

Desenvolvimento de um protocolo de investigação de doenças neurológicas utilizando imagens de ultrassonografia e fotoacústica

D. R. T. Sampaio, A. A. O. Carneiro e T. Z. Pavan

Departamento de Física, FFCLRP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil

Resumo. Estudos neurológicos, por exemplo, a investigação da hidrocefalia, dependem de uma ferramenta de diagnóstico, para determinação das dimensões das cavidades encefálicas. Para esta finalidade, estudos vêm utilizando a imagem por ressonância magnética nuclear (RMN), porém no âmbito da pesquisa, o acesso ao equipamento de RMN instalados em hospitais é restrito e, além disso, esta técnica envolve alto custo financeiro. Outra forma clássica de investigar a hidrocefalia é utilizar a ultrassonografia convencional – pulso-eco (PE), que produz imagens anatômicas de contraste baseado na diferença de impedância acústica, proporcionando as medidas das estruturas neurológicas internas. Uma técnica que vêm ganhando espaço no âmbito biomédico é a imagem fotoacústica (FA), que consiste em formar uma imagem anatômica, utilizando contrastes ótico (coeficiente de absorção ótico) e acústico (espalhamento de onda acústica), associados para diferenciar tecidos biológicos em grandes profundidades. No intuito de continuar o desenvolvimento de técnicas ultrassônicas, apresentamos um protocolo utilizando ultrassom para investigação de doenças neurológicas, montamos um aparato experimental para ambos os casos, PE e FA para aquisição de dados em formato RAW. Em seguida, utilizamos encéfalos *post-mortem* de ratos e aplicamos métodos de processamento e renderização 3D para determinação do volume de líquido intraventricular.

Palavras-chave: ultrassom, fotoacústica, 3D, hidrocefalia.

Development of a research protocol for neurological disease using ultrasound and photoacoustic imaging

Abstract. Neurological studies, for example, an investigation of hydrocephalus depends on the diagnostic tool used to determine the dimensions of the brain cavities. For this purpose, many studies have been used magnetic resonance imaging (MRI); however, this technique is expensive, which sometimes restricts research. Another way to investigate hydrocephalus is using conventional ultrasound that produces images based on the anatomical acoustic impedance difference, providing measurements of the neurological structures size. In addition, a technique that has gained relevance in biomedical scope is called photoacoustic imaging (PA), which consists in an anatomical image based on the optical contrast, allowing differentiate tissue by optical absorption and ultrasonic waves scattering. In order to continue the development of ultrasonic techniques, we present here a protocol using conventional ultrasound and PA imaging techniques focused to provide information for neurological research. We proposed a configuration for both, conventional and FA, which acquires data in RAW format. Then we use brains *post-mortem* of mice as a target. The collected data was processed into B-mode images and rendered in a 3D volume. This process permitted to measure the volume of intraventricular liquid.

Keywords: ultrasound, photoacoustic, 3D, hydrocephalus.

1. Introdução

A hidrocefalia é uma doença congênita que afeta menos de 1% dos recém-nascidos (1). Os indivíduos diagnosticados com hidrocefalia possuem grande quantidade de líquido na cavidade encefálica (2). Em pesquisas relacionadas a doenças neurológicas, primeiramente, os estudos são realizados em modelo animal, por exemplo, no caso da hidrocefalia, utilizando roedores divididos em grupo controle e induzido (3). Por possuir um alto

contraste para líquidos aquosos e alta resolução espacial, a imagem por ressonância magnética nuclear (RMN) vem sendo utilizada em muitos estudos que utilizam encéfalos de roedores (4), porém devido ao seu custo elevado e, em alguns casos, acesso (em hospitais) restrito para este fim, outras técnicas vêm sendo aplicadas para determinação do volume de líquido encefálico. Por exemplo, o ultrassom pulso-eco (PE), que é um método eficaz, não invasivo e de baixo custo que vêm sendo utilizado no diagnóstico de doenças cerebrais (5). Este método emite uma

ondamecânica com intensidade I_0 e frequência ultrassônica (na faixa de 1MHz até 15MHz) e captura a intensidade dos ecos refletidos I_r para formação da imagem, que é baseada na diferença de impedância acústica Z_i entre interfaces com diferentes impedâncias (i.e. Corrigidos efeitos de atenuação da onda mecânica, o contraste da interface água ($Z_1 = 1,48$) e osso ($Z_2 = 7,80$) é aproximadamente 46%):

$$I_r = I_0 \left(\frac{Z_2 - Z_1}{Z_2 + Z_1} \right)^2 \quad (1)$$

A atenuação do ultrassom pulso-eco dependa da frequência de emissão do transdutor, que também determina a resolução axial da imagem (i.e. $AR \cong \frac{1}{2}$) (6). A imagem fotoacústica (FA) (7,8) é uma modalidade de diagnóstico por imagem promissora no âmbito biomédico, que atualmente vem sendo utilizada em pesquisas pré-clínicas (e.g. biomarcadores) (9–11) e clínicas (e.g. imagens funcionais do cérebro) (12,13). Neste caso, não há emissão de ondas mecânicas para o interior do alvo, pois a absorção de uma dada radiação incidente E de fótons de luz ou raios-x (14) pelo alvo provoca uma expansão termoelástica, que gera o sinal fotoacústico I_{PA} capturado pelo transdutor conforme a relação:

$$I_{PA} \propto \mu_a E \quad (2)$$

Sua aplicação permite gerar imagens tomográficas de órgãos com alto contraste baseado na absorção óptica dos tecidos μ_a (contraste ótico) com resolução axial comparável as imagens convencionais de ultrassom. Em ambos os casos, PE e FA, podemos mensurar as dimensões do cérebro a partir de análise da imagem formada, que pode ser posteriormente segmentada para estimativa do volume encefálico.

Embora bastante conhecidas, as modalidades ultrassônicas ainda são pouco utilizadas para a investigação de doenças neurológicas, pois muitos equipamentos são restritos e possuem *presets* (conjunto de parâmetros pré-configurados para formação de imagens) específicos e pouco flexíveis a ajustes finos necessários para melhorar a qualidade da imagem fornecida. Alguns equipamentos de ultrassom comerciais permitem controle da formação de feixe acústico e acesso a dados adquiridos em formato não processado (15). Estes dados não processados, conhecidos como imagem de radiofrequência (RF) ou imagem RAW, são os sinais ultrassônicos fundamentais capturados pelos transdutores ultrassônicos, que são utilizados para formação das imagens em Modo-B. As imagens em RF, adquiridas com PE ou FA podem ser processadas em uma imagem Modo-B, utilizando em sequência: Transformada de Hilbert, Módulo e Logaritmo (16) e, em seguida, podem ser renderizadas em volumes 3D (17), permitindo um melhor acesso à informação volumétrica essencial em estudos neurológicos.

Neste trabalho, desenvolvemos um *setup* experimental para as técnicas de ultrassom: Pulso-eco (PE) e fotoacústica (FA) para definição de um protocolo de investigação de hidrocefalia. Com este *setup* foram rastreados cérebros post-mortem de ratos ao longo de uma terceira dimensão em passos de 1,0 mm para formação de um volume tridimensional. Em seguida, formatamos os dados adquiridos em um arquivo que propicia a renderização das imagens adquiridas, o *Nearly Raw Raster Data* (NRRD), que é compatível com o software de segmentação de volume Slicer 3D. Por fim, comparamos imagens em Modo-B formadas a partir de PE e FA qualitativamente e mensuramos a quantidade de líquido intraventricular a partir do volume renderizado.

2. Material e métodos

O aparato experimental do *setup* (Figura 1) desenvolvido consistiu de um transdutor ultrassônico de 128 elementos piezoelétricos, modelo L14-5/38, Ultrasonix com frequência central de 7,5 MHz, equipamento de ultrassom modelo Sonix OP, Ultrasonix, rodando um software dedicado em desenvolvimento que foi escrito em linguagem (C++ e Qt4 4.8.4) para aquisição de dados em formato RF, laser pulsado Nd:YAG, Brio com comprimento de onda 532 nm, energia nominal de 70 mJ, duração de pulso de 5 ns e frequência de repetição de pulso de 20 Hz e lente de vidro (índice de refração ~1,5) convergente (foco = 60 mm) utilizada para distribuir a fluência de fótons do laser em uma área maior, com fluência dentro dos limites seguros de radiação.

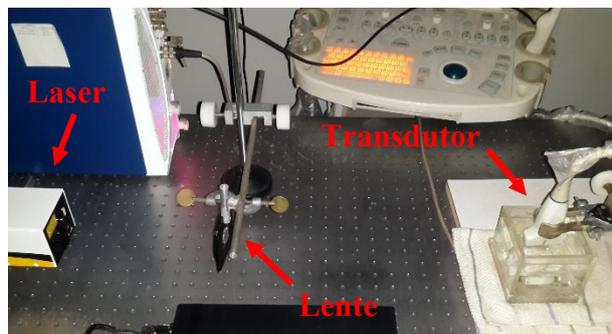


Figura 1. Aparato experimental desenvolvido utilizando um laser (esquerda), uma lente convergente (meio) e um transdutor ultrassônico linear (direita).

De acordo com as normas do comitê de ética local, foram utilizados apenas crânio e encéfalo de rato post-mortem (Figura 2) da espécie *Rattus norvegicus Wistar* (linhagem albina), que foram dissecados após morte por volta do 30º dia de vida e conservados em formaldeído. O crânio foi colocado em uma haste presa em um lastro de borracha (atenuador acústico) e imerso em um recipiente cúbico de acrílico contendo água mili-Q.

Utilizando o transdutor ultrassônico acoplado a um sistema de posicionamento 3D manual, com resolução de décimo de milímetro, foram feitas

5aquisições de imagens de radiofrequência (RF) com 40 x 38 mm de uma mesma área do plano sagital. Para geração de imagens FA, o laser foi posicionado a 600 mm de distância da amostra, a lente convergente foi posicionada a 200 mm de distância do laser para distribuir a fluência de fótons por uma área maior da amostra (Figura 3), a energia estimada por cálculo geométrico de 55 mJ na face do acrílico.



Figura 2. Crânio e cérebro de rato post-mortem da espécie *Rattus norvegicus wistar*

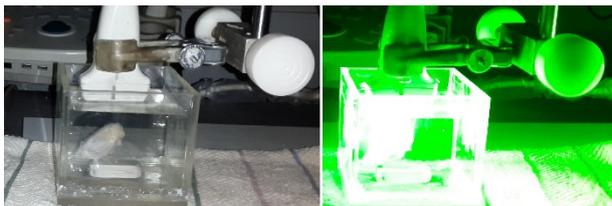


Figura 3. Antes (esquerda) e depois (direita) da incidência de 55mJ de energia sobre o cérebro de um rato proveniente de um feixe de fótons (532 nm) expandido por uma lente convergente para formação da imagem fotoacústica.

O sincronismo entre o equipamento de ultrassom e o laser foi feito por meio do trigger emitido pelo *Q-switch* do laser. Para cada pulso de laser emitido, uma linha da imagem final era formada pela soma das 32 linhas adjacentes (método *delay and sum*) (18). Portanto foram feitas 128 emissões de laser por imagem. O rastreamento manual foi realizado em passos de 1mm ao longo do eixo transversal totalizando 12mm totalizando um volume de 40 x 38 x 12 mm³.

Em seguida, utilizando o MATLAB® as imagens de RF para ambos, PE e FA, foram processadas tirando a média das 5 imagens adquiridas e convertidas para imagens 8-bits com tamanho de 512 x 512 pixel em modo-B. O conjunto de imagens adquiridas pelo rastreamento foram convertidas para o formato NRRD (19), que é compatível como software de renderização Slicer 3D (20), com o qual o volume foi renderizado e depois segmentado manualmente para mensuração do líquido.

3. Resultados

O software desenvolvido para aquisição em C++/Qt4, batizado de *GIIMUS Research Platform* (GRP) permitiu aquisição de fotoacústica e pulso-eco com controle de todos os parâmetros de deformação de imagem (Figura 4).



Figura 4. Software dedicado para aquisição de imagens de RF em modo pulso-eco e fotoacústica.

As imagens provenientes do rastreamento manual foram processadas e convertidas para o formato NRRD, em seguida, renderizadas em volumes tridimensionais com resolução espacial de 0,1 x 0,1 x 1 mm para a técnica pulso-eco mostrada na Figura 5 e fotoacústica na Figura 6.



Figura 5. Renderização do volume rastreado utilizando a técnica pulso-eco (ultrassonografia convencional)

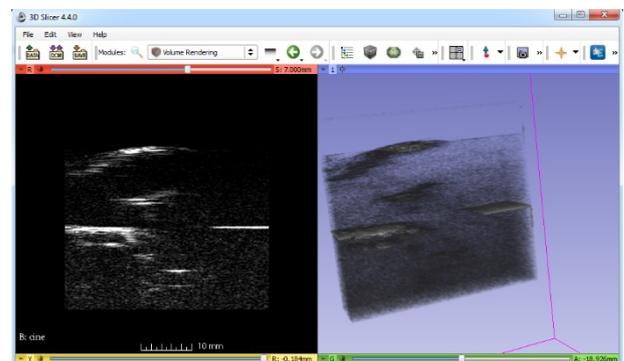


Figura 6. Renderização do volume rastreado utilizando a técnica fotoacústica.

Utilizando o Slicer 3D e o volume renderizado obtivemos o líquido encefálico de 0,1 ml.

4. Discussão e conclusões

O desenvolvimento do aparato, software de aquisição GRP e renderização propiciaram a definição de um protocolo rápido de aquisição de imagens de ultrassonografia convencional e de fotoacústica para volumetria. As imagens foram adquiridas de maneira rápida (1 minuto por volume para PE e 5 minutos por volume para FA), depois de convertidas para o formato NRRD (aproximadamente 1 minuto) puderam ser carregadas para renderização de um volume tridimensional (Figura 5 e Figura 6), utilizando o software Slicer 3D.

O volume renderizado foi utilizado para mensuração do líquido encefálico de roedores, criando-se um protocolo promissor para investigação de doenças neurológicas, por exemplo, a hidrocefalia, que possui como característica primordial o volume de líquido presente na cavidade encefálica.

Obtivemos melhores resultados para a técnica PE, podendo estimar o volume encefálico de maneira mais precisa. Embora a estimativa seja possível utilizando a técnica FA, o *setup* pode ser aprimorado. Uma possível melhoria imediata seria utilizar um laser infravermelho (1064 nm) associado ao laser verde (532 nm), para melhorar o contraste da imagem aumentando a contribuição das células vermelhas. Com esta melhoria esperamos diferenças vasculares que servem como referência para mensuração de estruturas encefálicas. O contínuo desenvolvimento deste sistema em conjunto com um protocolo mostra-se promissor para investigar o caso hidrocefálico, pois uma maior quantidade de líquido estará presente na cavidade encefálica.

Agradecimentos

Especial agradecimento ao grupo e laboratório GIIMUS, ao grupo e laboratório de neurocirurgia pediátrica e neuropatologia do desenvolvimento, laboratório de apoio ao manuseio de ratos, a empresa FIGLABS e à FINEP (MCT2613/09), CAPES, CNPq, and FAPESP (2010/07639-9; 2012/18420-3; 2013/18854-6) pelo suporte financeiro.

Referências

- Chervenak FA, Kurjak A. *Ultrasound and the Fetal Brain*. CRC Press; 1995. 264 p.
- Kliemann SE, Rosemberg S. Shunted hydrocephalus in childhood: an epidemiological study of 243 consecutive observations. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*. 2005 Jun;63(2B):494–501.
- Matsumoto S, Tamaki N. *Hydrocephalus: Pathogenesis and Treatment*. Springer Science & Business Media; 2012. 709 p.
- Okubo S, Strahle J, Keep RF, Hua Y, Xi G. Subarachnoid Hemorrhage-Induced Hydrocephalus in Rats. *Stroke*. 2013 Feb;44(2):547–50.
- Babapour B, Oi S, Boozari B, Tatagiba M, Bleck J, Hussein S, et al. Fetal hydrocephalus, intrauterine diagnosis and therapy considerations: an experimental rat model. *Childs Nerv Syst*. 2005 May;21(5):365–71.
- Christensen D. *Ultrasonic Bioinstrumentation*. 1 edition. New York: Wiley; 1988. 256 p.
- Kruger RA. Photoacoustic ultrasound. *Med Phys*. 1994 Jan;21(1):127–31.
- Xu M, Wang LV. Photoacoustic imaging in biomedicine. *Review of Scientific Instruments*. 2006 Apr 1;77(4):041101.
- Ntziachristos V, Ripoll J, Wang LV, Weissleder R. Looking and listening to light: the evolution of whole-body photonic imaging. *Nat Biotech*. 2005 Mar;23(3):313–20.
- Luke GP, Yeager D, Emelianov SY. Biomedical applications of photoacoustic imaging with exogenous contrast agents. *Ann Biomed Eng*. 2012 Feb;40(2):422–37.
- Homan KA, Souza M, Truby R, Luke GP, Green C, Vreeland E, et al. Silver Nanoplate Contrast Agents for in Vivo Molecular Photoacoustic Imaging. *ACS Nano*. 2011;6(1):641–50.
- Wang X, Pang Y, Ku G, Xie X, Stoica G, Wang LV. Noninvasive laser-induced photoacoustic tomography for structural and functional in vivo imaging of the brain. *Nat Biotech*. 2003 Jul;21(7):803–6.
- Oh J-T, Li M-L, Zhang HF, Maslov K, Stoica G, Wang LV. Three-dimensional imaging of skin melanoma in vivo by dual-wavelength photoacoustic microscopy. *Journal of Biomedical Optics*. 2006;11(3):034032.
- Xiang L, Han B, Carpenter C, Pratz G, Kuang Y, Xing L. X-ray acoustic computed tomography with pulsed x-ray beam from a medical linear accelerator. *Med Phys [Internet]*. 2013 Jan [cited 2015 Jan 17];40(1). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3537718/>
- Wilson T, Zagzebski J, Varghese T, Chen Q, Rao M. The Ultrasonix 500RP: a commercial ultrasound research interface. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*. 2006 Oct;53(10):1772–82.
- Richard S. C. Cobbold. *Foundations of Biomedical Ultrasound*. Oxford University Press; 2006. 844 p.
- Oyama R, Jakab M, Kikuchi A, Sugiyama T, Kikinis R, Pujol S. Towards improved ultrasound-based analysis and 3D visualization of the fetal brain using the 3D Slicer. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2013 Nov 1;42(5):609–10.
- Park S, Karpouk AB, Aglyamov SR, Emelianov SY. Adaptive beamforming for photoacoustic imaging. *Opt Lett*. 2008 Jun 15;33(12):1291–3.
- Teem: nrrd: Example NRRD files [Internet]. [cited 2015 Jun 26]. Available from: <http://teem.sourceforge.net/nrrd/files/>
- 3D Slicer [Internet]. [cited 2015 Jun 26]. Available from: <http://www.slicer.org/>

Contato:

Diego Ronaldo Thomaz Sampaio
Departamento de Física – DF – FFCLRP
Av. Bandeirantes, 3900 - CEP 14040-901 - Bairro Monte Alegre - Ribeirão Preto – SP – Brasil
diegorts@usp.br