

BIOMICROSCOPIA ULTRA-SÔNICA PARA CARACTERIZAÇÃO, *IN VITRO*, DA
COLITE POR ÁCIDO TRINITROBENZENO SULFÔNICO EM RATOS

Mônica Soldan

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA COORDENAÇÃO DOS
PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS
EM ENGENHARIA BIOMÉDICA.

Aprovada por:

Prof. João Carlos Machado, Ph.D.

Prof. Marco Antônio von Krüger, Ph.D.

Prof. Kalil Madi, D. Sc.

Prof. Fauze Maluf Filho, D. Sc.

Prof. Eduardo Tavares Costa, Ph. D.

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

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

DEZEMBRO DE 2007

SOLDAN, MÔNICA

Biomicroscopia ultra-sônica para
caracterização, *in vitro*, da colite por ácido
trinitrobenzeno sulfônico em ratos [Rio de
Janeiro] 2007

VII, 94 p. 29,7 cm (COPPE/UFRJ, D.Sc.,
Engenharia Biomédica, 2007)

Tese - Universidade Federal do Rio
de Janeiro, COPPE

1. Biomicroscopia ultra-sônica
2. Colite experimental
3. Doença de Crohn

I. COPPE/UFRJ II. Título (série)

Dedicatória

Ao meu pai, Carlos Roberto, por tudo.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. João Carlos Machado, exemplo de dedicação, seriedade e tolerância, modelo a ser seguido por todo educador.

Ao Prof. Kalil Madi, pela análise histológica do material da tese.

Ao Prof. Alberto Schanaider pela colaboração com o desenvolvimento do modelo animal.

Ao Prof. Paulo Cesar Silva, pelos ensinamentos em veterinária que me permitiram manusear os animais para realização dos experimentos.

Aos professores do Programa de Engenharia Biomédica-COPPE, por todos os conhecimentos transmitidos.

Às queridas amigas Kelly Zolli Alves e Lorena Itatí Petrella pela inestimável ajuda durante a realização da coleta de dados.

Ao Dr. Rodrigo Pacheco, pela colaboração nos experimentos com os animais.

À Prof^a Cyrla Zaltman, pela orientação fornecida para confecção do manuscrito.

Ao meu esposo, Guilherme, pela leitura e crítica do texto da tese.

Ao MCT-CNPq, MS-SCTIE-DECIT, ME-CAPES, pelo apoio financeiro.

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

BIOMICROSCOPIA ULTRA-SÔNICA PARA CARACTERIZAÇÃO, *IN VITRO*, DA COLITE POR ÁCIDO TRINITROBENZENO SULFÔNICO EM RATOS

Mônica Soldan

Dezembro/2007

Orientador: João Carlos Machado

Programa: Engenharia Biomédica

Ultra-som (47,3 MHz) foi usado na caracterização, *in vitro*, da colite por ácido trinitrobenzeno sulfônico em ratos. Foram obtidos imagens e parâmetros relacionados à propagação da onda no cólon com colite, com (n=18) e sem (n=20) úlceras. Resultados da média (± 1 desvio padrão) para cólon com e sem úlcera, sendo $p > 0,05$, foram, respectivamente: espessura (μm) de 1816,44($\pm 467,58$) e 1846,26($\pm 309,00$); velocidade (m/s) de 1621,99($\pm 110,59$) e 1627,52($\pm 138,83$); coeficiente de atenuação (dB/mm) em 50 MHz de 4,52($\pm 1,67$) e 5,71($\pm 1,99$), e de 4,52($\pm 1,65$) e 5,66($\pm 1,95$), usando bandas de -3dB e -6dB, respectivamente; coeficiente de retroespalhamento (1/sr-mm) em 50 MHz de $1,93(\pm 3,76) \times 10^{-3}$ e $3,25(\pm 4,07) \times 10^{-3}$, e de $2,13(\pm 4,53) \times 10^{-3}$ e $4,28(\pm 7,62) \times 10^{-3}$, usando bandas de -3dB e -6dB, respectivamente. O coeficiente de retroespalhamento integrado (1/sr-mm) foi medido ao longo da parede do cólon (n=4) e permitiu a quantificação do espalhamento do ultra-som pelas diferentes camadas da parede. As imagens permitem a identificação de diferentes camadas histológicas no cólon normal e das úlceras, quanto à profundidade, confirmada pela histologia.

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

IN VITRO ULTRASOUND BIOMICROSCOPY CHARACTERIZATION OF
TRINITROBENZENE SULFONIC ACID COLITIS ON RATS

Mônica Soldan

December/2007

Advisor: João Carlos Machado

Department: Biomedical Engineering

Ultrasound (47,3 MHz) was used for *in vitro* characterization of trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis on rats. Images and wave propagation parameters were obtained for colitis, with (n=18) and without (n=20) ulcers. Mean (± 1 std) results for colon with and without ulcer, all with $p > 0.05$, are, respectively: thickness (μm) of 1816.44(± 467.58) and 1846.26(± 309.00); speed (m/s) of 1621.99(± 110.59) and 1627.52(± 138.83); attenuation coefficient (dB/mm) at 50 MHz of 4.52(± 1.67) and 5.71(± 1.99), and of 4.52(± 1.65) and 5.66(± 1.95), using -3dB and -6dB bandwidths, respectively; backscattering coefficient (1/sr·mm) at 50 MHz of 1.93(± 3.76) $\times 10^{-3}$ and 3.25(± 4.07) $\times 10^{-3}$, and of 2.13(± 4.53) $\times 10^{-3}$ and 4.28(± 7.62) $\times 10^{-3}$ using -3dB and -6dB bandwidths, respectively. The integrated backscattering coefficient (1/sr·mm) was measured (n=4) across the wall of the colon and allowed for the ultrasound scattering quantification of the layers on the wall. The images allow identification of different histological layers of the normal colon as well as of the ulcers, accounting for their penetration depth, confirmed by histology.

SUMÁRIO

	Página
Capítulo I: Introdução	01
Capítulo II: Revisão da Literatura	03
II.1 – Doença de Crohn	03
II.2 – Biomicroscopia por ultra-som	19
II.3 – Parâmetros quantitativos obtidos com ultra-som	29
Capítulo III: Metodologia	36
III.1 – Modelo animal de colite por TNBS	36
III.2 – Biomicroscópio	44
III.3 - Obtenção dos parâmetros quantitativos	51
Capítulo IV: Resultados	56
IV.1 – Resultados quantitativos	56
IV.2 – Resultados qualitativos	61
IV.3 – Coeficiente de retroespalhamento integrado ou IBC	68
Capítulo V: Discussão	75
Capítulo VI: Conclusão	79
Capítulo VII: Referências Bibliográficas	80
Anexo I: Gráficos com resultados dos coeficientes de atenuação e retroespalhamento	88

CAPÍTULO I

Introdução

A Doença de Crohn (DC) é doença inflamatória do intestino (DII), de evolução crônica e com complicações graves que com grande frequência requerem tratamento cirúrgico [1]. A endoscopia é o padrão ouro para o diagnóstico inicial, mas o papel da cicatrização da mucosa na avaliação da resposta ao tratamento e em prognosticar o curso da doença é controverso [2]. Atualmente são utilizados sistemas de classificação clínicos para avaliação de atividade da DC, já que os índices endoscópicos de gravidade não se correlacionam com as respostas aos tratamentos tradicionais como corticosteróides e aminosalicilatos [2]. Alternativas à avaliação endoscópica para medição da atividade na DC como ultra-som e ressonância nuclear magnética são relatadas [3,4] com a vantagem de oferecerem o exame da parede intestinal em sua profundidade.

Modelos animais têm sido extremamente úteis não só para estudar os mecanismos da inflamação relacionados à DII, como também por proverem informações sobre quais citocinas podem ser alvos potenciais ao bloqueio medicamentoso. A colite induzida por TNBS (ácido trinitrobenzeno sulfônico) é um modelo experimental comumente usado, no qual a mucosa é exposta a um agente de contato sensibilizador, o TNBS, que ao se ligar a proteínas autólogas estimula uma resposta de hipersensibilidade tardia. Este modelo de inflamação crônica intestinal tem achados semelhantes àqueles da DC observada em humanos [5].

A biomicroscopia por ultra-som (BMU) permite a obtenção de imagens de tecido vivo de forma não invasiva e com resoluções microscópicas [6]. É uma técnica que emprega ultra-som (US) em altas frequências (na faixa de 40-100 MHz) com esta finalidade. Ela é referida na literatura como *ultrasound backscatter microscopy*, *ultrasound biomicroscopy (UBM)*, *high frequency ultrasound* ou *very high frequency ultrasound*.

Assim como ocorre com as técnicas convencionais de ultra-som em medicina, BMU permite ainda que se obtenham parâmetros ultra-sonográficos quantitativos e

usados para a caracterização de meios biológicos, tais como o coeficiente de atenuação e o coeficiente de retro-espalhamento em frequências elevadas, como também a velocidade de propagação da onda. Não foram encontrados relatos de utilização da BMU para cólon.

O presente trabalho teve como objetivo a utilização da BMU para examinar o cólon de rato submetido ao modelo de colite medicamentosa com TNBS. A proposta consistiu em obter imagens de ultra-som de alta resolução, identificar anormalidades estruturais da parede do cólon e correlacioná-las com a histopatologia. Em paralelo à obtenção de imagens foram determinados os parâmetros quantitativos, mencionados anteriormente, para a parede do intestino com anormalidades estruturais na tentativa de se fazer a comparação destes parâmetros com as áreas estruturalmente normais.

O Capítulo II é composto de uma revisão bibliográfica de doença de Crohn e de BMU. No Capítulo III descreve-se a metodologia usada para obtenção de imagens e parâmetros ultra-sonográficos quantitativos com a BMU. No Capítulo IV são descritos os resultados. Nos Capítulos V e VI estão a discussão e a conclusão desta tese.

CAPÍTULO II

Revisão da Literatura

II.1- Doença de Crohn

II.1.1- Definição

A doença inflamatória intestinal (DII) compreende todas as condições caracterizadas pela tendência à ativação imune crônica ou recidivante com inflamação do trato gastrointestinal [1].

A Doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa inespecífica (RCUI) são as duas formas principais de DII. Menos importantes, mas com reconhecimento cada vez maior, são as colites linfocítica, colagênica primária e a microscópica atípica.

Outras condições inflamatórias crônicas do intestino compartilham aspectos de apresentação e patogênese, mas possuem causa identificável. Estas incluem a colite por derivação, por irradiação, por *by pass*, ou induzida por drogas.

As duas maiores formas de DII se assemelham quanto aos seus aspectos clínicos e epidemiológicos, sugerindo um agente causal similar. Esporadicamente, não podem ser distinguidas em bases clínicas, apesar de serem doenças com tratamento e prognóstico diferentes.

A DC é uma doença em que ocorre inflamação crônica envolvendo potencialmente qualquer localização do trato alimentar, da boca ao ânus, mas com propensão para o delgado distal e cólon proximal. A inflamação é descontínua ao longo do eixo longitudinal e envolve todas as camadas da mucosa até a serosa. As pessoas afetadas geralmente se queixam de diarreia e dor abdominal, freqüentemente acompanhada de perda de peso [1].

Alguns aspectos gerais da DII são descritos nesta revisão, abordando-se com maior profundidade a DC.

II.1.2- Epidemiologia

A incidência e a prevalência da DII variam grandemente com a localização geográfica [7]. A freqüência por 100.000 habitantes varia de 35 a 100 para RCUI e de

10 a 100 para a DC. O número de casos novos anuais por 100.000 habitantes (incidência) varia de 0,5 a 13 para a RCUI e 0,08 a 7 para a DC. O mundo pode ser dividido em regiões de alta incidência (EUA, Inglaterra, Itália e Escandinávia), incidência intermediária (sul da Europa, África do Sul, Austrália, Nova Zelândia) e incidência baixa (Ásia, América do Sul).

No Brasil, a real incidência da DII não é conhecida, mas ela é maior nas regiões Sul e Sudeste [7].

A incidência de DII tem aumentado em todo o mundo, especialmente por causa do crescimento no número de pacientes com DC. Este fato pode ser atribuído a um melhor conhecimento da doença, mas parece refletir uma real elevação da incidência, sugerindo a participação de fatores ambientais ainda não identificados [7].

A DII pode acometer qualquer faixa etária, porém incide mais entre os 20 e 40 anos. Alguns autores descrevem um segundo pico de incidência entre os 60 e 80 anos, configurando a chamada apresentação bimodal. Existe um predomínio entre brancos, em detrimento de negros e amarelos e uma predileção pelo sexo feminino. Do ponto de vista étnico, é mais freqüente em judeus, particularmente aqueles com origem européia [7].

II.1.3- Etiologia e patogênese

Alguns fatores de risco são identificados para o desenvolvimento de DII e incluem fatores genéticos e ambientais. Os ambientais são o fumo, consumo de anticoncepcionais e antiinflamatórios não esteróides (AINES), dieta, infecções, amamentação, doenças na infância e apendicectomia [1,8].

Vários fatores genéticos estão envolvidos na etiopatogenia da DII. Em associação com fatores luminiais (presentes no lúmen intestinal), fatores relacionados à barreira intestinal e com as alterações na imuno-regulação da mucosa intestinal formam o conjunto de aspectos causais relacionados à doença [1,8].

À luz dos achados patológicos na DC e RCUI, está claro que existe um estado de resposta imune sustentada. Vários agentes infecciosos foram propostos como causa da DII, incluindo bactérias e vírus. Experimentos com modelos genéticos animais de DII sugerem que em um hospedeiro geneticamente susceptível não é necessária a existência

de um patógeno clássico. Bastaria um comensal da flora entérica para induzir uma resposta inflamatória crônica [1,9].

À luz da diversidade de substâncias e bactérias presentes na luz intestinal, é notável que o intestino não esteja cronicamente inflamado. A existência de um nível baixo de inflamação fisiológica na mucosa intestinal saudável representa um estado de predisposição para a convivência com agentes potencialmente danosos. Uma resposta mais vigorosa não seria apropriada se dirigida contra a flora comensal inócua. A inflamação é mantida sob controle através de um processo ativo denominado tolerância imunológica [10].

Quando ocorre um desafio antigênico, ou a tolerância é quebrada, surge a resposta imunológica que pode ser direcionada para imunidade mediada por células ou para a imunidade humoral. Há então produção de perfis de citocinas característicos das subpopulações de linfócitos CD4 T ativadas.

Genes específicos relacionados à DII foram identificados com o sequenciamento do genoma humano, com dois grupos independentes identificados num *locus* do cromossomo 16, denominados genes NOD2/CARD15 [11,12]. De 20-30% dos pacientes com DC têm anormalidades nos genes e em contrapartida um grande número de indivíduos com variações genéticas não têm DC, o que sugere a participação de fatores ambientais na expressão fenotípica da doença.

II.1.4- Patologia

Cólon normal

No cólon normal são encontrados linfócitos, plasmócitos, eosinófilos e neutrófilos distribuídos de forma esparsa pelo terço superior da lâmina própria, em geral mais numerosos no ceco [13]. Células indiferenciadas proliferam-se a partir da metade inferior das criptas, sofrem maturação enquanto migram à superfície, onde elas entram em apoptose e se descamam. Secreção ocorre nas criptas e absorção na superfície. Entre as células diferenciadas do epitélio visíveis aos cortes coloridos com hematoxilina e eosina estão as células caliciformes, as células absortivas, células endócrinas, células de Paneth e células M recobrando os folículos linfóides. As criptas normais são estreitas, paralelas, uniformemente espaçadas e uniformes em diâmetro. Suas bases são próximas

à muscular mucosa e, em adultos e crianças maiores que 9 anos, ramificações das criptas indicam regeneração após sua destruição [13].

Achados na DC

O achado patológico típico da DC é a inflamação intestinal focal. Esta tendência é evidente nas criptas, com áreas focais de intensa inflamação, presença de aftas e úlceras em um fundo com ou sem inflamação crônica e alternância de segmentos acometidos e não acometidos no intestino [1].

Achados precoces

Macroscopicamente, a lesão mais precoce e mais característica é a úlcera aftóide. São úlceras rasas, pequenas (até 3 mm), com halo de hiperemia. No delgado elas surgem sobre agregados linfóides. No cólon, as aftas podem ocorrer sem uma erosão central visível e podem estar associadas a complexos linfoepiteliais [1].

A presença de granulomas, apesar de característica da DC, não é exclusiva e tão pouco universalmente encontrada [1,14]. Estima-se que granulomas estejam presentes em 15% dos casos nas séries endoscópicas e 70% nas séries cirúrgicas. A variação parece estar associada a uma questão amostral. Os granulomas podem ser encontrados fora do tubo digestivo (pele, olho e fígado), mas são raridade. Eles são do tipo sarcóide, consistindo de coleções de histiócitos epitelióides e uma mistura de células inflamatórias. A inflamação granulomatosa na DC representa um processo particular envolvendo tipos celulares característicos e regulação por citocinas e moléculas de adesão específicas. O fator de necrose tumoral (TNF) é a citocina chave na formação de granulomas [1].

Achados tardios

Espécimes ressecados de intestino podem mostrar focos de distorção arquitetural acompanhados de inflamação crônica, sugerindo que lesões superficiais precoces, como aftas, podem ser reversíveis.

A lesão crônica caracteriza-se pela coalescência das lesões aftóides em úlceras grandes e de formato estrelado. Úlceras lineares ou serpiginosas podem se formar quando múltiplas lesões se fundem no sentido longitudinal. Com a coalescência

longitudinal e transversal das úlceras surge o aspecto clássico de ‘seixo de rio’. Áreas de mucosa relativamente normal e edema submucoso, assim como úlceras estendendo-se até a muscular própria também estão presentes.

O acometimento inflamatório é transmural na DC, em contraste com o acometimento superficial na RCUI, o que não pode ser apreciado com as biópsias endoscópicas superficiais. O acometimento transmural é menos observado que o mucoso e submucoso, mas quando encontrado é altamente sugestivo de DC. Grandes úlceras, fístulas e estenoses são achados tardios da DC. Perfurações livres são raras.

Densos agregados linfóides podem espessar a submucosa e estar presentes externamente à muscular própria.

A fibrose é outro evento transmural visto como espessamento irregular da parede do intestino. Junto com a hipertrofia da muscular mucosa pode contribuir para a formação de estenoses. O fator de crescimento tumoral beta 1 (TGF- β 1) é liberado localmente na inflamação e é a citocina crítica para cicatrização. Fibroblastos isolados da lâmina própria produzem colágeno tipo III em resposta a TGF- β 1 e, nos tecidos inflamados da DC grandes quantidades de colágeno tipo III são produzidos em resposta a esta citocina [1].

II.1.5- Aspectos clínicos

Localização da doença

A DC tem predileção pelo delgado distal e pelo cólon proximal [1,9]. Aproximadamente metade dos pacientes tem doença que afeta o íleo e o cólon. Um terço tem doença confinada ao delgado, principalmente no íleo terminal. Envolvimento isolado de esôfago, estômago, duodeno e jejuno é raro. Normalmente, o acometimento destes seguimentos é acompanhado de lesão do delgado distal e do cólon. Vinte a 25% dos pacientes têm doença restrita ao cólon.

Apresentação clínica

As apresentações típicas são a doença ileal com acometimento cecal, a doença colônica e a doença perianal. Apresentações não usuais são a doença gastroduodenal com úlceras H pylori negativas, a doença esofagiana, a jejunoileíte e a forma apendicular [1].

Comportamento da doença

O comportamento da doença pode ser dividido em duas categorias: uma forma agressiva fistulizante e outra indolente cicatrizante caracterizada pela formação de estenoses. Um terceiro grupo não desenvolve, ao longo de anos, nenhum dos comportamentos anteriores.

Fístulas e abscessos

As fístulas são frequentes e denotam a natureza transmural da DC. As mais comuns são as perianais, que ocorrem em 15-35% dos pacientes. Fístulas de um segmento intestinal para outro também ocorrem frequentemente e são comumente assintomáticas. Mais raramente ocorrem fístulas coloduodenais, cologástricas, enterovesicais, colovesicais, retovaginais e enterocutâneas.

Um quarto dos pacientes com DC apresenta-se com abscesso intra-abdominal em alguma época da vida. A maioria tem formas contidas de perfuração.

Estenoses

A estenose é outra complicação característica da DC. Ela representa inflamação de longa duração e pode ocorrer em qualquer segmento do trato gastrointestinal no qual a inflamação tenha permanecido ativa. Tende a recorrer principalmente em locais de anastomoses, em pacientes submetidos a ressecções intestinais por estenoses prévias. As estenoses devem ser consideradas com suspeita e sempre submetidas a biopsia, pelo risco de abrigar um câncer.

Classificação da doença

Uma questão essencial na investigação clínica da DC é a habilidade para definir subgrupos de pacientes com características e prognósticos distintos. Esta habilidade poderia adicionar grande poder na investigação de novas terapias e estudos genéticos.

A Classificação de Viena da DC [15] propõe um esquema que inclui a idade do paciente no início da doença, a localização da doença e o comportamento da mesma, em um esquema de 24 subgrupos potenciais. Ainda podem ser usadas características subclínicas como marcadores sorológicos e perfis genéticos para identificação de subgrupos.

Sintomas e sinais comuns

A diarreia é a queixa mais comum e pode ser atribuída a fatores múltiplos.

Outros achados são anemia, febre, perda de peso e desnutrição, estas últimas agravadas por náuseas e vômitos[1,9].

Manifestações extra-intestinais

Somando-se às complicações cicatrizantes e fistulizantes, numerosas complicações podem ocorrer distantes do intestino. Estima-se que um quarto dos pacientes com DC tem manifestações extra-intestinais da doença. Muitas delas são comuns à DC e à RCUI, além de outras condições inflamatórias do intestino.

Manifestações musculoesqueléticas

Entre as manifestações mais comuns estão as dos ossos e das articulações, geralmente não deformantes. Comumente, podem ocorrer baqueteamento digital e artropatia periférica pauci ou poliarticular, sem deformação significativa, além de eritema nodoso e uveíte.

Menos comumente podem ocorrer artropatias axiais como a espondilite anquilosante. Entre as complicações reumatológicas mais raras estão vasculite granulomatosa, periostite e amiloidose. Também podem ocorrer complicações relacionadas à extensão da doença, como artrite séptica e osteomielite, ou relacionadas ao uso de corticoesteróides, como pseudoartrite, necrose asséptica da cabeça do fêmur e doença óssea metabólica (osteopenia).

Manifestações mucocutâneas

As lesões de pele mais frequentemente encontradas são o pioderma gangrenoso e o eritema nodoso. Na DC, o pioderma e o eritema são associados à recrudescência de sintomas intestinais e tendem a melhorar com o tratamento. Ainda comumente encontradas são as úlceras aftóides da boca e a queilite angular. Outras lesões menos comuns são o acometimento da boca por inflamação granulomatosa, o Crohn metastático, a vasculite leucocitoclástica, a dermatose neutrofílica, a poliarterite nodosa, epirmólise bolhosa e psoríase.

Manifestações oculares

As manifestações oculares ocorrem em 6% dos casos de DC. A episclerite e a esclerite são associadas com a atividade da DC. Também ocorrem uveíte, ceratopatia e cegueira noturna resultantes da má absorção de vitamina A.

Manifestações renais e genitourinárias

Há complicações diretas relacionadas à forma perfurante da DC com acometimento da bexiga e outras estruturas genitourinárias. É também comum a formação de cálculos de oxalato e ácido úrico. Entre complicações mais raras estão a nefropatia membranosa, a glomerulopatia membranosa e a amiloidose renal.

II.1.6- Diagnóstico diferencial

Estabelecer o diagnóstico de DC pode ser uma tarefa difícil, já que um grande número de doenças pode ser confundido com ela, dada a variabilidade anatômica da doença, os diferentes graus de inflamação e a presença de manifestações extraintestinais. Entre as situações clínicas nas quais o diagnóstico deve ser suspeitado estão: diarreia ou dor abdominal, especialmente quando localizada no quadrante inferior direito; evidência de inflamação em estudos endoscópicos ou radiológicos; evidência de estenose ou fístula no intestino; presença de inflamação ou granulomas na histologia do intestino.

Entre as situações clínicas que mais comumente se apresentam como diagnóstico diferencial estão os distúrbios funcionais do intestino, incluindo a síndrome do cólon irritável, as doenças imunomediadas (principalmente a RCUI), medicações (antiinflamatórios não hormonais), doença vascular (doença isquêmica do intestino), neoplasias (carcinoma e linfoma) e diarreia infecciosa.

II.1.7- Diagnóstico e avaliação da doença

Não há sintoma, sinal ou teste diagnóstico que possa estabelecer, isoladamente, o diagnóstico de DC. O diagnóstico é estabelecido através da apresentação clínica e confirmado por achados radiológicos, endoscópicos e patológicos.

Laboratório

Achados laboratoriais não específicos incluem anemia, leucocitose, elevação da proteína C reativa e da taxa de sedimentação de eritrócitos.

Em última análise, o diagnóstico será confirmado por achados radiológicos de estudos contrastados, endoscopia e histopatologia.

Imagem

Estudo radiológico contrastado

O estudo do trânsito de delgado é a primeira opção quando a suspeita é de doença de delgado. O exame é especialmente útil para o diagnóstico de complicações transmuralis tardias da doença, mas também podem ser vistos aspectos típicos da doença inicial, quais sejam úlceras aftosas, pregas espessadas e padrão de mucosa com achatamento das vilosidades. O edema submucoso pode ser visto como achatamento e espessamento das válvulas coniventes e o edema transmural se manifesta com alargamento da separação entre as alças intestinais. Achados posteriores incluem fístulas, estenoses e o aspecto de seixo de rio, resultante de ilhas de mucosa relativamente preservada, separadas por úlceras longitudinais e transversais [1,16].

Tomografia computadorizada

A tomografia computadorizada (TC) não mostra detalhes da mucosa e é freqüentemente normal no início da doença. É útil no discernimento de achados extraluminais, podendo identificar linfadenopatia mesentérica e espessamento transmural. Permite a detecção de ar em pequenas quantidades na parede do intestino ou estruturas adjacentes, diagnosticando doença perforante, assim como é capaz de identificar proliferação fibrogordurosa do mesentério. A TC é essencial para o diagnóstico de complicações supurativas da DC como abscessos intraperitoneais e retroperitoneais [1].

A estratificação da parede do intestino pode ser vista na TC através da técnica de realce por contraste e é uma expressão da inflamação transmural. Já o espessamento sem realce é resultado da evolução para fibrose submucosa ou transmural [16].

Ressonância magnética

A ressonância magnética (RM) é técnica não invasiva e não ionizante para obtenção de imagem do trato digestivo. Os melhoramentos recentes da técnica permitiram obtenção de imagens de estruturas luminais e extraluminais com alta resolução espacial [16].

Entre as anormalidades vistas no íleo terminal por RM estão o aumento da espessura da parede, úlceras, aumento do realce da parede após contraste magnético e estenoses [17].

Em estudo cujo objetivo era correlacionar o grau de realce da parede após injeção de contraste magnético (gadolínio) com o índice de atividade de doença medido pelo CDAI (Crohn's Disease Activity Index), a RM mostrou alta especificidade nos achados de imagens. O estudo conclui que a RM é útil em avaliar a atividade da doença na DC [3].

Cintigrafia com leucócitos marcados

A cintigrafia com leucócitos marcados (CL) tem sido usada para investigação de DII na população pediátrica por ser minimamente invasiva. A exposição à radiação ionizante é menor quando comparada ao estudo contrastado com bário (trânsito de delgado) [18]. O procedimento é baseado na habilidade de leucócitos marcados se acumularem nos tecidos inflamados. O Tc-99m tem sido o marcador de escolha. A técnica tem boa especificidade e acurácia no diagnóstico de DC íleo-cecal e boa correlação com os achados da TC helicoidal [18].

O uso conjunto da CL e do ultra-som transabdominal foi recomendado como avaliação inicial dos pacientes com DC do delgado, como opção não invasiva ao diagnóstico [18].

Ainda com relação ao uso da CL, sensibilidade e especificidade elevadas são relatadas para detecção e localização da inflamação colônica em comparação com colonoscopias e biópsias [19].

Ultra-som transabdominal

As primeiras tentativas de avaliar a DC por meio de ultra-som (US) são datadas do final da década de 70. Desde então muitos estudos têm avaliado a habilidade desta técnica em diagnosticar e monitorar a doença [1].

Os principais achados na DC são o espessamento e a rigidez da parede do intestino, modificações ou perda da sua ecoestratificação, redução da peristalse, proliferação fibro-gordurosa do mesentério, aumento dos linfonodos, estenoses, fistulas e abscessos.

A acurácia diagnóstica do US foi comparada ao achado macroscópico cirúrgico, à endoscopia e à radiologia para casos suspeitos de DC, com resultados para sensibilidade variando entre 84-90% e especificidade variando entre 98-100%.

A aplicação mais importante do US é o seguimento dos pacientes com DC já diagnosticada, nos quais ele pode ser útil para avaliar o local e a extensão da doença e para garantir o diagnóstico precoce de complicações, principalmente estenoses e abscessos [4]. A capacidade de localizar a doença foi comparada com a radiografia, a endoscopia e a cirurgia, com sensibilidade de 93% e especificidade de 97% [16]. Para detecção de estenoses e abscessos o US é comparável à cirurgia e às técnicas radiológicas, mas tem resultados menos satisfatórios para diagnóstico de fistulas (sensibilidade de 50-87% , especificidade de 90-95%). Sob este aspecto, a melhora da avaliação do fluxo intramural por meio de *Power Doppler* e uso de agentes de contraste venosos pode ajudar na diferenciação entre estenoses inflamatórias e fibróticas, além de discriminar massas inflamatórias intra-abdominais e abscessos. As informações sobre esta aplicação são preliminares e necessitam de confirmação [16].

O uso do US também já foi proposto como ferramenta de medição de atividade de doença. No entanto, uma correlação fraca entre os achados ultra-sonográficos e a severidade da doença é observada [4,16]. Os parâmetros avaliados na parede do intestino doente foram a espessura máxima, o padrão ecogênico, o comprimento e a vascularização. Quase todos produziram correlações fracas, o que significa que o papel do US intestinal em avaliar a atividade de doença permanece controverso [4].

Exames ultra-sonográficos repetidos após cirurgia de ressecção intestinal parecem ser úteis para monitoração de recorrência. A persistência de parede espessada ou o aumento do espessamento da parede foram identificados como indicadores de reoperação precoce [4].

Endoscopia

Devido à habilidade de visualizar a mucosa diretamente e permitir biópsias para estudo histopatológico, a endoscopia complementa as técnicas radiológicas. Muitos dos aspectos vistos nos estudos com bário são também vistos à endoscopia, como úlceras aftóides, edema, aspecto de seixo de rio e estreitamento da luz. O aspecto salteado e o reto poupado são aspectos típicos da DC. Intubação do íleo e biópsias devem ser sempre realizadas e aumentam a sensibilidade e a especificidade do exame endoscópico [1].

Cápsula endoscópica

Tem havido grande interesse na utilidade da cápsula endoscópica (CE) para diagnosticar as lesões do delgado associadas à DC. A presença de estenose deve ser excluída radiologicamente antes do exame com a cápsula pelo risco de impactação da mesma. Um recente estudo encontrou sensibilidade de 93% e especificidade de 84% para o método num grupo com suspeita clínica de DC, acompanhado por um período de 21 meses [16].

Enteroscopia com duplo balão

A técnica da enteroscopia por duplo balão (EDB) permite não só a avaliação completa do intestino delgado, como também torna possível biópsias e intervenções terapêuticas. Quando comparada à CE, tem os inconvenientes de ser invasiva, necessitar de sedação, fluoroscopia e tempo prolongado para completar o exame. Não existem estudos comparativos com CE e EDB no diagnóstico da DC [16].

Ultra-som Endoscópico

O uso do US endoscópico na DC está bem definido no caso das fistulas perianais, onde ele se mostra de grande utilidade no diagnóstico e acompanhamento destas lesões [20,21].

O US endoscópico também já foi usado para distinguir a DC da RCU. Em trabalho publicado na década de 90 [22] foram avaliados parâmetros como espessura da parede, aspecto da mucosa, espessamento da submucosa, aumento do calibre de vasos na submucosa e número da linfonodos patológicos ao redor do reto e sigmóide, de forma cega e prospectiva, em grupos com DC, RCU e normais. Na conclusão do

trabalho os parâmetros serviram para diferenciar DC da RCU nas suas formas agudas, tendo sido úteis para predizer remissão da doença.

Diagnóstico diferencial entre Crohn e Retocolite Ulcerativa

Para a DII confinada ao cólon, a distinção entre DC e RCUI deve ser feita. Isto é importante quando se tem em vista a escolha entre terapias cirúrgicas e medicamentosas.

Aproximadamente 10% dos pacientes com DII terão achados de ambas as doenças e farão parte do grupo com colite indeterminada.

Avaliação de atividade de doença

Na prática clínica o questionamento a respeito dos sintomas e sinais é suficiente para a avaliação de resposta terapêutica. A repetição de estudos só é necessária perante o aumento ou mudança de sintomas, fazendo suspeitar de outras causas de inflamação ou da existência de complicações.

No contexto da pesquisa clínica a avaliação quantitativa é necessária, motivando a criação de escores compostos. O mais utilizado é o CDAI [23], criado para integrar o maior número possível de achados da doença. Este e outros escores têm tido pouca aplicação na prática clínica.

Outra abordagem com mérito são marcadores biológicos de inflamação. A velocidade de hemossedimentação (VHS) e as proteínas séricas de fase aguda de resposta como a proteína C e os orosomucóides são úteis em rastrear a atividade de doença, mas têm baixa sensibilidade e especificidade. A medida sérica de citocinas, receptores de citocinas e moléculas de adesão também têm baixa sensibilidade e especificidade [1].

A quantificação destes elementos na mucosa intestinal seria uma medida direta da ativação imune, com aumento da acurácia, mas tem a desvantagem de ser uma técnica invasiva e não ter metodologia padronizada.

Atividade microscópica da doença

A histologia como ferramenta de medição de atividade de doença foi primeiro usada para RCUI [14]. Todos os escores são baseados na análise de colorações de rotina com hematoxilina e eosina e alguns deles foram desenhados especialmente para DC

como o de D'Haens et al [14]. Estes escores são classificados em dois grupos: sistemas gradativos e sistemas numéricos (quantitativos) [14]. Nos sistemas gradativos a atividade ou severidade da doença é dividida em diferentes graus ou fases para os quais diferentes nomes são atribuídos. Nos sistemas numéricos, diferentes lesões ou variáveis são pontuadas e para cada uma é atribuído um valor numérico. A pontuação final é o resultado da soma dos pontos atribuídos a cada uma das variáveis.

A correlação entre os índices clínicos de atividade, a endoscopia e a histologia são variáveis [14]. Uma questão importante é se a histologia fornece informação adicional na avaliação de atividade, uma vez que os índices clínicos e laboratoriais não têm acurácia para acessar a atividade de doença em termos teciduais e este pode ser um guia importante na terapia para avaliar remissão [2,14].

II.1.8- Tratamento

Os objetivos primários do tratamento são induzir e manter a remissão da doença, uma vez que nenhuma terapia médica ou cirúrgica provê a cura. Com estes objetivos em mente, a intenção é melhorar os sintomas e a qualidade de vida.

Medicamentoso

A terapia médica se baseia em 5 grupos de medicamentos: 5-aminosalicilatos, antibióticos, glucocorticóides, imunomoduladores e modificadores da resposta biológica ou drogas biológicas. Uma discussão mais aprofundada sobre as estratégias de tratamento medicamentoso da DC está fora do escopo desta revisão e pode ser encontrada com facilidade na literatura específica [1,9,24].

Cirúrgico

A cirurgia tem papel no controle de sintomas e no tratamento das complicações da doença. A taxa de cirurgias nos primeiros 3 anos de diagnóstico varia de 25-45%. De 25-38% dos pacientes requer uma segunda cirurgia nos 5 anos subsequentes. Aproximadamente 1/3 dos pacientes que requereram uma segunda cirurgia serão submetidos a uma terceira [1]. Devido à alta taxa de reoperações, existe um princípio de que a cirurgia na DC deve preservar o máximo em extensão e manutenção da função

intestinal. As cirurgias podem ser ressecções com ou sem anastomoses, *by pass* interno ou externo (ostomias), ressecções ou reparos de fístulas e estricturoplastias.

Indicações cirúrgicas de complicações incluem abscessos, megacólon tóxico, sangramento e câncer. Sintomas refratários à terapia médica são indicação de colectomia total.

II.1.8- Prognóstico

Morbidade

A história natural da DC está continuamente mudando em função dos melhoramentos nas estratégias terapêuticas.

Estudos populacionais da Escandinávia fornecem as melhores informações sobre o curso da doença [1]. Num período de 4 anos, 22% dos pacientes ficam em remissão, 25% tem sintomas cronicamente ativos e 53% tem curso que flutua entre atividade e inatividade. Aproximadamente 10% dos pacientes são desabilitados pela doença.

Câncer

É estimada uma taxa de câncer 26,6 vezes maior em comparação à população geral [1]. Quando o acometimento é colônico, o risco de câncer colorretal é similar ao da RCUI e o seguimento com colonoscopias é recomendado, com o intuito de diagnosticar precocemente as neoplasias. A predisposição ao desenvolvimento de tumores malignos de delgado é controversa e, apesar de ter sido descrito um risco relativo de 12 vezes, estes tumores permanecem raros devido à baixa incidência da DC na população geral.

II.1.10- Modelos animais com DII

Morfologia normal e tipos de modelos

O cólon do rato normal tem aproximadamente 15 cm e é dividido em três partes: ceco, cólon e reto. A parede tem estrutura de camadas semelhante à do cólon humano, com camadas mucosa e submucosa com pregas proeminentes no reto [25]. O tecido linfóide é distribuído por todo o órgão como focos de tamanhos variados. Existe uma variabilidade com relação à espessura da mucosa e da muscularis.

Embora nenhum dos atuais modelos reproduza a DII completamente, os modelos animais de inflamação intestinal têm fornecido informações úteis a respeito da patogênese da resposta inflamatória intestinal. Os modelos animais de DII são espontâneos ou induzidos [9]. Os modelos induzidos incluem: animais tratados com agentes para promover a inflamação intestinal; roedores geneticamente manipulados; animais imunodeficientes nos quais populações de células que mediam a inflamação intestinal estão ausentes.

Modelos de ocorrência espontânea

Existem cepas de camundongos desenvolvidos em laboratório como a CSH/HeJ e a (SAM)P1/Yit que desenvolvem inflamação intestinal espontânea, mesmo criados em condições livres de patógenos [9].

Indução de DII com reagentes exógenos

Agentes luminais capazes de produzir resposta inflamatória crônica em hospedeiros geneticamente susceptíveis podem mimetizar aspectos da DII dos humanos. Entre os agentes relatados estão o ácido acético, a formalina, a indometacina, o *poligeenan*, o dextran sulfato de sódio (DDS), polímeros PG-OS, o linfocoma venéreo, a ciclosporina A e o ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) [26]. O DDS é também capaz de reproduzir modelo de carcinogênese a partir de colite em camundongos [27].

Colite por TNBS

A colite pode ser induzida por administração de enema contendo o alérgeno sensibilizador que é o TNBS diluído em etanol. O último é dado para quebrar a barreira mucosa e permitir a penetração do TNBS ao longo da parede intestinal. Tanto a dosagem do TNBS como a concentração do etanol têm variado em diferentes estudos e deve ser otimizada por cada pesquisador [26]. Este modelo tem sido usado em ratos, camundongos e coelhos. Existe um claro padrão de susceptibilidade vs. resistência entre diferentes cepas de camundongos, além de variabilidade no curso clínico entre diferentes espécies [26].

A administração de um só enema em algumas cepas de ratos pode resultar em uma colite crônica enquanto que múltiplos enemas são necessários para gerar cronicidade em camundongos. A lesão aguda, usualmente a necrose transmural, é seguida de processo de cicatrização contínuo e não há recaídas.

Em poucos dias após o enema, a histopatologia é marcada por focos discretos de necrose e inflamação agudas.

Esta é seguida por inflamação crônica com infiltrado mononuclear que persiste por tempo variável. Nos ratos são encontradas úlceras gosseiras, particularmente no local da injeção do enema. Granulomas podem ocorrer mas não são proeminentes, exceto quando administrados por via gástrica [26].

A colite induzida por TNBS no camundongo envolve resposta do tipo clássico de hipersensibilidade tardia devido a um alérgeno de contato. A resposta imunológica deste tipo é mediada por linfócitos T respondendo a antígenos próprios modificados por haptenos. Estes são formados pela ligação covalente do hapteno, trinitrofenil, a proteínas próprias. A avaliação imunológica na fase inicial sugere uma resposta Th1 [26,28]. O mecanismo no rato é desconhecido, mas presumivelmente imunológico.

Os animais com o modelo de colite induzida por TNBS têm respondido às drogas úteis ao tratamento da DII [26,29]. A existência de classificações quantitativas para histopatologia torna o modelo útil para a avaliação de novos agentes terapêuticos.

Pereira [30] utilizou o ácido trinitro-benzeno-sulfônico (TNBS) para induzir colite em ratos, com achados semelhantes ao da DII. O ácido resultou em uma necrose aguda transmural. A cicatrização ocorreu 8 semanas após a indução de colite e não houve recidiva. As alterações mais importantes ocorreram 1-2 semanas após a indução de colite e foram normalmente transmurais. O mesmo autor [30] descreveu infiltrado inflamatório, ulcerações e infiltrado de criptas. Granulomas foram achados em cerca de metade dos casos.

II.2- Biomicroscopia por ultra-som

II.2.1- Aplicações

O uso do ultra-som (US) com a finalidade de obtenção de imagem microestrutural dos tecidos data da década de 1930 [6], com o primeiro microscópio acústico. Somente na década de 1980, com o desenvolvimento da eletrônica, da

tecnologia de transdutores e da informática, surgiram as aplicações clínicas de sistemas de US pulso eco operando com frequências de uma ordem de magnitude acima dos sistemas convencionais. A utilização da ultra-sonografia de alta resolução em medicina se estende de frequências inferiores, da ordem de 20 MHz, como é o caso da caracterização da pele e da parede arterial, até 60 MHz para as aplicações em oftalmologia. Para a frequência de 30 MHz e usando um transdutor com foco natural e abertura de 0,5 mm, operando na água, consegue-se profundidade de campo com 2,5 mm e resoluções lateral e axial de 250 μm e 62 μm , respectivamente. Essas resoluções são comparáveis com as obtidas pela microscopia por ressonância magnética onde se conseguem resoluções da ordem de 75 μm . Para um transdutor operando em 100 MHz, focalizado, estes valores se reduzem para 1,6 mm, 60 μm e 19 μm , respectivamente [6]. Portanto, para frequências mais elevadas a resolução do ultra-som se aproxima daquela oferecida por microscopia óptica. Daí denominar-se a ultra-sonografia de alta frequência, aplicada na visualização de tecidos vivos por: biomicroscopia ultra-sônica (BMU), microscopia ultra-sônica por retroespalhamento, ultra-som de alta frequência ou então ultra-som de frequência muito elevada.

O desenvolvimento inicial se deu nas áreas de oftalmologia, dermatologia e intravascular, não havendo relatos de experimentos na área de gastroenterologia. Atualmente, a maioria esmagadora dos trabalhos é publicada na área de oftalmologia, com publicações em número pequeno nas áreas de dermatologia e vascular. Segundo levantamento bibliográfico realizado na ISI Web of Science [31], 73% dos trabalhos publicados são da área de oftalmologia e os 10 periódicos com maior número de publicações são da área de oftalmologia.

O olho é um alvo ideal para o uso de imagens de US de alta frequência, uma vez que estruturas de grande importância caem na faixa dos sistemas comercialmente disponíveis. Várias aplicações relacionadas ao segmento anterior do olho como tumores, glaucoma, doenças da esclera e da córnea, mapeamento paquimétrico da córnea, avaliação de lentes e trauma são descritas [6]. A BMU é usada por exemplo no acompanhamento dos pacientes submetidos a iridotomia a laser para tratamento do glaucoma de ângulo fechado. A medição do ângulo da câmara anterior e da espessura da íris são importantes para o diagnóstico de complicações pós-operatórias [32]. A avaliação pós-operatória da córnea e de lentes da câmara anterior do olho é feita

também com sucesso pela BMU [33]. No contexto das doenças congênitas do olho, há uma descrição recente de microcórnea, anormalidade em que a córnea e a câmara anterior do olho são menores que o normal, diagnosticada por paquimetria [34]. Uma série de 42 tumores pequenos do corpo ciliar foi avaliada por BMU. Ela se mostrou ferramenta útil para lesões até 4 mm, sendo que a maior parte das lesões não exibiu crescimento ou extensão. Apesar de fornecer informações sobre microestrutura das mesmas, uma inferência ao diagnóstico histológico não é possível [35].

A Figura II.1 exibe imagem de tumor do olho (melanoma da íris e corpo ciliar), reconhecida como massa distorcendo a arquitetura normal do olho. Devido à alta atenuação do sinal de alta frequência, a BMU só pode ser usada para examinar estruturas na profundidade de 3-6 mm, com limitação no exame de grandes tumores à sua margem proximal.

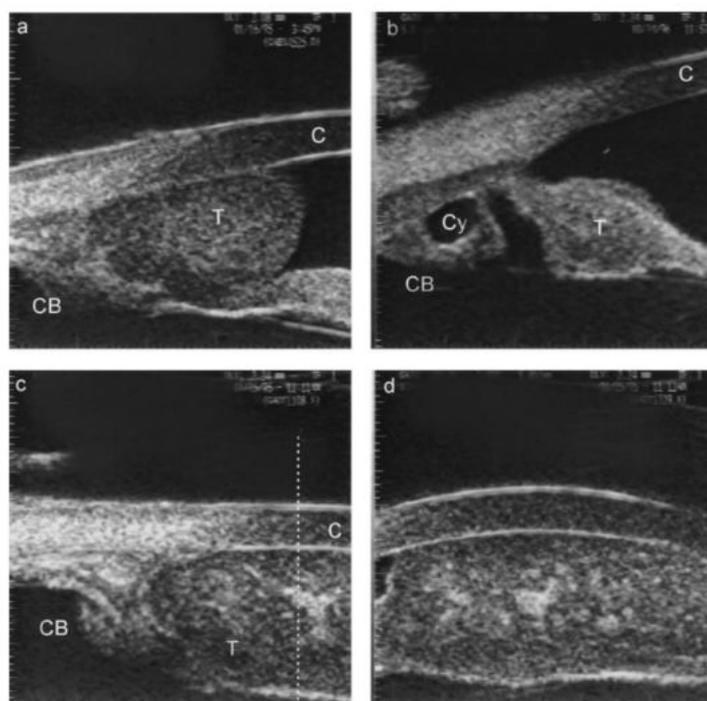


Figura II.1- Biomicroscopia de tumor ocular **(a)** melanoma da íris (T) com extensão para o corpo ciliar (CB); **(b)** melanoma da íris (T) e cisto ciliar (Cy); **(c)** melanoma ciliar heterogêneo; **(d)** plano transverso através da linha tracejada em (c) (Adaptado de Foster et al [6], com autorização).

Na área dermatológica, a BMU oferece meio para examinar lesões cutâneas de forma não invasiva com alta resolução. Medidas da espessura das camadas da pele e

acesso às margens, assim como a profundidade de tumores cutâneos, são exemplos de aplicações nesta área. Estas são informações úteis na avaliação pré-operatória dos tumores e no monitoramento do tratamento de algumas doenças inflamatórias [6].

A avaliação da inflamação da pele foi feita por meio de US na frequência de 33 MHz. O método se mostrou capaz de produzir imagem da pele e demonstrou espessamento da derme no caso de paciente com alergia de contato [36]. O US na frequência de 20 MHz também foi capaz de identificar áreas de cicatriz de pele com imagens mostrando limites bem demarcados em relação ao tecido adjacente normal [37]. Ainda com relação às lesões cutâneas, o US de 20 MHz associado ao Doppler revelou-se como ferramenta útil na avaliação de lesões pigmentadas da pele, com especificidade alta para presença de fluxo na lesão e o diagnóstico de melanoma [38], além de boa correlação entre as medidas ultrassonográfica e histológica da lesão.

A aparência de tumores de pele está exemplificada na Figura II.2. São melanomas malignos cujas imagens foram feitas a 40-50 MHz. O primeiro (a) é um melanoma com disseminação superficial e o segundo (b) é um melanoma nodular. A correlação com a histologia é feita ao lado.

A obtenção de imagem intravascular de BMU experimentou grande desenvolvimento na década de 90, com a proliferação de novas abordagens intervencionistas [6] como a angioplastia com balão e a colocação de próteses para tratamento da doença coronariana arterial. O princípio é a introdução de um cateter com um único elemento em rotação (ou transdutor com múltiplos elementos focalizado) na sua extremidade, com o objetivo de visualizar e medir a parede da artéria e qualquer placa lipídica em formação. O US intravascular (IVUS, do inglês *intravascular ultrasound*) está contribuindo cada vez mais para o cuidado com o doente coronariano, uma vez que é mais sensível, em relação à coronariografia, para avaliar o conteúdo de cálcio, o volume residual de placa, o trauma tissular e as dimensões do lúmen final. A habilidade do IVUS de demonstrar mudanças nas paredes dos vasos e complicações que se seguem às intervenções angiográficas tem levado ao uso deste tipo de equipamento no seguimento dos pacientes a curto e longo prazo, com sucesso em prever a reestenose pós angioplastia com base em dados morfológicos obtidos do IVUS. Outra aplicação importante é a avaliação de vasculopatia associada ao transplante cardíaco, onde a angiografia falhou no diagnóstico.

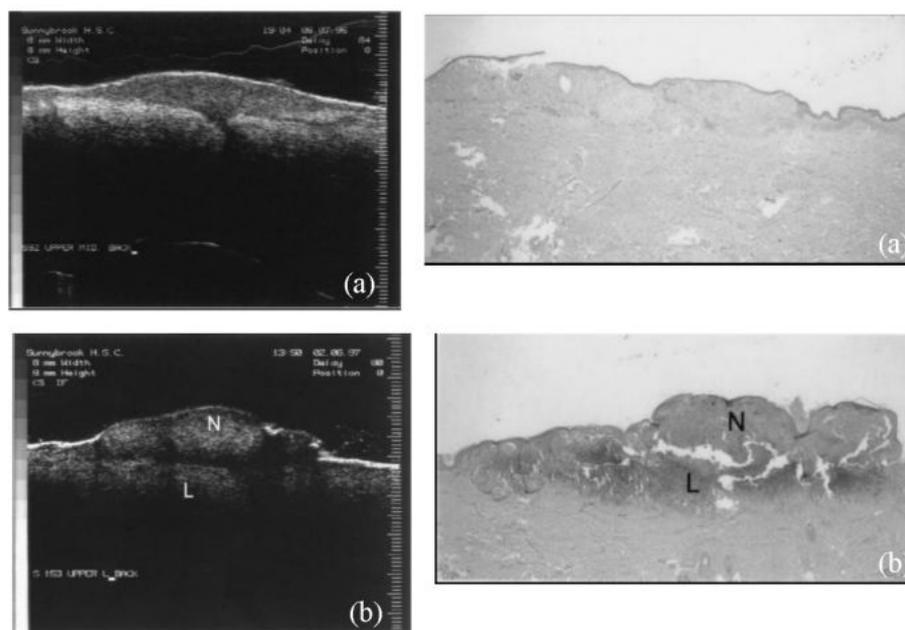


Figura II.2- Biomicroscopia de tumor cutâneo. Exemplos de imagens por BMU a 40 MHz (esquerda) e histologia correspondente (direita) de melanomas. Em (a) melanoma com disseminação superficial e em (b) melanoma com invasão linfocítica (L) e formação de nódulo (N) (Adaptado de Foster et al [6], com autorização).

Exemplos de imagens *in vitro* de amostras de artéria coronariana estão na Figura II.3, realizadas com freqüências de 30 e 50 MHz. Em (a), vê-se a imagem de uma placa assimétrica moderadamente avançada, feita com transdutor de IVUS de 30 MHz. Em (b) vê-se a histologia e em (c) a mesma lesão com freqüência de 50 MHz, com melhor resolução.

Com o objetivo de avaliar a evolução que ocorre nas artérias periféricas com a idade, o US na faixa de 55 MHz foi usado para obter imagens e medir a espessura da camada íntima e íntima-média na artérias radial e tibial [39]. O estudo mostrou aumento das espessuras da íntima e íntima-média com o aumento da idade

Ainda no âmbito da doença aterosclerótica, o US na freqüência de 20 MHz foi usado em camundongos para identificar doença da aorta com o objetivo de acompanhar a evolução da placa ateromatosa [40]. Ainda outro estudo com camundongos avaliou a administração de um inibidor da 5 lipoxigenase (5 LO) no desenvolvimento da placa de

ateroma. O US na frequência de 40 MHz identificou a redução da espessura da íntima média na aorta ascendente dos camundongos que receberam 5 LO, o que foi comprovado pela histopatologia [41].

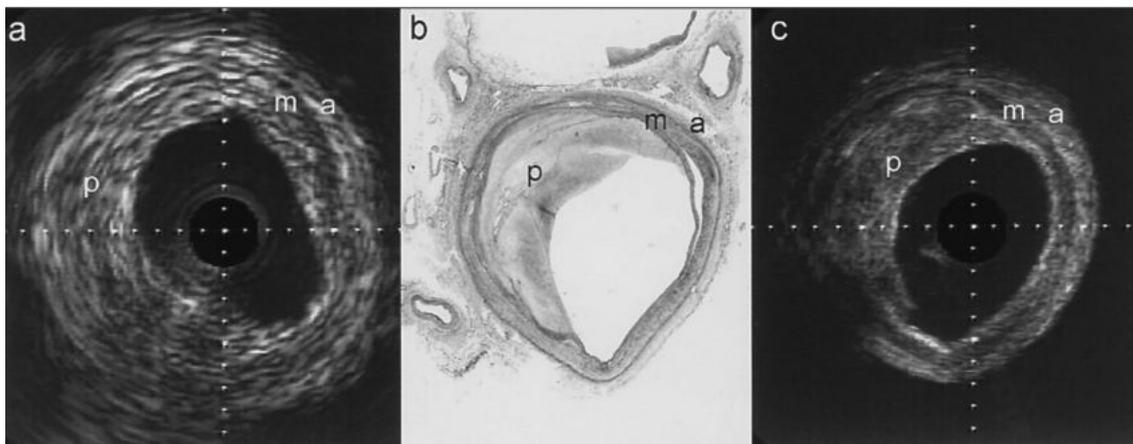


Figura II.3- Biomicroscopia de artéria coronária em diferentes frequências. Imagens obtidas com IVUS a **(a)** 30 MHz e **(c)** 50 MHz. Histologia correspondente em **(b)** de uma artéria femoral estenosada *ex vivo*. A imagem a 30 MHz não permite visualização adequada da placa. A 50 MHz, a visão da placa e da estrutura vascular são significativamente melhoradas (Adaptado de Foster et al [6], com autorização).

Com o sucesso do US intravascular de alta frequência interrogou-se o uso de sondas com aplicações não vasculares. São exemplos de potenciais aplicações o trato urinário, a árvore brônquica, o canal cervical, a via biliar, o cólon e o esôfago.

O US na frequência de 20 MHz foi capaz de detectar cálculos encravados na pelve renal, além um de tumor e outras lesões ureterais [42]. Na árvore brônquica o uso de transdutores miniaturizados instrumentados através do canal de biópsias do broncoscópico é útil na orientação de biópsias transmuralis de lesões pulmonares [43]. O ultra-som (US) na frequência de 20MHz tem sido utilizado para avaliação de pequenas lesões colônicas e, quando comparados à magnificação, seus resultados se mostram superiores quando o objetivo é a determinação da profundidade da invasão, sugerindo uma complementaridade entre as informações fornecidas pelos dois métodos com respeito à decisão entre ressecção local e tratamento cirúrgico [44].

Uma grande área de aplicação da BMU é a análise em útero de embriões de ratos normais e geneticamente modificados [45]. Entre alguns trabalhos na área podemos citar a avaliação do desenvolvimento neurológico[46], das mudanças hemodinâmicas ocorridas no útero, placenta e saco vitelino ao longo da gestação [46] e do desenvolvimento cardíaco do embrião [47].

Ainda na área experimental com modelos animais, podemos citar o uso do BMU na avaliação de enxertos cardíacos em ratos [48] e na obtenção de imagens de próstata em modelo de câncer da glândula em ratos geneticamente modificados [49].

Com o sucesso do US intravascular de alta frequência interroga-se o uso de sondas com aplicações não vasculares, com potencial aplicação no trato urinário, a via biliar, o canal cervical, os intestinos delgado e grosso, a árvore brônquica e o esôfago.

No caso do trato urinário, imagens da pelve renal e bexiga do porco na faixa de 40-60 MHz podem ser vistas na Figura II.4. Em (a) a estrutura interna do rim pode ser vista com penetração de 4 mm. Uma pirâmide renal é bem vista. Uma segunda imagem (b), no formato linear, mostra a bexiga com mucosa, submucosa e muscular bem delimitadas. Uma aplicação seria a detecção e quantificação da invasão de tumores precoces, através de cateteres endo-sonográficos usados durante procedimentos urológicos endoscópicos (cistoscopia e nefroscopia) [42].

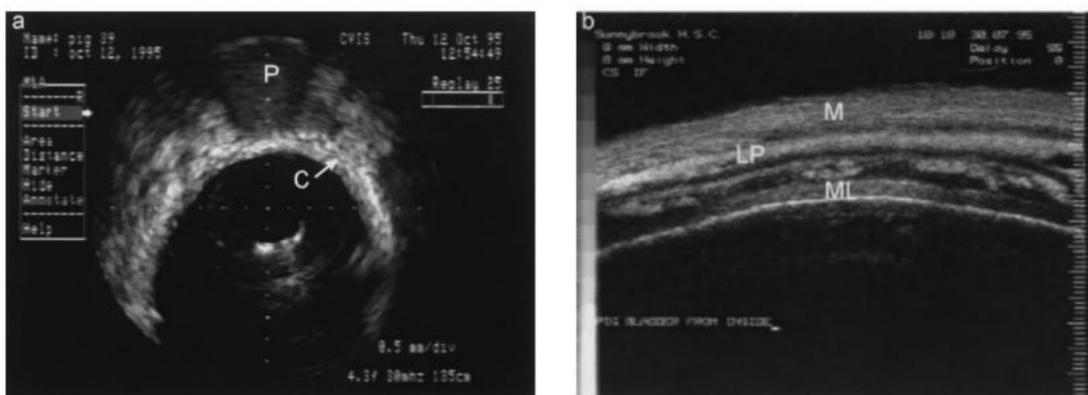


Figura II.4- BMU endoluminal de pelve renal e bexiga. (a) imagem de rim de porco via ureter obtida com IVUS intraoperatório a 50 MHz. O cálice renal é visualizado, assim como as colunas (C) e pirâmides (P). Escala: 0,5 mm /divisão. (b), BMU intraoperatório de 60 MHz da bexiga de porco mostrando mucosa (M), lâmina própria (LP), camadas musculares (ML). Escala 100µm/divisão (Adaptado de Foster et al [6], com autorização).

II.2.2- Biomicroscópio

Assim como para obtenção de imagens por US na faixa de frequência diagnóstica, a escolha das especificações para o desenvolvimento do biomicroscópio ultra-sônico depende da aplicação e, conseqüentemente, das características dos tecidos a serem examinados. A qualidade da imagem de um sistema de US estará relacionada à frequência e geometria do transdutor e às propriedades tissulares, obedecendo às leis de difração [6].

II.2.2.1- Princípios físicos

A qualidade da imagem gerada por US está relacionada às resoluções axial e lateral. A resolução axial é a habilidade de separar imagens de refletores dispostos ao longo da direção do feixe de US e é determinada pela largura de banda do pulso de ultra-som emitido. A resolução lateral é a capacidade de separar imagens de refletores situados perpendicularmente ao feixe, sendo ditada por sua largura [50].

O perfil lateral típico de um feixe de ultra-som, ilustrado na Figura II.5 [51], é obtido através da amplitude máxima de um pulso de amplo espectro retroespalhado por um alvo pontual em função da direção transversal ao feixe. Dois parâmetros são comumente usados para descrever o perfil lateral do feixe de US: a largura plena (“full width”) em -6dB ($FW-6\text{dB}$) e a largura plena em -40dB ($FW-40\text{dB}$). A $FW-6\text{dB}$ está relacionada à resolução lateral do transdutor, R_{lat} , e é dada pela equação [51]:

$$FW-6\text{dB} = R_{lat} = cL/fd = \lambda f_{numero}, \quad (1)$$

onde: c é a velocidade da onda, L é a distância focal do transdutor, f é a frequência do transdutor, d é o diâmetro do transdutor focalizado, λ é o comprimento de onda e f_{numero} é a razão entre a distância focal e o diâmetro do transdutor. Vale lembrar que (1) só é válida para a região focal do transdutor [51].

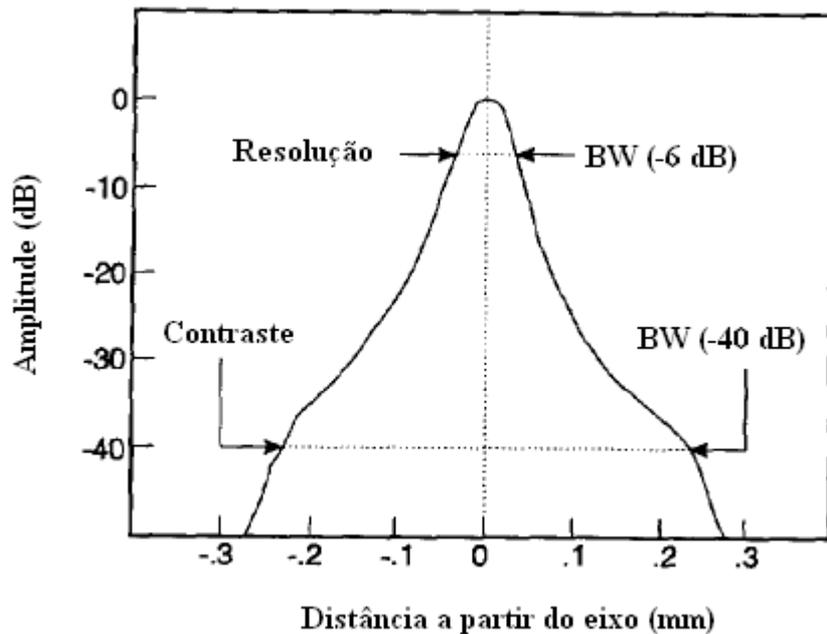


Figura II.5- Curva típica do perfil lateral do feixe de ultra-som. A resolução da imagem é proporcional à largura plena em -6 dB enquanto o contraste é proporcional à largura plena em -40 dB (Adaptado de Foster et al [51]).

O contraste de uma imagem gerada por US é determinado pela extensão do feixe na região dos lóbulos laterais. Por isto a largura de -40dB ($FW - 40dB$) do feixe pode ser relacionada ao contraste. A resolução pode ser melhorada aumentando-se a frequência ou diminuindo o f_{numero} do transdutor. Como exemplo, a Figura II.6 mostra as frequências e as resoluções para diferentes valores de f_{numero} .

A resolução axial, R_{ax} , é proporcional ao inverso da largura de banda do pulso, sendo dada pela equação [51]:

$$R_{ax} = \frac{c}{2BW}, \quad (2)$$

onde BW é a largura de banda do pulso emitido pelo transdutor.

A penalidade paga pelo aumento da resolução axial é a perda de penetração, uma vez que todos os tecidos humanos exibem aumento do coeficiente de atenuação com o aumento da frequência [51].

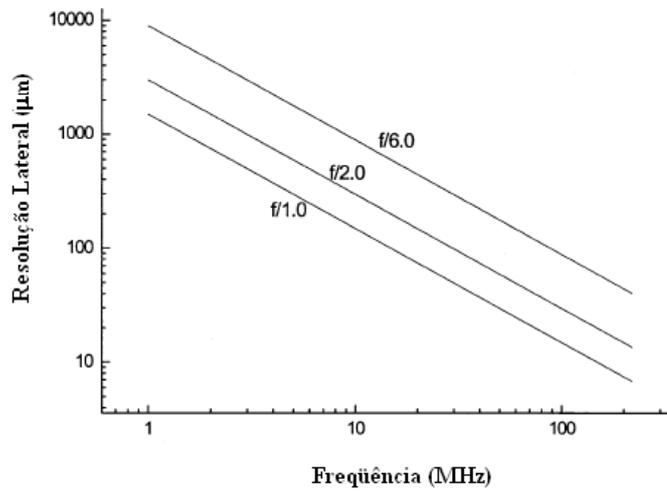


Figura II.6- Resolução versus frequência para transdutores com diferentes f_{numero} (Adaptado de Foster et al [6]).

A profundidade do campo, DOF , é dada por [51]:

$$DOF = 7\lambda(f_{numero})^2. \quad (3)$$

Outros parâmetros que influenciam na qualidade da imagem são os coeficientes de atenuação e retroespalhamento dos tecidos humanos. Resultados típicos para estes coeficientes foram extraídos de Foster et al [6] e estão resumidos nas Figuras II.7 e II.8.

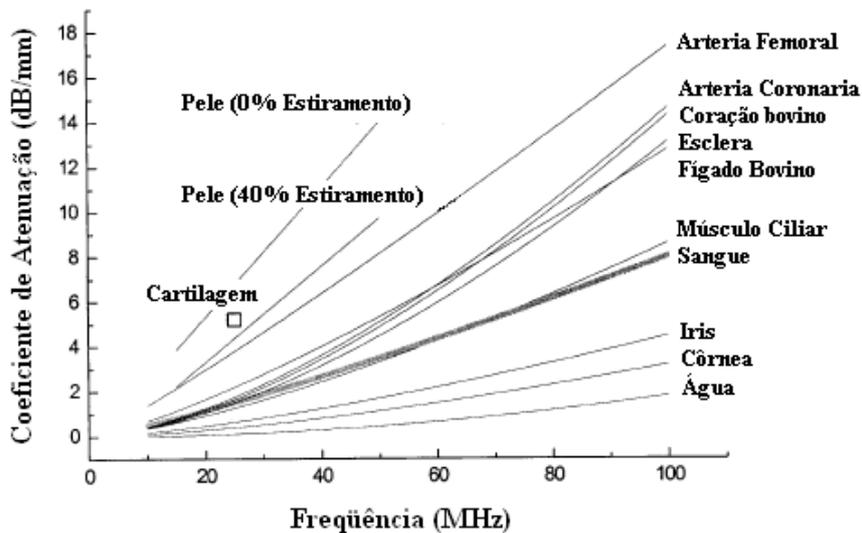


Figura II.7- Coeficientes de atenuação em altas frequências (Adaptado de Foster et al [6]).

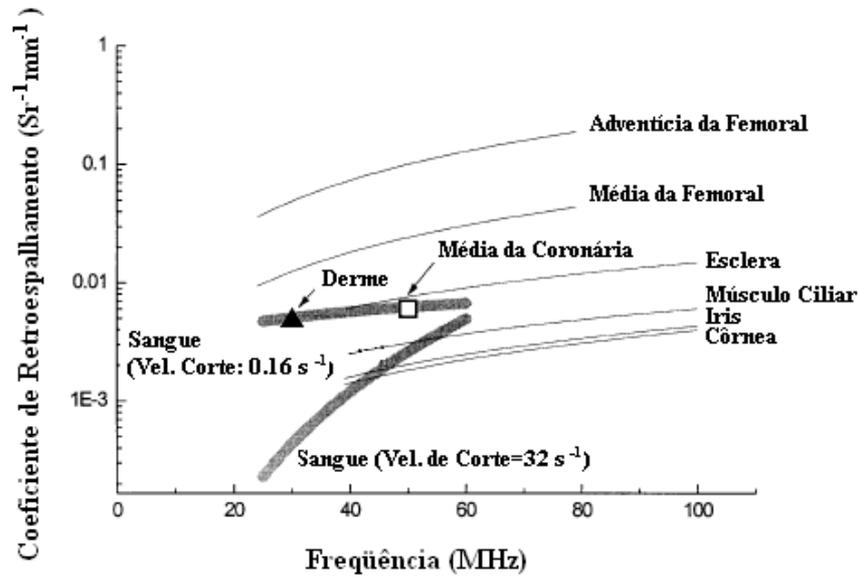


Figura II.8- Coeficientes de retroespalhamento em altas frequências (Adaptado de Foster et al [6]).

II.3- Parâmetros quantitativos obtidos com ultra-som

II.3.1- Definição de atenuação

Atenuação é a redução da intensidade do US durante a sua passagem por um meio [52]. A absorção e o espalhamento são os dois mecanismos de interação entre o US e os tecidos, relacionados à atenuação, específicos para cada tipo de tecido. Na absorção, a energia absorvida é transformada em térmica e outras formas de energia que aparecem no sítio de interação [52]. Já no espalhamento, a energia da onda que se propaga pelo meio é desviada da direção de propagação.

A equação que descreve a propagação de uma onda plana acústica harmônica na direção z e propagando-se em um meio com perdas é descrita a seguir [53]:

$$p(z,t) = p_0 e^{-\alpha z} e^{i\omega(t-z/c)}, \quad (4)$$

onde p_0 é a amplitude da onda de pressão em $z=0$, α é o coeficiente de atenuação da amplitude da onda, $\omega = 2\pi f$, sendo f a frequência da onda, t é o tempo e z a distância.

II.3.2- Definição de espalhamento

No espalhamento, a energia da onda incidente em um sítio de interação é re-irradiada em diversas direções com propriedades variando daquelas da onda incidente. Estas variações abrangem a amplitude, fase e direção da frente de onda incidente e, possivelmente, variam com a frequência [52].

Formalmente, o processo de espalhamento pode ser visto como contribuindo para a atenuação imposta na onda de US que se propaga através de um meio, como os tecidos biológicos. Assim, pode-se analisar o coeficiente de atenuação, para a intensidade da onda, como [52]:

$$\mu = \mu_{ab} + \mu_s, \quad (5)$$

onde μ_{ab} e μ_s representam os coeficientes de absorção e de espalhamento, para a intensidade da onda, respectivamente. A unidade geralmente usada para μ é Npcm^{-1} . Há uma relação entre α e μ dada por [53]:

$$\alpha = \frac{\mu}{2}. \quad (6)$$

II.3.3- Definição de retroespalhamento

O retroespalhamento é o caso particular para o espalhamento no sentido oposto ao da onda incidente. A quantificação da potência da onda retroespalhada, por unidade de intensidade incidente, de ângulo sólido e de volume de espalhadores, é dada em termos do coeficiente de retroespalhamento, μ_{bs} .

II.3.4- Caracterização de tecido com coeficientes de atenuação e retroespalhamento

Os coeficientes de retroespalhamento e atenuação estão relacionados à estrutura dos tecidos, podendo oferecer índices para identificação de vários tipos de lesão. Vários autores demonstraram que a dependência da atenuação e do espalhamento em relação à frequência podem ser usados como índices quantitativos da condição do meio investigado [54]. Estimativas locais de características ultra-sônicas do meio (atenuação, coeficiente de retroespalhamento) ou parâmetros descrevendo a microestrutura tecidual (tamanho efetivo do espalhador), podem ser dispostos na forma de imagem (imagem paramétrica) [38].

Bridal et al [54] descreveram, em 1997, o uso de US de alta frequência (25-56 MHz) para identificação de aorta aterosclerótica *in vitro*. Eles usaram um método para a medição local de parâmetros quantitativos de ultra-som a partir do sinal de rádio frequência (RF) retroespalhado. Os parâmetros foram: coeficientes de atenuação e de retroespalhamento integrado aparente. Construíram imagens de artéria aorta aterosclerótica humana *in vitro* a partir destes parâmetros e compararam com imagens histológicas. As medidas foram apresentadas no formato de imagens, sendo selecionadas regiões de interesse para as quais o valor médio de cada parâmetro foi calculado e mostrado. A atenuação medida na camada média da aorta humana normal e na aterosclerótica foi a mesma.

Machado et al [55] mostraram, em 2001, medidas de coeficiente de atenuação, velocidade de propagação da onda e coeficiente de retroespalhamento integrado (IBC) em artérias coronarianas *in vitro*. Usaram transdutor focalizado com largura de banda em -6dB de (36-67MHz). Encontraram valores diferentes de IBC para situações de espessamento da íntima, íntima fibrótica e placa ateromatosa.

Dent et al [56] usaram altas frequências (40 MHz) para caracterização de edema em miocárdio de ratos *in vitro*. Esta condição (edema) pode estar associada à rejeição no transplante cardíaco, à miocardite, à reperfusão que se segue à injúria isquêmica ou a estados edematosos sistêmicos. Foram usados miocárdios frescos e outros previamente congelados em nitrogênio líquido, imersos em salina por 4 horas. Para quantificar a evolução do edema foram medidas a espessura do miocárdio e a quantidade de água expressa em percentual. Os parâmetros analisados foram os coeficientes de espalhamento integrado, o coeficiente de atenuação (por substituição) e a velocidade da onda. As medidas realizadas em tempo zero a cada hora até 4 horas de imersão mostraram um aumento do retroespalhamento integrado. O coeficiente de atenuação diminuiu com o edema e a velocidade manteve-se praticamente constante.

A caracterização de metástases hepáticas *in vivo* foi investigada por Huisman et al [57]. Eles descreveram a dificuldade em se caracterizar as metástases devido ao fato delas não terem um único modelo homogêneo de tecido. Elas podem variar de acordo com a histologia do sítio primário, estágio de desenvolvimento ou tratamento prévio. Tipicamente, elas possuem um halo hiperecogênico ao redor de um centro hipocogênico. Para fazer a distinção do halo os autores usaram um modelo de segmentação

automática baseado em técnica de erosão binária. O retroespalhamento e a atenuação relativos da metástase foram calculados em relação ao retro-espalhamento e atenuação médios do tecido hepático ao redor da lesão. O método foi aplicável em baixas frequências (3 MHz), já que com o aumento da frequência o contraste diminui e o halo tende a desaparecer.

Em dermatologia, apesar de ainda não ser rotina, a ultra-sonografia está sendo cada vez mais usada [58]. As indicações clínicas mais comuns são: avaliação de tamanho de tumores, evolução da psoríase, efeito de medicamentos na espessura da pele. O problema principal em dermatologia reside no fato das camadas serem muito finas, necessitando-se de frequências ultra-sônicas elevadas para caracterização das mesmas [58]. Em meados da década de 90, após o desenvolvimento de transdutores de alta resolução, trabalhos para discriminação de detalhes relevantes da pele puderam então ser realizados.

Guittet et al [59] descreveram um método para estimar o coeficiente de atenuação a partir de sinais retroespalhados obtidos *in vivo* a 40 MHz em pele humana de 138 voluntários. A população foi avaliada quanto ao sexo e idade e a correlação (2ª ordem) feita com o coeficiente de atenuação. Usaram o algoritmo do centróide, que consiste em se dividir o sinal retroespalhado em várias janelas temporais com 50% de superposição e avaliar o centróide espectral em cada janela. Encontraram uma descontinuidade dos centróides, em relação à profundidade, que foi atribuída à interface derme/gordura subcutânea. Não houve diferenças em relação ao sexo. O coeficiente de atenuação médio para o grupo de 15-30 anos foi cerca de 1,1 dB acima do grupo de 60-85 anos. A redução da atenuação com a idade foi atribuída a mudanças na pele pelo processo de envelhecimento, mas a comparação com a histologia não foi feita.

Os coeficientes de retroespalhamento e a atenuação de derme e subcutâneo humanos foram medidos, *in vivo*, para faixas de frequência de 14-50 MHz e 14-34 MHz por Raju et al [58]. Os dados foram coletados a partir de 3 transdutores com frequências centrais de 28, 30 e 44 MHz, com o objetivo de comparar as medições a partir de 3 sistemas independentes. O coeficiente de atenuação foi obtido computacionalmente pelas curvas espectrais (espectro de potência) em relação à profundidade no tecido. O coeficiente de retroespalhamento foi estimado a partir da potência média do espectro registrado para cada região de interesse em relação à potência do sinal refletido em um

refletor perfeito localizado no foco do transdutor. Não houve diferença significativa entre o coeficiente de atenuação da derme e da gordura subcutânea. Na faixa de 14-34 MHz, o coeficiente de retroespalhamento integrado foi maior para a derme do que para gordura subcutânea.

A medida do coeficiente de retroespalhamento integrado ou '*integrated backscatter coefficient*' (IBC), assim como o coeficiente de retroespalhamento dependente da frequência, têm sido usados para caracterização ultra-sonográfica quantitativa dos tecidos [59]. As duas medidas possuem vantagens e desvantagens inerentes. O coeficiente de retroespalhamento em função da frequência possibilita a caracterização do tecido em função dos componentes de frequência contidos no espectro do pulso de US incidente. O IBC permite a caracterização contínua do tecido em função da profundidade e a informação no domínio da frequência, embora contida no sinal retroespalhado, não é usada. Em ambos os casos a medida é restrita a uma região de interesse (ROI), que corresponde à porção do sinal janelada no tempo [60].

Machado et al [60] apresentaram medidas de coronária normal e anormal, usando transdutor focalizado na frequência de 50 MHz. Encontraram um IBC maior na íntima espessada em comparação à adventícia normal, o que pode refletir o processo de aterosclerose.

A identificação de manifestações isquêmicas em cardiologia é feita também com US. Parâmetros como espessura do miocárdio e mobilidade já são incorporadas à rotina de avaliação com este método de imagem. Informações quantitativas têm sido investigadas nas três últimas décadas, mas com aplicação ainda restrita na rotina de investigação dos pacientes.

Madaras et al, em 1982 [61] quantificaram a variação sistemática de retroespalhamento integrado do US no músculo cardíaco ao longo do ciclo. Para isto utilizaram um transdutor de 5 MHz com banda larga, focalizado, acoplado ao epicárdio de cães. As medidas foram obtidas uniformemente ao longo do ciclo durante 7 intervalos de tempo (34 ms), sincronizados pelo ECG (onda R). O número médio de ciclos cardíacos neste modelo é de 130 por minuto. O valor máximo de retroespalhamento integrado ocorreu no final da diástole e o mínimo no final da sístole (variação aproximada de 3,5 a 5 dB), para várias localizações cardíacas. Apesar de não conseguirem explicar os mecanismos responsáveis pela mudança de

valores durante o ciclo, eles concluem que o padrão observado caracteriza o músculo cardíaco sob condições fisiológicas e que alterações deste padrão podem auxiliar no diagnóstico de miocárdio anormal.

Em 1986, Thomas et al [62] descreveram um sistema para quantificar o retroespalhamento integrado em tempo real. Registraram a variação do retroespalhamento integrado ao longo do ciclo, mas com análise *off-line* dos dados. Para determinar a energia retroespalhada pelo tecido em tempo real, eles usaram o efeito acusto-elétrico em material piezoelétrico semiconductor (cristal de sulfeto de cádmio). O coeficiente de retroespalhamento é expresso como razão entre a energia retroespalhada pelo volume de tecido em estudo e a energia refletida por um refletor padrão. Os resultados são expressos em decibéis para o retroespalhamento médio no tempo, dispostos em monitor em sincronia com a curva de pressão no ventrículo e a imagem do miocárdio em modo-M.

Naito et al [63] investigaram o coeficiente integrado de retroespalhamento (IBC) como meio de estimar a viabilidade miocárdica, comparando-os à investigação convencional com cintilografia miocárdica e ecocardiograma. Dois parâmetros foram utilizados: o IBC e a magnitude da variação do IBC durante o ciclo cardíaco. O IBC foi maior e a magnitude da variação durante o ciclo cardíaco foi menor no infarto ântero-septal comparado aos indivíduos normais. Os parâmetros (IBC e variação do IBC durante o ciclo) tiveram correlação com o espessamento percentual do septo visto à ecocardiografia, sendo mais forte a correlação com a magnitude da variação durante o ciclo. A correlação foi significativa para o percentual de captação do talio-201 e o IBC. Baseados nos achados eles concluem que o IBC está relacionado ao grau de fibrose e que a magnitude da variação do IBC está relacionada à performance do miocárdio, sendo assim, bons parâmetros para avaliar a sua viabilidade.

Posteriormente, Naito et al [64] usaram os mesmos parâmetros (coeficiente de retroespalhamento integrado (IBC) e variação cíclica do IBC) em infarto transmural (com onda Q) e sem onda Q. A diferença entre as metades direita e esquerda do septo foi encontrada somente entre os pacientes sem Q, refletindo a inhomogeneidade da fibrose miocárdica ou talvez sua viabilidade neste grupo.

O mesmo grupo [65] avaliou a influência da pré-carga (infusão de volume), pós-carga (constricção da aorta) e contratilidade (infusão de propranolol e dobutamina)

miocárdicas usando os mesmos parâmetros. Os parâmetros se mantiveram constantes em função da mudança de precarga e poscarga. A variação cíclica do IBC foi influenciada pelo uso de dobutamina (aumento da variação cíclica) e propranolol (redução da variação cíclica), demonstrando relação entre este parâmetro e a contratilidade miocárdica.

CAPÍTULO III

Metodologia

III.1.- Modelo animal de colite por TNBS

III.1.1- Local dos experimentos e aprovação do Comitê de Ética

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da UFRJ. O modelo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Laboratório em fevereiro de 2006.

III.1.2- População

Foram utilizados 20 ratos - *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769), adultos e com peso mínimo de 250 g. Os animais eram do tipo SPF (do inglês *specific pathogen free*). Eles foram submetidos ao procedimento ao longo de dez semanas divididos em pares. Cada animal recebeu a denominação segundo a ordem a que foi submetido ao clister para indução de colite. Desta forma os ratos foram denominados por R1, R2, R3...R20. Para medição dos parâmetros quantitativos foi gerada uma subdivisão neste grupo. De cada rato foi retirado fragmento na região da úlcera e outro fora dela para exame, mas próximo a ela. Assim, foram gerados R1c (com úlcera) e R1s (sem úlcera) e assim por diante. Não foi usado grupo controle, sendo apenas 1 animal normal (R0) sacrificado e examinado pela técnica de BMU para se obter a referência da histologia do cólon do rato normal. Os animais foram mantidos em biotério em temperatura ambiente, com ração apropriada e mantendo ciclo circadiano normal.

III.1.3- Técnica para indução de colite

Para geração de colite foi usado o modelo segundo técnica descrita por Pereira [30]. Usou-se o TNBS (ácido 2,4,6 trinitrobenzeno sulfônico), comprado em solução padrão a 5% (P2297; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Foram usados 0,4 ml da solução padrão de TNBS acrescidos de 0,4 ml de etanol a 30%, perfazendo um volume total de 0,8 ml. A solução foi infundida no cólon dos ratos por meio de clister com

sonda de nelaton de 6 cm de comprimento deixando-se o rato em posição de Tremdelemburg por 1 minuto. Para realização do clister os animais foram sedados com éter etílico. Após foram deixados no biotério com alimentação normal. Os animais foram sacrificados entre 4 e 10 dias após o clister de TNBS.

III.1.4- Exame colonoscópico

O exame para confirmação da colite foi feito com equipamento de endoscopia respiratória (broncofibroscópio modelo FB 120-P; Fujinon, Tóquio, Japão) com o animal anestesiado e apenas estendendo-se a anestesia para dose letal no caso da presença de lesões. Foram consideradas como lesões indicativas de indução de colite as úlceras, de quaisquer tamanho e localização. O exame foi realizado sem preparo, sendo realizada lavagem com água no caso da presença de fezes que impediam o exame. O registro fotográfico de um exame endoscópico está na Figura III.1.

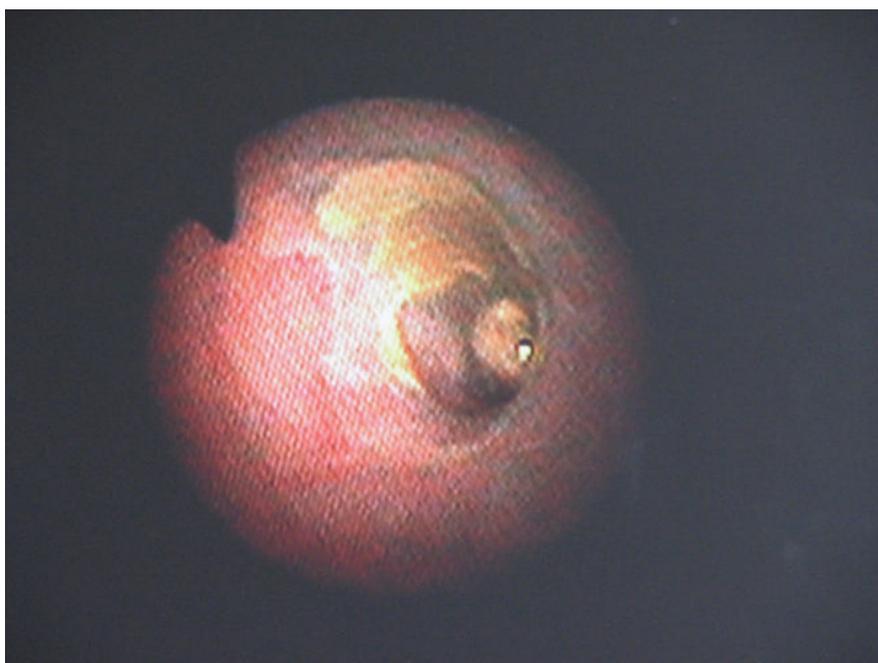


Figura III.1- Imagem endoscópica da úlcera gerada pela infusão de TNBS no cólon do rato

Os animais examinados e com confirmação da obtenção de colite foram sacrificados com éter etílico e tiveram o cólon esquerdo ressecado. Após retirada do cólon foi feita abertura longitudinal da peça e, após limpas em solução salina a 0,9 %,

foram submetidas à análise macroscópica das lesões e registro fotográfico. Foram consideradas na análise macroscópica a presença de perfurações, aderências, acometimento transmural e tamanho das úlceras. O tamanho consistiu na medição da extensão das úlceras no seu maior eixo na superfície mucosa. Foi considerada colite acentuada quando presentes úlceras com mais de 1 cm de extensão (úlceras grandes).

Nas Figuras III.2 e III.3 vêem-se exemplos de úlcera pequena e grande (com necrose transmural), respectivamente.



Figura III.2- Macroscopia do cólon aberto mostrando úlcera longitudinal rasa. A úlcera está na região apontada pela pinça.



Figura III.3- Macroscopia do cólon aberto mostrando úlcera circunferencial com acometimento transmural. A parte ulcerada está na região enegrecida.

III.1.5- Exame histomorfométrico

Os espécimes foram fixados em formol a 10% e desidratados com álcool etílico em concentrações crescentes, começando com álcool a 70% e terminando com álcool absoluto. Foram então submetidos a clareamento com benzol, com objetivo de embeber a peça com substância miscível com a parafina. A seguir foram impregnados com parafina fundida a 60° Celsius em estufa. A peça foi colocada em molde retangular contendo a parafina fundida, obtendo-se um bloco de formato regular para ser cortado no micrótomo [70]. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina. Após coloração, foi feita a correlação entre a histologia e as imagens obtidas com a BMU.

Na microscopia foi identificado e descrito o acometimento em profundidade gerado pelas ulcerações especificando as camadas histológicas lesadas. As camadas histológicas descritas para o cólon do rato são as mesmas que para os humanos, quais sejam: mucosa, muscular mucosa, submucosa, muscular própria e serosa.

O patologista responsável pela análise histológica era cego quanto à análise das imagens obtidas pela BMU.

III.2- Biomicroscópio

III.2.1- Descrição básica do sistema

O diagrama de blocos do BMU está na Figura III.4. Os componentes essenciais são idênticos aos do sistema convencional para geração de imagens em modo B, exceto por operar em frequências elevadas (aproximadamente uma ordem de magnitude acima).

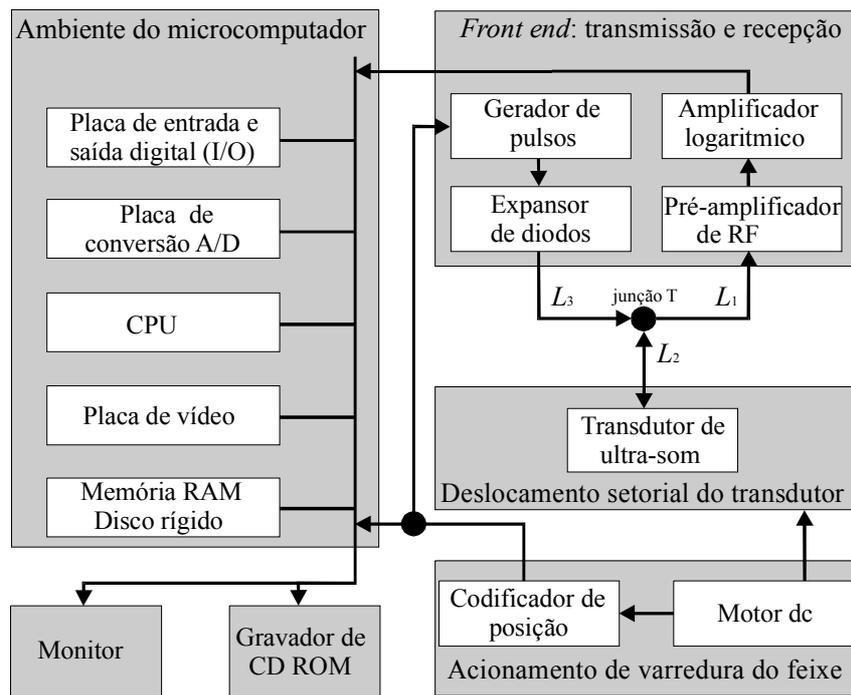


Figura III.4- Diagrama em blocos do sistema de BMU contendo as unidades típicas do ambiente de um microcomputador e seus periféricos, assim como os componentes do *front end* e do sistema de varredura do transdutor. A junção T é onde se conectam a entrada e a saída do *front end* com o transdutor através de cabos co-axiais com comprimentos L_1 , L_3 e L_2 , respectivamente.

O gerador é de alta voltagem com pulso monociclo de 50-100 MHz, que é usado para excitar o transdutor. O pulso de US gerado é transmitido pelo tecido e o US retroespalhado é detectado pelo mesmo transdutor. O sinal de rádio frequência (RF) é recebido, passa por um pré-amplificador e depois por um amplificador logarítmico para

acentuar os sinais de baixa amplitude e seu envelope é em seguida detectado e armazenado no microcomputador após digitalização.

III.2.2- Transdutor

Em todo o trabalho de tese foram usados transdutores de BMU construídos no próprio laboratório de ultra-som (LUS) e com único elemento piezoelétrico de difluoreto de polivinilideno (PVDF), com espessura de 9 μm (Piezotech AS, St Louis, França). Trata-se de polímero com estrutura flexível, o que facilita a montagem quando se trabalha em pequenas dimensões. Além disso, o material tem bom casamento de impedância com a água. O polímero é montado sobre conector tipo SMA com superfície ativa de 3 mm de diâmetro, com uma curvatura (côncava) que permite focalizar o feixe (Figura III.5).

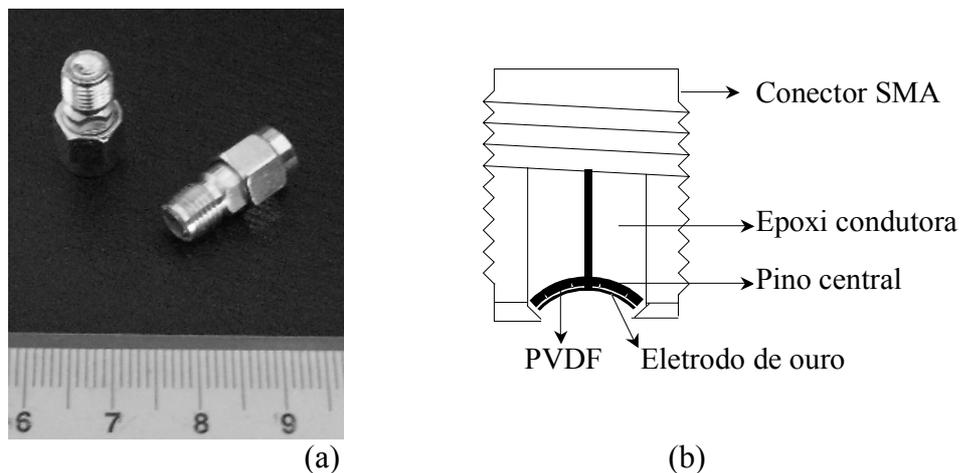


Figura III.5- Transdutor de ultra-som para o sistema de BMU. a) foto; b) representação esquemática da montagem utilizada

A distância focal dos transdutores situou-se entre 3.9 e 5.8 mm (determinados experimentalmente considerando a velocidade da onda na solução salina a 37 °C igual a 1531,74 m/s), o que confere valores de f_{numero} entre 1.3 e 1.9. A camada de retaguarda, "backing", foi constituída de epóxi condutora (CW2500, Chemtronics, Kennesaw, USA). Uma resolução lateral de 50 μm é estimada para frequência de 60 MHz com um transdutor $f/2$ [50].

Uma resposta típica do sistema de BMU operando com um dos transdutores usados neste trabalho é mostrada na Figura III.6 através do sinal de eco, e a magnitude de seu respectivo espectro, proveniente da superfície de um disco de safira posicionada perpendicularmente ao feixe e no foco do transdutor, estando ambos imersos em salina

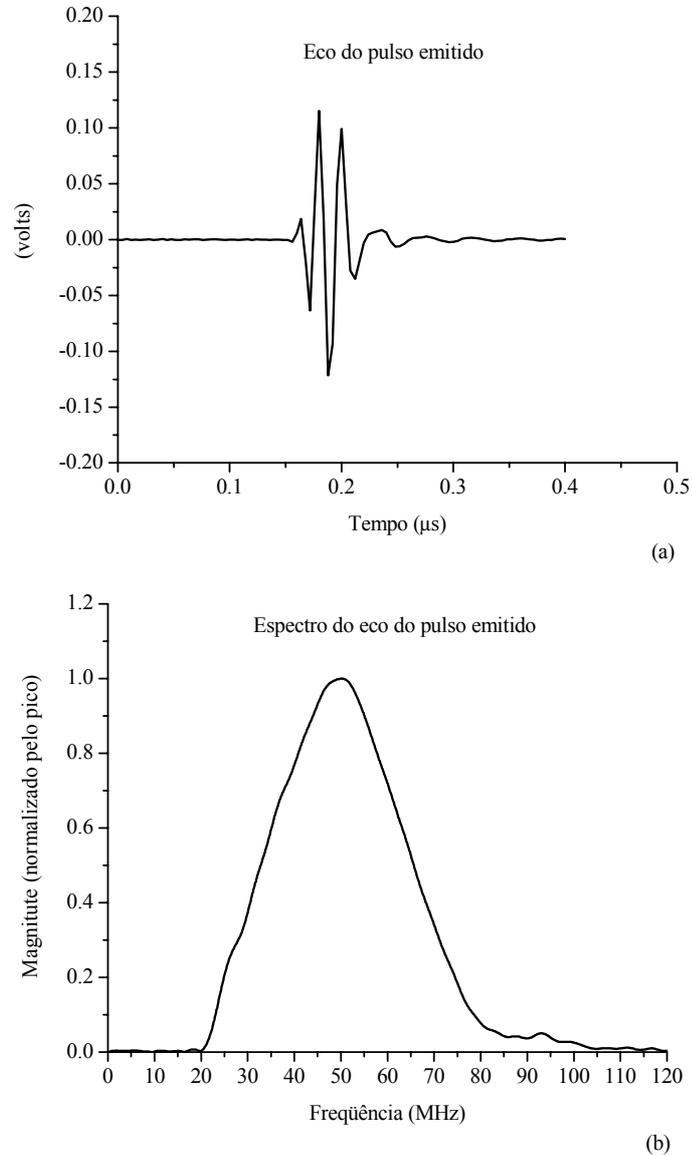


Figura III.6- (a) Sinal de eco e (b) magnitude de seu espectro, proveniente da superfície de um disco de safira posicionada no foco de um transdutor de PVDF com área ativa de 3 mm e usado no presente trabalho.

Para o conjunto de transdutores usados na tese, as médias (± 1 desvio padrão) da frequência central e da largura de banda (-3dB) do espectro do pulso de ultra-som emitido foram 47,3 (2,94) MHz e 21,9 (4,2) MHz, respectivamente.

III.2.3- Acionamento de varredura do feixe

Basicamente, a obtenção de imagens de ultra-som começa com o transdutor de ultra-som movimentando-se em forma pendular no plano de imagem (1,5 por 10 mm). Para isto, o transdutor foi montado em um sistema eletromecânico de varredura setorial constituído por um motor cc com eixo acoplado a um redutor de 14:1 (A-MAX26+GP26B; Maxon, Suíça) e um codificador óptico (BHK 06.24K1024-I6-5; Baumer, Suíça), o qual permite a obtenção de imagem em tempo real numa taxa de 2 quadros/segundo (Figura III.7). Típicamente, são geradas 512 linhas por cada quadro de imagem. Isto corresponde a um pulso de sincronismo emitido pelo codificador a cada passo de 0,35 graus do eixo do motor. Os sinais de pulso emitidos pelo codificador são usados como sinal de sincronismo. Eles são responsáveis pelo disparo do pulsador. Uma vez excitado, o transdutor emite um pulso de US no meio e o sinal retroespalhado é coletado no mesmo transdutor, cujo sinal de saída passa por um amplificador de RF (AU-1054; Miteq, Hauppauge, Canadá), por um filtro passa-banda (25 a 70 MHz) constituído de um filtro passa-alta com frequência de corte em 25 MHz (modelo BHP-25; Mini-circuits, Brooklyn, NY, EUA) em série com um filtro passa-baixa com frequência de corte em 70 MHz (modelo BLP-70; Mini-circuits, Brooklyn, NY, EUA) e depois por um amplificador logarítmico (ver item III.2.7, a seguir), construído no LUS.

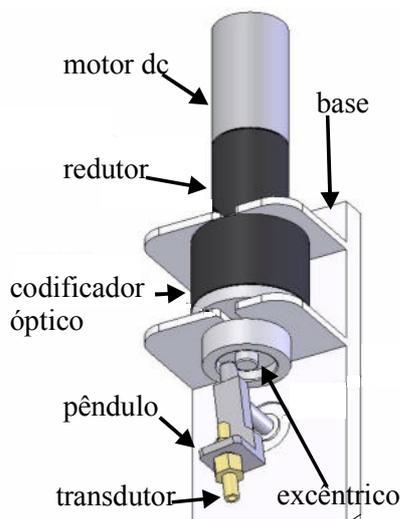


Figura III.7- Representação esquemática do sistema de acionamento da varredura setorial do feixe de ultra-som.

III.2.4- Gerador de pulsos

O gerador de pulsos (AVB2-TB-C, Avtech Eletrosystem, Ottawa, Canadá) usado para excitar o transdutor é do tipo monociclo e possui duas características fundamentais. A primeira é sua alta tensão (máximo de 400V), necessária para transmitir energia suficiente ao transdutor. A segunda é sua curta duração, já que o pulso gerado consiste de um único ciclo de senoide (com frequência teórica variando entre 50 e 100 MHz). Foi usado na tensão de saída máxima e na frequência de 50 MHz.

III.2.5- Proteção do circuito

O expansor de diodos de alta frequência utilizado (DEX-3, Matec, Northborough, EUA) é composto por dois conjuntos de diodos conectados com polaridades invertidas e posicionados em série entre a entrada e a saída do dispositivo. O mesmo tem como função atuar como circuito aberto entre o gerador de pulsos e o transdutor, quando se passa do estado de emissão ao de recepção.

O limitador de tensão está na entrada do pré-amplificador, ambos conectados em paralelo. Sua função é evitar que o pulso de alta tensão transmitido pelo gerador de pulsos possa ocasionar danos nos outros componentes do sistema. Quando um pulso de alta tensão é apresentado na entrada do limitador, este limita o nível de sinal do pré-amplificador, evitando danos ao mesmo. Se o sinal é de baixa tensão, o limitador se porta como circuito aberto (recepção), fazendo com que o limitador não interfira no sinal de US, transmitido ao pré-amplificador.

III.2.6- Pré-amplificador

O amplificador de RF (AU-1054, Miteq, Hauppauge, Canadá) está localizado na saída do transdutor para aumentar o nível de sinal de US proveniente da amostra. O ganho proporcionado é de 30 dB ($\pm 0,5$ dB), mantendo-se constante dentro de sua banda que vai de 1 a 500 MHz. As impedâncias, tanto na entrada como na saída são de 50Ω , permitindo casamento das mesmas com os cabos co-axiais que interligam o sistema.

III.2.7- Amplificador logarítmico (AL)

A montagem do AL foi parte do trabalho de tese desenvolvido por Petrella [66]. Suas funções são enfatizar os sinais de baixa amplitude e detectar a envoltória do sinal

de RF retroespalhado. A construção do AL envolve o uso de um circuito integrado (AD640N; Analog Devices Inc., Norwood, EUA) junto com um amplificador diferencial (AD844; Analog Devices Inc., Norwood, EUA) e uma série de elementos passivos (resistores, capacitores e indutor). Com a configuração proposta é obtida uma faixa de 40 dB e uma largura de banda de 50 a 150 MHz, adequadas para o sinal estudado.

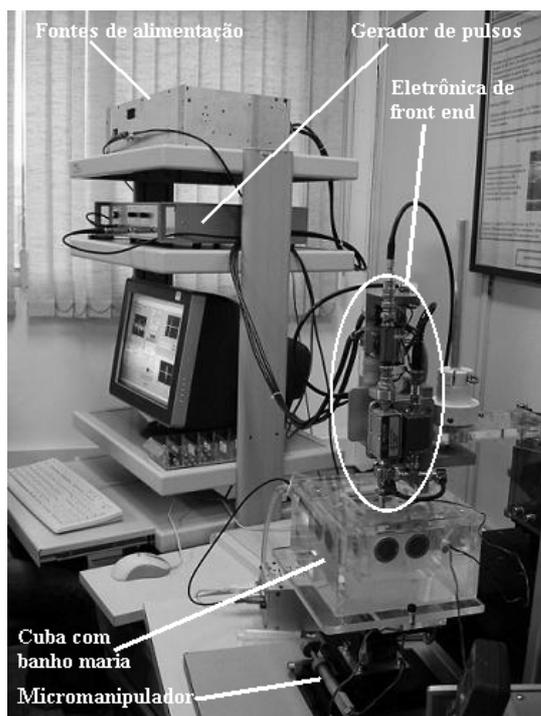
III.2.8- Conversor analógico/digital (CAD)

A digitalização dos sinais obtidos na saída do AL (envoltória dos sinais de RF) é feita por uma placa de CAD (modelo NI PCI-5114; National Instruments, Austin TX, EUA) e transferida para um processador digital de sinal (microcomputador) para a conversão de varredura e exibição da imagem na tela do monitor. Esta placa, com dois canais de entrada e 8 MB de memória RAM por canal, funciona com frequência de amostragem de 250 MS/s. Esta frequência de amostragem atende a digitalização das envoltórias do sinal retroespalhado para a frequência central de RF até 50 MHz.

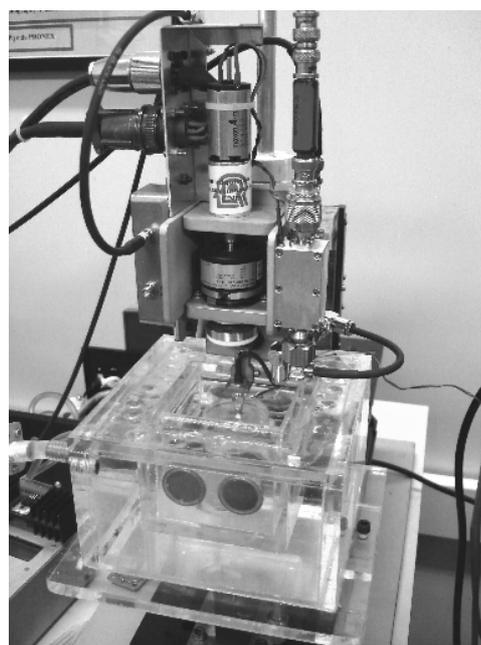
O *software* usado para a captação de sinais e geração de imagens, desenvolvido em LabVIEW™ (versão 7.2; National Instruments, Austin, TX, EUA), é denominado “Interface BMU 10.vi”. As rotinas de digitalização podem ser consultadas em [66].

III.2.9- Microcomputador e estante móvel

A instalação da placa do CAD, o desenvolvimento de *software* para configuração da placa, sincronização de varredura e apresentação dos resultados e armazenamento de dados foram realizados utilizando-se um computador Pentium III. Este computador foi equipado com um processador de 2,4 GHz, monitor de vídeo de 17 polegadas, teclado, mouse, driver de CD ROM com gravador e interfaces padrões para impressora RS-232. O conjunto foi instalado em estante móvel para facilitar a movimentação do sistema (Figura III-8).



(a)



(b)

Figura III.8- (a) Estante móvel com computador e detalhes do BMU e (b) detalhe do *front end* e recipiente para a amostra de tecido.

III.2.10- Plataforma XYZ para posicionamento da amostra

A metodologia empregada para obtenção de imagens de ultra-som (US) se faz movimentando o transdutor no plano de imagem com a amostra de tecido colocada imóvel sobre uma coluna contendo um disco de safira submerso em solução salina com a temperatura controlada. O conjunto transdutor e disco de safira possui deslocamento relativo por meio de uma plataforma XYZ.

Essa plataforma compõe-se de quatro partes (Figura III.9). Uma delas consiste em uma base com manipuladores lineares micrométricos com precisão de 10 μm (M-436A, Newport, Irvine, EUA), que permitem o movimento da amostra no plano horizontal XY. Sobre esta base está colocado o recipiente para a amostra de tecido biológico.

A inclinação da base é controlada por outro sistema de ajuste (M-39, Newport, Irvine, EUA), que tem dois manipuladores que permitem orientar a superfície da safira perpendicularmente à direção de propagação do feixe.

Uma terceira parte da plataforma consiste de um manipulador linear micrométrico (360-90, Newport, Irvine, EUA), que permite um ajuste fino do deslocamento do transdutor ao longo do eixo vertical Z. Esta plataforma está acoplada também a outro manipulador (281, Newport, Irvine, EUA), que permite ajuste grosso do transdutor, também ao longo do eixo vertical Z.

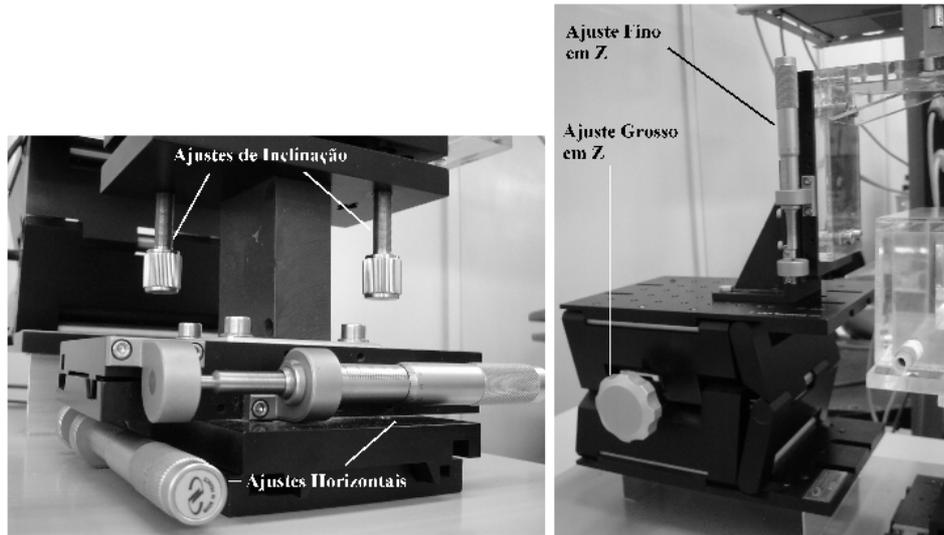


Figura III.9- Sistema para posicionamento da amostra, mostrando os micromanipuladores horizontais e vertical (Cedido por Petrella [66]).

III.2.11- Recipiente para amostra de tecido biológico e controle de temperatura

O recipiente onde é colocada a amostra de tecido foi usado durante a obtenção, *in vitro*, das imagens e a coleta de sinais de eco para a caracterização ultra-sônica de peças de cólon. O recipiente é formado por duas câmaras de acrílico incomunicáveis (Figura III.10). A câmara externa é selada e contém duas aberturas num dos lados para entrada e saída de fluido (água), que circula pela ação de uma bomba hidráulica. Este fluido é conectado a um regulador térmico (aquecedor) com controle PID (proporcional integral diferencial), que eleva o nível de temperatura ao valor desejado, que é estabelecido por um controle associado [66].

A câmara interna, envolta pela câmara externa, é aberta na parte superior por onde é inserida uma coluna de acrílico com altura regulável, para colocação da amostra. Esta câmara é preenchida com solução salina a 0,9% que atua como meio de acoplamento entre o transdutor e a amostra de tecido, servindo também para a condução

de calor. Assim, o fluido que circula dentro da câmara externa transmite o calor, por condução térmica através das paredes, para o fluido da câmara interna.

Sobre a coluna de acrílico, inserida na câmara interna, é montado um disco de safira (diâmetro = 25,4 mm, altura = 8,09 mm) que atua como um substrato. A amostra de tecido biológico é colocada em cima da safira e coberta por um filme de PVC.

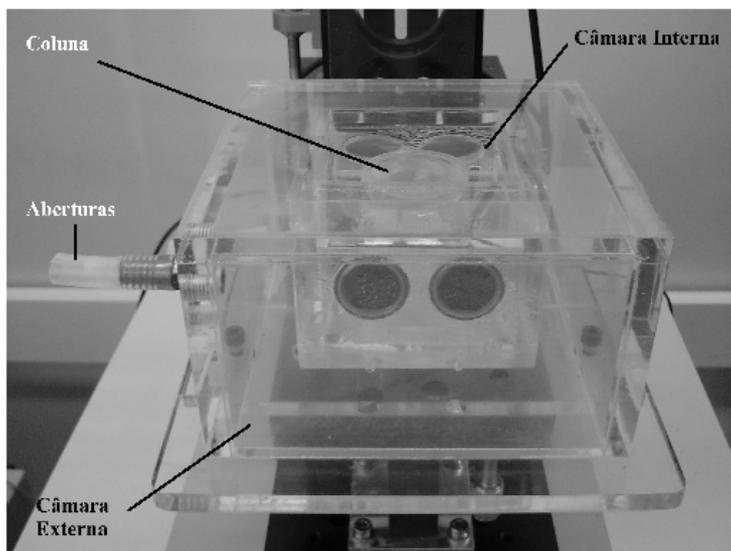


Figura III.10- Recipiente com temperatura controlada para colocação da amostra de tecido (Cedido por Petrella [66]).

III.3- Obtenção dos parâmetros quantitativos

Os parâmetros usados para a caracterização ultra-sônica da parede de cólon compreendem a espessura da amostra, a velocidade de propagação da onda e os coeficientes de atenuação e de retroespalhamento em função da frequência e de retroespalhamento integrado. Para a obtenção destes parâmetros é necessário determinar, antes, a espessura da parede. A coleta dos sinais, descrita a seguir, necessários para a determinação dos parâmetros mencionados, foi realizada utilizando-se o programa computacional “AQ_sinais_v1.vi”. Uma vez coletados os sinais, os mesmos foram processados usando o programa computacional “CTUS.vi” para o cálculo dos parâmetros citados. Ambos os programas computacionais, desenvolvidos em LabVIEW™ (versão 7,2; National Instruments, Austin, TX, EUA), são parte integrante da instrumentação de BMU do LUS.

III.3.1- Preparação da amostra

As imagens e os parâmetros quantitativos relacionados ao US são obtidos com tecido colocado sobre o disco de safira, que está repousado sobre uma coluna de acrílico posicionada no centro do recipiente com temperatura controlada. A amostra de tecido é recoberta por uma membrana de PVC de 9 μm de espessura para evitar que a mesma se desloque ao ser imersa no banho, conforme ilustrado na Figura III.11.

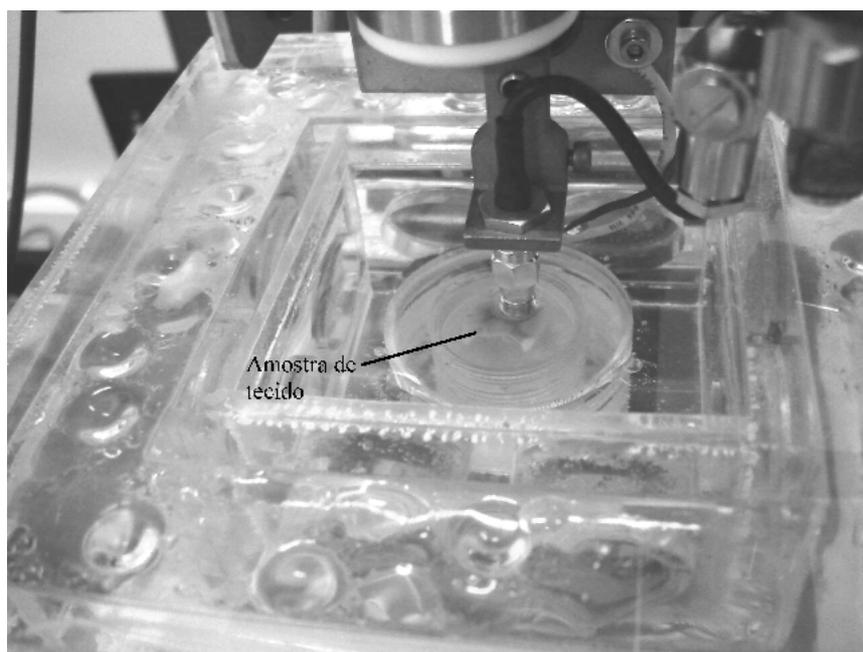


Figura III.11- Recipiente contendo a amostra de tecido já colocada sobre o disco de safira e recoberta pela membrana.

A amostra do cólon usada para exame é obtida a partir do recorte de uma porção retangular da peça original (cólon esquerdo do rato), medindo cerca de 5x5 mm. Antes de ser recoberta pela membrana de PVC, a amostra é gotejada com formaldeído a 10% por 2 minutos e enxaguada a seguir com solução salina a 0,9%. O gotejamento, introduzido já na metade dos experimentos, foi proposto pelo patologista ao constatar que havia autólise no material examinado. A autólise é atribuída ao tempo prolongado (\cong 3 horas) de imersão da peça em salina a 37 °C para a coleta de sinais.

III.3.2- Coleta dos sinais de RF usados no cálculo dos parâmetros quantitativos

A escolha da região de interesse para a coleta dos sinais de RF baseou-se na imagem de BMU da parede da amostra. Procurou-se uma região onde houvesse uma distribuição contínua de tecido entre a membrana de PVC e a superfície do disco de safira. Uma vez definida a região de interesse, foi realizada uma varredura do tipo *raster* do feixe sobre a mesma, coletando-se sinais de eco numa região contendo os pontos de amostragem distribuídos na forma de uma matriz de 8x8 perfazendo 64 pontos, separados por uma distância de 50 μm , conforme ilustra a Figura III.12.

Para medir a velocidade, a espessura e os coeficientes de atenuação e retroespalhamento, foram coletadas 6 seqüências de sinais, cada uma delas contendo 64 aquisições de sinal RF seguindo a varredura *raster* mencionada. A Figura III.13 ilustra cada seqüência de sinais adquirida. Para a aquisição dos sinais, o transdutor permaneceu fixo com seu feixe orientado perpendicularmente à superfície do disco de safira, sendo a varredura realizada pelo deslocamento da amostra em relação ao feixe e usando os micromanipuladores para os eixos X e Y. Os sinais de RF foram adquiridos diretamente da saída do pré-amplificador de RF usando-se o conversor analógico/digital. Cada sinal adquirido correspondeu a uma média coerente de 100 amostras, melhorando-se com isto a relação sinal/ruído dos sinais coletados.

Para a primeira seqüência de aquisição de sinais foi escolhida uma região de interesse fora da amostra. Cada aquisição compreendeu o sinal de eco da safira, com o pulso transmitido atravessando a membrana e uma camada de salina entre a membrana e a superfície do disco de safira. Na segunda seqüência foi coletado o sinal de eco da safira, mas com a onda transmitida atravessando a membrana e a amostra de tecido na região de interesse. Os sinais destas duas seqüências são usados na obtenção do coeficiente de atenuação.

Para a próxima seqüência foram coletados sinais de retroespalhamento provenientes de toda a parede da amostra, usados para calcular os coeficientes de retroespalhamento em função da frequência e integrado (IBC). Durante a coleta, os sinais adquiridos foram janelados de forma a eliminar os ecos da membrana e da superfície do disco de safira.

As próximas seqüências compreenderam os sinais de eco provenientes da membrana e da superfície do disco de safira. Neste último caso levaram-se em conta

duas situações: uma com a onda transmitida atravessando a membrana e a amostra de tecido e outra com a onda transmitida propagando-se apenas pela solução salina. Com as três seqüências de sinal de eco adquiridas foi possível determinar, de forma independente, a espessura e a velocidade de propagação da onda na amostra de tecido.

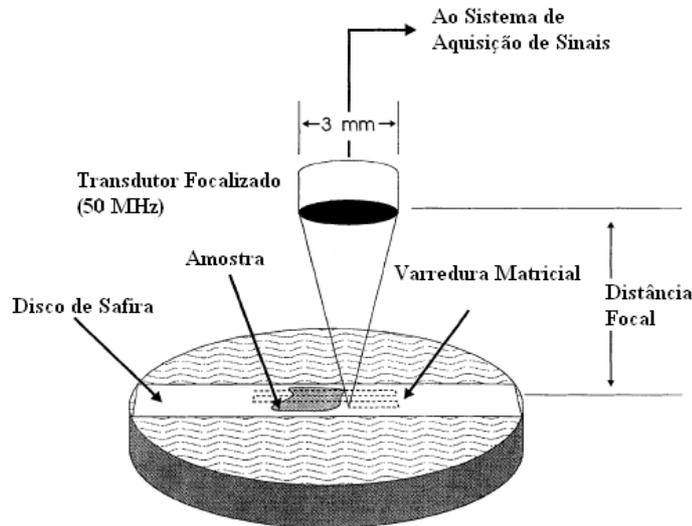


Figura III.12- Método de varredura para obtenção dos sinais. Adaptado de Ye et al [67]

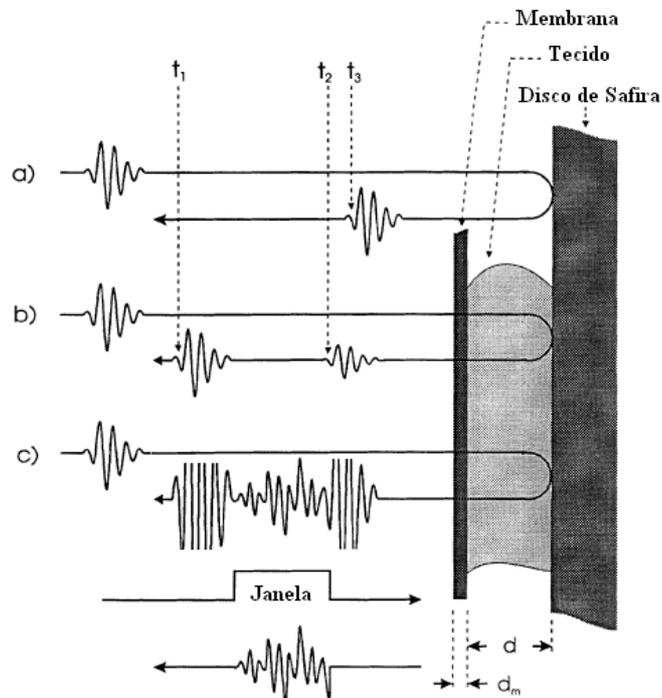


Figura III.13- Esquema com os sinais usados para cálculo da espessura, velocidade, atenuação e retroespalhamento. a) sinal de referência; b) sinal de eco atenuado e eco da membrana; c) sinal janelado para cálculo do retroespalhamento. Adaptado de Ye et al [67].

Durante a coleta dos sinais de RF a temperatura da solução salina na região contendo a amostra de tecido foi controlada em $37 (\pm 1) ^\circ\text{C}$.

III.2.3- Medição da espessura e da velocidade da onda na amostra de tecido

A espessura e a velocidade de propagação da onda na amostra de tecido são calculadas de forma independente a partir dos tempos de vôo dos sinais de eco coletados nas três últimas seqüências mencionadas anteriormente. O método de cálculo usado está descrito por Ye et al [66].

As equações utilizadas para a determinação da espessura da amostra, d , e velocidade da onda na amostra, v (ver figura III.13), são:

$$d(x, y) = \frac{c(t_3(x, y) - t_1(x, y))}{2} - d_m, \quad (7)$$

$$v(x, y) = d(x, y) \left(\frac{d(x, y) + d_m}{c} - \frac{d_m}{v_m} + \frac{t_2 - t_3}{2} \right)^{-1}, \quad (8)$$

onde x e y representam as coordenadas do ponto de incidência do feixe de ultra-som na região de interesse sobre a superfície da amostra, c é a velocidade do som na solução salina a 37°C (1531,27 m/s), t_3 é o tempo de vôo do pulso de ultra-som que se propaga pela solução salina e reflete na safira, t_1 é o tempo de vôo para o sinal de eco refletido na interface PVC/tecido, d_m é a espessura da membrana PVC (9 μm), v_m é a velocidade de som na membrana de PVC (1890 m/s, [68]) e t_2 é o tempo de vôo para o sinal de eco passando através do tecido e, posteriormente, refletido na placa de safira. Os tempos de vôo t_1 , t_2 e t_3 estão esquematizados na Figura III.10.

Os valores médios de d e v são determinados como segue:

$$d = \frac{1}{64} \sum_{i=1}^8 \sum_{j=1}^8 d(x_i, y_j) \quad (9)$$

$$v = \frac{1}{64} \sum_{i=1}^8 \sum_{j=1}^8 v(x_i, y_j). \quad (10)$$

III.3.4- Medição do coeficiente de atenuação

É usada técnica de inserção descrita por Ye et al [67], aplicada a tecidos sólidos e adequada à frequência do transdutor. A média do coeficiente de atenuação da amplitude, α , é determinada de acordo com a seguinte equação:

$$\alpha(f) = -\frac{1}{64} \sum_{i=1}^8 \sum_{j=1}^8 \frac{20}{2d} \log_{10} \frac{|A(x_i, y_j, f)|}{|A_0(f)|}, \quad (11)$$

onde f é a frequência da onda, d é a espessura da amostra, $|A|$ e $|A_0|$ são as amplitudes dos espectros do pulso de onda transmitida através da amostra de tecido e do pulso de referência refletidos na safira, respectivamente. O meio de propagação entre a membrana e a safira para o pulso de referência é somente a solução salina.

Normalmente, para a maioria dos tecidos moles e líquidos biológicos α depende da frequência [67] como segue:

$$\alpha = \alpha_0 f^\gamma, \quad (12)$$

onde α_0 tem o mesmo valor do coeficiente de atenuação em 1 MHz dado em $\text{Np}\cdot\text{m}^{-1}$ ou $\text{dB}\cdot\text{m}^{-1}$, sendo f a frequência em MHz.

A equação (12) pode ser reescrita em termos do coeficiente de atenuação em 50 MHz como segue:

$$\alpha = \frac{\alpha_{50}}{(f_{50})^\gamma} f^\gamma, \quad (13)$$

onde α_{50} é o coeficiente de atenuação em $\text{Np}\cdot\text{m}^{-1}$ ou $\text{dB}\cdot\text{m}^{-1}$ em 50 MHz sendo f_{50} a frequência em 50 MHz.

Comparando-se (12) e (13) tem-se que:

$$\alpha_0 = \frac{\alpha_{50}}{(f_{50})^\gamma}. \quad (14)$$

III.3.5- Medição do coeficiente de retroespalhamento

Para medir o coeficiente de retroespalhamento a região focal do transdutor foi posicionada no meio da amostra, a meio caminho entre a membrana de PVC e a superfície do disco de safira. Como os transdutores utilizados possuíam uma DOF variando entre 500 e 1000 μm , foi usada uma janela de 130 ns (\cong 100 μm e correspondendo a 20% da DOF mínima) para isolar o sinal de RF retroespalhado e

garantir que todo o sinal janelado ficasse dentro da *DOF* de cada transdutor e não apresentasse uma modulação em amplitude causada pela difração do feixe. Foi usada uma janela retangular afilada em 10% pela função co-seno (10% cosine tapered window). O sinal janelado foi compensado dos efeitos da atenuação usando-se o método descrito por Dastous et al [68].

O coeficiente de retroespalhamento, μ_{bs} , é calculado em função da razão entre a energia do sinal espalhado, corrigido da atenuação, e a energia do sinal de referência após reflexão na safira. Segundo Ye et al [67], seu valor médio é determinado usando a seguinte equação:

$$\mu_{bs}(f) = \frac{1}{64} \sum_{i=1}^8 \sum_{j=1}^8 \frac{1}{D} \frac{R_q}{2\pi(1-\cos\theta)} \frac{|S(x_i, y_j, f)|^2}{|A_0(f)|^2}, \quad (15)$$

onde $R_q = 0,631$ é o coeficiente de reflexão de intensidade na interface salina-safira; $|S|$ é a magnitude do espectro do sinal retroespalhado; $|A_0|$ é a magnitude do espectro do sinal de referência, θ é a metade do ângulo de abertura do feixe do transdutor na região focal, D é a profundidade em mm, que corresponde à duração da janela no sinal retroespalhado. O coeficiente de retroespalhamento é medido em $\text{sr}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$.

Analogamente ao coeficiente de atenuação, para a maioria dos tecidos moles e líquidos biológicos, μ_{bs} depende da frequência [67] como segue:

$$\mu_{bs} = \mu_0 f^\gamma, \quad (16)$$

onde μ_0 tem o mesmo valor do coeficiente de retroespalhamento em 1 MHz dado por $\text{sr}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$, sendo f a frequência em MHz.

A equação (15) pode ser reescrita em termos do coeficiente de retroespalhamento em 50 MHz como segue:

$$\mu_{bs} = \frac{\mu_{50}}{(f_{50})^\gamma} f^\gamma, \quad (17)$$

onde μ_{50} é o coeficiente de retroespalhamento em $\text{sr}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$ em 50 MHz sendo f_{50} a frequência em 50 MHz.

Comparando-se (16) e (17) tem-se que:

$$\mu_0 = \frac{\mu_{50}}{(f_{50})^\gamma}. \quad (18)$$

III.3.6- Medição do coeficiente de retroespalhamento integrado

A medição do coeficiente de retroespalhamento integrado, μ_I , é feita segundo técnica descrita por Machado et al [60]. Esta medição se baseia em um sinal retroespalhado da amostra ao longo da extensão de sua parede e de outro obtido pela reflexão do pulso emitido pelo transdutor em um alvo plano, posicionado perpendicularmente ao feixe de US, sendo a solução salina o único meio de propagação. A média de μ_I , como função da profundidade z na amostra, é determinada através da seguinte equação:

$$\mu_I(z) = \frac{1}{64} \sum_{i=1}^8 \sum_{j=1}^8 \frac{2 \cdot \sigma \cdot Rq}{\Omega \cdot v \cdot D_s(z; \omega_0)} \frac{|s_S(x_i, y_j, z)|^2}{\int_{-\infty}^{\infty} |s_0(t')|^2 dt'}, \quad (19)$$

onde σ é um coeficiente de correção, devido à difração, de um feixe focalizado e refletido em um alvo plano localizado no ponto focal z_0 (Chen et al [69], Machado et al [70]). $|s_S|$ é a envoltória do sinal retroespalhado ao longo da profundidade da amostra, Ω é o ângulo sólido de recepção do transdutor, D_s é uma função de correção da difração, Chen et al [69], do feixe ao longo de z e determinado na frequência central f_0 do pulso emitido pelo transdutor, $\omega_0 = 2\pi f_0$. $|s_0|$ é a envoltória do pulso de referência refletido na safira, para o qual o meio de propagação entre a membrana e a safira é somente solução salina.

O coeficiente de retroespalhamento integrado é dado em $\text{sr}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$.

III.3.7- Testes estatísticos

Para comparação das médias dos parâmetros quantitativos entre os grupos com úlcera e sem úlcera foi usado usado o teste t de Student. Levou-se em consideração um nível de significância estatística de 0,05. Os resultados são expressos em termos de média (± 1 desvio padrão).

CAPÍTULO IV

Resultados

IV.1- Resultados quantitativos

IV.1.1- Comparações entre os grupos

Os resultados dos parâmetros quantitativos relacionados à propagação do US no cólon dos ratos submetidos à colite por TNBS estão apresentados a seguir. A velocidade de propagação da onda e a espessura da parede para os dois grupos estão apresentadas na Tabela IV.1. Os resultados são expressos em termos de média (± 1 desvio padrão).

A frequência central do pulso de ultra-som incidente nas amostras teve um valor médio de 47,3 MHz (± 1 desvio padrão = 2,9 MHz). Os coeficientes de atenuação e de retroespalhamento foram calculados para as bandas de frequência de -3dB (média de 29.1 MHz) e -6dB (média de 31,4 MHz) do pulso de onda incidente nas amostras.

Tabela IV.1- Média (± 1 desvio padrão) da velocidade e da espessura para os grupos com e sem úlcera.

	n	Velocidade da onda (m/s)	Espessura do cólon (μm)
Grupo com úlcera	18	1621,99 ($\pm 110,59$)	1816,44 ($\pm 467,58$)
Grupo sem úlcera	20	1627,52 ($\pm 138,83$)	1846.26 ($\pm 309,00$)

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com e sem úlcera para os parâmetros velocidade e espessura.

Os coeficientes de atenuação em 50 MHz (α_{50}) e de retroespalhamento em 50 MHz (μ_{50}), assim como os valores dos expoentes da frequência (γ) relacionados a ambos os coeficientes, expressos em termos da média (± 1 desvio padrão) podem ser vistos nas Tabelas IV.2 e IV.3 para as bandas de -3dB e -6dB, respectivamente.

Tabela IV.2- Média (± 1 desvio padrão) dos coeficientes de atenuação e de retroespalhamento para a banda de -3dB.

	n	Atenuação		Retroespalhamento	
		α_{50} (dB/mm)	γ	$(10^3)\mu_{50}$ (1/sr·mm)	γ
Grupo com úlcera	18	4,52($\pm 1,67$)	1,74($\pm 1,04$)	1,93($\pm 3,67$)	1,22($\pm 1,61$)
Grupo sem úlcera	20	5,71($\pm 1,99$)	1,55($\pm 0,48$)	3,25($\pm 4,07$)	1,28($\pm 1,55$)

Tabela IV.3- Média (± 1 desvio padrão) dos coeficientes de atenuação e de retroespalhamento para a banda de -6dB.

	n	Atenuação		Retroespalhamento	
		α_{50} (dB/mm)	γ	$(10^3)\mu_{50}$ (1/sr·mm)	γ
Grupo com úlcera	18	4,52 ($\pm 1,65$)	1,63 ($\pm 0,78$)	2,13 ($\pm 4,53$)	0,49 ($\pm 0,94$)
Grupo sem úlcera	20	5,67 ($\pm 1,95$)	1,63 ($\pm 0,41$)	4,28 ($\pm 7,62$)	0,87 ($\pm 1,21$)

Não houve diferença significativa entre as médias dos coeficientes de atenuação e retroespalhamento nos grupos com e sem úlcera, considerando ambas as larguras de banda de -3dB e -6dB.

IV.1.2- Exemplos de comportamento dos coeficientes de atenuação e de retroespalhamento em função da frequência

Exemplos de comportamento dos resultados dos coeficientes de atenuação e retroespalhamento em função da frequência estão colocados a seguir. São mostrados os resultados para as amostras R0, R5s e R6c na faixa de -6dB (Figuras IV.1 a IV.6). Os resultados para outros 7 ratos estão no Anexo I. Nos gráficos são mostrados os resultados em termos de média, do dobro do erro padrão e da interpolação da média, para os coeficientes de atenuação e retroespalhamento. O comportamento é similar para os resultados nos três exemplos exceto pelo fato da atenuação ter sido significativamente maior no rato normal.

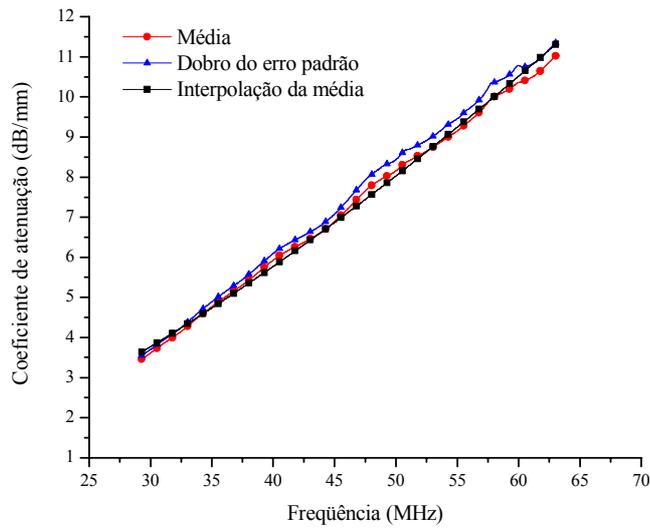


Figura IV.1- Comportamento do coeficiente de atenuação em função da frequência para o R0.

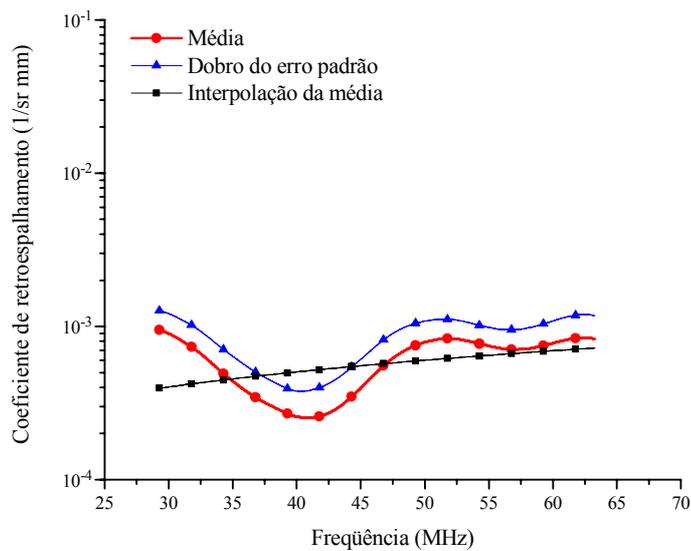


Figura IV.2- Comportamento do coeficiente de retroespalhamento em função da frequência para o R0.

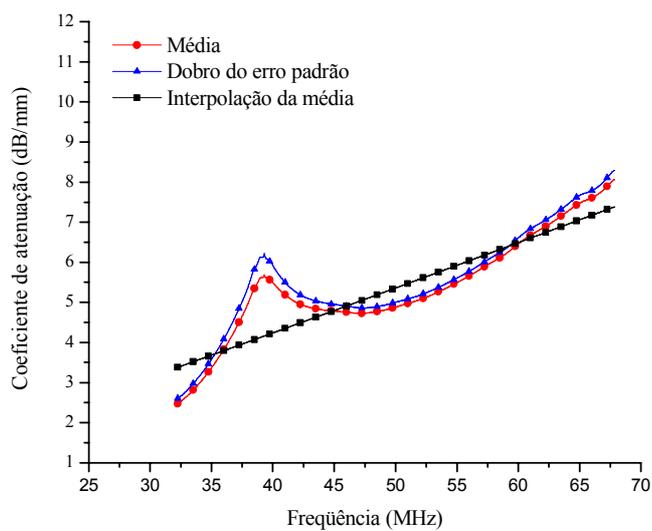


Figura IV.3- Comportamento do coeficiente de atenuação em função da frequência para o R5s.

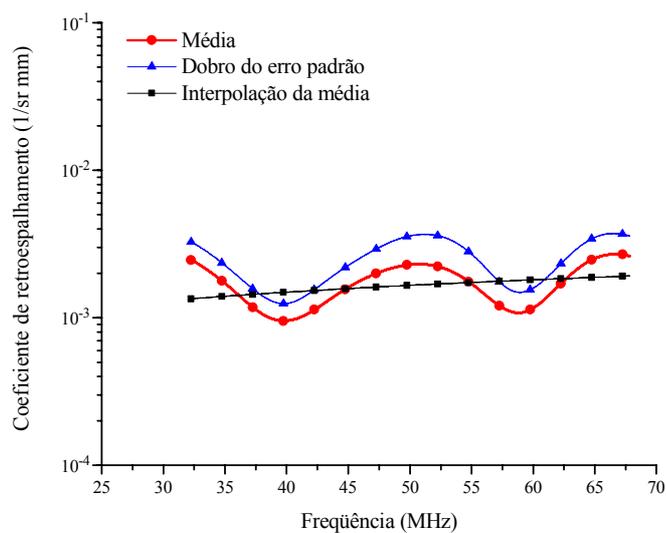


Figura IV.4- Comportamento do coeficiente de retroespalhamento em função da frequência para o R5s.

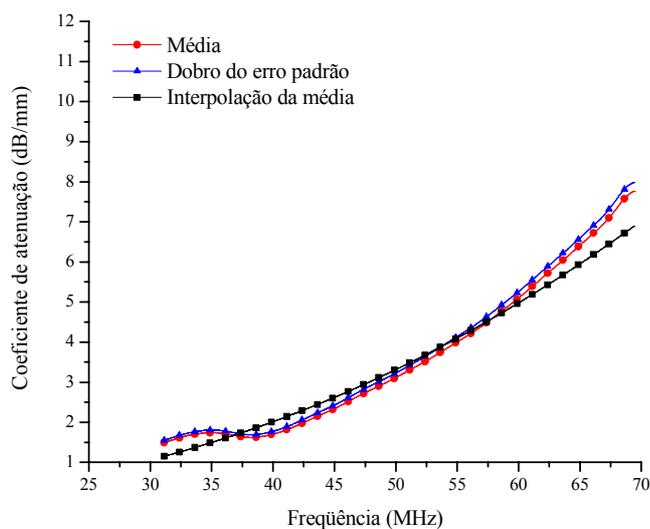


Figura IV.5- Comportamento do coeficiente de atenuação em função da frequência para o R6c.

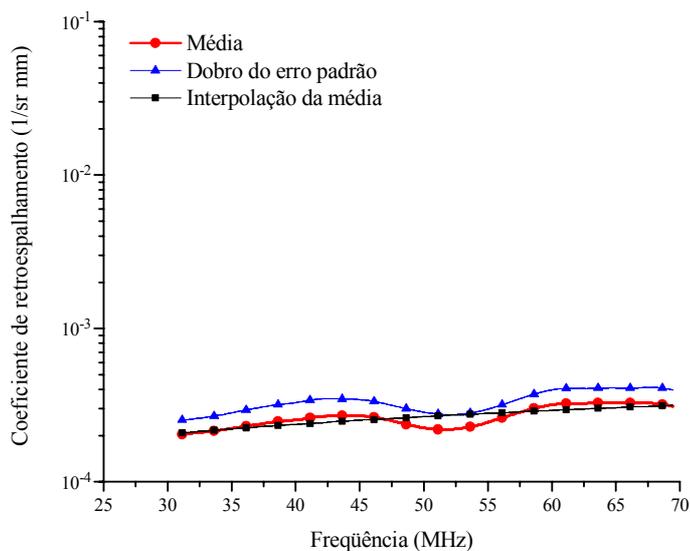


Figura IV.6- Comportamento do coeficiente de retroespalhamento em função da frequência para o R6c.

IV.2- Resultados qualitativos

IV.2.1- Descrição do material

A colite pelo TNBS desenvolvida nos ratos pôde ser considerada grave (com úlceras maiores do que 1 cm) em 11 dos 20 ratos (55%). Já a colite leve (úlceras

menores que 1 cm) estavam presentes em 8 casos (40%). Um dos animais (R1) não apresentou úlceras no momento do sacrifício e a histologia mostrou úlcera em epitelização.

Na tabela IV.4 estão listados os animais com colite leve ou intensa.

Tabela IV.4- Animais com colite leve ou intensa.

Ratos	
Colite leve	R2, R4, R10, R14, R16, R18, R19, R20
Colite acentuada	R3, R5, R6, R7, R8, R9, R11, R12, R13, R15, R17

IV.2.2- Comparação entre imagens de BMU e da histologia

Todo o material apresentou autólise em maior ou menor grau, que foi reduzida a partir dos experimentos com o R12, quando foi introduzido o gotejamento de formaldeído na superfície do tecido recortado antes da montagem para aquisição de sinais como descrito no item III.3.1.

A histologia normal pôde ser comparada à imagem da BMU com identificação de até 4 camadas: mucosa, correspondendo à primeira camada hiperecogênica; muscular mucosa, correspondendo à segunda camada hipoeecogência; submucosa, correspondendo à terceira camada hiperecogência; e muscular própria, correspondendo à quarta camada hipoeecogência. A correlação entre as camadas vistas pela BMU e pela histologia no rato R0 (sem clister de TNBS) é mostrada na Figura IV.7. A imagem de BMU foi obtida sem membrana recobrando o tecido e a faixa branca na parte inferior da imagem corresponde à superfície do disco de safira. Notam-se o pagueado e as camadas de aspecto normal.

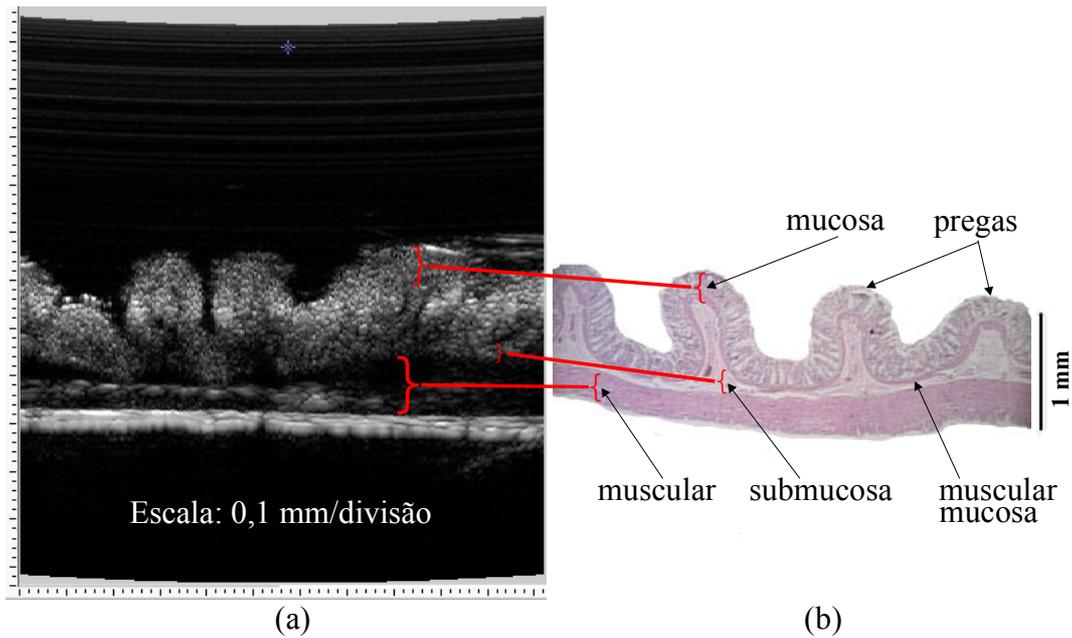


Figura IV.7- (a) Imagem de BMU de cólon de rato normal, R0. (b) histologia com identificação das camadas histológicas normais.

Imagens de BMU e de histologia do cólon de ratos submetidos ao clister de TNBS, mas obtidas a partir de fragmentos fora da região ulcerada podem ser vistos nas Figuras IV.8, IV.9 e IV.10. A Figura IV.8 corresponde à imagem obtida do cólon do R4s. As camadas estão íntegras e há hiperplasia do epitélio na histopatologia, além de peritonite e infiltrado inflamatório do meso. As faixas brancas nas partes superior e inferior da imagem de BMU correspondem à membrana de PVC e à superfície do disco de safira, respectivamente.

A Figura IV.9 contém as imagens de cólon do R19s. Nela, o epitélio hiperplásico está representado por um espessamento da primeira camada hiperecogênica. O pregueamento normal está mantido, assim como as demais camadas histológicas. As faixas brancas geradas pela membrana e pela superfície do disco de safira também estão presentes.

Na Figura IV.10 observa-se imagem de BMU com estrutura de camadas preservada no cólon do R10s. Esta imagem foi obtida sem membrana recobrendo a amostra de cólon. Há intensa autólise no exame histológico e vaso grande na submucosa.

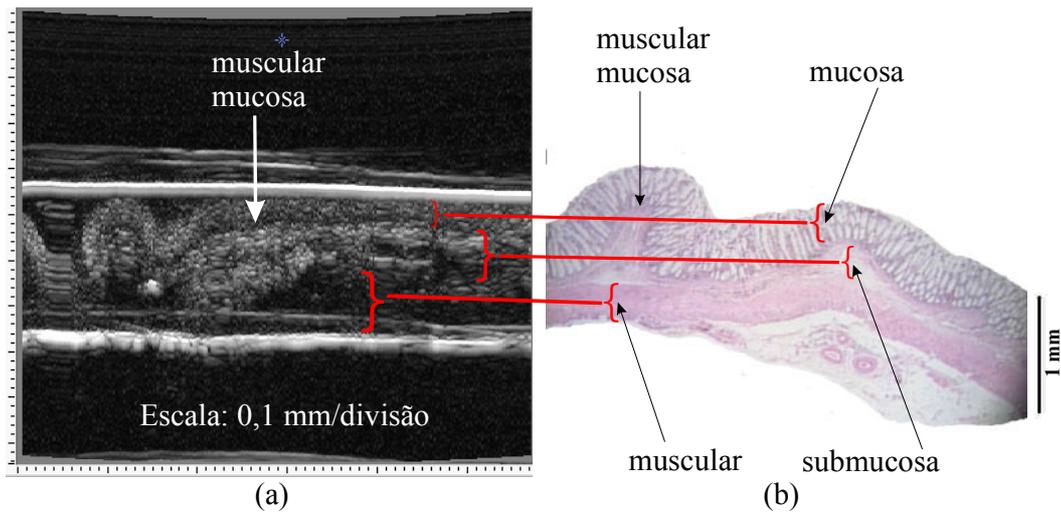


Figura IV.8- (a) Imagem de BMU do cólon do rato R4s. (b) histologia.

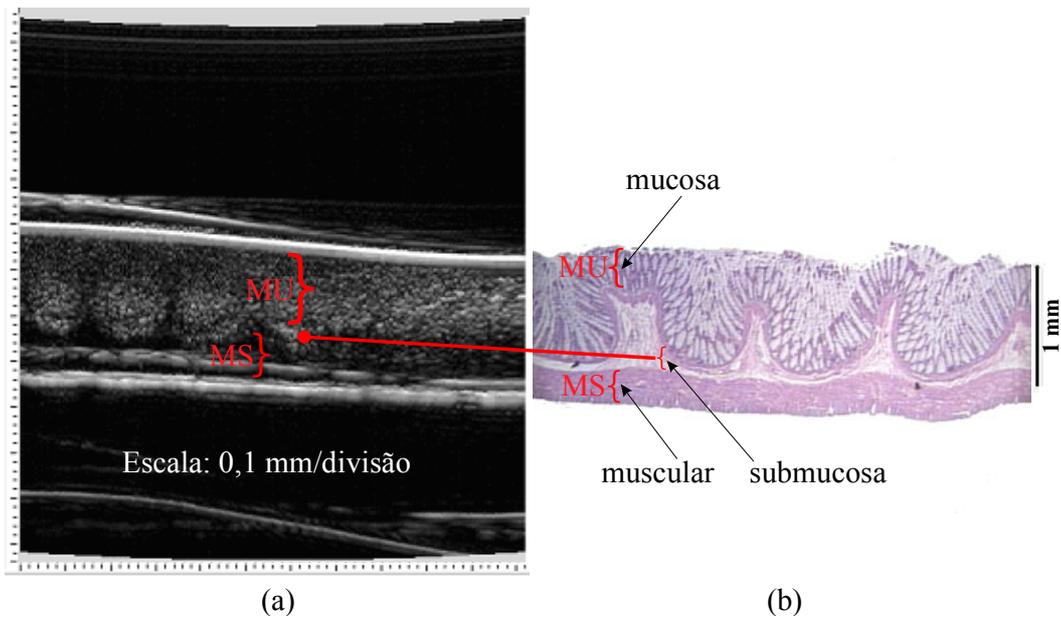


Figura IV.9- (a) Imagem de BMU do cólon do R19s. (b) histologia.

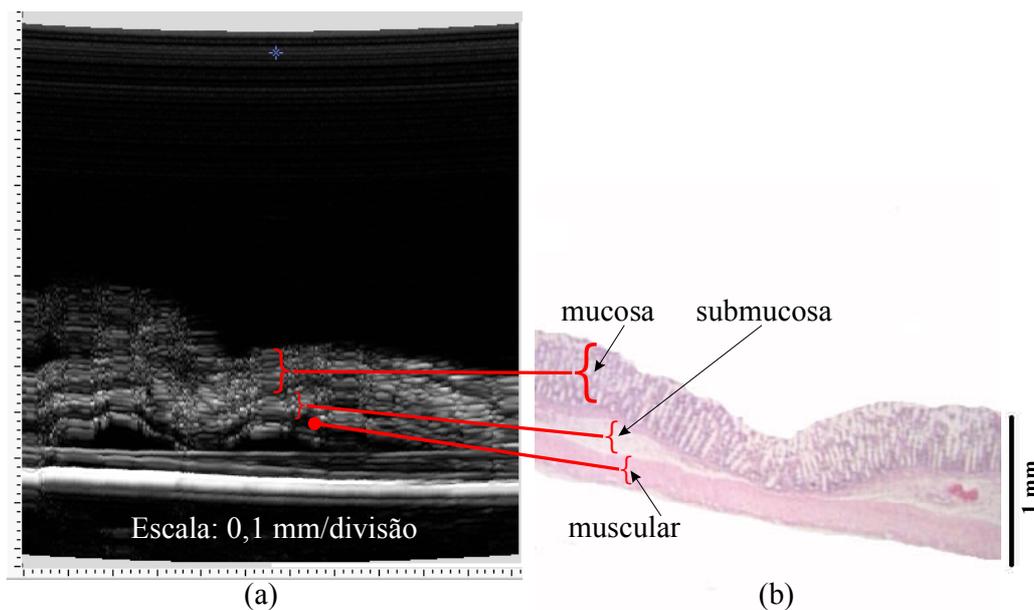


Figura IV.10- (a) Imagem de BMU do R10s. (b) Histologia.

A confirmação da presença de úlceras pelo patologista foi feita em todos os casos. Alguns outros achados histopatológicos considerados relevantes para o modelo de colite por sua similaridade com achados da doença de Crohn e outros por sua presença de forma repetida no material examinado estão listados na Tabela IV.5.

Tabela IV.5- Achados histopatológicos nos ratos submetidos a clister com TNBS.

	Ratos
Hiperplasia do epitélio	R1,R3,R4,R5, R11, R12, R14, R15, R16, R17, R18
Agregados linfóides	R1, R5, R7
Pseudopólipos	R3, R17
Fístula	R7, R12
Úlcera histológica	R1,R4, R9, R14, R17

O agregado linfóide foi identificado pela BMU em 1 rato e a sua correlação com a histologia pode ser vista na Figura IV.11.

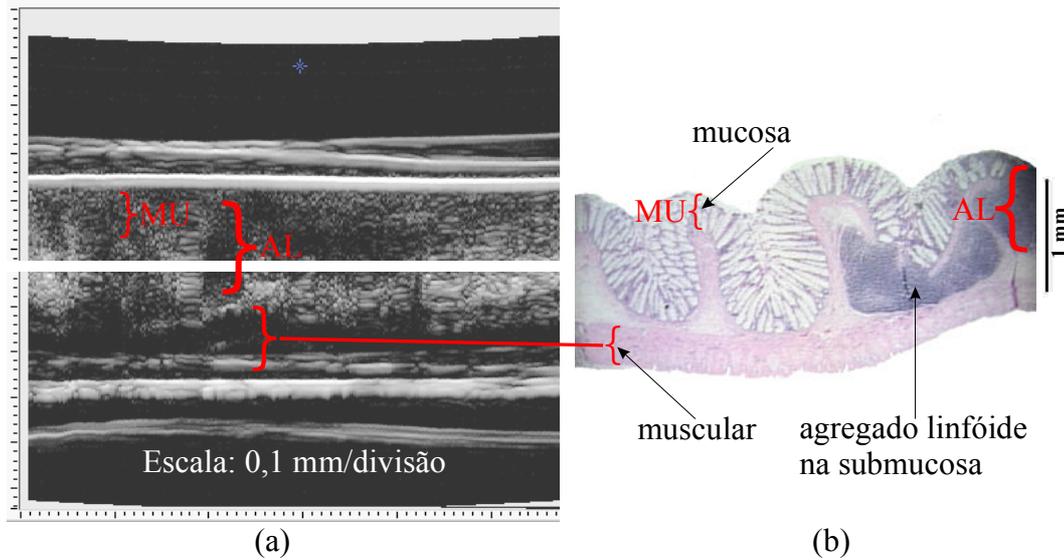


Figura IV.11- (a) Imagem de BMU do R5s. (b) Histologia com agregado linfóide na submucosa.

As úlceras menores que 1 cm puderam ser avaliadas em termos de acometimento em profundidade através da BMU, com delimitação das camadas histológicas envolvidas. As Figuras IV.12 e IV.13 são de cólon de rato com úlceras menores que 1 cm e mostram o acometimento em profundidade. Ambas as figuras mostram imagens de BMU com úlceras superficiais (restritas à mucosa), com preservação da muscular mucosa (segunda camada hipocogênica) e submucosa (terceira camada hiperecogênica). Há infiltrado inflamatório e espessamento da submucosa à histologia em ambos os casos. As faixas brancas nas partes superior e inferior da imagem de BMU correspondem à membrana de PVC e à superfície do disco de safira, respectivamente.

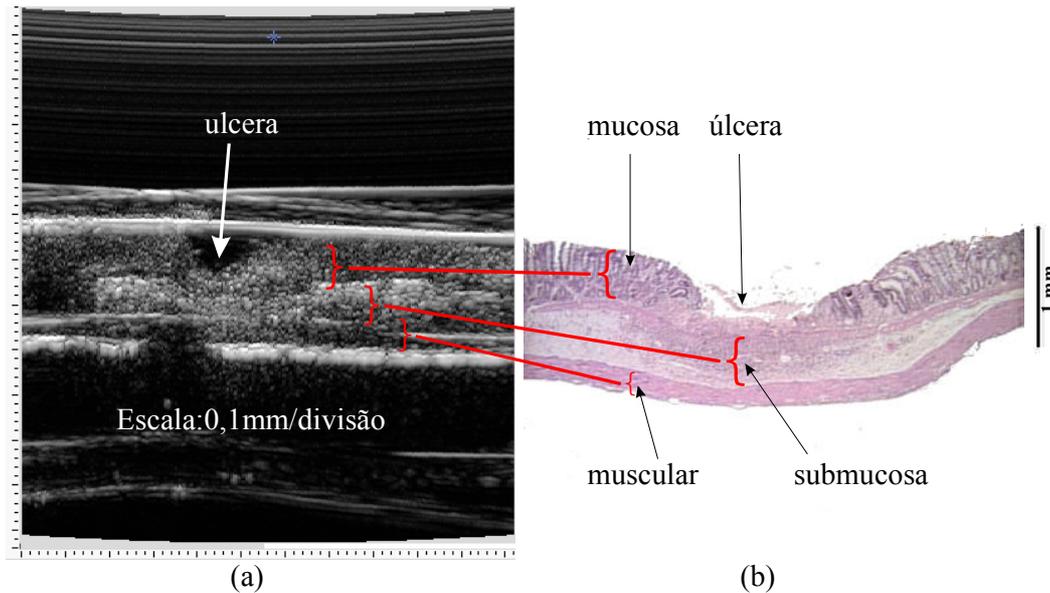


Figura IV.12- (a) Imagem de BMU do R14c. (b) Histologia.

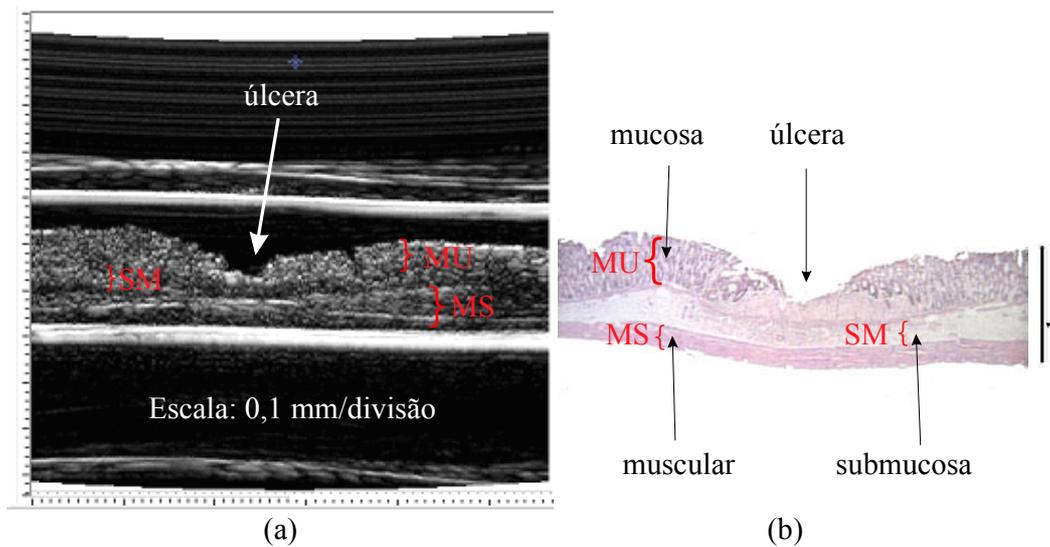


Figura IV.13- (a) Imagem de BMU do R16c. (b) Histologia.

As úlceras grandes tiveram como característica o acometimento transmural, levando geralmente ao espessamento da parede, intenso infiltrado inflamatório ao longo da parede e perda do pregueamento usual. As Figuras IV.14, IV. 15 e IV.16 são exemplos de imagens de BMU de úlceras grandes.

Na imagem de BMU da Figura IV.14 identifica-se a borda da úlcera do cólon do R11c. Nota-se transição do epitélio hiperplásico para úlcera, onde perde-se a distinção das camadas. A histologia mostra necrose de epitélio e submucosa, além de infiltrado

inflamatório intenso. Nas Figuras IV.15 e IV.16 não se vê transição ou borda, pois as imagens de BMU foram feitas no centro da úlcera. Há perda da estrutura de camadas nas imagens de BMU. A histologia do R9c (Figura IV.15) revela espessamento da submucosa, com fibrose e infiltrado inflamatório. Já no R6c (Figura IV.16), há necrose extensa da mucosa e da submucosa, além de espessamento da muscular.

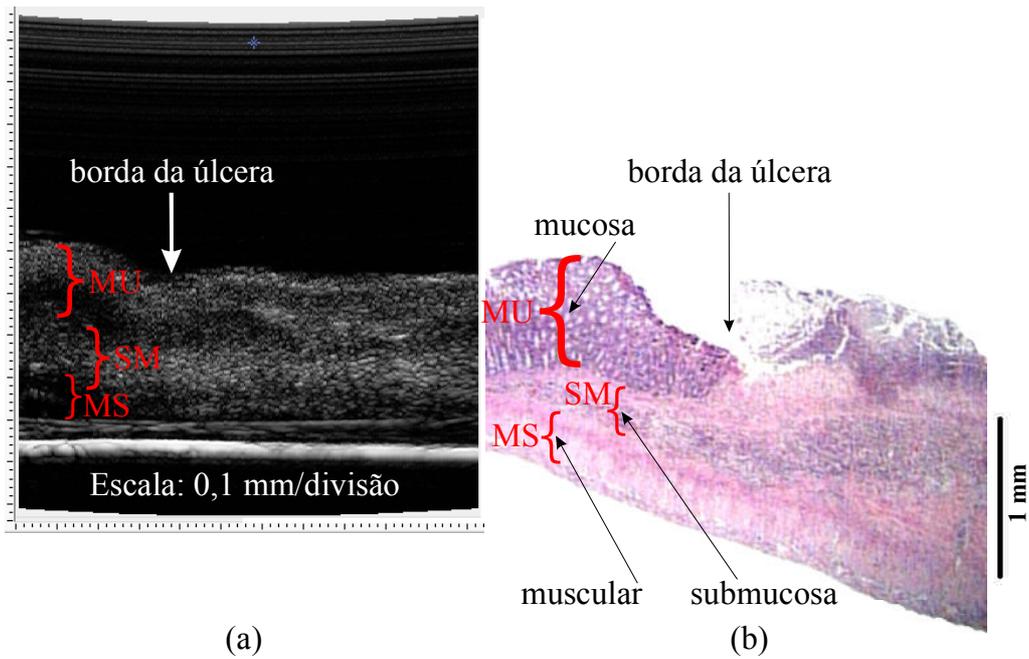


Figura IV.14- (a) Imagem de BMU do R11c. (b) Histologia.

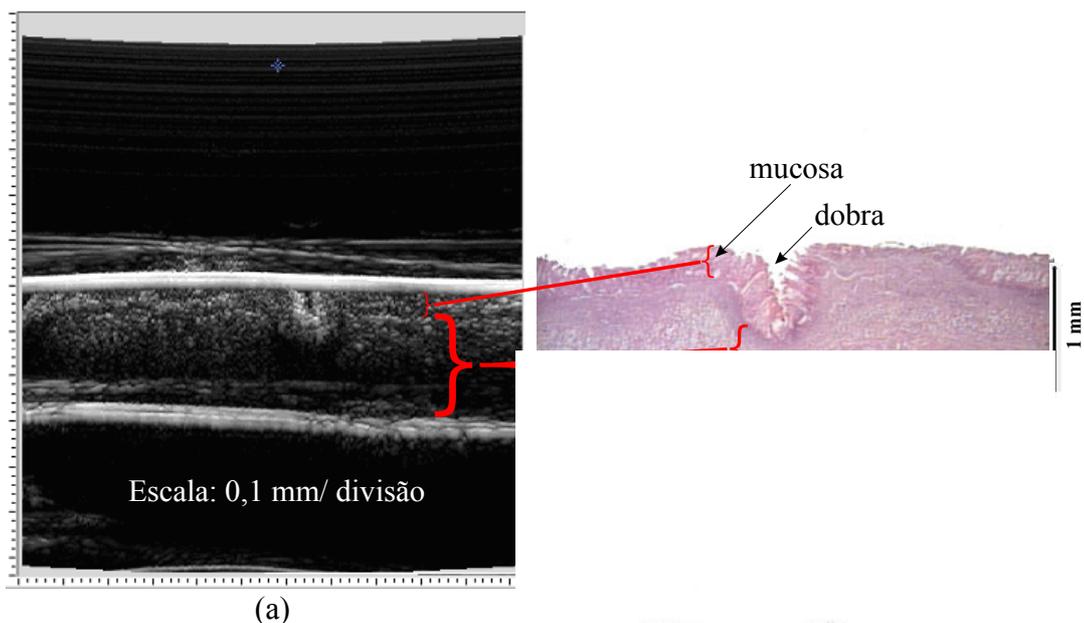


Figura IV.15- (a) Imagem de BMU do R9c

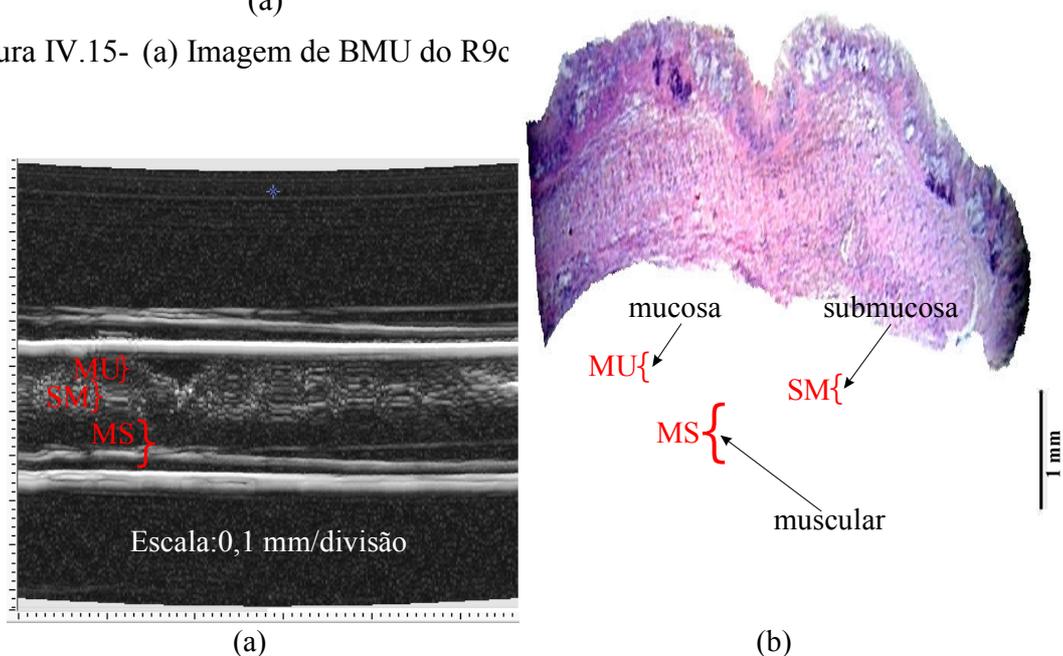


Figura IV.16- (a) Imagem de BMU do R6c. (b) Histologia.

IV.3- Coeficiente de retroespalhamento integrado ou IBC (*Integrated Backscatter Coefficient*)

As imagens de BMU e o perfil do IBC de quatro amostras de cólon dos ratos R5s, R6c, R14c e R16c são apresentados nas Figuras IV.17 a IV.25. Nestas imagens estão indicados o local da coleta de sinais de RF, a safira, a membrana de PVC e as camadas histológicas correlacionadas no IBC.

Nos gráficos observa-se a distinção entre as características do retroespalhamento para as diferentes camadas identificadas. A média e o dobro do erro padrão do IBC são plotadas em função da espessura da parede.

As histologias podem ser consultadas no item IV.2 em comparação da BMU com exame histopatológico.

Na Figura IV.17, a imagem de BMU apresenta um aumento da espessura da camada submucosa às custas do agregado linfóide. No gráfico do IBC (Figura IV.18) o segmento plotado corresponde às camadas mucosa, submucosa espessada, muscular própria e o artefato junto à safira. A localização e o tamanho de cada segmento foram determinados considerando as dimensões relativas de cada camada na imagem de BMU e na histologia.

As Figuras IV.19 e IV.20 correspondem à imagem de BMU e IBC do R6c. A imagem de BMU mostra mucosa com necrose, a submucosa de espessura normal e a muscular própria espessada. O gráfico do IBC mostra segmento correspondente à muscular própria espessada.

A imagem de BMU e o gráfico do IBC do R14c estão representadas nas Figuras IV.21 e IV.22. A coleta dos sinais para construção do IBC foi feita na adjacência da úlcera, onde está preservada a estrutura de camadas - indicado pela seta RF na imagem de BMU (Figura IV.21). O gráfico do IBC revela espessuras e padrão de retroespalhamento relativamente preservado e leve espessamento da submucosa (Figura IV.22).

A coleta de sinais para o R16c, da mesma forma que o caso anterior, foi feita nas adjacências da úlcera. Também se nota na imagem de BMU a preservação da estrutura de camadas no local da coleta dos sinais (Figura IV.23). O gráfico do IBC mostra espessamento da camada mucosa (Figura IV.24).

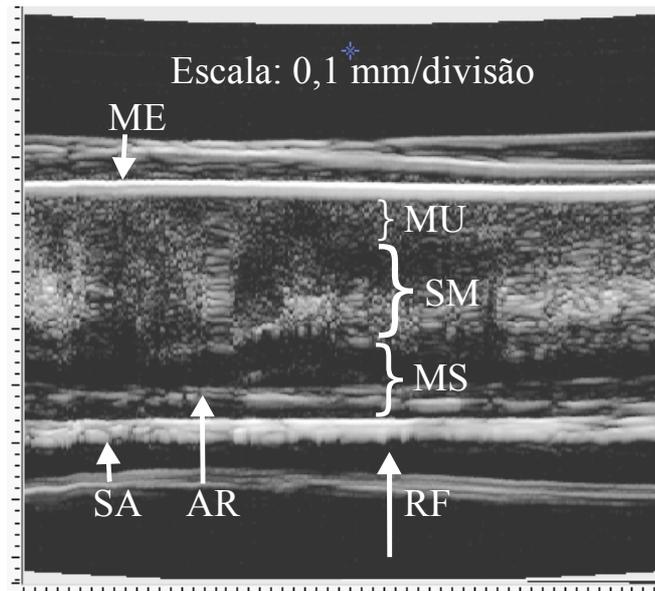


Figura IV.17- Imagem de BMU do R5s para coleta de sinais de RF e construção do IBC. MU-mucosa; SM-submucosa; MS-muscular; RF-indica a região de interesse para a coleta de sinais; SA- safira; ME-membrana; AR- artefato.

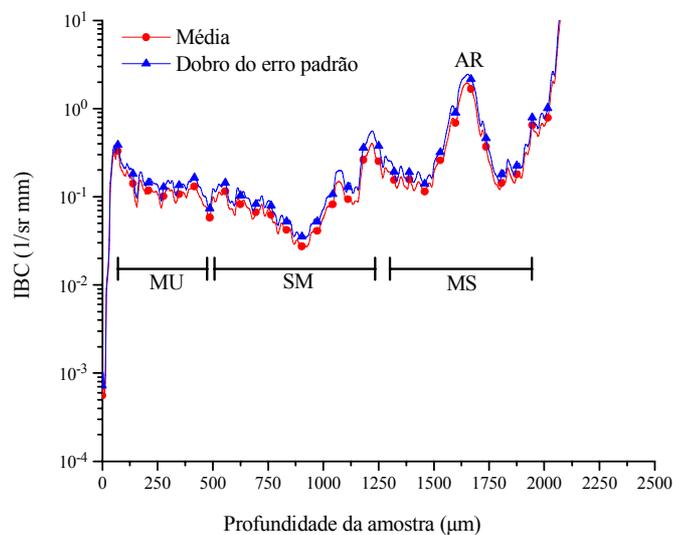


Figura IV.18- Gráfico do IBC do R5s. UM-mucosa; SM-submucosa; MS-muscular própria; AR-artefato.

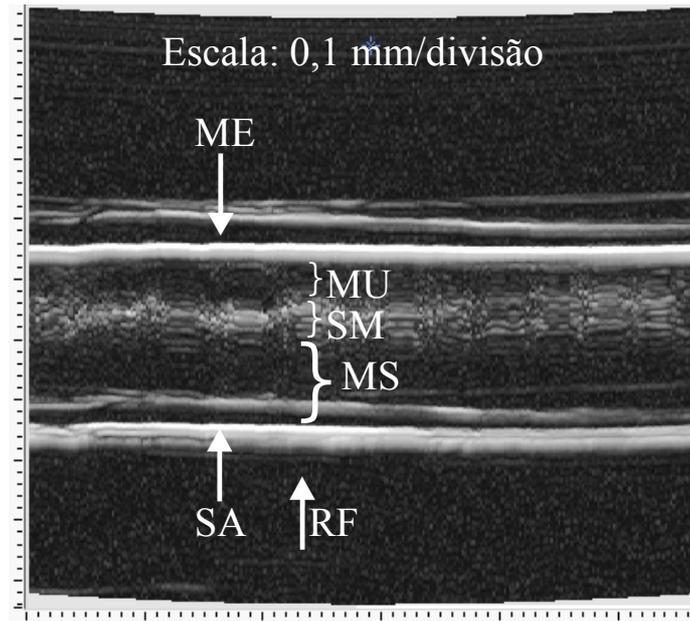


Figura IV.19- Imagem de BMU do R6c para coleta de sinais de RF e construção do IBC. MU-mucosa; SM-submucosa; MS-muscular; RF-indica a região de interesse para coleta de sinais; SA- safira; ME-membrana.

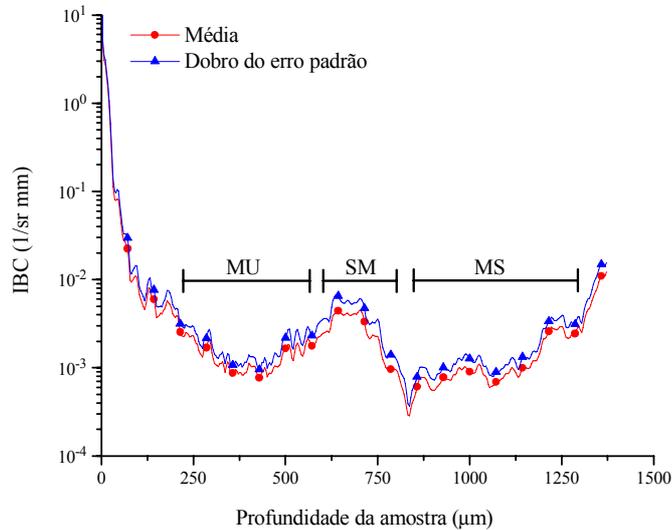


Figura IV.20- Gráfico do IBC do R6c. UM-mucosa; SM-submucosa; MS-muscular própria.

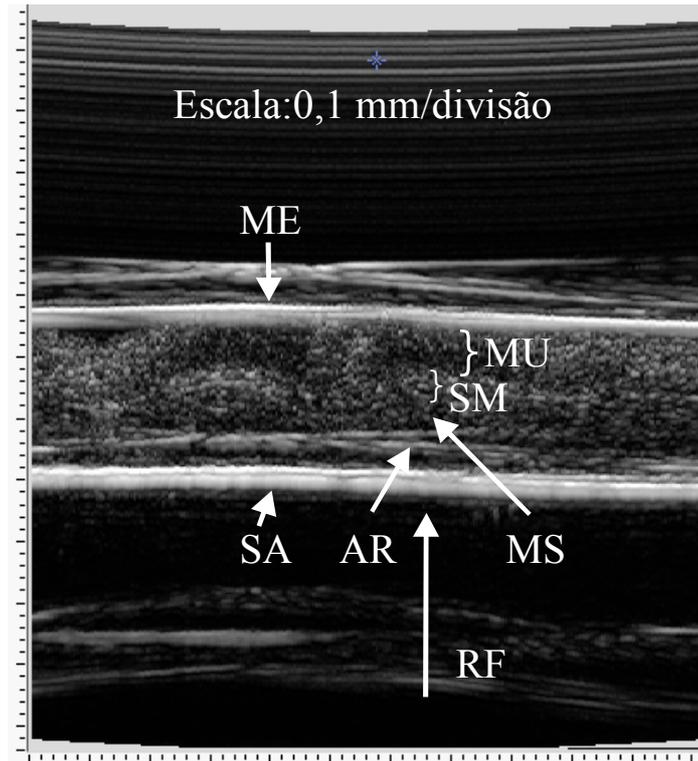


Figura IV.21- Imagem de BMU do R14c para coleta de sinais de RF e construção do IBC. MU-mucosa; SM-submucosa; MS-muscular; RF-indica a região de interesse para a coleta de sinais; SA- safira; ME-membrana; AR- artefato.

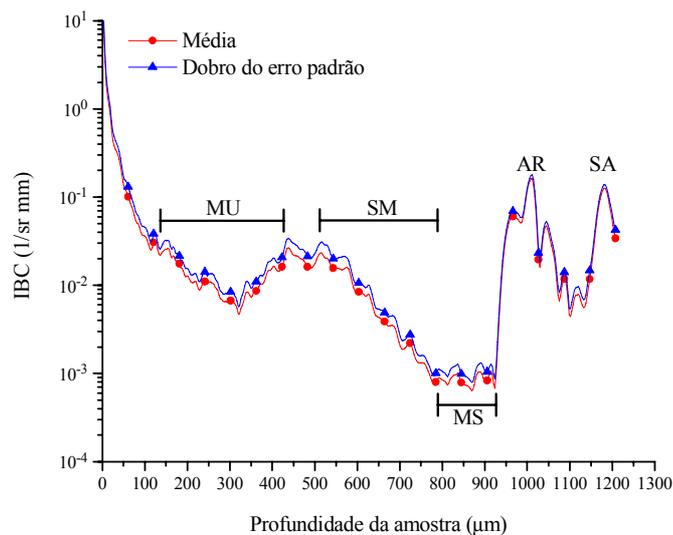


Figura IV.22- Gráfico do IBC do 14c. MU-mucosa; SM-submucosa; MS-muscular própria; AR-artefato; SA-safira.

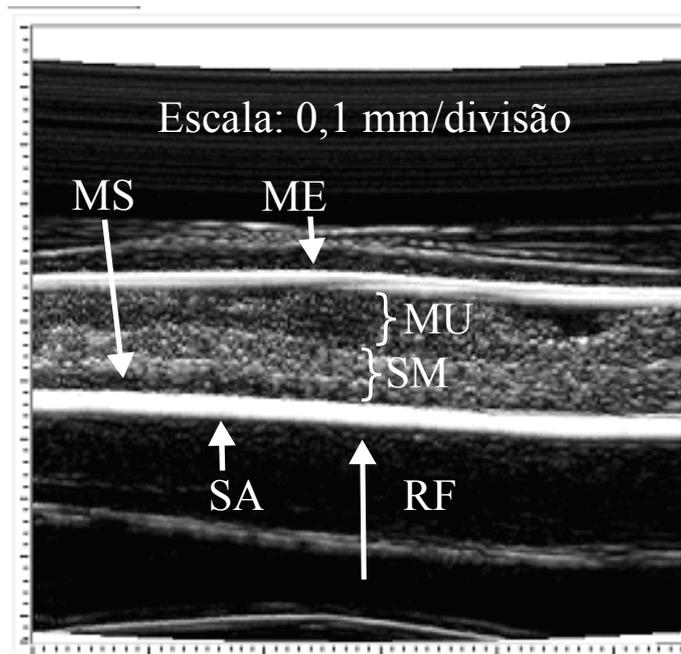


Figura IV.23- Imagem de BMU do R16c para coleta de sinais de RF e construção do IBC. MU-mucosa; SM-submucosa; MS-muscular; RF-indica indica a região de interesse para coleta de sinais; SA- safira; ME-membrana.

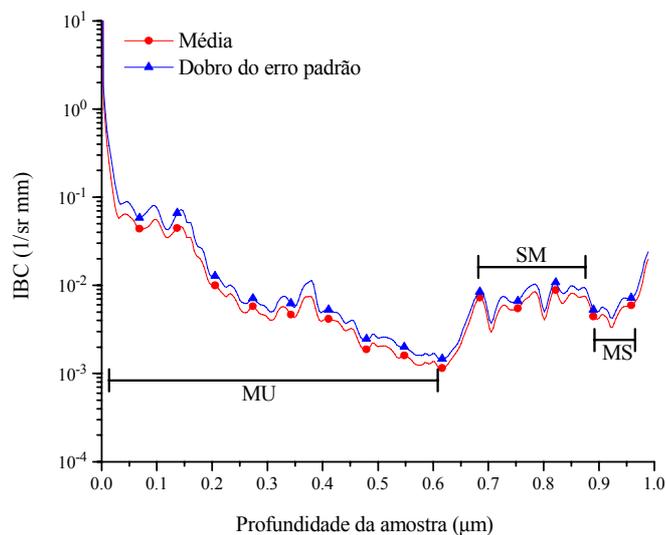


Figura IV.24- Gráfico do IBC do 16c. MU-mucosa; SM-submucosa; MS-muscular própria.

IV.4- Reconstrução em três dimensões de uma imagem de BMU

Uma imagem 3D de BMU correspondente ao rato R16c foi montada a partir da obtenção de 11 planos de imagem 2D de BMU espaçados de $100\ \mu\text{m}$ e varrendo a região da úlcera. As imagens correspondentes aos 11 planos estão agrupadas e apresentadas na Figura IV.25, onde se observa uma vista topográfica de uma úlcera de formato geográfico assinalada na cor laranja.

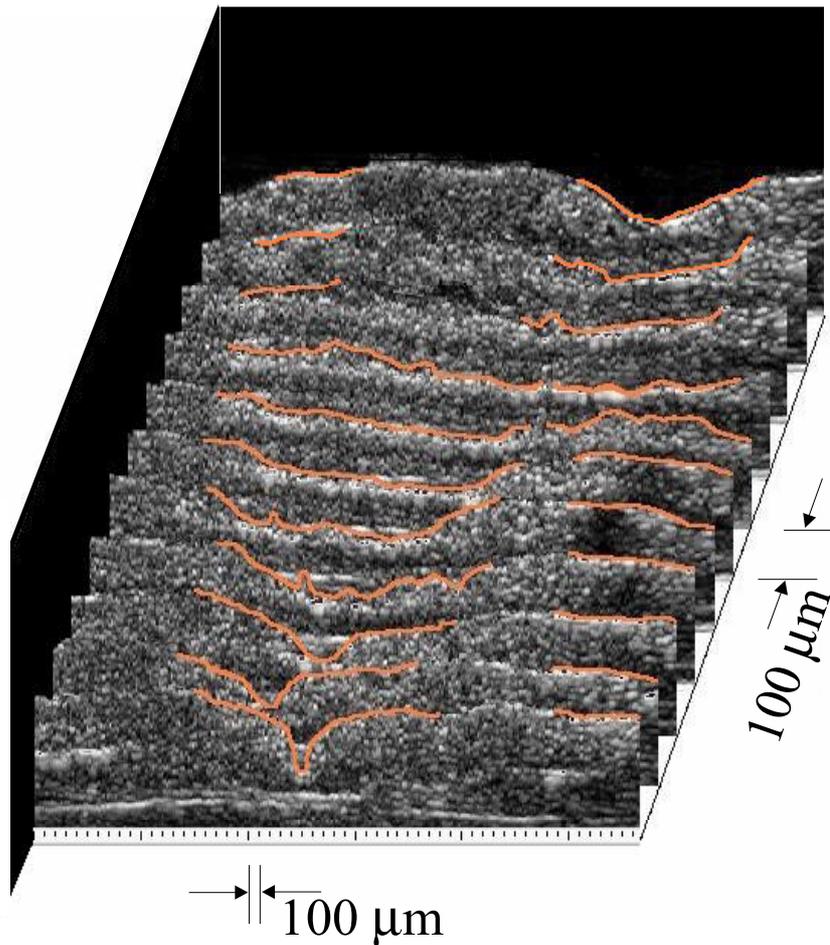


Figura IV.25- Reconstrução 3D da imagem de BMU obtida para o R16c, mostrando a imagem topográfica da úlcera assinalada em laranja.

CAPÍTULO V

Discussão

A proposta do presente trabalho foi a utilização da BMU como ferramenta diagnóstica em colite no modelo animal, simulando a Doença de Crohn. Neste caso, o modelo foi adequado em termos de espessura da parede para avaliação da doença desenvolvida (colite por TNBS), levando-se em conta a capacidade de resolução para o ultra-som de alta frequência (50 MHz).

Em uma fase que precedeu a aplicação da BMU ao modelo de colite, foi tentado um modelo de carcinogênese em esôfago. Do ponto de vista médico, havia um interesse maior nesse tipo de modelo de doença, uma vez que a técnica de BMU estaria no grupo de metodologias aplicáveis ao diagnóstico precoce de câncer devido à alta resolução das imagens produzidas. O modelo era cirúrgico (gastroenteroanastomose) e pressupunha que a exposição do esôfago ao conteúdo biliar da alça intestinal anastomosada no estômago proximal do rato aumentava o risco de desenvolvimento de esôfago de Barrett (EB), displasia e adenocarcinoma [72]. Seria administrado um carcinógeno para aumentar a taxa de desenvolvimento de displasia e câncer. Por problemas operacionais o carcinógeno não pôde ser administrado. Além disso houve uma grande mortalidade (em torno de 75%) dos ratos submetidos à gastroenteroanastomose. Entre os ratos sobreviventes acompanhados pelo tempo necessário ao desenvolvimento de EB não foi observado, por endoscopia, nenhum caso dessa doença.

O modelo de carcinogênese continua a ser pesquisado para cólon de rato, dado o interesse médico, sendo motivo de pesquisa de tese de doutorado, em andamento, que prevê o uso da BMU (Laboratório de US do Programa de Engenharia Biomédica-COPPE/ UFRJ).

Um problema relacionado à metodologia que ocorreu na primeira parte dos experimentos foi a autólise do tecido colocado em solução para coleta de sinais. A média para realização dos experimentos foi de 3 horas, o que levava à degradação por vezes visível do material. Este tempo prolongado deve-se, em parte, ao sistema de varredura do tipo *raster* ser manual. Por sugestão do patologista adicionou-se formaldeído sob a forma de gotejamento na superfície mucosa do fragmento antes que

ele fosse imerso em salina. Isso foi feito na segunda parte dos experimentos (n=16) com melhora consistente da qualidade do exame histopatológico. Considerou-se que, apesar da autólise na primeira parte dos casos (n=22), o exame histopatológico no menor aumento para comparação com a imagem de BMU foi satisfatório. Ainda, para avaliar o efeito causado pela adição de formol à superfície mucosa nos parâmetros quantitativos, foram comparadas as médias dos parâmetros acústicos medidos antes e depois da mudança da técnica, usando-se o teste *t* de Student. Como resultado, não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as médias. Estes resultados são consistentes com os da literatura [73] referentes a tecidos biológicos fixados com formaldeído.

Entre os parâmetros quantitativos relacionados à propagação do ultra-som no cólon, está a velocidade de propagação da onda. Ela foi praticamente a mesma para os grupos com e sem úlcera. Comparando com outros tecidos biológicos (fígado, baço e cérebro), foram encontrados valores semelhantes [53].

Do ponto de vista dos parâmetros quantitativos, a grande utilidade da BMU foi detectar o espessamento (medida da espessura da parede e IBC). O US com faixas de frequência menores (US transabdominal) é usado para medir a espessura da parede em humanos e isso é interpretado como medida da inflamação da parede [4]. Devido à limitação na profundidade de penetração, a BMU só fornece a informação sobre a espessura total da parede em animais cujo cólon tem espessura comparável à do rato, sendo neste caso, ferramenta de utilidade na avaliação da inflamação em trabalhos com modelo experimental de colite em pequenos roedores. Por outro lado, a informação sobre a espessura da parede do cólon do rato normal não pôde ser encontrada na literatura.

A semelhança entre os espessamentos nos grupos com e sem úlcera pode ser explicado pela proximidade dos recortes usados para as medições (junto à borda da úlcera e nela).

O espessamento individualizado das diversas camadas histológicas pôde ser avaliado em parte do material estudado. Os exemplos mostrados no Capítulo IV são bem ilustrativos e considera-se bastante razoável a correlação com a histologia. Apesar disso, foi difícil identificar os limites entre as camadas histológicas do cólon do rato, principalmente quando muito inflamado. Isso gerou também dificuldade em identificar

os limites entre as camadas nos gráficos do IBC. Uma explicação para este fato do ponto de vista da histologia é a similaridade entre os constituintes das camadas, de forma que a transição entre elas não fica bem demarcada pela presença de algum material que gere reflexões de US na interface entre as camadas. Em trabalhos publicados por Machado et al [55, 60], com artéria coronária, verifica-se o limite entre as camadas com maior facilidade, o que é atribuído à presença das lâminas elásticas interna e externa, limitando as camadas íntima, média e adventícia.

Um atributo do IBC é poder gerar informação sobre as medidas das diversas camadas, o que não foi feito no nosso trabalho de forma sistemática, mas que eventualmente poderia ser útil para caracterizar o processo inflamatório na parede do cólon.

Os resultados encontrados para os coeficientes de atenuação e retroespalhamento dos ratos com colite estão na mesma faixa que os encontrados para outros tecidos biológicos como a íris e a córnea e até mesmo o sangue [6].

Não houve diferença significativa para os coeficientes de retroespalhamento e atenuação, medidos em 50 MHz, entre os grupos com e sem úlcera. Os resultados são condizentes com o que se esperava encontrar, dada a proximidade dos recortes dos fragmentos de tecido com úlcera e sem úlcera, com inflamação intensa nas adjacências da úlcera vista na avaliação histológica.

A principal anormalidade estrutural estudada na parede do cólon do rato foi a úlcera. Na verdade, a existência das úlceras no exame endoscópico foi um viés de seleção já que ela foi pré-requisito ao diagnóstico da colite induzida pelo TNBS. Optou-se por este critério uma vez que anormalidades menores como enantema, friabilidade, mudança de brilho ou padrão vascular eram de difícil visualização no cólon com fezes.

As úlceras eram grandes em sua maioria (55%), o que é compatível com a descrição da colite experimental pelo TNBS [26], que geralmente resulta em lesões extensas e com necrose transmural, principalmente quando o modelo animal usado é o rato e não o camundongo.

A tendência para cura das lesões pôde ser constatada através do exame histopatológico, que em alguns casos ainda mostrava úlceras microscópicas (úlceras histológicas) ou em fase de epiteliação, que não podiam mais ser vistas a olho nu. Alterações relacionadas à cronicidade como fibrose quase não foram encontradas e isto

provavelmente deve-se ao fato do prazo para sacrifício após o clister de TNBS ter sido curto (de 1 semana).

As úlceras puderam ser identificadas pela BMU e o seu acometimento em profundidade em uma parte dos casos. O acometimento em profundidade das camadas histológicas é mais fácil nos casos das úlceras menores, acometendo as camadas superficiais. O acometimento transmural leva a uma indistinção destas camadas, o que deve estar relacionado ao fato de terem maior necrose e infiltrado inflamatório, com ruptura da estrutura das camadas histológicas.

Um fato interessante relacionado à identificação do acometimento em profundidade das úlceras é a curva de aprendizado. Houve uma grande diferença entre a avaliação da imagem feita nos experimentos iniciais em relação aos finais, com uma facilidade progressiva para identificar a camada histológica que limitava o fundo da úlcera. A importância do treinamento para qualquer técnica diagnóstica é conhecida, e em se tratando de ultra-som ela aumenta, por ser uma técnica altamente operador dependente.

Não foram encontrados granulomas nas amostras de tecido submetido ao modelo de colite. Elson et al [26] relacionam o desenvolvimento dos granulomas à administração do TNBS por via gástrica. Pereira et al [30] encontraram granulomas em metade do material estudado. Entre os achados histopatológicos descritos na presente casuística estão o pseudopólipo (2 ratos) e a fístula transmural (2 casos). Não foi encontrado relato destas lesões histológicas para o modelo de colite por TNBS. Apesar de serem interessantes do ponto de vista da correlação do modelo com a doença de Crohn, tais achados não puderam ser identificados pelo BMU. O achado histológico do agregado linfóide, presente em alguns dos nossos ratos, é descrito como normal [25]

CAPÍTULO VI

Conclusão

Com os resultados deste trabalho pode-se concluir que:

- Do ponto de vista qualitativo (imagem), a BMU é técnica aplicável ao estudo do cólon do rato. Foi capaz de identificar as úlceras provocadas pelo modelo de colite causado pelo TNBS. A BMU pôde também identificar o acometimento em profundidade nas camadas histológicas da parede do cólon gerado pelas úlceras.
- Do ponto de vista quantitativo, a BMU foi capaz de determinar a espessura da parede do cólon doente, não havendo diferença entre os grupos com e sem úlcera.
- O coeficiente de atenuação, medido em 50 MHz, foi semelhante entre os grupos de ratos com e sem úlcera.
- O coeficiente de retroespalhamento, medido em 50 MHz, foi igual nos grupos com e sem úlcera.

CAPÍTULO VII

Referências Bibliográficas

- [1]- SANDS, B.E., “Crohn’s Disease”. In: FELDMAN, FRIEDMAN, BRANDT (eds), *SLEISENGER AND FORDTRAN’S in Gastrointestinal and liver disease*, 8a edição, Capítulo 108, New York, 2006.
- [2]- VAN, ASSCHE, G, FERRANTE, M, VERMEIRE, S. et al, “The role and importance of endoscopic mucosal healing in Crohn’s disease”, *Techniques in Gastrointestinal Endoscopy*, v. 6, pp. 138-143, 2004.
- [3]- KOH, D.M., MIAO, Y., CHINN, R.J.S. et al, “MR evaluation of the activity of Crohn’s disease”, *American Journal of Roenterology* , v. 177, pp. 1325-1332, 2001.
- [4]- MACONI, G., RADICE, E., GRECO, S. et al, “Bowel ultrasound in Crohn’s disease”, *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, v. 20, n.1, pp. 93-112, 2006.
- [5]- CARVALHO, A.T., SOUZA, H., CARNEIRO, A.J. et al, “Therapeutic and prophylactic thalidomide in TNBS-induced colitis: Synergistic effects on TNF- α , IL-12 and VEGF production” *World Journal of Gastroenterology*, v.13, n 15, pp. 2166-2173, 2007.
- [6]- FOSTER, F.S., PAVLIN, C.J., HARASIEWICZ, K.A. et al, “Advances in Ultrasound Biomicroscopy”. *Ultrasound in Medicine & Biology*, v. 26, n.1. pp.1-37, 2000.
- [7]- MOURÃO, A.O., DAMIÃO C., SIPAHI, A.M., “Doença Inflamatória Intestinal”. In: *Gastroenterologia Castro e Coelho*, 1ª edição, pp. 1105, São Paulo, 2004.
- [8]- FIOCCHI, C., “Inflammatory bowel disease: Etiology and Pathogenesis”, *Gastroenterology*, v.115, pp. 182-205, 1998.
- [9]- HENDRICKSON, B. A., GOKHALE, R., CHO, J.H., “Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease”, *Clinical Microbiology Reviews*, v.15, n.1, pp. 79-94, 2002.

- [10]- DUCHMANN, P., MAY, E., HELKE, M. et al, "Tcell specificity and cross reactivity towards enterobacteria, Bacteroides, Bifidobacterium, and antigens from resident intestinal flora in humans", *Gut*, v. 44, pp. 812-818, 1999.
- [11]- OGURA, Y., BONEN, D.K., INOHARA, N. et al, "A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease", *Nature*, v 411, n. 31, pp. 603-606, 2001.
- [12]- ZHOU, Z., LIN, X., AKOLKAR, P.N. et al, "Variation at *NOD2/CARD15* in familial and sporadic cases of Crohn's disease in the Ashkenazi Jewish population", *The American Journal of Gastroenterology*, v. 97, n.12, pp. 3095-3101, 2002.
- [13]- CARPENTER, H.A., TALLEY, N.J., "The importance of clinicopathological correlation in the diagnosis of inflammatory conditions of the colon: histological patterns with clinical implications", *American Journal of Gastroenterology*, v. 95, n. 4, pp. 878-896, 2000.
- [14]- GEBOES, K., "Pathology of inflammatory bowel disease (IBD): variability with time and treatment", *Colorectal Disease*, v. 3, pp. 2-12, 2001.
- [15]- GASCHE, C, SCHOLMERICH, J., BRYNSKOV, J et al, "A simple classification of Crohn's disease: Report of the working party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1988". *Inflammatory Bowel Disease*, v. 6, pp. 8, 2000.
- [16]- SAIBENI, S., RONDONOTTI, E., IOZZELI, A. et al, "Imaging of the small bowel in Crohn's disease: A review of old and new techniques", *World Journal Gastroenterology*, v. 13, n.24, pp. 3279-3287, 2007.
- [17] NEGARD, A., PAULSEN, V, SANDVIK, L et al, "Prospective comparison of MRI enteroclysis with MRI using an oral contrast medium, in patients with suspected Crohn's disease of the terminal ileum.", *European Radiology Supplements* , v.16, supplement 3, c28, junho 2006.
- [18]- RISPO, A., IMBRIACO, M., CELENTANO, L et al, "Noninvasive diagnosis of small bowel Crohn's disease: combined use of bowel sonography and Tc-99m-HMPAO leukocyte scintigraphy" *Inflammatory Bowel Disease*, v. 11, n.4, pp.376-381, 2005.

- [19]- LEE, B-F., CHIU, N-T., WU, D-C. et al, “Use of ^{99m}Tc (V) DMSA scintigraphy in the detection and localization of intestinal inflammation: Comparison of findings at colonoscopy and biopsy”, *Radiology*, v. 220, pp. 381-385, 2001.
- [20]- ESRAILIAN, E., TARGOWNIK, L.E., SPIEGEL, B.M. et al, “Is endoscopic ultrasound (EUS) appropriate for the diagnosis of perianal fistula in Crohn’s disease (CD)? A survey of North American inflammatory bowel disease (IBD) experts”. *Gastrointestinal Endoscopy*, v. 61, n. 5, AB275, 2005.
- [21]- MARDINI, H.E., NICKL, N.J., GRIGORIAN, A et al, “Rectal endoscopic ultrasound in the management of rectal and perianal complaints of Crohn’s disease patients”, *Gastrointestinal Endoscopy*, v. 65, n. 5, AB119, 2007.
- [22]- GAST, P., BELAÏCHE, J. “Rectal endosonography in inflammatory bowel disease: differential diagnosis and prediction of remission”, *Endoscopy*, v. 31, n. 2, pp. 158-167, 1999.
- [23]- BEST, W.R., BECKTEL, JM, SINGLETON, J.W. et al, “Development of a Crohn’s disease activity index. National Cooperative Crohn’s Disease Study”. *Gastroenterology*, v. 70, pp. 439, 1976.
- [24]- KAMM, M.A., “Review article: biological drugs in Crohn’s disease”, *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, v. 24, suppl.3, pp. 80-89, 2006.
- [25]- ALLEGRINI P.R., “Imaging”. In KRINK, G.J. (ed), *The Laboratory Rat*, 1a edição, Capítulo 14, New York, EUA, Academic Press, 2000.
- [26]- ELSON, C.O., SARTOR, R.B., TENNYSON, G.S. et al, “Experimental models of inflammatory bowel disease”, *Gastroenterology*, v.109, pp. 1344-1367, 1995.
- [27]- WANG, J.G., WANG, D.F., LY, B.J. et al, “A novel mouse model for colitis-associated colon carcinogenesis induced by 1.2-dimethylhydrazine and dextran sulfate sodium”, *World Journal of Gastroenterology*, v.10, n. 20, pp. 2958-2962, 2004.
- [28]- STROBER, W., LUDVIKSSON, B.R., FUSS, I.J., “The pathogenesis of mucosal inflammation in murine models of inflammatory bowel disease and Crohn’s disease”, *Annals of Internal Medicine*, v. 128, n 10, pp. 848-856, 1998.
- [29]- SHEN, C., HERTOUGH, G, BULLENS, DM et al, “Remission-inducing effect of anti-TNF monoclonal antibody in TNBS colitis: mechanisms beyond neutralization?”, *Inflammatory Bowel Disease* , v.13, n. 3, pp. 308-16, 2007.

- [30]- PEREIRA, M.M.G., “Análise das alterações histológicas e da celularidade da lâmina própria intestinal, em modelo experimental de colite, antes e após o tratamento com talidomida”, M. Sc., Faculdade de Medicina da UFRJ, Rio de Janeiro, 2006.
- [31]- ISI Web of Science, URL: <http://portal.isiknowledge.com/analyze/ra.cgi>
Acessado em [04/11/2007].
- [32]- HE, M., FRIEDMA, D.S., GE, J. et al, “Laser peripheral iridotomy in eyes with narrow drainage angles: ultrasound biomicroscopy outcomes. The Liwan eye study”, *Ophthalmology*, v.114, n. 8, pp. 1513-1519, 2007.
- [33]- GICQUEL, J-J, GUIGOU, S., BEJJANI, R.A. et al, “Ultrasound biomicroscopy study of the Verisyse aphakic intraocular lens combined with penetrating keratoplasty in pseudophakic bullous keratopathy”, *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, v. 33, pp. 455-464, 2007.
- [34]- SOHAJDA, Z., HOLLÓ, D., BERTA, et al, “Microcornea associated with myopia”, *Graefe’s Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, v. 244, pp. 1211-1213, 2006.
- [35]- WEISBROD, D.J., PAVLIN, C. J., EMARA, K. et al, “Small ciliary body tumors: ultrasound biomicroscopic assessment and follow-up of 42 patients”, *American Journal of Ophthalmology*, v. 141, pp.622-628, 2006.
- [36]- RAJU, B.I., SWINDELLS, K.J., GONZALEZ, S. et al, “Quantitative ultrasonic methods for characterization of skin lesions in vivo”, *Ultrasound in Medicine & Biology*, v. 29, n. 6, pp. 825-838, 2003.
- [37]- BESSONART, M.N., MACEDO, N., CARMONA, C., “High resolution b-scan ultrasound of hipertrophic scars”, *Skin Research and Technology*, v. 11, pp. 185-188, 2005.
- [38]- BESSOUD, B., LASSAU, N., KOSCIELLNY, S. et al, “High-frequency sonography and color Doppler in the management of pigmented skin lesions”, *Ultrasound in Medicine & Biology*, v. 29, n.6, pp. 875-879, 2003.
- [39]- OSIKA, W., DANGARDT, F., GRONROS, J. et al, “Increasing peripheral artery intima thickness from childhood to seniority”, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 27, pp. 671-676, 2007.

- [40]- GAN, L-M, GRONROS, J., HAGG, U. et al, “Non-invasive real-time imaging of atherosclerosis in mice using ultrasound biomicroscopy”, *Atherosclerosis*, v. 190, pp. 313-320, 2007.
- [41]- FRITSCHÉ-DANIELSON, R., WAGBERG, M., GAN, L-M. et al, “5-lipoxygenase inhibition slows progression of atherosclerotic lesions in the aorta of ldlr-/- mice as assessed by in vivo ultrasound biomicroscopy”. XIV International Symposium on Atherosclerosis, Rome, Italy, June 18-22, 2006.
- [42]- GOLDBERG, B.B., BAGLEY, D., LIU, J-B et al, “Endoluminal sonography of the urinary tract: preliminary observations”, *American Journal of Roenterology*, v.156, pp. 99-106, 1991.
- [43]- GOLDBERG, B.B., STEINER, R.M., LIU, J-B et al, “US-assisted bronchoscopy with use of miniature transducer-containing catheters”, *Radiology*, v. 190, pp. 233-237, 1994.
- [44]- MATSUMOTO, T., HISAWA, K., ESAKI, M. et al, “Comparison of EUS and magnifying colonoscopy for assessment of small colorectal cancers”, *Gastrointestinal Endoscopy*”, v 56, pp. 354-360, 2002.
- [45]- ARISTIZÁBAL, O., KETTERLING, J.A., TURNBULL, D.H., “40-MHz annular array imaging of mouse embryos”. *Ultrasound in Medicine & Biology*, v. 32, n.11, pp. 1631-1637, 2006.
- [46]- MU, J., ADAMSON, S.L., “Developmental changes in hemodynamics of uterine artery, utero- and umbilicoplacental, and viteline circulations in mouse throughout gestation”, *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 291, pp. H1421-H1428, 2006.
- [47]- McVEIGH, E.R., “Emerging Imaging Techniques” *Circulation Research*, v. 98, pp. 879-886, 2006.
- [48]- ZHOU, Y-Q., BISHAY, R., FEINTUCH, A. et al, “Morphological and functional evaluation of murine heterotopic cardiac grafts using ultrasound biomicroscopy”, *Ultrasound in Medicine & Biology*, v. 33, n.6, pp. 870-879, 2007.
- [49]- WIRTZFELD, L.A., WU, G., BYGRAVE, M. et al, “A new three-dimensional ultrasound microimaging technology for preclinical studies using a transgenic prostate cancer mouse model”, *Cancer Research*, v. 65, n.14. pp. 6337-45, 2005.

- [50]- FISH, P., “Propagation in tissue”. In: *Physics and Instrumentation of Diagnostical Medical Ultrasound*, 1a edição, Capítulo 3, Londres, John Wiley & Sons Ltda., 1992
- [51]- FOSTER, F.S., PAVLIN, C.J., LOCKWOOD, G.R. et al, “Principals and Applications of Ultrasound Backscatter Microscopy”. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*, v. 40, n.5, pp 608-616, 1993.
- [52]- NICHOLAS, D., HILL, C.R, NASSIRI, D.K., “Evaluation of Backscattering Coefficients for excised human tissues: principals and techniques” *Ultrasound in Medicine & Biology*, v. 8, n.1, pp. 7-15, 1982.
- [53]- BAMBER, J.C., “Ultrasonic properties of tissues”, In: DUCK, F.A., BAKER A.C., STARRITT H.C. (eds), *Ultrasound in Medicine*, 1^a ed, capítulo 4, Londres, 1998.
- [54]- BRIDAL, S.L., FORNES, P., BRUNEVALL, P. et al, “Parametric (integrated backscatter and attenuation) images constructed using backscatter radio frequency signals (25-56 MHz) from human aortae in vitro”, *Ultrasound in Medicine & Biology*, v. 23, n. 2, pp. 215-229, 1997.
- [55]- MACHADO, J.C., FOSTER, F.S., GOTTLIEB A.I., “Measurements of the ultrasonic properties of human coronary arteries in vitro with a 50-MHz acoustic microscope”, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 35, pp. 895-903, 2002.
- [56]- DENT, C.L., SCOTT, M.J., WICKLINE, A. et al, “High-frequency ultrasound for quantitative characterization of myocardial edema”, *Ultrasound in Medicine & Biology*, v. 26, n. 3, pp. 375-384, 2000.
- [57]- HUISMAN, H.J., THIJSEN, J.M., WAGENER, D.J. et al, “Quantitative ultrasonic analysis of liver metastases”, *Ultrasound in Medicine & Biology*, v. 24, n.1, pp. 67-77, 1998.
- [58]- RAJU, B.I. AND SRINIVASAN M.A, “High-frequency ultrasound attenuation and backscatter coefficients of in vivo normal human dermis and subcutaneous fat”, *Ultrasound in Medicine & Biology*, v. 27, n.11, pp. 1543-1556, 2001.
- [59]- GUITTET, C., OSSANT, F., REMENIERAS, J. et al, “High-frequency estimation of the ultrasonic attenuation coefficient slope obtained in human skin: simulation

and in vivo results”. *Ultrasound in Medicine & Biology*, v.25, n.3, pp. 421-429, 1999.

- [60]- MACHADO, J.C., FOSTER F.S., “Ultrasonic integrated backscatter coefficient profiling of human coronary arteries in vitro”. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, v.48, n.1, pp. 17-27, 2001.
- [61]- MADARAS et al, “Changes in myocardial backscatter throughout the cardiac cycle”, *Ultrasonic Imaging*, v. 5, pp. 229-239, 1983.
- [62]- THOMAS L.J. et al, “A real-time integrated backscatter measurement system for quantitative cardiac tissue characterization” *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, v. 33, n.1, pp. 27-32, 1986.
- [63]- NAITO, J. et al, “Myocardial integrated ultrasonic backscatter in patients with old myocardial infarction: comparison with radionuclide evaluation”, *American Heart Journal*, v.132, pp. 54-60, 1995.
- [64]- NAITO, J. et al, “Analysis of transmural trend of myocardial integrated ultrasonic backscatter in patients with old myocardial infarction”, *Ultrasound in Medicine & Biology*, v. 22, n.7, pp. 807-814, 1996.
- [65]- NAITO, J. et al: Influence of preload, afterload and contractility on myocardial ultrasonic tissue characterization with integrated backscatter, *Ultrasound in Medicine & Biology*, 22(3), pp. :305-312, 1996.
- [66]- PETRELLA, L.I., “*Montagem de um sistema para geração de imagens por biomicroscopia Ultra-Sônica*”, M Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.
- [67]- YE, S.G., HARASIEWICZ, K. A., PAVLIN, C.J. et al, “Ultrasound characterization of normal ocular tissue in the frequency range from 50 MHz to 100 MHz”, *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, v. 42, n.1, pp. 8-14,1995.
- [68]- D’ASTOUS, F.T., FOSTER, F.S., “Frequency dependence of ultrasound attenuation and backscatter in breast tissue”, *Ultrasound in Medicine and Biology*, v.11, pp. 795-808, 1986.
- [69]- CHEN, X., PHILLIPS, D., SCHWARS, K.Q. et al, “The measurement of backscatter coefficient from a broadband pulse-echo system. A new formulation”.

IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control, v. 44, n.2, pp. 515-525, 1997.

- [70]- MACHADO, J.C., FOSTER, F.S., “Validation of theoretical diffraction correction functions for strongly focused high frequency ultrasonic transducers, *Ultrasonic Imaging*, v. 21, pp. 95-106,1999.
- [71] JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO J., “Métodos de estudos”. In: *Histologia Básica*, 5^a ed, capítulo 1, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1982.
- [72] MELO L.L., KRUEL C.D.P., KLIEMANN L.M. et al, “Influence of Surgically induced gastric and duodenal content reflux on esophageal carcinogenesis – experimental model in Winstar female rats”, *Disesases of Esophagus*, v.12, pp. 106-115, 1999.
- [73] SASAKI, H., SAIJO, Y., TANAKA, M., et al, “Influence of tissue preparation on the high-frequency acoustic properties of normal kidney tissue”, *Ultrasound in Medicine and Biology*, v.22, n.9, pp. 1261-1265, 1996.

ANEXO I

Gráficos com resultados dos coeficientes de atenuação e retroespalhamento

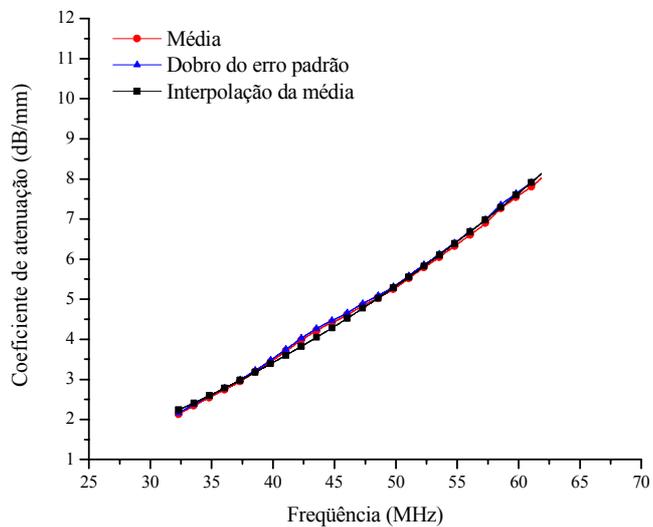


Figura 1- Comportamento do coeficiente de atenuação em função da frequência para o R9c.

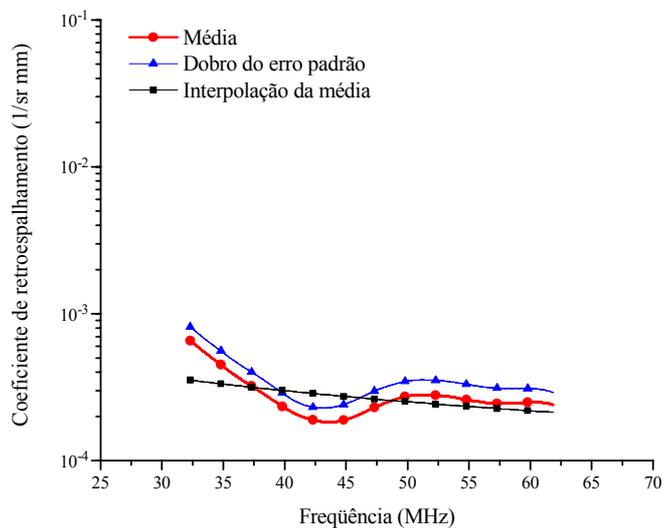


Figura .2- Comportamento do coeficiente de retroespalhamento em função da frequência para o R9c.

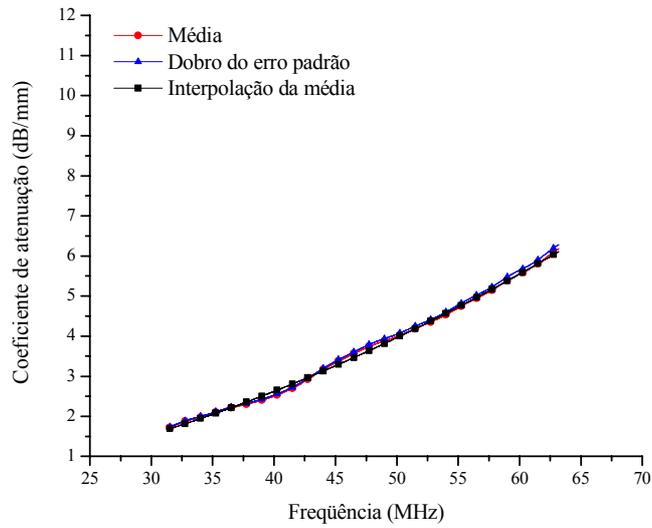


Figura .3- Comportamento do coeficiente de atenuação em função da frequência para o R10s.

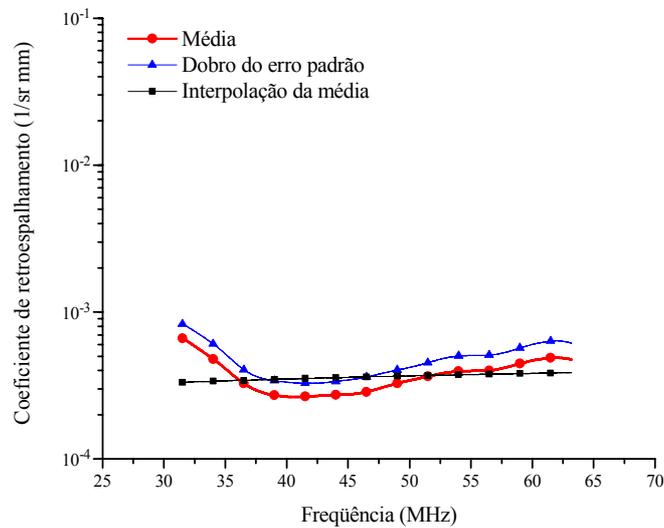


Figura .4- Comportamento do coeficiente de retroespalhamento em função da frequência para o R10s.

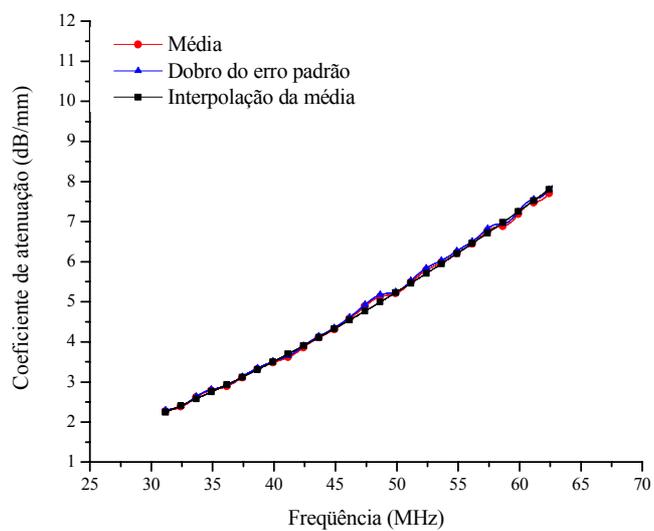


Figura .5- Comportamento do coeficiente de atenuação em função da frequência para o R11c.

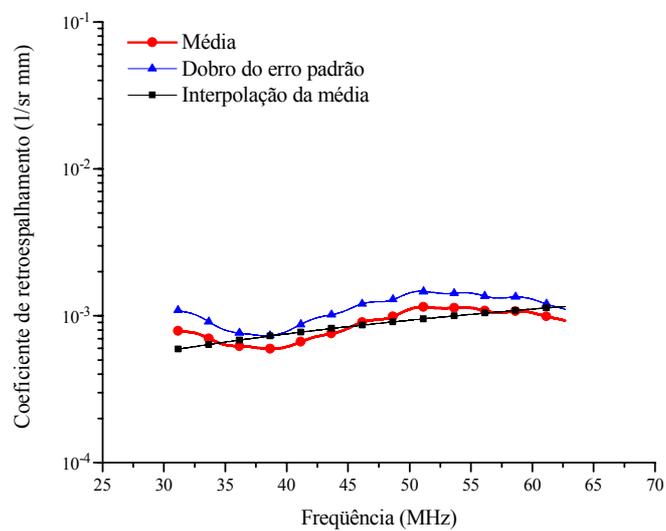


Figura .6- Comportamento do coeficiente de retroespalhamento em função da frequência para o R11c.

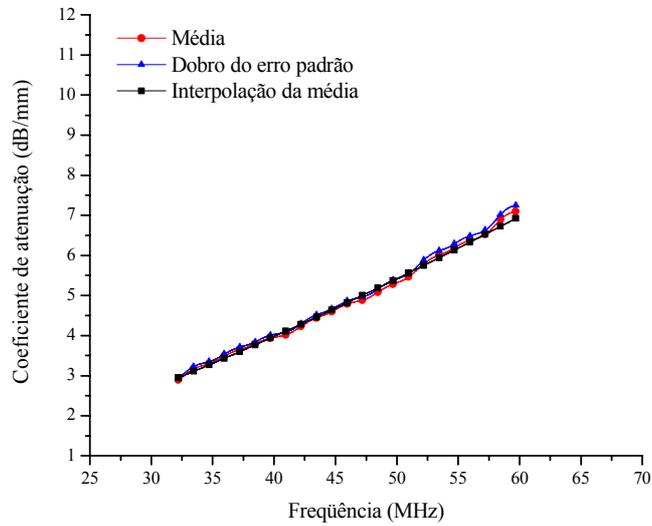


Figura .7- Comportamento do coeficiente de atenuação em função da frequência para o R14c.

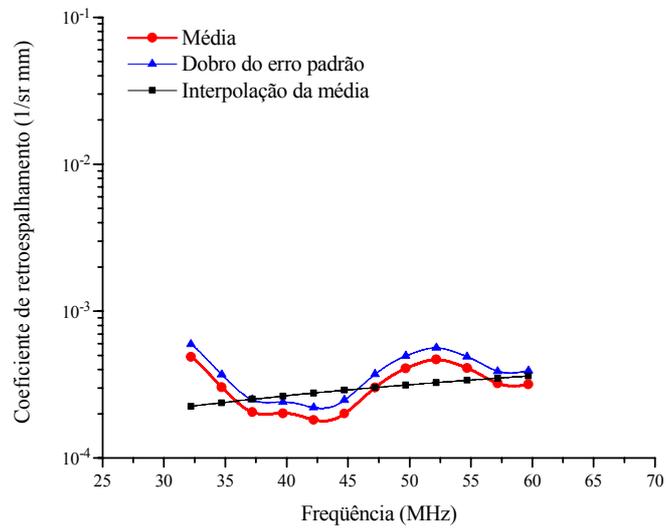


Figura .8- Comportamento do coeficiente de retroespalhamento em função da frequência para o R14c.

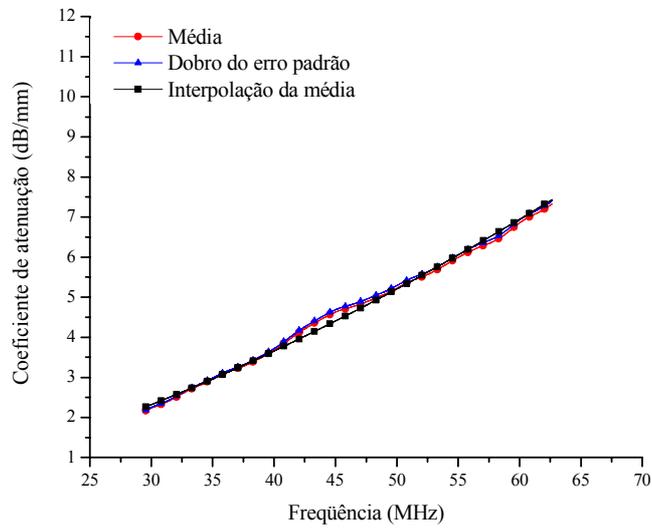


Figura .9- Comportamento do coeficiente de atenuação em função da frequência para o R16c.

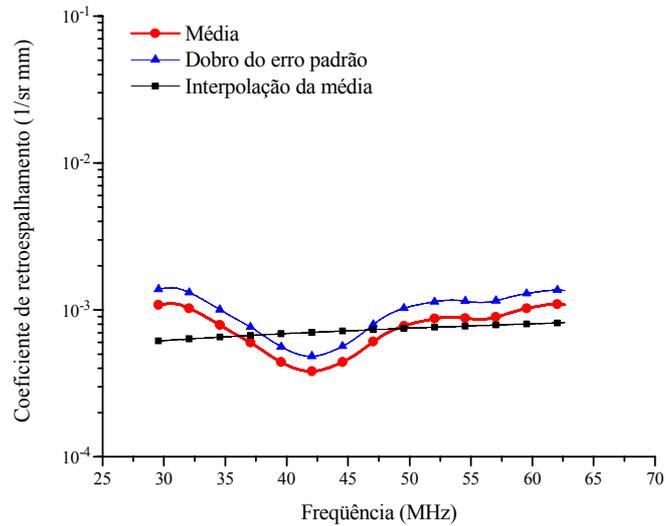


Figura .10- Comportamento do coeficiente de retroespalhamento em função da frequência para o R16c.

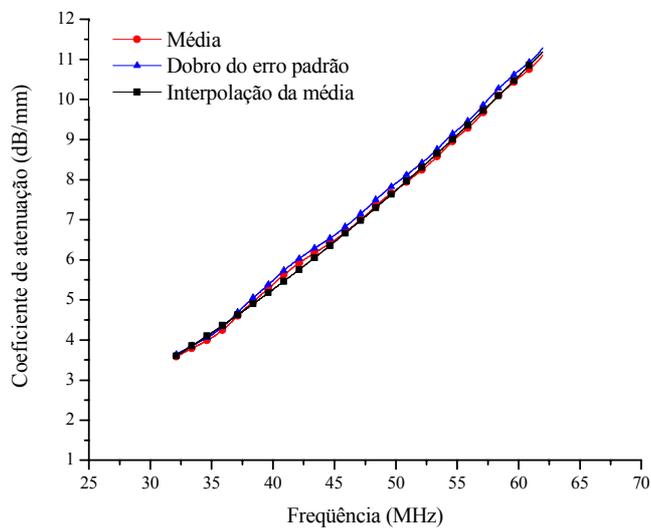


Figura .11- Comportamento do coeficiente de atenuação em função da frequência para o R19s.

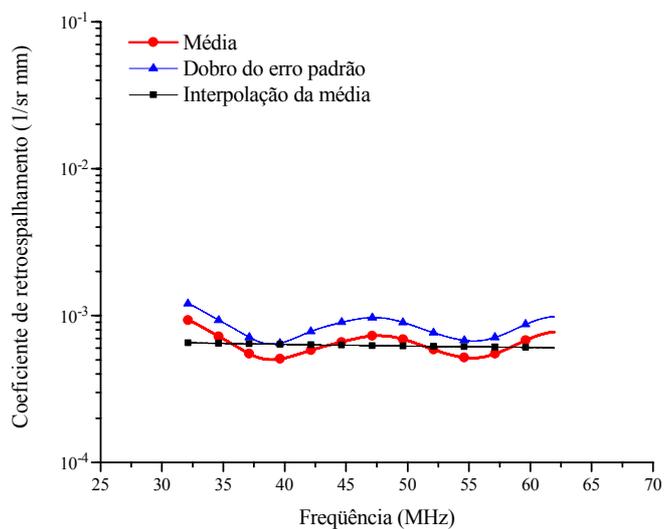


Figura .12- Comportamento do coeficiente de retroespalhamento em função da frequência para o R19s.

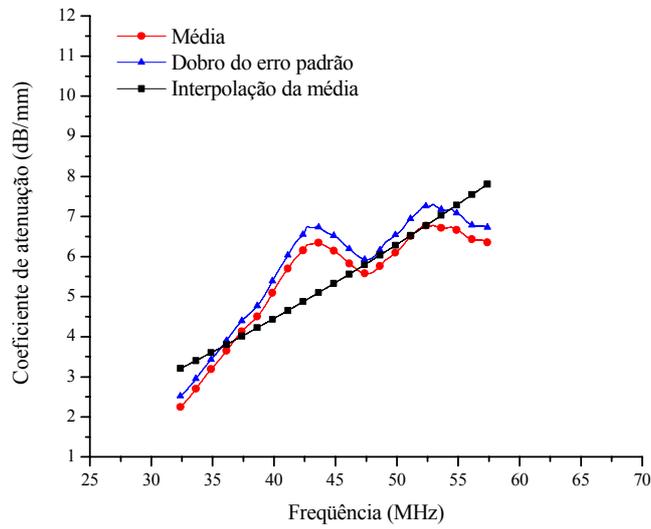


Figura .13- Comportamento do coeficiente de atenuação em função da frequência para o R04s.

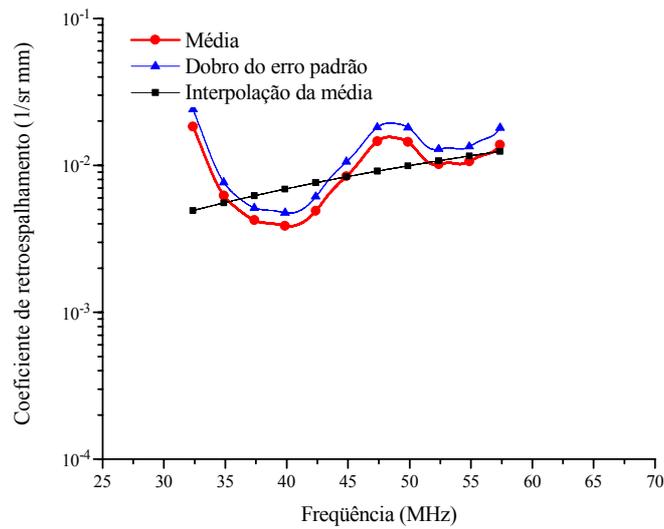


Figura .14- Comportamento do coeficiente de retroespalhamento em função da frequência para o R04s.