

Artigo Original

Recebido em 03/04/2006 e aceito em 16/11/2006

Caracterização da periodicidade de tecido hepático humano saudável *in vitro* usando sinais de ultra-som

Characterization of in vitro healthy human liver tissue periodicity using ultrasound signals

Christiano Bittencourt Machado*

Wagner Coelho de Albuquerque Pereira

Programa de Engenharia Biomédica – COPPE/UFRJ

Caixa Postal: 68510 – CEP: 21941-972

Rio de Janeiro – RJ, Brazil

Telefone: +55 21 2562-8630 – Fax : +55 21 2562-8591

e-mail: cbm@peb.ufrj.br

Mahmoud Meziri

Département de Physique

Université Badji Mokhtar, BP 12

Annaba, Algérie

Pascal Laugier

Laboratoire Imagerie Paramétrique

Université de Paris VI UMR 7623

Paris, France

*autor para correspondência

Resumo

A ultra-sonografia é amplamente usada na medicina para o diagnóstico de diversas doenças. Entretanto, o ultra-sonografista pode não identificar certos aspectos da estrutura tissular, levando a prognóstico e propedêutica inadequados. Sendo assim, a extração de parâmetros quantitativos do sinal retroespalhado seria de grande valia. O espaçamento médio entre espalhadores (*Mean Scatterer Spacing* – MSS) é um parâmetro que vem sendo estudado, podendo ser estimado por métodos de análise espectral. Sabe-se que o tecido hepático apresenta uma estrutura *quasi*-periódica, formada por células que se agrupam em placas, os lóbulos hepáticos (aproximadamente 1 mm de largura). O presente trabalho compara a aplicação dos métodos autocorrelação espectral (SAC), análise do espectro singular (SSA) e a transformação quadrática do sinal (proposto por Simon *et al.*) em sinais retroespalhados de US para caracterizar a periodicidade de tecido hepático humano *in vitro*, usando como parâmetro o MSS. Foram coletadas cinco amostras de tecido, e 300 sinais de ultra-som de cada uma. Para cada sinal, foram utilizados os três métodos para estimar o MSS. Ao se construir histogramas das estimativas, percebe-se um padrão entre as amostras de tecido. As médias entre os métodos não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) segundo a *one-way* ANOVA, e os intervalos de confiança (95%) para a média do MSS foram: SAC: $0,98 < MSS < 1,12$; SSA: $1,00 < MSS < 1,13$; SIMON: $0,96 < MSS < 1,13$. Conclui-se que não houve diferenças significativas entre as estimativas dos métodos, e o valor de MSS estimado é compatível com o relatado em literatura.

Palavras-chave: Ultra-som, Periodicidade, MSS, Tecido hepático, Caracterização tecidual.

Abstract

Ultrasonography is widely used in medicine in the diagnosis of several diseases. Nevertheless, the ultrasonographer may not detect certain aspects of tissue structure, leading to inadequate prognostics and propedeutics. Thus, the extraction of quantitative parameters from backscattered ultrasound signals would be valuable. The mean scatterer spacing (MSS) is a parameter which has been studied, basically by spectral analysis methods. It is known that hepatic tissue presents a quasi-periodic structure, formed by cells clustered in plaques, the hepatic lobules (approximately 1 mm wide). This work aims to compare three spectral analysis methods: spectral autocorrelation (SAC), singular spectrum analysis (SSA) and the signal quadratic transformation (proposed by Simon *et al.*), in the characterization of *in vitro* healthy human liver tissue periodicity using ultrasound signals. Three hundred samples of ultrasound backscattered signals from five tissue specimens were collected. For each signal, it was applied the three methods to estimate MSS. By constructing histograms, it can be identified some patterns among tissue samples. The mean values among methods did not show significant difference ($p > 0.05$), and the confidence intervals (95%) for MSS average values were: SAC: $0.98 < MSS < 1.12$; SSA: $1.00 < MSS < 1.13$; SIMON: $0.96 < MSS < 1.13$. It was concluded that there were no significant differences among the methods, and the estimated MSS value is compatible to that reported in literature.

Keywords: Ultrasound, Periodicity, MSS, Hepatic tissue, Tissue characterization.

Extended Abstract

Introduction

B-mode ultrasonography is an important diagnostic tool that provides images for the qualitative assessment of the insonified tissue (Fish, 1990). However, according to Wells (2000), the ultrasonographer needs a high level of skill to correctly interpret the image displayed. For this reason, vital information can be lost, like initial stages of a disease (Yeh et al., 2003).

In order to collect quantitative information about tissue structure, the mean scatterer spacing (MSS) is one of the ultrasonic parameters studied to characterize tissue periodicity (Shung et al., 1992). Several spectral analysis methods have been proposed to estimate this parameter. Some examples are spectral autocorrelation (SAC) (Varghese and Donohue, 1993; 1994; 1995), a quadratic transformation of the RF signal (henceforth called SIMON) (Simon et al., 1997) and the singular spectrum analysis (SSA) (Pereira and Maciel, 2001; Pereira et al., 2002).

The hepatic tissue structure shows an interesting pattern: hepatic cells clustered in plaques, forming the hepatic lobules, which are spatially regularly distributed. This periodicity may change in the presence of disease, mainly because of tissue fibrotic infiltration (fibrinogenesis) (Pinzani and Rombouts, 2004; Schuppan and Porov, 2002).

This work aims to compare the spectral analysis methods SAC, SSA and SIMON in the characterization of *in vitro* healthy human liver tissue periodicity using ultrasound signals. These methods have demonstrated robustness in MSS estimations of nylon-wire, sponge phantoms and hepatic tissue (Pereira and Maciel, 2001; Pereira et al., 2002; Pereira et al., 2004).

Materials and Methods

Twenty one specimens of human liver were obtained during hepatectomy. As a preparation before ultrasonic measurements, they were degassed and mounted on a polished steel plate beneath a thin plastic membrane, and then placed in a saline-filled box maintained between 25 °C and 37 °C by immersing it in a larger heated water bath (Figure 6) (Meziri et al., 2005).

After ultrasonic measurements, histological sections were prepared for each measured region of the liver. They were then reviewed without knowledge of the ultrasound findings to class tissue according to fibrosis degree. In this study, it was used five healthy samples.

A 20 MHz broadband transducer was utilized (Panametrics

M316, 20 MHz, 0.125" diameter, 0.75" focal length, bandwidth at 6 dB from 6 to 30 MHz, 460 μm -6 dB spatial resolution) for signal collection. For each healthy specimen, it was collected 300 samples of ultrasound signals. For each signal, it was utilized SAC, SSA and SIMON to estimate MSS.

The methods were implemented in MATLAB (Mathworks Inc., USA). The software processes all the RF signals, obtaining a MSS estimate for each RF signal envelope. For each specimen it was built three histograms of estimates, related to each method.

An one-way ANOVA was utilized in order to verify a possible difference among the methods. The Levene's statistics has been applied to be sure that the variances can be considered equal. The 95% confidence intervals were calculated for each method. All statistical analyses were made in SPSS (SPSS Inc.).

Results

It can be observed that the histograms present some consistent patterns in all samples, like data distribution and modes (Figure 7). Tables 1, 2 and 3 show average MSS results for the three methods (SAC, SSA and SIMON). The MSS values converge to approximately 1 mm, as reported by literature.

The Levene's statistics calculated was 0.38 ($p = 0.69$), showing no differences among group variances. One-way ANOVA results are depicted in Table 4. It can be seen that there is no difference among methods ($p = 0.75 > 0.05$). Confidence intervals for MSS mean values are shown in Table 5.

Discussion

The MSS estimates for healthy hepatic tissue are in agreement with the values reported by literature (Fellingham and Sommer, 1984). Machado et al. (2004) have already identified these results with SSA and SIMON. Although it is not known the real MSS value, the three methods find similar results, suggesting a well defined pattern.

The outliers were excluded from average value calculation, since some biases were detected in the peak identification process. The MSS mean values were used as representative of the MSS for each sample. However, it could be used other forms to express periodicity, like histogram modes.

The statistical analysis shows no significant differences among methods estimates, and the confidence intervals for the mean present a trend towards 1 mm. Although there is a few number of specimens, these preliminary results are promising.

Introdução

A ultra-sonografia apresenta uma grande aplicabilidade diagnóstica, sendo considerada como exame “padrão-ouro” em muitas patologias que causam alterações histológicas (Fish, 1990). Portanto, para elaborar o diagnóstico clínico, o ultra-sonografista tem à sua disposição informações qualitativas sobre a anatomia normal (contornos dos órgãos) ou de massa parenquimatosa anormal (como abscessos, hematomas, cistos), fruto das diferenças de impedância acústica entre os tecidos. A granulação da imagem (*speckle*), que é uma característica de sistemas que usam fontes coerentes, também possui importância fundamental, estando relacionada com a estrutura celular do tecido interrogado (Burckhardt, 1978; Hottier e Bernatets, 1984).

No entanto, informações que poderiam ser de suma importância para a elaboração de um diagnóstico, conduta de tratamento e prognóstico adequados, podem estar mascaradas no sinal de radiofrequência (RF) retroespalhado. Como há uma grande variação nas características acústicas do meio biológico, torna-se difícil tanto a realização de medidas acuradas quanto a descrição dos mecanismos de interação onda-meio, responsáveis pelas características acústicas observadas (Duck *et al.*, 1998; Yeh *et al.*, 2003). De acordo com Wells (2000), o ultra-sonografista precisa ter um alto nível de habilidade na aquisição e interpretação da imagem.

Com o intuito de superar essa limitação, pesquisadores têm investigado métodos quantitativos para avaliar o sinal ecográfico, com o objetivo de extrair parâmetros relacionados às propriedades dos espalhadores no meio de propagação da onda de ultra-som (US). Dentre os parâmetros estudados, como os coeficientes de atenuação, retroespalhamento e reflexão, ou mesmo distribuição de espalhadores, o espaçamento médio entre espalhadores (MSS – *Mean Scatterer Spacing*) tem demonstrado potencial no reconhecimento de variações na periodicidade tecidual (Shung *et al.*, 1992). A regularidade entre os espalhadores pode ser identificada como uma determinada frequência relacionada ao MSS, no espectro. Devido a fatores como a banda passante do transdutor e irregularidades da estrutura do tecido, apenas a frequência fundamental e/ou a primeira harmônica estão presentes no sinal de US, o que torna necessário o desenvolvimento de técnicas que forneçam estimativas robustas, mesmo na presença de certo grau de irregularidade na treliça tecidual.

Vários métodos de análise espectral já foram propostos, com o objetivo de fazer uma análise mais detalhada da informação contida no eco recebido de

um meio biológico. Dentre elas, menciona-se, como exemplo, a função de Autocorrelação (AR – *Autocorrelation function*) (Fellingham e Sommer, 1984); *Cepstrum* (Landini e Verrazzani, 1990); função de Autocorrelação Espectral (SAC – *Spectral Autocorrelation*) (Varghese e Donohue, 1993; 1994; 1995); transformação quadrática do sinal RF, que doravante será denominado método SIMON (Simon *et al.*, 1997); transformadas *Wavelet* (Tang e Abeyratne, 2000); Espectro Generalizado (Donohue *et al.*, 2001); e a Análise do Espectro Singular (SSA – *Singular Spectrum Analysis*) (Pereira e Maciel, 2001; Pereira *et al.*, 2002). Conforme estudo de Kauati (2003), SSA, SAC e SIMON apresentam resultados satisfatórios quanto às estimativas de MSS, quando aplicados a sinais simulados e provenientes de corpos de prova (*phantoms*) simples (compostos de fios de nylon ou esponjas).

No campo da caracterização tecidual por US, o tecido hepático é muito atraente, uma vez que apresenta uma estrutura *quasi*-periódica, formada basicamente por células hepáticas que se agrupam em placas, formando os lóbulos hepáticos (massas poliédricas hexagonais). Tal periodicidade é alterada, como por exemplo, em cirroses e tumores (Pinzani e Rombouts, 2004; Schuppan e Porov, 2003). Por conseguinte, caracterizando-se essa estrutura em seu estado normal, pode-se obter uma referência para uma possível diferenciação entre tecidos normais e anormais.

O presente trabalho compara a aplicação dos métodos SAC, SIMON e SSA a sinais retroespalhados de US para caracterizar a periodicidade de tecido hepático sadio humano *in vitro*, usando como parâmetro o MSS. Esses métodos já foram utilizados com *phantoms* de fios de nylon com espaçamento de 0,8 e 1,2 mm e de esponjas com diferentes tamanhos de poros, mostrando consistência nas estimativas (Kauati, 2003; Pereira e Maciel, 2001; Pereira *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2004). Será apresentada, *a priori*, uma breve explanação teórica dos métodos de análise espectral utilizados. Em seguida, serão abordados os materiais e métodos, resultados, discussão e conclusão do estudo em questão.

Fundamentação Teórica dos Métodos

A Figura 1 representa a propagação da onda de US através de um meio composto de espalhadores regulares e difusos. Considerando que o tecido apresenta uma treliça *quasi*-periódica, as distâncias entre os espalhadores regulares serão aproximadamente iguais, e isso estará marcado no sinal RF recebido, como periodicidades separadas por um tempo t aproximadamente constante. Ao calcular o espectro do sinal, a frequência relativa

a essa periodicidade estará presente, mesmo que não claramente visível (o que ocorre quase sempre). Daí a importância dos métodos de análise espectral capazes de detectar essa frequência. Assim, o MSS pode ser calculado de forma simples, pela seguinte equação:

$$MSS = c / 2f \tag{1}$$

onde c é a velocidade de propagação do US no meio, e f é a frequência de máxima amplitude no espectro (correspondente, a princípio, à periodicidade do meio).

A seguir, serão apresentadas as bases teóricas dos três métodos escolhidos para esse trabalho: SAC, SSA e SIMON.

Autocorrelação espectral (SAC) – O método SAC fornece estimativas de MSS que usam informação de fase para reduzir a degradação causada pelos efeitos do sistema e pela presença de espalhadores difusos. Consiste em gerar uma matriz de autocorrelação com a FFT da envoltória do sinal RF desejado (matriz SAC). Varghese e Donohue (1993; 1994; 1995) demonstraram que não há influência de espalhadores difusos nas diagonais laterais da matriz SAC. Por isso, somente informação relacionada com os espalhadores regulares está presente.

A função SAC é definida como:

$$S(f_1, f_2) = E[Y(f_1)Y^*(f_2)] \tag{2}$$

onde Y é a FFT do segmento janelado do sinal, centrado em t segundos, e Y^* é seu conjugado complexo. A diagonal do plano bifrequencial da função SAC, definida por $f_1 = f_2$, é equivalente à função densidade espectral

de potência (*Power Spectral Density function – PSD*).

Para estimar o MSS, identifica-se a frequência relativa ao pico de máxima amplitude das diagonais laterais ($f_1 \neq f_2$) da matriz SAC (Figura 2), sendo esta constituída pela envoltória do sinal RF.

Análise do Espectro Singular (SSA) – A SSA (*Singular Spectrum Analysis*) é baseada na Análise de Componentes Principais (PCA – *Principal Component Analysis*). A envoltória do sinal RF de N pontos é expandida com respeito a uma nova base ortonormal composta de M vetores, chamados autovetores (E^k), onde $1 \leq k \leq M$.

Os vetores E^k são obtidos da diagonalização da matriz de correlação C_x do sinal com N pontos. Inicialmente forma-se uma matriz $M \times (N-M+1)$, movendo uma janela de M pontos ao longo do sinal original de RF (com N pontos), sendo $M < N$. Depois estima-se a matriz de covariância C_x ($M \times M$), multiplicando a matriz original pela sua transposta (Figura 3). O sinal pode então ser descrito como:

$$x_{i+j} = \sum_{k=1}^M a_j^k E^k \tag{3}$$

onde os coeficientes a^k são chamados de Componentes Principais; i varia de 1 a $N-M+1$, e $1 \leq j \leq M$.

Vautard e Ghil (1989) mostraram que a presença de autovalores com valores próximos o suficiente para serem identificados como “pares” estão associados com um componente periódico do sinal. Os passos para selecionar os autovalores são: (1) os autovalores são organizados em ordem decrescente e somados; (2) quando a soma alcançar 98% da variância total dos

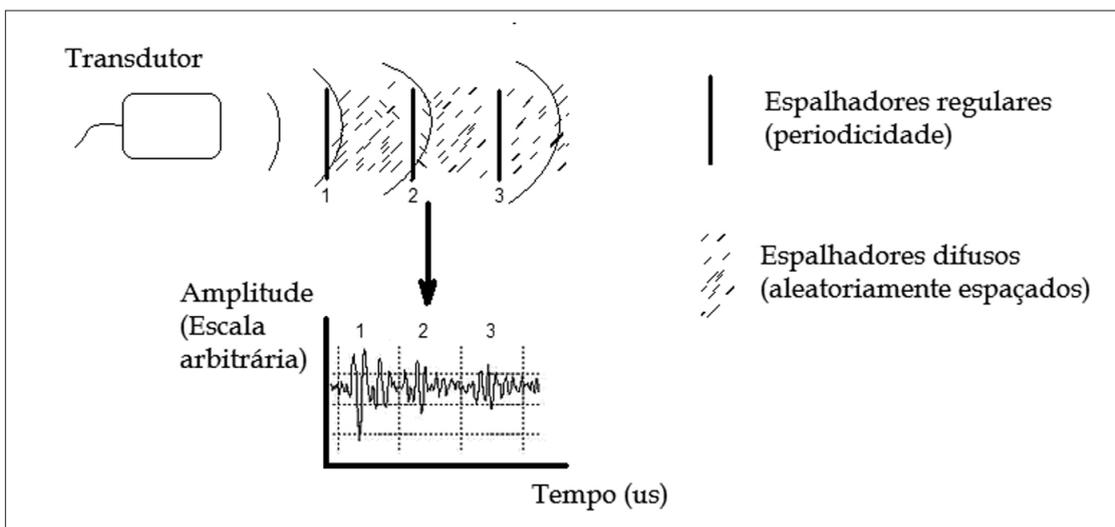


Figura 1. Propagação da onda de US em um meio composto por espalhadores regulares e difusos. A informação da periodicidade está sempre presente no sinal RF (números 1, 2 e 3). **Figure 1.** US wave propagation in a medium composed of regular and diffuse scatterers. The periodicity information is always present in the RF-signal (numbers 1, 2 and 3).

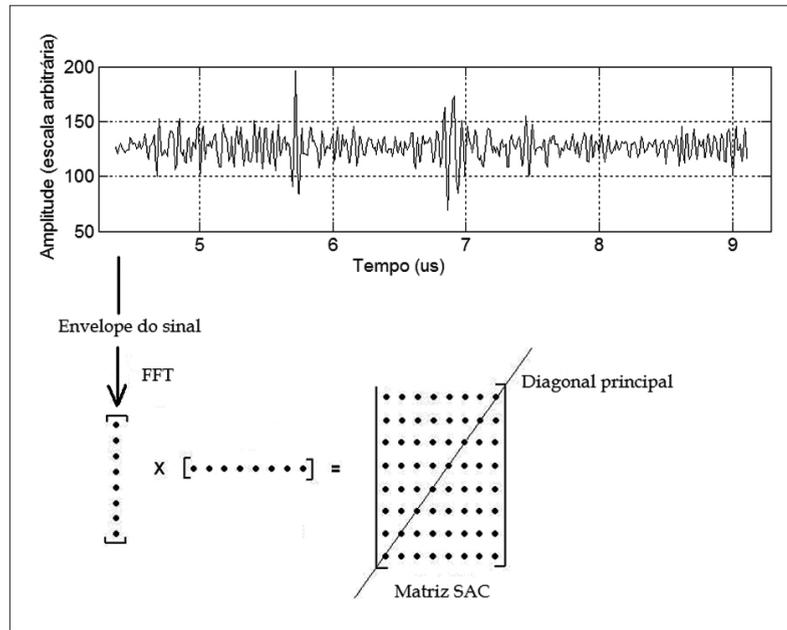


Figura 2. Processo de construção da matriz SAC: realiza-se a FFT da envoltória do segmento do sinal (vetor-coluna) e multiplica-se pelo seu transposto (vetor-linha), obtendo-se uma matriz quadrada (a origem dos eixos de frequência é na posição inferior esquerda da matriz). As diagonais laterais possuem somente informação dos espalhadores regulares. **Figure 2.** Construction process of SAC matrix: it is calculated the FFT of the signal segment envelope (column vector) and then it is multiplied by its transpose (line vector), obtaining a square matrix (the frequency axis origin is on the lower-left position). The off-diagonals have only information of regular scatterers.

dados, os autovalores remanescentes são excluídos; (3) os pares de autovalores somente são aceitos quando os picos dos espectros de seus respectivos autovetores são separados por não mais do que 2,5%, e a forma das curvas no tempo apresentarem uma autocorrelação de, no mínimo, 0,60. Esse valor de autocorrelação é um critério heurístico, escolhido durante o desenvolvimento do trabalho. Para *phantoms* de fios de nylon e esponjas, foi utilizado o valor de 0,80 (Pereira e Maciel, 2001; Pereira *et al.*, 2002; 2004). Porém, em sinais de fígado (mais complexos), os métodos identificaram picos em frequências que não condiziam com a periodicidade esperada. Uma vez diminuída a autocorrelação, os resultados foram consistentes.

Após a escolha dos pares, o componente periódico do sinal pode ser reconstruído (equação 3). Finalmente, a FFT do sinal resultante é realizada, e a frequência do pico de maior amplitude no espectro é identificada para a estimativa do MSS (Equação 1).

Método de SIMON – Esse método explora a redundância espectral de sinais periódicos, aplicando uma transformação quadrática no domínio do tempo (Simon *et al.*, 1997). A técnica consiste em três passos básicos, ilustrados na Figura 4: (1) elevar a envoltória do

sinal RF ao quadrado; (2) realizar a FFT do resultado; e (3) procurar o pico espectral dentro de uma janela, onde se espera encontrar a frequência relativa à periodicidade. O MSS é então calculado, com a frequência relativa ao pico, aplicando-se a equação 1.

Esse método requer uma janela espectral para identificar o pico relativo à periodicidade do meio, enquanto SSA e SAC não. Porém, uma janela foi aplicada para todos os métodos (0,5 – 2,2 mm), tendo em vista que o MSS de um tecido hepático normal é aproximadamente 1 mm (Fellingham e Sommer, 1984). A justificativa desse procedimento é apresentada na seção Discussão.

Materiais e Métodos

Os sinais foram coletados no *Laboratoire d'Imagerie Paramétrique* (Université de Paris, França). Vinte amostras de tecido hepático humano foram obtidas durante hepatectomia. Após o procedimento, os espécimes foram imediatamente congelados a -20 °C e estocados a essa temperatura, até o momento do experimento. Neste trabalho, apenas as amostras saudáveis ($n = 5$) foram utilizadas. Para a análise histológica, as mesmas foram fixadas (4% formalina), cortadas em seções de 5 μm

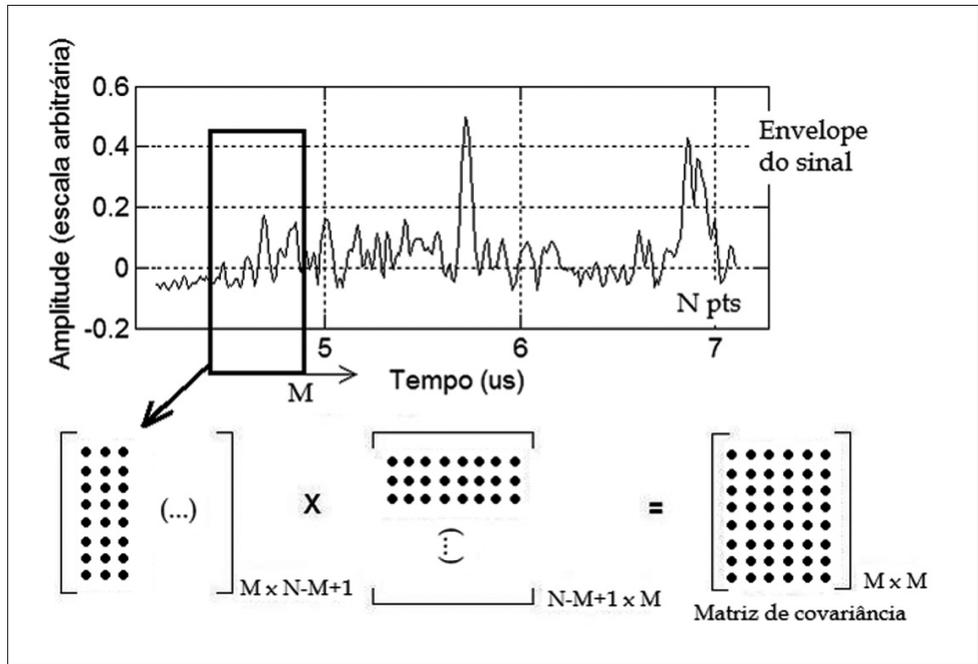


Figura 3. Processo de construção da matriz de covariância no método SSA: uma janela de M pontos desliza sobre a envoltória do sinal RF, formando uma matriz $M \times N-M+1$, e multiplica-se pela matriz transposta para encontrar a matriz quadrada $M \times M$, ou matriz de covariância do sinal. **Figure 3.** Construction process of covariance matrix in SSA method: a M-point window slides over the RF signal envelope, obtaining a $M \times N-M+1$ matrix, which is multiplied it by its transpose to find a $M \times M$ square matrix, called signal covariance matrix.

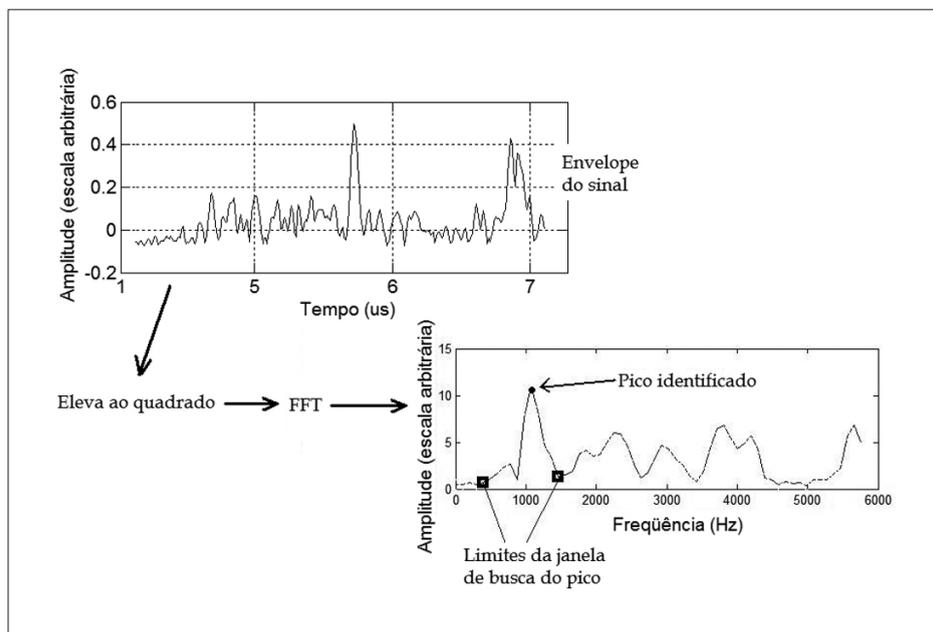


Figura 4. Identificação da periodicidade usando o método SIMON: eleva-se a envoltória do sinal RF ao quadrado. Em seguida realiza-se a FFT. O pico é identificado impondo-se uma janela na região espectral onde se espera encontrar o padrão periódico. **Figure 4.** Periodicity identification using SIMON method: the RF signal envelope is squared. After that it is made the FFT. The peak is identified imposing a window over the region where it is expected to find the periodic pattern.

de espessura e coloradas para a graduação da fibrose e atividade necrótico-inflamatória. As lâminas para o microscópio eletrônico foram preparadas de acordo com as técnicas de pigmentação de *picroSirius*, Gordon e Sweets e Perls (Kael e Korula, 2005).

Para as medidas ultra-sônicas, as amostras foram deixadas à temperatura ambiente até serem descongeladas naturalmente. Fatias de 0,5 cm de espessura foram então cuidadosamente cortadas, para assegurar uniformidade na espessura e superfícies paralelas.

Cada amostra foi degaseificada por 25 – 30 min a baixa pressão, enquanto imersa em uma cuba contendo solução salina fisiológica. Antes da aquisição, a amostra e a água salina foram levemente aquecidas a uma temperatura média de 35 ± 2 °C. Uma placa de aço plana e polida foi colocada abaixo do tecido, e uma fina membrana plástica acima. A cuba foi imersa em um tanque acústico com a mesma temperatura (Figura 5) (Meziri *et al.*, 2005).

Foi utilizado um transdutor de 20 MHz de frequência central (Panametrics® M316, EUA; 3,2 mm de diâmetro, 19 mm de distância focal, largura de banda de 6 a 30 MHz a 6 dB). Este foi posicionado acima do refletor plano, a uma distância igual à distância focal do transdutor. A orientação do feixe foi perpendicular ao refletor plano (ajustada mediante a maximização da amplitude do sinal refletido). O transdutor de US foi deslocado horizontalmente em passos de 1 mm. A cada localização do transdutor, o sinal RF era recebido e amplificado (Sofranel 5052 PRX, França), digitalizado a uma frequência de amostragem de 100 MHz, utilizando um osciloscópio (LeCroy 9350AL, 500 MHz), e então transferido a um microcomputador para posterior processamento.

Em cada posição do transdutor, o osciloscópio realizava automaticamente uma média no tempo no sinal RF ($n = 128$), para melhorar a relação sinal-ruído. O procedimento descrito anteriormente foi repetido para todas as amostras ensaiadas. A Figura 6 mostra um exemplo de sinal RF proveniente de tecido hepático normal e seu espectro de potência. Foram coletados 300 sinais ultra-sônicos de cada amostra.

A velocidade do US através da amostra foi estimada com três medidas consecutivas de tempo pulso-eco: (1) o tempo de trânsito do transdutor até a placa de aço com ($t_{c/a}$) e sem ($t_{s/a}$) a amostra; (2) o tempo de trânsito t_i do transdutor até a interface tecido/água; e (3) a velocidade conhecida da solução salina fisiológica (v_{s0}). A equação utilizada foi:

$$v_{\text{fígado}} = v_{s0} \left(\frac{t_{s/a} - t_i}{t_{c/a} - t_i} \right) \quad (4)$$

onde $v_{\text{fígado}}$ é a velocidade do US na amostra.

A amplitude máxima dos sinais recebidos foi usada para definir o tempo de trânsito. Um valor de velocidade representativo de cada espécime foi obtido, a partir da média dos valores obtidos em cada ponto da varredura do transdutor.

Todos os métodos de análise espectral foram implementados em MATLAB® (MathWorks Inc., EUA), de forma a tratar cada sinal individualmente (observando seu comportamento passo a passo), ou vários provenientes da mesma amostra (300 sinais RF), para construir os histogramas das estimativas (41 classes, largura de 0,03 mm). A média do histograma foi usada como sendo o valor representativo de cada amostra. Os valores extremos dos dois lados dos histogramas (*outliers*) se referem a uma limitação do algoritmo em

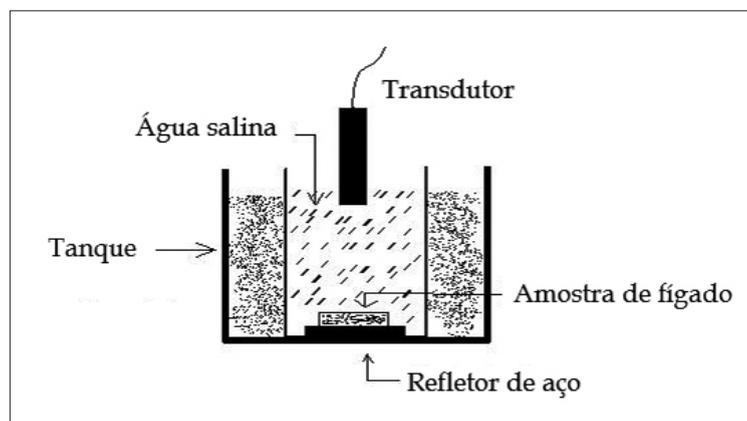


Figura 5. Desenho ilustrativo mostrando o procedimento de coleta dos sinais de US provenientes das amostras de tecido hepático. **Figure 5.** Illustrative drawing showing the data collection procedure of US signals from hepatic tissue samples.

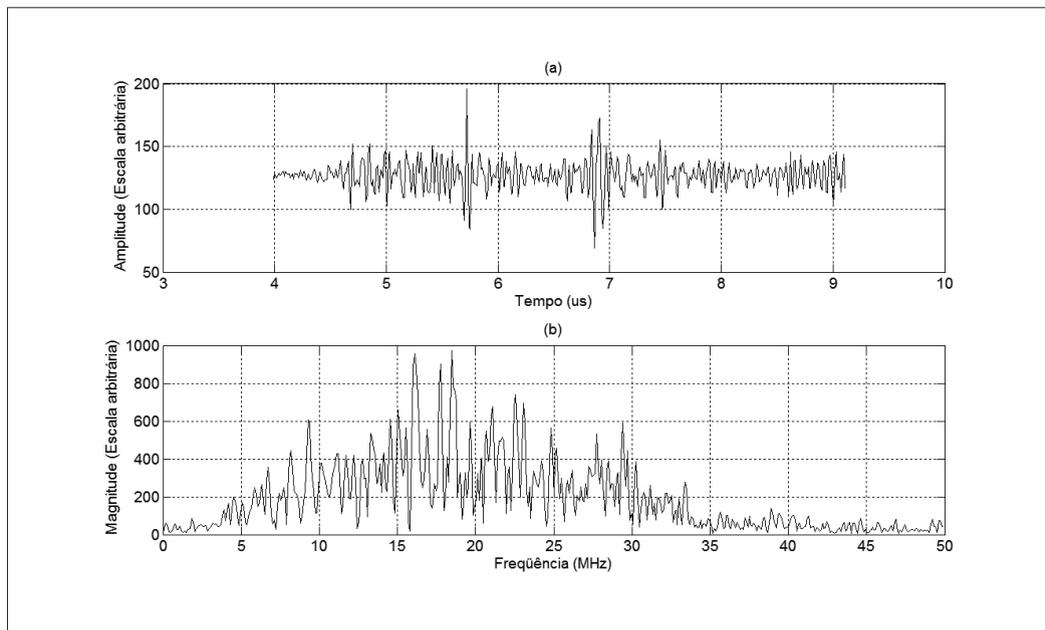


Figura 6. (a) exemplo de um sinal RF proveniente de tecido hepático humano saudável *in vitro*; e (b) seu espectro de potência.
Figure 6. (a) example of an RF-signal from *in vitro* healthy human hepatic tissue; and (b) its power spectrum.

encontrar o pico dentro da janela espectral, tendo sido decidido descartá-los para o cálculo da média de MSS. Isto será discutido mais à frente.

Para a análise estatística dos dados, foi usado o *one-way* ANOVA (SPSS Inc. v.12) para observar se há diferença entre as médias dos métodos, fornecendo também os intervalos de confiança (95%) para cada grupo (Dawson-Sauders e Trapp, 1994). A estatística de Levene foi calculada para verificar a suposição de igualdade das variâncias (Levene, 1960).

Resultados

Os sinais das cinco amostras foram processados. A Figura 7 apresenta os histogramas das estimativas de MSS para a amostra número 2, referente aos três métodos (SAC, SSA e SIMON). Pode-se observar que os histogramas apresentam um padrão similar, com duas classes centradas em uma distribuição semelhante a uma Gaussiana.

É importante ressaltar que o padrão apresentado na Figura 7 não ocorre em todas as cinco amostras. No entanto, é possível sempre identificar, entre os histogramas, similaridades como mesmas modas ou até distribuições dos dados.

As Tabelas 1, 2 e 3 mostram os resultados das estimativas de média, desvio-padrão e coeficiente de variação (CV) do MSS, e o número de sinais após a exclusão dos *outliers*, para os três métodos (SAC, SSA e SIMON, respectivamente). Nota-se uma convergência

dos valores para o MSS de tecido hepático saudável segundo a literatura (± 1 mm).

Os resultados do *one-way* ANOVA estão apresentados na Tabela 4. A estatística de Levene calculada foi de 0,38 ($p = 0,69 > 0,05$), mostrando que não se pode rejeitar a hipótese nula de que as variâncias são iguais entre os métodos. Os intervalos de confiança (95%) para as médias podem ser observados na Tabela 5.

Discussão

A principal limitação desse estudo é que os valores de MSS reais das amostras não são conhecidos. Os três métodos (SAC, SSA e SIMON) convergiram para resultados similares, sendo uma indicação de que, provavelmente, exista algum padrão bem definido. As estimativas de MSS para tecido hepático normal estão de acordo com os valores relatados pela literatura (Fellingham e Sommer, 1984; Machado *et al.*, 2004). Em especial, observa-se nos histogramas que as classes têm uma distribuição com algumas semelhanças importantes. Há uma tendência das classes estarem preenchidas ao redor dos mesmos valores, separadas pelas mesmas distâncias (classes vazias).

Estudos com amostras patológicas já foram realizados utilizando-se outros métodos de análise espectral. Fellingham e Sommer (1984) encontraram um MSS maior em tecidos cirróticos ($1,55 \pm 0,17$ mm) em comparação com tecidos normais ($1,10 \pm 0,10$ mm), realizando a FFT da autocorrelação dos sinais RF, e

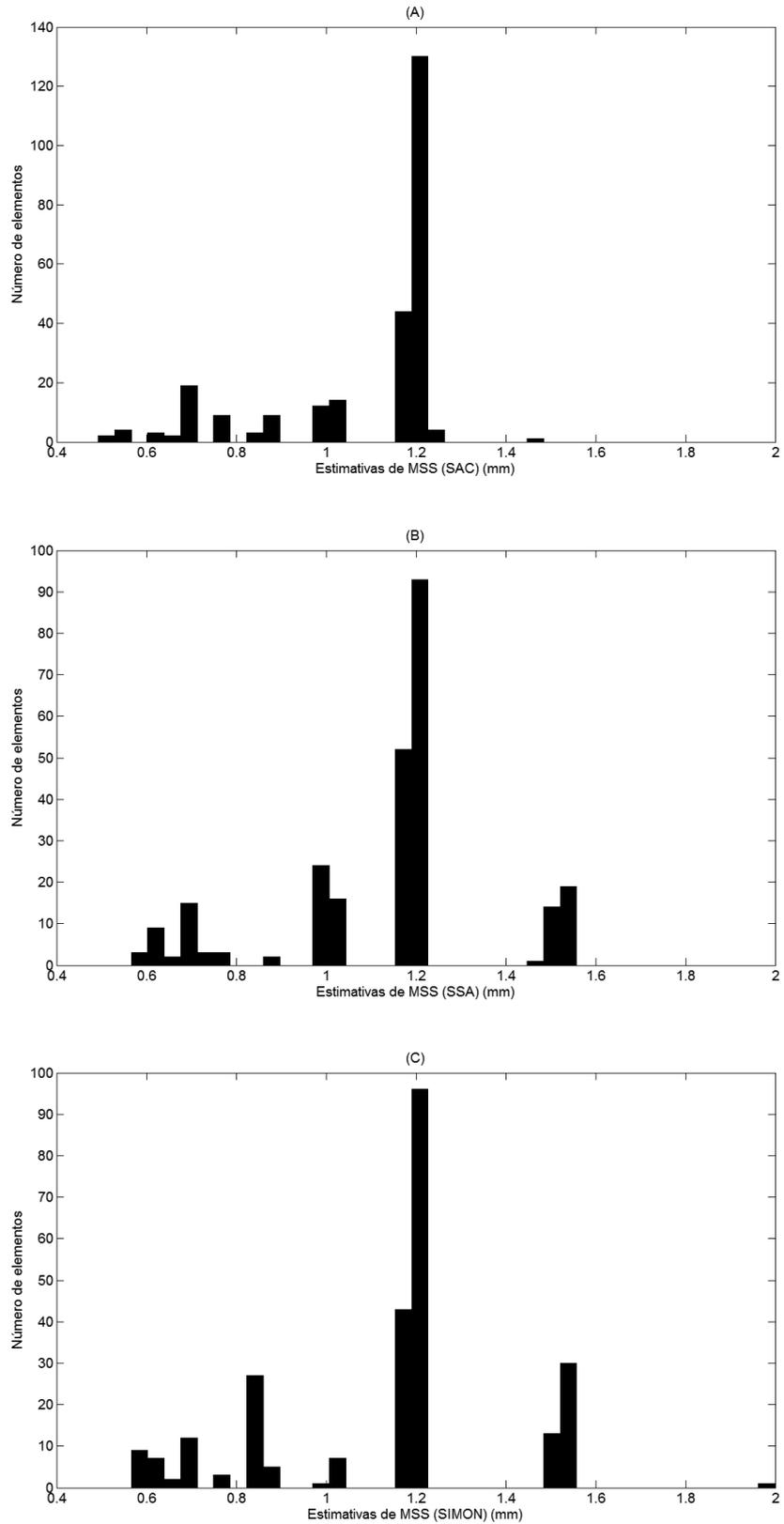


Figura 7. Histogramas referentes às estimativas de MSS da amostra número 2, para: (a) SAC; (b) SSA; e (c) SIMON.
Figure 7. Histograms related to MSS estimates of sample number 2, for: (a) SAC; (b) SSA; and (c) SIMON.

Tabela 1. Valores de média, desvio-padrão, e coeficiente de variação (CV) do MSS, e o número de sinais utilizados após exclusão de *outliers*, para cada amostra de tecido hepático, referente ao método SAC. **Table 1.** Values of MSS average, standard deviation and variation coefficient (CV), and the number of signals used after outliers exclusion, for each hepatic tissue sample, related to SAC method.

Amostra	MSS médio (mm)	Desvio padrão (mm)	CV (%)	Sinais
1	1,02	0,24	24,28	250
2	1,11	0,18	16,23	293
3	1,12	0,21	19,23	294
4	1,02	0,23	23,00	285
5	0,99	0,21	21,62	282

Tabela 2. Valores de média, desvio-padrão, e coeficiente de variação (CV) do MSS, e o número de sinais utilizados após exclusão de *outliers*, para cada amostra de tecido hepático, referente ao método SSA. **Table 2.** Values of MSS average, standard deviation and variation coefficient (CV), and the number of signals used after outliers exclusion, for each hepatic tissue sample, related to SSA method.

Amostra	MSS médio (mm)	Desvio padrão (mm)	CV (%)	Sinais
1	1,06	0,31	29,72	244
2	1,15	0,22	19,58	296
3	1,08	0,24	22,40	271
4	1,06	0,28	26,66	288
5	1,01	0,29	29,69	275

Tabela 3. Valores de média, desvio-padrão, e coeficiente de variação (CV) do MSS, e o número de sinais utilizados após exclusão de *outliers*, para cada amostra de tecido hepático, referente ao método SIMON. **Table 3.** Values of MSS average, standard deviation and variation coefficient (CV), and the number of signals used after outliers exclusion, for each hepatic tissue sample, related to SIMON method.

Amostra	MSS médio (mm)	Desvio-padrão (mm)	CV (%)	Sinais
1	0,98	0,27	27,73	262
2	1,15	0,23	20,15	289
3	1,06	0,22	21,11	294
4	1,04	0,29	28,27	288
5	0,99	0,29	29,84	262

Tabela 4. Resultados do one-way ANOVA. **Table 4.** One-way ANOVA results.

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	Estatística F	p
Intergrupos	0,020	2	0,001	0,292	0,752
Intragrupos	0,430	12	0,004		
TOTAL	0,450	14			

Tabela 5. Intervalos de confiança (95%) para as médias dos três métodos. **Table 5.** Confidence intervals (95%) for the average of the three methods.

Método	Limite inferior	Limite superior
SAC	0,98	1,12
SSA	1,00	1,13
SIMON	0,96	1,13

traçando um histograma das localizações (em frequência) dos picos referentes à periodicidade do tecido. Contudo, antes de coletarem os sinais RF, eles selecionaram a região de interesse no tecido, excluindo áreas onde se localizavam vasos. No presente estudo, não foi selecionada previamente uma região. Logo, a

comparação direta requer cautela, pois os sinais RF adquiridos podem carregar informações sobre arteríola, vênulas e ductos.

O método SIMON requer obrigatoriamente uma janela espectral que imponha limites para a busca do pico de periodicidade. Porém, achou-se conveniente o

uso dessa janela nos outros métodos (SAC e SSA); isso porque, não raramente, o maior pico no espectro não é o referente à periodicidade que se procura, e o algoritmo pode identificar picos relacionados a refletores mais potentes que dominam a energia retroespalhada e que, normalmente, estão fora desta janela de busca (fixada entre 0,5 e 2,2 mm).

Outro ponto importante a ser discutido é o processo de identificação do pico pelo algoritmo. Em alguns casos, o ponto de início ou de final da janela espectral era escolhido como sendo o pico de maior amplitude, e conseqüentemente formando as classes nas extremidades dos histogramas. Por isso, antes do cálculo das estimativas de MSS, os *outliers* foram excluídos.

A média do histograma foi usada como representativa do MSS de cada amostra, pois as estimativas ficaram espalhadas pelo histograma. Outra forma possível de expressar a periodicidade nas amostras seria o valor MSS mais freqüente, ou seja, as modas no histograma.

A *one-way* ANOVA foi usada no intuito de se verificar possível diferença entre os métodos. O valor de $p > 0,05$ mostra que não há diferença significativa entre os mesmos.

Obviamente deve-se atentar para o pequeno número de amostras utilizadas ($n = 5$). A obtenção de amostras para coleta de sinais é um processo difícil, dependente de vários fatores, como por exemplo, a disponibilidade de pacientes com sintomas hepatológicos que se submetam a uma biópsia (procedimento invasivo). Mesmo com tais limitações, os resultados preliminares apresentados nesse estudo mostram-se promissores.

Conclusão

A periodicidade de amostras de tecido hepático saudável foi estudada por três métodos de análise espectral, com concepções diferentes de processamento do sinal RF ultra-sônico, utilizando estimativas de MSS. Os resultados foram compatíveis com a literatura, indicando um MSS com valor próximo de 1 mm, para fígados normais.

Os três métodos parecem identificar a mesma periodicidade presente no tecido hepático, o que reforça a possibilidade de caracterização tecidual saudável usando sinais retroespalhados de US.

Na seqüência deste trabalho, será realizada a análise de amostras com diversos graus de fibrose (incluindo cirrose), visando avaliar a adequação do parâmetro MSS para discriminar tecidos saudáveis de tecidos patológicos.

Agradecimentos

Ao CNPq e à FAPERJ pelo apoio financeiro.

Referências

- Burckhardt, C.B. (1978), "Speckle in Ultrasound B-Mode Scans", *IEEE Transactions on Sonics and Ultrasonics*, v. SU-25, n. 1, p. 1-6.
- Dawson-Saunders, B., Trapp, R.G. (1994), *Basic & Clinical Biostatistics*, Connecticut: Appleton & Lange.
- Donohue, K.D., Huang, L., Burks, T., Forsberg, F., Piccoli, C.W. (2001), "Tissue classification with generalized spectrum parameters", *Ultrasound in Medicine & Biology*, v. 27, n. 11, p. 1505-1514.
- Duck, F.A., Baker, A.C., Stanitt, H.C. (1998), *Ultrasound in Medicine*, Philadelphia: IOP Publishing Ltd., UK.
- Fellingham, L., Sommer, F. (1984), "Ultrasonic characterization of tissue structure in the *in vivo* human liver and spleen", *IEEE Transactions on Sonics and Ultrasonics*, v. SU-31, p. 418-428.
- Fish, P. (1990), *Physics and Instrumentation of Diagnostic Medical Ultrasound*, West Sussex: John Wiley & Sons.
- Hottier, F., Bernatets, J.L. (1984), "Estimation of ultrasonic attenuation in biological tissues", *Acta Electronica*, v. 26, p. 33-58.
- Kael, G.C., Korula J. (2005), *Atlas of Liver Pathology*, UK: Elsevier Saunders.
- Kauati, A.T. (2003), *Avaliação da detecção automática do espaçamento médio de espalhadores utilizando sinais ultra-sônicos*, Tese de Doutorado, Programa de Engenharia Biomédica, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, 178 p., out.
- Landini, L., Verrazzani, L. (1990), "Spectral characterization of tissues microstructure by ultrasounds: a stochastic approach", *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, v. 37, p. 448-456.
- Levene, H. (1960), "Robust tests for the equality of variance", In: *Contributions to Probability and Statistics*, Ed.: I. Olkin, Palo Alto, CA: Stanford University Press.
- Machado, C.B., Meziri, M., Pereira, W.C.A., Laugier, P. (2004), "Characterization of *in vitro* normal human liver tissue periodicity using backscattered ultrasound signals", In: *Anais do XIX Brazilian Congress on Biomedical Engineering, III Congresso Latino Americano de Engenharia Biomédica [CLAEB'2004]*, João Pessoa, v. 5, p. 1567-1570, 22-25 Sep.
- Meziri, M., Pereira, W.C.A., Abdelwahab, A., Degott, C., Laugier, P. (2005), "*In vitro* chronic hepatic disease characterization with a multiparametric ultrasonic approach", *Ultrasonics*, v. 43, n. 5, p. 305-313.
- Pereira, W.C.A., Abdelwahab, A., Bridal, S.L., Laugier, P. (2002), "Singular spectrum analysis applied to 20 MHz backscattered ultrasound signals from periodic and quasi-periodic phantoms", In: *Acoustical Imaging*, Ed.: R.G. Maev, Springer, v. 26, p. 239-246.
- Pereira, W.C.A., Bridal, S.L., Coron, A., Laugier, P. (2004), "Singular spectrum analysis applied to backscattered ultrasound signals from *in vitro* human cancellous bone specimens", *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, v. 51, n. 3, p. 302-312.
- Pereira, W.C.A., Maciel, C.D. (2001), "Performance of ultrasound echo decomposition using singular spectrum

- analysis", *Ultrasound in Medicine & Biology*, v. 27, n. 9, p. 1231-1238.
- Pinzani, M., Rombouts, K. (2004), "Liver fibrosis: from the bench to clinical targets", *Digestive and Liver Disease*, v. 36, p. 231-242.
- Schuppan, D., Porov, Y. (2002), "Hepatic fibrosis: from bench to bedside", *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, v. 17, p. S300-S305.
- Shung, K.K., Smith, M.B., Tsui, B. (1992), *Principles of Medical Imaging*, San Diego, California: Academic Press.
- Simon, C., Shen, J., Seip, R., Ebbini, E.S. (1997), "A robust and computationally efficient algorithm for mean scatterer spacing estimation", *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, v. 44, n. 4, p. 882-894.
- Tang, X., Abeyratne, U.R. (2000), "Wavelet transforms in estimating scatterer spacing from ultrasound echoes", *Ultrasonics*, v. 38, p. 688-692.
- Yeh, W.C., Huang, S.W., Li, P.C. (2003), "Liver fibrosis grade classification with B-mode ultrasound", *Ultrasound in Medicine & Biology*, v. 29, n. 9, p. 1229-1235.
- Varghese, T., Donohue, K.D. (1993), "Characterization of tissue microstructure scatterer distribution with spectral correlation", *Ultrasonic Imaging*, v. 15, p. 238-254.
- Varghese, T., Donohue, K.D. (1994), "Mean scatterer spacing estimate with spectral correlation", *Journal of the Acoustical Society of America*, v. 96, p. 3504-3515.
- Varghese, T., Donohue, K.D. (1995), "Estimating mean scatterer spacing with the frequency-smoothed spectral autocorrelation function", *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, v. 42, n. 3, p. 451-463.
- Vautard, R., Ghil, M. (1989), "Singular spectrum analysis in nonlinear dynamics, with applications to paleoclimatic time series", *Physica D*, v. 35, p. 395-424.
- Wells, P.N.T. (2000), "Current status and future technical advances of ultrasonic imaging", *IEEE Engineering in Medicine and Biology*, set./out, p. 14-20.