



GERAÇÃO DE IMAGENS 3D DE BIOMICROSCOPIA ULTRASSÔNICA:  
VALIDAÇÃO DA TÉCNICA E IMAGEM VOLUMÉTRICA DO GASTROCNÊMIO  
LATERAL DE RATO *IN VIVO*.

Natália Santos da Fonseca Martins

Dissertação de Mestrado 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 Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientador: João Carlos Machado

Rio de Janeiro

Março de 2014

GERAÇÃO DE IMAGENS 3D DE BIOMICROSCOPIA ULTRASSÔNICA:  
VALIDAÇÃO DA TÉCNICA E IMAGEM VOLUMÉTRICA DO GASTROCNÊMIO  
LATERAL DE RATO IN VIVO.

Natália Santos da Fonseca Martins

DISSERTAÇÃO 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 MESTRE  
EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA BIOMÉDICA.

Examinada por:

---

Prof. João Carlos Machado, D.Sc.

---

Prof. Luciano Luporini Menegaldo, D.Sc.

---

Prof. Sérgio Shiguemi Furuie, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

MARÇO DE 2014

Martins, Natália Santos da Fonseca

Geração de Imagens 3D de Biomicroscopia Ultrassônica: Validação da Técnica e Imagem Volumétrica do Gastrocnêmio Lateral de Rato *In Vivo*/ Natália Santos da Fonseca Martins. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2014.

X, 80 p.: il.; 29,7 cm.

Orientador: João Carlos Machado

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Biomédica, 2014.

Referências Bibliográficas: p. 58-62.

1. Biomicroscopia Ultrassônica. 2. Imagem 3D. 3. Phantom. 4. Gastrocnêmio. I. Machado, João Carlos. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Biomédica. III. Título.

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho à minha mãe.

Mãe,

obrigada por me deixar como herança seu bom humor, sua força e principalmente sua determinação, que me impedem de desistir mesmo quando tudo parece impossível. É por você que eu estou aqui agora. Te amo como sempre, te amo como nunca.

## **Agradecimentos**

Ao meu orientador João Carlos Machado, pela presença constante, pelos ensinamentos prestados durante esses dois anos que certamente contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional. Pela paciência comigo nos momentos de lágrimas e desespero, pela compreensão, pois mesmo sendo tão diferente de mim, eu percebia o quanto ele se esforçava para me entender. Muito obrigada por tudo, Professor!

À minha orientadora “pessoal” desde a Iniciação Científica, Liliam Fernandes de Oliveira, meu primeiro exemplo daquilo que eu gostaria de ser profissionalmente. Obrigada pela amizade, pelo carinho de sempre e por me fazer entender que esse era o caminho certo pra mim, por acreditar no meu potencial até quando eu mesma duvidava.

À querida amiga Carolina Carneiro Peixinho, que teve a árdua missão de me orientar diretamente, na Iniciação Científica, apontar meus erros, corrigi-los, me ensinando o que eu posso chamar de “estado da arte” no mundo acadêmico. Obrigada por ser tão chata e me por me tornar tão exigente comigo mesma. Você é um grande exemplo pra mim.

Ao professor Wagner Coelho, pelo carinho, amizade, apoio e conselhos de sempre que fizeram grande diferença no meu dia a dia. Ao professor Marco Antônio von Krüger pela ajuda e enorme boa vontade nos diversos momentos em que eu precisei de uma ideia “engenheirística”, muito obrigada!

A todos os professores do PEB, mesmo aqueles que eu odiei por um dia, ou por um ano. Hoje, sou imensamente grata pelas oportunidade de aprendizado que eu tive aqui.

Aos amigos do meu antigo laboratório, na Escola de Educação Física e Desportos, o LABMUSC, principalmente ao “dindão” Thiago Matta, que me convidou e incentivou a fazer parte desse grupo, dando início a essa trajetória.

Aos amigos do LUS, que partilharam de muitos momentos de trabalho e também de diversão comigo. Queridos, tenho certeza que foi melhor porque todos vocês estavam por aqui... Obrigada a todas as “LUSietes”!

Agradeço agora, principalmente e enormemente aos meus amigos de turma. À turma de 2012. Amigos, o que passamos juntos nos fez irmãos e eu tenho certeza que não teria conseguido sem vocês. Não vou citar nomes pra não falhar gravemente em

esquecer alguém, mas sintam-se abraçados e saibam que sou imensamente agradecida por ter vivido esse momento louco, que é o Mestrado, com cada um de vocês.

Às minhas amigas, aquelas que não preciso dizer o nome, pois elas se reconhecerão nesse parágrafo, as mais queridas e amadas, que certamente irão permanecer para sempre ao meu lado. Obrigada por tudo. Pela amizade, pelo carinho, pelo cuidado, pela paciência, pelas conversas, pelas piadas, pelas gargalhadas, pelas histórias e por serem parte da minha vida. Amo vocês.

À minha família, biológica e não biológica, agradeço por entenderem a minha ausência em muitos momentos e mesmo assim, continuarem torcendo por mim e acreditando no meu sucesso.

A toda família Baldanza, pelo apoio, carinho, paciência e enorme cuidado comigo na fase inicial do Mestrado. Foi menos difícil porque vocês estavam ao meu lado. Muito obrigada, principalmente pelos sorrisos da minha eterna “TinkerBell”.

Aos meus amigos de fora do PEB, por igualmente entenderem minhas inúmeras faltas: de presença, de ligações, de respostas e mesmo assim, continuarem me amando, me ligando e me procurando. Eu só consegui porque sabia que vocês estariam me esperando em algum lugar.

Ao meu namorado Felipe, pelo companheirismo, pela paciência, por abdicar de si mesmo para me ajudar, por cuidar de mim diariamente, por me admirar tanto e me lembrar sempre, de que eu seria capaz. Por definir o amor em suas atitudes mais simples. Obrigada meu Amor.

À minha mãe, eternamente amada, que mesmo ausente fisicamente, me fez sentir muitas vezes sua presença em espírito, me iluminando e me transmitindo bons fluídos. A ela, que me ensinou o verdadeiro valor da educação e me indicou o melhor caminho a seguir antes de partir. Mãe, sei que você está transbordando de felicidade com essa minha conquista. Muito obrigada por toda a base que me fez ser o que sou.

À energia e inteligência suprema, que chamo de Deus, pelo dom da vida e por nunca, nunca me deixar sozinha.

Muito obrigada!

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

GERAÇÃO DE IMAGENS 3D DE BIOMICROSCOPIA ULTRASSÔNICA:  
VALIDAÇÃO DA TÉCNICA E IMAGEM VOLUMÉTRICA DO GASTROCNÊMIO  
LATERAL DE RATO *IN VIVO*.

Natália Santos da Fonseca Martins

Março/2014

Orientador: João Carlos Machado

Programa: Engenharia Biomédica

A biomicroscopia ultrassônica (UBM) é uma técnica de geração de imagens de alta resolução, que utiliza frequências de 40 a 100 MHz, empregada em pesquisas com animais e direcionadas para criar modelos de lesões e doenças que mimetizam condições humanas. Empregando um sistema de ultrassom tridimensional (3D) é possível visualizar imagens em diversos ângulos e estimar o volume de órgãos, colaborando para um diagnóstico preciso. Este estudo tem como objetivo gerar imagens 3D a partir da múltipla aquisição de imagens bidimensionais (2D) de *phantoms*, promover a validação da técnica e a confiabilidade das medidas do volume, e obter imagens 3D do gastrocnêmio de ratos. Foram realizadas 40 aquisições por UBM setorial (10 para cada *phantom*) e para cada aquisição foram realizadas 5 segmentações (50 para cada *phantom*), totalizando 200 medidas volumétricas de imagens em 3D. Após os *phantom*, foram adquiridas e convertidas imagens do gastrocnêmio de ratos e quantificado o volume parcial. Foi obtido o volume físico de todos os *phantoms* para a validação da técnica. Os valores de coeficiente de variação, coeficiente de correlação intraclasse atestaram a confiabilidade das medidas do volume obtido por segmentação. Além disso, também foi possível obter imagens transversais em 2D da pata trazeira de ratos, identificar o gastrocnêmio, gerar imagens 3D e quantificar parcialmente o volume do músculo. Os resultados indicaram que a técnica é válida para gerar imagens em 3D e quantificar o volume de um músculo com dimensões compatíveis com as de um animal pequeno.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

GENERATION OF 3D ULTRASOUND BIOMICROSCOPIC IMAGES:  
TECHNIQUE VALIDATION AND *IN VIVO* VOLUMETRIC IMAGING OF RAT  
LATERAL GASTROCNEMIUS

Natália Santos da Fonseca Martins

March/2014

Advisor: João Carlos Machado

Department: Biomedical Engineering

Ultrasound biomicroscopy (UBM) is a technique for generating high-resolution images, with frequencies from 40 to 100 MHz. It has been used in animal research with different purposes as, for example, models of injury and diseases that mimic human conditions. With a three-dimensional ultrasound (3D) image system, an organ can be viewed at various angles and the volume estimated, contributing to an accurate diagnosis. This study aims to generate 3D-UBM images, employing a 35 MHz ultrasound system, from multiple two-dimensional images (2D), acquired from phantoms, to validate the technique and to determine its the reliability of volume measurements. Additionally, the technique was used to obtain 3D images of the rat gastrocnemius muscle. Four different phantoms were used and ten acquisition sequences of 2D-images acquired for each one. Thereafter, 5 segmentations were performed for each acquisition sequence, resulting in 50 measured volumes for each phantom. The physical volumes of all phantoms were used to validate the technique based on the coefficient of variation (CV) and the intraclass correlation coefficient (ICC). Images of the Gastrocnemius muscle were acquired and the partial volume quantified. The CV and ICC confirmed the reliability of volume measurements obtained by segmentation. Moreover, cross-sectional 2D images of rat hindlimb were obtained, allowing to identify the gastrocnemius muscle and to partially quantify the muscle volume from 3D images. The results indicated that the technique is valid to generate 3D images and quantify the volume of a muscle compatible with the dimensions of a small animal.



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.2.1 <i>Objetivo Geral</i> .....	3
1.2.2 <i>Objetivos específicos</i> .....	4
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1 BIOMICROSCOPIA ULTRASSÔNICA 2D.....	5
2.2 IMAGENS EM 3D .....	7
2.2.1 <i>Volume Muscular</i> .....	9
2.3 IMAGENS BMU 3D .....	10
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	12
3.1 ESPECIFICAÇÕES DA BIOMICROSCOPIA ULTRASSÔNICA .....	12
3.2 MÚSCULO ESQUELÉTICO.....	14
3.2.1 <i>Gastrocnêmios</i> .....	15
3.3 CARACTERÍSTICAS BIOMECÂNICAS .....	16
3.3.1 <i>Volume Muscular</i> .....	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.1 INSTRUMENTAÇÃO PARA A GERAÇÃO DE IMAGEM DE BMU 3D .....	19
4.2 AQUISIÇÃO DAS IMAGENS DE BMU 2D EM MÚLTIPLOS PLANOS .....	22
4.3 CONSTRUÇÃO DAS IMAGENS de BMU 3D .....	24

4.4 CONFECÇÃO DOS PHANTOMS .....	26
4.5. AQUISIÇÃO DE IMAGENS DOS PHANTOMS.....	29
4.6 VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS DE VOLUME DOS PHANTOMS .....	30
4.7 AQUISIÇÃO DA SEQUÊNCIA DE IMAGENS BMU 2D, IN VIVO, DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO DE RATOS.....	31
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
5.1 CONFIABILIDADE DAS MEDIDAS DE VOLUME DOS PHANTOMS OBTIDAS DAS IMAGENS DE BMU 3D E VALIDAÇÃO DA TÉCNICA. .....	35
5.1.1 <i>Dados estatísticos para o phantom PH<sub>01</sub>G<sub>CI</sub></i> .....	37
5.1.2 <i>Dados estatísticos para o phantom PH<sub>10</sub>P<sub>CI</sub></i> .....	38
5.1.3 <i>Dados estatísticos para o phantom PH<sub>10</sub>PP<sub>CI</sub></i> .....	40
5.1.4 <i>Dados estatísticos para o phantom PH<sub>10</sub>G<sub>CO</sub></i> .....	43
5.1.5 <i>Correlação</i> .....	43
5.3 ANIMAIS .....	46
6. DISCUSSÃO .....	48
7.CONCLUSÃO .....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
ANEXO I.....	62

## 1. INTRODUÇÃO

A biomicroscopia ultrassônica (BMU) é uma técnica de geração de imagens de alta resolução, *in vivo*, que utiliza frequências na faixa de 40 a 100 MHz e alcança uma resolução típica de 30  $\mu\text{m}$  em tecidos biológicos (em 50 MHz). A BMU possui aplicação e importância amplamente observada em diversas áreas da medicina e recentes destaques na biologia (FOSTER *et al.*, 2002). No âmbito da medicina, os resultados mais expressivos são na oftalmologia, dermatologia, ultrassonografia intravascular, entre outras, tendo como principal objetivo a geração de imagens de alta resolução de tecidos saudáveis ou doentes, sem a necessidade de um procedimento invasivo (FOSTER *et al.*, 2000). Na biologia, a BMU é empregada em pesquisas com animais direcionadas à investigação de modelos de lesões e doenças que mimetizam condições humanas, como por exemplo, tumor de cólon de camundongo induzido quimicamente (KELLY *et al.*, 2013) e processo de regeneração após lesão por laceração nos músculos gastrocnêmio e solear de rato (PEIXINHO *et al.*, 2011).

Comumente, as imagens de ultrassom (US) bidimensionais (2D) são utilizadas para análises médicas e diagnósticos. No entanto, existem algumas limitações quando o objetivo é a observação da anatomia de um órgão em três dimensões (CHANG *et al.*, 2003). Tais limitações podem ser resolvidas ao utilizar um sistema de US com geração de imagens tridimensionais (3D), cujas vantagens incluem uma visão global e a possibilidade de rotacionar e manipular essas imagens em diversos ângulos (SOLBERG *et al.*, 2007). Com imagens em 3D pode-se ainda estimar o volume de determinados órgãos e tecidos, colaborando para um diagnóstico mais preciso (COBBOLD, 2007). Algumas aplicações médicas do US 3D incluem, por exemplo, a obtenção de imagens

endoscópicas do esôfago (SĂFTOIU E GHEONEA, 2009) para caracterizar a relação entre massas tumorais e vasos sanguíneos do mediastino (invasão de artérias aorta e pulmonar), de imagem endoanal para medir diâmetro e volume de esfíncter anal de mulheres com lesão de esfíncter causada por parto natural (GREGORY *et al.*, 2006), de imagens de *phantoms* de artéria femoral usando um sistema robotizado para controlar e padronizar a aquisição de múltiplas imagens de US 2D (JANVIER *et al.*, 2010).

Nas últimas décadas o US 3D também tem sido bastante empregado na validação do volume muscular (VM), importante parâmetro de arquitetura muscular para estimativa da função de um músculo. BARBER *et al.*, (2009) utilizaram um US 2D *freehand* e geraram imagens 3D processando inúmeros quadros de imagens 2D. Aplicaram a técnica para medições morfológicas do músculo gastrocnêmio e a validaram para a obtenção de volume, comparando os resultados com os obtidos por ressonância magnética (RM). O mesmo foi realizado por MAC GILLIVRAY *et al.*, (2009), que empregaram o US 3D na determinação do volume da região média da coxa e validaram a técnica por RM. DELCKER *et al.*, (1999) e INFANTOLINO *et al.*, (2006) também utilizaram o US 3D para medição de volume e realizaram a validação da técnica pelo método de deslocamento de coluna de água. WELLER *et al.*, (2007), além do deslocamento de coluna de água, utilizaram a tomografia computadorizada (TC) para reforçar a validação.

Até o presente momento, não foram encontrados ainda na literatura estudos com músculo-esquelético, baseados em imagens de US de alta resolução em 3D. No entanto, é crescente o número de trabalhos que utilizam essa metodologia para análise de outros tecidos biológicos (STACHS *et al.*, 2002) principalmente em animais de pequeno porte (ROELLING *et al.*, 2011; FOSTER *et al.*, 2011).

A justificativa da metodologia proposta nesta Dissertação para o uso de imagens

de BMU 3D na análise do músculo esquelético reside no fato de que parâmetros de arquitetura muscular, como o VM, comprimento de fibra (CF) e área da seção transversa (AST), influenciam diretamente na função muscular (LIEBER E FRIDEN, 2000). A AST fisiológica de um músculo é proporcional ao potencial de força muscular que este é capaz de exercer, e pode ser calculada pela relação entre o VM e o CF e multiplicada pelo cosseno do ângulo de penação (AP) (EPSTEIN e HERZOG, 1998). Esses parâmetros podem ser utilizados ainda para estimar as contribuições individuais dos músculos componentes de um grupamento e para a produção do torque articular (KONISHI *et al.*, 2012; MAGANARIS, 2004). Adicionalmente, medidas de volume e comprimento muscular podem ser utilizadas para avaliar contraturas musculares e determinar alterações ocasionadas por intervenções cirúrgicas ou por treinamentos específicos (FRY *et al.*, 2007; KAWAKAMI *et al.*, 2008). Embora imagens de US 2D permitam medições do diâmetro ou da AST anatômica de um músculo, pode-se incorrer em erros ao calcular o volume tão somente a partir de modelos baseados em uma única medição de diâmetro obtida apenas de uma imagem bidimensional da seção transversa.

Haja visto a importância da quantificação do VM e a relevância da imagem US 3D nessa obtenção, é considerável o preenchimento desta lacuna científica através da geração de imagens de BMU tridimensionais do músculo esquelético de animais de pequeno porte a fim de esclarecer certas condições humanas que só podem ser experimentadas em animais.

## 1.2 OBJETIVOS

### *1.2.1 Objetivo Geral*

Este estudo tem como objetivo geral a obtenção de múltiplos quadros de imagens de BMU em 2D do gastrocnêmio lateral de ratos, para posterior segmentação, conversão

a 3D e quantificação do volume das mesmas.

### *1.2.2 Objetivos específicos*

- Construir e gerar imagens de *phantoms* de dimensões similares as do gastrocnêmio de ratos,
- promover a validação da técnica de BMU 3D,
- testar a confiabilidade das medidas do volume obtido por segmentação das imagens dos *phantoms*,
- adquirir imagens de BMU em 2D do gastrocnêmio lateral de ratos e identificar os limites do músculo, segmentar as imagens e convertê-las a 3D,
- obter a quantificação do volume do gastrocnêmio lateral.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 BIOMICROSCOPIA ULTRASSÔNICA 2D

Nos anos 70 aumentaram as expectativas sobre a aplicabilidade da microscopia acústica, no entanto, a microscopia óptica já representava uma ferramenta de diagnóstico suficiente para a época (KESSLER *et al.*, 1972). Apenas na década de 80, com o aumento da necessidade médica de obter imagens de tecidos vivos, a microscopia acústica e a utilização de um ultrassom de alta frequência, novamente em voga, tiveram suas primeiras aplicações. O benefício da imagiologia com resolução microscópica tornou possível acompanhar de modo não invasivo, o crescimento de tecidos, *in vivo*, por meio da penetração do ultrassom, que permitiu a visualização de planos e *subsuperfícies* inacessíveis às técnicas ópticas. Em 1987, SHERAR *et al.* (1987) mostraram pela primeira vez uma imagem ultrassônica de um tumor esferoide, a 100MHz, de modo não invasivo.

Pesquisadores pioneiros convergiram para 3 importantes aplicações clínicas utilizando altas frequências em modo-B: oftalmologia (PAVLIN *et al.*, 1990), dermatologia (HOFFMANN *et al.*, 1990) e ultrassom intravascular (BOM *et al.*, 1989). Aplicações de ultrassom em altas frequências na pele e intravascular utilizaram inicialmente frequências na faixa de 20MHz, e na oftalmologia na faixa de 40-60MHz. Para cada especialidade, um instrumento específico era utilizado (FOSTER *et al.*, 2000).

Em 1995, TURNBULL *et al.*, (1995) publicaram um artigo sobre o uso de US de alta frequência para o fenótipo de embriões de camundongos e, essencialmente, inauguraram a moderna era das imagens pré-clínicas com US. Desde então, sistemas e

aplicações têm sido empregadas em muitas áreas, incluindo a investigação cardiovascular, câncer, biologia do desenvolvimento e muitas outras.

Visualização de tecido vivo em ultrassom microscópico é referido na literatura como “ultrassom microscópico por retroespalhamento” ou “ultrassom de alta frequência” ou “biomicroscopia ultrassônica” (BMU), que é análogo a microscopia óptica panorâmica, um método, portanto, já bem estabelecido para visualizar tecidos *in vivo* (FOSTER *et al.*, 2000).

Inúmeras aplicações clínicas da BMU em oftalmologia têm sido descritos na literatura (PAVLIN e FOSTER, 1995). Normalmente estão relacionados à avaliação intraocular, doenças da córnea, glaucoma, tumores e traumas. Na pele, a BMU atua como um método não invasivo para análise de lesões cutâneas com alta resolução. Imagens de BMU intravascular ressurgiram na década passada, como um resultado da recente proliferação de novas abordagens de intervenção, como a angioplastia e colocação de *stent*, para o tratamento de doença arterial coronariana com a finalidade de visualizar e medir a parede do vaso e qualquer acúmulo de placa bacteriana associada (FOSTER *et al.*, 2000).

Na biologia, a BMU já foi empregado para estudar o desenvolvimento embrionário através de imagens *in útero* de camundongos (TURNBULL, 1999), para acompanhar lesões musculares em coelhos (KIM *et al.*, 2002), para descrever organização e a coordenação de fibras musculares individuais de ratos, avaliando os efeitos da fadiga em testes *ex vivo* (WITTE *et al.*, 2004) e mais recentemente, na análise de modelo de lesão tumoral de colón de camundongo induzido quimicamente (KELLY *et al.*, 2013).

Para análise do músculo esquelético a BMU foi utilizada na caracterização da arquitetura muscular do tríceps sural saudável e lesionado de ratos, por meio da



quantificação de parâmetros de arquitetura muscular em diferentes instantes após aplicação de um protocolo de lesão do músculo (PEIXINHO *et al.*, 2011) e para caracterização da arquitetura do músculo gastrocnêmio lateral de ratos após a aplicação de um programa de alongamento crônico, também por meio da quantificação de parâmetros arquitetônicos (PEIXINHO *et al.*, 2013).

## 2.2 IMAGENS EM 3D

Apesar das imagens bidimensionais serem frequentemente utilizadas para visualizar e analisar estruturas biológicas, existem algumas limitações quando há a necessidade em se obter uma visão anatômica global de um órgão (CHANG *et al.*, 2003). Tais limitações podem ser resolvidas ao se utilizar um sistema com geração de imagens tridimensionais, cujas vantagens incluem a possibilidade de rotacioná-las e visualizá-las em diversos ângulos, alcançando uma análise mais completa da estrutura analisada (SOLBERG *et al.*, 2007).

Na medicina, imagens em 3D podem ser utilizadas, por exemplo, para medir diâmetro e volume de esfíncter anal de mulheres com lesão de esfíncter causada por parto natural por imagens endoanal em 3D (Gregory *et al.*, 2006) e para caracterizar a relação entre massas tumorais e vasos sanguíneos do mediastino (a invasão de artérias aorta e pulmonar) por imagens endoscópicas em 3D do esôfago (Săftoiu e Gheonea, 2009).

A partir de imagens em 3D é possível ainda, estimar o volume de órgãos e lesões, o que pode ser importante na determinação de um diagnóstico (COBBOLD, 2007). Ferrari *et al.*, (2006), a fim de determinar o volume de lesões em tendão de cavalo, compararam as técnicas de US 2D (indiretamente, a partir AST da lesão), US

3D (apenas por segmentação) e medidas em imagens de peças dissecadas. Os autores validaram a técnica por medidas repetidas em um *phantom* de volume conhecido, e relataram que determinar o volume a partir de imagens obtidas de peças dissecadas é bastante complicado principalmente devido ao processo de segmentação, que é dificultado por conta da perda tecidual e da descoloração natural que ocorre no tendão submetido a essas condições e pioram a qualidade das imagens. Por outro lado, os autores afirmam que ambas as técnicas, US 2D e 3D provaram ser reproduzíveis para medir o volume de uma lesão em tendão, mas concluíram que o US 3D é superior as outras para monitorar a evolução da lesão.

Nas últimas décadas o US 3D também tem sido bastante empregado na validação do volume muscular. DELCKER *et al.*, (1999) utilizaram o US 3D para reconstruir o volume de peças dissecadas da mão de cadáveres e realizaram a validação da técnica pelo método de deslocamento de coluna de água. Os autores confirmaram o potencial do US 3D apresentando baixos índices de variabilidade e desvio médio de 10% entre as 2 formas de medição.

WELLER *et al.*, (2007), utilizaram o US 3D para determinar o volume *in vivo*, *in situ* e em músculos isolados da pata de cadáveres de cães, e validaram a técnica por medidas volumétricas obtidas por TC e por deslocamento de coluna de água. Os autores relataram que as medidas de volume obtidas pelas 3 técnicas não foram correlacionadas significativamente, tendo a maior correspondência entre as medidas de US 3D e por deslocamento de coluna de água e a menor, entre as medidas por TC e por deslocamento de coluna de água, e concluíram que a US 3D se apresenta como uma técnica capaz de acessar o volume muscular.

BARBER *et al.*, (2009) utilizaram um US 2D *freehand* para gerar imagens em 3D do gastrocnêmio, *in vivo*, a partir de inúmeros quadros de imagens 2D. Aplicaram a

técnica para medições morfológicas do músculo gastrocnêmio e a validaram para a obtenção de volume, comparando os resultados com os obtidos por US com os obtidos por RM e concluíram que a US 3D pode ser de fato, empregada para obter o volume do músculo humano e pode substituir o que consideram como padrão ouro, a RM, para tal finalidade. O mesmo foi realizado por MACGILLIVRAY *et al.*, (2009), que empregaram o US 3D na determinação do volume da região média da coxa e também validaram a técnica por RM, e da mesma forma, concluíram que o US 3D é aplicável para gerar o volume muscular.

### 2.2.1 Volume Muscular

O volume de um corpo é representado pela quantidade de espaço por ele ocupado. As primeiras medidas de volume muscular foram obtidas *in vitro*, a partir de estudos realizados com cadáveres (FRIEDERICH e BRAND, 1990). Com o avanço de técnicas de obtenção de imagens, o VM passou a poder ser estimado *in vivo*, a partir do somatório de volumes segmentares em imagens transversais sequenciais de TC e RM, pelo somatório das áreas de seção transversa multiplicado pela distância entre elas, obtidos de imagens transversais sequenciais de TC e RM (MIYATANI *et al.*, 2004).

FUKUNAGA *et al.*, (2001) estimaram o VM, a AST fisiológica por imagens de RM. Os autores mediram a espessura, o AP e o comprimento do fascículo por US, e validaram duas novas equações, que incluíram outros parâmetros como a altura, massa corpórea e circunferência do braço para os músculos flexores e extensores de cotovelo.

Segundo MIYATANI *et al.*, (2004) a US também pode ser utilizada para estimar o VM. Os autores investigaram a estimativa do VM a partir de medidas de espessura muscular em imagens de US dos músculos flexores e extensores do cotovelo, extensores

do joelho e flexores plantares, e compararam o valor estimado para o VM a partir do US com o obtido por RM. Os autores utilizaram como modelo equações de regressão simples e múltiplas cujas variáveis eram os valores de EM (simples) e EM e comprimento do membro (múltipla). A equação de regressão simples não foi suficiente para predição do VM, enquanto as de regressão múltipla demonstraram predições satisfatórias às condições, com coeficiente de determinação entre 0,787 e 0,884 para os grupos musculares examinados.

### 2.3 IMAGENS BMU 3D

Na medicina, STACHS *et al.*, (2002) empregaram a BMU 3D e utilizaram as imagens para caracterizar e monitorar a função acomodativa do corpo ciliar em humanos, *in vivo*.

ZHOU *et al.*, (2003) utilizaram a BMU 3D para estudar a função cardíaca durante o desenvolvimento embrionário de camundongos. O embrião pode ser visualizado em três dimensões no útero, e o desenvolvimento de outras estruturas embrionárias podem ser examinadas, inclusive o olho, cérebro, patas, pulmões e fígado.

WIRTZFELD *et al.*, (2005) descreveram o uso de BMU 3D para obter o volume de tumores transgênicos de câncer de próstata, em progressão, com modelos de ratos. As medições realizadas nessas imagens BMU 3D, confirmaram com precisão o tamanho e a forma de massas tumorais, *in vivo*.

GRAHAM *et al.*, (2005) demonstraram a utilidade do BMU 3D para não só para controlar o crescimento das metástases do fígado (diâmetro, volume e curva de crescimento de tumores) de forma não invasiva, mas também para avaliar potenciais

quimioterápicos sobre esses parâmetros em um modelo longitudinal para metástases em murinos.

ROELLIG *et al.*, (2011) acompanharam o período de gestação de 70 dias de uma rainha rato toupeira, e de sete gestações de outras duas fêmeas, utilizando BMU e imagens de 3D. As imagens de US possibilitaram descrever a aparência dos órgãos reprodutores e calcular curvas de crescimento para predizer a idade gestacional e caracterizar fases da gravidez. Utilizando UBM, os autores afirmaram que a gravidez pode ser detectada 53 dias antes do parto.

Não foram encontrados, na literatura, estudos com músculo esquelético que apresentem imagens de alta resolução em 3D. No entanto, é crescente o número de estudos que utilizam essa metodologia para análise de tecidos biológicos, principalmente em animais de pequeno porte (ZHOU *et al.*, 2003; WIRTZFELD *et al.*, 2005; GRAHAM *et al.*, 2005; ROELLIG *et al.*, 2011).

### 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 ESPECIFICAÇÕES DA BIOMICROSCOPIA ULTRASSÔNICA

A instrumentação para geração da imagem de BMU 2D tem seu funcionamento similar ao de um equipamento convencional. Um pulso de ultrassom é emitido por um transdutor e propaga-se pelo tecido, e os sinais de eco são detectados pelo mesmo transdutor. À medida que o feixe emitido pelo transdutor executa a varredura pelo meio, várias linhas do modo-A são obtidas e usadas na geração da imagem de BMU 2D.

A principal diferença entre a BMU e um ultrassom convencional que opera em modo B é utilização de altas frequências, que permite a geração de imagens com maior poder de resolução. Na medicina, a utilização da ultrassonografia de alta resolução emprega frequências de 20MHz, na caracterização da pele, até 60MHz em oftalmologia (FOSTER *et al.*, 1993). Por outro lado, seu poder de penetração no tecido é reduzido, pois o coeficiente de atenuação aumenta com a frequência de modo exponencial, variando conforme as características do tecido no qual o ultrassom se propaga. Em tecidos como a íris e a córnea, por exemplo, há pouca atenuação. Mas em estruturas como a parede arterial ou a pele, o coeficiente de atenuação é maior. Para FOSTER *et al.*, (1993) essas diferenças são atribuídas a organização de colágeno e outras proteínas estruturais, no entanto, ainda não são completamente compreendidas.

Utilizando um transdutor de focalização esférica e abertura de 0,5 mm operando em 100 MHz na água, alcança-se uma profundidade de campo de 1,6 mm e resolução lateral e axial de 60  $\mu\text{m}$  e 19  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Ao reduzir a frequência para 30 MHz a profundidade de campo aumenta para 2,5 mm e resolução lateral e axial para 250 e 62 $\mu\text{m}$ , respectivamente, compatíveis com as obtidas por RM, na ordem de 75  $\mu\text{m}$ .

A largura do feixe de ultrassom e a largura de banda do pulso de onda ultrassônica definem as resoluções lateral e axial da imagem, respectivamente. Para transdutores com focalização esférica, a resolução lateral,  $R_{lat}$ , é obtida de acordo com a seguinte expressão (FOSTER *et al.* 2000):

$$R_{lat} = \bar{\lambda} \cdot f_{número}, \quad (1)$$

sendo  $\lambda$  o comprimento de onda relativo à frequência central do pulso de ultrassom emitido pelo transdutor e  $f_{número}$  representa a razão entre a distância focal e a abertura do transdutor.

A resolução axial,  $R_{ax}$ , varia com o inverso da largura de banda do pulso de onda, sendo calculada por (Foster *et al.* 2000):

$$R_{ax} = \frac{1}{2} \cdot \frac{c}{BW}, \quad (2)$$

sendo  $c$  a velocidade de propagação da onda e  $BW$  a largura de banda do pulso de onda.

Na água, um transdutor de alta frequência com largura de banda de 40% e operando em 30 MHz alcança uma resolução axial de 63  $\mu\text{m}$ .

A profundidade de campo,  $DOF$ , é a região útil, em torno do ponto focal do feixe emitido pelo transdutor, na construção da imagens. Para transdutores com focalização esférica, é determinada por (Foster *et al.*, 2000):

$$DOF = 7,0 \cdot \bar{\lambda} \cdot f_{número} \quad (3)$$

### 3.2 MÚSCULO ESQUELÉTICO

O músculo esquelético é formado por feixes de fibras musculares que representam as unidades contráteis desse tecido. Em volta de cada fibra há uma camada de tecido conjuntivo fibroadiposo, o perimísio (aponeurose) e a junção desse tecido nas extremidades de cada músculo forma os tendões, que têm como função básica unir o músculo ao osso (MCARDLE, 2011).

Nas fibras musculares encontram-se os sarcômeros, que são constituídos por um complexo de proteínas e considerados as unidades funcionais do músculo esqueléticos, por serem fisiologicamente responsáveis pela dinâmica da contração muscular. Entre as proteínas que compõe o sarcômero, as principais são a actina e a miosina, que ao se alinharem em série formam estruturas cilíndricas denominadas como miofibrilas (MCARDLE, 2011).

O músculo pode ter estrutura fusiforme ou penada. O primeiro possui suas fibras organizadas de modo paralelo umas as outras e à aponeurose, e o segundo tem suas fibras arranjadas de modo oblíquo em relação à aponeurose, formando uma estrutura conhecida como penada que pode ser unipenada, bipenada (com uma aponeurose central) ou multipenada.

O complexo músculo-tendão é constituído por componentes contráteis (fibras musculares) e elásticos, (tecido tendinoso: tendão, aponeurose, perimísio, endomísio, sarcolema). Esses componentes atuam juntos para a produção de força muscular.

Em uma imagem de US em 2D (Figura 1) é possível visualizar claramente a estrutura penada, em que os feixes são vistos em zonas hipoecóicas, isto é, nas áreas de menor reflexão e portanto mais escuras da imagens. O perimísio, assim como o



epimísio, as fâscias, os nervos e os tendões são estruturas que, devido a sua composição, refletem bastante o US em relação ao músculo e nas imagens são vistas como as linhas hiperecóticas e, portanto, mais claras, que separam os fascículos do músculo.

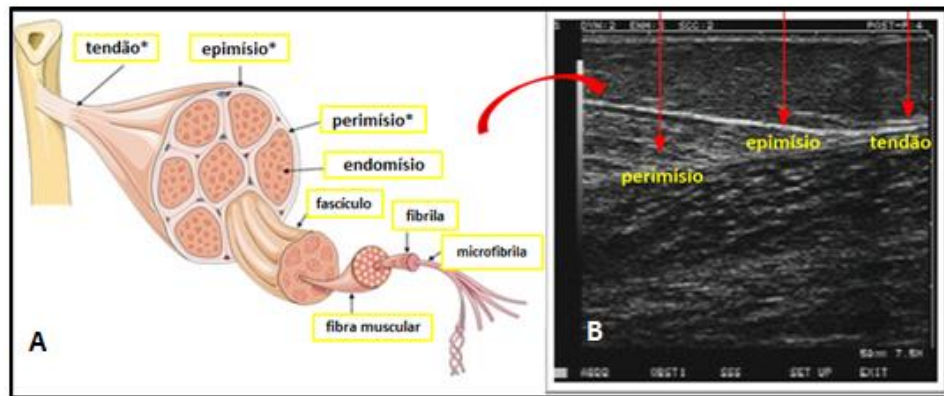


Figura 1. (A) Ilustração do complexo músculo-tendão e seus componentes. (B) Imagem ultrassônica (7,5MHz) de tecido muscular esquelético do tríceps sural humano com alguns componentes apontados pelas setas vermelhas.

### 3.2.1 Gastrocnêmios

Os gastrocnêmios, junto com o sóleo, fazem parte do grupamento muscular tríceps sural, um conjunto de músculos posteriores da perna, vulgarmente conhecido como panturrilha. Esse grupamento possui características específicas e funções definidas e fundamentais para as atividades físicas e diárias, atuando diretamente durante marcha e na manutenção do equilíbrio. Dada à sua exposição contínua possui risco de lesões e rupturas aumentado. O gastrocnêmio é dividido em duas porções: lateral (GL) e medial (GM). Ambas compõem as partes mais superficiais do tríceps sural e encontram-se bem próximas à pele. No caso dos ratos, essa musculatura está um pouco mais profunda, abaixo do bíceps femoral, que o recobre (Figura 2). Nos seres humanos, o tríceps sural possui uma disposição penada das fibras, ou seja, ao se inserirem na aponeurose muscular, elas formam um ângulo em relação ao eixo de geração de força, o ângulo de penação. Nos ratos, o sóleo pode ser considerado

fusiforme já que suas fibras são totalmente paralelas umas as outras e a linha de geração de força, mas os gastrocnêmios, assim como nos seres humanos, apresentam uma estrutura penada.

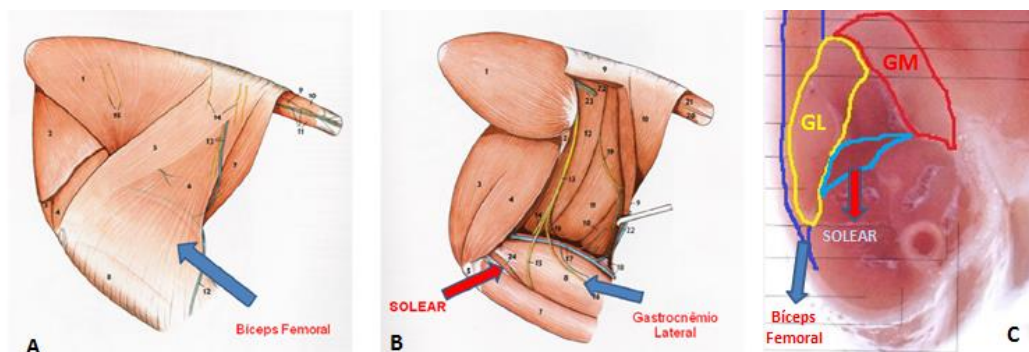


Figura 2. (A) Pata trazeira de rato, com bíceps femoral recobrindo o tríceps sural, (B) músculos componentes do tríceps sural, solear e gastrocnêmio lateral (abaixo do bíceps femoral) e (C) corte transversal da pata. O contorno em amarelo indica o GL, o vermelho o GM, o azul claro o solear e o azul escuro, o bíceps femoral. Retirado e adaptado de POPESKO *et al.*, (2002) (A,B) e de TAKAMASA *et al.*, (2001) (C).

### 3.3 CARACTERÍSTICAS BIOMECÂNICAS

As características biomecânicas do músculo esquelético são fundamentais para estimar sua função e para classificá-lo quanto a sua arquitetura e assim, prever seu comportamento quanto à produção força, elasticidade, ativação etc. Essas características são parametrizadas e servem como entrada para diversos modelos matemáticos de avaliação funcional, principalmente da força muscular (NARICI, 1999).

A produção de torque e a função muscular são determinadas pelas relações geométricas que se formam conforme as fibras se arranjam em um músculo, ou seja, pela arquitetura muscular. Essa disposição das fibras musculares pode ocorrer de modo paralelo à linha de ação muscular ou de modo penado, obliquamente à linha de ação, e ao se inserirem no tecido conjuntivo (aponeurose interna) formam um ângulo, o ângulo de penação (KAWAKAMI, 2005). A forma como essas fibras se arranjam é de grande importância no estabelecimento das relações constitutivas, força-comprimento e força-velocidade de encurtamento do músculo esquelético (LIEBER, 2002).

A arquitetura muscular passa por alterações devido a estímulos externos, doenças ou estado fisiológico do indivíduo. E seu estudo permite avaliar a relação entre a estrutura e a função dos músculos, e o quanto essas estruturas se adaptam em diferentes condições (KAWAKAMI, 2005), de uso aumentado, reduzido ou desuso, o que possibilita a determinação de diretrizes para programas de treinamento e reabilitação (KAWAKAI *et al.*, 1993). Existem ainda pesquisas para distinguir fenótipos por meio da arquitetura muscular, a fim de determinar características decisivas para atletas de alto rendimento (SILA e CARVALHO, 2007).

A utilização de técnicas de imagem como o ultrassom e a ressonância magnética para medir parâmetros da arquitetura muscular *in vivo* permite que pesquisadores relatem alterações nas propriedades mecânicas da unidade músculo-tendão, o que leva a crer que a arquitetura muscular possui alto grau de plasticidade e que as modificações e adaptações ocorridas são capazes de influenciar e, sobretudo alterar a expressão da força muscular.

### 3.3.1 Volume Muscular

O volume é um parâmetro de arquitetura muscular relacionado à quantidade de material contrátil presente no músculo e reflete diretamente na função e na capacidade de produção de força muscular (LIEBER E FRIDEN 2000). A partir de medidas volumétricas musculares também é possível estimar a contribuição individual para o torque de músculos que compõem um grupamento (KONISHI *et al.*, 2012; MAGANARIS, 2004). Além disso, a quantificação do volume (junto com o comprimento muscular) pode ser utilizada para avaliar contraturas musculares e determinar alterações ocasionadas por intervenções cirúrgicas ou por treinamentos específicos (FRY *et al.*, 2007; KAWAKAMI *et al.*, 2008).

Alguns métodos podem ser utilizados para a obtenção direta ou indireta do volume de uma estrutura: pesagem hidrostática, cálculos por medidas físicas, entre outras. Já o volume muscular pode ser obtido por dados antropométricos, dobras cutâneas, técnicas de bioimpedância elétrica e imagens transversais de tomografia computadorizada (TC) e ressonância magnética (RM). A ultrassonografia, de modo indireto, também permite estimar esse parâmetro a partir de medidas da espessura muscular, empregando equações de regressão simples ou múltipla. Dados de imagens transversais obtidas por TC e RM permitem calcular a área de secção transversa de um músculo. Adicionando os volumes segmentares, fornecidos pelo produto entre essas áreas e a distância entre elas, estima-se o volume muscular (INFANTOLINO *et al.*, 2006).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 INSTRUMENTAÇÃO PARA A GERAÇÃO DE IMAGEM DE BMU 3D

As imagens de BMU 3D foram geradas por meio do processamento de imagens de BMU 2D adquiridas de múltiplos planos de imagem paralelos e igualmente espaçados entre si, como mostra a Figura 3, gerados por um equipamento comercial de BMU 2D.

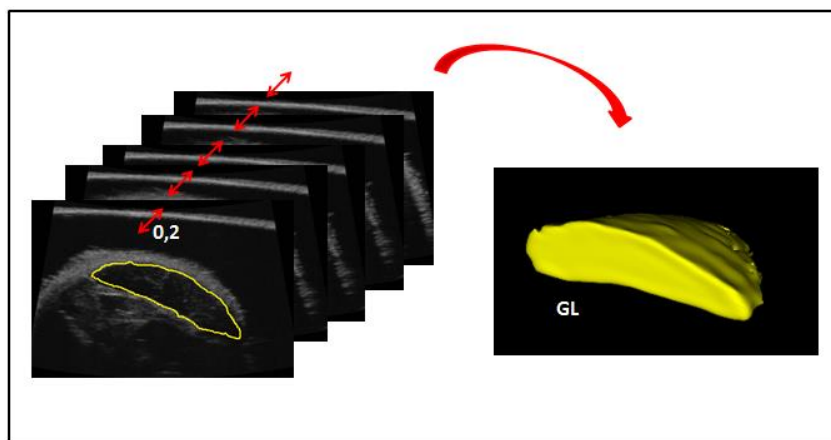


Figura 3. Esquema mostrando a sequência dos múltiplos planos em 2D e a imagem convertida para 3D. As setas em vermelho representa a distância entre os quadros de imagens em 2D. A estrutura envolvida em amarelo é o músculo gastrocnêmio lateral de rato.

A instrumentação utilizada na presente dissertação baseia-se em um equipamento comercial de BMU desenvolvido por Capistrano Labs Incorporated (San Clemente, CA 92672, EUA). Basicamente, o equipamento é composto por um sistema de geração de imagens baseado em um microcomputador pessoal (PC), estando todo o *hardware* contido em uma placa instalada no barramento PCI do PC (processador Intel Core i3 2100). Esta placa compreende um sistema de imagem de US completo e inclui o sistema de controle de “servomecanismo” que aciona a varredura do feixe de US. Além do controlador de servomecanismo, o *hardware* da placa inclui ainda o emissor/receptor de US, o detector de envelope dos sinais de eco, o conversor analógico/digital (A/D) com

frequência de amostragem de 80 MHz. A conversão de varredura é realizada por cálculo computacional. O equipamento de BMU opera em plataforma *Windows* e é controlado pelo Software Ultraview (versão 5.93; Capistrano Labs, Incorporated, San Clemente, CA, EUA).

O transdutor utilizado, com focalização esférica, opera em 35 MHz e contém uma fina membrana piezoelétrica de difluoreto de polivinilideno (PVDF) com metalização a ouro (C190210; Capistrano Labs, Inc., San Clemente, EUA). Tem ainda como características: distância focal de 12 mm, profundidade de campo de 0,8 cm e diâmetro de 5 mm ( $f_{\text{número}}$  de 2,4).

O transdutor de US se movimenta em forma pendular no plano de imagem, cujo quadro de imagem tem largura e altura de 13 e 8 mm, respectivamente. A altura do quadro de imagem é dependente da profundidade de campo do transdutor de US e a largura depende do ângulo do movimento pendular do transdutor e da distância entre o foco do feixe emitido pelo transdutor e o ponto em torno do qual o pêndulo oscila. O equipamento de BMU, fabricado por Capistrano Labs, gera imagens de ultrassom modo-B numa taxa de 20 quadros/segundo.

A imagem é gerada no formato setorial com ângulo de 20° é formada por 256 linhas em modo-A, cada linha com 2048 pontos de dados e cada ponto de dados assumindo valores entre 0 e 255. Os dados usados na formação de um quadro de imagem são armazenados em extensão “BS” e utilizados posteriormente para a geração de uma imagem que é armazenada em formato “jpeg”.

O sistema experimental, incluindo o equipamento de BMU 2D e todos os demais componentes usados na geração da imagem de BMU 3D podem ser visualizados na Figura 4.

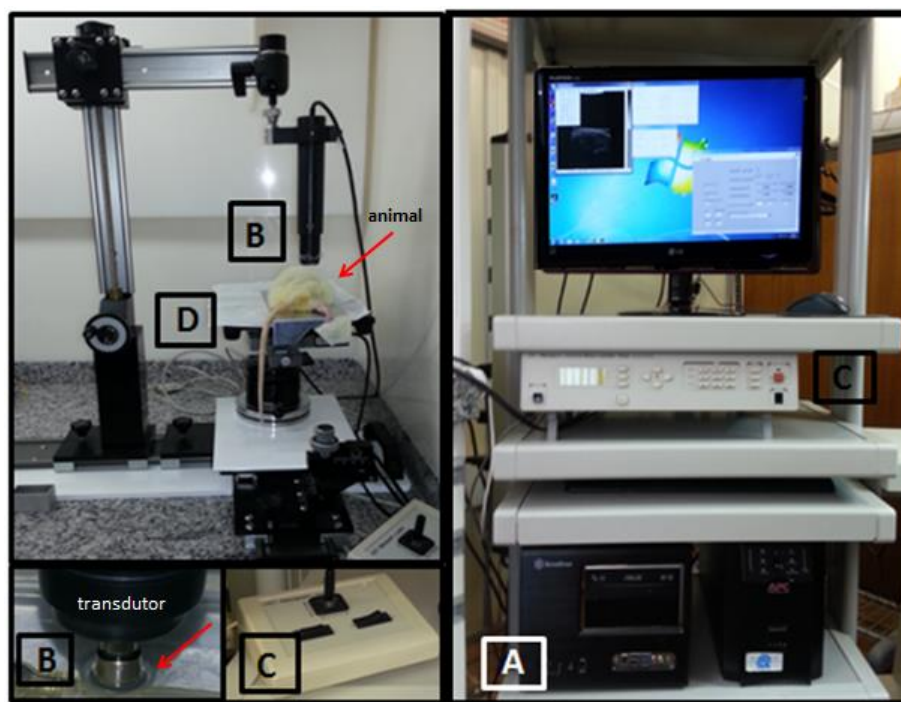


Figura 4. Sistema experimental para geração de imagens de BMU 3D: (A) computador com placa BMU Capistrano, (B) sonda BMU com transdutor (indicado pela seta em vermelho) e ampliação correspondente, (C) unidade de controle de movimento e *joystick* na ampliação correspondente, (D) plataforma de apoio para animal (indicado pela seta em vermelho).

O sistema responsável pelo deslocamento da plataforma que contém o meio do qual se obtém a imagem de BMU consistiu de um sistema de posicionamento ESP300 (Newport, Irvine, EUA) composto por um equipamento controlador de movimento que funciona como um *driver* responsável pelo acionamento de um *joystick* e pelo controle de dois motores usados nos estágios lineares (MFA-CC; Newport, Irvine, EUA) configurados em um plano horizontal XY. Cada estágio linear possui curso total de 2,54cm, passo com precisão de 0,0175  $\mu\text{m}$  e uma velocidade máxima de 2,5 mm/s. Durante a aquisição de imagens de BMU 2D, o meio a ser imageado (*phantom* ou animal) é colocado sobre uma plataforma (AS-11550; VisualSonics, Toronto, Canadá) que se desloca por degraus numa direção perpendicular ao plano de imagens 2D.

O movimento de cada estágio linear é programado pelo mesmo computador que contém o sistema da Capistrano e sua comunicação com o *driver* da Newport se faz por

meio da interface RS-232.

Toda a programação computacional do sistema de BMU realiza-se em linguagem LabVIEW (versão 7.1; National Instruments, Austin, EUA).

#### 4.2 AQUISIÇÃO DAS IMAGENS DE BMU 2D EM MÚLTIPLOS PLANOS

Para a aquisição das imagens de BMU em 2D em múltiplos planos paralelos, os motores usados nos estágios lineares configurados em um plano horizontal XZ necessitam de um controle segundo o qual o estágio linear no eixo X (paralelo aos planos de imagem) permanece parado e o do eixo Z (perpendicular aos planos de imagem) se move a passos controlados. Após cada passo no eixo Z, o sistema de posicionamento se mantém parado por 3 segundos para adquirir e salvar a imagem BMU 2D do plano correspondente. O operador define o tamanho do passo e o curso total, e o sistema determina o número de passos correspondentes e a velocidade máxima possível para a atuação do estágio linear. O esquema na Figura 3 demonstra de que forma isso acontece.

Em termos práticos, o tamanho do passo deve ser um pouco maior que a resolução lateral do sistema, já que um passo menor inclui informação redundante e um passo muito maior pode perder informação. Com isso, no presente caso foi escolhido um passo de 0,2 mm, já que a resolução lateral é de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ . Para cada posição de aquisição de imagem, são adquiridos 28 quadros de imagem de BMU 2D e a imagem média correspondente é determinada. A imagem média é armazenada em formato de "BS", que corresponde aos 256 blocos, cada um com 2048 dados, consecutivamente agrupados em um vetor. Cada dado, com valor entre 0 e 255, é representado em ASCII.

Após a conclusão da varredura no eixo Z, com a consequente aquisição e



armazenamento dos dados correspondente a cada uma das imagens de BMU 2D em múltiplos planos paralelos e igualmente separados entre si, o programa mestre executa uma rotina de conversão de varredura, por interpolação bilinear, para cada uma das imagens em BMU 2D obtida inicialmente na forma setorial. A interpolação bilinear mapeia os dados que foram obtidos utilizando coordenadas polares em um sistema de coordenadas retangulares, espaçadas de 9,375 µm em cada um dos eixos ortogonais, e uma imagem com dimensões típicas de 13x8mm de largura e altura, respectivamente, é formada em uma moldura retangular. A etapa computacional da conversão de varredura é executada em linguagem C (AT&T Bell *Laboratories*, Murray Hills, EUA) através de uma DLL (*Dinamic Link-Library*) carregada no programa computacional executado no micro PC desenvolvido em LabVIEW. A Figura 5 apresenta um diagrama de blocos correspondente a sequência de etapas relacionadas com a aquisição dos múltiplos quadros de imagem de BMU 2D, em que o N inicial é o número de passos a serem dados pelo estágio linear de eixo Z, ou seja, o número de imagens BMU 2D a serem adquiridas.

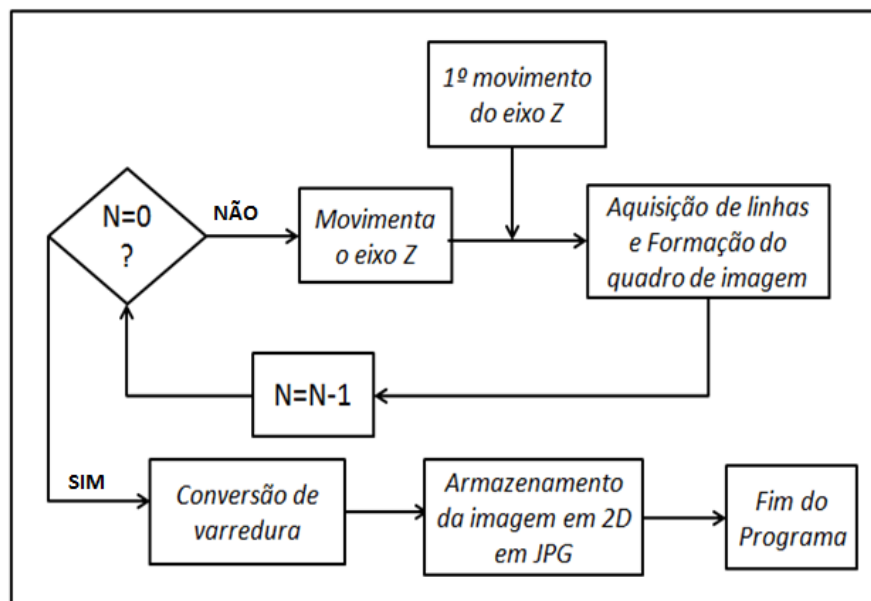


Figura 5. Diagrama de blocos correspondentes às sequências de operações para adquirir o conjunto de imagens 2D.

#### 4.3 CONSTRUÇÃO DAS IMAGENS de BMU 3D

Os quadros de imagens de BMU 2D, já armazenados em formato “jpeg”, são convertidos para o formato Dicom, com o auxílio do *software* Dicomizer (H.R.Z. Software Services LTD, Tel-Aviv, Israel). Em seguida, são segmentados pelo programa computacional TurtleSeg (Medical Image Analysis Lab at Simon Fraser University, e The Biomedical Signal and Image Computing Laboratory at the University of British Columbia, Vancouver, Canadá) com o qual é possível gerar as imagens 3D da estrutura e calcular seu volume posteriormente.

A segmentação das imagens ocorre de modo semiautomático, sendo realizada com o auxílio de uma ferramenta interna do *software*. A *Livewire* facilita o trabalho do operador, e é usada para acelerar o processo de contorno na imagem bidimensional, então, quando o mouse é movido, o contorno, ou *Livewire*, seguirá automaticamente a borda do objeto em tempo real, a fim de tornar mais preciso o processo, como é possível observar na Figura 6. Além disso, existe outra ferramenta do *software*, a *spotlight*, que, sugere os melhores planos de contorno ao operador colaborando para uma segmentação mais completa.

O método semiautomático de contorno da borda parece ser superior ao método automático que normalmente desconsideraria variações anatômicas entre as amostras, o que possivelmente comprometeria o resultado (POON, HAMARNEH, ABUGHARBIEH, 2007).

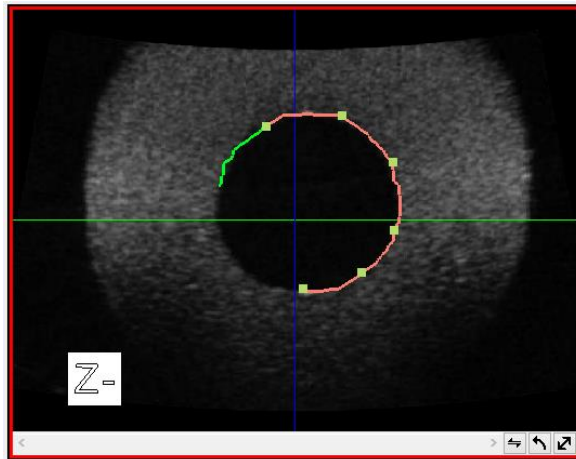


Figura 6. Ilustração da ferramenta de segmentação semiautomática (*Livewire*), com a fixação de uma linha de contorno ao longo da borda que delimita a região a ser segmentada e contida em um plano que atravessa essa região. Os pontos marcados por pequenos retângulos referem às marcações feitas pelo operador e a linha rosa refere-se ao contorno já fixado e que passa pelos pontos marcados. A linha em verde representa um trecho em construção e ficará definitiva (rosa) após ser definido um novo ponto de marcação.

O processo de geração do contorno fechado é realizado em vários planos sugeridos pelo programa, até se conseguir visualmente um volume segmentado que represente o volume desejado. Normalmente, quanto maior o objeto, maior o número de contornos realizados. Os contornos são executados em planos contidos nas três orientações e no presente caso, o maior número contornos foram realizadas no plano Z (transversal), que corresponde à extensão de comprimento e profundidade da estrutura. Outras segmentações também foram realizadas a partir dos planos X (sagital) e Y (coronal), no entanto, em menor número, pois a extensão a ser preenchida era menor (Figura 7).

Após a segmentação, o próprio *software* oferece um recurso para calcular o volume contido na imagem gerada em 3D. O valor final do volume (em unidades de volume) é calculado por meio de um procedimento de calibração de escala, que considera além do valor fornecido pelo *software* (Figura 6), as dimensões da imagem.

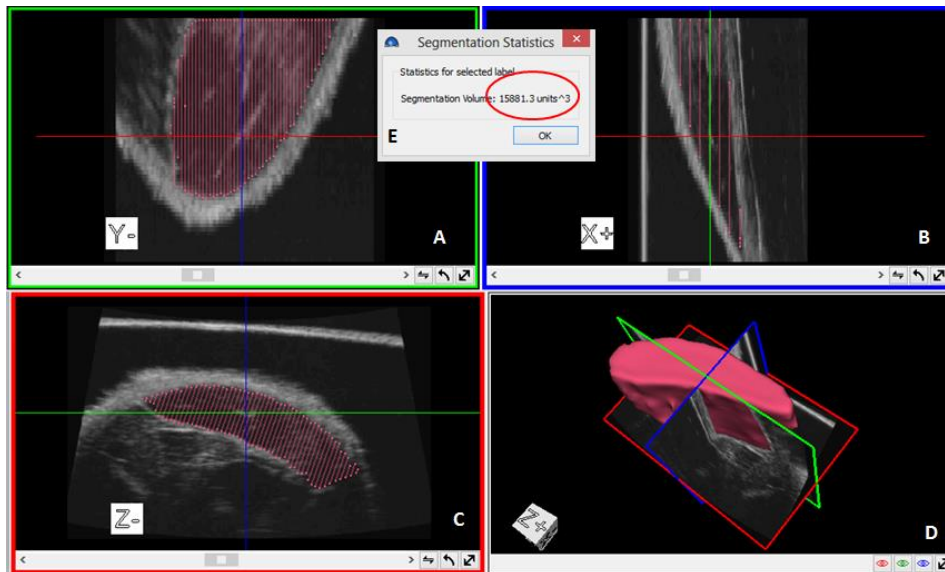


Figura 7. Detalhes do processo de segmentação no gastrocnêmio lateral de rato. (A) Plano coronal, (B) Plano sagital (C) Plano transversal (D) Imagem em 3D gerada a partir da segmentação realizada nos 3 planos. (E) A caixa cinza na parte superior, mostra o valor do volume segmentado calculado pelo próprio *software*. A parte hachurada em rosa representa o preenchimento realizado pela segmentação.

#### 4.4 CONFECCÃO DOS *PHANTOMS*

A construção dos *phantoms* seguiu a metodologia descrita por Ryan e Foster (1997): pó de gelatina (Tipo A: de pele de porco, G-2500; Sigma Chemical, Missouri, EUA) dissolvido em água destilada, numa temperatura controlada de 50°C, na concentração de 15% em peso até não haver grumos. Como espalhador de US foi utilizado pó de sílica (S-5631; Sigma Chemical, Missouri, EUA), em uma concentração de 2% em peso.

Foram confeccionados 4 *phantoms*, com diferentes geometrias. Todos com formato externo cilíndrico, consistindo em duas partes concêntricas, uma parte cilíndrica externa (anecóica ou ecóica) que envolve uma parte interna de formato cilíndrico ou cônico (anecóica ou ecóica). Estes *phantoms* foram da nomeados da seguinte forma:  $PH_{XY}T_f$ , em que "XY" representa a ecogenicidade (0 ou 1 para

anecóica ou ecóica) das partes exteriores e interiores respectivamente, "t" representa o diâmetro externo dos *phantoms* (G para grande ou P para pequena) e "f" representa o formato da parte interna (CI para cilíndrico ou CO para cônico). Os 4 *phantoms* foram nomeados PH<sub>01</sub>G<sub>CI</sub>, PH<sub>10</sub>P<sub>CI</sub>, PH<sub>10</sub>PP<sub>CI</sub>, PH<sub>10</sub>G<sub>CO</sub>. Na Figura 7 é possível observar os moldes utilizados para construir os *phantoms* e os observá-los prontos.

A parte exterior dos *phantoms* foi moldada usando seringas (Becton Dickinson, Franklin Lakes, EUA) de 3 ml (para o *phantom* grande) e 1 ml (para o *phantom* pequeno), que tiveram suas extremidades do lado de inserção da agulha seccionadas transversalmente ao eixo de simetria da seringa. Já para a moldagem da parte interna foram utilizados parte de um canudo plástico em polipropileno (Frascobel Descartáveis Plásticos, Rio Grande do Sul, Brasil), agulhas hipodérmicas descartáveis (MedGoldman, Amazonas, Brasil) de 25x0.9 e 25x0.8mm e uma ponteira de micropipeta em polipropileno transparente de até 200 µl (Plast Labor, Rio de Janeiro, Brasil), respectivamente.

O *phantom* PH<sub>01</sub>G<sub>CI</sub> foi confeccionado em formato cilíndrico, com a parte externa moldada por uma seringa de 3 ml (anecóica) e parte interna moldada com canudo flexível (ecóica) (Figura 8A); o PH<sub>10</sub>P<sub>CI</sub>, também com formato cilíndrico mas com parte externa moldada em seringa de 1 ml (ecóica) e parte interna anecóica, moldada com agulha de 0.9 mm de diâmetro (Figura 8B); o PH<sub>10</sub>PP<sub>CI</sub>, em formato cilíndrico e parte externa moldada com seringa de 1 ml (ecóica) e parte interna anecóica, moldada com agulha de 0.8 mm de diâmetro (Figura 8C); e o PH<sub>10</sub>G<sub>CO</sub>, em formato cônico com parte externa moldada em seringa de 3 ml (ecóica) e parte interna anecóica, moldada com ponteira de micropipeta automática (Figura 8D).

Para confeccionar os *phantoms*, uma seringa com uma de suas extremidades fechada pelo êmbolo foi preenchida com gelatina dissolvida em água quente, misturada

ou não com espalhadores (de acordo com o *phantom* que estivesse sendo construído), e mantida na posição vertical. A seguir, o pedaço de canudo, a agulha descartável ou a ponteira de micropipeta, eram inseridos através da extremidade aberta da seringa, e fixados em uma marca feita previamente no centro do êmbolo. Após a inserção do molde interno (canudo, agulha ou ponteira), a seringa contendo a gelatina (com ou sem espalhador, dependendo do *phantom*) era colocada na geladeira, por cerca de 12 horas para aguardar o endurecimento da gelatina. Depois de retirada da geladeira, o molde da parte interna (canudo/agulha/ponteira) era removido e posteriormente preenchido de gelatina misturada com espalhadores ou não, conforme o *phantom* a ser produzido. Os *phantoms* com a parte interna anecóica e, portanto, vazia, tinham esse espaço preenchido por água durante o experimento, após a imersão do mesmo em uma cuba com água. Antes do preenchimento da seringa, foi borrifado em sua parede interna óleo de silicone líquido para facilitar a retirada do *phantom* de dentro da mesma. Ao fim do processo de confecção, os *phantoms* foram mantidos por 5 minutos, em uma solução de formol a 5% (B. Herzog, Rio de Janeiro, Brasil) a fim de aumentar a consistência, prolongar a vida útil dos mesmos e evitar a formação de fungos (Ryan e Foster, 1997). Segundo Ryan e Foster (1997) a velocidade de propagação e o coeficiente de atenuação desse tipo de *phantom*, para uma frequência de 35MHz é de aproximadamente 1549 m/s e 2,5dB/mm, nesta ordem).

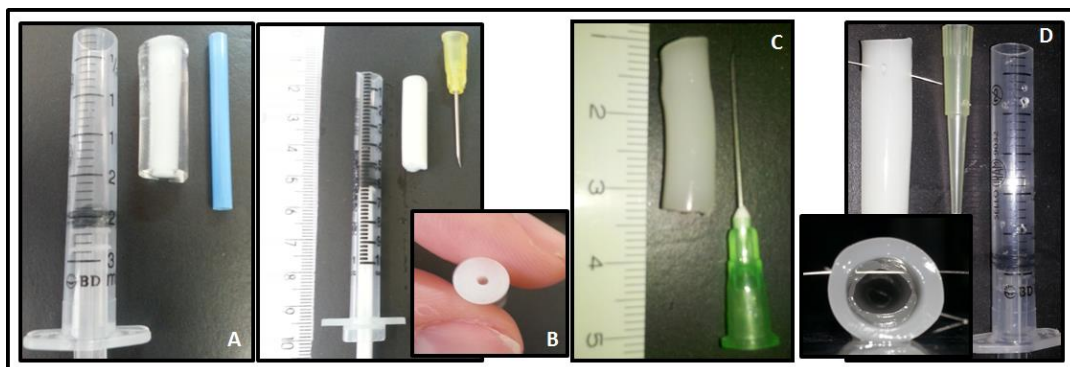


Figura 8. *Phantoms* (A)  $PH_{01}G_{Cl}$ , (B)  $PH_{10}P_{Cl}$ , (C)  $PH_{10}PP_{Cl}$  e (D)  $PH_{10}G_{CO}$  e principais acessórios utilizados para prepará-los.

#### 4.5. AQUISIÇÃO DE IMAGENS DOS *PHANTOMS*

Antes da primeira aquisição, foram introduzidos de forma transversal 2 fios de metal (0.3mm de diâmetro) nas duas extremidades dos *phantoms*, a fim de que ao identificá-los na imagem fosse possível determinar os pontos de início e fim da aquisição. Em seguida, o *phantom* foi fixado a uma estrutura de plástico ligada a uma pequena placa de alumínio para evitar a flutuabilidade, e imerso em água destilada contida em um reservatório de plástico colocado sobre a plataforma, como observado na Figura 9A.

A fim de validar e certificar a confiabilidade do sistema de BMU 3D para medir volumes, foram realizadas 10 sequências de aquisição de imagens de BMU 2D para cada *phantom*. O número total de imagens adquiridas em cada sequência variou entre 60 a 120, dependendo do comprimento do *phantom*. Em todos os intervalos entre as aquisições, os fios eram retirados e recolocados tendo a distância entre eles medida 5 vezes (representando o comprimento do mesmo) com o auxílio de um paquímetro digital (Digimess, São Paulo, Brasil) como mostra a figura 9B, para compor o posterior cálculo de volume físico, a ser comparado com o volume calculado a partir das segmentações das imagens. Para cada sequência de aquisições o TurtleSeg foi

executado 5 vezes (5 segmentações para cada sequência), totalizando 50 segmentações para cada *phantom*, isto é, 50 imagens em 3D e 50 valores de volume.

Durante a aquisição de imagens de todos os *phantoms* a temperatura foi monitorada, variando de 22 a 25°C, e para isso utilizou-se um termo higrômetro digital mth-1362w (Minipa, São Paulo, Brasil).

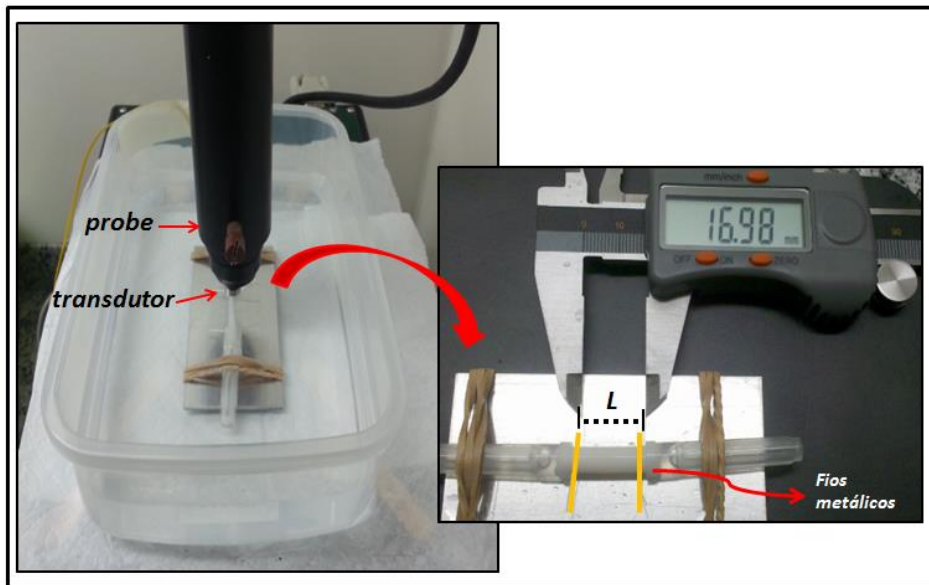


Figura 9. (A) *Phantom* colocado em uma estrutura de plástico fixado a uma pequena placa de alumínio dentro de cuba cheia com água destilada. (B) Fios nas extremidades do *phantom* e medida da distância entre eles (a altura do *phantom*) com um paquímetro digital.

#### 4.6 VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS DE VOLUME DOS *PHANTOMS*

A acurácia da metodologia para geração de imagens em 3D usando múltiplos quadros de imagens em 2D foi testada pela comparação do volume obtido por segmentação com o volume obtido pelas dimensões físicas dos *phantoms*.

O volume final calculado (utilizando os valores fornecidos pela segmentação e as dimensões das imagens) levou em consideração um fator de correção que considera a razão entre a velocidade de propagação do ultrassom considerada pelo equipamento de



BMU (1500 m/s) e a velocidade de propagação do ultrassom no material do phantom (aproximadamente 1540 m/s). Caso houvesse diferenças significativas entre os 2 valores, seria considerado o valor do volume resultante da segmentação multiplicado pelo fator de correção para comparação do volume determinado através da imagem 3D com o volume físico.

#### 4.7 AQUISIÇÃO DA SEQUÊNCIA DE IMAGENS BMU 2D, *IN VIVO*, DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO DE RATOS

Foram utilizados 5 ratos Wistar, com peso médio de 233,4 g. Todo o protocolo experimental envolvendo animais foi realizado em conformidade com as recomendações e com a aprovação do Comitê de Ética de Pesquisa em Animais da Universidade Federal do Rio de Janeiro (LABCE nº: 07-09/13).

Antes da aquisição de imagem, os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de ketamina (10-15 mg/kg) e xilazina (50-75 mg/kg), e tiveram as patas trazeiras tricotomizadas.

A seguir, o animal foi posicionado sobre a plataforma em posição corporal pronada, com o tornozelo em posição neutra (90°) e rotação interna da articulação do quadril como mostrado na Figura 10A. A pata do animal foi colocada em um anteparo plástico e totalmente recoberta de gel a base de água (Ultrex-gel; Farmativa Indústria e Comércio Ltda, Rio de Janeiro, Brasil) para permitir o acoplamento acústico entre o transdutor de ultrassom e o animal (Figura 10B).

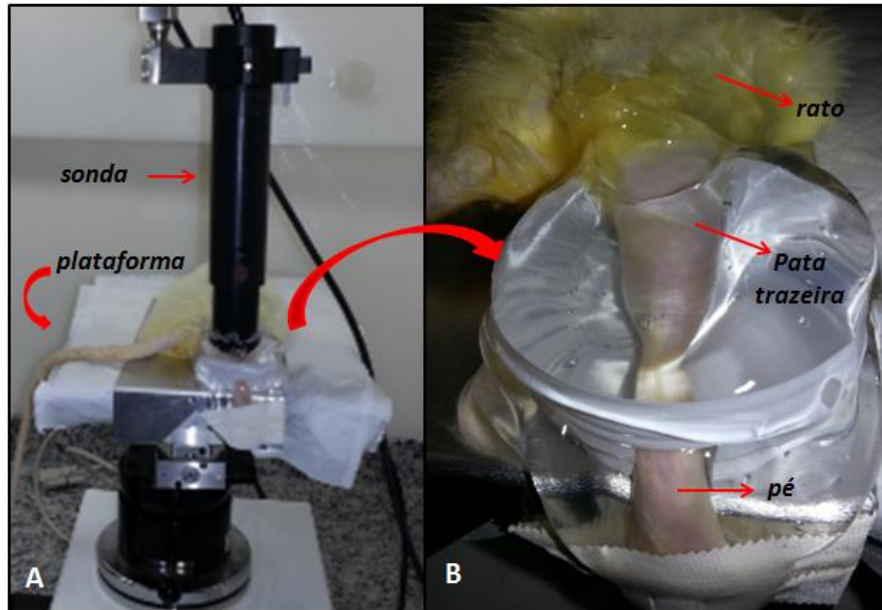


Figura 10. (A) Posicionamento do animal na plataforma e *probe*. (B) Detalhe da pata de rato no anteparo plástico com tornozelo em posição neutra ( $90^\circ$ ) e rotação interna do quadril, coberto com gel.

O plano de imagem 2D, definido pela varredura do feixe de ultrassom emitido pelo *probe*, é alinhado perpendicularmente ao eixo longitudinal do músculo gastrocnêmio. À medida que se adquire uma imagem 2D, a plataforma em que o animal está posicionado se desloca a um passo controlado e mantido em 0,2mm na direção perpendicular ao plano de imagem. O processo se repete até que toda a distância pré-determinada e programada para o eixo z seja percorrida.

Após a aquisição das imagens de BMU 2D foi possível identificar os músculos gastrocnêmios medial e lateral do rato, com o auxílio de um atlas anatômico animal (Figura 11A e B).

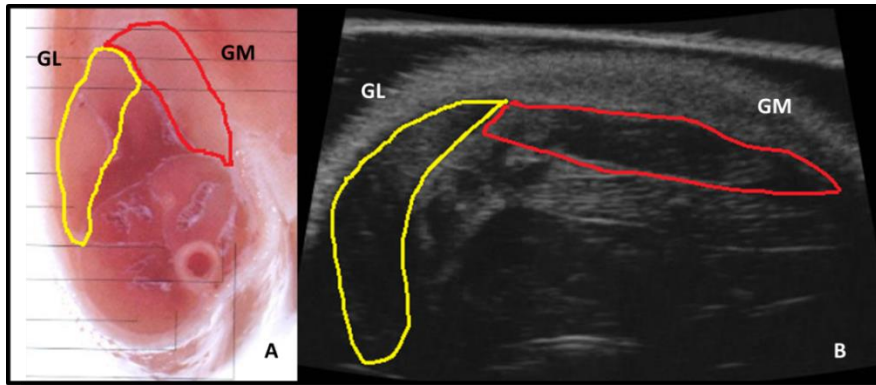


Figura 11. (A) Imagens transversais dos músculos GL e GM da pata esquerda de rato retirada de atlas animal anatômico e (B) e obtida por BMU 2D. Retirado e adaptado de Takamasa et al., (2001).

Após a segmentação das imagens no programa TurtleSeg, foi possível obter uma visão global da estrutura, em 3D. No entanto, não foi possível realizar a segmentação do músculo inteiro do animal pelo fato do curso total do estágio linear ser menor que o comprimento de todo o músculo. O protocolo de aquisição necessitará, futuramente, de ajustes de modo que a varredura se estenda entre as inserções proximal e distal do músculo.

As imagens obtidas de alguns animais não tinham qualidade suficiente para serem processados com o *software* TurtleSeg, e apenas 4 sequências de aquisição de imagens, obtidas de animais diferentes, foram utilizados para gerar imagens 3D e calcular o volume de segmentação do músculo do gastrocnêmio de lateral.

#### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com *software* comercial SPSS 20.0 (IBM SPSS; Chicago, USA). A distribuição normal das medidas foi avaliada pelo teste Kolmogorov-Smirnov. Para verificar as diferenças entre as 5 medidas de segmentação e entre as 10 medidas de aquisições, aplicou-se o teste paramétrico ANOVA one-way

para medidas repetidas, com correção de Bonferroni. Foram verificadas a confiabilidade e a variabilidade das medidas pelo coeficiente de variação (CV) e pelo coeficiente de correlação intraclass (ICC). Para a estimativa de erro, calculou-se o erro típico da medida (ETM), sugerido por Hopkins (2000). O teste-t foi realizado para verificar a existência de diferenças significativas entre as médias do volume físico e calculado.

Para a validação da técnica, foi calculada a diferença absoluta (DA) entre o volume físico do *phantom* e o volume obtido pelas segmentações e ETM.

Foi calculado ainda o coeficiente de correlação de *Pearson*, para verificar se há correlação entre o comportamento das medidas de volume obtidas por segmentação e pelas dimensões físicas dos *phantoms*.

O limite de significância estatística de todos os testes foi estabelecido em  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

Foram adquiridas imagens em BMU 2D e convertidas para 3D de todos os *phantoms* como é possível observar nas Figuras 12 e 13, respectivamente.

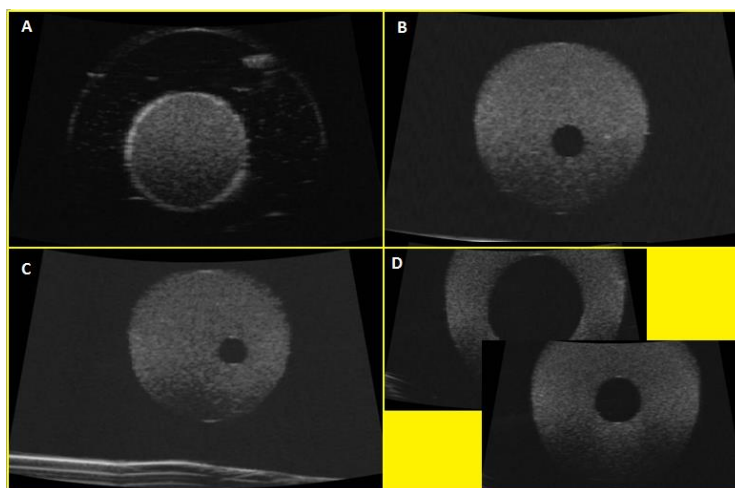


Figura 12. Imagens de BMU 2D dos *phantoms* (A)  $PH_{01}G_{Cl}$ , (B)  $PH_{10PCL}$ , (C)  $PH_{10PPCl}$  e (D)  $PH_{10GCo}$  imagem superior parte do *phantom* de diâmetro maior e imagem inferior do diâmetro menor.

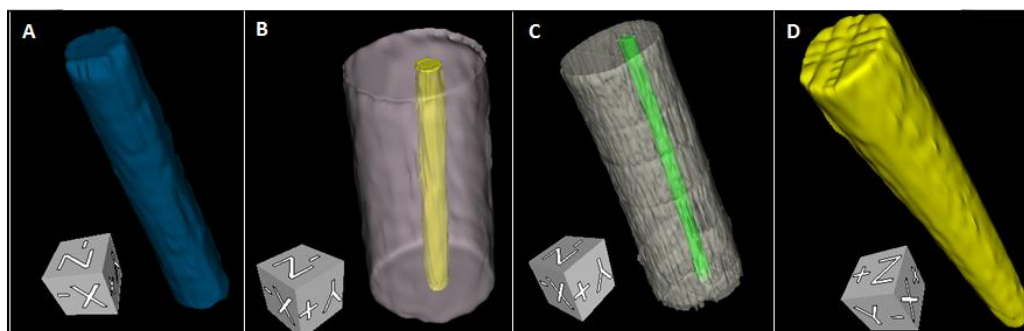


Figura 13. Imagens de BMU 3D após a segmentação dos *phantoms* (A)  $PH_{01}G_{Cl}$ , (B)  $PH_{10PCL}$ , (C)  $PH_{10PPCl}$  e (D)  $PH_{10GCo}$ .

### 5.1 CONFIABILIDADE DAS MEDIDAS DE VOLUME DOS *PHANTOMS* OBTIDAS DAS IMAGENS DE BMU 3D E VALIDAÇÃO DA TÉCNICA.

Para todos os *phantoms*, os valores das medidas de volume determinadas por

segmentação das imagens de BMU 3D apresentaram distribuição normal. Os dados referentes à média, desvio padrão (DP), CV, ICC de todos os *phantoms* podem ser observados nas Tabelas 1 e 2. Na Tabela 1, estão os valores representativos das medições ao longo das 10 sequências de aquisição e para cada uma das 5 repetições de segmentação. Esses valores serão referenciados no texto por “médias das segmentações”. Na Tabela 2, estão os valores que representam as medições ao longo das 5 repetições de segmentação para cada uma das 10 sequências de aquisição. Esses valores serão referenciados no texto por “médias das aquisições”.

Tabela 1. Média, DP, CV e CCI para as medições de volume ao longo das 10 sequências de aquisição, para cada uma das 5 repetições de segmentação (médias das segmentações), para os 4 *phantoms*

Segmentação	PH <sub>01</sub> G <sub>CI</sub>		PH <sub>10</sub> P <sub>CI</sub>		PH <sub>10</sub> PP <sub>CI</sub>		PH <sub>10</sub> G <sub>CO</sub>	
	Média ± DP (mm <sup>3</sup> )	CV (%)	Média ± DP (mm <sup>3</sup> )	CV (%)	Média ± DP (mm <sup>3</sup> )	CV (%)	Média ± DP (mm <sup>3</sup> )	CV (%)
1	304,01±14,02	4,61	14,45±1,50	10,41	14,42±1,85	12,85	305,47±48,84	15,99
2	301,64±18,51	6,13	14,31±1,61	11,25	14,06±1,56	11,13	310,24±47,39	15,27
3	302,68±17,33	5,72	14,47±1,38	9,58	14,07±1,77	12,57	307,54±46,95	15,26
4	302,73±14,08	4,65	14,43±1,33	9,26	14,02±1,71	12,23	307,69±47,98	15,59
5	296,11±21,04	7,10	14,12±1,27	9,04	14,11±1,62	11,48	308,67±47,81	14,48
CCI	0,74		0,90		0,92		0,99	

Tabela 2. Média, DP, CV e CCI para as medições de volume ao longo das 5 repetições de segmentação para cada uma das 10 sequências de aquisição (médias das aquisições), para os 4 *phantoms*

Sequências de Aquisições	PH <sub>01</sub> G <sub>CI</sub>		PH <sub>10</sub> P <sub>CI</sub>		PH <sub>10</sub> PP <sub>CI</sub>		PH <sub>10</sub> G <sub>CO</sub>	
	Média ± DP (mm <sup>3</sup> )	CV (%)	Média ± DP (mm <sup>3</sup> )	CV (%)	Média ± DP (mm <sup>3</sup> )	CV (%)	Média ± DP (mm <sup>3</sup> )	CV (%)
1	267,9±7,08	2,64	10,6±0,34	3,22	11,5± 0,21	1,88	226,5±1,28	0,56
2	296,9±6,67	2,24	14,0±0,19	1,40	12,3±0,39	3,19	256,5±0,96	0,37
3	291,6±9,94	3,40	14,4±0,27	1,90	13,0±0,23	1,79	266,6±5,90	2,21
4	302,9±3,80	1,25	14,3±0,06	0,44	13,2±0,17	1,35	286,8±2,31	0,80
5	305,3±14,60	4,78	15,6±0,41	2,63	13,3±0,19	1,47	303,5±1,35	0,44
6	290,5±11,43	3,93	15,0±0,30	2,02	14,5±0,69	4,77	306,4±2,45	0,79
7	302,1±5,72	1,89	15,9±0,37	2,36	15,9±0,34	2,16	341,8±4,11	1,20
8	324,5±7,02	2,16	14,2±0,37	2,64	15,0±0,83	5,56	341,9±4,11	1,2
9	313,4±5,63	1,79	14,2±0,51	3,63	15,1±0,48	3,21	365,5±2,66	0,72
10	319,1±3,52	1,10	15,0±0,16	1,08	17,2±0,44	2,59	383,5±1,40	0,36
CCI	0,93		0,97		0,98		0,99	

### 5.1.1 Dados estatísticos para o phantom $PH_{01}G_{CI}$

Para o *phantom*  $PH_{01}G_{CI}$ , todas as medidas de volume baseadas na imagem de BMU 3D apresentaram os valores mais baixos de CV (de 4,61 a 7,10% para as médias das segmentações e de 1,10 a 4,78% para as médias das aquisições, e os valores de CCI estão dentro do intervalo de grande confiabilidade (0,74 e 0,93) como pode ser observado nas Tabelas 1 e 2.

O teste ANOVA para medidas repetidas com correção de Bonferroni não identificou diferenças significativas entre as médias das segmentações, no entanto, foram encontradas diferenças significativas entre as médias das aquisições. Na Figura 14 estão indicadas as aquisições que apresentaram diferenças significativas quando comparadas entre si.

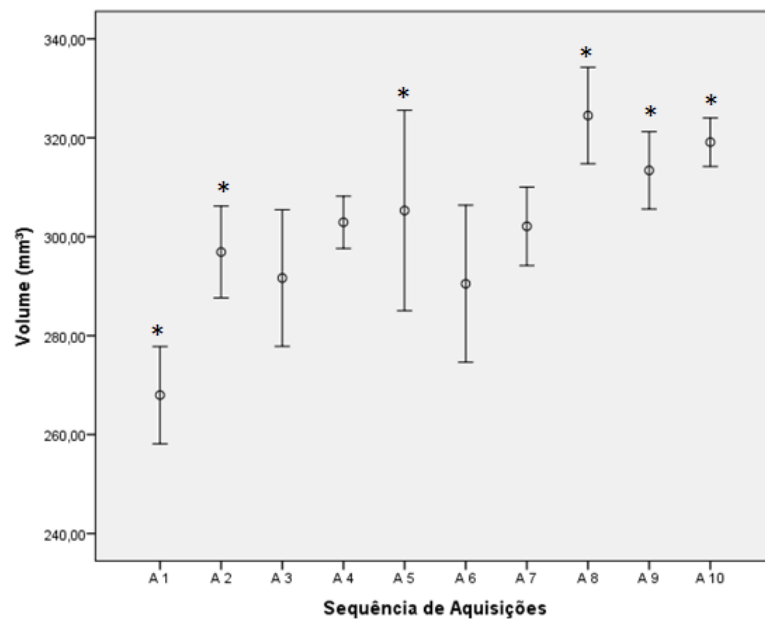


Figura 14. Resultados do teste ANOVA para medidas repetidas entre as médias de aquisições do *phantom*  $PH_{10}P_{CI}$ . As seqüências de aquisições que apresentaram diferenças significativas (comparando todas as aquisições entre si) estão indicadas por (\*). No eixo x está a seqüência de 10 aquisições e no eixo y valores de volume obtidos por segmentação. No Anexo I encontram-se as tabelas com os resultados da ANOVA, com as diferenças significativas entre as aquisições apontadas por (\*), uma a uma.

O teste-t utilizado para a comparação entre o volume do *phantom* PH<sub>01</sub>G<sub>CI</sub>, obtido por segmentação e o volume obtido pelo cálculo direto usando as dimensões físicas do *phantom*, indicou diferença significativa entre os 2 grupos de medidas, apresentando um p=0,044. O valor do CCI, embora não seja alto (0,66), está dentro do intervalo de confiança (Tabela 3).

Os valores de média, DP e CV dos volumes do *phantom* PH<sub>01</sub>G<sub>CI</sub>, determinados por cálculos a partir da segmentação e por cálculo direto a partir das dimensões físicas do *phantom* estão descritos na Tabela 3, bem como a diferença absoluta entre os volumes dos 2 grupos e o ETM absoluto e relativo.

Tabela 3. Valores de média, DP, CCI, DA e ETM para os volumes determinados por cálculo direto usando as dimensões físicas e por segmentação, para o *phantom* PH<sub>01</sub>G<sub>CI</sub>

Volume Físico (mm <sup>3</sup> )		Volume Calculado (mm <sup>3</sup> )		Diferença Absoluta (mm <sup>3</sup> )
Média±DP	CV (%)	Média±DP	CV(%)	
294,21±4,18	1,42	267,98±7,08	2,64	26,23
302,53±4,38	1,44	296,90±6,68	2,25	5,63
314,92±7,85	2,49	291,64±9,94	3,41	23,28
314,98±7,11	2,25	297,45±3,81	1,26	17,52
326,31±7,05	2,15	305,29±14,61	4,78	21,02
302,64±6,39	2,11	290,49±11,43	3,94	12,14
330,5±1,39	0,42	302,10±5,72	1,89	28,39
323,82±3,64	1,12	324,50±7,02	2,16	0,67
322,34±5,25	1,62	313,41±5,63	1,80	8,92
313,31±6,97	2,22	319,12±3,53	1,11	5,80
<b>CCI</b>		0,66		
<b>ETM (absoluto/relativo)</b>		10,58 mm <sup>3</sup> / 3,3%		



### 5.1.2 Dados estatísticos para o phantom $PH_{10}P_{CI}$

Para o phantom  $PH_{01}G_{CI}$ , todas as medidas de volume baseadas na imagem de BMU 3D apresentaram os valores mais baixos de CV (de 9,04 a 11,25% para as médias das segmentações e de 0,44 a 3,63% para as médias das aquisições, e os valores de CCI estão dentro do intervalo de grande confiabilidade (0,90 e 0,97), como pode ser observado nas Tabelas 1 e 2.

O teste ANOVA para medidas repetidas com correção de Bonferroni não identificou diferenças significativas entre as medidas de volume obtidas por segmentação, no entanto, foram encontradas diferenças significativas entre as medidas de aquisições para todas as sequências (A1-A10) (Figura 15).

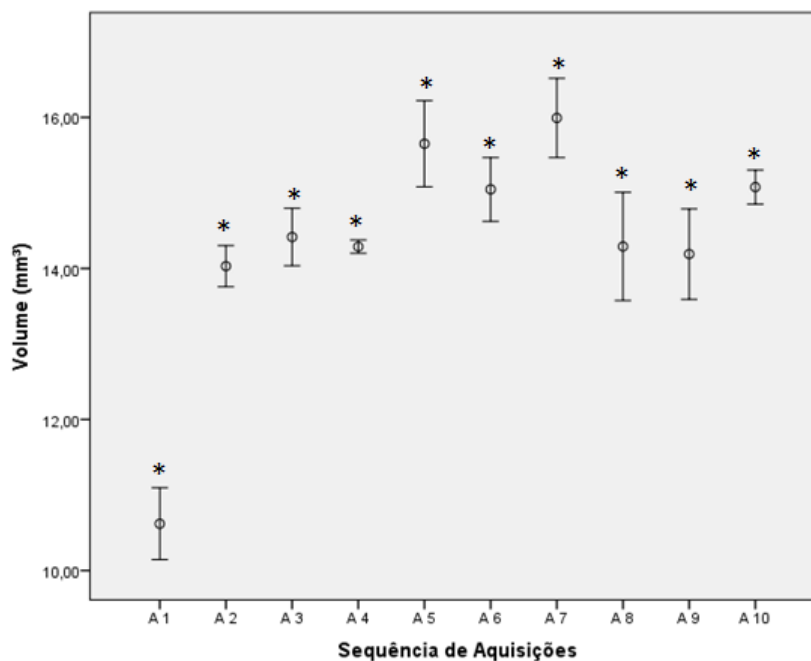


Figura 15. Resultados do teste ANOVA para medidas repetidas entre médias de aquisições do phantom  $PH_{10}P_{CI}$ . As sequências de aquisições que apresentaram diferenças significativas estão indicadas por (\*). No eixo  $x$  está a sequência de 10 aquisições e no eixo  $y$  valores de volume obtidos por segmentação. No Anexo I encontram-se as tabelas com os resultados da ANOVA, com as diferenças significativas entre as aquisições apontadas por (\*), uma a uma.

O teste-t utilizado para a comparação entre os volumes do *phantom* PH<sub>10</sub>PCl, determinados por segmentação e pelo cálculo direto usando as dimensões físicas do *phantom* indicou diferença significativa entre os 2 grupos de medidas, apresentando um p=0,007. O valor do CCI encontrado foi baixo, fora do intervalo de confiabilidade (0,21).

Os valores de média, DP e CV dos volumes do *phantom* PH<sub>10</sub>PCl, determinados por segmentação e pelo cálculo direto usando as dimensões físicas estão descritos na Tabela 4, bem como a diferença absoluta entre os volumes dos 2 grupos e o ETM absoluto e relativo.

Tabela 4. Valores de média, DP, CCI, DA e ETM para os volumes determinados por cálculo direto usando as dimensões físicas e por meio da segmentação, para o *phantom* PH<sub>10</sub>PCl

Volume Físico		Volume Calculado		Diferença Absoluta (mm <sup>3</sup> )
Média±DP (mm <sup>3</sup> )	CV (%)	Média±DP(mm <sup>3</sup> )	CV(%)	
15,30±0,34	2,24	10,61±0,34	3,23	4,68
15,64±0,41	2,72	14,03±0,20	1,40	1,61
15,98±0,05	0,33	14,41±0,27	1,90	1,56
15,85±0,17	1,09	14,28±0,06	0,44	1,56
15,77±0,11	0,73	15,65±0,41	2,63	0,12
15,84±0,16	1,07	15,047±0,30	2,02	0,8
16,08±0,10	0,64	15,99±0,38	2,37	0,09
15,64±0,33	2,16	14,29±0,38	2,65	1,35
16,45±0,53	3,29	14,19±0,52	3,64	2,26
15,53±0,25	1,64	15,07±0,16	1,08	0,45
<b>CCI</b>		0,21		
<b>ETM (absoluto/relativo)</b>		1,02mm <sup>3</sup> / 7,8%		

### 5.1.3 Dados estatísticos para o *phantom* PH<sub>10</sub>PPCl

Para o *phantom* PH<sub>10</sub>PPCl, todas as medidas de volume baseadas na imagem de

BMU 3D apresentaram baixos valores de CV (de 11,13 e 12,85% para as médias das segmentação e de 1,35 a 5,56% para as médias das aquisições). Os valores de CCI estão dentro do intervalo de grande confiabilidade 0,92 e 0,98 respectivamente (Tabelas 1 e 2).

O teste ANOVA para medidas repetidas com correção de Bonferroni não identificou diferenças significativas entre as médias das segmentações, no entanto, foram encontradas diferenças significativas entre as médias das sequências de aquisições como mostra a Figura 16.

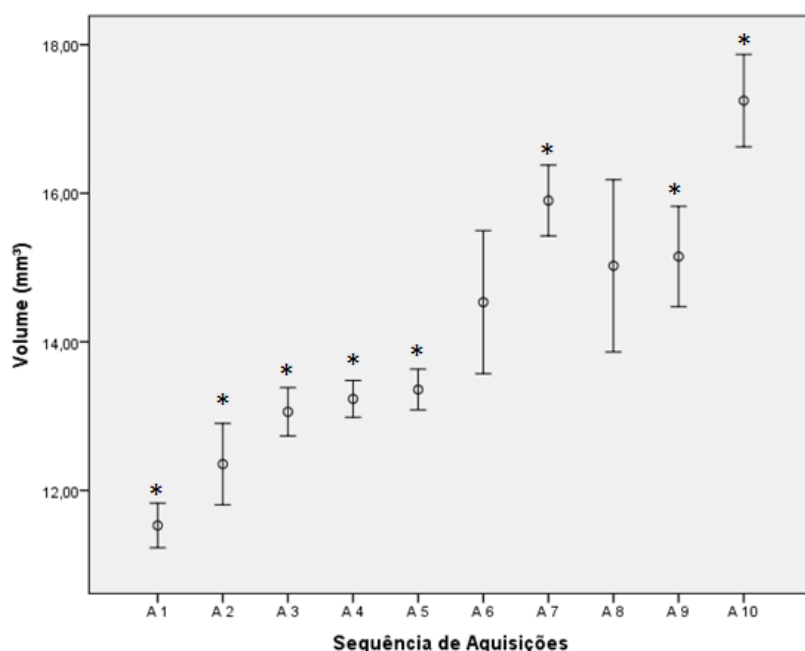


Figura 16. Resultados do teste ANOVA para medidas repetidas entre medidas de aquisições do *phantom* PH<sub>10</sub>PCl. As sequências de aquisições que apresentaram diferenças significativas estão indicadas por (\*). No eixo *x* está a sequência de 10 aquisições e no eixo *y* valores de volume obtidos por segmentação. No Anexo 1 encontram-se as tabelas com os resultados da ANOVA, com as diferenças significativas entre as aquisições apontadas por (\*), uma a uma.

Para o *phantom* PH<sub>10</sub>PPCl, o diâmetro da agulha (confirmado pelo fabricante) não pôde ser utilizado para calcular o volume físico, pois não representou o diâmetro real

utilizado para segmentação, e foi corrigido por medidas realizadas diretamente na imagem (Figura 17) com uma ferramenta do programa computacional de análise de imagens, o *ImageJ* (National Institute of Health, Maryland, EUA). O novo volume físico calculado, levando em conta os valores corrigidos para diâmetro e comprimento (o comprimento foi considerado o mesmo da profundidade utilizada para a segmentação, baseada nos fios de metal usados como referência), foi comparado com volume obtido por segmentação.

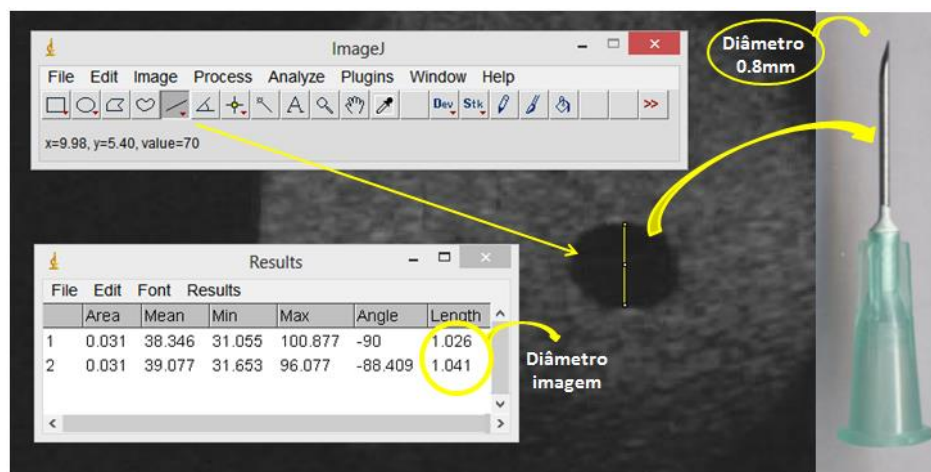


Figura 17. Determinação do diâmetro da parte interna do *phantom* PH<sub>10</sub>PP<sub>CI</sub> com auxílio do *ImageJ* e os valores obtidos para o diâmetro pela medição direta na imagem e na agulha.

O teste-t utilizado para a comparação entre os volumes do *phantom* PH<sub>10</sub>PP<sub>CI</sub>, determinados por segmentação e pelo cálculo direto usando as dimensões físicas do *phantom* não indicou diferença significativa entre os 2 grupos de medidas, apresentando um  $p=0,079$ . Embora não haja diferença significativa, o valor do CCI (0,17) está fora do intervalo de confiabilidade.

Os valores de média, DP e CV dos volumes do *phantom* PH<sub>10</sub>PP<sub>CI</sub>, determinados por meio da imagem de BMU 3D (por segmentação) e pelo cálculo direto usando as

dimensões físicas (já corrigidas) estão descritos na Tabela 5, bem como a diferença absoluta entre os volumes dos 2 grupos e o ETM absoluto e relativo.

Tabela 5. Valores de média, DP, CV, CCI, DA e ETM para os volumes determinados diretamente pelas dimensões físicas e calculado a partir da segmentação, para o *phantom* PH<sub>10</sub>PP<sub>CI</sub>

Volume Físico		Volume Corrigido	Volume Calculado		Diferença Absoluta (mm <sup>3</sup> )
Média±DP (mm <sup>3</sup> )	CV (%)	Média (mm <sup>3</sup> )	Média±DP(mm <sup>3</sup> )	CV(%)	
8,57±0,07	0,85	13,53	11,52±0,22	1,88	2,00
8,16±0,19	2,35	12,63	12,35±0,39	3,19	0,28
8,13±0,1	1,35	12,58	13,05±0,23	1,79	0,47
8,4±0,19	2,37	13,23	13,23±0,18	1,35	0,005
8,16±0,16	2,04	12,27	13,39±0,20	1,47	1,12
8,25±0,19	2,34	12,25	14,53±0,69	4,77	2,27
8,17±0,26	3,25	12,1	15,9±0,34	2,16	3,79
8,59±0,69	8,06	13,02	15,02±0,84	5,56	1,99
9,33±0,35	3,78	14,45	15,14±0,49	3,21	0,68
9,17±0,19	2,17	14,04	17,24±0,45	2,59	3,20
<b>ICC</b>		0,17			
<b>ETM (absoluto/relativo)</b>		1,12mm <sup>3</sup> / 7,1%			

#### 5.1.4 Dados estatísticos para o *phantom* PH<sub>10</sub>G<sub>CO</sub>

Para o *phantom* PH<sub>10</sub>G<sub>CO</sub>, o CV para todas as medidas de volume baseadas na imagem de BMU 3D variou entre 14,48 e 15,99%, para as médias das segmentações e entre 0,36 a 2,21%, para as médias das aquisições. Os valores de CCI, de 0,99 para ambos os casos, estão dentro do intervalo de grande confiabilidade (Tabelas 1 e 2).

O teste ANOVA para medidas repetidas com correção de Bonferroni não identificou diferenças significativas entre as medidas de volume a partir das segmentações das imagens de BMU 3D, no entanto, foram encontradas diferenças significativas entre as médias das aquisições, apontadas na Figura 18.

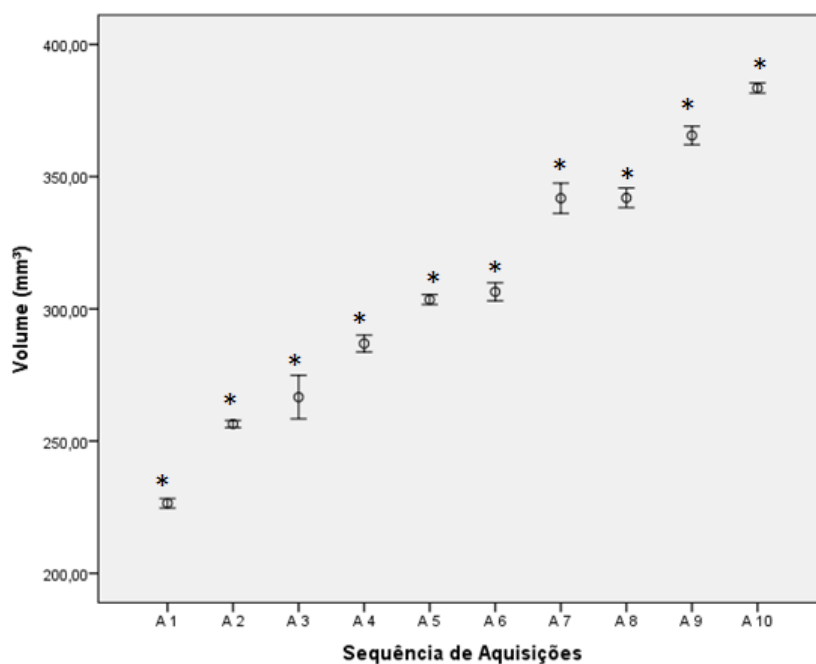


Figura 18. Resultados do teste ANOVA para medidas repetidas entre as médias das aquisições do *phantom* PH<sub>10</sub>PCl. As seqüências de aquisições que apresentaram diferenças significativas estão indicadas por (\*). No eixo *x* está a seqüência de 10 aquisições e no eixo *y* valores de volume obtidos por segmentação. No Anexo 1 encontram-se as tabelas com os resultados da ANOVA, com as diferenças significativas entre as aquisições apontadas por (\*), uma a uma.

O volume físico, obtido por medidas realizadas na ponteira de pipeta com o paquímetro e calculado a partir do volume de tronco de cone, não representava o volume real a ser segmentado devido a diferença de diâmetro entre a pipeta e a imagem de BMU 2D da pipeta e, portanto, foi corrigido, pelos valores de medidas de diâmetro obtidos diretamente das imagens, medido com ferramenta do *software ImageJ* (National Institute of Health, Maryland, EUA), , do mesmo modo demonstrado na Figura 17.

O teste-t utilizado para a comparação entre os volumes do *phantom* PH<sub>10</sub>GCo, determinados por meio da imagem de BMU 3D e pelo cálculo direto usando as dimensões físicas não indicou diferença significativa entre os 2 grupos de medidas, apresentando um  $p=0,36$ . O valor de 0,47 para o ICC (Tabela 6), embora baixo,

encontra-se dentro do intervalo de confiança (0,42 a 0,85) determinado pelo programa estatístico.

Os valores de média, DP e CV dos volumes do *phantom* PH<sub>10</sub>G<sub>CO</sub>, determinados ao longo da sequência de 10 aquisições, por meio da imagem de BMU 3D e pelo cálculo direto usando as dimensões físicas do *phantom*, antes e após a correção, estão descritos na Tabela 6. A validação estatística obtida pela diferença absoluta entre os 2 grupos e pelo ETM encontra-se também na Tabela 6.

A multiplicação do volume final calculado pelo fator de correção (FC) não gerou diferenças significativas para os *phantoms* PH<sub>01</sub>G<sub>Cl</sub>, PH<sub>10</sub>P<sub>Cl</sub> e PH<sub>10</sub>PP<sub>Cl</sub>. Mas para o *phantom* PH<sub>10</sub>G<sub>CO</sub>, houve diferença significativa. Portanto, o valor final considerado para análise foi o multiplicado pelo fator de correção, apresentado na Tabela 6.

Tabela 6. Valores de média, DP, CV, CCI, DA e ETM para os volumes determinados por cálculo direto usando as dimensões físicas e calculado por segmentação e para o *phantom* PH<sub>10</sub>G<sub>CO</sub>.

Volume Físico		Volume Corrigido	Volume Calculado		Volume Calculado*FC	Diferença Absoluta (mm <sup>3</sup> )
Média±DP (mm <sup>3</sup> )	CV (%)	Média (mm <sup>3</sup> )	Média±DP (mm <sup>3</sup> )	CV (%)	Média (mm <sup>3</sup> )	
281,92±2,25	0,79	259,18	226,50±1,28	0,57	214,88	44,29
296,59±1,7	0,57	263,75	256,47±0,97	0,38	243,32	20,43
303,69±3,92	1,29	270,85	266,62±5,90	2,21	252,94	17,9
302,17±2,26	0,75	276,91	286,87±2,31	0,81	272,15	4,75
301,32±1,86	0,61	271,00	303,49±1,35	0,44	287,93	16,92
309,4±3,59	1,16	286,66	306,46±2,45	0,80	290,74	4,07
301,8±3,06	1,01	276,53	341,82±4,11	1,20	324,29	47,75
311,65±2,39	0,76	286,38	341,97±4,11	1,20	324,44	38,05
313,44±4,22	1,34	288,18	365,56±2,66	0,73	346,81	58,63
318,75±5,26	1,65	296,01	383,51±1,40	0,37	363,85	67,83
<b>ICC</b>			0,47			
<b>ETM (absoluto/relativo)</b>			22,67 mm <sup>3</sup> / 6.8%			

### 5.1.5 Correlação

Os graus mais altos de correlação entre o volume medido calculado baseado na imagem de BMU 3D e medido diretamente a partir das dimensões físicas dos *phantoms* foram encontrados para os maiores *phantoms* PH<sub>01</sub>G<sub>Cl</sub> e PH<sub>10</sub>G<sub>CO</sub>, com  $r=0,70$  e  $0,90$ , respectivamente. Os diagramas de dispersão demonstram como se comportam os valores para os volumes para os 4 *phantoms* (Figura 19).

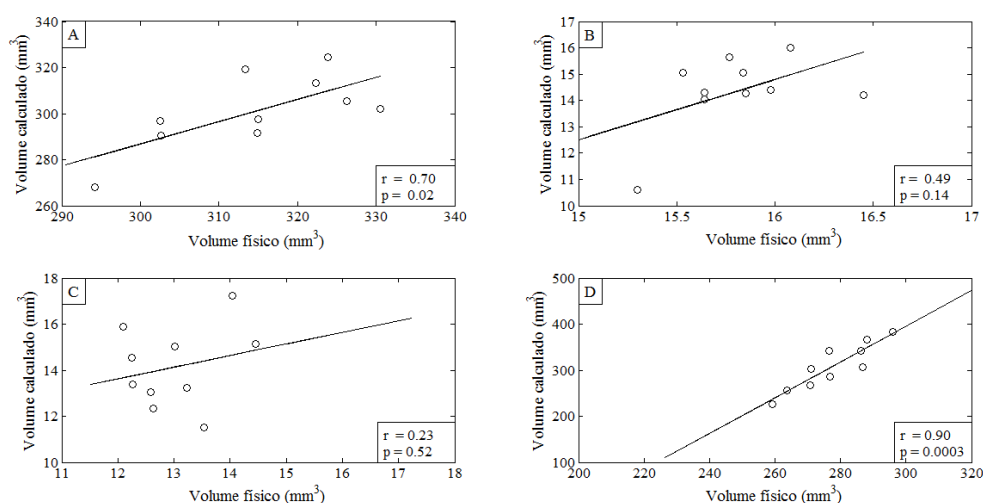


Figura 19. Diagrama de dispersão e reta de regressão ajustada pelo mínimo erro quadrado entre os valores de volume calculado (a partir da imagem de BMU 3D) e físico (medido diretamente a partir das dimensões físicas dos *phantoms*). (A) PH<sub>01</sub>G<sub>Cl</sub>, (B) PH<sub>10</sub>P<sub>Cl</sub>, (C) PH<sub>10</sub>PP<sub>Cl</sub> e (D) PH<sub>10</sub>G<sub>CO</sub>.

### 5.3 ANIMAIS

Imagens típicas geradas por BMU 3D podem ser visualizadas nos 3 planos (sagital coronal e transversal) na Figura 20.



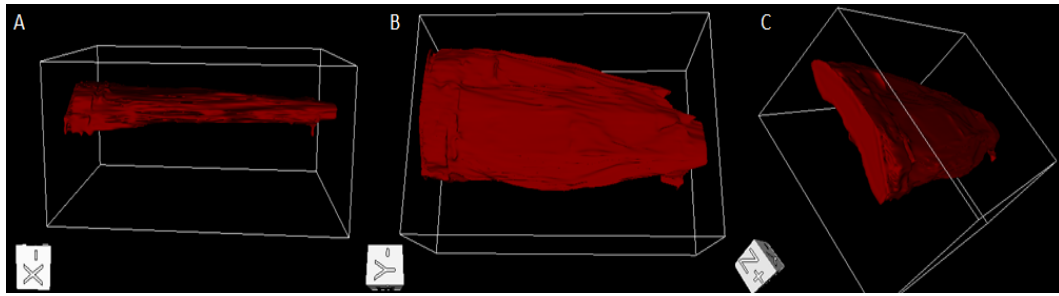


Figura 20. Visão de BMU 3D do gastrocnêmio lateral de rato nos planos sagital (A) coronal (B) e transversal (C).

Para os 5 animais, foram realizadas 13 sequências de aquisições (variando entre pata direita e esquerda), e apenas 4 apresentaram qualidade suficiente para identificação dos limites do gastrocnêmio lateral e portanto, a possibilidade de segmentação, geração da imagem 3D e quantificação do volume parcial.

Os valores parciais de volume obtidos pela segmentação do gastrocnêmio lateral, são:  $3,28 \text{ mm}^3$  (rato 2),  $1,07 \text{ mm}^3$  (rato 3),  $2,44 \text{ mm}^3$  (rato 4),  $2,04 \text{ mm}^3$  (rato 5).

## 6. DISCUSSÃO

O sistema de BMU 3D utilizado no presente estudo destina-se, principalmente, à obtenção de imagens de gastrocnêmio de ratos, cujas dimensões típicas são da ordem de 20 mm de comprimento, 10 mm de largura e 3,4 mm de espessura (PEIXINHO *et al.*, 2014). Portanto, foi desenvolvido para gerar imagens com comprimento e largura máximas de 25,4 e 15 mm, respectivamente. Estas dimensões são compatíveis com as do músculo gastrocnêmio de um rato pequeno.

A altura das imagens depende da profundidade de campo do transdutor de US empregado, e neste caso, foi utilizado um transdutor com profundidade de campo de 0,8 mm. Com esse valor, menor do que a espessura média do músculo há uma tendência em se gerar uma imagem mais focalizada (mais hiperecótica) na profundidade do músculo onde está o foco do feixe de US. Mesmo assim, o músculo do gastrocnêmio foi facilmente identificado nas imagens. Além disso, essa restrição pode ser superada utilizando um transdutor com  $f_{\text{número}}$  maior.

É comum a utilização de *phantoms* em trabalhos que visem validar determinadas técnicas de aquisição de imagens (WELLER *et al.*, 2007; BARBER *et al.*, 2009; RYAN e FOSTER, 1997). Da mesma forma, o presente trabalho objetivou avaliar as condições do sistema utilizado para gerar imagens com dimensões compatíveis às do músculo gastrocnêmio de ratos e, portanto, adequadas para reproduzir valores volumétricos similares aos obtidos por medidas de dimensões em objetos reais. Dos quatro *phantoms* confeccionados para esta pesquisa, 2 eram menores ( $PH_{10}P_{CI} = 16,37 \pm 0,4$  e  $5,48 \pm 0,19$  mm;  $PH_{10}PP_{CI} = 16,28 \pm 0,98$  e  $5,58 \pm 0,23$  mm de comprimento e diâmetro, respectivamente) e 2 maiores ( $PH_{01}G_{CI} = 23,75 \pm 0,94$  e  $9,3 \pm 0,37$  mm;  $PH_{10}G_{CO} = 24,07 \pm 0,84$  e  $9,78 \pm 0,61$  mm de comprimento e diâmetro, respectivamente) que o

tamanho médio do músculo gastrocnêmio de um rato com aproximadamente 230 g.

Os valores de volume provenientes da segmentação das imagens de BMU 3D dos *phantoms* apresentaram resultados positivos no que se refere à comparação entre os valores médios das 5 medidas de volume repetidas por segmentação, realizadas para cada sequência de aquisição de um único *phantom*. Estas medidas não apresentaram diferenças significativas, com resultados de CCI dentro do intervalo de grande confiabilidade para os quatro *phantoms* (Tabela 1). Já a comparação das médias de volume determinadas entre as sequências de aquisições mostrou diferenças entre si para todos os *phantoms*, sugerindo que ao longo do experimento, da primeira à última sequência, os *phantoms* se modificaram. Mesmo assim, a confiabilidade das medidas se manteve, sendo atestado por altos valores de CCI e baixos valores de CV (Tabela 2), variando de 1,1 a 4,78% para o *phantom* PH<sub>01</sub>G<sub>CI</sub>, 0,44 a 3,63% para o *phantom* PH<sub>10</sub>P<sub>CI</sub>, 1,35 a 5,56% para o *phantom* PH<sub>10</sub>PP<sub>CI</sub>, e 0,37 a 2,21% para o *phantom* PH<sub>10</sub>G<sub>CO</sub>. Esses valores estão compatíveis e até menores que os encontrados por Ferrari *et al.*, (2006) que, operando em 7,5 MHz, geraram imagens 3D de um *phantom* de forma similar, mas de material (plástico) e tamanho diferente (aproximadamente 3 vezes maior do que o maior *phantom* confeccionado no presente estudo, PH<sub>10</sub>G<sub>CO</sub>) e apresentaram como CV valores na faixa de 4,1 a 12,6%.

Os *phantoms* maiores, PH<sub>01</sub>G<sub>CI</sub> e PH<sub>10</sub>G<sub>CO</sub>, foram os que mais aumentaram seu volume ao longo das aquisições. Para o *phantom* PH<sub>10</sub>G<sub>CO</sub>, o volume médio determinado através das imagens de BMU 3D variou de 226,49±1,28 para 383,50±1,4mm<sup>3</sup> entre a primeira e a última aquisição. A Figura 20 demonstra visualmente a modificação do *phantom* e o aumento do volume ao longo do experimento.

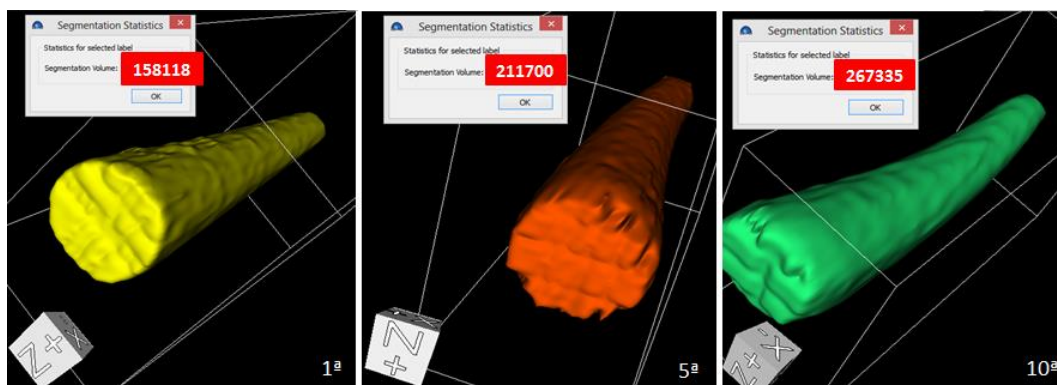


Figura 21. Imagens de BMU 3D do *phantom* PH<sub>10</sub>G<sub>CO</sub> ao longo das sequências de aquisições. A imagem à esquerda mostra a imagem em 3D da 1ª sequência de aquisições. Ao centro, após a 5ª sequência de aquisições. À direita, após a 10ª sequência de aquisições, com o volume de segmentação superior as aquisições anteriores.

O *phantom* é confeccionado à base de água e gelatina e, portanto, pode-se atribuir a essa modificação à possível absorção de água que ocorreu durante o experimento. Considerando que cada aquisição dura cerca de 20 minutos, após as 10 aquisições se passaram aproximadamente 3h e 30 mim. Durante todo esse tempo, o *phantom* permaneceu mergulhado na água e, portanto, pode ter tido suas dimensões alteradas e seu volume aumentado.

O teste-t indicou diferenças significativas entre o volume físico (determinado através das dimensões físicas do *phantom*) e o volume obtido por segmentação, apenas para os dois primeiros *phantoms* (PH<sub>01</sub>G<sub>CI</sub> e PH<sub>10</sub>P<sub>CI</sub>). Um fator que pode ser atribuído à diferença entre esses volumes é a referência considerada para determinar o início e o fim da varredura. Devido ao fenômeno da difração, o eco do fio metálico utilizado como referência aparecia mesmo para planos do feixe de ultrassom incidindo obliquamente ao fio, e esse “falso eco” estava sendo utilizado para orientar no comprimento do *phantom*, acarretando diferenças entre o comprimento real do *phantom* e o medido pelo equipamento e conseqüentemente, no volume. A tendência desse erro foi o de superestimar o comprimento do *phantom*.

Para os dois últimos *phantoms* (PH<sub>10</sub>PP<sub>CI</sub> e PH<sub>10</sub>G<sub>CO</sub>), isso foi corrigido, considerando-se apenas os planos de imagem com o feixe incidindo perpendicularmente aos fios demarcando as extremidades dos *phantoms*. Possivelmente essa correção influenciou na ausência de diferença significativa apontada pelo teste-t.

Ao comparar os volumes físicos e obtidos por BMU 3D, somente os volumes dos *phantoms* maiores (PH<sub>01</sub>G<sub>CI</sub> e PH<sub>10</sub>G<sub>CO</sub>), se mantiveram dentro do intervalo de confiabilidade mesmo com baixos valores de CCI (0,66 e 0,47). Esses 2 *phantoms* também apresentaram os maiores coeficientes de correlação (r=0,70 e 0,90, respectivamente), apresentando menor dispersão entre os valores do volume físico e calculado por segmentação. Isso sugere que alcançar médias homogêneas parece mais fácil em estruturas maiores.

Para os dois *phantoms* menores (PH<sub>10</sub>P<sub>CI</sub> e PH<sub>10</sub>PP<sub>CI</sub>), apesar de as diferenças absolutas entre volumes físicos e obtidos por segmentação serem baixas e na mesma faixa de valores apresentados por BARBER *et al.* (2009) e por MAC GILLIVRAY *et al.* (2009), que compararam medidas obtidas por US 3D com a RM, o ETM apresentou percentuais de 7,8 e 7,1% respectivamente, e foram baixos os índices de confiabilidade (CCI= 0,21 e 0,17). Esses resultados são similares aos de DELCKER *et al.* (1999) que ao investigarem a variabilidade de volume de pequenos músculos, com dimensões superiores às dos *phantoms* analisados no presente estudo, encontraram uma diferença de 10% entre o volume obtido por US 3D *freehand* e pelo método de deslocamento de coluna de água. Isso pode ser explicado pela hipótese conduzida por BARBER *et al.* (2009), que consideram a técnica de US 3D válida para medir grandes volumes musculares, e em seu estudo de validação da mesma técnica, confirmaram a tendência da técnica em superestimar do volume muscular do gastrocnêmio de humanos ao comparar os valores com os obtidos por RM. Além disso, a parte interna desses 2

*phantoms* (PH<sub>10</sub>P<sub>CI</sub> e PH<sub>10</sub>PP<sub>CI</sub>) foram moldadas por agulhas descartáveis que possuem um bisel (Figura 27A). Isso pode ter contribuído com o aumento da diferença entre os volumes físicos e calculados por segmentação, pois, quando o *phantom* encontra-se pronto para ser desenhado, é necessário retirar a agulha de dentro da estrutura gelatinosa e esse procedimento pode lacerar a parede interna do material, devido ao formato do bisel, aumentando o espaço hipocóico na imagem, e conseqüentemente, a superfície a ser segmentada (Figura 27B).

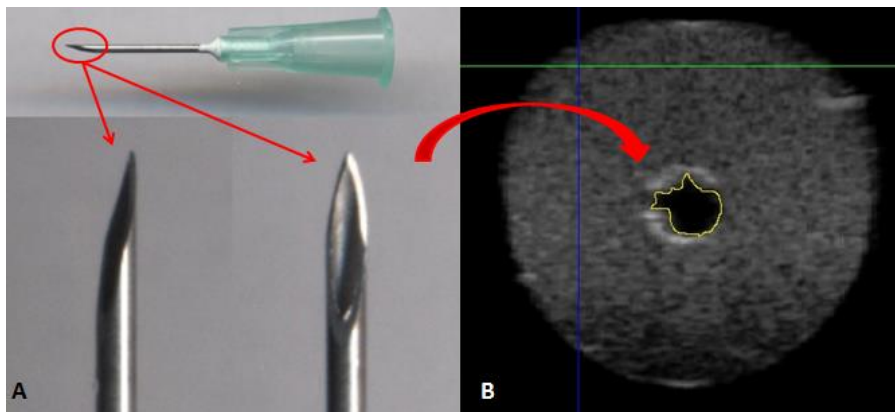


Figura 22. (A) Ilustração indicando o bisel das agulhas utilizadas na confecção dos *phantoms* e (B) imagem gerada após a retirada da agulha, apontando a laceração ocasionada pelo bisel.

Os estudos que empregam metodologias similares a do presente trabalho, e atualmente relatados na literatura, utilizam US de baixas frequências, aplicados a pesquisas com seres humanos (DELCKER *et al.*, 1999; INFANTOLINO *et al.* 2006; WELLER *et al.*, 2007; BARBER *et al.*, 2009).

BARBER *et al.*, (2009) tinham como proposta em seu estudo validar e verificar a confiabilidade das medidas do volume muscular do gastrocnêmio de humanos, *in vivo*, usando US 3D a partir de múltiplas varreduras em 2D, comparadas aos valores obtidos pela RM, e demonstraram acurácia e repetibilidade das medidas do volume de músculos relativamente grandes, apresentando um erro de medidas menor que 2%, cujo valor pode ser negligenciado para estimar força muscular a partir de medidas morfológicas.

No entanto, para pequenos músculos, os autores ressaltam que esse erro pode ser bastante aumentado, como ocorreu no estudo de DELCKER *et al.*, (1999), que encontraram um desvio percentual das medidas variando de 0,3 a 19,4% ao compararem o volume de um músculo da mão de cadáveres obtido por US 3D e por deslocamento de coluna de água.

WELLER *et al.*, (2007) determinaram, *in vivo*, o volume do bíceps femoral de cães, um músculo de tamanho médio quando comparado ao de um ser humano, usando um US 3D *freehand* a partir da obtenção de múltiplas imagens 2D. Ao compararem o volume muscular obtido por US 3D com os obtidos por TC, concluíram que o US 3D promove resultados precisos e acurados, e avaliaram a técnica como inovadora na determinação objetiva do volume muscular *in vivo*.

O mesmo se observou no estudo MAC GILLIVRAY *et al.*,(2009), que a partir de múltiplas imagens panorâmicas transversais da região média da coxa, geraram imagens em 3D do fêmur e do reto femoral. Os autores encontraram diferença média entre o volume por US 3D e por RM de 0,53 cm<sup>3</sup>, valor baixo quando comparado a 3,33cm<sup>3</sup> do estudo com cães, supracitado. Observaram ainda, que nas menores porções da coxa, ou em indivíduos com o membro de dimensões inferiores (idosos, por exemplo), a diferença entre o volume por US 3D e por RM aumentou. No entanto, os autores não atribuíram essas diferenças ao tamanho da estrutura, avaliando o US 3D como um método aceitável para reproduzir o volume do músculo esquelético. Essa observação parece confirmar a hipótese que sugere que menores erros são encontrados em maiores estruturas.

De modo geral, os resultados obtidos a partir dos *phantoms* analisados demonstraram que o sistema de BMU 3D está apto a gerar imagens em 3D, a partir de

múltiplos quadros em 2D, de pequenas estruturas com dimensões similares as dos *phantoms* apresentados no presente trabalho, com erros inferiores a 10%.

Há na literatura trabalhos que utilizam imagens em 2D de US de altas frequências para analisar tecidos biológicos de humanos e animais de pequeno porte. A análise da arquitetura do tecido muscular de ratos, por exemplo, já foi realizada por PEIXINHO *et al.*, (2011 e 2014). Já existem disponíveis também, imagens tridimensionais de animais de pequeno porte (FOSTER *et al.*, ROELLIG *et al.*, 2011). No entanto, até o presente momento ainda não foram encontrados trabalhos relacionados à obtenção de imagens de BMU 3D de estruturas musculares desses animais.

O presente estudo demonstrou que a técnica empregada foi válida para a obtenção do volume de estruturas com dimensões similares as do músculo gastrocnêmio lateral de ratos. Adicionalmente, a partir da segmentação das imagens, foi obtido parte do volume desses músculos em 4 animais, o que comprovou a capacidade da técnica em gerar imagens tridimensionais do músculo esquelético de ratos e sobretudo, quantificar o volume dos mesmos. É preciso esclarecer ainda a necessidade de incrementar melhorias ao protocolo, de forma que a inserção proximal do músculo em questão possa ser inclusa na varredura e, portanto, na segmentação. Mesmo assim, um passo foi dado nessa direção indicando que em breve será possível alcançar o volume total do gastrocnêmio de animais desse porte por esta técnica.

Além disso, as imagens obtidas com o sistema de BMU 3D não passaram por nenhum processamento. Conforme FORSBURG *et al.* (2010), é possível melhorar a qualidade das imagens por meio de técnicas de processamento baseadas em filtragem adaptativa não-estacionária para a remoção de *speckle* e ruído, mantendo a estrutura da imagem, porém possibilitando a redução do erro durante as segmentações. A melhora na



qualidade no momento de detecção de bordas facilitaria na determinação do volume de uma determinada região de interesse, possibilitando a realização de trabalhos futuros, como por exemplo, o acompanhamento da regeneração tecidual do músculo esquelético de ratos após lesão do mesmo.

Uma das grandes vantagens na geração das imagens US 3D está na possibilidade de determinar o volume de determinados órgãos ou lesões. Isso tem implicações, por exemplo, no planejamento de tratamento como também no monitoramento de respostas de tumores à terapias. Embora a RM seja considerada o padrão ouro para a medição direta de volume e comprimento muscular *in vivo*, é onerosa e demanda maior tempo de exame, sendo necessário em alguns casos a sedação do paciente por muito tempo, o que torna mais favorável a utilização da US 3D para os mesmos fins.

Não foram encontrados na literatura até o momento, estudos que apresentem imagens em 3D de gastrocnêmio de ratos, o que justifica a originalidade do estudo. Outros trabalhos são necessários para melhorar a técnica, no entanto, é evidente que ela é capaz de proporcionar imagens de estruturas pequenas e quantificar seus volumes, apresentando baixos índices percentuais de erro.

O protocolo de aquisição de imagens e quantificação dos parâmetros permitiu a determinação do volume muscular parcial, o que indica a futura possibilidade de obtenção do volume total após ajuste no protocolo.

## 7. CONCLUSÃO

O estudo foi projetado para avaliar a capacidade de um sistema de instrumentação BMU 3D, de gerar imagens em 2D para posterior conversão a 3D por segmentação semiautomática, do músculo esquelético de ratos, *in vivo*, tendo como objetivo obter dados quantitativos de um parâmetro de arquitetura, o volume muscular.

Os resultados demonstraram que a técnica utilizada neste trabalho foi capaz de gerar imagens de BMU 3D e quantificar o volume de diferentes *phantoms*. As medidas do volume obtido por segmentação mostraram alta confiabilidade, mas ao comparar as médias obtidas por segmentação com as obtidos por medidas de dimensões físicas nos *phantoms*, os resultados mais confiáveis se aplicam aos *phantoms* de tamanhos maiores.

Os resultados obtidos *in vivo* indicam que foi possível adquirir imagens em 2D do gastrocnêmio lateral de ratos, identificar os limites musculares, segmentá-las e convertê-las a 3D.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBER, L., BARRETT, R., LICHTWARK, G. “Validation of a freehand 3D ultrasound system for morphological measures of the medial gastrocnemius muscle” **Journal of Biomechanics** v. 42, pp.1313–1319, 2009.
- BOM, N., ten HOFF, H., LANCEE, C., GUSSENHOVEN. W., BOSCH, J. “Early and recent intraluminal ultrasound devices” **The International Journal of Cardiovascular Imaging** v.4, pp. 79–88,1989
- CHANG, R.F., WU, W.J., CHEN, D.R., CHEN, W.M., SHU, W., LEE, J.H., JENG, L.B. “3-D US frame positioning using speckle decorrelation and image registration” **Ultrasound in Medicine and Biology** v. 29, n.6, pp. 801-812, 2003.
- COBBOLD, R.S.C. **Ultrasound imaging arrays** In: Foundations of biomedical ultrasound, New York: Oxford University Press, pp. 413-491, 2007.
- DELCKER, A., WALKER, F., CARESS, J., HUNT, C., TEGELER, C. “In vitro measurement of muscle volume with 3-dimensional ultrasound” **European Journal of Ultrasound** v.9, pp.185–190, 1999.
- EPSTEIN, M., HERZOG, W. **Theoretical models of skeletal muscle: Biological and mathematical considerations**. Chichester, John Wiley and Sons, 1998.
- FERRARI, M., WELLER, R., PFAU, T., PAYNE, R.C., WILSON, A.M. “A comparison of three-dimensional ultrasound, two-dimensional ultrasound and dissections for determination of lesion volume in tendons” **Ultrasound Medicine Biology** v.32, n.6, pp.797-804, 2006.
- FORSBERG, F., BERGHELLA, V., MERTON, D.A., RYCHLAK, K., MEIERS, J., GOLDBERG, B.B. “Comparing image processing techniques for improved 3-dimensional ultrasound imaging. Journal of Ultrasound in Medicine” v.29, pp. 615–619,2010.
- FOSTER, F.S., PAVLIN, C.J., LOCKWOOD, G.R., RYAN, L.K., HARASIEWICZ, K. A., BERUBE, L. and RAUTH, A.M. “Principles and Applications of Ultrasound Backscatter Microscopy,” **IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control**, v.40, n. 5, pp. 608–617, 1993.
- FOSTER, F.S., PAVLIN, C.J., HARASIEWICZ, K.A., CHRISTOPHER, D.A., TURNBULL, D.H. “Advances in ultrasound biomicroscopy” **Ultrasound in Medicine and Biology** v.26, n.1, 1-27, 2000.

- FOSTER, F.S., ZHANG, M., ZHOU, Y. *et al.* "A new ultrasound instrument for in vivo microimaging of mice," **Ultrasound in Medicine and Biology** v.28, pp.1165–1172, 2002.
- FOSTER, F.S., HOSSACK, J., ADAMSON, S.L. "Review: Micro-ultrasound for preclinical imaging" **Interface Focus** v. 1, pp.576–601, 2011.
- FRIEDERICH, J.A., BRAND, R.A. "Muscle fiber architecture in the human lower limb" **Journal of Biomechanics** v. 23, n. 1, pp. 91–95, 1990.
- FRY NR, GOUGH M, MCNEE AE, Shortland AP. Changes in the volume and length of the medial gastrocnemius after surgical recession in children with spastic diplegic cerebral palsy. **Journal of Pediatric Orthopaedics** v. 27, n.7, pp.769–774, 2007.
- FUKUNAGA, T., MIYATANI, M., TACHI, M., KOUZAKI, M., KAWAKAMI, Y., KANEHISA, H. "Muscle volume is a major determinant of joint torque in humans" **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 172, n. 4, pp. 249–255, ago. 2001.
- GRAHAM, K. C., WIRTZFELD, L. A., MACKENZIE, L. T., POSTENKA, C. O., GROOM, A. C., MACDONALD, I. C., FENSTER, A., LACEFIELD, J. C. & CHAMBERS, A. F. "Three-dimensional high-frequency ultrasound imaging for longitudinal evaluation of liver metastases in preclinical models". **Cancer Research** v. 65, pp. 5231–5237, 2005.
- GREGORY, W.T., BOYLES, S.H., SIMMONS, K., CORCORAN, A., CLARK, A.L. "External anal sphincter volume measurements using 3-dimensional endoanal ultrasound" **American Journal of Obstetrics and Gynecology** v. 194, pp. 1243–1248, 2006.
- HOFFMANN, K., EL-GAMMAL, S., ALTMAYER, P. "B-scan ultrasound in dermatology" **Hautarzt** v. 41, pp. W7–W16, 1990.
- HOPKINS, W.G. "Measures of reliability in sports medicine and science" **Sports Medicine** v. 30, pp. 1-15, 2000.
- JANVIER, M.A., SOULEZ, G., ALLARD, L., CLOUTIER, G. "Validation of 3D reconstructions of a mimicked femoral artery with an ultrasound imaging robotic system" **Medical Physics** v.37, n.7, pp. 3868-3879, 2010.
- KAWAKAMI, Y., ABE, T., FUKUNAGA, T. "Muscle Fiber Pennation Angles Are Greater in Hypertrophied than in Normal Muscles" **Journal of Applied Physiology** v.74, pp. 2740-2744, 1993.

- KAWAKAMI, Y., "The effects of strength training on muscle architecture in humans," **International Journal of Sport and Health Science**, v. 3, pp. 208–217, 2005.
- KAWAKAMI, Y., KANEHISA, H., FUKUNAGA, T. "The relationship between passive ankle plantar flexion joint torque and gastrocnemius muscle and achilles tendon stiffness: implications for flexibility" **Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy** v.38, n.5, pp. 269–276, 2008.
- KELLY, A.Z., SOLETTI, R.C., DE BRITTO, A.P., DE MATOS, D.G., SOLDAN, M., BORGES, H.L., MACHADO, J.C. "In Vivo Endoluminal Ultrasound Biomicroscopic Imaging in a Mouse Model of Colorectal Cancer" **Academic Radiology** v. 20, pp. 90-98, 2013.
- KESSLER, L., KORPEL, A. and PALERMO, P. "Simultaneous acoustic and optical microscopy" **Nature** v. 239, pp. 111-112, 1972.
- KIM, H., RYU, K., SHUNG, D. and PARK, Y., "Correlation between sonographic and pathologic findings in muscle injury: experimental study in the rabbit," **Journal of Ultrasound in Medicine** v. 21, pp. 1113-1119, 2002.
- KONISHI, Y. *et al.* "Relationship between muscle volume and muscle torque of the hamstrings after anterior cruciate ligament lesion" **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy** v. 20, n. 11, pp. 2270–2274, 19 nov. 2012.
- LIEBER, R.L., FRIDEN, J. "Functional and clinical significance of skeletal muscle architecture" **Muscle & Nerve** v. 23, pp. 1647–1666, 2000.
- LIEBER, R. **Skeletal Muscle Structure, Function, & Plasticity – The Physiological Basis of Rehabilitation** Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002.
- LOCKWOOD, G., TURNBULL, D., CHRISTOPHER, D., and FOSTER, F., "Beyond 30MHz: Applications of High Frequency Ultrasound," **IEEE Engineering in Medicine and Biology** pp. 60-71, 1996.
- MAC GILLIVRAY, T.J., ROSS, E., SIMPSON, A.H.R.W., GREIG, C.A. "3D freehand ultrasound for in vivo determination of human skeletal muscle volume" **Ultrasound in Medicine & Biology** v.35,n.6, pp. 928–935, 2009.
- MAGANARIS, C.N.A. "Predictive model of moment-angle characteristics in human skeletal muscle: application and validation in muscles across the ankle joint" **Journal of Theoretical Biology** v.230, n.1, pp. 89–98, 2004.
- MCARDLE, W.D.; KATCH, F.I., KATCH, V.L. **Fisiologia do exercício: nutrição, energia e desempenho humano**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

- POON, M., HAMARNEH, G., and ABUGHARBIEH, R. "Segmentation of Complex Objects with Non-Spherical Topologies from Volumetric Medical Images using 3D Livewire". In **SPIE Medical Imaging** v. 6512, pp. 1-10, 2007.
- MIYATANI, M. et al. "The accuracy of volume estimates using ultrasound muscle thickness measurements in different muscle groups" **European Journal of Applied Physiology** v. 91, n. 2-3, pp. 264–272, 2004.
- NARICI, M., "Human skeletal muscle architecture studied in vivo by non-invasive imaging techniques: functional significance and applications" **Journal of Electromyography and Kinesiology** v. 9, pp. 97-103, 1999.
- PAVLIN, C.J., SHERAR, M.D., FOSTER, F.S. "Subsurface imaging of the eye by ultrasound biomicroscopy" **Ophthalmology** v.97, pp.244–250, 1990.
- PAVLIN, C.J., FOSTER, F.S. **Ultrasound biomicroscopy of the eye**. New York: Springer-Verlag, 1995.
- PEIXINHO, C.C., RIBEIRO, M.B., RESENDE, C.M.C., WERNECK-DE-CASTRO, J.P.S., OLIVEIRA, L.F., MACHADO, J.C. "Ultrasound biomicroscopy for biomechanical characterization of healthy and injured triceps surae of rats" **The Journal of Experimental Biology** v.214, pp.3880-3886, 2011.
- PEIXINHO, C.C., MARTINS, N.S.F., OLIVEIRA, L.F., MACHADO, J.C. "Structural adaptations of rat lateral gastrocnemius muscle–tendon complex to a chronic and optical microscopic images" **Clinical Biomechanics** pp. 29:57–62, 2014.
- ROELLIG, K., DREWS, B., GOERITZ, F., *et al.* "The Long Gestation of the Small Naked Mole-Rat (*Heterocephalus glaber* RU" PPELL, 1842) Studied with Ultrasound Biomicroscopy and 3D-Ultrasonography" **PLoS One** v. 6, n.3, e17744, 2011.
- RYAN, L.K., FOSTER, F.S. "Tissue equivalent vessel phantoms for intravascular ultrasound" **Ultrasound in Medicine and Biology** v.23, n.2, pp.261-273, 1997.
- SĂFTOIU, A., GHEONEA, D.I. "Tridimensional (3D) endoscopic ultrasound – a pictorial review" **Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases** v. 18, n.4, 501-505, 2009.
- SHERAR, M. D., NOSS, M. B. & FOSTER, F. S. "Ultrasound backscatter microscopy images the internal structure of living tumour spheroids" **Nature**, v.330, pp. 493–495, 1987.
- SILA, M.D.S., CARVALHO. R.F. "Mecanismos celulares e moleculares que controlam o desenvolvimento e o crescimento muscular", **Revista Brasileira de Zootecnia**

- v.36, pp. 21-31, 2007.
- SILVERMAN, R.H., “High-resolution ultrasound imaging of the eye – a review”.  
*Clinical and Experimental Ophthalmology*, vol 37, pp. 54–67, 2009.
- SOLBERG, O.V., LINDSETH, F., TORP, H., BLAKE, R.E., HERNES, T.A.N.  
 “Freehand 3D ultrasound reconstruction algorithms – a review” **Ultrasound in  
 Medicine and Biology** v.33, n.7, pp. 991-1009, 2007.
- STACHS, O., MARTIN, H., KIRCHHOFF, A., STAVE, J., TERWEE, T., GUTHOFF,  
 R. “Monitoring accommodative ciliary muscle function using three-dimensional  
 ultrasound” **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**  
 v.240, 906–912, 2002.
- TAKAMASA, I., HIROSHI, Y., TOSHIYUKI, H. **A Color Atlas of Sectional  
 Anatomy of the Rat** Japan, September 2001.
- TURNBULL, D. H., BLOOMFIELD, T. S., BALDWIN, H. S., FOSTER, F. S. &  
 JOYNER, A. L. “Ultrasound backscatter microscope analysis of early mouse  
 embryonic brain development” **Proceedings of the National Academy of  
 Sciences**, v. 92, pp. 2239–2243, 1995.
- TURNBULL, D.H., "In utero ultrasound backscatter microscopy of early stage mouse  
 embryos," **Computerized Medical Imaging and Graphics** v. 23, pp. 25-31,  
 1999.
- WELLER, R., PFAU, T., FERRARI, M., GRIFFITH, R., BRADFORD, T., WILSON,  
 A. “The determination of muscle volume with a freehand 3D” **Ultrasound in  
 Medicine and Biology** v.33, n.3, pp. 402–407, 2007.
- WITTE, R., DOW, D., OLAFSSON, R., et al. "High resolution ultrasound imaging of  
 skeletal muscle dynamics and effects of fatigue," **IEEE Ultrasonics Symposium**,  
 pp. 764-767, 2004.
- WIRTZFELD, L.A., WU, G., BYGRAVE, M., YAMASAKI, Y., SAKAI, H.,  
 MOUSSA, M., IZAWA, J.I., DOWNEY, D.B., GREENBERG, N.M., FENSTER,  
 A., XUAN, J.W., LACEFIELD, J.C. “A new three-dimensional ultrasound  
 microimaging technology for preclinical studies using a transgenic prostate cancer  
 mouse model” **Cancer Research** v.65, pp. 6337–6345, 2005.
- ZHOU, Y. Q., FOSTER, F. S., PARKES, R. & ADAMSON, S. L. “Developmental  
 changes in left and right ventricular diastolic filling patterns in mice” *American  
 Journal. Physiology. Heart and Circulatory*. v. 285, pp.H1563–H1575, 2003.

## Anexo I

TABELAS DA ANOVA PARA MEDIDAS REPETIDAS, COMPARAÇÃO ENTRE  
AS MÉDIAS DAS SEQUÊNCIAS DE AQUISIÇÕES PARA OS *PHANTOMS*  
 $PH_{01}G_{Cl}$ ,  $PH_{10}P_{Cl}$ ,  $PH_{10}PP_{Cl}$  e  $PH_{10}G_{Co}$



## ANOVA para medidas repetidas - PH01Gci

## Sequência de Aquisições

Comparação entre as aquisições		Diferença entre as Médias (A-B)	Erro padrão	valor p	Intervalo de confiança 95%	
A	B				Inferior	Superior
1	3	-23,666	3,681	,135	-54,500	7,168
	2	-28,924	3,928	,082	-61,829	3,981
	4	-34,941	5,084	,106	-77,528	7,646
	5	-37,313*	3,794	,027	-69,090	-5,537
	6	-22,515	7,057	1,000	-81,628	36,599
	7	-34,121	5,325	,137	-78,729	10,486
	8	-56,521*	5,394	,021	-101,707	-11,335
	9	-45,435*	2,570	,003	-66,959	-23,912
	10	-51,142*	4,156	,011	-85,958	-16,326
	2	1	28,924	3,928	,082	-3,981
3		5,257	4,313	1,000	-30,870	41,384
4		-6,017	3,602	1,000	-36,186	24,151
5		-8,390	6,793	1,000	-65,287	48,508
6		6,409	7,061	1,000	-52,740	65,558
7		-5,198	6,088	1,000	-56,191	45,796
8		-27,598	5,673	,371	-75,114	19,919
9		-16,512*	1,944	,047	-32,793	-,230
10		-22,218	4,400	,326	-59,078	14,641
3		1	23,666	3,681	,135	-7,168
	2	-5,257	4,313	1,000	-41,384	30,870
	4	-11,274	5,352	1,000	-56,101	33,552
	5	-13,647	5,094	1,000	-56,314	29,020
	6	1,152	9,960	1,000	-82,279	84,583
	7	-10,455	6,954	1,000	-68,707	47,797
	8	-32,855	4,898	,116	-73,879	8,169
	9	-21,769	3,159	,105	-48,228	4,690
	10	-27,476	6,316	,547	-80,381	25,429
	4	1	34,941	5,084	,106	-7,646
3		11,274	5,352	1,000	-33,552	56,101
2		6,017	3,602	1,000	-24,151	36,186
5		-2,372	8,727	1,000	-75,470	70,725
6		12,426	6,637	1,000	-43,171	68,023
7		,819	3,475	1,000	-28,289	29,928
8		-21,580	3,351	,135	-49,647	6,486
9		-10,494	3,698	1,000	-41,469	20,480
10		-16,201	2,965	,246	-41,039	8,637
5		1	37,313	3,794	,027	5,537
	3	13,647	5,094	1,000	-29,020	56,314
	2	8,390	6,793	1,000	-48,508	65,287
	4	2,372	8,727	1,000	-70,725	75,470
	6	14,799	10,107	1,000	-69,861	99,458
	7	3,192	8,915	1,000	-71,482	77,866
	8	-19,208	8,441	1,000	-89,910	51,495
	9	-8,122	5,534	1,000	-54,474	38,230
	10	-13,829	7,884	1,000	-79,867	52,209

6	1	22,515	7,057	1,000	-36,599	81,628
	3	-1,152	9,960	1,000	-84,583	82,279
	2	-6,409	7,061	1,000	-65,558	52,740
	4	-12,426	6,637	1,000	-68,023	43,171
	5	-14,799	10,107	1,000	-99,458	69,861
	7	-11,607	5,509	1,000	-57,754	34,540
	8	-34,006	8,901	,845	-108,568	40,555
	9	-22,920	7,478	1,000	-85,558	39,717
	10	-28,627	4,169	,106	-63,549	6,294
	7	1	34,121	5,325	,137	-10,486
3		10,455	6,954	1,000	-47,797	68,707
2		5,198	6,088	1,000	-45,796	56,191
4		-,819	3,475	1,000	-29,928	28,289
5		-3,192	8,915	1,000	-77,866	71,482
6		11,607	5,509	1,000	-34,540	57,754
8		-22,400	4,079	,241	-56,571	11,771
9		-11,314	5,536	1,000	-57,686	35,059
10		-17,021	2,202	,068	-35,462	1,421
8		1	56,521*	5,394	,021	11,335
	3	32,855	4,898	,116	-8,169	73,879
	2	27,598	5,673	,371	-19,919	75,114
	4	21,580	3,351	,135	-6,486	49,647
	5	19,208	8,441	1,000	-51,495	89,910
	6	34,006	8,901	,845	-40,555	108,568
	7	22,400	4,079	,241	-11,771	56,571
	9	11,086	4,556	1,000	-27,076	49,248
	10	5,379	4,823	1,000	-35,016	45,774
	9	1	45,435*	2,570	,003	23,912
3		21,769*	3,159	,105	-4,690	48,228
2		16,512*	1,944	,047	,230	32,793
4		10,494	3,698	1,000	-20,480	41,469
5		8,122	5,534	1,000	-38,230	54,474
6		22,920	7,478	1,000	-39,717	85,558
7		11,314	5,536	1,000	-35,059	57,686
8		-11,086	4,556	1,000	-49,248	27,076
10		-5,707*	4,215	1,000	-41,017	29,603
10		1	51,142*	4,156	,011	16,326
	3	27,476	6,316	,547	-25,429	80,381
	2	22,218	4,400	,326	-14,641	59,078
	4	16,201	2,965	,246	-8,637	41,039
	5	13,829	7,884	1,000	-52,209	79,867
	6	28,627	4,169	,106	-6,294	63,549
	7	17,021	2,202	,068	-1,421	35,462
	8	-5,379	4,823	1,000	-45,774	35,016
	9	5,707	4,215	1,000	-29,603	41,017

\*. O nível de significância adotado para a diferença entre as médias foi de ,05.

b. Ajuste para mustiplas comparações: Bonferroni.

**NOVA para medidas repetidas - PH10Pci**  
Sequência de Aquisições

Comparação entre as aquisições		Diferença entre as Médias (A-B)	Erro padrão	valor p	Intervalo de confiança 95%	
A	B				Inferior	Superior
1	2	-3,412*	,258	,009	-5,572	-1,251
	3	-3,797*	,287	,008	-6,201	-1,394
	4	-3,670*	,184	,002	-5,212	-2,128
	5	-5,032*	,333	,005	-7,818	-2,246
	6	-4,428*	,060	,000	-4,930	-3,926
	7	-5,374*	,288	,002	-7,784	-2,964
	8	-3,672*	,311	,013	-6,277	-1,066
	9	-3,571*	,229	,004	-5,491	-1,651
	10	-4,458*	,159	,000	-5,786	-3,130
	2	1	3,412*	,258	,009	1,251
3		-,386	,092	,626	-1,159	,387
4		-,258	,083	1,000	-,951	,435
5		-1,621*	,156	,022	-2,929	-,312
6		-1,016*	,232	,533	-2,958	,925
7		-1,962*	,156	,010	-3,269	-,656
8		-,260	,245	1,000	-2,314	1,793
9		-,160	,296	1,000	-2,638	2,319
10		-1,046*	,124	,049	-2,089	-,004
3		1	3,797*	,287	,008	1,394
	2	,386	,092	,626	-,387	1,159
	4	,128	,113	1,000	-,818	1,074
	5	-1,235	,162	,071	-2,588	,119
	6	-,631	,246	1,000	-2,691	1,430
	7	-1,576*	,117	,008	-2,553	-,600
	8	,126	,194	1,000	-1,500	1,751
	9	,226	,290	1,000	-2,201	2,653
	10	-,660	,183	1,000	-2,195	,874
	4	1	3,670*	,184	,002	2,128
2		,258	,083	1,000	-,435	,951
3		-,128	,113	1,000	-1,074	,818
5		-1,363	,183	,078	-2,895	,170
6		-,758	,156	,373	-2,066	,549
7		-1,704*	,164	,022	-3,081	-,328
8		-,002	,232	1,000	-1,947	1,943
9		,098	,236	1,000	-1,879	2,076
10		-,788*	,082	,030	-1,477	-,100
5		1	5,032*	,333	,005	2,246
	2	1,621*	,156	,022	,312	2,929
	3	1,235	,162	,071	-,119	2,588
	4	1,363	,183	,078	-,170	2,895
	6	,604	,303	1,000	-1,930	3,138
	7	-,342	,234	1,000	-2,299	1,615
	8	1,361	,283	,388	-1,011	3,733
	9	1,461	,396	,943	-1,852	4,775
	10	,574	,192	1,000	-1,037	2,186

6	1	4,428*	,060	,000	3,926	4,930
	2	1,016	,232	,533	-,925	2,958
	3	,631	,246	1,000	-1,430	2,691
	4	,758	,156	,373	-,549	2,066
	5	-,604	,303	1,000	-3,138	1,930
	7	-,946	,238	,741	-2,939	1,047
	8	,756	,253	1,000	-1,366	2,879
	9	,857	,228	,896	-1,056	2,770
	10	-,030	,149	1,000	-1,274	1,214
	7	1	5,374*	,288	,002	2,964
2		1,962*	,156	,010	,656	3,269
3		1,576*	,117	,008	,600	2,553
4		1,704*	,164	,022	,328	3,081
5		,342	,234	1,000	-1,615	2,299
6		,946	,238	,741	-1,047	2,939
8		1,702*	,102	,003	,845	2,560
9		1,803	,330	,245	-,958	4,564
10		,916	,217	,607	-,902	2,735
8		1	3,672*	,311	,013	1,066
	2	,260	,245	1,000	-1,793	2,314
	3	-,126	,194	1,000	-1,751	1,500
	4	,002	,232	1,000	-1,943	1,947
	5	-1,361	,283	,388	-3,733	1,011
	6	-,756	,253	1,000	-2,879	1,366
	7	-1,702*	,102	,003	-2,560	-,845
	9	,100	,372	1,000	-3,012	3,213
	10	-,786	,275	1,000	-3,090	1,517
	9	1	3,571*	,229	,004	1,651
2		,160	,296	1,000	-2,319	2,638
3		-,226	,290	1,000	-2,653	2,201
4		-,098	,236	1,000	-2,076	1,879
5		-1,461	,396	,943	-4,775	1,852
6		-,857	,228	,896	-2,770	1,056
7		-1,803	,330	,245	-4,564	,958
8		-,100	,372	1,000	-3,213	3,012
10		-,887	,279	1,000	-3,226	1,452
10		1	4,458*	,159	,000	3,130
	2	1,046*	,124	,049	,004	2,089
	3	,660	,183	1,000	-,874	2,195
	4	,788*	,082	,030	,100	1,477
	5	-,574	,192	1,000	-2,186	1,037
	6	,030	,149	1,000	-1,214	1,274
	7	-,916	,217	,607	-2,735	,902
	8	,786	,275	1,000	-1,517	3,090
	9	,887	,279	1,000	-1,452	3,226

\*. O nível de significância adotado para a diferença entre as médias foi de ,05.

b. Ajuste para múltiplas comparações: Bonferroni.

**ANOVA para medidas repetidas - PH10PPci**  
Sequência de Aquisições

Comparação entre as aquisições		Diferença entre as Médias (A-B)	Erro padrão	valor p	Intervalo de confiança 95%	
A	B				Inferior	Superior
1	2	-,827	,275	1,000	-3,126	1,473
	3	-1,531*	,117	,009	-2,515	-,547
	4	-1,704*	,188	,037	-3,281	-,127
	5	-1,830*	,175	,021	-3,294	-,365
	6	-3,007*	,377	,060	-6,163	,150
	7	-4,375*	,197	,001	-6,024	-2,726
	8	-3,497*	,446	,065	-7,236	,242
	9	-3,621*	,347	,021	-6,524	-,717
	10	-5,720*	,284	,002	-8,099	-3,341
	2	1	,827	,275	1,000	-1,473
3		-,704	,223	1,000	-2,568	1,160
4		-,877	,144	,165	-2,084	,329
5		-1,003*	,109	,035	-1,919	-,087
6		-2,180*	,449	,374	-5,940	1,580
7		-3,548*	,347	,023	-6,455	-,642
8		-2,670*	,328	,056	-5,420	,080
9		-2,794*	,202	,007	-4,484	-1,104
10		-4,893*	,151	,000	-6,157	-3,630
3		1	1,531*	,117	,009	,547
	2	,704	,223	1,000	-1,160	2,568
	4	-,173	,160	1,000	-1,512	1,165
	5	-,299	,126	1,000	-1,354	,756
	6	-1,476*	,457	1,000	-5,305	2,353
	7	-2,844*	,230	,011	-4,772	-,916
	8	-1,966	,438	,492	-5,636	1,704
	9	-2,090*	,334	,149	-4,885	,705
	10	-4,189*	,200	,001	-5,867	-2,511
	4	1	1,704*	,188	,037	,127
2		,877	,144	,165	-,329	2,084
3		,173	,160	1,000	-1,165	1,512
5		-,126	,068	1,000	-,698	,447
6		-1,303*	,359	1,000	-4,312	1,707
7		-2,671*	,204	,009	-4,383	-,959
8		-1,793*	,426	,611	-5,359	1,774
9		-1,916*	,181	,020	-3,434	-,399
10		-4,016*	,212	,002	-5,789	-2,242
5		1	1,830*	,175	,021	,365
	2	1,003*	,109	,035	,087	1,919
	3	,299	,126	1,000	-,756	1,354
	4	,126	,068	1,000	-,447	,698
	6	-1,177*	,405	1,000	-4,570	2,216
	7	-2,545*	,250	,023	-4,635	-,455
	8	-1,667	,384	,553	-4,887	1,553
	9	-1,791*	,224	,060	-3,666	,084
	10	-3,890*	,167	,001	-5,292	-2,488

6	1	3,007	,377	,060	-,150	6,163
	2	2,180	,449	,374	-1,580	5,940
	3	1,476	,457	1,000	-2,353	5,305
	4	1,303	,359	1,000	-1,707	4,312
	5	1,177	,405	1,000	-2,216	4,570
	7	-1,368	,319	,573	-4,039	1,303
	8	-,490	,584	1,000	-5,382	4,402
	9	-,614	,334	1,000	-3,414	2,186
	10	-2,713	,534	,319	-7,188	1,761
	7	1	4,375*	,197	,001	2,726
2		3,548*	,347	,023	,642	6,455
3		2,844*	,230	,011	,916	4,772
4		2,671*	,204	,009	,959	4,383
5		2,545*	,250	,023	,455	4,635
6		1,368	,319	,573	-1,303	4,039
8		,878	,582	1,000	-3,993	5,750
9		,754	,316	1,000	-1,896	3,405
10		-1,345	,371	1,000	-4,456	1,766
8		1	3,497	,446	,065	-,242
	2	2,670	,328	,056	-,080	5,420
	3	1,966	,438	,492	-1,704	5,636
	4	1,793	,426	,611	-1,774	5,359
	5	1,667	,384	,553	-1,553	4,887
	6	,490	,584	1,000	-4,402	5,382
	7	-,878	,582	1,000	-5,750	3,993
	9	-,124	,429	1,000	-3,714	3,466
	10	-2,223	,321	,103	-4,914	,467
	9	1	3,621*	,347	,021	,717
2		2,794*	,202	,007	1,104	4,484
3		2,090	,334	,149	-,705	4,885
4		1,916*	,181	,020	,399	3,434
5		1,791	,224	,060	-,084	3,666
6		,614	,334	1,000	-2,186	3,414
7		-,754	,316	1,000	-3,405	1,896
8		,124	,429	1,000	-3,466	3,714
10		-2,099	,295	,092	-4,568	,369
10		1	5,720*	,284	,002	3,341
	2	4,893*	,151	,000	3,630	6,157
	3	4,189*	,200	,001	2,511	5,867
	4	4,016*	,212	,002	2,242	5,789
	5	3,890*	,167	,001	2,488	5,292
	6	2,713	,534	,319	-1,761	7,188
	7	1,345	,371	1,000	-1,766	4,456
	8	2,223	,321	,103	-,467	4,914
	9	2,099	,295	,092	-,369	4,568

\*. O nível de significância adotado para a diferença entre as médias foi de ,05.

b. Ajuste para múltiplas comparações: Bonferroni.

**ANOVA para medidas repetidas - PH10Gco**  
Sequência de Aquisições

Comparação entre as aquisições		Diferença entre as Médias (A-B)	Erro padrão	valor p	Intervalo de confiança 95%	
A	B				Inferior	Superior
1	2	-29,975*	,317	,000	-32,634	-27,315
	3	-40,123*	2,730	,006	-62,987	-17,260
	4	-60,371*	,773	,000	-66,845	-53,897
	5	-76,996*	,393	,000	-80,284	-73,708
	6	-79,960*	1,126	,000	-89,389	-70,531
	7	-115,321*	1,616	,000	-128,857	-101,786
	8	-115,477*	1,615	,000	-129,006	-101,949
	9	-139,060*	1,101	,000	-148,280	-129,840
	10	-157,014*	,822	,000	-163,899	-150,128
	2	1	29,975*	,317	,000	27,315
3		-10,148*	2,968	1,000	-35,011	14,714
4		-30,396*	1,034	,000	-39,053	-21,739
5		-47,021*	,534	,000	-51,491	-42,551
6		-49,985*	1,323	,000	-61,067	-38,904
7		-85,346*	1,796	,000	-100,393	-70,299
8		-85,503*	1,676	,000	-99,545	-71,461
9		-109,085*	1,032	,000	-117,729	-100,441
10		-127,039*	,783	,000	-133,595	-120,482
3		1	40,123*	2,730	,006	17,260
	2	10,148*	2,968	1,000	-14,714	35,011
	4	-20,248*	2,188	,034	-38,575	-1,920
	5	-36,873*	2,697	,007	-59,466	-14,279
	6	-39,837*	1,985	,002	-56,464	-23,210
	7	-75,198*	3,333	,001	-103,113	-47,282
	8	-75,354*	2,707	,000	-98,029	-52,679
	9	-98,937*	3,696	,001	-129,897	-67,977
	10	-116,890*	2,495	,000	-137,786	-95,995
	4	1	60,371*	,773	,000	53,897
2		30,396*	1,034	,000	21,739	39,053
3		20,248*	2,188	,034	1,920	38,575
5		-16,625*	,589	,000	-21,557	-11,693
6		-19,589*	1,095	,003	-28,759	-10,419
7		-54,950*	1,881	,000	-70,706	-39,194
8		-55,107*	1,413	,000	-66,941	-43,272
9		-78,689*	1,751	,000	-93,354	-64,024
10		-96,643*	1,091	,000	-105,785	-87,501
5		1	76,996*	,393	,000	73,708
	2	47,021*	,534	,000	42,551	51,491
	3	36,873*	2,697	,007	14,279	59,466
	4	16,625*	,589	,000	11,693	21,557
	6	-2,964*	1,229	1,000	-13,256	7,328
	7	-38,325*	1,827	,001	-53,627	-23,023
	8	-38,482*	1,353	,000	-49,815	-27,148
	9	-62,064*	1,307	,000	-73,013	-51,115
	10	-80,018*	,896	,000	-87,527	-72,508

6	1	79,960*	1,126	,000	70,531	89,389
	2	49,985*	1,323	,000	38,904	61,067
	3	39,837*	1,985	,002	23,210	56,464
	4	19,589*	1,095	,003	10,419	28,759
	5	2,964*	1,229	1,000	-7,328	13,256
	7	-35,361*	1,870	,002	-51,028	-19,694
	8	-35,517*	1,487	,001	-47,976	-23,058
	9	-59,100*	1,874	,000	-74,799	-43,401
	10	-77,054*	1,112	,000	-86,370	-67,737
	7	1	115,321*	1,616	,000	101,786
2		85,346*	1,796	,000	70,299	100,393
3		75,198*	3,333	,001	47,282	103,113
4		54,950*	1,881	,000	39,194	70,706
5		38,325*	1,827	,001	23,023	53,627
6		35,361*	1,870	,002	19,694	51,028
8		-,156*	2,670	1,000	-22,523	22,210
9		-23,739*	1,291	,002	-34,549	-12,928
10		-41,692*	2,335	,003	-61,253	-22,132
8		1	115,477*	1,615	,000	101,949
	2	85,503*	1,676	,000	71,461	99,545
	3	75,354*	2,707	,000	52,679	98,029
	4	55,107*	1,413	,000	43,272	66,941
	5	38,482*	1,353	,000	27,148	49,815
	6	35,517*	1,487	,001	23,058	47,976
	7	,156*	2,670	1,000	-22,210	22,523
	9	-23,582*	2,230	,020	-42,261	-4,904
	10	-41,536*	1,578	,001	-54,758	-28,314
	9	1	139,060*	1,101	,000	129,840
2		109,085*	1,032	,000	100,441	117,729
3		98,937*	3,696	,001	67,977	129,897
4		78,689*	1,751	,000	64,024	93,354
5		62,064*	1,307	,000	51,115	73,013
6		59,100*	1,874	,000	43,401	74,799
7		23,739*	1,291	,002	12,928	34,549
8		23,582*	2,230	,020	4,904	42,261
10		-17,954*	1,763	,024	-32,719	-3,188
10		1	157,014*	,822	,000	150,128
	2	127,039*	,783	,000	120,482	133,595
	3	116,890*	2,495	,000	95,995	137,786
	4	96,643*	1,091	,000	87,501	105,785
	5	80,018*	,896	,000	72,508	87,527
	6	77,054*	1,112	,000	67,737	86,370
	7	41,692*	2,335	,003	22,132	61,253
	8	41,536*	1,578	,001	28,314	54,758
	9	17,954*	1,763	,024	3,188	32,719

\*. O nível de significância adotado para a diferença entre as médias foi de ,05.

b. Ajuste para mustiplas comparações: Bonferroni.