

Implementación de sistema ultrasónico de caracterización Paramétrica de tejido biológico blando

Phd. Luis Fernando Londoño.
Politécnico Gran Colombiano Jaime Isaza Cadavid
Colombia
lflondono@elpoli.edu.co

Phd. Julián Antonio Villamarín
Universidad Antonio Nariño - Colombia
jvilla22@uan.edu.co

Nylho Antonio Dorado
Universidad Antonio Nariño - Colombia
ndorado@uan.edu.co

Daniela Andrea Montilla
Universidad Antonio Nariño - Colombia
dmontilla@uan.edu.co

Fecha Recepción: 18/10/15 - Fecha Aprobación: 12/11/16

Resumen: Los métodos de caracterización ultrasónica son cada vez más utilizados en diferentes ámbitos de la investigación (aplicaciones biomédicas e industriales), debido a su significativa relación costo-beneficio, además de sus ventajas en la caracterización acústica no invasiva - no destructiva de fluidos, materiales y tejidos biológicos. La caracterización ultrasónica está basada en la estimación de parámetros acústicos a partir de técnicas de procesamiento de señales ultrasónicas de retrodispersión, las cuales permiten la medición de índices acústicos convencionales (tales como la velocidad del sonido S_oS y la atenuación acústica dependiente de la frecuencia (β)), con el propósito de construir imágenes paramétricas como herramientas potenciales en el análisis de la microestructura de tejidos en aplicaciones biomédicas. Este estudio evidencia las ventajas de la implementación de un sistema ultrasónico de caracterización cuantitativa, como método de soporte a las técnicas de procesado de tejido biológico.

Palabras clave: Acústica, atenuación, tejido biológico, velocidad del sonido, ultrasonido.

Abstract: The ultrasonic characterization methods are often used in different research fields (Biomedical and Industrial Applications) due to its significant low cost - high performance ratio, besides its advantages in the non-invasive and non-destructive acoustic assessment of fluids, materials and biological tissues. The ultrasonic characterization is based on the estimation of acoustic parameters from ultrasound backscattering signals processing techniques, which allow conventional ultrasonic index measurements (as speed of sound (S_oS) and the frequency dependent acoustic attenuation (β)) aiming to the construction of parametric images as a potential tools in the analysis of the microstructure of biological tissues in biomedical applications. This study evidence the advantages of the implementation of an ultrasonic system for the quantitative characterization as a method to support processing techniques of biological tissues.

Keywords: Acoustic, atenuation, biological tissues, speed of soun, ultrasound.

1. Introducción

Las técnicas y métodos actuales para la evaluación de tejidos están fundamentadas en métodos rudimentarios, convencionalmente los métodos más utilizados para establecer la normalidad de tejido biológico animal, e inferir posibles estados patológicos, son basados en procesos de inspección visual (verificación de tamaño, color, características de la microestructura entre otras) [1] [2], realizados subjetivamente por un experto (médico veterinario). Otros procedimientos manuales

y dispendiosos son las técnicas histológicas empleadas en el procesado de tejido biológico, en las cuales se tiene por desventaja el uso de reactivos químicos (*hematoxilina-eosina*) y procedimientos invasivos tales como la deshidratación del tejido, tinción, agregación de parafina y elaboración de cortes por micrótopo [3]-[6]. De este modo, las técnicas de procesado de tejido biológico son usualmente las más empleadas en análisis de inmunohistología, a pesar del uso de agentes químicos (los cuales repercuten en impactos negativos al medio ambiente) y de ser susceptibles al

error sistemático, por la variabilidad intra-observador e inter-observador, que en algunos casos ocasiona errores diagnósticos.

Diversos estudios han demostrado el uso de ultrasonido como herramienta potencial en la caracterización no invasiva y no destructiva de tejidos biológicos [7] [8], además en tejidos blandos esta técnica no causa ionización (alteraciones químicas y físicas a nivel estructural) [9], siendo esta la herramienta con la cual se pueden extraer parámetros físicos que se correlacionan con parámetros micro estructurales y anomalía en los tejidos mediante las técnicas de retro dispersión ultrasónica [10].

En el ámbito regional de ciencia y tecnología, del departamento del Cauca, no existen evidencias en relación al desarrollo de herramientas tecnológicas que faciliten, mediante métodos alternativos, el procesado de tejidos biológicos. Considerando la carencia de indicadores de desarrollo tecnológico en la línea estratégica de investigación y desarrollo en el marco del Plan Conciencia Cauca. El presente trabajo describe la implementación de una herramienta que soporta el estudio de normalidad en tejido blando, utilizando métodos de caracterización por ultrasonidos y la implementación de procedimientos computacionales para el procesamiento de señales ultrasónicas de retrodispersión, y la consecuente construcción de imágenes acústicas paramétricas de atenuación y velocidad del sonido de muestras biológicas de estudio.

En líneas generales, el presente estudio explora mediante el conocimiento científico la implementación y extrapolación de métodos y tecnologías de bajo costo y alto beneficio, que pretenden direccionar los procesos de innovación regional en aplicaciones de bioingeniería.

2. Marco conceptual

La utilización de ultrasonidos como herramientas en la caracterización no invasiva – no destructiva (baja potencia) ha impulsado diferentes áreas de la investigación por su eficacia en el análisis de tejidos, estructuras heterogéneas, líquidos y materiales. Considerando su principio básico de funcionamiento, éstas ondas mecánicas de alta frecuencia (ultrasonidos) pueden propagarse mediante compresiones y

rarefacciones, transfiriendo energía a sus partículas vecinas, reconociendo dos modos principales de propagación longitudinal y transversal, los cuales se caracterizan según la vibración de las partículas del medio de propagación, si es de forma paralela o perpendicular a la dirección de propagación de la fuente de emisión [11]. Las propiedades principales de estas ondas en materiales isotrópicos son la velocidad, frecuencia y la longitud de onda. Esta relación se evidencia en la siguiente expresión Ec. 1.

$$\lambda = \frac{V}{f} \quad (1)$$

Donde λ es la longitud de onda, V es la velocidad de propagación y f es la frecuencia de la onda.

Durante los procesos de interacción onda – material, en regímenes de propagación estrictamente geométricos ($\lambda \ll$ tamaño microestructura de inspección), las discontinuidades pequeñas generan modulaciones en amplitud y frecuencia, las cuales consecuentemente se ven reflejadas en las señales capturadas por la fuente de recepción. En este sentido, variaciones sobre el haz de propagación pueden ser utilizados para estimar índices de caracterización acústica oriundos en tejidos biológicos.

A continuación se mencionan algunos parámetros útiles en la caracterización ultrasónica cuantitativa.

2.1. Atenuación ultrasónica

La atenuación es la combinación de dos efectos físicos, la dispersión o reflejo del sonido en direcciones distintas a la de propagación y absorción o conversión de la energía del sonido a otras energías. De otro modo, la atenuación ultrasónica también puede ser definida como uno de los parámetros físicos asociados con la pérdida de energía durante el tiempo de vuelo de la onda en el medio de propagación. Así, el registro de señales ultrasónicas de retrodispersión $S(f,z)$ en el dominio de la frecuencia, después de la interacción onda – material, puede ser descrito mediante la siguiente expresión [12]- [14].

$$S(f,z) = P(f)D(f,z)A(f,z)B(f,z) \quad (2)$$

Donde $D(f,z)$ es la función de difracción, $A(f,z)$ es la función de atenuación, $P(f)$ es el pulso de excitación

y $B(f)$ está asociado a los efectos de dispersión para medios de propagación con características heterogéneas.

La función de atenuación utilizada para estimar las pérdidas de energía acústica en medios biológicos es descrita según la Ec 3:

$$A(f,z) = P(f)e^{-\alpha x} \quad (3)$$

En donde x es la distancia dentro del tejido, y α es el coeficiente de atenuación, el cual puede ser descrito como βf^n , donde n representa la dependencia del coeficiente de atenuación en relación a la frecuencia, usualmente considerado uno para tejidos blandos y β es el coeficiente de atenuación dependiente de la frecuencia (dB/cm MHz).

Despejando la Ec. 3 con el propósito de obtener β , se obtiene el modelo matemático de la Ec. 4.

$$\log \left[\frac{A(f, z)}{P(f)} \right] = \log [e^{-\beta f^n x}]$$

$$\log \left[\frac{A(f, z)}{P(f)} \right] = -\beta f^n x \quad (4)$$

$$\log \left[\frac{A(f, z)}{P(f)} \right] / f^n x = -\beta$$

El coeficiente de atenuación β se puede extraer mediante el método de sustracción espectral [16], este método describe la sustracción entre el espectro de potencia del tejido y un espectro de potencia obtenido desde una reflexión especular.

2.2. Velocidad del sonido

La velocidad del sonido en medios de dispersión acústica (SoS) depende de la relación entre impedancia acústica y densidad del medio de estudio, su cálculo es importante en la caracterización de tejidos puesto que brinda información sobre características de elasticidad del medio, compresibilidad, concentración de partículas, entre otras, posibilitando la comprensión de que las ondas acústicas se propagan en medios elásticos con mayor rapidez. Su estimación generalmente es realizada a partir de la medición del tiempo de vuelo de la señal (Time of Flight-ToF). La Ecuación 5 representa la expresión para estimar la velocidad del sonido en

configuración pulso-eco, midiendo el tiempo elapsado en el cual la onda atraviesa el medio de propagación:

$$SoS = \frac{2d}{Tof} \quad (5)$$

En una onda acústica la distancia de propagación en un medio está relacionada directamente con la energía que absorbe y la rapidez en el medio.

3. Materiales y métodos

La Figura 1 presenta el sistema de caracterización ultrasónica implementado para la caracterización de muestras de tejido biológico blando animal.

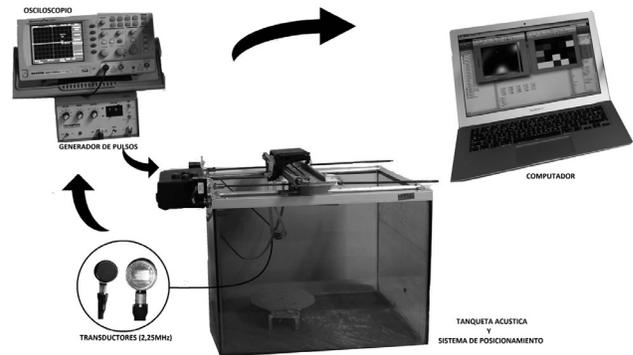


Figura 1. Sistema de emisión de señales, posicionamiento cartesiano, tanque acústico.

El sistema implementado está compuesto por: a) el sistema de posicionamiento del transductor acústico (robot cartesiano) y b) sistema de emisión, adquisición y procesamiento de señales.

3.1. Sistema de posicionamiento

Este sistema está compuesto por dos motores paso a paso de referencia c30026011, los cuales posicionan el transductor en los planos (x,y), acompañados por un sistema de rieles y dos pulsadores que facilitan su movimiento para el cambio de dirección. El sistema de control fue implementado con un microcontrolador Arduino UNO, ubicado en la parte superior de una tanqueta acústica utilizada como contenedor de agua, para facilitar la transferencia de energía al medio de inspección y por el método de inmersión (Figura 2).

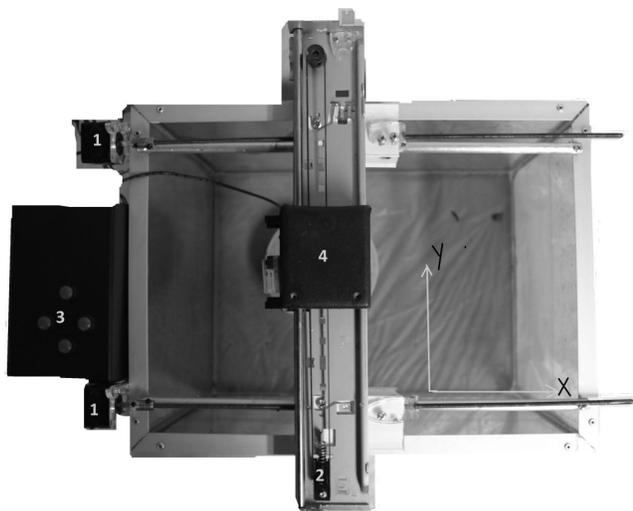


Figura 2. Sistema de posicionamiento milimétrico de vista superior. 1) Motores paso a paso. 2) Riveles. 3) Pulsadores de posicionamiento 4) Ubicación del transductor.

3.2. Emisión, adquisición y procesamiento de señales.

La emisión de las ondas ultrasónicas es dada por medio de un generador de pulsos OLYMPUS 5072 PR, en configuración emisión/recepción, con una frecuencia de repetición de pulsos de 100KHz y con una energía máxima del 50%. Las ondas son emitidas por un transductor ultrasónico de 2,25 MHz con ancho de banda de 1Mhz @ a -3dB. La captura de las señales ultrasónicas de retrodispersión fue llevada a cabo mediante un osciloscopio GW INSTEK G. Por último, los procedimientos computacionales para las lecturas y procesado de señales ultrasónicas fue realizado en MATLAB versión R2014A, con modelos matemáticos descritos anteriormente.

3.3. Muestras de Estudio

Las muestras de estudio utilizadas fueron de tejido musculo esquelético de bovino, obtenido de forma comercial. La Región anatómica corresponde a la parte dorsal de bovino llamada *longuísimos dorsii*, los volúmenes de todas las muestras inspeccionadas fueron de aproximadamente 50 ml y promedio peso de 1.85gr. La densidad promedio de tejidos estudiados se mantuvo en 0.037 g/ml (Figura 3).

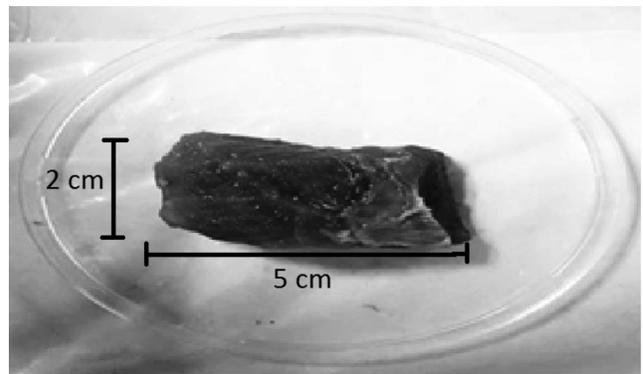


Figura 3. Muestra de tejido muscular inspeccionado

4. Procedimiento experimental

Los procedimientos experimentales de caracterización fueron inicialmente llevados a cabo a partir de la configuración del equipo generador de pulsos de ultrasonido y la consecuente configuración del sistema de adquisición con una tasa de muestreo de 25 M/S. El posicionamiento del transductor dentro de la tanqueta acústica, teniendo en cuenta el campo distante, fue de aproximadamente 13cm. Esta distancia es también conocida como distancia de focalización. El medio de acoplamiento para garantizar la distancia de focalización fue agua potable, considerando que sus parámetros acústicos son conocidos de forma a priori y no producen cambios significativos de atenuación. Adicionalmente, la captura de señales de referencia en un reflector especular es realizada con el propósito de obtener ecos de referencia que permitan una relación con la inspección del tejido o material biológico de estudio (ver Figura 4).

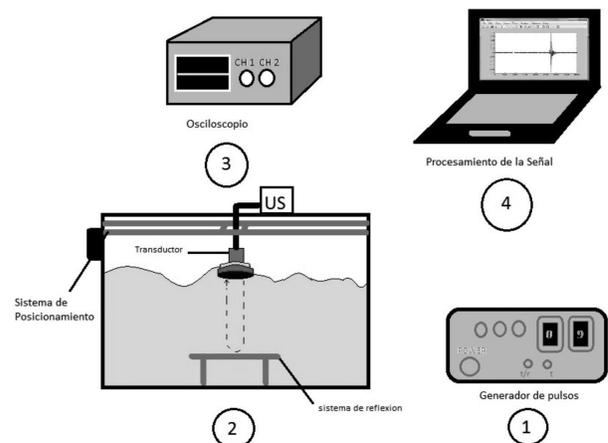


Figura 4. Posicionamiento del transductor, con medio de refracción.

Implementación de sistema ultrasónico de caracterización paramétrica de tejido biológico blando

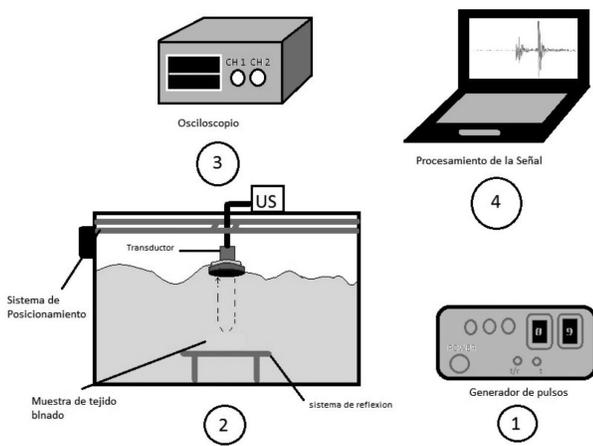
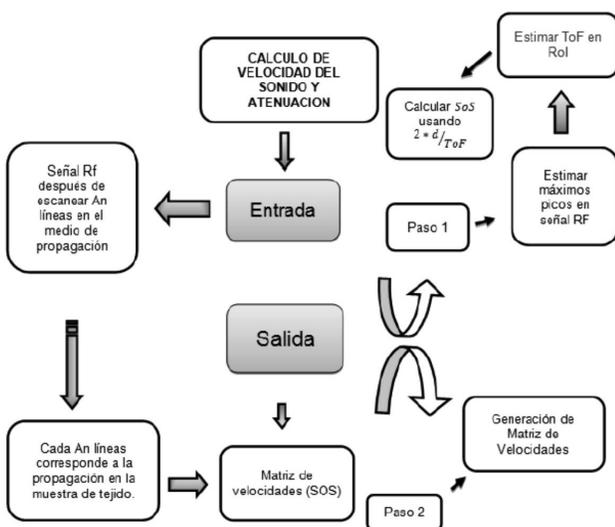


Figura 5. Posicionamiento del transductor con muestra de tejido blando.

Posterior al almacenamiento de señales de referencia, es llevada a cabo la adquisición de las señales del tejido de estudio, utilizando un método de inmersión. Así, es realizado un barrido controlado sobre un área de 10 cm^2 , ubicando la muestra en una capsula herméticamente sellada, procurando ningún contacto con el medio de transferencia de energía (agua). Posterior a ello, las señales ultrasónicas fueron almacenadas en formato .CVS para su posterior procesamiento en MATLAB, con base en algoritmos computacionales de estimación del tiempo de vuelo (ToF) de la onda en el tejido y las pérdidas de energía acústica mediante técnicas de análisis espectral. A seguir se describe el algoritmo implementado para la estimación de SoS y atenuación en cada uno de los puntos tomados en la muestra.



Algoritmo 1. Algoritmo híbrido para cálculo de velocidad del sonido SoS y atenuación β .

La señal acústica de retrodispersión que fue colectada en el tejido blando es ilustrada en la Figura 6 con su respectiva rol. De acuerdo con el área establecida fueron colectadas 454 señales RF en diferentes áreas del tejido. Estos permitieron los cálculos del coeficiente de atenuación (β) y la velocidad del sonido (SoS).

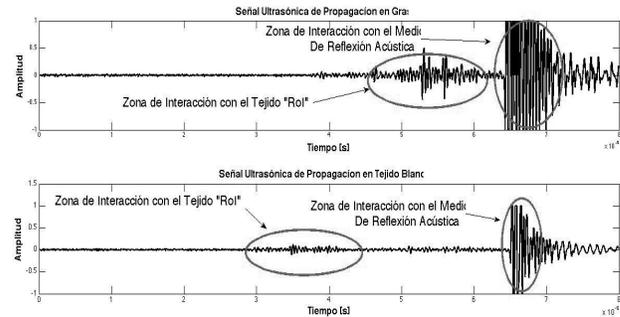


Figura 6. Señal ultrasónica de propagación en tejido blando.

5. Resultados

Los resultados obtenidos, tras inspeccionar la muestra de la Figura 3, son parámetros que apoyan los procesos de evaluación de tejidos blandos en el marco del plan de desarrollo departamental. Por medio de la obtención de estos parámetros fue posible evidenciar la presencia de zonas de mayor densidad en el tejido musculo esquelético inspeccionado (Tabla 1).

Tabla. 1. Variables estadísticas de SoS y β .

	SoS	β
\bar{x}	1378 m/s	0.525
Varianza	1517 m/s	2.5×10^{-4}
Desviacion Standart	26.13 m/s	0.0247

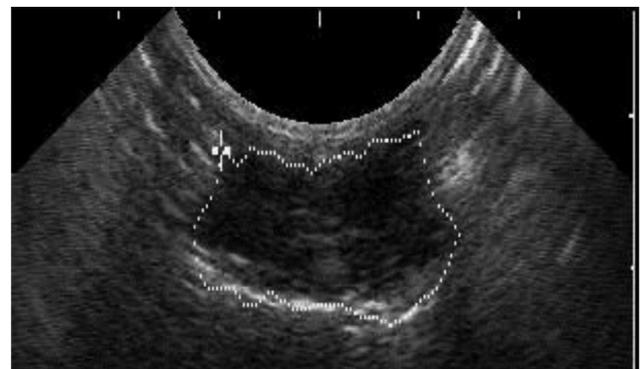


Figura 7. Imagen Ultrasonográfica de la muestra de estudio.

La Figura 7 presenta la imagen ultrasonográfica que corresponde al tejido, obtenida con el ecógrafo *Aquil Pro De Esaote Pie Medical* con un transductor micro *Convex* de rango 5MHz. En la Figura 6 se puede apreciar visualmente la demarcación del tejido y las zonas más claras que indican presencia de tejido conectivo o grasa intramuscular. En este contexto, por medio de las diferentes pruebas realizadas se pudieron determinar valores de velocidad promedios para tejido blando en este caso carne de Bovino con un rango de oscilación entre 1258 m/s a 1522 m/s (Std. ± 44.5 m/s) para músculo como se enseña en la tabla, resultados obtenidos mediante el histograma de la Figura 7. Los coeficientes β normalizados para tejido muscular fueron estimados entre 0,0026 dB/cm MHz a 0,8418 dB/cm MHz.

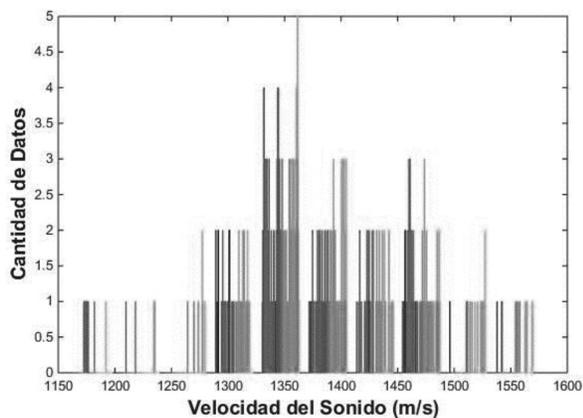


Figura. 8. Histograma de velocidades

Algunas de las velocidades que se obtuvieron del tejido blando y tuvieron mayor repetibilidad se observan en la Figura 8. Con respecto a estos datos la velocidad de sonido promedio en el tejido blando fue de 1429 m/s, teniendo como referencia que el valor de la velocidad del sonido en músculo es de 1585 m/s, se pueden determinar los porcentajes de error absoluto y relativo utilizando las siguientes ecuaciones:

$$Error\ absoluto = \frac{|1429 - 1585|}{1585} \times 100$$

$$Error\ absoluto = 9,84\%$$

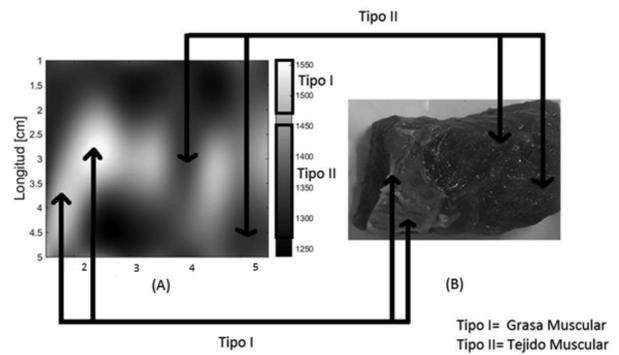


Figura 9. Imagen paramétrica de la velocidad del sonido

Por medio de la inspección ultrasónica del tejido que se observa en la sección B de la Figura 9, fue posible la construcción de una imagen ultrasónica paramétrica, la cual se aprecia en la sección A que contiene una distribución de velocidades de sonido promedio, estimadas a partir de un barrido de 454 señales de retrodispersión acústica y la interpolación bidimensional con un método lineal. En este sentido, se evidencia que existen partes del tejido que tienen una velocidad (A) mayor, lo anterior se debe a la presencia de tejido graso o conectivo.

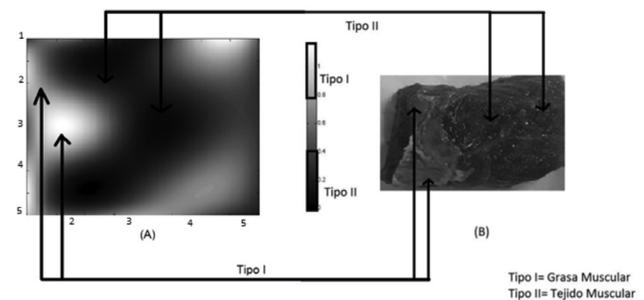


Figura 10. Imagen Ultrasónica paramétrica de Atenuación.

La construcción de una imagen paramétrica, con mapa de la atenuación acústica del tejido, fue posible realizando el cálculo de los coeficientes angulares obtenidos mediante el método de sustracción espectral logarítmica entre señales de retrodispersión y señales de referencia. De esta manera, se presenta en la Figura 10, sección A, la imagen paramétrica obtenida y sus respectivas simetrías en el tejido inspeccionado (Sección B). Los resultados obtenidos demuestran que el parámetro de atenuación permite brindar información sobre la heterogeneidad de los tejidos blandos.

Por medio de técnicas de caracterización acústica, como el análisis de histogramas de distribución de datos, se realizó el análisis del estado de tejidos blandos. La Figura 11 presenta el histograma obtenido para la imagen paramétrica de la Figura 7, en comparación al histograma obtenido de la imagen ultrasonográfica obtenida del mismo tejido.

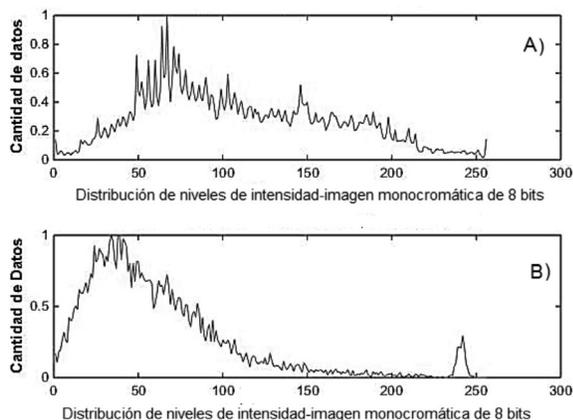


Figura 11. Histogramas obtenidos para: a) Imagen ultrasónica paramétrica de velocidad del sonido. b) Imagen ultrasonográfica.

En la Figura 11 se puede apreciar una distribución más uniforme en los datos del histograma asociado a la generación de la imagen ultrasónica paramétrica construida. La imagen construida presenta un mejor rango dinámico y la distribución de niveles de intensidad favorece un mejor contraste para la interpretación y visualización de datos, durante la caracterización de la distribución de heterogeneidad del tejido muscular esquelético. De esta forma, se puede inferir en mayor grado de percepción visual de las cualidades del tejido, si se compara con el histograma relacionado con la imagen ultrasonográfica (dada por el equipo en modo b), la cual presenta problemas de contraste y su rango dinámico es pobre, afectando las interpretaciones por parte de especialistas en lecturas sonográficas.

Portanto, el análisis de histogramas permite determinar una aproximación de índices de grasa intramuscular, a partir de las imágenes ultrasónicas paramétricas, considerando que representa cuantitativamente sectores donde el tejido contiene mayor densidad. En este sentido, el método implementado puede ser una alternativa a los métodos convencionales de inspección visual de análisis diagnóstico de tejidos, los cuales dependen de la subjetividad del especialista encargado de obtener imágenes ultrasonográficas.

6. Conclusiones

La implementación de sistemas ultrasónicos de caracterización paramétrica posibilitan un mejor aprovechamiento de la información extraída directamente desde la señal original de ultrasonido, reflejada por el medio de análisis, en comparación con los sistemas de caracterización cualitativa por ultrasonido, los cuales presentan reducción de efectos de retrodispersión asociados a la baja vascularización de tejidos e implícitamente se traducen como pérdida de información debido a las transformaciones que sufren las señales originales, al ser convertidas en señales de baja frecuencia (imágenes).

Así, los sistemas de caracterización ultrasónica, como herramientas potenciales de extracción de propiedades acústicas de medios biológicos (densidad, impedancia acústica, velocidad de propagación entre otras), consecuentemente favorecen al análisis eficiente no invasivo – no destructivo, con minimización de riesgos de contaminación y contribuyen a la tecnificación de este proceso biotecnológico. En líneas generales, la implementación del sistema de caracterización ultrasónica paramétrica, suministra nuevas herramientas y soluciones ingenieriles, aplicables al mejoramiento y optimización del análisis histológico de muestras biológicas realizado en nuestro país, de modo que tales soluciones pueden ser extrapolables a aplicaciones biomédicas e industriales y, a su vez, permiten incentivar el desarrollo de futuras tecnologías ultrasónicas en Colombia.

Agradecimientos

Los autores del grupo Bioingeniería, de la Facultad de Ingeniería Electrónica y Biomédica, agradecen a la Vicerrectoría de Investigaciones de la UAN por el apoyo frente al financiamiento del proyecto cod. 20141099.

Bibliografía

- [1] J. Fishback, T. Hall, M. Jinsana y S. Rosenthal. "Imaging structural properties of soft tissues using ultrasound". In Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, v. 12, No. 1, p. 327 – 328, 1996.
- [2] J. Gutiérrez. "Manual de prácticas de la asignatura medicina interna de caninos y felinos". Universidad Antonio Nariño, Medicina Veterinaria, Popayán, 2013.

- [3] E. König y H. Liebich. "Anatomía de los animales domésticos: texto y atlas en color". Buenos Aires, Madrid: Medica Panamericana, 2008.
- [4] R. Jirik, T. Tax y J. Jan. "Characterization of the ultrasonic attenuation coefficient and its Panneta" P.D.; Pappas, R.A.; Tucker, B. Process monitoring and particle characterization with ultrasonic backscattering. Patente No. US 7,114,375 B2, p. 1 – 17, 2006.
- [5] J. Kiernan. "Histological and histochemical methods: theory and practice". Arnold Publisher. (3ª edición). London, 2002.
- [6] S. Landreth y H. Vohr. "Development of the Rodent Immune System". Encyclopedic Reference Of Immunotoxicology, 2005.
- [7] S. Wilson, D. Robinson, y B. Doust. "Frequency domain processing for ultrasonic attenuation measurement in liver". *Ultrasonic Imaging*, pages 278 – 292, 1984.
- [8] J. Radovan y T. Jan. "Ultrasound attenuation imaging". *Journal of Electrical Engineering*. 180 – 187, 2004.
- [9] B. Gambin y E. Kruglenko. "Temperature Measurement by Statistical Parameters of Ultrasound Signal Backscattered from Tissue Samples". *Acta Physica Polonica*, A. 128, 1A, A-72-A-78. ISSN: 05874246. 2015.
- [10] P. Pallav, T. Gan y D. Hutchins. "Elliptical-tukey chirp signal for high-resolution, air-coupled ultrasonic imaging". *IEEE Transaction on Ultrasonics, Ferroelectrics, and frequency Control* 54 530–1540. 2007.
- [11] W. Smith, P. Einar, K. Rajendran, y K. Therimadasamy. "High-resolution Ultrasonography for Peripheral Nerve Diagnostics : A Guide for Clinicians Involved in Diagnosis and Management of Peripheral Nerve Disorders". Singapore: World Scientific Publishing Company, eBook Collection. 2010.
- [12] N. Taniguchi, K. Itoh, K. Shigeta, Y. Wang, J. Tsao, K. Kumasaki, T. Itoh y Y. Fujii. "A new method for attenuation coefficient measurement in the liver". *J Ultrasound Med*, pages 783 – 788, 2002.
- [13] H. Kim y T. Varghese. "Hybrid spectral domain method for attenuation slope estimation". *Ultrasound in Medicine and Biology*, (11):1808 – 1819, 2008.
- [14] M. Kuc y R. Schwartz. "Estimating the acoustic attenuation coefficient slope for liver from reflected ultrasound signals". *IEEE Transactions on Sonic and Ultrasonics*, (5): 353 – 362, 1979.
- [15] L. Wilson, D. Robinson, y B. Doust. "Frequency domain processing for ultrasonic attenuation measurement in liver". *Ultrasonic Imaging*, pages 278 – 292, 1984.
- [16] L. Fang, Z. Zhu, B. Huang, H. Ding, F. Mao y Y. Chen. "A comparative study of contrast enhanced ultrasound and contrast enhanced magnetic resonance imaging for the detection and characterization of hepatic hemangiomas". *Bioscience Trends [serial on the Internet]*. [cited October 2, 2015]; 9(2): 104-110.