**Figura 5.9** – Curvas *tensão-deformação* do grupo “controlo sedentário” do modelo animal da MNU: (a) deslocamento do atuador ( $E_L^{\delta,EXP}$ ); (b) correlação digital de imagem ( $E_L^{CDI,EXP}$ ).....5-12

**Figura 5.10** – Módulos de elasticidade dos ensaios de compressão dos fémures do modelo animal MNU: (a) deslocamento do atuador ( $E_L^{\delta,EXP}$ ); (b) correlação digital de imagem .....5-14



# Índice de tabelas

<b>Tabela 2.1</b> – Ensaio mecânicos clássicos utilizados para a determinação das propriedades elásticas do tecido ósseo (adaptada de Pereira, 2016) .....	2-7
<b>Tabela 2.2</b> – Propriedades do tecido ósseo de ratos que praticavam natação e de ratos sedentários (Hart et al., 2001). .....	2-14
<b>Tabela 3.1</b> – Quantidade de fêmures usados em cada grupo experimental do modelo animal RMR.....	3-2
<b>Tabela 3.2</b> – Quantidade de fêmures usados em cada grupo experimental do modelo animal MNU. ....	3-3
<b>Tabela 4.1</b> – Propriedades elásticas do modelo de elementos finitos (Martin et al., 1998). .....	4-3
<b>Tabela 4.2</b> – Características geométricas da secção central dos fêmures dos modelos de elementos finitos: grupo SO (grupo de controlo do modelo RMR). ....	4-8
<b>Tabela 4.3</b> – Características geométricas da secção central dos fêmures dos modelos de elementos finitos: grupo “controlo sedentário” (grupo de controlo do modelo MNU). ....	4-8
<b>Tabela 4.4</b> – Força e tensões de cedência: grupo SO (grupo de controlo do modelo RMR). ....	4-10
<b>Tabela 4.5</b> – Força de cedência e tensões de cedência: grupo “controlo sedentário” (grupo de controlo do modelo MNU). ....	4-10
<b>Tabela 4.6</b> – Módulos de elasticidade longitudinal identificados pelos métodos diretos e pelo método inverso: grupo SO (grupo de controlo do modelo RMR). ....	4-13
<b>Tabela 4.7</b> – Módulos de elasticidade longitudinal identificados pelos métodos diretos e pelo método inverso: grupo “controlo sedentário” (grupo de controlo do modelo MNU). ....	4-13
<b>Tabela 4.8</b> – Rigidez e módulo de elasticidade longitudinal dos modelos de elementos finitos: modelo baseado em imagem fotográfica e modelo baseado em TAC. ....	4-19
<b>Tabela 4.9</b> – Parâmetros geométricos dos fêmures do modelo animal RMR: $A$ , $J_{xx}$ , $J_{xy}$ e $J_{yy}$ .....	4-20

<b>Tabela 4.10</b> – Parâmetros geométricos dos fêmures do modelo animal RMR: $J_{11}$ , $J_{22}$ , $\alpha$ e $\beta$ .....	4-21
<b>Tabela 4.11</b> – Parâmetros estruturais dos fêmures do modelo animal RMR. ....	4-25
<b>Tabela 4.12</b> – Tensões de cedência do tecido ósseo cortical do modelo animal RMR. .	4-29
<b>Tabela 4.13</b> – Módulos de elasticidade longitudinal do modelo animal RMR. ....	4-31
<b>Tabela 4.14</b> – Parâmetros geométricos da secção transversal dos fêmures do modelo animal MNU: $A$ , $J_{xx}$ , $J_{xy}$ e $J_{yy}$ . ....	4-34
<b>Tabela 4.15</b> – Parâmetros geométricos da secção transversal dos fêmures do modelo animal MNU: $J_{11}$ , $J_{22}$ , $\alpha$ e $\beta$ .....	4-35
<b>Tabela 4.16</b> – Parâmetros estruturais dos fêmures do modelo animal MNU .....	4-38
<b>Tabela 4.17</b> – Tensões de cedência do tecido ósseo cortical do modelo animal MNU. .	4-42
<b>Tabela 4.18</b> – Módulos de elasticidade longitudinal do modelo MNU. ....	4-44
<b>Tabela 5.1</b> – Módulos de elasticidade longitudinal do ensaio de compressão .....	5-6
<b>Tabela 5.2</b> – Módulos de elasticidade dos ensaios de compressão dos fêmures do modelo animal RMR.....	5-10
<b>Tabela 5.3</b> – Módulos de elasticidade dos ensaios de compressão dos fêmures do modelo animal da MNU .....	5-13

# Nomenclatura

## Símbolos gregos

$\alpha$	Ângulo entre o referencial global e o referencial principal
$\beta$	Ângulo entre o referencial global e o eixo neutro
$\gamma$	Deformação angular
$\delta$	Deslocamento
$\varepsilon$	Deformação
$\nu_{ij}$	Coefficiente de Poisson ( $i,j=L,R,T$ )
$\sigma$	Tensão
$\tau$	Tensão de corte

## Símbolos romanos

A	Área
C	Centroide
$C12$	Referencial principal
CV	Coefficiente da variação
Cxy	Referencial global
D	Diâmetro exterior do anel circular
d	Diâmetro interior do anel circular
dif	Diferença
$E_i$	Módulo de elasticidade ( $i=L,R,T$ )
$G_i$	Módulo de corte ( $i=L,R,T$ )
H	Eixo menor exterior do anel elítico

$h$	Eixo menor interior do anel elítico
$J_{1,2}$	Momentos principais de inércia
$J_{xx}, J_{yy}$	Momentos de segunda ordem
$J_{xy}$	Produto de 2ª ordem
$K$	Rigidez
$L$	Distância entre apoios
$l$	Altura inicial do segmento de diáfise
$n$	Número de amostras
$nn$	Eixo neutro
$P$	Força
$P_{\max}$	Força máxima
$P_Y$	Força de cedência
$S$	Eixo maior exterior do anel elítico
$s$	Eixo maior interior do anel elítico
$S_{ij}$	Coefficientes elásticos ( $i, j=1, \dots, 6$ )
$tol$	Tolerância
$W$	Energia de rotura
$Y$	Tensão de cedência

## Abreviaturas

CAA	Ácido quetomélico A
CDI	Correlação digital de imagem
EXP	Procedimento experimental
MEC	Matriz extracelular osséa

MEF	Modelo de elementos finitos
MNU	Modelo animal de indução de cancro de mama
RMR	Modelo animal de redução de massa renal
SO	Cirurgia simulada ( <i>sham-operated</i> )
TAC	Tomografia axial computadorizada



# CAPÍTULO 1

---

## INTRODUÇÃO

### 1.1 GENERALIDADES

O tecido ósseo cortical tem uma estrutura hierarquicamente organizada e anisotrópica. Em geral, as propriedades elásticas do tecido ósseo variam com o tipo de osso, assim como de região para região dentro do mesmo osso. A anisotropia e a variabilidade do tecido ósseo, aliadas às alterações do tecido com a idade, e em função do ambiente mecânico e fisiológico, fazem com que a identificação das suas propriedades elásticas à escala macroscópica seja ainda um problema que está por resolver satisfatoriamente. Mas é fundamental dispor de métodos expeditos e precisos de medição das propriedades mecânicas do tecido ósseo cortical, uma vez que essas propriedades são um indicador importante para avaliar os efeitos de diversas patologias e a eficácia dos respectivos tratamentos.

No caso dos pequenos roedores empregues como modelos experimentais, a identificação do módulo de elasticidade longitudinal ( $E_L$ ) do tecido cortical é normalmente feita ensaiando diretamente os ossos longos, uma vez que as reduzidas dimensões desses ossos fazem com que seja difícil excisar provetes com uma geometria regular. Um dos ensaios mais usados é o ensaio de flexão em três pontos. O método de referência atual (*golden standard*) para a identificação de  $E_L$  através desse ensaio baseia-se na teoria de vigas de Bernoulli-Euler e em hipóteses fortemente simplificadoras da geometria das diáfises. No entanto, em virtude da forma irregular dos ossos longos, não há uma relação explícita entre os resultados experimentais e as propriedades elásticas. Os métodos inversos de identificação de parâmetros constitutivos, combinando resultados experimentais com resultados de simulação por elementos finitos através de algoritmos de otimização, constituem uma via importante para contornar essa dificuldade.

## 1.2 OBJETIVO DO TRABALHO

O objetivo central do presente trabalho é a identificação do módulo de elasticidade longitudinal do tecido ósseo cortical de pequenos roedores através do ensaio de flexão em três pontos, realizados diretamente em fêmures. Em concreto, pretendemos comparar a eficácia dos métodos diretos baseados na teoria de Bernoulli-Euler (e que são os métodos de referência atuais) com métodos inversos que contemplem de forma realista a geometria das diáfises. Adicionalmente, procuramos avaliar em que medida o ensaio de compressão longitudinal das diáfises pode ser uma alternativa ao ensaio de flexão em três pontos. O trabalho incidiu sobre ratos (espécie *Rattus norvegicus*) usados como modelos animais em estudos sobre cancro da mama (ratos da estripe *Sprague Dawley*) e sobre a insuficiência renal crónica (ratos da estripe *Wistar*).

## 1.3 ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Para além deste capítulo (Capítulo 1), de introdução e enquadramento do trabalho, a presente dissertação está organizada em mais 5 capítulos. O Capítulo 3 é dedicado à apresentação dos modelos animais (o modelo da redução da massa renal e o modelo de cancro da mama) e à descrição dos ensaios mecânicos (ensaio de flexão em três pontos e ensaio de compressão). O Capítulo 4 é o capítulo central da dissertação, onde apresentamos e analisamos os resultados relativos ao ensaio de flexão em três pontos. Neste capítulo procuramos dar resposta a três questões distintas: (1) qual é o método mais adequado para determinar o módulo de elasticidade longitudinal através do ensaio de flexão em três pontos de fêmures; (2) qual é o efeito do cancro da mama e da atividade física no módulo de elasticidade do tecido ósseo cortical; (3) qual é o efeito da redução de massa renal e do seu tratamento com ácido quetomólico A sobre o módulo de elasticidade longitudinal do tecido cortical. No Capítulo 5 apresentamos e discutimos os resultados referentes aos ensaios de compressão em segmentos de diáfise, excisados dos fêmures previamente submetidos ao ensaio de flexão em três pontos. Os ensaios de compressão têm uma finalidade dupla: (1) validar os resultados dos ensaios de flexão em três pontos; (2) avaliar em que medida é uma alternativa ao ensaio de flexão em três pontos para a identificação do módulo de elasticidade longitudinal de pequenos roedores.

Finalmente, o Capítulo 6 reúne todas as conclusões a que chegamos na sequência do trabalho que foi efetuado.



# REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 2.1 INTRODUÇÃO

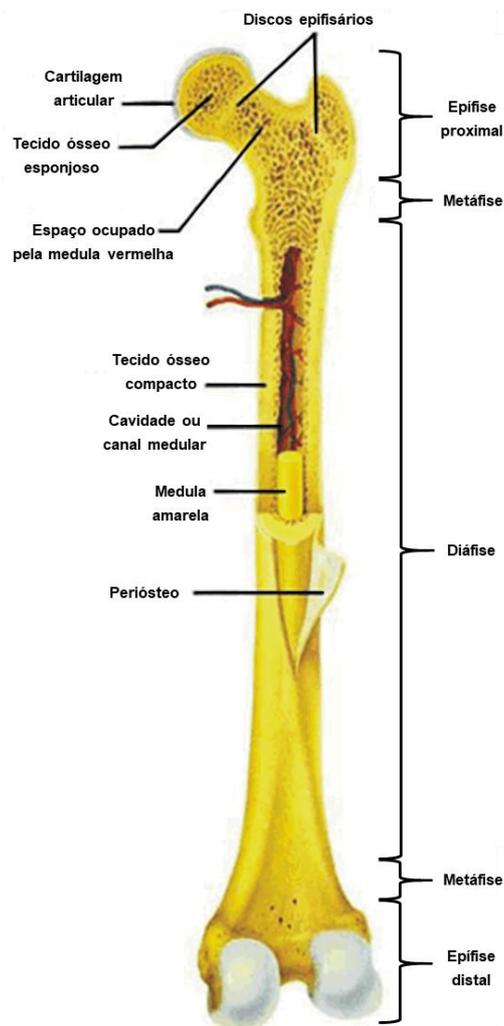
Neste capítulo será apresentada uma breve revisão dos aspetos gerais da estrutura e da composição do tecido ósseo cortical. Depois duma referência sumária ao comportamento elástico ortotrópico, segue-se uma revisão bibliográfica sumária sobre os métodos mais utilizados para a determinação das propriedades mecânicas do tecido ósseo cortical, assim como sobre a variabilidade dessas propriedades.

## 2.2 ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DO TECIDO ÓSSEO CORTICAL

O corpo humano é constituído por 206 ossos, com diferentes formas e dimensões, podendo ser classificados em ossos longos, curtos, achatados ou irregulares (Seeley et al., 2005). A maior parte dos ossos dos membros superiores (rádio, cubito, úmero) e dos inferiores (fémur, tibia e perónio) são ossos longos. Os ossos longos dividem-se em três zonas principais (Dias et al., 2005): diáfise, epífises e metáfises (figura 2.1). As epífises são as extremidades, sendo formadas por osso esponjoso envolvido por uma camada fina de osso compacto, que normalmente se encontra revestida pela cartilagem articular. As metáfises situam-se entre as epífises e a zona intermédia (diáfise), sendo igualmente

constituídas sobretudo por tecido ósseo esponjoso envolto em tecido cortical. Na fase de crescimento do organismo, as metáfises encontram-se separadas das epífises pela placa epifisária de crescimento. A diáfise é constituída apenas por tecido ósseo cortical, apresentando uma forma cilíndrica, com uma cavidade central preenchida pela medula óssea e por alguns elementos do tecido ósseo esponjoso (Dias et al., 2005).

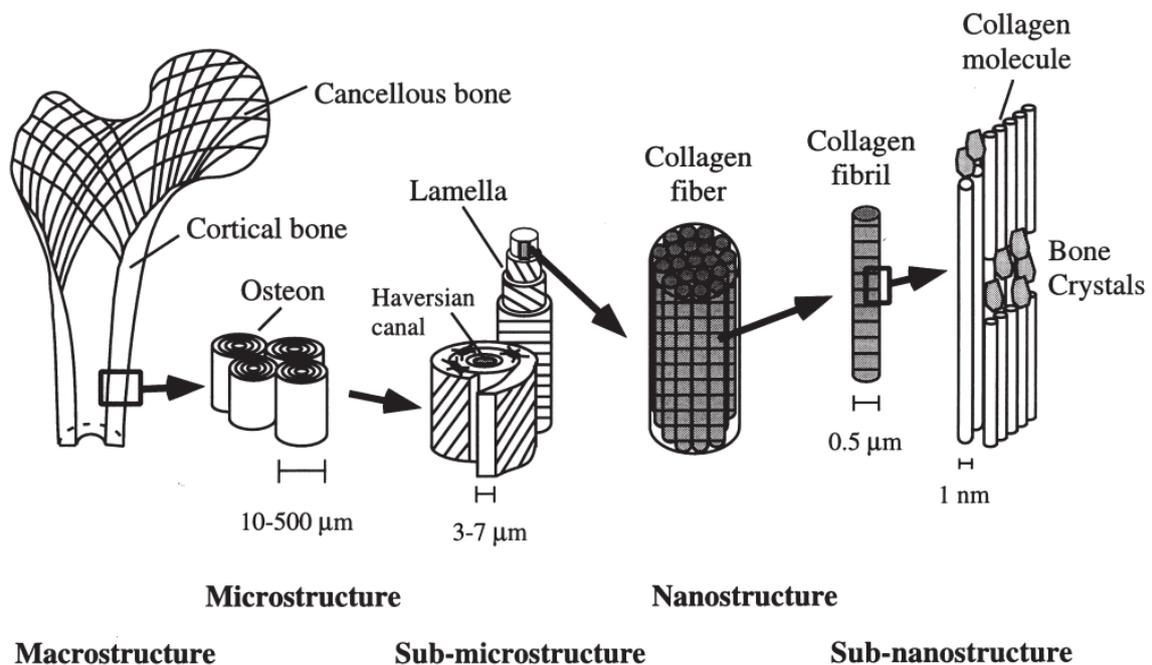
O tecido ósseo possui uma estrutura complexa, organizada de forma distinta em diferentes níveis hierárquicos (figura 2.2), apto para desempenhar diversas funções (mecânicas e biológicas). É usual distinguir os seguintes níveis de organização hierárquica no tecido ósseo (Rho et al., 1998): a macroestrutura (tecido ósseo cortical,



**Figura 2.1** – Estrutura de um osso longo: fêmur. (adaptada de Diaquino, 2011)

e tecido esponjoso), a microestrutura (sistema de Havers, lamelas e lacunas), a sub-microestrutura (lamelas), a nanoestrutura (fibras de colagénio e minerais incorporados) e a sub-nanoestrutura (minerais, colagénio e proteínas não-colagenosas).

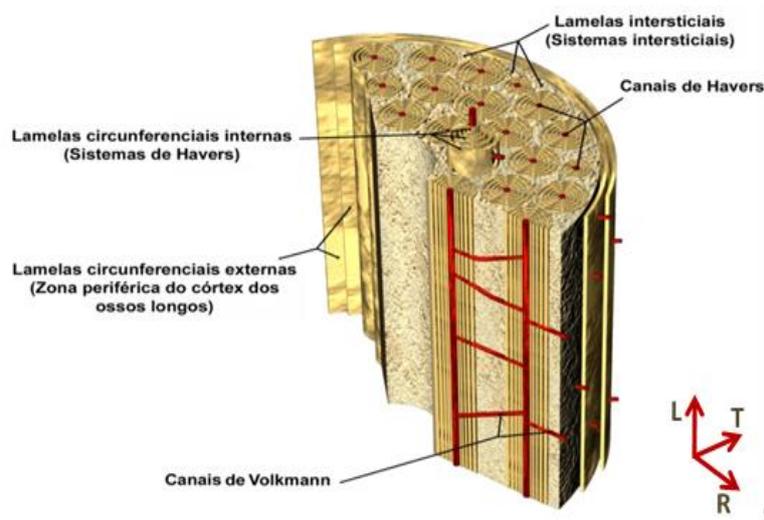
Ao nível macroscópico, existem dois tipos de tecido ósseo: o tecido cortical ou compacto e o tecido esponjoso ou trabecular. O tecido ósseo cortical desempenha essencialmente funções mecânicas e de proteção, enquanto o tecido ósseo esponjoso desempenha também funções metabólicas (Dias et al., 2005). O tecido ósseo cortical representa cerca de 70% do tecido ósseo existente no organismo, sendo altamente organizado e tendo um conteúdo mineral superior ao tecido ósseo esponjoso (Dias et al., 2005). O tecido ósseo esponjoso é altamente poroso e organizado aleatoriamente. (Ramaswamy, 2003). A porosidade do tecido esponjoso varia entre 50-95%, enquanto a porosidade do tecido ósseo cortical varia entre 5 e 10% (Mirzaali et al., 2016). Ao nível de microestrutura, o tecido ósseo possui dois componentes principais: as células (osteoblastos, osteoclastos, células de revestimento e osteócitos) e a matriz extracelular (MEC) óssea, composta essencialmente por colagénio e cristais de hidroxiapatite (Dias et al., 2005).



**Figura 2.2** – Organização estrutural do tecido ósseo (Rho et al., 1998).

Os osteoblastos, os osteoclastos e as células de revestimento estão localizadas ao nível das superfícies do tecido ósseo, enquanto os osteócitos estão incorporados na MEC óssea mineralizada. Os osteoblastos são as células capazes de produzir tecido ósseo. Os osteoclastos removem o tecido ósseo, desmineralizando-o com ácido e dissolvendo o colagénio com enzimas. As células de revestimento do tecido ósseo são osteoblastos inativos, permanecendo na superfície quando cessa a formação óssea e podem ser reativadas em resposta a estímulos bioquímicos e/ou mecânicos. Os osteócitos também são formados por osteoblastos que são incorporados na matriz óssea, estando localizados nas lacunas e é razoável assumir que são as únicas células incorporadas na matriz óssea que são afetadas pelo processo de dano mecânico do tecido (Doblaré et al., 2004).

Em termos histológicos, o tecido ósseo cortical é formado pelos sistemas de Havers (figura 2.3), cujo eixo maior se encontra orientado paralelamente ao eixo maior do osso (direção longitudinal). Estes sistemas de Havers são compostos por um canal central, contendo um ou dois capilares e, por vezes, uma fibra nervosa ao redor da qual existem 8 a 15 lamelas concêntricas contendo os osteócitos nas lacunas. Para além dos vasos sanguíneos que correm longitudinalmente nos canais de Havers, o tecido ósseo cortical possui vasos sanguíneos que atravessam perpendicularmente os sistemas de Havers, e que se encontram presentes no interior dos canais de Volkmann, possibilitando a ligação destes com a cavidade medular e o perióstio (Dias et al., 2005).



**Figura 2.3** – Microestrutura do tecido ósseo cortical com as três direções anatômicas identificadas (Dias et al., 2005): longitudinal (L), radial (R) e transversal (T).

## 2.3 MATERIAIS ELÁSTICOS

Os materiais ortotrópicos caracterizam-se por possuírem uma estrutura interna orientada em três direções de simetria mutuamente ortogonais (Morais et al., 2006), que lhe confere diferentes propriedades elásticas em diferentes direções do espaço. A microestrutura do tecido ósseo cortical está orientada em três direções de simetria ortogonais (figura 2.3) - a direção longitudinal (L), a direção tangencial (T) e a direção radial (R) -, inserindo-se assim na classe dos materiais ortotrópicos (Szabó et al., 2013). Com base nas três direções de simetria dum material ortotrópico podemos definir um sistema de coordenadas cartesiano e ortonormado, a que chamamos referencial de simetria material ou referencial de ortotropia. Demonstra-se que nesse sistema de coordenadas a Lei de Hooke Generalizada tem a seguinte forma:

$$\begin{bmatrix} \varepsilon_{11} \\ \varepsilon_{22} \\ \varepsilon_{33} \\ \gamma_{12} \\ \gamma_{23} \\ \gamma_{13} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} S_{11} & S_{12} & S_{13} & 0 & 0 & 0 \\ S_{21} & S_{22} & S_{23} & 0 & 0 & 0 \\ S_{31} & S_{32} & S_{33} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & S_{44} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & S_{55} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & S_{66} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \sigma_{11} \\ \sigma_{22} \\ \sigma_{33} \\ \tau_{12} \\ \tau_{23} \\ \tau_{13} \end{bmatrix} \quad (1.1)$$

onde  $\varepsilon_{ii}$  ( $i=1,2,3$ ) são as deformações lineares,  $\gamma_{ij}$  ( $i,j=1,2,3$ ) são as deformações angulares,  $\sigma_{ii}$  ( $i=1,2,3$ ) são as tensões normais,  $\tau_{ij}$  ( $i,j=1,2,3$ ) são as tensões de corte e  $S_{ij}$  ( $i,j=1,\dots,6$ ) são os coeficientes elásticos.

Em muitas aplicações práticas que envolvem materiais ortotrópicos, o estado de tensão em vigor num componente estrutural é o estado plano de tensão (Morais et al., 2006). Nesse caso, a Lei de Hooke exprime-se através da seguinte equação matricial reduzida:

$$\begin{bmatrix} \varepsilon_{11} \\ \varepsilon_{22} \\ \gamma_{12} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} S_{11} & S_{12} & 0 \\ S_{21} & S_{22} & 0 \\ 0 & 0 & S_{44} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \sigma_{11} \\ \sigma_{22} \\ \tau_{12} \end{bmatrix} \quad (1.2)$$

Os elementos  $S_{ij}$  da matriz de elasticidade de um material ortotrópico, relativos ao referencial de simetria material, são identificados através de ensaios mecânicos apropriados, sendo usual exprimir os resultados desses ensaios através das constantes de engenharia (módulo de Young, coeficiente de Poisson e módulo de distorção). A equação matricial reduzida da Lei de Hooke dum material ortotrópico, para o estado plano de tensão e relativamente ao referencial de simetria material, quando expressa através das constantes de engenharia adquire o seguinte aspeto (Morais et al., 2006):

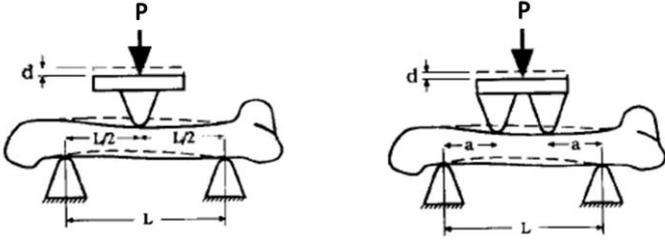
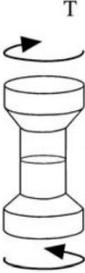
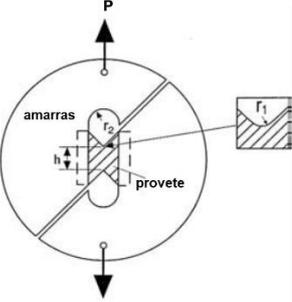
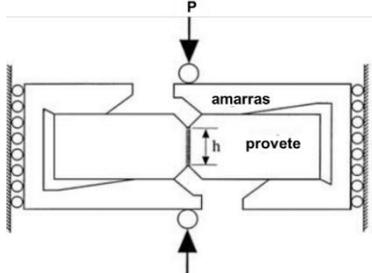
$$\begin{bmatrix} \varepsilon_{11} \\ \varepsilon_{22} \\ \gamma_{12} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1/E_1 & -\nu_{21}/E_2 & 0 \\ -\nu_{12}/E_1 & 1/E_2 & 0 \\ 0 & 0 & 1/G_{12} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \sigma_{11} \\ \sigma_{22} \\ \tau_{12} \end{bmatrix} \quad (1.3)$$

onde  $E$  representa o módulo de elasticidade,  $\nu$  representa o coeficiente de Poisson e  $G$  o módulo de corte, no plano de simetria material a que diz respeito o ensaio mecânico.

## 2.4 IDENTIFICAÇÃO DAS PROPRIEDADES ELÁSTICAS DO TECIDO ÓSSEO CORTICAL

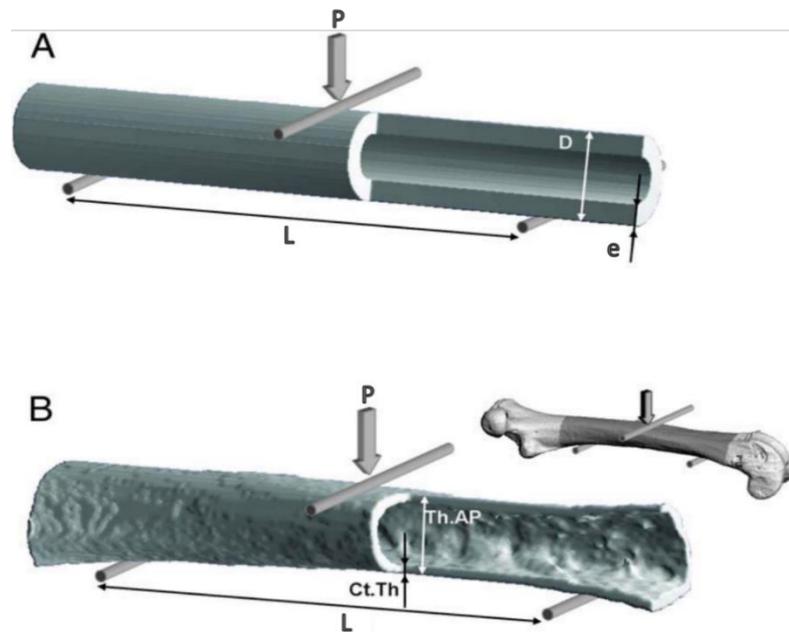
O comportamento mecânico elástico de um osso é o resultado tanto das propriedades do material como da sua configuração geométrica (Sharir et al., 2008). Existe uma grande variedade de ensaios experimentais que permitem avaliar as diferentes propriedades elásticas do tecido ósseo: ensaio de tração, ensaio de compressão, ensaio de flexão (em três e em quatro pontos), ensaios de torção e ensaios de corte puro (Iosipescu e Arcan). Na tabela 2.1 são apresentadas as configurações desses ensaios, bem como as propriedades mecânicas determinadas em cada um deles. Nos ensaios mecânicos é cada vez mais comum a utilização de métodos óticos baseados na análise de movimento de pontos da superfície do provete, como é o caso da correlação digital de imagem (CDI).

**Tabela 2.1** – Ensaio mecânicos clássicos utilizados para a determinação das propriedades elásticas do tecido ósseo (adaptada de Pereira, 2016)

Ensaio mecânico	Aspetto geral do ensaio	Propriedades elásticas
Ensaio de Tração / Compressão		$E_L$ $E_R$ $E_T$ $\nu_{RT}$
Ensaio de Flexão em 3 ou 4 pontos		$E_L$
Ensaio de Torção		$G_{LT}$ $G_{RT}$ $G_{RL}$
Ensaio de Arcan		$G_{LT}$ $G_{RT}$ $G_{RL}$
Ensaio de Iosipescu		$G_{LT}$ $G_{RT}$ $G_{RL}$

No ensaio de tração são geralmente usados provetes com uma região central cilíndrica ou paralelepípedica. O provete é fixado em duas amarras, sendo uma delas fixa e a outra móvel. Este ensaio oferece como informação básica a curva de tensão-deformação, tal como no ensaio de compressão (Morais et al., 2006). O ensaio de compressão permite a utilização de provetes relativamente pequenos. Contudo, é um ensaio mais difícil de executar, por causa dos problemas associados ao contacto com as amarras (Cowin, 2001).

O ensaio de flexão (em três ou em quatro ponto) em ossos longos é o método mais utilizado para medir as propriedades mecânicas do tecido ósseo de pequenos animais, como os roedores, uma vez que as reduzidas dimensões desses ossos tornam muito difícil a fabricação de provetes para os ensaios de tração e compressão convencionais (Cowin, 2001). Os ensaios de flexão podem ser feitos com 3 ou 4 pontos de carregamento. A principal vantagem do ensaio de flexão em quatro pontos reside no facto de toda a secção de osso entre os pontos de aplicação da carga estar submetida a um momento fletor uniforme. No entanto, o ensaio de flexão em três pontos é mais utilizado para medir as propriedades mecânicas dos ossos longos (Sharir et al., 2008). Na maioria dos trabalhos publicados a identificação das propriedades mecânicas baseia-se na teoria de vigas de Bernoulli-Euler (Akhter et al, 2004; Bonnet et al, 2007; Sun et al, 2009). Essa metodologia de identificação é em regra acompanhada pela aproximação da geometria irregular de um osso longo por uma geometria regular e uniforme (Turner et al., 1993). Nos trabalhos realizados por Sharir et al (2008) e Lenthe et al. (2008) são consideradas aproximações da geometria do fémur a uma viga oca com uma secção central circular (figura 2.4). Por sua vez, Turner et al. (1993) e An & Draughn (2000) aproximaram a secção central do fémur por um anel elítico. Porém, os valores do módulo de elasticidade obtidos com base nessa aproximação são fortemente afetados pelas discrepâncias em relação à forma real, resultando na subestimação do módulo de elasticidade (Lenthe et al. 2008). Sharir et al. (2008) ressalta que este método é bastante grosseiro para a determinação das propriedades do material, e os resultados obtidos servem apenas para uma primeira aproximação, pois ignora a anisotropia do material e a geometria complexa dos ossos longos.



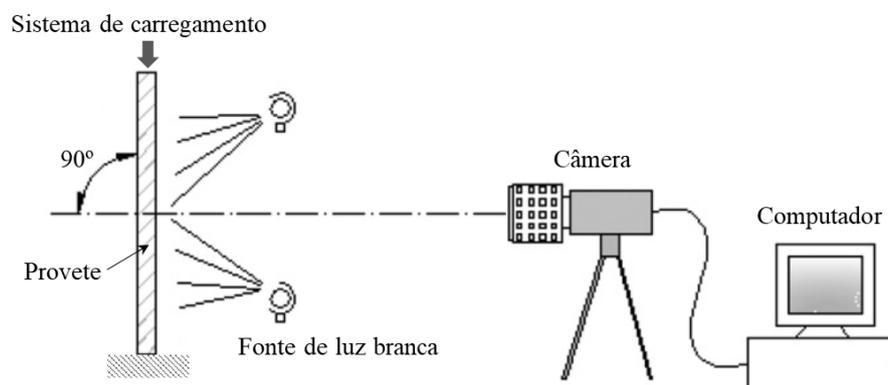
**Figura 2.4** – Representação do ensaio de flexão em 3 pontos (A) aproximando a geometria do fêmur a uma viga oca e (B) com a geometria real (Lenthe et al., 2008).

O ensaio de torção pode ser usado para medir as propriedades mecânicas do tecido ósseo (Cowin, 2001; Sharir et al., 2008). A dificuldade deste ensaio é fixar devidamente as extremidades do provete à máquina de ensaios, sendo normalmente embebidas nas extremidades do provete em resina. As cápsulas de resina podem ficar desalinhadas com o eixo do provete e não aderirem adequadamente ao tecido ósseo, o que pode estar na origem da sobrestimação da rotação e, conseqüentemente, da subestimação do módulo de corte (Diaquino, 2011). Outros ensaios que podem ser utilizados para a medição das propriedades de corte do tecido ósseo são o ensaio Iosipescu e o ensaio Arcan (tabela 2.1). Os testes de corte puro (Iosipescu e Arcan) são mais vantajosos do que os ensaios de torção, pois costumam ser mais precisos e podem ser usados provetes de pequenas dimensões.

A utilização de métodos óticos nos ensaios mecânicos é uma prática crescente. A correlação digital de imagem (CDI) é um método ótico que capta e compara uma seqüência de imagens através das quais é possível obter o campo de deslocamentos (figura 2.5). Este procedimento requer, em geral, a criação de um padrão *speckle* na superfície de uma amostra (Begonia et al., 2015; Lavet et al., 2009), uma câmara que capte a posição do padrão *speckle* enquanto o provete é carregado e a seqüência de imagens subsequente

é processada para a determinação dos campos cinemáticos (dos deslocamentos e das deformações). Lavet et al., (2009) refere que este método pode ser utilizado em modelos animais para detetar as alterações das propriedades ósseas resultantes de doenças ou tratamentos. No estudo que realizaram, a técnica DIC foi aplicada em ensaios de compressão para identificar as propriedades elásticas do tecido ósseo cortical de ratos, obtendo um módulo de elasticidade longitudinal de 15,4 GPa e um coeficiente de Poisson de 0,44.

Na literatura da biomecânica, o tecido ósseo é normalmente modelado como um material linear elástico (An & Draughn, 2000). Mas a identificação das propriedades elásticas do tecido ósseo pelos métodos diretos mencionados atrás (tabela 2.1) conduz, por vezes, a resultados pouco fiáveis, face às hipóteses simplificadoras em que assentam. Por isso, e também em virtude das dificuldades associadas à obtenção de provetes com uma forma regular, uma via alternativa é o recurso a métodos inversos. Estes métodos combinam os resultados experimentais com a simulação dos ensaios pelo método dos elementos finitos, sendo também conhecidos como métodos de atualização do modelo de elementos finitos (FEMU). A atualização do modelo de elementos finitos envolve um método de otimização, a partir do qual é possível estimar as propriedades elásticas do modelo com base em ensaios experimentais. As propriedades são as que minimizam as discrepâncias entre os dados experimentais e os resultados da simulação (Zapico-Valle et al., 2010).



**Figura 2.5** – Ensaio mecânico acompanhado com correlação digital de imagem (Diaquino, 2011).

## 2.5 VARIABILIDADE DAS PROPRIEDADES ELÁSTICAS DO TECIDO ÓSSEO CORTICAL

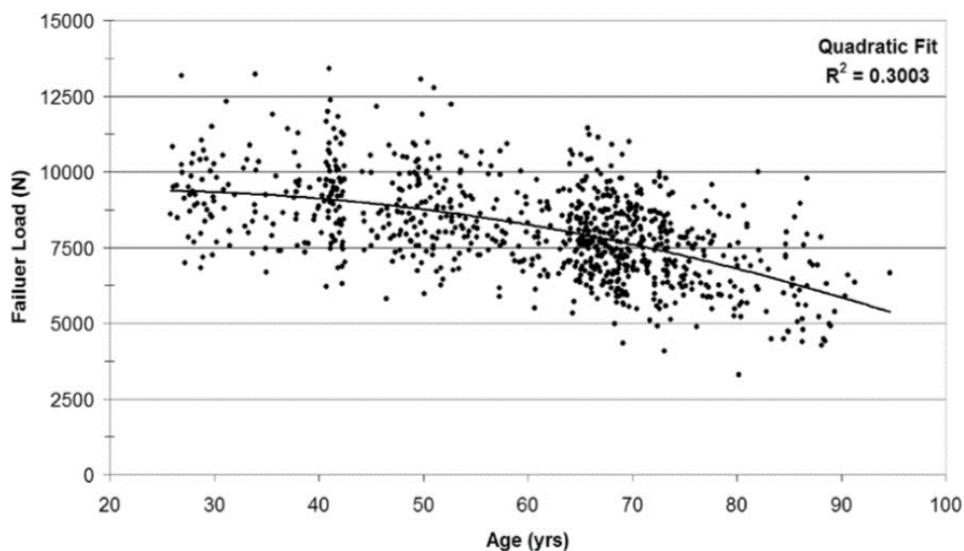
As propriedades mecânicas do tecido ósseo cortical são fortemente influenciadas por fatores *in vivo* e *in vitro*. Nos fatores *in vivo* estão incluídos a idade, o sexo, a espécie, a função do osso específico e as doenças, entre outros. Os fatores *in vitro* incluem os métodos de fabricação dos provetes, as condições de conservação do tecido, o grau de hidratação e o tipo de ensaio utilizado (An & Draughn, 2000). O processo de preparação dos provetes requer cuidados adequados de modo a evitar ou minimizar a ocorrência de micro danos no tecido ósseo. O contacto entre o provete e as amarras da máquina de ensaios também pode influenciar a qualidade e a dispersão dos resultados dos ensaios mecânicos (An & Draughn, 2000).

Nyman et al. (2005) estudou a influência da desidratação no tecido ósseo. As propriedades mecânicas do tecido ósseo são influenciadas pela perda de água da matriz extracelular do tecido ósseo. Vários estudos examinaram o efeito da congelação nas propriedades mecânicas do osso, tendo concluindo que a congelação a temperaturas muito baixas (-80°C) diminui significativamente tanto a tensão de rotura em flexão de fêmures de rato, como a tensão de rotura em compressão de vértebras de rato. No entanto, se os ossos forem mantidos a temperaturas superiores, nomeadamente a -20°C, não há alterações significativas nas propriedades mecânicas do tecido ósseo (Cowin, 2001).

Em geral, o desempenho mecânico das estruturas ósseas diminui com o aumento da idade (figura 2.6), em consequência das alterações da composição e da microestrutura do tecido ósseo. O módulo de elasticidade longitudinal e a resistência à tração longitudinal do tecido ósseo diminuem com o aumento da porosidade, embora o módulo de elasticidade transversal seja menos sensível à alteração da porosidade (Dong e Guo, 2004). O aumento da porosidade ao longo da idade provoca a diminuição do módulo de elasticidade e da tensão de rotura (Vilayphiou et al., 2016). A alteração no conteúdo mineral ao longo da idade e a acumulação de micro fraturas devido a redução da atividade de remodelação óssea contribuem para a diminuição da resistência à fratura do tecido ósseo cortical (Mirzaali et al., 2016). Também as modificações no colagénio associadas à idade podem reduzir a energia necessária para a fratura do tecido ósseo (Burr, 2002). Zioupos e Currey (1998) realizaram estudos em fêmures de diferentes animais, tendo

concluído que com a idade as propriedades mecânicas do tecido ósseo diminuem e que essa diminuição pode estar associada com a redução da estabilidade do colagénio.

Em geral, o tecido ósseo cortical masculino e feminino apresenta as mesmas propriedades mecânicas. No entanto, depois da menopausa os ossos femininos exibem taxas de reabsorção óssea mais elevadas, que originam níveis de porosidade aumentados e, conseqüentemente, o enfraquecimento do tecido ósseo (An e Draughn, 2000). A realização de ovariectomia em modelos animais replica em vários aspetos as condições de osteoporose pós-menopausa. Meyer Jr. et al. (2001) conduziram um estudo em fêmures de ratos fêmeas a que foram removidos os ovários, concluindo que com a idade e a ovariectomia o conteúdo mineral ósseo diminui, prejudicando significativamente o processo de cicatrização de fraturas. As alterações hormonais subsequentes à menopausa (falta de estrogénio) estão associadas a uma redução de massa óssea. Kasra et al. (1997) estudou a influência de uma terapia hormonal de substituição de estrogénio e progesterona, de modo a melhorar as propriedades mecânicas do tecido ósseo cortical de pacientes sem ovários ou em menopausa. Concluiu que a terapia hormonal de substituição de estrogénio e progesterona, em regime cíclico ou interrompido, melhoram a densidade óssea e o módulo de elasticidade (quando comparado com amostras de controlo, sem terapia hormonal ou apenas com reposição de estrogénio).



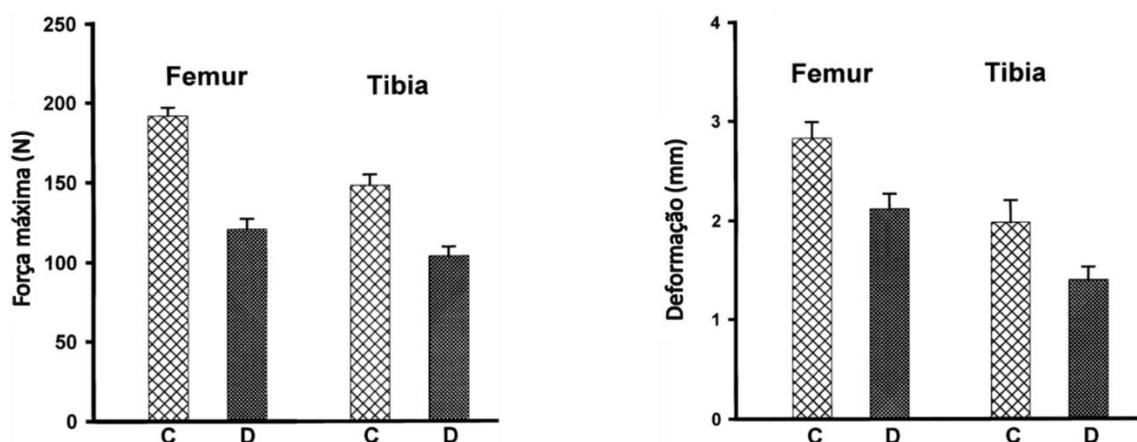
**Figura 2.6** – Evolução da força máxima da tíbia ao longo da idade, em ensaios de flexão. Este estudo foi realizado em mulheres, sendo que depois do período de menopausa a força máxima da tíbia diminui 25%. (Vilayphiou et al., 2016).

As fraturas no fêmur são uma consequência frequente de metástases de cancro da mama, da próstata, dos pulmões, da tiroide e dos rins. Ocorrem lesões metastáticas no fêmur em 8 a 11% de pacientes com cancro de mama, e num estudo de quase 700 pacientes com cancro de mama, 29% dos pacientes com metástases femorais sofreram fraturas patológicas. Aproximadamente metade de todas as fraturas patológicas no fêmur ocorrem proximalmente, e aproximadamente um quarto dessas fraturas estão localizadas na diáfise do fêmur (Keyak et al.,2005).

A fragilidade óssea é uma das complicações da insuficiência crónica renal. Os pacientes em dialise têm um risco global quatro vezes maior de fratura de anca do que indivíduos do mesmo género na população em geral. Iwasaki et al (2011) estudaram a deterioração das propriedades mecânicas do tecido ósseo cortical em ratos com insuficiência renal crónica, verificando alterações ao nível da composição química da matriz óssea, mas no entanto a densidade mineral óssea e o tecido ósseo esponjoso não se alteraram. Jokihaara et al (2006) estudaram o efeito de uma dieta altamente suplementada com cálcio em ratos com insuficiência renal moderada, concluindo que os valores de densidade mineral óssea e da massa óssea, que diminuem com a insuficiência renal, são revertidos para valores normais.

Outra doença que aumenta o risco de fraturas (principalmente de fratura da anca, do úmero proximal e do tornozelo) é a diabetes (Schwartz, 2003). Foi demonstrado que a *diabetes mellitus* altera as propriedades ósseas e prejudica a regeneração de fraturas, tanto em humanos como em animais. Funk et al (2000) fizeram um estudo no qual compararam a regeneração de uma fratura do fêmur em ratos diabéticos e em ratos de controlo. Observaram que os ratos diabéticos apresentam uma capacidade de cicatrização inferior aos de controlo. Além disso, observaram que a recuperação das propriedades estruturais dos fêmures com fraturas regeneradas é atrasada pelo menos uma semana nos ratos diabéticos. Reddy et al., (2001) realizaram ensaios de flexão em 3 pontos em fêmures e tíbias de rato com diabetes, tendo concluído que os ossos dos ratos diabéticos são significativamente menos resistentes, mais rígidos e mais frágeis quando comparados com os ratos de controlo (figura 2.8).

A prática de exercício físico desempenha um papel importante na melhoria das propriedades mecânicas ósseas, aumentando a massa e a resistência ósseas (tabela 2.2). No entanto, os efeitos da atividade física são maiores em adolescentes do que em indivíduos adultos. Nos adultos, o aumento da massa óssea devido ao incremento da atividade física apenas



**Figura 2.7** – Força máxima e deformação na rotura de fêmures e de tíbias do grupo de ratos de controlo (C) e do grupo de ratos diabéticos (D). (Reddy et al., 2001)

se faz sentir enquanto esse nível de atividade é mantido (An & Draughn, 2000). Vários autores estudaram o efeito do exercício em ratos com alguma patologia (normalmente ovariectomizados) ou com diferentes idades, relatando que a prática de exercício físico melhora as propriedades ósseas relativamente aos indivíduos inativos (Orwoll et al., 1989; Hoshi et al, 1998; Emslander, 1998; Barengolts et al, 1994; Hart et al, 2001).

**Tabela 2.2** – Propriedades do tecido ósseo de ratos que praticavam natação e de ratos sedentários (Hart et al., 2001).

Propriedades	Grupos	
	Controlo sedentário	Praticantes de natação
Área de tecido ósseo cortical (mm <sup>2</sup> )	5,91 ± 0,49	6,46 ± 0,20
Força máxima (N)	149 ± 20,0	155,65 ± 11,5
Rigidez (N/mm)	392,27 ± 20,5	510,08 ± 19,1
Módulo de elasticidade (GPa)	7,10 ± 1,0	10,43 ± 1,5

## TRABALHO EXPERIMENTAL

### 3.1. INTRODUÇÃO

Neste capítulo apresentamos, de forma sintética, os modelos animais que foram examinados no trabalho experimental: o modelo da redução de massa renal (modelo RMR) e o modelo do cancro da mama induzido pela administração do agente carcinogénico *N*-metil-*N*-nitrosureia (modelo MNU). Depois disso, descrevemos detalhadamente todo o trabalho experimental relativo à identificação do módulo de elasticidade longitudinal do tecido ósseo cortical, através do ensaio de flexão de fémures e do ensaio de compressão de segmentos femorais.

### 3.2. MODELOS ANIMAIS

O protocolo experimental do modelo animal RMR foi descrito detalhadamente por Nogueira *et al* (2017). Por sua vez, o protocolo experimental do modelo MNU fez parte de um projeto financiado pela FCT, intitulado “Avaliação bioquímica, morfológica e funcional do catabolismo muscular associado ao cancro da mama: o papel do exercício físico” e com a referência PTDC/DES/114122/2009. Todos os procedimentos experimentais implementados no âmbito desses protocolos encontram-se em conformidade com a legislação em vigor em Portugal e na União Europeia para a proteção de animais usados para fins científicos: Decreto-Lei nº 113/2013 e Diretiva Europeia 2010/63/UE.

### 3.2.1. Modelo da redução de massa renal

No modelo animal da redução de massa renal foram utilizados ratos do sexo masculino, da espécie *Rattus norvegicus* e da estirpe *Wistar* (Harlan-Interfauna, Iberica, Barcelona), com aproximadamente 135g. Todos os ratos foram sujeitos a 7 semanas de acomodação, tendo no final desse período, entre 359g e 402g (Nogueira *et al*, 2017). Os ratos foram divididos aleatoriamente em dois grupos: o grupo de cirurgia simulada (grupo SO, *sham-operated*) e o grupo da cirurgia de redução de massa renal (grupo RMR). Os animais do grupo RMR foram sujeitos à remoção total do rim direito e a dois terços do rim esquerdo (Nogueira *et al*, 2017). Os ratos do grupo SO sofreram a mesma incisão abdominal e a mesma manipulação de ambos os rins, mas sem qualquer remoção de massa renal. Todos os procedimentos cirúrgicos estão descritos em Nogueira *et al* (2017). Os ratos foram observados diariamente para verificar a sua saúde geral e mortalidade, tendo os seus pesos sido registados semanalmente.

Uma semana depois da cirurgia, os animais sobreviventes foram distribuídos por 4 grupos (Nogueira *et al*, 2017): (1) SO sem tratamento (grupo SO); (2) SO com administração intraperitoneal de ácido quetomélico A (grupo SO+CAA); (3) RMR sem tratamento (grupo RMR); (4) RMR com administração de ácido quetomélico A (grupo RMR+CAA). O ácido quetomélico A (CAA) foi administrado três vezes por semana durante seis meses. Seis meses depois da cirurgia, os animais sobreviventes foram sacrificados segundo o procedimento descrito em Nogueira *et al* (2017). Na tabela 3.1 indicamos o número de fêmures de cada um desses grupos (um fémur por animal), que foram usados nos ensaios mecânicos.

**Tabela 3.1**– Quantidade de fêmures usados em cada grupo experimental do modelo animal RMR

Modelo	Número de fêmures
SO	6
SO+CAA	12
RMR	7
RMR+CAA	8

### 3.2.2. Modelo do cancro da mama

Neste ensaio foram utilizados ratos do sexo feminino, da espécie *Rattus norvegicus* e da estirpe *Sprague-Dawley* (Harlan-Interfauna, Iberica, Barcelona), com quatro semanas de idade. Os animais foram submetidos a um período de quarentena com a duração de uma semana. Após o período de quarentena, os animais foram divididos em cinco grupos experimentais: o grupo “MNU sedentário”, o grupo “MNU ativo I”, o “grupo MNU ativo II”, o grupo “controlo sedentário” e o grupo “controlo ativo”. Mais adiante descreveremos cada um desses grupos. Na tabela 3.2 indicamos o número de fémures de cada um dos grupos experimentais (um fémur por animal), que foram usados nos ensaios mecânicos.

Durante o período experimental, os animais foram colocados em gaiolas de policarbonato (1500U Eurostandard Type IV, Tecniplast, Itália) com superfície lisa e bordos redondos. Como cama, para revestir a gaiola, foi usado carolo de milho adquirido à empresa Mucedola (Itália). Para a manutenção de uma adequada limpeza das gaiolas, a cama foi mudada semanalmente e as gaiolas lavadas quinzenalmente. O trabalho experimental decorreu no biotério da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD) com controlo da temperatura ( $22^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), controlo da humidade relativa (60%), sistema de renovação e de filtração de ar, e sistema de luz com temporizador que proporcionava um ciclo de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. A água (engarrafada) e a comida (ração Diet Standard 4RF21<sup>®</sup>, Mucedola, Itália) foram disponibilizadas *ad libitum*. No interior de cada uma das gaiolas foram colocados vários tubos de plástico

**Tabela 3.2** – Quantidade de fémures usados em cada grupo experimental do modelo animal MNU.

Modelo	Número de fémures
Controlo ativo	6
Controlo sedentário	7
MNU sedentário	7
MNU ativo 1	7
MNU ativo 2	8

rígido para enriquecer e dinamizar o ambiente. O peso corporal foi determinado semanalmente, usando uma balança de laboratório Mettler® Toledo PM 4000 (LabWrench, Midland, Canada), permitindo assim acompanhar a evolução do peso dos animais ao longo do trabalho experimental.

Às 7 semanas de idade, os animais dos grupos MNU receberam uma injeção intraperitoneal do agente carcinogénico *N*-metil-*N*-nitrosureia (MNU) (Isopac, Sigma Chemical Co., Madrid), numa dose de 50mg/Kg de peso vivo. Os animais dos grupos de controlo receberam uma injeção intraperitoneal do veículo (solução salina a 0,9%). Após a administração da MNU ou do veículo, os animais dos grupos “MNU ativo I” e “controlo ativo” foram adaptados ao tapete rolante Treadmill Control LE 8710, Panlab, Harvard Apparatus, EUA) por um período de 5 dias, a uma velocidade de 20 m/min, aumentando progressivamente o tempo diário de exercício de 20 para 60 min/dia. Após este período de adaptação, os animais foram exercitados a uma velocidade de 20 m/min, 60 min/dia, 5 dias/semana, durante 35 semanas. Os animais do grupo “MNU ativo II” foram exercitados após o desenvolvimento da primeira neoplasia mamária, a uma velocidade de 20 m/min, 60 min/dia, 5 dias/semana, até ao final do protocolo experimental (35 semanas após a administração do agente carcinogénico).

No final do protocolo experimental, os animais foram humanamente sacrificados. Os animais foram sedados através da administração intraperitoneal de ketamina (75mg/Kg, Imalgene® 1000, Merial S.A.S., Lyon, França) e xilazina (10mg/Kg, Rompum® 2%, Bayer Healthcare S.A., Kiel, Alemanha), seguida da exsanguinação por punção cardíaca.

### **3.3. ENSAIO DE FLEXÃO**

#### **3.3.1. Provetes**

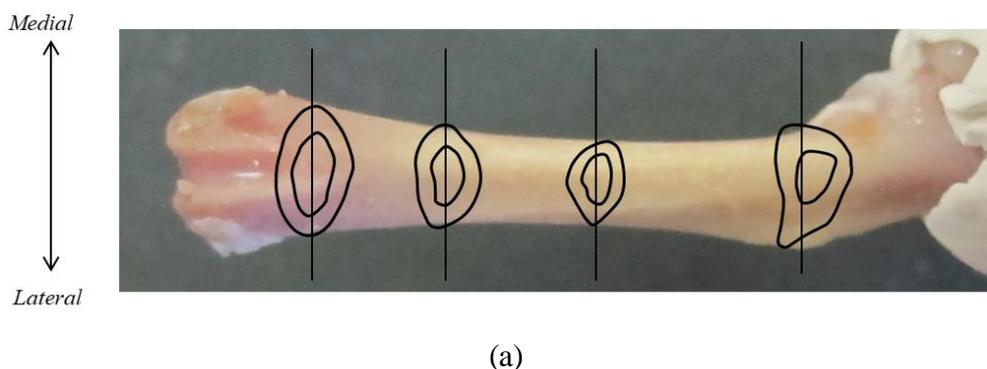
Na figura 3.1 pode ser apreciado o aspeto típico dos fémures dos ratos *Sprague-Dawley*, utilizados nos ensaios de flexão em três pontos. Antes da realização dos ensaios de flexão cada fémur foi fotografado no plano lateral-medial (Figura 3.2(a)). Depois dos



**Figura 3.1** – Aspeto de fémur de rato (*Sprague-dawley*).

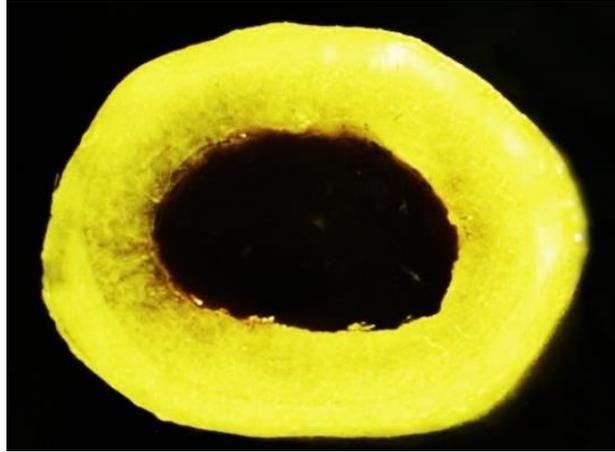
ensaios de flexão, foram fotografadas quatro secções transversais da diáfise (Figura 3.2(a)): duas secções nas extremidades da diáfise (próximo das epífises) e duas secções na região central da diáfise, de um lado e do outro da secção de rotura. Estas secções foram obtidas por corte com disco diamantado, numa máquina de corte de precisão ISOMET 5000 (Buehler). Na Figura 3.2(b) encontra-se a fotografia duma dessas secções.

As fotografias mencionadas no parágrafo anterior serviram para a reconstrução digital dos modelos geométricos das diáfises de todos os fémures ensaiados à flexão, recorrendo ao *software* SolidWorks®. A fotografia no plano lateral-medial foi usada como referência para o alinhamento e orientação das fotografias das secções transversais. A partir dos contornos exteriores das fotografias das secções transversais foi gerado um sólido (comando LOFT do SolidWorks®), ao qual foi subtraído o sólido gerado da mesma forma com base nos contornos interiores. Na figura 3.3(a) pode ser apreciado o aspeto do modelo geométrico de uma diáfise, obtido do modo que acabamos de descrever. Estes modelos geométricos foram empregues na construção dos modelos de elementos finitos do ensaio de flexão, conforme será descrito no capítulo 4.



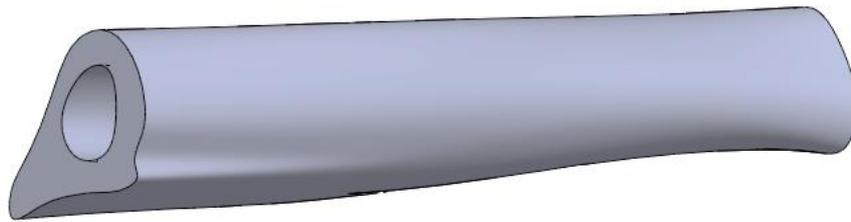
(a)

**Figura 3.2** – Levantamento fotográfico da forma e das dimensões do fémur: (a) fotografia no plano lateral-medial; (b) fotografia duma secção transversal. (*continua*)

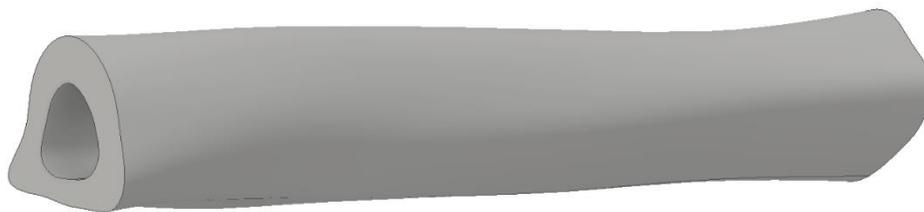


(b)

**Figura 3.2** – Levantamento fotográfico da forma e das dimensões do fémur: (a) fotografia no plano lateral-medial; (b) fotografia duma secção transversal. (*continuação*)



(a)



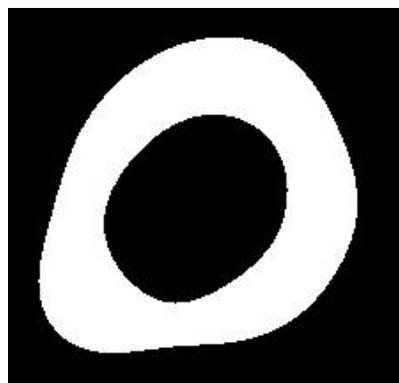
(b)

**Figura 3.3** – Modelo geométrico da diáfise de um fémur: (a) modelo baseado em fotografia; (b) modelo baseado em tomografia axial computadorizada.

Para dois fémures (não incluído nas amostras identificadas nas Tabelas 3.1 e 3.2) foi construído um modelo geométrico a partir de imagens obtidas por tomografia axial computadorizada (TAC), do Hospital Veterinário da UTAD (figura 3.4(a)). Partindo das imagens das secções transversais (figura 3.4(b)), foi reconstruído o modelo digital da diáfise que se encontra na figura 3.3(b), em duas etapas: (1) determinação dos contornos das secções recorrendo ao código MATALB®; (2) geração do modelo sólido com base nesses contornos, recorrendo ao software INVENTOR®. A obtenção deste modelo geométrico teve como propósito avaliar a fidelidade dos modelos geométricos construídos a partir das imagens fotográficas, conforme será referido mais adiante (no capítulo 4).



(a)



(b)

**Figura 3.4** – Tomografia axial computadorizada das diáfises: (a) aspeto geral do TAC; (b) imagem da secção medial da diáfise.

### 3.3.2. Ensaio mecânicos

Os ensaios de flexão em três pontos foram realizados numa máquina servo-elétrica MicroTester INSTRON 5848. Na figura 3.5(a) pode ser visto o aspeto geral da montagem experimental, enquanto na figura 3.5(b) se mostra como foram colocados os fêmures sobre os apoios. A solicitação ( $P$ ) foi aplicada no sentido cranial-caudal (figura 3.6), com uma distância entre apoios  $L = 25\text{mm}$ . Este vão foi escolhido por forma que a epífise inferior não ficasse em contacto com o apoio. A velocidade do atuador foi fixada em  $0,3\text{ mm/min}$ , sendo a força e o deslocamento do atuador registados à frequência de  $5\text{Hz}$ . Cada fémur foi ensaiado até à rutura.



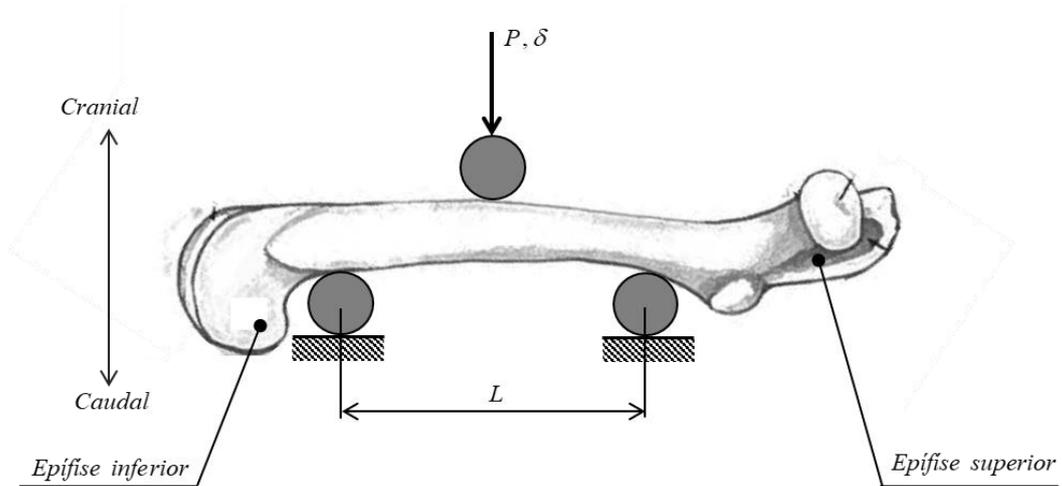
(a)

**Figura 3.5** – Ensaio de flexão em três pontos: (a) aspeto geral do ensaio; (b) detalhe das amarras e do posicionamento do fémur. (*continua*)



(b)

**Figura 3.5** – Ensaio de flexão em três pontos: (a) aspeto geral do ensaio; (b) detalhe das amarras e do posicionamento do fémur. (*continuação*)



**Figura 3.6** – Fémur de rato e esquema do ensaio de flexão em três pontos.

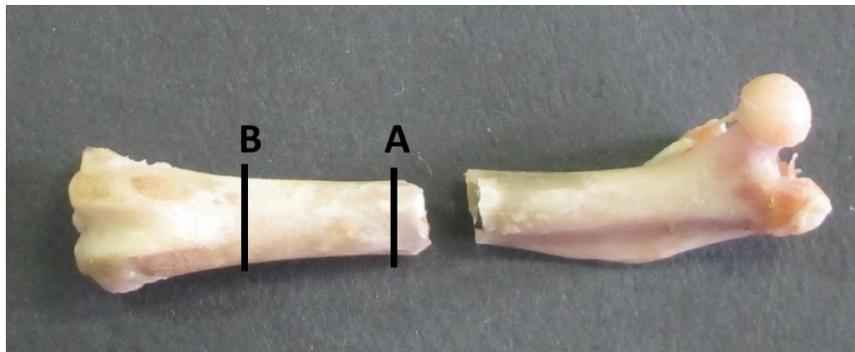
## 3.4. ENSAIO DE COMPRESSÃO

### 3.4.1. Provetes

Os provetes dos ensaios de compressão foram cortados a partir das partes mais longas das diáfises que resultaram da rotura dos fémures nos ensaios de flexão em três pontos, pelas secções A e B que estão indicadas na figura 3.7(a). Esses cortes foram efetuados com uma serra de disco diamantado, numa máquina de corte ISOMET 5000

(Buehler). Desta forma, obtivemos provetes com o aspeto ilustrado na figura 3.7(b), com comprimentos compreendidos entre 6 e 15 mm.

As secções de topo dos provetes de compressão foram fotografadas, sendo os contornos interiores e exteriores obtidos por processamento de imagem, usando o software *Adobe Fireworks CS6* (figura 3.8). Tendo por base esses contornos, assim como a fotografia das diáfises no plano lateral-medial (3.2(a)), foi obtido o modelo geométrico digital recorrendo ao software *SolidWorks®* (figura 3.9).

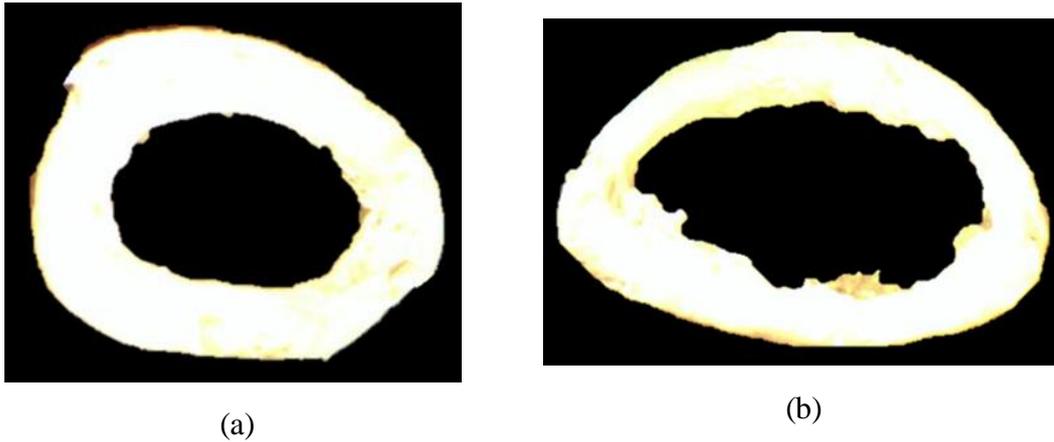


(a)



(b)

**Figura 3.7** – (a) Corte do provete de compressão a partir de um fémur fraturado no ensaio de flexão; (b) aspeto de um provete de compressão.



**Figura 3.8** – Secções extremas dos provetes de compressão: (a) secção medial; (b) secção distal.



**Figura 3.9** – Modelo geométrico de um segmento de diáfise femoral, baseado em fotografia.

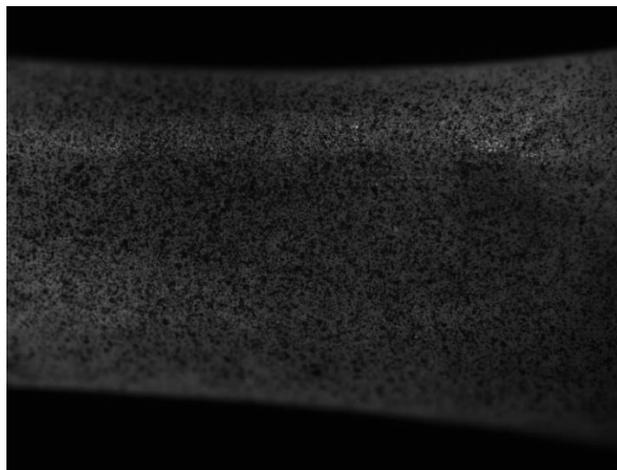
### 3.4.2. Ensaios mecânicos

Os ensaios de compressão foram realizados na máquina servo-elétrica MicroTester INSTRON 5848 (figura 3.10(a)), com a velocidade do atuador fixada em 0,1 mm/min e a frequência de aquisição em 5Hz. Os campos dos deslocamentos na superfície de cada provete foram medidos por correlação digital de imagem. Para o efeito, foi criado um padrão *speckle* com um aerógrafo IWATA (Custom Micron CM-B) e com tinta preta (3.10(b)). Durante o ensaio foram registadas imagens do padrão utilizando uma câmara

CCD Baumer Optronic FWX20 (8 bits, 1624x1236 pixel<sup>2</sup>), acoplada a uma lente telecêntrica TC 2309 (Opto Engineering SRL), tendo as superfícies dos provetes sido iluminadas com duas fontes de luz branca Raylux 25 (figura 3.10(a)). Os deslocamentos foram posteriormente obtidos por processamento usando o *software* ARAMIS DIC 2D. Nas medições por CDI foi obtida uma resolução espacial em deslocamento de 0,3 mm, correspondente à escolha de uma janela de correlação de 15x15 pixels. Para a lente telecêntrica usada, o fator de conversão é de 4,4 mm/pixel. As resoluções em deslocamento e em deformação foram da ordem de 0,01 pixel e 0,02 %, respetivamente (Xavier et al., 2012).



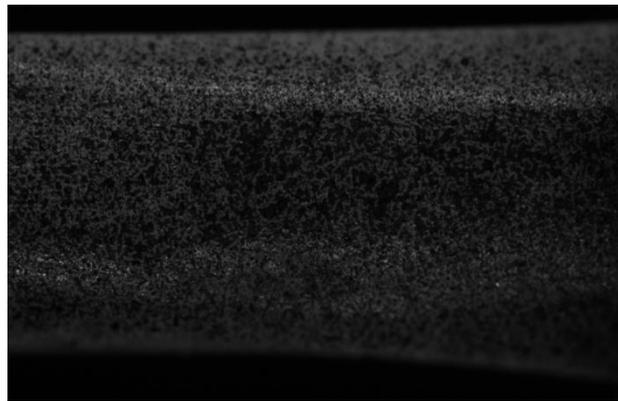
(a)



(b)

**Figura 3.10** – Ensaio de compressão: (a) aspeto geral da montagem experimental; (b) detalhe do provete de compressão com o padrão *speckle*.

Na figura 3.11 procuramos documentar os problemas detetados nos ensaios de compressão. Um deles prende-se com a menor qualidade do padrão (figura 3.11(a)), devida à acumulação de tinta nalgumas regiões da superfície, pondo em causa a validade do princípio da correspondência (Soutton et al, 2009). Outro problema tem a ver com o facto da superfície dos provetes não ser plana, pelo que a focagem do padrão não é uniforme (figura 3.11(b)), restringindo fortemente a região de medição dos deslocamentos. Por último, em virtude das pequenas dimensões dos provetes de compressão, nem sempre ficou garantido o contato do provete com as amarras em toda a extensão das suas secções de topo (figura 3.11(c)).



(a)



(b)

**Figura 3.11** – Ensaio de compressão: (a) provete com padrão *speckle* grosseiro; (b) provete com superfície curva; (c) provete com faces de apoio inadequadas (*continua*).



(c)

**Figura 3.11** – Ensaio de compressão: (a) provete com padrão *speckle* grosseiro; (b) provete com superfície curva; (c) provete com faces de apoio inadequadas (*continuação*).

## ENSAIOS DE FLEXÃO

### 4.1 INTRODUÇÃO

Neste capítulo apresentamos o trabalho de identificação do módulo de elasticidade longitudinal ( $E_L$ ) do tecido ósseo cortical, a partir dos ensaios de flexão em três pontos em fêmures dos modelos animais descritos na secção 3.2 do capítulo anterior. Começaremos por abordar o trabalho de simulação por elementos finitos do ensaio de flexão, que foi realizado tendo em vista a análise de duas metodologias de identificação de  $E_L$ : a metodologia direta (baseada na teoria de vigas de Bernoulli-Euler) e a metodologia inversa (baseada na simulação por elementos finitos). Na metodologia direta foram examinadas três variantes, que se distinguem entre si pela forma da secção transversal da diáfise: (1) secção aproximada por um anel circular; (2) secção aproximada por um anel elítico; (3) secção real. Na metodologia inversa foram analisadas duas variantes: (1) determinação de  $E_L$  através de um fator de escala baseado no quociente entre a rigidez experimental e a rigidez numérica (método inverso proporcional); (2) determinação de  $E_L$  através de um algoritmo de otimização que minimiza a diferença entre a rigidez experimental e a rigidez numérica (método inverso de otimização). Para o caso da metodologia inversa proporcional foi ainda efetuada uma análise comparativa do desempenho de dois tipos de modelos de elementos finitos: (1) modelo baseado em imagem fotográfica e modelo baseado em imagens de TAC.

Depois da apresentação e discussão dos resultados da simulação por elementos finitos, apresentamos os resultados experimentais dos ensaios de flexão. Em primeiro lugar, é efetuada uma análise detalhada das propriedades geométricas da secção central da diáfise (área, momentos de 2ª ordem e produto de 2ª ordem), dos parâmetros mecânicos estruturais das diáfises (rigidez, força de cedência, força máxima e energia de rotura). Em segundo lugar, procedemos a uma análise detalhada dos resultados referentes ao módulo

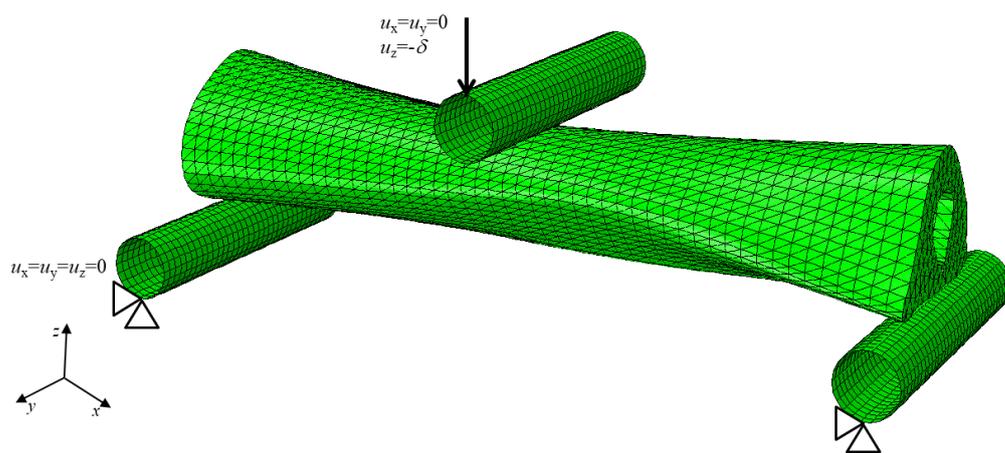
de elasticidade longitudinal. Este capítulo termina com as conclusões extraídas do trabalho que foi realizado.

## **4.2 ANÁLISE POR ELEMENTOS FINITOS DO ENSAIO DE FLEXÃO EM TRÊS PONTOS**

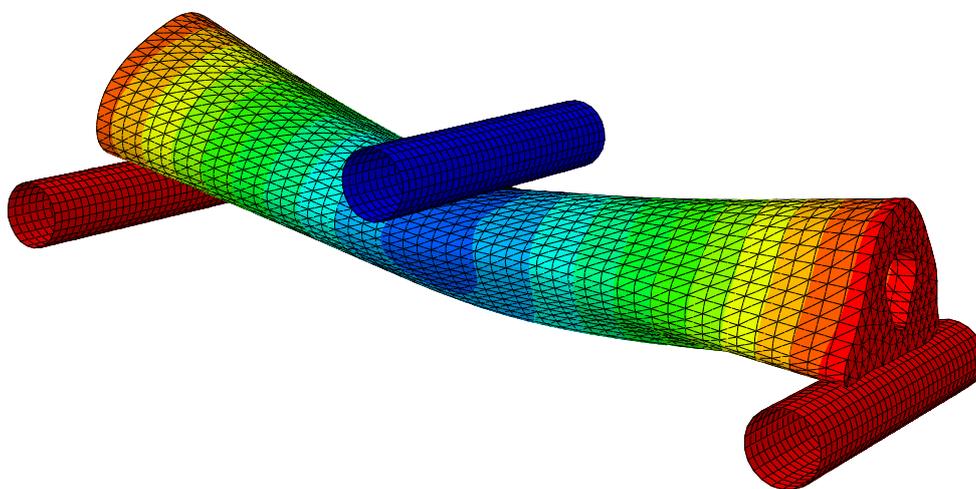
### **4.2.1. Modelo de elementos finitos**

Para cada fémur ensaiado à flexão (Tabelas 3.1 e 3.2), foi construído um modelo tridimensional de elementos finitos (figura 4.1(a)), tendo por base o respetivo modelo geométrico desenvolvido a partir de imagens fotográficas (figura 3.3(a)), tal como foi descrito na secção 3.3.1, do capítulo 3. Para a malha de elementos finitos escolhemos elementos tetraédricos quadráticos, uma vez que são mais adequados para geometrias irregulares. O tecido ósseo foi considerado como um material elástico transversalmente isotrópico, com as propriedades mecânicas que constam na tabela 4.1. Para melhor reproduzir as condições de fronteira dos ensaios experimentais, no modelo de elementos finitos foram incluídos cilindros rígidos no lugar dos apoios e do atuador, usando elementos finitos de contato e um coeficiente de atrito de 0,3. No atuador foi imposto incrementalmente um deslocamento na direção vertical (direção  $zz$ ), até ao valor máximo  $\delta = 2\text{mm}$ , sendo impedidos os restantes deslocamentos. Por sua vez, nos cilindros de apoio foram restringidos todos os movimentos de corpo rígido.

Na figura 4.1(b) encontra-se a deformada do modelo de elementos finitos, de um dos fémures (rato 13, do grupo SO), bem como o correspondente campo dos deslocamentos verticais ( $u_z$ ). Esta figura serve para documentar a adequação das condições de fronteira aplicadas no modelo. A curva força-deslocamento ( $P-\delta$ ) obtida por simulação está representada na figura 4.2 (“estimativa inicial”, tomando  $E_L = 18\text{ GPa}$ ), juntamente com a curva  $P-\delta$  experimental (“fémur de calibração”). É com base nestas curvas  $P-\delta$  que iremos analisar, nas próximas secções, diferentes métodos de identificação do módulo de elasticidade longitudinal do tecido ósseo cortical, a partir do ensaio de flexão à escala do órgão (isto é, do fémur).



(a)



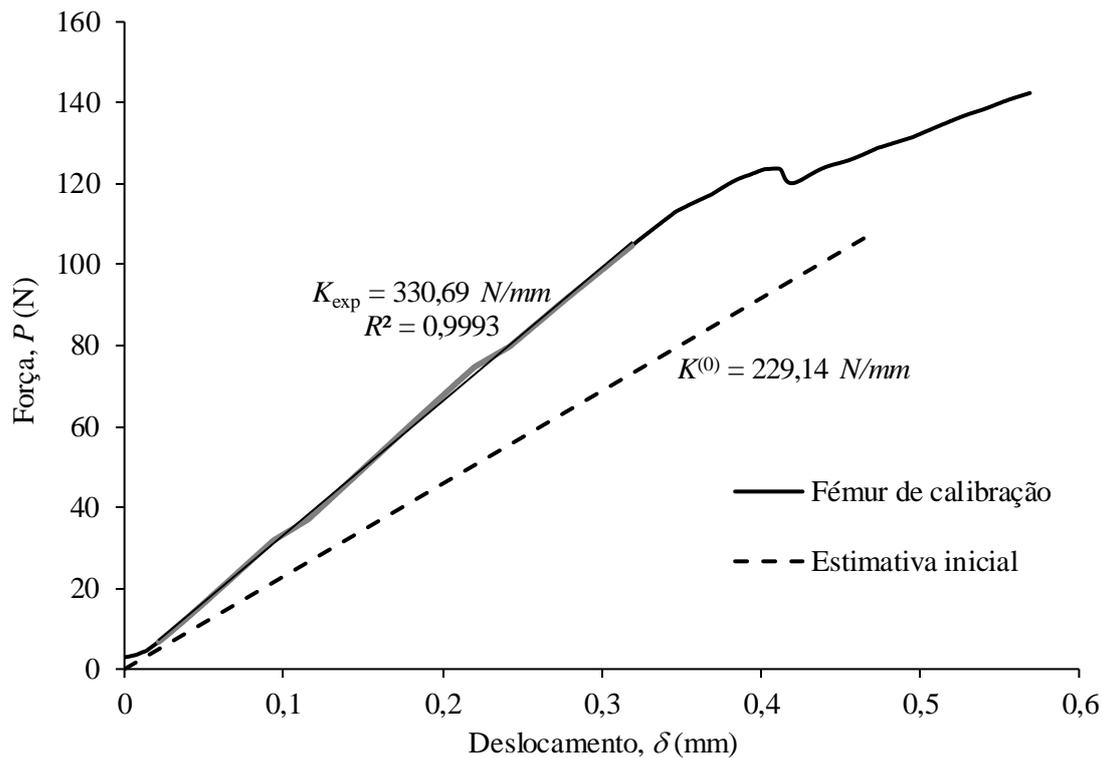
(b)

**Figura 4.1** – Simulação por elementos finitos do ensaio de flexão: (a) malha de elementos finitos e condições de fronteira; (b) deformada e campo dos deslocamentos  $u_z$ .

**Tabela 4.1** – Propriedades elásticas do modelo de elementos finitos (Martin et al., 1998).

$E_L$ (MPa)	$E_R$ (MPa)	$E_T$ (MPa)	$\nu_{LR}$	$\nu_{LT}$	$\nu_{RT}$	$G_{LR}$ (MPa)	$G_{LT}$ (MPa)	$G_{RT}$ (MPa)
18000 (20618)*	9000	9000	0,6	0,6	0,21	4100	4100	3360

\* Valor obtido por otimização



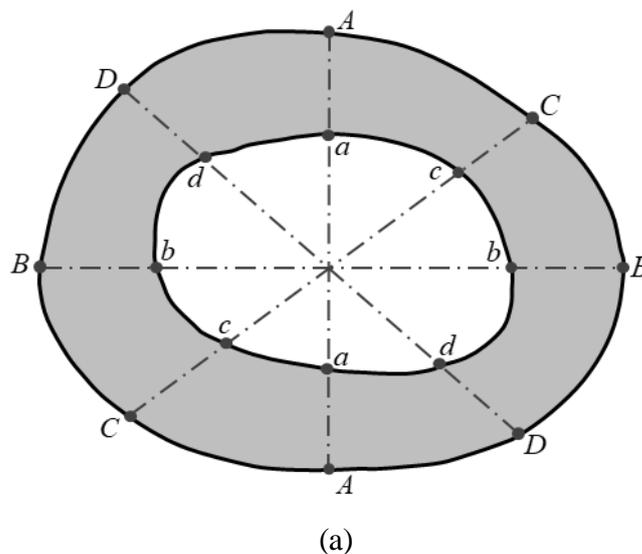
**Figura 4.2** – Curva  $P$ - $\delta$  do fémur usado para a calibração do módulo de elasticidade longitudinal (rato 13, do grupo SO).

#### 4.2.2. Identificação de $E_L$ pela teoria de vigas de Bernoulli-Euler

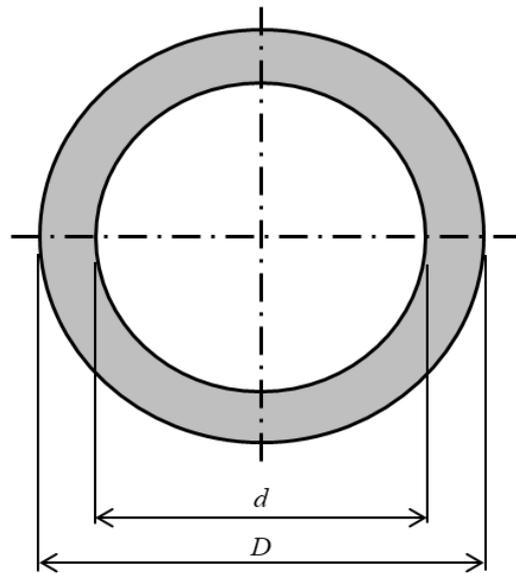
O método mais usado para a identificação do módulo de elasticidade longitudinal do tecido ósseo cortical de pequenos animais envolve a realização de ensaios de flexão em três pontos diretamente nos ossos longos e na aplicação da teoria de vigas de Bernoulli-Euler. Este método de identificação, que pode ser classificado como método direto, assume duas hipóteses simplificadoras da geometria das diáfises: (1) a secção transversal da diáfise é constante entre os apoios; (2) a forma da secção é um anel circular (Akhter et al, 2004) ou um anel elítico (Bonnet et al, 2007; Sun et al, 2009). Alguns autores (Schriefer et al, 2005; Ferreño et al, 2017) puseram em causa a validade da última hipótese, mostrando que deve ser usada a forma real da secção central da diáfise, embora Schriefer et al (2005) tenham considerado apenas o momento de 2ª ordem em relação ao eixo centroidal que é perpendicular à direção de carregamento e Ferreño et al (2017) não tenham proposto um método efetivo para a determinação de  $E_L$ . Lenthe et al (2008)

mostraram a necessidade de considerar a geometria real do fémur para a correta identificação de  $E_L$ , tendo proposto um método inverso (que designamos por método proporcional) baseado na simulação do ensaio de flexão por elementos finitos e na hipótese da razão entre a rigidez experimental e a rigidez numérica ser igual à razão entre o módulo de elasticidade do tecido cortical e o módulo de elasticidade do modelo de elementos finitos. Nesta secção iremos avaliar a validade do método direto para a determinação de  $E_L$ , assente na teoria de Bernoulli-Euler, admitindo que é válida a hipótese da uniformidade da secção transversal entre os apoios, mas assumindo diferentes formas para essa secção (anel circular, anel elítico e forma real). Na secção 4.2.3 examinaremos a validade de dois métodos inversos: o método proporcional (Lenthe et al, 2008) e um método de otimização.

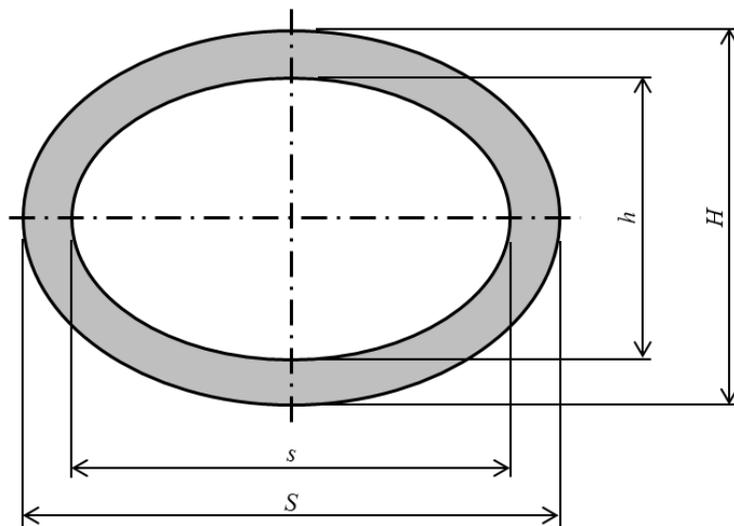
Na figura 4.3(a) está representada a secção transversal central real do fémur do modelo de elementos finitos apresentado na secção anterior (4.2.1). Essa secção transversal foi aproximada por um anel circular (figura 4.3(b)) e por um anel elítico (figura 4.3(c)). Os diâmetros  $D$  e  $d$  do anel circular são a média das distâncias entre os pontos do contorno exterior ( $D$ ) e entre os pontos do contorno interior ( $d$ ), indicados na figura 4.3(a). O eixo menor  $H$  e o eixo maior  $S$  foram medidos entre os pontos  $AA$  e  $BB$  (figura 4.3(a)), pertencentes à linha de ação da força  $P$  (aplicada pelo atuador) e reta perpendicular, respetivamente. Por sua vez, o eixo menor  $h$  e o eixo maior  $s$ , foram determinados subtraindo a  $H$  e a  $S$ , respetivamente, a média das espessuras do córtex entre os pontos assinalados na figura 4.3(a).



**Figura 4.3** – Modelos geométricos da secção transversal da diáfise: (a) modelo real; (b) modelo circular; (c) modelo elítico. (continua)



(b)



(c)

**Figura 4.3** – Modelos geométricos da secção transversal da diáfise: (a) modelo real; (b) modelo circular; (c) modelo elítico. (*continuação*)

Para aplicação da teoria de Bernoulli-Euler, quando se considera a secção real, é necessário determinar a posição do centroide  $C$  da secção (figura 4.4), bem como os momentos de segunda ordem ( $J_{xx}$  e  $J_{yy}$ ) e o produto de 2ª ordem ( $J_{xy}$ ), relativos ao referencial  $Cxy$  indicado na figura 4.4. A determinação destas características geométricas foi feita recorrendo ao *software* SolidWorks® e às fotografias da secção transversal. Na tabela 4.2 apresentamos os valores de  $J_{xx}$ ,  $J_{yy}$  e  $J_{xy}$  que obtivemos para todos os fémures do grupo SO (grupo de controlo do modelo animal RMR, tabela 3.1), enquanto na tabela

4.3 reunimos os valores que obtivemos para os fêmures do grupo “controlo sedentário” (grupo de controlo do modelo animal MNU, tabela 3.2). A partir destas propriedades geométricas, calculámos os momentos principais de 2ª ordem ( $J_1$  e  $J_2$ ) e as correspondentes direcções principais (1 e 2, na figura 4.4), usando as seguintes equações:

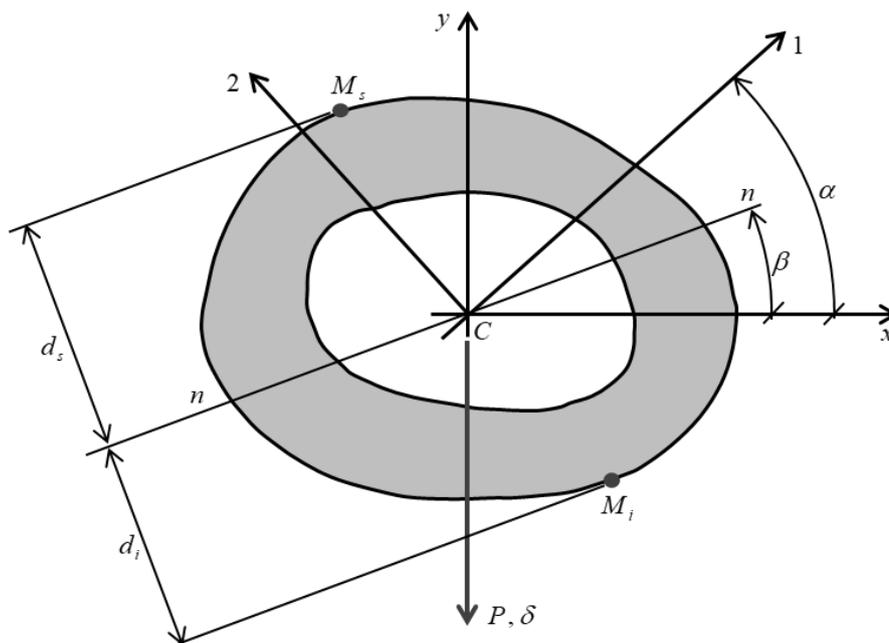
$$J_{1,2} = \frac{J_{xx} + J_{yy}}{2} \pm \sqrt{\left(\frac{J_{xx} - J_{yy}}{2}\right)^2 + J_{xy}^2} \quad (4.1)$$

e

$$\alpha_i = ATAN2\left(\frac{J_{xx} - J_i}{J_{xy}}\right), \text{ com } i = 1, 2 \quad (4.2)$$

Além disso, determinámos o eixo neutro de cada secção (eixo  $nn$ , na figura 4.4), através da seguinte equação:

$$\beta = ATAN2\left(\frac{J_{xy}}{J_{yy}}\right) \quad (4.3)$$



**Figura 4.4** – Esquema da secção transversal das diáfises: centroide ( $C$ ), referencial global ( $Cxy$ ), referencial principal ( $C12$ ) e eixo neutro ( $nn$ ).

Uma vez identificado o eixo neutro (4.3), obtivemos as coordenadas dos pontos mais afastados do eixo neutro ( $M_s$  e  $M_i$ , na figura 4.4), que usaremos mais adiante para a determinação da tensão de cedência do tecido ósseo cortical. Essas coordenadas,  $(x_s, y_s)$  e  $(x_i, y_i)$ , estão reunidas na tabela 4.2 (para o grupo SO) e na tabela 4.3 (para o grupo “controle sedentário”).

**Tabela 4.2** – Características geométricas da secção central dos fêmures dos modelos de elementos finitos: grupo SO (grupo de controlo do modelo RMR).

<i>Animal</i>	$J_{xx}$ (mm <sup>4</sup> )	$J_{xy}$ (mm <sup>4</sup> )	$J_{yy}$ (mm <sup>4</sup> )	$x_s$ (mm)	$y_s$ (mm)	$x_i$ (mm)	$y_i$ (mm)
Rato 10	11,16	0,13	19,07	0,20	1,82	0,62	-1,92
Rato 11	9,10	0,55	14,57	-0,44	1,74	0,00	-1,82
Rato 12	6,36	0,20	11,03	0,17	1,59	-0,30	-1,58
Rato 13	7,80	0,51	12,86	-0,36	1,75	-0,03	-1,63
Rato 14	9,01	0,89	10,38	-0,52	1,84	-0,08	-1,93
Rato 15	6,29	0,47	10,80	-0,12	1,61	0,44	-1,56

**Tabela 4.3** – Características geométricas da secção central dos fêmures dos modelos de elementos finitos: grupo “controle sedentário” (grupo de controlo do modelo MNU).

<i>Animal</i>	$J_{xx}$ (mm <sup>4</sup> )	$J_{xy}$ (mm <sup>4</sup> )	$J_{yy}$ (mm <sup>4</sup> )	$x_s$ (mm)	$y_s$ (mm)	$x_i$ (mm)	$y_i$ (mm)
Rato 45	4,90	0,14	7,32	-0,44	1,55	-0,2	-1,44
Rato 46	4,13	0,16	5,69	-0,42	1,53	0,51	-1,43
Rato 48	6,30	0,09	8,06	0,09	1,65	0,31	-1,68
Rato 49	4,40	0,12	6,42	0,33	1,49	0,35	-1,52
Rato 50	5,40	-0,07	7,47	-0,10	1,50	0,08	-1,67
Rato 51	4,70	-0,09	7,31	0,35	1,54	0,26	-1,49
Rato 52	4,57	0,07	6,41	-0,25	1,50	0,12	-1,60

Aproximando a secção transversal da diáfise por um anel circular, a tensão de cedência ( $Y^c$ ) do tecido ósseo cortical é, de acordo com a teoria de vigas de Bernoulli-Euler, dada pela seguinte equação (figura 3.6 e figura 4.3(b)):

$$Y^c = \frac{8LD}{\pi(D^4 - d^4)} P_Y \quad (4.4)$$

E se aproximarmos a secção transversal da diáfise por um anel elítico (figura 4.3(c)), a tensão de cedência ( $Y^e$ ) é dada pela seguinte expressão:

$$Y^e = \frac{8LH}{\pi(SH^3 - sh^3)} P_Y \quad (4.5)$$

Finalmente, considerando a secção transversal real da diáfise (figura 4.4), também de acordo com a teoria de vigas de Bernoulli-Euler, a tensão de cedência ( $Y^r$ ) pode ser assim determinada:

$$Y^r = \frac{L - J_{xy}x_\phi + J_{yy}y_\phi}{4 J_{xx}J_{yy} - J_{xy}^2} P_Y, \text{ com } \phi = i \quad \vee \quad \phi = s \quad (4.6)$$

Nas equações anteriores (4.4 a 4.6),  $P_Y$  representa a força correspondente ao fim do troço linear da curva força-deslocamento (figura 4.2).

Nas tabelas 4.4 e 4.5 encontram-se os valores de  $P_Y$ , bem como das tensões de cedência ( $Y^c$ ,  $Y^e$  e  $Y^r$ ), para os fémures do grupo de controlo do modelo RMR (grupo SO, tabela 4.4) e do grupo de controlo do modelo MNU (grupo “controlo sedentário”, tabela 4.5). Os mesmos resultados podem ser apreciados nos histogramas que constam na figura 4.5. Como termo de comparação citamos o trabalho de Ferreño et al (2017), que obtiveram para a tensão de cedência valores entre 84 MPa e 134 MPa, consoante o sentido da solicitação (anterior-posterior ou posterior-anterior) e o fémur (direito ou esquerdo), em ratos *Sprague-Dawley* com 30 semanas de idade ensaiados à flexão em três pontos. Citamos também o trabalho de Silva et al (2004), que obtiveram valores entre 70 MPa e 151 MPa, consoante a idade (4 ou 12 meses) e a linhagem (SAMP6 e SAMR1), através de ensaios de flexão em quatro pontos. Quanto aos resultados obtidos neste trabalho,

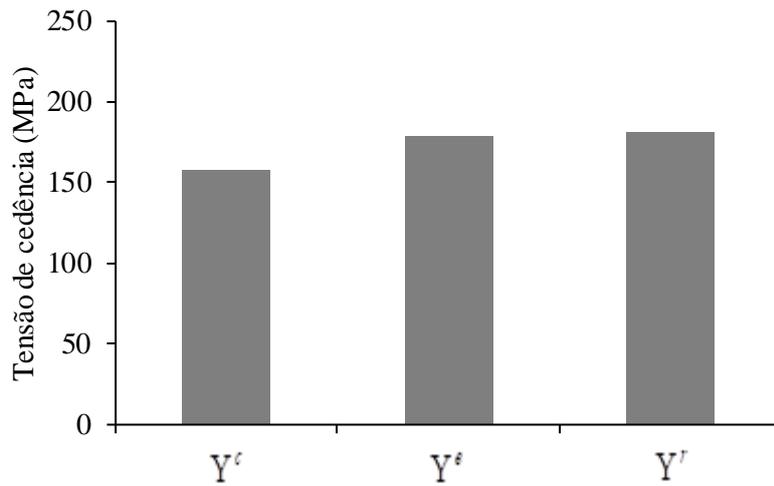
constata-se que não há diferenças significativas (teste  $t$ , para 95%) entre os valores médios das tensões de cedência  $Y^c$ ,  $Y^e$  e  $Y^r$  do grupo SO (tabela 4.4). Por outro lado, no grupo “controle sedentário” há uma diferença significativa entre os valores médios de  $Y^c$  e  $Y^e$ , enquanto os valores médios de  $Y^e$  e de  $Y^r$  são estatisticamente iguais (teste  $t$ , para 95%). Porém, nos dois grupos observa-se uma tendência consistente na ordem das tensões de cedência (tabelas 4.4 e 4.5):  $Y^c < Y^e, Y^r$ .

**Tabela 4.4** – Força e tensões de cedência: grupo SO (grupo de controle do modelo RMR).

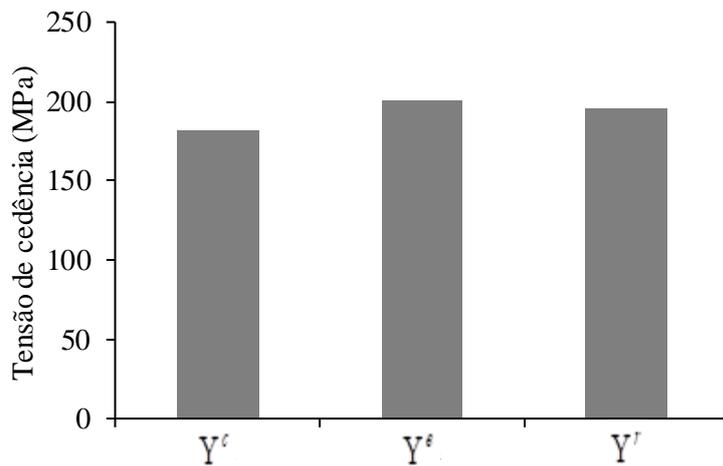
Animal	$P_Y$ (N)	$Y^c$ (MPa)	$Y^e$ (MPa)	$Y^r$ (MPa)
Rato 10	150,02	136,43	150,66	157,25
Rato 11	136,43	146,05	163,18	167,96
Rato 12	132,89	172,62	216,65	206,55
Rato 13	104,64	124,06	143,21	142,62
Rato 14	134,09	167,54	162,61	178,60
Rato 15	148,23	201,12	235,78	236,02
Média	134,39	157,97	178,68	181,50
CV (%)	12,1	17,7	21,3	18,9

**Tabela 4.5** – Força de cedência e tensões de cedência: grupo “controle sedentário” (grupo de controle do modelo MNU).

Animal	$P_Y$ (N)	$Y^c$ (MPa)	$Y^e$ (MPa)	$Y^r$ (MPa)
Rato45	91,42	163,49	195,02	174,69
Rato46	91,89	192,42	214,80	207,86
Rato48	105,56	166,65	181,77	174,52
Rato49	94,49	187,39	208,23	202,13
Rato50	96,64	166,64	182,54	177,21
Rato51	106,34	196,58	215,55	214,36
Rato52	104,11	202,82	209,90	221,02
Média	98,64	182,29	201,12	195,97
CV (%)	6,6	9,0	7,3	10,2



(a)



(b)

**Figura 4.5** – Comparação dos valores de  $Y$  obtidos pelos métodos diretos: (a) grupo SO (grupo de controlo do modelo RMR); (b) grupo “controlo sedentário” (grupo de controlo do modelo MNU).

Vamos agora comparar as previsões do método direto (baseado na curva  $P-\delta$  e na teoria de vigas de Bernoulli-Euler) para o módulo de elasticidade longitudinal. Para o caso da secção em anel circular,  $E_L$  é determinado pela seguinte equação (figura 3.6 e figura 4.3(b)):

$$E_L^c = \frac{4L^3}{3\pi(D^4 - d^4)} K \quad (4.7)$$

Para o caso da secção em anel elítico, temos (figura 3.6 e figura 4.3(c)):

$$E_L^e = \frac{4L^3}{3\pi(SH^3 - sh^3)} K \quad (4.8)$$

Nestas expressões,  $K$  é a rigidez elástica da diáfise, isto é, o declive do troço da curva  $P-\delta$  (figura 4.2) até à força de cedência ( $P_Y$ ):

$$K = \frac{P}{\delta}, \quad \text{com } P \leq P_Y \quad (4.9)$$

A partir desta rigidez podemos obter o módulo de elasticidade do tecido cortical, considerando a forma real da secção transversal da diáfise (figura 4.4), através da seguinte equação:

$$E_L^r = \frac{L^3}{48[J_1 \cos^2(\alpha - \beta) + J_2 \sin^2(\alpha - \beta)]} K \quad (4.10)$$

Os valores dos módulos de elasticidade  $E_L^c$ ,  $E_L^e$  e  $E_L^r$  obtidos para os fémures dos grupos de controlo do modelo RMR (grupo SO) e do modelo MNU (grupo “controlo sedentário”) encontram-se nas tabelas 4.6 e 4.7. Estes resultados podem ainda ser vistos nos histogramas da figura 4.6. Vem a propósito referir os resultados obtidos por Lenthe et al (2008) e Schriefér et al (2005) em murganhos, através de ensaios de flexão em três pontos: cerca de 6 GPa para a linhagem C57BL/6 e cerca de 10 GPa para a linhagem C3H/He. À semelhança do que vimos a propósito das tensões de cedência, não há diferenças significativas (teste  $t$ , 95%) entre os valores médios dos módulos de elasticidade ( $E_L^c$ ,  $E_L^e$  e  $E_L^r$ ) do grupo SO (tabela 4.6). Para o grupo “controlo sedentário” regista-se uma diferença significativa entre os valores médios de  $E_L^c$  e  $E_L^e$  mas os valores médios de  $E_L^c$  e  $E_L^r$ , por um lado, e os valores médios de  $E_L^e$  e  $E_L^r$ , por outro, são estatisticamente iguais (teste  $t$ , para 95%). Seja como for, e como já tinha sido observado

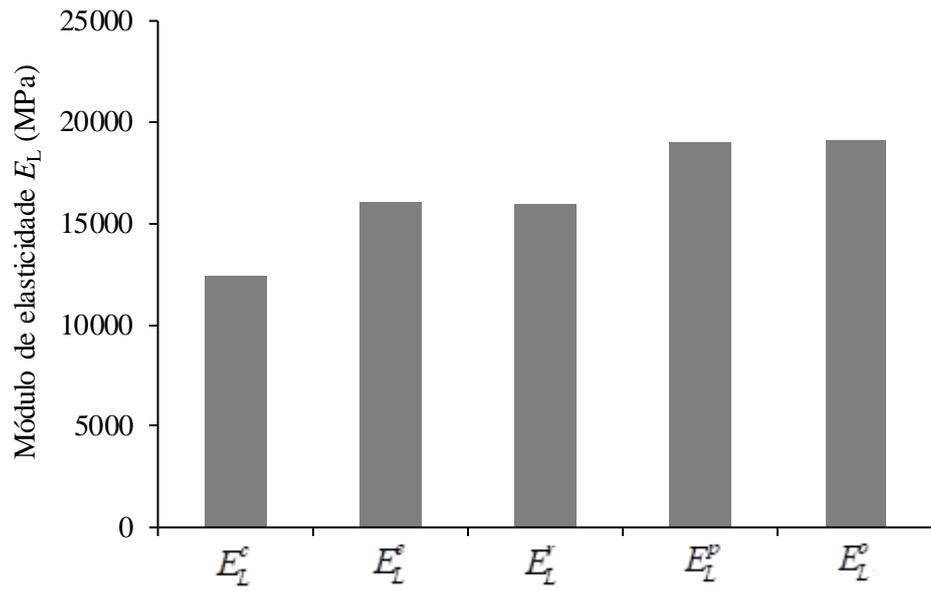
para as tensões de cedência, nos dois grupos observa-se uma tendência consistente na ordem dos módulos de elasticidade (tabelas 4.6 e 4.7):  $E_L^c < E_L^e, E_L^r$ . Quer a partir dos resultados referentes às tensões de cedência, quer a partir dos resultados referentes ao módulo de elasticidade longitudinal, podemos concluir que a aproximação da secção da diáfise por um anel elítico é o método direto mais apropriado, atendendo à sua maior facilidade de implementação.

**Tabela 4.6** – Módulos de elasticidade longitudinal identificados pelos métodos diretos e pelo método inverso: grupo SO (grupo de controlo do modelo RMR).

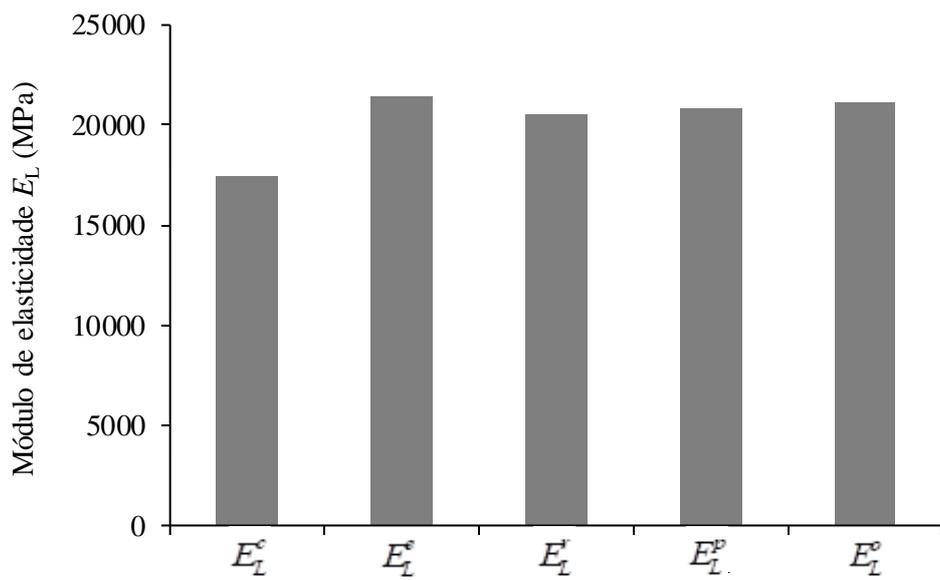
<i>Animal</i>	$E_L^c$ (MPa)	$E_L^e$ (MPa)	$E_L^r$ (MPa)	$E_L^p$ (MPa)	$E_L^o$ (MPa)
Rato 10	8677	11071	11428	---	---
Rato 11	10531	13517	13620	17277	16475
Rato 12	12807	19525	18338	18669	18180
Rato 13	10379	13948	13716	19899	20618
Rato 14	14744	14396	15209	16268	15384
Rato 15	17311	23839	23245	22893	25141
Média	12408	16049	15926	19001	19159
CV (%)	25,8	29,3	26,7	13,5	20,3

**Tabela 4.7** – Módulos de elasticidade longitudinal identificados pelos métodos diretos e pelo método inverso: grupo “controlo sedentário” (grupo de controlo do modelo MNU).

<i>Animal</i>	$E_L^c$ (MPa)	$E_L^e$ (MPa)	$E_L^r$ (MPa)	$E_L^p$ (MPa)	$E_L^o$ (MPa)
Rato 45	17427	24093	21117	22515	23000
Rato 46	18314	22831	21276	19908	20625
Rato 48	13459	15934	15061	---	---
Rato 49	18762	23254	22395	20739	21277
Rato 50	17437	20969	20389	18745	18000
Rato 51	14402	17824	17579	22644	23751
Rato 52	22462	24925	26011	20297	20195
Média	17466	21404	20547	20808	21141
CV (%)	17,0	15,7	17,0	7,3	9,8



(a)



(b)

**Figura 4.6** – Comparação dos valores de  $E_L$  obtidos pelos métodos diretos e pelo método inverso: (a) grupo SO (grupo de controlo do modelo RMR); (b) grupo “controlo sedentário” (grupo de controlo do modelo MNU).

### 4.2.3. Identificação inversa de $E_L$

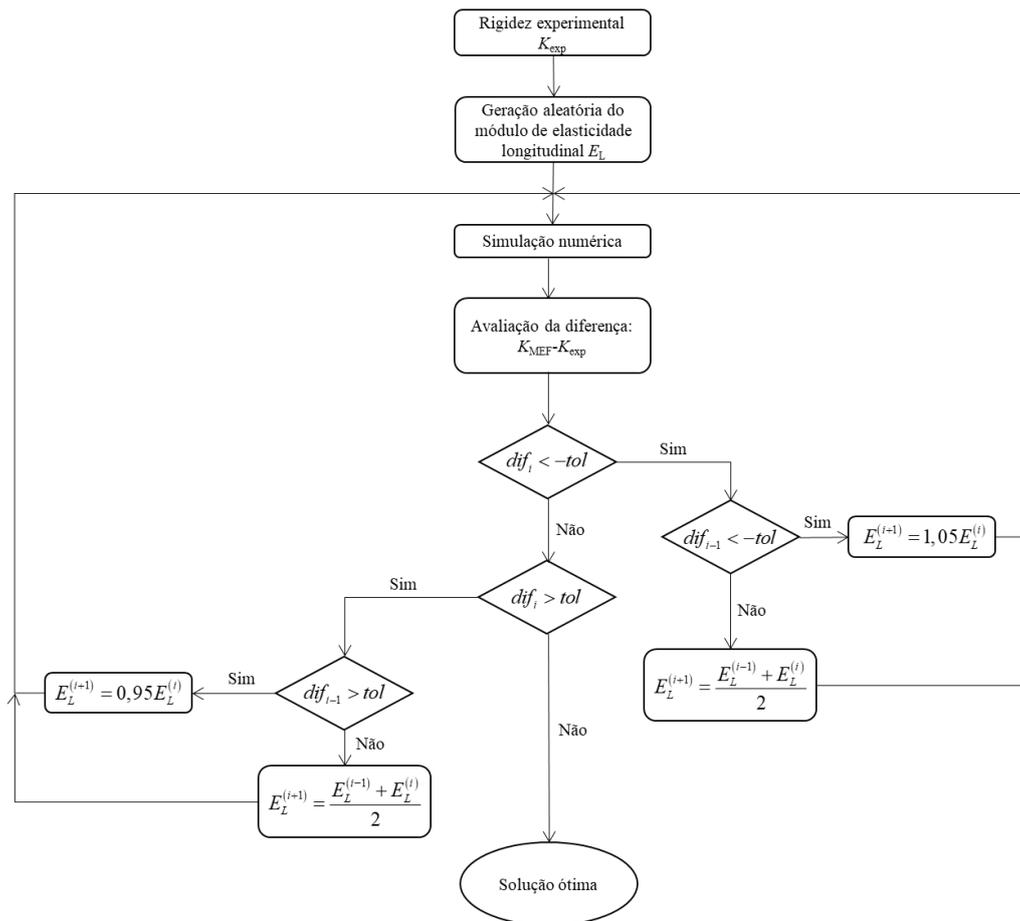
Recordemos que o método direto de identificação do módulo de elasticidade longitudinal ( $E_L$ ) baseia-se na hipótese da validade da teoria de vigas de Bernoulli-Euler e na hipótese da uniformidade da secção transversal ao longo da diáfise, entre os apoios. Vários autores (Silva et al, 2004; Schriefer et al, 2005; Lenthe et al, 2008; Fereño, 2017) colocaram em causa a exatidão dos valores de  $E_L$  que são obtidos com base nessas hipóteses. Por essa razão, Lenthe et al (2008) propuseram um método inverso, ao qual chamamos método proporcional, que se baseia na simulação por elementos finitos do ensaio de flexão (considerando a forma real da diáfise) e na seguinte relação linear entre a rigidez e o módulo de elasticidade:

$$E_L^p = \frac{K_{\text{exp}}}{K_{MEF}} E_L^{MEF} \quad (4.11)$$

Nesta equação  $E_L^p$  é o módulo de elasticidade associado à rigidez experimental  $K_{\text{exp}}$ , enquanto  $E_L^{MEF}$  é o módulo de elasticidade introduzido no modelo de elementos finitos, cuja rigidez é  $K_{MEF}$ . Além deste método, neste trabalho examinamos outro método inverso baseado num algoritmo de otimização, que combina a curva  $P-\delta$  experimental com a simulação por elementos finitos do ensaio de flexão (ver secção 4.2.1). O método de inverso implementado, cujo fluxograma se encontra na figura 4.7, minimiza a diferença entre a rigidez experimental ( $K_{\text{exp}}$ ) e a rigidez numérica ( $K_{MEF}$ ), usando  $E_L$  como variável de projeto. Partindo duma estimativa  $i$  do módulo de elasticidade ( $E_L^{MEF(i)}$ ), é determinada a rigidez numérica correspondente ( $K_{MEF}^{(i)}$ ). Esta rigidez numérica é comparada com a rigidez experimental,

$$dif_i = K_{MEF}^{(i)} - K_{\text{exp}} \quad (4.12)$$

e  $dif_i$  é comparado com a tolerância especificada,  $tol > 0$ . Neste trabalho impusemos  $tol = 0,4 \text{ N/mm}$ . O processo iterativo termina (critério de paragem) quando  $-tol < dif_i < tol$ , chegando-se assim à solução ótima do módulo de elasticidade,  $E_L^o$ .



**Figura 4.7** – Fluxograma do algoritmo de otimização para identificação do módulo de elasticidade longitudinal.

Aplicando este algoritmo de otimização ao modelo de elementos finitos apresentado na secção 4.2.1, partindo da estimativa inicial  $E_L^{(0)} = 18000MPa$ , a que corresponde a rigidez  $K_{FEM}^{(0)} = 229,14N/mm$  (figura 4.2), obtivemos o valor  $E_L^o = 20618MPa$  (tabela 4.1), que é coincidente com o valor introduzido no modelo de elementos finitos.

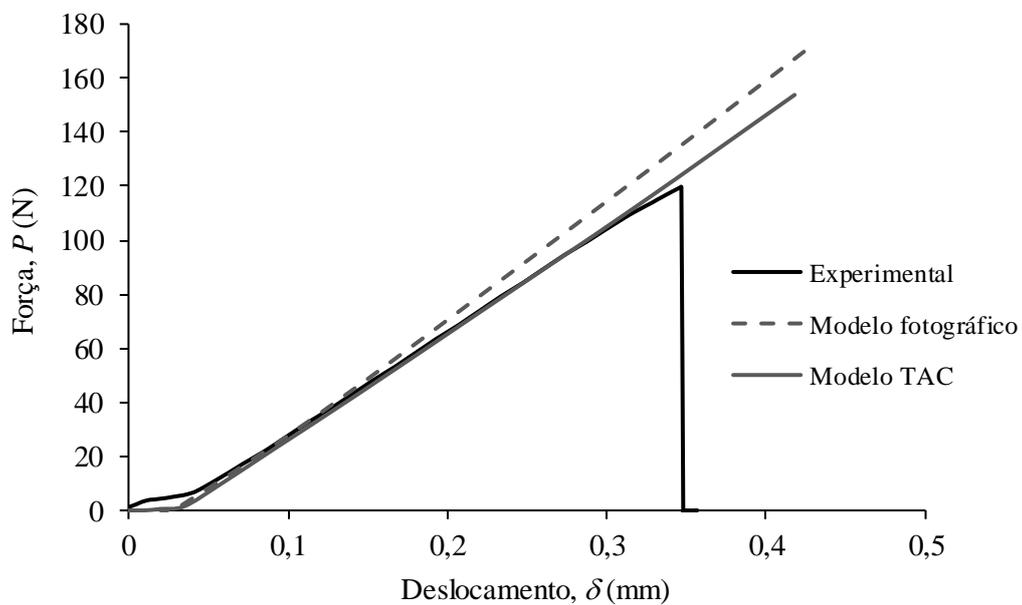
Na tabela 4.6 apresentamos os resultados do módulo de elasticidade longitudinal do grupo SO (grupo de controlo do modelo RMR) que foram obtidos pelos dois métodos inversos ( $E_L^p$  e  $E_L^o$ ), juntamente com os resultados obtidos pelo método direto. Por sua vez, os resultados referentes ao grupo “controlo sedentário” (do modelo animal MNU), estão reunidos na tabela 4.7. Todos estes resultados podem ser apreciados ainda nos histogramas da figura 4.6. Importa recordar que os valores de  $E_L^p$  e  $E_L^o$  foram

determinados recorrendo aos modelos de elementos finitos de cada diáfise, construídos a partir das respetivas imagens fotográficas, conforme foi descrito na secção 3.3.1, do capítulo 3. Quer no caso do grupo SO (tabela 4.6), quer no caso do grupo “controlo sedentário” (tabela 4.7), constata-se que os dois métodos inversos conduzem a valores médios do módulo de elasticidade longitudinal ( $E_L^p$  e  $E_L^o$ ) que diferem entre si menos de 2%. Aliás, recorrendo ao teste  $t$  (para um nível de significância de 95%), os valores médios de  $E_L^p$  e  $E_L^o$  são estatisticamente iguais. Assim sendo, podemos concluir que o método inverso proporcional é o mais adequado, uma vez que requer menos tempo computacional. Analisemos agora as diferenças entre os métodos inversos (proporcional ou ótimo) e os métodos diretos (secção elítica ou secção real). No grupo SO (tabela 4.6) observamos uma diferença da ordem dos 20% entre os valores médios do módulo de elasticidade obtidos pelos métodos inversos e pelos métodos diretos. Contudo, essa diferença não é estatisticamente significativa (teste  $t$ , para 95%). No grupo “controlo sedentário” as diferenças entre os valores médios do módulo elasticidade fornecidos pelos métodos inversos e pelos métodos diretos são inferiores a 3%, não sendo estatisticamente significativas (teste  $t$ , para 95%). Na sequência da análise que acabamos de apresentar, concluímos que o método inverso proporcional é o método mais apropriado para a identificação de  $E_L$ , embora o método direto com secção elítica seja uma alternativa viável e expedita.

#### **4.2.4. Validação do modelo geométrico baseado em fotografia**

Na secção 3.3.1 descrevemos o método empregue para a obtenção dos modelos geométricos digitais das diáfises femorais a partir de imagens fotográficas (figura 3.3(a)). Esses modelos geométricos serviram para a construção dos modelos de elementos finitos utilizados na identificação inversa do módulo de elasticidade (tabelas 4.6 e 4.7). Nesta secção vamos analisar em que medida esses modelos geométricos reproduzem fielmente a geometria das diáfises. Para o efeito, foram testados dois fêmures extra, isto é, dois fêmures que não estão incluídos nos grupos do modelo animal RMR (tabela 3.1) nem nos grupos do modelo MNU (tabela 3.2).

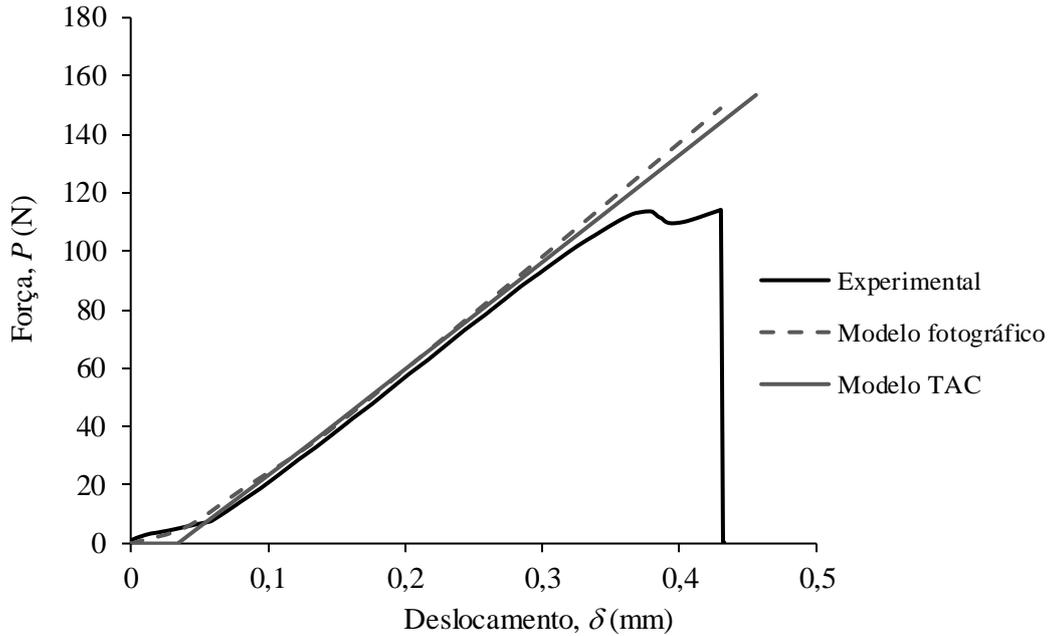
Para cada um dos fêmures mencionados no parágrafo anterior, construímos os modelos geométricos digitais a partir de imagens de TAC, conforme foi descrito na secção 3.3.1 (figura 3.3(b)), além dos modelos geométricos baseados em fotografia. Na figura 4.8 podem ser comparadas as curvas força-deslocamento fornecidas pela simulação numérica do ensaio de flexão, considerando o módulo de elasticidade longitudinal  $E_L=18\text{GPa}$ . A rigidez do modelo de elementos finitos baseado em fotografia é superior à rigidez do modelo baseado em TAC (tabela 4.8): 12% para o fémur 1 e 3% para o fémur 2. Os fêmures foram submetidos a um ensaio de flexão em três pontos, nas condições descritas na secção 3.3.2, encontrando-se as respectivas curvas  $P-\delta$  na figura 4.8, em conjunto com as curvas numéricas. Aplicando o método inverso proporcional (equação 4.11) obtivemos os módulos de elasticidade que constam na tabela 4.8. As diferenças registadas entre o modelo baseado em fotografia e o modelo baseado em TAC são da ordem de grandeza dos resultados experimentais (tabelas 4.6 e 4.7) e refletem as discrepâncias geométricas entre os dois tipos de modelos. Assim, pelo menos em primeira aproximação, podemos concluir que o modelo baseado em fotografia reproduz com uma fidelidade aceitável a forma real das diáfises. Porém, para uma conclusão estatisticamente mais robusta é necessário efetuar trabalho adicional.



(a)

**Figura 4.8** – Comparação entre as curvas  $P-\delta$  do modelo de elementos finitos baseado em imagem fotográfica e do modelo baseado em imagem de TAC: (a) fémur 1; (b) fémur 2.

(continua)



(b)

**Figura 4.8** – Comparação entre as curvas  $P$ - $\delta$  do modelo de elementos finitos baseado em imagem fotográfica e do modelo baseado em imagem de TAC: (a) fêmur 1; (b) fêmur 2. (continuação)

**Tabela 4.8** – Rigidez e módulo de elasticidade longitudinal dos modelos de elementos finitos: modelo baseado em imagem fotográfica e modelo baseado em TAC.

Fêmur	Rigidez, $K$ (N/mm)			$E_L^p$ (MPa)	
	Experimental	Fotografia*	TAC*	Fotografia	TAC
1	383,14	446,62	397,64	15442	17344
2	361,80	377,75	366,21	17240	17783

\* Para  $E_L=18\text{GPa}$

### 4.3 ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS EXPERIMENTAIS: MODELO ANIMAL RMR

Nesta secção vamos apresentar detalhadamente os resultados experimentais relativos aos ensaios de flexão do modelo animal RMR, com o objetivo de avaliar o efeito da redução da massa renal e do tratamento com CAA nos parâmetros geométricas e

estruturais das diáfises femorais, bem como nas propriedades mecânicas (tensão de cedência e módulo de elasticidade longitudinais) do tecido ósseo cortical.

### 4.3.1. Parâmetros geométricos dos fêmures

Na tabela 4.9 estão reunidos os valores médios das características geométricas da secção transversal das diáfises do modelo animal RMR, no plano de aplicação da força P (figuras 3.6 e 4.4): área ( $A$ ), momentos de 2ª ordem ( $J_{xx}$  e  $J_{yy}$ ) e produto de 2ª ordem ( $J_{xy}$ ). Na tabela 4.10 encontram-se os valores médios dos momentos principais de 2ª ordem (determinados através da equação 4.1), bem como o ângulo  $\alpha$  que define as direções principais (equação 4.2 e figura 4.4) e o ângulo  $\beta$  que define o eixo neutro da secção (equação 4.3 e figura 4.4). As distribuições das áreas, dos momentos principais de 2ª ordem e dos ângulos  $\alpha$  e  $\beta$ , pelos diferentes grupos do modelo RMR, podem ser apreciadas nos histogramas da figura 4.9.

De acordo com os resultados que constam na tabela 4.10, concluímos que para qualquer um dos grupos do modelo animal RMR o referencial principal  $C12$  da secção transversal pouco difere do referencial  $Cxy$  (figura 4.4): o ângulo  $\alpha$  está compreendido entre 1.8° (grupo RMR+CAA) e 7.8° (grupo SO). Além disso, o eixo neutro é praticamente coincidente com o eixo  $Cx$  (figura 4.4), pois o ângulo  $\beta$  varia entre 0.8° (grupo RMR+CAA) e 2.9° (grupo RMR).

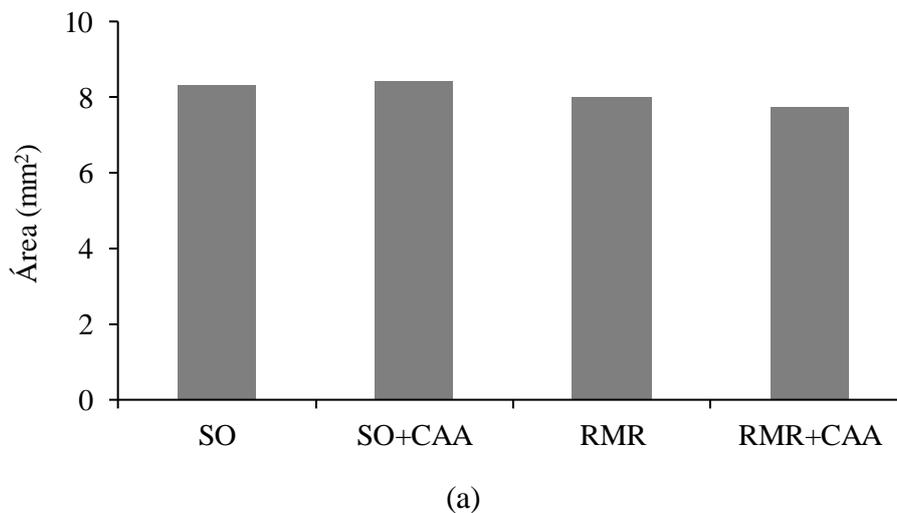
**Tabela 4.9** – Parâmetros geométricos dos fêmures do modelo animal RMR:  $A$ ,  $J_{xx}$ ,  $J_{xy}$  e  $J_{yy}$ .

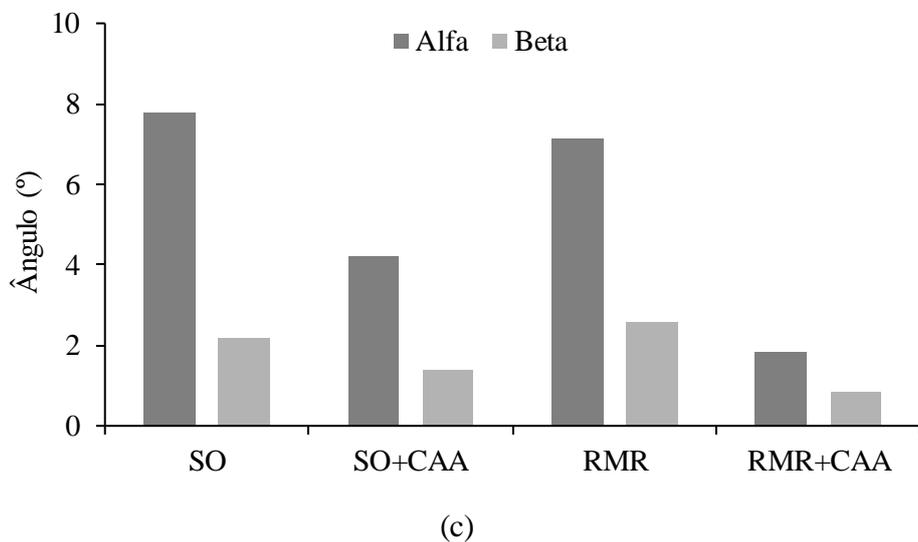
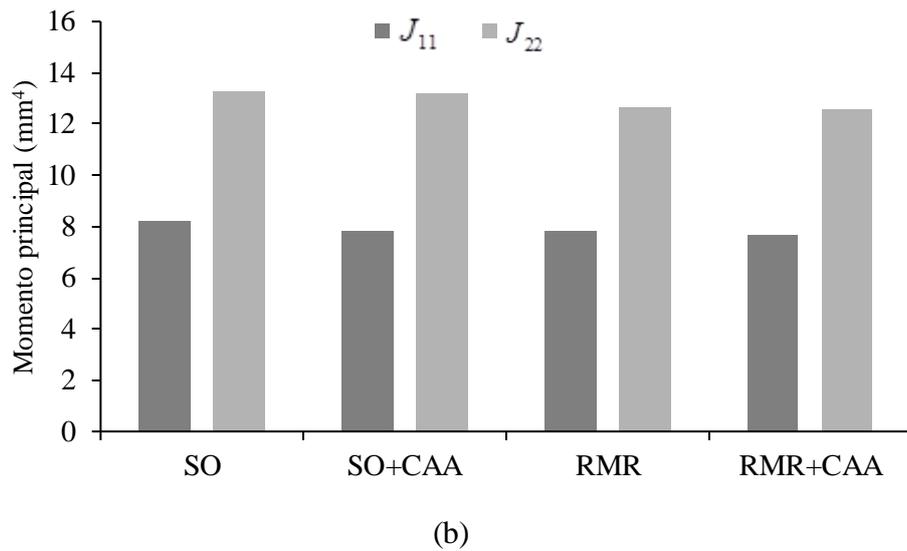
Modelo	$n$	$A$ (mm <sup>2</sup> )	$J_{xx}$ (mm <sup>4</sup> )	$J_{xy}$ (mm <sup>4</sup> )	$J_{yy}$ (mm <sup>4</sup> )
SO	6	8,33 (10,3%)	8,29 (22,5%)	0,50 (59,5%)	13,12 (25,2%)
SO+CAA	12	8,41 (10,6%)	7,98 (23,5%)	0,36 (205,2%)	13,08 (15,2%)
RMR	7	8,01 (11,8%)	7,98 (19,5%)	0,59 (100,7%)	12,50 (19,4%)
RMR+CAA	8	7,73 (16,9%)	7,74 (24,8%)	0,24 (147,3%)	12,55 (24,7%)

**Tabela 4.10** – Parâmetros geométricos dos fêmures do modelo animal RMR:  $J_{11}$ ,  $J_{22}$ ,  $\alpha$  e  $\beta$ .

Modelo	$n$	$J_{11}$ (mm <sup>4</sup> )	$J_{22}$ (mm <sup>4</sup> )	$\alpha$ (°)	$\beta$ (°)
SO	6	8,19 (22,5%)	13,27 (24,6%)	7,8 (119,2%)	2,2 (70,1%)
SO+CAA	12	7,84 (21,2%)	13,22 (16,0%)	5,4 (198,4%)	1,9 (204,4%)
RMR	7	7,85 (18,0%)	12,63 (20,0%)	7,8 (82,5%)	2,9 (82,0%)
RMR+CAA	8	7,70 (25,0%)	12,58 (24,7%)	1,8 (258,7%)	0,8 (211,5%)

É interessante observar que a razão  $J_{22}/J_{11}$  entre os momentos principais é praticamente a mesma para todos os grupos ( $J_{22}/J_{11} \approx 1,6$ ) e que essa razão é aproximadamente coincidente com razão  $J_{yy}/J_{xx}$  (tabela 4.9). Aliás, não há diferenças estatisticamente significativas (teste  $t$  para 95%) entre os valores médios dos momentos  $J_{xx}$  dos diversos grupos, bem como entre os valores médios dos momentos  $J_{yy}$ . Também não foram observadas diferenças significativas entre as áreas das secções transversais dos grupos do modelo animal RMR. Todavia, importa chamar a atenção que os grupos RMR e RMR+CAA, têm menor área que os grupos SO e SO+CAA (tabela 4.9).

**Figura 4.9** – Parâmetros geométricos da secção transversal dos fêmures do modelo animal RMR: (a) área; (b) momentos principais de 2<sup>a</sup> ordem, no centroide; (c) ângulos  $\alpha$  e  $\beta$ . (continua)



**Figura 4.9** – Parâmetros geométricos da secção transversal dos fêmures do modelo animal RMR: (a) área; (b) momentos principais de 2<sup>a</sup> ordem, no centroide; (c) ângulos  $\alpha$  e  $\beta$ . (continuação)

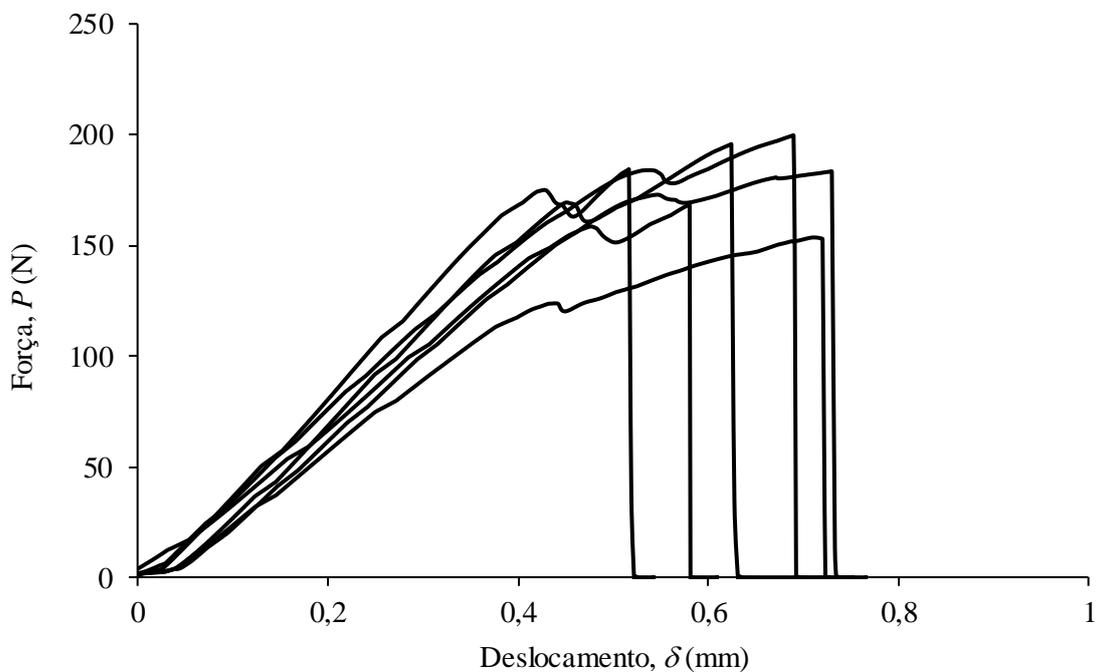
### 4.3.2. Parâmetros mecânicos estruturais dos fêmures

Cada fêmur foi ensaiado até à rotura, estando documentado na figura 4.10 o modo de rotura característico. A informação experimental registada diretamente nos ensaios de flexão são as curvas força-deslocamento do atuador (ou curvas  $P-\delta$ ). Depois da acomodação das diáfises, todas as curvas  $P-\delta$  exibem uma região linear, seguida de uma região não linear até à rotura final, conforme pode ser apreciado na figura 4.11 (para o

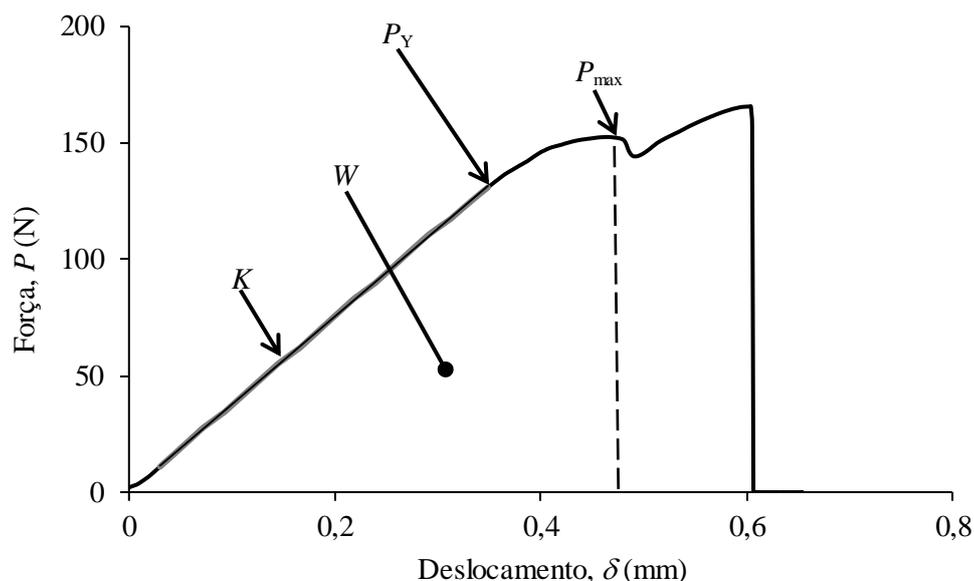
grupo SO). Um dos parâmetros mecânicos da diáfise é a rigidez ( $K$ ), isto é, o declive da região linear da curva  $P-\delta$  (figura 4.12). O fim dessa região linear é caracterizado por outro parâmetro: a força de cedência,  $P_Y$  (figura 4.12). A maioria das curvas  $P-\delta$  tem um máximo relativo bem antes da ocorrência da rotura final, caracterizado pela força máxima  $P_{max}$  (figura 4.12), que é um indicador do primeiro evento de rotura ( $W$ ). A este evento de rotura localizada podemos associar a energia de rotura da diáfise, que é numericamente igual à área sob a curva  $P-\delta$  até à força máxima (figura 4.12). Importa referir que os parâmetros mecânicos que acabamos de mencionar são características estruturais do fémur e não do material (isto é, do tecido ósseo compacto).



**Figura 4.10** – Modo de rotura dos provetes.



**Figura 4.11** – Curvas *força-deslocamento* do grupo SO (grupo de controlo do modelo animal RMR).

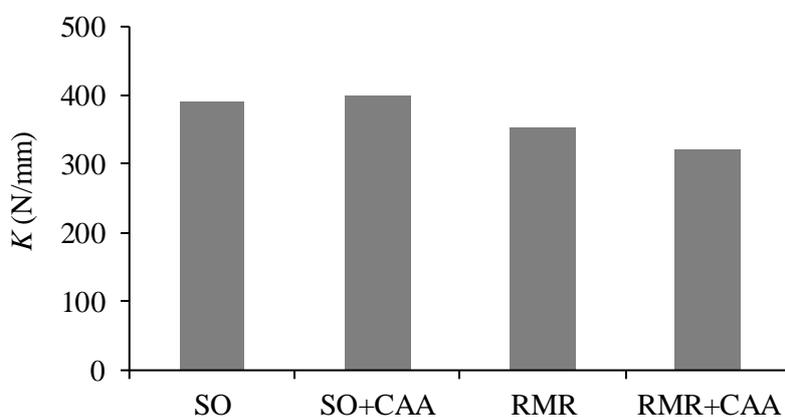


**Figura 4.12** – Identificação dos parâmetros característicos das curvas *força-deslocamento*.

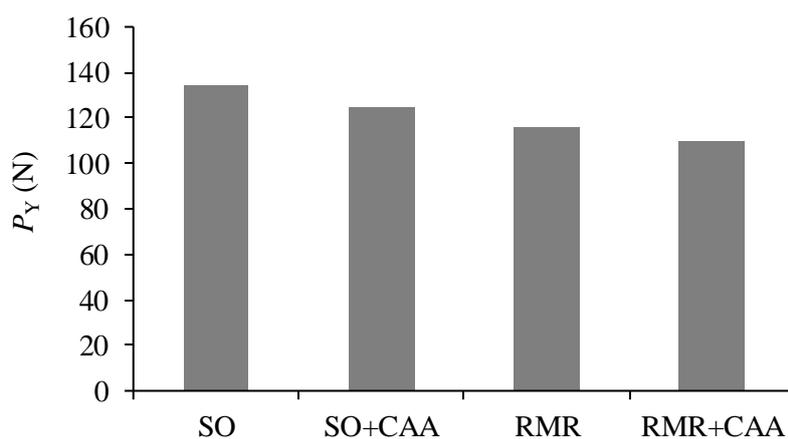
Na tabela 4.11 está resumida a estatística dos parâmetros mecânicos estruturais dos vários grupos do modelo animal RMR. Os mesmos resultados encontram-se na figura 4.13, sob a forma de histograma. Em primeiro lugar destacamos a elevada dispersão dos resultados experimentais, sobretudo nos modelos RMR e RMR+CAA, mas que é própria das estruturas biológicas. Em segundo lugar, aplicando o teste  $t$  (para 95%), detetamos uma diferença significativa entre os valores médios de  $K$  dos grupos SO+CAA e RMR+CAA. Mas não registamos diferenças estatisticamente significativas entre os valores médios de  $K$  dos grupos SO e SO+CAA, dos grupos SO e RMR, e dos grupos RMR e RMR+CAA. Seja como for, podemos concluir que os grupos com redução de massa renal (RMR e RMR+CAA) têm uma rigidez inferior à dos respetivos grupos de controlo, com cirurgia simulada (SO e SO+CAA). Além disso, a administração de CAA não parece afetar a rigidez dos fêmures. No que respeita aos restantes parâmetros mecânicos podemos extrair as mesmas conclusões, pese embora só se ter encontrado uma diferença estatisticamente significativa (teste  $t$ , para 95%) entre os valores médios de  $P_{\max}$  dos grupos SO+CAA e RMR+CAA.

**Tabela 4.11**– Parâmetros estruturais dos fêmures do modelo animal RMR.

<i>Modelo</i>	<i>n</i>	<i>K</i> (N/mm)	<i>P<sub>Y</sub></i> (N)	<i>P<sub>max</sub></i> (N)	<i>W</i> (Nmm)
SO	6	390,95 (11,5%)	134,39 (12,1%)	163,87 (13,0%)	40,44 (22,8%)
SO+CAA	11	401,10 (6,8%)	125,07 (9,5%)	159,58 (12,1%)	37,93 (25,0%)
RMR	7	354,55 (20,5%)	115,87 (25,1%)	136,89 (27,9%)	32,97 (48,0%)
RMR+CAA	7	320,27 (18,7%)	109,66 (17,9%)	136,35 (16,8%)	36,60 (24,6%)

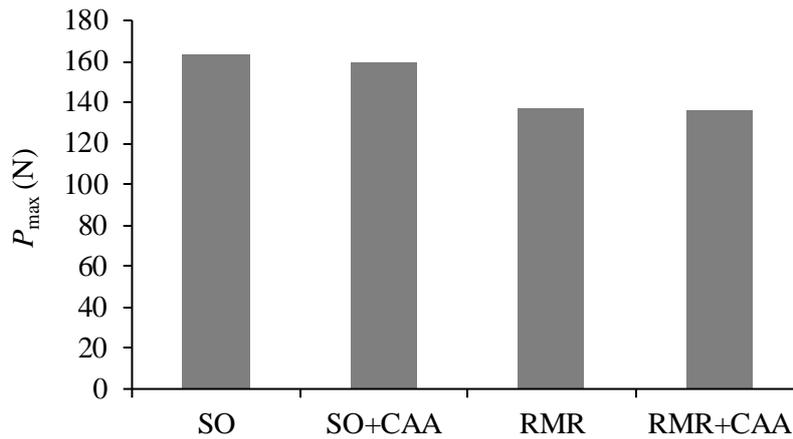


(a)

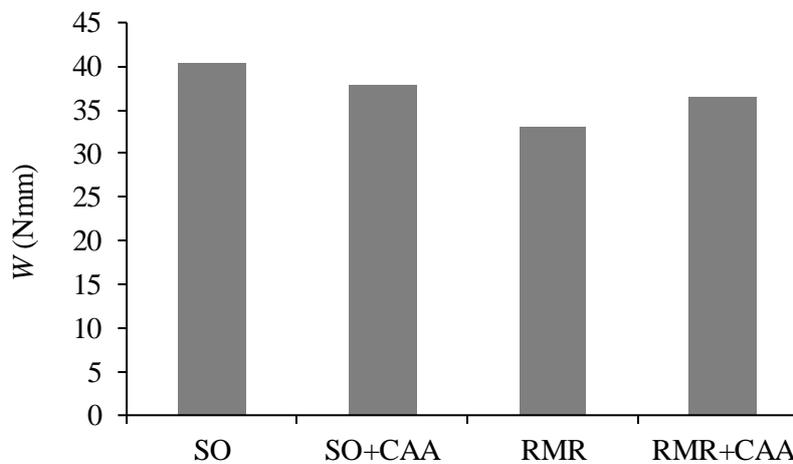


(b)

**Figura 4.13** – Parâmetros estruturais dos fêmures do modelo animal RMR: (a) rigidez elástica; (b) força de cedência; (c) força máxima; (d) energia de rotura. (*continua*)



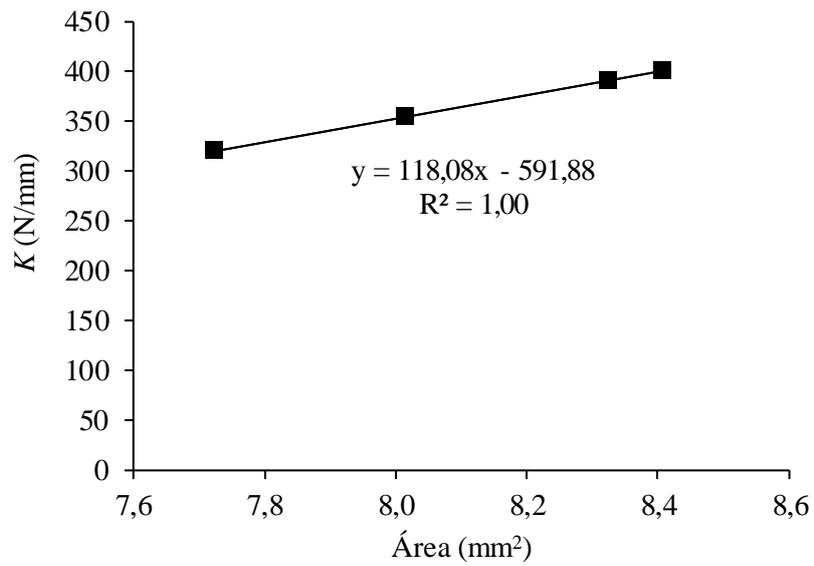
(c)



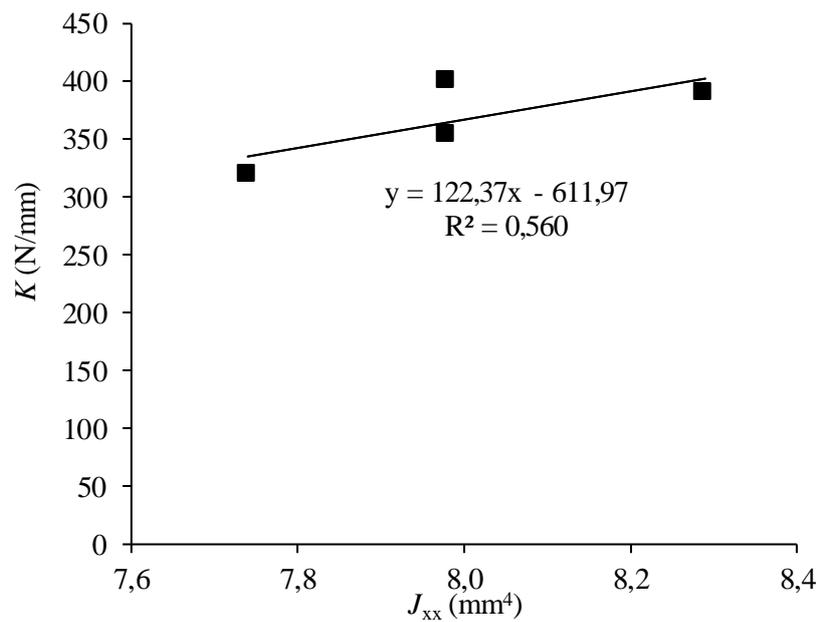
(d)

**Figura 4.13** – Parâmetros estruturais dos fêmures do modelo animal RMR: (a) rigidez elástica; (b) força de cedência; (c) força máxima; (d) energia de rotura. (*continuação*)

Os parâmetros estruturais que caracterizam a região linear das curvas  $P-\delta$  (a rigidez  $K$  e a força de cedência  $P_Y$ ) dependem da geometria das diáfises e das propriedades mecânicas do tecido ósseo cortical. No sentido de discriminar o contributo dessas duas fontes para a variação de  $K$  e  $P_Y$  entre os grupos do modelo animal (tabela 4.11), representamos nas figuras 4.14 e 4.15 a relação entre esses parâmetros e as características geométricas da secção transversal (a área e o momento de segunda ordem  $J_{xx}$ ). É evidente que existe uma significativa correlação linear positiva entre  $K$  e as características geométricas da secção transversal (figura 4.14), particularmente a área, acontecendo o mesmo para  $P_Y$  (figura 4.15).

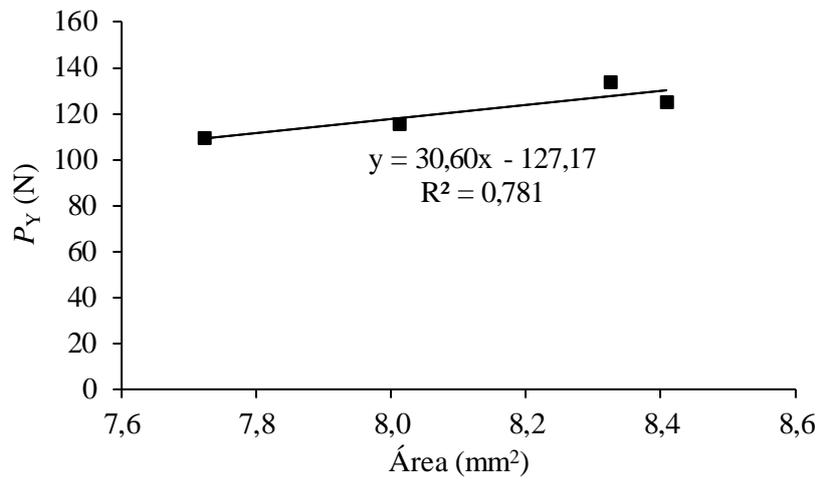


(a)

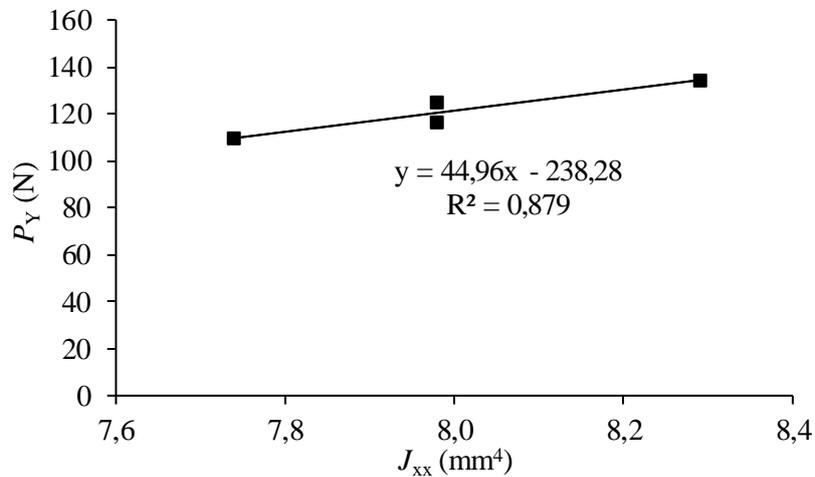


(b)

**Figura 4.14** – Rigidez do modelo animal RMR: (a) variação com a área  $A$  da secção transversal; (b) variação com o momento de 2ª ordem  $J_{xx}$ .



(a)



(b)

**Figura 4.15** – Força de cedência do modelo animal RMR: (a) variação com a área  $A$  da secção transversal; (b) variação com o momento de 2ª ordem  $J_{xx}$ .

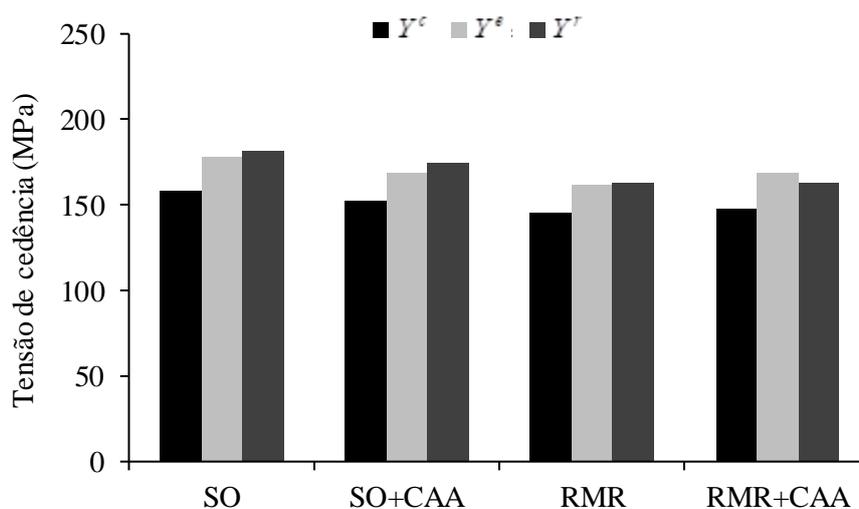
### 4.3.3. Tensão de cedência do tecido ósseo cortical

Na tabela 4.12 resumimos os resultados referentes às tensões de cedência do tecido ósseo cortical do modelo RMR, calculadas através da teoria de vigas de Bernoulli-Euler (equações 4.4 a 4.6). Os mesmos resultados estão representados nos histogramas da figura 4.16. Notemos antes de mais que, à semelhança do que acontece com os parâmetros estruturais (tabela 4.11), os grupos com redução de massa renal (grupos RMR e RMR+CAA) exibem uma maior dispersão (coeficientes de variação mais elevados) que os restantes grupos (grupos SO e SO+CAA). As diferenças observadas entre  $Y^c$ ,  $Y^e$  e  $Y^r$

(dentro de cada grupo) seguem a tendência que foi observada e comentada na secção 4.2.2. As diferenças registadas entre os vários grupos (concretamente, entre SO e SO+CAA, entre SO e RMR, entre RMR e RMR+CAA e entre SO+CAA e RMR+CAA) não são estatisticamente significativas (teste *t*, para 95%). Mas, no entanto, constata-se uma tendência consistente de diminuição das tensões de cedência com a redução da massa renal.

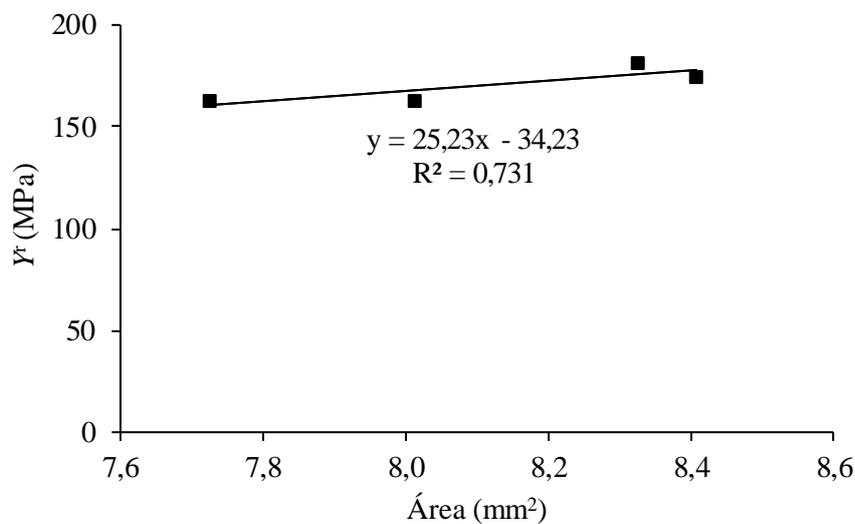
**Tabela 4.12** – Tensões de cedência do tecido ósseo cortical do modelo animal RMR.

<i>Modelo</i>	$Y^c$ (MPa)	$Y^e$ (MPa)	$Y^r$ (MPa)
SO	157,97 (17,1%)	178,68 (21,3%)	181,50 (18,9%)
SO+CAA	152,28 (12,6%)	168,58 (16,7%)	174,95 (13,8%)
RMR	145,95 (29,6%)	162,25 (31,7%)	163,16 (28,1%)
RMR+CAA	147,68 (24,0%)	168,36 (23,8%)	162,76 (22,8%)

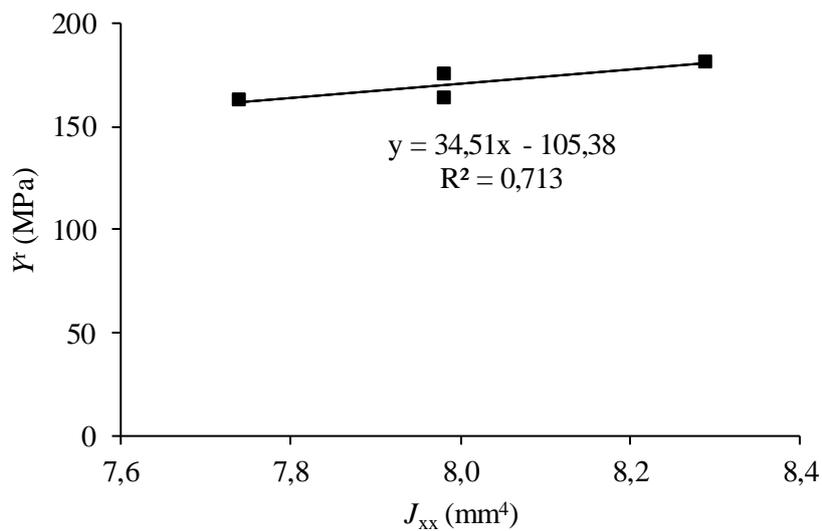


**Figura 4.16** – Tensões de cedência do tecido ósseo cortical do modelo animal RMR.

Na figura 4.17 representamos a dependência entre o valor médio da tensão de cedência  $Y^r$  (equação 4.6) e da média das áreas da secção transversal (figura 4.17(a)), assim como o valor médio de  $Y^r$  com o momento de segunda ordem  $J_{xx}$  (figura 4.17(b)). Assumindo que a tensão de cedência  $Y^r$  é uma propriedade intrínseca do tecido ósseo, as correlações lineares positivas patentes nos gráficos da figura 4.17 sugerem que a redução da massa renal não só acarreta a redução das propriedades geométricas da secção transversal (tabela 4.9), como a redução simultânea da tensão de cedência (tabela 4.12).



(a)



(b)

**Figura 4.17** – Tensão de cedência ( $Y^r$ ) do modelo animal RMR: (a) variação com a área  $A$  da secção transversal; (b) variação com o momento de 2ª ordem  $J_{xx}$ . (continua)

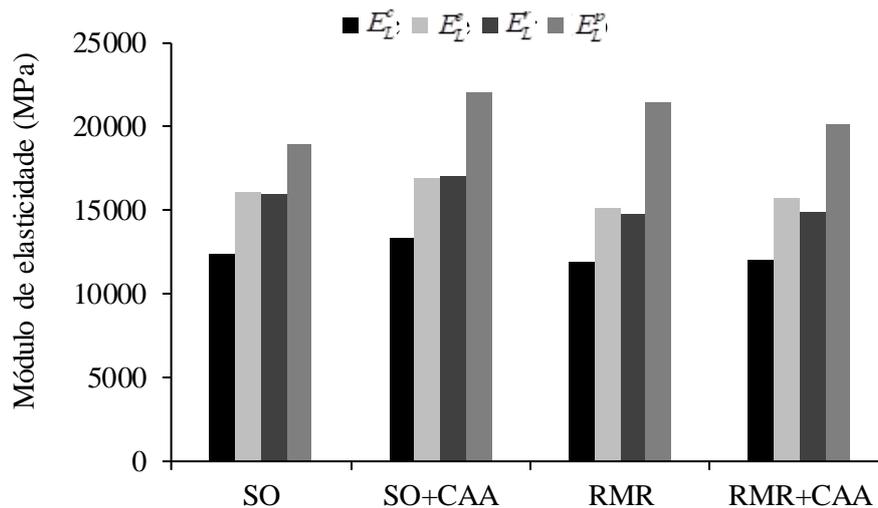
### 4.3.4. Módulo de elasticidade longitudinal do tecido ósseo cortical

Para todos os fêmures do modelo animal RMR determinámos o módulo de elasticidade longitudinal do tecido ósseo cortical pelo método direto (equações 4.7, 4.8 e 4.10) e pelo método inverso proporcional (equação 4.11). Os resultados obtidos estão resumidos na tabela 4.13, onde incluímos os valores médios e os coeficientes de variação. Na figura 4.18 apresentamos os histogramas dos valores médios. Mais uma vez notamos que a dispersão dos resultados é superior nos grupos com redução de massa renal (grupos RMR e RMR+CAA).

De acordo com o teste *t*, para um nível de significância de 95%, não existem diferenças significativas entre os vários grupos do modelo RMR, seja qual for a medida do módulo de elasticidade que considerarmos ( $E_L^c$ ,  $E_L^e$ ,  $E_L^r$  e  $E_L^p$ ). Apesar disso, e em concordância com os resultados das secções anteriores (4.3.2 e 4.3.3), notamos que a redução da massa renal acarreta uma diminuição dos módulos de elasticidade longitudinal, com exceção do módulo  $E_L^p$ , que não parece ser afetado pela redução da massa renal.

**Tabela 4.13** – Módulos de elasticidade longitudinal do modelo animal RMR.

<i>Modelo</i>	$E_L^c$ (MPa)	$E_L^e$ (MPa)	$E_L^r$ (MPa)	$E_L^p$ (MPa)
SO	12408 (25,8%)	16049 (29,4%)	15926 (26,7%)	19001 (13,5%)
SO+CAA	13339 (18,4%)	16931 (25,4%)	17030 (23,9%)	22010 (16,0%)
RMR	11987 (24,1%)	15100 (27,7%)	14777 (26,0%)	21411 (13,5%)
RMR+CAA	11993 (29,0%)	15777 (28,3%)	14870 (26,1%)	20118 (14,1%)



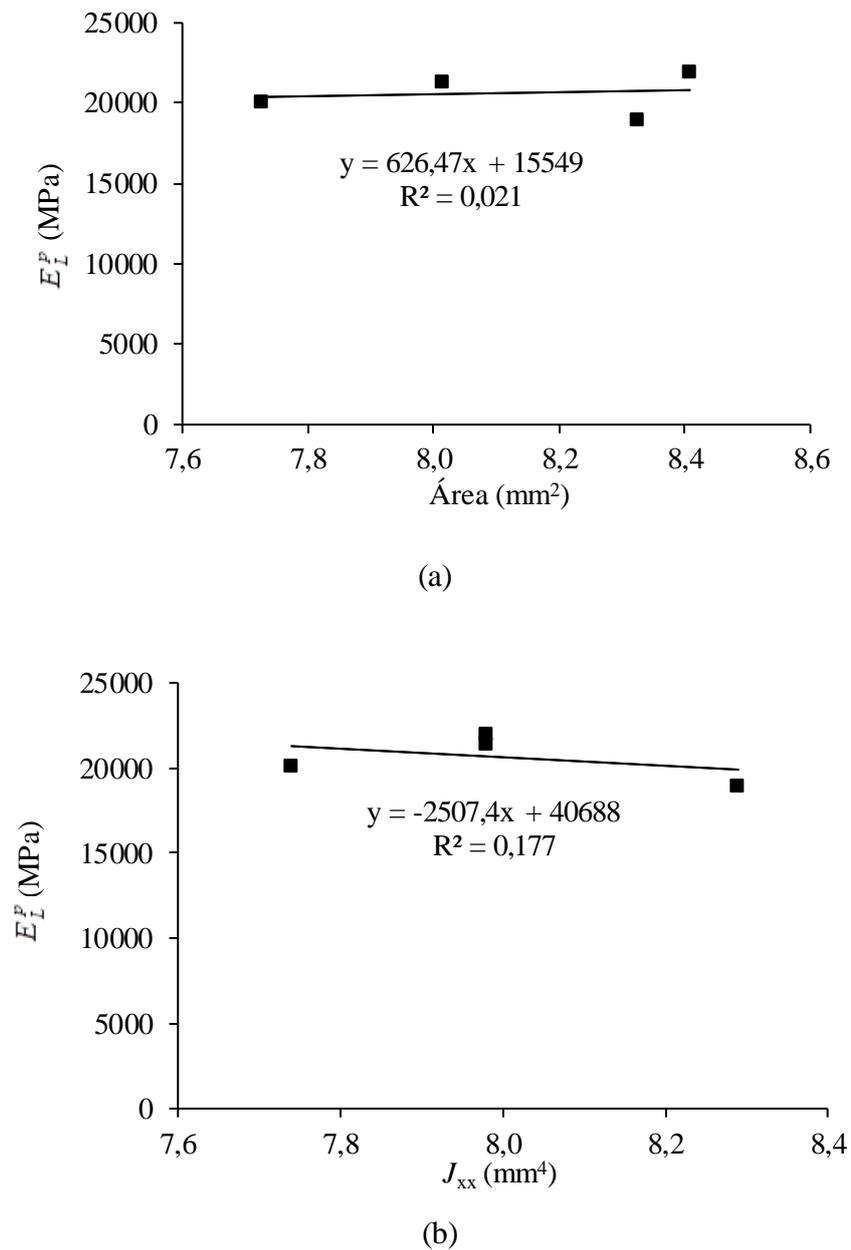
**Figura 4.18** – Módulo de elasticidade longitudinal do tecido ósseo cortical do modelo animal RMR.

Como já tínhamos concluído na secção 4.2.3, o método inverso proporcional é o método mais apropriado para a identificação do módulo de elasticidade longitudinal ( $E_L$ ) do tecido ósseo cortical, a partir de ensaios de flexão em três pontos à escala do fémur. Assumindo então que  $E_L^p$  é o valor representativo do módulo de elasticidade longitudinal, e tendo em atenção a última observação feita no parágrafo anterior, podemos concluir que a redução da massa renal, assim como a administração de CAA, não influenciam o módulo de elasticidade longitudinal do tecido ósseo. Esta conclusão é reforçada pelo facto de não haver uma correlação significativa entre  $E_L^p$  e as características geométricas da secção transversal dos fémures (área  $A$  e momento  $J_{xx}$ ), como se pode constatar nos gráficos da figura 4.19.

## 4.4 ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS EXPERIMENTAIS: MODELO ANIMAL MNU

Nesta secção vamos apresentar e discutir os resultados experimentais obtidos nos ensaios de flexão do modelo animal MNU, seguindo de perto o que foi feito na secção 4.4 para o modelo animal RMR. Pretendemos com isso examinar em que medida o cancro

da mama induzido pela administração de MNU e o exercício físico afetam as características geométricas e mecânicas das diáfises femorais, bem como as propriedades intrínsecas do tecido ósseo cortical (tensão de cedência e módulo de elasticidade longitudinais).



**Figura 4.19** – Módulo de elasticidade longitudinal (método inverso proporcional) do modelo animal RMR: (a) variação com a área  $A$  da secção transversal; (b) variação com o momento de 2<sup>a</sup> ordem  $J_{xx}$ .

#### 4.4.1. Parâmetros geométricos dos fêmures

Na tabela 4.14 são apresentados os valores médios dos parâmetros geométricos da secção transversal das diáfises do modelo animal MNU, nomeadamente, a área ( $A$ ), momentos de 2ª ordem ( $J_{xx}$  e  $J_{yy}$ ) e produto de 2ª ordem ( $J_{xy}$ ). Do ponto de vista estatístico (teste  $t$  para 95%) não existem diferenças entre os valores médios das áreas das secções transversais das diáfises dos grupos do modelo animal MNU. O mesmo acontece para os valores médios dos momentos  $J_{xx}$  e  $J_{yy}$ .

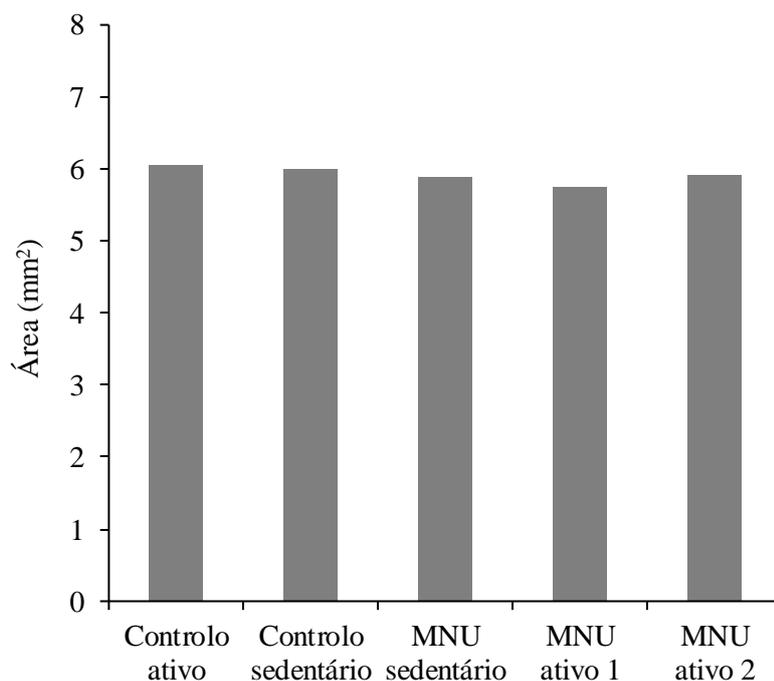
Na tabela 4.15 estão reunidos os valores médios dos momentos principais de 2ª ordem (determinados através da equação 4.1), bem como o ângulo  $\alpha$  que define as direcções principais (equação 4.2 e figura 4.4) e o ângulo  $\beta$  que define o eixo neutro da secção (equação 4.3 e figura 4.4). Nos histogramas apresentados na figura 4.20 podem ser observadas as distribuições das áreas, dos momentos principais de 2ª ordem e dos ângulos  $\alpha$  e  $\beta$ , dos diferentes grupos do modelo animal MNU. Tal como no grupo do modelo animal RMR, analisado anteriormente, podemos concluir que o referencial principal  $C12$  da secção transversal pouco difere do referencial  $Cxy$  (figura 4.4), estando o ângulo  $\alpha$  compreendido entre 1,1° (grupo “MNU ativo 1”) e 2,5° (grupo “MNU sedentário”). O ângulo  $\beta$  varia entre 0,5° (grupos “MNU ativo 1”, “controlo ativo”, “controlo sedentário”) e 0,9° (grupo “MNU sedentário”), o que significa que o eixo neutro é praticamente coincidente com o eixo  $Cx$  (figura 4.4).

**Tabela 4.14** – Parâmetros geométricos da secção transversal dos fêmures do modelo animal MNU:  $A$ ,

Modelo	$n$	$J_{xx}, J_{xy}$ e $J_{yy}$ .			
		$A$ (mm <sup>2</sup> )	$J_{xx}$ (mm <sup>4</sup> )	$J_{xy}$ (mm <sup>4</sup> )	$J_{yy}$ (mm <sup>4</sup> )
Controlo ativo	6	6,05	4,99	0,06	6,86
		(5,0%)	(11,6%)	(181,6%)	(7,8%)
Controlo sedentário	7	6,01	4,91	0,06	6,95
		(6,7%)	(14,9%)	(167,2%)	(11,6%)
MNU sedentário	7	5,90	4,88	0,11	7,17
		(8,6%)	(19,8%)	(162,2%)	(21,1%)
MNU ativo 1	7	5,75	4,81	0,07	7,55
		(7,0%)	(7,8%)	(139,0%)	(13,7%)
MNU ativo 2	8	5,92	4,94	0,09	7,01
		(10,3%)	(21,6%)	(156,2%)	(24,5%)

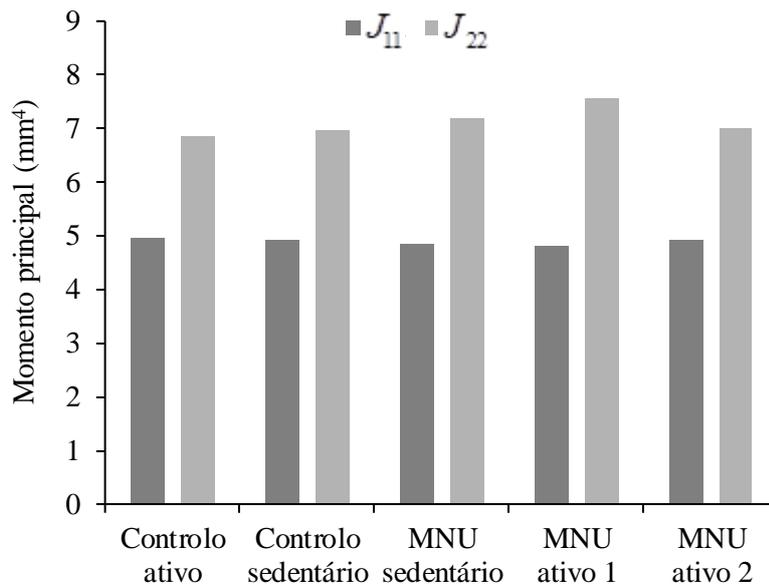
**Tabela 4.15** – Parâmetros geométricos da secção transversal dos fêmures do modelo animal MNU:  $J_{11}$ ,  $J_{22}$ ,  $\alpha$  e  $\beta$ .

Modelo	$n$	$J_{11}$ (mm <sup>4</sup> )	$J_{22}$ (mm <sup>4</sup> )	$\alpha$ (°)	$\beta$ (°)
Controlo ativo	6	4,98 (11,6%)	6,86 (7,8%)	2,1 (156,2%)	0,5 (178,1%)
Controlo sedentário	7	4,91 (14,9%)	6,96 (11,6%)	2,0 (142,6%)	0,5 (158,9%)
MNU sedentário	7	4,86 (19,8%)	7,19 (21,1%)	2,5 (130,1%)	0,9 (137,8%)
MNU ativo 1	7	4,80 (7,8%)	7,55 (13,7%)	1,1 (178,2%)	0,5 (148,3%)
MNU ativo 2	8	4,93 (21,5%)	7,02 (24,6%)	2,2 (159,0%)	0,7 (147,5%)

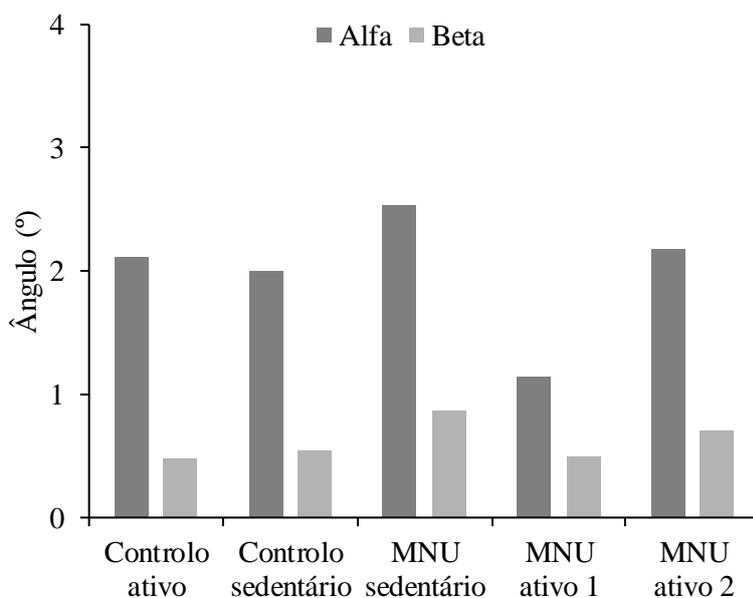


(a)

**Figura 4.20** – Parâmetros geométricos da secção transversal dos fêmures do modelo animal MNU: (a) área; (b) momentos principais 2<sup>a</sup> ordem, no centroide; (c) ângulos  $\alpha$  e  $\beta$ . (continua)



(b)



(c)

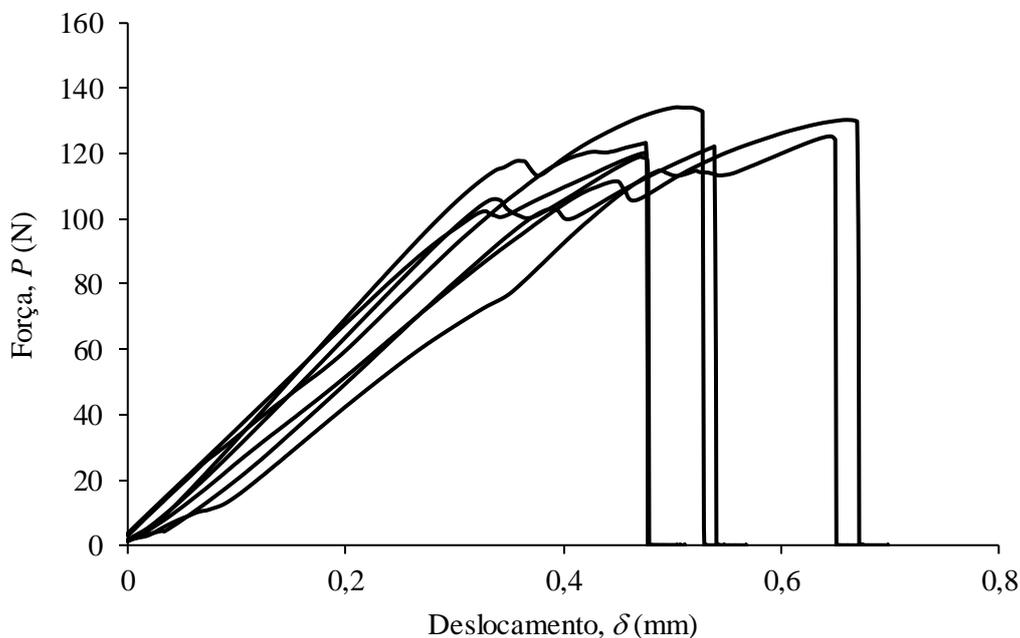
**Figura 4.20** – Parâmetros geométricos da secção transversal dos fémures do modelo animal MNU: (a) área; (b) momentos principais de 2ª ordem, no centroide; (c) ângulos  $\alpha$  e  $\beta$ . (continuação)

É importante salientar que, apesar de estatisticamente não existirem diferenças significativas entre as características geométricas dos diferentes grupos, verificamos que os grupos de controlo apresentam uma área da secção transversal ligeiramente maior que a área dos restantes grupos.

#### 4.4.2. Parâmetros estruturais dos fêmures

Tal como no modelo animal RMR, analisado na secção 4.3, os fêmures do modelo MNU também foram ensaiados até à rotura, apresentando, de maneira geral, o modo de rotura característico presente na figura 4.10. Na figura 4.21 são apresentadas, a título de exemplo, as curvas  $P-\delta$  para o grupo “controlo sedentário” do modelo animal MNU. Como foi explicado na secção 4.3, através da curva  $P-\delta$  é possível obter os parâmetros mecânicos da diáfise: rigidez ( $K$ ), força de cedência ( $P_Y$ ), força máxima ( $P_{\max}$ ) e energia de rotura ( $W$ ). Importa salientar novamente que os parâmetros mecânicos que acabamos de mencionar são características estruturais do fémur e não do material (isto é, do tecido ósseo compacto).

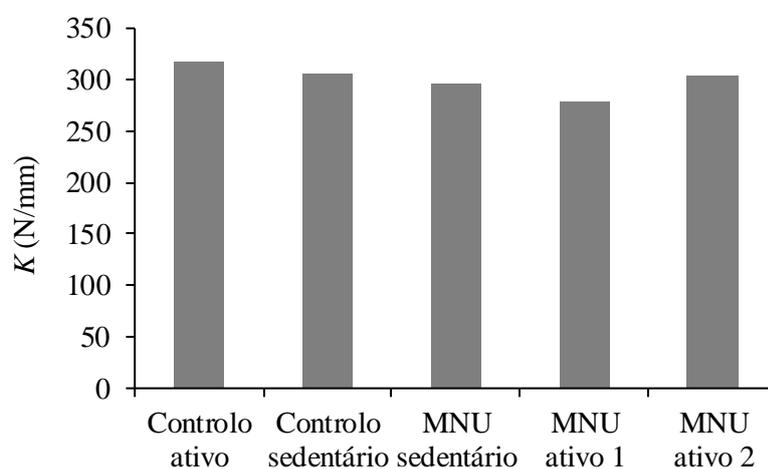
Na tabela 4.16 está resumida a estatística dos parâmetros mecânicos estruturais dos vários grupos do modelo animal MNU. Os mesmos resultados encontram-se na figura 4.22, sob a forma de histograma. Em primeiro lugar salientamos que a dispersão dos resultados é mais baixa no grupo “controlo sedentário”, o que seria de esperar uma vez



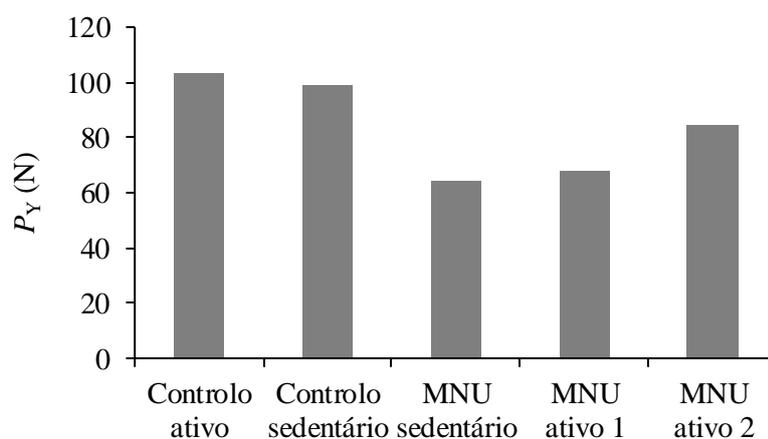
**Figura 4.21** – Curvas *força-deslocamento* do grupo “controlo sedentário” (grupo de controlo do modelo animal MNU).

**Tabela 4.16** – Parâmetros estruturais dos fêmures do modelo animal MNU

<i>Modelo</i>	<i>n</i>	<i>K</i> (N/mm)	<i>P<sub>Y</sub></i> (N)	<i>P<sub>max</sub></i> (N)	<i>W</i> (Nmm)
Controlo ativo	6	317,74 (21,4%)	103,06 (19,4%)	112,78 (20,7%)	23,09 (26,5%)
Controlo sedentário	7	305,92 (12,6%)	98,64 (6,6%)	110,90 (6,5%)	22,61 (18,8%)
MNU sedentário	7	297,09 (7,6%)	64,46 (17,7%)	87,61 (16,2%)	16,39 (28,7%)
MNU ativo 1	7	279,26 (12,7%)	67,58 (23,4%)	85,79 (22,2%)	16,12 (28,2%)
MNU ativo 2	8	303,61 (9,7%)	84,26 (12,3%)	98,88 (11,7%)	18,41 (24,8%)

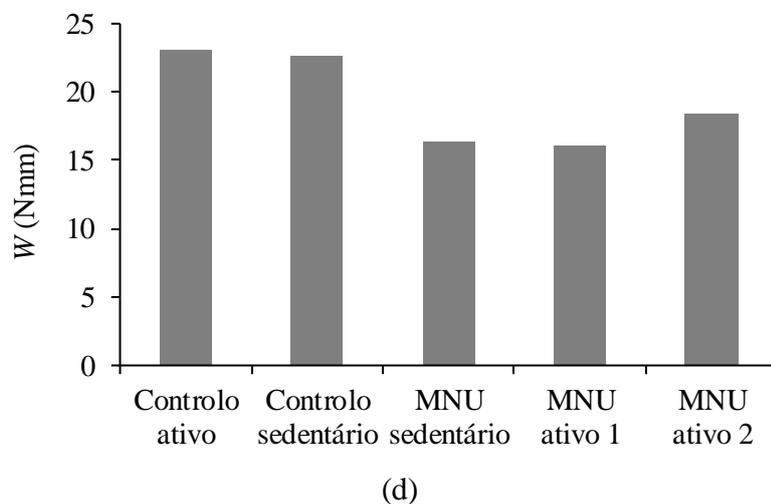
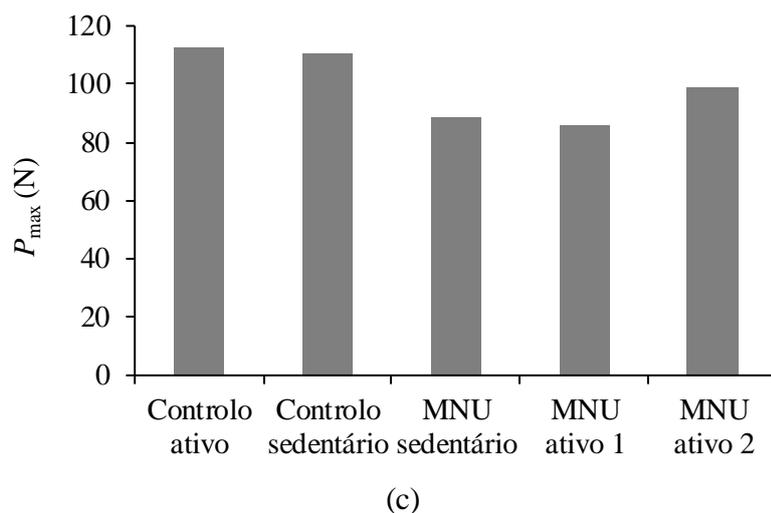


(a)



(b)

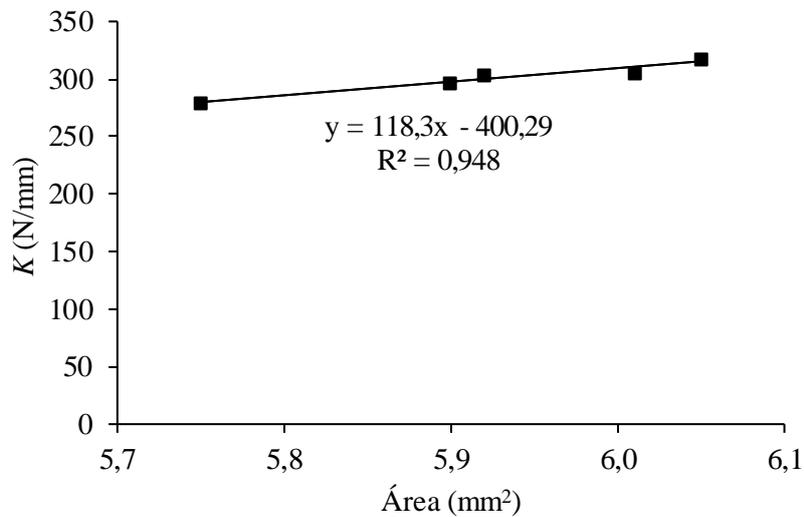
**Figura 4.22** – Parâmetros estruturais dos fêmures do modelo animal MNU: (a) rigidez elástica; (b) força de cedência; (c) força máxima; (d) energia de rotura. (*continua*)



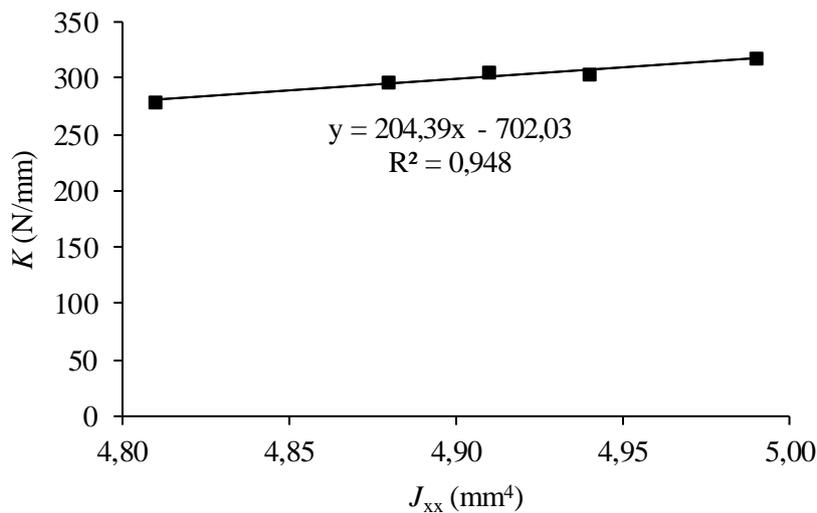
**Figura 4.23** – Parâmetros estruturais dos fêmures do modelo animal MNU: (a) rigidez elástica; (b) força de cedência; (c) força máxima; (d) energia de rotura. (*continuação*)

que este grupo não foi sujeito a nenhuma intervenção. Em segundo lugar, aplicando o teste  $t$  (para 95%), constatamos que há diferenças significativas nos parâmetros estruturais  $P_Y$ ,  $P_{max}$  e  $W$  entre os grupos “MNU sedentário” e “MNU ativo 1” e os respetivos grupos de controlo (“controlo sedentário” e “controlo ativo”). Registamos também uma diferença estatisticamente significativa na força de cedência ( $P_Y$ ) entre os grupos “MNU sedentário” e “MNU ativo 2”, assim como entre os grupos “MNU ativo 1” e “MNU ativo 2”. Podemos então afirmar, mesmo no caso da rigidez (apesar de não se terem observado diferenças estatisticamente significativas), que o cancro mamário induzido pela MNU reduz os parâmetros mecânicos estruturais das diáfises femorais, mas que essa redução parece ser atenuada pelo exercício físico.

À semelhança do que foi feito na secção 4.3.2, para o modelo animal RMR, de modo a discriminar o contributo da geometria das secções transversais das diáfises (área e momento de segunda ordem  $J_{xx}$ ) nos parâmetros mecânicos estruturais (rigidez  $K$  e força de cedência  $P_Y$ ) representamos nas figuras 4.23 e 4.24 a relação entre esses parâmetros. É evidente que existe uma significativa correlação linear positiva entre  $K$  e as características geométricas da secção transversal (figura 4.23), acontecendo o mesmo para  $P_Y$  (figura 4.24).

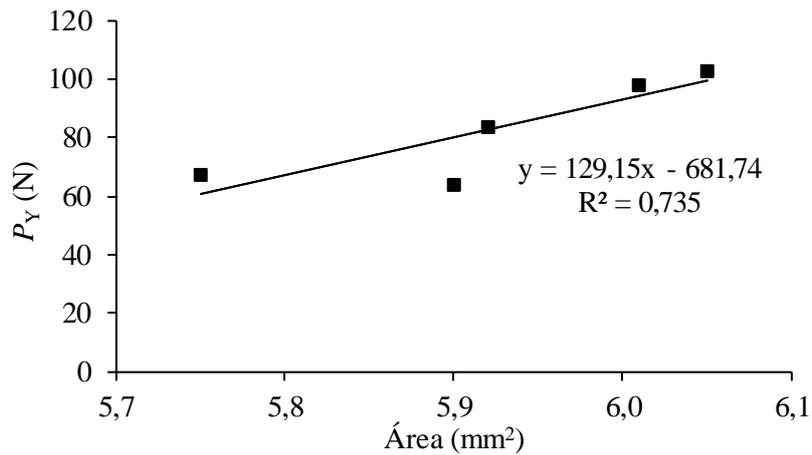


(a)

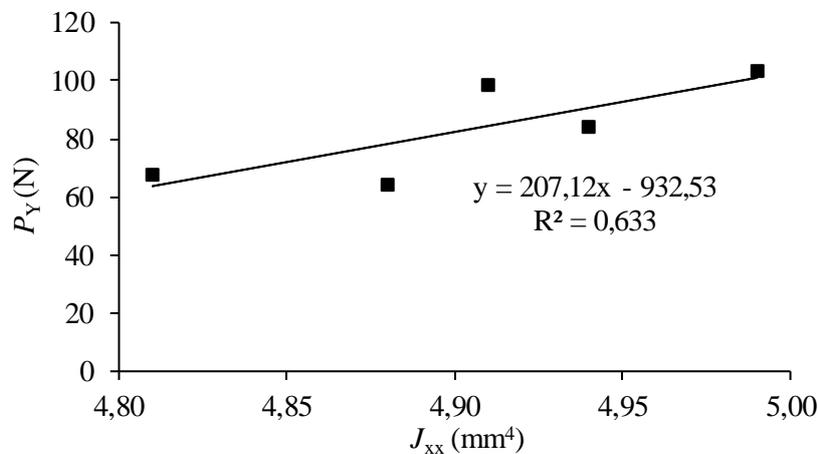


(b)

**Figura 4.24** – Rigidez do modelo animal MNU: (a) variação com a área  $A$  da secção transversal; (b) variação com o momento de 2ª ordem  $J_{xx}$ .



(a)



(b)

**Figura 4.25** – Força de cedência do modelo animal MNU: (a) variação com a área  $A$  da secção transversal; (b) variação com o momento de 2ª ordem  $J_{xx}$ .

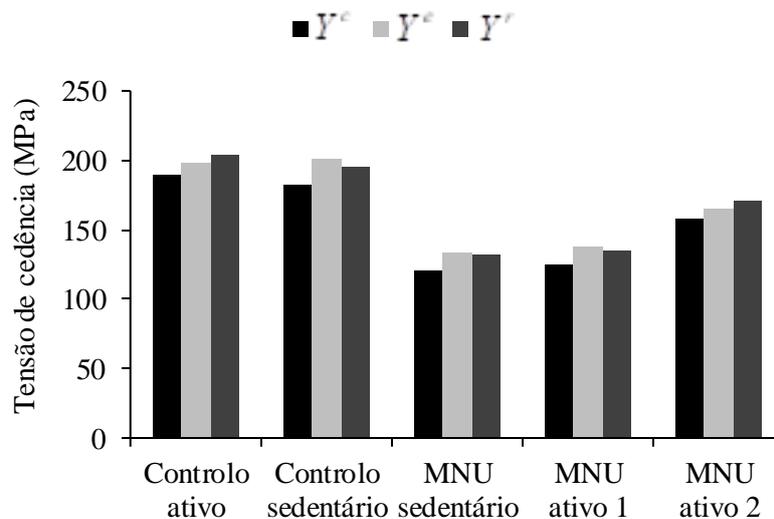
### 4.4.3. Tensão de cedência do tecido ósseo cortical

Na tabela 4.17 resumimos os resultados referentes às tensões de cedência do tecido ósseo cortical do modelo MNU, calculadas através da teoria de vigas de Bernoulli-Euler (equações 4.4 a 4.6). Os mesmos resultados estão representados nos histogramas da figura 4.26. À semelhança do que acontece com os parâmetros estruturais (tabela 4.16), é evidente uma diminuição da tensão de cedência nos grupos com cancro de mama induzido pela MNU, quando comparados com os respetivos grupos de controlo. Verifica-se também que a prática de exercício físico atenua este efeito. Do ponto de vista estatístico

(teste *t*, para 95%), há diferenças significativas entre os grupos “MNU sedentário” e “controle sedentário”, assim como entre os grupos “MNU ativo 1” e “controle ativo”. Também existem diferenças significativas quando comparamos o grupo “MNU ativo 2” com os grupos “MNU sedentário” e “MNU ativo 1”.

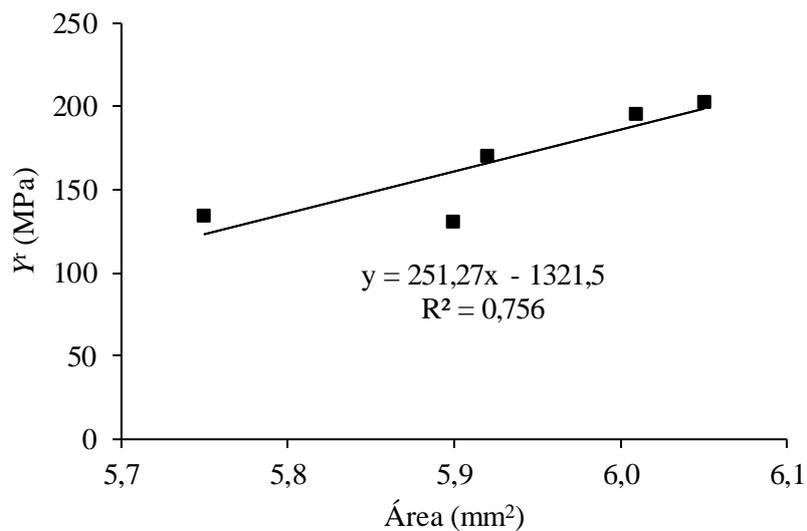
**Tabela 4.17** – Tensões de cedência do tecido ósseo cortical do modelo animal MNU.

<i>Modelo</i>	$Y^c$ (MPa)	$Y^e$ (MPa)	$Y^r$ (MPa)
Controle ativo	189,39 (16,4%)	198,07 (16,7%)	203,90 (16,8%)
Controle sedentário	182,29 (9,0%)	201,12 (7,3%)	195,97 (10,2%)
MNU sedentário	121,38 (29,6%)	133,74 (28,3%)	131,63 (29,6%)
MNU ativo 1	124,91 (25,1%)	138,45 (22,6%)	134,63 (23,7%)
MNU ativo 2	157,56 (15,1%)	165,68 (16,3%)	171,44 (15,3%)

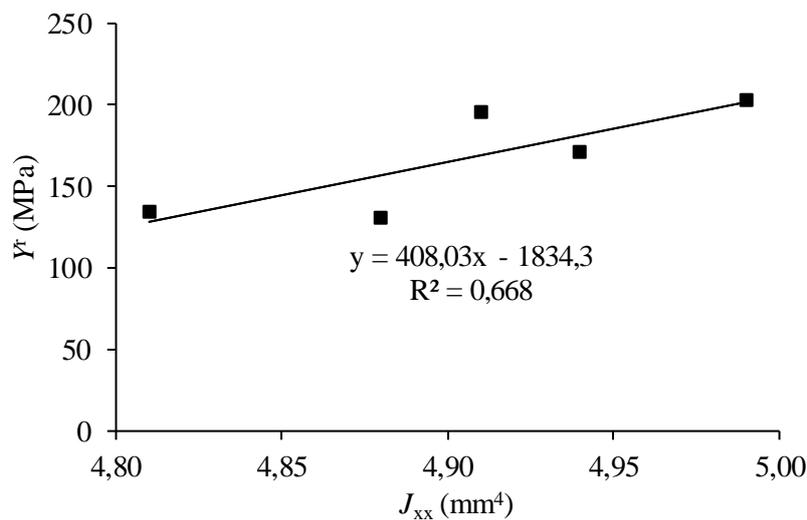


**Figura 4.26** – Tensões de cedência do tecido ósseo cortical do modelo animal MNU.

Na figura 4.27 representamos a dependência entre a tensão de cedência  $Y^r$  (equação 4.6) e a área da secção transversal (figura 4.27 (a)), assim como entre  $Y^r$  e o momento de segunda ordem  $J_{xx}$  (figura 4.27(b)). Assumindo que a tensão de cedência  $Y^r$  é uma propriedade intrínseca do tecido ósseo, as correlações lineares positivas patentes nos gráficos da figura 4.27 sugerem que a redução da massa renal não só acarreta a redução das propriedades geométricas da secção transversal (tabela 4.9), como a redução simultânea da tensão de cedência (tabela 4.14).



(a)



(b)

**Figura 4.27** – Tensão de cedência ( $Y^r$ ) do modelo animal MNU: (a) variação com a área  $A$  da secção transversal; (b) variação com o momento de 2<sup>a</sup> ordem  $J_{xx}$ .

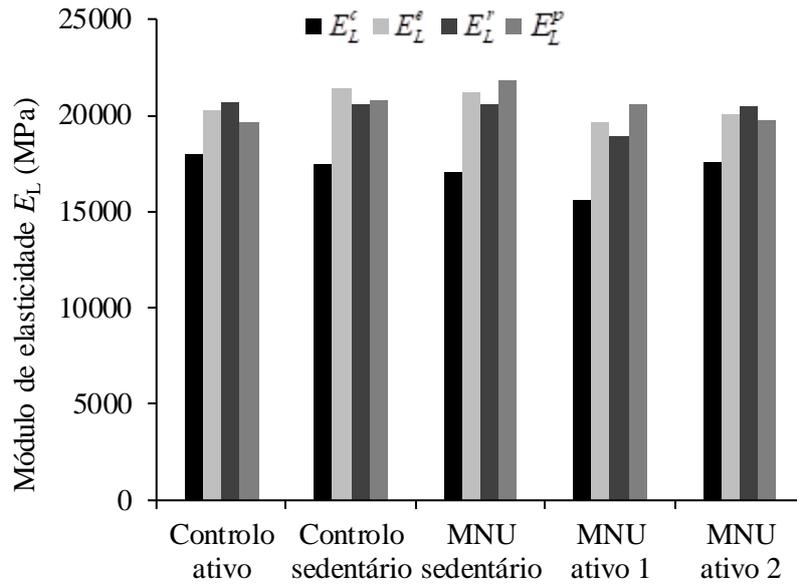
#### 4.4.4. Módulo de elasticidade longitudinal do tecido ósseo cortical

Para todos os fêmures do modelo animal MNU determinamos o módulo de elasticidade longitudinal do tecido ósseo cortical pelo método direto (equações 4.7, 4.8 e 4.10) e pelo método inverso proporcional (equação 4.11). Os resultados obtidos estão resumidos na tabela 4.18, onde incluímos os valores médios e os coeficientes de variação. Na figura 4.28 apresentamos os histogramas dos valores médios.

Do ponto de vista estatístico (teste  $t$ , para 95%) não existem diferenças significativas entre os vários grupos do modelo animal MNU, seja qual for o método de medida do módulo de elasticidade que considerarmos ( $E_L^c$ ,  $E_L^e$ ,  $E_L^r$  e  $E_L^p$ ). Além disso, e ao contrário dos resultados das secções anteriores (4.4.2 e 4.4.3), o módulo de elasticidade longitudinal não parece ser afetado pela indução de cancro de mama, nem pela prática de exercício físico.

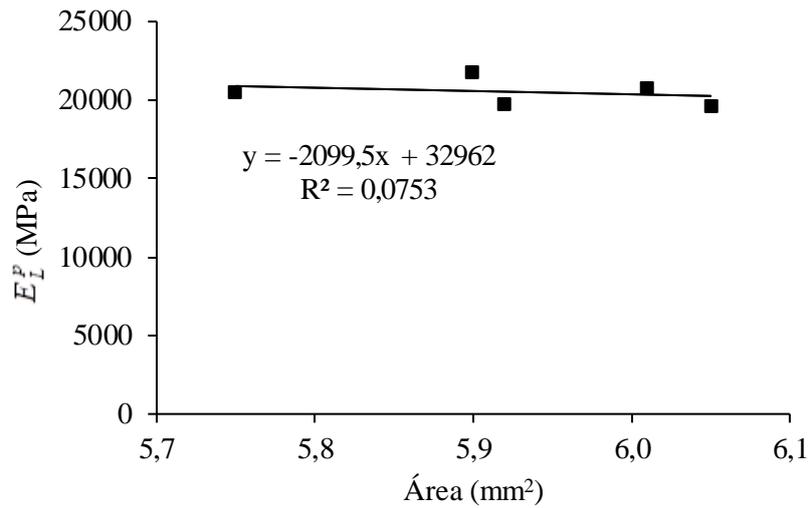
**Tabela 4.18** – Módulos de elasticidade longitudinal do modelo MNU.

<i>Modelo</i>	$E_L^c$ (MPa)	$E_L^e$ (MPa)	$E_L^r$ (MPa)	$E_L^p$ (MPa)
Controlo ativo	17972 (18,2%)	20289 (19,5%)	20681 (18,1%)	19663 (8,5%)
Controlo sedentário	17466 (17,0%)	21404 (15,7%)	20547 (17,0%)	20808 (7,3%)
MNU sedentário	17077 (23,4%)	21219 (24,1%)	20545 (23,1%)	21849 (11,2%)
MNU ativo 1	15616 (14,9%)	19671 (10,4%)	18909 (10,2%)	20529 (0,5%)
MNU ativo 2	17567 (16,2%)	20051 (19,0%)	20518 (17,0%)	19754 (5,5%)

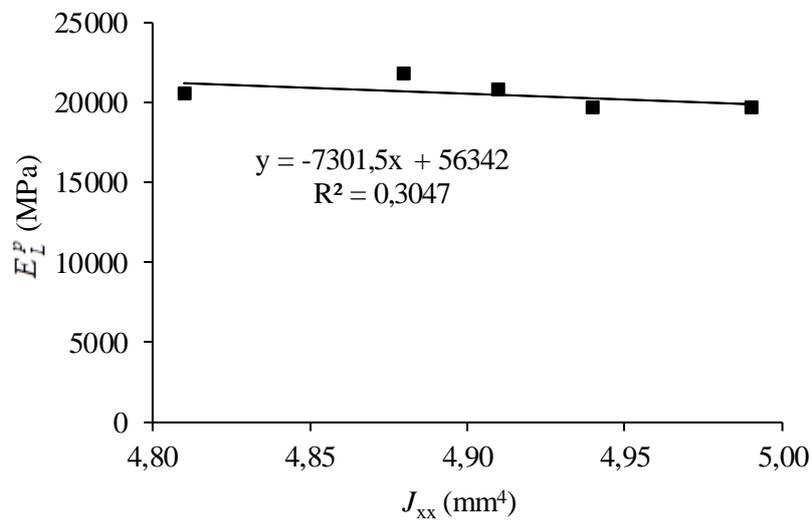


**Figura 4.28** – Módulo de elasticidade longitudinal do modelo animal MNU.

Como já tínhamos concluído na secção 4.2.3, o método inverso proporcional é o método mais apropriado para a identificação do módulo de elasticidade longitudinal ( $E_L$ ) do tecido ósseo cortical, a partir de ensaios de flexão em três pontos realizado à escala do fémur. Assumindo então que  $E_L^p$  é o valor representativo do módulo de elasticidade longitudinal, e tendo em atenção as observações feitas no parágrafo anterior, podemos concluir que indução de cancro de mama pelo agente MNU, assim como a prática de exercício físico, não influenciam o módulo de elasticidade longitudinal do tecido ósseo. Na figura 4.29 encontram-se os gráficos da relação entre  $E_L^p$  e as características geométricas da secção transversal dos fémures (área  $A$  e momento  $J_{xx}$ ), onde se pode constatar que não existe uma correlação significativa entre  $E_L^p$  e esses parâmetros geométricos.



(a)



(b)

**Figura 4.29** – Módulo de elasticidade longitudinal (método inverso proporcional) do modelo animal MNU: (a) variação com a área  $A$  da seção transversal; (b) variação com o momento de 2ª ordem  $J_{xx}$ .

## 4.5 CONCLUSÕES

No presente capítulo foram apresentados e discutidos os resultados relativos à identificação do módulo de elasticidade longitudinal do tecido ósseo cortical de dois modelos animais: o modelo de redução de massa renal (modelo RMR) e o modelo de

cancro de mama induzido pelo agente carcinogénico *N*-metil-*N*-nitrosureia (modelo MNU). Em ambos os modelos recorreremos ao ensaio de flexão em três pontos de diáfises femorais. Em seguida vamos resumir as conclusões extraídas e que foram sendo exposta ao longo do capítulo.

1. A teoria de vigas de Bernoulli-Euler foi usada para determinar a tensão de cedência ( $Y$ ) e o módulo de elasticidade longitudinal ( $E_L$ ), diretamente a partir dos ensaios de flexão. Foi analisada a aproximação da secção transversal das diáfises por um anel circular ( $Y^c$  e  $E_L^c$ ) e por um anel elítico ( $Y^e$  e  $E_L^e$ ), além da forma real ( $Y^r$  e  $E_L^r$ ). Quer no grupo SO (grupo de controlo do modelo animal RMR), quer no grupo “controlo sedentário” (grupo de controlo do modelo animal MNU) observámos uma tendência consistente na ordem das tensões de cedência e dos módulos de elasticidade:  $Y^c < Y^e, Y^r$  e  $E_L^c < E_L^e, E_L^r$ . Assim, a aproximação da secção da diáfise por um anel elítico é o método direto mais apropriado para a identificação de  $E_L$ , atendendo à sua maior facilidade de implementação.
2. Além dos métodos diretos mencionados no ponto anterior, foram utilizados dois métodos inversos para a identificação de  $E_L$ , combinando as curvas  $P$ - $\delta$  experimentais com a simulação por elementos finitos do ensaio de flexão, considerando modelos geométricos realistas das diáfises. Um desses métodos é o método proporcional ( $E_L^p$ ), assente na hipótese duma relação linear entre a rigidez da diáfise e o módulo de elasticidade longitudinal do tecido ósseo. O outro método, designado por método ótimo ( $E_L^o$ ) assenta num algoritmo de otimização que minimiza a diferença entre a rigidez experimental e a rigidez numérica. Tanto no grupo SO como no grupo “controlo sedentário” constatamos que o método proporcional é o mais adequado, uma vez que requer menos tempo computacional e conduz aos mesmos resultados que o método ótimo.
3. Comparando os métodos inversos (proporcional ou ótimo) com os métodos diretos (secção elítica ou secção real) de identificação do módulo de elasticidade longitudinal, nos grupos de controlo dos modelos RMR (grupo SO) e MNU (grupo

“controle sedentário”), concluímos que o método inverso proporcional é o método mais apropriado para a identificação de  $E_L$ .

4. Os métodos inversos de identificação do módulo de elasticidade longitudinal referidos no ponto 2 basearam-se em modelos geométricos das diáfises femorais construídos a partir de imagens fotográficas. Para avaliar a fidelidade desses modelos geométricos, utilizámos como comparação modelos geométricos construídos a partir de imagens de tomografia axial computadorizada (TAC). Os resultados obtidos permitem-nos concluir que o modelo baseado em fotografia reproduz com uma fidelidade aceitável a forma real das diáfises, embora seja necessário realizar trabalho adicional para uma conclusão mais sólida.
5. No modelo animal RMR, os grupos com redução da massa renal (grupos RMR e RMR+CAA) têm menor área que os respetivos grupos de controlo, submetidos a cirurgia simulada (grupos SO e SO+CAA), embora essa diferença não seja estatisticamente significativa. No modelo animal MNU, os grupos “controle ativo” e “controle sedentário” têm uma secção transversal com área ligeiramente maior (mas sem significado estatístico) que os restantes grupos, com cancro da mama (“MNU sedentário”, “MNU ativo 1” e “MNU ativo 2”).
6. Quanto aos parâmetros mecânicos estruturais (rigidez, força de cedência, força máxima e energia de rotura), no modelo animal RMR constatamos que os grupos com redução de massa renal (RMR e RMR+CAA) têm valores inferiores aos dos respetivos grupos de controlo, com cirurgia simulada (SO e SO+CAA); além disso, a administração de CAA não parece afetar os parâmetros mecânicos estruturais. Por outro lado, concluímos que o cancro mamário induzido pela MNU (modelo animal MNU) reduz os parâmetros mecânicos estruturais das diáfises femorais, mas que essa redução parece ser atenuada pelo exercício físico.
7. No modelo animal da redução de massa renal (modelo RMR) observamos uma tendência consistente de diminuição das tensões de cedência ( $Y^c$ ,  $Y^e$  e  $Y$ ) com a redução da massa renal, à semelhança do que acontece com os parâmetros mecânicos estruturais (ver ponto 6). No modelo animal do cancro da mama (modelo MNU) as tensões de cedência acompanham também a tendência de

redução dos parâmetros mecânicos estruturais com a indução do cancro, sendo no entanto atenuada pela prática de exercício físico.

8. Assumindo que  $E_L^p$  é o valor representativo do módulo de elasticidade longitudinal, concluímos que a redução da massa renal (modelo animal RMR), assim como a administração de CAA, não influenciam o módulo de elasticidade longitudinal do tecido ósseo. No modelo animal MNU, não registamos qualquer efeito do cancro de mama induzido pelo agente MNU, assim como qualquer efeito da prática de exercício físico, sobre o módulo de elasticidade longitudinal do tecido ósseo cortical.



## ENSAIOS DE COMPRESSÃO

### 5.1 INTRODUÇÃO

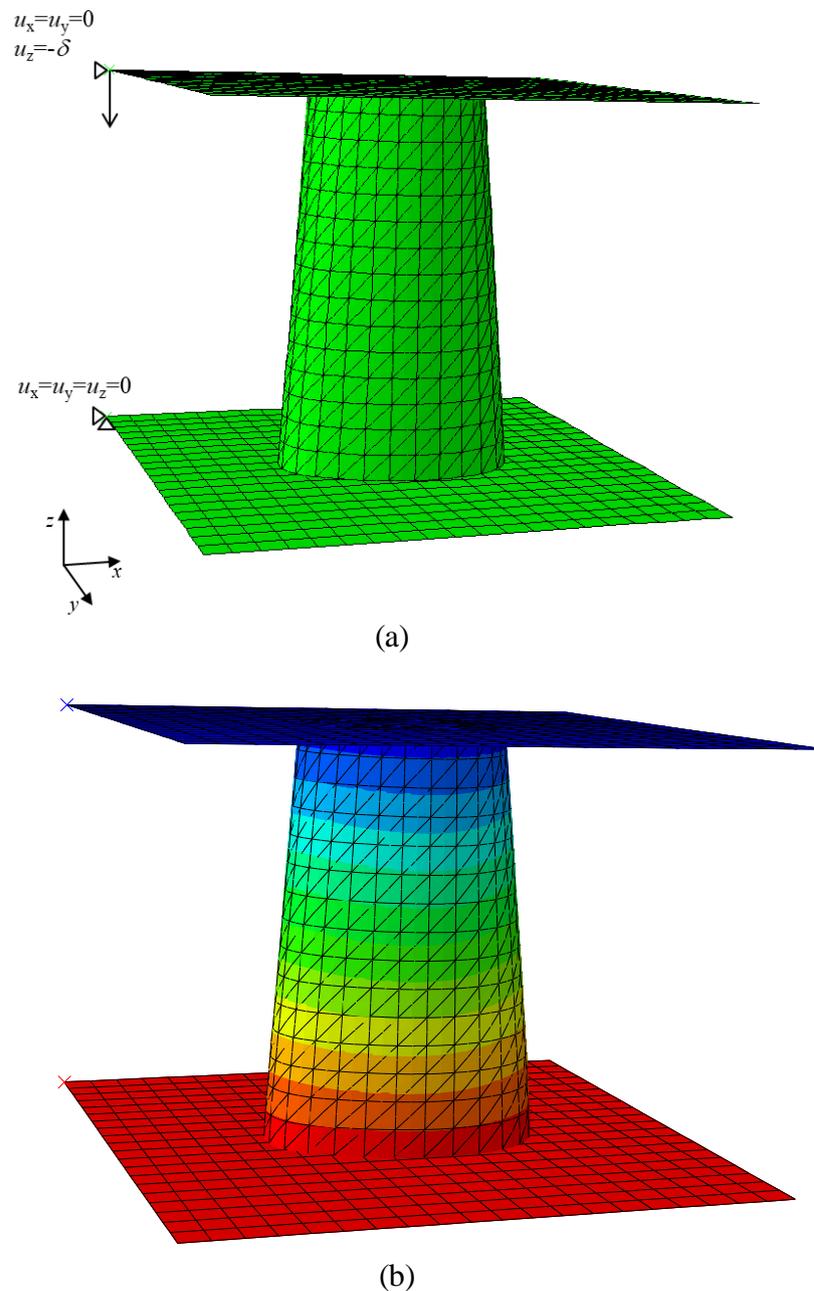
O objetivo central deste trabalho é o desenvolvimento de um método de identificação do módulo de elasticidade longitudinal ( $E_L$ ) do tecido ósseo cortical de pequenos animais (ratos *Sprague-Dawley* e *Wistar*) através de ensaios de flexão em três pontos realizados em fêmures. No sentido de contribuir para a validação desse método (analisado no capítulo 4), entendemos recorrer ao ensaio de compressão em segmentos de diáfise excisados dos fêmures após os ensaios de flexão. No capítulo 3 foram descritos os procedimentos experimentais do ensaio de compressão. Neste capítulo vamos apresentar e analisar os resultados obtidos, incluindo uma análise por elementos finitos do ensaio de compressão.

### 5.2 ANÁLISE POR ELEMENTOS FINITOS DO ENSAIO DE COMPRESSÃO

#### 5.2.1. Modelo de elementos finitos

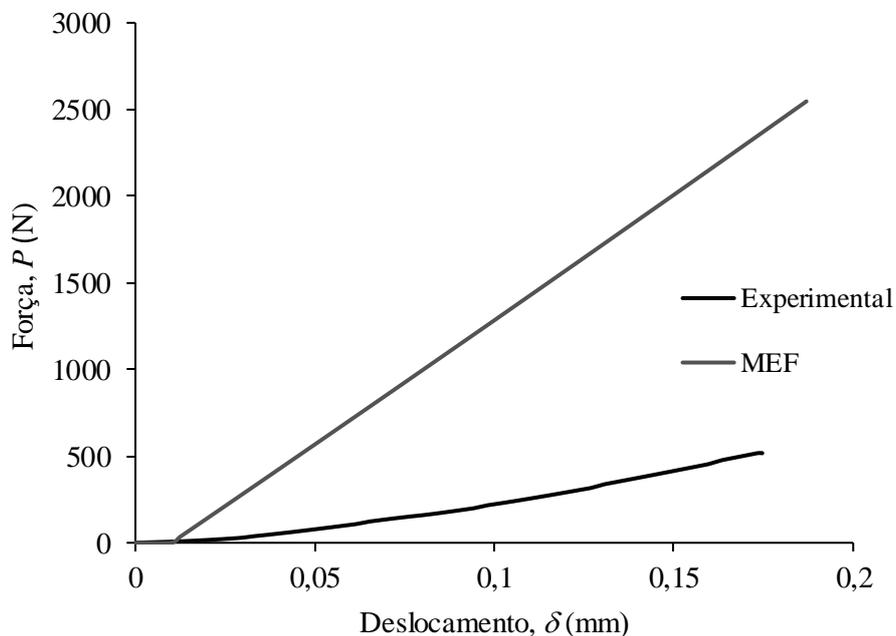
Escolhemos, arbitrariamente, um dos segmentos de diáfise femoral que foram ensaiados à compressão para construir um modelo tridimensional de elementos finitos, partindo do respetivo modelo geométrico baseado em imagens fotográficas (conforme foi descrito na secção 3.4.1, do capítulo 3). Esse modelo está representado na figura 5.1(a), juntamente com as condições de fronteira. Para a malha de elementos finitos escolhemos elementos tetraédricos quadráticos, aos quais foram atribuídas as propriedades elásticas

do tecido ósseo indicadas na tabela 4.1. No modelo de elementos finitos foram incluídas superfícies planas rígidas para simular o contato entre o provete e as amarras, usando elementos finitos de contato com um coeficiente de atrito de 0,3. Numa dessas superfícies foi aplicado incrementalmente um deslocamento na direção  $zz$  (figura 5.1(a)), até ao valor máximo  $\delta = 0,5\text{mm}$ , sendo impedidos os restantes deslocamentos; para a outra superfície rígida foram impedidos todos os deslocamentos. Na figura 5.1(b) pode ser apreciada a deformada do modelo de elementos finitos e o campo dos deslocamentos verticais ( $u_z$ ).

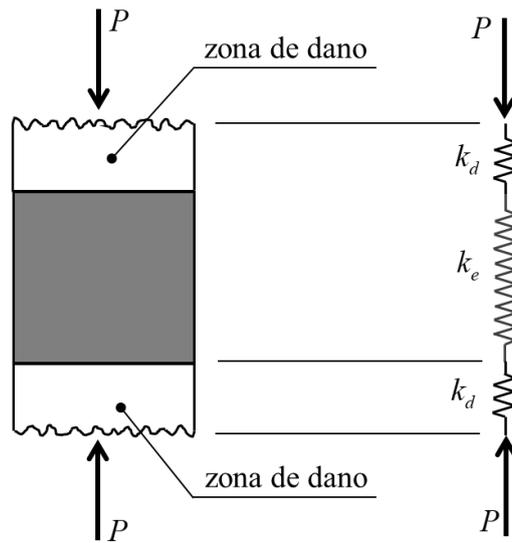


**Figura 5.1** – Simulação por elementos finitos do ensaio de compressão: (a) malha de elementos finitos e condições de fronteira; (b) deformada e campo dos deslocamentos  $u_z$ .

Na figura 5.2 comparamos a curva força-deslocamento ( $P-\delta$ ) fornecida pela simulação numérica (considerando  $E_L=18$  GPa) com a curva experimental. A discrepância entre as duas curvas pode ser devida a duas causas: (1) causas geométricas ou (2) causas materiais. As causas geométricas prendem-se com o facto de as superfícies de apoio do modelo de elementos finitos serem rigorosamente paralelas e perpendiculares ao deslocamento do atuador, enquanto nos provetes reais ocorrerem desvios de paralelismo ou de perpendicularidade mais ou menos acentuados (ver figura 3.11(c), do capítulo 3). As causas materiais têm a ver com o facto do módulo elasticidade longitudinal considerado no modelo de elementos finitos ser diferente do módulo de elasticidade do provete real. Mas podem também estar relacionadas com a rugosidade da superfície de contato entre o provete real e as amarras, e com a conseqüente criação de uma região danificada nas extremidades do provete, conforme se procura ilustrar na figura 5.3 e foi demonstrado por Xavier et al (2012) em provetes de madeira.



**Figura 5.2** – Curva  $P-\delta$  experimental do fémur usado na construção do modelo de elementos finitos e curva obtida por simulação.



**Figura 5.3** – Modelo simplificado do ensaio de compressão (baseado em Xavier et al, 2012).

### 5.2.2. Identificação de $E_L$

Assumindo que o estado de tensão em cada ponto do segmento de diáfise é uniaxial, o módulo de elasticidade longitudinal ( $E_L$ ) do tecido ósseo cortical pode ser determinado através da seguinte versão da lei de Hooke:

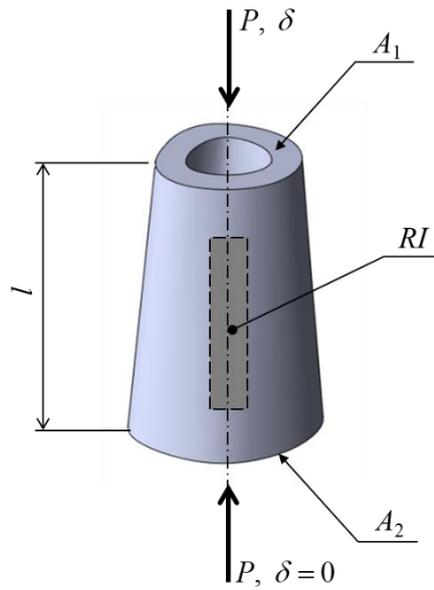
$$E_L = \frac{\sigma}{\varepsilon} \quad (5.1)$$

Se o estado de tensão é uniforme em cada secção transversal da diáfise, a tensão  $\sigma$  numa dada secção, com área  $A$ , vale (figura 5.4):

$$\sigma = \frac{P}{A} \quad (5.2)$$

Em primeira aproximação podemos determinar a deformação  $\varepsilon$  usando a seguinte expressão:

$$\varepsilon_\delta = \frac{\delta}{l} \quad (5.3)$$



**Figura 5.4** – Grandezas ( $P, \delta, l, A_1$  e  $A_2$ ) e região de interesse ( $RI$ ) utilizadas na identificação de  $E_L$  a partir do ensaio de compressão.

onde  $\delta$  é o deslocamento do atuador e  $l$  é a altura inicial do segmento de diáfise (figura 5.4). Admitindo que a secção transversal do provete é constante (entre as amarras), as equações 5.1 a 5.3 conduzem à seguinte expressão para a determinação de  $E_L$ , com base na rigidez ( $P/\delta$ ) e no fator geométrico  $l/A$  (figura 5.4):

$$E_L^\delta = \frac{l P}{A \delta} \quad (5.4)$$

Esta equação foi aplicada aos resultados da simulação numérica, considerando a área  $A = (A_1 + A_2)/2$  (figura 5.4), tendo-se obtido  $E_L^{\delta,MEF} = 19,322 \text{ GPa}$ , que é cerca de 7% superior ao valor que foi introduzido no modelo numérico ( $E_L^{0,MEF}$ , na tabela 5.1). Aplicando o mesmo método aos resultados experimentais (figura 5.2) obtivemos um valor do módulo de elasticidade do tecido ósseo cortical ( $E_L^{\delta,EXP} = 4,993 \text{ GPa}$ , na tabela 5.1) que é muito mais baixo que o esperado (pelos resultados dos ensaios de flexão). Embora a equação 5.4 permita obter uma estimativa aceitável de  $E_L$  para o modelo de elementos finitos, ela é claramente inadequada para a obtenção de  $E_L$  a partir dos resultados experimentais.

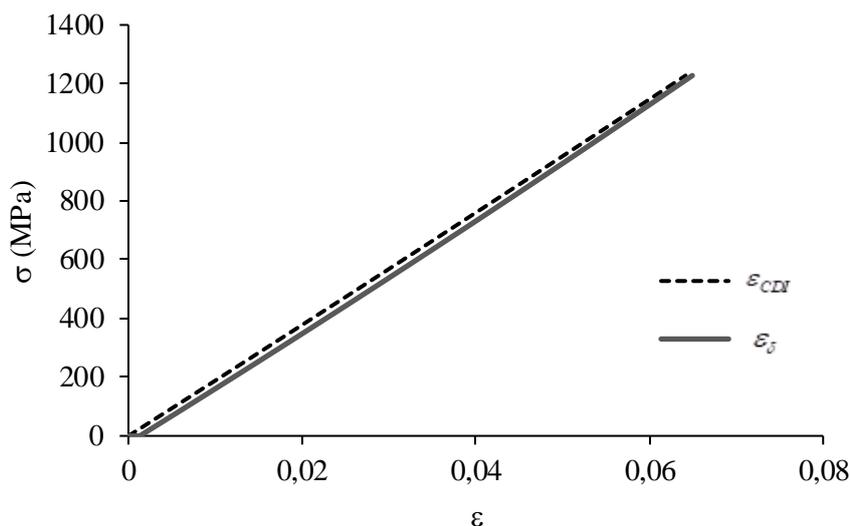
**Tabela 5.1** – Módulos de elasticidade longitudinal do ensaio de compressão

$E_L^{0,MEF}$	$E_L^{\delta,MEF}$	$E_L^{CDI,MEF}$	$E_L^{\delta,EXP}$	$E_L^{CDI,EXP}$
(MPa)	(MPa)	(MPa)	(MPa)	(MPa)
18000	19322	19143	4993	16756

Um método alternativo para a identificação do módulo de elasticidade longitudinal através do ensaio de compressão de segmentos de diáfise consiste na aplicação da lei de Hooke unidimensional (equação 5.1), usando também a equação 5.2 para o cálculo da tensão, mas recorrendo à técnica da correlação digital de imagem para a medição da deformação. Tomando então a deformação média numa região de interesse (*RI*, na figura 5.4) da superfície do provete, temos (equações 5.1 e 5.2):

$$E_L^{CDI} = \frac{1}{A} \frac{P}{\varepsilon_{CDI}} \quad (5.5)$$

Para o modelo de elementos finitos, o valor do módulo de elasticidade longitudinal calculado desta forma ( $E_L^{CDI,MEF} = 19,143 \text{ GPa}$ , na tabela 5.1) difere cerca de 6% do valor introduzido no modelo numérico ( $E_L^{0,MEF}$ , na tabela 5.1), sendo praticamente coincidente com o valor determinado através da equação 5.4 ( $E_L^{\delta,MEF} = 19,322 \text{ GPa}$ , na tabela 5.1). Aliás, como se pode verificar na figura 5.5, a curva tensão-deformação do modelo numérico é praticamente a mesma, quer se use  $\varepsilon_{\delta}$  quer se use  $\varepsilon_{CDI}$ . Aplicando a equação 5.5 aos resultados experimentais obtivemos o valor  $E_L^{CDI,EXP} = 16,756 \text{ GPa}$ , que é semelhante ao valor que foi introduzido no modelo de elementos finitos. Os resultados que acabamos de apresentar permitem-nos concluir que a equação 5.5 fornece um método apropriado para a identificação do módulo de elasticidade longitudinal do tecido ósseo cortical, a partir do ensaio de compressão de segmentos de diáfises femorais. Vem ainda a propósito referir que a discrepância entre a curva  $P-\delta$  numérica e a curva  $P-\delta$  experimental se deve, no caso do fémur que temos vindo a considerar nesta secção, a causas materiais relacionadas com as regiões de dano no contato com as amarras. Mas os eventuais desvios de paralelismo e de perpendicularidade das faces do provete, que



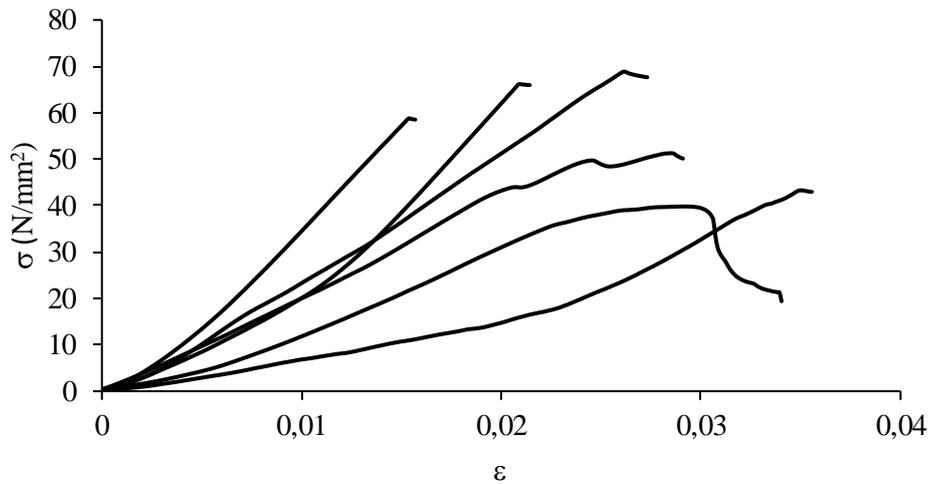
**Figura 5.5** – Curvas tensão-deformação do modelo de elementos finitos do ensaio de compressão.

referimos atrás (na secção 5.2.1), podem inviabilizar a aplicação da equação 5.5. Esta questão será abordada mais adiante, quando apresentarmos e discutirmos os resultados experimentais de todos os ensaios de compressão.

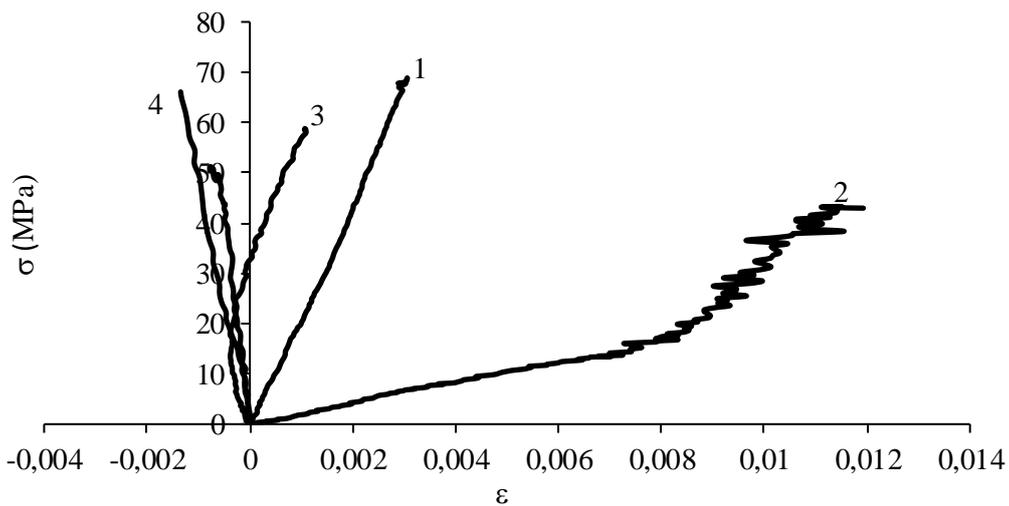
### **5.3 ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS EXPERIMENTAIS: MODELO ANIMAL RMR**

Na figura 5.6 apresentamos as curvas tensão-deformação (ou curvas  $\sigma - \varepsilon$ ) dos ensaios de compressão do grupo SO (grupo de controlo do modelo animal RMR, tabela 3.1). As curvas tensão-deformação para os restantes grupos desse modelo animal têm um aspeto semelhante. Nas curvas  $\sigma - \varepsilon$  da figura 5.6(a) a tensão normal foi calculada através da equação 5.2 e a deformação linear foi calculada através da equação 5.3. Nas curvas da figura 5.6(b) usámos a deformação medida por correlação de imagem ( $\varepsilon_{CDI}$ ). A primeira observação que fazemos sobre as curvas  $\sigma - \varepsilon$  remete para a sua elevada dispersão. No caso das curvas baseadas na deformação  $\varepsilon_{CDI}$  é também evidente a existência de comportamentos anómalos, não compatíveis com um ensaio de compressão. É o caso das curvas 3 e 4 na figura 5.6(b), que indiciam uma solicitação combinada de

compressão e de flexão. Esses comportamentos anómalos devem-se, muito provavelmente, ao não paralelismo entre as faces de topo do provete e/ou à não perpendicularidade dessas faces em relação ao deslocamento do atuador (ver figura 3.11(c)). O módulo de elasticidade longitudinal do tecido ósseo cortical foi determinado a partir do declive das curvas tensão-deformação, por regressão linear dos pontos experimentais na região com maior declive (figura 5.7), de acordo com a equação 5.4 (para as curvas da figura 5.6(a)) ou com a equação 5.5 (para as curvas da figura 5.6(b)).

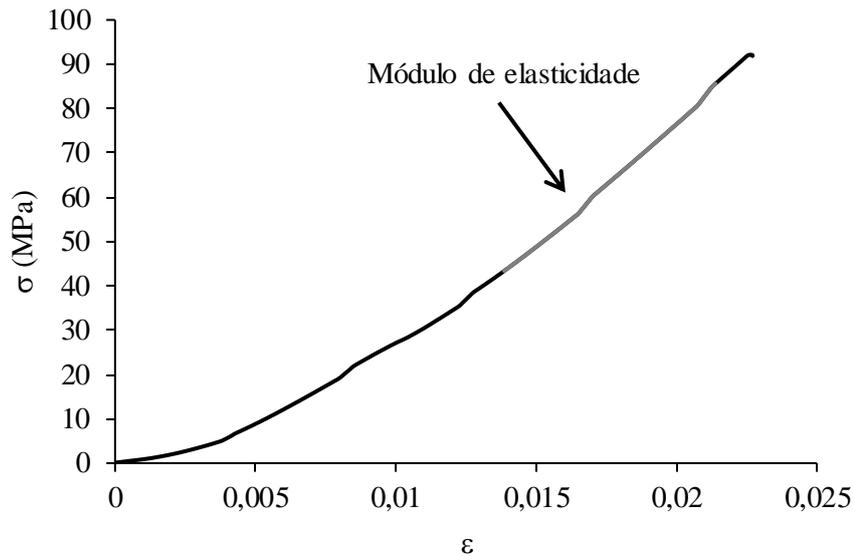


(a)



(b)

**Figura 5.6** – Curvas *tensão-deformação* do grupo SO do modelo animal RMR: (a) deslocamento do atuador; (b) correlação digital de imagem.

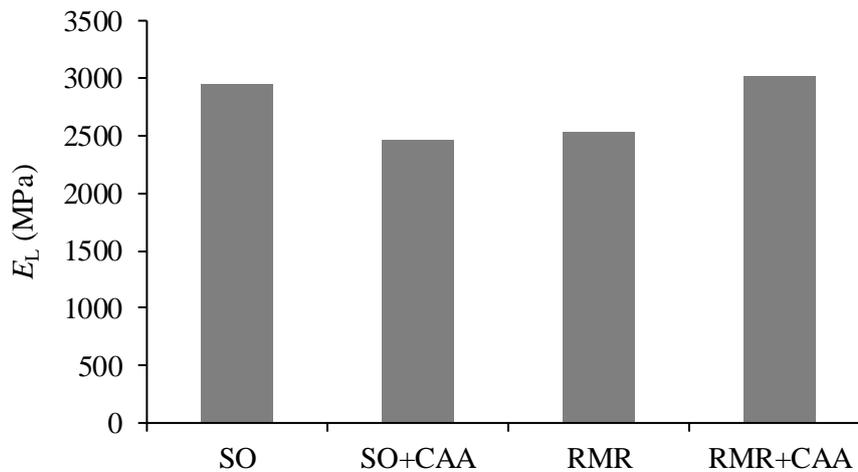


**Figura 5.7** – Curvas *tensão-deformação* e identificação do módulo de elasticidade longitudinal.

Os módulos de elasticidade obtidos através dos ensaios de compressão estão resumidos na tabela 5.2, para todos os grupos do modelo RMR. Nessa tabela incluímos os valores médios de  $E_L$ , juntamente com os respectivos coeficientes de variação ( $CV$ ) e a dimensão das amostras ( $n$ ). Estes resultados podem também ser apreciados na figura 5.8, na forma de histograma. Como já tínhamos observado antes, na secção 5.2.2, a deformação baseada no deslocamento do atuador (5.3) subestima fortemente o módulo de elasticidade ( $E_L^{\delta,EXP}$ , na tabela 5.2). Por sua vez, a utilização da deformação medida por correlação digital de imagem conduz a valores médios do módulo de elasticidade longitudinal ( $E_L^{CDI,EXP}$ , na tabela 5.2) próximos dos que foram obtidos através dos ensaios de flexão, usando o método inverso proporcional (tabela 4.13). Estes resultados contribuem para consolidar a conclusão extraída no capítulo 4 sobre a validade do método inverso proporcional para a identificação do módulo de elasticidade longitudinal do tecido ósseo cortical. Mas, acima de tudo, sugerem que o ensaio de compressão pode ser uma alternativa viável ao ensaio de flexão em três pontos, desde que sejam instrumentados com a técnica da correlação digital de imagem. A vantagem do ensaio de compressão é que se trata de um método direto de identificação de  $E_L$ , que não requer a realização de simulações por elementos finitos nem a utilização de técnicas de construção de modelos geométricos digitais.

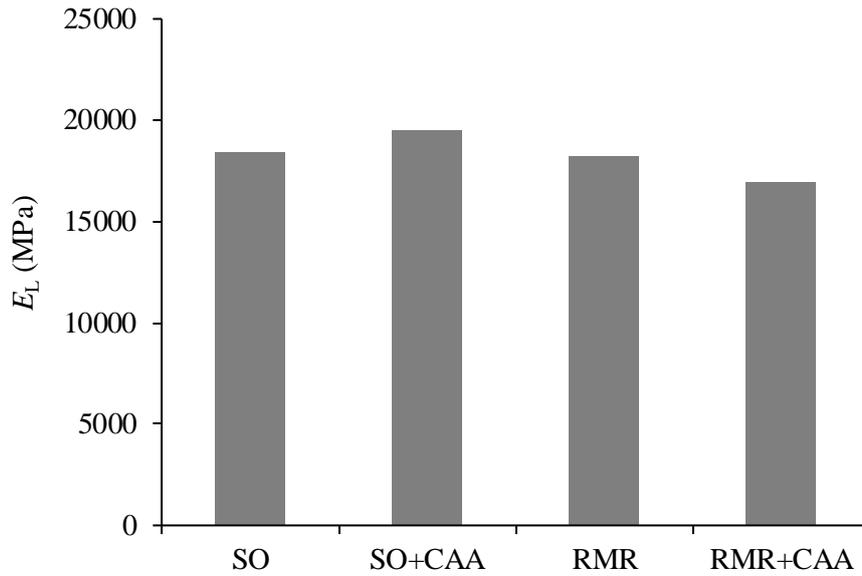
**Tabela 5.2** – Módulos de elasticidade dos ensaios de compressão dos fêmures do modelo animal RMR

Modelo	$E_L^{\delta,EXP}$ (MPa)	$E_L^{CDI,EXP}$ (MPa)
SO	2954 (n=6; CV=37,2%)	18403 (n=3; CV=49,7%)
SO+CAA	2463 (n=12; CV=43,0%)	19467 (n=4; CV=60,4%)
RMR	2541 (n=7; CV=57,0%)	18211 (n=3; CV=60,6%)
RMR+CAA	3011 (n=8; CV=30,8%)	16926 (n=4; CV=23,7%)



(a)

**Figura 5.8** – Módulos de elasticidade dos ensaios de compressão dos fêmures do modelo animal RMR: (a) deslocamento do atuador ( $E_L^{\delta,EXP}$ ); (b) correlação digital de imagem ( $E_L^{CDI,EXP}$ ). (continua)

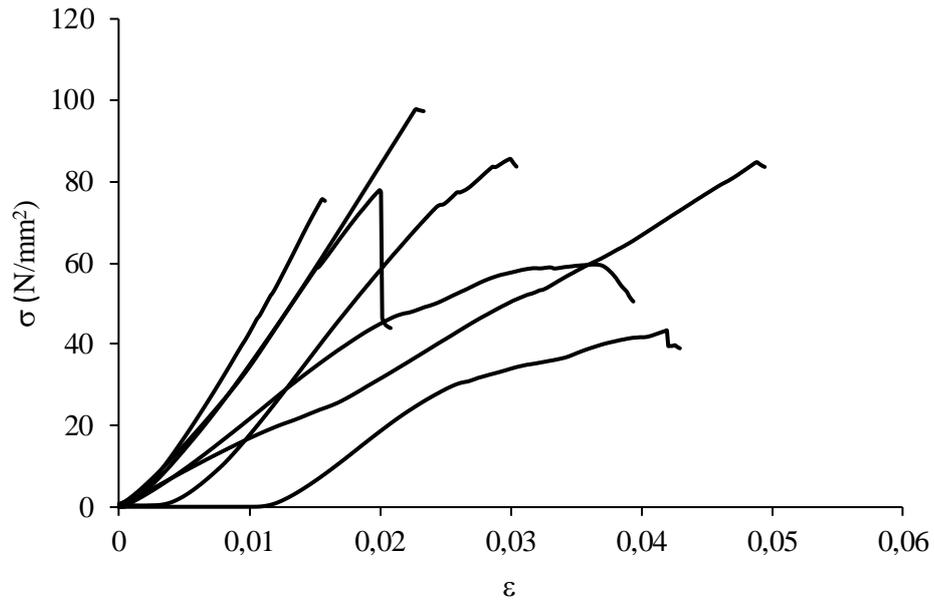


(b)

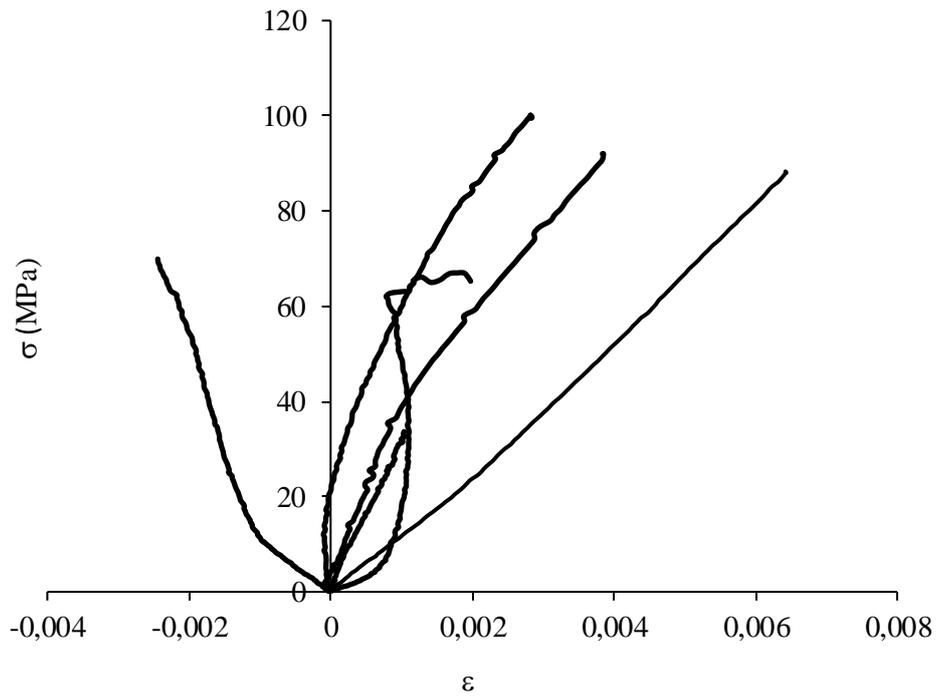
**Figura 5.8** – Módulos de elasticidade dos ensaios de compressão dos fêmures do modelo animal RMR: (a) deslocamento do atuador ( $E_L^{\delta,EXP}$ ); (b) correlação digital de imagem ( $E_L^{CDI,EXP}$ ). (continuação)

## 5.4 ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS EXPERIMENTAIS: MODELO ANIMAL MNU

Na figura 5.9 apresentamos as curvas tensão-deformação (ou curvas  $\sigma - \varepsilon$ ) dos ensaios de compressão do grupo “controle sedentário” (grupo de controle do modelo animal MNU, tabela 3.2). As curvas tensão-deformação para os restantes grupos desse modelo animal têm um aspeto semelhante. Nas curvas  $\sigma - \varepsilon$  da figura 5.9(a) a tensão normal foi calculada através da equação 5.2 e a deformação linear foi calculada através da equação 5.3. Nas curvas da figura 5.9(b) usámos a deformação medida por correlação de imagem ( $\varepsilon_{CDI}$ ). No caso das curvas baseadas na deformação  $\varepsilon_{CDI}$  é também evidente a existência de comportamentos anómalos, não compatíveis com um ensaio de compressão (tal como foi mencionado na secção 5.3).



(a)



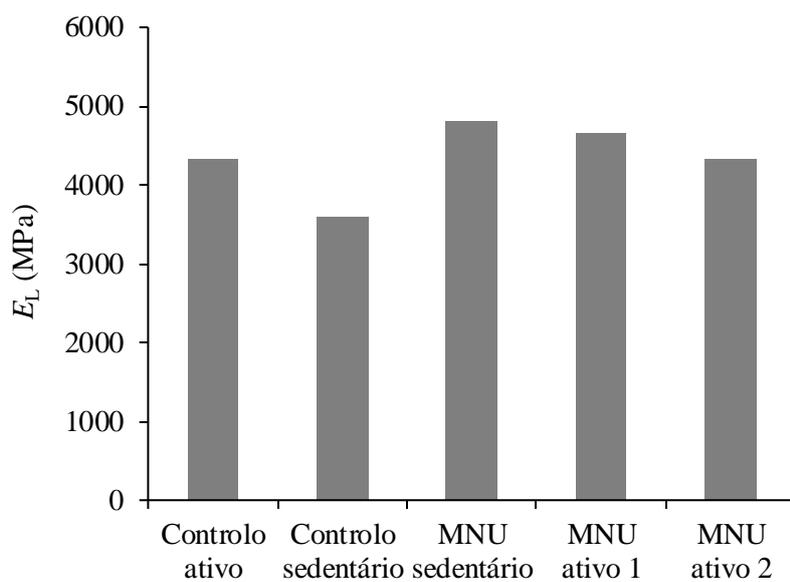
(b)

**Figura 5.9** – Curvas *tensão-deformação* do grupo “controle sedentário” do modelo animal da MNU: (a) deslocamento do atuador ( $E_L^{\delta,EXP}$ ); (b) correlação digital de imagem ( $E_L^{CDI,EXP}$ ).

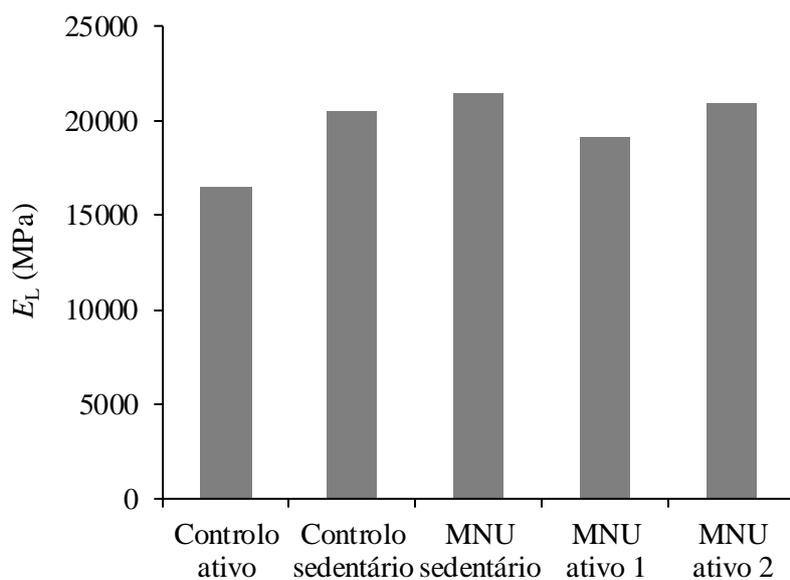
Os módulos de elasticidade obtidos através dos ensaios de compressão, para todos os grupos do modelo animal MNU, estão resumidos na tabela 5.3. Nesta tabela incluímos os valores médios de  $E_L$ , juntamente com os respectivos coeficientes de variação (CV) e a dimensão das amostras ( $n$ ). Importa salientar a elevada dispersão existente nos resultados obtidos. Estes resultados podem também ser apreciados na figura 5.10, na forma de histograma. Tal como tínhamos visto nas secções anteriores, o cálculo do módulo de elasticidade ( $E_L^{\delta,EXP}$ ) através do deslocamento do atuador, subestima fortemente os resultados médios (na tabela 5.3). No entanto, a utilização da deformação medida por correlação digital de imagem leva-nos a valores médios do módulo de elasticidade ( $E_L^{CDI,EXP}$ , na tabela 5.3) semelhantes aos que foram obtidos através dos ensaios de flexão, usando o método inverso proporcional (tabela 4.13). Os resultados obtidos permitem-nos concluir que os ensaios de compressão, acompanhados com correlação digital de imagem são viáveis para o estudo do módulo de elasticidade longitudinal do tecido ósseo cortical. No entanto, é necessário ter um especial cuidado na fabricação dos provetes para garantir o paralelismo das faces e perpendicularidade em relação ao atuador.

**Tabela 5.3** – Módulos de elasticidade dos ensaios de compressão dos fémures do modelo animal da MNU

Modelo	$E_L^{\delta,EXP}$ (MPa)	$E_L^{CDI,EXP}$ (MPa)
Controlo ativo	4321 (n=6; CV=20,6%)	16489 (n=3; CV=6,9%)
Controlo sedentário	3597 (n=7; CV=39,7%)	20536 (n=3; CV=25,1%)
MNU sedentário	4811 (n=7; CV=40,0%)	21477 (n=4; CV=29,9%)
MNU ativo 1	4659 (n=7; CV=32,7%)	19174 (n=4; CV=35,3%)
MNU ativo 2	4319 (n=8; CV=39,5%)	20923 (n=5; CV=16,5%)



(a)



(b)

**Figura 5.10** – Módulos de elasticidade dos ensaios de compressão dos fémures do modelo animal MNU: (a) deslocamento do atuador ( $E_L^{\delta,EXP}$ ); (b) correlação digital de imagem ( $E_L^{CDI,EXP}$ ).

## 5.5 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados e discutidos no presente capítulo, sobre a identificação do módulo de elasticidade longitudinal recorrendo ao ensaio de compressão de segmentos de diáfise femorais, permitiram-nos chegar às seguintes conclusões:

1. A deformação determinada a partir do deslocamento do atuador conduz a curvas tensão-deformação que subestimam o módulo de elasticidade longitudinal, em uma ordem de grandeza.
2. A deformação obtida por correlação digital de imagem numa região de interesse da superfície dos provetes permite obter curvas tensão-deformação a partir das quais se pode extrair o valor correto do módulo de elasticidade longitudinal.
3. Os provetes a usar nos ensaios de compressão (segmentos da diáfise) devem ter as faces de topo paralelas entre si e perpendiculares à direção de deslocamento do atuador.
4. Quando é usada a correlação digital de imagem, o módulo de elasticidade longitudinal identificado através dos ensaios de compressão é semelhante ao módulo de elasticidade longitudinal obtido através dos ensaios de flexão em três pontos, aplicando o método inverso proporcional. A vantagem do ensaio de compressão é que proporciona um método direto de identificação de  $E_L$ , que não obriga à utilização de ferramentas avançadas de modelação (método dos elementos finitos, de otimização e de modelação geométrica).



### 6.1 INTRODUÇÃO

O principal objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um método de identificação do módulo de elasticidade longitudinal ( $E_L$ ) do tecido ósseo cortical de pequenos animais (ratos *Sprague-Dawley* e *Wistar*), recorrendo ao ensaio de flexão em três pontos de diáfises femorais. Esse método serviu para determinar o módulo de elasticidade longitudinal de dois modelos animais: um modelo da redução de massa renal (modelo RMR, com 4 grupos e 33 fêmures) e um modelo do cancro da mama induzido pelo agente carcinogénico *N*-metil-*N*-nitrosureia (modelo MNU, com 5 grupos e 35 fêmures). Adicionalmente, procuramos validar o referido método recorrendo ao ensaio de compressão em segmentos das diáfises excisados após os ensaios de flexão. Nos capítulos precedentes foram sendo apresentadas as conclusões extraídas dos resultados obtidos. Neste capítulo iremos reunir essas conclusões.

### 6.2 ENSAIOS DE FLEXÃO

No presente trabalho foram examinados dois tipos de métodos de identificação do módulo de elasticidade longitudinal ( $E_L$ ) do tecido ósseo cortical, através de ensaios de flexão em três pontos de diáfise femorais: métodos diretos e métodos inversos. Os métodos diretos baseiam-se na teoria de vigas de Bernoulli-Euler, admitindo a hipótese da uniformidade da secção transversal das diáfises entre os apoios, tendo sido examinadas três variantes: (i) método baseado na aproximação da secção transversal por um anel circular ( $E_L^c$ ); (ii) método baseado na aproximação da secção transversal por um anel

elítico ( $E_L^e$ ); (iii) método baseado na secção transversal real ( $E_L^r$ ). Os dois primeiros métodos diretos constituem o *golden standard* atual da identificação de  $E_L$  em pequenos animais. Os métodos inversos baseiam-se na curva força-deslocamento experimental e na simulação do ensaio de flexão em três pontos, tendo sido analisadas duas variantes: (i) método proporcional, baseado na assunção de uma relação linear entre a rigidez e o módulo de elasticidade longitudinal ( $E_L^p$ ); (ii) método ótimo, assente num algoritmo de otimização que minimiza a discrepância entre a rigidez experimental e a rigidez numérica ( $E_L^o$ ). Na simulação por elementos finitos do ensaio de flexão foram usados modelos geométricos realistas das diáfises. Os métodos diretos e o método inverso proporcional foram aplicados a todos os fémures dos dois modelos animais (modelo RMR e modelo MNU). Em seguida vamos resumir as conclusões extraídas com o trabalho que foi efetuado sobre o ensaio de flexão.

1. Quer no grupo SO (grupo de controlo do modelo animal RMR), quer no grupo “controlo sedentário” (grupo de controlo do modelo animal MNU) observamos uma tendência consistente na ordem das tensões de cedência e dos módulos de elasticidade, obtidos através da teoria de Bernoulli-Euler:  $Y^c < Y^e, Y^r$  e  $E_L^c < E_L^e, E_L^r$ . Assim, a aproximação da secção da diáfise por um anel elítico é o método direto mais apropriado para a identificação de  $E_L$ , atendendo à sua maior facilidade de implementação.
2. Tanto no grupo SO como no grupo “controlo sedentário” constatamos que o método proporcional é o método inverso mais adequado, uma vez que requer menos tempo computacional e conduz aos mesmos resultados que o método ótimo.
3. Comparando os métodos inversos (proporcional ou ótimo) com os métodos diretos (com secção elítica ou com secção real) de identificação do módulo de elasticidade longitudinal, nos grupos de controlo dos modelos RMR (grupo SO) e MNU (grupo “controlo sedentário”), concluímos que o método inverso proporcional é o método mais apropriado para a identificação de  $E_L$ .

4. Os métodos inversos de identificação do módulo de elasticidade longitudinal referidos nos pontos 2 e 3, basearam-se em modelos geométricos das diáfises femorais construídos a partir de imagens fotográfica. Para avaliar a fidelidade desses modelos geométricos, utilizamos como comparação modelos geométricos construídos a partir de imagens de tomografia axial computadorizada (TAC). Os resultados obtidos permitem-nos concluir que o modelo baseado em fotografia reproduz com uma fidelidade aceitável a forma real das diáfises, embora seja necessário realizar trabalho adicional para uma conclusão mais sólida.
5. No modelo animal RMR, os grupos com redução da massa renal (grupos RMR e RMR+CAA) têm menor área que os respectivos grupos de controlo, submetidos a cirurgia simulada (grupos SO e SO+CAA), embora essa diferença não seja estatisticamente significativa. No modelo animal MNU, os grupos “controlo ativo” e “controlo sedentário” tem uma secção transversal com área ligeiramente maior (mas sem significado estatístico) que os restantes grupos, com cancro da mama (“MNU sedentário”, “MNU ativo 1” e “MNU ativo 2”).
6. Quanto aos parâmetros mecânicos estruturais (rigidez, força de cedência, força máxima e energia de rotura), no modelo animal RMR constatamos que os grupos com redução de massa renal (RMR e RMR+CAA) têm valores inferiores aos dos respectivos grupos de controlo, com cirurgia simulada (SO e SO+CAA); além disso, a administração de CAA não parece afetar os parâmetros mecânicos estruturais. Por outro lado, concluímos que o cancro mamário induzido pela MNU (modelo animal MNU) reduz os parâmetros mecânicos estruturais das diáfises femorais, mas que essa redução parece ser atenuada pelo exercício físico.
7. No modelo animal da redução de massa renal (modelo RMR) observamos uma tendência consistente de diminuição das tensões de cedência ( $Y^c$ ,  $Y^e$  e  $Y^r$ ) com a redução da massa renal, à semelhança do que acontece com os parâmetros mecânicos estruturais (ver ponto 6). No modelo animal do cancro da mama (modelo MNU) as tensões de cedência acompanham também a tendência de redução dos parâmetros mecânicos estruturais com a indução do cancro.

8. Assumindo que  $E_L^p$  é o valor representativo do módulo de elasticidade longitudinal, concluímos que a redução da massa renal (modelo animal RMR), assim como a administração de CAA, não influenciam o módulo de elasticidade longitudinal do tecido ósseo. No modelo animal MNU, não registamos qualquer efeito do cancro de mama induzido pelo agente MNU, assim como qualquer efeito da prática de exercício físico, sobre o módulo de elasticidade longitudinal do tecido ósseo cortical.

### **6.3 ENSAIOS DE COMPRESSÃO**

Conforme já foi referido, os ensaios de compressão tiveram como propósito inicial a validação dos resultados dos ensaios de flexão. Em certa medida, esse objetivo foi alcançado. Contudo, os resultados obtidos serviram essencialmente para demonstrar que é um ensaio viável para a identificação do módulo de elasticidade longitudinal do tecido ósseo cortical, alternativo ao ensaio de flexão. Mas vamos e seguida apresentar as conclusões a que chegamos sobre o ensaio de compressão.

1. A deformação determinada a partir do deslocamento do atuador conduz a curvas tensão-deformação que subestimam o módulo de elasticidade longitudinal, em uma ordem de grandeza.
2. A deformação obtida por correlação digital de imagem numa região de interesse da superfície dos provetes permite obter curvas tensão-deformação das quais se pode extrair o valor correto do módulo de elasticidade longitudinal.
3. Os provetes a usar nos ensaios de compressão (segmentos da diáfise) devem ter as faces de topo paralelas entre si e perpendiculares à direção de deslocamento do atuador.
4. Quando é usada a correlação digital de imagem, o módulo de elasticidade longitudinal identificado através dos ensaios de compressão é semelhante ao módulo

de elasticidade longitudinal obtido através dos ensaios de flexão em três pontos, aplicando o método inverso proporcional.

5. A vantagem do ensaio de compressão, relativamente ao ensaio de flexão em três pontos, é que proporciona um método direto de identificação do módulo de elasticidade longitudinal, que não exige a utilização de ferramentas avançadas de modelação (elementos finitos, otimização e modelação geométrica).



# Referências

Akhter M.P., Wells D.J., Short S.J., Cullen D.M., Johnson M.L., Haynatzki G.R., Babij P., Allen K.M., Yaworsky P.J., Bex F., Recker R.R.. Bone biomechanical properties in LRP5 mutant mice. *Bone* 35: 162–169, 2004.

An Y. H. e Draughn R.A.. *Mechanical Testing of Bone and the Bone-Implant Interface*. CRC Press, 2000.

Barengolts E.I., Lathon P.V., Curry D.J., Kukreja S.C.. Effects of endurance exercise on bone histomorphometric parameters in intact and ovariectomized rats. *Bone and Mineral* 26: 133-140, 1994.

Begonia M. T., Dallas M., Vizcarra B., Liu Y., Johnson M. L., Thiagarajan G.. Non-contact strain measurement in the mouse forearm loading model using digital image correlation (DIC). *Bone* 81: 593–601, 2015.

Bonnet N., Bernard P., Beaupied H., Bizot J.C., Trovero F., Courteix D., Benhamou C.L.. Various effects of antidepressant drugs on bone microarchitecture, mechanical properties and bone remodeling. *Toxicology and Applied Pharmacology* 221: 111–118, 2007.

Burr D. B. The contribution of the organic matrix to bone's material properties. *Bone* Vol. 31:8–11, 2002.

Cowin S.C.. *Bone Mechanics HANDBOOK*, Second edition, CRC Press, 2001.

Diaquino B., “Identificação das propriedades elásticas do tecido ósseo cortical usando o ensaio de Arcan.” Dissertação de Mestrado em Engenharia Mecânica. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 2011.

Dias M, Costa L. Viegas C. Alves H. Pires M.. *O Tecido Ósseo Biologia da Cicatrização*. Série Didáctica. Ciências Aplicadas; 280, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 2005.

Doblaré M., García J. M., Gómez M. J.. Modelling bone tissue fracture and healing: a review. *Engineering Fracture Mechanics*, 71: 1809–1840, 2004.

Dong X. N. e Guo X. E.. The dependence of transversely isotropic elasticity of human femoral cortical bone on porosity. *Journal of Biomechanics* 37: 1281–1287, 2004.

Emslander H., Sinaki M., Muhs J. M., Chao E. Y. S., Wahner H. W., Bryant S.C., Riggs B. L., Eastell R.. Bone Mass and Muscle Strength in Female College Athletes (Runners and Swimmers). *Mayo Clin Proc* 73: 1151-1160, 1998.

Ferreño D., Sainz-Ajaa J. A., Carrascala I. A, Diego S., Ruiza E., Casadoa J. A., Riancho J. A., Sañudo C., Gutiérrez-Solana F.. Orientation of whole bone samples of small rodents matters during bending tests. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 65: 200-212, 2017.

Funk J. R., Hale J. E., Carmines D., Gooch H. L., Hurwitz S. R.. Biomechanical Evaluation of Early Fracture Healing in Normal and Diabetic Rats. *Journal of Orthopaedic Research* 18: 126-132, 2000.

Hart K. J., Shaw J. M., Vajda E., Hegsted M., Miller S. C.. Swim-trained rats have greater bone mass, density, strength, and dynamics. *J Appl Physiol* 91: 1663–1668, 2001.

Hoshi A., Watanabe H., Chiba M., Inaba Y.. Effects of Exercise at Different Ages on Bone Density and Mechanical Properties of Femoral Bone of Aged Mice. *Tohoku J. Exp. Med.* 185: 15-24, 1998.

Iwasaki Y., Kazama J. J., Yamato H., Fukagawa M. Changes in chemical composition of cortical bone associated with bone fragility in rat model with chronic kidney disease. *Bone* 48: 1260–1267, 2011.

Jokihaara J., Järvinen T. L. N., Jolma P., Kööbi P., Kalliovalkama J., Tuukkanen J., Saha H., Sievänen H., Kannus P., Pörsti I.. Renal insufficiency-induced bone loss is associated with an increase in bone size and preservation of strength in rat proximal femur. *Bone* 39: 353–360, 2006.

Joyce H. Keyak, Tadashi S. Kaneko, Stephen A. Rossi, Marina R. Pejic, Jamshid Tehranzadeh, and Harry B. Skinner. Predicting the Strength of Femoral Shafts with and without Metastatic Lesions. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 439: 161–170, 2005.

Kasra M., Vanin C. M., MacLusky N. J., Casper R. F., e Grynopas M. D.. Effects of Different Estrogen and Progestin Regimens on the Mechanical Properties of Rat Femur. *Journal of Orthopaedic Research* 15: 118-123, 1997.

Lange M., Qvortrup K., Svendsen O. L., Flyvbjerg A., Nowak J., Petersen M. M., Ølgaard K., Feldt-Rasmussen U.. Abnormal bone collagen morphology and decreased bone strength in growth hormone-deficient rats. *Bone* 35: 178– 185, 2004.

Lavet C., Lapusta Y., Toussaint E., Labesse-Jied F., Poumarat G.. On measuring of overall mechanical properties of small animal bones using grid method. Springer Science+ Business Media B.V., 2009.

Lenthe G. H., Voide R., Boyd S. K., Müller R.. Tissue modulus calculated from beam theory is biased by bone size and geometry: Implications for the use of three-point bending tests to determine bone tissue modulus. *Bone* 43: 717–723, 2008.

Martin R. B., Burr D. B., Sharkey N. A.. *Skeletal Tissue Mechanics*. Springer-Verlag, New York, 1998.

Marwala, T.. *Introduction to Finite-element-model Updating*. Springer, 2010.

Meyer Jr R. A., Tsaahakis P. J., Martin D. F., Banks D. M., Harrow M. E., Kiebzak G. M.. Age and ovariectomy impair both the normalization of mechanical properties and the accretion of mineral by the fracture callus in rats. *Journal of Orthopaedic Research* 19: 428-435, 2001.

Mirzaali M., Schwiedrzik J., Thaiwichai S., Best J., Michler J., Zysset P., Wolfram U.. Mechanical properties of cortical bone and their relationship with age, gender, composition and microindentation properties in the elderly. *Bone*, 2016

Morais J.L., Dourado N.M., Xavier J.M., Sólidos elásticos. Série Didáctica. Ciências aplicadas; 293, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 2006.

Nogueira A., Vala H., Vasconcelos-Nóbrega C., Faustino-Rocha A. I., Pires C. A., Colaço A., Oliveira P. A., Pires M. J.. Long-term treatment with chaethomellic acid A reduces glomerulosclerosis and arteriolosclerosis in a rat model of chronic kidney disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 96: 489–496, 2017.

Orwoll E. S., Ferar J., Oviatt S. K., McClung M. R., Huntington K.. The Relationship of Swimming Exercise to Bone Mass in Men and Women. *Arch Intern Med* – Vol 149, 1989.

Pereira B., “Identificação numérica e experimental das propriedades elásticas do tecido ósseo cortical à escala do órgão” Dissertação de Mestrado em Engenharia Mecânica. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 2016.

Ramaswamy R. Correlating mechanical properties of cancellous bone in the rat with various density measures. Master of Science. Texas A&M University, 2003.

Reddy G. K., Stehno-Bittel L., Hamade S., Enwemeka C. S.. The biomechanical integrity of bone in experimental diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice* 54: 1–8, 2001.

Rho J. Y., Spearing L. K., Zioupos P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone, *Medical Engineering & Physics* 20: 92–102, 1998.

Schriefer J. L., Robling A.G., Warden S.J., Fournier A. J., Mason J. J., Turner C. H.. A comparison of mechanical properties derived from multiple skeletal sites in mice. *Journal of Biomechanics* 38: 467–475, 2005.

Schwartz A. V.. Diabetes Mellitus: Does it Affect Bone? *Calcified Tissue International* 73: 515–519, 2003.

Seeley R. R., Stephens T. D., Tate P., traduzido por Leal M.T., Durão M.C, Abecasis L.. *Anatomia e Fisiologia 6ed. Lusociência Edições Técnicas e Científicas, Lda. Lisboa, 2005.*

Sharir A., Barak M. M., Ron S.. Whole bone mechanics and mechanical testing. *The Veterinary Journal* 177: 8-17, 2008.

Silva, M. J., Brodt M. D., Fan Z., Jae-Young Rho J.-A.. Nanoindentation and whole-bone bending estimates of material properties in bones from the senescence accelerated mouse SAMP6. *Journal of Biomechanics*, 37: 1639–1646, 2004.

Sun L., Fan Y., Li D., Zhao F., Xie T., Yang X., Gu Z.. Evaluation of the mechanical properties of rat bone under simulated microgravity using nanoindentation. *Acta Biomaterialia* 5: 3506–3511, 2009.

Sutton M, Orteu JJ, Schreier H. Image correlation for shape, motion and deformation measurements: basic concepts, theory and applications. Springer, 2009.

Szabó M.E., Thurner P.J.. Anisotropy of bovine cortical bone tissue damage properties. *Journal of Biomechanics*, Volume 46: 2-6, 2013.

Turner C.H., Burr D.B.. Basic Biomechanical Measurements of Bone: a tutorial. *Bone* 14: 595-608, 1993.

Xavier J., Jesus A.M.P., Morais J.J.L., Pinto J.M.T. Stereovision measurements on evaluating the modulus of elasticity of wood by compression tests parallel to the grain. *Construction and Building Materials* 26: 207–215, 2012.

Zapico-Valle J.L., Alonso-Cambor R., Gonzalez-Martinez M.P., Garcia-Dieguez M.. A new method for finite element model updating in structural dynamics. *Mechanical Systems and Signal Processing* 24: 2137-2159, 2010.

Ziopoulos P., Currey J. D., Hamer A. J.. The role of collagen in the declining mechanical properties of aging human cortical bone. John Wiley & Sons, Inc. *J Biomed Mater Res*, 45: 108–116, 1999.