

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

N.S.F. Martins*, L.F. Oliveira* e J.C. Machado***

*Programa de Engenharia Biomédica/COPPE - UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas – FM/UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil

natalia_sfm@hotmail.com

Resumo: A biomicroscopia ultrassônica é uma técnica de geração de imagens de alta resolução, aplicada em pesquisas com pequenos animais e direcionadas para analisar modelos que mimetizam condições humanas. Utilizando 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, em 35 MHz, de phantoms, promover a validação da técnica e avaliar a confiabilidade das medidas do volume. Posteriormente, pretende-se obter imagens 3D do gastrocnêmio de ratos a fim de quantificar o volume muscular. Foi obtido o volume físico de todos os phantoms para a validação da técnica. Os valores de coeficiente de variação (CV) e coeficiente de correlação intraclasse (CCI) atestaram a confiabilidade das medidas do volume obtido por segmentação. Além disso, a técnica foi utilizada para obter imagens do músculo gastrocnêmio e quantificar seu volume parcial. Os resultados indicaram que a técnica é válida para gerar imagens em 3D e quantificar o volume de um músculo com dimensões compatíveis às de um animal pequeno.

Palavras-chave: biomicroscopia ultrassônica, imagem 3D, phantom, gastrocnêmio, rato

Abstract: *Ultrasound biomicroscopy (UBM) is a technique for generating high-resolution images. For example, it has been used in animal research related to models that mimic human conditions. With a three-dimensional ultrasound (3D) image system, it is possible to view pictures in different angles and the volume can be estimated, contributing to an accurate diagnosis. This study aims to generate 3D images from the acquisition of multiple two-dimensional images at 35 MHz, of the phantoms, promote the validation of the technique and evaluate the reliability of volume measurements. Subsequently, the aim is to obtain 3D images of the gastrocnemius of rats to quantify muscle volume. The coefficient of variation (CV) and intraclass correlation coefficient (ICC) confirmed the reliability of volume measurements obtained by segmentation. In addition, the technique was used to obtain images of the gastrocnemius muscle and quantify their partial volume.*

The results indicated that the technique is valid to generate 3D images and quantify the volume of a muscle from a small animal.

Introdução

A biomicroscopia ultrassônica (BMU) é uma técnica de geração de imagens de alta resolução, empregada amplamente em diversas áreas da medicina e da biologia, que utiliza frequências na faixa de 40 a 100 MHz [1]. A BMU permite a geração de imagens similares às obtidas com um ultrassom convencional e torna possível a detecção e o acompanhamento longitudinal de lesões, em animais de pequeno porte, para a investigação de modelos de lesões e doenças que mimetizem condições humanas [2].

Comumente, as imagens de ultrassom (US) bidimensionais (2D) são utilizadas para análises médicas e diagnósticos, mas existem algumas limitações para observar a anatomia de um órgão em três dimensões [3]. Tais limitações podem ser resolvidas utilizando um sistema de US com geração de imagens tridimensionais (3D), cujas vantagens incluem uma visão global e a possibilidade de rotacionar e manipular tais imagens em diversos ângulos [4]. Com imagens em 3D pode-se estimar o volume de órgãos e tecidos, colaborando para um diagnóstico mais preciso [5].

Nas últimas décadas, o US 3D também tem sido bastante empregado na validação do volume muscular (VM), importante parâmetro de arquitetura muscular para estimar a função de um músculo. Diversos estudos utilizaram um US 2D *freehand* e geraram imagens 3D, processando inúmeros quadros de imagens 2D, e validaram a técnica para a obtenção de volume, comparando os resultados com os obtidos por ressonância magnética (RM) [6,7], por deslocamento de coluna de água [8,9] e por tomografia computadorizada (TC) [9]. Entretanto, até o presente momento, não foram encontrados na literatura estudos com músculo-esquelético de pequenos animais, baseados em imagens de US de alta resolução em 3D.

Deste modo, este estudo tem como objetivo construir e gerar imagens 3D de *phantoms* de dimensões conhecidas e similares as do gastrocnêmio de ratos, a fim de promover a confiabilidade e validação da técnica

de BMU 3D. Adicionalmente, obter imagens de BMU 3D do gastrocnêmio lateral (GL) de ratos, para posterior segmentação e quantificação do volume muscular.

Materiais e métodos

Equipamento - Foram adquiridas imagens de BMU 2D utilizando-se um equipamento comercial da Capistrano Labs Incorporated (San Clemente, CA 92672, EUA), operando em plataforma Windows e controlado pelo Software Ultraview (versão 5.93; Capistrano Labs, Incorporated, San Clemente, CA, EUA). Usou-se um transdutor com focalização esférica, operando em 35 MHz, com distância focal de 12 mm, profundidade de campo de 0,8 cm e diâmetro de 5 mm.

Confeção dos phantoms - Os *phantoms* foram confeccionados à base de pó de gelatina dissolvido em água destilada, em 50°C, na concentração de 15% em peso [10]. Como espalhador de US foi utilizado pó de sílica (S-5631; Sigma Chemical, Missouri, EUA), em uma concentração de 2% em peso. Dois *phantoms*, com formato externo cilíndrico, foram confeccionados com duas partes concêntricas (externa/interna, anecoica/ecoica). O *phantom* 01 teve a parte externa (anecoica) moldada por uma seringa de 3 ml e parte interna (ecoica) moldada com canudo flexível. O *phantom* 02, teve a parte externa (ecoica) moldada com seringa de 1 ml e parte interna (anecoica) moldada com agulha descartável de 0,8 mm de diâmetro. As seringas foram preenchidas com gelatina dissolvida em água quente, misturada ou não com espalhadores (conforme o *phantom*). O molde da parte interna era inserido através da extremidade aberta da seringa e fixado no centro do êmbolo. A seringa era mantida na geladeira por 12 horas. Após esse tempo, o molde da parte interna (canudo ou agulha) era removido e o espaço interno preenchido (*phantom* 01) com gelatina misturada com espalhadores e retornado a geladeira por mais 12 horas.

Geração de imagens 3D - As imagens de BMU 3D foram geradas por processamento de imagens de BMU 2D adquiridas de múltiplos planos paralelos e igualmente espaçados entre si. Os quadros de imagens de BMU 2D, já armazenados em formato “jpeg”, foram convertidos para o formato Dicom e processados 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 e calcular o volume da estrutura. A segmentação das imagens ocorre de modo semiautomático, sendo realizada com o auxílio de uma ferramenta interna do *software*. O processo de geração do contorno fechado é realizado em vários planos sugeridos pelo programa, até se obter visualmente um volume segmentado que represente o volume desejado. Após a segmentação, o *software* calcula o volume contido na imagem gerada em 3D.

Todo o processo, da aquisição à segmentação, leva cerca de 40 minutos (considerando uma única sequência de aquisição).

Aquisição de imagens 2D dos phantoms - No momento de aquisição das imagens, o *phantom* foi fixado a uma estrutura de plástico ligada a uma pequena placa de alumínio, e imerso em água destilada contida em um reservatório colocado sobre uma plataforma. Para validar e certificar a confiabilidade do sistema de BMU 3D para medir o volume, foram realizadas 10 sequências de aquisição de imagens de BMU 2D para cada *phantom*. O número total de quadros adquiridos em cada sequência variou entre 60 a 120. Em todos os intervalos entre as aquisições, o comprimento do *phantom* era medido 5 vezes com o auxílio de um paquímetro digital para compor o cálculo de volume físico, a ser comparado com o volume calculado a partir das segmentações das imagens. Para cada sequência de aquisições foram realizadas 5 segmentações, totalizando 50 segmentações para cada *phantom*, a partir de 50 imagens em 3D e 50 valores de volume. Toda a programação computacional do sistema de BMU realiza-se em linguagem LabVIEW.

Animais (aquisição de imagens) - Foram utilizados 5 ratos Wistar, com peso médio de 233,4g. Todo o protocolo experimental envolvendo animais foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Animais da UFRJ (LABCE nº: 07-09/13). Antes da aquisição de imagem, os animais foram anestesiados com ketamina (10-15 mg/kg) e xilazina (50-75 mg/kg), e tiveram as patas trazeiras tricotomizadas. O animal foi posicionado sobre a plataforma em posição pronada, com o tornozelo em 90° e rotação interna da articulação do quadril. A pata do animal foi colocada em um anteparo plástico e recoberta de gel para permitir o acoplamento acústico entre a sonda e o animal (Figura 2).

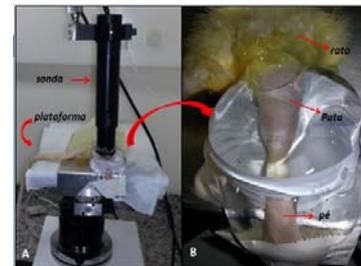


Figura 1. A) Posicionamento do animal na plataforma e sonda de US. B) Detalhe da pata do rato no anteparo plástico com tornozelo em posição neutra (90°) e rotação interna do quadril, coberto com gel.

O plano de imagem foi alinhado perpendicularmente ao eixo longitudinal do gastrocnêmio. À medida que se adquire uma imagem 2D, a plataforma em que o animal está posicionado se desloca a um passo controlado de 0,2mm. O processo se repete até que toda a distância pré-determinada seja percorrida.

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 aquisição, aplicou-se o teste paramétrico ANOVA one-way para medidas repetidas, com correção de Bonferroni. Para a

análise da confiabilidade e da variabilidade das medidas utilizou-se o coeficiente de variação (CV) e coeficiente de correlação intraclasse (CCI). Para a estimativa de erro, foi determinado o erro típico da medida (ETM), como sugerido por Hopkins (2000). O teste-t foi realizado para verificar a existência de diferenças significativas entre as médias do volume físico e do obtido por segmentação. O limite de significância estatística de todos os testes foi estabelecido em $p < 0,05$.

Resultados

Phantoms - Foram adquiridas imagens em BMU 2D (Figura 3 A,C) e convertidas para 3D (Figura 3 B,D) dos dois *phantoms*.

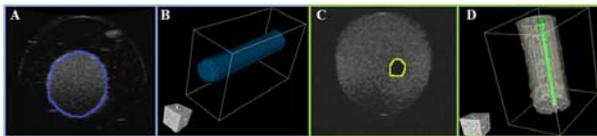


Figura 2. Imagens em 2D (A,C) e em 3D (B,D), (parte segmentada) dos *phantoms* 01 (A,B) e 02 (C,D)

Para os dois *phantoms*, os volumes determinados por segmentação das imagens de BMU 3D apresentaram distribuição normal. Para o *phantom* 01, todas as medidas de volume baseadas na imagem de BMU 3D apresentaram baixos valores 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 confiabilidade (0,74 e 0,93). Para o *phantom* 02, os volumes apresentaram baixos valores de CV (de 11,13 e 12,85% para as médias das segmentações 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.

A ANOVA para medidas repetidas com correção de Bonferroni não identificou diferenças significativas entre as médias das segmentações, a não ser entre as médias das aquisições para os 2 *phantoms*.

O teste-t utilizado para a comparação entre o volume do *phantom* 01 obtido por segmentação e o volume obtido pelo cálculo direto usando as dimensões físicas do *phantom*, não indicou diferença significativa entre os 2 grupos de medidas, apresentando um valor p de 0,29. O valor do CCI (0,79) está dentro do intervalo de confiança. No entanto, o teste-t realizado para comparar as 2 formas de aquisição de volume para o *phantom* 02, indicou diferença significativa entre os 2 grupos de medidas, apresentando um valor p de 0,006. Em concordância, o valor do CCI (0,29) está fora do intervalo de confiabilidade. Os valores de média, DP, CV, CCI e ETM encontram-se na Tabela 1.

Animais - Imagens típicas do GL de rato foram adquiridas em 2D (Figura 4) e convertidas para 3D, podendo ser visualizadas nos 3 planos (sagital, coronal e transversal) na Figura 4 (A,B,C). Dos 5 animais utilizados, em apenas 4 foi possível obter imagens com qualidade suficiente para identificação dos limites do GL e portanto, a possibilidade de segmentação, geração

da imagem 3D e quantificação do volume parcial. Os valores parciais de volume obtidos pela segmentação do GL, são: 3,28 mm³ (rato 2), 1,07 mm³ (rato 3), 2,44 mm³ (rato 4), 2,04 mm³ (rato 5). Essa clara diferença entre os volumes obtidos deve-se ao fato de a aquisição dos quadros de imagens em 2D ocorrer até diferentes pontos do GL. A varredura era iniciada na altura do tendão calcâneo e terminava pouco depois da metade do músculo, variando de animal para animal.

Tabela 1. Valores de média, DP, CCI e ETM para os volumes determinados por cálculo direto usando as dimensões físicas e por segmentação para os 2 *phantoms*.

	Volume Físico		Volume Segmentado	
	Média±DP(mm ³)	CV(%)	Média±DP(mm ³)	CV(%)
<i>Phantom</i> 01	294,21±4,18	0,42	285,77±7,55	1,11
	:	:	:	:
	330,5±1,39	2,49	346,04±8,22	4,78
	ICC 0,79			
	ETM (abs./rel.)		6,47 mm ³ / 2,1%	
<i>Phantom</i> 02	12,1±0,26	0,51	11,52±0,22	1,35
	:	:	:	:
	14,45±0,35	5,29	17,24±0,45	5,56
	ICC 0,29			
	ETM (abs./rel.)		0,85mm ³ / 6,3%	

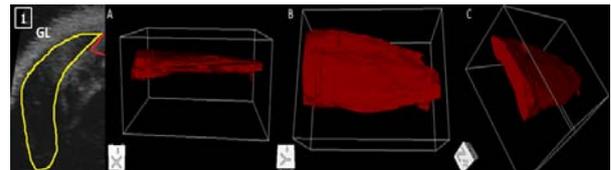


Figura 3. Imagem de BMU em 2D do GL de rato (1) e visão em 3D do músculo nos planos sagital (A) coronal (B) e transversal (C).

Discussão

O sistema de BMU 3D utilizado no presente estudo foi desenvolvido para gerar imagens com comprimento e largura máximas de 25,4 e 15 mm, respectivamente, e portanto, compatíveis às do gastrocnêmio de ratos e, portanto, adequadas para reproduzir valores volumétricos similares aos obtidos por medidas de dimensões em objetos reais. Dos *phantoms* confeccionados para esta pesquisa, um apresentava o diâmetro menor do que a espessura muscular do gastrocnêmio de um rato com aproximadamente 230 g (*phantom* 02, com média de comprimento/diâmetro de 16,28/0,8 mm) e o outro maior (*phantom* 01, com média de comprimento/diâmetro de 23,75/4,1mm).

Os valores de volume provenientes da segmentação das imagens de BMU 3D dos *phantoms* apresentaram resultados positivos quanto 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 2 *phantoms*. Já a comparação das médias de volume determinadas entre as sequências de aquisições mostrou diferenças entre si para ambos, sugerindo que ao longo do experimento, da primeira à última

seqüência, os *phantoms* se modificaram. Mesmo assim, a confiabilidade das medidas se manteve, sendo atestado por altos valores de CCI e baixos valores de CV, variando de 1,1 a 4,78% para o *phantom* 01 e de 1,35 a 5,56% para o 02. Esses valores estão compatíveis e até mais baixos que os encontrados por Ferrari *et al.* [11] que, operando em 7,5 MHz, geraram imagens 3D de um *phantom* similar, mas de material (plástico) e tamanho diferente (\cong 3 vezes maior que o *phantom* 01 deste trabalho). O *phantom* é confeccionado à base de água e gelatina e pode-se atribuir essa modificação à possível absorção de água ocorrida durante o experimento.

O teste-t indicou diferenças significativas entre o volume físico e o obtido por segmentação apenas para o *phantom* 02, e essa diferença pode ser atribuída ao fato de que seu interior foi moldado com agulha descartável, que possui um bisel cortante em uma de suas extremidades. Isto pode ter contribuído para o aumento na diferença entre os volumes, pois quando o *phantom* é desenformado do molde e a agulha é removida de dentro da estrutura gelatinosa, a parede interna do material pode ser dilacerada, aumentando acidentalmente o espaço hipocóico na imagem e, portanto, a superfície que foi segmentada.

Comparando os volumes físicos e obtidos por BMU 3D, o *phantom* 01 se manteve dentro do intervalo de confiabilidade (CCI=0,79) e apresentou baixo percentual de ETM (2,1%). Já o *phantom* 02, apesar dos valores obtidos estarem na mesma faixa de valores apresentados por autores que compararam medidas obtidas por US 3D com a RM [6,7], o ETM apresentou percentuais de 6,3% e baixo índice de confiabilidade (CCI= 0,29). Isso sugere que alcançar médias homogêneas parece mais fácil em estruturas maiores.

É importante ressaltar que não houve um processamento de imagens adequado para esse tipo de análise, portanto, o contraste das imagens pode ter sido comprometido (tanto no armazenamento em “jpeg” quanto na conversão para dicom) impactando negativamente na segmentação. Além disso, ao adquirir as imagens e armazená-las em “jpeg” o programa de aquisição do BMU, em LabView, realizava uma compactação com perda de 20% de sua qualidade original. Tudo isso, pode aumentar as chances de erro de medida durante a segmentação semiautomática.

Esses resultados são similares aos de Delcker *et al.* [8] que investigaram a variabilidade de volume de pequenos músculos, com dimensões superiores às dos *phantoms* do presente estudo, encontrando diferença de 10% entre o volume obtido por US 3D *freehand* e por deslocamento de coluna de água. Isso pode ser explicado pela hipótese já conduzida [6] que considera a técnica de US 3D válida para medir grandes volumes musculares.

As medidas do volume obtido por segmentação mostraram alta confiabilidade, com resultados mais confiáveis se aplicando ao *phantom* de tamanho maior. 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*, e portanto, similares às do GL de rato, com erros inferiores a 10%.

Para ratificar a eficácia do método em produzir imagens e valores de volume confiáveis, seria válido acrescentar a análise de mais de um avaliador a fim de verificar a confiabilidade das medidas inter-avaliadores.

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

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro das agências CNPq, CAPES e FAPERJ.

Referências

- [1] Foster FS, Zhang M, Zhou Y. et al. A new ultrasound instrument for *in vivo* microimaging of mice. *Ultrasound in Medicine and Biology*. 2002; 28, pp.1165–1172.
- [2] Peixinho CC, Ribeiro MB, Resende CMC, Werneck-De-Castro JPS, Oliveira LF, Machado JC. Ultrasound biomicroscopy for biomechanical characterization of healthy and injured triceps surae of rats. *The Journal of Experimental Biology*. 2011; 214, pp.3880-3886.
- [3] Chang RF, Wu WJ, Chen DR, Chen WM, Shu W, Lee JH, Jeng LB 3-D US frame positioning using speckle decorrelation and image registration. *Ultrasound in Medicine and Biology*. 2003; 29 (6), pp. 801-812.
- [4] Solberg OV, Lindseth F, Torp H, Blake RE, Hernes TAN. Freehand 3D ultrasound reconstruction algorithms – a review. *Ultrasound in Medicine and Biology*. 2007; 33(7), pp. 991-1009.
- [5] Cobbold RSC. Ultrasound imaging arrays In: *Foundations of biomedical ultrasound*, New York: Oxford University Press. 2007; pp. 413-491.
- [6] Barber L, Barrett R, Lichtwark G. Validation of a freehand 3D ultrasound system for morphological measures of the medial gastrocnemius muscle. *Journal of Biomechanics*. 2009; 42, pp.1313–1319.
- [7] Mac Gillivray TJ, Ross E, Simpson AHRW, Greig, CA. 3D freehand ultrasound for *in vivo* determination of human skeletal muscle volume *Ultrasound in Medicine & Biology*. 2009; 35(6), pp. 928–935.
- [8] Delcker A, Walker F, Caress J, Hunt C, Tegeler C. *In vitro* measurement of muscle volume with 3-dimensional ultrasound. *European Journal of Ultrasound*. 1999;9, pp.185–190.
- [9] 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*. 2007; 33(3), pp. 402–407.
- [10] Ryan LK, Foster FS. Tissue equivalent vessel phantoms for intravascular ultrasound. *Ultrasound in Medicine and Biology*. 1997; 23(2), pp.261-273.
- [11] Ferrari, M., Weller, R., Pfau, T., Payne, RC., Wilson, A.M. A comparison of three-dimensional ultrasound, two-dimensional ultrasound and dissections for determination of lesion volume in tendons. *Ultrasound Medicine Biology*, 2006; 32(6), pp.797-804.