



OBTENÇÃO DE IMAGENS BI E TRIDIMENSIONAIS DE BIOMICROSCOPIA  
ULTRASSÔNICA ENDOLUMINAL DO CÓLON DE CAMUNDONGOS PARA  
DETERMINAÇÃO DE ESPESAMENTO DE PAREDE E VOLUME TUMORAL

Rodrigo Pereira de Oliveira

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

Orientadores: Prof. João Carlos Machado

OBTENÇÃO DE IMAGENS BI E TRIDIMENSIONAIS DE BIOMICROSCOPIA  
ULTRASSÔNICA ENDOLUMINAL DO CÓLON DE CAMUNDONGOS PARA  
DETERMINAÇÃO DE ESPESAMENTO DE PAREDE E VOLUME TUMORAL

Rodrigo Pereira de Oliveira

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

Examinada por:

---

Prof. João Carlos Machado, Ph.D.

---

Prof. Roberto Macoto Ichinose, D.Sc.

---

Prof. Andre Victor Alvarenga, D.Sc.

---

Prof. Heitor Siffert Pereira de Souza, Ph.D.

---

Prof. Denise Gonçalves Priolli, Ph.D.

Rio de Janeiro

Agosto de 2021

de Oliveira, Rodrigo Pereira.

Obtenção de Imagens Bi e Tridimensionais de Biomicroscopia Ultrassônica Endoluminal do Cólon de Camundongos para Determinação de Espessamento de Parede e Volume Tumoral / Rodrigo Pereira de Oliveira – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2021.

xxii, 80 f.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: João Carlos Machado

Tese (doutorado) – UFRJ/COPPE/Programa de Engenharia Biomédica, 2021.

Referências Bibliográficas: p. 66-**Erro! Indicador não definido..**

1. Biomicroscopia Ultrassônica. 2. Imagem 3D. 3. Câncer de Cólon. I. Machado, João Carlos II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Biomédica. III. Título.

## Agradecimentos

À minha família, mãe: Terezinha Pereira de Oliveira, pai: José Chaves de Oliveira e irmã: Lucila Pereira de Oliveira, pelo apoio e amor incondicional.

Ao meu orientador João Carlos Machado pela oportunidade, paciência e incentivo.

A todos os colaboradores do Programa de Engenharia Biomédica, em especial do Laboratório de Ultrassom.

A todos os colaboradores do *Sunnybrook Health Sciences Centre*, onde realizei parte do doutorado sob a supervisão da Dra. Christine Demore, por toda receptividade e cordialidade.

Às agências de Fomento CNPq, CAPES, FAPERJ.

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

OBTENÇÃO DE IMAGENS BI E TRIDIMENSIONAIS DE BIOMICROSCOPIA  
ULTRASSÔNICA ENDOLUMINAL DO CÓLON DE CAMUNDONGOS PARA  
DETERMINAÇÃO DE ESPESAMENTO DE PAREDE E VOLUME TUMORAL

Rodrigo Pereira de Oliveira

Agosto/2021

Orientadores: Prof. João Carlos Machado

Programa: Engenharia Biomédica

O câncer de intestino é o terceiro tipo de câncer mais frequente nos homens e o segundo nas mulheres. Apesar da alta incidência e alta taxa de mortalidade, a maioria dos casos pode ser prevenida através de técnicas para detecção precoce. Para isto, é importante a realização de trabalhos pré-clínicos, usando modelos animais de doenças do cólon, o que requer a implementação de instrumentação de apoio às investigações. Para tanto, a proposta de tese incluiu a implementação de uma técnica de geração de imagens tridimensionais de biomicroscopia ultrassônica endoluminal (BMUe-3D), operando em 40 MHz, a partir da segmentação semi-automática da região de interesse. Para gerar imagens de BMUe-3D, foram adquiridas múltiplas imagens de BMUe-2D (bidimensionais), com os planos de imagem regularmente espaçados. A técnica foi testada com *phantom* mimetizador do cólon de pequenos animais, na qual foi validada a técnica, e posteriormente com 18 camundongos *musculus/129SVJ/Tac*, *in vivo* e submetidos ao protocolo AOM/DSS. As imagens de BMUe-2D foram processadas para a medição do espessamento da parede do cólon de camundongos. Foi obtido um espessamento médio global (SD) de 0.230 (0.023) mm e 0.336 (0.086) mm para os grupos de animais com os cólons saudáveis e inflamados, respectivamente. O Sistema de BMUe estimou volumes na faixa de 0.174 mm<sup>3</sup> a 7.909 mm<sup>3</sup> para o *phantoms* de validação e 0.066 mm<sup>3</sup> a 6.082 mm<sup>3</sup> para os tumores identificados no cólon.

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

### 3D ENDOLUMINAL ULTRASOUND BIOMICROSCOPY OF MOUSE COLON WITH TUMOR VOLUME ESTIMATION

Rodrigo Pereira de Oliveira

August/2021

Advisors: Prof. João Carlos Machado

Department: Biomedical Engineering

Colon cancer is the third most common cancer for men and the second most common in women. Despite the high incidence and high mortality rate, most of the cases can be prevented by techniques for early detection. In this sense, it is important to conduct preclinical studies using animal models of colon diseases, which requires the implementation of instrumentation to support investigations. Therefore, the thesis proposal consists in implementing a technique to generate three dimensional endoluminal ultrasound biomicroscopic images (eUBM-3D), operating at 40 MHz, from a semi-automated segmentation of region of interest. In order to generate eUBM-3D images, were acquired a set of eUBM-2D images. The technique was tested, initially, in a phantom mimicking the colon of small animals, in which it was validated and thereafter with 18 mice, *musculus/129SVJ/Tac*, *in vivo* and it was submitted under the AOM/DSS protocol. BMUe-2D images was processed to measurement of the thickness from mice colon. It was obtained a global mean (SD) of 0.230 (0.023) mm e 0.336 (0.086) for normal and inflamated colon, respectivaly The eUBM system estimated volumes in the range of 0.174 mm<sup>3</sup> to 7.909 mm<sup>3</sup> for validation phantoms and 0.066 mm<sup>3</sup> to 6.082 mm<sup>3</sup> for mouse colon polypoid tumors.

# Sumário

1	Introdução.....	1
2	Objetivos.....	5
2.1	Objetivos Gerais .....	5
2.2	Objetivos Específicos .....	5
3	Revisão de Literatura e Fundamentação Teórica .....	7
3.1	Modalidade de Imagens Clínicas.....	7
3.2	Modelos animais de doenças em estudos pré-clínicos .....	8
3.3	Modalidade de Imagens para Pesquisa com Pequenos Animais .....	9
3.3.1	Biomicroscopia Ultrassônica.....	13
3.4	Anatomia do Cólon.....	17
3.5	<i>Phantom de ultrassom de cólon</i> .....	19
4	Materiais e métodos.....	22
4.1	Phantoms de ultrassom .....	22
4.1.1	Construção dos Phantoms.....	22
4.1.2	Phantom para validação de estimativa de volume.....	24
4.1.3	Phantom multicamadas mimetizador de cólon.....	26
4.2	Animais.....	28
4.3	Indução de tumor de cólon .....	28
4.4	Preparação do animal para aquisição de imagens de colonoscopia e BMUe.....	29
4.5	Sistema de geração e aquisição de imagens de colonoscopia e BMUe.....	30
4.6	Geração de Imagem de BMUe-3D .....	38
4.7	Segmentação da imagem BMUe dos alvos nos phantoms e de tumor polipoide e estimativa de volume .....	39

4.8 Segmentação de imagem de BMUe-2D e medição de espessamento da parede do cólon .....	45
4.9 Cálculo estatístico.....	46
4.10 Análise da Histologia.....	47
5 Resultados.....	48
5.1 <i>Phantom</i> .....	48
5.1.1 Phantoms para validação de estimativa de volume .....	48
5.1.2 Phantom multicamadas mimetizador de cólon.....	50
5.1.3 Teste de espaçamento ideal entre Planos de Imagem de entrada .....	51
5.2 Animal .....	51
6 Discussão.....	60
7 Conclusão .....	64
8 Referências bibliográficas .....	66
8.1 Aprovação CEUA.....	72



# 1 Introdução

O INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (2021) estimou o diagnóstico de câncer coloretal (*colorectal cancer* - CRC) em 20.540 novos casos anuais em homens e 20.470 novos caso em mulheres, para o triênio 2019-2022 no Brasil. Enquanto que, o equivalente americano ao INCA, a Sociedade Americana de Câncer (*American Cancer Society* – ACS) estimou para 2021 a detecção de 104.270 novos casos de câncer de colón, com estimativa de 52.980 óbitos em decorrência da doença (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020). O câncer é a principal causa de morte no mundo (PORATTI, 2019), com o câncer colorretal figurando entre o terceiro e quarto tipo mais comum de câncer diagnosticado mundialmente, e o terceiro em número de mortes (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020).

Apesar da alta incidência e alta taxa de mortalidade, a maioria dos casos de câncer de cólon poderia ser prevenida através de técnicas para detecção precoce, acompanhamento e incremento de testes de diagnósticos mais avançados (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020). Na década passada houve uma redução significativa na incidência do câncer de cólon e na mortalidade devido a essa doença e essa diminuição deveu-se à ampla prevenção, ao diagnóstico precoce através de testes de diagnóstico e ao aumento do acesso à utilização das técnicas de diagnóstico de tumores malignos de cólon (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020).

O câncer de cólon esporádico representa 80% dos casos e desenvolve-se lentamente, levando cerca de 10 a 15 anos. Tipicamente, o tumor começa como um pólipó (crescimento de um tecido na luz do cólon ou do reto), não cancerígeno, que pode tornar-se maligno. Certos tipos de pólipos, chamados de pólipos de adenoma, são comuns, principalmente em pacientes idosos, e acometem de um terço à metade da

população. Contudo, menos de 10% dos adenomas progridem para o câncer (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020). A sequência adenoma-carcinoma no câncer de cólon esporádico compartilha algumas alterações genéticas com o câncer de cólon associado à inflamação, no qual a presença de inflamação crônica pode predispor à malignização (BEAUGERIE, 2015).

Indivíduos com doenças inflamatórias no intestino, (*inflammatory bowel disease* - IBD), como a doença de Crohn (*Crohn's disease* - CD), ou colite ulcerativa tem alto risco de desenvolver CRC, sendo maior do que em indivíduos saudáveis. Esta doença pode se desenvolver espontaneamente, ou como complicações tardias de inflamações crônicas. Acima de 20% dos casos de câncer são associados com alguma forma de inflamação crônica, 30% são associados ao fumo e inalação de poluentes e 30% são atribuídos a hábitos alimentares, considerando que 20% dos casos são relacionados à obesidade, assim o risco de desenvolvimento de tumores cancerígenos está diretamente relacionado à extensão e duração dos fatores de risco citados (DE ROBERTIS, 2011). Uma inflamação crônica que precede o desenvolvimento do tumor gera uma desregulação do sistema imunológico e a IBD representa um exemplo da condição que aumenta drasticamente o risco de CRC (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020).

Segundo a Sociedade Americana de Câncer, exames de fezes, sigmoscopia e tomografia computadorizada são exames do cólon complementares à colonoscopia, a qual é apontada como o exame padrão ouro, devido à alta sensibilidade e possibilidade de ressecção endoscópica das lesões, simultaneamente ao exame (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020). Apesar de ser o exame padrão ouro para o diagnóstico de lesões e tumores no cólon, esta técnica nem sempre é capaz de identificar pequenas lesões, especialmente lesões polipoides e outras localizadas na parede do cólon. É estimado que a colonoscopia previne cerca 65% dos casos de câncer de cólon

(AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020), com cerca de 34% de falha na detecção de casos para adenomas achatados, 27% para pólipos serrilhados e 14% para adenomas avançados, com falhas na detecção mais frequentes do que se supunha previamente (ZHAO, 2019).

Contudo, com a relevante taxa de falhas na detecção de lesões do exame endoscópico, principalmente as não-polipóides e outras localizadas no interior da parede do cólon, considerando-se que a inspeção é apenas na superfície, existem alguns trabalhos realizados provando a eficácia do uso do ultrassom endoscópico na avaliação de lesões do cólon em estudos pré-clínicos (OLIVEIRA, 2019; ALVES, 2013; DE BRITTO, 2013; SOLETTI, 2013), com a aplicação de ondas de alta frequência, capazes de avaliar a profundidade de invasão da lesão nas camadas intestinais. Esses estudos pré-clínicos reforçam a capacidade da utilização do colonoscópio, conjugado com o ultrassom, como uma ferramenta diagnóstica nas lesões do cólon. Esta ferramenta tem alta sensibilidade, com resolução de 30  $\mu\text{m}$  (axial) e 72  $\mu\text{m}$  (lateral) em frequências de 40 MHz, adequado para trabalhos com pequenos animais, ratos e camundongos, que em muitos casos é um caminho utilizado para testar instrumentação com algumas adaptações (OLIVEIRA, 2019, ALVES, 2013; DE BRITTO, 2013; SOLETTI, 2013).

FREELING (2016) testaram o uso da biomicroscopia ultrassônica (BMU) para realização de imagens 3D de tumores de cólon em modelos animais para CRC, empregando um método de imagem transabdominal e não invasivo. Neste estudo foi relatado a capacidade do sistema em quantificar a dinâmica do crescimento tumoral e rastrear sua resposta a um tratamento (FREELING, 2016).

Nesse contexto, uma estratégia para aumentar a eficiência da técnica de Ultrassom (US), verificando todo o tecido, é a geração de imagens de Biomicroscopia Ultrassônica endoluminal (BMUe) em 3 dimensões (BMUe-3D). Em particular, a

quantificação volumétrica de tumores como importante ferramenta de acompanhamento da eficácia de terapias e rastreamento da resposta de tumores à terapias anti-câncer, com imagens 3D minimizando erros, comuns em imagens 2D, como: falhas na detecção de lesões não polipoides, ou lesões dentro da parede do cólon, e falhas na classificação de estágio tumoral. Exemplos de quantificações volumétricas de tumores foram reportadas por SCHRAMM (2013) baseados em imagens de tomografia computadorizada (CT – *Computed Tomography*) do trato gastrointestinal, por NOUGARET (2012) e por LAMBREGTS (2015) baseado em imagens de ressonância magnética do CRC.

Nesse contexto, a BMUe é uma tecnologia de imagem com capacidade de aumentar o índice de detecção de tumores, que são difíceis ou impossíveis de serem detectadas por técnicas atuais. Providenciando análises histológicas virtuais e em tempo real, com detecção de lesões (OLIVEIRA, 2019; SOLETTI, 2013; ALVES, 2013; SOLETTI, 2012). Assim, a obtenção de imagem de US em três dimensões (US-3D) pode ser vantajosa, permitindo a visualização do órgão em qualquer direção e a sua estimativa de volume (FREELING, 2016; MARTINS, 2015), a quantificação da variação do volume de tumor (SCHRAMM 2013), e a diminuição do fator operador-dependente (SOLETTI, 2013; ALVES, 2013; SOLETTI, 2012).

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivos Gerais

Desenvolver e testar um sistema de imagens de Biomicroscopia Ultrassônica Endoluminal bidimensional (BMUe-2D), com pós renderização de imagens de BMUe-3D, para obtenção de imagens de *phantom* mimetizador de cólon de camundongo e de cólon de camundongos com tumores para a determinação de espessamento de parede e volume tumoral.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver e testar instrumentação para obtenção automatizada e simultânea das imagens de endoscopia e de BMUe-2D (bidimensional) em planos de imagem regularmente igualmente espaçados entre si, para a renderização de imagens de BMUe-3D;
- Confeção de Phantoms mimetizadores de cólon de camundongo  
Obtenção de imagens de BMUe-2D do cólon de camundongos sadios e com tumor;
- Segmentação da parede do cólon e determinação de espessamento;
- Desenvolvimento e teste de um método semiautomático de segmentação de uma sequência de imagens de BMUe-2D;

- Renderização de imagens de BMUe-3D a partir de uma sequência de imagens de BMUe-2D dos *phantoms*, do cólon de camundongos sadios e do cólon de camundongos com tumor;
- Estimativa do volume tumoral a partir das imagens de BMUe-3D.

## 3 Revisão de Literatura e Fundamentação Teórica

### 3.1 Modalidade de Imagens Clínicas

No contexto de imagens clínicas e diagnóstico precoce para humanos, os testes por imagem mais utilizados para detecção de pólipos são: sigmoidoscopia, tomografia computadorizada e colonoscopia. (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020; SCHRAMM, 2013).

A sigmoidoscopia consiste de um tubo flexível, delgado, oco e iluminado que é inserido, por um examinador treinado, no cólon sigmoide através do reto. Permite visualizações do reto e do cólon sigmoide, sendo necessária uma simples limpeza do cólon na preparação desse exame, que é realizado sob sedação. Se houver um pólipos ou um tumor presente é recomendado ao paciente uma colonoscopia (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020).

A tomografia computadorizada do cólon é uma colonoscopia virtual, sendo que este procedimento de imagem resulta em visualizações 3D e 2D detalhadas do cólon e do reto, baseando-se no uso de uma máquina de raios-X especial, interligada a um computador. No entanto, é necessária a limpeza completa do intestino para o sucesso do exame e o procedimento não requer sedação. No início do exame, um cateter é inserido no reto para permitir a entrada do gás dióxido de carbono que expande o cólon e logo após, o paciente passa pelo *scanner*, que gera múltiplas imagens do interior do cólon. Este procedimento é menos invasivo que outros, não necessita de tempo de recuperação do paciente e leva cerca de 15 minutos para ser concluído. Pacientes com pólipos de tamanho significantes, maiores que 5 mm, ou outros resultados anormais são encaminhados para a colonoscopia. Estudos demonstram que o desempenho do

tomógrafo é similar ao da colonoscopia óptica para a detecção de câncer invasivo ou pólipos de aproximadamente 1 cm (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020; SIEGEL, 2019; SCHRAMM, 2013).

A colonoscopia, assim como a sigmoidoscopia, permite um exame visual direto do cólon e do reto. Um colonoscópio, similar a um sigmoidoscópio, é mais alongado e mais complexo, capaz de permitir a visualização do cólon inteiro e a remoção de pólipos, se presentes. Antes da realização da colonoscopia, é realizada uma limpeza completa do cólon, através da utilização de agentes laxantes, e o paciente é sedado durante o exame para diminuir o desconforto. Se um pólipo for encontrado, o mesmo pode ser removido passando-se um instrumento através do canal de trabalho do colonoscópio, para remoção o pólipo da parede do cólon por ressecção elétrica. Estudos mostram que, atualmente, o colonoscópio é o método mais sensível para a detecção do câncer de cólon e de pólipos adenomatosos. A triagem por colonoscopia tem uma série de vantagens: grande sensibilidade, exame do cólon inteiro, o diagnóstico e a retirada de pólipos em um mesmo exame (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020; ZHAO, 2019).

### **3.2 Modelos animais de doenças em estudos pré-clínicos**

Modelos animais de doenças humanas em estudos pré-clínicos tem vital importância para o desenvolvimento de instrumentação usada no acompanhamento do desenvolvimento e elucidação de doenças (CHORILLI, 2007; FREELING, 2016). Vários avanços foram obtidos com estudos pré-clínicos, como descoberta da insulina, desenvolvimento de vacinas, uso terapêutico de antibióticos e desenvolvimento de técnicas de transplante de órgãos. No entanto, deve ser observada a impossibilidade, ou



já esgotamento, de outros métodos de estudo como *ex vivo* e *in vitro*, sendo os modelos animais *in vivo* vantajosos, pois fornecem informações sobre o organismo, no desenvolvimento de uma doença, ou resposta a um fármaco. Os camundongos são os mais utilizados para estudos pré-clínicos e dentre suas principais vantagens estão: o tamanho reduzido, o curto período de gestação, e a facilidade de proliferação, manutenção e domesticação (CHORILLI, 2007).

Estudo envolvendo animais não substituem os estudos clínicos, no entanto estudos pré-clínicos devem ser usados oportunamente para a formulação de novas técnicas de diagnósticos e terapias orientadas, de forma a se tornarem mais focadas, com forte incremento na possibilidade de sucesso. De fato, modelos animais não são os únicos instrumentos para estudos de descoberta de novos mecanismos da fisiopatologia da CRC, mas são também ferramentas promissoras para o avanço e entendimento das respostas tumorais para a inovação de estratégias quimiopreventivas e terapêuticas (DE ROBERTIS, 2011).

### **3.3 Modalidade de Imagens para Pesquisa com Pequenos**

#### **Animais**

Testes pré-clínicos, baseados em modelos animais para CRC, podem ser empregados para determinar o potencial de diagnósticos da técnica de BMUe-3D proposta. Cada vez mais, exames com imagens são indispensáveis nas práticas clínicas, e como consequência, houve um aumento significativo na obtenção de imagens de pequenos animais, *in vivo*, para estudos pré-clínicos. Em geral, as imagens de pequenos animais são baseadas em métodos não invasivos para a observação de estruturas

anatômicas e funções biológicas, *in vivo*, produzindo informações sobre os tecidos saudáveis e não saudáveis, tais como tumores (OLIVEIRA, 2019; FREELING, 2016; SOLETTI, 2013; ZANZONICO, 2011).

A natureza não invasiva do imageamento permite uma série de estudos longitudinais com modelos animais para doenças humanas, como: câncer, doenças cardiovasculares, doenças neurológicas, entre outras. Estes estudos podem ser direcionados para o diagnóstico da doença, o monitoramento do efeito de um tratamento, ou outro tipo de intervenção. Como exemplo, pode ser citado o acompanhamento do processo de tumorigênese ou metástase (FREELING, 2016; ZANZONICO, 2011; KLESSILING, 2011).

Várias modalidades de imagem são usadas clinicamente, como:

- Imagem por Ressonância Magnética (MRI – *Magnetic Resonance Imaging*) (NOUGARET, 2012; LAMBREGTS, 2015; ZANZONICO, 2011);
- Imagem de Ressonância Magnética por Espectroscopia (MRSI - *Magnetic Resonance Spectroscopic Imaging*) (ZANZONICO, 2011);
- Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET – *Positron Emission Tomography*) (SCHRAMM 2013; ZANZONICO, 2011);
- Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único (SPECT – *Single-Photon Emission Computed Tomography*) (ZANZONICO, 2011);
- Tomografia Computadorizada (CT – *Computed Tomography*) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020; SIEGEL, 2019; SCHRAMM, 2013),
- Ultrassom (SCHRAMM, 2013).

A instrumentação clínica para imageamento de pequenos animais é inadequada, devido baixa resolução espacial, para adquirir imagem de tecidos, e devido dimensões do equipamento, projetado para humanos. Assim, é necessário projetar e construir

equipamentos com maior resolução espacial e dedicados para a aquisição de imagens, com resolução e dimensões adequadas ao uso em pequenos animais (FREELING, 2016; ZANZONICO, 2011).

A aplicação dessas modalidades de imagem clínica em pesquisas pré-clínicas envolvendo pequenos animais encontra espaço na pesquisa translacional reversa (ZANZONICO, 2011), o que requer um incremento em performance, especialmente em resolução espacial. Na Tabela 1 é mostrada uma comparação entre as diferentes modalidades de imagem, assim como as necessidades para uma adaptação do equipamento clínico para pré-clínico.

*Tabela 3.1.1: Resolução espacial comparativa entre exames de imagem clínico e pré-clínico (ZANZONICO, 2011)*

Modalidade	Resolução Espacial		Refinamento
	Clínica	Pré-clínica	
MRI	1 mm	<100 $\mu$ m	Campos magnético mais intensos e bobinas melhores
MRSI	1 cm	2 mm	Campos magnético mais intensos e bobinas melhores
PET	5 mm	1-2 mm	Redução do sensor e anéis detectores menores
SPECT	1 cm	0,5-2 mm	Câmera com maior ampliação
CT	1-2 mm	<200 $\mu$ m	Aumento no fluxo de raios X, diminuição do ponto focal e maior ampliação
US	1-2 mm	<100 $\mu$ m	Maior frequência

Na Tabela 3.1.2 são apresentadas as características das diferentes modalidades de imageamento para pequenos animais.

*Tabela 3.1.2: Características das diferentes modalidades de imagens em pequenos animais (ZANZONICO, 2011)*

Modalidade	Resolução espacial	Imagem dinâmica	Dose de Radiação (cGy)	Custo do equipamento (aproximado)
MRI	<100 µm	Sim	0	\$1 milhão
MRSI	2 mm	Não	0	\$800 mil
PET	1-2 mm	SIM	10-100	\$800 mil
SPECT	0,5-2 mm	Não	10-100	\$800 mil
CT	<200 µm	Não	10-20	\$400 mil
US	<100 µm	Sim	0	\$400 mil

Na Tabela 3.1.2 se observa que a dose de radiação absorvida (cGy) é zero nas modalidades MRI, MRSI e US. Nas modalidades PET e SPECT há uma dose de radiação absorvida considerável. Esta radiação é uma variável que pode influenciar nas lesões ou tumores, com alterações genéticas nas células, que podem ser replicadas (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020). As modalidades MRI, CT E US são consideradas modalidades de imagem estrutural, devido à alta resolução na visualização da anatomia. MRSI, PET e SPECT são modalidades, geralmente, consideradas como “funcional” ou “molecular” (ZANZONICO, 2011).

US, CT e MRI são consideradas as modalidades mais adequadas para determinação de lesões (KLESSILING, 2011). Dentre as modalidades comparadas, a quem tem um menor custo relativo é a modalidade de US, que também tem alta resolução. No entanto, o US é uma modalidade de imagem operador-dependente, a

menos que um método de escaneamento automatizado seja implementado para a aquisição de múltiplas imagens capazes de permitir a reconstrução anatômica da região investigada (FREELING, 2016; KLESSILING, 2011).

Trabalhos realizados por ALVES (2013) e SOLETTI (2013) concluíram que a associação da BMUe com a colonoscopia aumenta a acurácia na detecção de lesões no cólon de camundongos, com ambas as técnicas complementando uma a outra. No entanto, devido à técnica de BMUe gerar imagens em duas dimensões (2D), transversais e em modo B, como imagens convencionais de US, esse fator apresenta uma característica de dependente operador, fornecendo uma sub-amostra do volume anatômico do tecido (ALVES, 2013; SOLETTI, 2013).

### **3.3.1 Biomicroscopia Ultrassônica**

Clinicamente, o US é usado para a caracterização de tecido biológico, determinação de funções cardíacas, diagnósticos e avaliação do desenvolvimento fetal, em emergências médicas, em triagens, na avaliação de tumores e como ferramenta para guiar procedimentos invasivos (FOSTER, 2011). Usualmente, os transdutores ultrassônicos usados em ultrassonografia endoscópica clínica operam na faixa de frequências entre 7,5-12 MHz, sendo que frequências mais elevadas são também empregadas (ALVES, 2013). ESTE PARÁGRAFO ESTÁ PERDIDO EM TERMOS DE CONTEXTO

Uma tecnologia relevante é a Biomicroscopia Ultrassônica (BMU), baseada em ultrassom de alta resolução em imagem 2D, com frequência variando de 20 MHz a 100 MHz, que visualiza tecidos *in vivo* (SOLETTI, 2012; SOLETTI 2013; KLESSILING, 2011). A qualidade da resolução espacial em imagens de US é diretamente proporcional

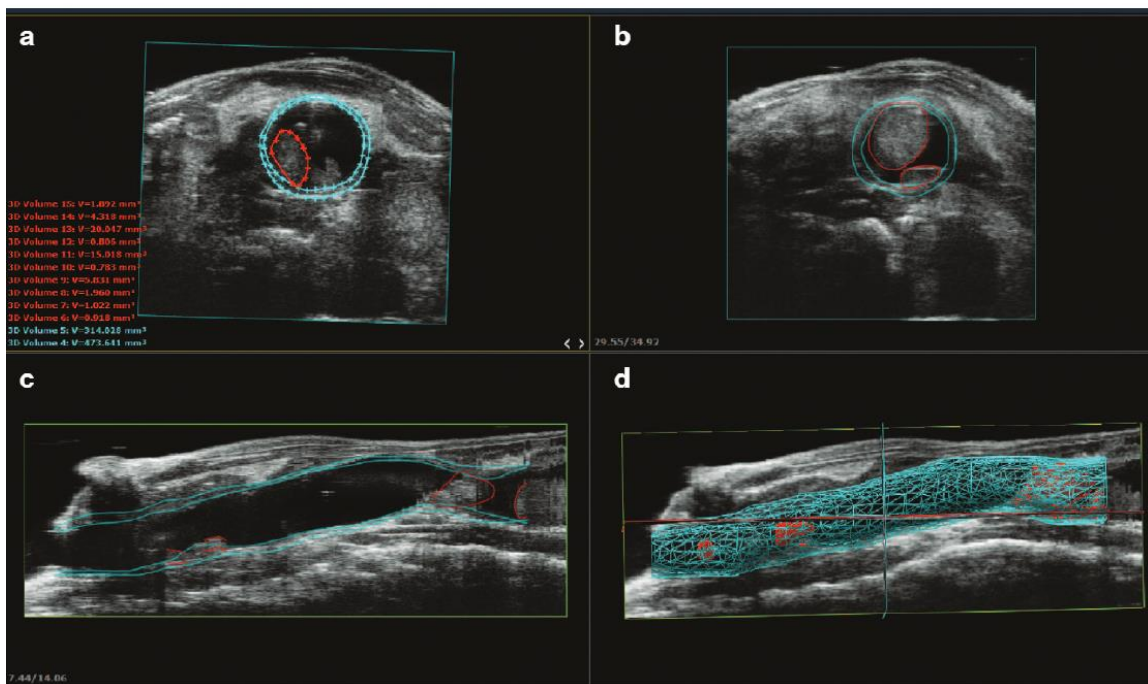
à frequência e a profundidade de penetração do US é inversamente proporcional à frequência. Assim, o aumento da frequência de US aumenta a resolução da imagem, mas diminui a profundidade de penetração do US, limitando a profundidade da imagem.

Um sistema de BMUe desenvolvido no Laboratório de Ultrassom (LUS) do Programa de Engenharia Biomédica (PEB) do Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia (COPPE) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), operando em 40 MHz e com capacidade de resolução axial de 40  $\mu\text{m}$ , foi utilizado por ALVES (2013) e SOLETTI (2013), para a obtenção, *in vivo*, de imagens de tumores do cólon de camundongo. DE BRITTO (2013) utilizou o mesmo sistema de BMUe para obtenção, *in vivo*, em modelo animal de inflamação para ratos. Os resultados demonstraram a viabilidade da BMUe como ferramenta de imagem para identificar as principais camadas do cólon em murinos.

MARTINS (2015) usou um sistema de BMU, extracorpóreo, para adquirir imagens de BMU-2D do músculo gastrocnêmio lateral de rato e renderizar imagem BMU-3D desse músculo. Essa imagem 3D foi gerada a partir de um conjunto de imagens 2D, obtidas de planos paralelos e igualmente espaçados entre si (MARTINS, 2015).

FREELING (2016) realizou um trabalho com BMU-3D (ou micro-ultrassom), de alta resolução, para inspeção e aquisição de imagem de cólon de camundongo, com renderização 3D e baseado na aquisição de imagens de BMU transabdominal. Esse mesmo trabalho demonstrou a viabilidade de quantificar o crescimento de tumores e rastrear a resposta ao tratamento quimioterápico, comprovando com sucesso essa técnica para a geração de imagens e visualização de CRC. Como resultados, foram encontrados facilmente tumores com volume de 0,5  $\text{mm}^3$  e, no caso extremo, tumores com volume de 0,1  $\text{mm}^3$ , segundo os autores. Na Figura 1 são mostradas imagens de

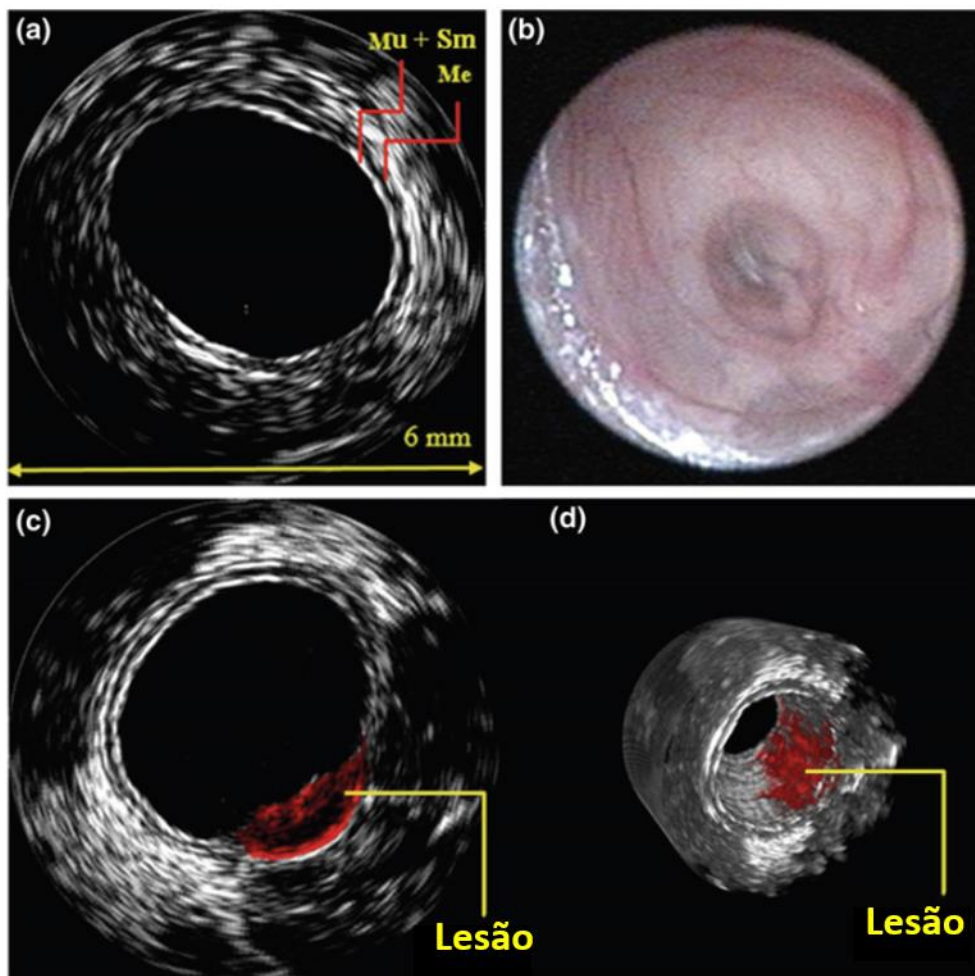
BMU transabdominal em planos coronais da região abdominal do animal, com as bordas das camadas do cólon marcadas em azul e o tumor circunscrito ao traçado em vermelho (a e b), e imagens em planos sagitais contendo o cólon (bordas marcadas em azul) e o os tumores circunscrito ao traçado em vermelho (c e d).



*Figura 3.2.1: Rederização das imagens de 3D NÃO HÁ IMAGENS 3D. (a) Imagem em plano coronal de BMU transabdominal da região abdominal do animal contendo uma seção do cólon com um tumor, com as bordas do cólon marcadas em azul e o tumor circunscrito ao traçado em vermelho; (b) Semelhante a imagem em (a), porém com a presença de dois tumores; (c e d) Imagens em planos sagitais com múltiplos tumores do cólon, com as bordas do cólon marcadas em azul e os tumores circunscrito ao traçado em vermelho (FREELING, 2016).*

OLIVEIRA (2019) utilizou um sistema de BMUe, desenvolvido no LUS/PEB/COPPE/UFRJ, para adquirir simultaneamente imagens de colonoscopia e imagens BMUe-2D de um cólon de camundongo normal e com lesão, para renderizar imagens em BMUE-3D (OLIVEIRA ,2019). O referido trabalho realizou-se seguindo a linha de pesquisa, já implementada pelo grupo, na qual já havia sido comprovada a capacidade do sistema de adquirir imagens de BMUe com imagens de colonoscopia, assim como, distinguir diferentes camadas do cólon. Ainda neste referido trabalho, foi

novamente demonstrada a capacidade do sistema em realizar a aquisição de uma sequência de imagens BMUe-2D, com planos de imagens paralelos e regularmente espaçados. Na Figura 3.2.2 é mostrada uma figura com as imagens obtidas ainda em 2018, contendo uma imagem de BMUe-2D do cólon de um animal saudável (Figura a), onde é possível diferenciar as camadas (Mu + Sm = Mucosa + Submucosa e Me = Muscular externa) e a correspondente imagem de colonoscopia do cólon saudável (Figura b). Há também uma imagem de BMUe-2D do cólon, de outro animal com lesão e marcado em vermelho (Figura c) e uma imagem de BMUe-3D (Figura d) do cólon com lesão e do mesmo animal em (Figura c).



*Figura 3.2.2. (a) Imagem de BMUe-2D com indicação das camadas do cólon de um animal saudável (Mu + Sm = Mucosa + Submucosa e Me = Muscular externa); (b) Imagem de colonoscopia do cólon do mesmo animal da imagem anterior; (c) Imagem*



*de BMUe-2D, do cólon com lesão, marcada em vermelho;(d) Imagem de BMUe-3D do colón com lesão (OLIVEIRA, 2019).*

Assim, são encontrados na literatura alguns trabalhos sobre BMU-3D e BMUe-2D de pequenos animais, ainda que muito escassos para BMU-3D e mais escassos ainda para BMUe-3D, onde deve ser considerado o estágio embrionário da área de estudo, mesmo com alguns trabalhos publicados.

### **3.4 Anatomia do Cólon**

O cólon, nos seres humanos, é um órgão que faz parte do intestino grosso. Possui cerca de 1,5 metros de comprimento e é constituído de quatro partes: cólon ascendente (ligado ao ceco), transverso, descendente e sigmoide (TORTURA, 2008 e AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020). Enquanto o cólon de um camundongo tem cerca de 5 centímetro e faz junção diretamente com o ceco e o ânus (NGUYEN, 2015; RANDALL, 2011). Existem diferenças no cólon dos mamíferos, para uma comparação específica entre humanos e murinos. Mas com a mesma estrutura básica, ou seja com 4 camadas concêntricas e funcionais (RANDALL, 2011). Assim, a parede do cólon é formada por quatro camadas, sendo que as camadas mais internas para a mais externa são:

- **Mucosa:** membrana composta de uma camada de epitélio (é um entre os quatro tecidos básicos do corpo humano, juntamente como o tecido conjuntivo, muscular e nervoso) em contato direto com conteúdo do trato gastrointestinal, de uma camada de tecido conjuntivo, chamada de lâmina própria, e de uma fina camada lisa de músculo;

- **Submucosa:** formada por um tecido conjuntivo areolar que liga a mucosa ao tecido muscular. Contém muita vascularização e vários vasos linfáticos que absorvem moléculas do bolo alimentar;
- **Muscular externa:** é formada por um tecido muscular liso composto de duas camadas, uma com fibras circulares e outra com fibras longitudinais. É responsável pelas contrações involuntárias que resultam no movimento peristáltico que propõe o material contido no interior do trato intestinal.
- **Serosa:** é composto por um tecido conectivo areolar e um mesotélio, um tipo de epitélio que reveste as cavidades, neste caso o cólon.

Na Figura 3.4.1 é mostrada uma ilustração, com corte transversal, das camadas do cólon, com a indicação de cada camada e de seus componentes. O lúmen é a parte central e oca.

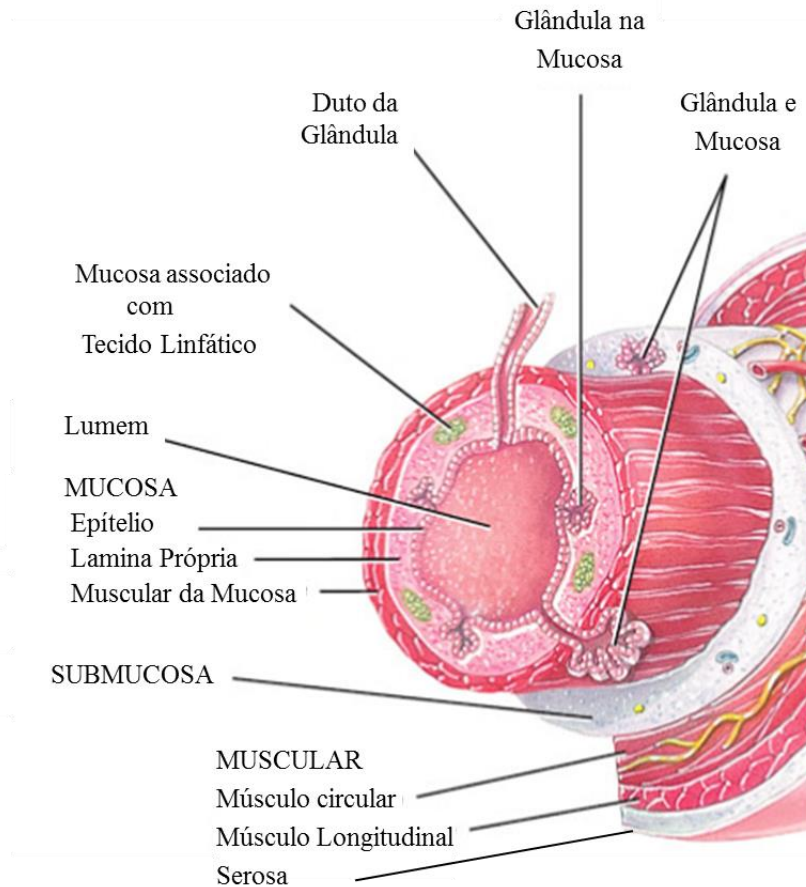


Figura 3.4.1. Anatomia do Cólon, com indicação das camadas Mucosa, Submucosa, Muscular externa e Serosa. (TORTURA, 2008).

### 3.5 Phantom de ultrassom de cólon

*Phantoms* de ultrassom constituem-se em corpos de prova usados para mimetizar as propriedades de propagação do ultrassom em tecidos biológicos. Geralmente, são confeccionados de modo a imitar a anatomia e características dos tecidos ou até mesmo um determinado órgão. Existem *phantoms* de ultrassom que mimetizam tecidos a pele, o colón, a mama, entre outros.

A grande maioria dos *phantoms* de ultrassom é construída por géis à base d'água compostos de ágar ou gelatina animal, com adição de espalhadores para a produção de *speckle* nas imagens ultrassônicas. São amplamente utilizados em testes de instrumentação de ultrassom para obtenção de imagens ultrassônicas (RYAN, 1997).

RYAN (1997) confeccionou 3 *phantoms*, em moldes cilíndricos, para mimetizar as camadas de vasos sanguíneos e testar um sistema de ultrassom intravascular (IVUS – *Intravascular Ultrasound*). Dois *phantoms* homogêneos, um chamado de “*soft*” e outro chamado de “*hard*”, foram construídos com o uso de gelatina (derivada de pele suína) nas concentrações de 15% e 30% à massa de água, respectivamente. Um terceiro *phantom* foi confeccionado com duas camadas concêntricas, sendo uma *soft* e a outra *hard*. Os *phantoms* usaram pó de sílica, na concentração de 2% da massa de água, como espalhador de ultrassom. Para completar o processo de solidificação, o *phantom* foi refrigerado a 5°C por algumas horas e estabilizado em glutaraldeído (47%-53%) por 5 minutos. Nesse estudo, os autores verificaram a compatibilidade entre os *phantoms* construídos e tecidos biológicos que formam a parede do vaso sanguíneo, incluindo a velocidade de propagação do US e elasticidade da parede do *phantom*.

NASCIMENTO (2012) confeccionou *phantoms* para mimetizar a pele com e sem lesões de melanoma. Os *phantoms* foram constituídos de 3 camadas, cada uma correspondendo a uma das camadas da pele, constituídas de pele de porco, na concentração de 10% da massa de água. O que diferenciou cada camada foi a quantidade e o espalhador utilizado, sendo que para a camada correspondente à epiderme foi utilizada gelatina pura (sem espalhador), para a derme usou-se pó de grafite na proporção de 30% da massa de água e para a hipoderme usou-se pó de sílica na proporção de 40% da massa de água.

OLIVEIRA (2016) confeccionou um *phantom* homogêneo para mimetizar o cólon de pequenos animais, misturando pó de gelatina, com concentração de 20% da massa de água filtrada e deionizada, com pó de sílica na concentração de 5% da massa de água, e utilizando um molde cilíndrico.

## 4 Materiais e métodos

A geração de imagens de BMUe-3D foi realizada em duas diferentes etapas: na primeira delas as imagens foram obtidas de *phantoms* de ultrassom e para isso foram confeccionados *phantoms* mimetizadores de cólon de camundongos e *phantoms* para validação do sistema de quantificação de volume, para o testar e desenvolver o sistema de BMUe-3D. Neste caso foi implementado um sistema de aquisição de uma sequência de imagens de BMUe-2D regularmente espaçadas e foram também desenvolvidos um método semiautomático para a segmentação de imagens, um protocolo para renderização 3D e um método para quantificação de volume de um alvo nos *phantoms* ou de tumores de cólon. Na segunda etapa foram obtidas imagens de BMUe-2D de cólon de camundongo, com os animais distribuídos em grupo controle e com indução de tumor de cólon. As imagens de BMUe-2D foram processadas, para se determinar a espessura da parede do cólon, para a geração de imagens de BMUe-3D e para a medição do volume de tumores.

Neste capítulo também serão ainda apresentados o sistema de aquisição e de geração de imagens de BMUe e o protocolo de indução de tumores.

### 4.1 Phantoms de ultrassom

#### 4.1.1 Construção dos *Phantoms*

Para a construção dos *phantoms* foi utilizada a metodologia descrita por OLIVEIRA (2016) para a confecção dos *phantoms* monocamadas e multicamadas.

Assim, dois tipos de camadas foram confeccionados, com diferentes finalidades, para mimetizar o cólon de camundongo e para validar a estimativa de volume. Um dos dois tipos de camada foi confeccionado com gelatina em pó (G2500; Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA) dissolvida em água destilada e deionizada, conferindo assim a essa camada a característica hipoecoica, quando da geração de sua imagem de US. O segundo tipo de camada foi produzido com gelatina em pó, dissolvida em água destilada e deionizada, e com adição de pó de sílica (S-5631; Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA) para atuar como espalhador de US e causador do *speckle* na imagem de ultrassom, conferindo uma característica hiperecoica na imagem de BMUe.

Para a pesagem de gelatina, sílica e água foi utilizada uma balança digital de precisão (Adventure OHAUS, ARA 520; Toledo Balanças, Brasil) e para o aquecimento da mistura durante o preparo do *phantom* foi usada uma plataforma de aquecimento (Hotpanel, VEC FE20L, China). A temperatura da mistura foi medida com um termômetro de vidro com coluna de mercúrio.

Para a construção da camada hipoecoica foi adicionado o pó de gelatina, com concentração de 15% de massa de água, à água filtrada e deionizada numa temperatura de 23°C. A mistura foi homogeneizada, utilizando um bastão de vidro, aquecida até uma temperatura de 60°C e, posteriormente, colocada em um molde específico para cada tipo de *phantom*. Para a camada hiperecoica foram seguidos os mesmos procedimentos descritos para a camada hipoecoica, com a adição do pó de sílica na concentração de 5% da massa de água. Após esses procedimentos, os *phantoms* foram colocados imersos em água deionizada e refrigerados a 5°C, por algumas horas, desinformado e fixado em formol, por 15 minutos.

#### **4.1.2 Phantom para validação de estimativa de volume**

Foram confeccionados três *phantoms* cilíndricos, para validar a estimativa de volume tumoral pelo sistema implementado e desenvolvido, construídos com uma única camada hiperecoica, ou seja uma camada com espalhadores de US, e orifícios preenchidos com solução aquosa, água deionizada, para acoplamento acústico. Um orifício cilíndrico central foi utilizado para a inserção do cateter do *miniprobe*, enquanto os orifícios periféricos foram os alvos, ou ROIs. A obtenção de uma sequência de imagens de BMUe de cada ROI, usadas renderização do volume da ROI, foi padronizada com a aquisição de 101 imagens de BMUe-2D, espaçadas de 25  $\mu$ m e perfazendo um comprimento de 2,5 mm. As medidas de diâmetro de cada tipo de ROI foram determinadas usando-se o ImageJ e diretamente nas imagens de BMUe-2D e não através da medição do molde da ROI, tendo-se como justificativa os relatos de outros trabalhos publicados, sendo um realizado por esse grupo de pesquisa (Martins, 2015) e um outro trabalho de BMU-3D (FREELING, 2016).

Na Figura 4.1.1 é mostrada uma ilustração dos três *phantoms* utilizados para a validação da estimativa de volume de tumor. A primeira ilustração (A) é referente ao *Phantom 1* (Ph1), com alvo cônico, diâmetro igual 2,71 mm na base maior e 1,49 mm na base menor. O segundo *Phantom 2* (Ph2) com alvo cilindro (B) não paralelo ao lúmen. Neste caso em particular foram realizadas dez medições do diâmetro em posições diferentes ao longo da ROI e calculada a média (Desvio Padrão – SD – *Standard Deviation*) como sendo 0,78 (0,05) mm. A angulação relativa entre o eixo da ROI e o eixo do lúmen do *phantom* foi determinada como sendo igual a 38°. O terceiro *Phantom* (Ph3 – Figura 4.1.1.C) contém duas ROIs cilíndricas, com diâmetros diferentes, e paralelos ao lúmen. Os diâmetros dos dois alvos foram também medidos



em dez posições diferentes, resultando em diâmetros (SDs) iguais a 0,90 (0,06) mm e 0,30 (0,04) mm para os alvos maior e menor, respectivamente.

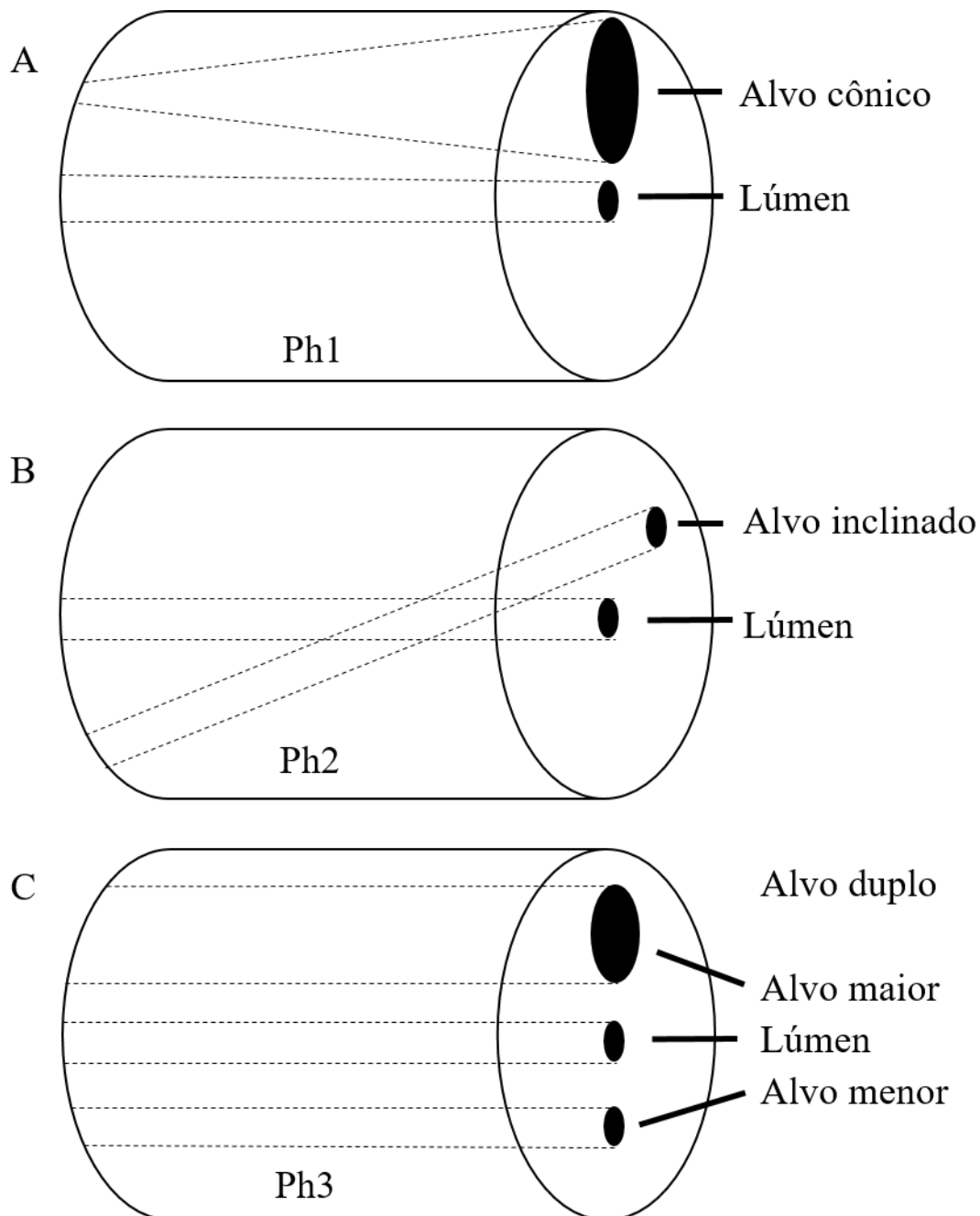
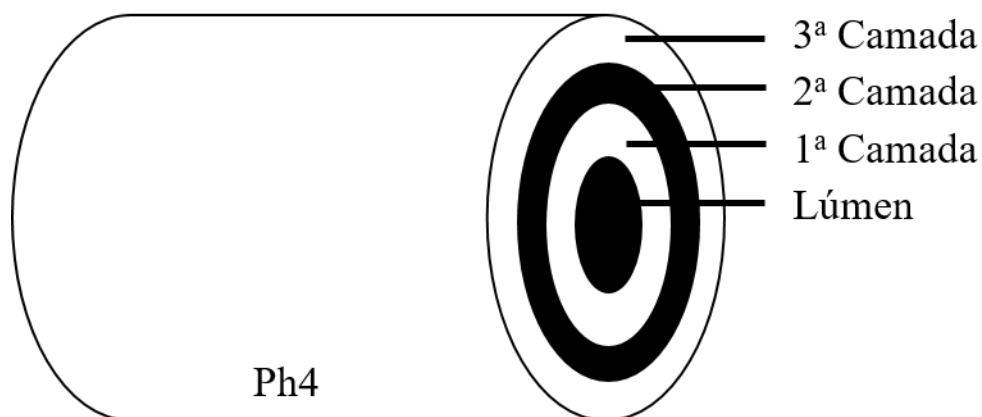


Figura 4.1.1. Ilustração dos phantoms de validação de estimativa de volume. (A) Ph1 com alvo cônico, diâmetro de 2,71mm e 1,49 mm, na base maior e menor, respectivamente. (B) Ph2 com alvo cilíndrico e inclinado, diâmetro médio (SD) de 0,78 (0,05) mm. (C) Ph3 com duplo alvo, com diâmetro médio (SD) de 0,90 (0,06) mm e 0,30 (0,04) mm, do maior e menor, respectivamente.

#### **4.1.3 Phantom multicamadas mimetizador de cólon**

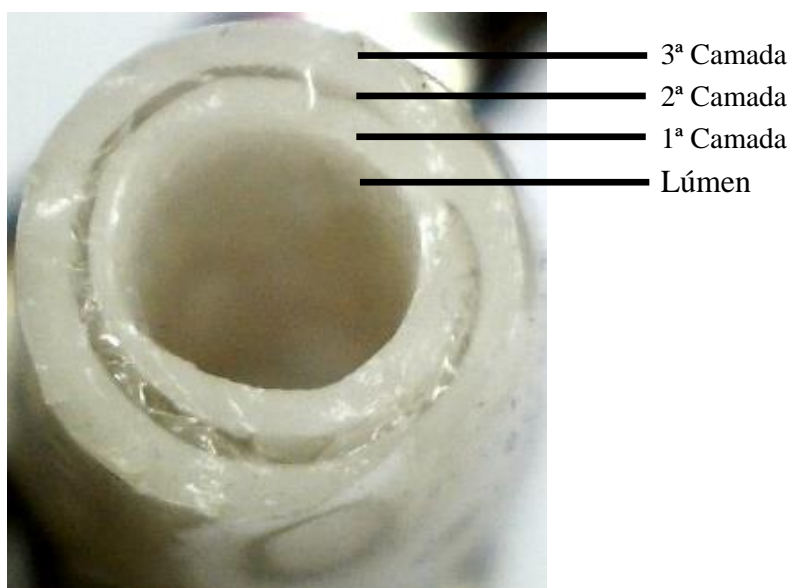
O *phantom* mimetizador de cólon e suas camadas (Ph4) foi confeccionado externamente a um molde constituído de um bastão cilíndrico com 4,2 mm de diâmetro. O bastão foi imerso na gelatina líquida com espalhador (camada hiperecoica), para formar a primeira camada. Após aguardar um tempo suficiente para a gelatina aderida ao bastão resfriar formando uma camada. Em seguida, o conjunto bastão + camada de gelatina foi imerso numa gelatina líquida e sem espalhador, para formar a segunda camada (camada hipoecoica). Por último todo o conjunto foi imerso na gelatina com espalhador para formar a terceira camada.

As primeira e a terceira camadas foram compostas do mesmo material, hiperecoicas (contendo espalhador), e mimetizaram a mucosa mais submucosa e a serosa, respectivamente. A segunda camada, hipoecoica (sem espalhador), mimetizou a muscular externa. A parte central é oca, mimetizando a luz do cólon, logo hipoecoica, e foi preenchida com solução salina, no momento da aquisição das imagens, para o acoplamento acústico entre o *miniprobe* e a parede do *phantom* durante a aquisição de imagens de US. Na Figura 4.1.1 é mostrada uma ilustração do *phantom* Ph4 confeccionado, com as camadas indicadas.



*Figura 4.1.1. Ilustração do phantom Ph4 de cólon confeccionado em forma cilíndrica e com 3 camadas concêntricas, a fim de mimetizar a mucosa e submucosa (1ª camada), muscular externa (2ª camada) e serosa (3ª camada).*

Na Figura 4.1.2 é mostrada uma fotografia da secção transversal do *Phantom* multicamadas, sendo possível observar que a parte central é oca, onde passa o miniprobe de US. As primeira e terceira camadas são hiperecoicas e brancas, devido ao pó de sílica, e a segunda camada é hipoecoica, sem pó de sílica, de aparência translúcida.



*Figura 4.1.2. Foto da secção transversal do phantom de cólon confeccionado em forma cilíndrica e com 3 camadas concêntricas, a fim de mimetizar as camadas mucosa e submucosa, muscular externa e serosa do cólon.*

## 4.2 Animais

Foram utilizados 18 camundongos machos e fêmeas da linhagem *Mus musculus/129SVJ/Tac*, com idade entre 2 e 3 meses, pesando aproximadamente 30 gramas. Os animais foram distribuídos, aleatoriamente, em dois grupos: grupo controle (n=6), sem a indução de tumor, e grupo com indução de tumor (n=12).

Os animais foram mantidos no biotério do Instituto de Ciência Biológicas (ICB), numa sala com temperatura entre 22-25°C, com a dieta provida de água e ração a vontade, ciclo circadiano de dia e noite (12h/12h) e com no máximo 4 animais por gaiola (Alesco; Monte Mor, SP, Brasil). O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em experimentação científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Protocolo No. 068/2018).

## 4.3 Indução de tumor de cólon

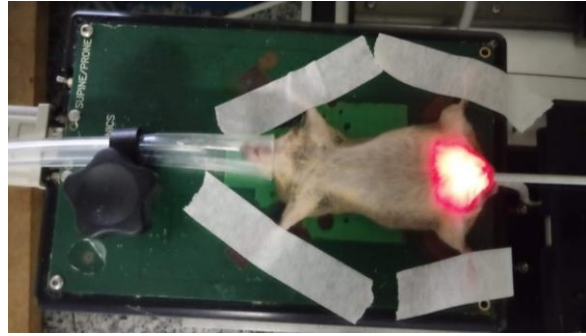
A indução de tumor de cólon foi baseada no protocolo AOM/DSS de indução química de tumores em camundongos, já utilizado em outros trabalhos desse mesmo grupo (ALVES, 2013; DE BRITTO, 2013; SOLETTI, 2012 e 2013). Os animais foram submetidos a uma injeção intraperitoneal do carcinógeno AOM (azoximetano; A5486; Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA), numa proporção de 12,5 mg/kg, no primeiro dia do experimento (D0). Cinco dias após, dia (D5) foram tratados com DSS (sulfato de dextrana, sal de sódio; 02160110, 36,000 to 50,000 Da; Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) diluído na água para beber a 2,0% por um período de 4 dias correspondente ao primeiro ciclo de DSS, de um total de 3 ciclos. No dia D27 os animais foram novamente

tratados com DSS (2%) diluído na água de beber durante 4 dias. O último ciclo de DSS (1.5%) iniciou-se no dia D48 e teve 3 dias de duração.

#### **4.4 Preparação do animal para aquisição de imagens de colonoscopia e BMUe**

Para a aquisição de imagens dos animais, os mesmos foram inicialmente submetidos à anestesia inalatória, com isoflurano (Cristália, São Paulo, Brasil), a 5% para indução anestésica e 1,5% para manutenção, em 1,5 L/Min de oxigênio, usando um sistema de anestesia para pequenos animais de laboratório (EZ-7000; Euthanex, Palmer, PA, EUA). Enquanto anestesiado, o animal foi fixado em decúbito dorsal sobre plataforma para fixação de animais (11503; VisualSonics, Toronto, Canadá) com o aquecimento elétrico da plataforma e programado para 37°C, de forma a evitar problemas com hipotermia durante a anestesia. Na Figura 4.4.1 é mostrada uma imagem de um camundongo, posicionado na plataforma de fixação de animais, durante a aquisição de imagens de BMUe-2D do cólon, adquiridas *in vivo*.

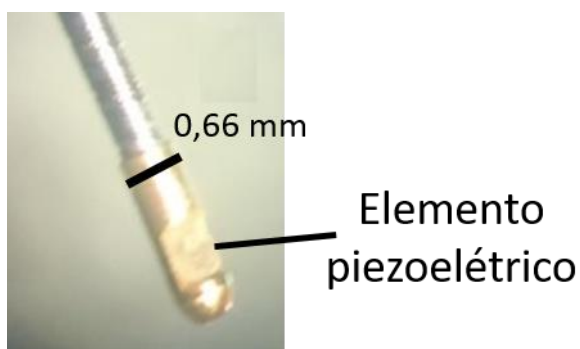
As imagens de BMUe-2D foram adquiridas em D44 para os animais do grupo controle, e para os animais submetidos ao protocolo AOM/DSS foram adquiridas em D44 e D45, com o cólon ainda sem a presença de tumores mas com inflamação, e durante dois dias (D70 e D71) com a metade dos animais em cada dia devido ao número elevado de animais e à complexibilidade do procedimento.



*Figura 4.4.1. Foto do camundongo na plataforma aquecida, anestesiado e em decúbito dorsal. Observa-se a transiluminação abdominal após a inserção do endoscópio no cólon do animal.*

## **4.5 Sistema de geração e aquisição de imagens de colonoscopia e BMUe**

Para a aquisição de imagens de ultrassom foi utilizado um sistema de BMUe como instrumento convencional de imagem de ultrassom modo-B, ou seja, gerando imagens radiais bidimensionais em escala de cinza (8 bits - 256 tons de cinza). Este sistema utiliza alta frequência ultrassônica (40 MHz), o que possibilita uma resolução comprovadamente adequada para imagens em pequenos animais, conforme descrito no capítulo 3, ao custo de uma menor profundidade de penetração. O sistema de BMUe utilizou um *miniprobe* de ultrassom comercial em forma de cateter (Atlantis SR Pro Coronary Imaging Catheter; Boston Scientific Corporation, Natick, MA, EUA), com diâmetro externo de 3,6-Fr. (1,2 mm), para a emissão dos pulsos de ultrassom e recepção dos sinais de eco. Na Figura 4.5.1 é mostrada uma foto ampliada da extremidade do *miniprobe* de US, mostrando o elemento piezoelétrico, que emite pulsos de ultrassom e recebe os sinais de eco.



*Figura 4.5.1: Foto ampliada da extremidade do cateter do minimiprobe mostrando o elemento piezoelétrico.*

O *miniprobe* de BMUe consiste de duas peças principais: o núcleo de imagem e o corpo do cateter. O núcleo de imagem contém um transdutor ultrassônico e o corpo do cateter é formado por seções telescópicas para a movimentação de avanço e recuo do núcleo de imagem dentro do cateter. O núcleo de imagem do *miniprobe* é ativado mecanicamente por uma unidade de servo motor, denominada *motor drive* (MD5 - Boston Scientific Corporation, Natick, Massachusetts, EUA), que impõe um movimento circular ao núcleo de imagem, para permitir a geração de imagens ultrassônicas com varreduras circulares e perpendiculares ao eixo em torno do qual gira o transdutor. Na Figura 4.5.2 é mostrada uma foto do *motor drive*.



*Figura 4.5.2. Foto do motor drive usado para acionar o transdutor de ultrassom*

A obtenção de imagens de BMUe é realizada com o transdutor de ultrassom rotacionando em torno do próprio eixo. A cada revolução do transdutor são gerados 256 pulsos de ultrassom (sincronizados pelos pulsos gerados pelo *encoder* do *motordrive*), que são retroespalhados/refletidos, e os sinais de eco resultantes adquiridos e convertidos em 256 linhas de modo-A para compor a imagem com varredura radial.

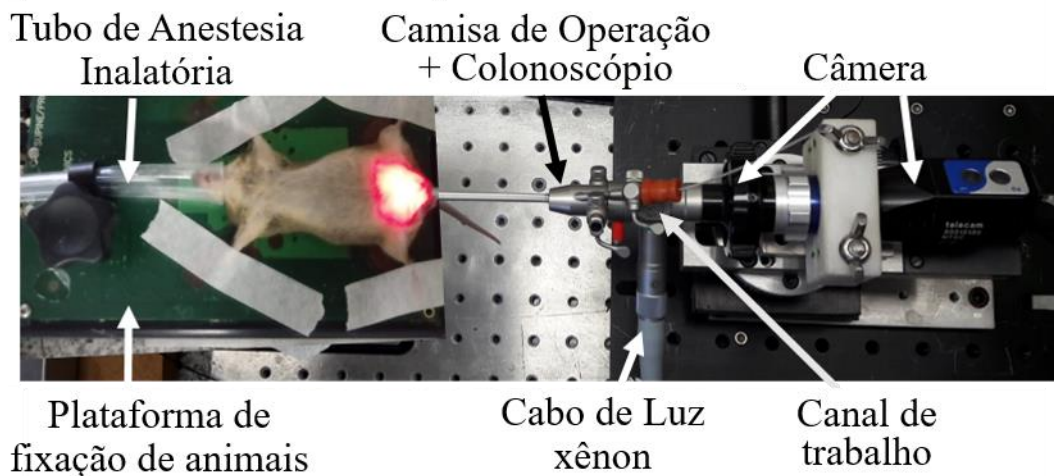
A eletrônica de *front end* para emitir e receber os pulsos de ultrassom, é composta pelo gerador de pulso de alta tensão (que excita o transdutor), do pré-amplificador de sinal de eco e do sistema de acionamento eletromecânico da varredura do feixe, sendo os circuitos e sistemas descritos elementos dedicados que fazem parte do dispositivo *motor drive*. Essa unidade de *motor drive*, modificada para ser acoplada ao sistema de BMUe, é alimentada por uma fonte de energia (Fonte US) desenvolvida no LUS. Os sinais RF de eco passam por um filtro passa-banda formado por um filtro passa-alta (BHP 25, Mini-Circuits, New York, EUA), com um frequência de corte (-3 dB) em 25 MHz, conectado em série com um filtro passa-baixa (BHP 70, Mini-Circuits) com uma frequência de corte (-3 dB) de 70 MHz. Os sinais de eco filtrados são digitalizados por uma placa com conversor analógico/digital de 8 bits e frequência de amostragem em 250 MHz (NI PCI-5114; National Instruments, Austin TX, EUA), instalada no barramento PCI de um microcomputador onde é realizada a detecção de envoltória do sinal de ultrassom retroespalhado/refletido pelo meio, a conversão de varredura e a exibição da imagem na tela do monitor, em tempo real. Os demais itens do sistema consistem em uma configuração normal de um microcomputador, incluindo: processador, monitor de vídeo, teclado, e *mouse*. O sistema funciona em ambiente Windows® XP (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, EUA) e a programação usada para controle da aquisição de dados e formação da imagem foi desenvolvida em LabVIEW® (versão 7.2; National Instruments, Austin, Texas, EUA).



Foi utilizado um conjunto de trocar (27021 CO, Karl Storz, Tuttlingen, Alemanha), que foi acoplado à um endoscópio rígido (Hopkins II 64301 AA, Karl Storz, Tuttlingen, Alemanha).

Durante os experimentos, o sistema de BMUe opera em associação com um endoscópio rígido (Hopkins 64301 AA, Karl Storz, Tuttlingen, Alemanha), com diâmetro externo de 1,90 mm e comprimento de 10 cm, coberto com uma camisa de operação (27021 CO, Karl Storz) com diâmetro externo de 2,50 mm. O canal de iluminação do endoscópio foi conectado a uma fonte de luz xênon (Xenolux 180, Confiance Medical, Rio de Janeiro, Brazil). Nesse conjunto foi inserido o *miniprobe* de ultrassom, pelo canal de trabalho da camisa de operação, para acessar o cólon dos animais, assim permitindo a geração simultânea de imagens de BMUe e colonoscópica. Durante a aquisição de imagens, o *miniprobe* foi posicionado com a extremidade contendo o elemento piezoelétrico exposto fora da extremidade distal do canal de trabalho da camisa de operação, porém o mais próximo possível da extremidade do endoscópio. Com isso, as regiões de interesse para o BMUe e o endoscópio são bem próximas, com ambas as imagens de BMUe e endoscopia adquiridas e exibidas, simultaneamente, lado a lado em um monitor de vídeo.

Na Figura 4.5.3 é mostrada uma foto do sistema usado na aquisição de imagens e contendo: tubo de anestesia inalatória, mantendo o animal anestesiado com isoflurano, camisa de operação acoplada ao endoscópio, câmera (H3-Z, Karl Storz, Tuttlingen, Alemanha) acoplada na ocular do endoscópio, a plataforma de fixação de animais, o cabo de luz xênon acoplado ao endoscópio e a entrada do canal de trabalho da camisa de operação, por onde foi inserido o cateter do *miniprobe* de US.



*Figura 4.5.3: Sistema de aquisição de imagens de BMUe e de colonoscopia: tubo de anestesia inalatória; endoscópio acoplado na camisa de operação, com o cateter do miniprobe inserido no canal de trabalho da camisa de operação; câmera acoplada na lente ocular do endoscópio, e o conjunto camisa de operação e endoscópio inserido no cólon do animal.*

O sinal de vídeo da câmera acoplada na ocular do endoscópio foi enviado a uma processadora de vídeo (Telecam SLII, Karl Storz, Tuttlingen, Alemanha), conectada a um sistema de captura de vídeo (HW-SET DVC100; Pinnacle Systems Inc, Mountain View, CA, USA), por sua vez ligado a uma porta USB do microcomputador do sistema de BMUe, e as imagens de colonoscopia correspondentes do colón do animal foram adquiridas e salvas no microcomputador.

Na Figura 4.5.4 é mostrada uma foto do sistema de aquisição de imagens de BMUe e de colonoscopia, composto por um rack onde foram alocados: o *driver* do estágio linear responsável pelo deslocamento do transdutor de ultrassom dentro do cateter do *miniprobe*, a processadora de vídeo, a fonte que alimenta o motor drive, a fonte de luz xênon e o microcomputador.

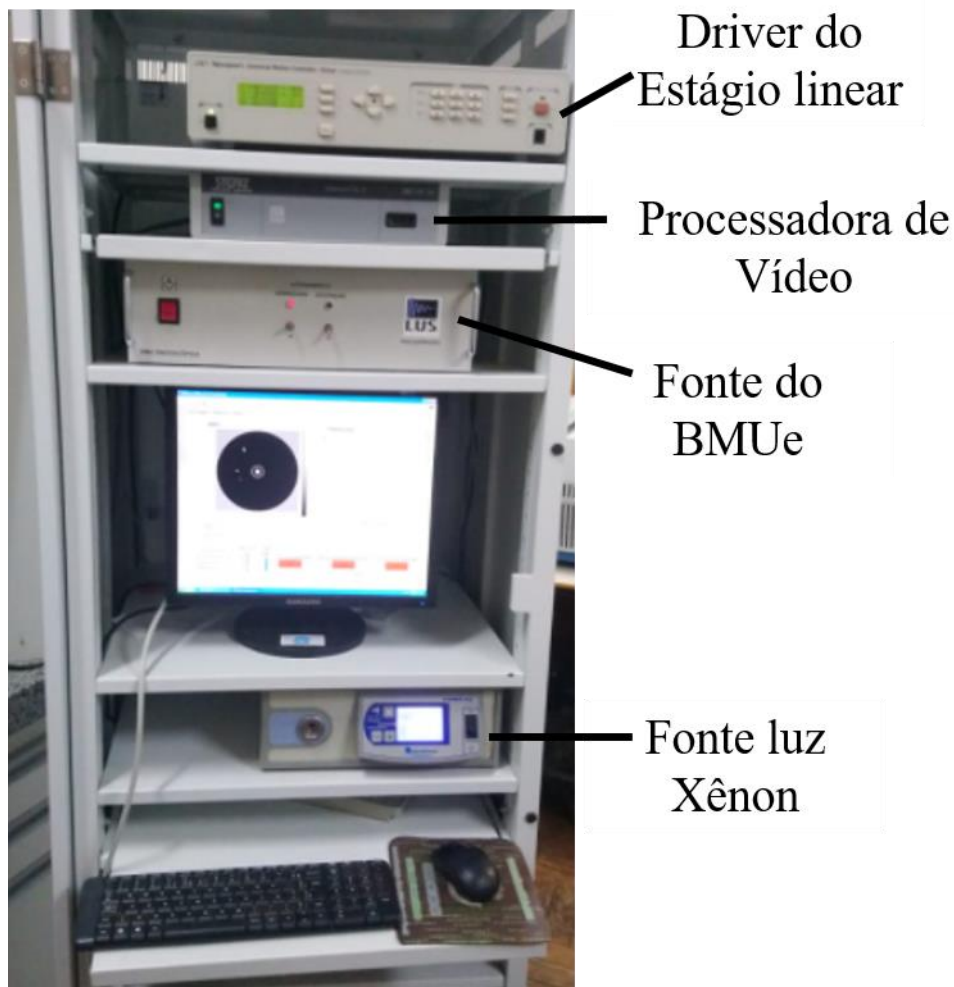


Figura 4.5.4: Foto do rack com sistema de aquisição de imagens de BMUe e de colonoscopia contendo o driver para controle de movimento do motor de estágio linear usado para o pull-back do miniprobe, a unidade processadora de vídeo de colonoscopia, a fonte de luz xênon, a fonte de alimentação motor drive e o microcomputador.

As interconexões entre os componentes dos dois sistemas de imagem foram projetadas, desenvolvidas e implementadas no LUS, de forma a promover a exibição simultânea e lado a lado das imagens de BMUe e endoscopia.

Além da função de captura de sinais e exibição das imagens de BMUe e colonoscopia, o programa computacional em linguagem Labview executa o controle do deslocamento (*pull-back*) do *miniprobe* de ultrassom, com número e tamanho de passos programados, para permitir a geração e o armazenamento de uma sequência de imagens de BMUe-2D, em planos perpendiculares ao deslocamento e igualmente espaçados

entre si. O conjunto das imagens de BMUe-2D é usado, posteriormente, para a renderização volumétrica de imagens de BMUe-3D, realizada *off-line* em um processo descrito no próximo tópico.

O sistema de controle de deslocamento (translação) do *miniprobe* é composto por:

- Um estágio linear (MFA-CC; Newport, Irvine, California, EUA) ativado por um motor DC, com curso total de 25 mm e precisão de 0,125  $\mu\text{m}$  entre cada passo e controlado por um *motor driver* (ESP300 Newport, Irvine, Califórnia, EUA), mostrado na Figura 4.5.4. Foi padronizado o tamanho do passo do estágio linear em 25  $\mu\text{m}$ , o qual é referente à distância entre os planos de as imagens de BMUe-2D consecutivos, ou à profundidade do voxel na imagem de BMUe-3D. Após o deslocamento de um passo do estágio linear, o mesmo ficou estacionário durante 0,1 segundo e durante este tempo foi realizada a aquisição de uma imagem de BMUe-2D;
- a seção telescópica do cateter do *miniprobe*, a qual realiza um descolamento do transdutor de US, exclusivamente dentro do cateter.

Na Figura 4.5.5 é mostrado o sistema de controle de deslocamento, com a seção telescópica do cateter do *miniprobe*, o estágio linear e o *motor drive* (MD5 - Boston Scientific Corporation, Natick, Massachusetts, EUA) com o *miniprobe* acoplado.

Sistema de controle  
de deslocamento

Motordrive



Estágio Linear

Mini-Probe

Figura 4.5.5: Foto do sistema de controle de deslocamento telescópico do miniprobe, o estágio linear e motor drive.

Na Figura 4.5.6 é mostrado um diagrama de blocos do sistema de BMUe-2D com o microcomputador e acessórios, com o restante do sistema composto das seguintes partes: Transmissão (Tx) e Recepção (Rx); Rotação do transdutor/Transdutor de ultrassom; Acionamento da varredura do feixe e Deslocamento linear do transdutor (*pull-back* do *miniprobe* de ultrassom) delimitado por um retângulo com lados em linha tracejada. O sistema Tx emite pulsos de US, comandados por sinais de pulso emitidos por um encoder óptico contido no dispositivo de acionamento e varredura do feixe (*Motor drive* – MD5). Este *encoder* gera 256 pulsos por rotação e desta forma a imagem de US tem 256 linhas radiais do modo-A. O motor CC que gira o encoder com uma frequência de até 20 Hz também rotaciona, em sincronia, o transdutor de US. No RX, o sinal de eco é recebido pelo transdutor de US, passa por um pré-amplificador de RF, e depois é enviado para processamento e exibição no microcomputador. A parte de deslocamento linear do transdutor sincroniza o controlador (*driver* do estágio linear) para o deslocamento linear do *miniprobe* durante a aquisição de uma sequência de imagens de BMUe-2D.

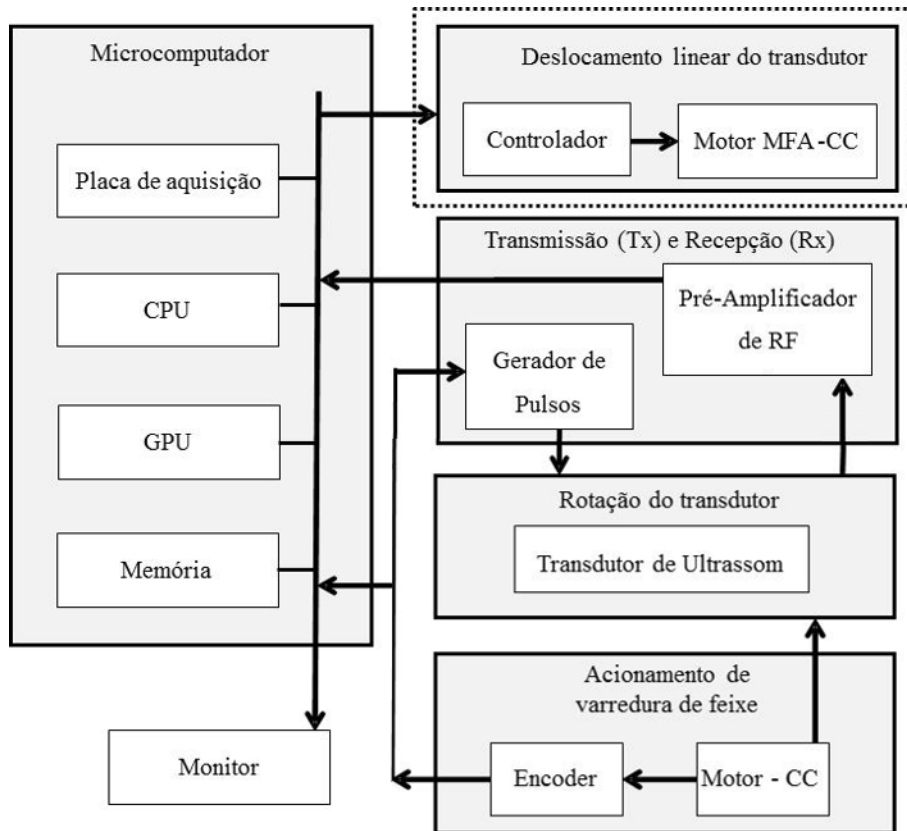


Figura 4.5.6. Diagrama em blocos do sistema de BMUe-2D: o sistema de deslocamento linear do transdutor (*pull-back*) do mini-probe de ultrassom (envolto por um retângulo com lados em linha tracejada), sistema de transmissão e recepção de pulsos de US, rotação do transdutor e acionamento de varredura de feixe.

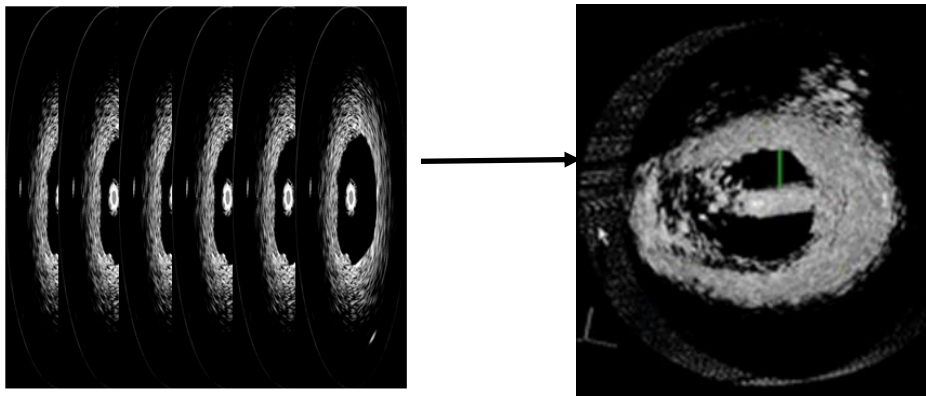
## 4.6 Geração de Imagem de BMUe-3D

As imagens de BMUe-3D foram renderizadas a partir de uma sequência de imagens, igualmente espaçadas, de BMUe-2D e adquiridas de um segmento de colón de camundongo. Essas imagens em 2D foram adquiridas durante o deslocamento controlado do *miniprobe* de US.

Para a renderização da sequência de imagens BMUe-2D numa imagem de BMUe-3D, foi utilizado a ferramenta *3D Viewer* do programa computacional ImageJ

(ImageJ 1.47v, National Institutes of Health, Bethesda, EUA), *opensource* e baseado em Java.

Na Figura 4.6.1 é mostrada uma ilustração do processo de formação da imagem 3D, na qual as imagens, com espaçamento regular entre si e conhecido, formam um volume de comprimento conhecido. As imagens em 2D são empilhadas sequencialmente para cada combinação de quatro pixels em cada um de dois planos consecutivos de imagem 2D formarem um voxel, cuja profundidade é a mesma do espaçamento entre os planos de imagens.



*Figura 4.6.1: Ilustração do processo de formação da imagem 3D. Do lado esquerdo é exibida uma sequência com as imagens de BMUe-2D, regularmente espaçadas, e do direito a imagem de BMUe-3D.*

## **4.7 Segmentação da imagem BMUe dos alvos nos phantoms e de tumor polipoide e estimativa de volume**

O conjunto contendo  $N_t$  imagens de BMUe-2D, igualmente espaçadas, varrendo alvos nos *phantoms* ou mesmo tumores polipoides nos cólons dos animais, todos chamados daqui para frente de alvos, foi processado para a segmentação do alvo e determinação de seu volume. O processo de segmentação baseou-se em um programa

computacional semiautomático, escrito em MATLAB (Versão R2019b, The MathWorks, Natick, MA, EUA), o qual tem como entrada uma coleção  $N_i$  de planos de imagens,  $IP_{i,m}$ , com  $1 \leq m \leq N_i$ , contendo as máscaras correspondentes às bordas das seções transversais dos alvos segmentadas com um contorno fechado. A saída do programa compreende uma coleção  $N_o$  ( $N_o = N_t - N_i$ ) de planos de imagens remanescentes  $IP_{o,n}$ , com  $1 \leq n \leq N_o$ , contendo as máscaras das seções transversais dos alvos determinadas pelo próprio programa computacional. Os planos de imagens intercalados,  $IP_{i,m}$  e  $IP_{o,n}$ , formam a sequência com todas os planos de imagens igualmente espaçados.

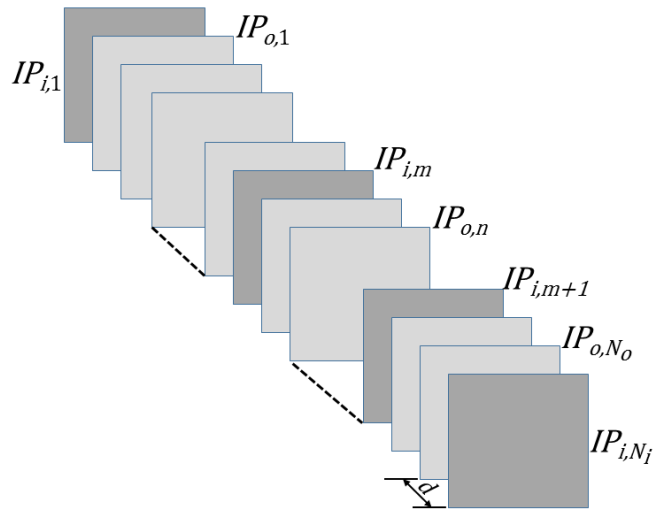
O espaçamento entre os planos de imagens,  $IP_{i,m}$ , é definido antes da execução do programa de segmentação e não necessita ser constante ao longo de toda a sequência de imagens de BMUe-2D adquirida. Em geral, costume haver mudanças rápidas nas seções transversais dos alvos correspondentes às extremidades dos alvos, quando comparado com as seções transversais numa região mais central do alvo. Desta forma, planos de imagem consecutivos  $IP_{i,m}$  correspondendo à parte central do alvo possuem distanciamentos maiores do que para aqueles correspondendo às extremidades do alvo.

Para cada imagem de BMUe-2D de entrada no programa computacional foi gerada, manualmente, uma máscara usando-se o programa ImageJ. Para isso, usou-se inicialmente a ferramenta *LiveWire 2D* do ImageJ para circunscrever a região de interesse (ROI – *Region of Interest*) da seção transversal e a seguir foi executado o comando *Create Mask* do ImageJ. A primeira imagem e a última da sequência de



imagens de BMUe-2D. Após a determinação dessas máscaras para as imagens de entrada, foi realizado o procedimento para a geração computacional de máscara para cada uma das imagens não pertencentes ao conjunto de imagens de entrada do programa computacional. Desta forma, cada plano de imagem de entrada da sequência de imagens de BMUe-2D tem uma máscara associada, correspondente a área transversal da ROI, que pode ter sido gerada pelo usuário, ou gerada pela segmentação semi-automática do software. Portanto, há uma máscara correspondente a secção transversal da ROI para cada imagem da sequência de BMUe-2D.

Uma ilustração do processo de interpolação semiautomático das máscaras é exibido na Figura 4.7.1. Os planos contendo as máscaras de entrada receberam o nome de plano de imagem de entrada ( $IP_i$ ) e as máscaras interpoladas receberam os nomes de plano de imagem de saída ( $IP_o$ ).



*Figura 4.7.1: Ilustração do processo de interpolação semiautomática de máscaras da sequência de imagens igualmente espaçadas. A sequência é formada pelos planos de imagem de entrada ( $IP_i$ ) e os planos de imagem de saída ( $IP_o$ ) (OLIVEIRA, 2021).*

Com relação aos planos de imagem de saída, cada um teve uma máscara determinada computacionalmente e levou em consideração uma abordagem (Figura 4.7.2) que determinou os pontos da borda da seção transversal do alvo, baseado em interpolação linear, para o plano de imagem de saída,  $IP_{o,n}$ , entre dois planos de imagem de entrada consecutivos,  $IP_{i,m}$  e  $IP_{i,m+1}$ . Esta abordagem considera um ponto  $T$  sobre a borda da máscara no plano de imagem de entrada  $IP_{i,m}$  e encontra o ponto  $V$  mais próximo e situado na borda da máscara no plano de imagem de entrada  $IP_{i,m+1}$ . O passo seguinte consistiu em encontrar a equação de uma reta passando pelos pontos  $T$  e  $V$  e localizar o ponto  $U$  contendo a interceptação da reta com o plano de imagem de saída

$IP_{o,n}$ . Este ponto  $U$  é considerado como pertencente à borda de contorno da seção transversal do alvo no plano  $IP_{o,n}$ . Este processo se repete para todos os pontos pertencentes ao contorno fechado da máscara no plano  $IP_{i,m}$ , resultando em uma coleção de pontos formando o contorno no plano de imagem  $IP_{o,n}$ . A abordagem descrita é aplicada em todos os planos de imagem  $IP_{o,n}$  ( $1 \leq n \leq N_o$ ).

Uma vez encontrada a sequência de  $NP_{o,n}$  pontos ao longo do contorno segmentado em  $IP_{o,n}$  então a máscara correspondente foi determinada. Para isso, o método consistiu em determinar o centroide  $CT_{o,n}$  para o conjunto  $NP_{o,n}$  de pontos e a seguir formar um triângulo com vértices em  $CT_{o,n}$  e dois pontos consecutivos,  $U_w$  e  $U_{w+1}$  ( $1 \leq w \leq NP_{o,n}$ ). A seguir, a função *bwconvhull* do MATLAB foi utilizada para encontrar os pontos contidos dentro do triângulo, aos quais atribui-se o valor um. Para os pontos fora do triângulo atribuiu-se o valor zero. Esse procedimento foi repetido para triângulos adjacentes com vértices em  $CT_{o,n}$ ,  $U_{w+1}$  e  $U_{w+2}$ , e assim, a máscara contornada pelos pontos  $NP_{o,n}$  foi construída passo a passo até o último triângulo contendo os vértices  $CT_{o,n}$ ,  $U_{(NP_{o,n}-1)}$  e  $U_{NP_{o,n}}$ .

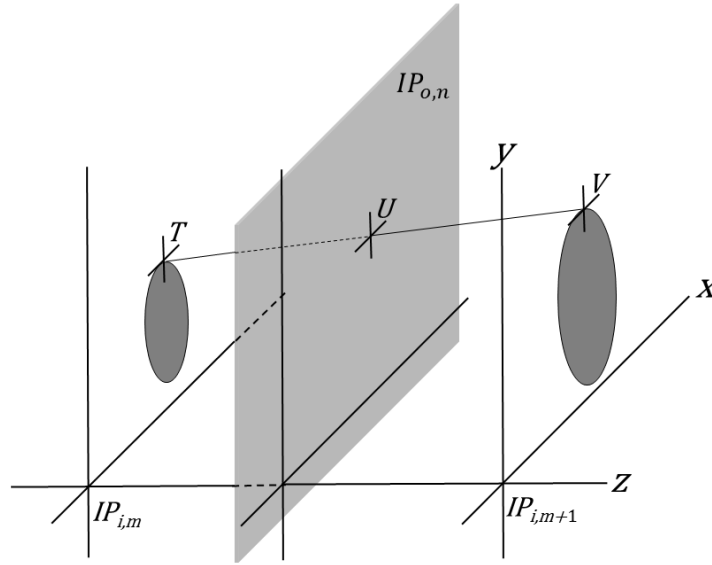


Figura 4.7.2: Ilustração da determinação dos pontos de contorno do plano de imagem de saída, situado entre dois planos de imagem de entrada. Para um ponto  $T$  no plano  $IP_{i,m}$ , o ponto mais próximo  $V$  no plano subsequente  $IP_{i,m+1}$  é determinado. Uma reta é traçada passando pelos pontos  $T$  e  $V$  e a interseção da linha atravessando os planos  $IP_s$  determina a localização do ponto  $U$ , pertencente ao contorno da seção transversal do tumor no plano  $IP_{o,n}$ . Esse processo é repetido para todos os pontos do contorno fechado em  $IP_{i,m}$ , até gerar uma sequência de pontos formando um contorno no plano  $IP_{o,n}$ . (OLIVEIRA, 2021).

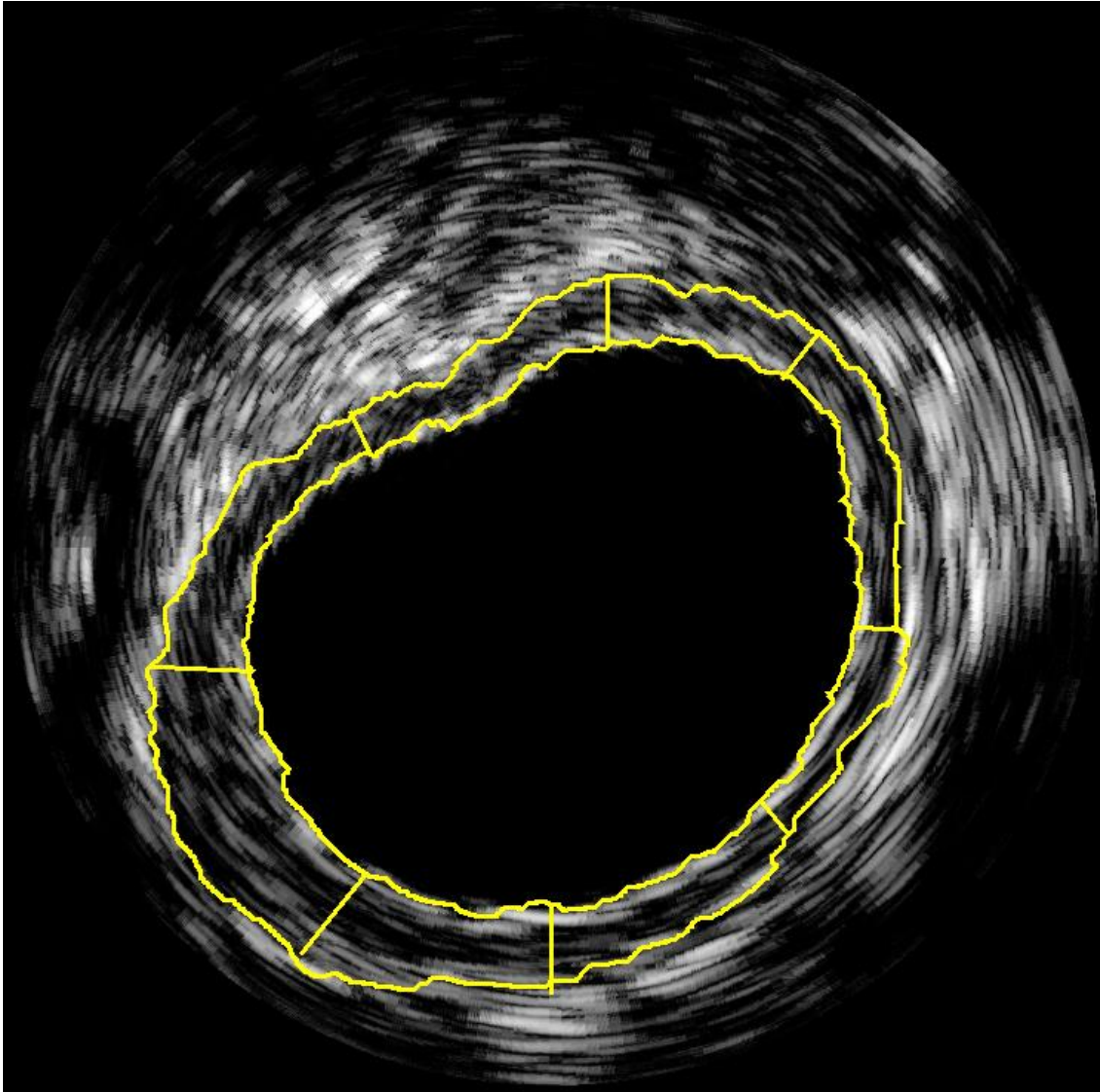
O volume do alvo (ROI), denominado  $V_{ROI}$  foi determinado de acordo com:

$$V_{ROI} = d \cdot r^2 \cdot \sum_{i=1}^{N_t} \sum_{j=1}^{N_x} \sum_{k=1}^{N_y} M_i(x_j, y_k), \quad (1)$$

onde,  $d$  é o tamanho do passo entre planos de imagem consecutivos da sequência de imagens de BMUe-2D adquiridas,  $r$  é a distância entre pixels consecutivos formando a imagem de BMUe,  $N_x$  e  $N_y$  representam as dimensões, em pixels, do  $i^o$  plano de imagem ao longo dos eixos  $x$  e  $y$ , respectivamente.  $M_i$  é igual a um se as coordenadas  $(x_j, y_k)$  do  $i^o$  plano de imagem estão dentro do contorno fechado da máscara e igual a zero se as coordenadas estão fora do contorno fechado.

## **4.8 Segmentação de imagem de BMUe-2D e medição de espessamento da parede do cólon**

As medidas de espessamento da parede do cólon foram determinadas diretamente nas imagens de BMUe, usando ferramentas do ImageJ. Para delimitar a parede do cólon foi utilizada a ferramenta *LiveWire 2D* do ImageJ para criar duas linhas de contorno fechado, uma delas acompanhando a face externa da mucosa e a outra a face externa da serosa. A ferramenta usada para medir o espessamento foi uma linha reta, na qual foi determinado o comprimento da linha, diretamente na imagem e com o auxílio do ImageJ. Na Figura 4.7.3 é mostrada uma imagem de BMUe-2D de um cólon com espessamento por inflamação, com as marcações realizadas em amarelo. Em cada imagem de BMUe-2D foram realizadas 8 marcações para a medição de espessamento, com espaçamento de 45° entre cada linha usada na medição. A seguir, foi calculada a média e desvio padrão.



*Figura 4.7.3: Imagem de BMUe-2D de um cólon com espessamento por inflamação. As marcações em amarelo, num total de oito e com espaçamento de 45° entre si, foram usadas para a determinação da espessura da parede (OLIVEIRA, 2020).*

## **4.9 Cálculo estatístico**

O programa estatístico livre Jamovi (Versão 1.1.9), baseado numa plataforma aberta em linguagem R, foi usado para determinar a significância estatística entre o espaçamento da parede de cólons dos animais do grupo controle e do grupo com

indução de tumor. Inicialmente, o teste para a normalidade de Shapiro-Wilk foi empregado e confirmou-se a distribuição normal dos dados amostrais. O teste de Levene confirmou variâncias desiguais entre os grupos e um teste ANOVA foi usado com um teste post-hoc Games-Howel (variâncias desiguais). A significância estatística considerada foi de  $p < 0,05$ .

#### **4.10 Análise da Histologia**

Após a aquisição das imagens de BMUe-2D do cólon dos animais do grupo controle, em D44, e em D70 e D71 para os animais submetidos ao protocolo AOM/DSS, os mesmos ainda estando anestesiados foram colocados em câmara saturada com isoflurano para induzir o óbito com subsequente deslocamento cervical. O cólon foi removido, cirurgicamente, limpo e fixado em 4% de formaldeído por 24 horas, imerso em álcool 70%, processado em etanol e xylol para inclusão de parafina, nesta sequência. Os segmentos de cólon foram fatiados transversalmente, ao eixo longitudinal do tecido, com 5  $\mu\text{m}$  de espessura, usando um microtome (RM2125 RTS; Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL, USA) e corando com hematoxylina e eosina (H&E) para análise histológica padrão. Vários cortes transversais foram realizados a cada 25  $\mu\text{m}$ .

As secções de histologia foram analisadas e comparadas com as imagens de BMUe-2D obtidas do mesmo local de lesão. Características morfológicas de cada cólon, como localização dos tumores, tamanho e forma, foram consideradas para a comparação e confirmação com os achados histológicos.

## 5 Resultados

Neste capítulo são apresentadas as imagens de colonoscopia, BMUe-2D e BMUe-3D obtidas durante os experimentos e estimativas de volume para os alvos nos *phantoms* e os tumores de cólon dos animais. Todas as imagens obtidas dos animais foram adquiridas *in vivo*.

### 5.1 Phantom

Para testar a acurácia da instrumentação de BMUe gerar imagens de BMUe-3D e validar a estimativa de volumes, uma sequência de imagens BMUe-2D foi adquirida de 4 *phantoms* de ultrassom, sendo 3 com diferentes formatos, orientações e diâmetros dos alvos e usados especificamente para validar a estimativa de volume pelo método proposto. Um quarto *phantom* foi usado para demonstrar a capacidade de resolução do sistema em diferenciar as camadas do cólon de um camundongo.

#### 5.1.1 Phantoms para validação de estimativa de volume

A renderização das imagens de BMUe-3D foi baseada em uma sequência de 101 imagens de BMUe-2D, com 11 planos de imagem de entrada, segmentados manualmente e 90 Planos de imagem de saída, segmentados de forma semiautomática, por interpolação. Cada plano de imagem é separado por 25  $\mu\text{m}$ .

Na Figura 5.1.1 são mostradas as imagens de BMUe-3D renderizadas, com o alvo Tg (Tg – *Target*) colorido em branco. Na Figura (A) é mostrado o *phantom* 1 (Ph<sub>1</sub>), com alvo cônico (Tg<sub>1</sub>), indicado pela seta, com diâmetros de 2,71 mm e 1,49 mm,



correspondentes à base ( $\phi_{\text{base}}$ ) e ao topo ( $\phi_{\text{topo}}$ ), respectivamente. Na Figura B é mostrado o *Phantom 2* ( $\text{Ph}_2$ ), com um alvo ( $\text{Tg}_2$ ) cilíndrico e inclinado a  $38^\circ$ , indicado pela seta, e com diâmetro igual a 0,78 mm. Na Figura C é mostrado o *Phantom 3* ( $\text{Ph}_3$ ), com alvos duplos constituídos de dois cilindros paralelos ( $\text{Tg}_{3A}$  e  $\text{Tg}_{3B}$ ) e com diâmetros iguais a 0,90 mm e 0,30 mm.

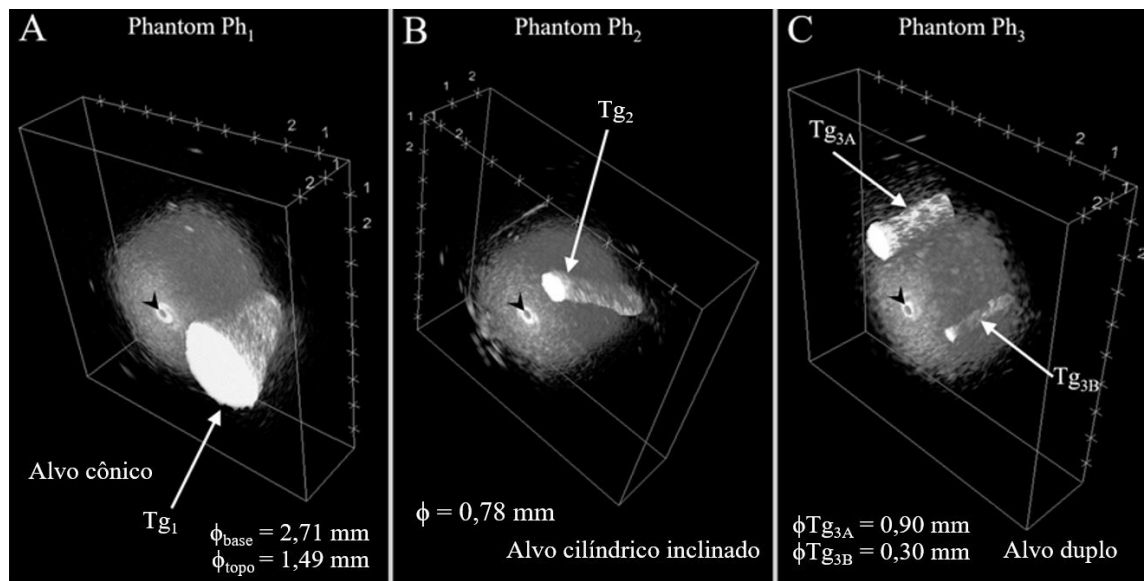


Figura 5.1.1. Phantoms de validação de estimativa de volume. (A) imagem de BMUe-3D, com a indicação do alvo cônico ( $\text{Tg}_1$ ); (B) imagem de BMUe-3D, com a indicação do alvo cilíndrico inclinado ( $\text{Tg}_2$ ); (C) imagem de BMUe-3D, com a indicação de alvos duplo ( $\text{Tg}_{3A}$  e  $\text{Tg}_{3B}$ ). Nessas imagem são mostradas as escalas de 1mm/divisão (OLIVEIRA, 2021).

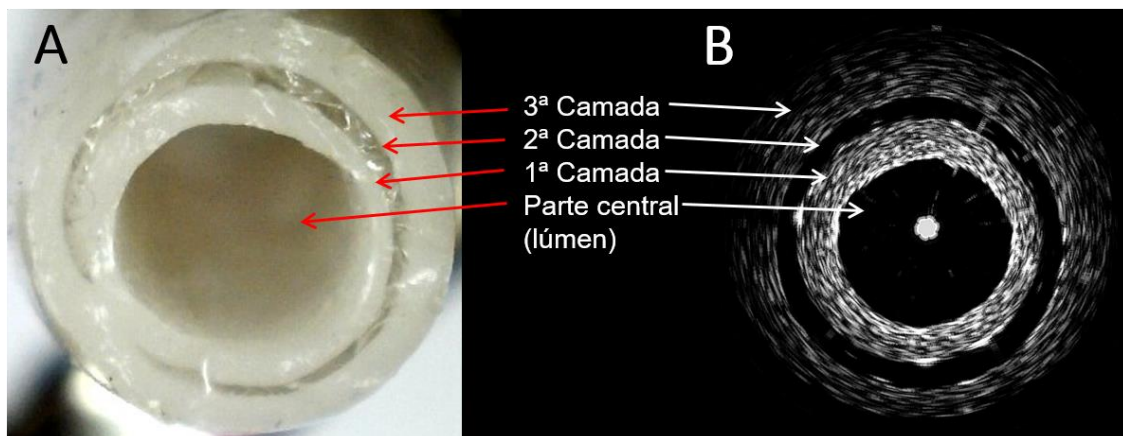
O volume foi calculado a partir do conhecimento da forma geométrica de cada *phantom* e comparada com o valor medido de volume que foi determinado computacionalmente das imagens de BMUe-2D segmentadas. Na Tabela 5.1.1 são mostrados os valores obtidos para o volume medido, volume calculado e a diferença relativa.

*Tabela 5.1.1. Resultados para o volume medido, volume calculado e diferença relativa, obtidos dos 3 phantoms de estimativa de volume*

Phantom	Alvo	Volume medido (mm <sup>3</sup> )	Volume Calculado (mm <sup>3</sup> )	Diferença relativa (%)
Ph <sub>1</sub>	Tg <sub>1A</sub>	7.909	8.903	11.17
Ph <sub>2</sub>	Tg <sub>2A</sub>	1.179	1.195	1.34
Ph <sub>3</sub>	Tg <sub>3A</sub>	1.599	1.494	7.03
	Tg <sub>3B</sub>	0.174	0.177	1.70

### **5.1.2 Phantom multicamadas mimetizador de cólon**

Na Figura 5.1.2 são mostrados os resultados obtidos para o *phantom* 4. (A) uma fotografia de uma secção transversal do *phantom*, onde são indicadas as camadas e a parte central (oca). (B) uma imagem de BMUe-2D com indicação das camadas e da correspondência com as camadas do *phantom* em (A).



*Figura 5.1.1. Phantom multicamadas mimetizador de cólon (Ph<sub>4</sub>). (A) fotografia de uma secção transversal externa do phantom, onde são indicadas as camadas e a parte central (oca). (B) imagem de BMUe-2D, com indicação das camadas e da correspondência com as camadas do phantom em (A).*

### **5.1.3 Teste de espaçamento ideal entre Planos de Imagem de entrada**

Foi realizado um teste para verificação da influência do espaçamento entre os planos de imagem de BMUe-2D de entrada,  $IP_i$ , no valor do volume de um alvo. Assim, 3 testes foram realizados no *phantom* cônico, com os planos de imagem de entrada distanciados de 5, 10 e 15 passos de 25  $\mu\text{m}$  cada, que resultaram nas seguintes estimativas de volume: 7,100  $\text{mm}^3$ , 7,899  $\text{mm}^3$  e 8,190  $\text{mm}^3$ , respectivamente. Esses dados apresentaram um erro relativo da ordem de 10% e em função disso foi utilizado um distanciamento de 10 passos para os planos de imagem de entrada e para todos os tipos de *phantoms*.

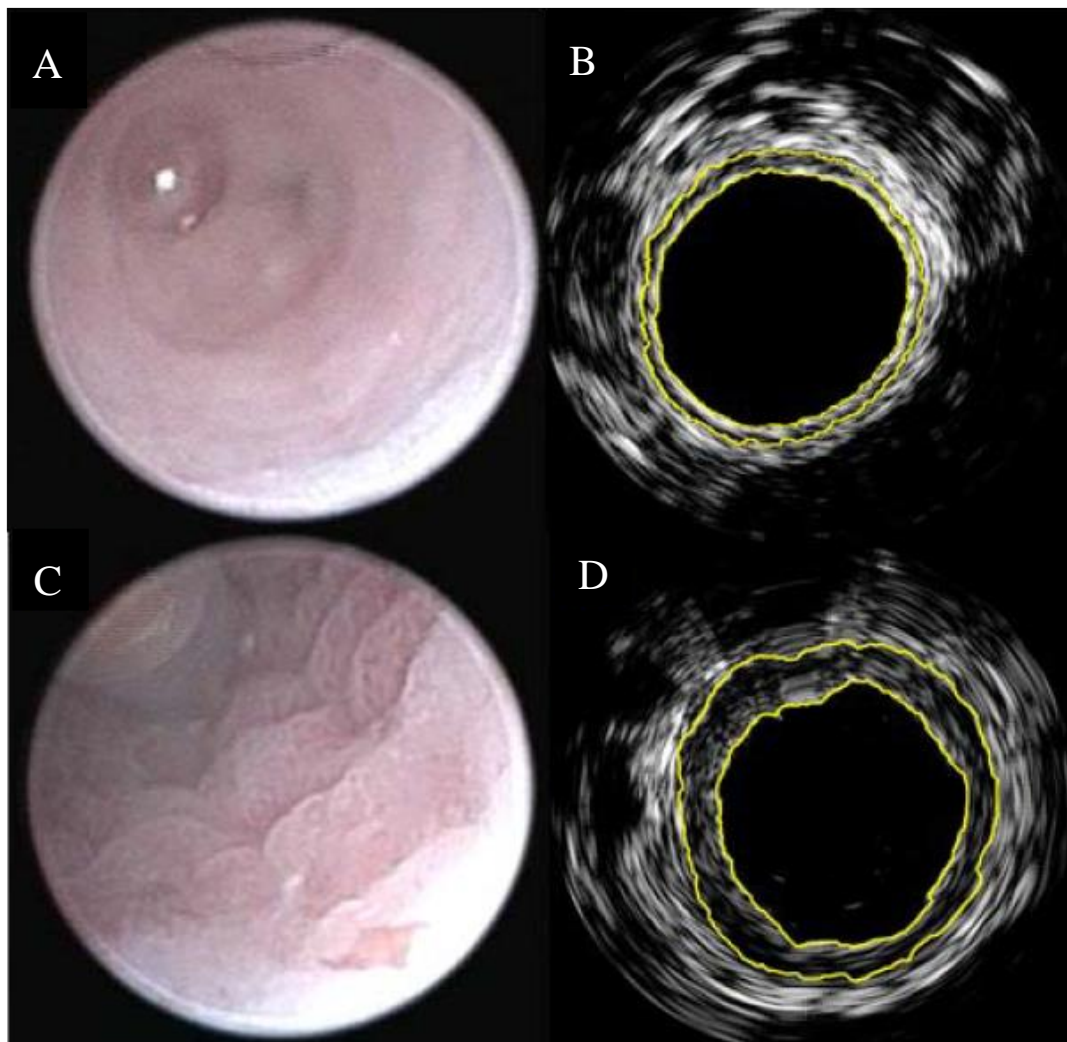
## **5.2 Animal**

### **5.2.1 Animal com cólon inflamado**

Dos 12 animais submetidos ao protocolo de indução de tumor AOM/DSS e submetidos ao imageamento de colonoscopia e UBMe-2D nos dias D70 e D71, um foi sacrificado, de acordo com os critérios de manipulação de animais, e 6 não tiveram o desenvolvimento tumoral.

Para os 11 animais examinados em D70 e D71, suas imagens de BMUe-2D e colonoscopia adquiridas em D44 e D45 foram reexaminadas, juntamente com as imagens adquiridas, na mesma época, para os animais do grupo controle. A Figura 5.2.1 apresenta os achados de um animal com o cólon saudável (grupo controle), sendo a colonoscopia em (A) e sua respectiva imagem de BMUe-2D em (B). Já uma imagem de colonoscopia para um animal com o cólon inflamado é apresentada em (C) e sua respectiva imagem de BMUe-2D em (D). Observa-se que em ambas imagens de BMUe-

2D (B e D), as camadas do cólon estão delimitadas com um contorno fechado na cor amarela.



*Figura 5.2.1. Imagens de colonoscopia e BMUe-2D adquiridas simultaneamente, in vivo, do cólon de camundongos. (A) imagem de colonoscopia de cólon normal, sem inflamação e sem tumor. (B) imagem de BMUe-2D do cólon em (A). (C) imagem de colonoscopia de cólon inflamado e (D) imagem de BMUe-2D do cólon em (C) (OLIVEIRA, 2020).*

Foi determinada a média das espessuras da parede do cólon medidas nas imagens de BMUe-2D para cada um dos 17 animais (controle=6 e inflamado=11). A seguir, foi realizada uma comparação estatística entre o conjunto das médias de espessura de cólon dos animais do grupo controle e o conjunto correspondentes para os

animais do grupo submetido ao protocolo AOM/DSS. Disso resultou em média global (SD) de 0.230 (0.023) mm e 0.336 (0.086) mm para os grupos de animais com os cólons saudáveis e inflamados, respectivamente. O teste estatístico determinou uma diferença significativa entre a média do cólon saudável e do inflamado. A classificação inicial foi realizada visualmente, por colonoscopia, observadas nas Figuras 5.2.1 (A) e (C), onde a imagem do cólon normal é lisa e contrasta com a imagem do cólon inflamado, o qual apresenta rugosidades acentuadas.

### **5.2.2 *Animal com cólon contendo tumor***

Após a verificação de presença de tumor em seis animais, uma sequência de imagens de BMUe-2D cobrindo toda a região contendo tumor, ou múltiplos tumores, foi adquirida. Em um desses animais, a sequência de imagens foi prejudicada devido a presença de fezes, tornando essa sequência de imagens não adequada para renderização de imagens BMUe-3D. Para os demais cinco animais foi adquirida boa sequência de imagens que permitiram a renderização 3D e a medição de volume. Em dois animais foi encontrado a presença de apenas um tumor e nos outros três foram identificados múltiplos tumores, totalizando onze tumores com imagens de BMUe-3D renderizadas. No geral, os espaçamentos entre os planos de imagem de entrada foram de dez passos, cada um correspondendo a um distanciamento de 25  $\mu\text{m}$ , exceto para as regiões próximas das extremidades, onde os espaçamentos foram menores (2 a 3 passos e cada um distanciamento de 25  $\mu\text{m}$ ), para compensar as variações rápidas da área da seção transversal do tumor apresentada na imagem de BMUe-2D.

Na Tabela 5.2.1 são apresentados a numeração dos animais (1 - 5) e os correspondentes valores medidos para o volume dos 11 tumores, variando de 0.066 a 6.082 mm<sup>3</sup> e com média (SD) igual a 2.053 (2.079) mm<sup>3</sup>.

Na Figura 5.2.2. são mostradas as imagens adquiridas do animal #1 com tumor. Uma imagem de BMUe-3D (Fig.5.2.1.A) foi renderizada a partir de uma sequência de imagens de BMUe-2D, sendo uma delas mostrada na Figura 5.2.1.B. As imagens de BMUe-2D correspondentes aos planos de imagem de entrada foram tiveram a região tumoral segmentada, usando a ferramenta *LiveWire 2D* do ImageJ, que na figura de BMUe-2D apresentada aparece como uma linha verde pontilhada de contorno fechado. Também são exibidas uma imagem de colonoscopia (Fig.5.2.1.C), com uma seta indicando o tumor (Tu<sub>1</sub>) e o *miniprobe* (Mp), e uma imagem de histologia (Fig.5.2.1.D). Na imagem de histologia, o tumor Tu<sub>1A</sub> está circundado com um contorno fechado, na cor preta, e as camadas mucosa (Mu), submucosa (Su) e muscular externa (Me) são indicadas por setas. Ainda na imagem de histologia é possível observar uma displasia epitelial e hiperplasticidade na região do tumor.

*Tabela 5.2.1. Numeração dos animais e volume medido para cada tumor de cólon*

<b>Camundongo #</b>	<b>Tumor</b>	<b>Volume do tumor (mm<sup>3</sup>)</b>
<b>1</b>	Tu <sub>1A</sub>	5,103
	Tu <sub>2A</sub>	1,015
<b>2</b>	Tu <sub>2B</sub>	0,937
	Tu <sub>2C</sub>	6,082
	Tu <sub>3A</sub>	0,299
<b>3</b>	Tu <sub>3B</sub>	3,105
	Tu <sub>3C</sub>	2,515
	Tu <sub>4A</sub>	0,066
<b>4</b>	Tu <sub>4B</sub>	0,493
	Tu <sub>4C</sub>	0,083
<b>5</b>	Tu <sub>5A</sub>	2,890

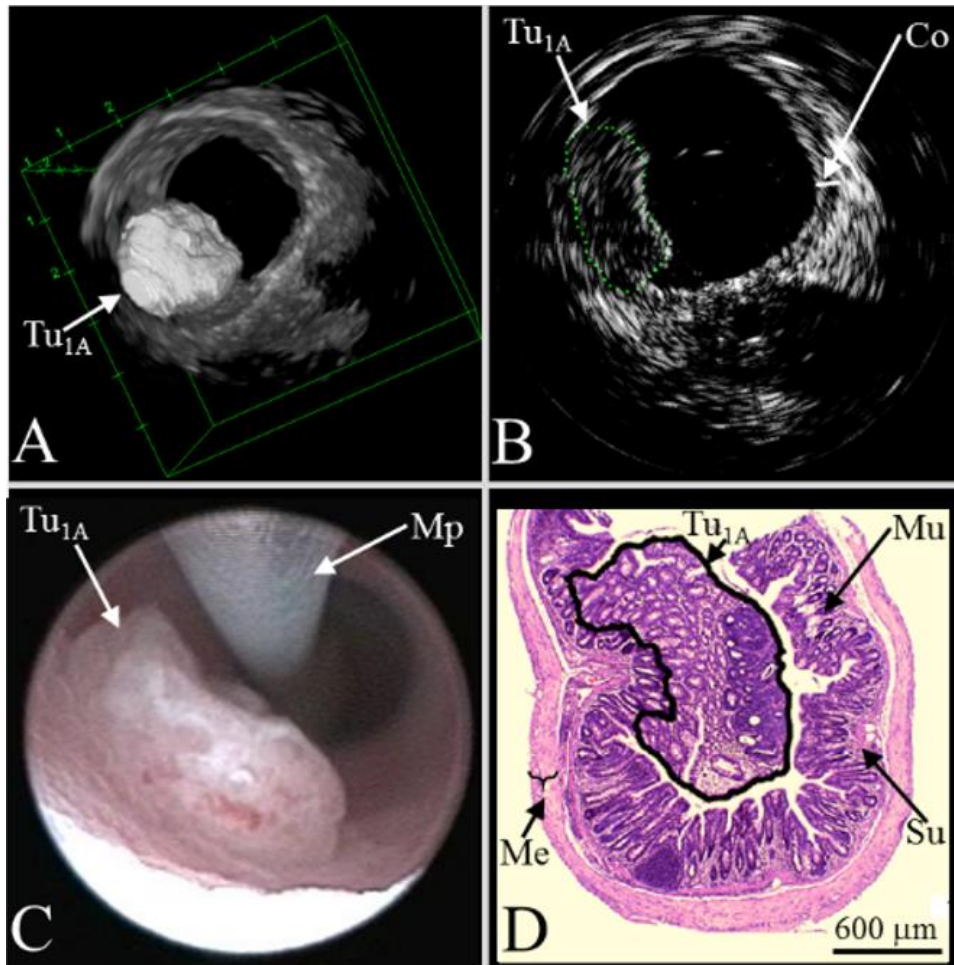


Figura 5.2.2. Imagens de colonoscopia e BMUe-2D adquiridas simultaneamente, *in vivo*, do cólon do camundongo #1 contendo um tumor polipóide. (A) Imagem de BMUe-3D do cólon com a indicação do tumor polipóide  $Tu_{1A}$ . Escala 1 mm/divisão. (B) Imagem de BMUe-2D de um segmento do cólon, com o tumor ( $Tu_{1A}$ ) segmentado manualmente e circundado por um contorno fechado de cor verde e com a parede do cólon indicada por Co. (C) Imagem de colonoscopia do tumor polipóide  $Tu_{1A}$ , sendo também mostrado o miniprobe (Mp). (D) Imagem de histologia (corada de H&E) do cólon com tumor polipóide delimitado por um contorno fechado na cor preta, mostrando as camadas do cólon: mucosa (Mu), submucosa (Su) e muscular externa (Me) (OLIVEIRA, 2021).

As imagens de BMUe-3D do tumor  $Tu_{1A}$  foram renderizadas baseado numa sequência de 158 imagens de BMUe-2D, com espaçamento padronizado em 25  $\mu$ m, das quais 23 foram usadas como  $IP_i$ , e 135 usadas com  $IP_o$ , para as quais os contornos dos tumores foram obtidos por interpolação semi-automática. O conjunto das 158 máscaras



correspondentes à área da seção transversal nas imagens de BMUe-2D do tumor foi usado para a construção da imagem de BMUe-3D.

O camundongo #2 apresentou múltiplos tumores polipoides de cólon, conforme pode ser observado na Figura 5.2.3, onde são exibidas duas imagens de BMUe-3D, (A e B) contendo 2 tumores polipoides,  $Tu_{2A}$  e  $Tu_{2C}$  em (A) e  $Tu_{2B}$  e  $Tu_{2C}$  em (B) contendo o mesmo segmento de cólon, mas com diferente angulação de visão. As imagens de BMUe-3D dos tumores  $Tu_{2A}$ ,  $Tu_{2B}$  e  $Tu_{2C}$  foram reconstruídas a partir de uma sequência de imagens de BMUe-2D ( $IP_i$ ) contendo 91(12), 88(14) e 139(19) imagens, respectivamente. O comprimento total desse segmento de cólon é de 4,75 mm. Uma imagem de BMUe-2D com os tumores  $Tu_{2B}$  e  $Tu_{2C}$ , segmentados com um contorno fechado da cor verde, está mostrada em (C) e duas imagens de colonoscopia são apresentadas, uma mostrando o tumor  $Tu_{2C}$  em (D) e outra mostrando o tumor  $Tu_{2B}$  em (E). Na Figura 5.2.3.F é mostrada uma imagem de histologia com os tumores  $Tu_{2B}$  e  $Tu_{2C}$ , com a identificação das camadas: mucosa (Mu), submucosa (Su) e muscular externa (Me).

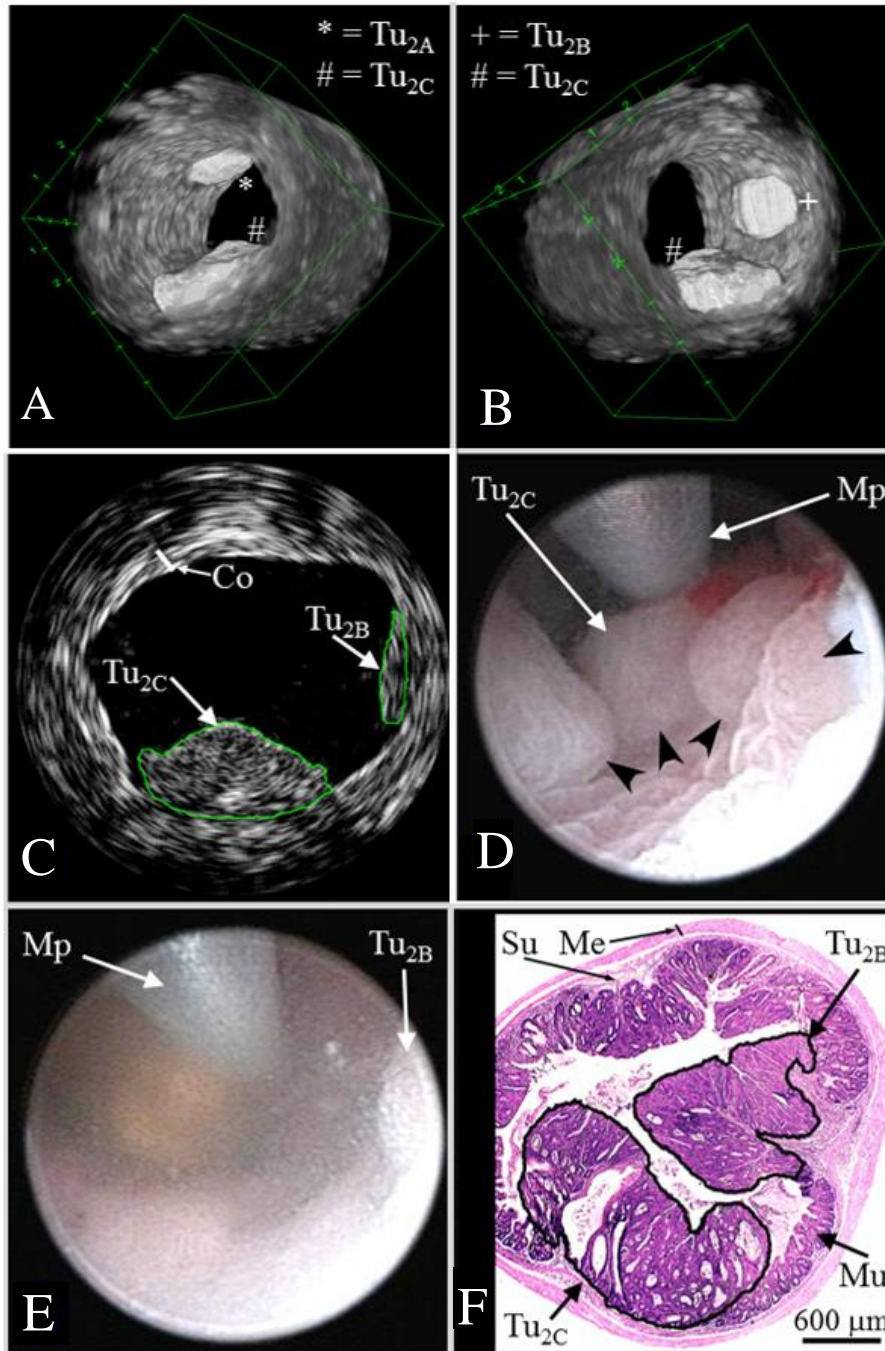


Figura 5.2.3. Imagens de BMUe-3D, BMUe-2D e colonoscopia adquiridas simultaneamente, in vivo, do cólon do camundongo #2 contendo múltiplos tumores. (A) Imagem de BMUe-3D do cólon, mostrando dois tumores polipoides ( $Tu_{2A}$  e  $Tu_{2C}$ ). (B) Imagem de BMUe-3D do mesmo camundongo, com diferente ângulo de visão, mostrando dois tumores polipoides ( $Tu_{2B}$  e  $Tu_{2C}$ ). (C) Imagem de BMUe-2D, mostrando dois tumores ( $Tu_{2B}$  e  $Tu_{2C}$ ) presentes na mesma secção transversal do cólon e circundados com uma linha verde de contorno fechado. (D) Imagem de colonoscopia com identificação do tumor polipoide ( $Tu_{2C}$ ) e do cateter do miniprobe (Mp). (E) Imagem de colonoscopia com identificação do tumor polipoide ( $Tu_{2B}$ ) e do cateter do miniprobe (Mp). (F) Imagem de histologia (corada com H&E) com identificação dos tumores polipoides ( $Tu_{2B}$  e  $Tu_{2C}$ ), segmentados por uma linha preta em contorno

*fechado, e com a indicação das camadas do cólon: mucosa (Mu), submucosa(Su) e muscular externa (Me) (OLIVEIRA, 2021).*

## 6 Discussão

Trabalhos apresentados previamente utilizando a BMU, operando em 40 MHz, comprovaram sua capacidade técnica quanto ao poder de resolução espacial em imagens de cólons de camundongos adquiridas *in vivo*, com resolução suficiente para distinguir as diferentes camadas do cólon. Com isto, indicando a possibilidade de utilização do sistema de BMU em trabalhos pré-clínicos com camundongos (OLIVEIRA, 2020; SOLETTI, 2013; ALVES, 2013; DE BRITTO, 2013).

Nosso grupo de pesquisa demonstrou em trabalhos publicados anteriormente (SOLETTI, 2013; ALVES, 2013; DE BRITTO, 2013) DAR REFS, que a colonoscopia associada ao sistema de BMUe-2D é uma instrumentação importante em estudos pré-clínicos na inspeção de lesões de cólon, com a complementação de ambas as técnicas. A colonoscopia permite a visualização da superfície do cólon, de seu aspecto e de componentes presentes, características essenciais na detecção de tumores, identificação de inflamações e identificação da presença de fezes, o que não seria possível somente com imagens de US.

Um aprimoramento dessa instrumentação foi desenvolvido nesse trabalho, com o objetivo de gerar imagens em três dimensões de BMUe e permitir medidas de espessamento do cólon e estimativas de volume de tumores de cólon. Aplicações futuras dessa técnica podem considerar estudos pré-clínicos baseados em rastreamento de volumes tumorais como respostas a terapias anticâncer.

No presente trabalho, o sistema de BMUe e colonoscopia detectou diferenças significativa entre a média global do grupo cólon saudável e do grupo cólon inflamado, pela média global do espessamento do cólon. O espessamento das camadas do cólon é um parâmetro importante para o rastreamento do progresso de CRC em modelos

animais. Outro importante aspecto é a diferença nas imagens de colonoscopia entre as imagens do grupo normal do grupo inflamado, no grupo normal a superfície interna do cólon tem uma aspecto liso, enquanto no grupo inflamado a superfície do interna do cólon tem um aspecto enrugado.

O sistema de BMUe apresentou resolução espacial suficiente para a aquisição de imagens de regiões cilíndricas de paredes do *phantom* com área transversal de 0,073 mm<sup>2</sup> e diâmetro de 0,30 mm.

Em geral, o espaçamento utilizado entre os  $IP_i$ 's foi de 10 passos, cada passo separando duas imagens consecutivas de BMUe-2D, e foi mostrado nos resultados, o erro relativo entre o volume medido e o calculado para o alvo cônico do *phantom* Ph1 foi da ordem de 10%, mesmo para um espaçamento menor, de cinco passos. Sendo assim, esse espaçamento de 10 passos foi padronizado para os *phantoms*. No caso dos animais, o espaçamento entre os  $IP_i$ 's foi dependente da variação na ROI ao longo do eixo longitudinal do tumor, sendo que nas suas extremidades o espaçamento variou entre 5 e 10 passos, dependendo do operador, e na parte central do tumor foram realizados espaçamentos de 10 passos.

O presente trabalho estimou volumes de tumores de cólon de camundongos entre 0.066 mm<sup>3</sup> (Tu<sub>4A</sub>) a 6.082 (Tu<sub>2C</sub>) mm<sup>3</sup>. Em comparação com o trabalho realizado por FREELING (2016), onde o menor valor estimado foi de 0,5 mm<sup>3</sup>, usando-se um sistema de BMU transabdominal e operando na frequência de 40 MHz. Comparativamente, sistemas baseados em tomografia computadorizada tem resolução espacial suficiente para definir camada do cólon e medir volumes menores que 0,8 mm<sup>3</sup> (DURKEE, 2010) e sistemas baseados em ressonância magnética tem resolução para medirem volumes da ordem de 1,2 mm<sup>3</sup> (YOUNG, 2009).

Uma comparação entre os sistemas de BMU transabdominal e endoluminal releva uma vantagem de um método sobre o outro e vice-versa. O método transabdominal tem a inerente limitação de inspecionar regiões mais distantes no cólon distal, onde os órgãos genitais e a ponte pélvica formam uma sombra distal, que é mais proeminente nos animais do sexo masculino, obstruindo o feixe de US e possibilitando um falso negativo (*miss rate*) na detecção de lesões. Em contrapartida, o método baseado em BMUe permite uma inspeção completa do cólon distal, evitando falsos negativos de lesões. Em adição, o sistema de BMUe utilizado é conjugado com imagens de colonoscopia obtidas simultaneamente, que é o padrão ouro para inspeção de cólons, que como abordado anteriormente apenas verifica a superfície das mucosa do cólon.

A possibilidade translacional da técnica de BMUe para exames clínicos irá requerer a diminuição da frequência do US, permitindo maior profundidade de penetração da onda de US através do cólon, que tem dimensões maiores se comparado com cólon de camundongo. No entanto, a diminuição da frequência acarretará na diminuição da resolução do sistema de BMU (FOSTER, 2011). No entanto, essa menor resolução é compensada pelas maiores dimensões das paredes do cólon humano. De fato, ultrassom endoluminal usado em exames clínicos para a realização de imagens em cólon em humanos emprega frequências na faixa de 12 a 20 MHz e as imagens geradas apresentam resolução e penetração suficientes para ao longo de toda a parede do cólon, permitindo localizar tumores e determinar o grau de invasão dos mesmos nas camadas da parede do cólon (GALL, 2014; HAJI, 2012). Somando-se a esse fator, um sistema de US operando em 20 MHz foi usado em um estudo prospectivo, com 104 pacientes, alcançando a eficácia de 96,1% na determinação do estágio de lesões do cólon nas camadas mucosa e submucosa (HAJI, 2012). Assim, a diminuição da frequência de US para a faixa entre 10 e 20 MHz, para realizar imagens clínicas em cólons, não

comprometeria a estimativa de volume, uma vez que a resolução do sistema de imagem continua adequada e capacitada para definir as camadas do cólon humano.

Erros na renderização das imagens de volume podem ser gerados devido a vulnerabilidade da imagem à Distorção Rotacional Não Uniforme (NURD - *nonuniform rotational distortion*), quando é utilizado um *miniprobe* de US como o empregado no presente trabalho, principalmente ao atravessar partes não retas do cólon. No entanto, esses erros foram minimizados no presente trabalho, visto que somente o cólon distal foi inspecionado e o *miniprobe* foi mantido o mais reto possível, também considerando o colonoscópio rígido utilizado em conjunto com o *miniprobe*, que permitiu a inspeção de secções retas. Ainda nesse mérito, existem caminhos para corrigir o efeito NURD, usando-se métodos computacionais de processamento de imagens (AHSEN, 2014; LEE, 2016) e este tema pode torna-se objeto de futuros trabalhos envolvendo a geração de imagens de BMUe-3D não só restritas ao cólon distal.

A maior diferença relativa entre o volume estimado e o calculado para os alvos dos *phantoms* foi de 11, 17% para o alvo cônico, contrastando com a menor diferença de 1,34% para o alvo inclinado. Essa diferença pode sugerir uma limitação na interpolação linear para a segmentação semiautomática e estimativa de volumes. Como melhorias futuras poderão ser utilizadas técnicas de interpolação por contornos ativos para a segmentação dos tumores nas imagens de BMUe-2D, ao custo da necessidade de maior tempo para processamento e mais processamento computacional.

## 7 Conclusão

Foram obtidas imagens do *phantom* multicamadas e do *phantom* de validação da estimativa de volume, desenvolvidos e confeccionados para as respectivas finalidades. Estas imagens mostraram que o formato e a geometria, bem como as características de espalhamento de ultrassom pelas camadas são semelhantes às do cólon. Assim cumpriu-se o objetivo de mimetizar um determinado tecido, testar a instrumentação de BMUe e validar a estimativa dos volumes, com erro máximo de 11,17% entre o volume estimado e o calculado teoricamente nos *phantoms* de validação.

Foi demonstrado que as imagens de colonoscopia são capazes de verificar a superfície do cólon e diferenciar, qualitativamente, cólons normais de cólons inflamados. Também foi demonstrado a capacidade do sistema de BMUe em verificar a diferença entre os dois grupos, normal e inflamado, através da medida da espessura das camadas do cólon.

A reconstrução de imagens de BMUe-3D permitiu a análise de camadas mais profundas com estimativas de volume e profundidade de lesões ou tumores. Adicionalmente, é possível usar diversos planos de corte na imagem volumétrica para a análise de diferentes regiões. Uma das maiores vantagens da geração de imagens BMUe-3D é a possibilidade de determinação de volumes de lesões ou tumores e a diminuição da característica de operador-dependente das imagens US em 2D. Estes parâmetros têm implicações diretas no tipo, no tempo e na resposta do tumor a um tratamento.

Assim, o sistema de BMUe apresenta-se como um ferramenta com potencial para a realização de trabalhos futuros relacionados com o rastreamento da resposta



tumoral a terapias anticâncer do cólon em investigações pré-clínicas em modelos animais.

## 8 Referências bibliográficas

ALVES, K.Z., SOLETTI, R.C., DE BRITTO, M.A.P., DE MATOS, D.G., SOLDAN, M., BORGES, H.L., MACHADO, J.C., “In Vivo Endoluminal Ultrasound Biomicroscopic Imaging in a Mouse Modelo of Colorectal Cancer”. **Academic Radiology**, Vol. 20, No. 1, pp. 90-98, 2013.

AMERICAN CANCER SOCIETY, **Colorectal Cancer Facts & Figures 2020-2022**, Atlanta: American Cancer Society, 2020.

ANDERSON, J.C., KAHI, C.J., **Colorectal Cancer Screening: Clinical Gastroenterology**, Editora Humana Press, Series Editor: George Y. Wu, Farmington, 2011.

BEAUGERIE, L., ITZKOWITZ, S.H.; “Cancers complicating inflammatory bowel disease”; **New England Journal of Medicine**. 372, 15: pp. 1441-1452, 2015.

CHORILLI, M., MICHELIN, D.C., SALGADO, H.R.N.; “Animais de Laboratório: o camundongo”; **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**; Vol. 28, n. 1, pp. 11-23, 2007.

CHAE, Y.J., KIM, J., HEO, H., WOO, C.W., KIM, S.T., KIM, M.J., CHOI, J.R., KIM, D.H., WOO, D.C., KIM, K.W., CHOI, Y., “Magnetic Resonance Colonography Enables the Efficacy Assessment of Immune Checkpoint Inhibitors in an Orthotopic Colorectal Cancer Mouse Model”. **Translational Oncology**; Vol. 12, n. 9, pp. 1264–1270, 2019.

DE BRITTO, M.A.P., SOLETTI, R.C., SCHANAIDER, A.; MADI, K.; DE SOUZA, H.S.P.S., MACHADO, J.C., “Endoluminal ultrasound biomicroscopy as a reliable tool for in vivo assessment of colonic inflammation in rats”. **International Journal of Colorectal Disease**, Vol. 28, pp. 1613-1620, 2013.

DURKEE, B.Y., SHINKI, K., NEWTON, M.A., IVERSON, C.E., WEICHERT, J.P., DOVE, W.F., HALBERG, R.B. “Longitudinal Assessment of Colonic Tumor Fate in Mice by Computed Tomography and Optical Colonoscopy”. **Academic Radiology**, Vol. 16: pp.1475–1482, 2009.

DE ROBERTIS M., MASSI E., POETA M.L., CAROTTI S., MORINI S., CECCHETELLI L., SIGNORI E., FAZIO V.M.; “The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies”, **Journal of Carcinogenesis**, Vol. 10, 2011.

FOSTER S., CATHERINE T.; **Small Animal Imaging- Basics and Practical Guide**; F. Kiessling e B. J. Pichler (Editores); Part. III, Cap. 15, Editora: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011.

FREELING J.L., REZVANI K., “Assessment of murine colorectal cancer by micro-ultrasound using three dimensional reconstruction and non-linear contrast imaging”. **Molecular Therapy – Methods & Clinical Development**, Vol. 5, pp.16070, 2016.

HÜNERBEIN M., TOTKAS S., GHADIMI B.M., “Preoperative evaluation of colorectal neoplasms by colonoscopic miniprobe ultrasonography”. **Annals of Surgery**, Vol. 232, n. 1, pp. 46-50, 2000.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA); Disponível em:  
<<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer> >; Acessado em 27 de Julho de 2021.

KLESSILING F.; **Small Animal Imaging- Basics and Practical Guide**; F. Kiessling e B. J. Pichler (Editores); Part III, Cap. 9, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011.

KUTTRUFF H.; **Acoutics An Introduction**, Editora Taylor & Francis, Nova York, 2007.

LAMBREGTS D.M.J., RAO S.X., SASSEN S., MARTENS M.H., HEIJNEN L.A., BUIJSEN J., SOSEF M., BEETS G.L., VliegEN R.A., BEETS-TAN R.G.H., “MRI and Diffusion-weighted MRI Volumetry for Identification of Complete Tumor Responders After Preoperative Chemoradiotherapy in Patients With Rectal Cancer: A Bi-institutional Validation Study”. **Annals of Surgery**, Vol.262, pp.1034–1039, 2015.

MARTINS N.S.F., CARNEIRO L.T., DANTAS H.M., ESPERANÇA C., MARROQUIM R.G., OLIVEIRA L.F., MACHADO J.C.; “Generation of 3D ultrasound biomicroscopic images: technique validation and in vivo volumetric imaging of rat lateral gastrocnemius”; **Research on Biomedical Engineering**, Vol. 31, n. 2, pp. 85-96, 2015.

MILLER S.J., HEIST K.A., FENG Y., GALBÁN C.J., REHEMTULLA A., ROSS B.D., FEARON E.R., WANG T.D., “Multimodal Imaging of Growth and Rapamycin-Induced Regression of Colonic Adenomas in Apc Mutation-Dependent Mouse”. **Translational Oncology**, Vol. 5, pp.313–320, 2012.

NASCIMENTO T.L., BORBA C.M., COSTA JUNIOR J.F.S., MACHADO J.C., “Phantom Ultrassônico que mimetiza imagens da pele com e sem lesões de melanoma” **XXIII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica**, Porto de Galinhas, 2012.

NGUYEN T.L.A., VIEIRA-SILVA S., LISTON A., RAES J., “How informative is the mouse for human gut microbiota research?” *Disease Models & Mechanisms*, Vol. 8(1), pp. 1-16, 2015.

NOUGARET S., ROUANET P., MOLINARI N., PIERREDON M.A., BIBEAU F., AZRIA D., LEMANSKI C., ASSENAT E., DUFFOUR J., YCHOU M., REINHOLD C., GALLIX B. “MR Volumetric Measurement of Low Rectal Cancer Helps Predict Tumor Response and Outcome after Combined Chemotherapy and Radiation Therapy”. **Radiology**, Vol. 263, n. 2, pp.409–418, 2012.

OLIVEIRA R.P., BAPTISTA R.P., CASTRO C.B., FALETTI, A., SOLETTI R.C., BORGES L.B., MACHADO J.C., “3-D Endoluminal Ultrasound Biomicroscopic Imaging and Volumetry of Mouse Colon Tumors”; **Ultrasound in Medicine and Biology**, <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2021.06.004>, 2021.

OLIVEIRA R.P., CASTRO C.B., CUNHA A.W.F., SOLETTI R.C., BORGES L.B., MACHADO J.C., “Vivo and Simultaneously Acquired Endoluminal Ultrasound Biomicroscopic and Colonoscopic Images of Inflamed Mouse Colon and Wall Thickness Measurement”; **Conference: 2020 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS)**, pp. 1-3, DOI: 10.1109/IUS46767.2020.9251491, Las Vegas, 2020.

OLIVEIRA R.P., SOLETTI R.C., MACHADO J.C., “3D-Endoluminal Ultrasound Biomicroscopy of Mouse Colon Tumor and Mimicking Phantom”. In: **XXVI Brazilian Congress on Biomedical Engineering**; IFMBE Proceedings 70/1; DOI:10.1007/978-981-13-2119-1\_62, Springer Nature Singapore, 2019.

OLIVEIRA R.P., GEREMIA J., SOLETTI R.C., MACHADO J.C., “Geração de imagens 3D de Biomicroscopia Ultrassônica endoluminal do cólon de camundongo” **XXV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica**, Foz do Iguaçu, 2016.

PORATTI M., MARZARO G.; “Third-generation CDK inhibitors: A review on the synthesis and binding modes of Palbociclib, Ribociclib and Abemaciclib”, **European Journal of Medicinal Chemistry**, Vol. 172, 2019.

RANDALL K.J., TURTON J., FOSTER J.R.. “Explant culture of gastrointestinal tissue: a review of methods and applications”. **Cell Biol Toxicol.**, Vol. 27(4), pp. 267-84, 2011.

RYAN L.K., FOSTER F.S., "Tissue equivalent vessel phantom for intravascular ultrasound". **Ultrasound in Medicine & Biology.**, Vol. 23, N. 2, pp. 261-273, 1997.

SCHRAMM N., ENGLHART E., SCHLEMMER M., HITTINGER M., ÜBLEIS C., BECKER C.R., REISER M.F., BERGER F., “Tumor response and clinical outcome in metastatic gastrointestinal stromal tumors under sunitinib therapy: Comparison of RECIST, Choi and volumetric criteria”. **European Journal of Radiology**, Vol. 82, pp. 951–958, 2013.

SIEGEL R.L., MILLER K.D., JEMAL A., “Cancer Statistics, 2019”. **Cancer Journal for Clinicians**, Vol. 69, n. 1, pp. 7-34, 2019.

SOLETTI R.C., DE BRITTO M.A.P., BORGES H.L., MACHADO J.C.; “Analysis of tumor morphology and vasculature in an animal model of colorectal cancer using *in vivo* contrast-enhanced endoluminal ultrasound biomicroscopy” **Ultrasonics Symposium (IUS)**, Desdren, 2012.

SOLETTI R.C., ALVES K.Z., DE BRITTO M.A.P., DE MATOS D.G., SOLDAN M., BORGES H.L., MACHADO J.C., “Simultaneous follow-up of mouse colon lesions by colonoscopy and endoluminal ultrasound biomicroscopy” **World Journal of Gastroenterology**, Vol. 19, n. 4, pp. 8056-64, 2013.

TORTURA G.J., DERRICKSON B., “**Principles of Anatomy and Physiology**”, Editora: John Wiley & Sons, 12<sup>a</sup> edição, Nova Jersey, 2008.

ZANZONICO P.; **Small Animal Imaging- Basics and Practical Guide**; F. Kiessling e B. J. Pichler (Editores); Part I, Cap. 1, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011.

## 8.1 Aprovação CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ  
Centro de Ciências da Saúde - CCS

Rio de Janeiro, 04 de novembro de 2019

Prezado Professor João Carlos Machado

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro registrada no Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) sob o número de processo 01200.001568/2013-87 certifica que o projeto intitulado: "Biomicroscopia Ultrassônica Endoluminal 3D no Diagnóstico de Tumores do Cólon.", protocolo nº 068/18, sob sua responsabilidade que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado por esta comissão de ética, em reunião do dia 22/10/2019.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do Projeto	Até 04/11/2022
Espécie/linhagem	<i>Mus musculus</i> / 129SVJ/Tac
Nº de animais	24 animais
Peso/idade	30g/ 2-3 meses
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério Multiusuário de ratos e camundongos do Programa de Anatomia do ICB – CCS – Bloco K – térreo – Contêiner – UFRJ.

Atenciosamente;

Prof. Marcel Frajblat  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CCS