

Artigo Original

Recebido em 12/01/2007, aceito em 09/05/2007

Sistema de biomicroscopia ultra-sônica para imagens com alta resolução de tecidos biológicos

Ultrasound biomicroscopy system for high resolution images of biological tissues

**Lorena Itatí Petrella
João Carlos Machado***

Programa de Engenharia Biomédica – COPPE/UFRJ
Caixa Postal 68510
21941-972 - Rio de Janeiro, RJ
E-mail: jmc@peb.ufrj.br

Fernando Reizel Pereira

Instituto Politécnico, IPRJ/UERJ
Caixa Postal 97282,
28601-970 - Nova Friburgo, RJ

*Autor para Correspondência

Resumo

A biomicroscopia ultra-sônica (BMU) é uma técnica que permite gerar imagens de tecidos biológicos com resoluções compatíveis com a microscopia óptica, e de forma não invasiva. O método utilizado na reconstrução da imagem é semelhante ao de sistemas ecográficos convencionais, porém as frequências das ondas acústicas utilizadas são consideravelmente maiores (entre 20 e 200 MHz), motivo pelo qual algumas características do sistema devem ser adaptadas. Uma limitação desta técnica é o baixo poder de penetração do feixe de ultra-som (limitado a poucos milímetros), devido à grande atenuação ocasionada em ondas acústicas de alta frequência, quando se propagam por um tecido biológico. No presente trabalho foi realizada a montagem de um sistema de BMU para uso experimental em laboratório, inicialmente projetado para ser usado com amostras de tecidos *in vitro*. Os componentes utilizados na montagem, suas principais características e o desempenho geral do sistema são apresentados. A frequência de trabalho utilizada foi próxima a 50 MHz. As resoluções no sentido axial e lateral das imagens geradas foram de até 50 e 80 μm , respectivamente. A profundidade do campo que pode ser visualizada na imagem foi estimada em aproximadamente 270 μm . O sistema foi avaliado tanto com *phantoms* como com amostras de tecidos de rato *in vitro*. Algumas modificações podem ainda ser introduzidas, a fim de melhorar a qualidade da imagem e adaptar o sistema para utilização *in vivo*.

Palavras-chave: Biomicroscopia, Ultra-som, Imagem, Alta resolução.

Abstract

*Ultrasound biomicroscopy (UBM) is a non-invasive technique used to generate images of biological tissues with resolutions close to those obtained with optical microscopy. The method employed for the image reconstruction process is similar to that found in conventional echographic systems, but with acoustic wave frequencies significantly higher (between 20 and 200 MHz) and consequently with some system characteristics adequately adapted. The trade-off with higher resolution is the technique limitation for low penetration of the ultrasound beam (limited to few millimetres), imposed by the tissue large ultrasound attenuation of high-frequency acoustic waves. The present work refers to the assembly of an UBM system for experimental applications, initially designed to be used with *in vitro* biological tissue samples. This article describes the components used in the assembled UBM system, their main characteristics and the system performance. The working frequency is close to 50 MHz. Axial and lateral resolutions of the generated images are around 50 and 80 μm , respectively. The useful depth of field to be imaged was estimated around 270 μm . The system was evaluated with both *phantoms* and *in vitro* mouse tissue samples. Some modifications can yet be introduced into the system for image quality enhancement and to expand the potential applications to other types of studies, including *in vivo* image acquisition.*

Keywords: Biomicroscopy, Ultrasound, Image, High resolution.

Extended abstract

Introduction

Ultrasound biomicroscopy is a technique that allows imaging biological tissues non-invasively and with resolutions at microscopic levels. The method for image reconstruction is similar to that used in conventional echographic medical diagnostic system, however employing higher ultrasound frequencies (between 20 and 200 MHz). Among the limitations of this technique, an important one is the reduced ultrasound beam penetration (between 3 and 8 mm). Several works are presented in both medical and biological areas, with applications limited to the visualization of superficial and endocavitary structures.

Materials and Methods

A schematic illustration of the assembled system is presented in Figure 1. It includes a monoelement ultrasonic transducer, working in pulse-echo mode. The beam-scanning block consists of a linear slide unit driven by an integrated DC motor, axially coupled to a position optical encoder. The encoder output provides synchronous pulses used to construct the images. A monicycle pulse generator is used to excite the transducer, providing both high frequency and short time pulse characteristics. A high-frequency diode expander and a voltage limiter integrate the system front end protection circuitry. The lengths of the transmission lines connecting the protection circuitry with the transducer were carefully selected to avoid signal filtering caused by unmatched impedances between these components. The RF amplifier, connected to the transducer output, provides enough gain of the backscattered signals and its output is connected to a logarithmic amplifier, used to compress the dynamic range of the RF signal into the image dynamic range. Its signal output, the RF signal envelope log-compressed, is then sampled by an A/D converter board installed in the PC bus, which

is controlled by a user interface developed in LabVIEW®. The user's interface manages the configuration of the digitization routines, the image reconstruction from the backscattered signals stored in the A/D board memory (using the synchronism pulses emitted by the position encoder), and the storage of the information in the PC memory. The samples to be imaged are placed in an acrylic recipient with controlled temperature. This recipient lays over a high-precision positioning platform. Both PC and others components are placed in a mobile rack, to facilitate the physical translation of the whole UBM system.

Results

The axial (R_{ax}) and lateral (R_{lat}) resolutions as well as the depth of field (DOF), that determine the image characteristics, were calculated with the information contained in the echo spectrum of the system response, with the echo obtained from the water/flat-sapphire interface, keeping the transducer excited by a high-frequency pulse with central frequencies varying from 35 to 75 MHz. The results obtained for these parameters are listed in Table I.

The image frame rate reached with the system was near to 2 frames/s, with this value limited by the highest speed allowed by the mechanical scanning system.

Some system-acquired images are presented in Figures 8 and 9 for both, phantoms and *in vitro* biological tissues, respectively. In Figure 8a is presented a "V" shape steel phantom, with a continuous varying gap, for lateral resolution measurement. Figures 8b and 8c present images of the phantom used for axial resolution measurements. This phantom was assembled with polymer layers of 110 μm e 50 μm respectively. Figure 9 presents *in vitro* biological tissue images (rat's liver), where it is possible to observe the blood vessel's walls.

Introdução

A biomicroscopia ultra-sônica (BMU) é uma técnica que permite obter imagens de tecidos biológicos de forma não invasiva e com resoluções em níveis microscópicos, utilizando pulsos de ultra-som (US) de alta frequência (frequência central típica entre 20 e 200 MHz). As primeiras experiências com US de alta frequência datam de 1980, e desde então numerosos estudos foram desenvolvidos tanto na área médica como biológica (Foster *et al.*, 2000). A grande vantagem desta técnica, que motiva numerosas pesquisas e aplicações, reside no fato de que estudos *in vivo* podem ser realizados sem interferir no processo biológico analisado, permitindo observar tecidos com resoluções de até poucas dezenas de micrômetros e sem a necessidade de biópsias. Por outro lado, uma limitação da técnica está no poder de penetração do feixe de US, já que ondas acústicas de frequências mais elevadas são altamente atenuadas pelo meio. Tipicamente, a profundidade de tecido que pode ser visualizada fica reduzida a poucos milímetros (na ordem de 3 a 8 mm), limitando as aplicações desta técnica à visualização de estruturas superficiais ou endocavitárias.

A BMU vem evoluindo tanto na área médica como biológica. Os estudos na área da medicina visam utilizar a técnica como ferramenta na detecção de estruturas anômalas, na medição de tamanhos de microestruturas, no acompanhamento de processos fisiológicos e terapêuticos, entre outros. Estes estudos são realizados em diversos órgãos, sendo que em alguns casos a técnica já ganhou um espaço no diagnóstico clínico. Entre os campos da medicina onde a BMU é estudada, podem ser mencionados: a) *oftalmologia* (Pavlin e Foster, 1995) no qual a BMU apresentou o maior desenvolvimento devido ao fácil acesso deste órgão com o transdutor; b) *dermatologia*, com aplicação na detecção de tumores, no estudo de processos de irritação, de inflamação e de queimaduras, e na quantificação da elasticidade da pele, entre outros (Raju *et al.*, 2003); c) *traumatologia* (Töyräs *et al.*, 2002) onde a técnica está ainda em etapa experimental, e visa avaliar o estado da matriz de cartilagem e osso subcondral em articulações; d) *cardiologia* (Machado *et al.*, 2002), sendo a técnica aplicada para visualizar alterações apresentadas nas paredes de pequenos vasos e à medição de fluxos, mediante o uso de transdutores intravasculares; e) aplicações endoluminares onde estão incluídas as áreas de *gastroenterologia* (Soldan *et al.*, 2004), *urologia* (Kondabolu *et al.*, 2004), *pneumologia* (Okamoto *et al.*, 2002), *ginecologia* (Senoh *et al.*, 1999) e *otorrinolaringologia* (Rothbaum *et al.*, 2004), nas quais

a técnica é aplicada para visualizar as estruturas dos diversos dutos que integram estes sistemas e as alterações que nelas acontecem.

Na área da biologia são conduzidos estudos experimentais em animais (para posterior implementação em humanos), a fim de obter maior conhecimento sobre diversos processos patológicos. Uma das aplicações nesta área é o estudo do *desenvolvimento embrionário*, no qual é analisado o crescimento de diferentes órgãos durante a gestação, e os fatores que nele influenciam. Entre os órgãos comumente estudados podem ser mencionados o globo ocular (Foster *et al.*, 2003), o tubo neural (Turnbull *et al.*, 1998), o coração (Zhou *et al.*, 2002) e as extremidades (Liu *et al.*, 1998). Uma outra aplicação biológica se refere ao estudo do *desenvolvimento de tumores*, no qual são analisados os processos envolvidos no crescimento tumoral e as respostas apresentadas ante diferentes tipos de drogas (Wirtzfeld *et al.*, 2005).

Um equipamento de BMU por retroespalhamento se assemelha a um instrumento de US convencional que opera no modo B (Fish, 1990). A diferença fundamental reside na alta frequência usada para biomicroscopia. Hoje em dia é possível implementar o controle, a aquisição dos sinais e a exibição da imagem em microcomputadores pessoais, graças às atuais capacidades que eles apresentam em termos de velocidade e tamanho de memória para armazenamento de dados. Um diagrama de blocos do sistema é apresentado na Figura 1.

O sistema de BMU desenvolvido neste trabalho foi construído para servir como ferramenta em diversos trabalhos de pesquisa, atuais e futuros, envolvendo a obtenção de imagens de US de alta resolução. O sistema opera com frequências próximas a 50 MHz, e apresenta resoluções axiais e laterais de até 50 μm e 80 μm , respectivamente.

Fundamentos

Resolução e Região de Focalização – A qualidade de uma imagem ultra-sônica é determinada, em parte, pela resolução do sistema utilizado na geração de imagem, isto é, pela menor distância de separação entre interfaces muito próximas capazes de serem diferenciadas na imagem. A resolução é medida tanto no sentido de propagação do feixe de US (resolução axial ou R_{ax}), como no sentido perpendicular a este (resolução lateral ou R_{lat}). A primeira é função da largura de banda do pulso emitido pelo transdutor, sendo dada por (Foster *et al.*, 2000):

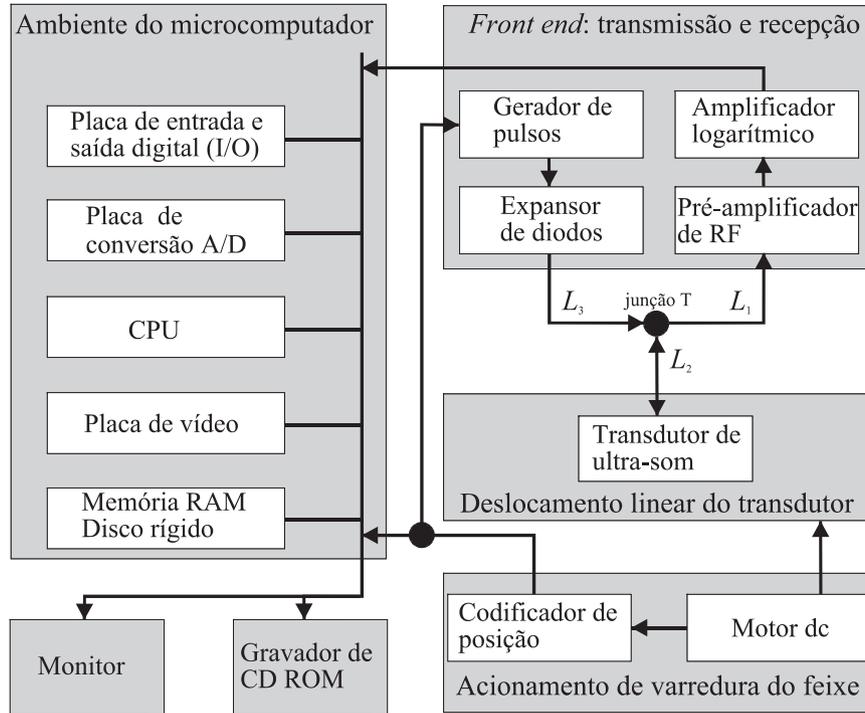


Figura 1. Diagrama em blocos do sistema de BMU contendo as unidades típicas do ambiente de um microcomputador e seus periféricos, assim como os componentes do *front end* e do sistema de varredura do transdutor. A junção T é onde se conectam a entrada e a saída do *front end* com o transdutor através de cabos coaxiais com comprimentos L_1 , L_2 e L_3 , respectivamente. **Figure 1.** Block diagram of the UBM system containing the typical unities of the PC and peripherals, like the front end components and the beam scanning system. The front end input and output are connected with the transducer at the T-junction, through the coaxial cables with lengths L_1 , L_2 and L_3 , respectively.

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

sendo c a velocidade do US no meio e BW a largura de banda do pulso emitido pelo transdutor. Já R_{lat} é função tanto da frequência central do pulso emitido pelo transdutor como das características de focalização do mesmo (Foster *et al.*, 2000), sendo dada por:

$$R_{lat} = \bar{\lambda} \left(\frac{d_{focal}}{d_{AA}} \right) = \bar{\lambda} (f - \text{número}) \quad (2)$$

sendo $\bar{\lambda}$ o comprimento de onda médio do feixe, d_{focal} a distância focal, d_{AA} o tamanho da abertura do transdutor e $(f - \text{número})$ a razão entre d_{focal} e d_{AA} .

Outro parâmetro de interesse é a profundidade do campo que pode ser visualizada na imagem (*DOF*, do inglês *depth of field*), o qual depende tanto da frequência utilizada como das características de focalização do transdutor, e é dado por (Foster *et al.*, 2000):

$$DOF = 7,0 \bar{\lambda} (f - \text{número})^2 \quad (3)$$

De (1) se observa que R_{ax} melhora (diminui) à medida que BW aumenta, o que é possível utilizando-se transdutores com frequências de ressonância mais elevadas. A melhora de R_{lat} é também obtida com aumento da frequência (diminuição de $\bar{\lambda}$) e com transdutores mais focalizados ($f - \text{número}$ menor). Em contrapartida, de (3) é possível observar que valores menores tanto de $\bar{\lambda}$ como de $(f - \text{número})$ reduzem a região focalizada, *DOF*, que pode ser visualizada. Por este motivo, no momento de escolher uma frequência de trabalho deve ser estabelecido um compromisso entre resolução da imagem e profundidade do campo de focalização do feixe de US.

Vale salientar ainda que a atenuação da onda aumenta exponencialmente com a frequência. Tipicamente, o coeficiente de atenuação para tecidos moles é da ordem de 0,5 dB/cm/MHz (Foster *et al.*, 1993) o que implica numa penetração máxima de 10 mm para uma frequência de 40 MHz. Portanto, a escolha da frequência da onda impõe um compromisso com a profundidade de campo, com a resolução e com a penetração máxima.

Princípio de funcionamento do Sistema de BMU –

A geração e reconstrução da imagem têm início com o movimento do motor, utilizado no sistema de varredura linear do feixe que, acoplado ao codificador de posição, faz com que o mesmo emita sinais de sincronismo utilizados na reconstrução da imagem. Estes sinais de sincronismo (pulsos) são de dois tipos: o primeiro, denominado sinal de sincronismo por quadro (*ssq*), é gerado no início de cada quadro de imagem; o segundo, denominado sinal de sincronismo por coluna (*ssc*), consiste em um conjunto de pulsos disparados a intervalos fixos de deslocamento ao longo da varredura. O gerador de pulsos é disparado pelo *ssc*, emitindo um pulso de alta tensão e curta duração que atravessa o expansor de diodos e excita o transdutor, o qual funciona como emissor-receptor. O transdutor é fixado ao sistema de varredura por meio de um eixo e os pulsos de US por ele emitidos são retroespalhados ao atravessar o meio, sendo então captados pelo próprio transdutor. Os sinais de eco que retornam carregam informação do tecido em estudo, que posteriormente é utilizada na formação da imagem.

Tanto o expansor de diodos, conectado em série entre o gerador de pulsos e o transdutor, como o limitador de tensão, montado em paralelo com a entrada do pré-amplificador, são elementos de proteção do sistema. O pré-amplificador de RF aumenta o nível de tensão do sinal, para evitar perdas de informação nas próximas etapas do processamento. O amplificador logarítmico se localiza após o pré-amplificador, e tem como função adaptar as características dos sinais para serem representados na imagem.

Os sinais na saída do amplificador logarítmico são posteriormente discretizados no conversor analógico digital (conversor A/D) instalado no microcomputador. Para isto, o programa permanece na espera do *ssq* e após sua detecção, os *ssc* dão início à leitura dos sucessivos sinais para gerar as colunas que compõem a imagem. Quando completado o número de aquisições que integrarão o quadro de imagem, a placa envia toda a informação à memória do computador, que posteriormente será acessada para apresentar os resultados no monitor como imagens 2D. O processo é repetido com a detecção de cada *ssq*.

Materiais e Métodos

As principais partes que integram o sistema (vide Figura 1) são descritas a seguir.

Transdutor

Foi utilizado um transdutor ultra-sônico monoelemen-

to, construído com uma membrana de difluoreto de polivinilideno ou filme de PVDF (Piezotech, França) de 9 μm de espessura, com eletrodos de ouro e uma retaguarda de cola epóxi condutor Circuitworks® (Chemtronics, EUA). A área ativa consiste em uma superfície circular com aproximadamente 3,5 mm de diâmetro, na qual se deu uma curvatura esférica para permitir a focalização do feixe. Todo o conjunto foi montado num conector tipo SMA, como apresentado na Figura 2. O transdutor possui uma distância focal de 3,8 mm, correspondendo a um f -número de 1,09, e com os valores de BW obtidos entre 30 e 40 MHz.

Sistema de Varredura do Feixe

Integra este sistema uma unidade de deslocamento linear acionada pelo motor, na qual o transdutor é fixado, e um codificador de posição também acionado pelo motor e responsável pela geração dos pulsos de sincronismo, como representado no diagrama da Figura 3. O sistema de varredura realiza um movimento linear bidirecional, com uma excursão máxima no sentido horizontal de 1,25 cm, e com uma frequência de 2,63 Hz (o qual limita a quantidade máxima de quadros de imagem por segundo). Os pulsos de sincronismo gerados têm uma amplitude de 5 V e são



Figura 2. Transdutores monoelemento de PVDF, montados num conector tipo SMA. **Figure 2.** PVDF mono-element transducers, assembled in a SMA connector.

emitidos na razão de 712 *ssc* para cada pulso *ssq* (o que corresponde a deslocamentos de aproximadamente 17,5 μm entre os disparos).

Gerador de Pulsos

Para excitar o transdutor foi utilizado um gerador de pulsos monociclo modelo AVB2-TB-C (Avtech Electrosystem, Canadá). Este é capaz de gerar pulsos de alta tensão (máximo de 400 Vpp), necessários para fornecer energia suficiente ao transdutor, e de curta duração, já que o pulso gerado consiste em um único ciclo de senóide (com uma frequência teórica variando entre 40 e 100 MHz).

Expansor de Diodos

Foi utilizado um expensor de diodos de alta frequência modelo DEX-3 (Matec, EUA). Sua função é permitir a passagem do pulso elétrico de alta tensão ao transdutor durante a transmissão, atuando como um circuito fechado. Já durante a recepção, o expensor desacopla o gerador de pulsos passando do estado condutor ao de circuito aberto, quando na sua entrada é apresentado um sinal de baixa amplitude (inferior a 1,5 V), evitando perdas do sinal que deve ser transmitido ao pré-amplificador.

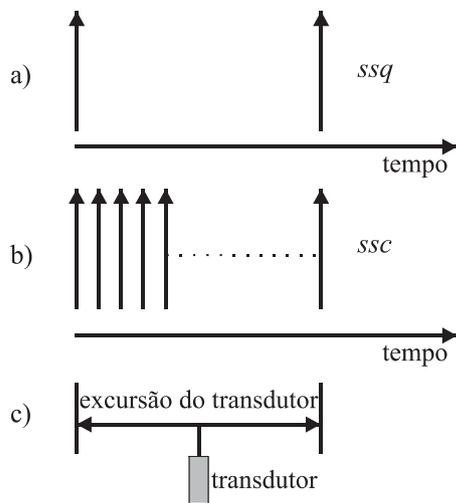


Figura 3. Esquema dos sinais de sincronismo associados ao movimento do sistema de varredura: a) *ssq* emitidos nos extremos da excursão de varredura, b) *ssc* emitidos em intervalos fixos de deslocamento e c) movimento linear bidirecional do transdutor. **Figure 3.** Scheme of the synchronization signals associated to the scanning movements: a) *ssq* emitted in the end of the scan excursion, b) *ssc* emitted at fixed displacement intervals and c) two-way transducer movement.

Pré-Amplificador de RF com Limitador de Tensão

O amplificador de RF modelo AU-1054 (Miteq, Canadá) é conectado na saída do transdutor para aumentar a amplitude do sinal de eco proveniente do meio. O ganho proporcionado pelo dispositivo é de $30 \pm 0,5$ dB, mantendo-se aproximadamente constante dentro de uma faixa de frequência que vai de 1 a 500 MHz. As impedâncias, tanto na entrada como na saída são de 50Ω , permitindo um casamento destas com os cabos coaxiais que interligam o sistema.

O limitador de tensão está integrado na entrada do pré-amplificador, ambos conectados em paralelo. Durante a transmissão, o limitador funciona como um curto circuito ao terra e desacopla o pré-amplificador do resto do sistema, impedindo que o pulso de alta tensão emitido pelo gerador cause danos ao pré-amplificador. Durante a recepção, o nível de tensão é pequeno e o limitador de tensão passa a ser um circuito aberto, sem causar interferência na transmissão do sinal de eco.

Amplificador Logarítmico

Este dispositivo é usado para comprimir a faixa dinâmica do sinal de RF e adequar a faixa dinâmica da imagem. Isto é feito dando um ganho maior aos sinais de eco de menor amplitude e vice-versa, seguindo uma relação logarítmica entre tensão de entrada e tensão de saída. Ao mesmo tempo, a forma como foi montado permite a obtenção da envoltória do sinal de RF.

A montagem se baseia numa configuração proposta pela Analog Devices Inc., que utiliza dois circuitos integrados do tipo AD640N (Analog Devices, EUA) acoplados por um indutor. O circuito inclui também o amplificador operacional AD844 (Analog Device, EUA) que transforma a saída de corrente em saída de tensão, e uma série de elementos passivos tipo SMD. Com esta configuração é obtida uma faixa dinâmica de 70 dB, e uma largura de banda de 50 a 150 MHz. O caminho que o sinal percorre em todas as etapas é totalmente diferencial, o que permite reduzir oscilações devidas a um inadequado desacoplamento entre a fonte de alimentação e as conexões a terra compartilhadas.

Conversor Analógico/Digital

Os sinais obtidos na saída do amplificador logarítmico são digitalizados pela placa de conversão A/D, modelo CompuScope 8500 (Gage Applied, EUA) instalada no barramento PCI do microcomputador. A mesma foi adquirida juntamente com um *kit* para desenvolvimento de *software* (SDK) em LabVIEW®, o qual permite instalar as rotinas da digitalização. Os sinais

digitalizados são transferidos ao microcomputador para visualização de imagens, armazenamento na memória ou posterior processamento digital.

A placa realiza a leitura tanto dos sinais de eco a serem digitalizados, como dos sinais de sincronismo que permitem a reconstrução da imagem. Para a digitalização possui valores predefinidos de frequência de amostragem, que se encontram numa faixa entre 25 e 500 Mega-amostras/segundo (Ms/s), uma faixa dinâmica para o sinal de entrada com valores que vão de ± 100 mV até ± 5 V, e um canal de oito bits para transmissão do sinal digital.

O SDK dispõe dos códigos de comunicação entre o *software* (interface de usuário) e o *hardware* (placa de aquisição), mediante as chamadas sub-rotinas (sub-VIs). Estas são arquivos criados no LabVIEW® que realizam uma seqüência de tarefas específicas, permitindo a configuração da placa e a aquisição dos dados digitalizados. Desenvolveram-se duas interfaces de usuário fazendo uso destas sub-VIs: uma para configuração da placa prévia ao início das aquisições, e outra para apresentação dos resultados (Figura 4),

atendendo às necessidades próprias do sinal e do sistema, e otimizando os tempos necessários para sua execução.

Microcomputador e Estante Móvel

A instalação da placa do conversor A/D, o desenvolvimento do *software* e o armazenamento de dados, foram realizados em um computador Pentium III. O mesmo foi equipado com um processador de 2,4 GHz, monitor de vídeo de 17 polegadas, teclado, mouse, *driver* de CD ROM com gravador e interfaces padrão RS-232 para impressora. O conjunto foi instalado numa estante móvel para facilitar a translação física do sistema.

Recipiente para Amostra de Tecido Biológico e Controlador de Temperatura

O recipiente onde é colocada a amostra de tecido biológico *in vitro* a ser analisada, Figura 5, está formado por duas câmaras de acrílico incomunicáveis. A câmara externa é selada e contém duas aberturas num dos lados para entrada e saída de fluido (água destilada), que circula pela ação de uma bomba hidráulica. Este fluido

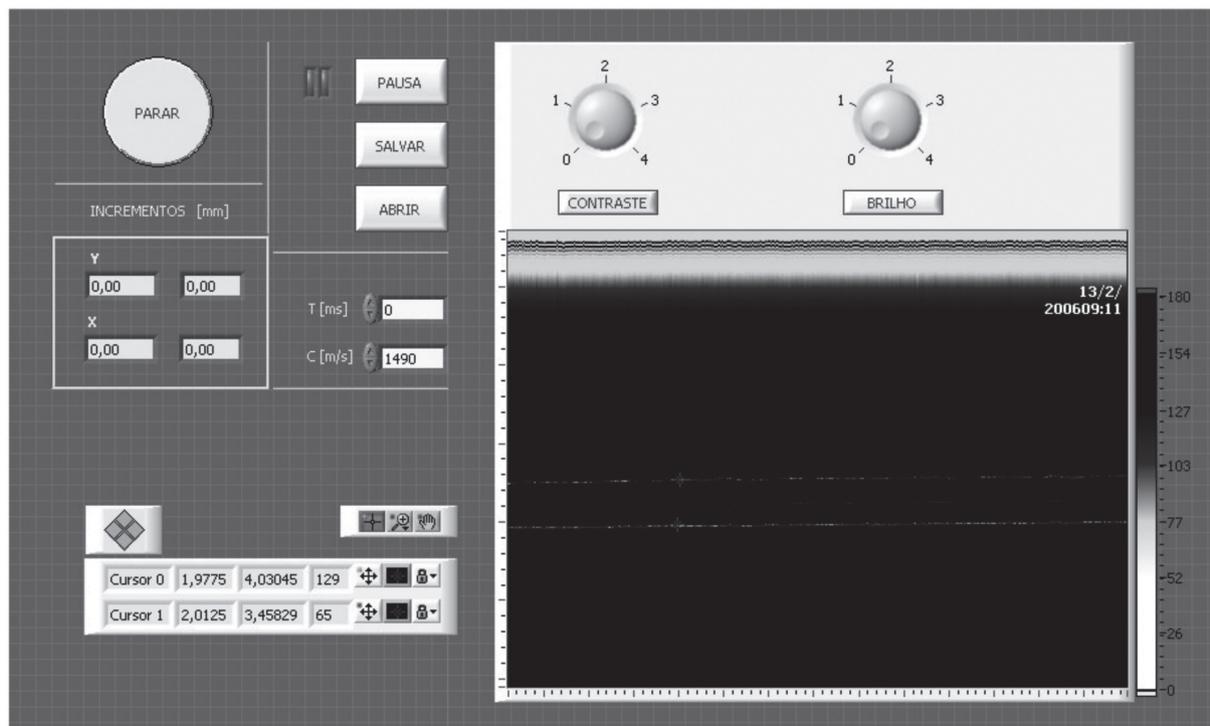


Figura 4. Interface de usuário principal desenvolvida em LabVIEW®, de onde é acessada, em forma automática, a interface secundária para configuração da placa de conversão A/D. No lado direito são apresentadas as imagens resultantes da aquisição e no lado esquerdo os comandos e indicadores associados. **Figure 4.** Main user interface developed in LabVIEW®, from which a secondary user's interface, for A/D board configuration, is accessed automatically. In the right side are presented the acquired images, and in the left side are the associated controls and indicators.

é conectado a um regulador térmico (aquecedor) com controle PID (Proporcional, Integrador, Derivador), que mantém a temperatura no valor programado. A câmara interna é aberta na parte superior e preenchida com solução salina, que atua como meio de acoplamento entre o transdutor e a amostra, e como condutor de calor. Na câmara interna é inserida uma coluna de acrílico com altura regulável para a colocação das amostras de tecido, sobre a qual é montado um cilindro de safira (diâmetro 25,4 mm, altura 8,09 mm) que atua como um substrato. A amostra de tecido biológico é colocada sobre a safira e coberta por um filme de PVC (espessura de 10 μm) para evitar movimentos durante a obtenção da imagem.

Plataforma XYZ para Posicionamento da Amostra

Esta plataforma compõe-se de quatro partes como apresentado na Figura 6. Uma delas consiste numa base com manipuladores lineares micrométricos, com precisão de 10 μm para movimentos no plano horizontal XY (Figura 6a), modelo M-436A (Newport, EUA), sobre a qual é colocado o recipiente contendo a amostra de tecido biológico. A inclinação da base é controlada mediante um outro sistema de ajuste modelo M-39 (Newport, EUA) o qual consta de dois manipuladores, que permitem orientar a superfície da safira perpendicularmente à direção de propagação

do feixe de US. Outra parte da plataforma consiste de um manipulador linear micrométrico modelo 360-90 (Newport, EUA), para ajuste fino do deslocamento do conjunto motor/transdutor ao longo do eixo vertical Z (Figura 6b). Esta plataforma também possui um outro manipulador modelo 281 (Newport, EUA) para o ajuste grosso do deslocamento ao longo do eixo Z.

Linhas de Transmissão

Quando se trabalha com sinais elétricos de altas frequências, os comprimentos dos cabos coaxiais (linhas de transmissão) que interligam o transdutor com os dispositivos de proteção do sistema (Figura 1) devem ser cuidadosamente escolhidos, já que estes interferem nas características do sinal que excita o transdutor, como também no sinal de eco (Chaggares *et al.*, 1999; Lockwood *et al.*, 1991; Sherar e Foster, 1989). Para determinar os comprimentos dos cabos que otimizem esta resposta, foi utilizado um programa de cálculo computacional desenvolvido com o *software* Matlab® (Rosa, 2003), com o qual é possível simular a resposta do sistema baseado no modelo elétrico equivalente KLM (Krimholtz-Leedom-Matthei). Dos resultados obtidos na simulação, escolheram-se para a montagem cabos com 22, 25 e 1,5 cm para L_1 , L_2 e L_3 respectivamente, os quais proporcionam um pulso de eco o mais estreito possível.

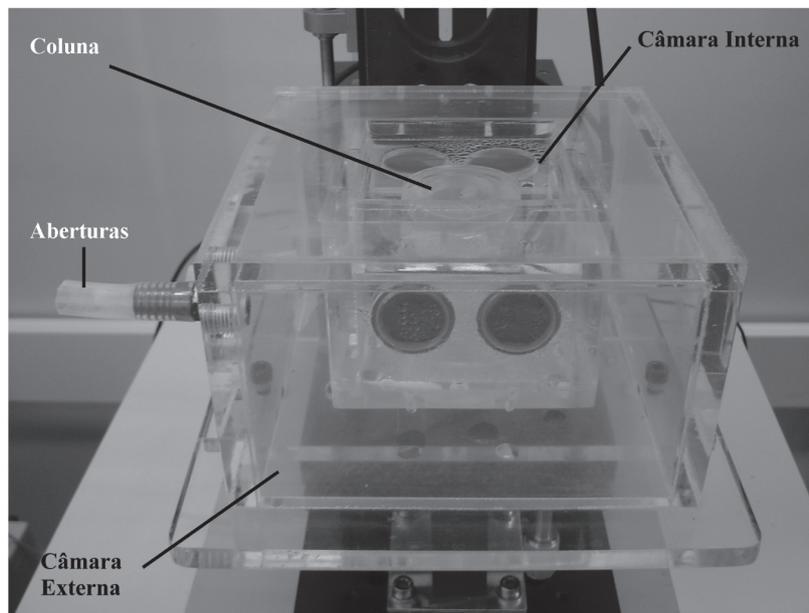


Figura 5. Recipiente de acrílico utilizado para estudo de amostras *in vitro*. As amostras são imersas na câmara interna, a qual é preenchida com água, enquanto o fluido circulante pela câmara externa ajuda a manter a temperatura controlada.

Figure 5. Acrylic container used in the *in vitro* tissues study. The tissue samples are introduced in the inner container filled with water, while the circulating flux in the outer container keeps the temperature under control.

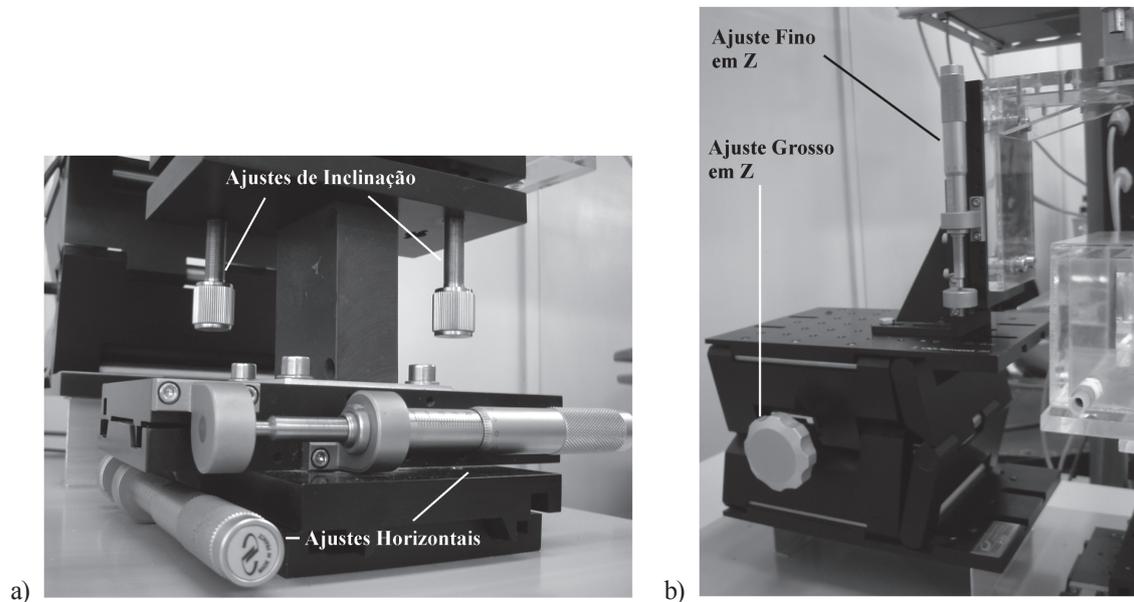


Figura 6. Plataformas para posicionamento da amostra: a) manipuladores para ajuste fino no plano horizontal XY (com precisão de 10 μm) e para ajuste da inclinação; b) manipuladores para ajustes fino e grosso da posição vertical Z. **Figure 6.** Sample positioning platforms: a) manipulators for fine adjustments in the horizontal XY plane (with 10 μm precision) and for tilt adjustment; b) manipulators for fine and coarse adjustment along the vertical Z direction.

Resultados

Uma foto do sistema montado é apresentada na Figura 7. Os valores de R_{ax} e R_{lat} que determinam a qualidade da imagem foram calculados mediante (1) e (2). Para isso analisou-se o espectro da resposta pulso-eco do sistema, proveniente de uma interface água/material refletor (safira), com o transdutor excitado com pulsos de frequência central variando entre 35 e 75 MHz, aproximadamente. A partir dos espectros dos sinais de eco foram determinados o comprimento de onda médio ($\bar{\lambda}$), correspondente à frequência central do espectro (próxima a 50 MHz) e a largura de banda (BW) para -6 dB, a qual variou entre 30 e 40 MHz. Os resultados obtidos para R_{ax} , R_{lat} e DOF são listados na Tabela 1.

Com a interface de usuário desenvolvida é possível visualizar imagens 2D, e utilizar ferramentas adicionais como cursores para medições quantitativas de tamanhos e distâncias, ajustes do nível de cinza (brilho e contraste), entre outros. As imagens obtidas possuem uma atualização de quadro numa taxa de aproximadamente 2 quadros/s, sendo esse valor limitado pela velocidade permitida pelo motor bidirecional que comanda a varredura.

Algumas das imagens obtidas com o sistema são apresentadas nas Figuras 8 e 9. A primeira refere-se a

materiais com características conhecidas, utilizados para avaliar o sistema (*phantoms*), enquanto a segunda corresponde a tecidos biológicos de rato *in vitro*. O *phantom* da Figura 8a, empregado na determinação de R_{lat} , consiste de duas lâminas de aço inox montadas em forma de "V" sobre uma base de epóxi, sendo a abertura máxima do "V" de 430 μm . Os *phantoms* das Figuras 8b e 8c são utilizados para a determinação de R_{ax} . O primeiro deles foi construído empilhando duas camadas de polímero de 110 μm de espessura e o segundo foi construído empilhando cinco camadas de PVDF de 50 μm de espessura. A Figura 9 apresenta imagens de fígado de rato *in vitro*, nas quais é possível visualizar as paredes e o lúmen de diferentes artérias nele presentes. Os níveis de amplitude e frequência utilizados para excitar o transdutor, durante a aquisição destas imagens, foram próximos a 31 Vpp e 64 MHz respectivamente.

Discussão

O sistema de imagem por BMU desenvolvido está na sua fase inicial de projeto, e modificações necessitam ser implementadas para garantir uma melhoria na qualidade da imagem, como também permitir aplicações *in vivo*. No entanto, a arquitetura instrumental para o sistema já está delineada, e as modificações (em anda-

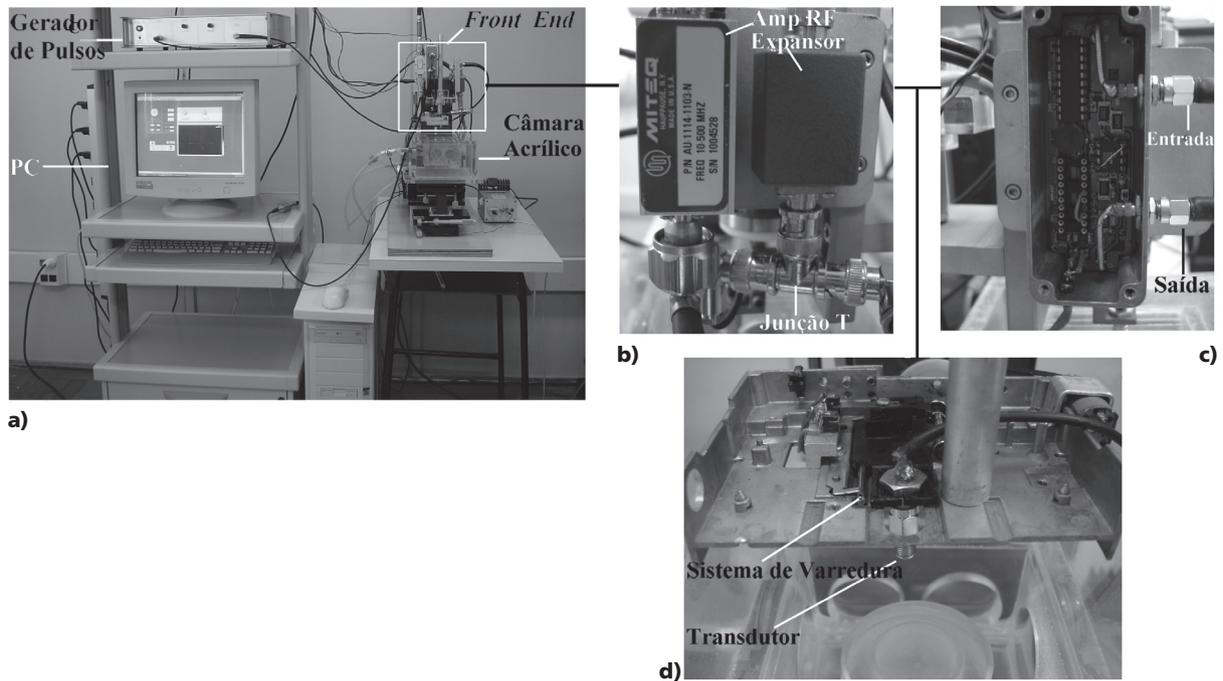


Figura 7. Sistema de BMU montado: a) microcomputador e gerador de pulsos (acima); b) pré-amplificador com limitador de tensão incorporado (esquerda) e expansor de diodos (direita); c) amplificador logarítmico; d) transdutor acoplado ao sistema de varredura. **Figure 7.** UBM assembled system: a) PC and pulse generator (top); b) RF amplifier with voltage limiter (left) and diode expander (right); c) logarithmic amplifier; d) transducer and beam-scanning block.

Tabela 1. Medidas obtidas a partir da resposta pulso-eco proveniente de uma interface água-safira (F: frequência do pulso de excitação). **Table 1.** Measurements obtained from the pulse-echo response originating at the water-sapphire interface (F: excitation wave frequency).

F [MHz]	$\bar{\lambda}$ [μm]	BW [MHz]	R_{ax} [μm]	R_{ax} [μm]	DOF [μm]
40	32,39	31	24,0	35,3	269
50	29,80	33	22,6	32,5	248
60	29,80	34	21,9	32,5	248
65	28,11	35	21,3	30,6	234
68	27,59	37	20,1	30,1	229
72	26,14	41	18,2	28,5	217
73	27,59	43	17,3	30,1	229

mento) prestam-se: à confecção de novos transdutores com uma distância focal maior (próxima a 5 mm), a fim de visualizar estruturas mais profundas; ao aprimoramento do sistema eletromecânico de varredura do feixe de US para permitir a geração de imagens em tempo real (sendo necessária uma velocidade de varredura que proporcione 10 quadros/s, o que não se conseguiu nas condições atuais) e para evitar as vibrações ocasionadas pelo sistema atual.

Dois novos sistemas de varredura estão sendo implementados, um com varredura do tipo setorial e outro que inclui um transdutor em forma de catéter para estudos endoluminares, o qual permitirá

gerar imagens radiais, sendo nesse caso necessário introduzir algumas modificações no *software* para a reconstrução deste tipo de imagem.

Uma melhor diferenciação das diversas estruturas presentes nos tecidos pode ser conseguida realizando-se adicionalmente algum tipo de processamento digital nos quadros de imagem, que melhor se adaptem ao tipo de amostra estudada.

Mesmo sem a introdução destas melhorias no sistema, as resoluções conseguidas permitiram visualizar na imagem estruturas pequenas, como dimensões da ordem de 50 μm , tanto no caso de *phantoms* como no de tecidos biológicos.

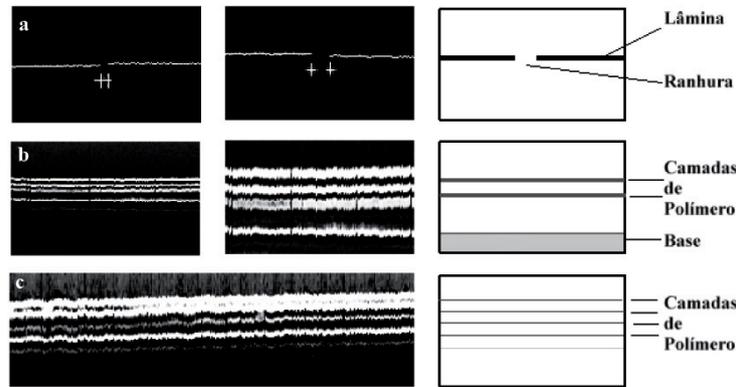


Figura 8. Imagens de *phantoms*: a) *phantom* de aço com ranhura de espessura variável para medição de R_{lat} , 80 μm (lado esquerdo) e 200 μm (centro); b) *phantom1* construído com camadas de polímero de 110 μm de espessura para medição de R_{ax} (lado esquerdo) e zoom (centro) – as três linhas superiores correspondem às interfaces entre as camadas do *phantom*, e a linha inferior ao disco de safira utilizado como base; c) *phantom2* construído com camadas de polímero de 50 μm de espessura para medição de R_{ax} (zoom). No lado direito é apresentado um diagrama de cada um dos *phantoms*. **Figure 8.** Phantom images: a) “V” shape steel phantom with variable thickness gap for R_{lat} measurement, 80 μm gap (left side) and 200 μm gap (center); b) phantom1 constructed with 110 μm thickness polymer layers, for R_{ax} measurement (left side) and zoom (center) – the three top lines are from the layer’s interfaces and the bottom line is from the base sapphire disc; c) phantom2 constructed with 50 μm thickness polymer layers, used in the R_{ax} measurements (zoom). In the right side is present a design for each phantom.

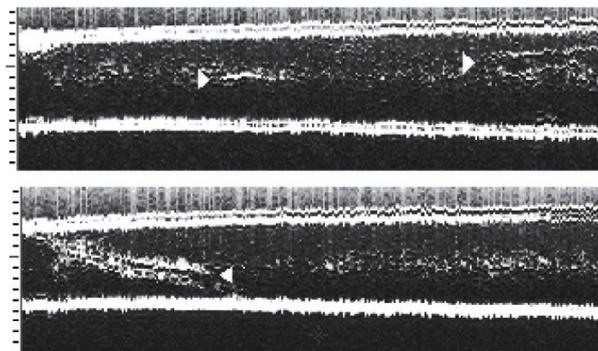


Figura 9. Imagens de fígado de rato *in vitro* onde as setas indicam a presença de vasos sangüíneos, sendo possível diferenciar parede e lúmen dos mesmos. Nos dois casos as linhas hiperecóicas superiores e inferiores pertencem ao filme de PVC e ao disco de safira respectivamente, utilizados para fixar a posição dos tecidos. O espaçamento entre marcadores verticais (à esquerda) é de 100 μm . **Figure 9.** *In vitro* mouse liver images, where the arrows indicate the blood vessels in the tissue, being possible to differentiate the wall from the vessels’ lumen. In the two pictures, the top and bottom bright lines belong to the PVC film and sapphire disc respectively, used for tissue anchorage. The separation between vertical cursors (left side) is 100 μm .

Conclusão

No presente trabalho foi montado um sistema para geração de imagens por BMU. O mesmo pode operar numa faixa de frequências entre 35 e 75 MHz aproximadamente.

As resoluções axiais e laterais mínimas medidas a partir dos espectros dos sinais refletidos por uma

interface água/safira foram de 17 e 28 μm respectivamente, enquanto os valores de DOF variaram entre 217 e 270 μm .

Do ponto de vista experimental, foi possível a obtenção de imagens tanto de *phantoms* como de tecidos de rato *in vitro*. As R_{ax} e R_{lat} conseguidas experimentalmente na imagem, foram da ordem de 50 e 80 μm

respectivamente. Este nível de resolução é satisfatório para um grande número de aplicações nas quais o sistema visa ser utilizado.

A taxa de atualização de imagem atingida é próxima a 2 quadros/s, não permitindo a visualização da imagem em tempo real, porém esta velocidade é suficiente para os estudos *in vitro* atualmente propostos.

Agradecimentos

Ao CNPq pela bolsa de mestrado concedida e pelo apoio financeiro para a construção do sistema de biomicroscopia ultra-sônica.

Referências Bibliográficas

Chaggares, N.C., Tang, R.K., Sinclair, A.N. (1999), "Protection circuitry and time resolution in high frequency ultrasonic NDE", *IEEE Ultrasonics Symposium*, Lake Tahoe, v. 1, p. 819-822, 17-21 Oct.

Fish, P. (1990), *Physics and Instrumentation of Diagnostic Medical Ultrasound*, Chichester: John Wiley & Sons.

Foster, F.S., Lockwood, G.R., Ryan, L.K., Harasiewicz, K.A., Berube, L., Rauth, A.M. (1993), "Principles and applications of ultrasound backscatter microscopy", *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, v. 40, n. 5, p. 608-617.

Foster, F.S., Pavlin, C.J., Harasiewicz, K.A., Christopher, D.A., Turnbull, D.H. (2000), "Advances in ultrasound biomicroscopy", *Ultrasound in Medicine & Biology*, v. 26, n. 1, p. 1-27.

Foster, F.S., Zhang, M.Y., Duckett, A.S., Cucevic, V., Pavlin, C.J. (2003), "In vivo imaging of embryonic development in the mouse eye by ultrasound biomicroscopy", *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, v. 44, n. 6, p. 2361-2366.

Kondabolu, S., Khan, S., Whyard, J., Diblasio, C., Ayyala, M., Pentylala, S. (2004), "The role of endoluminal ultrasonography in urology: current perspectives", *International Brazilian Journal of Urology*, v. 30, n. 2, p. 96-101.

Liu, A., Joyner, A.L., Turnbull, D.H. (1998), "Alterations of limb and brain patterning in early mouse embryos by ultrasound-guided injection of Shh-expressing cells", *Mechanisms of Development*, v. 75, n. 1-2, p. 107-115.

Lockwood, G.R., Hunt, J.W., Foster, F.S. (1991), "The design of protection circuitry of high-frequency ultrasound imaging systems", *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, v. 38, n. 1, p. 48-55.

Machado, J.C., Foster, F.S., Gotlieb, A.I. (2002), "Measurement of the ultrasonic properties of human coronary arteries in vitro with a 50 MHz acoustic microscope", *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 35, n. 8, p. 895-903.

Okamoto, H., Watanabe, K., Nagatomo, A., Kunikane, H., Aono, H., Yamagata, T., Kase, M. (2002), "Endobronchial ultrasonography for mediastinal and hilar lymph node metastases of lung cancer", *Chest*, v. 121, n. 5, p. 1498-1506.

Pavlin C.J., Foster F.S. (1995), *Ultrasound Biomicroscopy of the Eye*, New York: Springer-Verlag.

Raju, B.I., Swindells, K.J., Gonzalez, S., Srinivasan, M.A. (2003), "Quantitative ultrasonic methods for characterization of skin lesions in vivo", *Ultrasound in Medicine & Biology*, v. 29, n. 6, p. 825-838.

Rosa, I. (2003), *Modelagem e Otimização de Sistemas Ultra-Sônicos Pulso-Eco para Altas Frequências Utilizadas em Biomicroscopia*, Projeto Final de Graduação, Departamento de Eletrônica e de Computação, Escola de Engenharia, UFRJ, Rio de Janeiro, 39 p., Mai.

Rothbaum, D.L., Roy, J., Mustufa, T., Snook, K.A., Cannata, J.M., Chen, W.H., Hager, G.D., Taylor, R.H., Shung, K.K., Whitcomb, L.L., Francis, H.W., Niparko, J.K. (2004), "High-resolution ultrasonography of the cochlea", In: http://robotics.me.jhu.edu/~llw/ps/US_of_the_Cochlea.pdf, acessado em 03 de maio de 2007.

Senoh, D., Yanagihara, T., Akiyama, M., Ohnishi, Y., Yamashiro, C., Tanaka, H., Hayashi, K., Hata, T. (1999), "Laparoscopy-assisted intrapelvic sonography with a high-frequency, real-time miniature transducer for assessment of the Fallopian tube: a preliminary report", *Human Reproduction*, v. 14, n. 3, p. 704-706.

Sherar, M.D., Foster, F.S. (1989), "The design and fabrication of high frequency poly (vinylidene fluoride) transducers", *Ultrasonic Imaging*, v. 11, n. 2, p. 75-94.

Soldan, M., Machado, J.C., Pereira, F.R., Rodriguez, M.A.B., Vieira, T.P.P. (2004), "Biomicroscopia ultra-sônica aplicada a caracterização de esôfago", In: *Anais do XIX Brazilian Congress on Biomedical Engineering, III Congresso Latino Americano de Engenharia Biomédica [CLAEB'2004]*, João Pessoa, p. 1603-1606, 22-25 Sep.

Töyräs, J., Nieminen, H.J., Laasanen, M.S., Nieminen, N.T., Korhonen, R.K., Rieppo, J., Hirvonen, J., Helminen, H.J., Jurvelin, J.S. (2002), "Ultrasonic characterization of articular cartilage", *Biorheology*, v. 39, n. 1-2, p. 161-169.

Turnbull, D.H., Bloomfield, T.S., Baldwin, H.S., Foster, F.S., Joyner, A.L. (1998), "Ultrasound backscatter microscope analysis of early mouse embryonic brain development", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 92, n. 6, p. 2239-2243.

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., Laceyfield, J.C. (2005), "A new three-dimensional ultrasound microimaging technology for preclinical studies using a transgenic prostate cancer mouse model", *Cancer Research*, v. 65, n. 14, p. 6337-6345.

Zhou, Y.Q., Foster, F.S., Qu, D.W., Zhang, M.Y., Harasiewicz, K.A., Adamson, S.L. (2002), "Applications for multi-frequency ultrasound biomicroscopy in mice from implantation to adulthood", *Physiological Genomics*, v. 10, n. 2, p. 113-126.