

Tecnologias emergentes na ultrassonografia do trato reprodutivo

Luiz Francisco Machado Pfeifer
João Henrique Moreira Viana
Luiz Gustavo Bruno Siqueira
Eduardo Kenji Nunes Arashiro

Introdução

A crescente importância da ultrassonografia como método diagnóstico, particularmente na medicina reprodutiva, estimulou o desenvolvimento de equipamentos mais modernos que, aos poucos, incorporaram os avanços tecnológicos e ampliaram as possibilidades de uso daquela técnica.

As melhorias nesses equipamentos são facilmente detectáveis: na arquitetura e na ergonomia, na portabilidade, no uso de fontes internas de energia (baterias recarregáveis), no tamanho, na resolução e no tipo dos monitores, e também no desenho das probes (Figura 1). Particularmente importantes foram os avanços relacionados à eletrônica, que possibilitaram a incorporação, nos equipamentos de ultrassonografia, de recursos já comuns em equipamentos de informática, como: telas de LCD e *touch screen*, discos internos de memória de alta capacidade e interfaces externas, por meio de portas USB. Esses avanços resultaram em facilidade na execução dos exames e melhoria da qualidade das imagens geradas, recursos que deram mais precisão aos diagnósticos e à documentação dos achados, contribuindo de forma decisiva para a incorporação da ultrassonografia à rotina dos exames ginecológicos. Ademais, essas tecnologias instigaram novas abordagens na ultrassonografia reprodutiva, para fins de estudo e diagnóstico.



Figura 1. Evolução tecnológica em equipamentos de ultrassonografia, representada por equipamentos de duas gerações (1998 e 2008): Scanner 200, Pie-Medical e Holanda (A, C, E); MyLab 30, Esaote e Itália (B, D, F); design, layout, tipo e tamanho do monitor (A, B); probes (setorial mecânica vs. microconvexa eletrônica) (C, D); portas de saída (vídeo vs. USB/Ethernet) (E, F).

Neste capítulo, serão analisadas algumas dessas novas tecnologias: a análise computacional de imagens, a ultrassonografia de alta resolução, a ultrassonografia Doppler e a ultrassonografia tridimensional. Em todos

os casos, trata-se de procedimentos ainda em desenvolvimento, mas com grande impacto potencial, e que, no futuro, poderão ser incorporados às rotinas de exames em ginecologia e obstetrícia veterinárias.

Ultrassom biomicroscópio (UBM)

A resolução de uma imagem é definida pela capacidade de tornar dois pontos distintos, ou seja, quanto maior for a resolução de uma imagem, maior será o nível de detalhamento. No caso das imagens ultrassonográficas, a resolução é definida principalmente pelo comprimento de onda utilizado. Estruturas (pontos) separadas por uma distância inferior à do comprimento de onda não podem ser distinguidas na imagem. Conseqüentemente, quanto maior a frequência, maior a resolução obtida.

A maioria dos equipamentos de ultrassonografia disponíveis para uso na avaliação reprodutiva de animais domésticos, incluindo bovinos, possuem probes em que a frequência varia de 3 MHz a 9 MHz. Essa frequência é adequada para uma variedade de usos clínicos e para a avaliação ginecológica de rotina, incluindo o diagnóstico e o monitoramento de gestações, a identificação do sexo fetal, a avaliação de patologias do sistema genital, da função luteal e da dinâmica do crescimento em folículos ovarianos com diâmetro ≥ 2 mm.

Existem situações, contudo, em que essa resolução não é suficiente. É o caso, por exemplo, da avaliação do crescimento folicular em algumas espécies de laboratório. O camundongo é um importante modelo experimental em diversas áreas da biologia, inclusive na reprodução, mas apresenta folículos ovulatórios de difícil visualização, já que seu diâmetro é muito pequeno, entre 400 μm e 600 μm (CAMPOS-JUNIOR et al., 2011). Outro caso que exemplifica essa dificuldade está na avaliação da dinâmica folicular em bovinos no início da fase antral. O antro folicular é formado quando o folículo em crescimento atinge aproximadamente 200 μm , porém os aparelhos convencionais só permitem a visualização do antro

em folículos que estão na fase de emergência das ondas de crescimento (ADAMS et al., 2008; SINGH et al., 2003).

Para contornar essas limitações, uma nova tecnologia de geração de imagens ultrassonográficas, com uma resolução comparável à de uma lupa estereomicroscópica, foi desenvolvida no início da primeira década de 2000 (Visual Sonics Inc., Toronto, Canadá). Conhecida como ultrassom biomicroscópio (UBM), a resolução desses aparelhos é de 30 μm a 50 μm (abaixo do poder de resolução do olho humano, que é de aproximadamente 200 μm), o que permite o estudo de estruturas ovarianas em tempo real com resolução próxima à histológica.

O transdutor do UBM utiliza um único cristal piezoelétrico para a emissão de ondas sonoras de altíssima frequência (de 20 MHz a 70 MHz), o que lhe permite gerar imagens com alto poder de resolução. Entretanto, como existe uma relação inversa entre frequência e poder de penetração da onda ultrassonográfica, essa tecnologia implica a geração de imagens de uma pequena porção dos tecidos (aproximadamente 10 mm com um transdutor de 30 MHz, e 5 mm com 50 MHz), além de um baixo frame-rate (8 frames seg^{-1}) (JAISWAL et al., 2009; SINGH et al., 2003). Isso não tem maiores implicações quando se pretende avaliar estruturas ovarianas em animais de laboratório (camundongos). Em bovinos, contudo, apenas uma porção do ovário pode ser visualizada em cada imagem. Ainda assim, a alta resolução e o grau de detalhamento das imagens abre um grande número de possibilidades de aplicação, particularmente na pesquisa da fisiologia ovariana.

Já foi demonstrada a possibilidade do uso do UBM na avaliação de ovários bovinos in vivo, tendo sido possível até mesmo visualizar estruturas ecogênicas inclusas em folículos antrais, que supostamente seriam complexos *cumulus*-oócito (CCOs) (PFEIFER et al., 2012), conforme demonstrado na Figura 2. Resultados obtidos por meio de ultrassonografia biomicroscópica in vivo em bovinos demonstraram ser possível a identificação de folículos antrais com apenas 0,4 mm de diâmetro. Além disso, o uso do UBM permitiu

a detecção de um número 2,76 vezes maior de folículos do que a ultrassonografia B-mode convencional em ovários de vacas e novilhas (PFEIFER et al., 2012).

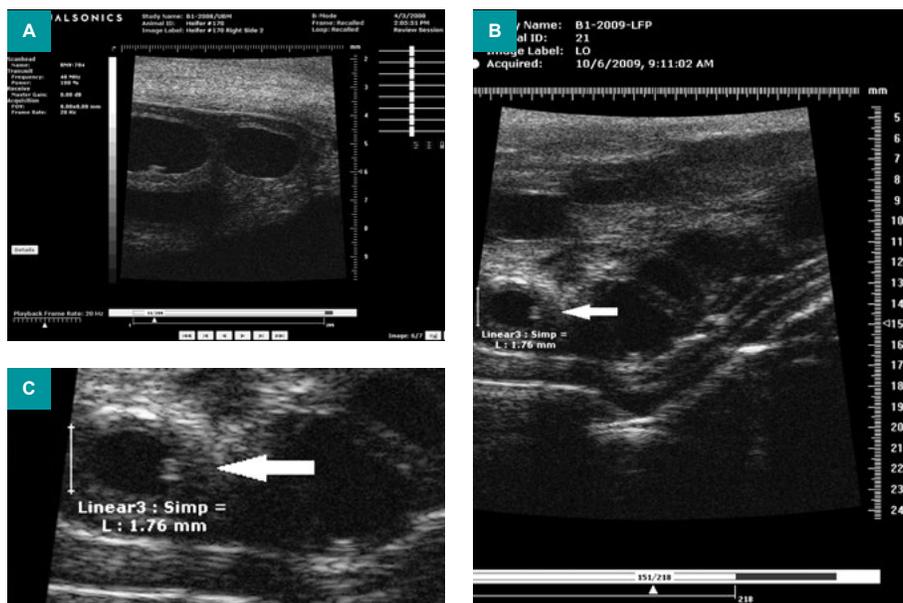


Figura 2. Imagens de ovários bovinos geradas por ultrassom biomicroscópio. Folículos antrais de 2,6 mm (esquerda) e 2,3 mm (direita) de diâmetro: a parede folicular (linha branca) pode ser claramente distinguida do estroma ao redor do folículo (imagem gerada por aparelho Vevo 660, Visual Sonics Inc., utilizando probe transvaginal convexa de 40 MHz) (A). Imagem de ultrassom biomicroscópico de um folículo de 1,76 mm de diâmetro demonstrando uma área ecogênica dentro do antro (seta), que se acredita ser o complexo *cumulus*-oócito (CCO) (B). Imagem do CCO ampliada (C). Imagens geradas com aparelho Vevo 660, Visual Sonics Inc., utilizando probe transvaginal convexa de 25 MHz (B e C).

A habilidade de monitorar sequencialmente o desenvolvimento de pequenos folículos antrais e CCOs contidos nesses folículos pode resultar em importante avanço no entendimento da fisiologia ovariana e da competência oocitária. Em virtude da alta resolução dos equipamentos biomicroscópicos

e da possibilidade do monitoramento in vivo de folículos com diâmetro de 500 μm a 1,0 mm, estudos já estão sendo conduzidos visando à caracterização da dinâmica de desenvolvimento folicular nessa fase, além de análises computacionais da parede e do antro nas imagens obtidas.

Análise computacional de imagens

Depois de feito o exame ultrassonográfico convencional, podem-se avaliar objetivamente as características morfológicas das estruturas visualizadas na imagem bidimensional, utilizando, caso necessário, ferramentas de mensuração dos aparelhos para o cálculo de comprimento, circunferência, área e volume. Subjetivamente, pode-se também classificar as estruturas de acordo com sua ecogenicidade (de anecoico a hiperecoico), considerando como padrão de referência imagens ou partes de imagens consideradas representativas do tecido. Como toda avaliação subjetiva, essa classificação é pouco sensível e passível de erros.

Imagens de ultrassom são compostas de centenas de milhares de *pixels*, e a intensidade de brilho de cada um desses *pixels* pode ser representada numericamente em uma escala de 256 tonalidades de cinza (0 = preto; 255 = branco). A observação visual, contudo, não possibilita uma diferenciação confiável de tecidos de diferentes densidades (ecotextura), pois o olho humano somente é capaz de distinguir entre 18 a 20 tonalidades de cinza (PIERSON; ADAMS, 1995). A alternativa, nesse caso, é quantificar o brilho desses *pixels* por meio de softwares específicos, processo conhecido como análise computacional de imagens. Essa técnica fornece informações precisas e objetivas sobre a ecotextura de um determinado tecido e, conseqüentemente, permite inferências sobre a estrutura histológica e seu possível estado funcional (SINGH et al., 2003). A análise computacional elimina a subjetividade das análises visuais e aumenta a confiabilidade dos diagnósticos baseados no padrão de densidade (ecotextura) das imagens ultrassonográficas.

Para a realização da análise computacional, é necessário, antes de tudo, selecionar a região da imagem que será avaliada. O software captura o campo selecionado, calcula a intensidade de brilho dos *pixels* e converte os dados em uma matriz com os valores numéricos de cada *pixel* (SIQUEIRA et al., 2009). Como variáveis de análise, podem ser utilizados dois parâmetros: 1) o valor médio dos *pixels* (intensidade média de brilho na região analisada); e 2) a heterogeneidade dos *pixels* (desvio-padrão do valor médio, que representa o grau de variação dos *pixels* componentes da imagem) (SINGH et al., 2003). Além dos valores de média e heterogeneidade, a distribuição dos dados pode ser representada na forma de um histograma (Figura 3).

A técnica de análise computacional tem aplicação em vários campos do diagnóstico por imagem, incluindo avaliações reprodutivas, tanto de machos (ecotextura e função testicular) (ARTEAGA et al., 2005; GÁBOR et al., 1998) quanto de fêmeas, principalmente em estudos relativos à função ovariana (SINGH et al., 1997; TOM et al., 1998). Estudos envolvendo

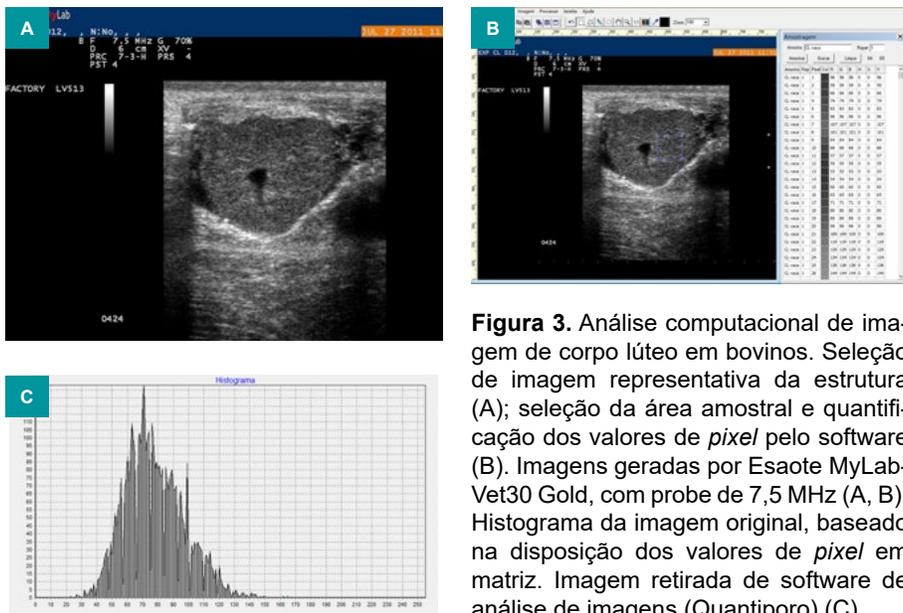


Figura 3. Análise computacional de imagem de corpo lúteo em bovinos. Seleção de imagem representativa da estrutura (A); seleção da área amostral e quantificação dos valores de *pixel* pelo software (B). Imagens geradas por Esaote MyLab-Vet30 Gold, com probe de 7,5 MHz (A, B). Histograma da imagem original, baseado na disposição dos valores de *pixel* em matriz. Imagem retirada de software de análise de imagens (Quantiporo) (C).

análise computacional de imagens demonstraram relação entre o estado fisiológico de estruturas ovarianas e sua ecotextura nas diferentes fases do ciclo estral (HERZOG et al., 2008; SINGH et al., 1998). Na avaliação da função luteal, a análise de ecotextura do corpo lúteo (CL) permite uma estimativa de sua funcionalidade, mesmo sem o conhecimento prévio da fase do ciclo estral (SIQUEIRA et al., 2009; TOM et al., 1998). A análise de imagens permite ainda a diferenciação entre folículos funcionais e atrésicos (TOM et al., 1998; VASSENA et al., 2003), auxiliando nos procedimentos de reprodução assistida, principalmente em humanos (BIAN et al., 2006; BIRTCH et al., 2005).

Apesar de promissora, a análise computacional de imagens ainda apresenta algumas limitações. A principal está relacionada à padronização dos procedimentos para a geração das imagens e a seleção dos campos para análise. Diferenças relacionadas ao arranjo dos cristais e à frequência das probes influenciam a qualidade das imagens geradas e, consequentemente, o resultado da avaliação posterior dos *pixels*. Da mesma forma, variações no posicionamento da probe e dos órgãos internos e a ocorrência de artefatos de imagens, comuns na ultrassonografia, podem interferir diretamente na análise. Dessa forma, a despeito das evidências científicas de que a técnica possa ser utilizada na determinação do estado fisiológico de estruturas ovarianas, ainda não existe consenso sobre a metodologia a ser adotada ou valores de referência para comparação.

Ultrassonografia 3D/4D

A ultrassonografia tridimensional (3D) é um avanço natural na área de diagnóstico por imagem. Na imagem tridimensional, é possível realizar mensurações volumétricas, além de rotacionar a imagem em todas as direções, permitindo, assim, que órgãos e tecidos sejam avaliados por uma perspectiva espacial. Na medicina humana, a tecnologia 3D já vem sendo utilizada para estudar o desenvolvimento e as malformações fetais (WERNER JÚNIOR et al., 2016). Na medicina veterinária, estudos vêm sendo

desenvolvidos para a aplicação dessa tecnologia na avaliação de gestação em animais silvestres (ROELLIG et al., 2011) e de produção (KOTOYORI et al., 2012; LE CLEACH et al., 2012).

Nos equipamentos 3D, o modelo tridimensional é gerado por um software interno, com base em imagens bidimensionais, geradas de forma convencional, pela varredura manual da estrutura em estudo (Figura 4A). Conseqüentemente, diferenças na velocidade da movimentação da probe podem causar distorções no modelo final. Os equipamentos 4D são equipados com probes que fazem a varredura de forma automática, evitando essas distorções. Em ambos os casos, contudo, a contenção do animal e a imobilidade da estrutura avaliada são condições de garantia da qualidade do modelo final. Alternativamente, a modelagem computacional pode ser utilizada na construção de modelos tridimensionais com base em sequências de imagens bidimensionais (geradas em modo B, em equipamentos convencionais). Essa abordagem foi utilizada no estudo da vascularização ovariana (ARASHIRO et al., 2013; VIANA et al., 2013).

Apesar das dificuldades técnicas e do alto custo dos equipamentos, a ultrassonografia 3D/4D apresenta um amplo campo de possibilidades de aplicação no estudo e na avaliação do trato genital e gestação. Modelos tridimensionais possibilitam uma visualização direta de alterações estruturais, como no caso da sexagem fetal ou da caracterização de malformações fetais, algumas das quais não são claramente identificáveis em imagens bidimensionais. Da mesma forma, avaliações volumétricas são de grande importância para a avaliação funcional de determinados órgãos e estruturas, particularmente nos casos em que a massa de tecido tem implicação direta na fisiologia. Modelos tridimensionais também permitem a geração de modelos físicos por manufatura aditiva (também conhecida como impressão 3D), para fins didáticos e de pesquisa (Figura 4B).

A modelagem tridimensional vem sendo utilizada rotineiramente na medicina humana, associada a tecnologias de imagem de alta energia,

que geram imagens de alta definição, como a tomografia computadorizada e a ressonância magnética. Seu uso associado à ultrassonografia foi inicialmente limitado por questões técnicas, particularmente relacionadas à qualidade de imagem. Entretanto, a melhoria da qualidade tecnológica dos equipamentos de ultrassonografia, associada à incorporação de outras tecnologias, como a análise computacional e o Doppler, abrem a perspectiva para um crescente uso da ultrassonografia 3D/4D.

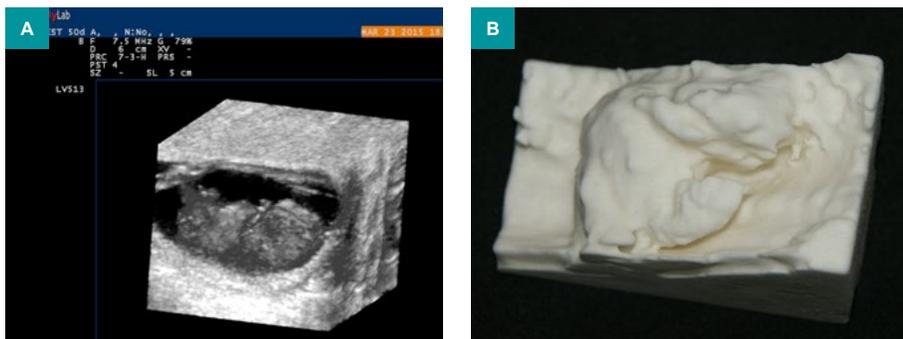


Figura 4. Imagem tridimensional gerada por ultrassonografia 3D de um feto bovino com cerca de 40 dias. É possível observar a região da cabeça e os membros anteriores e posteriores; a parte caudal do modelo tridimensional foi distorcida por causa da movimentação do animal durante o exame (A). Modelo físico gerado por manufatura aditiva (impressão em 3D) com base em imagem ultrassonográfica tridimensional, usando aparelho MyLab Vet 30 Gold, Esaote, com probe de 7,5 MHz (B).

Referências

ADAMS, G. P.; JAISWAL, R.; SINGH, J.; MALHI, P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. **Theriogenology**, v. 69, n. 1, p. 72-80, 2008.

ARASHIRO, E. K. N.; PALHAO, M. P.; SANTOS, J. R. L.; FONTES, R.; SIQUEIRA, L. G. B.; HENRY, M. R. J. M.; VIANA, J. H. M. Three-dimensional modeling of color Doppler images: a new approach to study follicular vascularization in cattle. **Animal Reproduction**, v. 10, n. 4, p. 662-669, 2013.

ARTEAGA, A. A.; BARTH, A. D.; BRITO, L. F. C. Relationship between semen quality and pixel-intensity of testicular ultrasonograms after scrotal insulation in beef bulls. **Theriogenology**, v. 64, n. 2, p. 408-415, 2005.

- BIAN, N.; ERAMIAN, M. G.; PIERSON, R. A. Evaluation of texture features for analysis of ovarian follicular development. **Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention**, v. 9, pt. 2, p. 93-100, 2006.
- BIRTCH, R. L.; BAERWALD, A. R.; OLATUNBOSUN, O. A.; PIERSON, R. A. Ultrasound image attributes of human ovarian dominant follicles during natural and oral contraceptive cycles. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 3, n. 12, p. 3-12, 2005.
- CAMPOS-JUNIOR, P. H. A.; SILVA, C. A.; GRÁZIA, J. G. V.; SOARES, M. B. P.; SANTOS, R. R.; VIANA, J. H. M. Use of ultrasound biomicroscopy to evaluate induced ovarian follicular growth and ovulation in mice. **Laboratory Animals**, v. 45, n. 4, p. 254-258, 2011.
- GÁBOR, G.; SASSER, R. G.; KASTELIC, J. P.; MÉZES, M.; FALKAY, G. Y.; BOZÓ, S.; VRLGVI CSIK, J.; BÁRÁNI, I.; HIDAS, A.; SZÁISZ, F.; BOROS, G. Computer analysis of video and ultrasonographic images for evaluation of bull testes. **Theriogenology**, v. 50, n. 2, p. 223-228, 1998.
- HERZOG, K.; KIOSSIS, E.; BOLLWEIN, H. Examination of cyclic changes in bovine luteal echotexture using computer-assisted statistical pattern recognition techniques. **Animal Reproduction Science**, v. 106, n. 3-4, p. 289-297, 2008.
- JAISWAL, R. S.; SINGH, J.; ADAMS, G. P. High-resolution ultrasound biomicroscopy for monitoring ovarian structures in mice. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 7, p. 69, 2009.
- KOTOYORI, Y.; YOKOO, N.; ITO, K.; MURASE, H.; SATO, F.; KOROSUE, K.; NAMBO, Y. Three-dimensional ultrasound imaging of the equine fetus. **Theriogenology**, v. 77, n. 7, p. 1480-1486, 2012.
- LE CLEACH, N.; RICHARD, C.; KIEFER, H.; LECARPENTIER, E.; HALLÉ, V.; MOREL, O.; LE BOURHIS, D.; JAMMES, H.; CHAVATTE-PALMER, P. Ultrasound evaluation of fetal and placental development in somatic cell nuclear transfer and artificial insemination bovine pregnancies. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n. 1, p. 118, 2012.
- PFEIFER, L. F. M.; SIQUEIRA, L. G. B.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; SINGH, J. In vivo imaging of cumulus-oocyte-complexes and small ovarian follicles in cattle using ultrasonic biomicroscopy. **Animal Reproduction Science**, v. 131, n. 1-2, p. 88-94, 2012.
- PIERSON, R. A.; ADAMS, G. P. Computer-assisted image analysis, diagnostic ultrasonography and ovulation induction: strange bedfellows. **Theriogenology**, v. 43, n. 1, p. 105-112, 1995.
- ROELLIG, K.; DREWS, B.; GOERITZ, F.; HILDEBRANDT, T. B. The long gestation of the small naked mole-rat (*Heterocephalus glaber* Rüppell, 1842) studied with ultrasound biomicroscopy and 3D-ultrasonography. **PLoS One**, v. 6, n. 3, p. 1-10, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017744>.

- SINGH, J.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A. Promise of new imaging technologies for assessing ovarian function. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3-4, p. 371-399, 2003.
- SINGH, J.; PIERSON, R. A.; ADAMS, G. P. Ultrasound image attributes of the bovine corpus luteum: structural and functional correlates. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 109, n. 1, p. 35-44, 1997.
- SINGH, J.; PIERSON, R. A.; ADAMS, G. P. Ultrasound image attributes of bovine ovarian follicles and endocrine and functional correlates. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 112, n. 1, p. 19-29, 1998.
- SIQUEIRA, L. G. B.; TORRES, C. A. A.; AMORIM, L. S.; SOUZA, E. D.; CAMARGO, L. S. A.; FERNANDES, C. A. C.; VIANA, J. H. M. Interrelationships among morphology, echotexture, and function of the bovine corpus luteum during the estrous cycle. **Animal Reproduction Science**, v. 115, n. 1-4, p. 18-28, 2009.
- TOM, J. W.; PIERSON, R. A.; ADAMS, G. P. Quantitative echotexture analysis of bovine corpora lutea. **Theriogenology**, v. 49, n. 7, p. 1345-1352, 1998.
- VASSENA, R.; ADAMS, G. P.; MAPLETOFT, R. J.; PIERSON, R. A.; SINGH, J. Ultrasound image characteristics of ovarian follicles in relation to oocyte competence and follicular status in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 76, n. 1-2, p. 25-41, 2003.
- VIANA, J. H. M.; ARASHIRO, E. K. N.; SIQUEIRA, L. G. B.; GHETTI, A. M.; AREAS, V. S.; GUIMARÃES, C. R. B.; PALHAO, M. P.; CAMARGO, L. S. A.; FERNANDES, C. A. C. Doppler ultrasonography as a tool for ovarian management. **Animal Reproduction**, v. 10, n. 3, p. 215-222, 2013.
- WERNER JÚNIOR, H.; SANTOS, J. L.; BELMONTE, S.; RIBEIRO, G.; DALTRO, P.; GASPARETTO, E. L.; MARCHIORI, E. Aplicabilidade da tecnologia tridimensional na medicina fetal. **Radiologia Brasileira**, v. 49, n. 5, p. 281-287, 2016.