



Escuela de ingeniería
Ingeniería civil mecánica

Desarrollo de una cámara de perfusión para placenta humana ex-vivo funcional para la
implementación y análisis de imágenes ultrasónicas

Gabriel Ignacio Maureira Bravo
Profesor(a) guía: David Espíndola

Tesis para optar al título y/o grado de Ingeniero Civil Mecánico

Rancagua, Chile
Marzo del año 2022

Dedicatoria

Esta tesis está dedicada a mi pareja actual Sasha López, quien me acompaña y apoyo durante todo el proceso correspondiente al desarrollo de esta tesis de forma emocional y académica siendo una ayuda indispensable durante este proceso.

Agradecimientos

Durante mi desarrollo como estudiante, así como en esta tesis recibí el apoyo de muchas personas ya sea desde dentro o fuera de la universidad, y es necesario agradecer el apoyo brindado debido a que en conjunto me han ayudado a llegar hasta aquí. Dicho esto, agradezco a mis amigos y excompañeros Hernán Reyes (Waren) y Rubén Quijón quienes siempre que tenía una duda estuvieron ahí para ayudarme con la mejor de las disposiciones. A mi novia Sasha López que me acompañó siempre aun cuando el futuro y avance de mi tesis se veía incierto, prestando toda su contención cariño y ayuda, siendo una persona y un pilar fundamental para mi durante todo esto. A mi familia que a pesar de todo siempre me han apoyado para seguir estudiando lo que me gusta. a mi profesor guía, de quien he aprendido muchísimo durante el desarrollo de esta tesis, ayudándome a mejorar la forma en la que explico mis ideas, apoyándome también en el entendimiento de los distintos conceptos, dedicando horas en ayudarme a resolver y comprender el significado de las ecuaciones y conceptos implicados en esta tesis, dejándome con la sensación de que, si bien aún tengo muchas cosas que aprender, no habría aprendido tanto con un profesor guía diferente. Agradezco a la señorita Muriel Espinosa y al profesor Cristóbal Quiñinao quienes también estuvieron muy presentes aclarándome cualquier duda y siempre recibíéndome con la mejor de las disposiciones, actitud que destaco desde que los conocí al entrar en la universidad. Finalmente agradezco el financiamiento desde Fondecyt Regular 1190212, Fondo multidisciplinario UOH MDM2021004 y Fondecyt 3210458.

Índice

DEDICATORIA.....	1
AGRADECIMIENTOS	2
ÍNDICE.....	3
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN.....	6
HIPÓTESIS.....	20
OBJETIVO GENERAL.....	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
MARCO TEÓRICO.....	23
ANATOMÍA DE LA PLACENTA.....	23
PERFUSIÓN PLACENTARIA.....	28
CÁMARAS DE PERFUSIÓN	29
PROCESAMIENTO DE DATOS BRUTOS ULTRASONIDO.....	31
MARCO METODOLÓGICO.....	34
METODOLOGÍA OBJETIVO ESPECÍFICO No1	34
METODOLOGÍA OBJETIVO ESPECÍFICO No2	38
METODOLOGÍA OBJETIVO ESPECÍFICO No3	44
METODOLOGÍA OBJETIVO ESPECÍFICO No4	46
RESULTADOS	54
RESULTADOS OBJETIVO ESPECÍFICO No1	54
RESULTADOS OBJETIVO ESPECÍFICO No2	58
RESULTADOS OBJETIVO ESPECÍFICO No3	61
RESULTADOS OBJETIVO ESPECÍFICO No4	62

CONCLUSIÓN.....	70
REFERENCIAS.....	72
ANEXOS.....	81

Resumen

El ultrasonido es una de las herramientas para el diagnóstico pronóstico y monitoreo más utilizadas actualmente en el mundo, lo que se da gracias a sus características únicas destacando, entre ellas, el uso de radiación no ionizante, ser un sistema portable, tener bajo costo de adquisición y mantenimiento, y funcionar de forma no invasiva. Dentro de este contexto recientemente se ha gestado una nueva técnica de obtención de imágenes de súper resolución ultrasónica, denominada “Ultrasound Localization Microscopy” (ULM), que ha tomado fuerza debido a su capacidad de alcanzar una resolución de hasta 5 micrómetros. Esta revolucionaria técnica aún está en fase de desarrollo ya sea por problemas de robustez, la dependencia del operador, o las variaciones en sus parámetros de utilización. Este proyecto de tesis, se enmarca un estudio de obtención de imágenes ULM de placenta humana ex-vivo, con el fin de lograr un mayor acercamiento a lo que sería su aplicación a nivel clínico, pudiendo obtener los parámetros correctos para acelerar la traslación clínica. Esta tesis busca desarrollar una cámara de perfusión placentaria compatible con técnicas ultrasónicas para ser implementada en la obtención de imágenes ULM. Para el desarrollo de esta cámara, se definieron 4 hitos que se realizaron de forma iterativa. El primero es el diseño, que se basa en las necesidades para la perfusión placentaria y la obtención de imágenes ultrasónicas. El segundo es la fabricación, que resulto en una cámara desarmable, que permite reparar la cámara solo cambiando las zonas afectadas en caso de ruptura. El tercero es probar las características fundamentales de la cámara, donde se testea la permeabilidad, fijación y conexiones. El último hito es el desarrollo de imágenes ultrasónicas estructurales y cuantitativas a partir de la toma de datos de la perfusión placentaria en la cámara desarrollada. Este último hito muestra la utilidad de la cámara, logrando implementar un experimento de perfusión y toma de datos ultrasónicos exitoso gracias a sus características únicas. Logrando formar imágenes B-mode y Doppler, donde se calcularon velocidades promedio en tres vasos sanguíneos diferentes para 10 caudales, obteniendo una correlación presumiblemente lineal entre caudal y velocidad.

Palabras clave: ultrasonografía, cámara, perfusión, Doppler, ULM

Introducción

El ultrasonido es una de las técnicas de imágenes más utilizadas clínicamente debido a que funciona con radiación no ionizante, es portable, de bajo costo, y tiene una naturaleza no invasiva. Estas características hacen que el ultrasonido sea ampliamente aplicado en diversas instancias a nivel clínico, incluyendo consultas en comunidades aisladas y/o rurales. Además, la aplicación de radiación no ionizante convierte al ultrasonido en una técnica sumamente segura para el cuerpo, al no producir mutaciones celulares. Estas propiedades ubican al ultrasonido como una preferencia en todo el mundo a la hora de realizar diagnósticos, pronósticos, monitoreo y tratamientos médicos (Couture et al., 2018). Las imágenes ultrasónicas convencionales se denominan “B-mode”, estas consisten en un mapa bidimensional de brillo o intensidad con la que un órgano o tejido responde a una perturbación ultrasónica. En la Figura 1 A se puede observar un ejemplo de imagen B-mode del corte de cuatro cavidades (Figura 1 B corte c), de un corazón humano, en el que se pueden ver las distintas estructuras que lo conforman (ventrículos, aurículas y válvulas).

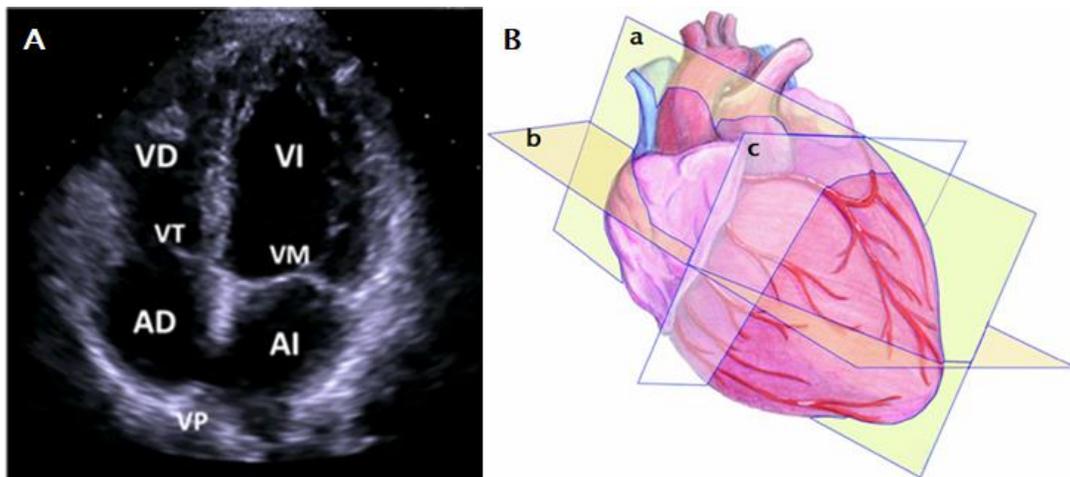


Figura 1. A: Ecocardiograma plano de corte de cuatro cavidades. VD: ventrículo derecho. VI: ventrículo izquierdo VT: Válvula tricúspide. VM: Válvula mitral. AD: Aurícula derecha. AI: aurícula izquierda. VP: Vena pulmonar (García Fernández MA et al., s. f.). Figura 1. B: Cortes ecocardiográficos del corazón. a: Cortes longitudinales del ventrículo izquierdo. b: Cortes transversales. c: Cortes de cuatro cavidades.

Herramientas para la obtención de imágenes ultrasónicas: Para la obtención de imágenes ultrasónicas se debe utilizar, un transductor ultrasónico que funciona como emisor y receptor de ondas de ultrasonido. Este transductor está formado por un arreglo lineal de elementos piezoeléctricos que a partir de una señal eléctrica genera vibraciones. A su vez los elementos piezoeléctricos, al recibir el eco de la onda enviada reaccionan generando una señal eléctrica, todo esto acoplado a un escáner ultrasónico, encargado de producir y controlar esta señal. A partir del registro de dicho eco es posible reconstruir la imagen ultrasónica calculando la profundidad a la que se encuentra cada elemento del tejido u órgano que refleja el ultrasonido, utilizando la velocidad de propagación de la onda en el medio, y el tiempo entre la emisión del ultrasonido y la recepción del eco. Sin embargo, la reconstrucción de la imagen a partir de este cálculo depende de la homogeneidad del medio, donde, si el medio no es suficientemente homogéneo, la propagación de los ecos de la onda en el tejido se vuelve incoherente, propagándose en direcciones aleatorias, y haciendo imposible identificar la procedencia de la onda recibida por el transductor. Esto en seres vivos y específicamente en seres humanos no es un problema debido a que el tejido y los órganos del cuerpo humano son suficientemente homogéneos para que la onda se propague coherentemente (Fernández Domínguez et al., 2012).

Resolución espacial imágenes ultrasónicas convencionales: Las imágenes B-mode cuentan con una resolución de hasta 200 micras. El límite de resolución se define como la distancia mínima entre dos objetos para ser detectados como diferentes (Δr). Esta resolución viene dada fundamentalmente por la ecuación (1) (Ilovitsh et al., 2018) que define la proporcionalidad del límite de difracción de la onda con los parámetros descritos en dicha ecuación:

$$\Delta r \propto \frac{\lambda z}{D} = \frac{C z}{D f}. \quad (1)$$

Donde, λ es la longitud de la onda ultrasónica y se calcula como C/f , C es la velocidad de propagación del sonido en el medio, que normalmente se toma como constante, y f es la frecuencia de la onda emitida, z corresponde al foco de la onda el cual varía con la propagación de la onda y D corresponde a la apertura del transductor dada por el ancho del arreglo de piezoeléctricos (Szabo, 2004). En la ecuación (1), se puede ver que, al aumentar la frecuencia,

y/o aumentar la apertura, la resolución con la que se ven los tejidos u órganos mejora. Sin embargo, el aumento de la frecuencia provoca una disminución en la penetración de la onda (Halliwell, 2000), lo que hace que si se aumenta demasiado llegará un punto en el que solo se alcanza a ver la superficie del tejido. A la hora de aumentar la apertura existen 2 formas, una es aumentar la separación entre los elementos del transductor y otra es agregar más piezoeléctricos a la matriz lineal manteniendo la separación entre ellos. Para el primer caso de aumentar la separación se produce lo llamado "lóbulos secundarios", los que surgen del reflejo de la energía de ultrasonido al estar fuera del eje del haz principal (Baad et al., 2017) generando pérdidas de contraste. Para el segundo caso el aumentar la cantidad de elementos en la matriz del transductor se requiere de un escáner sumamente potente y un cable muy ancho ya que cada elemento está conectado físicamente al escáner, esto se traduce en un costo monetario computacional y tecnológico muy alto. Típicamente los transductores clínicos poseen del orden de 128 elementos.

Aplicaciones de las imágenes ultrasónicas B-mode: La resolución de estas imágenes junto con las características únicas del ultrasonido, han permitido que se considere como una modalidad clave para el diagnóstico y tratamiento de algunos casos de cálculos renales (Kamath & Umesh Nayak, 2014), diagnóstico en el hígado de esteatosis, hepatopatía crónica y cirrosis (Segura Grau et al., 2016), diagnóstico y tratamiento de cálculos en la vesícula biliar (Kamath & Umesh Nayak, 2014), el diagnóstico en el útero de adenomatosis (Fedele et al., 1992) y cáncer (Alcázar et al., 2014), diagnóstico y pronóstico de cáncer mama, pronóstico de cáncer de próstata (Salirrosas et al., 2005), diagnóstico de prostatitis, y pronóstico en pulmones de presencia de edema intersticial, derrame pleural, neumonía y neumotórax. Su utilización más reconocida se da durante la gestación, debido a que las imágenes ultrasónicas son una técnica segura para el feto y da la posibilidad de ver en tiempo real el desarrollo fetal. El monitoreo del desarrollo de un embarazo a partir del ultrasonido, está tan generalizado que en Chile se solicita realizar al menos 3 ecografías durante el embarazo desde las 12 semanas de gestación (*Controles prenatales / Chile Crece Contigo*, s. f.; González G et al., 2003; Pinedo et al., 1994). Esto ayuda al pronóstico y diagnóstico de muchas enfermedades prenatales de forma activa, debido al monitoreo

constante del desarrollo embrionario. pudiendo detectar, mal formaciones, ubicación del bebé, en caso de que este mal posicionado para el parto, e incluso problemas en el desarrollo o falta de órganos como lo es la anencefalia (Bonilla–Musoles et al., 2013). El diagnóstico temprano de problemas prenatales da tiempo a los doctores de abordar la situación, pensar en un plan de acción y dar conocimiento a la madre de la situación en la que se encuentra, salvando miles de vidas en todo el mundo.

A pesar de la utilidad de las imágenes ultrasónicas convencionales, las imágenes B-mode solo son capaces de entregar información anatómica y no funcional de los órganos, esto porque la imagen convencional es una traducción de la intensidad de la reflexión de la onda ultrasónica en brillo, mostrando características del órgano y potenciales heridas en caso de que no sean demasiado pequeñas. Las imágenes convencionales no son capaces de ver estructuras más pequeños que 200 micrómetros (Errico et al., 2015; Lin et al., 2017) debido al límite en la resolución espacial de las imágenes ultrasónicas explicado con la ecuación (1).

Imágenes ultrasónica Doppler: Las imágenes de ultrasonido cuentan con otras modalidades enfocadas en la obtención de información distinta a la anatómica (cuantitativa), dos de estas son la elastografía, capaz de mapear la rigidez del tejido (Gennisson et al., 2013), y las imágenes de ultrasonido Doppler, capaces de obtener la velocidad del flujo sanguíneo en un órgano y sus vasos (Paola Paolinelli, 2013). La obtención de datos para elastografía puede basarse en distintos métodos, estos son, con ondas de corte, empuje mecánico, elastografía transitoria, enfocada en rayos acústicos, impulso de fuerza de radiación acústica (ARFI) y las imágenes de onda de corte supersónica (SSI) (Gennisson et al., 2013; Jeong et al., 2014). En cuanto a las imágenes de ultrasonido Doppler, miden la velocidad del flujo sanguíneo a partir de los glóbulos rojos, los que actúan como pequeños espejos en movimiento durante la medida. El efecto Doppler ocurre 2 veces durante su implementación ultrasónica, una en la recepción de los glóbulos rojos y la segunda en la recepción del transductor ultrasónico. En la Figura 2 se puede ver como la onda ultrasónica viaja desde el transductor, e incide en los glóbulos rojos, estos al estar en movimiento perciben una frecuencia menor si se están alejando del transductor y mayor si se están acercando

a él (Halliwell, 2000; Kripfgans et al., 2006). Este efecto da como resultado una variación en la frecuencia del eco emitido por la sangre y es gracias a él que es posible calcular la velocidad con Doppler. La relación descrita se ve plasmada en la ecuación (2) vista a continuación (Paola Paolinelli, 2013):

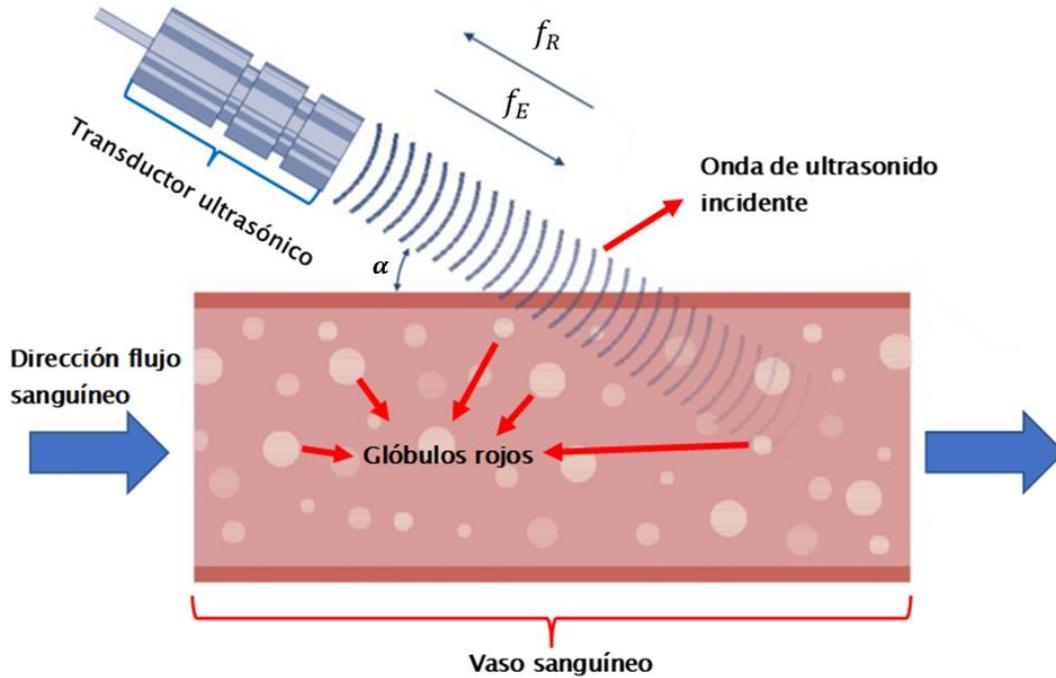


Figura 2: Imagen esquemática del comportamiento del efecto Doppler en ultrasonido donde se ilustra el comportamiento de la onda al rebotar en el flujo sanguíneo y volver con otra frecuencia. f_E : Frecuencia emitida. f_R : Frecuencia reflejada (Web, s. f.)

$$\Delta f = \frac{2 f_E V \cos \alpha}{C}. \quad (2)$$

En la ecuación (2) Δf corresponde al corrimiento en frecuencia entre la onda recibida y la emitida, es decir $\Delta f = f_R - f_E$. El factor 2 viene dada debido a que, durante el proceso, el efecto Doppler se produce 2 veces, f_E corresponde a la frecuencia emitida, V representa la velocidad de los glóbulos rojos en el flujo sanguíneo, C se toma como una constante igual a 1540 m/s, que es una velocidad promedio de propagación del sonido en el cuerpo humano, y α que corresponde al ángulo de emisión del transductor ultrasónico. El ángulo α se encuentra normalmente entre

0° y 60° ya que en ángulos mayores el cálculo está sujeto a errores de hasta el 50% (Paola Paolinelli, 2013).

Aplicaciones de imágenes ultrasónicas Doppler: Comúnmente los datos Doppler se superponen en la imagen B-mode como se ve en la Figura 3, donde se observa la velocidad del flujo sanguíneo durante el bombeo de un corazón in-vivo, para contar con la información anatómica y funcional en conjunto. Las imágenes ultrasónicas basadas en el efecto Doppler son cruciales en la clínica ya que ayudan a diagnosticar enfermedades de cáncer en el hígado y el páncreas a partir del estudio del comportamiento de la red vascular en dichas zonas. También es capaz de detectar algunas enfermedades durante la gestación fetal a partir del estudio del flujo sanguíneo en el cordón umbilical como la inserción velamentosa (Nomiya et al., 1998), monitoreo de derrames internos ya sea por ataques cerebrovasculares o golpes, diagnóstico y detección de coágulos en el sistema circulatorio de un área focalizada para su tratamiento, el diagnóstico de enfermedades pericárdicas (Chandraratna, 1991) y de evaluar el daño cardiológico luego de ataques. Hoy en día la masificación a lo largo de todo el mundo ha significado una adición importante en la mejora de la salud de las personas en general y una herramienta cuantitativa utilizada activamente para apoyar en la clínica.

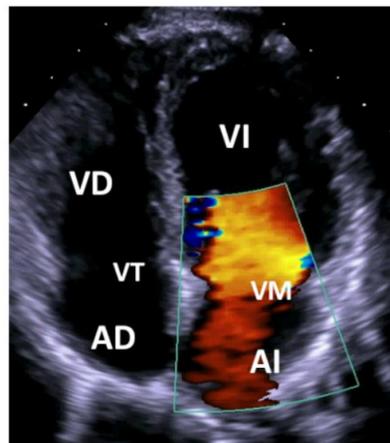


Figura 3: Doppler color superpuesto en B-mode en el plano de cuatro cámaras, donde, en Doppler la paleta de colores va desde azul a rojo, siendo azul una dirección contraria al transductor, y rojo hacia el transductor. VD: Ventrículo derecho. VI: Ventrículo izquierdo VT: Válvula tricúspide. VM: Válvula mitral. AD: Aurícula derecha. AI: Aurícula izquierda. VP: Vena pulmonar (García Fernández MA et al., s. f.).

Limitaciones de las imágenes ultrasónicas Doppler: Para comprender las limitaciones y hasta qué punto pueden ser utilizadas las ecografías Doppler, es necesario revisar sus problemas. Dentro de estos se encuentra el “aliasing”, que ocurre cuando la frecuencia de muestreo o la frecuencia con la que se mide la variación de un evento no es suficiente para caracterizar su frecuencia, lo que implica en algunos casos visualizar un comportamiento distinto al real. Un ejemplo práctico de este fenómeno es lo que se da cuando una rueda gira a cierta velocidad y aparentemente comienza a girar en dirección contraria, este mismo efecto ocurre en la ecografía Doppler y se da cuando el flujo es demasiado rápido. Otro problema es la sensibilidad con la que identifica si algo está en movimiento o no, esto debido a que si la sensibilidad es demasiado alta los movimientos por palpitations o respiratorios del paciente podrían perjudicar la calidad de la imagen, mientras que si la sensibilidad es muy baja podría no detectarse el flujo sanguíneo (Oglat et al., 2018). En cuanto a problemas con el nivel de resolución, esta está sujeta a la ecuación (1), misma que restringe las imágenes convencionales, obteniendo una resolución de hasta 200 micrómetros. Finalmente, la velocidad máxima y mínima que las ecografías Doppler pueden detectar, dependen de la frecuencia de muestreo o cuadros por segundo que es capaz de obtener el escáner y de la resolución. En la ecuación (3) se ve una estimación de la velocidad máxima que puede existir entre 2 píxeles para ser detectada:

$$V_{max} = \Delta r f_n . \quad (3)$$

En la ecuación (3) Δr representa la mínima distancia de resolución alcanzada con el muestreo de imágenes convencionales (200 micrómetros), f_n representa la frecuencia de Nyquist. esta frecuencia define la mínima cantidad de puntos por oscilación necesarias para obtener la frecuencia de una onda, y es igual a la mitad de la frecuencia de muestreo ($F_s/2$). De la ecuación (3) se infiere que si se aumenta la frecuencia de muestreo la velocidad máxima que se puede observar también aumenta, y es por esto que en fenómenos de velocidades muy altas es necesario utilizar un escáner ultrarrápido. Por otro lado, según esta ecuación, aumentar la distancia de resolución también sería válido para detectar velocidades mayores, pero esto solo

sería útil en vasos lo suficientemente grandes para contener el tamaño total de la resolución usada:

$$V_{min} = \Delta r f_{min} = \Delta r \frac{Fs}{N}. \quad (4)$$

En la ecuación (4) se ve como calcular la estimación de la mínima velocidad que se pueden detectar en imágenes ultrasónicas Doppler, f_{min} representa la frecuencia mínima entre una imagen Doppler y otra, y esta dada por la igualdad $f_{min} = Fs/N$, en la que N representa la cantidad de muestras o cuadros para fabricar una imagen ultrasónica Doppler. De la ecuación (4) se puede inferir que es posible detectar velocidades menores con una mejor resolución y/o utilizando una frecuencia de imágenes Doppler menor, ya que el contar con un mayor tiempo entre muestras Doppler, es posible detectar eventos que tardan más en cambiar su frecuencia, lo que ayuda a observar velocidades menores. Es posible estimar la velocidad máxima y mínima del flujo sanguíneo que puede detectar un escáner ultrasónico utilizando las ecuaciones (3) y (4) respectivamente. Para esto se utilizan datos reales con los que pueden trabajar las herramientas, definiendo “Fs” como 1000 cuadros por segundo, valor comúnmente utilizado en escáner ultrarrápidos, “N” con 50 cuadros y “ Δr ” igual a 200 micrones que corresponde a la mínima resolución obtenida en imágenes convencionales B-mode. Se utilizan los datos mencionados y se obtiene:

$$V_{max} = 100 \left[\frac{mm}{s} \right]$$
$$V_{min} = 4 \left[\frac{mm}{s} \right].$$

Técnicas de obtención de imágenes de súper resolución: El éxito clínico de las imágenes ultrasónicas motiva a mejorar la resolución espacial, intentando superar el límite de difracción de la onda a partir de distintas técnicas ultrasónicas, las que en general son denominadas, imágenes de súper resolución ultrasónica. Dentro de estas se encuentra el método de descomposición del operador de inversión de tiempo (DORT) (Prada et al., 1996), que busca

realizar un enfoque selectivo de los elementos dispersores de un medio que no varían con el tiempo utilizando el vector propio que define su ubicación, pero debido a la naturaleza de los órganos humanos, no es aplicable en clínica (Couture et al., 2018). También está la imagen ultrasónica con súper armónicos (Dayton & Rychak, 2007), que depende de la utilización de 2 transductores ultrasónicos, y aprovecha los terceros o quintos armónicos que aparecen debido a la reacción del ultrasonido con agentes de contraste como microburbujas o “MMBB” (Couture et al., 2018; Opacic et al., 2017). Aunque estos métodos mejoran la resolución, no son capaces de superar por mucho el límite de difracción de la onda presentado en la ecuación (1). Sin embargo, recientemente se ha propuesto el método “Ultrasound Localization Microscopy” (ULM) que ha tomado fuerza debido al nivel de resolución que este es capaz de alcanzar, de hasta 5 micrómetros, superando el límite de la difracción de la onda por un factor de casi 10 veces con respecto a las imágenes ultrasónicas convencionales. Este revolucionario método consiste en la perfusión o introducción controlada de líquido al torrente sanguíneo con microburbujas en bajas concentraciones. Las microburbujas actúan como pequeños espejos debido a la reflectancia de estas. Gracias a esta característica es posible localizarlas de forma aislada y ubicar sus centros. Para localizarlas se toman imágenes a alta velocidad (>100 cuadros por segundo), acumulando las locaciones particulares de MMBB que se encuentran a una distancia suficiente para ser definidas como elementos separados o “diferenciables”. Así, a partir de la suma de todas estas capturas ubicando los centros, en distintas locaciones, se mejora considerablemente la resolución espacial de la imagen final (Couture et al., 2018; Errico et al., 2015; Lin et al., 2017). Las MMBB son burbujas de gas hexafluoruro de azufre recubiertas de una monocapa fosfolipídica de diámetro entre 0.5 y 10 micrómetros y son reconocidas como el método de contraste para el ultrasonido más seguras para el cuerpo humano, aprobado por la empresa gubernamental de Estados Unidos de “Administración de Alimentos y Medicamentos” (FDA) (Chong et al., 2018). El método ULM es una propuesta reciente basada en la microscopia de localización por fotoactividad de fluorescencia, método que aprovecha los intermitencia de fuentes fluorescentes específicas para separarlas en eventos independientes por zonas de estudio (Betzig et al., 2006; Hell & Wichmann, 1994) y que otorgó el novel de química en el año 2014 a su creador. Es así como se

propone el alter ego acústico ULM, capaz de lograr un nivel de resolución espacial de la red vascular de un órgano nunca vista. En la Figura 4 se pueden observar 2 imágenes de un riñón de roedor donde la imagen A corresponde al B-mode convencional, en el que apenas se nota la forma del órgano debido a su tamaño de algunos milímetros. La imagen B corresponde a una imagen ULM donde se puede ver claramente el árbol vascular y se lograron observar vasos con una resolución de hasta 5 micrómetros, superando por un amplio margen la resolución de las imágenes convencionales.

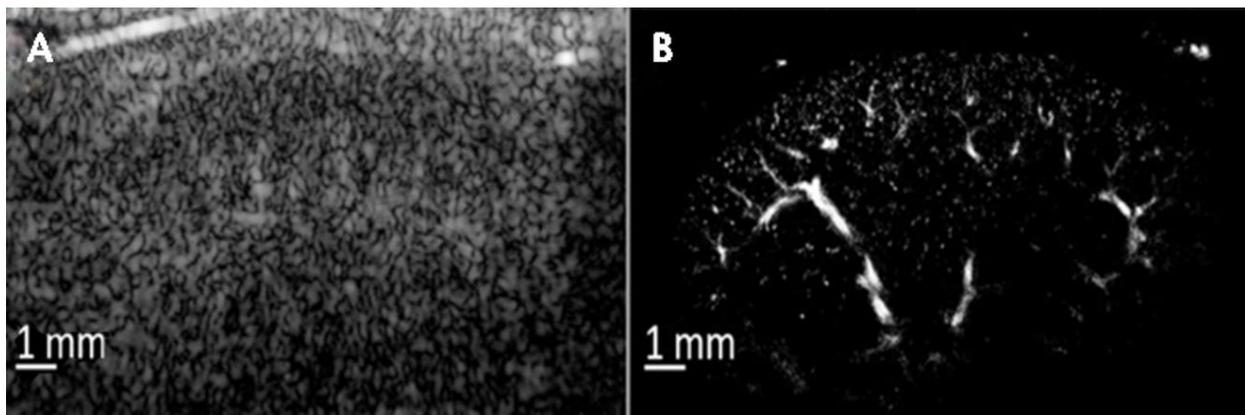


Figura 4: Microscopía ULM súper armónicos con corrección de movimiento en un riñón de roedor. A: B-mode del riñón utilizado como referencia para la corrección de movimiento. B: Imagen ULM generada a partir de 25.000 fotogramas con corrección de movimiento (Kierski et al., 2020)

Proyecciones de aplicaciones futuras del método ULM: El método de obtención de imágenes ultrasónicas de súper resolución actualmente se encuentra en fase de estudio y, por lo tanto, aún no cuenta con aplicaciones médicas formales. Aun así, su potencial es alentador con posibles aplicaciones de gran importancia clínica y científica debido al nivel de resolución que se puede alcanzar en medios opacos. Un claro ejemplo es el mostrado en la Figura 5 correspondiente al estudio de cáncer de sarcoma en roedores, donde se alcanzó una resolución de hasta 20 micrómetros (Lin et al., 2017). En el artículo se mencionan las formas en las que se puede detectar el cáncer en etapas tempranas a partir de la tortuosidad de la red vascular formada en las proximidades de las células cancerosas. Esta información se puede extrapolar a seres humanos ayudando activamente a la temprana detección de enfermedades de esta índole.

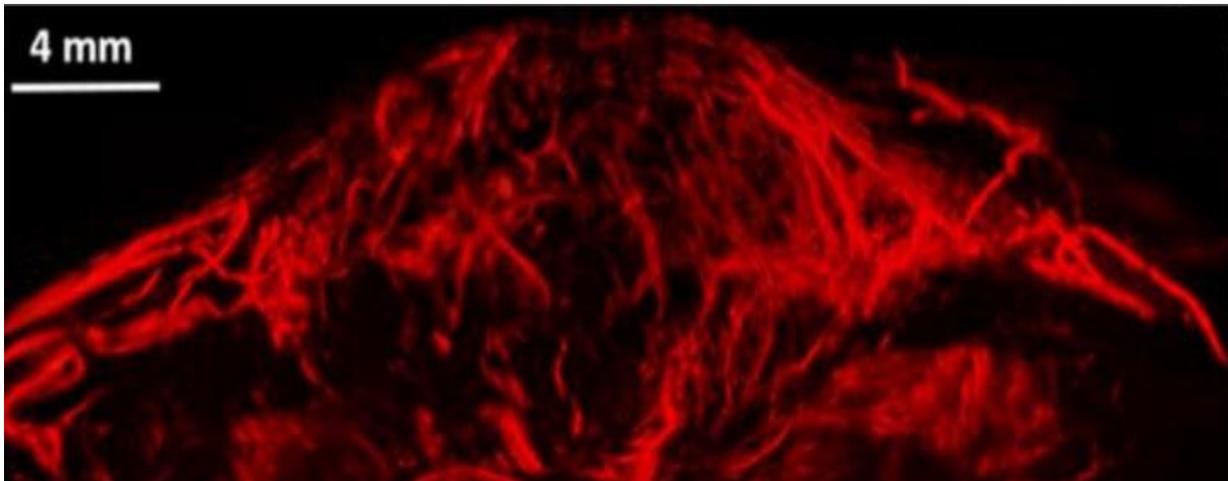


Figura 5: Imagen de la microvasculatura de un cáncer sarcoma de rata con una escala de vasos sanguíneos visibles de hasta 20 micrómetros (Lin et al., 2017)

Otro caso interesante es el estudio del funcionamiento cerebral a una alta resolución, esto debido a que la actividad cerebral tiene una directa relación con la actividad vascular. Las zonas con un mayor funcionamiento necesitan una mayor oxigenación y por ende un flujo sanguíneo mayor. En la Figura 6 A se observa una imagen ULM de un cerebro de roedor con corrección de movimiento, en esta se pueden ver claramente las ramificaciones de la red vascular a partir del flujo sanguíneo. También en la Figura 6 B, se pueden ver las direcciones del flujo, lo que ayuda a identificar si un vaso se trata de una vena o una arteria. Aplicar esto en seres humanos significaría la posibilidad de monitorear la respuesta cerebro vascular con alta especificidad, incorporando las direcciones del flujo y la velocidad de este. El estudio de esta respuesta de forma no invasiva consta de un potencial en el estudio de la respuesta neurológica del sistema humano a un nivel de especificidad que es imposible de alcanzar con otros métodos de obtención de imágenes. Así mismo, es posible homologar este potencial al resto de órganos dentro del organismo, obteniendo la posibilidad de observar las distintas estructuras que se dan dentro de ellos con una escala que, al no existir antes, podría dar acceso a nuevos tipos de diagnósticos tratamientos y monitoreo de actividades vasculares desconocidas en la actualidad. Es por esto por lo que distintos grupos multidisciplinarios buscan apresurar a traslación clínica de esta técnica ayudando a encontrar solución a las distintas problemáticas de esta.

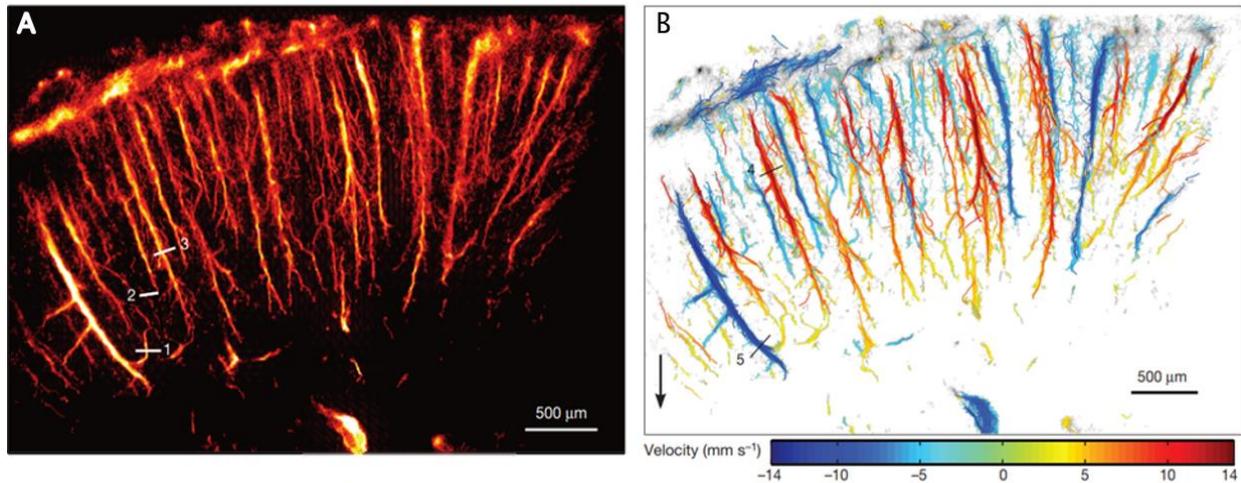


Figura 6: A: Imagen de súper resolución con corrección de movimiento de un cerebro de roedor. B: Correlaciones de súper resolución con direcciones de velocidad usando colores Doppler que indican la dirección.

Funcionamiento del método de obtención de imágenes ULM: Para lograr el funcionamiento del método ULM no solo se necesita de las microburbujas (que dan la posibilidad de evadir la barrera de difracción de la onda) sino que la existencia de un escáner ultrasónico programable de alta velocidad. Los nuevos scanner de alta velocidad han pasado de una cantidad máxima de cuadros por segundo de 50 a 20000, manteniendo en promedio una recepción de más de 1000 imágenes por segundo en un campo de visión grade (Tanter & Fink, 2014). Esto ha abierto las puertas al estudio de fenómenos que ocurren a alta velocidad en el cuerpo humano que antes eran incapaces de notar. Las MMBB entregan un alto contraste y se pueden localizar gracias a la capacidad de las ondas ultrasónicas de no perder coherencia incluso en medios con aberraciones (Sun & Hynynen, 1998), múltiples puntos (Tourin et al., 1999) y no lineales (Couture et al., 2008). La adquisición a alta velocidad es un factor importante debido a la sensibilidad de las imágenes al movimiento, donde incluso las pulsaciones del corazón podría arruinar la imagen si no se corrige el movimiento (Couture et al., 2018). La detección puede mejorar aún más si se toma en cuenta el factor de respuesta no lineal de las MMBB (Mulvana et al., 2017).

Problemas del método ULM: El factor más importante a la hora de generar imágenes ULM no es encontrar las microburbujas sino lograr que se diferencien entre ellas durante su recorrido por la red vascular de la zona estudiada. Es debido a esta necesidad que es tan importante la concentración de microburbujas, ya que, si la concentración es alta, estas tienden a aglomerarse dificultando diferenciar si se trata de una o más, empeorando la resolución final. Este problema si bien se soluciona disminuyendo la concentración de MMBB, es necesario definir un límite inferior en esta. Las MMBB en bajas concentraciones permiten la diferenciación entre partículas en un medio y no disminuyen demasiado la penetración de la onda ultrasónica, pero si es demasiado baja, estas no son capaces de recorrer la totalidad de la red vascular durante el tiempo de muestreo, mostrando una red vascular incompleta (Couture et al., 2018; Opacic et al., 2017). Acentuando la necesidad de definir la concentración óptima a utilizar durante la implementación del método ULM. Este tipo de problemas varían dependiendo del organismo o fase de investigación en la que se encuentre el modelo, mostrando una clara falta de robustez en el método, donde es necesario ajustar todos los parámetros ad-hoc, mediante ensayo y error, produciendo demasiada incerteza sobre la imagen final. De esta forma muchos de las investigaciones actuales responden a encontrar y optimizar de manera automática estos parámetros.

Para realizar avances que respondan a los problemas planteados, se usa un método de investigación que consta de una cadena de experimentos, los que siguen el orden de, simulación, in-vitro, ex-vivo para animales pequeños, in-vivo para animales pequeños, ex-vivo para animales grandes o medianos, in-vivo para animales grandes o medianos y pruebas en humanos. Esta cadena se realiza de forma iterativa cada vez que se identifica un error en un eslabón superior lo que lo transforma en un sistema que requiere de años de prueba y error. Para adelantar este proceso es que se propone la utilización de placenta humana ex-vivo, la que comúnmente es un órgano humano de desecho. Utilizar la placenta humana ex-vivo para el estudio del método ULM podría saltar algunos pasos de la metodología de investigación acercándose directamente a las características fisiológicas y mecánicas del cuerpo humano. La placenta cuenta con una red vascular compleja y ramificada a partir de la cual se podrían

responder algunos de los problemas actuales de la técnica ULM. Para lograr utilizar la placenta como medio de estudio ex-vivo, es necesaria una cámara de perfusión adaptada para el estudio ultrasónico de la misma. La cámara de perfusión en general consiste en un espacio en el que se dan las condiciones necesarias para realizar la perfusión de un órgano, que se refiere a inyectar de forma controlada un flujo dentro de los vasos sanguíneos. En esta se intenta hacer funcionar la red completa de la placenta para poder observarla el movimiento y el comportamiento del fluido perfundido en esta. Para lograr observarlo, esta cámara debe contar con características específicas para la aplicación del ultrasonido, como la eliminación de gases atmosféricos dentro de esta, para no interrumpir la propagación de la onda ultrasónica. Un espacio en el que no exista intercambio de sales de la placenta con el medio y que dé acceso al órgano en cuestión para las herramientas utilizadas en ultrasonografías.

En esta tesis se presenta el diseño y fabricación de una Cámara de perfusión optimizada para las necesidades del análisis ultrasónico de placenta humana ex-vivo, en la que se estudió su funcionamiento a partir de la formación de imágenes Doppler, para su posterior aplicación en la fabricación de imágenes de súper resolución de placenta humana ex-vivo.

Hipótesis

La metodología de investigación para la traslación clínica de la técnica ultrasónica ULM, requiere de una cadena de experimentos iterativos, lo que es un proceso que requiere en general años de experimentación antes de llegar a pruebas en humanos. El estudio de este método de obtención de imágenes ultrasónicas utilizando placenta humana ex-vivo, es un complemento a la metodología de investigación convencional que acelera el proceso debido que se enfrenta a un órgano humano con sus distintas características específicas, lo que podría dar respuesta a algunos de los problemas actuales de la modalidad ULM. Se sabe que la placenta, tiene una red vascular compleja con múltiples ramificaciones, y conserva propiedades físicas y mecánicas luego del alumbramiento, lo que la convierte en un sujeto de estudio ex-vivo sumamente funcional. Para realizar el estudio ex-vivo de este órgano, se requiere de una cámara de perfusión adaptada a la implementación de técnicas ultrasónicas. Por ello se hipotetiza que es posible la visualización de la red vascular del órgano, y la cuantificación de los flujos sobre este utilizando una cámara de perfusión para placenta humana ex-vivo, desarrollada para ser compatible con el uso de técnicas ultrasónicas.

Objetivo general

Se busca obtener imágenes estructurales y cuantitativas de placenta humana ex-vivo a partir de una cámara de perfusión para placenta humana ex-vivo, desarrollada para ser compatible con la implementación de técnicas ultrasónicas y para la obtención de imágenes ULM, que cuente con un fácil montaje y reparación, que aseguren su disponibilidad en la investigación.

Objetivos específicos

- **Objetivo específico N°1; Diseñar una cámara de perfusión para placenta humana ex-vivo compatible con adquisición de imágenes ultrasónicas:** Se diseña una cámara de perfusión a partir de los requerimientos para la preparación y perfusión placentaria, así como de la implementación para mediciones ultrasónicas.
- **Objetivo específico N°2; Fabricar la cámara de perfusión:** se fabrican las piezas para el montaje de una cámara modular desarmable con una etapa de “CNC” laser y otra manual de taladrado, fabricación de hilos, rectificado, adaptación de piezas prefabricadas y ensamblaje.
- **Objetivo específico N°3; Probar características de funcionalidad fundamentales:** Se implementan dos experimentos, el primero consiste en una prueba de permeabilidad interna y el segundo consiste una prueba de flujo y sistema de fijación.
- **Objetivo específico N°4; Desarrollar imágenes ultrasónicas estructurales y cuantitativas de placenta humana ex-vivo:** Se implementa en un ámbito de investigación con placenta humana ex-vivo y se utiliza como parte de un montaje experimental para la obtención de datos ultrasónicos de esta.

Marco teórico

Anatomía de la placenta

La placenta es un órgano temporal desarrollado en el útero durante el embarazo, realiza funciones vitales para el feto durante todo el embarazo. Esta se forma aproximadamente después de una semana de haberse implantado el embrión en el útero y contiene la misma información genética que el feto (Huppertz, 2008). Al mismo tiempo, las alteraciones de su funcionamiento pueden causar problemas durante el embarazo (Perez Sanchez & Donoso Siña, 2011). Debido a esto se han realizado estudios funcionales del comportamiento de la placenta en distintos animales con sustancias nocivas.

En los mamíferos existen distintos tipos de placenta, donde según la clasificación por forma y puntos de contacto se dividen en cuatro tipos, vistos en la Figura 7. La placenta difusa se caracteriza por contar con puntos de contacto materno fetal distribuidos a través de toda la estructura placentaria, y se conoce por pertenecer a porcinos, equinos, camélidos y cetáceos (Roa et al., 2012). La placenta cotiledonaria cuenta con puntos de contacto más definidos que el tipo anterior, llamados cotiledones (Perez Sanchez & Donoso Siña, 2011), y se encuentra en ovinos y bovinos (Roa et al., 2012). La placenta discoidal cuenta con puntos de contacto definidos, pero en forma de discos, con los que se realiza el intercambio de nutrientes y es propia de seres humanos y roedores (Perez Sanchez & Donoso Siña, 2011). La placenta zonaria, como se observa en la Figura 7, cuenta con puntos de contacto parecidos a un anillo, y esta se da en perros y gatos (Roa et al., 2012).

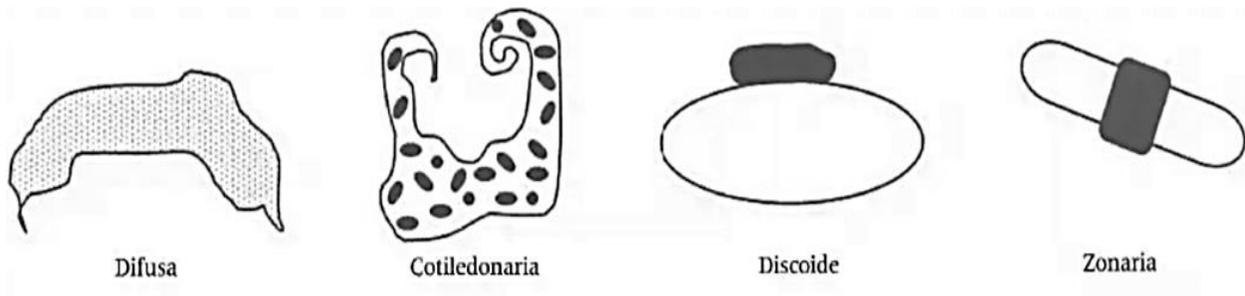


Figura 7: Tipos de placenta según forma y tipo de conexión materno-fetal (separación morfológica) (Perez Sanchez & Donoso Siña, 2011).

Otra forma de clasificar las placentas es a partir del número de barreras que funcionan como mediadoras entre la sangre materna y fetal. En la Figura 8 se observan las distintas capas y elementos que conforman tanto la zona materna como la zona fetal, mostrando los tipos de células (endoteliales y epiteliales) y el tipo de tejido del órgano.

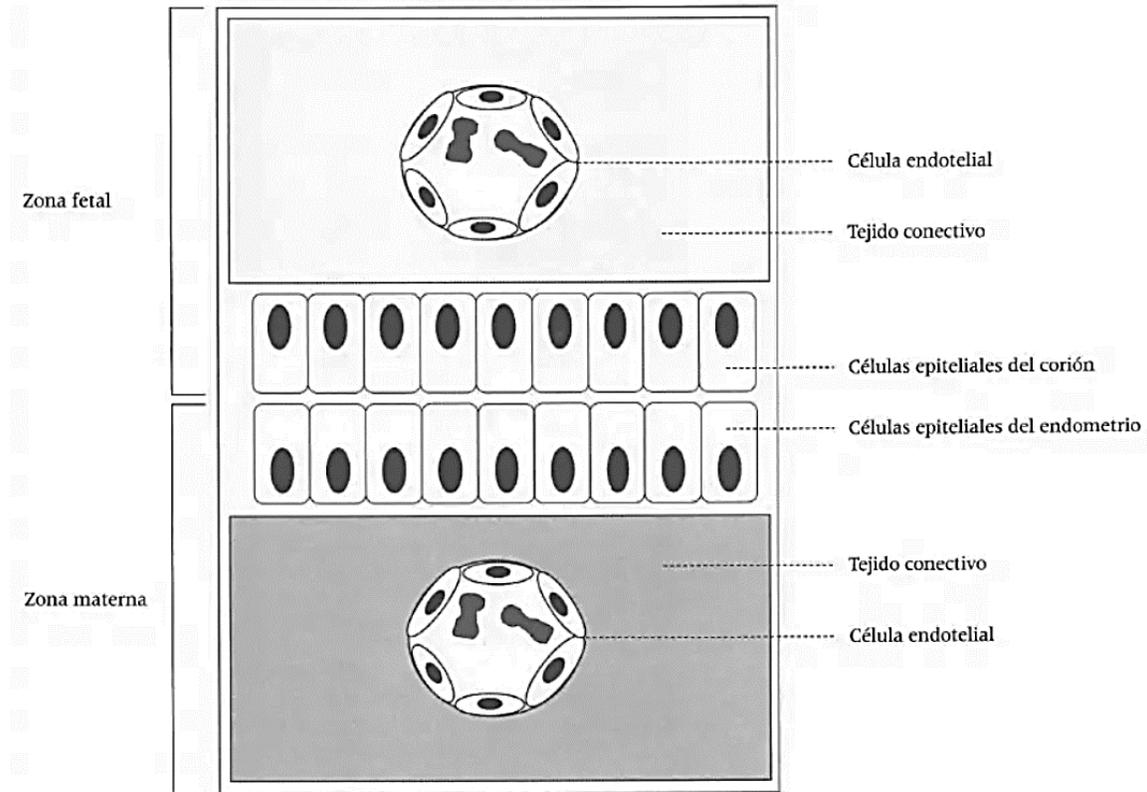


Figura 8: Zonas a partir de las cuales, se da la clasificación histológica de la placenta, que se caracteriza por depender del número de barreras que se interponen entre la sangre fetal y la materna.

Mientras tanto, en la Figura 9 se observan las conformaciones que diferencian un tipo de placenta de otra. En esta figura, en la imagen "A", se observa una placenta epiteliocorial, perteneciente a caballos rumiantes y cerdos. Mientras, en la imagen "B" de la Figura 9, se observa una placenta del tipo endoteliocorial, que pertenece a perros y gatos. Por último, en la placenta hemocorial, que se ve representada en la imagen "C" de la Figura 9, no existe barrera materna, mientras que, de las barreras de la zona fetal, después de las 20 semanas de gestación, solo quedan el endotelio y un trofoblasto reducido. Este tipo de placenta pertenece a humanos y ratas, donde la diferencia radica en que para el caso de las ratas existen las vellosidades (protuberancias

con el mismo material genético que el feto) unidas entre sí, en cambio, para los humanos estas vellosidades son diferentes ya que no se encuentran unidas entre sí.

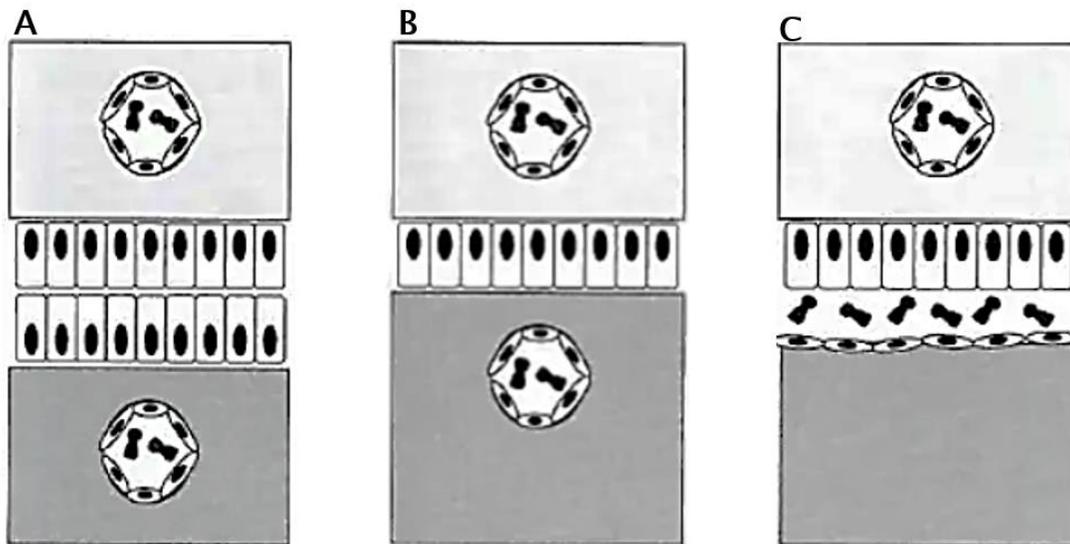


Figura 9: Distribución de los tipos de placenta. A: Epiteliocorial. B: Endoteliocorial. C: Hemocorial.

La misión principal de la placenta es la trasmisión de nutrientes desde la madre hacia el bebé en formación. En la Figura 8 se muestra una separación entre la zona materna y fetal del órgano, mientras que en la Figura 9 se observan las variaciones entre las distintas barreras entre ambas zonas, pudiendo ver en la Figura 9 C el tipo de placenta correspondiente al ser humano. En la Figura 10 en las imágenes A y B se observa la zona materna y fetal respectivamente, donde para la imagen A se identifican las separaciones entre los cotiledones de la placenta, zonas donde el flujo vascular es mayor para realizar distintos intercambios de sustancias entre la madre y el hijo. En la imagen B, el flujo sanguíneo del bebé se conecta a la placenta por medio del cordón umbilical, hacia la placenta, zona que se encuentra sumamente ramificada y es la encargada de recibir las sustancias que entrega la zona materna (Huppertz, 2008). La sangre materna jamás entra en contacto con la sangre fetal y ambas pertenecen a organismos diferentes no necesariamente son compatibles. El flujo sanguíneo en dirección al útero es de 500–700 ml por minuto durante el embarazo (Wang, 2010). La placenta realiza funciones correspondientes a distintos órganos que, durante la gestación, no pueden ser realizados por los órganos propios del bebé (Morgan-Ortiz et al., 2015). El suministro de sangre rica en oxígeno, nutrientes y

hormonas a la zona materna de la placenta se transmite a la sangre del sistema circulatorio fetal. Realizando también la función de traspasar el anhídrido carbónico desde el bebé hacia la madre, siendo esta última capaz de desecharlo a través de los riñones. La placenta cumple funciones de filtro, al dejar pasar solo algunos tipos de sustancias, en general pequeñas, sin permitir el paso de sangre. También, regula funciones endocrinas, como la síntesis de la hormona gonadotropina coriónica, responsable de los síntomas del embarazo y el estrógeno u hormonas sexuales de tipo femenino para el desarrollo de mamas y lactógeno placentario (necesario en etapas de lactancia).

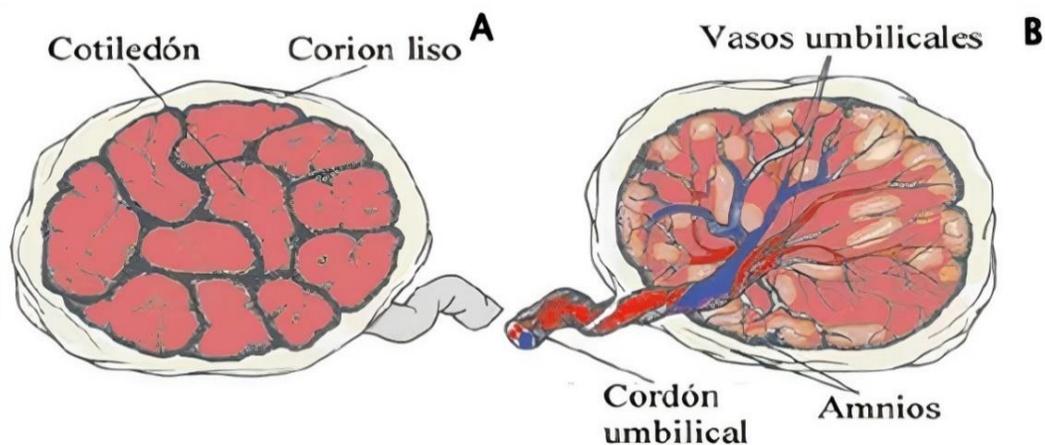


Figura 10: Anatomía general placenta humana. A: Zona materna. B: Zona fetal. Imagen extraída de "slideshare"

El feto se conecta a la placenta a partir del cordón umbilical, al observar la Figura 11 A se notan distintas estructuras que la conforman, donde destacan la gelatina de Wharton, las dos venas umbilicales y la arteria. Las arterias umbilicales tienen en promedio un tamaño de 15 mm y las venas 22 mm (Schneider & Huch, 1985)

La placenta humana cuenta con un alto nivel de capilarización en la vellosidad para el flujo entre zona materna y fetal. Dentro de la sección transversal de la placenta, evidenciable en la Figura 11 B, más del 50% del área total de la sección transversal corresponde a la capilarización de la vellosidad. El nivel de capilarización y la permeabilidad selectiva de la membrana convierten a esta zona en la más importante dentro de la placenta (Huppertz, 2008).

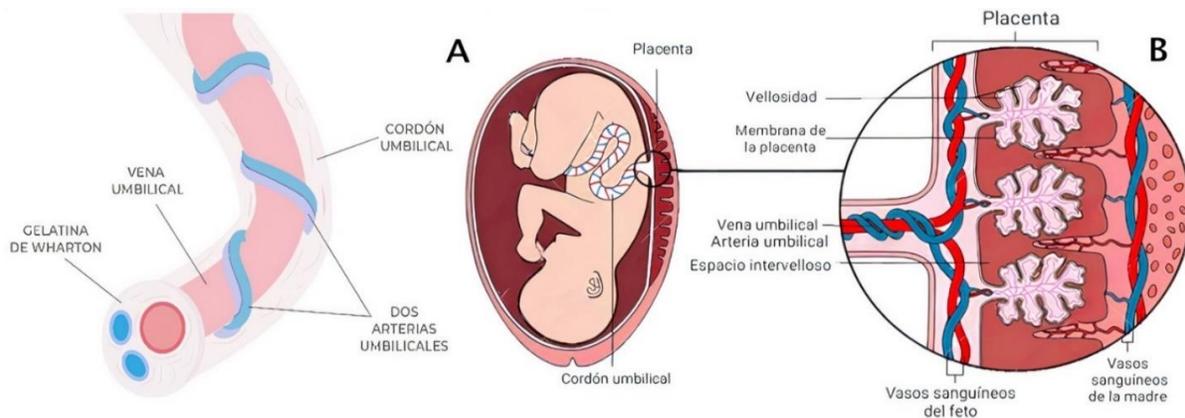


Figura 11: Diagrama vascular de las partes de la placenta humana. A: diagrama interno de la placenta especificando zonas de interacción de las venas y arterias. B: corte transversal del cordón umbilical y especificación de venas y arterias.

La sangre materna jamás entra en contacto con la sangre fetal, que corresponden a organismos con distinto material genético (Morgan-Ortiz et al., 2015). Es así, que la placenta consta de dos sistemas circulatorios independientes como se puede observar en la Figura 10, donde se diferencia entre dos zonas de la placenta, siendo la imagen A correspondiente a la parte materna y la B a la zona fetal. El intercambio entre ambas zonas de la placenta para la absorción de nutrientes y excreción de productos de desecho funciona por difusión simple, facilitada u transporte activo altamente selectivo. En la Figura 10 A se observa la zona materna en la cual se pueden diferenciar los distintos cotiledones que en promedio cuentan con un diámetro entre 100 y 120 mm (Conings et al., 2017), en los que a partir de las vellosidades ocurren intercambios de nutrientes, oxígeno y excreciones (Huppertz, 2008).

Debido a que el sistema circulatorio fetal y materno de la placenta son independientes y en ningún momento la sangre del feto o la madre entran en contacto o se mezclan, es seguro hacer funcionar una de las dos sin que se filtre por la otra zona. Según lo visto al explicar la Figura 10, la zona fetal es la que cuenta con un cordón umbilical. Donde, si se observa la Figura 11 A, se diferencian tres estructuras a lo largo del cordón umbilical, correspondientes a dos de arterias y una vena umbilical (Schneider & Huch, 1985). En la Figura 11 B se observan las vellosidades, membrana y arterias de la zona fetal, que realizan el intercambio de nutrientes y excreciones con los vasos sanguíneos maternos.

Perfusión placentaria

La perfusión corresponde a la imposición del paso de un fluido a través del sistema circulatorio o linfático de un órgano o tejido. En estudios ex-vivo se requiere un suministro adecuado para estudiar el comportamiento de un órgano o tejido como si aún estuviese dentro del organismo.

Al perfundir placenta humana ex vivo, normalmente se busca conocer las características funcionales de la misma, revisar el intercambio de sustancias entre ambas redes vasculares, notar como afectan ciertas sustancias químicas o como se adentran en la misma algunos narcóticos (D'Errico et al., 2019; Mathiesen et al., 2010; Schneider & Huch, 1985). El estudio funcional de la placenta es tan normalizado que incluso existen metodologías publicadas para su realización (Mathiesen et al., 2010). Aun así, en esta tesis se apunta a un análisis distinto, ligado en este nivel solo a una revisión de la mecánica de fluidos y la visualización de la red vascular implicada en el funcionamiento placentario.

Para realizar una correcta perfusión de placenta humana ex-vivo, con la que se espera lograr la visualización de la red vascular placentaria y un análisis de la mecánica de fluidos dentro de ella, es necesario contar con las características enumeradas en la siguiente lista.

- Eliminar o disminuir la cantidad de gases atmosféricos dentro del órgano
- Una vez eliminados los gases atmosféricos aislar el órgano de ellos hasta la perfusión
- Utilizar un líquido que sea biocompatible
- Control del caudal perfundido

Durante su funcionamiento la placenta no cuenta con gases atmosféricos entre sus fibras, adentrándose estas luego del alumbramiento de la madre. Para eliminarlo o disminuirlo existen distintos métodos como aislar lo mejor posible el órgano una vez obtenido, utilizar trampas de burbujas y vaciar de aire la red vascular antes del análisis e incluso aplicar vacío. En estudios ultrasónicos esta característica toma mayor relevancia debido a que estos gases impiden la correcta propagación de las ondas, dando como resultado imágenes de peor calidad. El punto

dos de la lista trata de mantener la baja concentración en el órgano de estos gases confinándolo en un espacio libre de ellos. El tercer punto se refiere a la correcta utilización de sustancias que no dañen el experimento para estudiar el flujo dentro del órgano y visualizar la red vascular, en general se utiliza "buffer fosfato salino" (PBS) desgasificado como líquido de perfusión placentaria (Zabel et al., 2021) debido a que además de ser una concentración salina fisiológica compatible con el cuerpo humano, evita el intercambio de sales de la placenta con el medio. Finalmente, el medir y controlar el nivel de caudal perfundido en un órgano es una característica fundamental en el estudio de la mecánica de fluidos para trabajar en un régimen estacionario.

Finalmente dadas las características anatómicas de la placenta, la perfusión se puede realizar desde la zona materna y la fetal por separado, siendo posible realizar la perfusión de la zona fetal en su totalidad a partir del cordón umbilical. Las arterias umbilicales tienen en promedio un tamaño de 15 mm y las venas 22 mm (Schneider & Huch, 1985). Aun así, lograr perfundir el órgano luego de su extracción no es una tarea trivial debido a que una vez es extraído el órgano, las actividades fibrinolíticas de este, encargadas de evitar la coagulación sanguínea cesan, lo que implica la aparición de obstrucciones en la red vascular placentaria.

Cámaras de perfusión

Para la perfusión de placenta humana ex-vivo es necesaria la utilización de una cámara de perfusión que facilite el estudio de la característica seleccionada del órgano. La perfusión de placenta humana ex-vivo, se propuso primero por el científico Panigel y luego fue modificada por Schneider (Panigel et al., 1967; Schneider et al., 1972). A partir de estas se han creado muchas cámaras de perfusión similares, existiendo incluso, protocolos de perfusión (Mathiesen et al., 2010). Las cámaras de perfusión placentaria típicas están formadas por dos cilindros concéntricos como se ve en la Figura 12, donde el cilindro interno se encarga de contener la placenta y el externo de mantener la temperatura fisiológica de 37 °C a la que se encuentra el cuerpo humano. Dentro de la cámara de perfusión de la Figura 12 se identifican dos tipos de tubos para realizar la perfusión. El tubo destacado en la zona "A" se encarga de recibir el fluido

perfundido de la zona materna. Mientras que los tubos destacados en la zona “B” se encargan de la entrada y salida del líquido perfundido en la zona fetal del órgano.

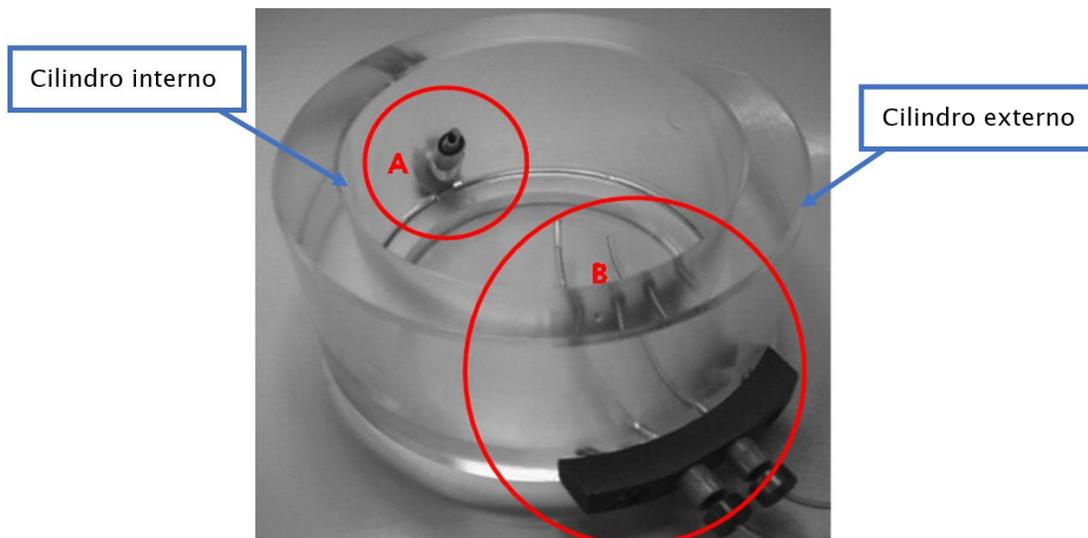


Figura 12: Cámara de perfusión para placenta humana ex vivo para análisis de sustancias. A: Flujo placentario zona materna. B: conexiones flujo placentario zona fetal (Mathiesen et al., 2010)

En las cámaras de perfusión placentaria típicamente se utiliza acrílico, material polímero de metil metacrilato. Es un termoplástico naturalmente sin color, pero se puede pigmentar, así como también des pigmentar y producir laminas completamente transparentes dependiendo de la necesidad.

En la Figura 13 se observa un diagrama que muestra el funcionamiento típico de una cámara de perfusión de la zona materna y fetal para el estudio fisiológico del comportamiento de la placenta y la concentración de las distintas sustancias perfundidas, donde se intenta replicar el contenido de la red vascular durante la gestación. En esta figura, la zona A corresponde al reservorio de líquido de perfusión para la red vascular fetal, cuenta con una entrada y una salida y está sobre un revolvedor electrónico. El líquido sale de este reservorio hacia la arteria de la placenta por acción de una bomba peristáltica, correspondiente a una bomba de rodillos normalmente utilizada para bombear fluidos sanitarios debido a que los mecanismos no entran en contacto directo con el líquido. Al salir de ella el fluido se encuentra con un atrapador de burbujas, para lograr un flujo continuo. Una vez entra el líquido perfundido, recorre la red vascular fetal y sale por la vena umbilical, donde el líquido vuelve al reservorio y se vuelve a

utilizar. La zona D de la Figura 13 corresponde al reservorio de líquido para la zona materna, este también está sobre un revolvedor electrónico y también es arrastrado a la red vascular de la zona materna por una bomba peristáltica

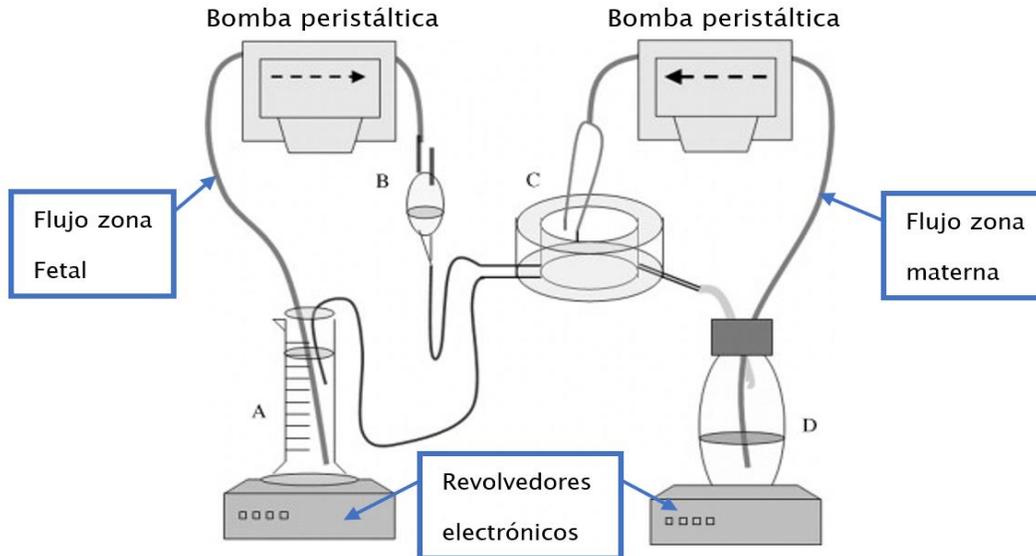


Figura 13: Montaje para la perfusión placentaria. A: líquido de perfusión de la zona fetal de la placenta sobre un revolvedor eléctrico. B: Bomba peristáltica con atrapador de burbujas. C: Cámara de perfusión placentaria. D: Recipiente de líquido de perfusión materna placentaria sobre un revolvedor eléctrico. (Mathiesen et al., 2010)

Finalmente, el tamaño promedio de las placentas de bebés pequeños para su edad gestacional es de 15.73 cm, y para bebés adecuados para su edad gestacional es de 19.14 cm (Prieto Gómez et al., 2008), además, el tamaño de los cotiledones como se nombró en la parte dedicada a la placenta esta entre 10 y 12 cm (Conings et al., 2017). Medidas utilizadas para diseñar las cámaras de perfusión.

Procesamiento de datos brutos ultrasonido

Para la formación de imágenes de ultrasonido es necesario hacer un tratamiento de los datos para poder identificar la ubicación en la que se encuentran los elementos que reciben el ultrasonido y emiten una onda en respuesta.

Beamforming: El “beamforming” corresponde al tratamiento de los datos necesario para pasar de datos brutos de recepción de ecos ultrasónicos a la identificación y localización de el o los emisores de estos ecos (Choi et al., 2015). Para este caso se utilizaron emisiones de onda plana como se ve en la Figura 14 A, donde el medio o el tejido, no responde con el mismo tipo de onda, sino que vibra por sí mismo como reacción, entregando un eco del tipo representado en la Figura 14 B, existiendo una dispersión de la onda de respuesta de forma circular. La mayoría de las imágenes ultrasónicas en la clínica están basadas en el método de beamforming convencional conocido como “Delay and Sum” aunque también existen otros métodos que, aun que mejoran la calidad de las imágenes obtenidas se basan en cálculos más complejos y requieren de una capacidad computacional mayor. Algunos ejemplos son los sistemas adaptativos que se dan tomando las estadísticas de los datos recibidos y modificaciones de métodos de otras aplicaciones para ser implementados en médicas, como lo es el “Delay Multiply and Sum” (Matrone et al., 2015). A pesar de esto, al ser el método el “Delay and Sum”, el más utilizado en la obtención de imágenes ultrasónicas, lo convierte en el más relevante en este proyecto de tesis. Este método utiliza la variación del tiempo de respuesta de las partículas del medio, donde se utilizan relaciones geométricas dependiendo de si existe un ángulo o no y se revisa una zona de piezoeléctricos dependiendo de la profundidad. En la ecuación (5), se ve una ecuación simplificada de la relación entre profundidad, y tiempo desde la onda emitida hasta la recepción del eco. Esta ecuación podría cambiar, pero en esencia el cálculo es el mismo, utilizando otro tipo de perfil para la propagación del eco:

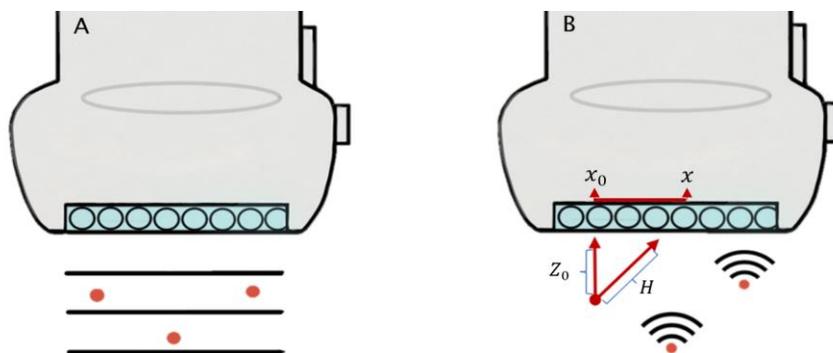


Figura 14: Comportamiento de emisión y recepción de un transductor ultrasónico frente a la respuesta del medio a una emisión de onda plana como ejemplo. A: Acción de emisión en el medio. B: Acción de recepción.

$$t = \frac{Z_0 + \sqrt{Z_0^2 + (x - x_0)^2}}{c}. \quad (5)$$

En la ecuación (5) “t” representa el tiempo transcurrido entre la emisión de la onda de ultrasonido y la recepción de su eco, “C” representa la velocidad de propagación del sonido en el medio, en este caso un órgano, y “H” la hipotenusa entre la ubicación del elemento que está recibiendo la onda y el ubicado frente a la partícula vistos como x y x_0 respectivamente. De la ecuación (5) se puede extraer que para lograr comprender desde donde se está emitiendo una onda se deben revisar los transductores aledaños a “ x_0 ”, que corresponde al traductor ubicado a la menor distancia del tejido que responde al ultrasonido. Para notar desde donde viene este eco muchas veces no es necesario revisar la totalidad de los elementos del transductor y esto depende de la profundidad a la que se está localizando el o los elementos del tejido (Matrone et al., 2015). Para realizar este cálculo de forma más rápida existe un número que define el espacio óptimo de elementos que realizan este cálculo para el “beamforming”, este se denomina “Fnumber”, comúnmente es representado como “F#” y se calcula como la división entre la apertura del transductor y el foco o la profundidad a la que esta zona que se está procesando (Wells, 1999).

Marco metodológico

Para lograr el objetivo general propuesto en esta tesis, se desarrollaron una serie de actividades ligadas a cada objetivo específico

Metodología objetivo específico N°1; Diseñar una cámara de perfusión para placenta humana ex-vivo compatible con adquisición de imágenes ultrasónicas

Las cámaras de perfusión placentaria estudiadas en el marco teórico son de acrílico, con una forma cilíndrica. Esta forma requiere solicitar al fabricante un tamaño específico, que en caso de alguna rotura es necesario cambiar la pieza por completo, lo que requiere tiempo e imposibilita modificaciones en su tamaño o de otra índole. Por esto en el diseño se implementó la idea de una cámara de perfusión cúbica, por módulos y desmontables, lo que da la posibilidad de en caso de accidentes, reemplazar solo el módulo afectado.

Para el diseño de la cámara de perfusión se tomaron en cuenta los distintos requerimientos presentados en la sección del marco teórico.

- Requerimientos para la perfusión placentaria
- Requerimientos para la obtención de imágenes ultrasónicas
- Requerimientos para la fabricación y montaje de la cámara

Los requerimientos de la placenta se refieren a necesidades fisiológicas para lograr la perfusión y mantenerla durante el experimento. Los requerimientos del ultrasonido buscaron suplir las necesidades para la propagación de la onda en el medio y lograr una buena calidad en las imágenes. Finalmente, los requerimientos para la fabricación, se enfocaron en hacer más fácil el armado y el montaje debido a problemas durante esta fase en iteraciones iniciales, donde cada uno de estos puntos esta explicado a detalle a continuación.

Para los requerimientos de la placenta fue importante destacar que la cámara de perfusión está enfocada en el estudio de la red vascular dentro de la zona fetal de placenta humana ex-vivo. Donde gracias a que es posible recorrer el sistema circulatorio del órgano conectando y perfundiendo una de las dos arterias umbilicales, se notó que se debe tener como mínimo dos flujos que conectan el medio externo y el interno de la cámara de perfusión. Entre ellos, se definió

una conexión de entrada y otra de salida, las que dieron paso al flujo controlado de líquido que se impuso con una bomba de inyección desde fuera de la cámara. Estas conexiones se implementaron fijando conectores tipo Luer hembra de acrílico, los que son compatibles con gran parte de las agujas, válvulas y jeringas en el mercado. Otro requerimiento de la placenta fue la utilización de un líquido biocompatible, que no reaccione con el medio, que no genere osmosis y mantenga el órgano en condiciones mecánicas similares a las que tiene durante su funcionamiento in-vivo. Por esto se decidió utilizar PBS desgasificado, solución salina que evita el intercambio de sales y agua entre el medio y la placenta. Finalmente, como requerimientos de la placenta con respecto a su introducción dentro de la cámara, el recipiente debe contar con un tamaño de alrededor de 15x15 cm para poder ubicar la placenta sumergida, permitiendo visualizar los cotiledones de entre 10 y 12 cm.

Dentro de los requerimientos para la aplicación del ultrasonido estaba la desgasificación de la placenta. Durante el funcionamiento de los órganos dentro del cuerpo, estos no están en contacto con gases atmosféricos, lo que permite la penetración de ondas de ultrasonido durante las ecografías. Esta situación es diferente luego del alumbramiento, debido a que, durante su traslado, la placenta se expone constantemente a gases atmosféricos, los que se introducen en los tejidos placentario dificultando el paso del ultrasonido. Para disminuir estos gases, la placenta se debe sumergir en líquido PBS y luego someterse a vacío, logrando que los distintos gases salgan de la placenta al medio y del medio fuera de la cámara de vacío. Luego del proceso hasta la visualización de la placenta, no se expuso nuevamente la placenta a los gases atmosféricos. Debido a esto, la cámara debe ser, internamente impermeable, para sumergir la placenta en líquido PBS. Como sello para lograr la impermeabilización interna de la cámara de perfusión, se seleccionó al etil vinil acetato (EVA), debido a su baja absorción de líquido a condiciones normales (<3% según la norma ISO 53428) (MOSCOSO GALLARDO, 2020) y su baja resistencia a la compresibilidad, permitiendo ajustarse con menos esfuerzo a una superficie. Este material ira ubicado entre las conexiones de los paneles, como recortes con la forma de los rieles de ensamblaje, estos recortes de material cuentan con un espesor de 2 mm que corresponde al “block de goma eva” comercial de marca “Torre”. La cámara también debe contar con un sistema

de fijación, que asegure la ubicación de la placenta y la mantenga sumergida, evitando el contacto del órgano con gases atmosféricos. Otra característica importante es la capacidad de introducir la cámara de perfusión dentro de la cámara de vacío, que cuenta con un tamaño de 30 cm de diámetro y 30 cm de altura. Esto para luego de desgasificar, no cambiar la placenta de recipiente y exponerla a gases atmosféricos nuevamente. Otro requerimiento del ultrasonido es la existencia de un medio acuoso para transmitir la onda ultrasónica, ya que a través del aire esta se refleja casi en su totalidad. Debido a esto, el llenar la cámara de perfusión de líquido PBS y mantener la placenta sumergida ayuda a mirar desde distintas direcciones sin la necesidad de unir el transductor al órgano. Sin embargo, al existir un sistema de fijación para la placenta humana ex-vivo, es posible que esta interfiera en el paso de la onda ultrasónica, agregando el requerimiento de que este sistema permita el paso de la onda ultrasónica. A su vez, se espera implementar mejorar la calidad de las imágenes obtenidas atenuando el eco ultrasónico que se producirá al llegar la onda al fondo de la cámara. También, para permitir la introducción del transductor ultrasónico libremente y ajustar la zona que se desea estudiar, se requiere que la cámara tenga un acceso libre en la zona superior. Finalmente se espera que la cámara al igual que sus predecesoras (Conings et al., 2017; D'Errico et al., 2019; Panigel, 1962; Schneider et al., 1972; Schneider & Huch, 1985), sea transparente para facilitar la manipulación de la placenta y el transductor durante el proceso de toma de datos con ultrasonido, además de ayudar a la rápida identificación de cualquier irregularidad durante el montaje experimental.

Para los requerimientos de fabricación y montaje, se separó la cámara de perfusión en dos partes, encargadas de dos funciones distintas, estas son el recipiente, encargado de mantener el PBS y la placenta en un mismo espacio confinado, y el sistema de fijación, encargado de mantener la placenta sumergida en PBS y fija en un lugar para su visualización con ultrasonido. Para cumplir con el requerimiento de transparencia se ha seleccionado el acrílico como material de fabricación, el que ya ha sido utilizado en aplicaciones similares (Conings et al., 2017; Panigel, 1962; Schneider & Huch, 1985). El acrílico como material cuenta con características químicas y mecánicas sumamente útiles para fabricar, donde se destaca, su solvencia al cloroformo, lo que ayuda a soldar piezas entre ellas, su transparencia, lo que ayuda a monitorear el estado del

experimento, límite elástico mayor al del vidrio, lo que ayuda a contar con mayor resistencia a la deformación durante en ajuste y apernado entre piezas, y capacidad de mecanizado, que es parecida a la de la madera, lo que permite implementar herramientas convencionales durante la fabricación y el montaje de la cámara de perfusión. Para el recipiente, se seleccionaron planchas de acrílico de 10 mm de espesor debido a que ayuda a implementar pernos en los cantos de los módulos de forma segura y fácil.

Durante iteraciones iniciales existieron problemas en el ensamblaje y la ubicación de los puntos de apernado entre las piezas del recipiente. Como respuesta a este problema, se implementaron cambios en el diseño inicial, los que consisten en implementar cavidades que funcionan como rieles de ensamblaje, ubicados en los bordes de las caras que entran en contacto con los cantos de los otros módulos. Este sistema, sirve para evitar que, las piezas deslicen entre sí, dificultando la localización del punto de agujerado para realizar los hilos y conectar las paredes modulares entre ellas y a la base con pernos. También, se implementaron agujeros guía de 3 mm de diámetro, que funcionan como guía para el agujerado en los cantos, necesario para la fabricación de los hilos donde se apernaran las paredes del recipiente. Para el sistema de fijación, se utiliza el mismo material (acrílico) utilizado para el recipiente debido a sus buenas características antes mencionadas, aunque con un menor espesor debido a que en esta pieza no está la necesidad de introducir pernos en los cantos de la pieza. Como requerimiento en el diseño para mejorar el montaje del sistema de fijación, este está separado en dos piezas que funcionan como una prensa donde la placenta se ubica entre ambas. Estas piezas deben contar con una cavidad superior para dar paso al ultrasonido y una cavidad inferior para introducir el material "Aptflex F28" (de "Precision Acoustics Ltd") que disminuye el eco ultrasónico. Finalmente, durante el experimento, la cámara se llena de líquido PBS, el cual corresponde a una solución salina que acelera la formación de óxido en metales. Debido a esto, para conectar las caras de la cámara de perfusión, y las placas para el sistema de sujeción, se utilizan pernos y tuercas de acero inoxidable, evitando cualquier posible contaminación del órgano con óxido.

Para concluir el diseño, se utilizó el software "inventor 2021", dicho software ayudo a asegurar la compatibilidad entre piezas utilizando la opción de montaje para construir la cámara.

Metodología objetivo específico N°2: Fabricar la cámara de perfusión

Durante la Fabricación de la Cámara de perfusión se identificaron 2 fases de avance. La primera estaba relacionada con la fabricación de las piezas modulares, incluyendo agujeros, guía y carriles para el ensamblado de las piezas. La segunda fase se enfocó en los procedimientos necesarios para lograr la fijación, impermeabilidad y flujo de caudal por las válvulas de la cámara de perfusión.

Selección de herramientas de fabricación: Para la fabricación de las piezas de la cámara de perfusión se utilizó tecnología de corte CNC laser, debido a su precisión, seguridad y disponibilidad. Para la utilización eficaz de la cortadora láser se consideraron sus distintos parámetros de ajuste. Durante la fabricación la cortadora laser puede realizar 3 acciones, estas son, grabado, corte de elementos internos y corte de los bordes externos. Dentro de la universidad existen dos cortadoras laser, las que varían en precisión, potencia y área de trabajo, debido a esto, y dependiendo de las necesidades de cada pieza, se utilizó una u otra. La cortadora laser "EPILOG MINI" de 40 Watts cuenta con un área de trabajo con forma de panel de abeja de 24 X 12 pulgadas. La cortadora laser Realiza cortes a base de CO2 y es compatible con PDF generados con el programa de dibujo vectorial "Inkscape". El origen desde donde se realizan las operaciones vectoriales está definido y fijado con respecto a su mesa de trabajo. La cortadora EPILOG MINI también tiene una mayor precisión y una menor tolerancia que la cortadora de mayor potencia marca "julong". La cortadora laser "Julong", modelo "JL-K9060" de 120 Watts, cuenta con un área de trabajo de 900 X 600 mm con una rejilla de panel de abejas y funciona con el programa "RDworksV8". Este programa que tiene incorporada una modalidad de simulación para ver el orden y la velocidad con la que realizaran las distintas acciones definidas en el mismo y es compatible con archivos de "AutoCAD".

Ajuste de parámetros de cortadora laser para la fabricación de las piezas del recipiente: Se decidió utilizar la cortadora "julong JL-K9060" en las paredes y base del recipiente debido al

espesor del acrílico utilizado en estas piezas (10 mm). Durante la utilización de esta se identificaron distintos problemas que afectaron la forma de las piezas. Estos van desde la deformación de la pieza debido al alto coeficiente de dilatación lineal del acrílico (7.1×10^{-5} según prueba "ASTM D696" por la empresa "Vical acrílicos"), por la formación de llamas o un mal orden de las actividades durante la fabricación, hasta problemas en el ángulo entre cortes con un error de $\pm 1^\circ$, que se presume se debe a un desajuste en la red de espejos de la cortadora laser. El fuego producido durante el corte se solucionó pausando el corte cada vez que se producía. Para lograr una pieza del tamaño esperado, el dibujo vectorial que sigue la maquina debe contar con dimensiones aumentadas en 0.3 mm para el eje "x" y 0.4 mm para el eje "y", obteniendo un error en el tamaño deseado de ± 0.07 mm. Las actividades realizadas por la cortadora laser "julong JL-K9060", llevaron un orden específico para evitar que los movimientos en el material producto de las caídas de cada pieza luego de ser cortadas produzcan errores en el producto final deseado. El orden utilizado es, primero grabar, luego agujerear, y al final cortar, en caso contrario si se corta primero, la pieza se desconecta del resto del material reacomodándose, error que no es controlado por la cortadora y desencadena un grabado o agujerado en una zona distinta a la esperada. Adicionalmente, durante este proceso es importante tomar en cuenta que, si la pieza cortada es lo suficientemente grande, su caída puede ejercer una fuerza en dirección al canto del retazo sacándolo de su posición inicial. Este suceso es grave si la pieza de material a cortar tiene un margen entre piezas pequeño, ya que, parte de alguna próxima pieza podría quedar fuera del corte. Debido a esto, el material introducido en la cortadora laser tiene un margen de 4 cm en todas direcciones y se decidió el orden de corte de las piezas de menor a mayor tamaño ya que, las piezas más pequeñas no ejercen tanta fuerza normal en los bordes como lo hacen las más grandes. Para disminuir la deformación, malas terminaciones y controlar correctamente la profundidad del corte, es necesario configurar correctamente la potencia y la velocidad para los grabados y cortes. Debido a que el grabado se utiliza para fabricar los carriles, este debe contar con buenas terminaciones y una profundidad suficiente para evitar el deslizamiento entre piezas durante el ensamblaje y fabricación de hilos. Para lograrlo, se realizan dos procesos de grabado, el primero con una configuración de 15% de potencia a 100% de velocidad, y el segundo con un

14% de potencia y un 100% de velocidad. Para los cortes del láser (exteriores, interiores y agujerados), se usa un 50% de su potencia y un 3% de velocidad, logrando cortes presumiblemente rectos en el espesor. Aunque los cortes y grabados realizados por la cortadora laser, eran visiblemente rectos, se lijaron los cantos utilizando el método de rectificado por homologación de superficies que, en este caso, consiste en pasar cuidadosamente los cantos sobre una lija de 180 elementos fija en vidrio, ya que se presume como una superficie plana. Para quitar la porosidad de los surcos de ensamblaje, se utilizó una lija de 180 elementos y se lijo al agua hasta volver esta superficie menos opaca. Finalmente, el error de $\pm 1^\circ$ en el ángulo de cortes no se pudo arreglar ya que es problema de la máquina, aun así, este error al no ser demasiado grande se puede mitigar durante la fabricación deformando manualmente las piezas durante el ensamblaje.

Montaje del recipiente: Una vez terminados los cortes laser de las piezas modulares del recipiente, se procede a realizar el ensamblaje de las piezas, armando y fijando con prensas todos los módulos en su cavidad correspondiente. Durante la fijación de las piezas se utilizó un talado de pedestal y brocas de metal M3 y M4. La broca M3 se utilizó para hacer el agujerado necesario para la formación de hilos M4 y la broca M4 para el paso de los pernos, después de la formación de cada hilo, se ubicaba inmediatamente el perno correspondiente, para ir quitando prensas y poder acceder a todos los lugares a taladrar. Logrando fabricar un total de 24 hilos M4, que se ajustaron con pernos Allen, esto debido a la facilidad de apernado de los mismos.

Implementación de método de impermeabilización del recipiente: Una vez montada la cámara de perfusión fue necesario volverla internamente impermeable, para lograrlo se utilizó una lámina gomosa entre las conexiones de las piezas modulares. Como material impermeabilización interna de la cámara de perfusión, se tiene seleccionado al etil vinil acetato (EVA), debido a su baja absorción de líquido a condiciones normales. Esta impermeabilidad, aumenta al eliminar las porosidades del material por compresión lo que se ajusta perfectamente a la utilidad y la zona donde se utilizó. Al ser un material comúnmente utilizado en manualidades es fácil de maneja y

darle la forma deseada, donde para disminuir las posibilidades de filtración se optó por realizar cortes de una sola pieza para la base, tomando la forma y dimensiones del área grabada en la base, también se utilizaron cortes de 130 x 10 x 2 mm para ubicar en los surcos de las paredes. Se definió un orden de montaje para evitar dejar espacios en los que podría haber filtraciones, este consiste en conectar todas las paredes con la goma entre ellas y dejar el sobrante expuesto en la zona inferior, luego con la goma ubicada en la base, conectar ambas piezas (paredes y base). Gracias a esto, la EVA de las paredes queda sobrepuesta en la de la base, en las esquinas internas sin dejar espacios que podrían provocar filtraciones.

Adaptación de conectores para la conexión entre el medio externo e interno: Una vez completado el recipiente se adaptaron la pieza que conectan el medio interno con el externo. La pieza utilizada se conoce como conector “Luer” o “Luer lock” regido según la norma ISO 80369. Estos conectores actualmente son compatibles con la mayoría de las agujas del mercado. En la Figura 15 se pueden ver dos imágenes donde se muestra la adaptación desde un conector Luer hembra normal a la forma esperada, donde en la imagen A se observa el isométrico del cambio en su forma y en la B la vista superior con las medidas iniciales y finales aproximadas necesarias para introducirlo en una de las paredes del recipiente. Para lograr la perfusión, se requiere de dos pasos del líquido perfundido, uno para la entrada y otro para la salida, eso implica adaptar un total de 4 conectores Luer hembra. En la Figura 15 B se observa la zona modificada y el cambio de su largo desde más de 21 mm a solo 5 mm. Esta modificación permitió introducir dos conectores Luer por agujero en una de las paredes del recipiente, donde la forma en la que termina introducido se puede observar en el detalle “E” del plano 6 en el anexo. Debido a que no existen herramientas que cambien el conector Luer comercial a esta forma específica de forma automática, la modificación se realizó a mano, utilizando alicate cortante para las aletas, cúter para remanentes de estas y lija de 180 elementos para tener un acabado más homogéneo. Debido a esto la medida del diámetro vista en la imagen B solo es una aproximación.

Para formar un túnel continuo entre los 2 conectores, se utiliza un tubo de PVC médico transparente con el que venían los conectores. Conectados los pares de conectores Luer, se mide el diámetro y a partir de este se realiza el agujerado.

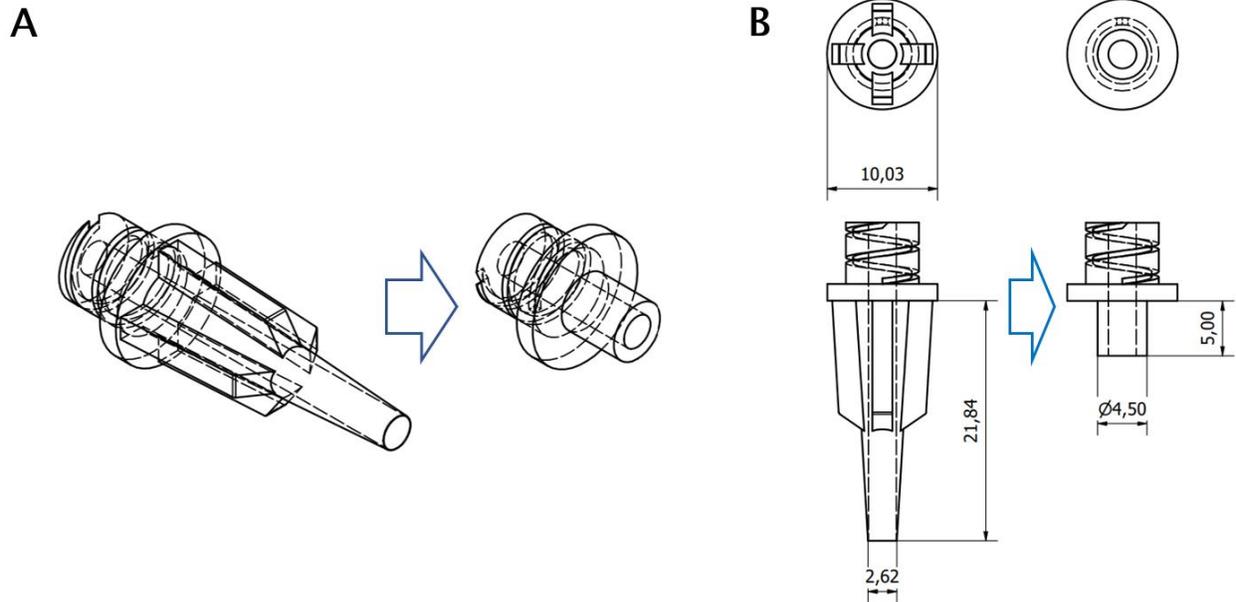


Figura 15: Conector Luer lock antes y después de las modificaciones necesarias para introducirlo en la cámara de perfusión. A: Vista isométrica. B: Vista frontal con medidas.

Ajuste de parámetros de cortadora laser para la fabricación de las piezas del sistema de fijación y agujeros para el conector Luer: A diferencia de la cortadora laser “julong JL-K9060” de la Universidad O’Higgins, La cortadora laser “EPILOG MINI” del establecimiento no cuenta con un error visualmente apreciable con una escuadra entre sus ángulos de corte. Además, su configuración es más amigable, con un espacio de trabajo con un origen definido, que ayuda a realizar agujerados precisos en piezas ya fabricadas. Debido a que el sistema de fijación utiliza acrílico de menor espesor y que los agujeros en una de las paredes para el “Luer lock” se realizan después del montaje del recipiente, se seleccionó la cortadora laser “EPILOG MINI”. Los parámetros de corte para acrílico de 5 mm fueron 3% de velocidad y 100% de potencia mientras que para acrílico de 10 mm fueron de 6% de velocidad y 100% de potencia, aunque este último no logra un diámetro continuo entre entrada y salida. Para fabricar el sistema de fijación se

cortaron 3 piezas de acrílico de 5 mm, la primera con forma de anillo que se ubicó en la parte superior. Esta pieza entrego accesibilidad al paso de la onda ultrasónica durante las mediciones, además de ayudar a mantener sumergida la placenta. Las siguientes 2 piezas corresponden a una misma parte del sistema de fijación definida como la base de este y funciona como un ancla para el sistema de fijación completo. La base fue diseñada para que se le introdujeran 4 pernos M8 x 50mm de cabeza hexagonal, para funcionar como conexión entre el anillo y la base (ancla), ya que al utilizar el hilo de los pernos se forma una prensa con ambas piezas (base y anillo). La base también está diseñada para contener la goma "Aptflex F28" (de "Precision Acoustics Ltd"), necesaria para atenuar el eco ultrasónico. Para fabricar la base se cortan dos piezas de acrílico, ambas cuadradas con una cavidad cuadrada en su centro de 10x10 cm. En una de las piezas se realizaron agujeros hexagonales centrados en cada uno de los lados con las medidas de la cabeza del perno mencionado. Mientras tanto, en la otra pieza se realizó exactamente el mismo procedimiento, pero con cortes circulares de 8 mm en lugar de hexagonales. Una vez fabricadas ambas piezas, se ubicaron una sobre la otra alineadas y se fundieron juntas usando cloroformo. Para insertar los conectores Luer se seleccionó una de las paredes con grabado del recipiente ya que son más fáciles de reemplazar al contar con menos hilos. Los agujeros se realizaron 10 mm bajo el canto superior de la pieza y 37 mm desde el borde hacia el centro, donde luego de tomar medidas se decidió como mejor medida del diámetro del agujero 4.7 mm. Para realizar el corte basto con ubicar la pieza desde el origen ubicado en la zona superior izquierda y enviar el diseño a cortar con las medidas. Como esta cortadora laser tiene una potencia menor, el agujerado en la pared del recipiente (10 mm de espesor), no tiene el mismo diámetro de entrada que de salida, siendo el de salida menor. Debido a esto, los agujeros necesitaron ser lijado por el lado de menor diámetro hasta alcanzar un diámetro similar, suficiente para introducir y fijar los conectores Luer, los que finalmente se fundieron en la pared utilizando cloroformo, esto debido a que ambos fueron fabricados con acrílico. Dicho esto, el tubo de PVC en el que se introducen los conectores, cumple una segunda funcionalidad, que es proteger la zona adaptada del cloroformo, evitando la deformación de dicha zona y la posibilidad de no permitir el paso de fluido. Al completar el proceso de fabricación solo resto volver a montar todas las piezas juntas para completar la

cámara de perfusión. Se montó la pared modificada con el conector Luer en el recipiente y se introdujo el sistema de fijación dentro de este con el "Aptflex F28", y las golillas de mariposa.

Metodología objetivo específico N°3 Probar características de funcionalidad fundamentales

Experimento de permeabilidad interna para el recipiente de la cámara de perfusión: Para probar la impermeabilidad del recipiente de la cámara de perfusión, este se llenó con agua, simulando la utilización de PBS. Si no se detectaban visualmente fugas, se ubica la cámara de perfusión sobre papel absorbente delgado, esta distribución se dejaba durante un día y una noche. En este punto, la utilización de papel absorbente cumplió la función de sensor a las filtraciones de agua, debido a que, al ser delgado, el contacto esta lo deshace o arruga, siendo estas marcas un indicador de la existencia de fugas. Si no se encontraban rastros de filtraciones, se probaba el experimento en la cámara de vacío, donde nuevamente, debajo de la base, se deja un papel absorbente. Finalmente, si el recipiente superaba todas estas pruebas, se asumía que el sistema es internamente impermeable, pasando al siguiente experimento.

Experimento de funcionalidad sistema de fijación y flujo de conexiones: Para probar la funcionalidad del sistema de fijación y las conexiones entre microtubos se monto un fantoma. Este consistia en dos cortes de aproximadamente 15 mm de espesor y 120 mm de diámetro de hígado bobino, donde se ubicaba uno sobre el otro y entre ellos un microtubo que imitaba un vaso sanguíneo. Una vez ubicado el fantoma en el sistema de fijación, entre la base con el "Aptflex F28" y el anillo fijado con las tuercas de mariposa, se llenó el recipiente de agua, para simular las condiciones en las que se encuentra la placenta durante la toma de datos. finalmente se realizó la perfusión del fantoma mientras este permanecía sumergido gracias al sistema de fijación.

En la Figura 16 se observa el montaje de la cámara de perfusión con el fantoma, además de como el microtubo de 0.580 mm pasa desde la entrada en la zona B izquierda por los cortes de hígado atrapados por el sistema de fijación en la zona A y luego de nuevo a la aguja 21G (aguja de 0.8 mm de diámetro interno) conectada al conector Luer en la zona B derecha

completando el circuito. Una vez aseguradas las conexiones de esta distribución, se procede a llenar el recipiente de agua.

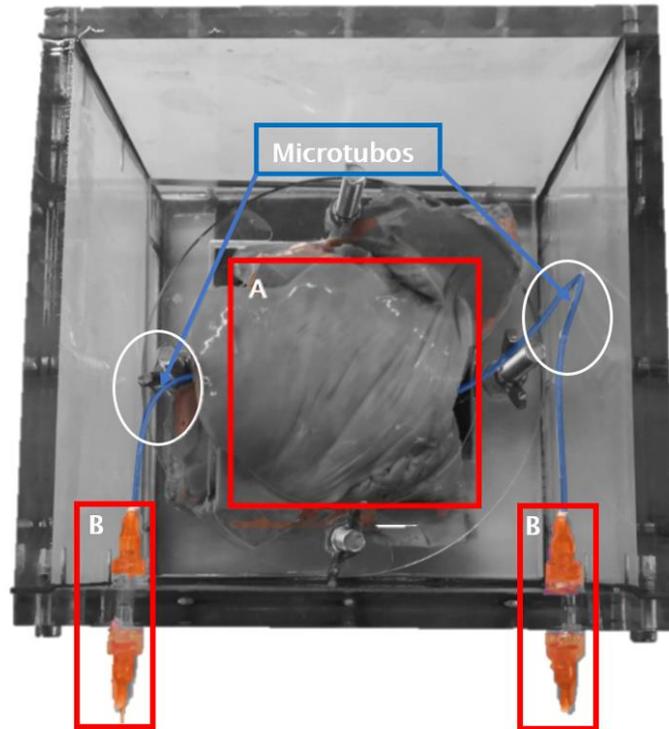


Figura 16: montaje del fantoma de placenta conectado al sistema de conexión de microtubos-aguja.

Si el fantoma se mantiene en su lugar, el sistema de fijación cumple su función de evitar movimientos y contacto con gases atmosféricos durante el experimento, quedando por testear la accesibilidad de los datos con el órgano fijo y la perfusión con el fantoma montado. En este contexto se revisaron también dos puntos importantes, primero averiguar si debido a este sistema de fijación, los flujos de la red vascular se obstruyen, en este caso el microtubo que simula el vaso, y segundo, si el sistema de aguja-tubos conectado admite material particulado sin obstruirse. Para ambos casos se definió un fluido a utilizar distinto, en el primero se decidió utilizar solamente agua, mientras que para el segundo se utilizó una mezcla de agua y 10% de carbón pulverizado (entre 1 y 10 micras de diámetro) que aun que son partículas muy pequeñas tienden a aglomerarse. Para revisar si el sistema de fijación genera una obstrucción se realiza la perfusión a mano utilizando agua y revisando la diferencia entre el esfuerzo necesario para que fluya con el sistema de fijación y sin el. Para revisar si es posible utilizar material particulado en

el montaje a través de los conectores y agujas se utilizó el segundo fluido (agua y carbón), el cual se perfundió a mano realizando pulsos que asemejan al funcionamiento cardiaco. Finalmente, para analizar la funcionalidad de dar paso a la onda ultrasónica mientras se mantiene el fantoma sumergido, se monta una prueba perfundiendo líquido con la “bomba 11 elite Harvard apparatus modelo dual” de jeringas, como se ve en la Figura 17. En dicho montaje se introdujo el transductor de marca “Philips”, modelo “ATL-L12-5 50mm”, y utilizando un código de adquisición de imágenes B-mode en tiempo real, se revisó la visibilidad del fantoma fijado en la cámara.

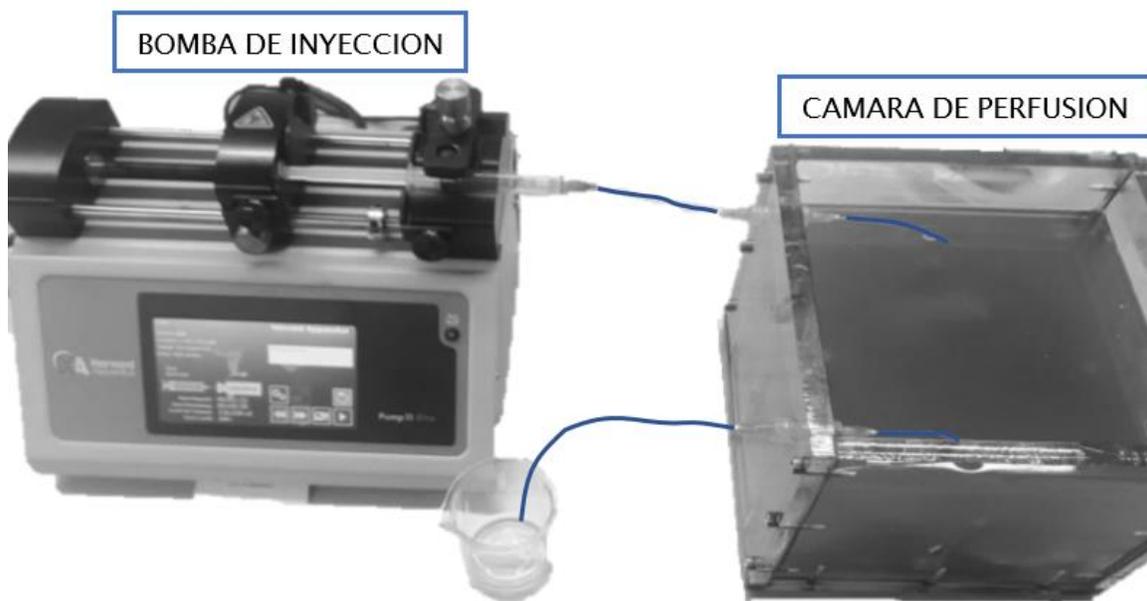


Figura 17. Montaje cámara de perfusión con fantoma y flujo inducido por la Bomba 11 elite Harvard apparatus modelo dual.

Metodología objetivo específico N°4: Desarrollar imágenes ultrasónicas estructurales y cuantitativas de placenta humana ex-vivo

Placenta: Todos los procedimientos y experimentos fueron guiados acorde al Informe de Belmont (Emanuel et al., 2008). Las placentas fueron obtenidas de embarazos sin patología cuyo parto se atendió en la Maternidad del Hospital de la Universidad de Chile. Las voluntarias que donaron su placenta firmaron un consentimiento informado. El uso de estas muestras está aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Chile. En breve, previo al parto se les presentó la solicitud

de donación de placentas a las madres ingresadas a la maternidad del Hospital, y las placentas de alumbramiento que tuvieron lugar dentro de las 24 horas posteriores al reclutamiento fueron guardados a 4°C hasta el momento de los procedimientos en laboratorio.

Si bien todas las placentas recibidas eran meticulosamente seleccionadas para no contar con enfermedades, para resguardar la salud y bienestar de quienes trabajan con esta, se tomaron distintas medidas de precaución sanitaria. Se utilizaron constantemente guantes de nitrilo, donde cada vez que se entraba en contacto con un elemento externo a la preparación placentario se desechaban y en caso de volver a entrar en contacto con ella se tomaban nuevos. También se utilizó durante todo el proceso mascarillas, cabello atado en caso de ser necesario y bata de laboratorio, para evitar cualquier contaminación de las personas implicadas.

Para preparar la placenta y utilizarla en el montaje experimental, primero se revisó la funcionalidad de los vasos sanguíneos desde el cordón umbilical. Para que el proceso sea más fácil, primero se corta el tejido circundante de los vasos del cordón umbilical, dejando las dos arterias y una vena expuestas como se ve en la Figura 18. Una vez expuestos los vasos, se introduce un microtubo de 0.580 mm en la arteria como se ve en la zona "A" de la figura. Para lograr introducir el microtubo con mayor facilidad a lo largo del cordón, se utiliza líquido PBS para ir separando las paredes de la arteria utilizada. Este proceso requirió del orden de horas debido a la presencia de coágulos como se ve en la Figura 19, donde para contrarrestar este problema se utilizó líquido PBS un 10% de aspirina diluida con en su composición. Esta se utilizó, debido su capacidad fibrinolítica, disminuyendo el tamaño de los coágulos en el cordón umbilical o en la placenta, permitiendo el flujo en la red vascular de los mismos y revisando si tienen alguna fuga. Este proceso de perfusión inicial se desarrolló dando pulsaciones cuidando no generar un aumento excesivo de volumen en las zonas obstruidas de las paredes de los vasos sanguíneos para no dañarlo. A su vez, se realizan masajes circulares en las zonas donde no avanza el líquido apuntando en dirección al flujo para acelerar el proceso. Comprendiendo este procedimiento como completado al observar la salida de PBS desde la vena del cordón umbilical. Una vez realizada la perfusión del órgano, para hacer más cómodos los procesos siguientes, se fijó el

microtubo al órgano con un amarre simple doble como se ve en la Figura 18. Este proceso se realizó en una riñonera médica, pero también puede ser realizado en la cámara de perfusión.

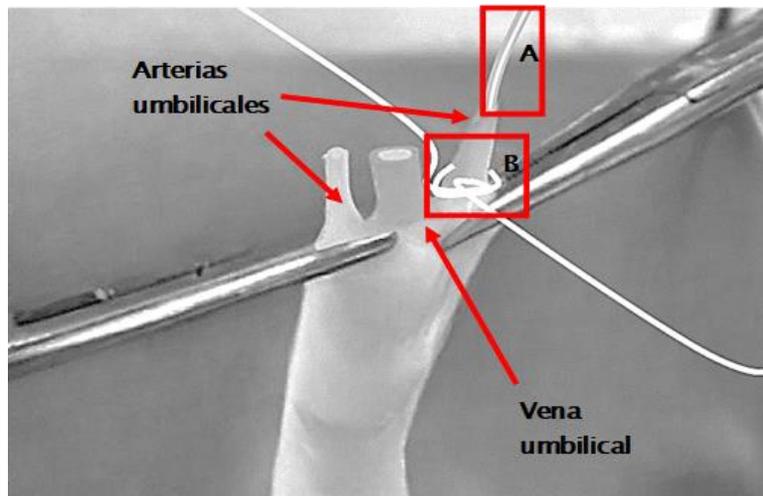


Figura 18: Representación de cordón umbilical con arterias y vena expuestas, canulada y suturada. A: Microtubo de polietileno con D.I de 0.58 mm y D.E de 0.965 [mm]. B: doble amarre simple en la base de la arteria expuesta con hilo de algodón trenzado marca Cóndor.



Figura 19: Coagulo en el final del cordón umbilical, a la entrada de la placenta, siendo perfundido con PBS y aspirina pulverizada para disminuir el tamaño de estos y mejorar el flujo de PBS a lo largo de la placenta.

Una vez realizado el proceso de revisión de la red vascular, se rompió la membrana “corion” correspondiente al lado materno, y se introdujo la placenta dentro de la cámara de perfusión fijada en el sistema de fijación. Una vez firme la placenta, se llenó el recipiente de PBS, y luego se introdujo la cámara de perfusión dentro de la cámara de vacío. El nivel de vacío generado en la cámara para desgasificar la placenta es de alrededor de un 85%, esto para evitar

la evaporación del líquido PBS. La cámara de perfusión se mantuvo dentro por alrededor de 50 minutos, logrando así obtener un órgano en óptimas condiciones para su observación con ultrasonido.

Luego de desgasificar, se retiró la cámara de perfusión de la cámara de vacío y se volvió a perfundir la placenta manualmente utilizando la misma mezcla de PBS desgasificado y aspirina, dejando la red vascular funcional y lista para ser conectada a la bomba de inyección por jeringas, y así perfundir el órgano de forma controlada.

Montaje experimental: En la Figura 20 se puede observar un esquema representativo del montaje experimental utilizado para la obtención de datos ultrasónicos de placenta humana ex-vivo. Para el montaje primero se dejó conectado el extremo libre del microtubo fijados en la arteria, conectado a la aguja 21G apertadas internamente en el sistema de conexión Luer. Para poder obtener imágenes de ultrasonido Doppler es necesario utilizar un fluido de contraste, para esto, el fluido perfundido utilizado corresponde a una solución de PBS con un 10% de sangre. Este fluido fue perfundido en la red vascular desde una jeringa NIPRO de 10 ml con una aguja 21G. La jeringa se ubicó en la bomba de inyección 11 elite, para controlar la velocidad del caudal perfundido y monitorear la cantidad volumétrica de fluido introducida a la red vascular por experimento. El volumen de líquido perfundido ayuda a definir una cantidad de flujo antes de tomar los datos, esto para trabajar en un régimen de flujo permanente. La cámara de perfusión se ubicó sobre un "lab jak" modelo "Thorlab L490" para poder manejar fácilmente la elevación de esta. El transductor ultrasónico utilizado es de marca "Philips", modelo "ATL-L12-5 50mm", donde su posición horizontal se ajustó utilizando un soporte universal. El lab jak se definió como encargado de manejar la distancia entre el transductor y el órgano debido su precisión de elevación en el eje "y" ayudando a encontrar la mejor vista del fragmento de la red vascular a estudiar. El transductor ultrasónico emitió y recibió las ondas programadas en el escáner ultrasónico de alta velocidad verasonics VANTAGE 128 que se encarga de procesar los datos.

Una vez montado el experimento se corrieron mediciones utilizando 10 caudales distintos impuestos en la bomba de jeringa expuestos en la matriz [4, 5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5] en

unidades de mililitros por minuto. Una vez impuestos estos flujos en la bomba se esperaba a que se haya perfundido al menos 1 ml antes de iniciar la emisión y extracción de los datos, esto para trabajar en el régimen estacionario del flujo en los vasos del órgano. Para cada caudal se extraían un total de 1000 imágenes donde dentro de estas 500 eran datos para imágenes B-mode y otras 500 eran para la formación de imágenes de ultrasonido Doppler.

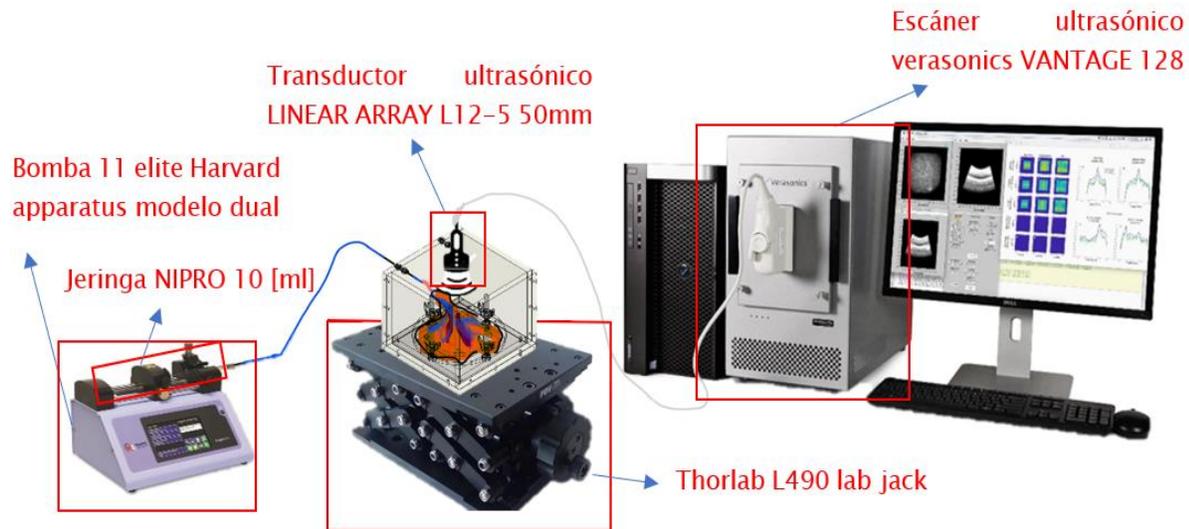


Figura 20: montaje del experimento mostrando las herramientas utilizadas con imágenes referenciales de las mismas.

Tratamiento y formación de imágenes ultrasónicas B-mode y Doppler: Durante el tratamiento de datos y la formación de imágenes se utilizaron funciones programadas con anterioridad, donde de ser necesario se estudió más a fondo su funcionamiento y se hicieron algunas modificaciones básicas para ser utilizadas en esta tesis en específico. Durante el desarrollo de este tema se darán las explicaciones correspondientes a los procesos que realizaron estas funciones para obtener imágenes B-mode y Doppler.

A diferencia de los escáneres ultrasónicos clínicos, el escáner “verasonics” tiene la capacidad de almacenar y dar acceso a datos brutos, los que son guardados en forma de matriz. Los datos que se obtienen pueden ser descritos como un matriz bidimensional, donde cada fila representa el recorrido de la onda ultrasónica en el tiempo, y cada columna representa los

elementos emisores y receptores de la onda ultrasónica. Así se obtuvieron múltiples matrices donde cada una corresponde a una propagación ultrasónica en el tejido y los vasos de la placenta. Cada imagen contiene información de 7 emisiones y recepciones de onda plana en 5 ángulos distintos correspondientes al vector $[-5, -3.333, -1.667, 0, 1.667, 3.333, 5]$ en grados. Durante el proceso de emisión y recopilación de información, el transductor se mantuvo quieto, siendo la onda, la emitida con estas inclinaciones. Para que los 7 ángulos representen la misma imagen, el tiempo del cambio desde un ángulo a otro es muy pequeño, específicamente de $120 \mu s$, mientras que el tiempo entre el término de una imagen y el inicio de otra es de $5000 \mu s$, con estos valores se puede calcular el periodo entre “frames” o imágenes como 7 veces el tiempo entre ángulos (120) más el tiempo entre el término e inicio de la secuencia (5000), obteniendo un periodo entre imágenes de $5840 \mu s$, lo que también se puede comprender como una velocidad de 171 imágenes por segundo aproximadamente. Se realizó un total de 1000 adquisiciones, para una zona de 35 mm de profundidad desde los 5 mm hasta los 40 mm con respecto al arreglo de piezoeléctricos en el transductor, y 25 mm de ancho, con 12.5 mm para cada lado desde el centro de la emisión de la onda. Los datos brutos de ancho y profundidad obtenidos se conocen como datos de radio frecuencia o “RF Data” en inglés. Para utilizar estos datos en la formación de imágenes ultrasónicas es necesario realizar una transformación conocida como “beamforming”, que para su cálculo se utilizó una función especializada en el cálculo basada en la técnica “Delay and sum”(Lin et al., 2017; Matrone et al., 2015). Para la utilización de esta función se deben conocer los datos del transductor utilizado a partir de su modelo, con datos como el número de elemento, el espaciado entre ellos y la frecuencia central. También se debe incluir la ventana de observación o el tamaño físico en el que se realizan las mediciones (profundidad y ancho), la velocidad de propagación del sonido para este caso es 1500 m/s, la frecuencia de adquisición o “sampling”, que se define como 4 veces la frecuencia central y el fnumber, que para este caso tiene un valor de 1.

Para realizar El cálculo Doppler de los datos post-beamforming del tejido, es importante destacar que para realizar imágenes ultrasónicas existen dos tipos de datos, los datos analíticos “IQ” que se utilizan para el cálculo del Doppler, y los datos de radio frecuencia “RF” que

corresponde al tipo de dato obtenido por el transductor almacenado en una matriz real. Los datos RF contienen todas las frecuencias y amplitudes dentro del experimento, y puede escribirse como $A(t, x) * e^{i \omega t}$, donde tanto la amplitud como la exponencial son complejas, y la multiplicación entre ellas entrega una matriz real. En esta representación la exponencial contiene las frecuencias principales de los datos correspondiente a la frecuencia emitida y $A(t, x)$ correspondiente a la amplitud variable en el tiempo y el espacio, que contiene la energía producto de las frecuencias secundarias resultantes del efecto Doppler. Para identificar estas frecuencias se hace una demodulación de los datos RF a datos "IQ" donde en la ecuación (6) representa una de las formas de comprender la relación entre los datos.

$$IQ = A(t, x) = RF * e^{-i \omega_0 t} \quad (6)$$

En la ecuación (6) se comprende que la demodulación de los datos RF, corresponde a quitar las frecuencias principales de los datos RF quedándose con la matriz que contiene la energía correspondiente a las frecuencias secundarias ocasionadas por el efecto Doppler.

Para poder calcular la matriz de velocidades dentro del flujo sanguíneo utilizando el efecto Doppler se realizó la autocorrelación de la matriz de datos IQ. De este cálculo se obtienen las frecuencias asociadas a dicha matriz, que en este caso corresponden a los datos de frecuencias secundarias producidos por el efecto Doppler.

Para el cálculo de las direcciones reales en las que se mueve el vector velocidad dentro del flujo sanguíneo primero se calculó la velocidad Doppler correspondiente a todos los ángulos del experimento. Este cálculo entregó una velocidad en perspectiva desde cada uno de los 7 ángulos utilizados, donde estas direcciones pueden ser utilizadas para calcular componentes de velocidad correspondientes al eje "x" y al eje "y". Utilizando específicamente los vectores de velocidad obtenidos de dos ángulos opuestos entre sí, los que denominaremos $-\alpha$ y $+\alpha$ es posible realizar el cálculo que define de forma más precisa el comportamiento de la velocidad dentro de un flujo sanguíneo a partir de los datos Doppler ultrasónicos en las ecuaciones (7) y (8) (García, 2021):

$$V_x = (V_{-\alpha} - V_{\alpha}) / \sin(\alpha). \quad (7)$$

$$V_z = -\frac{V_{-\alpha} + V_{\alpha}}{1 + \cos(\alpha)}. \quad (8)$$

Las ecuaciones (7) y (8) dependen del cálculo de la velocidad Doppler para todos los ángulos excepto el cero, donde V_x y V_y representan los vectores de velocidades en el eje “x” e “y” respectivamente. Las variables $V_{\pm\alpha}$ representan las velocidades Doppler obtenidas para cada ángulo, y α representa el ángulo de emisión y recepción desde donde se captaron los datos. Con estas ecuaciones se obtuvieron dos matrices, donde una representa el módulo de la velocidad y la otra la dirección de la velocidad. Para calcular el módulo se remplazan los valores en la siguiente ecuación $V = |\sqrt{V_x^2 + V_y^2}|$, mientras que para calcular la matriz de direcciones se calculo $Dir = \arctan\left(\frac{V_y}{V_x}\right)$. Estas ecuaciones se realizaron en pares de ángulos, para utilizar el total de los grados. Una vez completados los pares se toman las matrices correspondientes a la amplitud y la dirección y se promedian. Utilizando la matriz del módulo de la velocidad y la de direcciones, es posible construir una matriz Doppler juntando ambos datos. Para realizar este trabajo, bastó con transformar la matriz de direcciones en una matriz binaria, con valores de uno y menos uno, siendo negativos o positivos dependiendo de si se aleja o acercan al transductor respectivamente. Logrando obtener para cada experimento una matriz con la información de los vasos sanguíneos que corresponden a venas y los que corresponden arterias, así como también, la velocidad del flujo sanguíneo en ellos.

Resultados

Resultados objetivo específico N°1; Diseñar una cámara de perfusión para placenta humana ex-vivo compatible con adquisición de imágenes ultrasónicas

Durante el diseño de la cámara de perfusión se tomaron en cuenta distintos requerimientos, donde cada uno de ellos tuvo una respuesta vista de forma más simple en la Tabla 1. En ella se trataron los requerimientos funcionales de la placenta, requerimientos en la implementación de herramientas para la obtención de imágenes ultrasónicas y finalmente, para mejorar el proceso de fabricación y mantención. Donde la respuesta a los requerimientos expuesta en la Tabla 1 se complementa con la información de los planos de la cámara de perfusión expuestos en el anexo.

Tabla 1: Requerimientos y sus respuestas

Requerimientos	
Medio de propagación líquido para la propagación del ultrasonido y biocompatible con el órgano	Cámara internamente impermeable llena de líquido PBS, fabricada con materiales que no contaminan el órgano
Eliminación del contacto con gases atmosféricos	Desgasificación placentaria con esta montada en la cámara de perfusión y fijada en el fondo durante el proceso con sistema de fijación.
Accesibilidad del transductor ultrasónico	Parte superior de la cámara expuesta y sistema de fijación con un hueco.
Entrada y salida del sistema circulatorio placentario fetal controlada y simple.	Entrada controlada por bomba de infusión de jeringas y conexión entre medio externo e interno por “Luer lock” hembra y agujas con microtubos.
Transparencia y fácil fabricación	Se utiliza como material principal el acrílico que cuenta con una transparencia similar a la del vidrio, pero cuenta con una capacidad de mecanizado similar a la madera lo que facilita la utilización de pernos
Fácil montaje y reparación	Cámara fabricada con módulos intercambiables y fácilmente reemplazables y repetibles, con gravado en profundidad como guías de ensamblaje y conectores Luer compatibles con la mayoría de las agujas actuales.

Para tomar en cuenta e implementar las distintas consideraciones y lograr una cámara de perfusión que cumpliera con todos los requerimientos se separó la cámara de perfusión en dos sistemas independientes. En la Figura 21 se observan ambos, donde la imagen “A” corresponde a la vista isométrica del recipiente montado, con los distintos tipos de módulos que lo conforman. Cada uno de ellos se puede observar en los planos 3, 4, 5 y 6, dentro de la sección de anexos, además en el plano 2 se encuentra el despiece completo de los distintos elementos con sus materiales, que se implementaron en el diseño para responder a los requerimientos del recipiente. En la Figura 21 B, se observa la vista isométrica del montaje del sistema de fijación, indicando las piezas de acrílico fabricadas por el nombre que se encuentra en su detalle, en los planos 8 y 9 en la sección del anexo, además en el plano número 7 se encuentra el montaje con sus vistas y el despiece de los distintos elementos que en conjunto conforman el sistema de fijación.

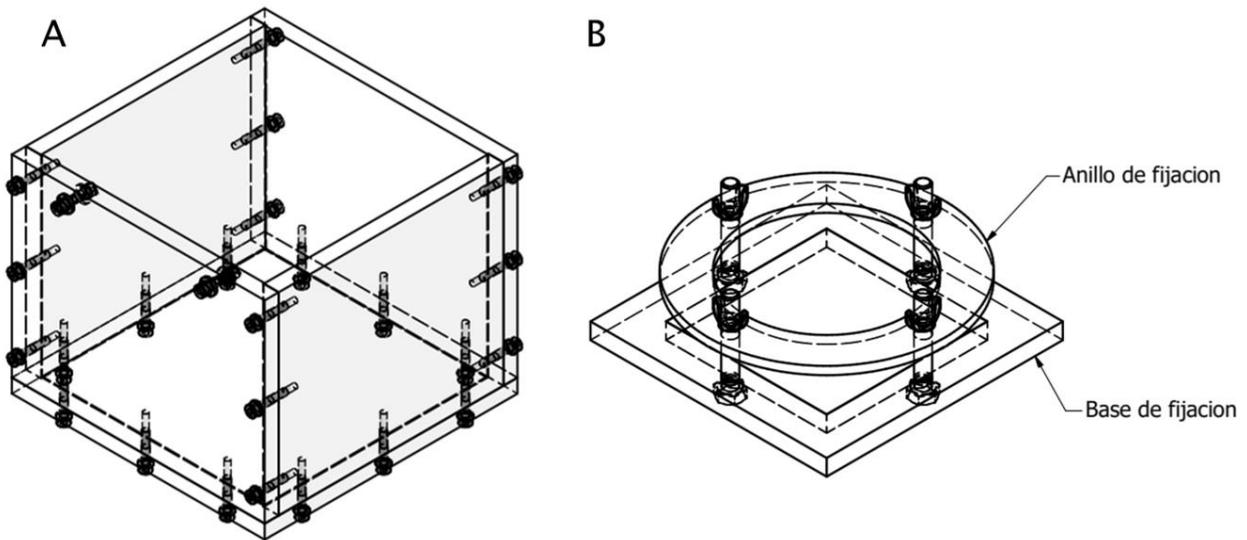


Figura 21: vistas isométricas de los conjuntos que componen la cámara de perfusión. A: Recipiente internamente impermeable por módulos. B: Sistema de fijación montado.

En la Figura 22 se puede observar la cámara de perfusión montada, donde se puede ver la vista frontal, superior, izquierda e isométrica del montaje, así como también el detalle de las funciones que cumplen algunos elementos en conjunto al estar montados. En la vista frontal se muestra el detalle “A”, zona en la que debe ir ubicada la placenta para mantenerse fija, sumergida

y accesible a las ondas ultrasónicas. En la vista superior se muestra la zona de muestreo, refiriéndose al lugar por el que se propagan las ondas ultrasónicas para encontrarse con la placenta humana ex- vivo. Mientras que en la vista izquierda se puede discriminar la parte del dibujo que corresponde al recipiente y la que corresponde al sistema de fijación. Finalmente, en la vista isométrica se pueden apreciar el total de los elementos involucrados, incluyendo la lámina de Aptflex F28 (de "Precision Acoustics Ltd") de color azul, ubicada en la cavidad cuadrada de la base del sistema de fijación.

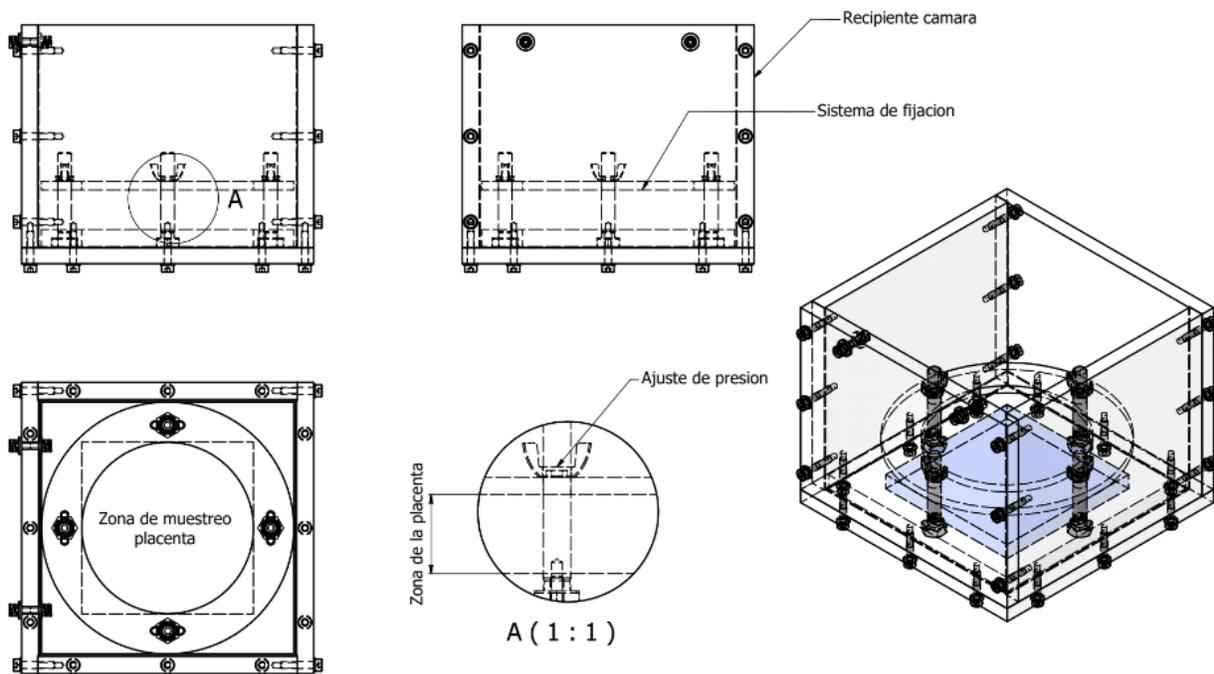


Figura 22: Planos de conjunto de la cámara de perfusión. Para acceder al resto del detalle de todas las piezas utilizadas, sus materiales largos y cantidad, consultar los planos en el anexo.

En la Figura 23 se observa el plano de desarme del sistema de fijación, en él se puede comprender como este responde a las distintas necesidades para las que fue diseñado. La primera es debido a la capacidad hundirse del sistema, siendo la pieza (1) el ancla inicial, que a su vez esta contiene el Aptflex F28 que se ve claramente en la vista isométrica de la Figura 22. Luego, la pieza (3) es la encargada de conectar la pieza (2) y la (1), las que se juntan al girar las piezas (4) funcionando como una prensa. Es así como la placenta, se ubica entre las piezas (2) y (1),

quedando sujeta, sumergida y permitiendo ubicar la placenta humana dentro, contar con un cierto margen de acceso al cotiledón, y que el tamaño sea suficiente para visualizarlo, con un orificio de 100 mm de diámetro de acceso (diámetro de un cotiledón entre 10–12 cm) (Conings et al., 2017).

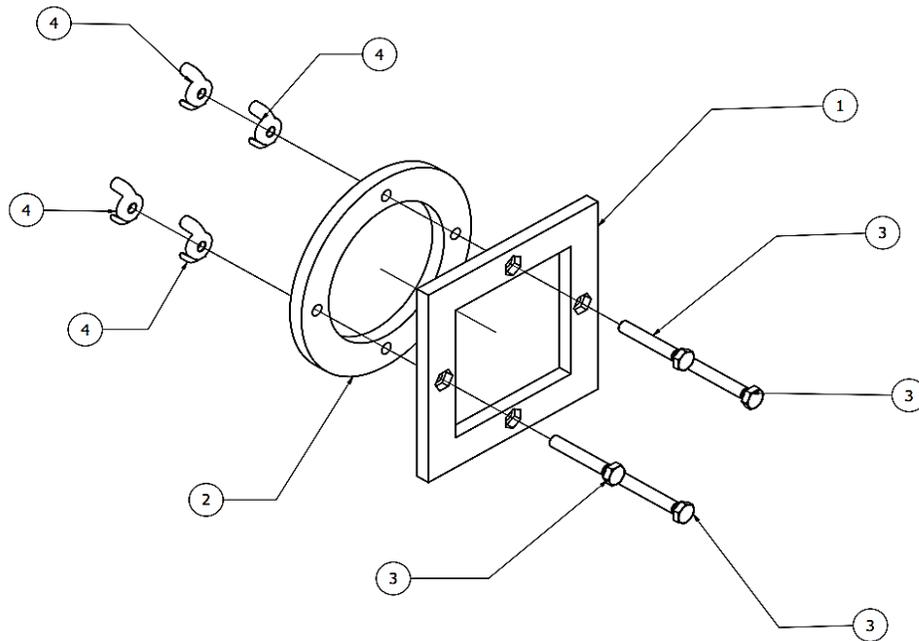


Figura 23: Plano de despiece sistema de fijación. (1) Base de sujeción con un orificio central para ubicar lamina Aptflex F28 y agujeros para pernos hexagonales con cabeza escondida. (2) Anillo de fijación con agujero central de acceso a cotiledones y agujeros periféricos para el ajuste de presión. (3) Pernos de cabeza hexagonal M8 de acero inoxidable. (4) Tuerca de ajuste de presión de mariposa para facilitar la manipulación de la presión ejercida.

En la Figura 24 se observa cómo se conecta la aguja seleccionada (21G) con el conector Luer, además de mostrar el tipo de microtubo que se conecta a la red vascular de la placenta.

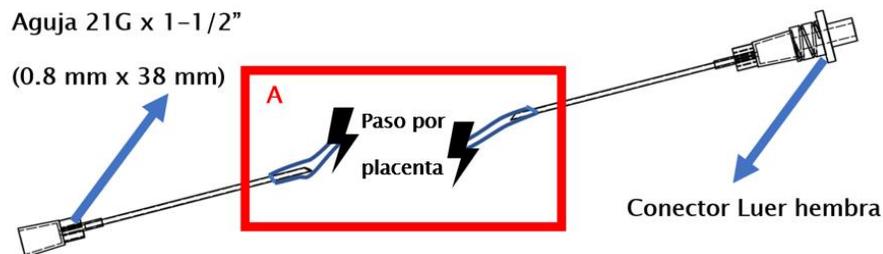


Figura 24: conexión Luer, aguja, microtubo A: Microtubo de polietileno con diámetro interno de 0.58 mm y diámetro externo de 0.965 [mm] que se conecta al cordón umbilical con la aguja para entrada y salida.

Concluyendo que este diseño responde a todos los requerimientos respondiendo a las necesidades placentarias, ultrasónicas y para la fabricación y montaje. El diseño permite que la placenta se mantenga sin contacto con gases atmosféricos una vez desgasificada, utiliza materiales que no contaminan el órgano, permite llenar la cámara de líquido PBS sin fugas, además permite introducir y maniobrar la placenta dentro de la cámara fácilmente antes de ser fijada, y debido a los conectores Luer regidos por la norma ISO 80369, es altamente compatible con las agujas del mercado, permitiendo conectar y controlar el flujo perfundido fácilmente con una bomba de infusión. En cuanto a los requerimientos ultrasónicos, la apertura del sistema de fijación y el orificio para ubicar el material que atenúa el eco, permiten la toma de datos y el paso de la onda ultrasónica. El tamaño de la cámara le permite ser introducida en la cámara de vacío para lograr obtener imágenes ultrasónicas correctamente, sin la interferencia producto del aire dentro del experimento. También el que este expuesta por la zona superior ayuda a introducir y manipular fácilmente el transductor ultrasónico. Finalmente, la implementación en el diseño de carriles, los que se pueden observar con mayor detalle en los planos 3 y 5 del anexo, ayuda a realizar correctamente el montaje, así como también los agujeros ayudan a guiar el paso del taladro en la zona correcta, para fabricar de forma fácil y rápida alguno de los módulos en caso de ruptura u otro motivo, permitiendo mantener en buen estado la cámara para ser utilizada cuando sea necesario.

Resultados objetivo específico N°2: Fabricar la cámara de perfusión

Durante la metodología de fabricación se observan resultados en tres puntos, los que se relacionan a la cortadora laser, rectificado de piezas y soldadura con cloroformo, y el montaje, sujeción de los paneles con pernos y aplicación de “goma Eva”.

En los procesos asociados a la cortadora laser “Julong”, modelo “JL-K9060”, se obtuvo que, a partir del orden de corte, el reajuste del dibujo por el material perdido durante el corte y los parámetros de potencia y velocidad utilizados, se logró un error de ± 0.07 mm en las piezas. Gracias a la solución del problema de formación de llamas, se lograron piezas mucho más

precisas al disminuir el factor de error producto del alto coeficiente de dilatación térmica. La configuración utilizada en el grabado, realizado en dos pasos, obtuvo como resultado una profundidad promedio de 0.65 mm con un error de ± 0.04 mm además de dejar un buen acabado superficial. Esta profundidad entrega a la conexión entre las piezas una tolerancia de $150 \mu m$, suficiente para introducir la goma Eva y comprimirla sin que la misma provoque problemas en el ensamblaje. En cuanto los procesos relacionados a la cortadora laser "EPILOG MINI", las dimensiones del sistema de fijación con respecto al diseño visto en los planos 8 y 9 del anexo, contaron con un error de ± 0.03 mm y un error en el ángulo entre cortes imperceptible al utilizar una escuadra. Mientras, al referirse al agujerado para la introducción de los conectores Luer, se observó que los agujeros quedaron bien centrados y permitían introducir la pieza a presión con un ajuste de -0.2 mm con respecto al diámetro del Luer introducido en el tubo de PVC (4.9 mm aproximadamente).

El proceso de rectificado de piezas se realizó en los cantos de los módulos del recipiente de la cámara, para contar con una conexión entre el canto de la pared y la base más continua, resultando en una mayor facilidad para ubicar y ensamblar las piezas entre ellas. También, en los grabados de las piezas el lijado al agua disminuyó la porosidad ayudando a la ubicación de la goma Eva. En cuanto al soldado de piezas con cloroformo, este se aplicó en la fabricación de la base del sistema de fijación, para lograr introducir pernos escondidos de cabeza hexagonal, donde esta pieza en específico se puede apreciar con sus medidas en el plano 8 del anexo, y también se aplicó este proceso de soldado en la fijación del conector Luer a la pared con grabado del recipiente, quedando totalmente fijo como una sola pieza.

Al referirse a la técnica de armado y fabricación de hilos, la metodología por esquinas ayudó a deformar manualmente el material luego de fabricar un hilo y fijar las piezas con pernos, lo que a su vez ayudó a disminuir el error entre conexiones producto del error en el ángulo de corte durante ese proceso. Finalmente, la introducción de la goma Eva en las zonas de grabado destinadas a la conexión entre módulos fue un proceso rápido y sin mayores complicaciones ya que el material es fácil de cortar y tratar, quedando correctamente adherido a las conexiones.

En la Figura 25 se observa una fotografía de la cámara de perfusión completamente montada, pudiendo observar en ella el producto final del proceso de fabricación en las conexiones con pernos Allen M4, ubicados en los distintos tipos de paredes, además de la goma Eva de color azul, correctamente ajustada entre conexiones, las conexiones Luer implementadas en la pared izquierda, y también el sistema de fijación con los pernos escondidos, conteniendo en su interior la goma "Aptflex F28" (de "Precision Acoustics Ltd") para atenuar el eco ultrasónico, encajando la totalidad de las piezas entre sí.

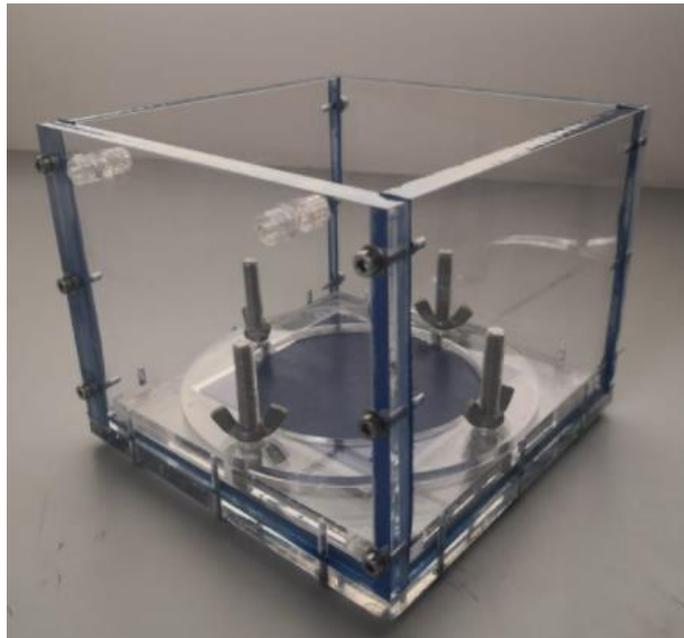


Figura 25: Cámara de perfusión fabricada internamente impermeable con su sistema de conexión Luer implementado.

Como resultado extra de la metodología de fabricación, se obtuvo que la fabricación por módulos de la cámara de perfusión, funciono correctamente. Esto demostrado debido a que, durante la manipulación de esta, una pared y la base se quebraron, entregando la necesidad de un recambio de estas piezas. Al contar con los materiales, diseños y la cortadora láser de la universidad disponible, la fabricación de las 2 piezas tardo alrededor de 2 horas, sumando la fabricación de hilos y montaje, se necesitó en total 3 horas para dejar la cámara disponible y funcional nuevamente, lo que responde perfectamente al objetivo del diseño de fabricar la cámara por módulos para maximizar su disponibilidad manteniendo su utilidad.

Resultados objetivo específico N°3 Probar características de funcionalidad fundamentales

Experimento de permeabilidad interna para el recipiente de la cámara de perfusión: El utilizar la goma Eva como sellante entre conexiones durante el experimento de impermeabilidad resulto en una nula filtración observable por distintos métodos, ya sea con papel absorbente, tacto o la vista. Destacando de este experimento que la utilización de goma Eva cumplió su función correctamente siendo un material de fácil acceso, encontrándose en la mayoría de las librerías en Chile, de manipulación segura, pudiendo darle forma ya sea con tijeras simples, cúter o incluso cortadora laser, no toxico y no reacciona con los químicos utilizados en el experimento. Aun así, es sabido que los puntos de apertado dentro de la cámara de perfusión son concentradores de esfuerzo, por lo que siempre se aconseja cambiar la goma Eva antes de aumentar la presión entre los módulos en caso de filtración, para mantener la cámara de perfusión en buen estado.

Experimento de funcionalidad sistema de fijación y flujo de conexiones: El sistema de fijación mantiene en una posición la fantoma sin causarle daño y es fácilmente ajustable y retirable gracias al sistema de tuerca de ajuste de presión de mariposa. A su vez en cuanto al flujo en las distintas configuraciones de microtubos-agujas insertados en la fantoma, se obtiene que la que ambas configuraciones permiten el flujo de líquido y no se ven obstruidas por el sistema de fijación, pero el sistema más pequeño con agujas 24G es sensible a la utilización de material particulado obstruyéndose durante su utilización. Mientras la configuración con aguja 21G (0.8 mm de diámetro interno) y microtubo de polietileno con diámetro interno 0.58 mm y diámetro externo de 0.965 [mm] no producía este problema. Permitiendo la utilización de, por ejemplo, aspirinas que se utilizan para disminuir el tamaño de los coágulos durante la preparación del experimento. Esto es sumamente importante debido a que al utilizar microburbujas la presión de perfusión no debe sobrepasar el límite de ruptura de las microburbujas de alrededor de 250 kPa (Emmer et al., 2007). Finalmente los resultados tienen un sustento experimental al ser utilizadas configuraciones con placentas perfundidas (Conings et al., 2017; Mathiesen et al.,

2010; Schneider & Huch, 1985), dejando definida esta configuración como la que se utilizara durante el montaje experimental definitivo.

Un resultado inesperado de suma importancia a destacar es las resistencias químicas del material utilizado en la fabricación de la cámara de perfusión (acrílico). Durante este experimento se agregó alcohol isopropílico al 99.9%, sustancia química que mantiene elementos orgánicos más tiempo. Debido al contacto prolongado (días) de esta sustancia química con el material, la base del sistema de fijación, que normalmente contiene el material Aptflex F28, se fisuro y quebró en dirección a las zonas más delgadas o con esquinas. Donde según la empresa “Vical acrílicos”, el acrílico es capaz de resistir el alcohol isopropílico, pero por periodos de tiempo cortos y a temperatura ambiente. Dejando como protocolo la no utilización de este químico o similares para preservar la placenta.

Resultados objetivo específico N°4: Desarrollar imágenes ultrasónicas estructurales y cuantitativas de placenta humana ex-vivo

Placenta: Durante la preparación de la placenta se logró hacer fluir el líquido PBS en el circuito vascular desde las arterias en todas las placentas recibidas, utilizando 500 miligramos de aspirina en 50 mililitros de PBS. La utilización de aspirinas con PBS como solución fibrinolítica es sumamente importante ya que el lograr la perfusión placentaria con líquido PBS antes de la desgasificación, ayuda a identificar el estado de la red vascular y que al llenar los vasos sanguíneos de PBS las paredes de estos se mantuvieron abiertas durante la desgasificación.

Luego del proceso de desgasificación no se observaron problemas relacionados con la red vascular de la placenta funcionando correctamente oponiendo la misma resistencia notada durante su tratamiento previo. Manteniendo presumiblemente sus propiedades físicas y mecánicas, y dejándola en condiciones propicias para su visualización con técnicas ultrasónicas

Tratamiento y formación de imágenes ultrasónicas Doppler: En la Figura 26 se observan dos tipos de imágenes B-mode distintas, donde las imágenes A y B corresponden a la imagen B-mode convencional para caudales de 4 ml/min y 9.5 ml/min respectivamente. En esta se observa tejido

placentario y presumiblemente cavidades que corresponden a vasos sanguíneos. Mientras que las imágenes C y D corresponden a imágenes B-mode filtradas para los mismos caudales respectivos. El filtro aplicado se denomina de valor singular, que se encarga de eliminar los pixeles que cambian su luminosidad muy lentamente entre un fotograma y otro, y mantiene los que la cambian más rápido. Entregando la delimitación y ubicación de vasos sanguíneos. Observando las imágenes filtradas se logran identificar 3 posibles vasos sanguíneos en la zona analizada de la placenta, done el posible vaso de mayor diámetro, ubicado en la parte superior de la imagen, corresponde a un vaso umbilical debido a la ubicación del transductor durante la toma de datos. Al comparar la Figura 26 D con la C se observa una variación en la luminosidad de las zonas correspondientes a flujo, dando a entender la visible correlación entre el caudal y la visibilidad de la zona, Donde si bien la imagen filtrada solo obtiene las zonas con mayor variación en su luminosidad, esta es importante durante la generación de las figuras siguientes.

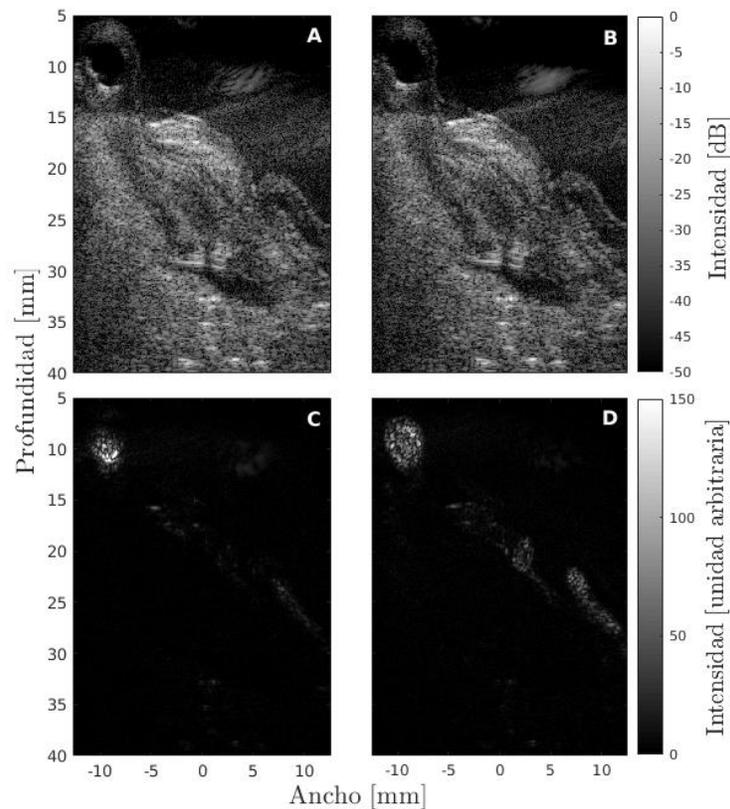


Figura 26: Imágenes B-mode utilizando como liquido de perfusión PBS con sangre del paciente. A: Imagen convencional del flujo de 4 [ml/min]. B: Imagen convencional de flujo de 9.5 [ml/min]. C: Imagen filtrada del flujo de 4 [ml/min]. D: Imagen filtrada del flujo de 9,5 [ml/min].

Para la obtención de la Figura 27 se utilizaron los datos de V_{α} y $V_{-\alpha}$ para los ángulos -5° y 5° obtenidos de la implementación del algoritmo para la generación de imágenes Doppler basado en la autocorrelación. Estas matrices de velocidad se ubicaron sobre la imagen B-mode convencional para ver una primera aproximación de las velocidades del flujo en su zona estructural. Para hacer esta superposición, se implementó la matriz de datos B-mode filtrados, los que se transforman en una matriz de datos binarios, con un valor uno si el pixel cuenta con información y cero en caso contrario, funcionando como una “máscara”, que ayuda a visualizar solo los datos de velocidad en las zonas de movimiento, luego se aplica una transparencia a todos los datos iguales a cero y se graficaron ambas imágenes juntas, obteniendo el arreglo de 4 imágenes en la Figura 26.

En las imágenes A y B se observan las velocidades V_{α} y $V_{-\alpha}$ para un caudal de 4 ml/min, mientras que en las imágenes C y D se observan las mismas velocidades, pero para un caudal de 9.5 ml/min. Esta variación en el caudal se puede ver reflejada en el tamaño de los vasos sanguíneos, donde el vaso central tiene una zona de movimiento notablemente más pequeña en el experimento mostrado en la zona superior de la Figura 26. También, se puede notar en las imágenes C y D, una mayor claridad en los colores del flujo central del vaso sanguíneo superior, mostrando el cumplimiento de la condición de no deslizamiento (Yunus A. Cengel et Al., 2006) y la existencia de un perfil de velocidades dentro del vaso sanguíneo.

Los colores utilizados en la gráfica corresponden a colores de imágenes ultrasónicas convencionales normales, donde los colores desde azules a celestes se les dan a los flujos que está en una dirección contraria a la ubicación del transductor ultrasónico, mientras los colores desde rojos hasta amarillo se dan a flujos que se están acercando al transductor ultrasónico.

Si bien las velocidades de esta primera iteración corresponden a velocidades en perspectiva desde un ángulo, al no cambiar con el ángulo contrario se espera que las direcciones del flujo no cambien, con lo que es posible saber que vasos corresponden a venas o arterias aun cuando existe un poco de ruido representado por los colores amarillos.

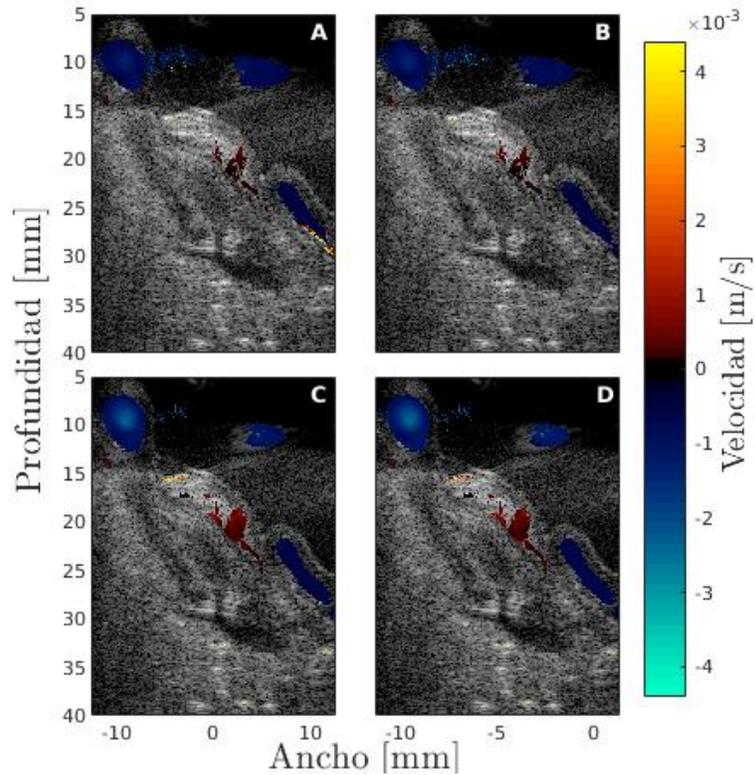


Figura 27: Imágenes de la velocidad en los ángulos extremos $-\alpha$ y positivo con colores de imagen de ultrasonido Doppler. A: Imagen de la velocidad percibida en el ángulo negativo del flujo de 4 [ml/min]. B: Imagen de la velocidad percibida en el ángulo $+\alpha$ del flujo de 4 [ml/min]. C: Imagen de la velocidad percibida en el ángulo $-\alpha$ del flujo de 9,5 [ml/min]. D: Imagen de la velocidad percibida en el ángulo $+\alpha$ del flujo de 9,5 [ml/min].

En la Figura 28 se grafican los datos del módulo de la velocidad y las direcciones del flujo obtenido a partir de 7 ángulos, utilizando las velocidades por componente calculadas con las ecuaciones (7) y (8). Esta información se superpone en la imagen B-mode convencional utilizando la misma técnica explicada en la figura anterior. En la Figura 28 las imágenes A y B corresponden al módulo de la velocidad y las direcciones de la velocidad respectivamente, esto para el caudal de 4 ml/min, en el caso de las imágenes C y D cuentan con la misma información, pero para un caudal de 9.5 ml/min. Al ser un cálculo de la velocidad a partir de distintas perspectivas, las velocidades y direcciones contenidas en la Figura 28, cuentan con datos más representativos de lo que está pasando dentro del flujo sanguíneo obtenidos del promedio de cada pixel en los

distintos pares de ángulos luego del proceso descrito en el último párrafo de la metodología del 4to objetivo.

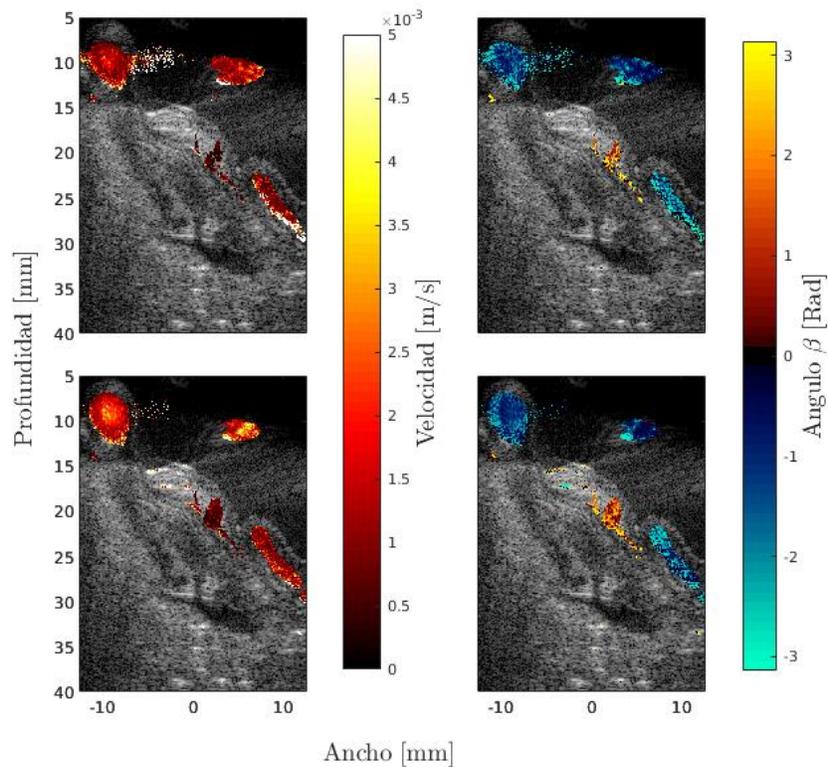


Figura 28: Imágenes de perfusión de PBS con sangre del paciente. A: Imagen del módulo de la velocidad del flujo de 4 [ml/min]. B: Imagen de las direcciones de flujo de 9.5 [ml/min]. C: Imagen filtrada por variación de intensidad del flujo de 4 [ml/min]. D: Imagen filtrada por variación de intensidad del flujo de 9,5 [ml/min].

Al comprender la correspondencia de las barras de color en la Figura 28 se observa una velocidad mayor el experimento correspondiente a un caudal mayor además de una nula variación en las direcciones del flujo. En la Figura 28 zona derecha, la barra de color indica la dirección en radianes de los distintos cuadrantes del plano cartesiano. Obteniendo una mayor certeza en las direcciones del flujo sanguíneo e identificando que vasos corresponden a venas o arterias respectivamente. Adicionalmente si observamos la zona cercana al vaso superior se puede identificar la presencia de otro vaso pequeño en dirección contraria.

La Figura 29 representa la condensación de los datos de dirección con los datos del módulo de la velocidad, y corresponde a una imagen ultrasónica Doppler utilizando 7 ángulos y 500 cuadros. Para concentrar esta información se transformó la matriz de direcciones en una

matriz binaria con valores $[-1, 1]$ y multiplicándola por el módulo de la velocidad. En la Figura 29 A y B se ve el comportamiento de la velocidad y dirección de un flujo perfundido de 4 ml/min y 9.5 ml/min respectivamente.

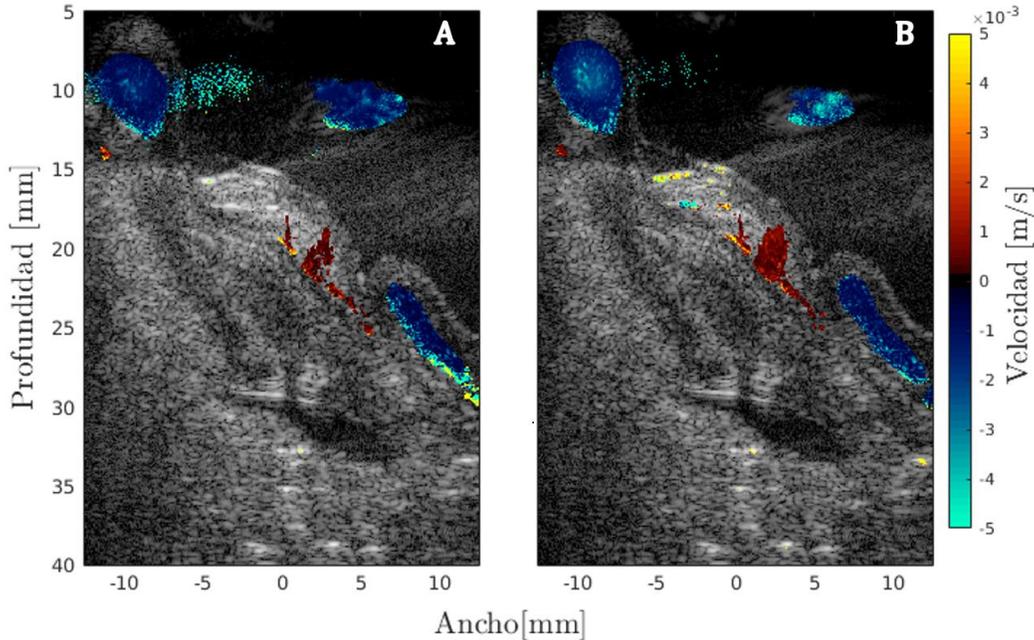


Figura 29: Imagen de ultrasonido Doppler con 7 ángulos. A: caudal de 4 [ml/min]. B: caudal de 9.5 [ml/min].

Al observar la Figura 29 se pueden identificar en la arteria superior píxeles de una velocidad mínima cercana a los 5 mm/s, valor por sobre el rango estimado de la mínima velocidad detectada por el efecto Doppler en la ecuación (4) lo que es un buen indicador de datos menos ruidosos y da pie a buscar como varia la velocidad promedio en los distintos vasos sanguíneos.

En la Figura 30 se destacan 3 vasos sanguíneos “A”, “B” y “C” restringidos por un recuadro, este recuadro indica la zona utilizada para calcular la velocidad promedio del flujo perfundido en la placenta. El cálculo se realizó para los 10 caudales diferentes, dando un total de 10 puntos con los que se construye la gráfica del lado derecho de la Figura 30. En esta grafica se observa como varia la velocidad del fluido dentro del vaso sanguíneo con respecto al caudal impuesto, donde se muestran tres rectas que corresponden a la regresión lineal de los datos. Obtenido la ecuación $y = (120 \pm 70)x + (720 \pm 500)$ para la arteria A, la ecuación $y = (15 \pm 40)x + (780 \pm 320)$ para la arteria B y la ecuación $y = (46 \pm 50)x + (350 \pm 370)$ para la vena C. observando en todos los casos

una tendencia positiva en la pendiente de la variación del módulo de la velocidad con respecto al caudal impuesto

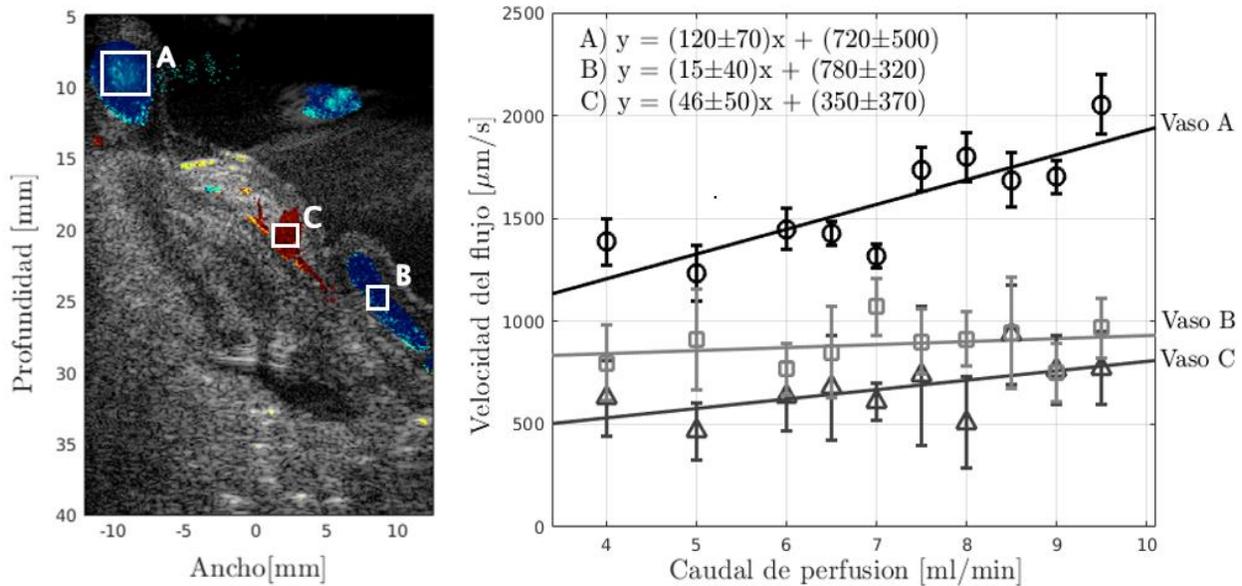


Figura 30: Calculo de la velocidad promedio de los vasos sanguineos A, B y C con sus respectivas lineas de error a lo largo de los dias caudales diferentes, con la regresion lineal de la tendencia de los datos para cada caso.

Si se analizan los datos de velocidad de cada vena y su variación con respecto al caudal mostrados en la Figura 30 es posible concluir, que si bien, la aproximación lineal cuenta con mucho error, existe una correlación entre el cambio del caudal con la velocidad observada con el efecto Doppler. Calculando que, la arteria A tiene un error en su pendiente del 58.3%, la arteria B un error en la pendiente del 266,6%, y la vena C con un error en la pendiente de 111,1%. Esto es esperable debido al tamaño de los vasos y a que el rango de velocidades obtenidas está por debajo del mínimo estimado con la ecuación (4). Esto indica que a velocidades tan bajas es normal encontrarse con mucho ruido. Si se analiza la arteria A, es posible notar que su velocidad es siempre mayor a las velocidades implicadas en los otros vasos sanguíneos, lo que podría explicar la diferencia en el error debido a la sensibilidad del método. En esta misma arteria también se puede observar que tiene una correlación lineal muy cercana a la proporcionalidad del aumento del caudal, donde el aumento del caudal al doble responde en dicha arteria en un aumento en su velocidad casi al doble, lo que se puede entender debido a la elasticidad de las paredes y el

aumento de su diámetro. Finalmente se concluyó que los datos obtenidos de la placenta perfundida en la cámara de perfusión, entrega datos útiles para la formación de imágenes ultrasónicas Doppler, y el error asociado en la gráfica corresponde a un error asociado al estado de la técnica de las imágenes ultrasónicas Doppler, que normalmente no captan velocidades tan bajas.

Conclusión

Lograr el desarrollo de una cámara de perfusión para placenta humana ex-vivo, compatible con estudios ultrasónicos, que tenga una alta mantenibilidad y fácil reparación, supone una parte fundamental en el estudio ultrasónico de las características vasculares del órgano. Esto se logró desarrollando una cámara que responde a las distintas problemáticas para la aplicación del ultrasonido expuestas en esta tesis, logrando un sistema de fácil montaje experimental, que permite conectar los microtubos sin mayores complicaciones en la red vascular, así como a la bomba de infusión. La facilidad y simpleza del montaje experimental con este sistema ayuda a minimizar la posibilidad de cometer algún error durante este proceso, lo que se traduce en una disminución la posibilidad de problemas posteriores en la toma de datos debido a errores durante el montaje experimental. Además, su diseño, forma y tamaño contribuye en las fases previas para la preparación del órgano, dando la posibilidad de desgasificar el sistema montado, haciendo que no sea necesario volver a exponer la placenta en ningún momento a gases atmosféricos antes de la toma de datos.

Al referirse a este trabajo de tesis de forma general, el desarrollo de la cámara de perfusión se realizó como un procedimiento iterativo en cada fase, agregando mejoras, para asegurar la funcionalidad de la cámara en el estudio funcional y estructural de la red vascular de placenta humana ex-vivo. Donde dicha metodología resultó en el éxito de la totalidad de los objetivos propuestos para su desarrollo.

Como conclusiones específicas con respecto al mantenimiento y reparaciones de la cámara, la implementación de un sistema por módulos para dar posibilidad al cambio de piezas supero todas las expectativas. Donde los módulos en caso de ruptura solo tardan en promedio 1,5 horas en fabricarse e implementarse. Además, el mantenimiento de las conexiones entre piezas al ser goma Eva es sumamente fácil de fabricar, requiriendo un recambio en caso de fuga o cada dos semanas si se utiliza todos los días.

Finalmente, luego del análisis de los datos y la visualización de las figuras que los representan, se concluye la funcionalidad de la cámara de perfusión para la implementación de

técnicas de ultrasonografía, pudiendo desarrollar imágenes estructurales B-mode, e imágenes funcionales Doppler a partir de los datos recolectados durante su utilización.

Con respecto a perspectivas futuras, se apunta a la implementación de esta cámara para la obtención de imágenes de super resolución a partir de la técnica ULM, pudiendo hacer imágenes y análisis del total de la red vascular placentaria fetal. También es posible ampliar la aplicabilidad de la cámara para ambas zonas de la placenta (materna y fetal), donde para acercarse más al experimento a la realidad se podría controlar la temperatura a la que se encuentra la cámara de perfusión y controlar otro tipo de parámetros durante esta, tales como, la presión ejercida o conocer el perfil de velocidades a lo ancho de una sola vena.

Concluyendo en una cámara que puede ser extrapolable a distintos estudios dentro de la ultrasonografía, desarmable a la que se le pueden implementar variaciones o modificaciones modulares en caso de necesitarse la perfusión de un órgano distinto, manteniendo las características de funcionalidad.

Referencias

- Alcázar, J. L., Arribas, S., Mínguez, J. A., & Jurado, M. (2014). The Role of Ultrasound in the Assessment of Uterine Cervical Cancer. *The Journal of Obstetrics and Gynecology of India*, *64*(5), 311–316. <https://doi.org/10.1007/s13224-014-0622-4>
- Baad, M., Lu, Z. F., Reiser, I., & Paushter, D. (2017). Clinical Significance of US Artifacts. *RadioGraphics*, *37*(5), 1408–1423. <https://doi.org/10.1148/rg.2017160175>
- Betzig, E., Patterson, G. H., Sougrat, R., Lindwasser, O. W., Olenych, S., Bonifacino, J. S., Davidson, M. W., Lippincott-Schwartz, J., & Hess, H. F. (2006). Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1127344>
- Bonilla-Musoles, F., Raga, F., Castillo, J., Jr, F., Climent, M., & Caballero, O. (2013). High Definition Real-Time Ultrasound (HDLive) of Embryonic and Fetal Malformations before Week 16. *Donald School Journal of Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, *7*, 1–8. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10009-1266>
- Chandraratna, P. A. (1991). Echocardiography and Doppler ultrasound in the evaluation of pericardial disease. *Circulation*, *84*(3 Suppl), I303–10.
- Choi, Y., Lee, J.-R., Kang, D., & Flynn, E. B. (2015). *Delay-and-Sum Beamforming Technique on Ultrasonic Propagation Imaging System*. 4.
- Chong, W. K., Papadopoulou, V., & Dayton, P. A. (2018). Imaging with ultrasound contrast agents: Current status and future. *Abdominal Radiology*, *43*(4), 762–772. <https://doi.org/10.1007/s00261-018-1516-1>

- Conings, S., Amant, F., Annaert, P., & Van Calsteren, K. (2017). Integration and validation of the ex vivo human placenta perfusion model. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, *88*, 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2017.05.002>
- Controles prenatales / Chile Crece Contigo*. (s. f.). Recuperado 13 de enero de 2022, de <https://www.crececontigo.gob.cl/tema/controles-prenatales/>
- Couture, O., Aubry, J.-F., Montaldo, G., Tanter, M., & Fink, M. (2008). Suppression of tissue harmonics for pulse-inversion contrast imaging using time reversal. *Physics in Medicine and Biology*, *53*(19), 5469–5480. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/53/19/013>
- Couture, O., Hingot, V., Heiles, B., Muleki-Seya, P., & Tanter, M. (2018). Ultrasound Localization Microscopy and Super-Resolution: A State of the Art. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, *65*(8), 1304–1320. <https://doi.org/10.1109/TUFFC.2018.2850811>
- Dayton, P., & Rychak, J. J. (2007). *Molecular ultrasound imaging using microbubble contrast agents*. (23.^a ed., Vol. 12). Front Biosci.
- D’Errico, J. N., Fournier, S. B., & Stapleton, P. A. (2019). Ex Vivo Perfusion of the Rodent Placenta. *Journal of visualized experiments: JoVE*, *147*, 10.3791/59412. <https://doi.org/10.3791/59412>
- Emanuel, E. J., Grady, C., Crouch, R. A., Lie, R. K., Miller, F. G., & Wendler, D. (2008). *The Oxford Textbook of Clinical Research Ethics*. OUP USA.

- Emmer, M., van Wamel, A., Goertz, D. E., & de Jong, N. (2007). The Onset of Microbubble Vibration. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 33(6), 941–949. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2006.11.004>
- Errico, C., Pierre, J., Pezet, S., Desailly, Y., Lenkei, Z., Couture, O., & Tanter, M. (2015). Ultrafast ultrasound localization microscopy for deep super-resolution vascular imaging. *Nature*, 527(7579), 499–502. <https://doi.org/10.1038/nature16066>
- Fedele, L., Bianchi, S., Dorta, M., Arcaini, L., Zanotti, F., & Cannelli, S. (1992). Transvaginal ultrasonography in the diagnosis of diffuse adenomyosis**Presented at the 47th Annual Meeting of The American Fertility Society, Orlando, Florida, October 19 to 25, 1991. *Fertility and Sterility*, 58(1), 94–97. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)55142-5](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)55142-5)
- Fernández Domínguez, J., Martínez Sánchez, P., García Rodríguez, R., Mateos Marcos, V., & Valdueza, J. M. (2012). El eco-doppler color transcraneal en el estudio vascular cerebral. *Neurología Argentina*, 4(3), 132–143. <https://doi.org/10.1016/j.neuarg.2012.02.002>
- Garcia, D. (2021). Make the most of MUST, an open-source Matlab UltraSound Toolbox. 2021 *IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS)*, 1–4. <https://doi.org/10.1109/IUS52206.2021.9593605>
- García Fernández MA, Azcarate P, & Gómez de Diego JJ. (s. f.). *El Ecocardiograma para el Nefrólogo*. Recuperado 29 de diciembre de 2021, de <https://www.nefrologiaaldia.org/388>

- Gennisson, J.-L., Deffieux, T., Fink, M., & Tanter, M. (2013). Ultrasound elastography: Principles and techniques. *Diagnostic and Interventional Imaging*, *94*(5), 487–495. <https://doi.org/10.1016/j.diii.2013.01.022>
- González G, R., Vásquez M, R., & Fernández R, B. (2003). EVALUACION DEL SUBPROGRAMA DE ECOGRAFIA PRECOZ, DECENIO 1992–2001 SERVICIO METROPOLITANO SUR. *Revista chilena de obstetricia y ginecología*, *68*(3), 221–228. <https://doi.org/10.4067/S0717-75262003000300005>
- Halliwell, M. (2000). Doppler Ultrasound: Physics, Instrumentation and Signal Processing (Second Edition). *Physiological Measurement*, *21*(3), 425–426. <https://doi.org/10.1088/0967-3334/21/3/702>
- Hell, S. W., & Wichmann, J. (1994). Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: Stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics Letters*, *19*(11), 780–782. <https://doi.org/10.1364/OL.19.000780>
- Huppertz, B. (2008). The anatomy of the normal placenta. *Journal of Clinical Pathology*, *61*(12), 1296–1302. <https://doi.org/10.1136/jcp.2008.055277>
- Ilovitsh, T., Ilovitsh, A., Foiret, J., Fite, B. Z., & Ferrara, K. W. (2018). Acoustical structured illumination for super-resolution ultrasound imaging. *Communications Biology*, *1*, 3. <https://doi.org/10.1038/s42003-017-0003-5>
- Jeong, W. K., Lim, H. K., Lee, H.-K., Jo, J. M., & Kim, Y. (2014). Principles and clinical application of ultrasound elastography for diffuse liver disease. *Ultrasonography*, *33*(3), 149–160. <https://doi.org/10.14366/usg.14003>

- Kamath, D. G., & Umesh Nayak, S. (2014). Detection, removal and prevention of calculus: Literature Review. *The Saudi Dental Journal*, 26(1), 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2013.12.003>
- Kierski, T. M., Espíndola, D., Newsome, I. G., Cherin, E., Yin, J., Foster, F. S., Démoré, C. E. M., Pinton, G. F., & Dayton, P. A. (2020). Superharmonic Ultrasound for Motion-Independent Localization Microscopy: Applications to Microvascular Imaging From Low to High Flow Rates. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, 67(5), 957–967. <https://doi.org/10.1109/TUFFC.2020.2965767>
- Kripfgans, O. D., Rubin, J. M., Hall, A. L., & Fowlkes, J. B. (2006). Vector Doppler imaging of a spinning disc ultrasound Doppler phantom. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 32(7), 1037–1046. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2006.04.007>
- Lin, F., Shelton, S. E., Espíndola, D., Rojas, J. D., Pinton, G., & Dayton, P. A. (2017). 3-D Ultrasound Localization Microscopy for Identifying Microvascular Morphology Features of Tumor Angiogenesis at a Resolution Beyond the Diffraction Limit of Conventional Ultrasound. *Theranostics*, 7(1), 196–204. <https://doi.org/10.7150/thno.16899>
- Madiseti, V. (2018). *Wireless, Networking, Radar, Sensor Array Processing, and Nonlinear Signal Processing*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781315219844>
- Mathiesen, L., Mose, T., Mørck, T. J., Nielsen, J. K. S., Nielsen, L. K., Maroun, L. L., Dziegiel, M. H., Larsen, L. G., & Knudsen, L. E. (2010). Quality assessment of a placental perfusion protocol. *Reproductive Toxicology*, 30(1), 138–146. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.01.006>

- Matrone, G., Savoia, A. S., Caliano, G., & Magenes, G. (2015). The Delay Multiply and Sum Beamforming Algorithm in Ultrasound B-Mode Medical Imaging. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 34(4), 940–949. <https://doi.org/10.1109/TMI.2014.2371235>
- Morgan-Ortiz, F., Morgan-Ruiz, F. V., Quevedo-Castro, E., & Báez-Barraza, J. (2015). *Anatomía y fisiología de la placenta y líquido amniótico*. 5(4), 9.
- MOSCOSO GALLARDO, K. Cristhiank. (2020). “*APROVECHAMIENTO DEL RESIDUO INDUSTRIAL ETIL VINIL ACETATO EVA PARA SU USO EFICIENTE COMO MATERIAL INSONORIZANTE DE RUIDO AMBIENTAL Y OCUPACIONAL*”. 14.
- Mulvana, H., Browning, R. J., Luan, Y., de Jong, N., Tang, M.-X., Eckersley, R. J., & Stride, E. (2017). Characterization of Contrast Agent Microbubbles for Ultrasound Imaging and Therapy Research. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, 64(1), 232–251. <https://doi.org/10.1109/TUFFC.2016.2613991>
- Nomiyama, M., Toyota, Y., & Kawano, H. (1998). Antenatal diagnosis of velamentous umbilical cord insertion and vasa previa with color Doppler imaging. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 12(6), 426–429. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0705.1998.12060426.x>
- Oglat, A. A., Matjafri, M. Z., Suardi, N., Oqlat, M. A., Abdelrahman, M. A., & Oqlat, A. A. (2018). A Review of Medical Doppler Ultrasonography of Blood Flow in General and Especially in Common Carotid Artery. *Journal of Medical Ultrasound*, 26(1), 3–13. https://doi.org/10.4103/JMU.JMU_11_17
- Opacic, T., Dencks, S., Theek, B., Piepenbrock, M., Ackermann, D., Rix, A., Lammers, T., Stickeler, E., Delorme, S., Schmitz, G., & Kiessling, F. (2017). *Super-Resolution Ultrasound Bubble*

Tracking for Preclinical and Clinical Multiparametric Tumor Characterization (p. 203935).

<https://doi.org/10.1101/203935>

Panigel, M. (1962). Placental perfusion experiments. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, *84*(11), 1670–1683. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(62\)90009-1](https://doi.org/10.1016/0002-9378(62)90009-1)

Panigel, M., Pascaud, M., & Brun, J. L. (1967). [Radioangiographic study of circulation in the villi and intervillous space of isolated human placental cotyledon kept viable by perfusion]. *Journal De Physiologie*, *59*(1 Suppl), 277.

Paola Paolinelli, G. (2013). Principios físicos e indicaciones clínicas del ultrasonido doppler. *Revista Médica Clínica Las Condes*, *24*(1), 139–148. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(13\)70139-1](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(13)70139-1)

Pinedo, J., Espinoza, M., Días, J., Trelles, J., Maradiegue, E., & Gonzáles, C. (1994). Diagnóstico prenatal de anomalías congénitas por ultrasonido. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*, *40*(1), 45–48. <https://doi.org/10.31403/rpgo.v40i1654>

Prada, C., Manneville, S., Spoliansky, D., & Fink, M. (1996). Decomposition of the time reversal operator: Detection and selective focusing on two scatterers. *The Journal of the Acoustical Society of America*, *99*(4), 2067–2076. <https://doi.org/10.1121/1.415393>

Prieto Gómez, R., Matamala, F., & Rojas, M. (2008). Características Morfológicas y Morfométricas de la Placenta de Término, en Recién Nacidos Pequeños para la Edad Gestacional (PEG) en la Ciudad de Temuco–Chile. *International Journal of Morphology*, *26*(3). <https://doi.org/10.4067/S0717-95022008000300017>

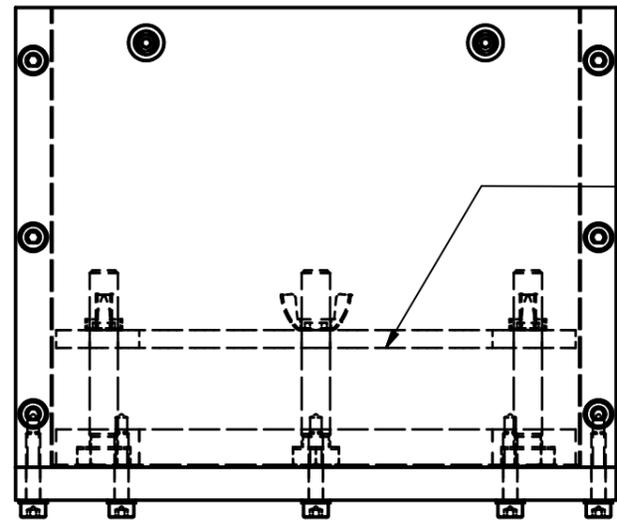
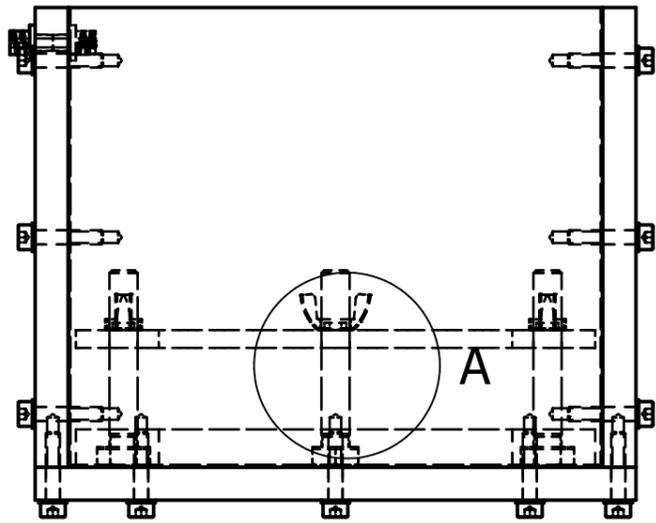
- Roa, I., Smok S, C., & Prieto G, R. (2012). Placenta: Anatomía e Histología Comparada. *International Journal of Morphology*, 30(4), 1490–1496. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022012000400036>
- Salirrosas, V. B. S., Armborgo, J. S., & Mostacero, M. L. (2005). Clinical correlation, ecographic and levels of prostate specific antigen in patients with prostate cancer. *Acta chirurgica iugoslavica*, 52(4), 13–17.
- Schneider, H., & Huch, A. (1985). Dual in vitro Perfusion of an Isolated Lobe of Human Placenta: Method and Instrumentation. *In Vitro Perfusion of Human Placental Tissue*, 13, 40–47. <https://doi.org/10.1159/000410668>
- Schneider, H., Panigel, M., & Dancis, J. (1972). Transfer across the perfused human placenta of antipyrine, sodium, and leucine. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 114(6), 822–828. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(72\)90909-X](https://doi.org/10.1016/0002-9378(72)90909-X)
- Segura Grau, A., Valero López, I., Díaz Rodríguez, N., & Segura Cabral, J. M. (2016). Ecografía hepática: Lesiones focales y enfermedades difusas. *Medicina de Familia. SEMERGEN*, 42(5), 307–314. <https://doi.org/10.1016/j.semerg.2014.10.012>
- Sun, J., & Hynynen, K. (1998). Focusing of therapeutic ultrasound through a human skull: A numerical study. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 104(3), 1705–1715. <https://doi.org/10.1121/1.424383>
- Szabo, T. L. (2004). *Diagnostic Ultrasound Imaging: Inside Out*. Academic Press.

- Tanter, M., & Fink, M. (2014). Ultrafast imaging in biomedical ultrasound. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, 61(1), 102–119.
<https://doi.org/10.1109/TUFFC.2014.2882>
- Tourin, A., Derode, A., & Fink, M. (1999). Dynamic time reversal of randomly backscattered acoustic waves. *Europhysics Letters*, 47(2), 175. <https://doi.org/10.1209/epl/i1999-00369-6>
- Wang, Y. (2010). Vascular Biology of the Placenta. *Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function*, 2(1), 1–98.
<https://doi.org/10.4199/C00016ED1V01Y201008ISP009>
- Web, S. (s. f.). *Técnica Doppler*. Ecocardio.com. Recuperado 5 de enero de 2022, de <https://ecocardio.com/documentos/manual-ecocardiografia-basica/1155-tecnica-doppler.html>
- Wells, P. N. T. (1999). Ultrasonic imaging of the human body. *Reports on Progress in Physics*, 62(5), 671–722. <https://doi.org/10.1088/0034-4885/62/5/201>
- Zabel, R. R., Bär, C., Ji, J., Schultz, R., Hammer, M., Groten, T., Schleussner, E., Morales-Prieto, D. M., Markert, U. R., & Favaro, R. R. (2021). Enrichment and characterization of extracellular vesicles from ex vivo one-sided human placenta perfusion. *American Journal of Reproductive Immunology*, 86(2), e13377. <https://doi.org/10.1111/aji.13377>
- Yunus A. Cengel, Cimbala, J. M., & Sknarina, S. F. (2006). *Mecánica de fluidos: fundamentos y aplicaciones*. McGraw-Hill Interamericana.

Anexos

Página en blanco debido al proceso de unión de PDF para mantener la calidad y tamaño del dibujo vectorial en los planos.

(1:2)



Recipiente camara

Sistema de fijacion

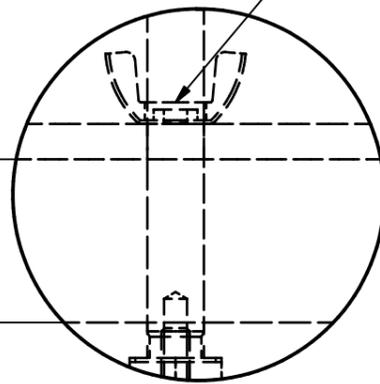
A



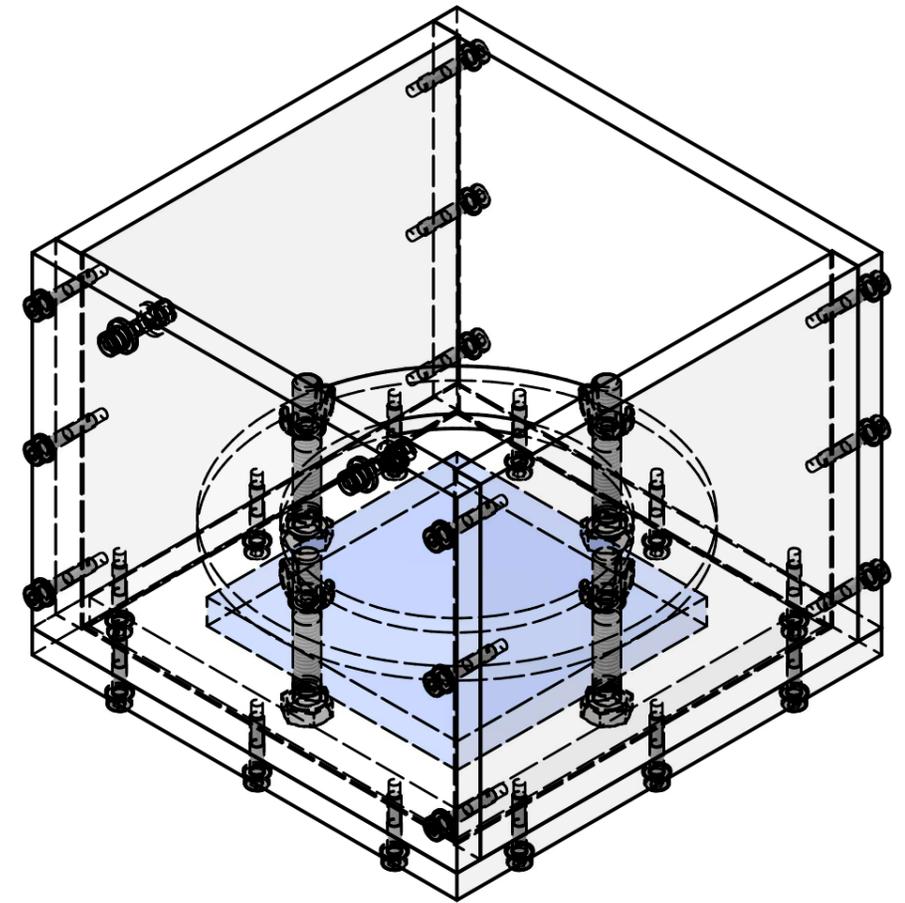
Zona de muestreo placenta

Zona de la placenta

Ajuste de presion



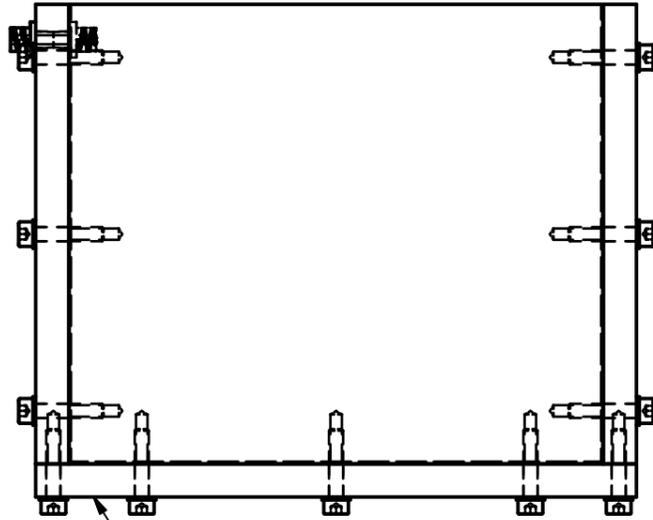
A (1:1)



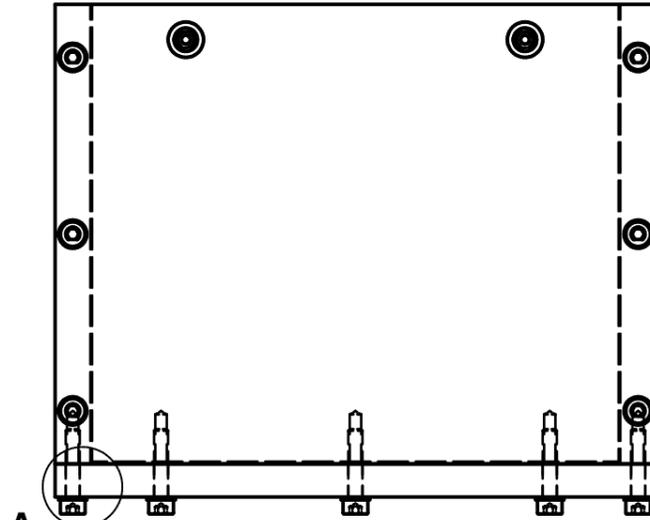
LISTA DE PARTES

CANT.	NOMBRE	DESCRIPCION		
1	Recipiente de perfusion	Ver detalle en lamina 2/9		
1	Sistema de fijacion	Ver detalle en lamina 7/9		
INSTITUTO DE	DIBUJADO POR:	APROBADO POR:	FECHA	
Ciencias de la Ingeniería	Gabriel Ignacio Maureira Bravo	Domingo Julian Fabres	04-02-2022	
		REVISADO POR:	Camara de perfusion	
		Domingo Julian Fabres	ESCALA	Nº PLANO
 Universidad de O'Higgins		Gabriel Ignacio Maureira Bravo	Indicada en el plano	1 / 9

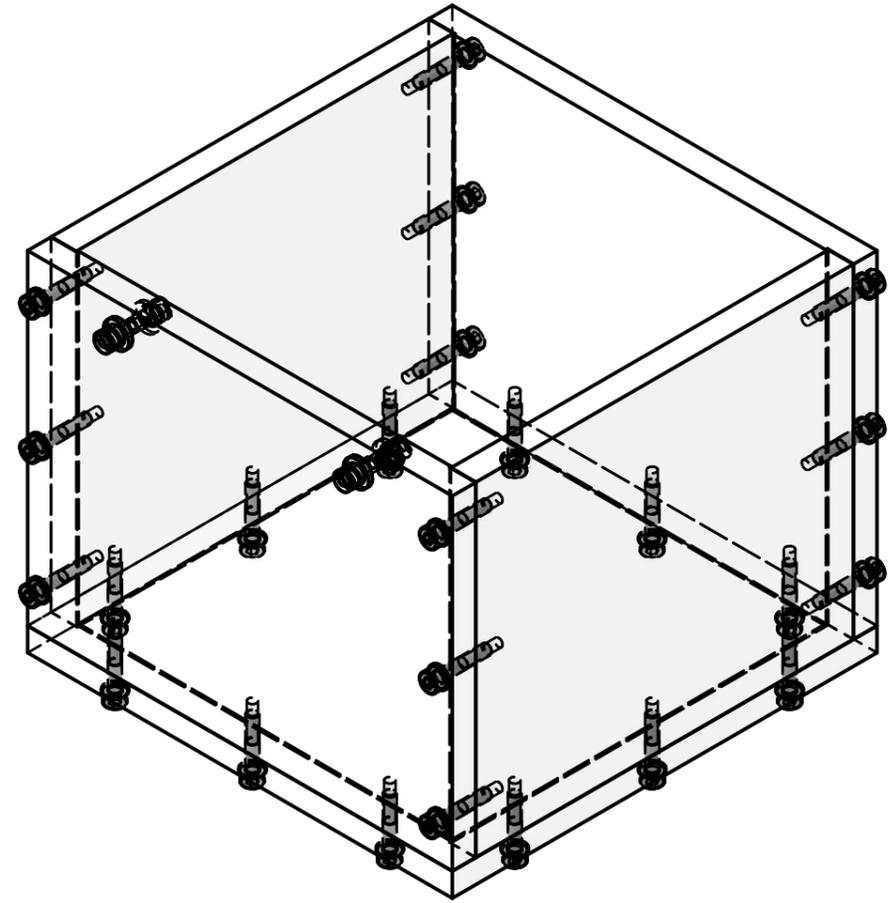
(1:2)



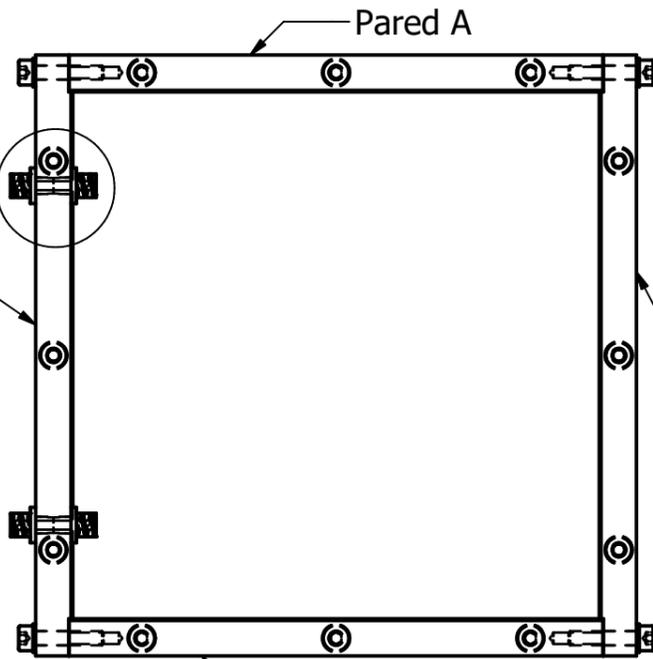
Base recipiente



A

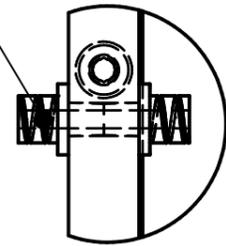


B (1:1)



Pared A

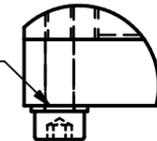
Conector tipo Luer hembra



Pared B

A (1:1)

Golilla M4 acero inoxidable

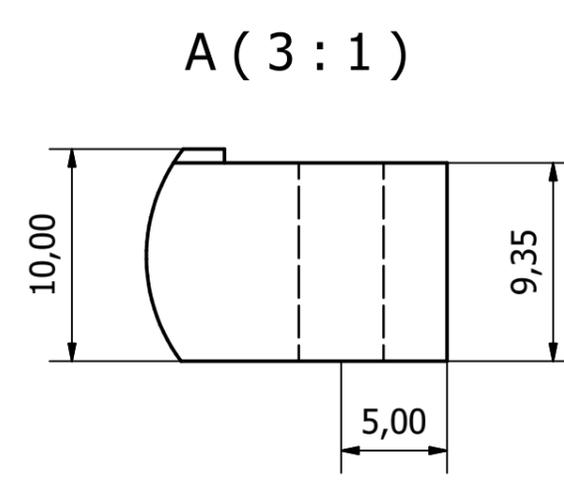
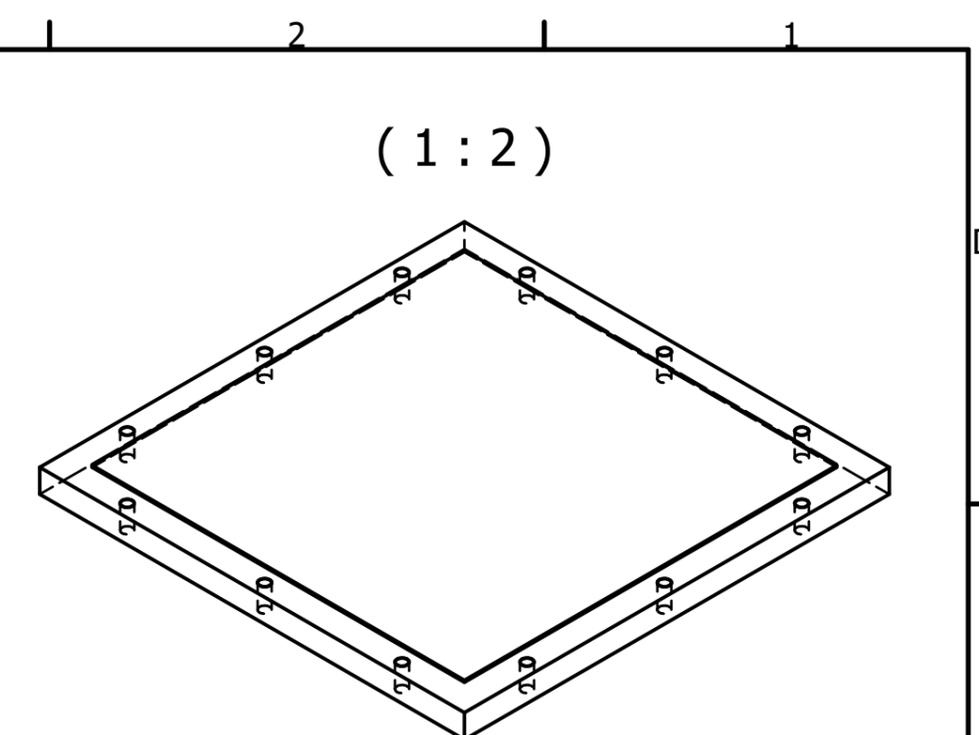
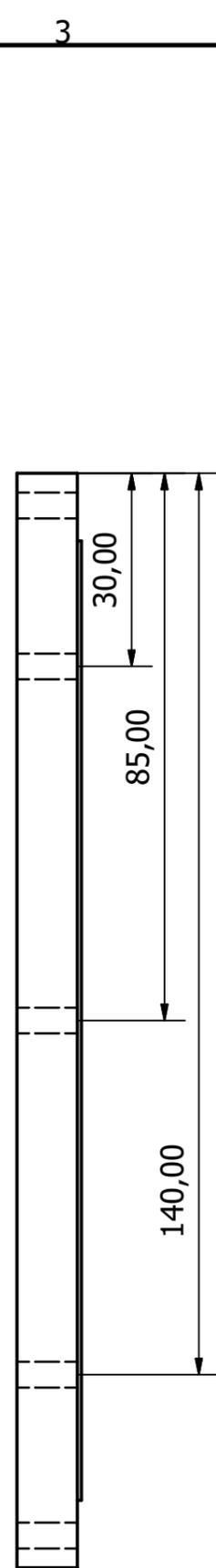
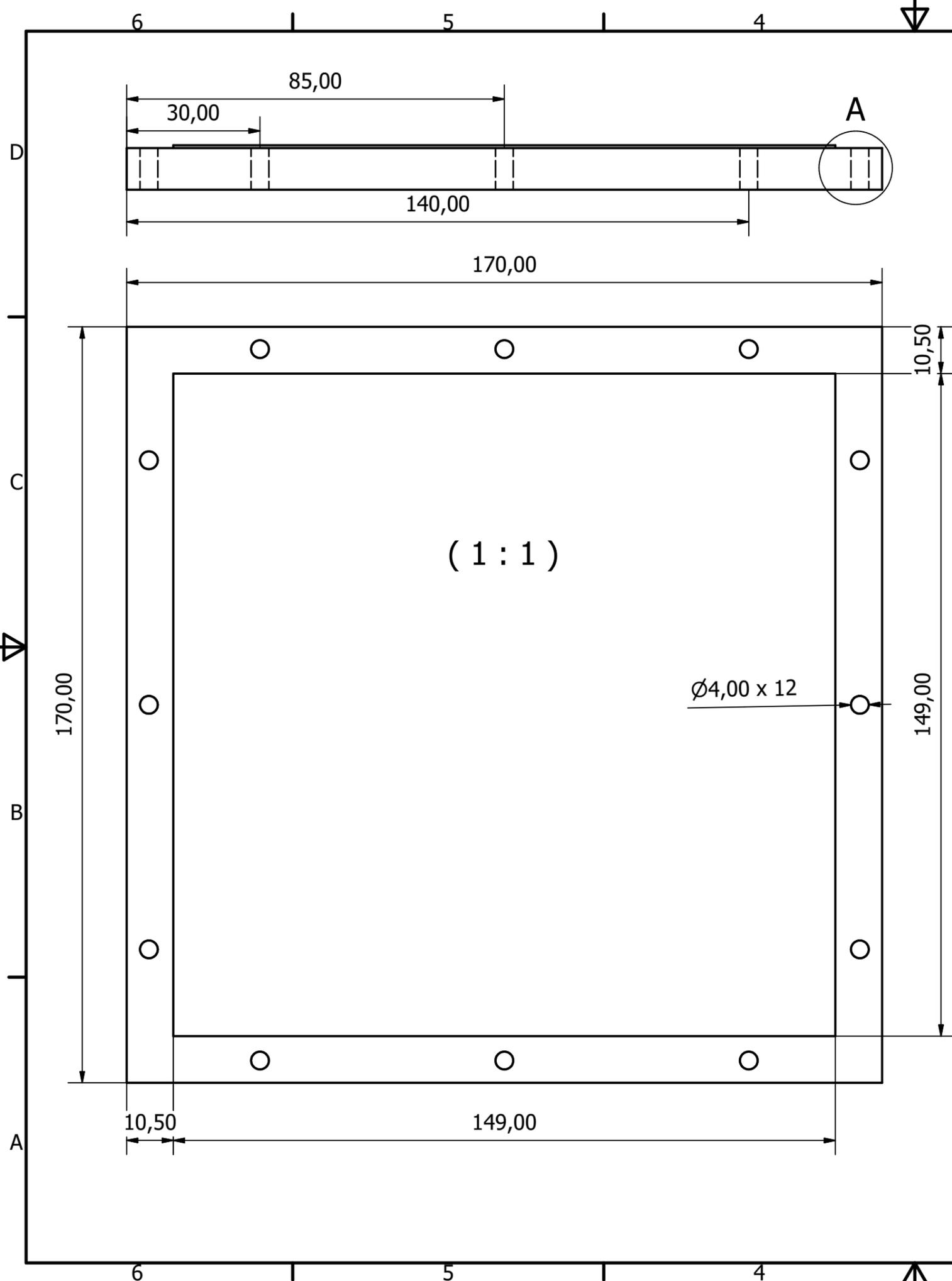


Perno tipo Allen M4

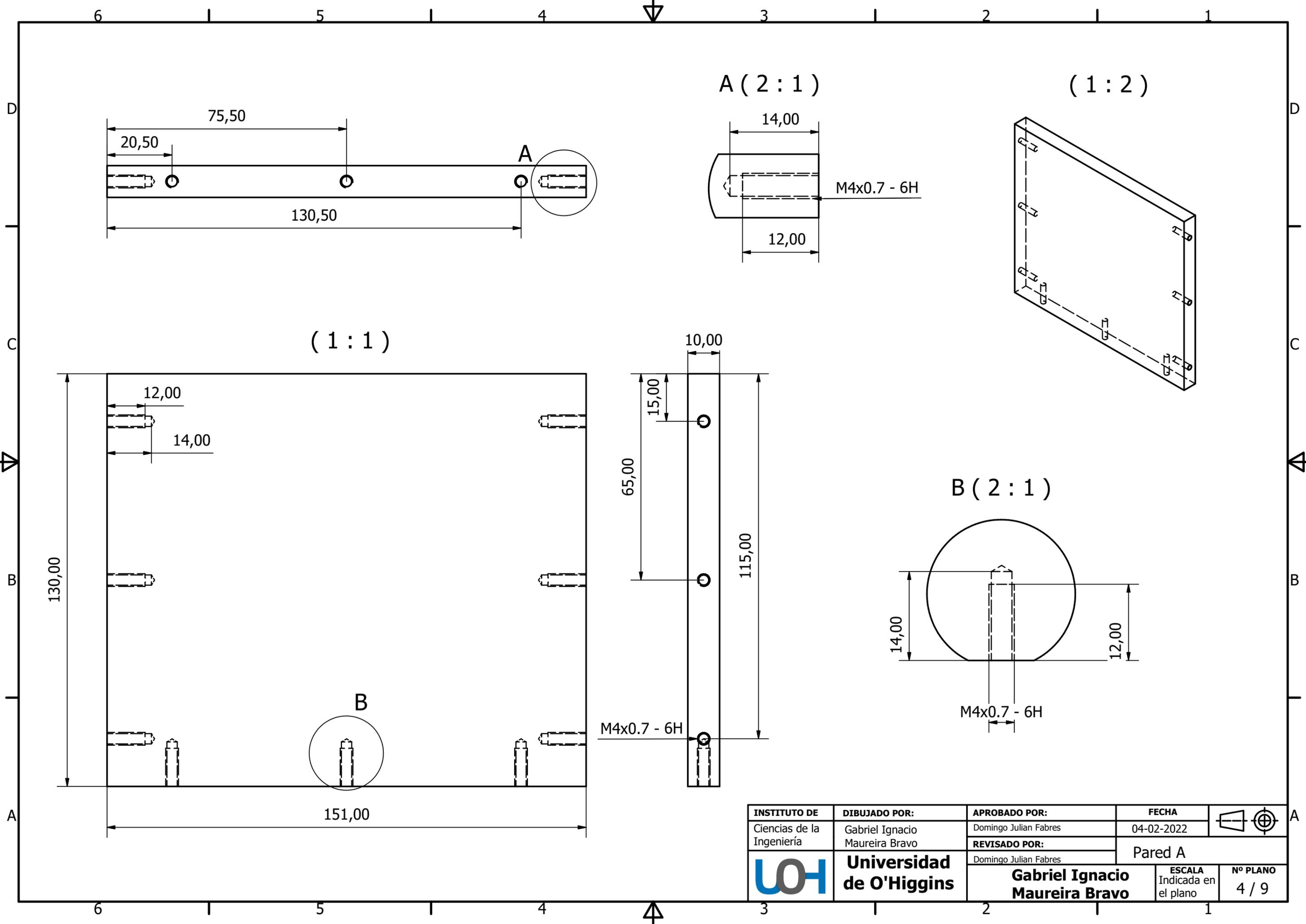
Pared A

LISTA DE PARTES			
CANT.	NOMBRE	DESCRIPCION	MATERIAL
24	DIN 912 - M4 x 20	Cabezal allen cilindrico	Acero inoxidable
1	Base de la camara	Ver en lamina 3/9	Acrilico
2	Pared A	Ver en lamina 4/9	Acrilico
1	Pared B	Ver en lamina 5/9	Acrilico
1	Pared B Luer	Ver en lamina 6/9	Acrilico
24	AS 1237 - 4	Golilla plana	Acero inoxidable
1	Goma sellante	Goma de 3 mm de espesor que rellena los surcos	Etil vinil acetato

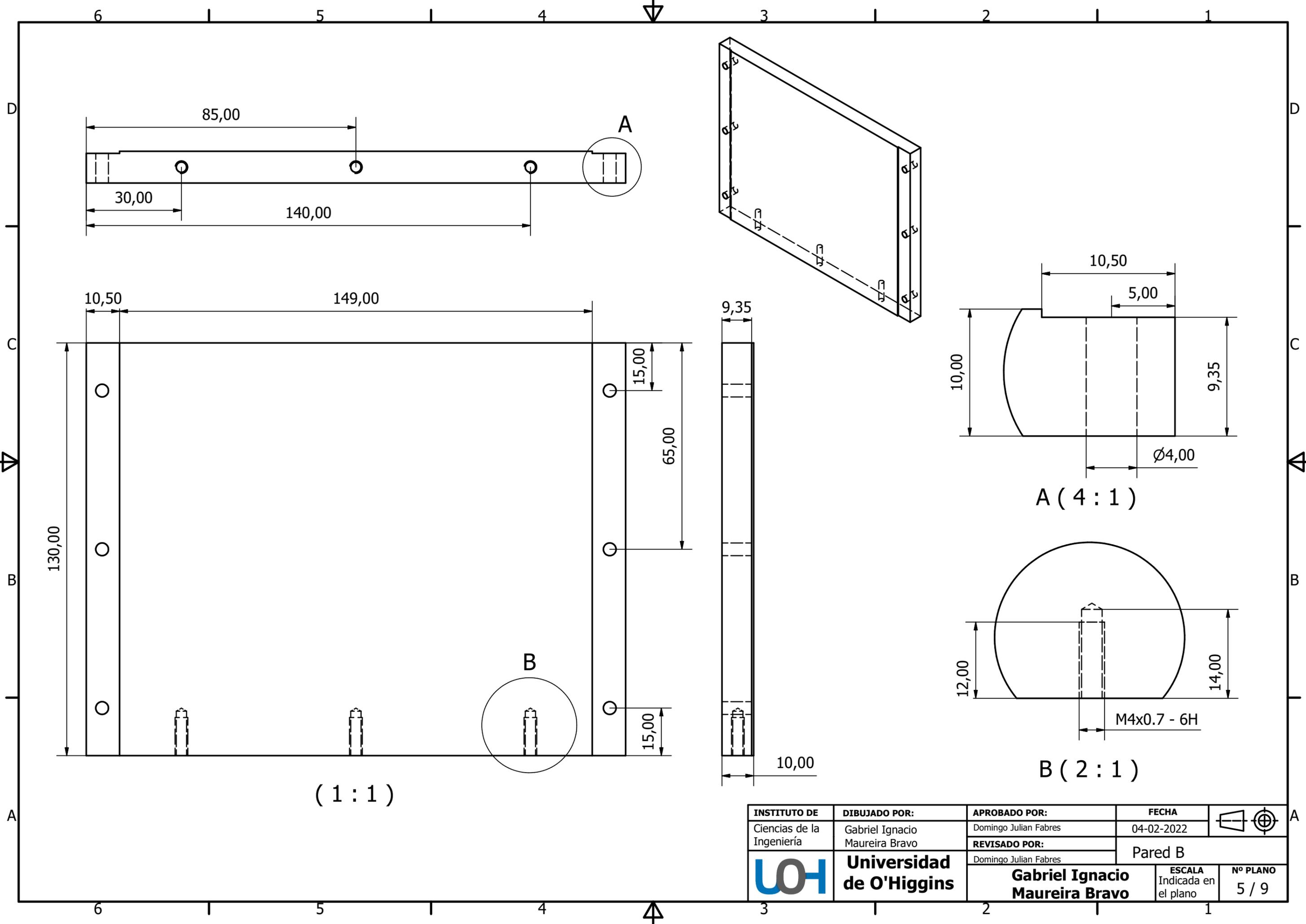
INSTITUTO DE	DIBUJADO POR:	APROBADO POR:	FECHA	
Ciencias de la Ingeniería	Gabriel Ignacio Maureira Bravo	Domingo Julian Fabres	04-02-2022	
	Universidad de O'Higgins	REVISADO POR:	Recipiente	
		Domingo Julian Fabres		
		Gabriel Ignacio Maureira Bravo	ESCALA Indicada en el plano	Nº PLANO 2 / 9



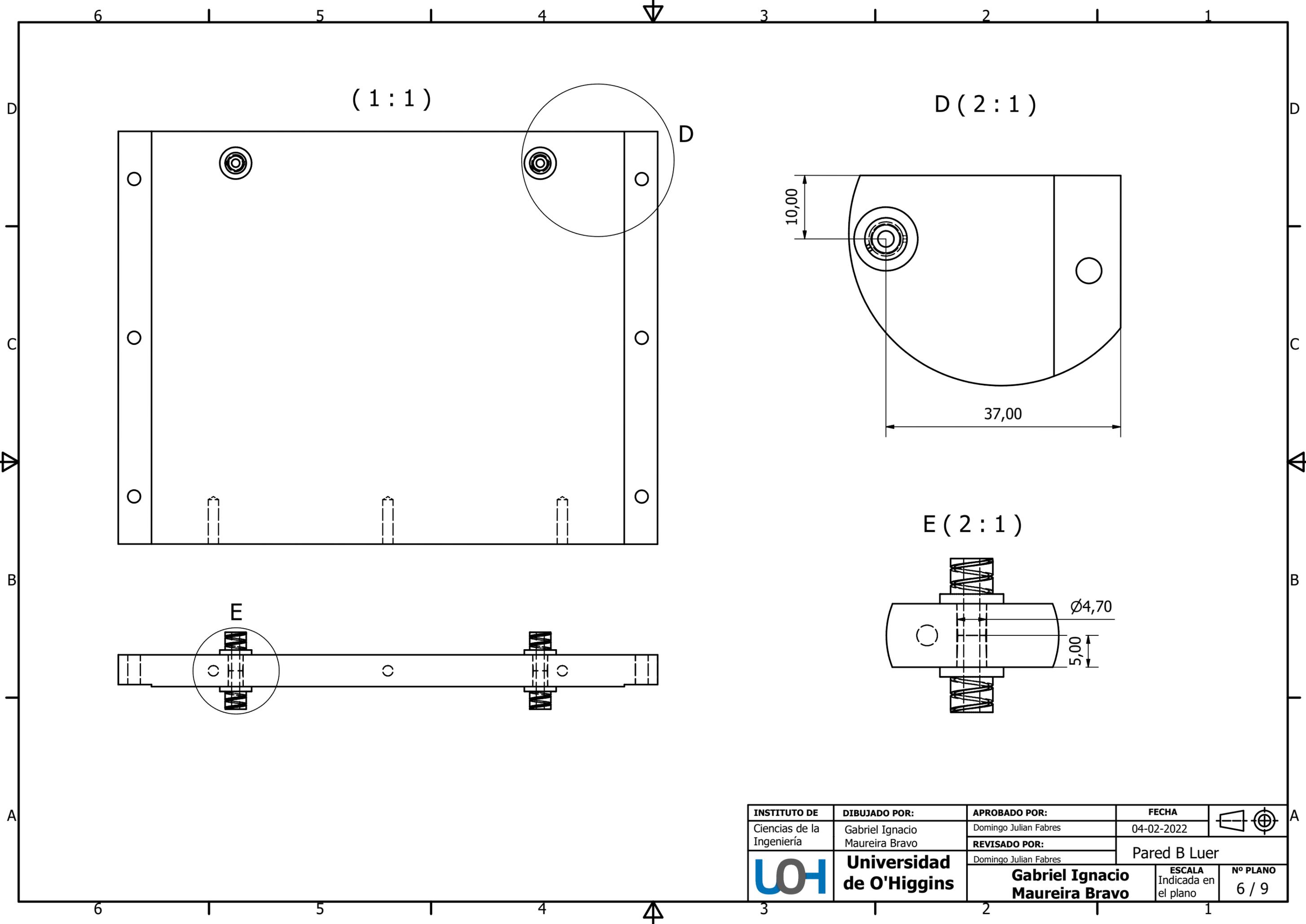
INSTITUTO DE	DIBUJADO POR:	APROBADO POR:	FECHA	
Ciencias de la Ingeniería	Gabriel Ignacio Maureira Bravo	Domingo Julian Fabres	04-02-2022	
	Universidad de O'Higgins	REVISADO POR:	Base del recipiente	
		Domingo Julian Fabres		
		Gabriel Ignacio Maureira Bravo	ESCALA	Nº PLANO
			Indicada en el plano	3 / 9



INSTITUTO DE	DIBUJADO POR:	APROBADO POR:	FECHA	
Ciencias de la Ingeniería	Gabriel Ignacio Maureira Bravo	Domingo Julian Fabres	04-02-2022	
	Universidad de O'Higgins	REVISADO POR:	Pared A	
		Domingo Julian Fabres		
		Gabriel Ignacio Maureira Bravo	ESCALA	Nº PLANO
			Indicada en el plano	4 / 9



INSTITUTO DE	DIBUJADO POR:	APROBADO POR:	FECHA	
Ciencias de la Ingeniería	Gabriel Ignacio Maureira Bravo	Domingo Julian Fabres	04-02-2022	
	Universidad de O'Higgins	REVISADO POR:	Pared B	
		Domingo Julian Fabres		
		Gabriel Ignacio Maureira Bravo	ESCALA Indicada en el plano	Nº PLANO 5 / 9



(1:1)

D (2:1)

E (2:1)

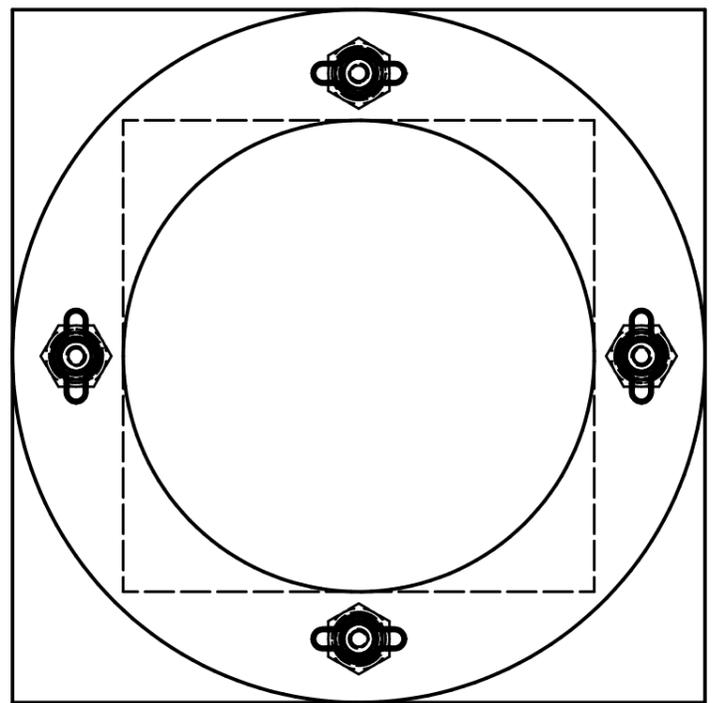
10,00

37,00

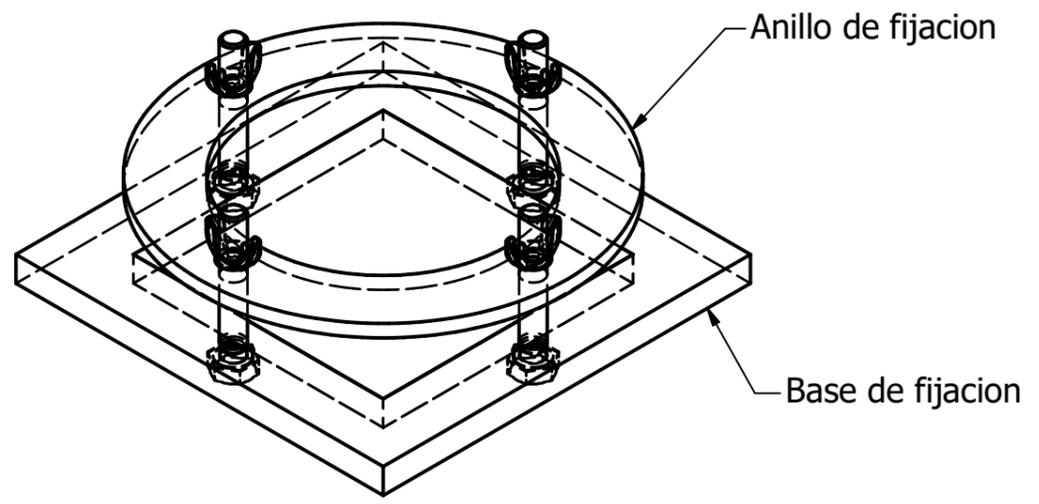
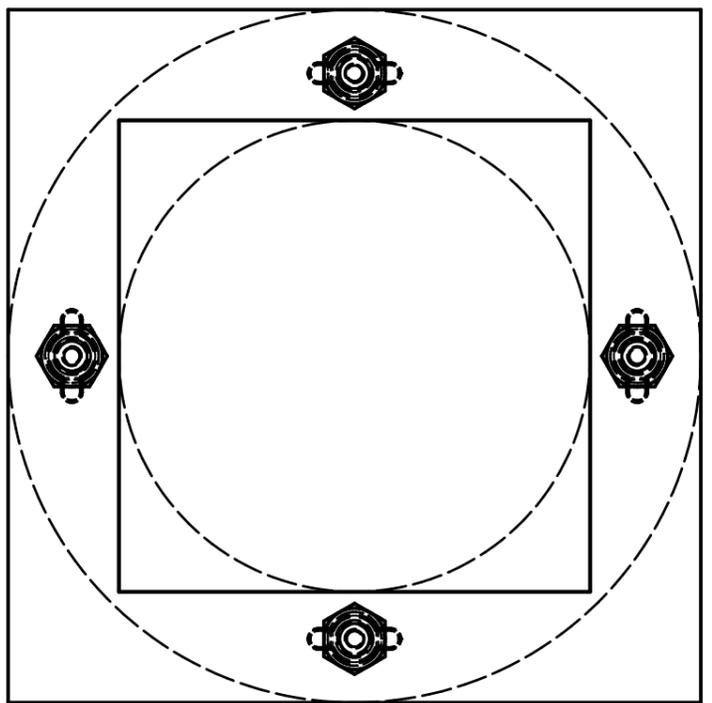
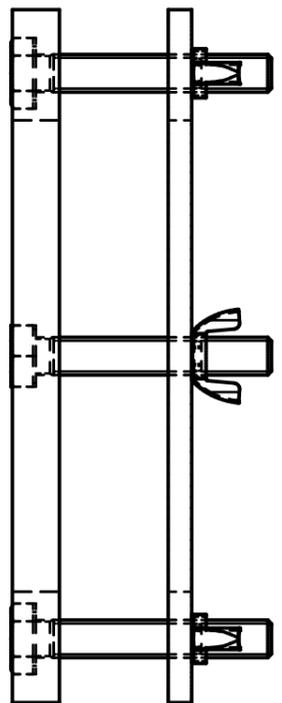
Ø4,70

5,00

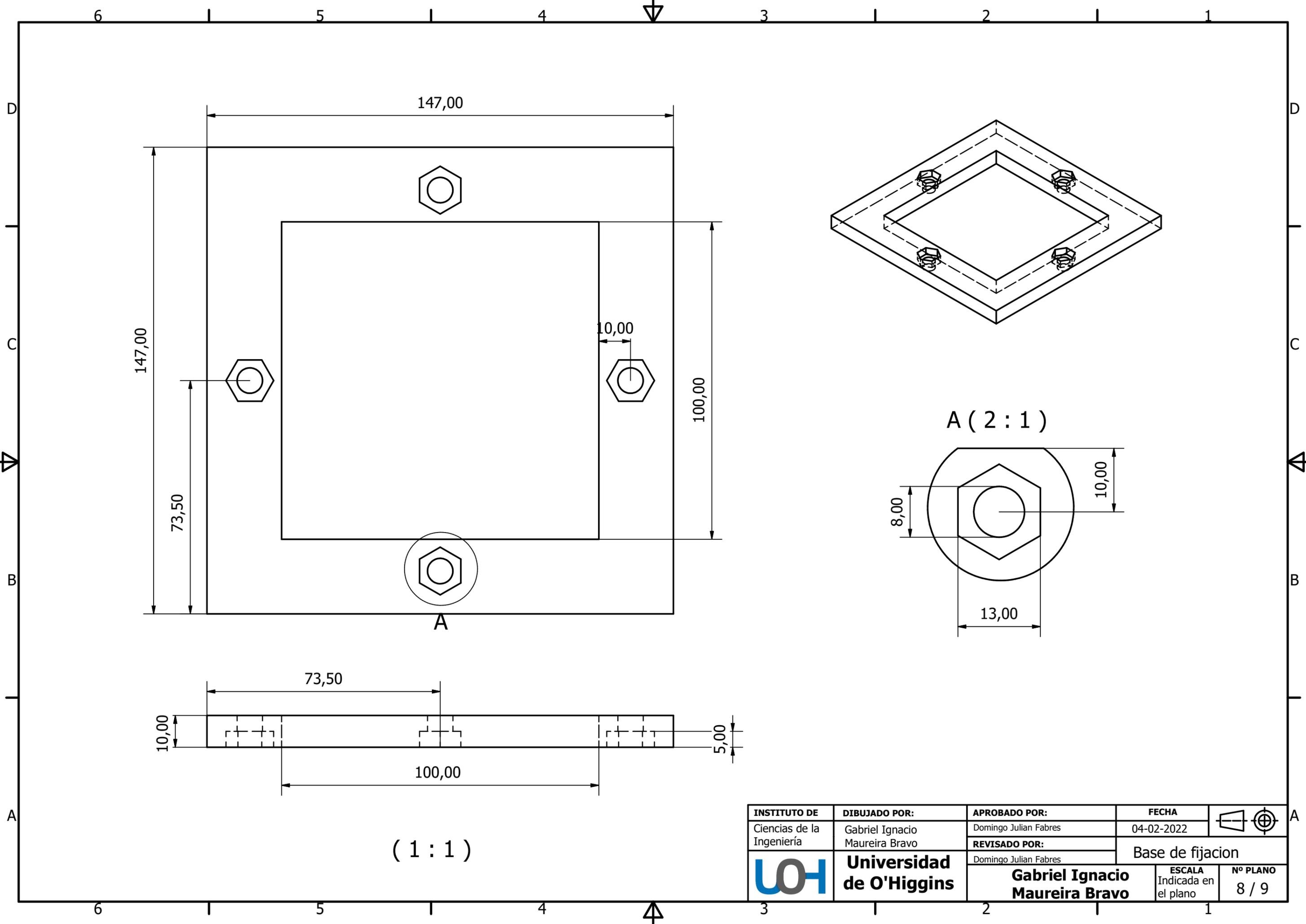
INSTITUTO DE	DIBUJADO POR:	APROBADO POR:	FECHA	
Ciencias de la Ingeniería	Gabriel Ignacio Maureira Bravo	Domingo Julian Fabres	04-02-2022	
	Universidad de O'Higgins	REVISADO POR:	Pared B Luer	
		Domingo Julian Fabres		
		Gabriel Ignacio Maureira Bravo	ESCALA Indicada en el plano	Nº PLANO 6 / 9



(2 : 3)



LISTA DE PARTES				
CANT.	NOMBRE	DESCRIPCION	MATERIAL	
1	Base de fijacion	Ver detalle lamina 8/9	Acrilico	
1	Anillo de fijación	Ver detalle lamina 9/9	Acrilico	
4	ANSI B18.17 - No. 8 - 32, TDS1WNI	Tuerca de mariposa de acero inoxidable	Acero inoxidable	
4	DIN 933 - M8 x 50	Perno cabeza hexagonal	Acero inoxidable	
1	Aptflex F28 de "Precision Acoustics"	Material para atenuar ultrasonido	NPL	
INSTITUTO DE		DIBUJADO POR:		APROBADO POR:
Ciencias de la Ingeniería		Gabriel Ignacio Maureira Bravo		Domingo Julian Fabres
				FECHA
				04-02-2022
				REVISADO POR:
				Domingo Julian Fabres
				Sistema de fijacion
		Universidad de O'Higgins		Gabriel Ignacio Maureira Bravo
				ESCALA
				Indicada en el plano
				Nº PLANO
				7 / 9



INSTITUTO DE	DIBUJADO POR:	APROBADO POR:	FECHA	
Ciencias de la Ingeniería	Gabriel Ignacio Maureira Bravo	Domingo Julian Fabres	04-02-2022	
	Universidad de O'Higgins	REVISADO POR:	Base de fijacion	
		Domingo Julian Fabres		
		Gabriel Ignacio Maureira Bravo	Indicada en el plano	8 / 9

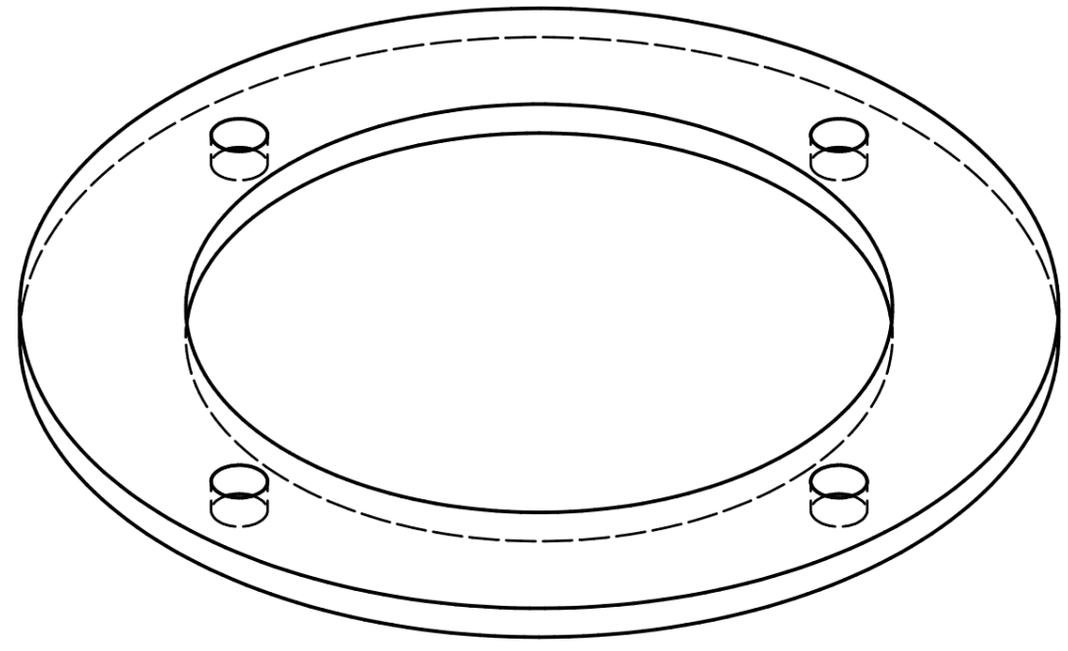
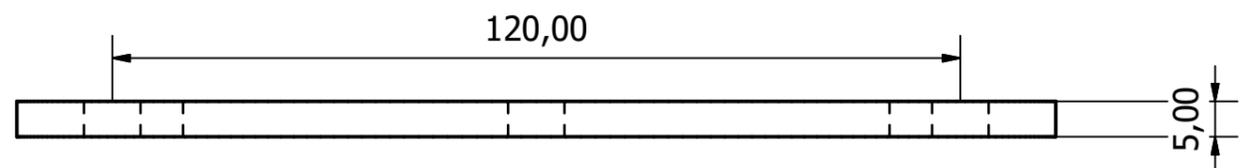
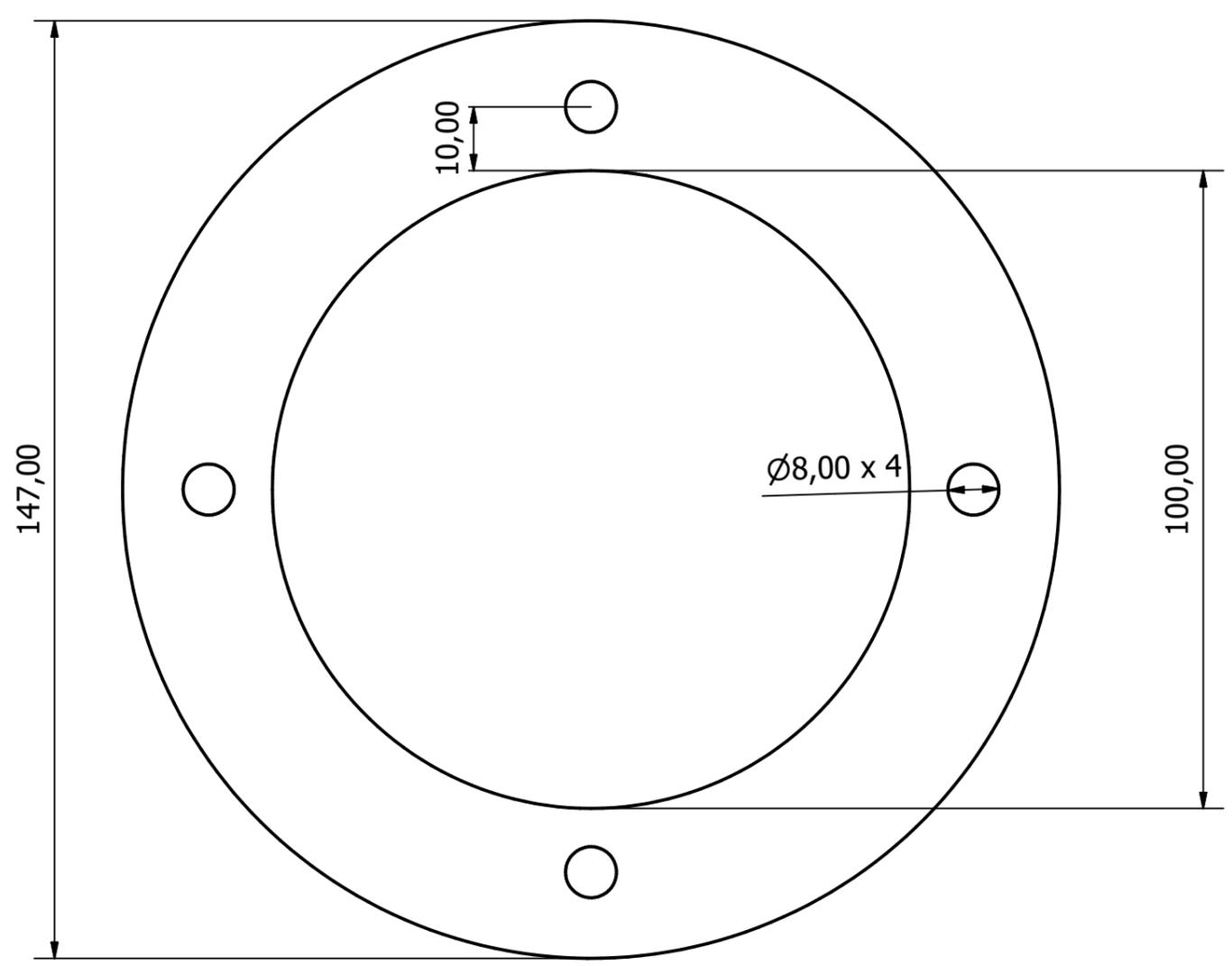
6 1 5 1 4 3 1 2 1 1

D D

C C

B B

A A



INSTITUTO DE	DIBUJADO POR:	APROBADO POR:	FECHA	
Ciencias de la Ingeniería	Gabriel Ignacio Maureira Bravo	Domingo Julian Fabres	04-02-2022	
	Universidad de O'Higgins	REVISADO POR:	Anillo de fijacion	
		Domingo Julian Fabres		
		Gabriel Ignacio Maureira Bravo	ESCALA	Nº PLANO
			Indicada en el plano	9 / 9

6 1 5 1 4 3 1 2 1 1