



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CUANTIFICACIÓN DE PROPIEDADES ACÚSTICAS
DE TEJIDO CEREBRAL A TRAVÉS DE TÉCNICAS
DE RETRODISPERSIÓN ULTRASÓNICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

FÍSICA

PRESENTA:

LAURA CASTAÑEDA MARTÍNEZ



TUTOR:

DR. IVÁN MIGUEL ROSADO MÉNDEZ

Ciudad Universitaria, CD. MX.

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Castañeda

Martínez

Laura

55 27 28 85 90

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Física

310025571

2. Datos del tutor

Dr.

Iván Miguel

Rosado

Méndez

3. Datos del sinodal 1

Dra.

María Ester

Brandan

Siqués

4. Datos del sinodal 2

Dr.

Mayo

Villagrán

Muniz

5. Datos del sinodal 3

Dra.

Karla Paola

García

Pelagio

6. Datos del sinodal 4

Dr.

Héctor

Alva

Sánchez

Con todo mi amor y agradecimiento para Luz y Elisa.

Agradecimientos

Mi agradecimiento infinito por la guía, paciencia y enseñanzas otorgadas por mi asesor, el Dr. Iván Rosado Méndez. De usted aprendí que mi mejor aliado es la perseverancia para alcanzar mis metas, me mostró a no perder calma cuando la vida no sigue el camino esperado. Gracias doctor por compartir este tiempo de aprendizaje conmigo, ha sido un honor trabajar a su lado. No hay palabras suficientes que muestren lo agradecida que estoy con usted.

Agradezco a la Dra. María Ester Brandan Siqués por el apoyo incondicional mostrado durante el desarrollo de este trabajo, por su tiempo, y por el detalle y esfuerzo que implicaron las correcciones de este trabajo.

Gracias al Dr. Mayo Villagrán Muniz por su amabilidad, comentarios y y conversaciones interesantes a lo largo de este proceso.

Agradezco a la Dra. Karla Paola Pelagio García por cuestionamientos durante la revisión de la tesis. Las respuestas a cada pregunta complementó este trabajo y me mostró lo enriquecedor que puede ser no dar las cosas por sentado.

Gracias al Dr. Héctor Alva Sánchez por siempre mostrarse interesado en el trabajo, y por su esfuerzo implicado en el aprendizaje del teja. El detalle de cada uno de sus comentarios se encuentra plasmado en las páginas de este trabajo.

Agradezco al M. en C. César Gustavo Ruiz Trejo por creer en mi e impulsarme a ser una mejor estudiante.

Agradezco al grupo de Dosimetría y Física Médica del Instituto de Física de la UNAM, a la Dra. María Ester Brandan Siqués, al Dr. Luis Alberto Medina, a la Dra.

Guerda Massillon, al M. en C. César Ruiz, al M. en C. Eduardo López Pineda y al Dr. Iván Rosado Méndez, por su apoyo durante este proceso y por permitirme desenvolverse en ambiente académico lleno de oportunidades.

A ti mamá, gracias ser el amor sincero. Este trabajo me hubiera sido imposible realizarlo sin cada una de tus enseñanzas. Tu fuerza y amor han dosis necesarias durante toda mi vida. Sé que en ti siempre puedo encontrar palabras de aliento para sobrepasar cualquier obstáculo que se encuentre en el camino. Agradezco a mi padre, sin importar cuantos años pasen te llevo en mi corazón.

A Eli y Lucianna, por ser los dos rayitos de luz más brillantes en mi vida. Eli, no quisiera pensar cómo sería mi vida sin tenerte a mi lado. Gracias por todas tus muestras de cariño, tu amor me ha hecho crecer.

A ti Miguel, por ser tu sinceridad y apoyo infinito. Encontré en ti un cómplice incondicional. Tu impulso, fortaleza y amor fueron piezas fundamentales en este rompecabezas.

A mi abuelita Lupita por cada una de las muestras de amor durante mi vida. A mi tía Jose por ser mi primera maestra, haz sido la maestra más amorosa que podré conocer. A mi tía Clarita por compartir conmigo una época tan bonita como lo fue mi infancia. A mi tía Paty y tío Beto por el amor a mi familia y apoyo en los momentos más críticos.

A mis amigos de la Facultad, Luis, Daniel, Efrén, Dani, Ale, Yazmín y Alejandro por compartir esta locura a la que llamamos Física. A mis amigos Gustavo y Dani por ser comprensivos durante toda la carrera, supieron reconocer que a pesar de la distancia la amistad perdura. Gracias a mi amigo Rodrigo, su apoyo y risas me acompañan desde hace muchos años.

A mis Tiägers por regalarme sonrisas y amor sin saberlo.

A la Dra. María Magdalena González Sánchez que sin conocerme, creyó en mi. Gracias Magda por guiarme desde que me conociste, has sido un ejemplo a seguir.

Gracias a la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México, y a la Facultad de Ciencias de la UNAM por ser mi refugio durante cinco años, en este

recinto siempre encontré lo necesario para desarrollar mi carrera. Gracias a cada uno de los profesores que me impartieron clase, todas sus enseñanzas se encuentran implícitas en estas páginas.

Al Instituto de Física de la UNAM (IFUNAM) por proveerme un espacio de trabajo para la realización de esta tesis.

Gracias a mis compañeros del Laboratorio de Ultrasonido Médico del IFUNAM por compartir el espacio de trabajo.

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM (IN107916). Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida. Investigación realizada gracias al apoyo de ayudante de Investigador Nacional Nivel III (Dra. María Ester Brandan Siqués). Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología el apoyo recibido. Investigación realizada gracias al Programa UNAM-PAPIIT (IA104518) (equipo de cómputo), y a los proyectos R01HD072077, R01HD083001-01A1 y P51OD011106 (Wisconsin National Primate Research Center Pilot Award) de los Institutos de Salud de Estados Unidos (NIH).

Agradezco al Dr. Ernest Madsen y a Gary Frank por la fabricación de los maniqués tejido-equivalentes usados en este trabajo.

I also thank Dr. Timothy Hall for sharing his knowledge on the subject. Through each of the discussion sessions I had the opportunity to learn. His valuable comments allowed the enrichment of this work.

I thank Dr. Chrysanthi Ikonomidou for her advice in the neurological area to carry out this work. I also appreciate the interest shown during the development of the thesis and for the time it took to select the thalamus in each image. Through the discussions with her it was easier for me to establish the synergy of the importance of this pilot study in the daily life of a newborn.

I thank both Dr. Hall and Dr. Ikonomidou for allowing me to have access to the ultrasound data and the results of the immunohistochemical study. As well as the time that required them to help me with details of the thesis.

Resumen

Introducción: Estudios previos en modelos animales en tejido *ex vivo*, han demostrado que exposiciones largas al anestésico sevoflurano (SEVO) inducen apoptosis en neuronas y oligodendrocitos. Recientemente, la Food and Drug Administration (FDA, por sus siglas en inglés) emitió una advertencia acerca de los efectos de largas exposiciones a cierto tipo de anestésicos en niños menores a tres años y mujeres embarazadas. A pesar de las evidencias observadas en modelos animales, estos efectos no han podido ser observados en humanos por la falta de un método no invasivo capaz de detectar apoptosis en el tejido cerebral de niños y recién nacidos. Estudios realizados en el área oncológica han demostrado la capacidad del Ultrasonido Cuantitativo (QUS, por sus siglas en inglés) de detectar de apoptosis en células cancerígenas. Esto sugiere que el QUS tiene el potencial para evaluar apoptosis en tejido cerebral de forma no invasiva.

Objetivo: El objetivo del presente trabajo es estandarizar técnicas del Ultrasonido Cuantitativo para analizar dos de sus parámetros como posibles biomarcadores capaces de evaluar cambios en la microestructura de tejido cerebral de macacos Rhesus recién nacidos, quienes han sido expuestos al anestésico sevoflurano.

Métodos: La muestra consistió en 14 macacos Rhesus terminales de 2 a 9 días de edad. Los sujetos fueron expuestos durante 5 hrs al anestésico SEVO. Los datos de la señal de radiofrecuencia (RF, por sus siglas en inglés) se adquirieron con un equipo clínico Siemens Acuson S3000 con un transductor de fase cuya frecuencia de operación fue de 10 MHz. Las señales de RF se obtuvieron de varios planos del cerebro, cuidando

que el tálamo fuera a visible en cada una de las imágenes en modo B. Se realizó la adquisición a las 0 hrs y 6 hrs posteriores al inicio de la exposición al SEVO. El *tamaño efectivo del dispersor* (ESS, por sus siglas en inglés) y la *concentración acústica* (AC, por sus siglas en inglés) se calcularon mediante el ajuste de un factor de forma teórico a los datos estimados del factor de forma obtenido por medio de la señal de RF. El proceso de optimización consistió en: (1) identificar el máximo de la relación señal a ruido del espectro de energía retrodispersada de todo el conjunto de datos para determinar el ancho de banda, (2) análisis de la dependencia del factor de forma calculado, con la frecuencia, para identificar discontinuidades relacionadas con diferentes fuentes de dispersión, (3) determinación de un modelo del factor de forma basado en la prueba estadística χ^2 , (4) comparación de los cambios del ESS y AC posteriores a la exposición al SEVO, entre el lado derecho e izquierdo del tálamo. La significancia estadística del cambio porcentual del ESS y AC entre las 0 hrs y 6 hrs se realizó a través de una prueba Wilcoxon rank-sum. Finalmente, se obtuvo el coeficiente de correlación de Pearson entre los cambios porcentuales de cada parámetro y la activación de la caspasa 3 (CASP3) del estudio inmunohistoquímico en el tálamo.

Resultados: En todo el ancho de banda (3.2 MHz a 8.7 MHz) el promedio del factor de forma calculado a las 0 hrs y 6 hrs, decrece de forma monótona con la frecuencia. Este resultado justificó realizar el ajuste de un sólo factor de forma sobre todo el ancho de banda. Los valores de la prueba χ^2 del factor de forma continuo Gaussiano fueron 10 veces menores comparados con los valores del factor de forma discreto de la esfera fluida. En seis sujetos se observó acuerdo entre el lado izquierdo y derecho del tálamo, éstos seis mostraron cambios significativos del ESS (5 decrementos, y 1 incremento) y para la AC, cuatro mostraron cambios significativos (3 decrementos, y 1 incremento). El tamaño efectivo del dispersor mostró mayor sensibilidad a efectos del SEVO que la concentración acústica. El coeficiente de correlación de Pearson mostró una correlación fuerte entre el cambio porcentual del ESS y la activación de la CASP3.

Conclusiones: Los resultados preliminares sugieren que un modelo continuo del factor de forma representa de forma más adecuada a la retrodispersión ultrasónica del

cerebro de macacos Rhesus recién nacidos. La cuantificación de la reducción del ESS a través de este modelo sugiere que el parámetro es capaz de estimar los cambios en la microestructura cerebral inducidos por el anestésico del anestésico SEVO.

Índice general

Índice de tablas	xvii
1. Introducción	1
1.1. Ultrasonido Médico	1
1.2. Ultrasonido Cuantitativo	3
1.3. Ultrasonido Cuantitativo y neuroapoptosis	4
1.4. Presentación de tesis	6
2. Marco teórico	11
2.1. Radiación	11
2.1.1. Radiación ionizante y no ionizante	12
2.2. Ultrasonido	13
2.2.1. Propiedades físicas de una onda	13
2.2.1.1. Impedancia acústica	15
2.2.2. Proceso físico para la creación de una imagen de ultrasonido	15
2.2.2.1. Proceso de la creación de la imagen	17
2.2.3. Ultrasonido cuantitativo (QUS)	18
2.2.3.1. Secciones eficaces de dispersión	18
2.2.3.2. Coeficientes de retrodispersión incoherente	20
2.2.3.3. Coeficiente de correlación de la esfera fluida	20
2.2.3.4. Coeficiente de correlación Gaussiano	21

ÍNDICE GENERAL

2.2.3.5.	Coeficiente de correlación exponencial	22
2.2.3.6.	Factor de forma	22
2.2.4.	Tamaño Efectivo del Dispersor (ESS)	24
2.2.5.	Concentración acústica	24
2.3.	Anatomía del tálamo	25
2.3.1.	Análisis inmunohistoquímico	29
2.3.1.1.	Caspasa 3	30
2.3.2.	Apoptosis en el tálamo	30
3.	Metodología	33
3.1.	Implementación y validación	35
3.1.1.	Maniqués tejido equivalentes	35
3.1.2.	Adquisición de datos	37
3.1.3.	Procesamiento de datos	39
3.2.	Estimación del coeficiente de retrodispersión	42
3.2.1.	Parámetros con interpretación física directa	42
3.3.	Modelo animal	44
3.3.1.	Valores de atenuación en la literatura	48
3.3.2.	Cálculo de espectros de energía	49
3.4.	Parámetros de Espectroscopía por Retrodispersión Ultrasónica (ERU)	49
3.4.1.	Parámetros con interpretación física directa	50
3.4.2.	Parámetros con interpretación física indirecta	51
3.5.	Análisis de los factores de forma y coeficiente de retrodispersión	52
3.5.1.	Coeficiente de Pearson	54
4.	Resultados	57
4.1.	Validación	57
4.1.0.1.	Análisis del ancho de banda	58
4.1.1.	Coeficientes de atenuación y retrodispersión	59

4.1.1.1. Tamaño Efectivo del dispersor (ESS) y Concentración Acústica (AC)	63
4.1.2. Concentración Acústica	64
4.2. Resultados en modelo animal	66
4.2.1. Compensación por atenuación	70
4.2.2. Factores de forma	72
4.2.3. Selección de modelo para factor de forma	75
4.2.4. Biomarcadores	77
4.2.4.1. Tamaño efectivo del dispersor (ESS)	81
5. Discusión	91
5.1. Validación	91
5.2. Modelo animal	92
6. Conclusiones	99
7. Trabajo a futuro	103
8. Apéndice	105
8.1. Tamaño efectivo del dispersor (ESS)	106
Bibliografía	111

Índice de tablas

1.1. Listado de las ventajas y desventajas del ultrasonido médico.	3
3.1. Valores de la rapidez de propagación, del coeficiente de atenuación y retrodispersión para el maniquí de referencia y los maniqués A y B. . .	38
4.1. Valores de la estadística asociada a los cálculos de la frecuencia mínima, central y máxima del maniquí A.	59
4.2. Valores de la estadística asociada a los cálculos de la frecuencia mínima, central y máxima del maniquí B.	59
4.3. Valores estadísticos del ESS del maniquí A y B calculados con el método de maniquí de referencia aplicado a señales RF del equipo Siemens. . . .	64
4.4. Valores estadísticos de la AC del maniquí A y B.	65
4.5. Valores de AC calculados con valores esperados del σ_b para el maniquí A y B.	65
4.6. Valores de la estadística asociada a los cálculos de la frecuencia mínima, central y máxima del conjunto de datos del modelo animal.	70

Introducción

1.1. Ultrasonido Médico

El ultrasonido médico forma parte de las modalidades de imagen utilizadas en la Medicina. El término *ultrasonido* se refiere a ondas de sonido con frecuencias mayores a 20 kHz. A pesar que las ondas de ultrasonido no pueden ser detectadas a través del oído, es posible crear imágenes del interior del cuerpo a través de la detección de ecos reflejados y dispersados por las estructuras del cuerpo. La gama de aplicaciones médicas del ultrasonido es diversa: además de ser una herramienta que los médicos utilizan para el diagnóstico, también puede utilizarse como una técnica de tratamiento (dependiendo de la intensidad de las ondas).

El ultrasonido diagnóstico utiliza frecuencias entre 1 MHz a 15 MHz, la resolución espacial varía entre 0.2 mm y 3 mm [1]. El ultrasonido médico utiliza ondas mecánicas para generar una imagen de la anatomía del cuerpo con base en el principio de eco-localización. Este mecanismo es utilizado por varias especies animales para navegar y localizar presas a través de la emisión de pulsos sonoros. A partir del tiempo de vuelo de dichos pulsos y sus reflexiones o ecos, es posible construir un mapa acústico del medio circundante [1]. De manera similar, el ultrasonido diagnóstico se basa en una técnica pulso-eco. El estímulo (un pulso de ultrasonido) se genera por el transductor del equipo, el cual se encuentra en contacto con el cuerpo. El pulso de ultrasonido se propaga dentro del cuerpo a lo largo de una trayectoria definida, y al ser reflejado y dispersado

1. INTRODUCCIÓN

por el tejido, se producen ecos que viajan de vuelta al transductor. El transductor, al operar en modo de detección, transforma los ecos acústicos en señales eléctricas. Con la detección de dichas señales, es posible crear una imagen (mapa) de las estructuras del interior del cuerpo a partir de localizar los ecos espacialmente (con base en el tiempo que toma detectarlos) y asignarles un tono de gris relacionado con la amplitud del eco. Este tipo de imagen se conoce como modo *B* o de *brillo* [1–3].

El ultrasonido médico ofrece varias ventajas sobre otras modalidades de imagen. El ultrasonido es radiación no ionizante y, a las energías utilizadas en estudios diagnósticos (por debajo de 1 W/cm^2 [4]) no se han observado efectos biológicos, por lo que se le considera segura. Además, comparado con otras modalidades de imagen, el ultrasonido diagnóstico es de bajo costo [5]. Por esta razón, es una de las técnicas más utilizadas mundialmente para la detección, diagnóstico y seguimiento de muchas enfermedades. Sin embargo, a pesar de estas ventajas, el ultrasonido diagnóstico tiene una limitación importante: la interpretación de las imágenes de ultrasonido convencionales suele ser subjetiva debido a la gran variabilidad de parámetros de operación del equipo y de la experiencia de quien adquiere e interpreta las imágenes [6, 7]. La tabla 1.1 presenta un resumen de las ventajas y limitaciones del ultrasonido médico.

Tabla 1.1: Listado de las ventajas y desventajas del ultrasonido médico.

Ventajas	Desventajas
“Seguro” - No utiliza radiación ionizante.	Subjetivo - La adquisición y evaluación de las imágenes depende de la experiencia de los técnicos y radiólogos.
Portátil - El equipo se puede transportar fácilmente.	“Ruidoso” - La imagen posee un patrón de moteado que dificulta la detección de estructuras de interés.
Económico - Costo relativamente bajo comparado con otras modalidades.	Resolución limitada - La resolución espacial es menos fina que las técnicas de rayos X.
Rápido - Se puede visualizar el tejido en tiempo real.	Entrenamiento - Cada aplicación del ultrasonido requiere un entrenamiento dedicado.
Diagnóstico y tratamiento - La gama de aplicaciones médicas del ultrasonido es diversa.	Penetración - Existe un compromiso entre la resolución espacial y la profundidad de penetración debido a la atenuación.

1.2. Ultrasonido Cuantitativo

Para superar esta limitación, se han desarrollado técnicas de *ultrasonido cuantitativo* que, a través del procesamiento de señales de ecos ultrasónicos obtenidas de equipos clínicos, permiten cuantificar propiedades físicas del tejido de interés [8]. Una de estas técnicas es la *Espectroscopía por Retrodispersión Ultrasónica* (ERU) que, por medio de la descomposición espectral de señales de ecos ultrasónicos, permite cuantificar el coeficiente de atenuación y el coeficiente de retrodispersión. El coeficiente de atenuación (α) cuantifica la pérdida de energía de una onda de ultrasonido al viajar cierta distancia dentro del medio. El coeficiente de retrodispersión (σ_b) es el diferencial angular de la sección eficaz de dispersión en la dirección opuesta al haz de ultrasonido incidente por unidad de volumen [9].

Los coeficientes de atenuación y retrodispersión se han utilizado como biomarcadores de imagen cuantitativa para diferentes enfermedades. Un biomarcador de imagen cuantitativa es una característica que se mide de manera objetiva en un imagen médi-

ca, que puede ser correlacionada con propiedades anatómicas y fisiológicas que pueden indicar la presencia de alguna enfermedad, su estado, sus características moleculares, así como su respuesta al tratamiento [10].

Por ejemplo, estos biomarcadores han permitido diferenciar hígado graso de sano [11, 12]. Otros estudios indican que el coeficiente de retrodispersión puede utilizarse para diagnosticar enfermedades crónicas renales [13, 14]. El coeficiente de retrodispersión ha permitido diferenciar masas benignas y malignas en los ojos y ganglios linfáticos [15]. Además, a través del ajuste de modelos teóricos al coeficiente de retrodispersión, es posible cuantificar la dimensión característica de variaciones de impedancia acústica, llamadas dispersores, así como cuantificar la concentración acústica. La concentración acústica es el producto del número de dispersores dentro del volumen del pulso de ultrasonido multiplicado por el promedio al cuadrado de la variación de impedancia acústica. A dicha dimensión característica se le conoce como *tamaño efectivo del dispersor (ESS, por sus siglas en inglés)*. Este parámetro, en combinación con otros derivados del coeficiente de retrodispersión, se han utilizado para diferenciar fibroadenomas (lesiones benignas) y carcinomas (lesiones malignas) mamarios en modelos animales pequeños [16] y en humanos [17]. Recientemente, la ERU se ha utilizado para detectar muerte celular *in vitro* e *in vivo* en aplicaciones oncológicas, tales como la evaluación de los efectos de quimioterapia en tumores mamarios [18, 19]. Estas aplicaciones se basan en la hipótesis de que los procesos de muerte celular inducidos por quimioterapia, en particular la apoptosis (muerte celular programada), modifican de manera drástica la microestructura del tejido y, por tanto, la manera en que dicha microestructura interacciona con el pulso de ultrasonido [20].

1.3. Ultrasonido Cuantitativo y neuroapoptosis

Las intervenciones clínicas en recién nacidos y niños pequeños comúnmente requieren el uso de anestesia o sedantes. Se estima que alrededor de 3 a 4 millones de niños se les administra anualmente algún tipo de anestesia tan sólo en los Estados Unidos [21].

Uno de los fármacos más utilizados es el anestésico sevoflurano debido a que posee un aroma agradable al ser inhalado, es de rápido efecto y recuperación rápida [22–27].

Sin embargo, desde hace más de 15 años varios estudios en modelos animales murinos y primates han demostrado que la exposición a dichos fármacos puede producir efectos neurotóxicos en neuronas y oligodendrocitos. El efecto neurotóxico predominante es la apoptosis. Ikonomidou y cols. [28] descubrieron que el bloqueo por unas horas en ratas recién nacidas del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA), desencadenó la neurodegeneración apoptótica generalizada en el cerebro en desarrollo de ratas. Una característica del anestésico sevoflurano es que bloquea a dicho receptor.

En un estudio realizado por Brambrink et al. [29] se concluyó que el cerebro en desarrollo de primates no-humanos recién nacidos, es sensible a la acción apoptogénica del anestésico isoflurano. El cerebro de los primates mostró un gran aumento en la apoptosis neuronal en varias regiones del cerebro tres horas más tarde del comienzo de la exposición al anestésico, sin embargo no fue posible determinar dicho efecto en el desarrollo cognitivo de los primates. Años después, Brambrink et al. [30] estudiaron el efecto de la ketamina en el cerebro de macacos Rhesus en edad fetal y neonatales. Su estudio concluyó que el cerebro a las dos diferentes edades de los macacos es sensible a la acción apoptogénica de la ketamina, y que una exposición de 5 horas es suficiente para inducir una respuesta neurodegenerativa significativa a cualquier edad.

El pico de vulnerabilidad del mecanismo apoptogénico coincide con el periodo rápido de desarrollo de sinaptogénesis, también conocido como el periodo de crecimiento cerebral rápido. En el caso del ser humano comienza alrededor de la mitad del periodo de gestación y termina aproximadamente a los tres o cuatro años postnatales [31]. Con base en lo anterior, en 2006 la Food and Drug Administration (FDA) de EE.UU. emitió una advertencia sobre posibles efectos neurotóxicos de la exposición prolongada y/o repetida de anestesia general en niños menores a 3 años y mujeres embarazadas [32].

La evidencia sobre la cual se fundamenta la advertencia de la FDA se basa en estudios en modelos animales que evaluaron la neuroapoptosis a través de técnicas invasivas. Un ejemplo es el análisis inmunohistoquímico para cuantificar la expresión

de enzimas pro-apoptóticas en muestras de tejido extraído del modelo animal. Por supuesto, estas técnicas no son aplicables a humanos vivos.

Debido a esta complicación no ha sido posible comprobar los efectos neurotóxicos de la anestesia en humanos. Esto ha contribuido a la falta de evidencia concluyente en humanos.

De lo anterior surge la necesidad de desarrollar un método no invasivo, seguro y fácilmente aplicable a neonatos y niños para poder evaluar cambios del tejido cerebral relacionados con la apoptosis. El ultrasonido médico ofrece dicho potencial, ya que es una técnica no invasiva y utiliza radiación no ionizante (por tanto es segura para ser utilizada en niños).

Recientemente, la ERU se ha utilizado para detectar células apoptóticas *in vitro* e *in vivo* en aplicaciones oncológicas [18, 19]. Czarnota et al. [33] demostraron que los cambios a nivel celular que se dan durante la apoptosis de células de leucemia mieloide expuestas a cisplatino, fármaco de quimioterapia, pueden ser detectados utilizando ultrasonido de alta frecuencia (mayor a 20 MHz). En otro trabajo, Czarnota et al. [34] mostraron que a través de análisis espectral de la señal de radiofrecuencia es posible diferenciar, a través de parámetros espectrales, células apoptóticas de células viables expuestas a radiación. Sadgehi et al. mostraron por primera vez que a través del estudio de parámetros del ultrasonido cuantitativo, utilizando frecuencias diagnósticas, se puede evaluar de forma no invasiva los cambios del tejido *in vivo* provocados por los efectos de la quimioterapia en pacientes con cáncer de mama [18]. La base de la sensibilidad de estas técnicas a apoptosis se debe a que los cambios drásticos a nivel celular durante la apoptosis (formación de cuerpos apoptóticos, por ejemplo) dispersan el ultrasonido de manera diferente que las células viables [20].

1.4. Presentación de tesis

A partir de la necesidad de métodos cuantitativos no invasivos para evaluar neuro-apoptosis y, de la experiencia oncológica, el interés de esta tesis radica en la estimación

de parámetros derivados de la *Espectroscopía por Retrodispersión Ultrasónica* (ERU) para su uso como posibles biomarcadores de la apoptosis en tejido cerebral.

A partir de lo anterior, se propone la siguiente hipótesis: Los parámetros derivados de la *Espectroscopía por Retrodispersión Ultrasónica* (ERU), en particular el *tamaño efectivo del dispersor* (ESS, por sus siglas en inglés) y la concentración acústica (AC, por sus siglas en inglés) tienen potencial como biomarcadores para detectar cambios microestructurales inducidos por apoptosis en tejido cerebral expuesto a anestesia.

De probarse esta hipótesis, estos biomarcadores podrían utilizarse como un método no invasivo y práctico para detectar la neurotoxicidad de la anestesia. Para probar esta hipótesis, el objetivo de esta tesis es realizar una evaluación preliminar de la sensibilidad de parámetros de la ERU como posibles biomarcadores de neuroapoptosis en un modelo animal joven expuesto a anestesia. De este objetivo general se desprenden los siguientes objetivos específicos y metas correspondientes para alcanzarlos:

- **Objetivo específico 1:** Implementar y validar herramientas de procesamiento de datos de la técnica de ERU en sistemas de cómputo del Laboratorio de Ultrasonido Médico (LUM) del Instituto de Física de la UNAM.
 - **Meta 1.1:** Habilitar herramientas de software en Matlab de ERU en sistemas de cómputo del LUM para la cuantificación de ESS y AC, así como para el procesamiento en paralelo.
 - **Meta 1.2:** Validación de las herramientas a través del cálculo del coeficiente de atenuación y retrodispersión de materiales tejido-equivalentes.

- **Objetivo específico 2:** Selección del modelo teórico que mejor represente al proceso de retrodispersión acústica en tejido cerebral, a partir del cual se calculan los parámetros derivados de la ERU, el tamaño efectivo del dispersor y la concentración acústica.
 - **Meta 2.1: Identificación del ancho de banda.** El coeficiente de atenuación y retrodispersión son dos procesos físicos que poseen una dependencia con

la frecuencia del pulso de ultrasonido al propagarse en el medio. Por lo tanto, para realizar un cálculo preciso de dichos coeficientes, es fundamental determinar el intervalo de frecuencias (ancho de banda) disponible en la muestra.

- **Meta 2.2: Selección del modelo teórico.** Existen diferentes modelos teóricos para describir el proceso de retrodispersión ultrasónica, cada uno basado en suposiciones diferentes acerca del medio y de los agentes dispersores que interactúan con el pulso de ultrasonido. Debido a que se desconocen los agentes dispersores en el tejido cerebral, es necesario utilizar modelos con diferentes características para después evaluar, a través de pruebas estadísticas, cuál de ellos representa de mejor forma la retrodispersión del pulso de ultrasonido por parte del tejido de interés.
 - **Meta 2.3: Cuantificación del tamaño efectivo del dispersor (ESS) y concentración acústica (AC).** Para cada modelo teórico se debe realizar el cálculo de la magnitud de estos dos parámetros derivados de la ERU en el tejido cerebral. Debido a que se desea identificar cambios antes y después de la exposición a la anestesia, es necesario estimar dicha magnitud para cada sujeto, tanto a las 0hrs como a las 6hrs después de la exposición a la anestesia.
- **Objetivo específico 3:** Evaluar cambios de estos parámetros antes y después de la exposición a la anestesia.
- **Meta 3.1: Comparación a las 0 hrs y 6 hrs después a la exposición a la anestesia, de los valores de ESS y AC, a través de un análisis estadístico Wilcoxon.** Una vez identificado el modelo teórico más adecuado, se deben utilizar los valores estimados de ESS y AC de dicho modelo para realizar una comparación entre los valores obtenidos a las 0 hrs y 6 hrs después del inicio de la administración de la anestesia. Para evaluar si la diferencia es o no estadísticamente significativa, se debe llevar a cabo un

análisis estadístico de Wilcoxon de la diferencia de valores en ese intervalo de tiempo.

- Objetivo específico 4: Evaluar la correlación de los cambios de dichos parámetros con la evaluación histopatológica de inducción de apoptosis a través de un análisis inmunohistoquímico.
 - **Meta 4.1: Cálculo de la correlación con caspasa 3 activada a las 6 hrs después de la exposición a la anestesia.** Esto permite evaluar la correlación, positiva o negativa, de la diferencia entre dichos parámetros con la apoptosis.

La tesis de licenciatura aquí propuesta realizada entre agosto de 2017 y junio de 2018, se desarrolló en el marco de una colaboración entre el Instituto de Física de la UNAM y los Departamentos de Neurología y Física Médica de la Universidad de Wisconsin-Madison. Dicha colaboración comprende un estudio piloto para explorar la factibilidad de utilizar biomarcadores de retrodispersión acústica para detectar apoptosis inducida por la exposición a sevoflurano en macacos Rhesus neonatos. Las señales que provienen de imágenes de ultrasonido fueron adquiridas en el Centro Nacional de Investigación en Primates de Wisconsin entre 2015 y 2017.

La organización de la tesis es la siguiente. El capítulo 2 presenta el marco teórico detrás de la técnica de ERU. El capítulo 3 describe la metodología de adquisición y procesamiento de datos. El capítulo 4 presenta los resultados. El capítulo 5 discute los resultados obtenidos. En el capítulo 6 se presentan las conclusiones generales del trabajo de tesis. En el capítulo 7 se presentan futuras líneas de trabajo que se desprenden de los resultados. Finalmente en el capítulo 8 se encuentra un apéndice con gráficas de los parámetros estimados.

La investigación realizada es el primer esfuerzo en realizar una estandarización sistemática de la estimación de un marcador de apoptosis extraído de señales de ultrasonido médico en tejido cerebral. Igualmente dará pie a una evaluación preliminar de la sensibilidad de esta técnica a efectos neurodegenerativos de la anestesia en el cere-

1. INTRODUCCIÓN

bro en desarrollo. Los resultados sentarán las bases para aplicaciones en humanos. A largo plazo, el ultrasonido cuantitativo podría utilizarse como herramienta no invasiva, segura y práctica para la evaluación de tejido cerebral en recién nacidos.

Marco teórico

2.1. Radiación

La radiación está presente en muchos fenómenos de la naturaleza y es estudiada por diversas disciplinas de la Física como: la termodinámica, la óptica, la física cuántica, la física de partículas y la física médica.

El término *radiación* se refiere a la emisión y transporte de energía a través del espacio, o través de un medio material, en forma de haces de partículas u ondas [35]. En 1925 de Broglie postuló el comportamiento onda-partícula de la materia. Es decir, los fotones (ondas electromagnéticas) no son los únicos que exhiben un comportamiento dual, la materia (electrones, protones y átomos) también muestra ese comportamiento. Por tanto, al movimiento de las partículas materiales se les puede asociar una descripción ondulatoria, y a los fotones se les puede describir como partículas.

Una onda está definida como una perturbación que viaja a través del espacio. Durante la propagación de una onda en el medio, las partículas que constituyen a éste no se propagan con la perturbación, solamente la transmiten, es decir, oscilan alrededor de su posición de equilibrio. Por lo tanto, cuando una onda se propaga, existe un transporte de energía pero no de materia [36]. Existen diferentes tipos de ondas, entre ellas se encuentran las ondas electromagnéticas y las mecánicas.

Las *ondas electromagnéticas* son fluctuaciones espaciales de intensidad del campo eléctrico (E) y del campo magnético (H). Este tipo de ondas pueden propagarse tanto

en el vacío como en un medio material. Una de las características principales de las ondas electromagnéticas es que no requieren de un medio para propagarse. Además, al no poseer masa ni carga, este tipo de ondas no son afectadas por campos eléctricos o magnéticos y por lo tanto viajan a una velocidad constante en el medio [2].

Las ondas mecánicas son ondas que solamente pueden propagarse a través de un medio material. Este tipo de ondas se clasifican de acuerdo a la dirección de oscilación de las partículas del medio con respecto de la dirección de propagación de la misma. Se les conoce como *ondas transversales* a aquellas ondas cuya dirección de propagación es perpendicular a la dirección de oscilación de las partículas del medio. Las *ondas longitudinales* son aquellas donde la dirección de la propagación de la onda es paralela a la dirección de oscilación de las partículas [37].

2.1.1. Radiación ionizante y no ionizante

Dependiendo de su energía, la radiación puede clasificarse en ionizante y no ionizante. La radiación *ionizante* (cada partícula o cada fotón) posee la energía suficiente para ionizar y excitar a los átomos que componen a la materia con la que interactúa. La energía mínima para ionizar un electrón de valencia, conocida como potencial de ionización, depende de la composición de la materia, y varía entre 4 eV y 25 eV. Por lo tanto, la radiación que posea al menos ese valor mínimo de energía, es capaz de ionizar la materia [38]. Los rayos X y los rayos gamma son ejemplos de este tipo de radiación [2].

En cambio, la *radiación no ionizante* no posee la energía suficiente para ionizar átomos. Es decir, la energía de este tipo de radiación es menor a la energía mínima del potencial de ionización de los átomos o moléculas del medio. La radiación ultravioleta, la luz visible, la radiación infrarroja, las microondas, las onda de radio y las ondas mecánicas como el ultrasonido, son ejemplos de radiación no ionizante [2].

El uso de radiación ionizante para fines diagnósticos conlleva riesgos asociados a los efectos biológicos de la exposición a la radiación. La base de dichos efectos recae en los cambios químicos subsecuentes a nivel atómico o molecular en la materia irradiada [2].

Por lo tanto, al ser el ultrasonido radiación no ionizante, es considerado una técnica de imagen libre de riesgo [1].

2.2. Ultrasonido

El ultrasonido es una onda mecánica longitudinal que se propaga en un medio a frecuencias mayores a 20 kHz [39].

2.2.1. Propiedades físicas de una onda

En un fluido homogéneo (isotrópico) y sin viscosidad se puede modelar la propagación de una onda en un medio a través de la ecuación de onda.

$$\nabla^2 \phi - \kappa_s \rho_o \frac{\delta^2 \phi}{\delta t^2} = 0 \quad (2.1)$$

donde ϕ es el potencial de velocidad de la partícula, κ_s es el módulo de compresibilidad adiabática, el subíndice s indica una entropía constante, ρ_o es la densidad de equilibrio del medio.

Las soluciones de la ecuación 2.1 dependen de los valores iniciales y de las condiciones a la frontera. Una solución a dicha ecuación es una onda longitudinal plana que viaja en dirección del vector unitario \hat{k} en un medio infinito y con dependencia temporal. En caso de suponer que no existen pérdidas viscosas, esta onda se puede describir por medio de coordenadas cartesianas.

$$\phi(\vec{x}, t) = \phi(c_o t - \hat{k} \cdot \vec{x}) \quad (2.2)$$

donde \vec{x} es el vector de posición, c_o es la velocidad de la onda, que se relaciona con el módulo de compresión adiabática y la densidad a partir de la siguiente relación:

$$c_o^2 = \frac{1}{\kappa_s \rho_o} \quad (2.3)$$

Por lo tanto, la ecuación de onda se expresa como:

$$\nabla^2 \phi - \frac{1}{c_o^2} \frac{\delta^2 \phi}{\delta t^2} = 0 \quad (2.4)$$

Para el caso particular de una onda armónica, la solución 2.2 puede expresarse como:

$$\phi(x, t) = \phi_o \exp ik(c_o t - \hat{k} \cdot \vec{x}) \quad (2.5)$$

donde $k = \frac{\omega}{c_o} = \frac{2\pi}{\lambda}$.

La *frecuencia* (f), es el número de ciclos por unidad de tiempo que atraviesan un punto del espacio, sus unidades son los hertz (Hz). El tiempo que le toma a una onda completar un ciclo recibe el nombre de *periodo*, T .

$$T = \frac{1}{f} \quad (2.6)$$

La *longitud de onda* (λ), es la distancia entre dos ciclos consecutivos de la onda. La λ depende de la frecuencia y de la rapidez de propagación del sonido en el medio [39].

$$\lambda = \frac{c}{f} \quad (2.7)$$

La rapidez del sonido en cualquier medio está determinada principalmente por las características del mismo y por la frecuencia. Para tejidos blandos puede suponerse que la dependencia en frecuencia (en intervalos diagnósticos), es despreciable. Específicamente para ondas longitudinales en líquidos o tejidos blandos la expresión para la rapidez de propagación del sonido es:

$$c = \sqrt{\frac{B}{\rho}} \quad (2.8)$$

donde B es el módulo de compresión volumétrico. La variable ρ es la densidad másica del material. En promedio la rapidez de propagación del sonido en tejido blando es

1540 m/s [1, 2].

2.2.1.1. Impedancia acústica

Los ecos del pulso de ultrasonido son producidos por variaciones de impedancia acústica. La impedancia acústica, Z , es la resistencia que presenta el medio a la propagación de ondas acústicas.

Para ondas planas armónicas:

$$Z = \rho c \quad (2.9)$$

La unidad que se utiliza para la impedancia acústica son los *rayls*, $1 \text{ rayl} = 1 \text{ kg/m}^2\text{s}$.

2.2.2. Proceso físico para la creación de una imagen de ultrasonido

El ultrasonido médico se basa en el principio de ecolocalización, el cual es la base del SONAR y el RADAR.

Un eco se genera cuando el pulso de ultrasonido se encuentra con una interfase entre dos materiales que poseen diferentes valores de impedancia acústica. La amplitud del eco depende de tres factores principalmente: las propiedades de la interfase de impedancia acústica (tamaño relativo con respecto a la longitud de onda, forma y orientación de los dispersores), la amplitud del pulso de ultrasonido cuando se encuentra con la interfase, y la pérdida de energía del eco al recorrer el camino antes de encontrarse con el detector. Mientras mayor sea la amplitud del eco, más brillante aparecerá en la imagen.

Cuando el tamaño de la interfase de impedancia es significativamente más grande que la longitud de onda (como la interfase entre tejidos, vasos sanguíneos) la interfase se comporta como un espejo, reflejando parcialmente al pulso de ultrasonido, de acuerdo con la ley de Snell [3].

Los elementos microestructurales del tejido, como glándulas, fibras de colágeno o células, representan variaciones en la impedancia acústica a una escala más pequeña que la longitud de onda del pulso. La interacción del pulso con cada uno de estos

elementos resulta en dispersión, es decir, la redirección espacial de una fracción de la energía del pulso, así como un cambio en su contenido espectral, en otras ramas de la física, como la óptica, a este fenómeno se le conoce como “esparcimiento” [40]. El eco que se produce en una posición dada del pulso es el resultado de la interferencia entre los pulsos dispersados por los elementos dispersores que se encuentran dentro del volumen ocupado por el pulso de ultrasonido. Por lo tanto, la amplitud y contenido espectral del eco, dependen del número total de dispersores, de su distribución espacial dentro del pulso de ultrasonido, así como de sus propiedades físicas (tamaño, forma, orientación y diferencia de impedancia acústica respecto al medio circundante). Debido a que la distribución espacial de dispersores en el tejido así como sus propiedades físicas presentan variaciones aleatorias [41], el proceso de dispersión del ultrasonido es un proceso estocástico. Por tanto, el patrón de interferencia que resulta de la variación espectral estocástica de las propiedades físicas de los dispersores resulta en variaciones aleatorias de la amplitud de los ecos detectados a partir del proceso de dispersión. Al representarse en una imagen, dichas variaciones aleatorias de amplitud generan el patrón de moteado característico de las imágenes de ultrasonido [1].

El nivel promedio de la amplitud de los ecos dispersados define la *ecogenicidad* de un tejido en la imagen de ultrasonido, es decir, qué tan brillante luce.

Al proceso de pérdida exponencial de energía que experimenta el pulso de ultrasonido mientras viaja a través del tejido se le llama atenuación. Dicha pérdida de energía es consecuencia de la reflexión, la dispersión y la absorción de energía del pulso. La absorción es la conversión de energía acústica en energía térmica. La capacidad atenuante de un tejido se cuantifica a través del coeficiente de atenuación, definido como la fracción de energía (en decibeles) que pierde el pulso cuando atraviesa 1 cm de tejido, sus unidades son dB/cm. Los decibeles (dB) están definidos como 10 veces el logaritmo en base 10 de la energía perdida. En tejidos blandos, la atenuación aumenta aproximadamente de manera lineal con la frecuencia [42].

Por tanto, entre mayor es la frecuencia, mayor es la atenuación. Esta relación entre frecuencia y atenuación está relacionada intrínsecamente con la profundidad que puede

alcanzar el pulso de ultrasonido en el interior del cuerpo. Debido a esto, y dado que la resolución espacial del sistema mejora al aumentar la frecuencia, el uso de altas frecuencias tiene como resultado la reducción de la penetración. Por tanto, las altas frecuencias se utilizan para estudios superficiales.

Cada eco detectado provee dos tipos de información del tejido. El tiempo en el que se detecta el eco indica la distancia entre el transductor y la estructura que generó el eco, a través del tiempo de vuelo del pulso y el eco detectado:

$$t = \frac{2z}{c}, \quad (2.10)$$

donde z es la ubicación de la estructura que generó el eco a lo largo del eje axial de propagación del pulso, y c es la velocidad del sonido en el medio.

La amplitud del eco depende de su generación, que puede ser por reflexión o dispersión. A dicha amplitud se le asigna un tono de gris para crear la imagen, de tal forma que las estructuras más reflejantes se muestran más blancas que las menos reflejantes.

2.2.2.1. Proceso de la creación de la imagen

Al realizar un estudio de ultrasonido se coloca la apertura del transductor en contacto con la piel del paciente. Para emitir un pulso de ultrasonido es necesario activar una fracción de la apertura, formada por un grupo de sus elementos piezoeléctricos. Inmediatamente después de la emisión del pulso, la misma fracción de la apertura se utiliza para detectar los ecos generados por la interacción del pulso con el tejido a diferentes profundidades. La tarea del transductor es convertir la información del eco en una señal de eco eléctrica, llamada señal de radiofrecuencia (RF). La señal posee información acerca de una serie de ecos provenientes del interior del tejido examinado.

El equipo de ultrasonido utiliza la ecuación 2.10 para ubicar los ecos a la profundidad correspondiente. El proceso de detección pulso-eco se repite conforme la apertura activa realiza un barrido lateral, obteniendo una señal de RF a cada posición de la apertura activa. Posteriormente, la imagen se forma mediante la recopilación de las señales de

eco adyacentes, donde se encuentra la información de cada uno de los ecos generados a diferentes profundidades del tejido.

La resolución espacial es la mínima separación que debe existir entre dos objetos para que puedan ser distinguidos como diferentes. Esta resolución está definida por el volumen ocupado por el pulso de ultrasonido. En caso de que dos objetos se encuentren dentro de este volumen, se generará solamente una señal de eco asociada a los dos objetos, por lo tanto no podrá distinguirse uno de otro. El incremento de la frecuencia mejora la resolución espacial. Debido a que cada transductor tiene rangos de frecuencias diferentes, la elección del transductor que debe utilizarse implica un compromiso entre la resolución espacial y la penetración.

2.2.3. Ultrasonido cuantitativo (QUS)

El ultrasonido convencional proporciona información cualitativa acerca de las estructuras internas del tejido blando. La técnica Espectroscopía por Retrodispersión Ultrasónica (ERU) se basa en modelar el tejido blando como un fluido que contiene inhomogeneidades discretas o continuas con variaciones de densidad y compresibilidad, es decir, de impedancia acústica, y donde dichas inhomogeneidades se encuentran distribuidas aleatoriamente. Aparte, debe suponerse que las propiedades estadísticas del medio aleatorio son estacionarias en el tiempo y homogéneas en el espacio [9]. Las ondas de ultrasonido que viajan dentro de un medio (tejido blando) experimentan pérdidas de energía provocadas por efectos de atenuación. Para realizar el cálculo del coeficiente de retrodispersión (σ_b) es necesario realizar la compensación del pulso de ultrasonido debida a procesos de atenuación. Por lo tanto, realizar un cálculo preciso de la pérdida exponencial de la energía del pulso de ultrasonido repercute en cada uno de los cálculos posteriores.

2.2.3.1. Secciones eficaces de dispersión

La sección eficaz se define como el cociente de la potencia total removida por un proceso de interacción dado y la intensidad incidente [41], además es una probabilidad

de interacción de una partícula u onda con el medio. A través de ella es posible cuantificar la pérdida de energía del haz incidente debido a dicha interacción. En el caso de la técnica pulso-eco es de particular interés cuantificar el coeficiente de retrodispersión (σ_b), que está definido como la diferencial angular de la sección eficaz a un ángulo de 180 grados por unidad de volumen [43].

$$\sigma_b = \frac{1}{V} \frac{\partial \sigma}{\partial \Omega} \Big|_{180} \quad (2.11)$$

Para una onda plana, el diferencial angular de la sección eficaz diferencial se expresa de la siguiente forma:

$$\frac{\sigma_b}{d\Omega} = \frac{d\Pi}{I_i d\Omega} = |\Phi(\mathbf{K})|^2 \quad (2.12)$$

donde I_i es la intensidad de la onda incidente y $\Phi(K)$ es el factor de la distribución del ángulo para ondas dispersadas y $\mathbf{K}=2k$, k es el número de onda. Además:

$$d\Pi = I_s r^2 d\Omega$$

donde I_s es la intensidad de la onda dispersada y $d\Omega$ el diferencial de ángulo sólido. El término $|\Phi(\mathbf{K})|^2$ describe la distribución angular de la amplitud de dispersión. La sección eficaz total se obtiene integrando sobre una superficie esférica de radio R :

$$\sigma = 2\pi \int_0^\pi |\Phi(\mathbf{K})|^2 \sin \Theta d\Theta \quad (2.13)$$

Las unidades típicas del coeficiente de retrodispersión son $cm^{-1}sr^{-1}$. Para un medio con una distribución aleatorio e isotrópica de dispersores, el coeficiente de retrodispersión depende del número de dispersores por unidad de volumen, su tamaño, forma e impedancia acústica, así como de la frecuencia [41]. El σ_b es una función de una variable experimental, la frecuencia.

2.2.3.2. Coeficientes de retrodispersión incoherente

El coeficiente de correlación es una medida estadística de la similitud entre muestras de un proceso aleatorio. En particular, $b_\gamma(\Delta r)$ describe la similitud de la densidad y compresibilidad en dos posiciones dentro de un volumen V , separadas por una distancia Δr y promediadas sobre un conjunto. Si D es el promedio del tamaño espacial de la dimensión de las inhomogeneidades aleatorias, entonces el coeficiente de correlación del medio se desvanece para distancias $\Delta r \gg D$. Bajo la suposición de que la distribución de dispersores es aleatoria e isotrópica, el coeficiente de correlación está relacionado con $b_\gamma \Delta r$ a través de la transformada de Fourier [41].

$$\sigma_b = \frac{k^4 \langle \gamma^2 \rangle}{16\pi^2} \int_{-\infty}^{\infty} b_\gamma(\Delta r) \exp^{-i\mathbf{K} \cdot \Delta \mathbf{r}} dv_\Delta$$

donde k es el número de onda y γ es función aleatoria que describe la distribución de los dispersores en el volumen V [44].

$$\begin{aligned} \sigma_b &= \frac{k^4 \langle \gamma^2 \rangle}{16\pi^2} \int_0^{2\pi} d\phi \int_0^\pi \sin \theta d\theta \int_0^\infty b_\gamma(\Delta r) \exp^{-i2k\Delta r \cos \theta} (\Delta r)^2 d\Delta r \\ \sigma_b &= \frac{k^4 \langle \gamma^2 \rangle}{8\pi} \int_0^\infty b_\gamma(\Delta r) \sin(2k\Delta r) \Delta r d\Delta r \end{aligned} \quad (2.14)$$

La función de correlación $b_\gamma \Delta r$ describe la distribución espacial de dispersores que, para condiciones de distribuciones aleatorias invariantes a desplazamientos e isotrópicos, dependen principalmente del tamaño de los dispersores. Dicha dependencia permite estimar un tamaño efectivo de los dispersores a partir del ajuste de modelos teóricos a valores medidos de $b_\gamma \Delta r$. Existen modelos discretos y continuos. En este trabajo se utilizaron tres modelos: el gaussiano, el exponencial y el de esfera fluida.

2.2.3.3. Coeficiente de correlación de la esfera fluida

En este modelo se consideran esferas fluidas idénticas de radio a , distribuidas aleatoriamente dentro de otro fluido con diferente densidad y/o compresibilidad [43]. El

coeficiente de correlación para este medio se encuentra a través de la función de auto-correlación de una esfera en tres dimensiones.

$$\begin{aligned} b_\gamma(\Delta r) &= 1 - \frac{3\Delta r}{4a} + \frac{(\Delta r)^3}{16a^3} \quad \text{para } 0 \leq \Delta r \leq 2a \\ &= 0 \quad \text{para } 2a \leq \Delta r \end{aligned} \quad (2.15)$$

Realizando la integral de la ec. 2.14, sustituyendo el término 2.15, el coeficiente de retrodispersión se expresa como:

$$\sigma_b = \frac{k^4 V_s^2 \bar{n} \gamma_o^2}{16\pi^2} \left(\frac{3}{2ka} j_1(2ka) \right)^2 \quad (2.16)$$

donde j_1 es la función de Bessel de primer orden y primer tipo. Nótese que:

$$V_s = \int_{-\infty}^{\infty} b_\gamma(\Delta r) d\nu_\Delta = \frac{4\pi a^3}{3}$$

2.2.3.4. Coeficiente de correlación Gaussiano

En el caso del coeficiente de correlación Gaussiano se supone que las fuentes de dispersión son variaciones continuas de las propiedades acústicas del medio con simetría esférica y que su correlación espacial puede ser descrita a través de una variable aleatoria Gaussiana [9]. La ecuación del coeficiente de correlación para un medio aleatorio b_γ Gaussiano es:

$$b_\gamma(\Delta r) = e^{-\Delta r^2/2d^2} \quad (2.17)$$

donde d es la dimensión característica. Por lo tanto, σ_b es:

$$\sigma_b = \left(\frac{k^4 V_s^2 \bar{n} \gamma_o^2}{16\pi^2} \right) e^{-2k/2d^2} \quad (2.18)$$

En este caso, V_s es:

$$V_s = \int_{-\infty}^{\infty} b_\gamma(\Delta r) d\nu_\Delta = (2\pi d^2)^{\frac{3}{2}}$$

2.2.3.5. Coeficiente de correlación exponencial

Finalmente, se considera un medio continuo aleatorio descrito por un coeficiente de correlación exponencial [9]:

$$b_\gamma(\Delta r) = e^{\Delta r/d} \quad \text{para } \Delta r \geq 0 \quad (2.19)$$

Por lo tanto:

$$\sigma_b = \left(\frac{k^4 V_s^2 \bar{n} \gamma_o^2}{16\pi^2} \right) \frac{1}{(1 + 4k^2 d^2)^2} \quad (2.20)$$

Nótese que:

$$V_s = \int_{-\infty}^{\infty} b_\gamma(\Delta r) d\nu_\Delta = \pi(2d)^3$$

2.2.3.6. Factor de forma

Para calcular el tamaño efectivo del dispersor, resulta más práctico trabajar en el dominio de Fourier debido a la necesidad de compensar por atenuación dependiente de la frecuencia y por factores dependientes del sistema. En el dominio de Fourier, el efecto de $b_\gamma \Delta r$ en el coeficiente de retrodispersión se obtiene a través de la factor de forma. El factor de forma se define como la razón entre el coeficiente de retrodispersión de una muestra (σ_b), con dispersores de tamaño finito, y el coeficiente de retrodispersión de Rayleigh (σ_o) [9]:

$$F(2k, d) = \frac{\sigma_b}{\sigma_o} \quad (2.21)$$

k es el número de onda, σ_b es el coeficiente de retrodispersión de la muestra y σ_o es el coeficiente de retrodispersión del material con dispersores mucho más pequeños que la longitud de onda del pulso de ultrasonido [9]. Por tanto, a partir del factor de forma es posible explicar la distribución espacial y organización de los dispersores en el dominio

de frecuencias.

La expresión matemática de F es:

$$F = \frac{1}{V_s} \int_{-\infty}^{\infty} b_\gamma(\Delta r) e^{-i\mathbf{K} \cdot \Delta r} d\nu_\Delta. \quad (2.22)$$

Para un proceso de retrodispersión, $K = 2k$. Por tanto, el factor de forma describe los cambios de σ_b en función de la frecuencia asociados a la microestructura del medio. Esta relación permite ajustar modelos geométricos del factor de forma obtenido experimentalmente para cuantificar la dimensión característica de la función de correlación del arreglo de dispersores [45]. Bajo la suposición de modelos con geometría esférica, dicha dimensión característica se conoce como *tamaño efectivo del dispersor (ESS)*.

Insana et al. [41] propusieron varios factores de forma para tejido blando a partir de modelos de b_γ descritos anteriormente:

$$F(2k, d) = \left(\frac{3}{2ka} j_1(2ka) \right)^2 \quad (\text{Modelo de la esfera fluida}) \quad (2.23)$$

$$F(2k, d) = e^{-2k^2 d^2} \quad (\text{Modelo Gaussiano}) \quad (2.24)$$

$$F(2k, d) = \frac{1}{(1 + 4k^2 d^2)^2} \quad (\text{Modelo exponencial}) \quad (2.25)$$

La elección sobre qué tipo de factor de forma acústico utilizar depende de la estructura del medio de la muestra y de la comparación de diferentes factores de forma que se calculan en un intervalo de diferentes tamaños de dispersor. Por lo tanto, la forma de elegir el factor de forma que mejor represente las propiedades del medio de interés requiere de un conocimiento empírico acerca de éste.

Para describir la bondad del ajuste del factor de forma teórico a los datos calculados, se calcula el parámetro estadístico χ^2 , el cual se explicará a detalle en el capítulo 3.

En este estudio, dado que no se tiene conocimiento *a priori* sobre la estructura geométrica de las fuentes de retrodispersión acústica en el tálamo de los macacos Rhe-

sus, se utilizará χ^2 como figura de mérito para optimizar la selección del factor de forma que mejor represente el proceso de retrodispersión en este tejido.

2.2.4. Tamaño Efectivo del Dispensor (ESS)

El tamaño efectivo del dispensor y la concentración acústica son parámetros acústicos útiles para describir la microestructura del tejido. Por lo tanto, pueden utilizarse como biomarcadores que contribuyan al diagnóstico de ciertas enfermedades.

El método mediante el cual se estima el ESS es determinando mediante el modelo teórico del factor de forma que minimice el error cuadrático entre el factor de forma del modelo teórico y el factor de forma experimental [41]:

$$ESS(x, z) = \underset{ESS}{\operatorname{argmin}} \left[\frac{1}{N_{AB}} \sum_{i=1}^N 10 \log \left[\frac{F_{muestra}(f_i)}{F_{modelo}(f_i, ESS)} \right] - \overline{10 \log \left[\frac{F_{muestra}(f_i, x, z)}{F_{modelo}(f_i, ESS)} \right]} \right]^2 \quad (2.26)$$

donde f_i es la i -ésima frecuencia del ancho de banda que comprende desde f_1 hasta f_{AB} y la barra indica el promedio dentro de dicho ancho de banda [41]. Una limitante importante de todos los factores de forma es que no pueden ser utilizados cuando $ka \gg 1$, k el número de onda y a el radio del dispensor.

El modelo Guassiano posee la gran ventaja de poseer una expresión cerrada que permite realizar el cálculo directo del ESS. Esta expresión es [46]:

$$d^2 = \frac{-d_1 c^2}{80} \frac{\sum_{\omega_{min}}^{\omega_{max}} (y(\omega)\omega^2 - \bar{y}\bar{\omega}^2)}{\sum_{\omega_{min}}^{\omega_{max}} (\omega^2 - \bar{\omega}^2)^2} \quad (2.27)$$

donde ω es la frecuencia angular y $y(\omega) = 10 \ln \left(\frac{\sigma(\omega)}{\omega^4} \right)$.

2.2.5. Concentración acústica

La concentración acústica se define como el producto del número de dispensores dentro del volumen del pulso de ultrasonido, y el promedio cuadrado de la variación de

impedancia acústica entre los dispersores y el tejido que los rodea.[15]

$$AC = \frac{\sigma_b}{10} \frac{16\pi^2}{k^4 V_{s_{modelo}} F_{teo}} \quad (2.28)$$

donde V_s es el volumen del dispersor calculado a partir del valor estimado de ESS. El subíndice *modelo* corresponde al factor de forma teórico con mejor ajuste al experimental, y el subíndice *teo* (teórico) es el correspondiente al ESS calculado.

2.3. Anatomía del tálamo

El cerebro (encéfalo) es un órgano que se encuentra ubicado dentro del cráneo. Posee tres estructuras principales: los hemisferios cerebrales, el sistema límbico y el núcleo basal (ganglios basales). El cerebro pesa aproximadamente 1.350 kg, sin embargo adquiere este peso con la edad. Durante el primer año de vida crece de forma rápida, en los primeros 24 meses de vida triplica su peso. Cuando un ser humano nace, el cerebro pesa aproximadamente el 25 % de su peso adulto, a los 6 meses el 50 %. En el primer año de vida pesa 60 %, a los 5 años apenas ha completado el 90 % de su maduración total. Finalmente a los 12 años, el peso total del cerebro se alcanza [47].

Debido al hecho de que el cerebro crece a diferentes tasas de tiempo, lo mismo sucede con los órganos y tejidos que lo componen, cada estructura alcanza su pico de crecimiento a diferentes tiempos. En el caso del desarrollo interno, la médula espinal y el cerebro (a excepción del cerebelo) alcanzan su número máximo de neuronas en la semana 25 de gestación (billones de neuronas) así como neuroglías (células del sistema nervioso) [47].

El tálamo forma parte del sistema límbico y está situado en el diencefalo. El diencefalo está compuesto de cuatro estructuras principales: el tálamo, hipotálamo, epitálamo, y subtálamo [47]. En la figura 2.1 se observan tres de las estructuras principales del diencefalo, quien está rodeado por los dos hemisferios cerebrales.

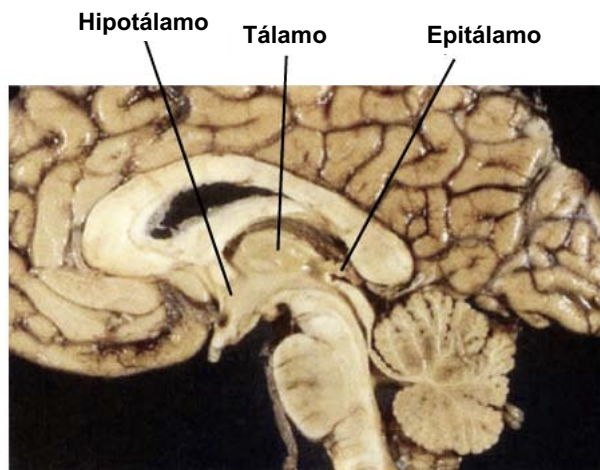


Figura 2.1: Corte sagital del cerebro humano, se observa el hipotálamo, tálamo y epitálamo. Tomada de Webb W. [48]

En la figura 2.2 se observa los ejes que se utilizan para describir el cerebro humano. El mismo sistema es utilizado para describir las diferentes secciones del tálamo.

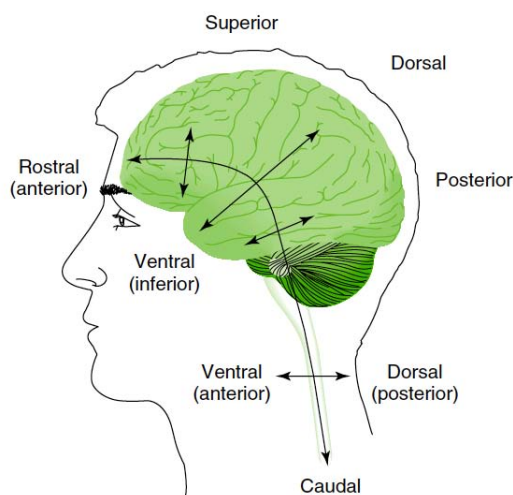
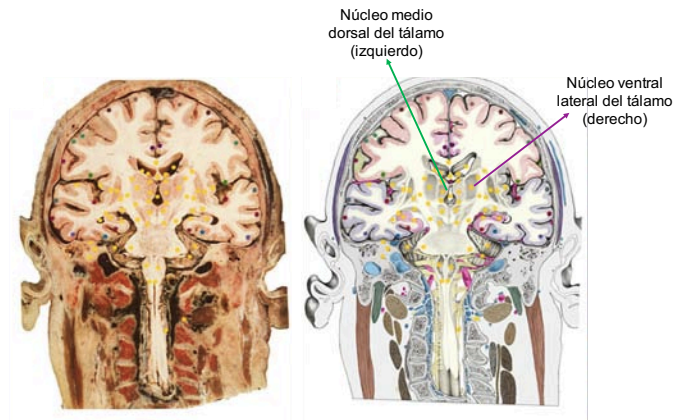


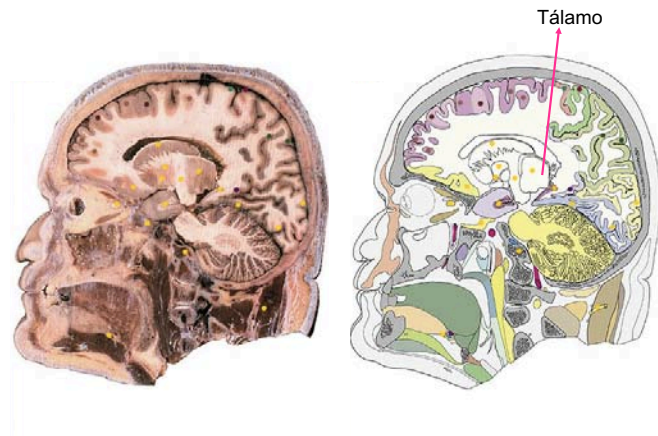
Figura 2.2: Ejes del cerebro humano. Adaptada de Webb W.[47]

El tálamo está ubicado en la sección ventral inferior, tiene una forma redondeada y está constituido de materia gris. Su composición se asemeja a dos masas con forma de huevo una a un lado de la otra. En un cerebro adulto se estima que la dimensión

rostrocaudal del tálamo es de aproximadamente 30 mm, con 20 mm de altura y 20 mm de ancho [47].



(a) Corte coronal del cerebro.



(b) Corte sagital del cerebro.

Figura 2.3: Estructuras en el corte coronal y sagital del cerebro. Adaptada de Atlas del cerebro humano [49].

La figura 2.4 muestra un estudio de ultrasonido en modo B de un corte coronal del cerebro de un macaco Rhesus neonato, en la imagen se encuentran señalado el tálamo y la base del cráneo.

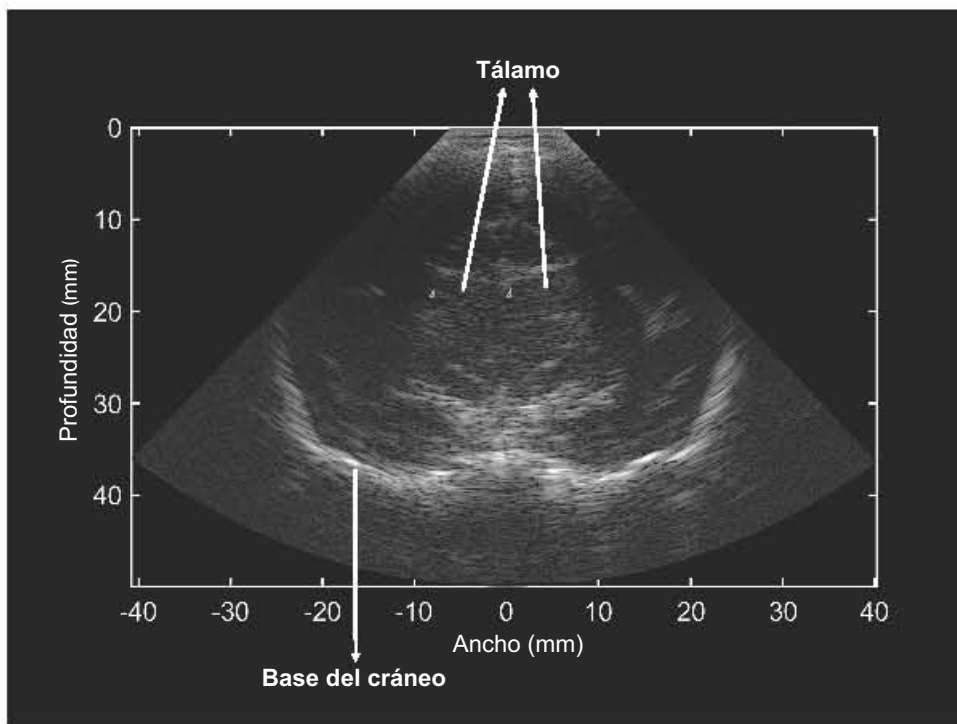


Figura 2.4: Ultrasonido del cerebro de macacos Rhesus neonatos.

El tálamo controla mecanismos sensoriales y mecánicos como la conciencia, la atención y otro tipo de procesos neurocognitivos como la memoria y el lenguaje. Además, el tálamo integra sensaciones del sistema nervioso. El tálamo del humano se encuentra dividido de 50 a 60 núcleos.[50] Cada núcleo tiene una función diferente, actúan como transmisores enviado información a otras áreas sensoriales de la corteza cerebral.

Los núcleos del tálamo que pueden visualizarse en el corte coronal son, al menos, seis núcleos. Los que ocupan mayor área; son el núcleo ventral lateral seguido del medio dorsal. El núcleo ventral lateral se considera que tiene pocas células comparado con otros núcleos, posee dos tipos de células clasificadas de acuerdo a sus tamaños, una entre $(30-40) \mu m^2$ y la otra de $20\mu m^2$. Las células grandes, localizadas en la parte ventral, tienen forma poligonal, y normalmente están acomodadas en filas, y están distribuidas de forma homogénea. Su región lateral y basal está caracterizada por tener paquetes de fibras, lo cual sugiere una distribución arreglada en ciertas zonas de este núcleo [49, 50]. Estudios realizados en humanos han demostrado que el tálamo no sólo

es complejo por las funciones que realiza, sino porque incluso entre seres humanos no siempre cada núcleo se localiza en la mismo lugar.[50] Siervert et al. observaron importantes variaciones en la sección transversal entre sujetos del tálamo y la localización de los núcleos de dicho órgano. Por tanto, el tálamo es un tejido complejo y heterogéneo.

2.3.1. Análisis inmunohistoquímico

Un análisis inmunohistoquímico se utiliza para buscar antígenos de células o tejidos que pueden ser aminoácidos, proteínas o agentes infecciosos. El estudio se lleva a cabo en dos fases: en la primera se prepara la muestra (fija y procesa el tejido) para las etapas involucradas en la reacción, en la segunda fase se interpreta y cuantifica la expresión del antígeno [51]. Los estudios de inmunohistoquímica enfocados en apoptosis se llevan a cabo haciendo uso de diferentes tipos de caspasas.

Los dos procesos más conocidos de muerte celular son la apoptosis y la necrosis, a éstos se les identifica dependiendo de las características de la muerte celular. La apoptosis es un proceso biológico fundamental y complejo de muerte celular programada, se lleva a cabo de forma ordenada, mientras que la necrosis es un proceso desordenado y espontáneo. Durante la apoptosis ocurre fragmentación del ADN, condensación del citoplasma y cromatina, así como la formación de cuerpos apoptóticos, que son absorbidos rápidamente por otras células sin la necesidad de activar respuesta inmune [52].

Las caspasas (citosina-aspartato proteasas) son enzimas que son mediadoras de la apoptosis, necrosis, y otros tipos de muerte celular. Existen 14 tipos de caspasas, las cuales son clasificadas dependiendo de su función. A las caspasas 2,3,7,8,9, y 10 se les considera proapoptóticas. Las caspasas restantes, 1,4,5,11 y 12 se les llamada proinflamatorias (necrosis) [53]. Pueden clasificarse de otra forma, iniciadoras o ejecutoras. Las caspasas 1,2,4,5,8,9,10,11 y 12 son iniciadoras, este tipo de caspasas son activadas cuando son traslocadas a compartimientos específicos. Las caspasas 3,6 y 7 son ejecutoras, se activan a través de las caspasas iniciadoras [52].

2.3.1.1. Caspasa 3

La caspasa 3 es una protoasa que se activa durante la muerte celular. Esta caspasa es fundamental para el desarrollo normal del cerebro, además es característica de la apoptosis. Es indispensable para la fragmentación del ADN, para la condensación de la cromatina y por tanto para la formación de cuerpos apoptóticos en todo tipo de células. En animales mamíferos se ha demostrado que la muerte celular programada puede seguir dos caminos, el camino de la mitocondria (intrínseco) y el camino del receptor de la muerte (extrínseco) [54]. Las proteínas Bax y Bak son consecuencia de un estímulo apoptótico. La caspasa 9 es el iniciador de la caspasa 3 y 7. La característica interesante de la caspasa 3 es que tanto el camino intrínseco como el extrínseco convergen en este tipo de caspasa. Se estima que alrededor de la mitad de la población inicial del sistema nervioso es eliminada por apoptosis con la finalidad de optimizar conexiones de sinapsis y eliminar neuronas innecesarias [54]. Con algunas excepciones se ha mostrado que las neuronas siguen el camino intrínseco durante la apoptosis, por tanto, el papel central de la caspasa 3 en el neurodesarrollo recae por la activación alterada de esta caspasa durante un desarrollo anormal del cerebro.

2.3.2. Apoptosis en el tálamo

Kerr et al. [20] fueron los primeros en utilizar el término *apoptosis* al cual describieron como un proceso estructural. Propusieron que la muerte celular podía ser dividida en *apoptosis* y *necrosis*, sin embargo su clasificación no fue realizada para tejidos neurológicos, por lo tanto no es posible extender su definición a neuronas del sistema nervioso central [55]. Existe otro tipo de muerte celular llamado excitotóxico, el cual ha sido descrito como un proceso de necrosis, sin embargo también ha sido considerado como apoptosis, dependiendo de la magnitud del estímulo. Por tanto, es evidente que existe un mal uso de la terminología utilizada. En 1999 Ikonomidou et al. [56] observaron que una rata recién nacida al recibir un trauma cerebral sufre tanto muerte celular excitotóxica como apoptosis. Además demostraron que los dos procesos de muerte ce-

lular son distintos y puede distinguirse uno de otro de forma clara. Durante el periodo de crecimiento y desarrollo rápido del cerebro (sinaptogénesis) los dos tipos de muerte celular están presentes, sin embargo tienen una relación contraria con el transmisor de glutamato NMDA. Durante la sinaptogénesis una estimulación excesiva del receptor de glutamato NMDA activa la neurodegeneración excitotóxica, mientras que el bloqueo de este receptor desencadena la neurodegeneración apoptótica [57]. Por lo tanto, se ha demostrado que la apoptosis en el sistema nervioso puede desencadenarse mediante el bloqueo del receptor de glutamato NMDA por un periodo de exposición largo a anestésicos como el etanol, ketamina, isoflurano y sevoflurano, tal que dicho intervalo coincida con el periodo de sinaptogénesis del tejido. En algunos estudios se hace énfasis en la importancia de estudiar tanto el proceso excitotóxico y la apoptosis. A pesar de que ambos tengan algunas características similares, ocurren durante periodos distintos. Por ejemplo, el proceso de condensación de la cromatina ocurre en los dos procesos de muerte celular, sin embargo durante la apoptosis se da en las primeras etapas y en el excitotóxico ocurre al final del proceso. Al parecer, la fragmentación de la membrana nuclear es una característica fundamental de la neuroapoptosis y no ocurre en la neurodegeneración excitotóxica [55]. Se ha demostrado la inducción de neuroapoptosis debida a la exposición a anestésicos mediante estudios realizados con microscopio electrónico y con fotones. Este tipo de estudios otorgan información de características morfológicas (estructura) del tejido [55, 56, 58, 59]. El proceso que ocurre durante la neuroapoptosis involucra la traslocación de la proteína Bax a membranas mitocondriales y la filtración extra-mitocondrial de citocromo c, seguido de la activación de caspasa 3. La proteína Bax está presente en la caspasa 3 [54]. Debido a que la muerte celular se da previamente a la activación de la caspasa 3, un estudio de inmunohistoquímica de caspasa 3 activada identifica de manera confiable las células que han progresado más allá de la muerte celular. Este tipo de análisis se ha utilizado numerosas veces en trabajos que investigan la neuroapoptosis debida a anestésicos en neuronas [30, 55, 60?]. Además como se mencionó previamente la proteína Bax es una consecuencia de un estímulo apoptótico.

Metodología

El coeficiente de retrodispersión ($\sigma_b(f)$) y sus parámetros derivados fueron estimados a través de ERU. Para eliminar las dependencias del sistema se usó el método del maniquí de referencia desarrollado por Yao et al. [61]. Este método permite eliminar los dependencias del sistema y la adquisición de datos mediante el uso de un maniquí de referencia. Dicho método ha sido validado en maniqués de materiales equivalentes a tejido [62, 63] y utilizado para caracterizar varios tejidos [8]. Este método consiste en obtener señales de radiofrecuencia (RF) utilizando el mismo equipo de ultrasonido y con los mismos parámetros con los que se adquirieron los datos para el tejido que se desea caracterizar [61]. Para poder utilizar este método es necesario conocer los coeficiente de atenuación (α) y retrodispersión (σ_b) del maniquí utilizado como referencia. Además, el método supone que en el medio (muestra) existe dispersión incoherente, y que la rapidez de propagación en el maniquí es similar a la velocidad de propagación del pulso en el tejido.

A partir del procesamiento de señales RF puede generarse el espectro de energía retrodispersada de las señales de RF tanto del tejido como del maniquí de referencia. Bajo condiciones de retrodispersión incoherente, dicho espectro puede modelarse como el producto de cuatro factores que dependen de la frecuencia f y de la profundidad z de la región del tejido que se quiere caracterizar:

$$S(f, z) = D(f, z)G(f, z)A(f, z)\sigma_b(f) \quad (3.1)$$

3. METODOLOGÍA

Estos factores son:

1. El *patrón de difracción* $D(f,z)$: Este factor define la contribución de la distribución espacial de intensidad del haz de ultrasonido.
2. La *función de transferencia del sistema* $G(f,z)$: Este factor incluye las funciones de transferencia de los componentes del sistema (amplificadores, convertidores analógico-digital) y ganancias.
3. La *atenuación acústica* $A(f,z)$: Este término considera la atenuación de las capas $m = 1, 2, \dots, M$ de tejidos interpuestos entre el transductor y la región del tejido que se caracteriza, y depende del coeficiente de atenuación $\alpha_m(f)$ y el espesor Δz_m de cada capa:

$$A = \exp \left\{ -4 \sum_{m=1}^M \alpha_m(f) \cdot \Delta z_m \right\} \quad (3.2)$$

4. El coeficiente de retrodispersión $\sigma_b(f)$.

Para eliminar los factores dependientes del sistema y la adquisición (G y D), se normaliza el espectro del tejido de interés ($S_{muestra}$) con respecto al espectro de un material de referencia (S_{ref}): como resultado, G y D son iguales en las señales de RF de la muestra y el maniquí de referencia. Por tanto, el espectro normalizado es:

$$S_{norm}(f, z) = \frac{G(f, z) \cdot D(f, z) \cdot A_{muestra}(f, z) \cdot \sigma_{b,muestra}(f)}{G(f, z) \cdot D(f, z) \cdot A_{ref}(f) \cdot \sigma_{b,ref}(f)} \quad (3.3)$$

donde A_{ref} es la atenuación del maniquí de referencia.

De la ecuación 3.3 es posible obtener la expresión para estimar el coeficiente de retrodispersión:

$$\sigma_{b,muestra}(f, x, z) = \sigma_{b,ref}(f) e^{-4\alpha_{ref}(f)z} \frac{S_{muestra}(f, x, z)}{S_{ref}(f, x, z)} \frac{1}{A(f, x, z)} \quad (3.4)$$

Dado que se conocen tanto A_{ref} como $\sigma_{b,ref}$, la ecuación anterior puede resolverse para el coeficiente de retrodispersión.

3.1. Implementación y validación

Para poder realizar el cálculo del espectro de energía retrodispersada, el cálculo de atenuación y del coeficiente de retrodispersión, así como el cálculo de ESS y AC, fue necesario realizar la implementación de los códigos computacionales en el programa Matlab. Igualmente, los códigos se habilitaron en el servidor DAVIS del Instituto de Física de la UNAM, para procesar datos de manera paralela usando 12 nodos del servidor.

Para validar los códigos implementados, se calculó el tamaño efectivo del dispersor (ESS) y la concentración acústica de dos maniqués tejido equivalentes (referidos como maniqués muestra A y B) y que contienen dispersores esféricos con diferentes distribuciones de diámetro. El objetivo de la validación es demostrar que los códigos implementados permiten cuantificar valores de ESS y AC sensibles a las diferencias en la microestructura de los maniqués muestra. Para esto, se calcularon los valores de ESS y AC aplicando el método de maniqué de referencia a señales RF adquiridas de los maniqués A y B (así como de un maniqué de referencia) en la Universidad de Wisconsin-Madison.

3.1.1. Maniqués tejido equivalentes

En esta sección se utilizaron tres maniqués compuestos por materiales tejido-equivalentes. Dos maniqués se utilizaron como “muestra” (referidos como maniqués A y B) y uno como referencia para la compensación por los factores dependientes de la adquisición de datos.

El maniqué de referencia es un paralelepípedo de acrílico, con dimensiones de $15 \times 15 \times 5 \text{ cm}^3$, que se llena con un gel a base de agarosa con polvo de grafito. Para proveer condiciones de retrodispersión incoherente, el maniqué de referencia contiene microesferas de vidrio cuya densidad es de 236 dispersores/ mm^3 . El maniqué muestra A es un paralelepípedo con las mismas dimensiones y composición que el maniqué de referencia, las microesferas sólidas en su interior poseen un diámetro variable entre 75-90

3. METODOLOGÍA

μm con una concentración de 9 dispersores/ mm^3 . El maniquí muestra B es un paralelepípedo de acrílico de $16 \times 10 \times 10 \text{ cm}^3$, contiene una mezcla de agarosa-propilenglicol a base de agua y leche filtrada, las microesferas solidas contenidas en su interior poseen un diámetro variable entre $5\text{-}43 \mu\text{m}$ (Spheriglass 3000E, Potter Industries, Malvern, PA). La agarosa-propilenglicol se utiliza dado que posee valores de densidad y compresibilidad similares a tejido blando. Los maniqués se fabricaron por el Dr. Ernest Madsen y Gary Frank del taller de la Universidad de Wisconsin-Madison, siguiendo procedimientos descritos previamente [64].

Las figuras 3.1, 3.2 y 3.3 muestran imágenes de cada uno de los maniqués y una imagen en modo B de cada uno de ellos. Las imágenes en modo B de los tres maniqués son muy similares entre si y no proveen información visual sobre la microestructura que compone a cada uno de ellos.

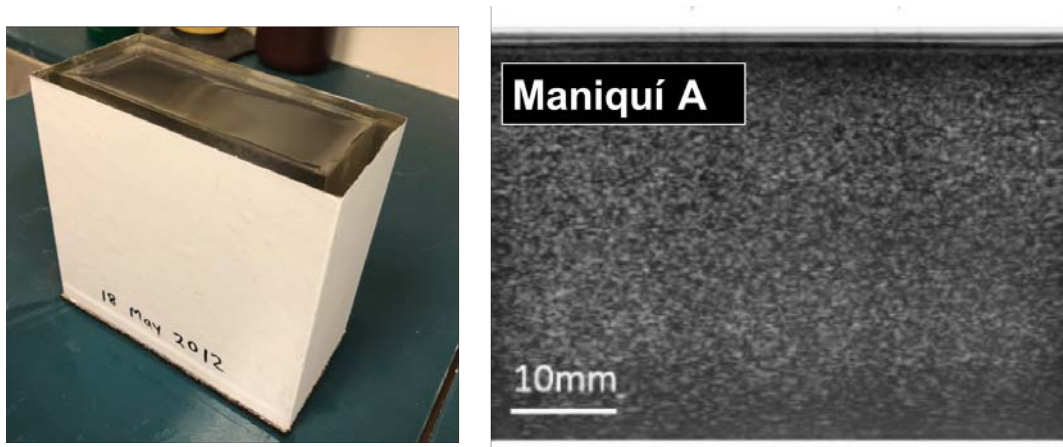


Figura 3.1: Fotografía del maniquí A y una imagen en modo B del mismo.

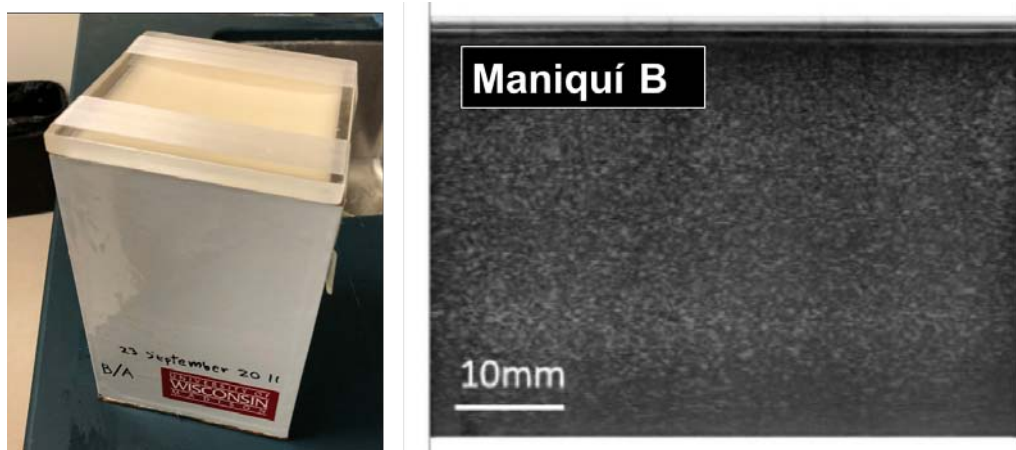


Figura 3.2: Fotografía del maniquí B y una imagen en modo B del mismo.

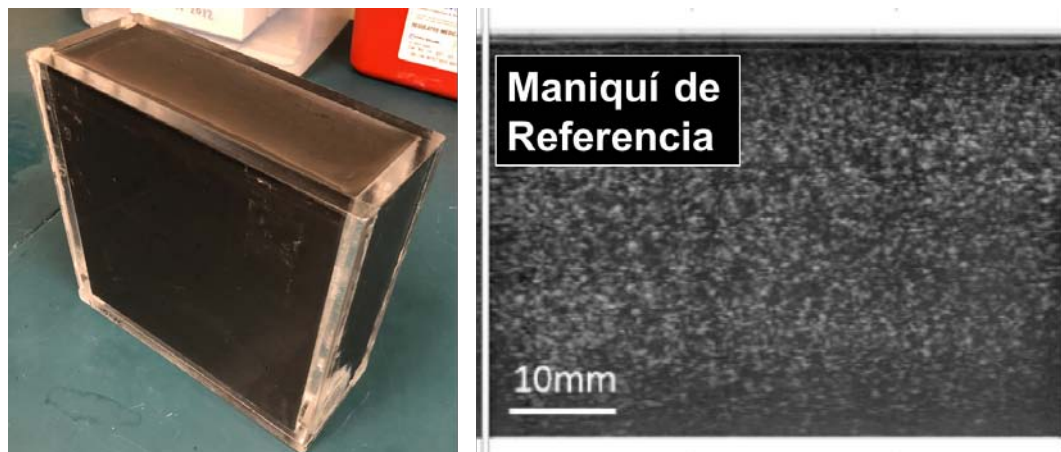


Figura 3.3: Fotografía del maniquí de referencia y una imagen en modo B del mismo.

3.1.2. Adquisición de datos

Ambos maniqués tienen una ventana de escaneo cubierta por una membrana de plástico de Saran. Para contar con valores estándar del coeficiente de atenuación y del coeficiente de retrodispersión, los valores de estos parámetros en los tres maniqués se midieron en la Universidad de Wisconsin-Madison con técnicas de sustitución de banda estrecha y pulso-eco de banda ancha, conocidas como técnicas de caracterización ultrasónica no destructiva por inmersión [64, 65].

En estas técnicas se utilizan transductores de un solo elemento piezoeléctrico y

3. METODOLOGÍA

muestras de prueba con un grosor de 2.5 cm y diámetro de 10 cm, compuestas de los mismos materiales tejido-equivalentes que los maniqués. La tabla 3.1 muestra los valores estándar para la rapidez de propagación del sonido (c), y del coeficiente α y σ_b para ambos maniqués. Los valores que se muestran son el promedio de cuatro mediciones realizadas a distintas frecuencias que son: 2.5 MHz, 5 MHz, 7.5 MHz y 10 MHz. Además, se muestra la desviación estándar asociada a cada promedio, la cual utiliza la siguiente ecuación:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{(N-1)} \sum_{i=1}^N |A_i - \mu|^2} \quad (3.5)$$

$$\mu = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N A_i$$

donde σ es la desviación estándar, A_i es cada uno de los valores de la muestra, μ es el promedio de los datos y N es el número total de datos.

Tabla 3.1: Valores de la rapidez de propagación, del coeficiente de atenuación y retrodispersión para el maniquí de referencia y los maniqués A y B.

Maniquí	c [m/s]	Coefficiente α	Coefficiente σ_b
Referencia	1533.2±0.6	0.4882[dBcm ⁻¹ MHz ⁻ⁿ]f ^{1.1085}	1×10 ⁻⁵ [cm ⁻¹ sr ⁻¹ MHz ^{-β}]f ^{2.8129}
Muestra A	1533.0±0.0	0.4833[dBcm ⁻¹ MHz ⁻ⁿ]f ^{1.1485}	8×10 ⁻⁴ [cm ⁻¹ sr ⁻¹ MHz ^{-β}]f ^{1.3841}
Muestra B	1543.3±1.21	0.3393[dBcm ⁻¹ MHz ⁻ⁿ]f ^{1.2624}	1×10 ⁻⁶ [cm ⁻¹ sr ⁻¹ MHz ^{-β}]f ^{3.9858}

Para el método del maniquí de referencia, se adquirieron 10 planos de señales de RF de ambos maniqués con un transductor lineal compuesto por 192 elementos piezoléctricos y una apertura de 38 mm, utilizando un equipo de ultrasonido Siemens Acuson S3000 (Siemens Medical Solutions USA, Inc., Malvern, PA) el cual opera a una frecuencia central de 6.6 MHz y una profundidad focal de transmisión de 3 cm. Se habilitó al escáner con una interfaz de investigación Axius Direct [66]. Cada plano está compuesto por un conjunto de 256 señales de RF digitalizadas a una tasa de muestreo de 40 MHz, cada una de las cuales contiene señales ecos a una profundidad máxima de 6 cm. Las 256 señales corresponden a líneas de visión equidistantes que abarcan la

apertura de 38 mm del transductor.

3.1.3. Procesamiento de datos

En la figura 3.4 se presenta un diagrama de flujo que describe, de manera general, la secuencia de pasos de procesamiento de señales de RF dentro de una región de interés (ROI) con la técnica ERU usando el método de maniquí de referencia. Durante el proceso de validación, en vez de caracterizar el tejido, se caracterizaron dos maniqués tejido-equivalentes. Posteriormente, se calculó el espectro de energía a través del método multitaper adaptado por Rosado-Mendez et al. [67].

La matriz generada después de realizar el cálculo del espectro de energía, consta de 74 renglones que abarcan profundidades de 0.25 cm a 5.73 cm, a intervalos de 0.07 cm, y 40 columnas, que abarcan posiciones laterales de 0.26 cm a 3.73 cm, a intervalos de 0.081 cm. Con esta información el programa de Matlab puede ubicar la región que se selecciona a través de la imagen en modo B.

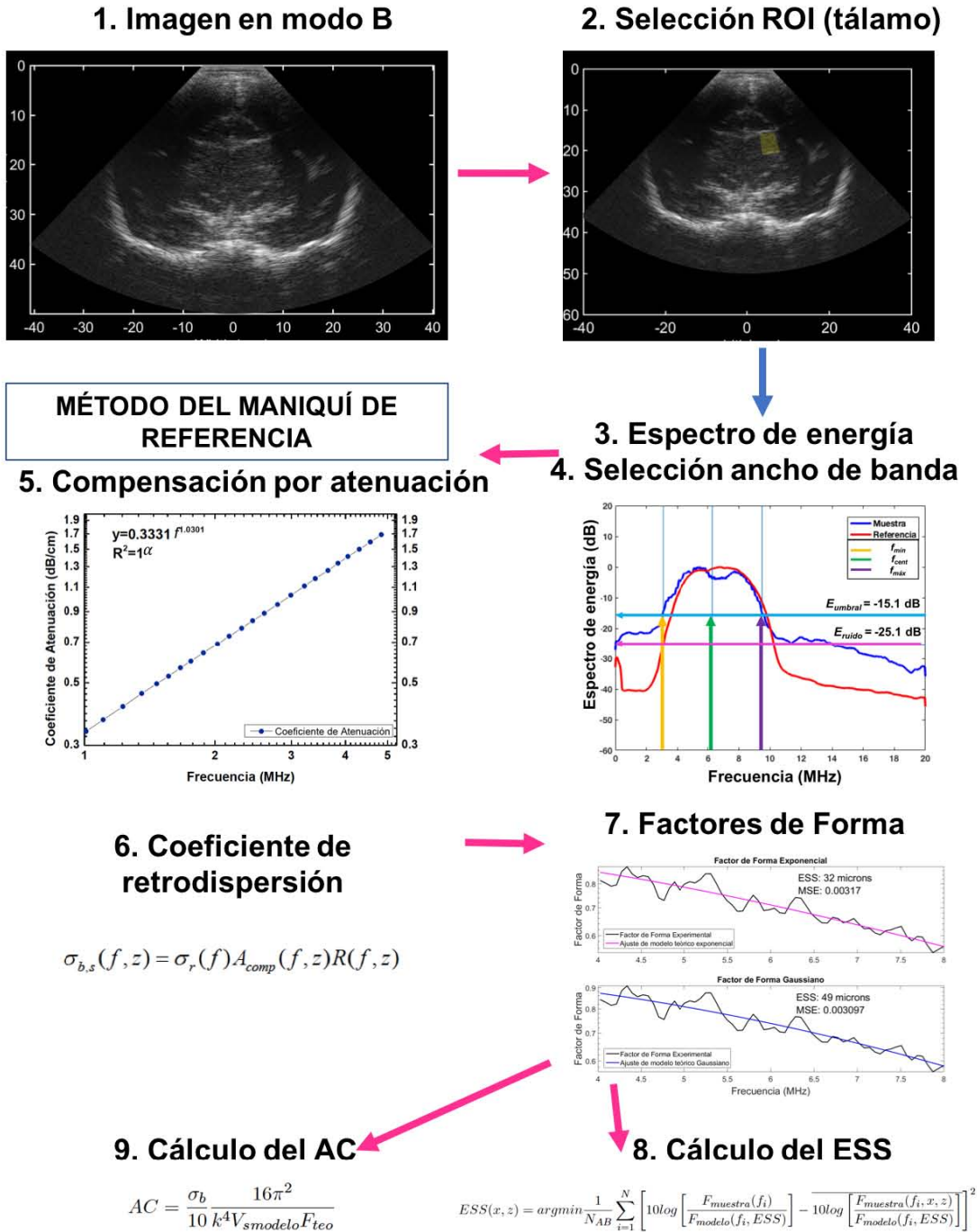


Figura 3.4: Algoritmo utilizado durante el procesamiento de datos, basado en el método del maniquí de referencia.[61]

Determinación del ancho de banda para análisis

Para determinar el ancho de banda se seleccionó una región central de cada uno de los planos. Posteriormente, en dicha región se calculó el espectro de energía a través del método multitaper [67]. Se calculó el nivel de ruido a altas frecuencias relacionado con ruido electrónico. Para esto se obtuvo el promedio de energía de la muestra (maniqués) de cada plano en un intervalo de 12 MHz a 16 MHz. Esto permitió fijar el nivel base (E_{ruido}) de energía individual de cada espectro. Enseguida, se determinó el valor de la energía umbral (E_{umbral}) para el análisis a partir de $E_{umbral} = E_{ruido} + 10\text{dB}$. A partir de la E_{umbral} se seleccionó el ancho de banda con energía mayor a dicho nivel, las frecuencias mínima (f_{min}), y máxima (f_{max}), así como la frecuencia central, $f_{cent} = \frac{f_{max} + f_{min}}{2}$. Este análisis se realizó para cada uno de los 10 planos de señales de RF de cada uno de los maniqués. Posteriormente, se obtuvieron histogramas de los valores de f_{min} , f_{cent} , f_{max} y E_{umbral} . Finalmente, el ancho de banda para el análisis de ERU se definió a partir de la mediana de f_{min} y f_{max} para todo el conjunto de datos correspondiente a cada maniquí.

Compensación por atenuación

La idea general sobre cómo se estima la atenuación es cuantificar la pérdida de energía promedio para cada componente de frecuencia de la señal de RF sobre la profundidad del campo de visión. Para esto, se calculó la pérdida de energía a lo largo de cada una de las columnas del arreglo de espectros a diferentes profundidades. Para obtener una sola estimación de la atenuación del tejido equivalente interpuesto en función de la frecuencia, se calcula la pérdida de energía acústica sobre el eje x a lo largo de cada N_x columnas del arreglo de espectros de energía dentro del mismo plano. La atenuación interpuesta α_{IST} se calcula a través del logaritmo del espectro normalizado ($S_{norm}(f, x, z)$):

$$L(f, x, z) = \ln[S_{norm}(f, x, z)] \quad (3.6)$$

$$\Rightarrow L(f, z) = \ln \left(\frac{\sigma_{b,muestra}(f)}{\sigma_{b,ref}(f)} \right) - 4[\alpha_{IST} - \alpha_{ref}(f)]z \quad (3.7)$$

Se estima la atenuación mediante un ajuste lineal de la diferencia mínima cuadrática para $L(f, z)$ vs. z , para cada frecuencia dentro al ancho de banda utilizado. La pendiente del ajuste es proporcional a la diferencia de α_{IST} y α_{ref} , y dado que el valor de α_{ref} se conoce, entonces es posible calcular α_{IST} . El número cuatro en la ecuación 3.7 proviene de dos fuentes, la primera es que toma en cuenta la distancia que recorre el pulso en su camino a la región de interés y del eco en su viaje hacia el transductor, la segunda es que considera que se realizan cálculos con la intensidad del pulso (cuadrado de la amplitud) y no con su amplitud. Alrededor de 20 estimaciones de α_{IST} se obtienen por plano, cada una corresponde a cada una de las columnas del arreglo de espectros de energía. Posteriormente se realiza un promedio de la atenuación en las 40 columnas de cada plano para los 10 planos. Dicho promedio se utiliza como la atenuación interpuesta. Finalmente, la dependencia en frecuencia de α_{IST} se parametriza con un ajuste de potencia y la ecuación se utiliza para estimar el coeficiente de atenuación.

3.2. Estimación del coeficiente de retrodispersión

Para poder estimar el coeficiente de retrodispersión es necesario aplicar la ecuación 3.4 al conjunto de datos por plano resultante del cálculo del espectro de energía, considerando el ancho de banda establecido previamente. El cálculo se realizó de forma independiente para cada posición de la ROI en el plano de señales de RF.

3.2.1. Parámetros con interpretación física directa

Se calculó el tamaño efectivo del dispersor (ESS) y la concentración acústica (AC) con un modelo Gaussiano del factor de forma, a partir de ajustar al coeficiente de retrodispersión medido a dicho modelo. El cálculo se realizó para cada una de las columnas y filas que componen a la matriz de los valores del coeficiente de retrodispersión. Para calcular el ESS y la AC, fue necesario estimar el factor de forma experimental y el

factor de forma teórico.

El factor de forma teórico se calculó aplicando las ecuaciones correspondientes al modelo Gaussiano 2.24, y se utilizó el mismo intervalo de frecuencias con el que se estimó el coeficiente de retrodispersión obtenido experimentalmente.

El factor de forma experimental se calcula mediante la división del coeficiente de retrodispersión de la muestra σ_b entre la frecuencia elevada a la cuarta potencia.

$$F_{exp}(f, d) = \frac{\sigma_b}{cf^4} \quad (3.8)$$

donde c es un factor de normalización igual a la razón entre promedio de F_{teo} dentro del ancho de banda y el promedio de σ_b .

Tamaño efectivo del dispersor (ESS)

El cálculo del ESS se realizó por medio del factor de forma Gaussiano, utilizando la expresión cerrada (explícita) de la ecuación 2.27.

Concentración acústica

Para realizar el cálculo de la concentración acústica se calcula el volumen asociado al modelo gaussiano V_{sGAUSS} a partir del valor calculado del ESS:

$$V_{sGAUSS} = (2\pi d^2)^{3/2} = f_1(ESS) \quad (3.9)$$

Por tanto, la ecuación para calcular la AC es:

$$AC = \frac{\sigma_b}{10} \frac{16\pi^2}{k^4 V_{sGAUSS} F_{teo}} \quad (3.10)$$

La ecuación 3.10 se describió previamente en la sección correspondiente al marco teórico (sección 2.2.5). Debido a que la concentración acústica es un parámetro que comúnmente presenta un gran rango dinámico, se expresará en decibeles respecto a 1mm^{-3} .

3.3. Modelo animal

La muestra de datos consiste en un conjunto de señales RF de imágenes de ultrasonido de 14 macacos Rhesus neonatos expuestos a una dosis del 3 %-4 % de concentración de sevoflurano. Bajo estas condiciones los animales se encontraban sedados de tal forma que no responden a ningún estímulo doloroso pero son capaces de mantener su respiración sin equipo de respiración asistida. Estos datos fueron adquiridos en el Centro Nacional de Investigación en Primates de Wisconsin entre 2015 y 2017. En cada procedimiento, inmediatamente después de sedar al animal se recostó sobre su lado derecho y se realizó la adquisición de imágenes. Los datos fueron adquiridos con un equipo Siemens S3000, con un transductor de fase 10V4, con una frecuencia nominal de operación de 10 MHz. Se adquirieron entre 10 a 15 planos de señales RF de vistas coronales del tálamo, posicionando el transductor sobre la sutura sagital, a medio camino entre la fontanela anterior y la fontanela posterior. La adquisición de datos se repitió 6 horas después de la administración del anestésico. La figura 3.5 muestra un esquema de la forma en la que se realiza el estudio de ultrasonido para los macacos, en lugar de estar recostado un bebé recién nacido, se encuentra un macaco Rhesus neonato inhalado el anestésico.



Figura 3.5: Esquema de la adquisición de señales de RF. Tomado de The Neumors Foundation [68].

En la figura 3.6 se muestra como ejemplo el conjunto de 10 planos pertenecientes a un sujeto.

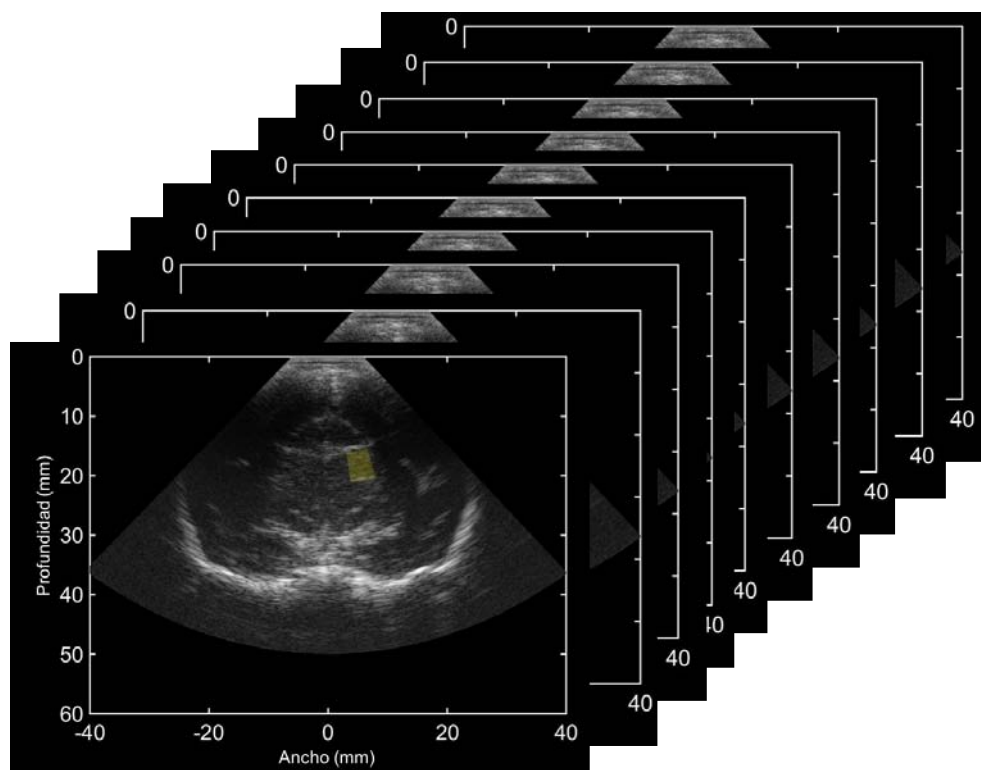


Figura 3.6: Conjunto de planos para un sujeto de la muestra.

Un transductor de fase posee alrededor de 64 a 128 elementos piezoeléctricos en un arreglo lineal (el número exacto es propiedad intelectual del fabricante). A través del control de tiempos de estimulación eléctrica de los elementos piezoeléctricos del transductor es posible angular el haz de ultrasonido en diferentes direcciones, como se muestra en la figura 3.7 [69]. Un transductor de fase se caracteriza por un tamaño de apertura pequeño y la formación de una imagen con un campo de visión amplio a través del proceso de angulación electrónica del haz de ultrasonido. Esto permite obtener imágenes internas del cuerpo a través de ventanas de acceso pequeñas (como el espacio intercostal, o las suturas craneales en recién nacidos).

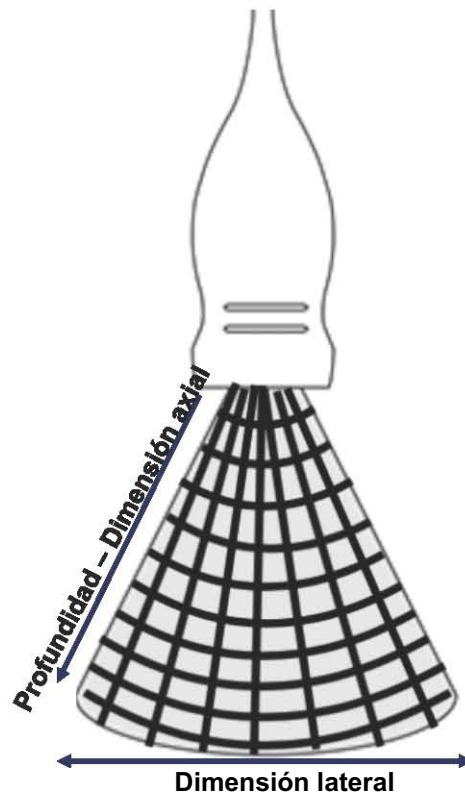


Figura 3.7: Esquema de un transductor de fase y la distribución de las líneas acústicas en el campo de visión. Adaptado de Frankel et al. [69]

A diferencia de una imagen producida por un transductor lineal (como en el caso de la validación), en una imagen sectorial producida por el transductor de fase el espacio entre las líneas de visión de las señales RF aumenta con la profundidad.

Posteriormente fueron adquiridos entre 20-25 planos de señales de radiofrecuencia del maniquí de referencia, mismo que se utilizó en las pruebas de validación, conservando cuidadosamente los parámetros con los que fueron adquiridos los datos de los macacos. Se siguieron los pasos mostrados en el algoritmo de la figura 3.4 durante el procesamiento de datos.

Determinación del ancho de banda

Se siguió el mismo procedimiento descrito en la sección anterior, *validación*, para determinar el ancho de banda del conjunto de datos compuesto por los 14 sujetos (sección 3.0.1). El análisis se realizó para cada uno de los 10-15 planos de señales de RF de los experimentos a 0 hrs y a 6 hrs de cada macaco. Se obtuvieron histogramas de los valores de f_{min} , f_{max} , f_{cent} y E_{umbral} . A partir de este análisis y de las medianas de f_{min} y f_{max} de todo el conjunto de datos se obtuvo el ancho de banda para el análisis de ERU.

3.3.1. Valores de atenuación en la literatura

Debido a que el método descrito anteriormente para el cálculo de la atenuación requiere de un tejido con composición homogénea, no es posible aplicarlo al tejido cerebral. Para superar esta limitación, se utilizaron valores reportados en la literatura del coeficiente de atenuación de materia blanca cerebral. En el caso del valor de atenuación en adultos se encontraron dos referencias [42, 70] y para infantes, solamente una [70]. Kremkrau et al. midieron el coeficiente de atenuación mediante dos técnicas: la de sustitución de banda-corta, y la de fuerza de radiación acústica. Esta técnica utiliza un transductor y una superficie reflectora y una superficie reflectora. El haz de ultrasonido transfiere momento al incidir sobre la superficie reflectora. La fuerza ejercida es proporcional a la potencia acústica total del haz. Mediante la diferencia de la fuerza con y sin la muestra, entre el emisor del haz y la superficie reflectora, es posible determinar la pérdida de potencia debida a la atenuación de la muestra.

Los autores también presentan valores para el tejido cerebral (materia blanca) de adultos, los cuales están de acuerdo con los valores reportados por Bamber et al. [42], quienes utilizaron otra técnica de medición. Se obtuvieron los valores de la gráfica presentada por Kremkrau et al. [70] a través de una digitalización con el programa PlotDigitizer (Java, versión 2.6.8, software libre). Dichos valores fueron modelados con un ajuste de potencias, y la ecuación obtenida se utilizó para realizar la compensación

por atenuación en todo el conjunto de datos, tanto para 0 hrs como a 6 hrs.

3.3.2. Cálculo de espectros de energía

Para cada macaco se definieron regiones de estimación de parámetros en el lado izquierdo y lado derecho del tálamo en regiones con patrón de moteado relativamente uniforme y sin reflectores especulares identificadas en cada plano de señales de RF. La región de estimación de parámetro (PER, por sus siglas en inglés), se eligió de un tamaño de $5\text{ mm}\times 5\text{ mm}$, tamaño seleccionado a partir de optimizaciones previas realizadas por Rosado-Mendez et al. [67]. En cada PER (x,z) , el espectro de energía de la muestra se estima a través del método multitaper desarrollado por Thomson [71] y adaptado por Rosado-Mendez et al. [67]. La idea general propuesta por Thomson permite estimar el espectro de energía de una serie de datos finita del segmento de señal RF, al aplicar un conjunto de ventanas ortogonales a los datos, y posteriormente realizar un promedio de los espectros estimados para las diferentes ventanas. Este método reduce la varianza del espectro calculado en comparación con otros métodos como el periodograma o el método de Welch. A dichas ventanas ortogonales se les conoce como secuencias de Slepian [72] y al producto de cada ventana con el segmento de la señal RF se le aplica la transformada de Fourier en el espacio de frecuencias de la señal [73].

3.4. Parámetros de Espectroscopía por Retrodispersión Ultrasónica (ERU)

Dado que no se tiene un conocimiento exacto sobre la fuente principal de retrodispersión en el tálamo de macacos Rhesus neonatos, se realizó una optimización de la selección del factor de forma teórico que mejor representa los valores medidos experimentalmente.

Para poder estimar el coeficiente de retrodispersión es necesario aplicar la ecuación 3.4 al conjunto de datos por plano resultante del cálculo del espectro de energía, considerando el ancho de banda establecido previamente. El cálculo se realizó de forma

independiente para cada PER definida en cada plano de señales de RF.

3.4.1. Parámetros con interpretación física directa

Para el análisis con la muestra de datos de los 14 sujetos, se realizó la implementación de tres factores de forma, el Gaussiano, el exponencial y el de la esfera fluida. Para calcular el ESS y la AC, se realizó el procedimiento descrito en la sección de validación pero adaptado a cada modelo teórico. Es decir, es necesario estimar el factor de forma experimental y el factor de forma teórico de cada modelo. El factor de forma teórico se calcula aplicando las ecuaciones correspondientes a cada modelo, 2.24 para el factor de forma Gaussiano, 2.23 para el factor de forma de la esfera fluida y 2.25 corresponde al factor de forma exponencial.

El factor de forma experimental se calcula mediante la división del coeficiente de retrodispersión de la muestra σ_b entre la frecuencia elevada a la cuarta potencia, y el F_{exp} queda determinado por la ecuación 3.8. El ESS obtenido a través del factor de forma Gaussiano se calculó utilizando la ecuación 2.27. Por otro lado, el ESS calculado a través del modelo de la esfera fluida y del modelo exponencial, se calcularon a partir de la minimización de la diferencia entre el factor de forma experimental y un conjunto de modelos teóricos calculados con diferentes valores de ESS. Una vez calculados los valores de ESS, se obtuvo la concentración acústica para cada modelo.

Para realizar el cálculo de la concentración acústica se calcula el volumen asociado a cada modelo V_s , a partir del valor calculado del ESS:

$$V_{s,GAUSS} = (2\pi d^2)^{3/2} = f_1(ESS) \quad (3.11)$$

$$V_{s,EXP} = (2\pi d)^3 = f_2(ESS) \quad (3.12)$$

$$V_{s,EF} = 4\frac{\pi a^3}{3} = f_3(ESS) \quad (3.13)$$

donde d es la dimensión característica y a es el radio de la esfera para un modelo

continuo como lo es la esfera fluida.

Finalmente, se calcula la concentración acústica dada por la ecuación 2.28, descrita previamente. En este trabajo, la concentración acústica se representará en decibeles respecto de 1mm^{-3} .

Para cuantificar el acuerdo entre el modelo ajustado y el factor de forma experimental, se cuantifica el parámetro estadístico χ^2 , el cual está dado por:

$$\chi^2 \simeq \frac{1}{N_{AB}} \sum_{i=1}^N (\Delta \log F(f_i))^2 \quad (3.14)$$

donde $\Delta \log F(f_i) = \log F_{muestra}(f_i) - \log F_{modelo}(f_i)$. [41].

3.4.2. Parámetros con interpretación física indirecta

Con el fin de validar las tendencias observadas en ESS y AC tras la exposición a anestesia, se calcularon dos parámetros relacionados con ESS y AC pero sin la necesidad de un modelo teórico de dispersión. Estos parámetros son la pendiente y el valor a medio ancho de banda de un ajuste lineal aplicado al coeficiente de retrodispersión. La pendiente guarda una correlación inversa con el ESS (dentro de los valores de ka del estudio, los dispersores de mayor tamaño disminuyen la pendiente del coeficiente de retrodispersión vs. frecuencia). El valor del ajuste a medio ancho de banda (MBF por “mid band fit”) está relacionado de manera directa con la concentración acústica. Estos parámetros y su interpretación física fueron propuestos por Lizzi et al. [74].

En la figura 3.8 se muestra en a) una imagen en modo B, mediante el procesamiento de la región señalada en la imagen, se obtuvieron los parámetros espectrales definidos previamente y los cuales se encuentran graficados en la figura b).

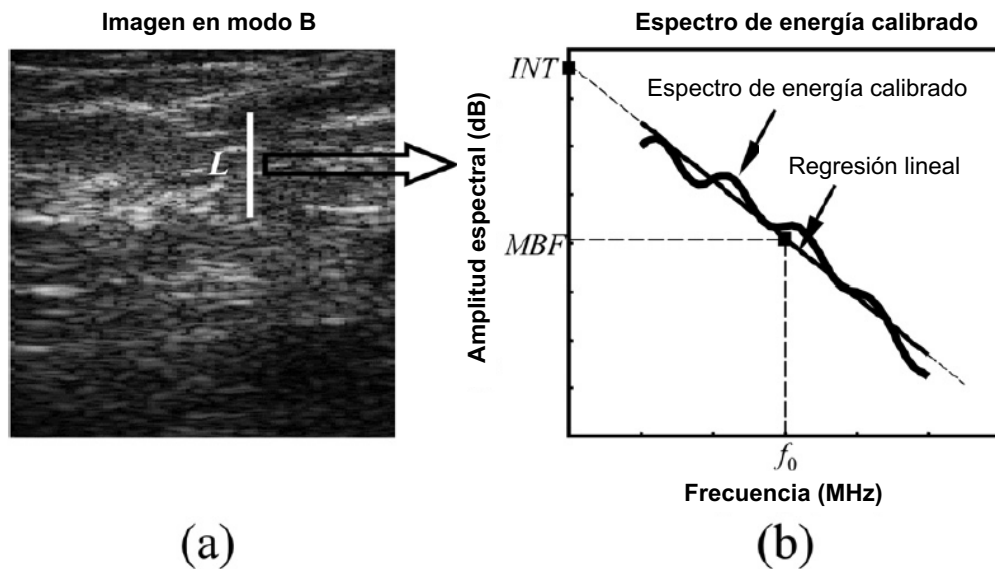


Figura 3.8: Gráfica de los parámetros espectrales adaptada de Lizzi et al. [75]

3.5. Análisis de los factores de forma y coeficiente de retrodispersión

Dada la estructura compleja del tálamo y la falta de conocimiento sobre la naturaleza exacta de los agentes dispersores, se realizó un análisis de la dependencia en frecuencia del promedio del factor de forma en todo el conjunto de datos. El objetivo fue identificar discontinuidades posiblemente debidas a diferentes fuentes de dispersión. Por lo tanto, se obtuvo el promedio y la desviación estándar de los factores de forma de los 10-15 planos de cada sujeto a 0 hrs y 6 hrs de la región del tálamo evaluada.

Criterio de aceptación de datos

Para obtener valores confiables de cada parámetro se estableció un criterio de aceptación de datos que consistió en tres puntos importantes:

1. Existencia de regiones de análisis con patrón de moteado homogéneo tanto en el lado izquierdo como en el lado derecho del tálamo.

2. Razón señal/ruido espectral mayor a 15 dB [14].

De los 14 sujetos, solamente en 9 se cumplieron con los criterios de aceptación.

Diferencia entre parámetros tras la exposición a anestesia

Con el fin de evaluar la sensibilidad de ESS y AC a apoptosis inducida por anestesia se calcularon:

1. La significancia estadística de la variación de ESS y AC tras la exposición a sevoflurano.
2. La correlación entre el cambio en dichos parámetros y la expresión de apoptosis cuantificada histológicamente.

La significancia estadística de los valores de ESS y AC entre 0 hrs y 6 hrs se calculó utilizando la prueba no paramétrica de Wilcoxon. Sea x y y las muestras que se desea comparar, la hipótesis nula es considerar que los valores de x y y son muestras que provienen de una distribución continua con medianas iguales. La hipótesis alternativa es probar si no lo son. Dicha prueba se realiza cuando se desea comparar datos que no necesariamente están pareados, es decir, son independientes y los tamaños de x y y pueden ser diferentes. [76] Se calcula de la siguiente forma:

1. Combinar todos los datos de cada grupo y clasificarlos (rango), del más grande al más pequeño o del más pequeño al más grande.
2. Sumar los rangos para los puntos de datos de cada muestra, sea este R_i . Encontrar el número de puntos en el grupo; sea este valor n_i .
3. Realizar la siguiente operación: Sea U_i :

$$U_i = R_i - n_i \frac{n_i + 1}{2} \quad i=1, 2 \quad (3.15)$$

donde U_i corresponde a los valores de x para $i = 1$ y y con $i = 2$.

3. METODOLOGÍA

4. Finalmente, el valor p es el mínimo entre U_1 y U_2 . Por lo tanto, $U = p$.

$$U = \min(U_1, U_2) \tag{3.16}$$

Si los valores de las medianas son muy diferentes, entonces p será un número cercano a 0. En esta tesis se utilizó la función ranksum de Matlab.

3.5.1. Coeficiente de Pearson

Con el objetivo de analizar si existía una relación entre el cambio de ESS tras la exposición a SEVO y el nivel de apoptosis en cada macaco, se cuantificó el coeficiente de correlación de Pearson entre el cambio de los parámetros propuestos a 0 hrs y 6 hrs y la activación de la proteína pro-apoptótica Caspasa 3 medida a través de análisis inmunohistoquímico en muestras extraídas a través de necropsia de los mismos macacos. El análisis inmunohistoquímico fue realizado por el Dr. Kevin Noguchi de la Washington University at St. Louis. Los resultados de dicho análisis se obtuvieron a través de la colaboración con la Dra. Chrysanthy Ikonomidou, del Departamento de Neurología de la Universidad de Wisconsin-Madison. La técnica de inmunohistoquímica mide el número de células que expresan caspasa 3 activada por unidad de volumen del tejido analizado. El número de células que expresan caspasa 3 está relacionado con las células que sufrieron apoptosis. Los detalles de esta técnica se describen en [77].

El coeficiente de correlación de Pearson es una medida de la asociación lineal entre dos variables, se denota con la letra r . La idea general es generar el mejor ajuste lineal entre los datos de las dos variables, el valor de r puede tomar valores de $[-1, 1]$ y la magnitud indica qué tan cercanos o lejanos se encuentran dichos valores del ajuste lineal. Un valor 0 indica que no existe asociación entre las dos variables. Si $r > 0$ existe una relación positiva, es decir, si el valor de la variable incrementa también lo hace la segunda variable. En caso de que $r < 0$ existe una relación negativa, indicando que cuando una de las variables incrementa, la otra disminuye.

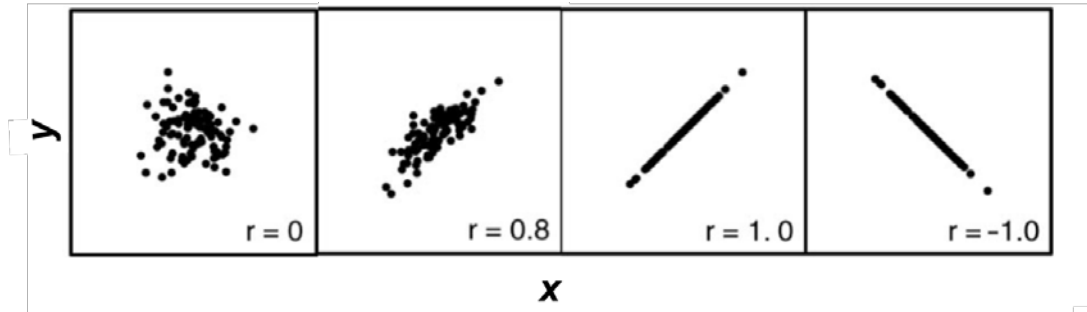


Figura 3.9: Gráficas representativas de los diferentes valores del coeficiente de correlación de Pearson para las variables x y y .

Si cada variable tiene N valores, el coeficiente r está dado por:

$$r(A, B) = \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N \left(\frac{A_i - \mu_A}{\sigma_A} \right) \left(\frac{B_i - \mu_B}{\sigma_B} \right) \quad (3.17)$$

donde μ_A y σ_A es el promedio y la desviación estándar de la variable A , respectivamente, y μ_B y σ_B corresponden a la variable B .

Resultados

En esta sección se presentan los resultados obtenidos durante el desarrollo de la tesis, siguiendo el orden presentado en la metodología.

4.1. Validación

Los resultados contenidos en esta sección corresponden al cálculo de espectros de energía, coeficiente de atenuación, coeficiente de retrodispersión, ESS y AC para los maniqués tejido equivalentes A y B.

Espectros de energía

Se realizó el cálculo de los espectros de energía para cada plano del maniquí A y el maniquí B. Los espectros que se muestran a continuación son un ejemplo de la distribución de energía en la región central de uno de los planos para cada maniquí.

4. RESULTADOS

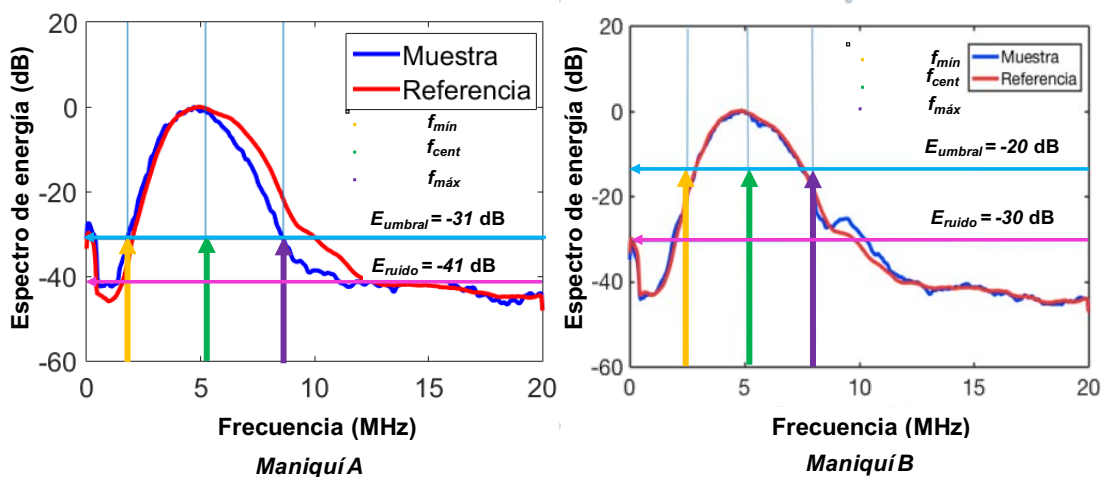


Figura 4.1: Espectros de energía del maniquí A y B.

En la figura 4.1 se muestra un ejemplo de uno de los espectros correspondiente a uno de los planos del maniquí A y B. La curva de color azul muestra el espectro de energía del maniquí utilizado como muestra (maniquí A o B). La curva roja representa el espectro de energía de la referencia. En la figura 4.1 se observan algunas variables señaladas: E_{ruido} , $E_{umbrales}$, f_{min} , f_{cent} , y f_{max} . Cada una de estas variables se utiliza para determinar el ancho de banda disponible en el conjunto de datos para cada maniquí. Es importante recalcar que la diferencia entre la $E_{umbrales}$ y la E_{ruido} es de 10 dB. El maniquí A muestra una $E_{umbrales} = -31$ dB y para el maniquí B $E_{umbrales} = -20$ dB.

4.1.0.1. Análisis del ancho de banda

Los histogramas que se muestran enseguida son representativos de los datos de frecuencia máxima y mínima para cada maniquí. El histograma de color azul pertenece a los valores de frecuencia mínima y el histograma de color rojo corresponde a la frecuencia máxima. A partir de los datos que componen dichos histogramas, se determina la mediana, el 25 percentil, el 75 percentil y la desviación estándar para cada parámetro.

Maniquí A

La muestra de datos para realizar cada histograma fue de $N = 10$, donde la N_i corresponde a cada plano analizado. En la tabla 4.1 se encuentran los valores estadísticos asociados a cada parámetro del maniquí A. A partir de estos datos es posible determinar el ancho de banda para este maniquí, que va de (2.2 ± 0.02) MHz a (7.3 ± 0.01) MHz.

Tabla 4.1: Valores de la estadística asociada a los cálculos de la frecuencia mínima, central y máxima del maniquí A.

Parámetro	Mediana	25 Percentil	75 Percentil	Promedio	Desviación Estándar
Frecuencia mínima	2.2 MHz	2.2 MHz	2.3 MHz	2.2 MHz	0.02 MHz
Frecuencia máxima	7.3 MHz	7.3 MHz	7.4 MHz	7.4 MHz	0.01 MHz
Frecuencia central	4.8 MHz	4.8 MHz	4.8 MHz	4.8 MHz	0.01 MHz

Maniquí B

La tabla 4.2 muestra los valores que se utilizaron para determinar el ancho de banda del maniquí B, que va de (2.5 ± 0.02) MHz a (7.9 ± 0.01) MHz.

Tabla 4.2: Valores de la estadística asociada a los cálculos de la frecuencia mínima, central y máxima del maniquí B.

Parámetro	Mediana	25 Percentil	75 Percentil	Promedio	Desviación Estándar
Frecuencia mínima	2.5 MHz	2.5 MHz	2.6 MHz	2.5 MHz	0.02 MHz
Frecuencia máxima	7.9 MHz	7.9 MHz	8.0 MHz	7.9 MHz	0.02 MHz
Frecuencia central	5.2 MHz	5.2 MHz	4.2 MHz	5.2 MHz	0.01 MHz

4.1.1. Coeficientes de atenuación y retrodispersión

A continuación se presentan los resultados del coeficiente de atenuación y del coeficiente de retrodispersión.

4. RESULTADOS

Maniquí A En esta sección se muestran los resultados de atenuación para el maniquí A. La diferencia porcentual entre el valor calculado del coeficiente de atenuación y el valor esperado (ver tabla 3.1) del mismo es de $(3.3 \pm 1.1) \%$. La ecuación utilizada para este tipo de dispersores fue un ajuste de potencia cuyo coeficiente de correlación R fue de 0.998.

$$\alpha = 0.4492f^{1.216} \quad (4.1)$$

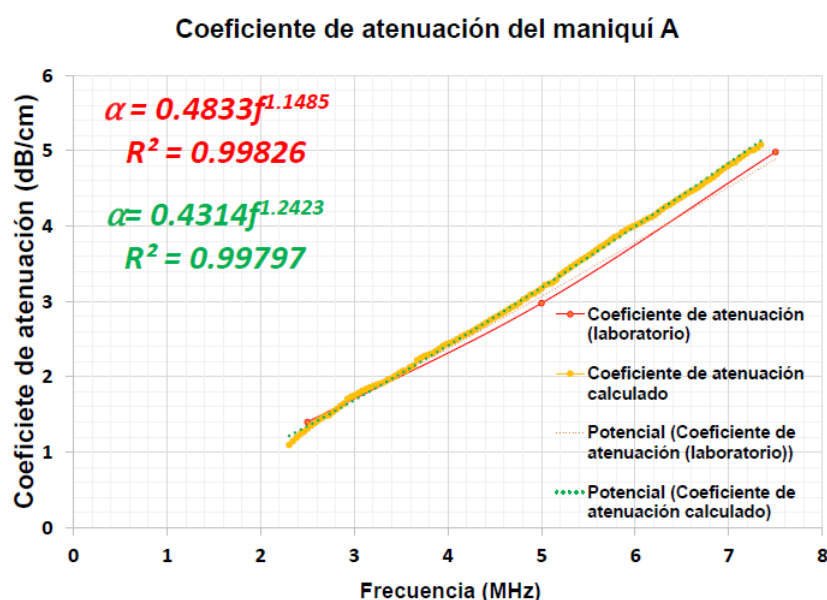


Figura 4.2: Coeficientes de atenuación del maniquí A y del valor esperado del mismo.

En la figura 4.3 se observan las curvas para el coeficiente de retrodispersión calculado por dos formas diferentes en función de la frecuencia. La diferencia porcentual entre el coeficiente de retrodispersión del laboratorio y el calculado fue del 16.0 %.

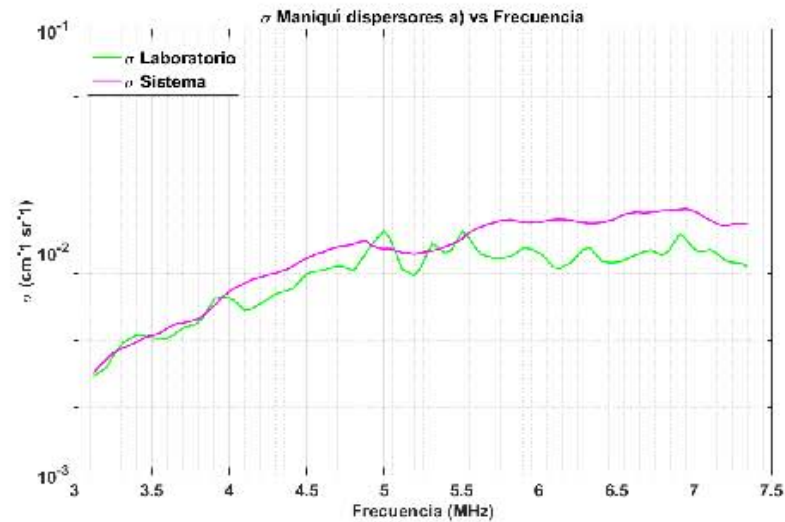


Figura 4.3: Curvas de σ de los valores del laboratorio y sistema correspondiente al maniquí A.

Maniquí B En la gráfica 4.4 se muestran dos curvas, la roja representa el valor esperado del coeficiente atenuación y la curva azul, el valor del coeficiente calculado en este trabajo. La diferencia porcentual entre el valor del coeficiente de atenuación obtenido con respecto al valor esperado de dicho parámetro fue de $(2.9 \pm 1.1)\%$. La ecuación que se utilizó para realizar la compensación por atenuación para este maniquí fue un ajuste de potencias, cuyo coeficiente de correlación R fue de 0.9991.

$$\alpha = 0.3516f^{1.2586} \quad (4.2)$$

4. RESULTADOS

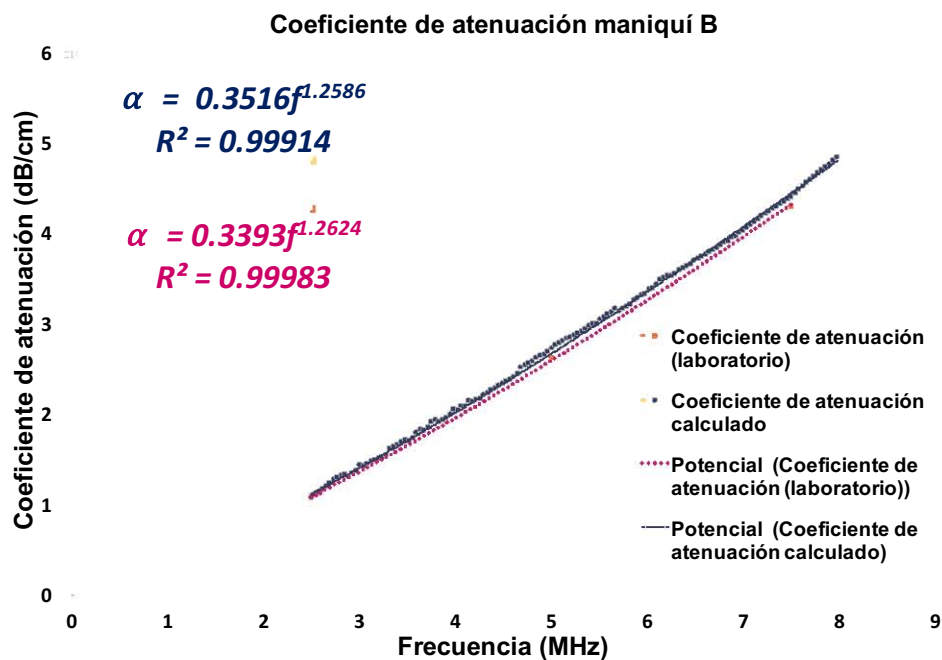


Figura 4.4: Coeficientes de atenuación del maniquí B y del valor esperado del mismo.

En la gráfica 4.5 se muestran las curvas del coeficiente de retrodispersión en función de la frecuencia: el del laboratorio y el del sistema (calculado). La diferencia porcentual entre el coeficiente de retrodispersión del laboratorio y el calculado fue del 13.75 %.

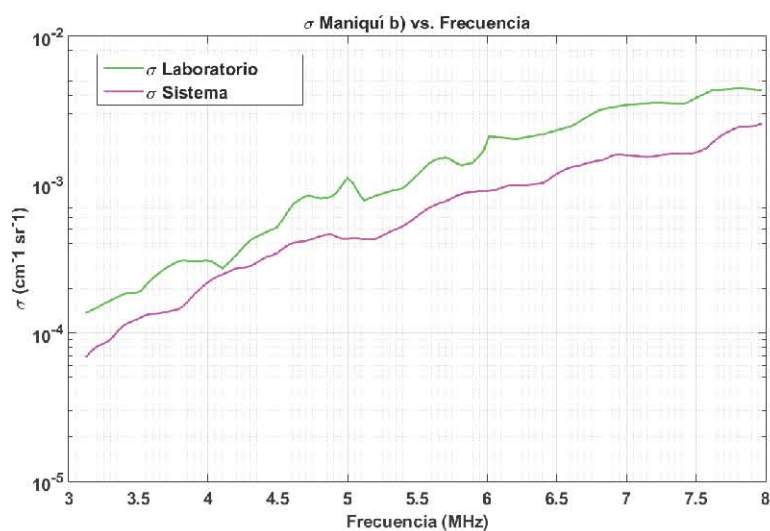


Figura 4.5: Curvas de σ del laboratorio y sistema, correspondiente al maniquí b).

4.1.1.1. Tamaño Efectivo del dispersor (ESS) y Concentración Acústica (AC)

La figura 4.6 muestra una gráfica de caja del ESS calculados a partir del coeficiente de retrodispersión obtenido del método de maniquí de referencia aplicado a señales RF del equipo Siemens. Cada caja agrupa los valores obtenidos de 10 planos de señales RF de cada maniquí. La línea central corresponde a la mediana, los extremos superior e inferior de la caja corresponden al intervalo intercuartil (50% de los datos), y los bigotes corresponden al rango total de datos. Los puntos circulares son los valores de ESS calculados a partir del valor esperado del coeficiente de retrodispersión, utilizando el ancho de banda correspondiente a cada maniquí. Los rombos, representan los valores de ESS calculados con el valor esperado del coeficiente de retrodispersión, utilizando el ancho de banda correspondiente a 0.6;ka;1.0 sugerido por Insana et. al. [78] como el intervalo de mayor sensibilidad. Dicho intervalo corresponde a 3.0 MHz a 3.5 MHz para el maniquí A, y 6.12 MHz a 12.25 MHz para el maniquí B. con el ancho de banda con mayor sensibilidad (factor ka).

En la tabla 4.3 se exhiben los valores de la mediana e intervalo intercuartil para el maniquí A y B. Para el maniquí A el valor de $ESS=(109.2 \pm 7.7)\mu\text{m}$ y para el B, $ESS=(41.94 \pm 8.9)\mu\text{m}$.

Para los maniquíes A y B, la diferencia porcentual entre el ESS, calculado con el método del maniquí de referencia y el estimado con valor esperado del σ_b , ambos con el mismo ancho de banda, es del 11.6 % y 187 %, respectivamente. En cambio, la diferencia porcentual entre el ESS, estimado con el factor de forma Gaussiano, y el estimado con el valor esperado con el ancho de banda de mayor sensibilidad, es del 45 % y 14.8 %, respectivamente. Sin embargo, la diferencia porcentual entre los valores del ESS entre los maniquíes A y B estimados con el método del maniquí de referencia, es del 61 %. Por tanto, la técnica del maniquí de referencia, ofrece suficiente sensibilidad para diferenciar la microestructura (no visible en imágenes convencionales) entre ambos maniquíes.

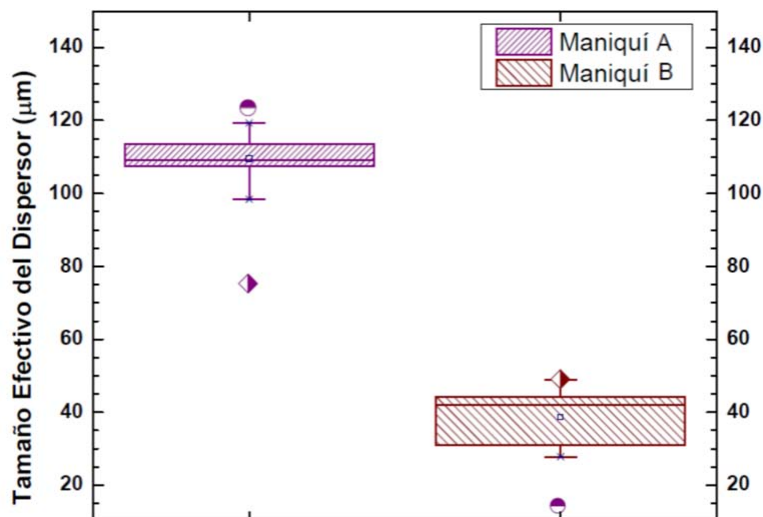


Figura 4.6: Gráfica de caja del ESS estimado con el factor de forma Gaussiano para el maniquí A y B.

Tabla 4.3: Valores estadísticos del ESS del maniquí A y B calculados con el método de maniquí de referencia aplicado a señales RF del equipo Siemens.

ESS	Maniquí A	Maniquí B
Mediana	109.2 μm	41.9 μm
25 Percentil	107.4 μm	31.1 μm
75 Percentil	113.5 μm	44.4 μm

4.1.2. Concentración Acústica

En la figura 4.7 se observa una gráfica de caja correspondiente a cada maniquí. Los pentágonos representan los valores de AC calculados con el ancho de banda correspondiente a cada maniquí, y los triángulos representan los valores calculados utilizando el ancho de banda de mayor sensibilidad (ka).

Para los maniquíes A y B, la diferencia porcentual entre la AC, calculado con el método del maniquí de referencia y el estimado con valor esperado del σ_b , ambos con el mismo ancho de banda, es del 148.9 % y mayor al 200 %, respectivamente. En cambio, la diferencia porcentual entre el ESS, estimado con el método del maniquí de referencia,

y el estimado con el valor esperado con el ancho de banda de mayor sensibilidad, es del 82 % y 38.7 %, respectivamente.

Figura 4.7: Gráfica de caja del AC calculado a través del factor de forma Gaussiano para el maniquí A y B.

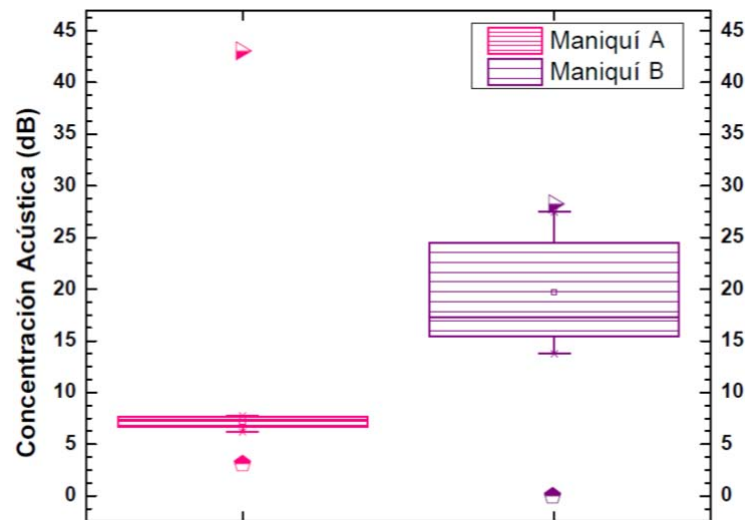


Tabla 4.4: Valores estadísticos de la AC del maniquí A y B.

AC	Maniquí A	Maniquí B
Mediana	7.7 dB	17.3 dB
25 Percentil	6.7 dB	15.5 dB
75 Percentil	7.4 dB	24.5 dB

Tabla 4.5: Valores de AC calculados con valores esperados del σ_b para el maniquí A y B.

Maniquí	AC (ancho de banda)	AC (factor k_a)
Maniquí A	3.0 dB	43.1 dB
Maniquí B	2.9×10^{-4} dB	28.2 dB

Los resultados anteriores muestran que el maniquí A es más atenuador comparado con el maniquí B y además posee microesferas de mayor que el maniquí B. Estos resultados fue posible corroborarlos mediante el cálculo del ESS con el método del

maniquí de referencia.

4.2. Resultados en modelo animal

En esta sección se muestran los resultados correspondientes al estudio con los 14 macachos Rhesus recién nacidos. El orden de las secciones está de acuerdo con la información contenida en la sección 4.1.

Espectros de energía

Se calcularon los espectros de energía de cada plano para cada uno de los sujetos de la muestra. En particular se extrajeron los espectros de energía de la región de interés del tálamo de cada plano. Dichos espectros se utilizaron para hacer el análisis del ancho de banda disponible para el conjunto de datos y para estimar el coeficiente de retrodispersión a través del método del maniquí de referencia. A continuación se muestran ejemplos de los espectros y de las variables involucradas en dicho análisis.

Análisis del ancho de banda

Las gráficas 4.8 y 4.9 muestran dos ejemplos representativos de espectros de energía retrodispersada del tálamo, calculados para dos sujetos diferentes. La figura 4.8 corresponde a un caso en el que el espectro muestra al menos 15 dB de energía ($E_{umbral} = -15.1$ dB), que es suficiente energía retrodispersada comparada con la energía de la referencia. La figura 4.9 muestra un caso en el que el espectro no posee suficiente energía ($E_{umbral} = -4.6$ dB). La forma de visualizar esta diferencia en el espectro es observar la diferencia del comportamiento de la curva azul con respecto a la curva roja. El nivel de ruido de la curva azul se encuentra cercana al máximo de la misma curva, lo cual no se observa en el espectro de la figura 4.8.

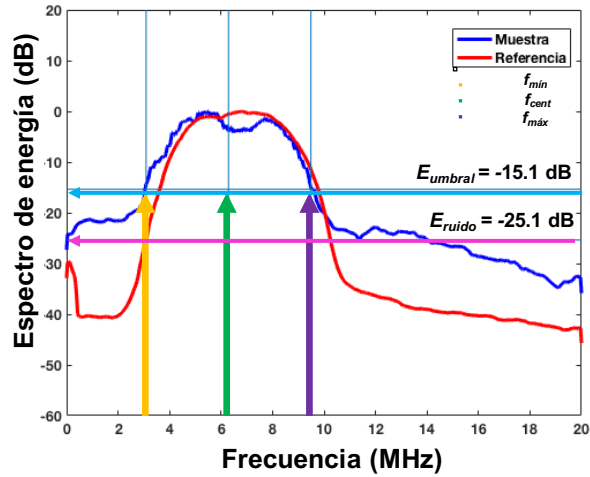


Figura 4.8: Espectros de energía de un sujeto con suficiente energía retrodispersada proveniente de la muestra.

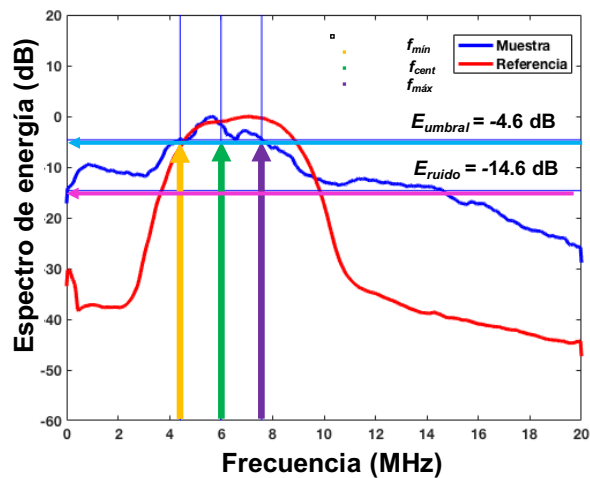


Figura 4.9: Espectros de energía de un sujeto sin energía suficiente originada por la muestra.

A partir de este análisis se obtuvieron histogramas de los datos de la frecuencia mínima, máxima, central, así como de E_{umbra} , figura 4.10 y 4.11.

En el histograma de la frecuencia mínima (figura 4.10) se observa que existe una dispersión de datos entre 2.5 Mhz y 5 MHz, y el promedio de dicha frecuencia se encuentra en 3.5 MHz.

4. RESULTADOS

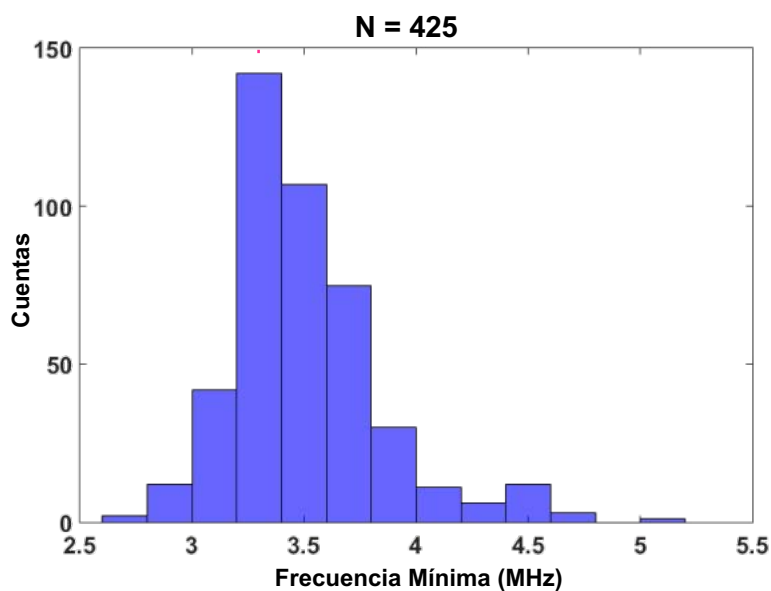


Figura 4.10: Histograma de la frecuencia mínima del ancho de banda para el análisis en todo el conjunto de datos.

La figura 4.11 posee una dispersión en el eje x (frecuencia) de 6 MHz a 10 MHz, donde la mayoría de los datos están concentrados entre 8 MHz y 9 MHz.

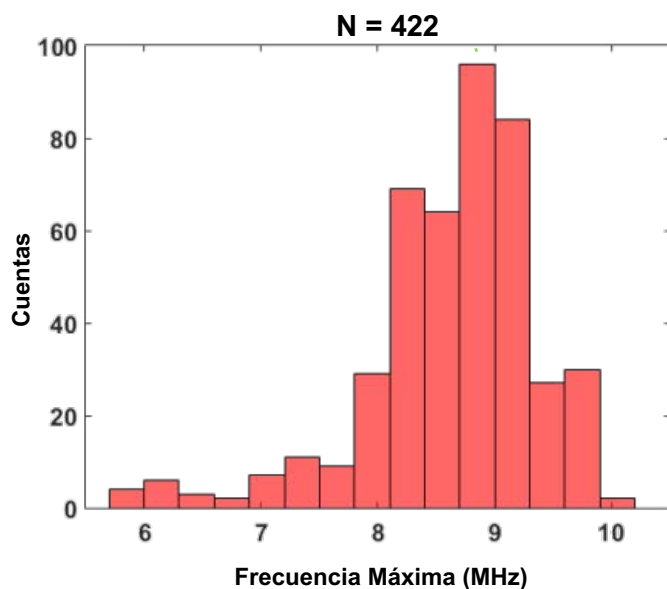


Figura 4.11: Histograma de la frecuencia máxima del ancho de banda para el análisis en todo el conjunto de datos.

En el caso del histograma de la frecuencia central (figura 4.12) los datos se encuentran concentrados aproximadamente en 6.2 MHz.

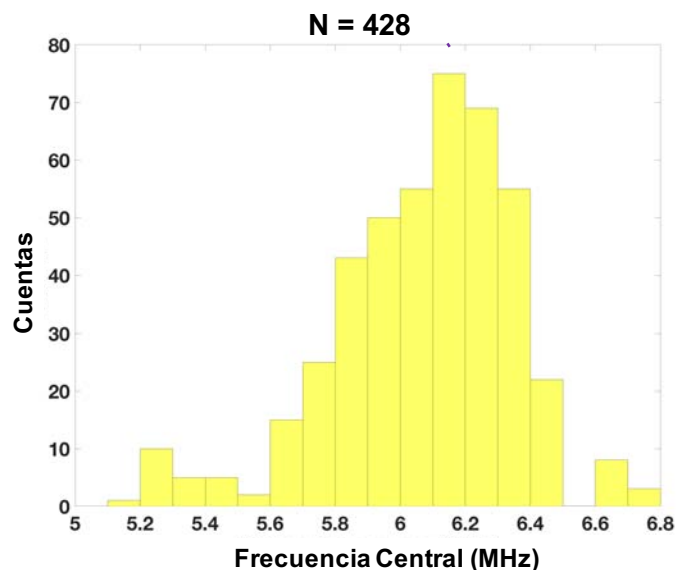


Figura 4.12: Histograma de la frecuencia central del ancho de banda para el análisis en todo el conjunto de datos.

La figura 4.13 muestra que muchos datos poseen una energía umbral entre -15 dB y -10 dB, sin embargo solamente se utilizan aquellos datos que al menos poseen -15 dB, que es el nivel mínimo para obtener estimaciones confiables del ESS y AC [14].

4. RESULTADOS

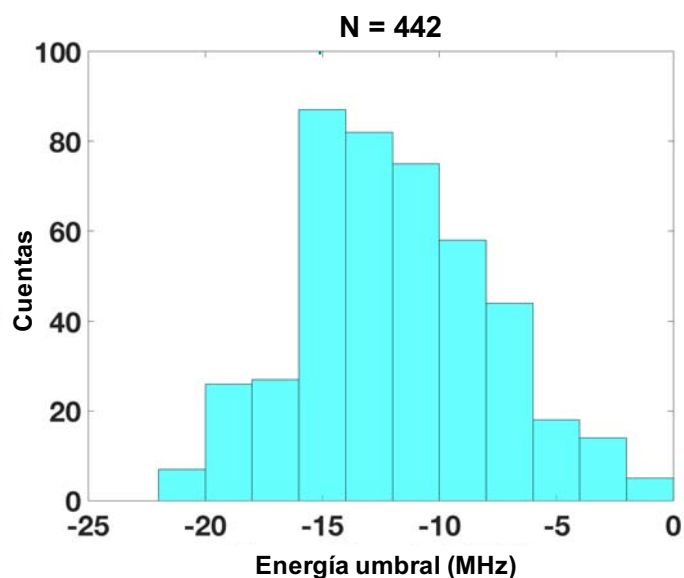


Figura 4.13: Histograma de la energía umbral en todo el conjunto de datos.

Tabla 4.6: Valores de la estadística asociada a los cálculos de la frecuencia mínima, central y máxima del conjunto de datos del modelo animal.

Parámetro	Mediana	25 Percentil	75 Percentil	Promedio	Desviación Estándar
Frecuencia mínima	3.2 MHz	3.2 MHz	3.3 MHz	3.2 MHz	0.01 MHz
Frecuencia máxima	8.7 MHz	8.4 MHz	8.9 MHz	8.7 MHz	0.02 MHz
Frecuencia central	6.2 MHz	5.9 MHz	6.2 MHz	6.1 MHz	0.01 MHz
Energía umbral	-12.1 dB	-14.6 dB	-9.3 dB	-11.9 dB	0.01 dB

Se determinó que el ancho de banda disponible para todo en análisis de datos sería de 3.2 MHz a 8.7 MHz.

4.2.1. Compensación por atenuación

La figura 4.14 muestra la digitalización de la gráfica reportada por Kremkrau et al. [70] del coeficiente de atenuación en infantes, en función de la frecuencia.

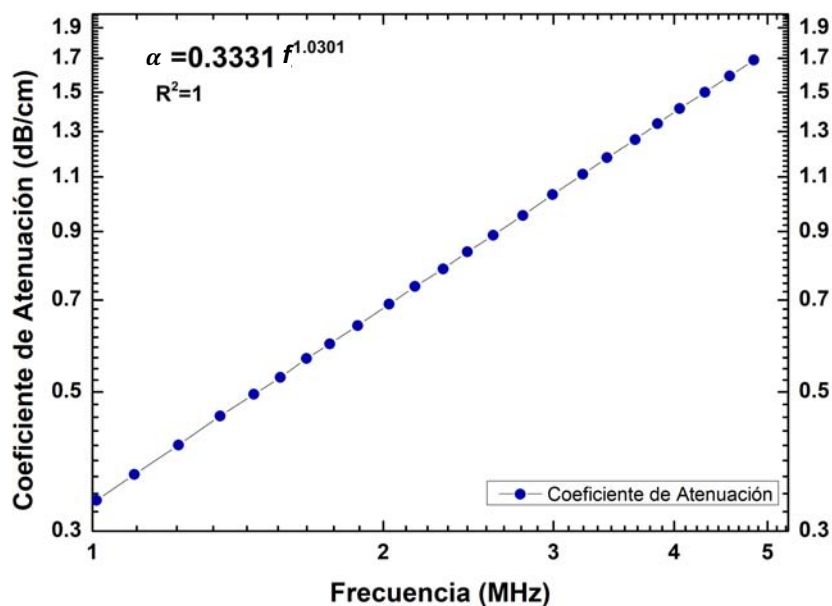


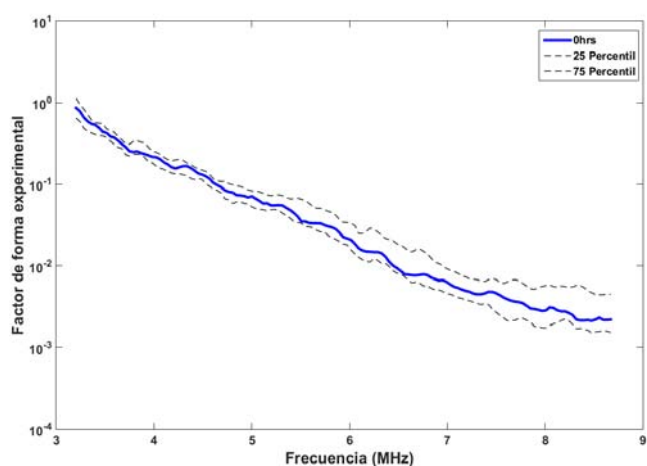
Figura 4.14: Gráfica del coeficiente lineal de atenuación calculado en cerebro de infantes por [70].

En la gráfica 4.14 se observa el ajuste realizado a los valores del coeficiente de atenuación, el cual está en función de la frecuencia:

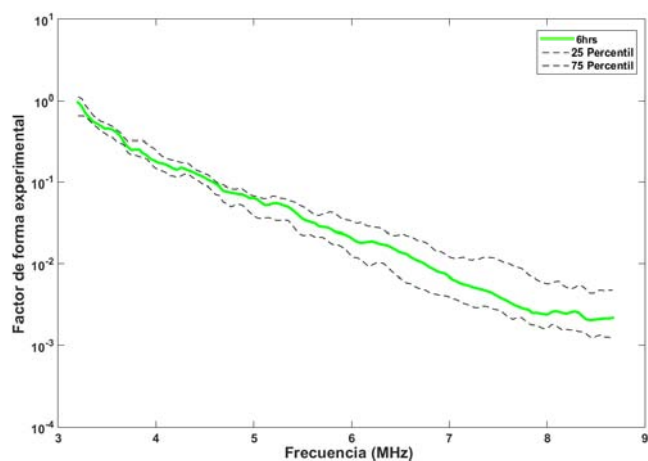
$$\alpha = 0.3331 f^{1.0301} \quad (4.3)$$

Las siguientes dos gráficas corresponden a valores del coeficiente de atenuación en función de la frecuencia para ciertos materiales biológicos. La figura 4.14 muestra valores del coeficiente de atenuación para el cerebro de infantes y adultos [70], y en la figura 4.15(a)[42] se observan la dependencia en frecuencia del coeficiente de atenuación para el cerebro y otro tipo de órganos.

El factor de forma experimental presentó un comportamiento decreciente en todo el conjunto de datos tanto a 0 hrs como a 6 hrs. Esto se puede observar en la figura 4.16 a) y b) las cuales muestran el promedio (curva sólida) y la desviación estándar (curvas punteadas) a 0 hrs y 6 hrs para la muestra de datos.



(a)



(b)

Figura 4.16: Gráficas de factor de forma experimental a 0hrs y 6hrs.

La gráfica de la figura 4.17 combina las figuras 4.16 a) y b). En la figura 4.18 se

4. RESULTADOS

observa la resta de los factores de forma experimentales entre 0 hrs y 6 hrs (curva sólida azul), así como su 25 y 75 percentil (curvas sólidas verdes). En promedio no se observaron discontinuidades en la dependencia en frecuencia de los factores de forma a 0 hrs y 6 hrs. Por lo tanto, a partir de dichas gráficas se determinó que no era necesario ajustar diferentes factores de forma entre 0 hrs y 6hrs, ni para diferentes intervalos de frecuencia.

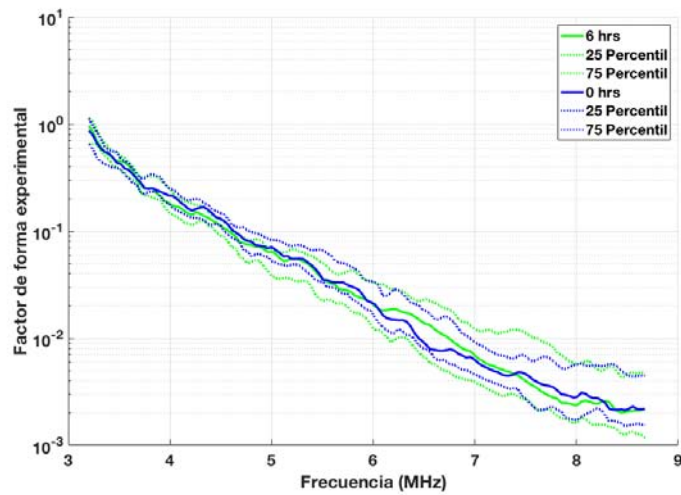


Figura 4.17: Gráfica con la superposición de los factores de forma a 0 hrs y 6 hrs.

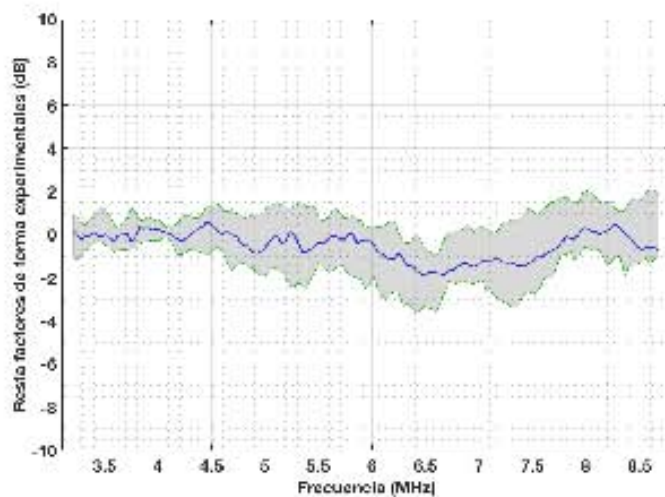


Figura 4.18: Gráfica de la resta de los factores de forma a 0 hrs y 6 hrs.

4.2.3. Selección de modelo para factor de forma

Para encontrar el modelo teórico que mejor represente los datos calculados, se compararon los valores de χ^2 obtenidos de ajustes de los modelos Gaussiano, exponencial y de esfera fluida a todo el conjunto de datos.

En la figura 4.19 se muestra un ejemplo de valores del factor de forma experimental ajustados a los tres factores de forma teóricos: Gaussiano, exponencial y esfera fluida. A partir de esta gráfica es posible observar que el modelo teórico que posee un mejor acuerdo con el factor de forma experimental es el Gaussiano, cuyo valor de χ^2 es 10 veces menor al del factor de forma de la esfera fluida.

4. RESULTADOS

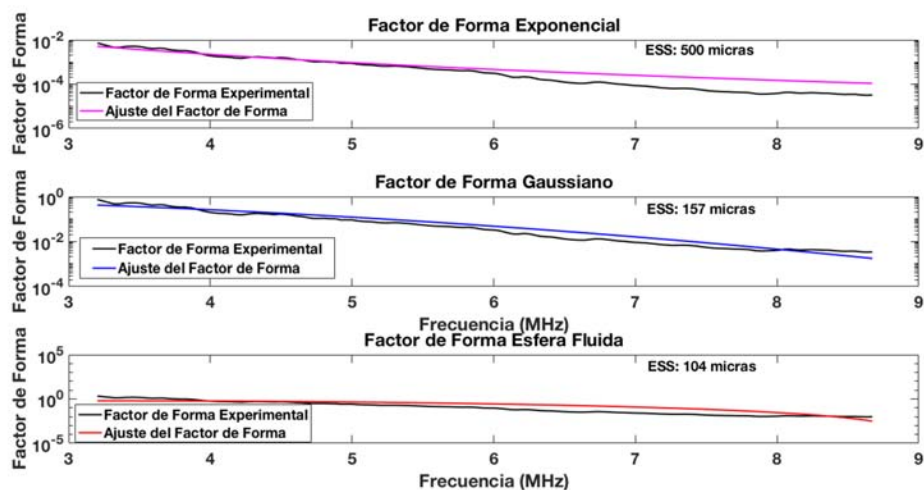


Figura 4.19: Gráficas con los tres factores de forma; Gaussiano, exponencial y esfera fluida.

En general, el factor de forma Gaussiano representó de manera más exacta los factores de forma experimentales. Las figura 4.20 a) muestra los resultados de χ^2 del modelo Gaussiano y la figura 4.20 b) el modelo de la esfera fluida. Los valores de χ^2 para el factor de forma exponencial no se presentan debido a que éste no mostró convergencia en el ancho de banda utilizado. Para el modelo Gaussiano, χ^2 varió entre 0.07 y 0.6, con mediana 0.2. Para el modelo de esfera fluida, χ^2 varió entre 0.2 y 8.9, con mediana 1.4. Debido que el mejor ajuste del factor de forma teórico con el experimental resultó ser el modelo Gaussiano, el resto del análisis hace uso exclusivo de este modelo para el cálculo de ESS y AC.

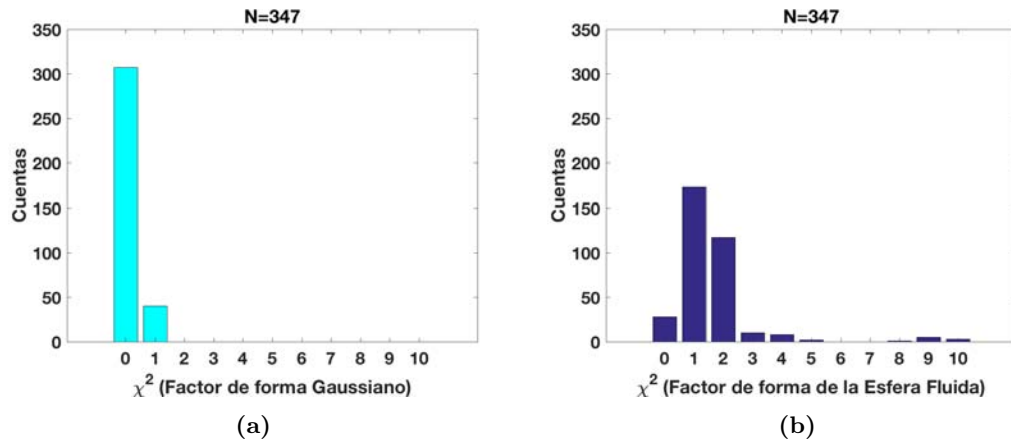


Figura 4.20: Histograma de χ^2 para el factor de forma Gaussiano y esfera fluida.

4.2.4. Biomarcadores

Las tablas mostradas a continuación muestran los valores del ESS y AC para los ocho sujetos analizados para cada lado del tálamo. Se incluye el número de sujeto, edad, tiempo al que pertenece el dato del ESS o AC, 25 percentil, 75 percentil, 95 % intervalo de confianza mínimo y máximo, y desviación estándar entre los 10-15 planos de datos procesados.

4. RESULTADOS

No. de sujeto	Edad (días)	Tiempo exposición anestesia (hrs)	Lado del tálamo	Mediana (μm)	25 Percentil (μm)	75 Percentil (μm)	95% IC Mínimo	95% IC Máximo	Desviación estándar (μm)
1	4	0	Derecho	165.7	161.0	167.5	162.5	166.1	3.8
		6		147.5	145.5	149.7	144.9	149.0	3.0
		0	Izquierdo	162.1	161.3	163.6	161.4	163.3	2.0
		6		159.5	153.5	162.3	155.9	162.1	6.0
2	5	0	Derecho	140.9	138.9	150.0	141.8	147.4	7.0
		6		161.9	158.2	163.7	158.9	162.9	4.2
		0	Izquierdo	173.1	169.0	175.7	171.1	175.4	5.1
		6		158.4	157.7	160.1	157.3	159.3	2.0
3	1	0	Derecho	187.6	186.4	189.9	186.8	189.4	2.6
		6		175.1	173.5	177.6	173.7	177.0	3.1
		0	Izquierdo	170.1	167.1	176.2	168.7	173.8	4.9
		6		179.3	173.1	182.5	173.9	180.4	5.8
4	5	0	Derecho	152.1	149.7	153.9	150.0	153.6	3.3
		6		146.9	143.3	154.7	146.3	151.1	6.0
		0	Izquierdo	170.1	158.0	179.5	162.2	174.5	11.5
		6		151.6	149.8	152.9	149.4	152.0	2.6
5	9	0	Derecho	170.0	168.4	173.3	169.0	173.0	3.4
		6		162.6	160.2	164.8	160.5	164.1	3.4
		0	Izquierdo	178.1	177.6	178.8	176.6	178.6	1.0
		6		170.1	164.9	179.4	168.1	175.4	7.0
6	NA	0	Derecho	167.1	166.3	167.7	165.6	167.4	0.8
		6		163.6	161.9	165.2	162.0	164.2	1.9
		0	Izquierdo	148.8	148.2	152.0	148.3	151.4	2.8
		6		145.2	140.3	147.2	141.3	146.6	4.4
7	NA	0	Derecho	174.7	173.2	176.0	173.5	175.8	1.9
		6		188.2	187.5	189.0	186.5	189.2	0.9
		0	Izquierdo	166.4	165.7	169.9	165.9	169.0	2.5
		6		183.3	179.9	184.4	180.3	183.8	3.0
8	NA	0	Derecho	153.4	152.7	155.5	152.7	154.9	1.9
		6		117.0	113.3	120.8	113.2	118.9	5.1
		0	Izquierdo	134.5	132.3	135.9	133.4	138.2	1.9
		6		110.1	107.5	112.5	108.0	112.0	3.6

Tabla 4.8: Datos del ESS para ocho sujetos.

En la primera tabla se muestran datos del ESS para los ocho sujetos de la muestra. En ella se puede observar que el sujeto 7 tanto en lado derecho como en el izquierdo muestra un incremento del ESS a las 6 hrs posteriores al inicio de la exposición con la anestesia. El sujeto 8 muestra acuerdo bilateral en el tálamo para el ESS, sin embargo en éste se observa una disminución del ESS a las 6 hrs posteriores al inicio de la exposición al sevoflurano. Estos resultados se observan en las gráficas 4.21(a) y 4.21(b) para el sujeto número 7 y en las gráficas 4.22(a) y 4.22(b) en el caso del sujeto número 8.

No. de sujeto	Edad (días)	Tiempo exposición anestesia (hrs)	Lado del tálamo	Mediana (dB)	25 Percentil (dB)	75 Percentil (dB)	95% IC Mínimo (dB)	95% IC Máximo (dB)	Desviación estándar (dB)
1	4	0	Derecho	-36.7	-38.0	-36.4	-37.5	-36.7	0.8
		6		-43.4	-44.9	-42.3	-44.5	-42.6	1.4
		0	Izquierdo	-39.6	-40.3	-38.1	-40.3	-38.6	1.6
		6		-43.9	-44.1	-42.6	-43.9	-41.5	0.4
2	5	0	Derecho	-32.9	-33.4	-32.3	-33.3	-32.5	0.9
		6		-37.3	-37.8	-36.9	-37.7	-37.0	0.7
		0	Izquierdo	-33.3	-33.7	-32.4	-33.4	-32.2	1.0
		6		-38.7	-39.2	-37.7	-39.1	-38.1	1.0
3	1	0	Derecho	-36.4	-37.1	-36.0	-36.8	-35.9	0.9
		6		-35.6	-36.6	-34.8	-36.6	-35.2	1.3
		0	Izquierdo	-36.1	-36.4	-35.7	-36.8	-35.9	0.5
		6		-36.2	-36.4	-35.6	-36.6	-35.6	0.7
4	5	0	Derecho	-40.8	-42.0	-37.7	-41.0	-38.0	2.7
		6		-33.4	-36.0	-32.0	-34.7	-33.1	2.0
		0	Izquierdo	-39.9	-40.6	-39.1	-40.4	-39.3	1.1
		6		-36.0	-39.7	-33.2	-38.2	-35.2	3.9
5	9	0	Derecho	-40.6	-40.8	-39.9	-40.8	-40.2	0.5
		6		-40.6	-41.8	-39.9	-41.4	-40.3	1.0
		0	Izquierdo	-41.9	-42.4	-40.9	-43.0	-41.4	1.0
		6		-39.7	-40.7	-38.0	-40.4	-38.7	1.7
6	NA	0	Derecho	-36.4	-37.5	-36.2	-37.6	-36.4	1.1
		6		-37.9	-38.4	-37.6	-38.4	-37.8	0.5
		0	Izquierdo	-35.8	-36.1	-35.5	-36.1	-35.6	0.4
		6		-36.9	-37.2	-36.4	-37.3	-36.3	0.6
7	NA	0	Derecho	-27.5	-28.0	-27.0	-27.8	-27.2	0.5
		6		-27.8	-28.1	-27.6	-28.2	-27.7	0.3
		0	Izquierdo	-31.2	-31.3	-30.4	-31.3	-30.5	0.7
		6		-31.2	-31.9	-30.9	-31.9	-31.0	0.7
8	NA	0	Derecho	-34.5	-34.6	-34.2	-34.7	-34.3	0.2
		6		-30.4	-30.9	-30.1	-31.1	-30.2	0.6
		0	Izquierdo	-27.8	-28.0	-27.4	-27.9	-27.5	0.4
		6		-28.5	-29.1	-28.1	-29.1	-28.1	0.9

Tabla 4.9: Datos del AC para ocho sujetos.

La siguiente tabla muestra datos de la concentración acústica para ocho sujetos. En el caso del sujeto 1 se observa una disminución de la AC para ambos lados del tálamo, dicha tendencia se puede observar en las gráficas 4.23(a) y 4.23(b). Un caso en donde se observa un incremento es para el sujeto 4, es posible observar este resultado en las gráficas 4.24(a) y 4.24(b). Por último, el sujeto número 3 no muestra diferencia de la AC entre las 0 hrs y 6 hrs posteriores al inicio de la exposición al sevoflurano, las gráficas 4.25(a) y 4.25(b).

Las figuras 4.21 a 4.25 muestran gráficas de cajas de los diferentes parámetros en el lado izquierdo y derecho del tálamo. Cada gráfica agrupa los valores de cada parámetro en los planos donde la $E_{umbral} > 15dB$. Cada caja contiene puntos que indican valores de cada plano en función de la densidad de probabilidad ajustada a la distribución de

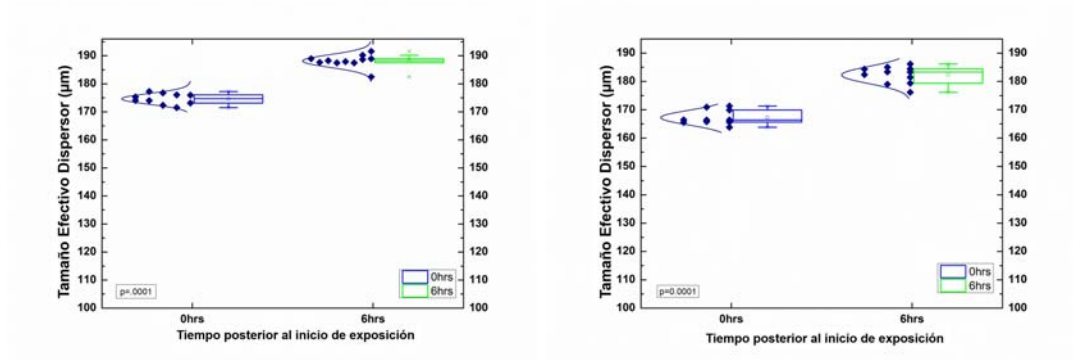
4. RESULTADOS

datos. Dicho ajuste se realizó a través del programa Origin (versión 2015a), que tiene distribuciones predeterminadas, en este caso se utilizó una distribución normal. A partir de los datos otorgados al programa Origin, éste crea la gráfica de caja calculando el promedio (línea dentro de la caja), la mediana (cuadro central dentro de la caja), el 25 percentil (límite inferior de la caja), 75 percentil (límite superior de la caja), el valor mínimo (línea superior fuera de la caja) y máximo (línea inferior dentro de la caja) e identifica valores atípicos dentro de los datos. Las gráficas presentadas son ejemplos representativos de los sujetos 7 y 8, las gráficas de los sujetos restantes se encuentran en el apéndice 1.

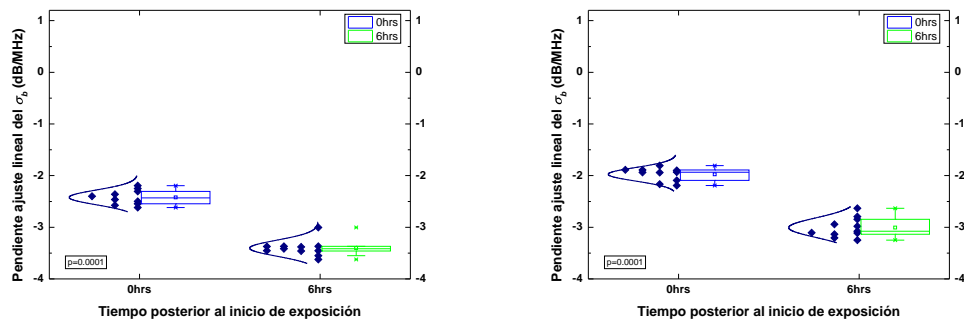
Las figuras 4.21 a 4.22 presentan resultados para ESS [a) y b)] y la pendiente [c) y d)], en tanto las figuras 4.24 a 4.25 muestran resultados para la AC y MBF. En todos los casos, el ESS mostró tendencias de cambio entre 0 hrs y 6 hrs, y mostró tendencias opuestas a la pendiente de $\sigma_b(f)$. La AC y MBF mostraron la misma tendencia. Estas observaciones están de acuerdo con los comportamientos esperados para dichos parámetros: dispersores más pequeños producen σ_b con dependencias más severas con la frecuencia, en tanto que mayores concentraciones de dispersores generan coeficientes de retrodispersión ($\sigma_b(f)$) con mayor amplitud. Estas gráficas son ejemplos representativos de los resultados para los sujetos 1, 3 y 4. El apéndice 1 muestra los resultados para todos los sujetos.

En general se observó acuerdo entre lados izquierdo y derecho en 6 sujetos en el caso del ESS y 6 sujetos en el caso del AC. Debido a que el efecto de la anestesia debe ser el mismo en ambos lados del tálamo (discusión con Dra. Ikonomidou) el resto del análisis se restringió a sujetos que presentaran acuerdo bilateral en el tálamo.

4.2.4.1. Tamaño efectivo del dispersor (ESS)



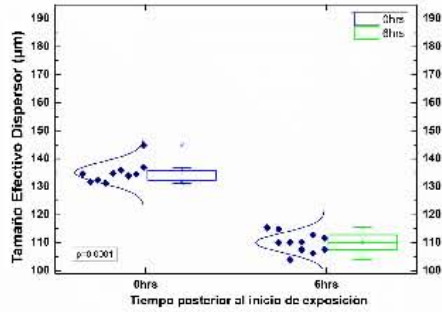
(a) Gráfica del tamaño efectivo del dispersor del lado derecho del tálamo. (b) Gráfica tamaño efectivo del dispersor del lado izquierdo del tálamo.



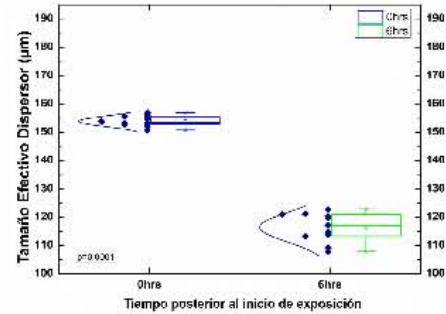
(c) Gráfica de la pendiente del coeficiente de retrodispersión lado derecho del tálamo. (d) Gráfica de la pendiente del coeficiente de retrodispersión lado izquierdo del tálamo.

Figura 4.21: Gráficas de caja del ESS y pendiente del coeficiente de retrodispersión para el sujeto 7. El valor p que se muestra en cada una de las gráficas pertenece a la comparación de los valores a 0 hrs y 6 hrs del parámetro correspondiente para el mismo lado del tálamo, por tal razón cada gráfica posee un valor p.

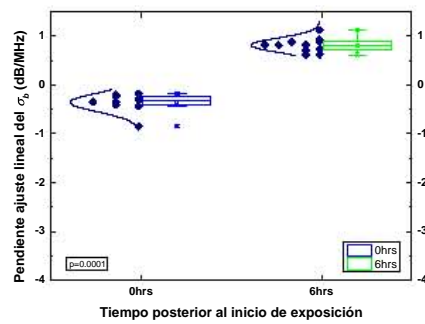
4. RESULTADOS



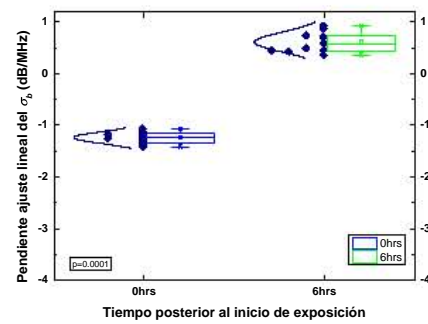
(a) Gráfica del tamaño efectivo del dispersor del lado derecho del tálamo.



(b) Gráfica tamaño efectivo del dispersor del lado izquierdo del tálamo.

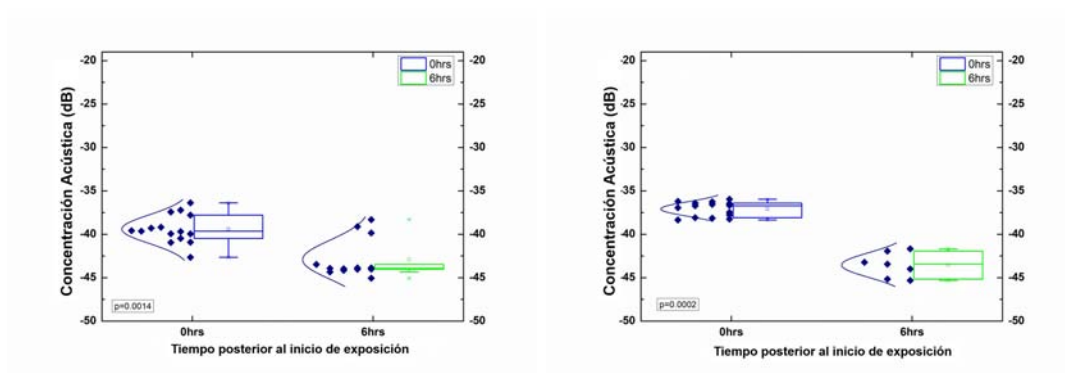


(c) Gráfica de la pendiente del coeficiente de retrodispersión lado derecho del tálamo.

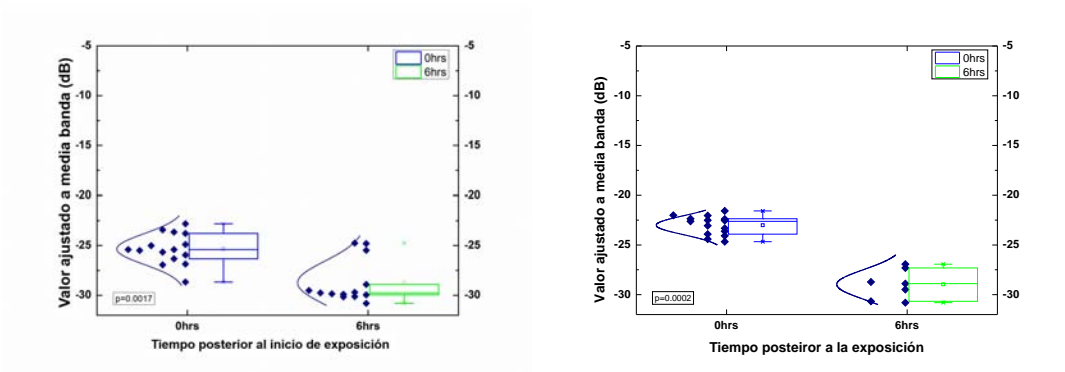


(d) Gráfica de la pendiente del coeficiente de retrodispersión lado izquierdo del tálamo.

Figura 4.22: Gráficas de caja del ESS y pendiente del coeficiente de retrodispersión para el sujeto 8. El valor p que se muestra en cada una de las gráficas pertenece a la comparación de los valores a 0 hrs y 6 hrs del parámetro correspondiente para el mismo lado del tálamo, por tal razón cada gráfica posee un valor p.



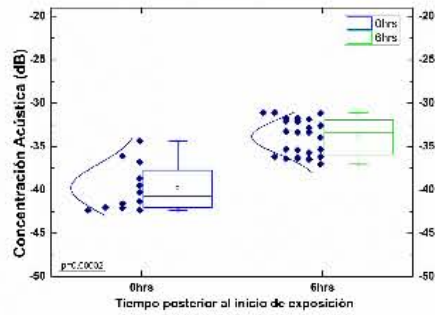
(a) Gráfica de la concentración acústica del lado derecho del tálamo. (b) Gráfica de la concentración acústica del lado izquierdo del tálamo.



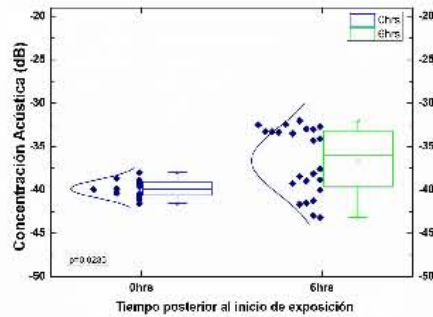
(c) Gráfica de la frecuencia central del σ_b del lado derecho del tálamo. (d) Gráfica de la frecuencia central del σ_b del lado izquierdo del tálamo.

Figura 4.23: Gráficas de caja de la concentración acústica y frecuencia central del σ_b para el sujeto 1. El valor p que se muestra en cada una de las gráficas pertenece a la comparación de los valores a 0 hrs y 6 hrs del parámetro correspondiente para el mismo lado del tálamo, por tal razón cada gráfica posee un valor p.

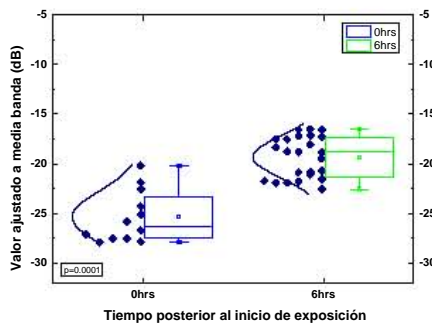
4. RESULTADOS



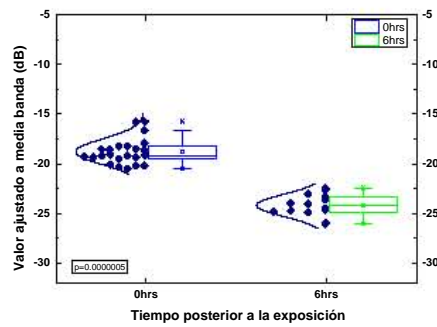
(a) Gráfica de la concentración acústica del lado derecho del tálamo.



(b) Gráfica de la concentración acústica del lado izquierdo del tálamo.

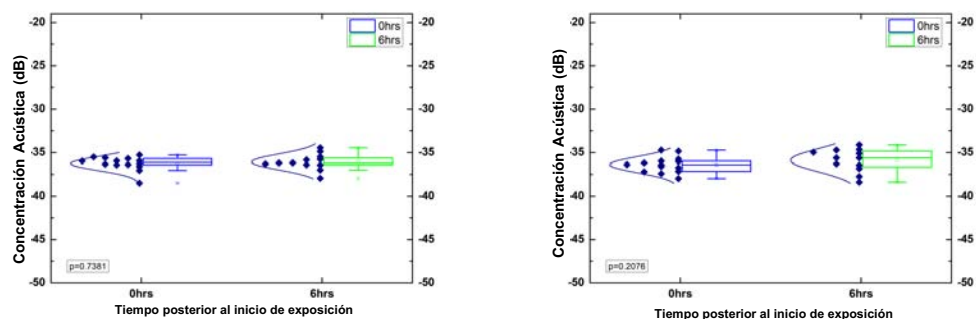


(c) Gráfica de la frecuencia central del σ_b del lado derecho del tálamo.

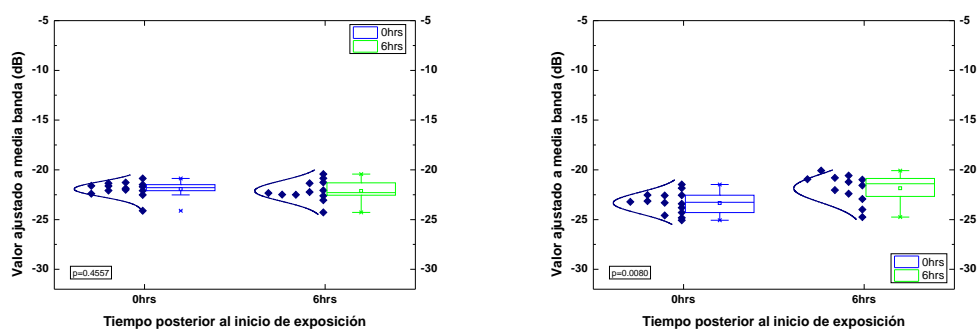


(d) Gráfica de la frecuencia central del σ_b del lado izquierdo del tálamo.

Figura 4.24: Gráficas de caja de la concentración acústica y frecuencia central del σ_b para el sujeto 4. El valor p que se muestra en cada una de las gráficas pertenece a la comparación de los valores a 0 hrs y 6 hrs del parámetro correspondiente para el mismo lado del tálamo, por tal razón cada gráfica posee un valor p.



(a) Gráfica de la concentración acústica del lado derecho del tálamo. (b) Gráfica de la concentración acústica del lado izquierdo del tálamo



(c) Gráfica de la frecuencia central del σ_b del lado derecho del tálamo. (d) Gráfica de la frecuencia central del σ_b del lado izquierdo del tálamo.

Figura 4.25: Gráficas de caja de la concentración acústica y frecuencia central del σ_b para el sujeto 3. El valor p que se muestra en cada una de las gráficas pertenece a la comparación de los valores a 0 hrs y 6 hrs del parámetro correspondiente para el mismo lado del tálamo, por tal razón cada gráfica posee un valor p.

Para reducir la dimensionalidad del análisis, se combinaron los resultados del lado izquierdo y derecho de cada macaco. Para justificar la combinación, se realizó una prueba Wilcoxon no pareada de los resultados del lado izquierdo y derecho del tálamo para cada sujeto, dicho análisis sugirió que las diferencias no son significativas en ningún caso, es decir, el valor p asociado dichos resultados fue mayor a 0.05. Por tanto se calculó el promedio de las medianas de cada lado para los valores de ESS y AC, obteniendo un único valor a 0hrs y 6hrs para cada sujeto.

4. RESULTADOS

Las figuras 4.26 y 4.27 muestran los valores combinados de ESS y AC, respectivamente, para todos los sujetos que mostraron acuerdo bilateral, tanto a 0 hrs como a 6 hrs. A 0 hrs, el ESS fue ($162 \mu m$, entre $158 \mu m$ y $170 \mu m$) en tanto que a 6 hrs fue ($154 \mu m$, entre $149 \mu m$ y $166 \mu m$) con un valor p asociado de 0.5. Por otro lado, a 0 hrs, la AC fue (-36 dB, entre -38 dB y -33 dB) en tanto que a 6 hrs fue (-36 dB, entre -35 dB y -34 dB) con un valor p asociado de 0.9.

En las figuras 4.26 y 4.27, el cambio en los parámetros está opacado por la variabilidad biológica de las propiedades acústicas del tálamo entre sujetos. Para reducir dicho efecto se calculó el cambio porcentual de cada parámetro para cada sujeto respecto al valor a 0 hrs.

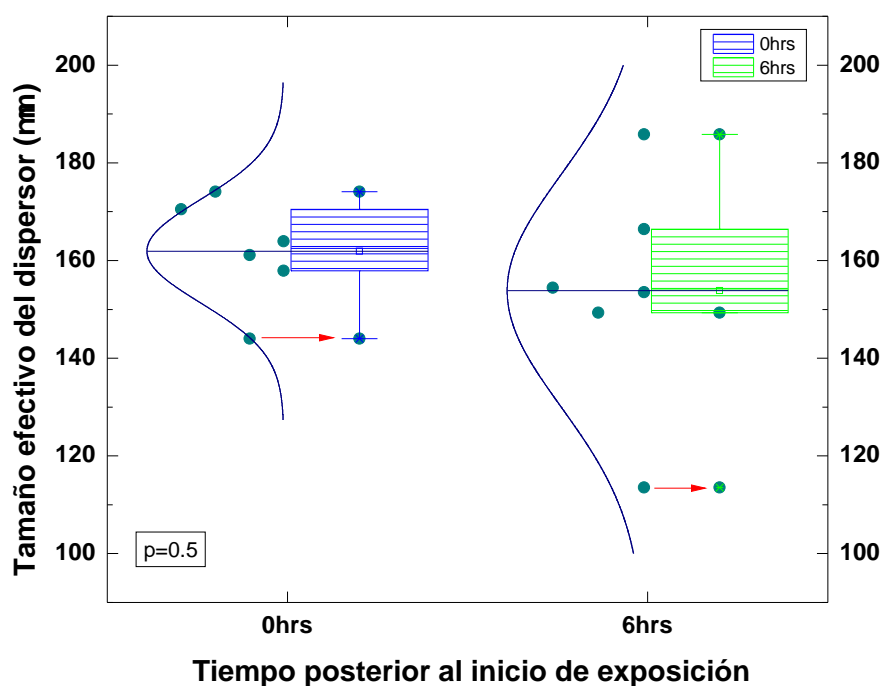


Figura 4.26: Comparación inter-sujeto del tamaño efectivo del dispersor a 0 hrs y 6 hrs después del inicio de la exposición a SEVO.

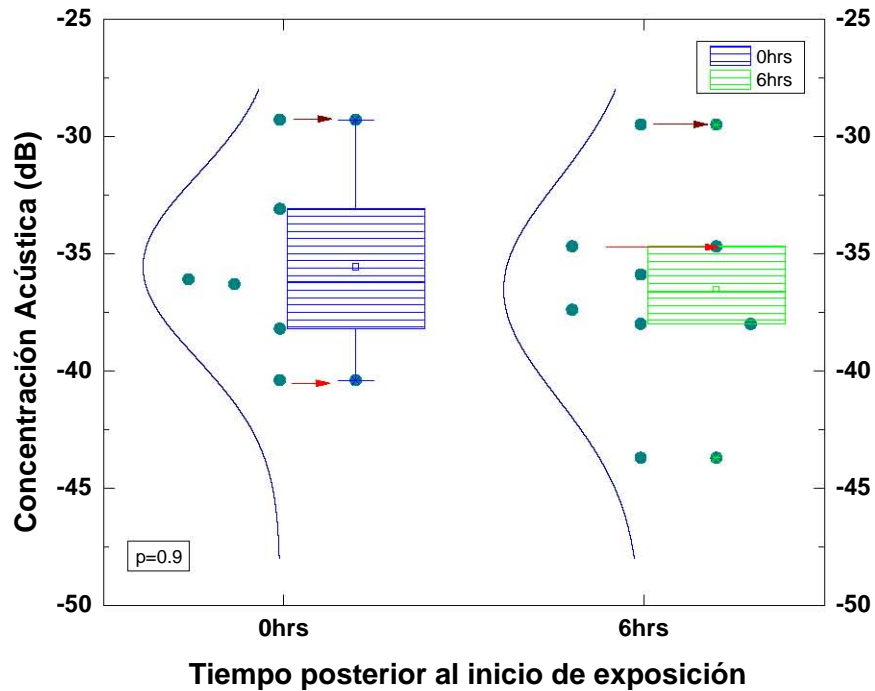


Figura 4.27: Comparación inter-sujeto de los valores de la concentración acústica a 0 hrs y 6 hrs después del inicio de la exposición a SEVO.

El cambio porcentual de ESS y AC se muestra en la figura 4.28. La figura también muestra los valores p asociados a la prueba Wilcoxon no pareada para el cambio porcentual de cambios parámetros ($p_{ESS} = 0.05$ y $p_{AC} = 0.36$).

Después de analizar los valores de la gráfica anterior pueden observarse dos puntos, para el caso del ESS, los cuales serán considerados de ahora en adelante como valores atípicos. Estos valores son considerados atípicos ya que se encuentran fuera del rango de valores igual a 1.5 veces el intervalo intercuartil.

4. RESULTADOS

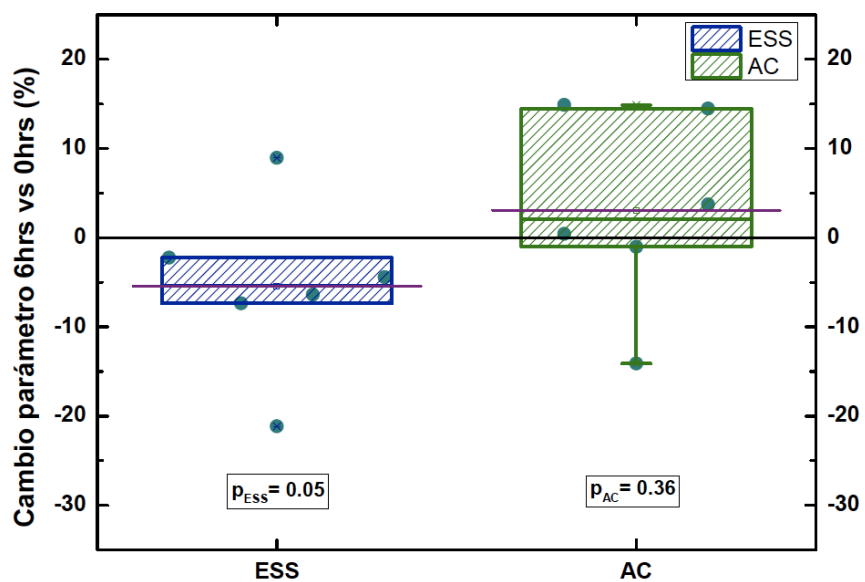


Figura 4.28: Porcentaje del cambio entre 0hrs y 6hrs normalizado por el valor a 0hrs de los dos biomarcadores.

Finalmente, la figura 4.29 muestra el cambio porcentual de ESS como función de la expresión de caspasa-3 activada evaluada a través de un análisis inmunohistoquímico. Se encontró una correlación negativa entre ambos parámetros (Pearson $r = -0.98$, cuyo intervalo de confianza al 95 % es de [0.47,0.99]) para los cuatro sujetos restantes.

Como puede observarse, entre mayor sea el cambio del tamaño efectivo del dispersor, la expresión de apoptosis aumenta.

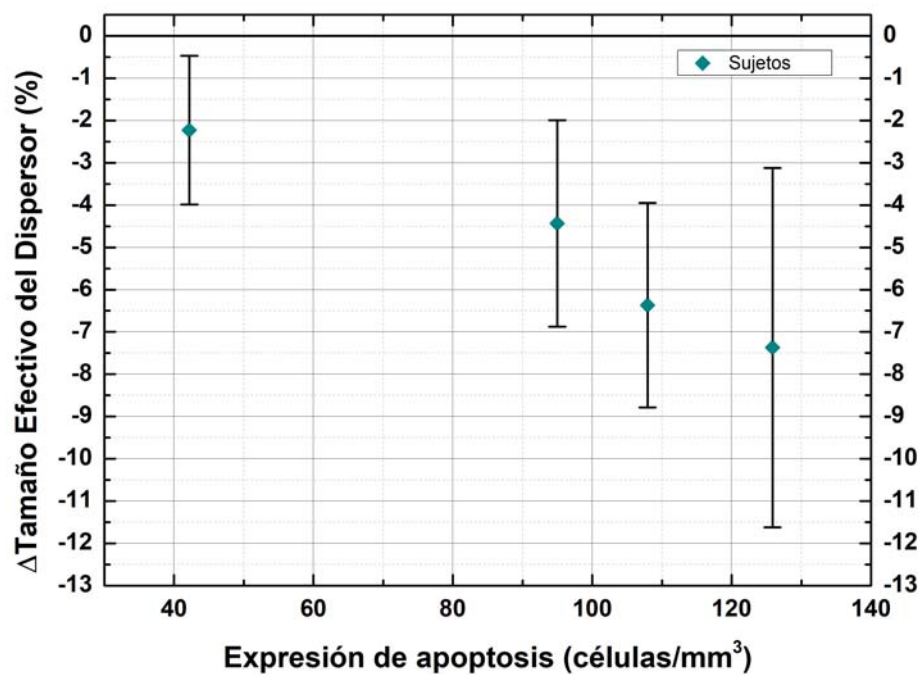


Figura 4.29: Gráfica de la diferencia porcentual en función de la expresión de apoptosis.

Discusión

En este capítulo se analizan y discuten los resultados presentados previamente. La discusión sigue el orden presentado en el capítulo anterior con la finalidad de conducir de una forma lógica a las conclusiones del trabajo.

5.1. Validación

La utilidad de procesar maniqués tejido-equivalentes con diferentes tamaños de dispersores fue verificar que los programas utilizados durante el trabajo no tuvieran errores de programación tales que alteraran el cálculo de los parámetros evaluados. A través del cálculo de la atenuación y del ESS fue posible observar que los valores estimados de ambos parámetros presentan acuerdo con mediciones de laboratorio similares a las reportadas por Nam et al. [79]. Además la figura 4.6 se muestra que el ESS estimado con el factor de forma Gaussiano ofrece contraste para diferenciar los dispersores entre ambos maniqués. Para ambos maniqués se muestra una diferencia porcentual del coeficiente de retrodispersión del laboratorio y el estimado en este trabajo mayor al 10 %, esto puede deberse a parámetros experimentales durante la adquisición de datos, sin embargo ambas curvas para el coeficiente de retrodispersión de los dos maniqués en el caso del laboratorio y el estimado poseen una dependencia en frecuencia similar. En la misma figura se visualiza una notoria discrepancia entre el ESS correspondiente al maniqué B calculado con los valores esperados de éste (círculos) y valor obtenido de las señales del equipo clínico (cajas de bigotes). Es posible que tal discrepancia se deba a

que el coeficiente de retrodispersión del maniquí B se encuentra muy cercano al límite de Rayleigh, condición bajo la cual la dependencia en frecuencia del coeficiente de retrodispersión no provee información sobre el tamaño efectivo del dispersor. Por tanto, pequeñas variaciones de la potencia del coeficiente de retrodispersión causan cambios grandes relativos del ESS. En el caso del maniquí A hay mejor acuerdo porque el ancho de banda del método del maniquí de referencia utilizado para el cálculo del ESS con el factor de forma Gaussiano, coincide con el ancho de banda de mayor sensibilidad. [44] Además, al realizar el cálculo del ESS se utilizó el factor de forma Gaussiano, el cual es un modelo continuo, es decir, modela la impedancia acústica del medio con una distribución continua de valores, sin embargo las microesferas presentes en ambos maniqués poseen tamaños discretos y son sólidas, esto implica que la impedancia acústica posee variaciones discretas de impedancia acústica, lo cual difiere del modelo Gaussiano. Farran et al. [80], propusieron un modelo que aproxima de forma más precisa el coeficiente de retrodispersión para esferas sólidas y por tanto el ESS y el AC, sin embargo realizar el cálculo con este modelo va más allá de los objetivos de esta tesis.

5.2. Modelo animal

Se realizó un proceso sistemático de estandarización de análisis de ERU durante el trabajo de tesis. A través de dicha estandarización solamente en un número limitado de los 14 sujetos (6 en el caso de ESS y 7 en el caso de AC) que constituían la muestra inicial, pudieron obtenerse resultados consistentes para el tamaño efectivo del dispersor y la concentración acústica.

Una exclusión de datos del 42 % para el ESS y del 50 % para la AC sugiere que deben implementarse modificaciones en la metodología con la finalidad de poder utilizar el máximo de datos posibles en el análisis. Estos porcentajes se calcularon con respecto al número inicial de sujetos (14).

La prueba estadística de χ^2 fue de gran utilidad para elegir el modelo teórico que mejor representa a los datos calculados. El resultado obtenido de dicha prueba sugiere

que el factor de forma Gaussiano representa mejor los factores de forma obtenidos a partir del método de maniquí de referencia en comparación con los modelos de esfera fluida y exponencial. Las suposiciones teóricas del factor de forma Gaussiano se basan en considerar a un medio con una función de correlación que modela un medio continuo e isotrópico de impedancia acústica, el cual consta de una distancia característica asociada al ancho de la curva Gaussiana que modela el factor de forma de retrodispersión. En cambio, el factor de forma de la esfera fluida, modela un medio discreto e isotrópico de impedancia acústica. Por lo tanto, a través de la prueba de χ^2 resultó que para obtener valores más precisos es preferible utilizar en el tálamo un modelo continuo de variaciones microscópicas de impedancia acústica. Esto se entiende a partir de los histogramas que se mostraron en la figura 4.20.

Tomando en cuenta que la prueba χ^2 mostró que era mejor utilizar el factor de forma Gaussiano, en el trabajo de tesis solamente se mostraron los resultados de los biomarcadores calculados con dicho factor de forma. Para poder evaluar qué tan sensibles eran los biomarcadores, se realizó una prueba de Wilcoxon no pareada entre dichos cambios. Uno de los sujetos tuvo que ser eliminado a mediados del análisis debido a que en ninguno de sus planos tenía al menos 15 dB de energía retrodispersada. A partir de ese momento el análisis se redujo a 13 sujetos.

Primero se realizó únicamente un análisis de un lado del tálamo de cada sujeto. En dicho análisis se mostró una reducción del ESS en 7/13 sujetos, y un incremento en 6/13 (resultados no mostrados). Por otro lado, al obtener el valor p entre los valores estimados a 0 hrs y 6 hrs, el valor mostró ser significativo para 12/13 sujetos. Este valor indica que el cambio estimado del tamaño efectivo del dispersor a las 6 hrs muestra significancia estadística, rechazando la hipótesis nula que considera que el tamaño efectivo del dispersor estimado a 6 hrs no es diferente con respecto al estimado a 0 hrs. Sin embargo, había una proporción aproximada del 50 % de los datos entre incrementos y disminuciones del parámetro, por lo que los datos no eran concluyentes. Dada esta situación se realizó una selección de los sujetos en los que fuera posible identificar regiones de estimación de parámetros en ambos lados del tálamo. Esto permitió

5. DISCUSIÓN

utilizar el acuerdo entre los cambios de los parámetros a ambos lados del tálamo como evaluación de la consistencia de la técnica. Del total de los 13 macacos solamente fue posible analizar en 9 de ellos los dos lados del tálamo.

De los seis sujetos que mostraron acuerdo en el ESS entre en lado izquierdo y derecho en el tálamo, en 5/6 macacos hubo una reducción del tamaño efectivo del dispersor y 1/6 un incremento.

En los 6 casos que hubo acuerdo bilateral en los cambios de la concentración acústica, en 3/6 hubo un incremento, 1/6 una reducción, en 2/6 no hubo diferencia y en los tres restantes hubo desacuerdo entre los cambios para cada lado.

Una posible causa de la discrepancia entre resultados en el lado derecho y el lado izquierdo del tálamo puede ser la estructura compleja y heterogénea del tálamo.

Dicha complejidad y heterogeneidad estructural del tálamo aumenta la sensibilidad de la técnica a la reproducibilidad de la alineación del plano de la imagen entre la adquisición a 0 hrs y la adquisición a 6 hrs, y representa un reto en cuanto al proceso de adquisición de datos. La consideración del acuerdo entre lados derecho e izquierdo se propuso como una medida prospectiva para aumentar la confiabilidad en la alineación del transductor. En el futuro se buscará identificar estructuras de interés que sirvan de referencia para la alineación del transductor en el mismo plano a 0 hrs y 6 hrs, como por ejemplo la presencia de vasos sanguíneos detectados a través de técnicas de ultrasonido Doppler.

Es importante señalar que en el caso de los seis sujetos que pertenecen al análisis del tamaño efectivo del dispersor, todos mostraron cambios del parámetro, incremento o reducción, entre 0 hrs y 6 hrs. Por el contrario, en el conjunto de los seis macacos del análisis de la concentración acústica, solamente cuatro de ellos mostraron cambios, y dos de ellos no mostraron diferencia significativa.

Los resultados del análisis inmunohistoquímico sugieren que hubo un aumento en la expresión de apoptosis posterior al inicio de la anestesia. Debido a que la apoptosis causa cambios en la microestructura del tejido con exposiciones largas (mayores a 3 hrs)[42] se espera que la función de autocorrelación espacial cambie como efecto de la

apoptosis inducida por el anestésico. Los resultados sugieren que en el medio a las 6 hrs hubo un cambio en la distribución de la impedancia acústica, lo cual podría deberse a una redistribución o reestructuración del medio por la presencia de células apoptóticas. Sin embargo, es importante señalar que no esperamos que el ESS represente el tamaño de una célula apoptótica (1 a $2\mu\text{m}$) [81]. La interpretación física del tamaño efectivo del dispersor es que es una medida del promedio espacial del tamaño característico de la función de correlación de impedancia acústica del medio. Por tanto, los cambios en este parámetro representan modificaciones espaciales y físicas (cambio de impedancia acústica) de todas las estructuras que contribuyan al proceso de retrodispersión, tanto celulares como del tejido conectivo. Por tanto, a pesar de que el tamaño efectivo del dispersor no pueda ser relacionado directamente con un tamaño biológico de una célula u otra estructura microscópica del tejido, resulta muy interesante observar que dicho parámetro es sensible a los cambios en la microestructura, tal como lo demostró Sadeghi y cols. [82] en células cancerosas de la mama.

Sadeghi y cols.[82] estimaron dos posibles biomarcadores para monitorear la respuesta de un tratamiento de quimioterapia para un tumor de la glándula mamaria. En ese estudio se observó que el tamaño promedio de las células y núcleos de ellas se va reduciendo en función al tiempo posterior al inicio del tratamiento. Si bien el tejido analizado no es el mismo, existe un acuerdo con la reducción del tamaño efectivo del dispersor observada por Sadeghi y cols.

Las fuentes de variabilidad biológica inmersa en nuestros datos recae principalmente en la complejidad biológica del tálamo, tal como se describió en la sección 2.3. Su composición es muy importante al realizar una evaluación de las propiedades acústicas del tejido, debido a que por su gran complejidad es posible que al realizar una estimación de cualquier parámetro, se esté recopilando información de varias capas del mismo tejido. Esto resulta en un problema pues no es posible determinar una única fuente de dispersión de la onda de ultrasonido, ni determinar con exactitud si existe una fuente principal de dispersión o es el cúmulo de estructuras del tálamo.

Después de realizar el proceso de reducción de variabilidad inter-sujeto (a través de

5. DISCUSIÓN

normalizar por los valores de los biomarcadores a 0 hrs) y de considerar cuales eran valores atípicos, solamente fue posible obtener datos confiables de cuatro sujetos. En estos cuatro sujetos se muestra una reducción del tamaño efectivo del dispersor a las 6 hrs después del inicio de la exposición a la anestesia.

Una fuente de sesgo importante en los datos fue el uso del mismo coeficiente de atenuación para todos los sujetos. La atenuación de un pulso de ultrasonido depende de tres factores: frecuencia, temperatura y de la presión, además la atenuación no es la misma de sujeto en sujeto [42]. La forma matemática desarrollada a través del maniquí de referencia para obtener el coeficiente de atenuación en el tejido de interés, es considerar una función exponencial dependiente de dos factores: del número de capas interpuestas por encima del tejido de interés, del grosor de éstas y del coeficiente de atenuación de cada una de estas. En este trabajo, el valor utilizado para el coeficiente de atenuación en el tálamo se supuso igual para los 14 macacos, reportado por [70]. El valor reportado por Kremkau et al. para el coeficiente de atenuación en infantes solamente consideró la medición de una única muestra de cerebro perteneciente a un niño de 3 días de edad. Las mediciones las realizaron en un ancho de banda de 1 MHz a 5Mhz, y la gráfica que reportan es un ajuste de mínimos cuadrados para los valores de atenuación medidos en dichas frecuencias. Un dato que permite validar que los valores de atenuación medidos por Kremkau et al. es el buen acuerdo con los reportados por Bamber y cols.[42]. Debido a que no existen valores en la literatura para el cerebro de macacos Rhesus recién nacidos, se debe analizar si la ecuación utilizada en esta tesis es apropiada para el análisis. Para esto se requieren nuevos métodos de cuantificación de atenuación *in vivo* que permitan comparar con los valores de Kremkau et al. El desarrollo de dichos métodos en tejidos complejos como el cerebral es tema de investigación actual en nuestro grupo.

Finalmente, de acuerdo con el trabajo de Zhu et al. [83] resaltaron que para poder estimar valores precisos de ESS es preferible tener conocimiento acerca de las estructuras del tejido de interés que contribuyen al proceso de retrodispersión. Sin embargo, sin tener conocimiento previo también es posible realizar mediciones que no estén tan

alejadas del valor de la estructura interna. En este estudio a partir de la frecuencia central y el promedio de ESS, se determinó que el factor de ka fue en promedio de 2.1, donde k pertenece al valor a la frecuencia central del ancho de banda, y a al promedio de los 6 macacos que mostraron acuerdo a las 0 hrs. Dicho valor está por encima del rango de mayor sensibilidad sugerido por Insana et. al. (0.6;ka;1.0). Por tanto, de acuerdo con Zhu et al. [83] los valores de ESS podrían estar subestimados. Sin embargo, esta subestimación también está inmersa en los valores de ESS estimados a 6 hrs y debido a que la diferencia porcentual entre los valores 0 y 6 hrs tan sólo es del 5% no se espera que la subestimación repercuta en las observaciones de este trabajo.

El tamaño efectivo del dispensor resultó ser más sensible a los cambios estimados entre 0 hrs y 6 hrs. Tomando en cuenta la definición e interpretación física del tamaño efectivo del dispensor, más los argumentos presentados previamente que dicho parámetro haya sido sensible a los cambios inducidos por la presencia de anestesia, los resultados sugieren que la impedancia acústica del tálamo se modificó por la presencia de células apoptóticas. Este argumento posee mayor sustento al observar el coeficiente de correlación entre el cambio en el tamaño efectivo del dispensor y los resultados del estudio inmunohistoquímico de la expresión de la activación de CASP3. El coeficiente indica una correlación fuerte entre ambos parámetros, $r=-0.98$ (intervalo de confianza al 95% de [0.47,0.99]). Por lo tanto, los resultados reportados en este trabajo sugieren que el tamaño efectivo del dispensor tiene potencial para ser considerado como un biomarcador para evaluar cambios en la microestructura del tálamo que resultan de la apoptosis en cerebros de macacos Rhesus recién nacidos.

Por otro lado, la concentración acústica resultó ser menos sensible a los cambios entre 0 hrs y 6 hrs. Esto se puede deber a que este parámetro depende de dos factores, del número de dispensores contenidos en el volumen del pulso de ultrasonido y de la variación promedio de impedancia acústica. Como se mencionó previamente, la impedancia acústica puede verse modificada en presencia de células apoptóticas. Sin embargo el pulso de ultrasonido no interactúa con un sólo núcleo, sino con un conjunto de estos, entonces si dentro del volumen de ultrasonido el número de dispensores aumenta pero

5. DISCUSIÓN

la variación de impedancia acústica disminuye, entonces el producto se mantiene, o viceversa. Lo anterior podría explicar que el valor de la concentración acústica no se vea modificado entre las 0 hrs y 6 hrs.

Por último, en este trabajo se exploró el uso del ultrasonido cuantitativo como un método primario para la evaluación de efectos neurotóxicos en tejido cerebral debido a anestésico sevoflurano. En este sentido, se espera que las técnicas presentadas puedan utilizarse como herramienta para la detección de neurotoxicidad de anestésicos en neonatos que no necesite o sea complementaria de otras técnicas de diagnóstico por imagen, como usualmente se utiliza el ultrasonido diagnóstico. Esto se debe a que las técnicas de ultrasonido cuantitativo presentadas en este trabajo permiten un análisis cuantitativo y menos subjetivo que el ultrasonido convencional.

Conclusiones

Al inicio de este trabajo de tesis se plantearon objetivos y metas específicas, cada uno de los ellos se cumplió exitosamente. Se realizó la implementación y validación de programas para el procesamiento de datos para la técnica de ERU en el LUM. Se llevó a cabo la estandarización del modelo teórico que representa de mejor forma al tejido cerebral y por lo tanto fue posible calcular tanto el tamaño efectivo del dispersor como la concentración acústica a 0 hrs y 6hrs. Dichos resultados fueron correlacionados con el análisis inmunohistoquímico de caspasa 3 activada a las 6 hrs después de la exposición al anestésico sevoflurano.

Los resultados obtenidos durante este trabajo sugieren que el *tamaño efectivo del dispersor* tiene potencial como un posible biomarcador del ultrasonido cuantitativo para evaluar la neurotoxicidad de la anestesia en el cerebro de macacos Rhesus recién nacidos. La importancia de este trabajo recae en haber obtenido una correlación fuerte, con un valor $r = -0.98$, entre un parámetro estimado de forma no invasiva (el tamaño efectivo del dispersor) y un biomarcador del nivel de expresión de apoptosis de CASP3, el cual se obtiene a través de un método invasivo. Esto quiere decir que el tamaño efectivo del dispersor podría ser utilizado para evaluar el nivel de apoptosis en tejido *in vivo*.

El número de datos que pasaron la prueba de confiabilidad se redujo un 78 % con respecto al total. La reducción del número de sujetos sugiere que debe desarrollarse un método de adquisición de datos que cumpla con las necesidades de la técnica utilizada

6. CONCLUSIONES

en este trabajo, el ultrasonido cuantitativo. Las razones expuestas previamente sugieren que las conclusiones están sujetas a un número reducido de muestras y deben ser interpretadas con precaución.

Los valores de ESS estimados a 0 hrs para los cuatro sujetos que pasaron el control de calidad, se encuentra entre $157 \mu\text{m}$ y $174 \mu\text{m}$, esto sugiere que a pesar de la variabilidad biológica inmersa en la estimación de dichos valores, no existe gran dispersión entre éstos. Este intervalo de valores resulta importante debido a que fueron adquiridos los datos a 0 hrs no había efectos de la anestesia, por lo tanto este rango de valores podría tener una relación con la microestructura del cerebro de los sujetos que dispersa al pulso del ultrasonido.

Se observó que el factor de forma Gaussiano representa de forma más precisa las propiedades acústicas del medio, comparado con los factores de forma Gaussiano y exponencial. Uno de los resultados secundarios de dicho análisis mostró que el factor de forma exponencial no convergió para el ancho de banda utilizado en el trabajo.

Una de las limitantes del trabajo fue la falta de un método preciso para evaluar la atenuación del pulso de ultrasonido en el cerebro en cada sujeto. Esta limitación condujo a utilizar el mismo coeficiente de atenuación para todos los sujetos tanto a 0 hrs como a 6 hrs. El cálculo de la atenuación en el método del maniquí de referencia se encuentra un paso adelante antes del cálculo del coeficiente de retrodispersión. Entre más preciso sea el cálculo del coeficiente de atenuación, mayor será la precisión del coeficiente de retrodispersión. Por lo tanto, es de suma importancia proponer un nuevo método para evaluar la atenuación del pulso de ultrasonido en el cerebro de macacos Rhesus recién nacidos. Este método debe considerar la complejidad estructural del cerebro, por ejemplo, la presencia de reflectores, y cómo éstos repercuten durante la adquisición de datos crudos de señal de radiofrecuencia, y por tanto, en el cálculo del coeficiente de atenuación.

La concentración acústica no resultó ser un biomarcador para evaluar la neurotoxicidad del tamaño efectivo del dispersor en el cerebro de macacos Rhesus recién nacidos. Esto sugiere que la magnitud del coeficiente de retrodispersión no se ve modificada

significativamente entre el tiempo sin la inducción de anestesia y 6 hrs posteriores a la iniciación de ésta.

En este trabajo se probó la hipótesis: biomarcadores de ERU mostraron variaciones significativas tras la inducción de apoptosis con SEVO. Sin embargo, la prueba de la hipótesis se realizó bajo condiciones muy limitadas debido al número reducido de datos de la muestra. Durante el desarrollo del trabajo existieron tres limitaciones. La primera fue a partir de varios criterios de consistencia, el 78% de los datos tuvieron que ser eliminados. La segunda es la aplicación del mismo coeficiente de atenuación para el tejido cerebral de todos los sujetos de la muestra. La tercera limitación está relacionada con el análisis de los datos, el cual se realiza suponiendo que el tálamo es un tejido que presenta dispersión incoherente. A pesar de estas limitaciones, los resultados aquí presentados son prometedores y vale la pena seguir explorando nuevas técnicas que permitan obtener resultados que expandan los presentados en este trabajo de tesis.

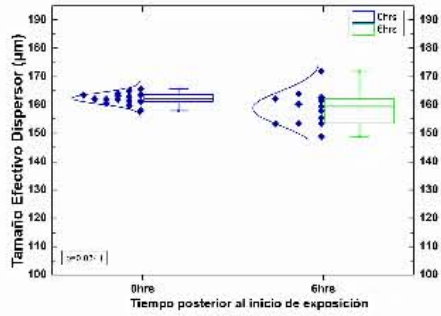
Trabajo a futuro

Se propone como trabajo a futuro implementar una técnica de adquisición de datos que pueda ser reproducible, de tal forma que se maximice el número de datos que cumplan los criterios de aceptación para poder ser analizados. Además, es necesario trabajar en un método que cuantifique la atenuación del haz de ultrasonido en tejido cerebral para cada sujeto, de tal forma que considere la variabilidad biológica entre sujetos. Por último se sugiere expandir las técnicas utilizadas de ultrasonido cuantitativo para analizar el tejido cerebral que no cumplan con la condición de dispersión incoherente (es decir, que existan fuentes de retrodispersión coherente).

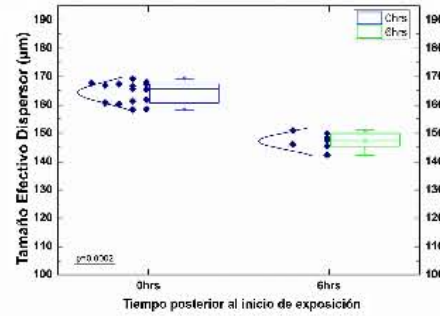
Apéndice

En el siguiente apéndice se encuentran gráficas del tamaño efectivo del dispersor, de la pendiente del coeficiente de retrodispersión, de la concentración acústica y de la frecuencia central del coeficiente de retrodispersión para el tálamo de los 9 sujetos en los que se pudo realizar el análisis de lado derecho e izquierdo del tálamo..

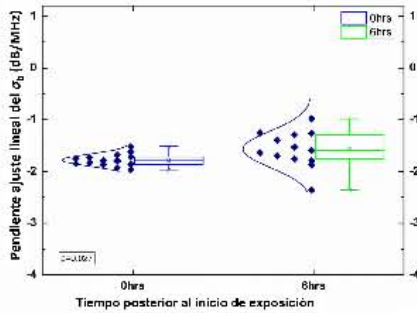
8.1. Tamaño efectivo del dispersor (ESS)



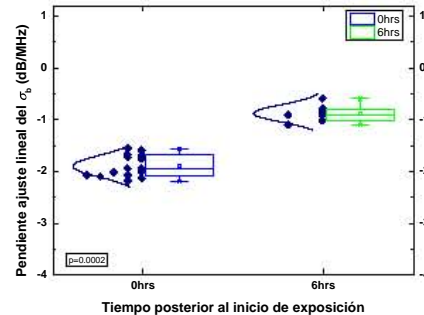
(a) Gráfica del tamaño efectivo del dispersor del lado derecho del tálamo.



(b) Gráfica tamaño efectivo del dispersor del lado izquierdo del tálamo.



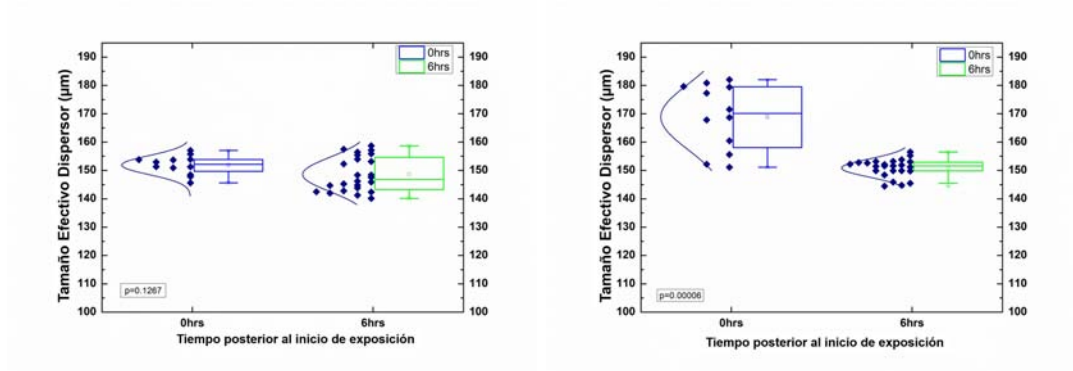
(c) Gráfica de la pendiente del coeficiente de retrodispersión lado derecho del tálamo.



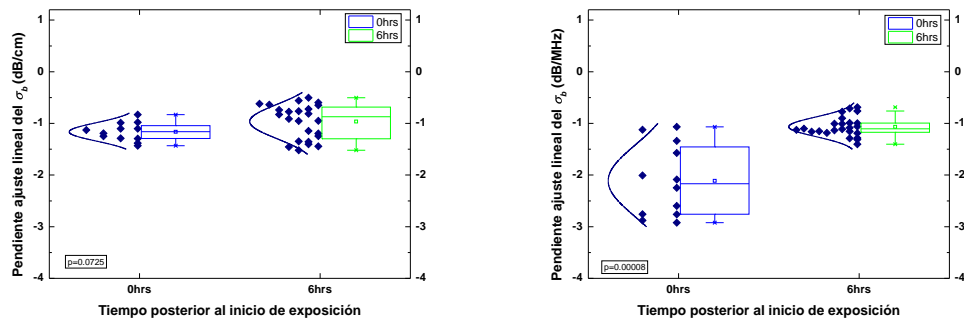
(d) Gráfica de la pendiente del coeficiente de retrodispersión lado izquierdo del tálamo.

Figura 8.1: Gráficas de caja del ESS y pendiente del coeficiente de retrodispersión para el sujeto 1. El valor p que se muestra en cada una de las gráficas pertenece a la comparación de los valores a 0 hrs y 6 hrs del parámetro correspondiente para el mismo lado del tálamo, por tal razón cada gráfica posee un valor p.

8.1 Tamaño efectivo del dispersor (ESS)



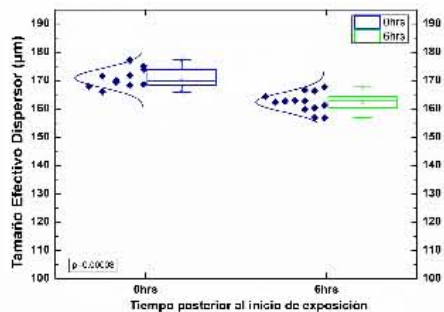
(a) Gráfica del tamaño efectivo del dispersor del derecho del tálamo. (b) Gráfica tamaño efectivo del dispersor del lado izquierdo del tálamo.



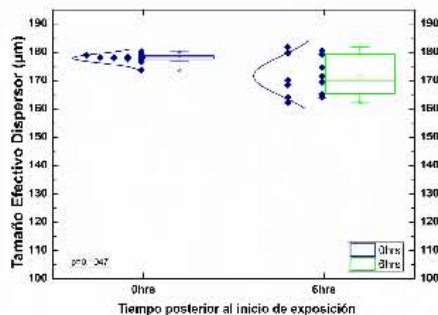
(c) Gráfica de la pendiente del coeficiente de retrodispersión lado derecho del tálamo. (d) Gráfica de la pendiente del coeficiente de retrodispersión lado izquierdo del tálamo.

Figura 8.2: Gráficas de caja del ESS y pendiente del coeficiente de retrodispersión para el sujeto 4. El valor p que se muestra en cada una de las gráficas pertenece a la comparación de los valores a 0 hrs y 6 hrs del parámetro correspondiente para el mismo lado del tálamo, por tal razón cada gráfica posee un valor p.

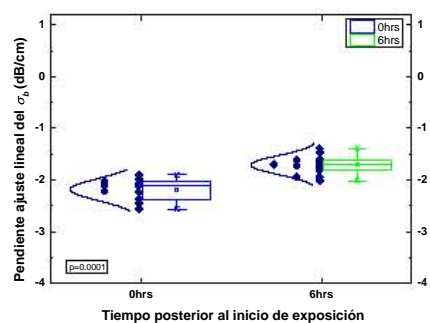
8. APÉNDICE



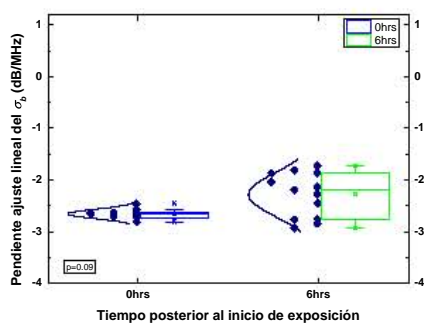
(a) Gráfica del tamaño efectivo del dispersor del lado derecho del tálamo.



(b) Gráfica tamaño efectivo del dispersor del lado izquierdo del tálamo.



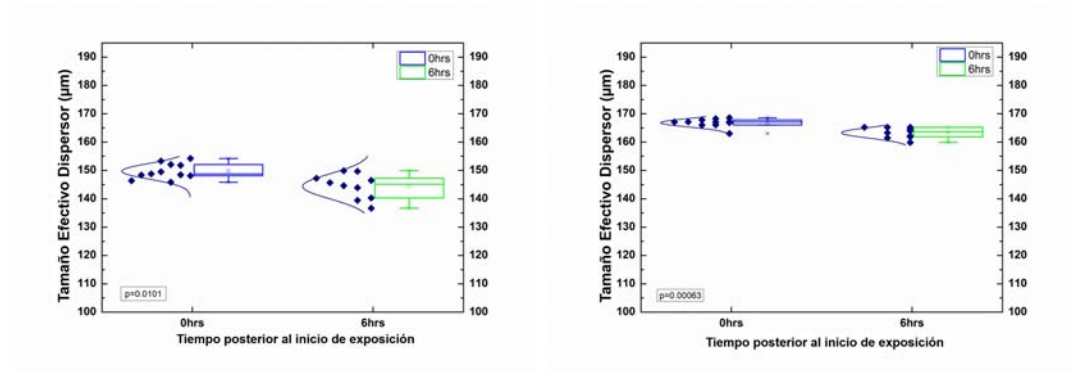
(c) Gráfica de la pendiente del coeficiente de retrodispersión lado derecho del tálamo.



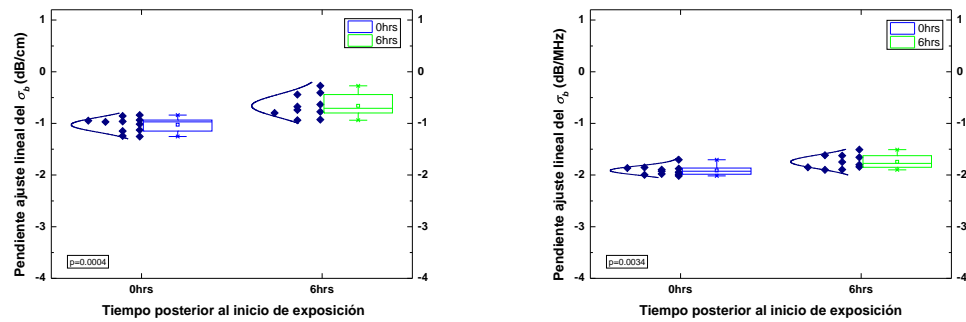
(d) Gráfica de la pendiente del coeficiente de retrodispersión lado izquierdo del tálamo.

Figura 8.3: Gráficas de caja del ESS y pendiente del coeficiente de retrodispersión para el sujeto 5. El valor p que se muestra en cada una de las gráficas pertenece a la comparación de los valores a 0 hrs y 6 hrs del parámetro correspondiente para el mismo lado del tálamo, por tal razón cada gráfica posee un valor p.

8.1 Tamaño efectivo del dispersor (ESS)



(a) Gráfica del tamaño efectivo del dispersor del lado derecho del tálamo. (b) Gráfica tamaño efectivo del dispersor del lado izquierdo del tálamo.



(c) Gráfica de la pendiente del coeficiente de retrodispersión lado derecho del tálamo. (d) Gráfica de la pendiente del coeficiente de retrodispersión lado izquierdo del tálamo.

Figura 8.4: Gráficas de caja del ESS y pendiente del coeficiente de retrodispersión para el sujeto 6. El valor p que se muestra en cada una de las gráficas pertenece a la comparación de los valores a 0 hrs y 6 hrs del parámetro correspondiente para el mismo lado del tálamo, por tal razón cada gráfica posee un valor p.

Bibliografía

- [1] Thomas Szabo. *Diagnostic ultrasound imaging : inside out*. Elsevier Academic, 2004. [1](#), [2](#), [13](#), [15](#), [16](#)
- [2] Jerrold T Bushberg and John M Boone. *The essential physics of medical imaging*. Lippincott Williams & Wilkins, 2011. [12](#), [15](#)
- [3] R.S.C. Cobbold. *Foundations of Biomedical Ultrasound*. Biomedical Engineering Series. Oxford University Press, 2007. [2](#), [15](#)
- [4] American Institute of Ultrasound in Medicine. Statement on Mammalian Biological Effects of Ultrasound In Vivo, 2015. [2](#)
- [5] Daniel J Mollura and Matthew P Lungren. *Radiology in Global Health*. 2014. [2](#)
- [6] Jonathan Mamou and Michael Olze. *Quantitative Ultrasound in Soft Tissues*. 2013. [2](#)
- [7] Michael L. Oelze and Jonathan Mamou. Review of Quantitative Ultrasound: Envelope Statistics and Backscatter Coefficient Imaging and Contributions to Diagnostic Ultrasound, 2016. [2](#)
- [8] J.A. Zagzebski, I.M. Rosado-Mendez, H.G. Nasief, and T.J. Hall. Quantitative ultrasound: Enhancing diagnosis using estimates of acoustic attenuation and backscatter. In *AIP Conference Proceedings*, volume 1747, 2016. [3](#), [33](#)

- [9] Michael F M.F. Insana and David G D.G. Brown. *Acoustic scattering theory applied to soft biological tissues*. CRC press, Boca Raton, FL, 1993. [3](#), [18](#), [21](#), [22](#)
- [10] Kirsteen R.; Yu John-Paul J.; Scalzetti Ernest M.; Yankeelov Thomas E.; Rosenkrantz Andrew B.; Mendiratta-Lala Mishal; Bartholmai Brian J.; Ganeshan Dhakshinamoorthy; Lenchik Leon; Subramaniam Rathan M. Abramson, Richard G.; Burton. Methods and challenges in quantitative imaging biomarker development. *Academic Radiology*, 22, 01 2015. [4](#)
- [11] Zheng Feng Lu, J. A. Zagzebski, and F. T. Lee. Ultrasound backscatter and attenuation in human liver with diffuse disease. *Ultrasound in medicine & biology*, 25(7):1047–1054, 1999. [4](#)
- [12] Frederic L. Lizzi, Donald L. King, Mary C. Rorke, Joanne Hui, Michael Ostromogilsky, Mykola M. Yaremko, Ernest J. Feleppa, and Peter Wai. Comparison of theoretical scattering results and ultrasonic data from clinical liver examinations. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 14(5):377–385, 1988. [4](#)
- [13] Brian S. Garra. the Value of Sonographic Texture Analysis, 1993. [4](#)
- [14] Pawan Chaturvedi and Michael F Insana. Error bounds on ultrasonic scatterer size estimates. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 100(1):392–9, 1996. [4](#), [53](#), [69](#)
- [15] F.L. Lizzi, M. Ostromogilsky, E.J. Feleppa, M.C. Rorke, and M.M. Yaremko. Relationship of Ultrasonic Spectral Parameters to Features of Tissue Microstructure. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*, 34(3):319–329, 5 1987. [4](#), [25](#)
- [16] Michael L. Oelze, William D. O’Brien, James P. Blue, and James F. Zachary. Differentiation and characterization of rat mammary fibroadenomas and 4T1 mouse carcinomas using quantitative ultrasound imaging. *IEEE Transactions on medical imaging*, 23(6):764–771, 2004. [4](#)

- [17] Haidy Gerges Naisef, Ivan Rosado-Mendez, James A Zagzebski, and Timothy J Hall. Quantitative Ultrasound-based multi-parameter classifier for breast masses. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, submitted, 2016. [4](#)
- [18] Ali Sadeghi-Naini, Omar Falou, Hadi Tadayyon, Azza Al-Mahrouki, William Tran, Naum Papanicolau, Michael C Kolios, and Gregory J Czarnota. Conventional Frequency Ultrasonic Biomarkers of Cancer Treatment Response In Vivo. *Translational Oncology*, 6(3):234–243, 2013. [4](#), [6](#)
- [19] A.S. Tunis, G.J. Czarnota, A. Giles, M.D. Sherar, J.W. Hunt, and M.C. Kolios. Monitoring structural changes in cells with high-frequency ultrasound signal statistics. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 31(8):1041–1049, 8 2005. [4](#), [6](#)
- [20] John F. R. Kerr, Clay M. Winterford, and Brian V. Harmon. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer Therapy. *Cancer*, 73(8):2013–2026, 4 1994. [4](#), [6](#), [30](#)
- [21] Dean B Andropoulos and Michael F Greene. Anesthesia and Developing Brains — Implications of the FDA Warning. *n engl j med*, 376(10):905–907, 2017. [4](#)
- [22] J. R. Castro Conde, A. A. Hernández Borges, E. Doménech Martínez, C. González Campo, and R. Perera Soler. Midazolam in neonatal seizures with no response to phenobarbital. *Neurology*, 64(5):876–879, 3 2005. [5](#)
- [23] Jacqueline R. Farwell, Young Jack Lee, Deborah G. Hirtz, Stephen I. Sulzbacher, Jonas H. Ellenberg, and Karin B. Nelson. Phenobarbital for Febrile Seizures — Effects on Intelligence and on Seizure Recurrence. *New England Journal of Medicine*, 322(6):364–369, 2 1990.
- [24] Michael J. Painter, Mark S. Scher, Aryeh D. Stein, Stacey Armatti, Zhiming Wang, Joseph C. Gardiner, Nigel Paneth, Beth Minnigh, and John Alvin. Phenobarbital compared with phenytoin for the treatment of neonatal seizures. *The New England Journal of Medicine*, 341(7):485–489, 1999.

BIBLIOGRAFÍA

- [25] L A Lockman, R Kriel, D Zaske, T Thompson, and N Virnig. Phenobarbital dosage for control of neonatal seizures. *Neurology*, 29(11):1445–9, 11 1979.
- [26] Sven Bercker, Bettina Bert, Petra Bittigau, Ursula Felderhoff-Müser, Christoph Bühner, Chrysanthy Ikonomidou, Mirjam Weise, Udo X. Kaisers, and Thoralf Kerner. Neurodegeneration in Newborn Rats Following Propofol and Sevoflurane Anesthesia. *Neurotoxicity Research*, 16(2):140–147, 2009.
- [27] Jerrold American Society of Anesthesiologists., Nancy Sikich, Sam Kleinman, and Steve Yentis. *The pharmacology of sevoflurane in infants and children*, volume 80. [American Society of Anesthesiologists, etc.], 4 1994. 5
- [28] C. Ikonomidou. Blockade of NMDA Receptors and Apoptotic Neurodegeneration in the Developing Brain. *Science*, 283(5398):70–74, 1999. 5
- [29] Ansgar M. Brambrink, Alex S. Evers, Michael S. Avidan, Nuri B. Farber, Derek J. Smith, Xuezhao Zhang, Gregory A. Dissen, Catherine E. Creeley, and John W. Olney. Isoflurane-induced Neuroapoptosis in the Neonatal Rhesus Macaque Brain. *Anesthesiology*, 112(4):834–841, 4 2010. 5
- [30] Ansgar M. Brambrink, Alex S. Evers, Michael S. Avidan, Nuri B. Farber, Derek J. Smith, Lauren D. Martin, Gregory A. Dissen, Catherine E. Creeley, and John W. Olney. Ketamine-induced neuroapoptosis in the fetal and neonatal rhesus macaque brain. *Anesthesiology*, 116(2):372–384, 2012. 5, 31
- [31] G.A Neligan. THE HUMAN BRAIN GROWTH SPURT. *Development Medicine and Child Neurology*, pages 677–678, 1974. 5
- [32] Fda and Cder. FDA Drug Safety Communication: FDA review results in new warnings about using general anesthetics and sedation drugs in young children and pregnant women. 5
- [33] Gregory J Czarnota, Michael C Kolios, Homayoun Vaziri, Sm Benchimol, F Peter Ottensmeyer, Michael D Sherar, and John W Hunt. Ultrasonic biomicroscopy of

-
- viable, dead and apoptotic cells. *Ultrasound in Med. & Biol. World Federation for Ultrasound in Medicine & Biology*, 23(0):961–965, 1997. [6](#)
- [34] G J Czarnota, M C Kolios, J Abraham, M Portnoy, F P Ottensmeyer, J W Hunt, and M D Sherar. Ultrasound imaging of apoptosis: high-resolution non-invasive monitoring of programmed cell death in vitro, in situ and in vivo. *British journal of cancer*, 81(3):520–7, 1999. [6](#)
- [35] Faiz M. Khan. *The Physics of Radiation Therapy*. 2003. [11](#)
- [36] Frederick J. Bueche and Eugene Hecht. *Física General*. 2007. [11](#)
- [37] Universidad Iberoamericana. Ondas mecánicas. [12](#)
- [38] Frank Herbert Attix. *Introduction to Radiological Physics and Radiation Dosimetry*. 1986. [12](#)
- [39] James A. Zagzebski. *Essentials of ultrasound physics*. Mosby, St. Louis, Missouri, 1996. [13](#), [14](#)
- [40] Eugene Hecht. *Óptica*. Addison-Wesley, 1999. [16](#)
- [41] Michael F Insana and Timothy J Hall. Parametric ultrasound imaging from backscatter coefficient measurements: Image formation and interpretation. *Ultrasonic imaging*, 12(4):245–267, 1990. [16](#), [18](#), [19](#), [20](#), [23](#), [24](#), [51](#)
- [42] C R Hill, J C Bamber, and G R Haar. *Physical Principles of Medical Ultrasonics*. 2005. [16](#), [48](#), [71](#), [72](#), [94](#), [96](#)
- [43] Insana MF and Hall TJ. Parametric ultrasound imaging from backscatter coefficient measurements: image formation and interpretation. *Ultrasonic Imaging*, 12:245–267, 1990. [19](#), [20](#)
- [44] Michael F Insana, Robert F Wagner, David G Brown, and Timothy J Hall. Describing small-scale structure in random media using pulse-echo ultrasound. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 87(1):179–192, 1990. [20](#), [92](#)
-

- [45] M F Insana and T J Hall. Characterising the microstructure of random media using ultrasound. *Physics in Medicine and Biology*, 35(10):1373–1386, 10 1990. [23](#)
- [46] Anthony Gerig, James Zagzebski, and Tomy Varghese. Statistics of ultrasonic scatterer size estimation with a reference phantom. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 113(6):3430–3437, 2003. [24](#)
- [47] Wanda Webb. *Neurology for the Speech-Language Pathologist*. Mosby, 6 edition, 2016. [25](#), [26](#), [27](#)
- [48] Robert G. Ross. Laurie lundy-ekman, ,neuroscience: Fundamentals of rehabilitation (1998) w. b. saunders,philadelphia 468 pages. *Journal of Hand Therapy*, 12, 1999. [26](#)
- [49] Thomas Voss Jürgen K. Mai, George Paxinos. *Atlas of the Human Brain, 3rd Edition*. Academic Press, 3 edition, 2007. [27](#), [28](#)
- [50] Jürgen K. Mai and F. Forutan. *Thalamus*. 2012. [28](#), [29](#)
- [51] Luongo De Leandro Luongo De Matos, Damila Cristina Trufelli, Maria Graciela, Luongo De Leandro Luongo De Matos, Leandro Luongo De Matos, Cristina Trufelli, Maria Graciela, Luongo De Matos, Maria Aparecida, and Silva Pinhal. Biomarker Insights Immunohistochemistry as an Important Tool in Biomarkers Detection and Clinical Practice. *Biomarker Insights*, 5:9–20, 2010. [29](#)
- [52] J. Li and J. Yuan. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*, 27(48):6194–6206, 2008. [29](#)
- [53] S. Shalini, L. Dorstyn, S. Dawar, and S. Kumar. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death and Differentiation*, 22(4):526–539, 2015. [29](#)
- [54] M. D’Amelio, V. Cavallucci, and F. Cecconi. Neuronal caspase-3 signaling: Not only cell death. *Cell Death and Differentiation*, 17(7):1104–1114, 2010. [30](#), [31](#)

-
- [55] Krikor Dikranian, Masahiko J Ishimaru, Tatyana Tenkova, Joann Labruyere, Y Q Qin, Chrysanthi Ikonomidou, and John W Olney. REVIEW Apoptosis in the in Vivo Mammalian Forebrain. [30](#), [31](#)
- [56] F. Miksa M. Vockler J. Bittigau P. Pohl D. Dikranian K. Tenkova T. Turski l. Olney J. W. Ikonomidou, C. Bosch. Blockade of glutamate receptors triggers apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science*, 283(January):70, 1999. [30](#), [31](#)
- [57] C. Ikonomidou. Blockade of nmda receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science*, 283, 1 1999. [31](#)
- [58] John W Olney, Tatyana Tenkova, Krikor Dikranian, Yue-Qin Qin, Joann Labruyere, and Chrysanthi Ikonomidou. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing C57BL / 6 mouse brain. *Developmental Brain Research*, 133:115–126, 2002. [31](#)
- [59] Richard E.; Izumi Yukitoshi; Benshoff Nicholas D.; Dikranian Krikor; Zorumski Charles F.; Olney John W.; Wozniak David F. Jevtovic-Todorovic, Vesna; Hartman. Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. *Journal of Neuroscience*, 23, 02 2003. [31](#)
- [60] Catherine E. Creeley, Krikor T. Dikranian, Gregory A. Dissen, Stephen A. Back, John W. Olney, and Ansgar M. Brambrink. Isoflurane-induced apoptosis of neurons and oligodendrocytes in the fetal rhesus macaque brain. *Anesthesiology*, 120(3):626–638, 2014. [31](#)
- [61] Lin Xin Yao, James A Zagzebski, and Ernest L Madsen. Backscatter coefficient measurements using a reference phantom to extract depth-dependent instrumentation factors. *Ultrasonic imaging*, 12(1):58–70, 1990. [33](#), [40](#)
- [62] Janelle J Anderson, Maria-Teresa Herd, Michael R King, Alexander Haak, Zachary T Hafez, Jun Song, Michael L Oelze, Ernest L Madsen, James A Zagzebski,

- William D O'Brien, and Timothy J Hall. Interlaboratory Comparison of Backscatter Coefficient Estimates for Tissue-Mimicking Phantoms. [33](#)
- [63] Kibo Nam, I.M. Ivan M Rosado-Mendez, Lauren A L.A. Wirtzfeld, Viksit Kumar, Ernest L E.L. Madsen, Goutam Ghoshal, Alexander D A.D. Pawlicki, M.L. Michael L Oelze, Roberto J R.J. Lavarello, T.A. Timothy A Bigelow, J.A. James A Zagzebski, William D O'Brien, Timothy J T.J. Hall, others, J.A. James A Zagzebski, W.D. O'Brien Jr., and Timothy J T.J. Hall. Cross-imaging system comparison of backscatter coefficient estimates from a tissue-mimicking material. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 132(3):1319–24, 2012. [33](#)
- [64] El Madsen, Hj Sathoff, and Ja Zagzebski. Ultrasonic shear wave properties of soft tissues and tissuelike materials. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 74:1346–1355, 1983. [36](#), [37](#)
- [65] Jian Feng Chen, James A. Zagzebski, and Ernest L. Madsen. Tests of Backscatter Coefficient Measurement Using Broadband Pulses. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, 40(5):603–607, 1993. [37](#)
- [66] Shelby S. Brunke, Michael F. Insana, Jeremy J. Dahl, Christian Hansen, Mohammad Ashfaq, and Helmut Ermert. An ultrasound research interface for a clinical system. *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*, 54(1):198–210, 2007. [38](#)
- [67] Ivan M Rosado-Mendez, Lindsey C Carlson, Timothy J Hall, and James A Zagzebski. A multitaper generalized spectrum technique for detection of periodic structures in tissue: Comparison with conventional methods. In *Ultrasonics Symposium (IUS), 2013 IEEE International*, pages 433–436, 2013. [39](#), [41](#), [49](#)
- [68] The Nemours Foundation. Ultrasonido : cabeza Qué es, 2018. [45](#)
- [69] Heidi L. Frankel and Bennett P. De Boisblanc. *Bedside procedures for the intensivist*. 2010. [46](#), [47](#)

- [70] C. Patrick McGraw Frederic W. Kremkrau, Ralph W. Barnes. Ultrasonic Attenuation and Propagation speed in normal human brain. *Acoustical Society of America*, 70(29):29–38, 1981. [48](#), [70](#), [71](#), [72](#), [96](#)
- [71] D J Thomson. Spectrum estimation and harmonic analysis. *Proceedings of the IEEE*, 70(9):1055–1096, 1982. [49](#)
- [72] David Slepian. Prolate spheroidal wave functions, Fourier analysis, and uncertainty—V: The discrete case. *Bell Labs Technical Journal*, 57(5):1371–1430, 1978. [49](#)
- [73] Ramos-Matusalem A.K. *Estudio numérico de los forzamientos que generan la surgencia de Yucatan*. PhD thesis, 2013. [49](#)
- [74] E. J. Feleppa M. Elbaum F. L. Lizzi, M. Greenebaum and D. J. Coleman. Theoretical framework for spectrum analysis in ultrasonic tissue characterization. *Journal of the Acoustical Society of America*, 73:1366–1373, 1983. [51](#)
- [75] Frederic L. Lizzi, S. Kaisar Alam, Samuel Mikaelian, Paul Lee, and Ernest J. Feleppa. On the statistics of ultrasonic spectral parameters. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 32(11):1671–1685, 2006. [52](#)
- [76] The Kolmogorov-smirnov. Nonparametric statistics and model selection, 2017. [53](#)
- [77] Kevin K. Noguchi, Stephen A. Johnson, Francesca M. Manzella, Kobe L. Masuoka, Sasha L. Williams, Lauren D. Martin, Gregory A. Dissen, Chrysanthy Ikonomidou, Katie J. Schenning, John W. Olney, and Ansgar M. Brambrink. Caffeine augments anesthesia neurotoxicity in the fetal macaque brain. *Scientific Reports*, 8(1), 12 2018. [54](#)
- [78] Michael F. Insana, Timothy J. Hall, and James L. Fishback. Identifying acoustic scattering sources in normal renal parenchyma from the anisotropy in acoustic properties. 17(6):613–626, 1 1991. [63](#)

- [79] K. Nam, I.M. Rosado-Mendez, L.A. Wirtzfeld, A.D. Pawliki, V. Kumar, E.L. Madsen, G. Ghoshal, R.J. Lavarello, M.L. Oelze, T.A. Bigelow, J.A. Zagzebski, W.D. O'Brien Jr., and T.J. Hall. Ultrasonic attenuation and backscatter coefficient estimates of rodent-tumor-mimicking structures: Comparison of results among clinical scanners. *Ultrasonic Imaging*, 33(4):233–250, 2011. [91](#)
- [80] James J Faran. Society 23 of america. *Acoustical Society of America*, 23(4):405–418, 1951. [92](#)
- [81] G J Czarnota, M C Kolios, J Abraham, M Portnoy, F P Ottensmeyer, J W Hunt, and M D Sherar. Ultrasound imaging of apoptosis: high-resolution non-invasive monitoring of programmed cell death in vitro, in situ and in vivo. *Br J Cancer*, 81(3):520–527, 1999. [95](#)
- [82] Ali Sadeghi-Naini, Omar Falou, Hadi Tadayyon, Azza Al-Mahrouki, William Tran, Naum Papanicolau, Michael C Kolios, and Gregory J Czarnota. Conventional Frequency Ultrasonic Biomarkers of Cancer Treatment Response In Vivo. 2013. [95](#)
- [83] Yang Zhu, Aiguo Han, William D O'brien, Michael L Oelze, and Michael F Insana. Limitations on estimation of effective scatterer diameters Characterization of interface reflection coefficients using a finite-difference injection technique. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 142(142), 2017. [96](#), [97](#)