



BIOMICROSCOPIA ULTRASSÔNICA NA DETECÇÃO DE LESÕES
EM CÓLON DE CAMUNDONGOS

Kelly Zolli Alves

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

Orientador: João Carlos Machado

Rio de Janeiro
Outubro de 2011

BIOMICROSCOPIA ULTRASSÔNICA NA DETECÇÃO DE LESÕES EM CÍLON
DE CAMUNDONGOS

Kelly Zolli Alves

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

Examinada por:

Prof. Dr. João Carlos Machado, Ph.D.

Prof. Dr. Marcio Nogueira de Souza, D.Sc.

Prof. Dr. Marco Antônio von Krüger, Ph.D.

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

Profa. Dra. Edna Frasson de Souza Montero, Ph.D.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

OUTUBRO DE 2011

Alves, Kelly Zolli

Biomicroscopia ultrassônica na detecção de lesões em cólon de camundongos / Kelly Zolli Alves. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2011.

XVIII, 54 p.: il.; 29,7 cm.

Orientador: João Carlos Machado

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

Referências Bibliográficas: p. 47-52.

1. Biomicroscopia Ultrassônica. 2. Colonoscopia. 3. Modelo Animal. 4. Cólon. 5. Camundongo. 6. Câncer de cólon e reto. I. João Carlos Machado. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Biomédica. III. Título.

Á minha família e meu amor Thiago, pelo apoio em todos os momentos.

"They did not know it was impossible, so they did it!"

Mark Twain

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu grande Pai do céu agradeço por ter arquitetado espantosamente o plano da minha vida, a Ele toda honra.

Aos meus Pais, Alcimar e Elizabete, agradeço pela confiança em mim depositada, por todo esforço e ajuda para que mais este projeto fosse possível e real, com certeza vocês são parte fundamental na minha formação e educação. Também por ter aceitado minha ausência e distância além de suportar meu choro, raro mas real ao telefone.

Ao meu marido Thiago, por tanto zelo, compreensão, superação, sem falar no estímulo, auxílio, ajuda, amor e por ter realizado todas as tarefas domésticas que acabaram sobrando para ele e por ter entendido meus momentos de ausência.

Ao meu irmão querido Guilherme, meu orgulho por me tornar referência em sua vida acadêmica, obrigada por acreditar em mim desta forma.

Ao meu orientador João Carlos Machado pelo apoio e orientação sem os quais este trabalho de maneira nenhuma seria concluído, também pela credibilidade e paciência a mim dedicadas. E agradeço acima de tudo, por ter compreendido meu modo, muitas vezes atropelado, de conduzir este trabalho, devido às circunstâncias da minha vida.

A todos colaboradores deste trabalho, Prof^a. Helena Borges, Dr. Carlos Alberto Schneider, e Dyanna Galaxe, pelo apoio técnico e orientações. Aos queridos Professores do LUS (Laboratório de Ultrassom), Wagner e Marcão, por tanto apoio e incontáveis cafés (mais produtivos que podemos imaginar), pelas ideias, apoio emocional e, principalmente, por ter me ajudado a ter mais tranquilidade nos dias difíceis.

A amiga Mônica e ao Marcelo, por tanta ajuda com as colonoscopias e pela amizade que cultivamos neste período.

A Rossana, que ajudou imensamente na parte experimental e sempre com uma ideia criativa para parte escrita que sempre salvava meu dia!

Aos amigos do LUS que fazem parte de muitas etapas em minha vida: sem vocês certamente não seria tão divertido! Não poderia deixar de destacar alguns: Isabela: sempre me estimulando com o “processa Kelly Key”!; Lorena, sempre tão solícita e companheira; sem falar nas brincadeiras do Maggi, Rodrigo, Daniel e Christiano com suas colocações hilárias; A Rejane, Carolina e Thais de todas as festas e “ovocultos”.

Ao Franciso, pela companhia e ajuda, principalmente com as referências da Tese.

A Telma que chegou quase na conclusão, mas fez uma enorme diferença no finalzinho deste trabalho.

Não posso esquecer-me dos amigos que torcem de longe como a Luciana, meus tios e tias, nem daqueles de não muito longe, como Luis e Lúcia, sempre apoiando e estando presentes nos melhores e piores momentos (raros).

Aos funcionários do PEB (Programa de Engenharia Biomédica), Edna, Amauri e Diniz, por todo o suporte. Ao Jorge Alves (UERJ), pelo apoio com as fotos e confecção das lâminas e fotografias.

Aos meus queridos amigos de Mimoso, obrigada por todas as orações e por entenderem minha ausência. Por falar em ausência, lembro-me também da família, Noemia, Zé Elias, Lana, Elias, Thais, Rafa, Matheus e Phellipe, obrigada por entenderem minhas faltas nos compromissos familiares, valeu a pena! O resultado está aqui.

Também aos amigos da Life Technologies muito obrigada pela torcida!

Finalmente, obrigado à CAPES, CNPq e FAPERJ pelo fomento da pesquisa.

Para elaboração desses agradecimentos estive a pensar com certo saudosismo em tantos momentos importantes que se passaram no decorrer desta Tese. Não posso deixar de registrar que foi um período pessoal muito difícil e que marcou muito a minha existência, motivando este pequeno discurso que considero uma sincera homenagem.

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

BIOMICROSCOPIA ULTRASSÔNICA NA DETECÇÃO DE LESÕES EM CÓLON DE CAMUNDONGOS

Kelly Zolli Alves

Outubro/2011

Orientador: João Carlos Machado

Programa: Engenharia Biomédica

A biomicroscopia ultrassônica (BMU) é um método de diagnóstico relevante, pois além de ser não invasivo permite a aquisição de imagens de ultrassom com resolução microscópica. Esta Tese utilizou a BMU para obtenção de imagens de lesões de cólon em camundongos objetivando explorar, *in vitro* e *in vivo*, modelos animais de desenvolvimento de lesões de cólon, de forma reprodutível e factível, e avaliar o método de aquisição de imagem associado à colonoscopia na investigação de tumores de cólon. O modelo animal de tumor de cólon foi por indução química empregando-se o carcinógeno azoximetano (AOM) e dextran sulfato de sódio (DSS) agente irritante restrito à mucosa do cólon e reto. Inicialmente, o estudo foi realizado *in vitro* com uma instrumentação de BMU de varredura setorial (BMUs) operando em 45MHz. Posteriormente utilizou-se uma instrumentação de varredura circular, operando em 40 MHz, para geração de imagens endoluminais denominada BMUe, a qual permitiu a avaliação das lesões em cólon de camundongo *in vivo*. A BMUe foi empregada simultaneamente com a colonoscopia na avaliação da evolução das lesões do cólon em camundongos por meio de um estudo longitudinal, com monitoramento periódico (dois meses). Os resultados obtidos *in vivo* demonstram a capacidade complementar da BMUe à colonoscopia, uma vez que a BMUe foi capaz de detectar lesões no interior da parede de cólon. Tanto a BMUs quanto a BMUe foram capazes de detectar hiperplasia linfoide e tumor de cólon.

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

ULTRASOUND BIOMICROSCOPY IN THE DETECTION OF
MOUSE COLON LESIONS

Kelly Zolli Alves

October/2011

Advisor: João Carlos Machado

Department: Biomedical Engineering

Ultrasound biomicroscopy (UBM) is a relevant diagnostic method, which besides being noninvasive allows the acquisition of ultrasound images with microscopic resolution. This Thesis used the UBM to obtain images of lesions in mouse colon, with the objective to test, *in vitro* and *in vivo*, animal models of colon lesion with a feasible and reproductive fashion, and to evaluate the method of image acquisition associated with colonoscopy in the investigation of colon tumors. It employed a mouse model of colon tumor chemically induced by azoximethane (AOM), a colon-specific carcinogen associated with DSS, a mucosal-irritant agent. Initially, the study was performed *in vitro* using a sector scanning UBM instrumentation operating at 45 MHz. Thereafter, a circularly scanning UBM (eUBM) instrumentation operating at 40 MHz was employed to generate endoluminal images of colon lesions *in vivo*. The eUBM was employed simultaneously with colonoscopy in a longitudinal study to evaluate the progression of mouse colon lesions along a two months period. The results obtained *in vivo* demonstrate the eUBM capability to complement colonoscopy, once eUBM was able to detect lesions inside the colon wall. Both sUBM and eUBM were able to detect colon lymphoid hyperplasias and tumors.

Sumário

Lista de Figuras	xii
Lista de Tabelas	xvi
Lista de Abreviaturas e Símbolos	xvii
CAPÍTULO I INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO II REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
II.1. BIOMICROSCOPIA ULTRASSÔNICA	4
II.2. TÉCNICAS DE IMAGENS USADAS NA DETECÇÃO DE CCR EM MODELOS ANIMAIS	6
II.3. MODELO ANIMAL DE TUMOR COM O AOM-DSS	7
CAPÍTULO III METODOLOGIA.....	9
III.1. INDUÇÃO DE TUMOR DE CÓLON EM CAMUNDONGOS.....	9
III.2. UTILIZAÇÃO DE BMUs E BMUe PARA REALIZAÇÃO DE ESTUDOS <i>IN</i> <i>VITRO</i>	10
III.2.1. Sistema de BMUs	10
III.2.2. Sistema de BMUe	15
III.3. UTILIZAÇÃO DE BMUe PARA REALIZAÇÃO DE ESTUDOS <i>IN VIVO</i>	21
III.3.1. Exames Simultâneos de BMUe e Colonoscopia, <i>in vivo</i> , e Análise Comparativa com a Histologia.....	23
III.3.2. Estudo Longitudinal do Desenvolvimento de Lesão do Cólon	24
III.4. RESUMO DA DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS NOS GRUPOS DE EXPERIMENTOS.	26
CAPÍTULO IV RESULTADOS	27
IV.1. IMAGENS OBTIDAS <i>IN VITRO</i>	27
IV.1.1. Resultados com o BMUs	27
IV.2. IMAGENS OBTIDAS <i>IN VIVO</i>	35
IV.2.1. Exames simultâneos de BMUe e colonoscopia e análise comparativa com a histologia	35

IV.2.2. Exames simultâneos de BMUe e colonoscopia para estudo longitudinal da progressão de lesão de cólon.....	39
CAPÍTULO V DISCUSSÃO	42
CAPÍTULO VI CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
ANEXO.....	53

Lista de Figuras

- Figura III.1 - Ilustração da forma de varredura setorial do feixe de ultrassom usada na formação da imagem. Durante o movimento pendular do transdutor, o mesmo é disparado 512 vezes e os sinais de eco são coletados ao longo de cada uma das 512 linhas compreendidas em um setor com ângulo de 14°. 11
- Figura III.2 - (a) Estante móvel com computador e detalhes do BMUs e (b) detalhe da eletrônica e recipiente para a amostra de tecido. 11
- Figura III.3 - Imagem do exame de colonoscopia em um BALB/c. 13
- Figura III.4 - Recipiente contendo a amostra de tecido já colocada sobre o disco de safira e recoberta pela membrana. 14
- Figura III.5 - Ilustração da forma de varredura circular do feixe de ultrassom usada na formação da imagem. Durante o giro do transdutor, o mesmo é disparado 256 vezes e os sinais de eco são coletados ao longo de cada uma das 256 linhas compreendidas em um ângulo de 360°. 15
- Figura III.6 - Esquema do sistema de varredura para o BMUe. 16
- Figura III.7 - Foto do sistema de BMUe montado no LUS e contendo o sistema *front end* e de acionamento mecânico responsável pelo movimento do transdutor em torno do eixo do cateter conforme ilustrado na Figura III.6. O sistema ainda consiste de um microcomputador com placa de aquisição e fontes de alimentação. 17
- Figura III.8 - Foto do sistema de aquisição de imagem endoluminal do cólon de camundongo, *in vitro*. A peça de cólon é distendida pela ação da coluna d'água e a minissonda de ultrassom é inserida no cólon para realização do exame. 19
- Figura III.9 - Detalhes da montagem experimental contendo a peça anatômica do cólon de camundongo, imerso em água, e presa a um cateter que forma uma coluna de água. Observa-se a extremidade que foi ocluída por sutura e a outra, proximal, presa ao cateter por onde é inserida a minissonda de ultrassom. 20

Figura III.10 - Extremidade do broncosfibroscópio evidenciando o canal de iluminação, o canal de captura da imagem óptica, o cateter da minissonda, passando pelo canal acessório do broncofibroscópio, contendo em seu interior o transdutor de ultrassom.	22
Figura III.11 - Foto que ilustra o exame de BMUe e de colonoscopia, <i>in vivo</i> , utilizando-se um sistema de anestesia inalatória.....	22
Figura III.12 – Ilustração contendo o fluxograma resumido da distribuição dos Grupos de animais e as etapas dos experimentos.	26
Figura IV.1 - Imagem de BMUs de uma peça de cólon normal aberto de camundongo, <i>in vitro</i> , e a histologia correspondente. Na parte superior da Figura de BMUs observam-se a camada mucosa (Mu) hiperecólica, a segunda camada hipoeecólica correspondente à muscular da mucosa (Mm), uma terceira camada hiperecólica referente à submucosa (Sm) e uma última camada hiperecólica que é a muscular externa (Me). As vilosidades (Vi) têm uma boa concordância entre as imagens de BMU e de histologia. A linha horizontal hiperecólica inferior na imagem de BMU corresponde à superfície refletora da safira (Sa).....	27
Figura IV.2 - Imagens de histologia e BMUs de cólon de camundongo com tumor (Tu). Observa-se a invasão do tumor até a camada hipoeecólica da muscular externa (Me), estando o mesmo cercado lateralmente por estruturas de cólon preservadas contendo as vilosidades (Vi), a mucosa (Mu) hiperecólica, a muscular da mucosa (Mm) hipoeecólica, a submucosa (Sm) hiperecólica e a camada muscular externa (Me). A imagem BMUs é bem correlacionada com a histologia, que confirmou a presença de um adenoma. As linhas hiperecólicas na parte inferior e superior da imagem de ultrassom correspondem à face da placa de safira (Sa) e à membrana de PVC (Mb), respectivamente.....	28
Figura IV.3 - Imagem de histologia e BMUs de cólon de camundongo com tumor (Tu) invadindo completamente a parede até a camada muscular externa (Me). Grande parte da estrutura do cólon foi destruída pelo tumor, e somente a camada muscular externa (Me) hipoeecólica está presente. Existe uma concordância entre a imagem de BMUs e a histologia, que confirmou a presença de um adenocarcinoma. As linhas hiperecólicas na parte inferior e superior da imagem de ultrassom correspondem à	

face safira (Sa) e à membrana de PVC (Mb), respectivamente.	29
Figura IV.4 - Imagem BMUs do cólon do camundongo com um tumor formado como um pólipó. Da mesma forma que na Figura IV.3, a estrutura do cólon está em grande parte destruída, e apenas a camada muscular externa (Me) hipoeecóica está presente. Existe uma concordância entre a imagem de BMUs e a histologia, que confirmou a presença de um pólipó adenomatoso. As linhas hipereecóicas na parte inferior e superior da imagem de ultrassom correspondem à face safira (Sa) e à membrana de PVC (Mb).	29
Figura IV.5 - Imagem endoscópica do cólon do mesmo animal analisado na Figura IV.4. As cabeças de setas indicam os pólipos.	30
Figura IV.6 - Imagem de BMUs referente a planos longitudinais da amostra de cólon com varredura paralela, do mesmo animal analisado na Figura IV.4. A prolongação da lesão (formada pelo pólipó) ao longo da superfície de cólon é notada na sequencia de imagens. Todas as dimensões de distância vertical e entre planos de imagem estão em μm	31
Figura IV.7 - Imagem de BMUs do cólon de camundongo do grupo controle com uma hiperplasia linfóide (HI). As vilosidades (Vi), a camada mucosa (Mu) hipereecóica, a muscular da mucosa (Mm) hipoeecóica e a camada muscular externa (Me) hipoeecóica estão presentes. A linha hipereecóica na parte inferior da imagem de ultrassom corresponde à face safira (Sa).	31
Figura IV.8 - Imagem colonoscópica do cólon do mesmo animal analisado na Figura IV.7. A parede saliente, causada pela hiperplasia linfóide, está rodeada por quatro cabeças de setas.	32
Figura IV.9 - Comparação entre as imagens obtidas através da BMUe (esquerda), obtida <i>in vitro</i> , e da análise histológica (direita) do cólon de camundongo sem lesão (grupo controle). Observam-se as camadas do cólon: mucosa (Mu), submucosa (Sm) e muscular externa (Me). A região central na imagem de BMUe corresponde à minissonda de ultrassom.	34
Figura IV.10 - Comparação entre as imagens obtidas através da BMUe (esquerda) e da análise histológica (direita) do cólon de camundongo tratado com AOM-DSS. Nesta	

comparação evidencia-se o mesoentério (Ms, camada que é bastante hiperecótica na imagem de ultrassom. Observa-se hipocogenicidade na região da lesão, devido à presença de uma presença de uma hiperplasia linfóide e na camada muscular externa (Me).....	34
Figura IV.11 - Comparação entre as imagens obtidas através da BMUe (esquerda), da análise histológica (centro) e da colonoscopia (direita) do cólon de camundongo sem lesão (animal 6). Observam-se as camadas do cólon: mucosa (Mu), Muscular da mucosa (Mm), submucosa (Sm), e muscular externa (Me). A região central na imagem de BMUe (Ms) corresponde à minissonda	37
Figura IV.12 - Comparação entre as imagens obtidas através da BMUe (esquerda) da análise histológica (direita) do cólon de camundongo (animal 7) com um hiperplasia linfóide (Hl). Observam-se as camadas do cólon: mucosa (Mu), e muscular externa (ME). A região central na imagem de BMUe corresponde à minissonda	37
Figura IV.13 - Imagens de BMUe (esquerda), histológica (centro) e colonoscópica (direita) do cólon de camundongo (animal 7) com um adenocarcinoma (Ad) ocupando quase metade da luz. As camadas do cólon presentes nas imagens são: mucosa (Mu) e muscular externa (Me). A região central na imagem de BMUe corresponde à minissonda	38
Figura IV.14 - Imagens e BMUe (esquerda), da análise histológica (centro) e de colonoscopia (direita) do cólon de um camundongo com dois adenomas (Adm). Observam-se as camadas do cólon: mucosa (Mu), e muscular externa (Me). A região central na imagem de BMUe corresponde à minissonda (Ms).....	38
Figura IV.15 - Três imagens de BMUe de uma mesma lesão do cólon (animal 10 L1) obtidas em momentos distintos. A lesão L1 foi delimitada de amarelo e o Ms representa a minissonda, também podemos observar a mucosa (Mu).....	40
Figura IV.16 - Três imagens de BMUe de uma mesma lesão do cólon de um animal obtidas em momentos distintos, evidenciando-se a regressão da lesão, na primeira e na segunda imagem a lesão foi delimitada por amarelo L1, na terceira temos a região normal com uma pequena elevação. A mucosa (Mu) e a minissonda (Ms) também foi evidenciado.....	40

Lista de Tabelas

Tabela III.1 - Distribuição dos animais utilizados no experimento em dois grupos: controle e tratado.....	12
Tabela III.2 - Distribuição dos camundongos nos grupos controle e tratados (AOM-DSS).....	18
Tabela III.3 - Relação entre os animais do experimento e a sequência de aquisição das imagens simultâneas de BMUe e de colonoscopia.....	25
Tabela IV.1 - Resultados da detecção da lesão obtidas através das imagens de BMUs, da colonoscopia e da histopatologia.	33
Tabela IV.2 - Resultados das alterações detectadas com os exames simultâneos de BMUe e colonoscopia de luz branca comparados com os laudos de histopatologia.	36
Tabela IV.3 - Resultados da progressão das lesões detectadas com os exames de BMUe, entre 1 ^a e 2 ^a aquisições (entre barras laterais duplas) e entre 1 ^a , 2 ^a e 3 ^a aquisições (entre barras laterais triplas).....	41

Lista de Abreviaturas e Símbolos

=	Inalterado
↑	Aumento
↓	Diminuição
A	Acentuado
Ad	Adenocarcinoma
Adm	Adenoma
AM	Aumento da espessura da Mucosa
AOM	Azoximetano
BMU	Biomicroscopia Ultrassônica
BMUe	Biomicroscopia Ultrassônica endoluminal
BMUs	Biomicroscopia Ultrassônica setorial
CCR	Câncer cólon retal
Ctrl	Controle
DSS	Dextran Sulfato de Sódio
HI	Hiperplasia Linfoide
IL	Intensidade Leve
IVUS	<i>Intravascular Ultrasound</i>
LCD	<i>Liquid Crystal Display</i>
LUS	Laboratório de Ultrassom
M	Moderado
Mb	Membrana
Me	Muscular externa
Mm	Muscular da Mucosa

Ms	Minissonda
Mu	Mucosa
Nr	Normal
PVC	Policloreto de Vinila
PVDF	Difluoreto de Polivinilideno
Sa	Safira
Sm	Submucosa
Tu	Tumor
UCSD	University of California, San Diego
US	Ultrassom
Vi	Vilosidade

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

O câncer colo-retal (CCR) abrange tumores que atingem o cólon (intestino grosso) e o reto. Tanto homens como mulheres são igualmente afetados, sendo uma doença tratável e frequentemente curável quando localizada no intestino (sem metástase, acometimento de outros órgãos). O CCR, uma das principais causas de mortalidade por câncer em vários países industrializados, foi listado como o terceiro câncer mais comumente diagnosticado e a terceira causa de morte mais comum, devido à malignidade, nos Estados Unidos [1]. Quando detectado em seu estágio inicial possui grandes chances de cura, diminuindo a taxa de mortalidade associada ao tumor. Cerca de 90% dos tumores malignos podem ser curados desde que diagnosticados precocemente e tratados de maneira correta [2].

Como acontece com a maioria das neoplasias epiteliais, a incidência e a mortalidade do CCR aumentam de forma exponencial com a idade, também associada ao aumento de adenomas. Após os 60 anos, o risco de adenomas com displasia de alto grau é 80% maior do que em pessoas mais jovens. A maioria dos carcinomas tem início em adenomas e, portanto, a remoção dos adenomas reduz do risco de CCR. Adenomas maiores que 1 cm têm 15% de risco de transformação em carcinoma em 10 anos [3].

Para que o tratamento seja efetivo utiliza-se a análise do estágio de CCR, que depende da profundidade da invasão da mucosa, e o melhor prognóstico é geralmente relacionado a um diagnóstico precoce. Tratamento de lesões pré-neoplásicas ou tumores limitados à mucosa, como o carcinoma *in situ*, têm uma excelente taxa de sobrevivência em longo prazo.

Nesse contexto, considerando-se a atual taxa de incidência de câncer de cólon e o alarmante aumento de sua incidência nos últimos anos é essencial reconhecer a importância do diagnóstico precoce e o tratamento minimamente invasivo como opção cada vez mais frequente. Além disso, os estudos clínicos são limitados por pequeno número de pacientes e as preocupações éticas dificultam a realização de estudos em seres humanos.

Há uma área ativa de pesquisa científica relacionada ao desenvolvimento de vários modelos animais de CCR, utilizando carcinógenos, para entender os mecanismos patogênicos desta doença, para estabelecer medidas terapêuticas e preventivas e também

avaliar a evolução dos métodos e ferramentas de diagnóstico [4, 5]. Diversos modelos murinos de inflamação de cólon relacionados com a carcinogênese têm sido desenvolvidos na última década, incluindo os modelos de indução química CCR [6-9]. Entre esses modelos de roedores, o camundongo tem um papel importante abrangendo modelos de implantação do tumor [6], camundongos geneticamente modificados [6, 10].

O uso dos modelos animais associados aos métodos atuais de geração de imagens, principalmente para diagnóstico, é muito importante considerando-se o grande avanço da tecnologia nesta área e investimentos em pesquisas [11]. O desenvolvimento de novos tipos de equipamentos, como em ultrassonografia clínica, requer sistemas capazes de produzir imagens de alta qualidade para fácil detecção e monitoramento de diversos estágios de doenças, de desenvolvimento embriológico e outras aplicações. A utilização de instrumentação de imagem de ultrassom (US) de frequências mais elevadas (maiores que 20 MHz) tem permitido a visualização de tecidos vivos com resoluções microscópicas, e neste caso tanto a técnica como a instrumentação são denominadas de Biomicroscopia Ultrassônica (BMU). [12].

Soldan *et al.* [13, 14] aplicaram a BMU, *in vitro*, em modelos animais de colite ulcerativa e seus resultados demonstraram a viabilidade desta modalidade de imagem para identificar as camadas do cólon de ratos com contraste adequado entre elas e com resolução suficiente para detectar úlceras com profundidade de 500 µm.

Baseado nestas informações foi definido, como proposta desta tese, a utilização da BMU com o objetivo de obtenção de imagens das lesões de cólon de camundongos considerando-se um modelo animal de tumor de intestino grosso por indução química. Nesta etapa de geração da lesão foi usando o carcinógeno azoximetano (AOM) [15, 16] e dextran sulfato de sódio (DSS) que é um agente irritante restrito à mucosa do cólon e reto, atua induzindo a inflamação desses tecidos [16, 17].

Inicialmente, o estudo foi realizado *in vitro* utilizando-se uma instrumentação de BMU de varredura setorial (BMUs), visando não apenas a avaliação da lesão, mas considerando também o desenvolvimento da técnica, sua evolução, e avaliação de toda a instrumentação do equipamento de BMU utilizado.

Vencida a etapa anterior, e uma vez comprovada a possibilidade de usar a BMU para a obtenção de imagens de lesões de cólon de camundongos, o passo seguinte consistiu na utilização de uma instrumentação de BMU de varredura circular, utilizada na geração de imagens endoluminais, denominada BMUe. Utilizando-se esta

modalidade de geração de imagens de BMU foi possível avançar na obtenção de imagens do cólon inteiro. Estudos preliminares foram realizados *in vitro* e, posteriormente, a evolução desta técnica culminou com a avaliação das lesões em cólon de camundongo *in vivo*, com a obtenção de imagens simultâneas de colonoscopia e de BMUe. Por fim, a BMUe foi empregada na avaliação da evolução de lesões do cólon de camundongos por meio de um estudo longitudinal, com monitoramento periódico por um período de até dois meses.

CAPÍTULO II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1. BIOMICROSCOPIA ULTRASSÔNICA

Dentre as diversas formas de utilização do US a modalidade de imagem está bem estabelecida para o diagnóstico em medicina. Está contida em aproximadamente 1/3 de todos os procedimentos de diagnóstico por imagem. Os métodos de diagnóstico de imagens médicas por US convencional (frequência tipicamente entre 2,5 e 7,5 MHz) fornece uma resolução na ordem de 0,5 - 1 mm e penetração maior que 100 mm [12]. Portanto, as resoluções obtidas com o US convencional são insuficientes para o diagnóstico precoce de algumas doenças, como por exemplo, aquelas que envolvem alterações neoplásicas.

Quando há necessidade de resoluções micrométricas, a BMU torna-se um método relevante, pois além de ser não invasivo permite a aquisição de imagens e com resolução microscópica. A geração das imagens de BMU é semelhante à da ultrassonografia do modo-B convencional, porém com frequências elevadas. O preço a se pagar pela frequência elevada é a diminuição da penetração do US nos tecidos biológicos, tipicamente limitada entre 4 e 7 mm.

Para uma frequência de 30 MHz e usando um transdutor de US 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 [12]. Essas resoluções são comparáveis com as obtidas pela microscopia por ressonância magnética, onde se conseguem resoluções da ordem de 75 μm . Por outro lado, para um transdutor de US operando em 100 MHz e focalizado, estes valores se reduzem para 1,6 mm, 60 μm e 19 μm , respectivamente [12]. Portanto, para frequências mais elevadas a resolução do US se aproxima daquela oferecida por microscopia óptica panorâmica. Daí denominar ultrassonografia de alta frequência, aplicada na visualização de tecidos vivos por: BMU, microscopia ultrassônica por retro espalhamento, US de alta frequência ou então US de frequência muito elevada.

Em 1935, Sokolov [18] propôs o primeiro microscópio acústico, o US de alta frequência para a imagem de microestruturas. Nos anos 70 houve uma grande esperança com a aplicabilidade da microscopia ultrassônica, através do desenvolvimento do

microscópio acústico de varredura laser [19] e do microscópio acústico de varredura [20]. Esperava-se que o contraste inerente à microscopia acústica (maior cerca de 2 ordens de magnitude se comparado com o contraste óptico de tecidos), complementasse os resultados obtidos com a microscopia óptica; mas, no entanto, isto não se verificou. Pelo fato da microscopia óptica já estar estabelecida como uma ferramenta de rotina, a microscopia acústica não teve grandes avanços até o final da década de 80, quando a utilização do US em alta frequência voltou a ser considerada. Tal situação ocorreu em medicina pela possibilidade de se utilizar a microscopia acústica na obtenção de imagens de tecidos vivos. As aplicações clínicas logo se sucederam em oftalmologia [21], em dermatologia [3], em ultrassonografia intravascular (IVUS, do inglês *intravascular ultrasound*) [22] e do trato gastrointestinal [23].

Em 2003, Murata *et al* [24] empregaram a BMUe, usando um de altas frequências (15, 20, 30 MHz) montado na ponta de um cateter para a obtenção de imagens da parede do esôfago de pacientes, conseguiram delinear 9 estruturas das camadas esofágicas normais, sendo: mucosa constituída por 4 camadas (epitélio, 1ª e 2ª, lâmina própria, 3ª, muscular da mucosa, 4ª); submucosa constituída da 5ª camada; muscular própria, 6ª a 8ª camadas e consistindo da muscular circular, 6ª, tecido conectivo, 7ª e da muscular longitudinal, 8ª; adventícia, 9ª camada. Vários relatos evidenciam que a BMUe, baseada na utilização de transdutores do tipo cateter de alta frequência, fornece informações corretas da profundidade de penetração do tumor de câncer esofágico, com acurácia para identificar invasão de câncer na mucosa e submucosa. Resultados melhores são obtidos à medida que se utilizam frequências maiores, uma vez que para 30 MHz o epitélio e a muscular da mucosa são mais claramente delineados na imagem de US quando comparada com imagem obtida com o US de 20MHz [24].

A utilização de US, em frequências superiores (40 MHz), na obtenção de imagens do cólon pode fornecer imagens mais detalhadas de neoplasias superficiais do cólon, permitindo a determinação da profundidade do acometimento das camadas, assim como da microestrutura tecidual, contribuindo com informações mais precisas que o US convencional. O US de alta frequências poderá, futuramente, reduzir a necessidade de biópsia e aproximar-se da histologia convencional com vantagem de poder ser empregada *in vivo*.

II.2. TÉCNICAS DE IMAGENS USADAS NA DETECÇÃO DE CCR EM MODELOS ANIMAIS

Colonoscopia é uma ferramenta de rastreamento bem estabelecida para CCR em seres humanos e considerada como tendo a mais alta precisão na detecção de câncer [1] em humanos, já foi empregada em roedores [4, 5]. O exame de colonoscopia é uma técnica que apenas fornece informações sobre a superfície da mucosa do cólon, não possibilitando observações das outras paredes que compõem este órgão. Portanto, como forma de complementar à colonoscopia, há uma variedade de técnicas de imagens ópticas e não ópticas que podem fornecer o mapeamento anatômico espacial e informações funcionais sobre o cólon de animais vivos de pequeno porte. Exemplos de técnicas não invasivas de obtenção de imagem, que podem complementar a colonoscopia, usadas para a detecção de tumores de cólon em roedores incluem a tomografia de coerência óptica [25], ressonância magnética [26], tomografia computadorizada com emissão de fóton único [27], imagem por bioluminescência [28], colonografia por microtomografia computadorizada [29], microtomografia computadorizada com emissão de fóton único combinada com tomografia computadorizada [30] e imagem por radiação infravermelha curta [31].

Outra modalidade de imagem usada com sucesso em animais de pequeno porte é a baseada no US. Para pequenos animais, como o camundongo, a técnica de imagem por US exige uma frequência 10 vezes maior do que a do US convencional usada em humanos, a fim de manter a mesma proporcionalidade entre o comprimento de onda e o tamanho de estruturas teciduais, para com isto manter a mesma resolução relativa para a imagem dos órgãos a serem inspecionados [32]. O trabalho pioneiro Turnbull e Foster [33] em 2002 relata a obtenção, *in vivo*, de imagens de BMU de embriões de camundongos. Desde então, o progresso da tecnologia de BMU permitiu diversas investigações sobre o camundongo, incluindo a capacidade de investigar o desenvolvimento do embrião a partir do dia 5 de embriogênese até o nascimento, e disso resultou a primeira prova da formação do placóide óptico (espessamento na camada de células embrionárias epiteliais) no dia 8 e na morfogênese do cristalino, retina e órbita trazidos à luz desde seus primeiros estágios [34]. Além disso, as imagens de US dos tecidos moles inspecionados, como fígado e rim, em camundongos recém-nascidos e adultos revelou uma extraordinária semelhança com as de humanos obtidas com uma frequência inferior [32].

Um sistema de BMU, operando a 80 MHz, foi usado por Jolly *et al* [35] para determinar a morfologia da retina em modelos animais de pequeno porte. Foi o primeiro estudo a avaliar quantitativamente a capacidade do BMU em diferenciar em ratos as camadas intra-retinais. Normalmente, a morfologia da retina é avaliada por meio de análise histológica, que se baseia na medição da espessura da camada nuclear externa e contagem de células [35]. Isto requer o sacrifício de um grande número de animais.

Um sistema BMU duplex (modo B de imagem e Doppler pulsado para medição de vazão sanguínea), operando com banda de frequências entre 40-75 MHz e projetado para investigação cardiovascular de pequenos animais *in vivo*, foi utilizado para a obtenção de imagem das câmaras cardíacas de camundongos, ratos e *zebrafish* (o peixe paulistinha)[36].

Apesar do grande número de investigações relacionadas com imagens de BMU em modelos animais de pequeno porte, muito pouco existe na literatura a respeito da obtenção de imagens de cólon de ratos ou camundongos. O grupo de pesquisa do Laboratório de Ultrassom do Programa de Engenharia Biomédica já usou uma instrumentação BMU, *in vitro*, para a geração de imagens de cólon de ratos submetidos a um processo de indução química de colite[13].

II.3. MODELO ANIMAL DE TUMOR COM O AOM-DSS

Modelos animais são muito úteis e largamente utilizados em estudos de carcinogênese do cólon para elucidar mecanismos e fornecer indicações para abordagens de prevenção dessa doença em humanos [37].

O AOM é um carcinógeno potente e específico para indução de câncer colón retal em camundongo [38], sendo o agente mais comum de indução química usado em roedores para o desenvolvimento de modelos CCR [25], sendo que a combinação de uma única aplicação de AOM, seguida com uma semana de exposição ao agente inflamatório DSS tem provado reduzir drasticamente o tempo de latência para a indução do CCR [9]. O DSS é um agente irritante restrito à mucosa do cólon e reto que induz inflamação. Essa associação com AOM para indução da colite ou CRC, aumentando as chances para o desenvolvimento do tumor de cólon em camundongos e reduzindo o tempo de aparecimento da lesão [40]. Os protocolos baseados AOM-DSS rendem mais adenomas que adenocarcinomas de cólon e sua eficiência está relacionada com o *background* e genótipo dos camundongos [38].

Este modelo tornou-se excelente para o estudo de carcinogênese do cólon devido à sua alta reprodutibilidade, potência, e o modo simples acessível de aplicação. Adicionalmente, o modelo AOM/DSS é, também, particularmente aplicável quando o foco do estudo se relaciona com a progressão tumoral ocasionada por colite, como na colite ulcerativa ou doença de Crohn [39].

Além de todas estas aplicações, ainda podemos destacar a possibilidade futura de correlação com doença em humanos, em um estudo realizado por Boivin [40] há descrição de mais de 30 modelos de neoplasias intestinais e relacionando as características primárias de diferentes modelos animais com a doença em humanos.

CAPÍTULO III

METODOLOGIA

A metodologia experimental empregada neste trabalho compreende as seguintes etapas direcionadas para a caracterização do cólon de camundongos:

- indução de tumor de cólon em camundongos
- utilização de BMUs e BMUe para realização de estudos *in vitro*,
- utilização de BMUe para realização de estudos *in vivo*.

Os testes *in vitro* foram realizados, inicialmente, com peças de cólon abertas longitudinalmente e planejadas, utilizando-se o BMUs. O segundo passo foi a utilização do BMUe para obtenção de imagens, também *in vitro*, do cólon inteiro e preservado na sua forma anatômica. Estes procedimentos *in vitro* corroboraram para a padronização, o aperfeiçoamento e o conhecimento da técnica empregada na terceira etapa relacionada com a aplicação da BMUe *in vivo*.

III.1. INDUÇÃO DE TUMOR DE CÓLON EM CAMUNDONGOS

A indução dos tumores nos animais foi realizada segundo o protocolo AOM-DSS (protocolo 042), aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da UFRJ. O animal escolhido foi o camundongo – *Mus musculus* (Linnaeus, 1758) com 6-7 semanas de idade e média de peso, esperada para esta faixa etária, de 25 g. A escolha desse animal baseou-se no fato da facilidade de obtenção da espécie, do suporte da literatura com reprodutibilidade comprovada e do manuseio e da adaptação à resolução do biomicroscópio ultrassônico. Além disso, é um animal de pequeno porte, e que portanto necessita de pequenas quantidades de reagentes para indução de tumores, reduzindo assim o custo com carcinógenos. Foi utilizada mais de uma linhagem de camundongo, visando o estudo de variadas leões, incluindo tamanho e quantidades diversas considerando as diferenças genéticas entre cada uma delas. Essas linhagens estão especificadas na distribuição dos grupos de animais.

O AOM (Referência: A2853, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, peso molecular de 74,08 Da) é um agente químico cancerígeno clássico, que induz o câncer colorretal em roedores [6-8]. No presente trabalho foi administrado via intraperitoneal numa dose de 12,5 mg/kg de peso do animal. Uma semana logo após a administração do AOM, os

animais consumiram, de forma espontânea, DSS (Referência: D8906, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, peso molecular:36,000-50,000 Da) a 3% diluído em água, por uma semana.

Os animais foram mantidos à temperatura ambiente com ciclo circadiano e dieta apropriados. O Guia para Cuidado e Uso de Animais de Laboratório, do *National Institute of Health* dos Estados Unidos, também foi considerado. O consumo de água foi monitorado e constatou-se ser similar entre os camundongos de diferentes genótipos [41]. Peso corporal, consistência das fezes e sangramento intestinal foram monitoradas durante e após a administração DSS. O cólon dos animais foi inspecionado vinte e duas semanas após o início do protocolo AOM-DSS, à exceção dos animais pertencentes ao grupo do estudo longitudinal *in vivo*, o qual foi iniciado 13 semanas após o início do protocolo AOM-DSS.

III.2. UTILIZAÇÃO DE BMUs E BMUe PARA REALIZAÇÃO DE ESTUDOS *IN VITRO*

III.2.1. Sistema de BMUs

O BMUs é semelhante a um sistema de imagem de ultrassom do modo-B convencional, porém com frequências elevadas e com penetração nos tecidos biológicos limitada entre 4 e 7 mm. Para o BMUs usado no presente trabalho, o feixe emitido pelo transdutor de ultrassom monoelemento realiza uma varredura na forma setorial, como ilustrado na Figura III.1, durante a geração de imagens planas da parede do cólon.

Basicamente, a obtenção de imagens de ultrassom começa com o transdutor de ultrassom movimentando-se em forma pendular no plano de imagem (1,7 por 10 mm). Para isto, o transdutor foi montado em um sistema eletromecânico de varredura setorial constituído por um motor dc com eixo acoplado a um codificador óptico, capaz de produzir quadros de imagem em tempo real. A imagem é formada por 512 linhas e em uma taxa de 2 quadros/segundo. Uma foto do sistema de BMU de varredura pendular é mostrada na Figura III.2.

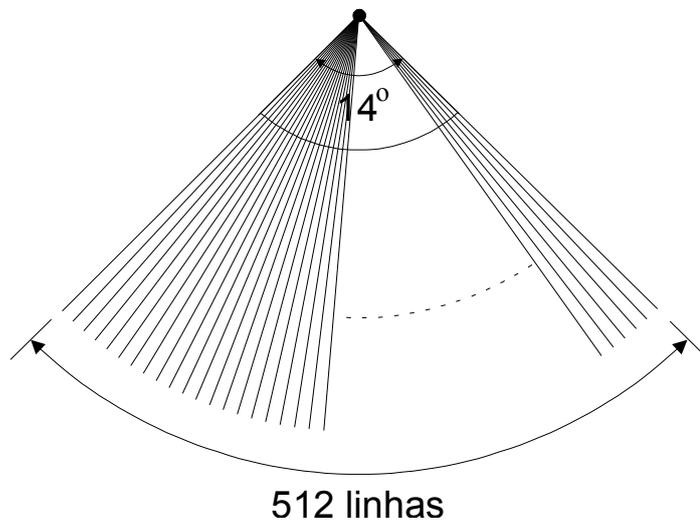
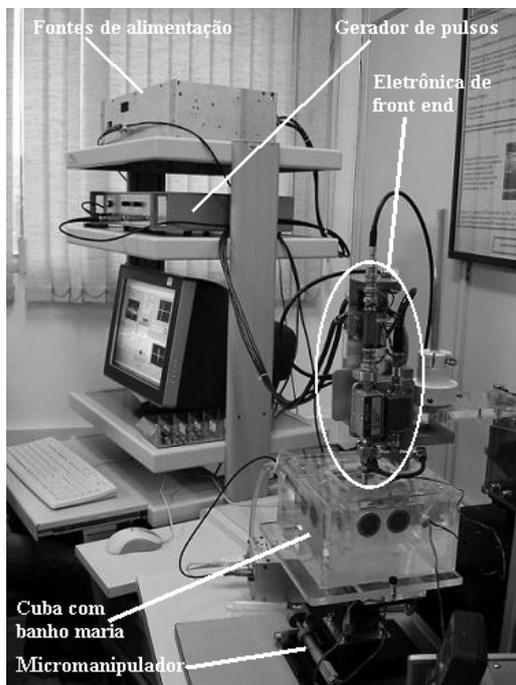
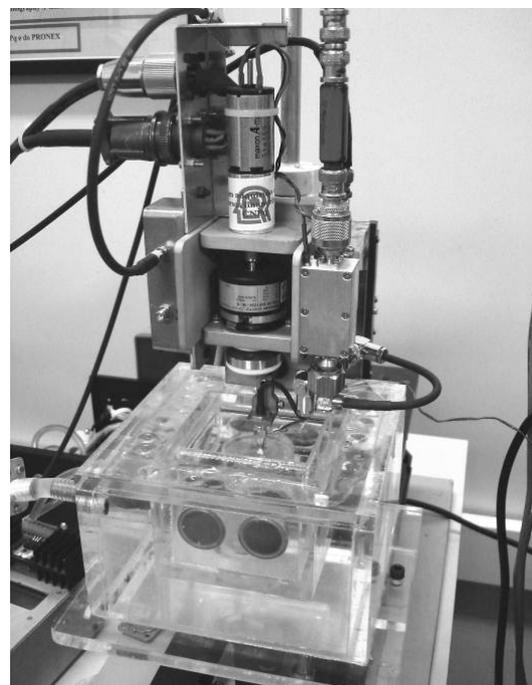


Figura III.1 - Ilustração da forma de varredura setorial do feixe de ultrassom usada na formação da imagem. Durante o movimento pendular do transdutor, o mesmo é disparado 512 vezes e os sinais de eco são coletados ao longo de cada uma das 512 linhas compreendidas em um setor com ângulo de 14°.



(a)



(b)

Figura III.2 - (a) Estante móvel com computador e detalhes do BMUs e (b) detalhe da eletrônica e recipiente para a amostra de tecido.

O transdutor de ultrassom é composto de um filme fino de PVDF (difluoreto de polivinilideno) piezoelétrico banhado a ouro (modelo C190240; Capistrano Labs, Inc.; San Clemente, CA) com focalização esférica, tendo distância focal de 12 mm, f-número = 2,4 e profundidade de campo para -3 dB de 1,7 mm. Uma vez conectado ao sistema BMU, o pulso emitido pelo transdutor tem uma frequência central de 45 MHz, com largura de banda (-3 dB) de 25,2 MHz. De acordo com Foster *et al* [12], o transdutor de ultrassom usado no presente trabalho tem resoluções axial e lateral no ponto focal estimadas em 30 e 80 μm , respectivamente.

A) Grupo de animais

Foram utilizados 32 camundongos, *Mus musculus* (Linnaeus, 1758), a partir de três *backgrounds* (25 BALB/c, 4 SWR e 3 129/Svj), de ambos os sexos. A linhagem BALB/c foi usada devido à sua tendência natural para a formação de tumores gastrointestinais [41]. Os animais SWR são considerados os melhores representantes da variação normal para resposta AOM-DSS em camundongos. Já os animais 129/Svj são heterozigotos para o supressor de tumor p53, um genótipo propenso à formação de tumor [42] e que deve ter aumentada a chance de adenocarcinomas. A genotipagem p53 foi realizada conforme descrito por Chau *et al.* [43]. Os animais 129/Svj foram doados pelo Dr. Jean Wang da UCSD (*University of California, San Diego*) Cancer Center.

Todos os animais foram distribuídos em dois grupos, conforme apresentado na Tabela III.1.

Tabela III.1 - Distribuição dos animais utilizados no experimento em dois grupos: controle e tratado

Background	Grupos		Mortes durante todo o trabalho				Sobreviventes	
	1 (Ctrl*)	2 (Tratados**)	Período de indução de tumor		Colonoscopia		(Ctrl*)	(Tratados**)
			(Ctrl*)	(Tratados**)	(Ctrl*)	(Tratados**)		
BALB/c	7	18	2	6	1	1	4	11
SWR		4		2				2
129***		3						3
Total	7	25	2	8	1	1	4	16

*Controle

**Protocolo AOM-DSS

***129/Svj heterozigoto para o supressor p53 ($p53^{+/-}$)

O Grupo 1, composto de 7 animais BALB/c, serviu como controle, sem indução do tumor por cancerígeno. O Grupo 2 continha os demais 25 animais que foram tratados de acordo com o protocolo AOM-DSS.

Dois animais do Grupo 1 morreram no período em que os animais do Grupo 2 estavam sendo submetidos ao protocolo AOM-DSS e um morreu durante a colonoscopia. No Grupo 2, oito animais (6 BALB/c e 2 SWR) morreram durante o tratamento, pois não resistiram o protocolo, e um morreu durante a colonoscopia. Um total de 20 animais (4 controles e 16 tratados) sobreviveram e foram utilizados nos experimentos.

B) Exames de colonoscopia

Previamente à obtenção das imagens de BMU das peças de colon, os animais foram anestesiados e inspecionados por colonoscopia (exceto dois da linhagem 129/Svj cujos intestinos estavam com muitas fezes). Todos os exames ocorreram seis dias antes do exame de BMU, à exceção de dois animais que foram examinados dois meses antes. Todos estes procedimentos com animais presentes no desenvolvimento prático desta tese, foram aprovados pelo Comitê de Ética para Pesquisa com Animal de Laboratório da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob registro 71/08.

Foram obtidas as imagens do cólon e as lesões foram detectadas e registradas (Figura III.3), por meio de um broncofibroscópio pediátrico (modelo FB 120-P; Fujinon, Tóquio, Japão) com diâmetro externo de 2,8 mm.



Figura III.3 - Imagem do exame de colonoscopia em um BALB/c.

C) Obtenção das imagens de BMUs das peças de colon

Os animais do Grupo 2 foram sacrificados com 8 semanas (1 BALB/c e 1 SWR), 16 semanas (4 BALB/c, 1 SWR e 3 129/Svj) e 24 semanas (6 BALB/c) após a injeção de AOM. Em relação aos controles, o grupo foi formado 24 semanas antes do sacrifício.

Para a obtenção das peças de cólon, os animais foram sacrificados e foram feitas uma incisão mediana a partir da região submentoniana até a região púbica, a abertura da caixa esternocostal e a incisão peritoneal na mesma direção. Estas manobras expõem as cavidades torácica e abdominal, assim como a região cervical. O cólon foi então identificado e retirado, desde o cecum até o ânus, e após a remoção foram seccionados longitudinalmente. Cada peça de cólon aberta foi colocada horizontalmente sobre uma placa de safira (superfície refletora do BMU), com a mucosa voltada para cima, e coberta com uma membrana de PVC (policloreto de vinila) fabricado por Wanor Ind. Com. Imp. Exp. LTDA (Campinas, SP, Brasil), para impedir o movimento da amostra no momento de aquisição das imagens. Esta montagem está representada na Figura III.4.

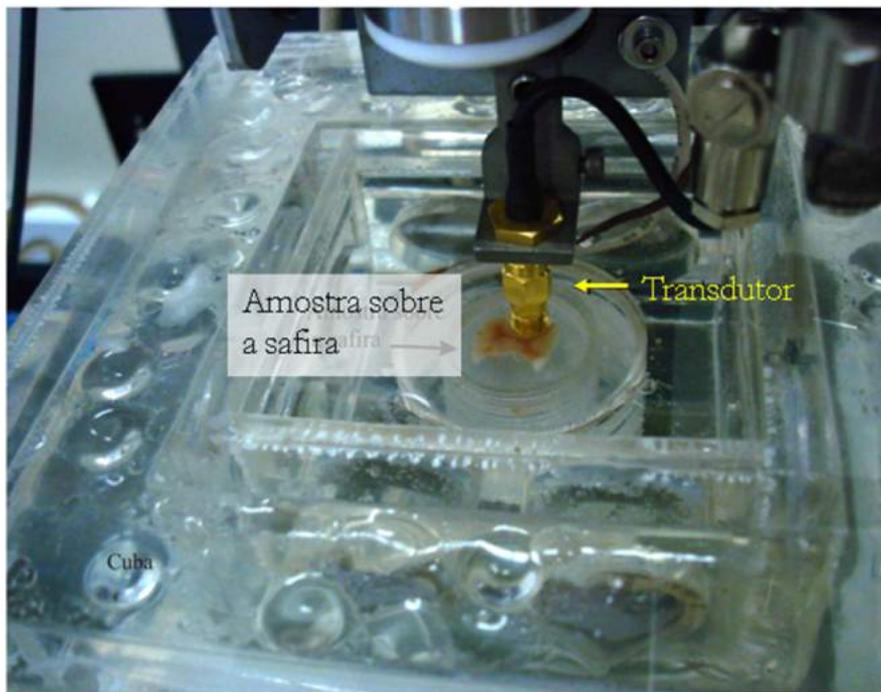


Figura III.4 - Recipiente contendo a amostra de tecido já colocada sobre o disco de safira e recoberta pela membrana.

O recipiente onde é colocada a amostra de tecido é imerso em um reservatório de acrílico preenchido com solução salina, na temperatura ambiente, que atua como meio

de acoplamento entre o transdutor e a amostra de tecido.

As imagens de BMUs de toda a amostra de cólon aberto foram obtidas em planos de varredura transversais ao eixo longitudinal do cólon, separados por passos de 1 milímetro, começando-se pela parte proximal. Houve exceção para uma amostra, da qual foram obtidas imagens de BMUs no sentido longitudinal do cólon, em planos de varredura paralelos.

Na sequência da inspeção por BMUs, as peças foram fixadas em formalina a 10%, seccionadas (transversalmente ou longitudinalmente) nas regiões cujas imagens de BMU revelaram quaisquer alterações morfológicas na parede do cólon. A seguir, as peças foram incluídas em parafina, e coradas com hematoxilina e eosina para análise histológica.

III.2.2. Sistema de BMUe

O sistema de imagem BMUe usado nesta tese funciona como um instrumento de imagem modo-B convencional usado para diagnóstico médico. A sua diferença fundamental reside na alta frequência usada para o sistema endoluminal e na varredura circular do feixe de ultrassom, conforme ilustrado na Figura III.5.

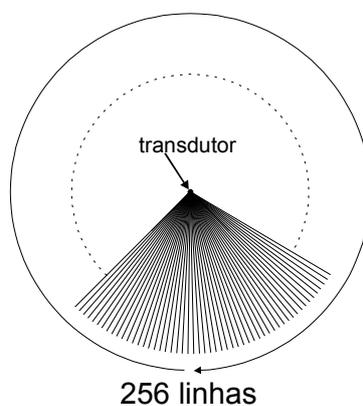


Figura III.5 - Ilustração da forma de varredura circular do feixe de ultrassom usada na formação da imagem. Durante o giro do transdutor, o mesmo é disparado 256 vezes e os sinais de eco são coletados ao longo de cada uma das 256 linhas compreendidas em um ângulo de 360°.

Uma minissonda ultrassônica de 40 MHz (Atlantis ® SR Pro - cateter de imagem coronariana; Boston Scientific Corporation, Natick, MA) montada na forma de

um cateter de diâmetro 3,6 F, usada em ultrassonografia intravascular, foi utilizada no presente trabalho para transmitir e receber pulsos ultra-sônicos.

Esta minissonda é constituída por dois conjuntos principais: o núcleo de imagem e o corpo do cateter. O núcleo de imagem contém um transdutor de ultrassom de 40 MHz, que irradia radialmente e está localizado na ponta distal do cateter. O corpo de cateter é formado pelas seções telescópica, lúmen proximal e lúmen distal. Essas duas seções de lúmen compõem o comprimento de trabalho (1,35 m) do cateter, tendo diâmetros externos de 1,18 mm (3,6 F) na região do transdutor e 0,83 mm (2,5 F) na seção distal.

Basicamente, a obtenção de imagens de US com o sistema de BMUe começa com o transdutor de US movimentando-se na forma de rotação, de 360° graus em torno do eixo do cateter que compõe a minissonda. Há um sistema eletromecânico de varredura constituído por um motor Dc com eixo acoplado a um codificador óptico, conforme ilustrado na Figura III.6.

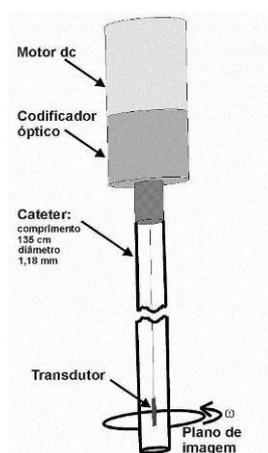


Figura III.6 - Esquema do sistema de varredura para o BMUe.

Todo o sistema de BMUe, montado no Laboratório de Ultrassom (LUS), está ilustrado na Figura III.7.

O núcleo de imagem da minissonda, acionado mecanicamente por uma unidade de *motordrive* (MD5; Boston Scientific Corporation, Natick, MA), gira 360° em torno de seu próprio eixo e no interior do corpo do cateter, durante a geração de imagens de ultrassom de uma região plana, varrida circularmente, perpendicular ao eixo da minissonda.

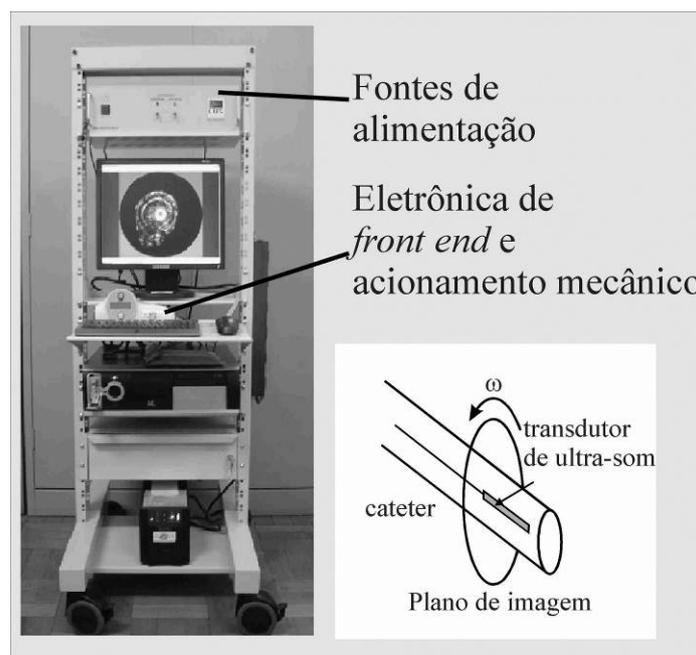


Figura III.7 - Foto do sistema de BMUe montado no LUS e contendo o sistema *front end* e de acionamento mecânico responsável pelo movimento do transdutor em torno do eixo do cateter conforme ilustrado na Figura III.6. O sistema ainda consiste de um microcomputador com placa de aquisição e fontes de alimentação.

A unidade *motordrive* também contém a eletrônica de *front-end* para excitar o transdutor de ultrassom e amplificar os sinais de eco recebidos que foram então enviados a um filtro passa-banda (25-70 MHz) e digitalizados por uma placa de conversão analógico/digital (A/D) de 8 bits e frequência de amostragem de 250 MHz, instalada em um microcomputador.

Os sinais de eco digitalizados foram processados pelo microcomputador que realizou a compressão logarítmica, a conversão de varredura e o armazenamento das imagens além da exibição das mesmas em um monitor de cristal líquido (LCD). Cada quadro de imagem, formado a partir de 256 linhas radiais do modo-A, foi apresentado numa taxa de 3,8 quadros/segundo. De acordo com a fabricante da minissonda, a mesma emite um pulso de ultrassom de 0,058 μ s de duração, que concede às imagens de BMUe uma resolução axial da ordem de 40 μ m [44]

Com exceção da minissonda e da unidade de *motordrive*, todas as demais partes do sistema BMUe relacionadas com *hardware* e programa de computador para controle de aquisição de dados, processamento e geração de imagens, foram concebidos e

implementados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Ultrassom do Programa de Engenharia Biomédica.

A) Grupo de animais

Foram utilizados 14 animais, todos alimentados com dieta própria para roedores, com aporte de água *ad libitum* e vivendo em biotério adequado.

Os animais, camundongos, foram distribuídos em dois grupos de acordo com a Tabela III.2 sendo o Grupo 1 formado por 4 animais controles e o Grupo 2 por 10 animais tratados de acordo com o mesmo protocolo AOM-DSS [6-8], descrito anteriormente na seção III.1, para a indução de tumor de colon. Durante os experimentos um camundongo controle morreu. Os animais foram pesados e avaliados diariamente durante o período de administração do DSS. Cerca de 20 semanas após a injeção de AOM, os animais foram sacrificados e seus cólons removidos para realização dos experimentos *in vitro*.

Tabela III.2 - Distribuição dos camundongos nos grupos controle e tratados (AOM-DSS)

<i>Background</i>	Grupos	
	1 (Ctrl*)	2 (Tratados**)
129/Svj		7
BALB/c	4	2
Black/6		1
Total	4	10

*Controle

**Protocolo AOM-DSS

B) Obtenção das imagens de BMUe das peças de colon, *in vitro*

Após o sacrifício do animal, foi realizada uma incisão mediana para expor as cavidades torácica e abdominal, assim como a região cervical. O cólon foi então identificado e retirado, desde o cecum até o ânus.

A peça de cólon foi lavada em água destilada, para a retirada de fezes remanescentes, e a extremidade junto ao cecum foi ocluída por sutura. A extremidade oposta foi fixada em um cateter e o conjunto submetido a uma coluna de água para manter o cólon distendido e imerso em um béquer contendo água na temperatura

ambiente. A minissonda de ultrassom foi inserida no lúmen do cólon preenchido com água para se realizar o acoplamento acústico entre o transdutor e a parede do órgão, como mostrado na Figura III.8.

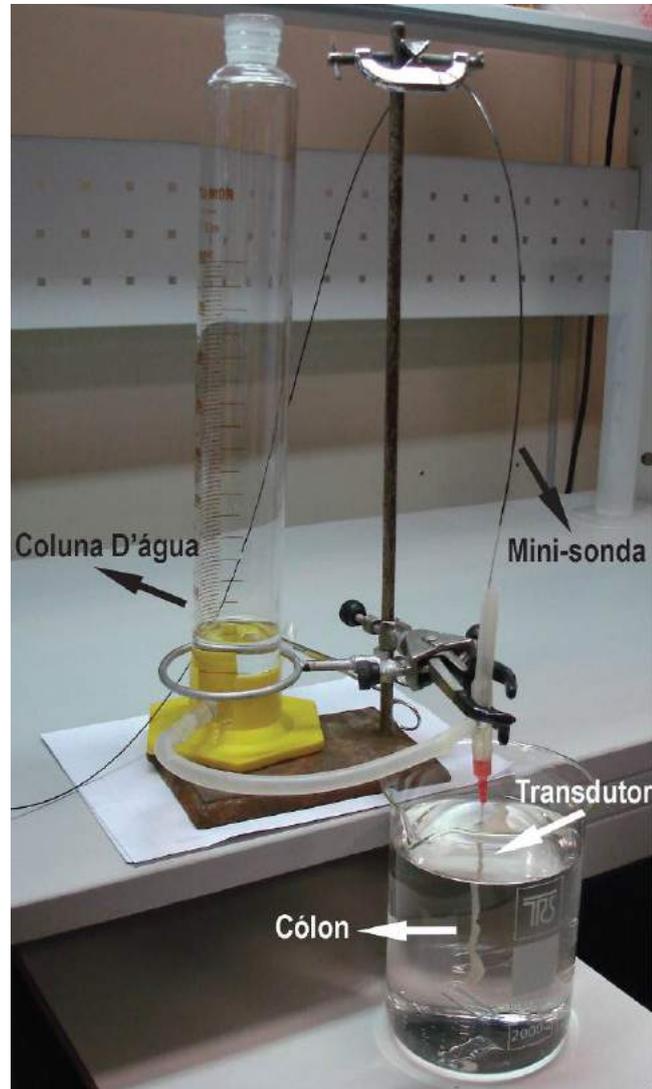


Figura III.8 - Foto do sistema de aquisição de imagem endoluminal do cólon de camundongo, *in vitro*. A peça de cólon é distendida pela ação da coluna d'água e a minissonda de ultrassom é inserida no cólon para realização do exame.

A Figura III.9 já apresenta, com mais detalhes, a montagem experimental contendo a peça de cólon imersa na água contida no béquer e presa, pela sua extremidade proximal, ao cateter que compõe a coluna de água.



Figura III.9 - Detalhes da montagem experimental contendo a peça anatômica do cólon de camundongo, imerso em água, e presa a um cateter que forma uma coluna de água. Observa-se a extremidade que foi ocluída por sutura e a outra, proximal, presa ao cateter por onde é inserida a minissonda de ultrassom.

As imagens de ultrassom foram adquiridas sequencialmente em um plano transversal à parede do cólon e ao longo do mesmo. O transdutor foi colocado próximo a região suturada da peça do cólon e em seguida foi iniciada a captura da sequência de imagens por toda extensão da peça, gerando o vídeo, que foi armazenadas em disco CD-ROM, para posterior análise. Depois dessa inspeção por ultrassom, as peças de cólon foram imersas em solução de formaldeído a 10% e utilizadas para a confecção das lâminas histológicas.

III.3. UTILIZAÇÃO DE BMUe PARA REALIZAÇÃO DE ESTUDOS *IN VIVO*

A BMUe foi realizada simultaneamente com a colonoscopia de luz branca, sendo que para isso a minissonda de ultrassom foi inserida no canal acessório de um broncofibroscópio flexível pediátrico (modelo FB 120-P; Fujinon, Tóquio, Japão). O broncofibroscópio tem um comprimento total de 920 mm e diâmetros externos de 2,8 e 2,7 mm para as partes flexíveis e distal-final, respectivamente. Seu canal acessório tem 1,2 mm de diâmetro.

O fabricante da minissonda sugere o uso de um cateter guia com diâmetro interno de 1,63 mm, maior portanto que o diâmetro do canal acessório broncofibroscópio. Para superar esta limitação, foi removido o cateter da minissonda que recobre o núcleo de imagem, cujo elemento principal é o transdutor de ultrassom de 40 MHz. Assim, apenas o núcleo de imagem, com diâmetro de 0,5 mm, foi introduzido no canal acessório broncofibroscópio.

O seção telescópica da minissonda foi usada para avançar e retrair o transdutor de ultrassom, localizado na ponta do núcleo, de forma a colocá-lo fora da extremidade distal do canal acessório e próximo da extremidade do broncofibroscópio, como mostrado na Figura III.10. Desta forma, as regiões de interesse para a obtenção das imagens de BMUe de colonoscopia ficaram coincidentes.

Durante a aquisição das imagens de BMUe e de colonoscopia, os animais foram anestesiados com isoflurano (Cristália, São Paulo, Brasil) na concentração de 1,5% em uma mistura com O₂ e numa vazão de 1,5 l/min, utilizando-se um sistema de anestesia inalatória apropriado para pequenos animais (EZ-7000; Euthanex, Palmer, PA, Estados Unidos), conforme mostrado na Figura III.11. Para realização dos exames, os camundongos ficaram em decúbito dorsal, na plataforma cirúrgica de aço-inox do sistema de anestesia, cuja temperatura foi controlada em 37° C usando-se o equipamento T/Pump System (Gaymar, Orchard Park, NY, Estados Unidos). A plataforma foi inclinada de 30 graus para que a cabeça do animal permanecesse elevada, facilitando o movimento das bolhas de ar presentes no cólon para sua parte descendente, afastando-se da extremidade do broncofibroscópio e com isto permitindo a obtenção das imagens de BMUe.

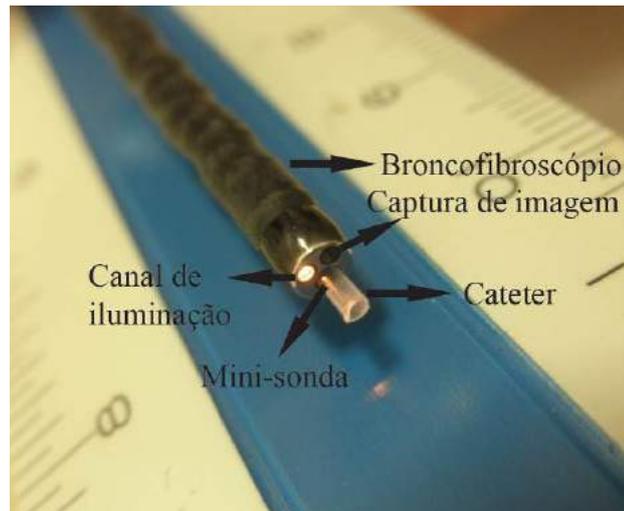


Figura III.10 - Extremidade do broncosfibroscópio evidenciando o canal de iluminação, o canal de captura da imagem óptica, o cateter da minissonda, passando pelo canal acessório do broncofibroscópio, contendo em seu interior o transdutor de ultrassom.

Antes da introdução retal do broncosfibroscópio contendo o transdutor de ultrassom, já com o animal posicionado, foi realizado um clister usando uma seringa de 1ml, para a limpeza do colon.



Figura III.11 - Foto que ilustra o exame de BMUe e de colonoscopia, *in vivo*, utilizando-se um sistema de anestesia inalatória.

Finalmente, as imagens BMUe e colonoscopia de luz de branca foram capturadas simultaneamente e armazenados toda vez que uma lesão foi detectada pela colonoscopia ou através da imagem de BMUe revelando uma anatomia modificada na

parede do cólon. Durante o procedimento, o cólon foi irrigado com água destilada injetada através do canal de irrigação da minissonda, para atuar como meio de acoplamento ultrassônico entre o transdutor e a parede do cólon e para evitar a presença de bolhas de ar ou fezes na área investigada.

Com este método de aquisição, *in vivo*, das imagens do cólon de camundongos foram realizados dois experimentos, ambos relacionados com o protocolo de AOM-DSS para a indução de tumor de colon, cujas metodologias serão abordadas nas próximas seções. No primeiro caso, foi realizada uma comparação para verificar a concordância das imagens de BMUe com a histologia e colonoscopia, e já no segundo caso foi feito um estudo longitudinal do desenvolvimento de lesão do cólon dos animais tratados segundo o protocolo de AOM-DSS.

III.3.1. Exames Simultâneos de BMUe e Colonoscopia, *in vivo*, e Análise Comparativa com a Histologia

A) Grupo de animais

O grupo de animais foi composto de dez camundongos, *Mus musculus* (Linnaeus, 1758), de background 129/Svj, com idade média (\pm um desvio-padrão) de 51,19 (\pm 9,24) semanas, de ambos os sexos e peso de 24g. Esses animais foram doados pelo Dr. Jean Wang da UCSD Cancer Center, e todos passaram pelo protocolo AOM-DSS.

B) Preparo das peças de cólon para análise histológica

Uma vez terminada a aquisição de imagens de BMUe e de colonoscopia, o camundongo anestesiado foi sacrificado por deslocamento cervical e o cólon distal foi retirados, limpo e fixado em formol a 4% durante 16 horas para a incorporação de parafina. Os tecidos incluídos em parafina foram seccionadas transversalmente (5 μ m) ao eixo longitudinal do cólon e corados com hematoxilina e eosina. Todas as amostras histológicas foram analisadas e comparadas com imagens obtidas das regiões do cólon onde uma mesma lesão havia sido observada com o BMUe e colonoscopia de luz branca.

III.3.2. Estudo Longitudinal do Desenvolvimento de Lesão do Cólon

A) Grupo de animais

No estudo longitudinal, *in vivo*, foram utilizados onze camundongos, *Mus musculus* (Linnaeus, 1758), de *background* 129/Svj, de ambos os sexos. Esses animais também foram doados pelo Dr. Jean Wang da UCSD Cancer Center, e todos passaram pelo protocolo AOM-DSS e pelos exames simultâneos de BMUe e de colonoscopia.

B) Obtenção das imagens *in vivo*

O protocolo para obtenção destas imagens foi desenvolvido objetivando o acompanhamento da evolução das lesões, sendo realizado com a obtenção simultânea das imagens de colonoscopia e de BMUe conforme citado anteriormente.

Os exames de aquisição das imagens foram feitos em três etapas: a primeira aquisição foi realizada entre 13 e 14 semanas após a injeção de AOM, a segunda entre 4 e 7 semanas após a primeira aquisição das imagens e a terceira 4 semanas após a segunda aquisição das imagens. Na Tabela III.3 tem-se a sequência da aquisição das imagens para cada um dos animais. Nem todos os animais foram inspecionados em três momentos distintos. Dois morreram antes da segunda aquisição e cinco antes da terceira aquisição.

Tabela III.3 - Relação entre os animais do experimento e a sequência de aquisição das imagens simultâneas de BMUe e de colonoscopia

Animal	Aquisição das imagens de BMUe e de colonoscopia		
	Semanas após início do protocolo AOM-DSS		
	Primeira aquisição	Segunda aquisição	Terceira aquisição
1	13	---	---
2	13	---	---
3	13	18	---
4	13	20	---
5	13	20	---
6	13	20	---
7	13	20	---
8	13	17	21
9	13	17	21
10	13	20	24
11	13	17	21

III.4. RESUMO DA DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS NOS GRUPOS DE EXPERIMENTOS.

Conforme descrito anteriormente, duas etapas compõem esta metodologia, os experimentos *in vitro* e *in vivo*. A distribuição de todos os animais em seus respectivos Grupos utilizados nesta Tese, assim como as etapas dos experimentos foram ilustradas na Figura III.12.

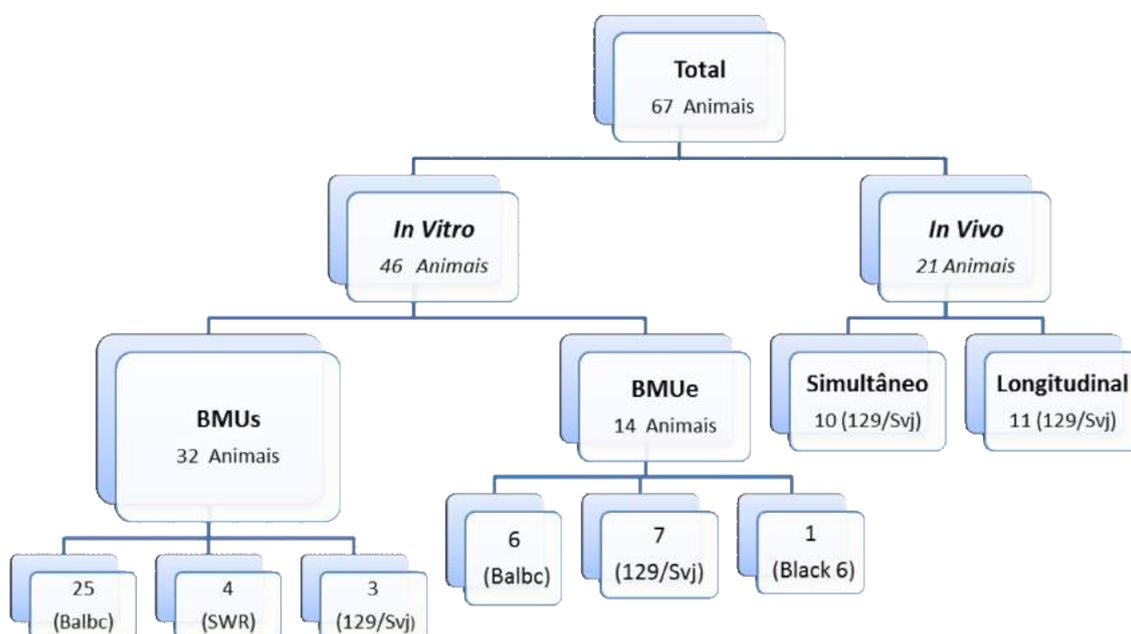


Figura III.12 – Ilustração contendo o fluxograma resumido da distribuição dos animais nos Grupos e as etapas dos experimentos.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

IV.1. IMAGENS OBTIDAS *IN VITRO*

IV.1.1. Resultados com o BMUs

Nesta seção são apresentadas as imagens de BMUs juntamente com a histologia correspondente. Na Figura IV.1 está a imagem de BMUs do cólon de um camundongo saudável, cuja estrutura anatômica das camadas ao longo de todo o segmento é bastante semelhante a dos humanos, incluindo a mucosa, a muscular da mucosa, a submucosa e muscular externa [26]. Na imagem de BMUs, a primeira camada mais superficial e hiperecótica é a mucosa, seguida pela segunda camada hipoeecótica correspondente à muscular da mucosa. A terceira camada, hiperecótica, é a submucosa, seguida pela muscular externa, que é a quarta camada hipoeecótica. As vilosidades, assim como as 4 camadas identificadas na imagem de ultrassom, estão bem correlacionadas com a histologia. A linha hiperecótica horizontal, na parte inferior da imagem de ultrassom, corresponde à face superior da placa de safira.

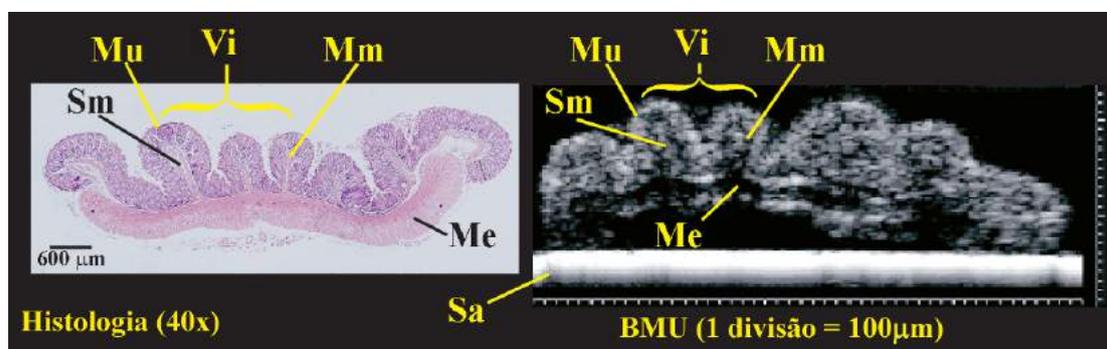


Figura IV.1 - Imagen de BMUs de uma peça de cólon normal aberto de camundongo, *in vitro*, e a histologia correspondente. Na parte superior da Figura de BMUs observam-se a camada mucosa (Mu) hiperecótica, a segunda camada hipoeecótica correspondente à muscular da mucosa (Mm), uma terceira camada hiperecótica referente à submucosa (Sm) e uma última camada hiperecótica que é a muscular externa (Me). As vilosidades (Vi) têm uma boa concordância entre as imagens de BMU e de histologia. A linha horizontal hiperecótica inferior na imagem de BMU corresponde à superfície refletora da safira (Sa).

As próximas três Figuras são exemplos de imagens contendo tumor de cólon. Nas Figura IV.2 e Figura IV.3 (corte transversal ao eixo do colon) e Figura IV.4 (corte longitudinal), juntamente com suas respectivas imagens histológicas. Na Figura IV.2 observa-se as vilosidades na extremidade esquerda e o tumor invadindo a parede intestinal até a submucosa.

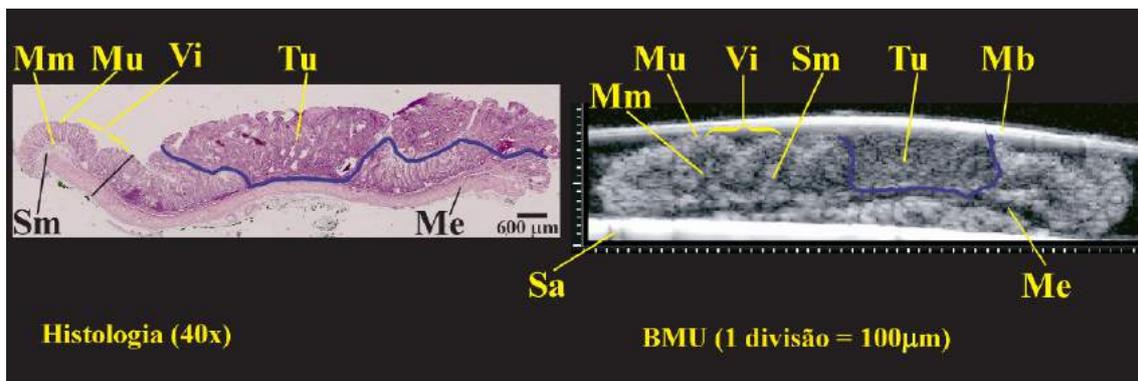


Figura IV.2 - Imagens de histologia e BMUs de cólon de camundongo com tumor (Tu). Observa-se a invasão do tumor até a camada hipocólica da muscular externa (Me), estando o mesmo cercado lateralmente por estruturas de cólon preservadas contendo as vilosidades (Vi), a mucosa (Mu) hiperecólica, a muscular da mucosa (Mm) hipocólica, a submucosa (Sm) hiperecólica e a camada muscular externa (Me). A imagem BMUs é bem correlacionada com a histologia, que confirmou a presença de um adenoma. As linhas hiperecólicas na parte inferior e superior da imagem de ultrassom correspondem à face da placa de safira (Sa) e à membrana de PVC (Mb), respectivamente.

Já na Figura IV.3 é observado um tumor invadindo completamente a parede do cólon até a muscular externa.

Por último, na Figura IV.4 tem-se o exemplo de uma imagem de BMUs de um tumor polipóide. Há uma excelente concordância entre as imagens de BMUs e as histologias correspondentes apresentadas nas Figura IV.2 e Figura IV.4 que revelaram a presença de diferentes tipos de tumores, como o adenoma, o adenocarcinoma e pólipos adenomatosos confirmados pela histologia.

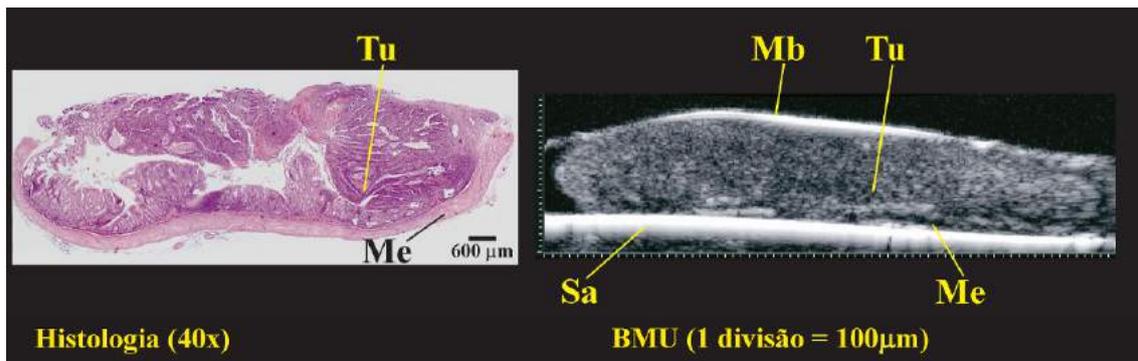


Figura IV.3 - Imagem de histologia e BMUs de cólon de camundongo com tumor (Tu) invadindo completamente a parede até a camada muscular externa (Me). Grande parte da estrutura do cólon foi destruída pelo tumor, e somente a camada muscular externa (Me) hipocóica está presente. Existe uma concordância entre a imagem de BMUs e a histologia, que confirmou a presença de um adenocarcinoma. As linhas hiperecóicas na parte inferior e superior da imagem de ultrassom correspondem à face safira (Sa) e à membrana de PVC (Mb), respectivamente.

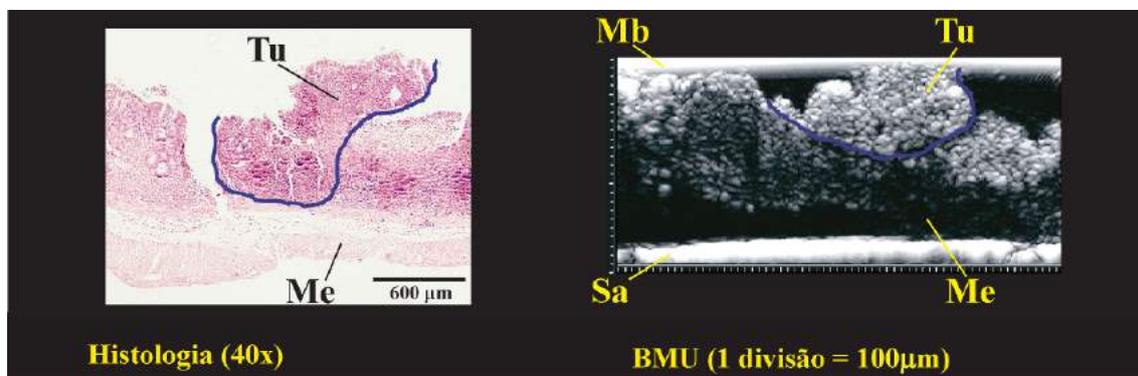


Figura IV.4 - Imagem BMUs do cólon do camundongo com um tumor formado como um pólip. Da mesma forma que na Figura IV.3, a estrutura do cólon está em grande parte destruída, e apenas a camada muscular externa (Me) hipocóica está presente. Existe uma concordância entre a imagem de BMUs e a histologia, que confirmou a presença de um pólip adenomatoso. As linhas hiperecóicas na parte inferior e superior da imagem de ultrassom correspondem à face safira (Sa) e à membrana de PVC (Mb).

Uma imagem endoscópica do cólon do mesmo animal analisado na Figura IV.4 é mostrada na Figura IV.5, confirmando a presença de pólipos.

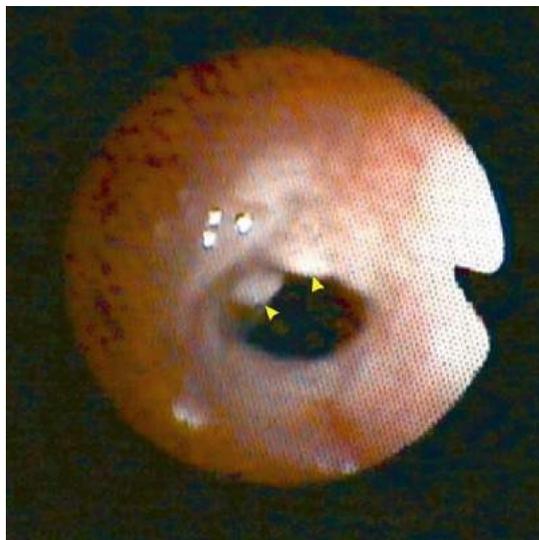


Figura IV.5 - Imagem endoscópica do cólon do mesmo animal analisado na Figura IV.4. As cabeças de setas indicam os pólipos

Na Figura IV.1 não aparece a linha horizontal hiperecótica na parte superior da imagem de BMUs porque parte do filme sobre o local de imagem de amostra foi removido.

Várias imagens de BMUs correspondentes a planos de varredura paralelos entre si e ao eixo longitudinal do cólon de um mesmo animal são apresentadas simultaneamente na Figura IV.6 onde o prolongamento da lesão (formado por pólipos) ao longo da superfície do cólon é notado na sequência de imagens.

Uma última imagem de BMUs, apresentada na Figura IV.7 juntamente com a histologia correspondente, refere-se a uma hiperplasia linfóide no cólon de um animal do grupo controle. A imagem endoscópica correspondente é apresentada na Figura IV.8.

Os resultados envolvendo detecção de lesão do cólon com base nas imagens de BMUs e de colonoscopia são resumidos na Tabela IV.1, juntamente com os achados histopatológicos, para os animais tratados e controle.

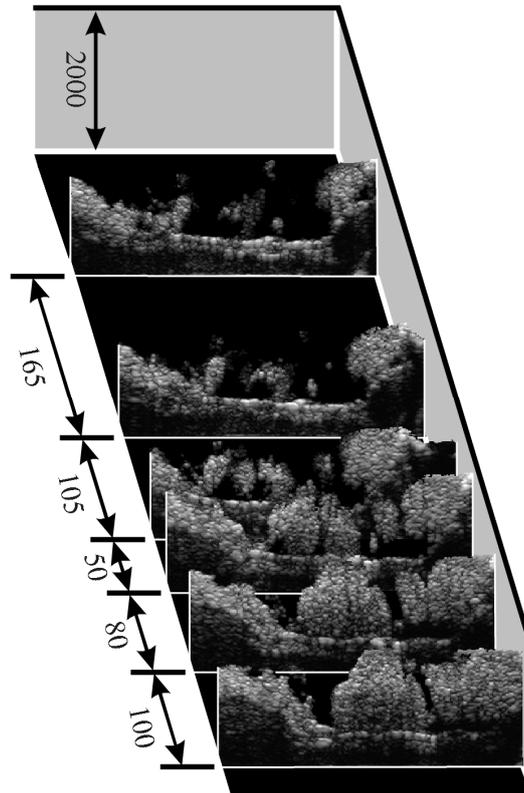


Figura IV.6 - Imagem de BMUs referente a planos longitudinais da amostra de cólon com varredura paralela, do mesmo animal analisado na Figura IV.4. A prolongação da lesão (formada pelo pólip) ao longo da superfície de cólon é notada na sequencia de imagens. Todas as dimensões de distância vertical e entre planos de imagem estão em μm .

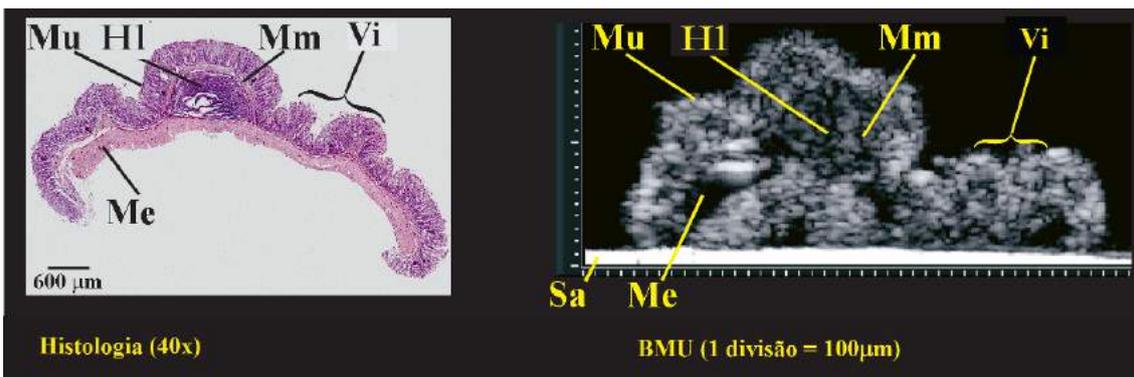


Figura IV.7 - Imagem de BMUs do cólon de camundongo do grupo controle com uma hiperplasia linfóide (HI). As vilosidades (Vi), a camada mucosa (Mu) hiperecótica, a muscular da mucosa (Mm) hipoeecótica e a camada muscular externa (Me) hipoeecótica estão presentes. A linha hiperecótica na parte inferior da imagem de ultrassom corresponde à face safira (Sa).

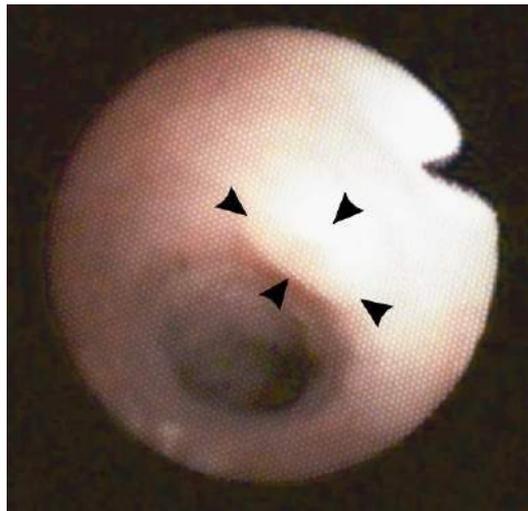


Figura IV.8 - Imagem colonoscópica do cólon do mesmo animal analisado na Figura IV.7. A parede saliente, causada pela hiperplasia linfóide, está rodeada por quatro cabeças de setas.

Os resultados da BMUs e da colonoscopia estão classificados em duas categorias: detectado e não-detectado. Não foi possível a classificação do tipo de lesão, como sendo hiperplasia linfóide ou tumores malignos e benignos, com base nas imagens de BMUs e da colonoscopia. Ambos os métodos de imagem falharam com alguns animais, conforme marcado na coluna de observação, devido à má qualidade da imagem durante a inspeção por BMUs ou pelo excesso de fezes ou hemorragia durante a colonoscopia. Os resultados do padrão-ouro, obtido a partir de histopatologia, também são apresentados e classificados como hiperplasia linfóide, tumor de cólon e cólon normal (lesão não detectada).

Resultados com o BMUe

Todos os quadros de imagem de BMUe para cada peça de cólon usada nos experimentos foram inspecionados visualmente para a identificação e seleção das regiões suspeitas de lesão. As regiões com alterações anatômicas nas imagens de BMUe foram selecionadas e processadas para obtenção das lâminas histológicas. As imagens de BMUe e de histologia das mesmas regiões na peça de cólon foram utilizadas em um estudo comparativo com vistas ao estabelecimento de concordância entre as lesões visualizadas nas imagens de ultrassom e a histologia. Exemplos dos resultados onde houve a concordância entre as imagens de BMUe e de histologia são mostrados nas Figura IV.9 e Figura IV.10, sendo que a primeira delas refere-se ao cólon normal

(animal controle) e a segunda ao cólon de um animal tratado com AOM-DSS. Neste caso não houve tumor presente, mas sim uma hiperplasia linfóide. Os resultados obtidos com a BMUe *in vitro* deram suporte para sustentar a viabilidade de se usar a BMUe *in vivo* para o diagnóstico de doenças relacionadas ao colón. Os resultados correspondentes são apresentados a seguir.

Tabela IV.1 - Resultados da detecção da lesão obtidas através das imagens de BMUs, da colonoscopia e da histopatologia.

Animais		Detecção da Lesão						Análise histológica		
		BMUs			Colonoscopia			Hl	Tu	Nr
#	Background	Sim	Não	Obs ¹	Sim	Não	Obs ²			
Tratados										
1	BALB/c	✓			✓			✓		
2	BALB/c	✓					✓	✓	✓	
3	BALB/c	✓					✓		✓	
4	BALB/c	✓			✓			✓		
5	BALB/c			✓	✓			✓		
6	BALB/c	✓			✓			✓		
7	BALB/c	✓			✓			✓		
8	BALB/c	✓			✓			✓		
9	BALB/c		✓			✓				✓
10	BALB/c	✓			✓			✓		
11	BALB/c		✓			✓				✓
12	SWR	✓			✓			✓		
13	SWR	✓			✓			✓	✓	
14	129*			✓			✓	✓	✓	
15	129*			✓			✓		✓	
16	129*			✓	✓				✓	
Controles										
1	BALB/c	✓				✓		✓		
2	BALB/c	✓				✓		✓		
3	BALB/c	✓			✓			✓		
4	BALB/c	✓			✓			✓		

*129/Svj: heterozigoto para supressor do *p53* (*p53*^{+/-})

Obs¹: qualidade de imagem ruim

Obs²: impossível examinar devido à presença de fezes ou hemorragia

Hl: Hiperplasia Linfóide, Tu: tumor, Nr: normal

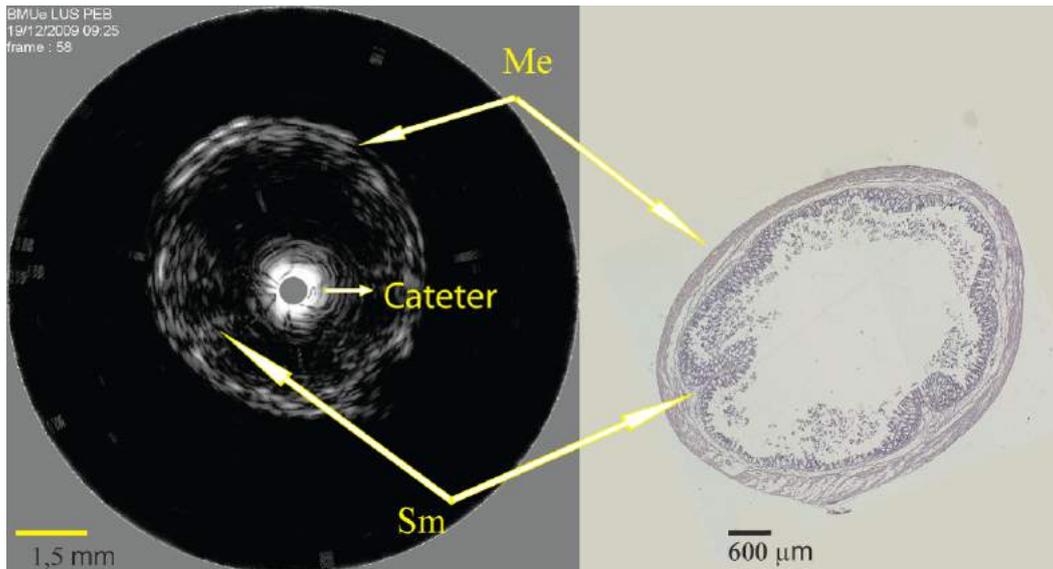


Figura IV.9 - Comparação entre as imagens obtidas através da BMUe (esquerda), obtida *in vitro*, e da análise histológica (direita) do cólon de camundongo sem lesão (grupo controle). Observam-se as camadas do cólon: mucosa (Mu), submucosa (Sm) e muscular externa (Me). A região central na imagem de BMUe corresponde à minissonda de ultrassom.

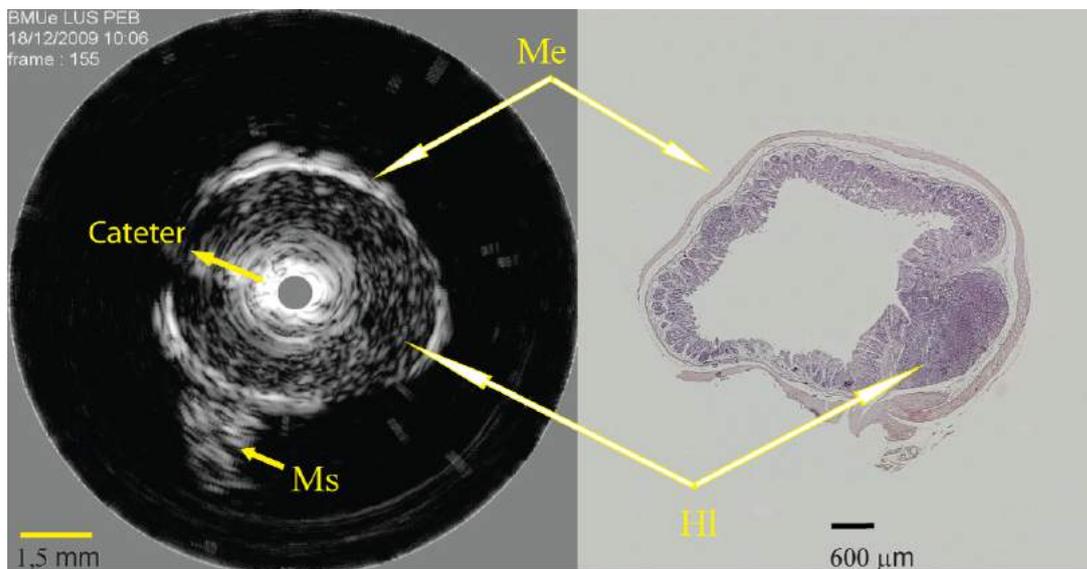


Figura IV.10 - Comparação entre as imagens obtidas através da BMUe (esquerda) e da análise histológica (direita) do cólon de camundongo tratado com AOM-DSS. Nesta comparação evidencia-se o mesoentério (Ms, camada que é bastante hiperecótica na imagem de ultrassom). Observa-se hipocogenicidade na região da lesão, devido à presença de uma presença de uma hiperplasia linfóide e na camada muscular externa (Me).

IV.2. IMAGENS OBTIDAS *IN VIVO*

IV.2.1. Exames simultâneos de BMUe e colonoscopia e análise comparativa com a histologia

Os dez animais tratados com protocolo AOM-DSS foram examinados por colonoscopia de luz branca e pelo sistema de BMUe. As imagens da colonoscopia e de BMUe foram capturadas simultaneamente dos animais vivos.

Todas as alterações da mucosa encontradas por estas duas técnicas, assim como as alterações anatômicas no interior da parede do cólon encontradas pela BMUe, foram comparados com histologia *post mortem*. A Tabela IV.2 resume e compara os achados obtidos com a BMUe, a colonoscopia de luz branca e a histologia. A BMUe e histologia foram capazes de detectar espessamento da mucosa, o que não foi identificado pela colonoscopia. A lesão detectada em cada animal recebe a denominação Li-j, onde o primeiro índice, i, refere-se ao número da lesão e o segundo, j, ao número do animal. Pode-se observar que mais de uma lesão foi detectada em alguns dos animais.

A Figura IV.11 apresenta um exemplo de imagens de BMUe imagem e de colonoscopia de luz branca, juntamente com a histologia correspondente de uma área normal do cólon de camundongo. Na imagem de BMUe é possível observar cinco camadas do colon, a partir do lúmen para a camada exterior: a mucosa, seguida pela muscular da mucosa (hipoecóica), pela submucosa (hiperecóica), pela muscular externa (hipoecóica) e pela serosa (hiperecóica). Todas as vilosidades são correlacionadas com a histologia da mesma seção.

Tabela IV.2 - Resultados das alterações detectadas com os exames simultâneos de BMUe e colonoscopia de luz branca comparados com os laudos de histopatologia.

Animais 129/Svj		Resultados								
#	Lesão	BMUe			Colonoscopia			Análise histológica		
		Sim	Não	Obs ¹	Sim	Não	Obs ²	HI	Tu	AM
1	L1-1	✓				✓				✓
1	L2-1	✓			✓				✓	
2	L1-2		✓			✓		✓		
2	L2-2	✓			✓				✓	
2	L3-2	✓			✓				✓	
3	L1-3	✓			✓				✓	
4	L1-4	✓			✓			✓		
4	L2-4	✓			✓				✓	
5	L1-5	✓			✓			✓		
5	L2-5	✓			✓				✓	
6	L1-6	✓			✓			✓		
7	L1-7	✓				✓	✓	✓		
7	L2-7	✓			✓			✓		
7	L3-7	✓			✓				✓	
8	L1-8	✓			✓			✓		
9	L1-9	✓			✓			✓		
10	L1-10	✓				✓				✓
10	L2-10	✓			✓				✓	
10	L3-10	✓			✓				✓	

129/Svj: heterozigoto para supressor do *p53* (*p53*^{+/-})

Observações: 1- qualidade de imagem ruim

2- impossível examinar devido à presença de fezes ou hemorragia

HI: hiperplasia linfóide,

Tu: tumor

AM: aumento da espessura da mucosa

A maioria das lesões encontradas foi de hiperplasia linfóide ou adenoma. A Figura IV.12 contém um exemplo da hiperplasia linfóide representada por uma área hipocóica na imagem BMUe, que se projetou da camada mucosa para o lúmen. A colonoscopia não conseguiu evidenciar a lesão neste caso.

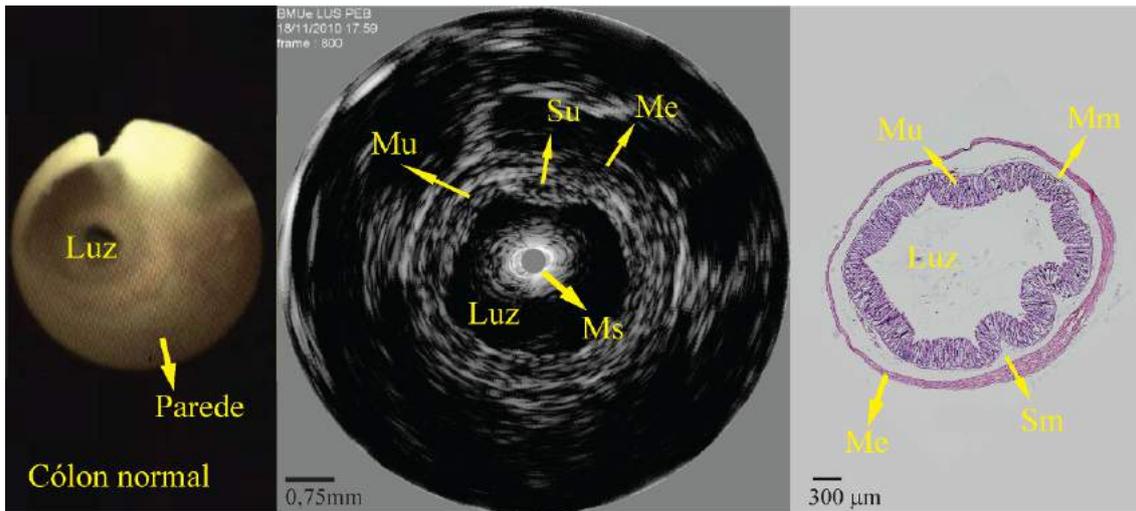


Figura IV.11 - Comparação entre as imagens obtidas através da BMUe (esquerda), da análise histológica (centro) e da colonoscopia (direita) do cólon de camundongo sem lesão (animal 6). Observam-se as camadas do cólon: mucosa (Mu), Muscular da mucosa (Mm), submucosa (Sm), e muscular externa (Me). A região central na imagem de BMUe (Ms) corresponde à minissonda .

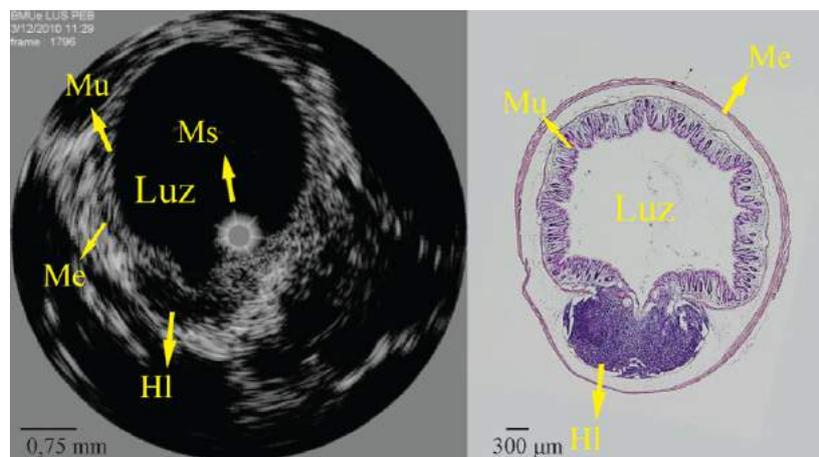


Figura IV.12 - Comparação entre as imagens obtidas através da BMUe (esquerda) da análise histológica (direita) do cólon de camundongo (animal 7) com um hiperplasia linfóide (HI). Observam-se as camadas do cólon: mucosa (Mu), e muscular externa (ME). A região central na imagem de BMUe corresponde à minissonda

Sete animais desenvolveram tumores de cólon, a maioria deles diagnosticada como adenomas e que são representados na imagem BMUe por uma área de hiperecótica. Na Figura IV.13 pode-se observar um adenocarcinoma, confirmado pela histologia, invadindo a submucosa. Este padrão de imagem para tumores é diferente

daquele de outro tipo de lesões, como o HI mostrado na Figura IV.12 e representado por uma região hipoecóica.

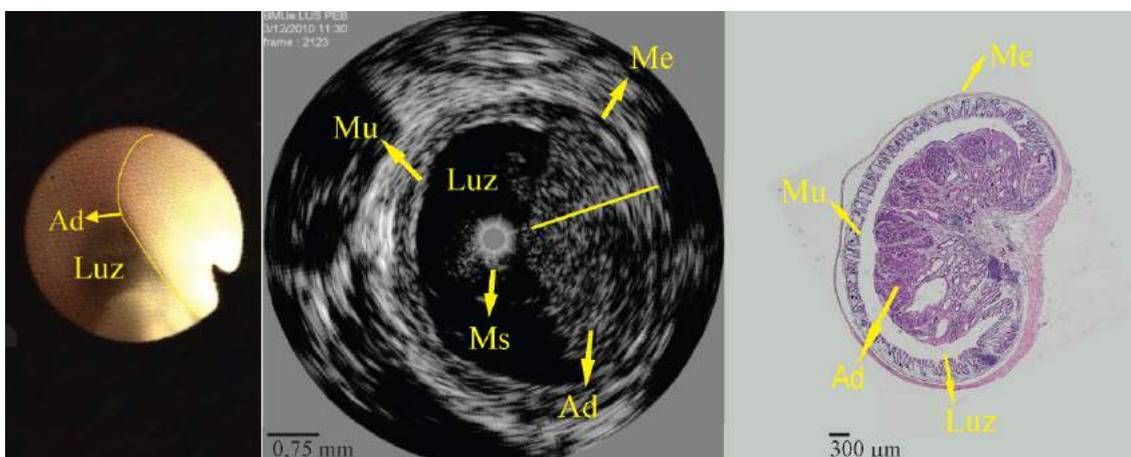


Figura IV.13 - Imagens de BMUe (esquerda), histológica (centro) e colonoscópica (direita) do cólon de camundongo (animal 7) com um adenocarcinoma (Ad) ocupando quase metade da luz. As camadas do cólon presentes nas imagens são: mucosa (Mu) e muscular externa (Me). A região central na imagem de BMUe corresponde à minissonda.

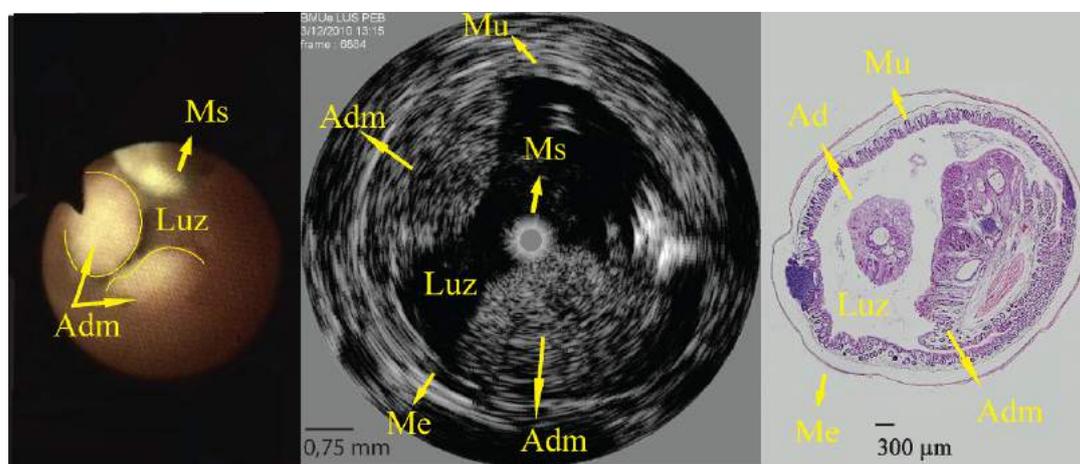


Figura IV.14 - Imagens e BMUe (esquerda), da análise histológica (centro) e de colonoscopia (direita) do cólon de um camundongo com dois adenomas (Adm). Observam-se as camadas do cólon: mucosa (Mu), e muscular externa (Me). A região central na imagem de BMUe corresponde à minissonda (Ms).

A colonoscopia de luz branca não é capaz de diferenciar um carcinoma invasivo de um tumor benigno. Por outro lado, as imagens BMUe mostram uma interrupção da

submucosa, destacado pela linha amarela, indicando uma invasão tumoral na camada adjacente, o que pode ser um indicativo da presença de um tumor maligno.

Entre todos os camundongos analisados, houve uma concordância positiva entre o diagnóstico obtido com BMUe e colonoscopia com o exame histológico das lesões.

Para o animal 2 verifica-se o único caso em que não foi possível a detecção de lesão pela BMUe, a qual foi confirmado como uma hiperplasia linfóide pela análise histológica, conforme os resultados da Tabela IV.1. Todas as demais lesões foram perfeitamente detectadas pela BMUe. Na Figura IV.14 tem-se a presença de duas lesões protrusas nitidamente delineadas pelo BMUe. Estes resultados sugerem que a BMUe é uma valiosa ferramenta a ser utilizada como método auxiliar de diagnóstico para doenças do cólon. Após a confirmação da possibilidade de exames simultâneos de BMUe e colonoscopia, foi possível o monitoramento de lesão de cólon por meio do estudo longitudinal cujos resultados são apresentados a seguir.

IV.2.2. Exames simultâneos de BMUe e colonoscopia para estudo longitudinal da progressão de lesão de cólon

O monitoramento das lesões foi realizado de forma periódica em três momentos distintos, compreendendo três séries de aquisições (1^a, 2^a, 3^a) das imagens com os intervalos entre elas descritos na Tabela IV.3. Todas as imagens de cada uma das séries de cada animal foram inspecionadas visualmente para a identificação e a separação de sequências de imagens de uma mesma lesão e de uma mesma série. As sequências correspondentes em cada uma das séries foram identificadas, visualmente e com a ajuda das imagens de colonoscopia que serviram de guia na identificação das lesões, e de cada sequência foi escolhida a imagem com a lesão mais pronunciada. Um dos resultados obtidos com esta operação está apresentado na Figura IV.15, onde se observam as três imagens de uma mesma lesão no cólon de um mesmo animal, obtidas em momentos distintos.

Os onze animais desenvolveram lesões e à exceção de dois deles possível monitorar a evolução das lesões com BMUe para os animais que não morreram antes da segunda aquisição. Os achados com a BMUe, comparados com o laudo da colonoscopia, estão descritos na Tabela IV.3.

Dos resultados apresentados na Tabela IV.3 pode-se observar que algumas lesões permaneceram inalteradas, enquanto outras tiveram crescimento.

Adicionalmente, para as lesões L1-8, do animal #8, e L1-9, do animal #9, houve uma regressão. No caso da lesão e L1-9, o laudo da colonoscopia para a primeira aquisição foi lesão deprimida, já na terceira aquisição foi normal, confirmando a regressão desta lesão, o que foi previamente constatado pelos exames de BMUe, a análise histológica também não identificou nenhuma lesão. No caso da L1-8, observamos regressão no BMUe, portanto não foi identificada regressão pela colonoscopia por ter sido uma regressão de intensidade leve. A Figura IV.16 apresenta a sequência de três imagens de BMUe do cólon do animal #9.

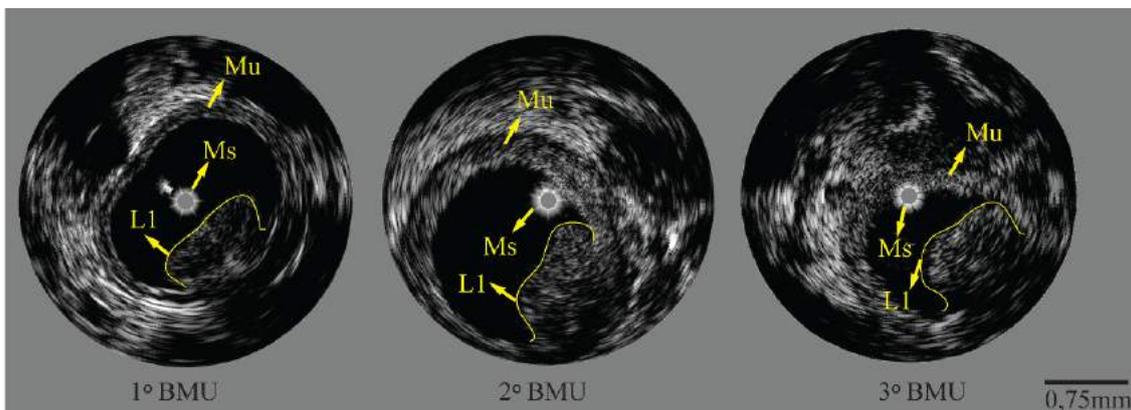


Figura IV.15 - Três imagens de BMUe de uma mesma lesão do cólon (animal 10 L1) obtidas em momentos distintos. A lesão L1 foi delimitada de amarelo e o Ms representa a minissonda, também podemos observar a mucosa (Mu).

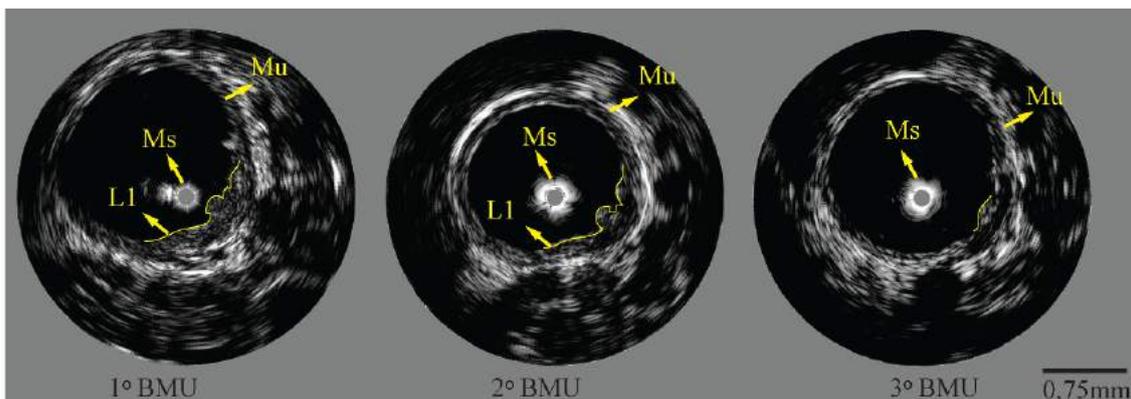


Figura IV.16 - Três imagens de BMUe de uma mesma lesão do cólon de um animal obtidas em momentos distintos, evidenciando-se a regressão da lesão, na primeira e na segunda imagem a lesão foi delimitada por amarelo L1, na terceira temos a região normal com uma pequena elevação. A mucosa (Mu) e a minissonda (Ms) também foi evidenciado.

Tabela IV.3 - Resultados da progressão das lesões detectadas com os exames de BMUe, entre 1ª e 2ª aquisições (entre barras laterais duplas) e entre 1ª, 2ª e 3ª aquisições (entre barras laterais triplas)

Animais		Detecção						Progressão e classificação da lesão					
129/Svj		BMUe			Colonoscopia			Aquisições: 1ª para 2ª () 1ª para 2ª para 3ª ()			Classificação		
#	Lesões	Sim	Não	Obs ¹	Sim	Não	Obs ²	↑	↓	=	IL	M	A
1	L1-1	✓			✓								
2	L1-2	✓					✓						
3	L1-3	✓			✓			✓				✓	
	L2-3	✓			✓			✓			✓		
4	L1-4	✓			✓			✓			✓		
	L2-4	✓			✓					✓			
	L3-4	✓			✓			✓				✓	
	L4-4	✓			✓			✓				✓	
5	L1-5	✓			✓			✓			✓		
	L2-5	✓					✓	✓				✓	
6	L1-6	✓			✓			✓					✓
	L2-6	✓			✓			✓					✓
	L3-6	✓				✓				✓			
	L4-6	✓				✓				✓			
7	L1-7	✓				✓				✓			
	L2-7	✓					✓	✓					✓
8	L1-8	✓			✓				✓		✓		
	L2-8			✓	✓			✓				✓	
	L3-8	✓				✓				✓			
9	L1-9	✓			✓				✓				✓
10	L1-10	✓			✓			✓				✓	
	L2-10	✓			✓			✓				✓	
	L3-10	✓		✓				✓					✓
11	L1-11		✓		✓								

Obs¹: impossível examinar devido à presença de fezes ou hemorragia

Obs²: qualidade de imagem ruim

Lesão aumentou (↑)

Lesão diminuiu (↓)

Lesão permaneceu inalterada (=)

IL: Intensidade Leve

M: moderada

A: acentuada

CAPÍTULO V

DISCUSSÃO

Nesta tese foi utilizado o US de alta frequência na visualização do cólon de camundongo. Os dois sistemas de biomicroscopia ultrassônica utilizados, BMUs e BMUe, possuem resoluções axial e lateral da ordem de 30 e 100 μm , respectivamente, no foco e uma profundidade de penetração e contraste de imagem adequados para visualização ao longo da espessura total do cólon do camundongo normal e com lesões. As camadas do cólon sadio identificadas foram: mucosa, muscular da mucosa, submucosa e muscular externa. Os tumores foram visualizados como uma região com ausência de estruturas epiteliais observadas em um de cólon sadio. Folículos linfóides foram também visualizados como uma região hipoeecóica e para as lesões do tipo hiperplasia linfóide, a imagem BMUs correspondente, como na Figura IV.7, revela a presença de uma camada hipereecóica referente à mucosa e a lesão logo abaixo, o que é confirmado pela histologia.

Portanto, a visualização da camada mucosa nas imagens de BMU pode ser uma diferenciação entre a detecção de lesões epiteliais e sub-epiteliais, que por sua vez, pode apoiar na decisão de tratamento como a polipectomia, no primeiro caso, e avaliação clínica no segundo.

Entre as ferramentas de seleção atual para diagnóstico de câncer colorretal, o padrão ouro ainda é a colonoscopia, que é considerada como o método mais sensível para detectar o câncer colorretal e pólipos adenomatosos [1]. No entanto, da mesma forma que com a cromoendoscopia, a microscopia confocal e outros métodos de imagem, ela só fornece a visualização da superfície da mucosa. Há ainda um desafio para medir a profundidade da invasão da submucosa por uma lesão, apesar de um esforço feito nos últimos anos para implementar novos métodos não-invasivos com essa finalidade. Os trabalhos de Hurlstone *et al.* [45, 46] mostram que a colonoscopia de alta resolução com cromoscopia pode definir o estágio da neoplasia colorretal com uma sensibilidade e precisão global máxima de 78%, quando usado em pacientes com câncer de Paris II tipo plano. Considerando os resultados resumidos na Tabela IV.1 e desprezando uma imagem ultrassom com má qualidade, o sistema BMUs forneceu uma sensibilidade de 100% onde foi considerada a detecção da lesão. Por outro lado, os exames de colonoscopia forneceram resultados falso-negativos para os animais # 1C e

2C, cujas lesões estavam abaixo da mucosa.

Em relação aos resultados desta tese, as imagens BMUs fornecem informações sobre o tamanho e penetração da lesão tanto para hiperplasia quanto para tumor linfóide. Por exemplo, os tumores nas imagens apresentadas nas Figura IV.2 e Figura IV.3 penetraram além da camada submucosa e esta informação é muito difícil de ser obtida com precisão com técnicas mais sensíveis, tais como a colonoscopia de alta resolução com cromoscopia [46]. Portanto, a técnica BMU pode contribuir para determinar o prognóstico na parede do intestino grosso, através da identificação da profundidade de penetração do tumor. Uma vez que o tumor de cólon seja diagnosticado em um estágio inicial, um melhor prognóstico pode ser alcançado. A escolha da melhor terapia para tumores de cólon depende da sua localização, profundidade de invasão da parede e do estágio clínico. Por exemplo, tumores pequenos confinados no revestimento do cólon ou do reto podem ser tratados por ressecção e as chances de desenvolvimento de câncer são eliminados [1]. Em comparação com outras tecnologias de imagem para pequenos animais, o sistema BMU tem como vantagens a rapidez em fornecer uma imagem, a simplicidade de uso e a portabilidade. Ultrassonografia de alta frequência de intestino grosso pode não só melhorar a acurácia do diagnóstico diferencial entre lesões tumorais e não-tumoral, mas também permitir a avaliação da profundidade de penetração no tumor em estágio inicial.

A evolução do equipamento para o BMUe permitiu que fossem detectadas alterações na estrutura da mucosa intestinal por meio obtenção de imagens circulares (*in vitro*), e a comparação com as imagens obtidas com a histologia. Observou-se que a BMUe foi eficiente na detecção das lesões do cólon evidenciadas pela histologia, assim como o espessamento da mucosa e a presença de hiperplasias linfóides. Considerando-se o fato de que na literatura científica não foram encontrados muitos relatos da utilização de BMUe para a detecção de lesões intestinais de murinos, os padrões de imagens de BMUe ainda necessitavam de uma definição e neste caso ressalta-se a importância da utilização, *in vitro*, da BMUe. Neste caso, o uso *in vitro* serviu de parâmetro para consolidar a perspectiva de desenvolver esta modalidade de imagem de diagnóstico, visando sua aplicação no trato gastrointestinal de modelos camundongos, tanto para doenças inflamatórias intestinais ou neoplásicas.

É importante salientar que existem variados protocolos de geração de câncer em camundongos [40]. Nas duas últimas décadas, modelos murinos de CCR têm fornecido um conhecimento detalhado da histopatologia, e processos moleculares de progressão

do CCR têm contribuído para o entendimento do CCR em humano [47]. Portanto, a avaliação desses modelos por meio de BMUe se torna perfeitamente justificável e aplicável. A obtenção de resolução adequada com as dimensões da parede do tubo digestivo do animal foi de fundamental importância para servir de base em estudos futuros de progressão das lesões e de estratégias de tratamento do CCR, principalmente porque este modelo permite a obtenção de estudos e monitoramento *in vivo*.

Os estudos *in vivo* com a BMUe aplicados em modelos de CCR em camundongos comprovam mais uma vez a capacidade desta instrumentação na análise deste modelo animal. Adicionalmente, a inspeção simultânea do cólon por BMUe e colonoscopia viabilizou de fato o estudo preliminar do monitoramento periódico da lesão, com a vantagem de ser realizado de forma dinâmica, que nesta tese foi denominando estudo longitudinal do cólon de camundongos com indução de tumor por AOM-DSS. Os resultados comprovam que esta análise periódica possibilitou uma avaliação qualitativa da evolução das lesões encontradas. Observou-se também que o protocolo pode ser ajustado de modo que a observação seja realizada precocemente, isto é antes de treze semanas, e com acompanhamentos periódicos de intervalos menores para a observação de instalação da lesão e da velocidade de crescimento das mesmas. Além disso, um aprimoramento na forma de execução dos exames com o BMUe, isto é determinação de parâmetros tais como medições no cólon para determinação exata de região estudada, isto permitiria uma análise mais precisa de cada lesão, e do colón de maneira geral. Todas estas adaptações resultariam em um protocolo quantitativo de monitoramento mais robusto da evolução da lesão.

No diz respeito ao BMU, temos algumas limitações, penetração devido as altas frequências utilizadas necessidade de meio a acoplamento para propagação US, mas nenhuma dessas limitações impediram a realização destes protocolos.

É importante destacar que não foram encontrados relatos científicos deste modelo de avaliação, com instrumentação de BMUe com resoluções adaptadas para modelos animais de câncer colón retal, o que evidencia a importância do trabalho executado.

O objetivo deste trabalho foi contribuir com uma metodologia de utilização da BMUs e da BMUe, para explorar modelos de desenvolvimento de lesões de cólon, *in vitro* e *in vivo* de forma reprodutível e factível. Com isto, trabalhos futuros podem desenvolver ainda mais o potencial da técnica de diagnóstico precoce de lesões planas e deprimidas em cólon de camundongos com a BMUe, assim como de determinação da

profundidade das lesões e isto permitiria uma avaliação de estadiamento dos tumores. Esta avaliação mais precisa dos tecidos com uma técnica de imagem não invasiva pode resultar em uma oportunidade única para desenvolver estudos randomizados e estudos de coorte focando estratégias de tratamento inovador para câncer colorretal.

CAPÍTULO VI

CONCLUSÕES

1. Os sistemas de BMUs e BMUe, operando em 45 e 40 MHz, respectivamente, foram adequados para a obtenção de imagem da parede de cólons de camundongos, tratados e não tratados com AOM-DSS. A técnica de BMU foi capaz de gerar uma imagem contendo os detalhes morfológicos do cólon normal, incluindo as camadas mucosa, muscular da mucosa, submucosa e a camada muscular externa. Para o cólon com lesões do tipo hiperplasia linfóide e tumores, as mesmas foram observadas nas imagens BMU e uma diferenciação entre lesões epiteliais e sub-epiteliais foi possível através da visualização da camada mucosa hiperplásica quando hiperplasia linfóide estava presente.
2. A invasão da lesão tumoral através do cólon foi possível de ser visualizada a partir das imagens. O sistema de BMUs foi capaz de detectar não só as camadas da parede intestinal mas também de identificar os tumores e determinar a localização dos mesmos na mucosa, na submucosa, etc. Além disso, o sistema BMUs foi capaz de discriminar pólipos de tumores invadindo até a camada muscular externa e essa capacidade de diagnóstico é uma vantagem em relação à colonoscopia.
3. Excluindo as amostras de cólon a partir do qual as imagens de ultrassom eram de má qualidade, todas as lesões detectadas pelo sistema BMUs foram confirmadas pela histologia.
4. O sistema de BMUe também foi utilizado para a detecção de lesões de cólon *in vivo*, juntamente com a colonoscopia. Os resultados obtidos *in vivo* demonstram a capacidade complementar da BMUe à colonoscopia, uma vez que a BMUe foi capaz de detectar lesões no interior da parede de cólon.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AMERICAN CANCER SOCIETY, 2011, "Colorectal Cancer Facts & Figures 2011-2013".
- [2] SPECHLER, S. J., 2001, "Screening and Surveillance for Complications Related to Gastroesophageal Reflux Disease", *Am. J. Med.*, v. 111 Suppl 8A, n. pp. 130S-136S.
- [3] HOFFMANN, K., JUNG, J., EL, G. S. *et al.*, 1992, "Malignant Melanoma in 20-MHz B Scan Sonography", *Dermatology*, v. 185, n. 1 pp. 49-55.
- [4] HUANG, E. H., CARTER, J. J., WHELAN, R. L. *et al.*, 2002, "Colonoscopy in Mice", *Surg. Endosc.*, v. 16, n. 1 pp. 22-24.
- [5] BECKER, C., FANTINI, M. C., and NEURATH, M. F., 2006, "High Resolution Colonoscopy in Live Mice", *Nat. Protoc.*, v. 1, n. 6 pp. 2900-2904.
- [6] HEIJSTEK, M. W., KRANENBURG, O., and BOREL RINKES, I. H., 2005, "Mouse Models of Colorectal Cancer and Liver Metastases", *Dig. Surg.*, v. 22, n. 1-2 pp. 16-25.
- [7] PAPANIKOLAOU, A., WANG, Q. S., DELKER, D. A. *et al.*, 1998, "Azoxymethane-Induced Colon Tumors and Aberrant Crypt Foci in Mice of Different Genetic Susceptibility", *Cancer Lett.*, v. 130, n. 1-2 pp. 29-34.
- [8] CHAN, C. H., COOK, D., and STANNERS, C. P., 2006, "Increased Colon Tumor Susceptibility in Azoxymethane Treated CEABAC Transgenic Mice", *Carcinogenesis*, v. 27, n. 9 pp. 1909-1916.
- [9] DE, R. M., MASSI, E., POETA, M. L. *et al.*, 2011, "The AOM/DSS Murine Model for the Study of Colon Carcinogenesis: From Pathways to Diagnosis and Therapy Studies", *J. Carcinog.*, v. 10, n. pp. 9.

- [10] TAKETO, M. M. and EDELMANN, W., 2009, "Mouse Models of Colon Cancer", *Gastroenterology*, v. 136, n. 3 pp. 780-798.
- [11] MAMOU, J., CORON, A., OELZE, M. L. *et al.*, 2011, "Three-Dimensional High-Frequency Backscatter and Envelope Quantification of Cancerous Human Lymph Nodes", *Ultrasound Med. Biol.*, v. 37, n. 3 pp. 345-357.
- [12] FOSTER, F. S., PAVLIN, C. J., HARASIEWICZ, K. A. *et al.*, 2000, "Advances in Ultrasound Biomicroscopy", *Ultrasound Med. Biol.*, v. 26, n. 1 pp. 1-27.
- [13] SOLDAN, M., SCHANAIDER, A., MADI, K. *et al.*, 2009, "In Vitro Ultrasound Biomicroscopic Imaging of Colitis in Rats", *J. Ultrasound Med.*, v. 28, n. 4 pp. 463-469.
- [14] SOLDAN, M., MACHADO, J. C., PEREIRA, F. R. *et al.*, 2004, "Biomicroscopia Ultra-Sônica Aplicada à Caracterização Do Esôfago", *Anais Do III Congresso Latinoamericano De Engenharia Biomédica e XIX Congresso Brasileiro De Engenharia Biomédica*, v. pp. 1603-1606.
- [15] WARD, J. M., YAMAMOTO, R. S., and BROWN, C. A., 1973, "Pathology of Intestinal Neoplasms and Other Lesions in Rats Exposed to Azoxymethane", *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 51, n. 3 pp. 1029-1039.
- [16] TANAKA, T., KOHNO, H., SUZUKI, R. *et al.*, 2003, "A Novel Inflammation-Related Mouse Colon Carcinogenesis Model Induced by Azoxymethane and Dextran Sodium Sulfate", *Cancer Sci.*, v. 94, n. 11 pp. 965-973.
- [17] GRETEN, F. R., ECKMANN, L., GRETEN, T. F. *et al.*, 2004, "IKKbeta Links Inflammation and Tumorigenesis in a Mouse Model of Colitis-Associated Cancer", *Cell*, v. 118, n. 3 pp. 285-296.
- [18] SOKOLOV, S. J., 1935, "Ultrasonic Oscillations and Their Applications", *Tech. Phys*, v. 2, n. pp. 522-534.
- [19] KESSLER, L. W., KORPEL, A., and PALERMO, P. R., 1972, "Simultaneous

Acoustic and Optical Microscopy of Biological Specimens", *Nature*, v. 239, n. 5367 pp. 111-112.

- [20] LEMONS, R. A. and QUATE, C. F., 1975, "Acoustic Microscopy: Biomedical Applications", *Science*, v. 188, n. 4191 pp. 905-911.
- [21] PAVLIN, C. J., SHERAR, M. D., and FOSTER, F. S., 1990, "Subsurface Ultrasound Microscopic Imaging of the Intact Eye", *Ophthalmology*, v. 97, n. 2 pp. 244-250.
- [22] BOM, N., TEN, H. H., LANCEE, C. T. *et al.*, 1989, "Early and Recent Intraluminal Ultrasound Devices", *Int. J. Card Imaging*, v. 4, n. 2-4 pp. 79-88.
- [23] PATHIRANA, A. and POSTON, G. J., 2001, "Lessons From Japan--Endoscopic Management of Early Gastric and Oesophageal Cancer", *Eur. J. Surg. Oncol.*, v. 27, n. 1 pp. 9-16.
- [24] MURATA, Y., NAPOLEON, B., and ODEGAARD, S., 2003, "High-Frequency Endoscopic Ultrasonography in the Evaluation of Superficial Esophageal Cancer", *Endoscopy*, v. 35, n. 5 pp. 429-435.
- [25] HARIRI, L. P., QIU, Z., TUMLINSON, A. R. *et al.*, 2007, "Serial Endoscopy in Azoxymethane Treated Mice Using Ultra-High Resolution Optical Coherence Tomography", *Cancer Biol. Ther.*, v. 6, n. 11 pp. 1753-1762.
- [26] INDERBITZIN, D., STOUPIS, C., SIDLER, D. *et al.*, 2007, "Abdominal Magnetic Resonance Imaging in Small Rodents Using a Clinical 1.5 T MR Scanner", *Methods*, v. 43, n. 1 pp. 46-53.
- [27] SHI, J., JIA, B., LIU, Z. *et al.*, 2008, "99mTc-Labeled Bombesin(7-14)NH₂ With Favorable Properties for SPECT Imaging of Colon Cancer", *Bioconjug. Chem.*, v. 19, n. 6 pp. 1170-1178.
- [28] ZABALA, M., ALZUGUREN, P., BENAVIDES, C. *et al.*, 2009, "Evaluation of Bioluminescent Imaging for Noninvasive Monitoring of Colorectal Cancer

Progression in the Liver and Its Response to Immunogene Therapy", *Mol. Cancer*, v. 8, n. pp. 2.

- [29] DURKEE, B. Y., WEICHERT, J. P., and HALBERG, R. B., 2010, "Small Animal Micro-CT Colonography", *Methods*, v. 50, n. 1 pp. 36-41.
- [30] CHANG, Y. J., CHANG, C. H., YU, C. Y. *et al.*, 2010, "Therapeutic Efficacy and MicroSPECT/CT Imaging of 188Re-DXR-Liposome in a C26 Murine Colon Carcinoma Solid Tumor Model", *Nucl. Med. Biol.*, v. 37, n. 1 pp. 95-104.
- [31] ALENCAR, H., FUNOVICS, M. A., FIGUEIREDO, J. *et al.*, 2007, "Colonic Adenocarcinomas: Near-Infrared Microcatheter Imaging of Smart Probes for Early Detection--Study in Mice", *Radiology*, v. 244, n. 1 pp. 232-238.
- [32] FOSTER, F. S., ZHANG, M. Y., ZHOU, Y. Q. *et al.*, 2002, "A New Ultrasound Instrument for in Vivo Microimaging of Mice", *Ultrasound Med. Biol.*, v. 28, n. 9 pp. 1165-1172.
- [33] TURNBULL, D. H., 2002, "In Vivo Ultrasound Biomicroscopy in Developmental Biology", *Trends in Biotechnology*, v. 20, n. 8 pp. S29.
- [34] FOSTER, F. S., ZHANG, M., DUCKETT, A. S. *et al.*, 2003, "In Vivo Imaging of Embryonic Development in the Mouse Eye by Ultrasound Biomicroscopy", *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 44, n. 6 pp. 2361-2366.
- [35] JOLLY, C., JEANNY, J. C., BEHAR-COHEN, F. *et al.*, 2005, "High-Resolution Ultrasonography of Subretinal Structure and Assessment of Retina Degeneration in Rat", *Exp. Eye Res.*, v. 81, n. 5 pp. 592-601.
- [36] SUN, L., XU, X., RICHARD, W. D. *et al.*, 2008, "A High-Frame Rate Duplex Ultrasound Biomicroscopy for Small Animal Imaging in Vivo", *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, v. 55, n. 8 pp. 2039-2049.
- [37] TAKAHASHI, M. and WAKABAYASHI, K., 2004, "Gene Mutations and Altered Gene Expression in Azoxymethane-Induced Colon Carcinogenesis in

Rodents", *Cancer Sci.*, v. 95, n. 6 pp. 475-480.

- [38] DRUCKREY, H., PREUSSMANN, R., MATZKIES, F. *et al.*, 1967, "[Selective Production of Intestinal Cancer in Rats by 1,2-Dimethylhydrazine]", *Naturwissenschaften*, v. 54, n. 11 pp. 285-286.
- [39] NEUFERT, C., BECKER, C., and NEURATH, M. F., 2007, "An Inducible Mouse Model of Colon Carcinogenesis for the Analysis of Sporadic and Inflammation-Driven Tumor Progression", *Nat. Protoc.*, v. 2, n. 8 pp. 1998-2004.
- [40] BOIVIN, G. P., WASHINGTON, K., YANG, K. *et al.*, 2003, "Pathology of Mouse Models of Intestinal Cancer: Consensus Report and Recommendations", *Gastroenterology*, v. 124, n. 3 pp. 762-777.
- [41] SUZUKI, R., KOHNO, H., SUGIE, S. *et al.*, 2006, "Strain Differences in the Susceptibility to Azoxymethane and Dextran Sodium Sulfate-Induced Colon Carcinogenesis in Mice", *Carcinogenesis*, v. 27, n. 1 pp. 162-169.
- [42] HANAHAN, D. and WEINBERG, R. A., 2000, "The Hallmarks of Cancer", *Cell*, v. 100, n. 1 pp. 57-70.
- [43] CHAU, B. N., BORGES, H. L., CHEN, T. T. *et al.*, 2002, "Signal-Dependent Protection From Apoptosis in Mice Expressing Caspase-Resistant Rb", *Nat. Cell Biol.*, v. 4, n. 10 pp. 757-765.
- [44] COBBOLD, R. S. C., 2007, *Foundations of Biomedical Ultrasound*. New York, Oxford University Press.
- [45] HURLSTONE, D. P., CROSS, S. S., ADAM, I. *et al.*, 2004, "Efficacy of High Magnification Chromoscopic Colonoscopy for the Diagnosis of Neoplasia in Flat and Depressed Lesions of the Colorectum: a Prospective Analysis", *Gut*, v. 53, n. 2 pp. 284-290.
- [46] HURLSTONE, D. P., SANDERS, D. S., and THOMSON, M., 2007, "Detection and Treatment of Early Flat and Depressed Colorectal Cancer Using High-

Magnification Chromoscopic Colonoscopy: a Change in Paradigm for Western Endoscopists?

6", *Dig. Dis. Sci.*, v. 52, n. 6 pp. 1387-1393.

[47] ROBERTIS, M., MASSI, E., POETA, M. L. *et al.*, 2011, "The AOM/DSS Murine Model for the Study of Colon Carcinogenesis: From Pathways to Diagnosis and Therapy Studies", *J. Carcinog.*, v. 10, n. pp. 9.

ANEXO

PRODUÇÃO CIENTÍFICA DA TESE

1. Artigos completos publicados em periódicos

1.1. Artigos publicados em periódico:

Alves, K. Z.; Borges, H. L.; Soletti, R. C.; Viana, A. L.P.; Petrella, L. I.; Soldan, M. ; Chagas, V. L.; Schanaider, A.; Machado, J. C.. “Features of In Vitro Ultrasound Biomicroscopic Imaging and Colonoscopy for Detection of Colon Tumor in Mice”. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 37, p. 001-010, 2011.

1.2. Trabalhos completos publicados em anais de congressos

Alves, K. Z. ; Soletti, R. C. ; Britto, M. A. P. ; Matos, D. G. ; Borges, H. L. ; Soldan, M.; Machado, J. C. “In vivo endoluminal ultrasound biomicroscopic imaging of colon lesions in mouse models of cancer and inflammation.” **In: IEEE International Ultrasonics Symposium 2011**, 2011, Orlando. 2011 IEEE, p.1-4, 2011.

Alves, K. Z.; Britto, M. A. P.; Borges, H. L.; Matos, D. G.; Soletti, R. C.; Chagas, V. L.; Machado, J. C. “Utilização da biomicroscopia ultrassônica endoluminal para detecção de lesões em cólon de camundongos.” **In: Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica**, Tiradentes MG. Anais do XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica v. 1. p. 596-599; 2010.

Alves, K. Z.; Petrella, L. I.; Machado, J. C. “Phantoms para utilização em biomicroscopia ultra-sônica para obtenção das resoluções lateral e axial.” **In: XX CBEB - Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica**, 2006, São Pedro. Anais do XX CBEB, v. 1. p. 744-747; 2006.

Petrella, L. I.; Alves, K. Z.; Machado, J. C. “Testes experimentais de um sistema de biomicroscopia ultra-sônica mediante o uso de Phantoms.” **In: XX CBEB Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica**, 2006, São Pedro. Anais do XX CBEB, v. 1. p. 760-763; 2006.

1.3. Resumos publicados em anais de congressos

Alves, K. Z.; Soletti, R. C.; Britto, M. A. P.; Matos, D. G.; Borges, H. L. ; Soldan, M.
“Detection of colon lesions in animal model of colorectal cancer using endoluminal
ultrasound biomicroscopy.” **In: UEGW- United European Gastroenterology Week,**
2011, Stolckholm. UEGW- United European Gastroenterology Week, 2011, 2011.