



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA ELÉCTRICA
SECCIÓN DE BIOELECTRÓNICA

Propuesta de un protocolo experimental basado en craneotomías para la apertura temporal de la barrera hematoencefálica por acción del ultrasonido focalizado para permitir el paso de químicos macromoleculares al cerebro de roedor.

Tesis que presenta

Daniel Alberto Hernández Chávez

para obtener el Grado de

Maestro Ciencias

en la Especialidad de

Ingeniería Eléctrica

Directores de Tesis: Dr. Lorenzo Leija Salas
Dr. Mario Ibrahín Gutiérrez Velasco

México, Ciudad de México.

Noviembre 2017

Dedicatoria

A quienes no temen equivocarse.
Y a Rosalba Hernández, allá en la eternidad

Agradecimientos

Primeramente, a Dios por permitirme subir otro peldaño más en mi formación profesional. Porque pese a todo es cierto eso que dicen: “Dios aprieta, pero no ahorca.”

A mi madre, por estar ahí conmigo en las buenas y en las malas, por siempre apoyarme e inspirarme a ser mejor persona de lo que los demás dicen que soy. Por creer en mí pese a los tropiezos. Por enseñarme que el trabajo es de los que quieren salir a delante y las excusas de los mediocres. Por todo y mucho más.

A mi hermana Janeth, mi mejor amiga y confidente, por siempre escucharme, por creer en mí aun cuando ni yo lo hacía. Por ser mi ejemplo y mi ángel de la guarda. Por acompañarme en este camino por que como decía nuestra madre: “Juntos debemos salir adelante.”

A mi padre y su familia por abrirme las puertas de su hogar y permitirme ser parte de él. Por todo el apoyo que siempre tuve y tengo de su parte. Gracias.

A Abril Robles por el amor, la compañía y por el apoyo que siempre encuentro en ti. Por soportar mi humor que no siempre es el mejor. Por darme nuevos puntos de vista y mejorarme a mí y a lo que hago. Por darme la mano en esta aventura y las que faltan.

Al Dr. Lorenzo Leija Salas por confiar en mí y siempre empujar para que diera lo mejor. Por permitirme formar parte de su grupo de trabajo.

Al Dr. Mario Ibrahim Gutiérrez, por transmitir parte de su conocimiento. Por corregirme y ayudarme a como usted me dijo alguna vez: “cambiar el chip y hacer las cosas bien.”

Al Dr. Arturo Vera por su confianza, por los consejos y por permitirme ser parte de su equipo de trabajo.

Al Dr. Daniel Martínez-Fong por la colaboración en el proyecto, por su confianza y por abrirme las puertas de su laboratorio.

Al auxiliar de investigación Biol. José Ayala por la ayuda en las pruebas *in vivo*, por tomarse el tiempo necesario para el desarrollo de este trabajo, por transmitir su conocimiento, por su amistad.

Al auxiliar de investigación Biol. Mario Gil Moreno por su apoyo, consejos y por transmitir su conocimiento.

Al auxiliar de investigación M. en C. Rubén Pérez Valladares, por su apoyo durante las mediciones requeridas durante la realización de este proyecto, por compartir su conocimiento. Por la amistad y el apoyo durante mi estancia.

Al auxiliar de investigación M. en C. José Hugo Zepeda, por sus consejos, por transmitir su conocimiento y aportar ideas para la realización de este proyecto. Por siempre tener un as bajo la manga cuando un problema se presentaba.

A mis compañeros de laboratorio por su compañía y apoyo en especial a Claudia Reyes por su apoyo durante la fase final de esta tesis. Y a los que ya no están, Víctor, Jaime por transmitir su conocimiento, por apoyarme y por su amistad. A mis compañeros de generación, especialmente a Walther y Armando que aparte de ser compañeros de generación son *roomies* y amigos.

A todos los Doctores. de la sección por sus consejos y por transmitir sus conocimientos. Especialmente al Dr. Carlos Alvarado por aceptarme prácticamente como uno más dentro de su laboratorio.

Agradecimientos especiales

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados CINVESTAV-IPN por permitirme realizar mis estudios de Maestría en Ciencias. Por ser mi hogar durante poco más de 2 años.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por brindarme la beca con la que pude obtener el grado.

Resumen

La enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad degenerativa producida por la muerte de neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra*. La reducción de los niveles en este neurotransmisor provoca temblor, rigidez, lentitud de movimientos e inestabilidad postural. En la actualidad 4.6 millones de personas mayores de 50 años sufren la enfermedad a nivel mundial. En México el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía reporta una prevalencia entre 40 a 50 casos por cada 100,000 habitantes/año.

Los tratamientos para las enfermedades neurodegenerativas, como la EP, se ven obstaculizados por la barrera hematoencefálica (BHE). Que limita el paso de ciertas sustancias, como medicamentos o moléculas con cargas positivas, hacia las células del sistema nervioso central (SNC). En el laboratorio LAREMUS de la sección Bioelectrónica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV-IPN), se ha estado trabajado con ultrasonido focalizado (FUS), y se ha demostrado que con el uso del FUS se puede lograr la apertura de la BHE en ratas, por efectos térmicos.

El FUS demuestra ser una herramienta efectiva y no invasiva que, gracias a la pequeña dimensión del foco, permite que los efectos se produzcan de una manera específica en el área deseada, sin dañar los tejidos circundantes, ocasionando que los pacientes se recuperen rápidamente.

Este trabajo busca lograr la apertura de la BHE, para permitir una mejor liberación de fármacos sobre la *substantia nigra* de ratas de la sepa Wistar. Se propone aprovechar los fenómenos termomecánicos que producen las ondas ultrasónicas, así como realizar craneotomías que mejoren su propagación sobre los tejidos de la cabeza de ratas. Los efectos causados a la BHE por los procedimientos realizados deben ser reversibles para evitar el paso de agentes extraños dentro del SNC e infecciones.

Abstract

Parkinson's disease (PD) is a degenerative disease caused by the death of dopaminergic neurons of the *substantia nigra*. The reduction of levels of this neurotransmitter causes tremor, rigidity, slowness of movements and postural instability. At present, 4.6 million people over the age of 50 suffer from the disease worldwide. In Mexico, the National Institute of Neurology and Neurosurgery reports the prevalence of between 40 and 50 cases per 100,000 inhabitants per year.

Treatments for neurodegenerative diseases, such as PD, are hampered by the blood-brain barrier (BBB). That it limits the passage of certain substances, such as drugs or molecules with positive charges, to the cells of the central nervous system (CNS). In the LAREMUS laboratory of the Bioelectronics section of the Research and Advanced Studies Center of the IPN (CINVESTAV-IPN), we have been working with focused ultrasound (FUS), and it has been shown that with the use of FUS the opening of BBB can be achieved in rats, by thermal effects.

The FUS proves to be an effective and non-invasive tool that, thanks to the small size of the focus, allows the effects to occur in a specific way in the desired area without damaging the surrounding tissues, causing patients to recover quickly.

This work aims to achieve the opening of the BBB, to allow a better release of drugs on the substantia nigra of Wistar rats. We proposed to take advantage of the thermo-mechanical phenomena that produce the ultrasonic waves, as well as perform craniotomies that improve its propagation on the tissues of the rat's head. The effects caused to the BBB by the procedures performed must be reversible to avoid the passage of foreign agents into the CNS and infections.



Índice general

Dedicatoria	II
Agradecimientos	III
Resumen	V
Abstract	VI
Índice general	VII
Índice de figuras	X
Índice de tablas.....	XIII
CAPÍTULO 1.....	1
1.1. Organización de la tesis	2
CAPÍTULO 2.....	4
2.1. Ultrasonido.....	4
2.2. Propiedades acústicas	5
2.2.1. Compresión y rarefacción	5
2.2.2. Frecuencia	5
2.2.3. Velocidad de propagación del sonido.....	6
2.2.4. Longitud de onda	6
2.2.5. Atenuación	7
2.2.6. Impedancia acústica	7
2.2.7. Ciclo de trabajo (duty cycle)	8
2.2.8. Presión acústica.....	8
2.2.9. Intensidad acústica	8
2.3. Generación de ultrasonido	8
2.4. Tipos de focalización del ultrasonido.....	9
2.5. Transductores de ultrasonido	9
2.6. Phantoms.....	11
2.7. Método de elementos finitos.....	11
2.8. COMSOL Multiphysics	12
2.8.1. Módulo de Acústica.....	12
2.8.2. Módulo de mecánica estructural.....	13
2.8.3. Módulo de transferencia de calor	13
2.9. Barrera hematoencefálica	13



2.10.	Azul de Evans	15
CAPÍTULO 3.....		17
3.1.	Ultrasonido Focalizado.....	17
3.2.	Ultrasonido focalizado para la disrupción de la barrera hematoencefálica.....	18
3.3.	Investigaciones previas en el laboratorio LAREMUS.....	19
CAPÍTULO 4.....		21
4.1.	Definición del problema.....	21
4.2.	Justificación de la tesis.....	22
4.3.	Objetivos de la tesis	23
4.3.1.	Objetivo general	23
4.3.2.	Objetivos particulares.....	23
CAPÍTULO 5.....		25
5.1.	Transductor FUS y su caracterización.....	25
5.1.1.	Determinación de la frecuencia de resonancia	27
5.2.	Diseño del aplicador cónico.....	28
5.3.	Obtención de cráneos de rata	29
5.4.	Craneotomías	29
5.5.	Modelado con el método del elemento finito	30
5.5.1.	Modelado de campo acústico.....	30
5.5.1.1.	Geometría del sistema	30
5.5.1.2.	Ecuaciones del dominio y condiciones de contorno	30
5.5.1.3.	Discretización del dominio.....	32
5.5.1.4.	Propiedades de los materiales utilizados en el modelo FEM	33
5.5.1.5.	Estudios de presión acústica realizados con FEM.....	33
5.5.2.	Modelado del patrón de calentamiento.....	35
5.5.2.1.	Condiciones contorno.....	36
5.5.2.2.	Estudio del patrón de biocalentamiento.....	37
5.5.3.	Modelado del efecto de las craneotomías	37
5.6.	Fabricación de phantom de cerebro	38
5.7.	Diseño del protocolo de aplicación de FUS	39
5.8.	Experimentos in vivo	42
5.8.1.	Localización del sitio de aplicación.....	43
5.8.2.	Rata control.....	44
5.8.3.	Apertura de la BHE con FUS en ratas.....	45



5.8.4.	Cierre de la BHE con FUS en ratas.....	48
5.9.	Sacrificio, extracción del cerebro y obtención de cortes	48
CAPÍTULO 6.....		51
6.1.	Transductor y su caracterización.....	51
6.1.1.	Resultado de la medición y simulación de la frecuencia de resonancia.....	51
6.2.	Resultados de las simulaciones en FEM.....	53
6.2.1.	Discretización del dominio.....	53
6.2.2.	Resultados del modelado de campo acústico	53
6.2.2.1.	Resultado del diseño del aplicador cónico para FUS.....	54
6.2.2.2.	Resultado de la simulación del campo acústico sobre la cabeza de una rata.....	56
6.2.3.	Resultados de los estudios de patrón de calentamiento.....	56
6.2.4.	Resultado del modelado del efecto de craneotomías	57
6.3.	Resultado del diseño del protocolo de aplicación.....	58
6.4.	Resultado de la experimentación in vivo	61
6.4.1.	Resultados de las pruebas para la localización del sitio de aplicación	61
6.4.2.	Resultados de las pruebas con la rata control.....	62
6.4.3.	Resultados de los experimentos in vivo para generar la apertura de la BHE.....	63
6.4.4.	Resultado de los experimentos in vivo para verificar el cierre de la BHE.....	66
CAPÍTULO 7.....		68
7.1.	Conclusiones	68
7.2.	Perspectivas y trabajo futuro	70
CAPÍTULO 8.....		72
Referencias		73
Apéndice 1.....		80
Apéndice 2.....		81



Índice de figuras

Fig. 2. 1: Moléculas del medio en presencia de una onda de sonido. Se aprecian las áreas de compresión, densidad y presión elevada, y rarefacción, áreas con densidad y presión menores.	6
Fig. 2. 2: Formas de focalizar el Ultrasonido. a) Elemento Piezoeléctrico cóncavo, b) con una lente cóncava delante del piezoeléctrico y c) arreglo de fases.	9
Fig. 2. 3: Esquema de un transductor. La presencia o ausencia de algunos componentes depende de la aplicación.	10
Fig. 2. 4: Estructura de la barrera hematoencefálica, los vasos sanguíneos cerebrales están revestidos de células endoteliales conectados por complejas uniones estrechas [12].	15
Fig. 5. 1: Transductor FUS Onda Corporation® utilizado para la experimentación. Arriba a la derecha se muestra la cara cóncava del transductor.	27
Fig. 5. 2: Configuración para la medición de la frecuencia de resonancia del transductor. De derecha a izquierda se presenta el analizador de impedancias, una sonda de impedancia incluida en el equipo y el transductor FUS.	28
Fig. 5. 3: Cráneo extraído de una rata de 220 g, el cráneo es partido por mitad para obtener dimensiones y facilitar los experimentos en phantom.	29
Fig. 5. 4: Geometría axisimétrica utilizada para la obtención del campo acústico en FEM. El domino 1 representa el piezoeléctrico del transductor, el 2 simboliza el housing del transductor, 3 representa un espacio lleno de agua. La línea roja es el eje de simetría. Los contornos eternos marcados con azul marcan la impedancia acústica del agua.	33
Fig. 5. 5: Geometría del estudio realizado para diseñar el aplicador cónico. 1 muestra el transductor, 2 el housing, 3 el aplicador cónico y 4 agua. Las fronteras marcadas de color verde tienen la impedancia acústica del agua.	34
Fig. 5. 6: Geometría axisimétrica considerando los tejidos de la cabeza de la rata. 1 representa piezoeléctrico, 2 el acoplador cónico, 3 piel de la cabeza de la rata, 4 cráneo, 5 meninges, 6 cerebro, 7 agua, 8 housing del transductor. El contorno rojo muestra el eje de simetría. Los contornos externos marcados con azul tienen la impedancia acústica del aire.	35
Fig. 5. 7: Colocación de termopares sobre cráneo de rata para registrar el aumento de temperatura que provocan las ondas ultrasónicas.	41
Fig. 5. 8: Inserción de termopar dentro de phantom posicionado sobre el foco del transductor.	42



Fig. 5. 9: Cráneo de una rata de la sepa Wistar. Se aprecian las suturas craneales bregma y lambda. Para este trabajo se tomó como referencia la sutura lambda [65]. 44

Fig. 5. 10: A la izquierda se aprecia la inyección de Azul de Evans vía intravenosa. La imagen de la derecha muestra un corte trasversal de la cola de una rata: arteria ventral (a), venas laterales (b, f), vertebra (c), vena dorsal (d), piel (e) y tendones (g) 45

Fig. 5. 11: Se retira el exceso de pelo de la cabeza de la rata sobre la zona del procedimiento. 46

Fig. 5. 12: Rata sujeta al estereotáxico previo a la aplicación de Ultrasonido. 46

Fig. 5. 13: La zona de la craneotomía es marcada tomando como centro la coordenada sobre la sustancia negra (izquierda). En seguida se procede a retirar el fragmento del hueso marcado utilizando el Dremel® (derecha). 47

Fig. 5. 14: Trépanos y craneotomías realizadas. A y B muestran los orificios con diámetros de 1 mm y 3 mm respectivamente, C y D muestran las craneotomías de 6 mm y 10 mm por lado, respectivamente. 48

Fig. 5. 15: Montaje experimental. a) Acoplador de impedancias, b) transductor de ultrasonido focalizado, c) cono aplicador lleno de agua, d) rata Wistar, e) medidor de potencia, f) amplificador de potencia, g) osciloscopio, h) generador de señal. 49

Fig. 5. 16: A la izquierda se aprecia el fragmento de hueso reincorporado al cráneo de la rata y fijado con cera. En la derecha se puede observar a la rata con la cabeza suturada tras recibir la aplicación de FUS. 49

Fig. 5. 17: Cerebro sin cerebelo fijo en la base del vibratomo antes de realizar los cortes ... 50

Fig. 6. 1: Frecuencia de resonancia del transductor simulada y medida. a) presenta los resultados obtenidos en aire y b) muestra los resultados en agua. 52

Fig. 6. 2: Presión acústica obtenida en la simulación con FEM y su comparación con las mediciones. Se presentan los valores de la presión en los ejes X (A), Y(B) y Z(C). 54

Fig. 6. 3: Presión acústica absoluta a lo largo del eje Z con diferentes radios superiores (izquierda). El gráfico de la derecha presenta las mismas curvas, pero con mayor detalle. ... 55

Fig. 6. 4: Cono obtenido e impreso en 3D. Se acopló una película de látex para evitar el derrame del agua con la que será llenado con el fin de brindar un medio de propagación. .. 55

Fig. 6. 5: Resultados de la simulación de presión acústica. A la izquierda se presenta el gráfico que muestra la propagación de la presión acústica absoluta a lo largo de eje de simetría. En la derecha se presenta el patrón de campo acústico en toda la geometría. 56



Fig. 6. 6: Resultado del estudio de calentamiento provocado por las ondas de ultrasonido. A la izquierda se presenta la temperatura a lo largo del eje Z. A la derecha se observa el patrón de calentamiento sobre los tejidos de la cabeza de rata. 57

Fig. 6. 7: A) Muestra la presión acústica absoluta para cada craneotomía sobre el eje Z. B) muestra de forma detallada la propagación de la presión en la apertura de 5 mm de radio. .58

Fig. 6. 8: Incremento de temperatura para caso del estudio de las craneotomías. 59

Fig. 6. 9: Calentamiento medido con termopares sobre el cráneo de la rata con los distintos protocolos 60

Fig. 6. 10: Incremento de temperatura producido por el protocolo 3 en el foco del transductor. 61

Fig. 6. 11: Se muestran los cortes que se obtuvieron tras realizar la localización del sitio de aplicación. Los cuadros rojos marcan la substantia nigra. Se puede observar que la tinción esta sobre la misma zona corroborando que el posicionamiento es correcto..... 62

Fig. 6. 12: Sujetador frontal de la rata, fijo a 5 mm. Esta coordenada asegura un sitio correcto en ratas de 210 y 230 g. 63

Fig. 6. 13: Rata control con inyección de azul de Evans vía intravenosa. Se muestran los tejidos de la rata teñidos, excepto el cerebro y su interior. 63

Fig. 6. 14: Cortes de cerebro realizados tras la aplicación del protocolo 3 sobre la cabeza de una rata con una craneotomía de 1 mm (izquierda superior). 64

Fig. 6. 15: Cortes resultado de la aplicación del protocolo 3 en conjunto con una craneotomía de 3mm..... 64

Fig. 6. 16: Resultados del protocolo 3 con sobre la cabeza de una rata con craneotomía de 6 mm. La formación del foco está bien definida por la tinción provocada por el EB, sin embargo, su ubicación se encuentra desplazada asía la parte superior del cerebro..... 65

Fig. 6. 17: Apertura de la BHE puntal sobre la substantia nigra. Cortes realizados después de aplicar el FUS con el protocolo 3 en conjunto con una craneotomía de 10 mm. 66

Fig. 6. 18: Resultado de la experimentación para corroborar la reversibilidad de la apertura de la BHE. Los cortes presentados corresponden a diferentes horarios de administración del EB post aplicación del FUS. 67



Índice de tablas

Tabla 2. 1: Propiedades del Azul de Evans.....	16
Tabla 5. 1: Propiedades del material piezoeléctrico del transductor.	26
Tabla 5. 2: Propiedades mecánicas y acústicas de los materiales.....	34
Tabla 5. 3: Propiedades térmicas de los tejidos.	37
Tabla 5. 4: Protocolos obtenidos con la combinación de valores de cycle duty.	42



CAPÍTULO 1

Introducción

Las enfermedades neurodegenerativas (EN) son alteraciones que afectan el sistema nervioso central (SNC), provocando la pérdida de la función de las células neuronales y se asocian a menudo con la atrofia de las estructuras del sistema nervioso afectadas [1]. La enfermedad de Parkinson (EP) es el trastorno más común, afectando entre 40 y 50 personas por cada 100 mil habitantes en México. Atacando principalmente a personas entre los 40 y 65 años, pero que se presenta cada vez más frecuentemente en edades menores. Se especula que para el 2040 la cifra se duplicara, según datos de la secretaria de salud.

La EP es la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la zona nigroestriatal, provocando temblor, bradicinesia, rigidez y alteraciones en la marcha. Y también síntomas no motores, como alteraciones autonómicas, sexuales, del sueño y neuropsiquiátricas. Esta enfermedad es progresiva, y se ha calculado una duración media entre 10 y 13 años. Existen diferentes tratamientos según la evaluación clínica, estos tratamientos pueden incluir inhibidores de la isoenzima de la monoamino oxidasa tipo B, amantadina, anticolinérgicos, agonistas dopaminérgicos orales o levodopa con inhibidor de la dopa-decarboxilasa [2].



En la actualidad las terapias génicas han tomado fuerza en el tratamiento de diferentes enfermedades, gracias a la facilidad de infectar tipos celulares diferentes a linfocitos y así poder transferir genes a otros órganos tales como el hígado y el SNC. Esta virtud ha llevado al desarrollo de una nueva terapia, en el Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV, para atacar la EP, obteniendo resultados prometedores y sin mostrar efectos secundarios en ratas [3].

Todos los fármacos aplicados para tratar enfermedades en el SNC se ven afectados por la barrera hematoencefálica (BHE). Esta estructura, formada por células endoteliales, limita el flujo de sustancias que se encuentran en el torrente sanguíneo a fin de mantener la homeostasis del SNC [4]. Esta permeabilidad debe aumentar para lograr que los medicamentos para la EP lleguen de forma adecuada a las zonas afectadas. En esta tesis se propone el uso de FUS para logra la apertura de la BHE sobre la *substantia nigra* de manera reversible, permitiendo así el paso de moléculas de mayor tamaño dentro del parénquima cerebral.

1.1. Organización de la tesis

Este trabajo de tesis presenta el desarrollo de un protocolo para el uso de ultrasonido focalizado (FUS, por sus siglas en ingles) y la práctica de craneotomías, para lograr una apertura reversible y puntual de la BHE sobre la sustancia *nigra*. Para lograr el objetivo se utilizarán los efectos termoacústicos provocados por el FUS. Dicho protocolo será aplicado y evaluado en modelos murinos, de la sepa Wistar, para probar la terapia génica que se ha desarrollado para el tratamiento de Parkinson en el departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV. Este protocolo busca eliminar los daños al tejido, ocasionados por el incremento de temperatura que provocan las ondas de ultrasonido y su interacción con el cráneo, así como también puntualizar la disrupción de la BHE en la *substantia nigra*.

Para el desarrollo de este trabajo se estudió el campo acústico de los transductores para ultrasonido focalizado, sus efectos térmicos y la medición de las presiones que



estos alcanzan en su foco y la atenuación que causa el cráneo. Además, se estudiaron los efectos que provocan las ondas ultrasónicas y la forma en la que estas provocan la disrupción de la BHE. Se fabricaron simuladores de tejido, *phantoms* para realizar pruebas antes de la experimentación *in vivo*. Las pruebas realizadas nos permitieron encontrar las curvas y el patrón de calentamiento sobre el cráneo para elegir el ciclo útil de trabajo y la potencia adecuada para no generar daño al tejido.

Para presentar esta investigación, se dividió esta tesis en 8 capítulos. El capítulo 2, presenta la terminología y los conceptos básicos en el uso del ultrasonido y que son necesarios para la comprensión de este trabajo. Los trabajos de investigación realizados por otros autores sobre este tema se presentan en el capítulo 3. El planteamiento de la problemática se presenta en el capítulo 4, así como también se expone el objetivo general y los objetivos particulares de este trabajo de tesis. El capítulo 5 desarrolla la metodología utilizada, así como la descripción de la experimentación realizada con ratas. Los resultados obtenidos se muestran en el capítulo 6. El capítulo 7 expone las conclusiones alcanzadas tras finalizar el trabajo, así como el trabajo futuro y posibles mejoras. Finalmente, el capítulo 8 presenta los productos obtenidos durante este trabajo de investigación.



CAPÍTULO 2

ATECEDENTES

2.1. Ultrasonido

El sonido se define como la energía mecánica transmitida por ondas de presión en un medio material. Estas ondas se caracterizan por ser periódicas y viajar a una frecuencia determinada. Esta definición de sonido engloba el sonido audible, las ondas sísmicas de baja frecuencia y el ultrasonido. Cuando las ondas acústicas superan el nivel audible, es decir su frecuencia supera los 20 kHz, se le conoce como ultrasonido (US) [5].

En el estudio de la acústica podemos diferenciar distintos tipos de onda por medio de las cuales se propaga el sonido. La onda depende de la forma en que se generó, el medio donde viaja y la geometría del medio [6]. Algunas de las más comunes:

- **Longitudinal:** se caracteriza por que las partículas vibran paralelas a los ejes de la onda. Producen rarefacción y compresión.
- **Transversal:** la vibración de las partículas es perpendicularmente a la propagación de la onda. Este tipo de onda se puede propagar fácilmente por materiales sólidos como el metal o el hueso.



- **Rayleigh:** en este tipo de onda las partículas forman una elipse conforme pasa una onda a través de ellas.
- **Lamb:** son ondas complejas que cuando se transmiten, las partículas del centro del material vibran longitudinalmente, pero las adyacentes a éstas describen elipses grandes al centro, pero cada vez más pequeñas cuando nos acercamos al borde del material.

2.2. Propiedades acústicas

2.2.1. Compresión y rarefacción

Las ondas del sonido afectan el medio en el que viajan, con su fuerza vibracional. El movimiento de la fuente comprime y empuja las partículas del medio las cuales ejercen el mismo efecto sobre sus partículas vecinas. Las zonas donde las moléculas son empujadas son llamadas zonas de compresión. En estas zonas la densidad es ligeramente mayor. Por otro lado, las áreas donde las moléculas se separan son llamadas regiones de rarefacción. Y por ende tiene una densidad menor [5]. Este efecto puede apreciarse mejor en Fig. 2.1.

2.2.2. Frecuencia

Si se gráfica el comportamiento de una onda sonora en función de la presión contra el tiempo, el resultado es una sinodal. El número de oscilaciones por segundo que generan las partículas en el medio que vibran alrededor de su posición de reposo, es la frecuencia (f). La unidad de medida de la frecuencia son los ciclos por segundo Hertz (Hz). El intervalo de frecuencias audibles para los seres humanos se encuentra entre los 20 Hz y los 20 KHz. Todas las frecuencias superiores a este intervalo se le llama



ultrasonido. El ultrasonido médico y de diagnóstico se encuentra entre 1 MHz y 20 MHz [5].

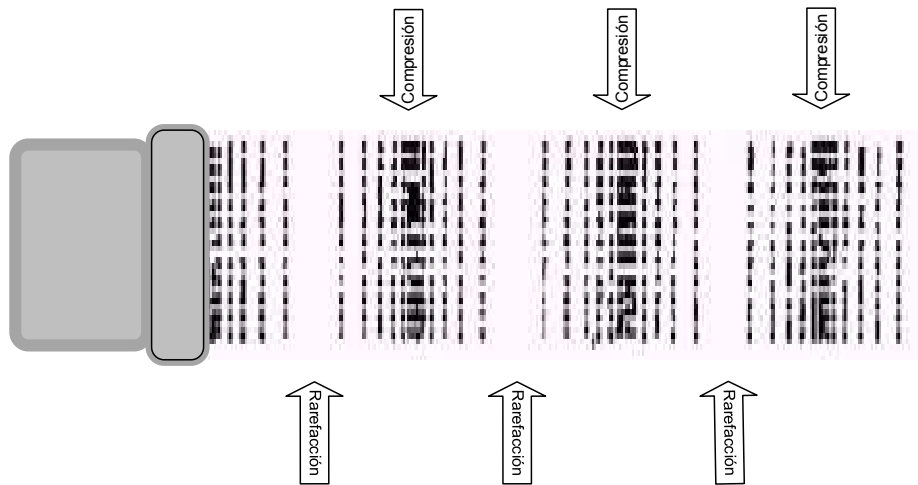


Fig. 2. 1: Moléculas del medio en presencia de una onda de sonido. Se aprecian las áreas de compresión, densidad y presión elevada, y rarefacción, áreas con densidad y presión menores.

2.2.3. Velocidad de propagación del sonido

La velocidad de propagación del sonido en un medio depende principalmente de las características del medio. La velocidad del sonido (c) puede expresarse según

$$c = \sqrt{\frac{B}{\rho}}, \quad (2.1)$$

donde B es el módulo de compresibilidad y ρ la densidad [5].

2.2.4. Longitud de onda

La longitud de onda es la distancia entre dos crestas de una señal. Es la distancia que la onda acústica viaja en un ciclo completo de la onda. La longitud de onda acústica depende de la frecuencia (f) y la velocidad de propagación (c). Esta relación está dada en Ec. 2.2. Así entre mayor sea la frecuencia de la onda ultrasónica, menor será la longitud de onda.



$$\lambda = \frac{c}{f} \quad (2.2)$$

2.2.5. Atenuación

Conforme a las ondas acústicas cruzan por medio de propagación, su intensidad y amplitud se reducen en función de la distancia recorrida. Cuando el ultrasonido viaja a través de tejidos del cuerpo, se puede hablar de 3 fuentes de atenuación: 1) reflexión, 2) *scattering* y 3) la absorción. En los tejidos viscoelásticos la contribución que hace el *scattering* a la atenuación de las ondas de ultrasonido es despreciable, por lo cual se toma como principal fuente a la absorción, que involucra la transformación de energía acústica en calor.

El grado de atenuación generalmente se mide en decibeles por centímetro (dB/cm), sin embargo, también se puede medir en neper por metro (Np/m). Esta medida es conocida como coeficiente de atenuación (α). Además de la absorción, la frecuencia es un factor que influye directamente en la atenuación. A mayor frecuencia mayor atenuación, complicando así la penetración de las ondas en tejidos más profundos [5].

2.2.6. Impedancia acústica

La impedancia acústica se refiere a la facilidad con la cual las ondas de ultrasonido se propagan por un medio. La impedancia acústica se define como el producto de la presión acústica y la velocidad del sonido. La impedancia acústica (Z) está dada por

$$Z = \rho c, \quad (2.3)$$

donde c es la velocidad del sonido en un medio y ρ la densidad de dicho medio. Así el aire o una estructura llena de aire tienen una impedancia acústica muy baja comparado con estructuras más densas como el hueso [5].



2.2.7. Ciclo de trabajo (duty cycle)

La aplicación de ultrasonido puede ser de forma continua o pulsada. Cuando la aplicación es pulsada, la onda fundamental, se ve modulada por un pulso cuadrado de cierta frecuencia, y cuya relación del estado en alto entre el periodo del mismo pulso determina el ciclo útil de la señal también conocido como ciclo de trabajo. De aquí en adelante se utilizará el termino en ingles *duty cycle*.

2.2.8. Presión acústica

La presión acústica es una magnitud utilizada para cuantificar la amplitud de una onda de sonido. En estas ondas, las zonas de compresión se ven acompañadas de un incremento en la presión respecto a la presión atmosférica, a diferencia de las regiones de rarefacción las cuales tienen una presión menor. La presión acústica (P) se expresa en pascales (Pa) [5].

2.2.9. Intensidad acústica

Se define como la cantidad de trabajo realizada por unidad de área. La intensidad acústica instantánea está dada por la Ec. 2.3. Donde p_i indica la presión acústica instantánea, v_i la velocidad de partícula instantánea, y $\langle \rangle$, un promedio temporal [5].

$$I = \langle p_i v_i \rangle \quad (2.4)$$

2.3. Generación de ultrasonido

Las ondas Ultrasónicas se generan cuando un campo eléctrico es aplicado a un conjunto de cristales piezoeléctricos. Esta estimulación provoca una distorsión mecánica resultante de la vibración y la producción de ondas de sonido. Este fenómeno es conocido como efecto piezoeléctrico. Algunos de los materiales piezoeléctrico más conocidos son el cuarzo y la turmalina [7].



Para la fabricación de transductores se pueden utilizar capas del material piezoeléctrico. La búsqueda de mejores propiedades ha llevado a la fabricación de nuevos materiales como los transductores cerámicos [7]. Las cerámicas piezoeléctricas están compuestas por materiales ferroeléctricos policristalinos, que, al estar bajo su temperatura de Curie, tienen un dipolo eléctrico en su estructura. Los cerámicos de titanato zirconato de plomo (PZT) son ampliamente utilizados en aplicaciones médicas por su alto acoplamiento electromecánico y sus bajas pérdidas mecánicas y eléctricas [8].

2.4. Tipos de focalización del ultrasonido

Existen distintas maneras de focalizar las ondas de ultrasonido. Si el transductor es mono elemento se puede focalizar utilizando un lente curvo sobre el piezoeléctrico (Fig. 2.2b) en caso de que el transductor sea plano, o utilizando un transductor inicialmente curvo (Fig. 2.2a) [5]. Otra forma de focalizar las ondas ultrasónicas es utilizando arreglo de transductores planos, mediante su excitación en fase, lo que nos permite controlar el foco [9]. La fig. 2.2 muestra las configuraciones antes mencionadas.

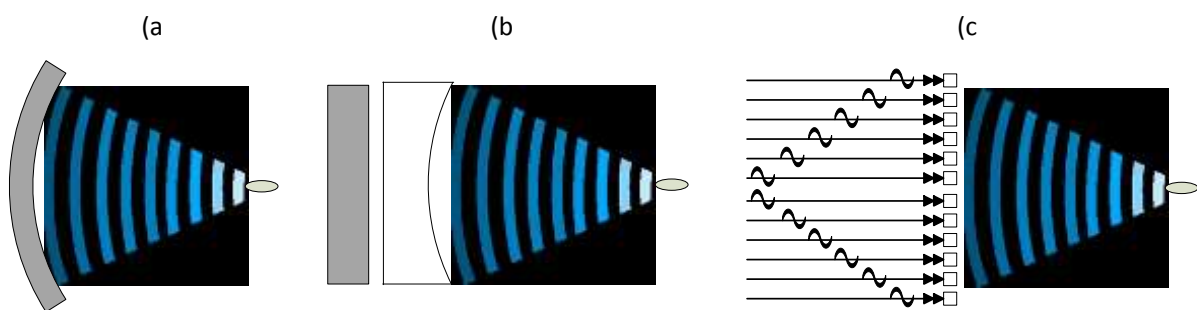


Fig. 2. 2: Formas de focalizar el Ultrasonido. a) Elemento Piezoeléctrico cóncavo, b) con una lente cóncava delante del piezoeléctrico y c) arreglo de fases.

2.5. Transductores de ultrasonido



Los transductores de ultrasonido monoelemento son montados en una caja cilíndrica, utilizando materiales que eviten el acoplamiento de energía ultrasónica al encapsulado tales como el caucho o corcho, entre otros. Un protector metálico previene que se recojan señales de ruido eléctrico [5].

En general se pueden encontrar las siguientes partes en un transductor de ultrasonido (Fig. 2.3):

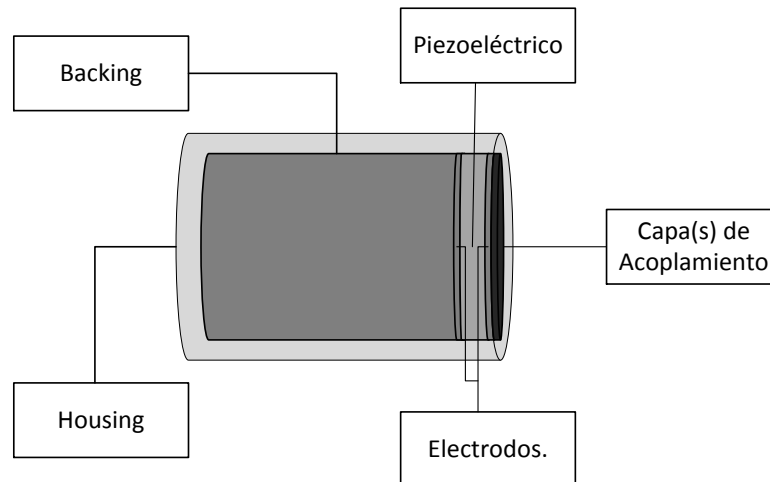


Fig. 2. 3: Esquema de un transductor. La presencia o ausencia de algunos componentes depende de la aplicación.

Housing: es el chasis y/o carcasa, en el cual se encuentran los electrodos, la cerámica piezoeléctrica y las capas de acoplamiento. Cuenta con un conector que permite su uso con el sistema de excitación

Backing: es un material que sirve para aumentar el ancho de banda del transductor mediante la reducción de la respuesta vibratoria. Cuando las aplicaciones requieren de alta potencia, se puede utilizar aire como backing para asegurar la transmisión eficiente de la potencia eléctrica en potencia acústica.

Capa de acoplamiento: pueden ser más de una, su función es acoplar la impedancia acústica entre el piezoeléctrico y el medio, para mejorar el traspaso de energía.

Electrodos: se encargan de alimentar eléctricamente el piezoeléctrico.



Piezoeléctrico: se encarga de convertir la energía eléctrica a energía mecánica.

Los transductores para focalizar ultrasonido de alta intensidad en general no utilizan capa(s) de acoplamiento de impedancia, la parte más distal del conector puede ser el lente o el piezoeléctrico cóncavo [5].

2.6. Phantoms

Los phantoms son materiales que se utilizan para la experimentación, y que emulan las propiedades del tejido biológico de interés. Para el caso de experimentación con US, estos simuladores deben tener propiedades acústicas tales como, la impedancia acústica, la velocidad de propagación del sonido y atenuación. Estos simuladores de tejido son utilizados para ajustar variables de la experimentación antes de realizarlas *in vitro* y/o *in vivo*.

2.7. Método de elementos finitos

Para describir cuantitativamente un fenómeno físico, se comienza por plantearse las ecuaciones que caracterizan el comportamiento del problema. Estas, generalmente, son un sistema de ecuaciones diferenciales en cierta región o dominio (medio continuo). Estos dominios se dividen en subdominios llamados elementos finitos. Cada elemento se define por una serie de puntos llamados nodos. Estos puntos son adyacentes si pertenecen al mismo elemento. Dependiendo de esta adyacencia el conjunto de nodos es llamado malla y sobre esta malla o discretización, se realizan los cálculos [10].

Estas relaciones permiten corresponder el valor de un grupo de incógnitas con cada nodo y que se denominan grados de libertad. Las relaciones entre el valor de una variable y los nodos se pueden representar por un conjunto de ecuaciones, cuya matriz



se llama matriz de rigidez o Hipermatriz. Por ende, el número de ecuaciones será proporcional al número de nodos [10].

El método de elementos finitos (FEM, por sus siglas en inglés), permite la introducción de dominios de cálculos complejos en 2 y 3 dimensiones. Se basa en aproximaciones por funciones de prueba, estas aproximaciones pueden ser por interpolación, discretización, utilización de métodos numéricos, etc. y permite, a pesar de la designación de aproximación, realizar una gran cantidad de análisis, que sería difícil realizar con métodos analíticos tradicionales [10].

2.8. COMSOL Multiphysics

Es un software que permite el análisis de fenómenos físicos y de ingeniería basado en la resolución de ecuaciones diferenciales parciales, mediante el uso del FEM. COMSOL permite la simulación de fenómenos multifísicos para optimizar los diseños, y prototipos virtuales. Complementando módulos específicos de aplicación, la eficacia del modelado se incrementa con herramientas dedicadas para aplicaciones eléctricas, mecánicas, fluidas y químicas.

El resultado final que ofrece este paquete informático permite un alto grado de flexibilidad y postprocesamiento. Estos resultados permiten realizar las modificaciones necesarias a los modelos antes de la experimentación, reduciendo errores y gastos. Sin embargo, dependiendo de la complejidad el gasto computacional puede aumentar considerablemente.

2.8.1. Módulo de Acústica

El Módulo de acústica permite el análisis de trabajos con ondas acústicas, interacción acústica-estructural y vibración en fluidos y sólidos. Las simulaciones acústicas que usan este módulo pueden modelar fácilmente problemas clásicos como dispersión, difracción, emisión, radiación y transmisión de sonido. Estos problemas



pueden solucionarse para análisis transitorio, estacionario armónico, eigen-frecuencia, etc. Así como también con distintas simetrías, ya sea 2D, 2D axial o 3D.

2.8.2. Módulo de mecánica estructural

Este módulo está dedicado al análisis de las estructuras mecánicas que están sujetas a cargas estáticas o dinámicas. Este módulo tiene una gama de tipos de análisis, incluyendo estacionario y transitorio, paramétrica y respuesta en frecuencia cuasi estática.

Al igual que el módulo acústico, permite análisis en simetrías 2D, 2D axial y 3D. Se pueden usar desde medios isotrópicos o anisotrópicos, también materiales no lineales.

Con este módulo se puede trabajar con las variaciones resultantes de la excitación eléctrica de un material piezoeléctrico, gracias a una subdivisión para los efectos piezoeléctricos. Esta subdivisión permite estudiar la respuesta vibratoria del piezoeléctrico dependiendo la carga.

2.8.3. Módulo de transferencia de calor

Este módulo es usado para estudiar la influencia del calentamiento y enfriamiento de dispositivos y procesos. Contiene herramientas de modelado para simulación de todos los mecanismos de transferencias de calor. Dentro de estas herramientas está la aplicación específica para el calentamiento de medios biológicos, basada en la ecuación de biocalentamiento.

2.9. Barrera hematoencefálica

El sistema nervioso central (SNC) necesita mantener el control y la estabilidad en el entorno neuronal. Cualquier alteración se considera determinante en la fisiopatología de las lesiones cerebrales. Mantener este medio dentro de un intervalo



estrecho homeostático requiere una regulación del transporte de células, moléculas e iones entre sangre y cerebro. Esta regulación rigurosa se logra gracias a una interfaz anatómica entre el SNC y la circulación periférica, llamada barrera hematoencefálica [11].

Existen 3 capas que contribuyen a la separación de la sangre y los tejidos neurales: 1) El epitelio aracnoideo que separa la sangre del líquido cefalorraquídeo especializado subaracnoide. 2) La barrera sanguínea del líquido cerebroespinal con el epitelio cefalorraquídeo especializado y los ventrículos cerebrales, y 3) la barrera hematoencefálica (BHE) [11].

La BHE es una estructura compleja constituida por células endoteliales de la red capilar del SNC, figura 2.4. Otros mecanismos celulares que ayudan a la BHE son los pericitos localizados en la lámina basal abluminal, los astrocitos perivasculares, la lámina basal de la pared capilar y la microglía. En los mamíferos la BHE regula y restringe el acceso al parénquima nervioso de múltiples sustancias y moléculas que circulan en la sangre, para mantener la homeostasis del microambiente químico del SNC, lo que implica un intercambio bidireccional donde la BHE permite el acceso a nutrientes y se encarga del excretar de los productos de desecho [4].

Se pueden observar 3 funciones específicas de la BHE:

- Proteger al cerebro de ciertos compuesto, dejando cruzar solo oxígeno, la glucosa, aminoácidos y otros nutrientes, gracias a las uniones estrechas del endotelio en los vasos sanguíneos cerebrales.
- Transporte selectivo desde el sistema circulatorio cerebral, mediante el trasporte facilitado, al igual que sucede con la glucosa, y por difusión activa dependiente del ATP.
- Metabolizar elementos de la sangre hacia el tejido nervioso y viceversa.

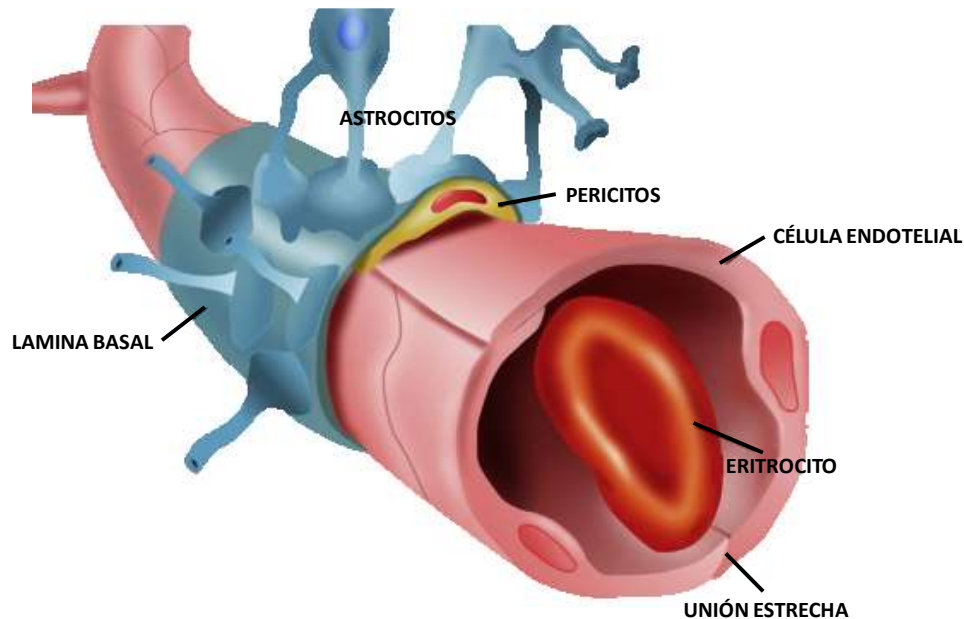


Fig. 2. 4: Estructura de la barrera hematoencefálica, los vasos sanguíneos cerebrales están revestidos de células endoteliales conectados por complejas uniones estrechas [12].

El término BHE puede hacer alusión a una impermeabilidad total, sin embargo, tiene características de permeabilidad selectiva. Es decir, constituye un filtro activo entre el cuerpo y el cerebro por medio de sus elementos estructurales y metabólicos. Siendo las uniones estrechas entre las células endoteliales su estructura más efectiva. En general las sustancias pueden atravesar la BHE por 4 vías:

- Penetración por caveolas y transcitosis.
- Difusión transmembranal.
- Mecanismos de acarreo y transportadores.
- Transporte por vía retrógrada de flujo axónico que elude la BHE.

2.10. Azul de Evans



La BHE fue descubierta por Paul Ehrlich en 1885. Ehrlich inyectó un colorante de forma intravenosa a un conejo descubriendo que todo el cuerpo se teñía excepto el cerebro. Desde entonces se han utilizado distintos trazadores para el estudio de la permeabilidad de la BHE [4]. Los trazadores más utilizados son los llamados trazadores vitales. De entre ellos sobresale el azul de Evans.

El azul de Evans es un colorante con una afinidad muy alta a la albumina de la sangre. Esta propiedad ha sido utilizada para medir volúmenes sanguíneos [13]. Y propiedades como su peso molecular, el cual, en condiciones fisiológicas normales, le impide pasar a través de la BHE [4]. La tabla 2.1 muestra con mayor detalle las propiedades del azul de Evans.

Tabla 2. 1: Propiedades del Azul de Evans

Nombres	
T-1824	
Azul directo 53	
Identificadores	
Numero CAS	314-13-6
Propiedades	
Formula química	$C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$
Peso molecular	960.81 g/mol



CAPÍTULO 3

Estado del arte

3.1. Ultrasonido Focalizado

Desde que los hermanos Curie descubrieron el efecto piezoeléctrico en ciertos cristales, en 1880, la evolución de las técnicas de Ultrasonido (US) mejoraron considerablemente. En 1935 Gruetzmacher colocó una superficie cóncava sobre el transductor piezoeléctrico y observó que las ondas ultrasónicas podían focalizarse [13]. A partir de ese descubrimiento el uso del Ultrasonido Focalizado (FUS) se propuso como una herramienta no invasiva para la destrucción de tejidos dentro del cuerpo. Tal es el caso de William y Francis Fry, que en 1954 desarrollaron un dispositivo FUS para la lesión de tejido en el Sistema Nervioso Central de animales [14]. Un año más tarde comienzan a realizar experimentos en mamíferos, específicamente estudiando los efectos que provoca el ultrasonido dentro del cerebro de gatos [15-16]. En 1958 Francis Fry propone el uso del dispositivo diseñado para cirugías en el ser humano aprovechando la virtud de solo afectar un área específica [17].

El estudio del FUS en tratamientos de cáncer fue propuesto desde 1956 por Burov y Andreevskaya que trabajaron en estudios con tumores implantados en conejos y en melanomas cutáneos en humanos [18]. Para 1964 Oka reportó el uso de FUS con



resultados exitosos en el tratamiento de cáncer de tiroides y mama [19]. El desarrollo de los tratamientos de tumores en el cerebro, mama y próstata siguió creciendo en los siguientes años [20].

Entre las diversas aplicaciones del FUS está el tratamiento del glaucoma. Coleman et al crean glaucomas sobre un solo ojo en 42 conejos y aplican sonicaciones con un transductor monoelemental en 1985. Confirmando su valioso potencial como una terapia alternativa contra el glaucoma [21-22]. En 1986 reportan los resultados de ojos de 170 pacientes con glaucoma refractario que fueron tratados con ultrasonido focalizado de alta intensidad (HIFU, por sus siglas en inglés) [23]. Las aplicaciones en oftalmología siguen mejorándose no solo para el glaucoma sino también para liberación de fármacos [24-25].

El Ultrasonido focalizado también es utilizado tratar la fibrilación auricular en la cirugía cardíaca. Se demostró la seguridad y eficacia del tratamiento. Los pacientes regresan al ritmo sinusal estos resultados se ven más pronunciado en pacientes con fibrilación auricular paroxística [26-27].

Las propiedades del FUS han llevado sus aplicaciones a la dermatología [28]. Estos efectos prometen ser un método eficaz y seguro para brindarle firmeza a la piel tanto en la cara, como demostraron Murad Alam y colaboradores [29], como en otras partes del cuerpo como las rodillas, trabajo estudiado en 2014 [30]. Las investigaciones siguen arrojando resultados alentadores en el uso del FUS para fines estéticos [31-32].

3.2. Ultrasonido focalizado para la interrupción de la barrera hematoencefálica

En 1996 comenzó a estudiarse el efecto del FUS en vasos sanguíneos, Hynynen et al, desarrollaron estudios en riñones de conejos [33]. Estos estudios dieron paso a una nueva aplicación del FUS, el inducir la apertura de la Barrera Hematoencefálica (BHE). Este grupo comienza estudiando los efectos térmicos del FUS para inducir la



apertura de la Barrera Hematoencefálica en conejos [34]. En 2005 el grupo de Hynynen reportó cómo reaccionan las células de la BHC ante el FUS y el uso de medios de contraste ultrasónico, también conocidos como microburbujas. El resultado obtenido demostró la apertura de la BHE [35]. Un año más tarde, Hynynen trabajó con la liberación de anticuerpos dirigida en el cerebro de ratones, utilizando el mismo tipo de microburbujas y un transductor con una frecuencia de 0.69 MHz. La disrupción de la BHE se confirmó por la presencia del azul de tripano que fue previamente inyectado, corroborando otros estudios desarrollados durante la primera década del siglo 21 [36]. Aunque los resultados obtenidos por Hynynen y sus colaboradores son alentadores, existen dificultades que solucionar para mejorar esta técnica [37].

En el 2006 Choi et al, abordan el tema de la apertura de la BHE de ratones, utilizando microburbujas en ratones [38-39]. Siguiendo con la investigación Choi y colaboradores reportan el paso de moléculas a través de la BHE y de fármacos tras aplicación de FUS [40]. Aunque los mecanismos de acción del FUS en conjunto con medios de contraste ultrasónicos (MCU), no son del todo comprendidos. Existen distintas variables que influyen en la disrupción de la BHE. Como son el diámetro de las microburbujas [41-44], así como el tiempo de aplicación, la longitud y ciclo útil del pulso [45-46]. Estas investigaciones han dado pauta para el uso de FUS como herramienta en la liberación de fármacos para enfermedades neurodegenerativas como en la enfermedad del Parkinson [47-50].

3.3. Investigaciones previas en el laboratorio LAREMUS

Los efectos termoacústicos del FUS se han estudiado desde el año 2010 dentro del laboratorio. Estos experimentos se han realizado en *phantoms* y/o tejido exvivo. El uso del FEM en el modelado y la simulación de fenómenos acústicos y térmicos ha sido determinante para la obtención de información antes de la experimentación [51]. En 2016 se comenzó en el laboratorio la investigación del uso del FUS para abrir la BHE, con experimentos *in vivo* [52]. Esta investigación ha demostrado que el uso del FUS logra la apertura de la BHE. Sin embargo la apertura se logra solamente en el



neocortex del cerebro de la rata. Este inconveniente se debe a los efectos de atenuación causados por el cráneo. Este trabajo de tesis propone un protocolo de aplicación con mayor potencia pero con tiempos de exposición más cortos. Esto con el fin de evitar el daño tisular causado por el sobrecalentamiento en el cerebro de los roedores.



CAPÍTULO 4

Planteamiento del proyecto

4.1. Definición del problema

Las enfermedades como el Alzheimer, Parkinson, Huntington, siempre se ven acompañadas, además del deterioro propio de la condición de salud del paciente, de un deterioro económico y un desgaste emocional de la familia. Los tratamientos farmacológicos que se han planteado para estas enfermedades generalmente pierden eficiencia debido a la selectividad de la BHE. En el departamento de Fisiología del CINVESTAV se ha desarrollado un nuevo vector para suministrar un fármaco a nivel cerebral para la enfermedad de Parkinson. Pero la impermeabilidad de la BHE dificulta que las células cerebrales entren en contacto con el medicamento de manera significativa. Para potenciar el efecto de este medicamento es necesaria la apertura de la BHE de manera puntual sobre la *substantia nigra*, que es la zona donde se pretende suministrar el fármaco.

En los últimos años se ha utilizado el FUS para inducir la apertura de la BHE, pero el cráneo y los demás tejidos que rodean el cerebro provocan cambios en el foco del transductor, no solo en sus dimensiones y geometría, sino también su distancia de posicionamiento. Otro problema es que las ondas de ultrasonido provocan un incremento de temperatura que se disipa principalmente en el cráneo y que limita la



apertura de la BHE a la corteza cerebral, que es una zona no adecuada para la liberación y absorción del fármaco.

Por lo tanto, es necesario estudiar la propagación del ultrasonido producido por transductores focalizados a través del cráneo y capas subyacentes para lograr llegar a la zona de interés sin dañar otras estructuras del cerebro. Es necesario también verificar la viabilidad de usar craneotomías para eliminar el efecto atenuante del cráneo en los tratamientos con FUS, como una primera etapa del proyecto. El hecho de mejorar los modelos computacionales agregando geometrías que representen las meninges, el cerebro y el cráneo completo, nos permitirá obtener resultados más precisos tanto en los estudios del campo acústico como los de bioalentamiento. El análisis de los resultados obtenidos con estos estudios permitirá determinar protocolos de aplicación que eviten el excesivo calentamiento y por ende minimizar los daños causados al tejido.

4.2. Justificación de la tesis

Diversos estudios han demostrado que el uso de FUS, en conjunto con MCU, logra abrir la barrera hematoencefálica. Esto ha sido aprovechado para la liberación de fármacos de manera eficiente en estudios con animales *in vivo* sobre la *substantia nigra*, ya que es donde la enfermedad del Parkinson causa daños [47-50]. Dentro del laboratorio LAREMUS los trabajos realizados con anterioridad usando FUS han permitido abrir la BHE de manera reversible. Sin embargo, los protocolos aplicados no lograron posicionar el foco del transductor sobre la *substantia nigra*, sino que la apertura de la BHE fue lograda en la corteza cerebral, debido al calentamiento del cráneo. Además, con estos protocolos fácilmente se causa daño térmico en la corteza cerebral por el calentamiento descontrolado que provoca la interacción de las ondas ultrasónicas y el hueso del cráneo de la rata, lo que ocasiona la ablación del tejido dañado.



Algunas investigaciones han sugerido retirar una porción del cráneo (craneotomía) para mejorar la propagación de las ondas de ultrasonido, y así utilizar solo FUS (sin MCU) para lograr la disrupción de la BHE. Todas estas situaciones dan la pauta para el desarrollo de este trabajo, en el cual se propone practicar craneotomías a las ratas y definir las características óptimas. Estas craneotomías tendrán una dimensión suficiente para permitir la propagación de las ondas ultrasónicas y eliminar la atenuación que provoca el hueso del cráneo, pero que permitan su reimplantación y posterior recuperación de la rata. Además, se buscarán tiempos de exposición menores de 5 minutos con el fin de impedir un exceso de calentamiento y ablación en zonas fuera de la región de interés.

4.3. Objetivos de la tesis

4.3.1. Objetivo general

Diseñar mediante modelado computacional y desarrollar experimentalmente un protocolo de sonicación con ultrasonido focalizado para lograr la apertura de la barrera hematoencefálica *in vivo* en la *substantia nigra* del cerebro de ratas Wistar con craneotomías.

4.3.2. Objetivos particulares

- Modelar mediante FEM la interacción de las ondas de FUS y los diferentes tejidos de la cabeza de la rata para estudiar la propagación de campo acústico en ellos.
- Modelar mediante FEM el calentamiento que provoca el FUS en cerebro y en los demás tejidos de la cabeza de la rata.
- Diseñar un aplicador cónico utilizando FEM, para ofrecer un medio de propagación a las ondas ultrasónicas entre el transductor y la zona de aplicación sin deformar ni alterar la posición del foco. Además, la geometría



del aplicador cónico permite la posibilidad de tener una idea de la posición del foco.

- Definir un protocolo de aplicación que produzca un incremento de temperatura controlado sin producir ablación del tejido. Esto se realizará mediante la experimentación con *phantoms* y mediante el control de la señal de excitación de FUS con diferentes *duty cycles*. Este diseño se retroalimentará con los resultados del modelado computacional de craneotomías.
- Implementar el protocolo de sonicación diseñado previamente en experimentos *in vivo* en ratas con craneotomía para la apertura de la barrera hematoencefálica con diferentes condiciones experimentales, variando potencia, *duty cycles* y diferentes dimensiones de craneotomías. Estos experimentos permitirán encontrar los valores óptimos de tratamiento en ratas con craneotomía para la apertura controlada de la barrera hematoencefálica reversible. Posteriormente, se pretende aplicar el fármaco desarrollado y se evaluará su efecto terapéutico. Sin embargo, esto último está fuera del alcance de esta tesis.



CAPÍTULO 5

Metodología

Este proyecto de tesis sugiere el uso de ultrasonido focalizado para abrir la barrera hematoencefálica en ratas. Para permitir una mejor propagación de las ondas ultrasónicas sobre el tejido encefálico, se propone practicar craneotomías a los roedores y aplicar la sonicación.

Este capítulo describe la metodología llevada a cabo para el desarrollo de esta tesis, detallando cada proceso para la realización de las pruebas *in vivo*. Estos pasos incluyen la selección del transductor, las simulaciones con FEM, la experimentación en *phantoms*, el diseño del protocolo de aplicación y las pruebas con modelos murinos, así como los estudios histológicos necesarios para cuantificar la apertura de la BHE.

5.1. Transductor FUS y su caracterización

La selección del transductor FUS se basa en el análisis de las necesidades y requerimientos de la experimentación. Un primer parámetro importante del transductor que se debe considerar es su frecuencia de operación. Como se mencionó en la sección de Antecedentes la frecuencia influye en el grado de atenuación que puede tener una onda ultrasónica [5]. En el estudio del estado del arte encontramos que se han utilizado transductores en un intervalo de frecuencias de 500 kHz a 2.5 MHz. Otro segundo aspecto por considerar es la zona de aplicación a la cual se desea posicionar



el foco, relacionada directamente con la distancia focal del transductor. Para nuestro caso de estudio, el tratamiento se realizará en la *substantia nigra*, que se encuentra entre 7 mm y 8 mm bajo la corteza del encéfalo dependiendo del peso de la rata.

Tomando en cuenta estas consideraciones se seleccionó el transductor cóncavo monoelemento con matrícula 2-20-20/4 de la empresa Onda Corporation® con una frecuencia de trabajo de 2 MHz (Fig. 5.1). Este transductor tiene las siguientes características dadas por el fabricante: diámetro de 20 mm, concavidad de 2.7 mm, distancia focal de 20 mm, y espesor de 1.02 mm; el material es piezoeléctrico es PZT-8 (Exelis®, EC-67) [53] cuyas propiedades físicas se presentan en la Tabla 5.1.

Tabla 5. 1: Propiedades del material piezoeléctrico del transductor.

PZT-8 EC-67 [53]			
Propiedades electromecánicas		Valor	Unidad
Propiedades físicas	Módulo de Modulo de Young	9.3×10^{10}	$\frac{N}{m^2}$
	Densidad	7.5×10^3	$\frac{Kg}{m^3}$
Propiedades eléctricas	Matriz de acoplamiento (orden: xx, yy, zz, yz, xz, zy) d_{15} d_{31} d_{33}	362×10^{-12} -107×10^{-12} 241×10^{-12}	$\frac{C}{N}$
Constantes elásticas	Matriz de cumplimiento elástico (orden: xx, yy, zz, yz, xz, zy) S_{11}^E S_{12}^E S_{33}^E	10.8×10^{-12} -3.6×10^{-12} 13.7×10^{-12}	$\frac{1}{Pa}$

La caracterización de este transductor fue realizada en el trabajo de Contreras en 2015 [52]. Sólo se repitieron las mediciones realizadas para la obtención de la frecuencia de resonancia del transductor a fin de optimizar el modelo desarrollado en COMSOL Multiphysics.



Fig. 5. 1: Transductor FUS Onda Corporation® utilizado para la experimentación. Arriba a la derecha se muestra la cara cóncava del transductor.

5.1.1. Determinación de la frecuencia de resonancia

La frecuencia de resonancia del transductor se determinó a partir de la medición de la curva de impedancia eléctrica del transductor utilizando un analizador de impedancias (4294A, Agilent Technologies, USA).

Para efectuar la medición es necesario conectar el transductor FUS al analizador de impedancias mediante la sonda de impedancia (incluida en el equipo), como se muestra en la Fig. 5.2. Cuando las conexiones se encuentran realizadas se procede con la configuración del equipo. Se establece un intervalo de medición entre 10 kHz hasta 4 MHz de frecuencia. En seguida se procede a realizar la medición de la impedancia real e imaginaria, presionando dentro del panel *measurement*, del analizador de impedancia, el botón *means*. Para poder interpretar los datos mostrados en la pantalla, se ajusta a una escala logarítmica el eje 'y' de la gráfica y se extraen los datos para su posterior análisis.



Fig. 5. 2: Configuración para la medición de la frecuencia de resonancia del transductor. De derecha a izquierda se presenta el analizador de impedancias, una sonda de impedancia incluida en el equipo y el transductor FUS.

5.2. Diseño del aplicador cónico

Para poder utilizar el FUS sobre la cabeza de la rata. Fue necesario diseñar un aplicador que ofreciera un medio de propagación a las ondas ultrasónicas entre el piezoeléctrico del transductor y la zona de aplicación. Este aplicador debe permitir que las dimensiones del foco y su posición no se vean afectadas.

Se propuso una geometría cónica con el fin de proporcionar una idea espacial de la posición del foco. Y llenar este cono con agua como medio de propagación. Las condiciones óptimas serán explicadas a detalle más adelante en la sección de modelado.

Una vez que se obtuvo el modelo más óptimo, se exportó la geometría en un archivo stl (STereo Lithography por sus siglas en inglés) al software SolidWorks®. Dentro de este paquete informático, se le aplicó a la geometría 2D una revolución de 360° para obtener la geometría en 3D. Después esta geometría fue exportada también en un archivo stl a un software de licencia libre llamado Cura®, dentro del cual se configuran variables para la impresión 3D tales como relleno, temperatura de extrusor, densidad del material, entre otras. Las impresiones fueron realizadas en una impresora 3D AirWolf HD2x.



5.3. Obtención de cráneos de rata

Para el desarrollo de los modelos simulados y las pruebas en phantoms es necesario tener cráneos de ratas. Estos cráneos son extraídos de ratas de la sepa Wistar con un peso entre 210 y 230. El proceso que se siguió para la extracción es el siguiente. La rata es anestesiada con una inyección vía intraperitoneal de pentobarbital sódico (Pisabental®, PISA agropecuaria®, México) con una dosis de 60 mg/Kg. Enseguida se sacrifica al animal, cortándole la cabeza mediante una guillotina. La cabeza del roedor es desollada y descarnada utilizando pinzas y tijeras de disección. El cráneo es colocado en un jardín para que las hormigas terminen de retirar el tejido restante. Los cráneos obtenidos son como el que se muestra en la Fig. 5.3.

5.4. Craneotomías



Fig. 5. 3: Cráneo extraído de una rata de 220 g, el cráneo es partido por mitad para obtener dimensiones y facilitar los experimentos en *phantom*.

El uso de FUS para lograr la apertura de la BHE puede verse limitado por la atenuación acústica que provoca el hueso del cráneo. J. Choi *et al* han reportado una atenuación del 18% de la presión acústica en la *substantia nigra* al pasar a través del hueso parietal de ratón [38, 41]. La propagación del ultrasonido en el cráneo induce un incremento de temperatura no deseado provocando que la BHE se abra únicamente sobre la corteza del cerebro y que ocasionalmente causa ablación.

Con el fin de eliminar los efectos negativos que el cráneo ocasiona a las ondas de ultrasonido, se propone realizar craneotomías. Estas craneotomías deben permitir una propagación eficiente del campo acústico sobre el cerebro de la rata. Otra



característica de estas aperturas es que no deben afectar la posición ni la geometría del foco del transductor. A demás deben tener una dimensión mínima para causar el menor daño posible al roedor. Las especificaciones de diseño de las craneotomías son descritas con mayor detalle en la sección de modelado.

5.5. Modelado con el método del elemento finito

El método de elemento finito (FEM) se ha convertido en una herramienta indispensable para la resolución de problemas de ingeniería, ya que permite obtener modelos aproximados a los fenómenos físicos reales. El análisis del campo acústico y de calentamiento provocado por el ultrasonido no son la excepción.

5.5.1. Modelado de campo acústico

5.5.1.1. Geometría del sistema

Gracias a que el sistema a simular mediante FEM tiene simetría respecto a un eje. La geometría utilizada para el desarrollo de este trabajo de tesis fue axisimétrica. Lo que permitió simplificar el sistema. Se tomó como referencia un transductor con una distancia focal nominal de 20 mm, un diámetro de 20 mm y una concavidad de 2.7 mm, mostrado en la Fig. 5.1. Se adquirieron las dimensiones de espesor y curvatura del cráneo de la rata para agregar al modelo las geometrías de estos componentes, así como también se agregaron el cerebro y las meninges. En la Fig. 5.4 se muestra la geometría del transductor introducido en un dominio de agua.

5.5.1.2. Ecuaciones del dominio y condiciones de contorno

Los estudios en dominio de la frecuencia permiten calcular el comportamiento de un sistema lineal a una excitación armónica en una o varias frecuencias. Para este tipo de estudio se utiliza la ecuación homogénea de Helmholtz mostrada por



$$\nabla \cdot \left(-\frac{1}{\rho_c} (\nabla p) \right) - \frac{k_{eq}^2 p}{\rho_c} = 0, \quad (5.1)$$

donde ρ_c representa el componente complejo de la densidad, p es la presión total, y k_{eq}^2 es la ecuación del número de onda. Para una geometría axisimétrica la ecuación de onda está dada por

$$k_{eq}^2 = \left(\frac{\omega}{c_c} \right)^2 - \left(\frac{m}{r} \right)^2, \quad (5.2)$$

donde ω es la frecuencia angular, c_c es la componente compleja de la velocidad del sonido en el medio, m indica el número de onda circunferencial y r la coordenada radial. En una geometría axisimétrica $p(r, \phi, z) = p(r, z)e^{-im\phi}$, por lo que el campo acústico no varía a lo largo de la coordenada azimutal ϕ . Como resultado, la ecuación para resolver la presión acústica en una geometría axisimétrica está determinada por

$$\frac{\partial}{\partial r} \left[-\frac{r}{\rho_c} \left(\frac{\partial p}{\partial r} \right) \right] + r \frac{\partial}{\partial z} \left[-\frac{1}{\rho_c} \left(\frac{\partial p}{\partial z} \right) \right] - \left[\left(\frac{\omega}{c_c} \right)^2 \right] \frac{rp}{\rho_c} = 0, \quad (5.3)$$

donde r es la coordenada radial, z la coordenada axial, p la presión acústica, ρ_c y c_c indican valores complejos de la densidad y la velocidad de propagación del sonido que se deben tener en cuenta por las propiedades de amortiguamiento de los materiales.

En seguida se detallan las condiciones de contorno para este estudio.

- Contorno de simetría axial: Este contorno se utiliza en modelos con simetría axial. Se puede entender como el eje de simetría. En Fig. 5.4 está marcado con una línea roja.



- Impedancia: Es una generalización de los contornos rígidos y blandos. Permite establecer una impedancia acústica definida en un contorno de interés. El comportamiento de este contorno está descrito por

$$-\mathbf{n} \cdot \left(-\frac{1}{\rho_c} (\nabla p) \right) + \frac{i\omega p}{Z_i} = 0, \quad (5.4)$$

donde $Z_i = \rho_c c_c$. Esta ecuación depende de una frecuencia harmónica o un barrido de frecuencias.

- Aceleración normal: Este contorno especifica un valor de aceleración que funciona como fuente externa del modelo. La ecuación de este contorno está dada por

$$-\mathbf{n} \cdot \left(-\frac{1}{\rho_c} (\nabla p) \right) = a_n \quad (5.5)$$

donde a_n es la aceleración normal conocida. En la Fig. 5.4 se muestra esta condición marcada con el número 1.

- Contorno rígido: Es un contorno o límite en donde el componente de aceleración es cero. En la Fig. 5.4 está marcado con el número 2.

5.5.1.3. Discretización del dominio

La discretización, o enmallado del dominio, está relacionada con la longitud de onda y con la geometría del problema [54]. Cuando la geometría contiene superficies curvas, como en nuestro caso, se prefieren utilizar elementos triangulares [55].

Algunos autores proponen que un número entre 5 y 12 elementos por longitud de onda es adecuado para la propagación de una onda [54,55]. Se han realizado pruebas

de convergencia para verificar que número de elementos es necesario para para obtener una cierta precisión en los resultados de las simulaciones [55].

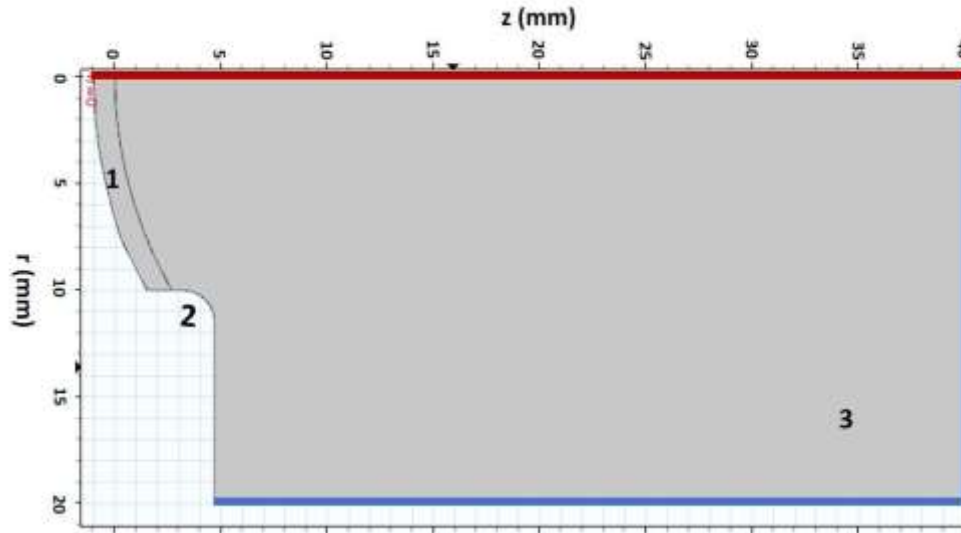


Fig. 5. 4: Geometría axisimétrica utilizada para la obtención del campo acústico en FEM. El dominio 1 representa el piezoeléctrico del transductor, el 2 simboliza el *housing* del transductor, 3 representa un espacio lleno de agua. La línea roja es el eje de simetría. Los contornos externos marcados con azul marcan la impedancia acústica del agua.

5.5.1.4. Propiedades de los materiales utilizados en el modelo FEM

Para realizarlos estudios de modelado se agregaron a la geometría dominios que representan los tejidos de la cabeza de la rata. Estos tejidos son: piel, cráneo meninges y cerebro. También se agregó el acoplador cónico de poliuretano. Las propiedades del cerámico se mostraron en la Tabla 5.1. Debido a la falta de información de propiedades de los tejidos de la cabeza de la rata, se utilizó información de tejidos humanos [56]. Estas propiedades se muestran en la Tabla 5.2.

5.5.1.5. Estudios de presión acústica realizados con FEM

Basados en la geometría que se aprecia en Fig. 5.4, se realizó un estudio para obtener la frecuencia de resonancia del transductor simulado. En este estudio se varió la frecuencia en un intervalo de 10 kHz hasta 4 MHz con pasos de 1 kHz, para poder



ser cotejados con los valores medidos al transductor real. Además, se realizó un análisis en frecuencia para observar el patrón de campo acústico del transductor.

Tabla 5. 2: Propiedades mecánicas y acústicas de los materiales.

Material	Velocidad del sonido, c (m/s)	Constante de atenuación, α (Np/m)	Densidad, ρ (kg/m ³)	Módulo de Young, E (Pa)
Poliuretano	1900	-	35	25 x10 ⁶
Piel	1624	43.96	1109	-
Cráneo	2814	113.36	1908	-
Meninges (tejido conectivo)	1545	34.18	1027	-
Cerebro	1546	17.60	1046	-

Para el diseño del acoplador entre el transductor y la cabeza de la rata se realizó un estudio en frecuencia. La geometría utilizada se muestra en Fig. 5.5. Para determinar la inclinación de la pared del aplicador, se varió la distancia entre su parte más distal al transductor y el eje de simetría. Para cada variación se analizó la presión acústica que incide sobre toda la pared del aplicador y las afectaciones que pueden tener sobre la distancia y geometría del foco.

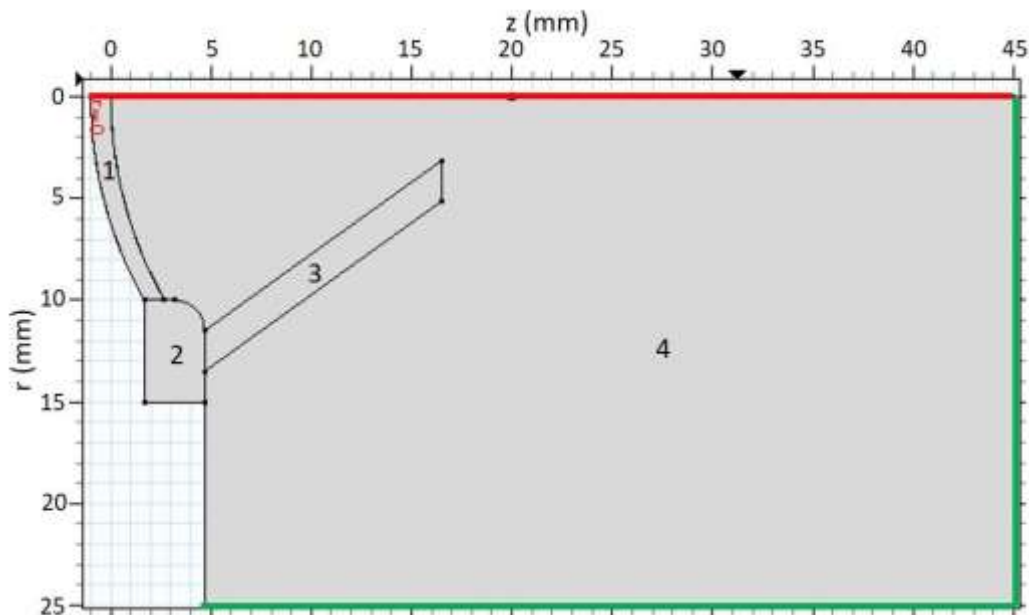


Fig. 5. 5: Geometría del estudio realizado para diseñar el aplicador cónico. 1 muestra el transductor, 2 el housing, 3 el aplicador cónico y 4 agua. Las fronteras marcadas de color verde tienen la impedancia acústica del agua.



A la geometría de la Fig. 5.5 se le agregaron dominios que representan los tejidos de la cabeza de una rata (Fig. 5.6). Con esta nueva geometría se llevó a cabo un estudio para ver la interacción de las ondas acústicas en los tejidos de la cabeza de la rata. Observando la distribución del patrón de campo acústico sobre la geometría y la presión a lo largo del eje de simetría.

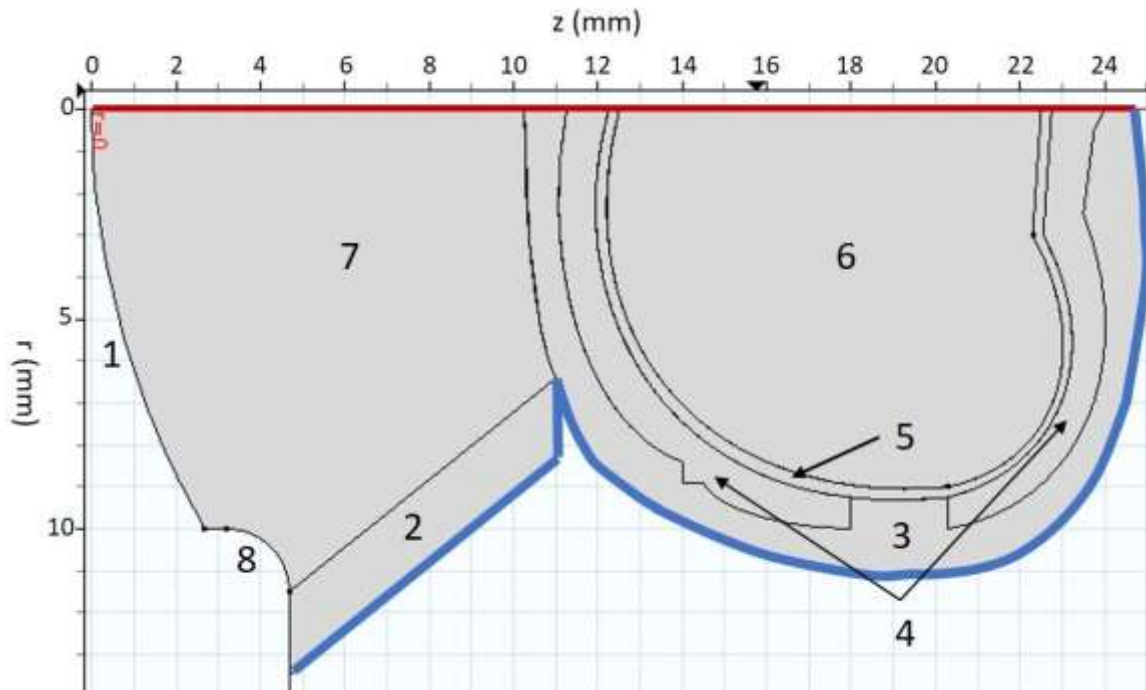


Fig. 5. 6: Geometría axisimétrica considerando los tejidos de la cabeza de la rata. 1 representa piezoeléctrico, 2 el acoplador cónico, 3 piel de la cabeza de la rata, 4 cráneo, 5 meninges, 6 cerebro, 7 agua, 8 *housing* del transductor. El contorno rojo muestra el eje de simetría. Los contornos externos marcados con azul tienen la impedancia acústica del aire.

5.5.2. Modelado del patrón de calentamiento

Un efecto que provoca el ultrasonido es el calentamiento en los tejidos. Para obtener el patrón de calentamiento se utilizó el módulo de transferencia calor incluido en el software, específicamente la ecuación de bioalentamiento de Pennes dada por

$$\rho C_p \frac{\partial T}{\partial t} + \nabla \cdot (-k \nabla T) = Q + Q_{bio}, \quad (5.6)$$



donde ρ es la densidad, C_p es la capacidad calorífica a presión constante y k es la conductividad térmica, T es la temperatura, Q es la fuente de calor externa y Q_{bio} es el bio-calor. Para nuestro caso, Q está dada por la absorción de energía ultrasónica que se calcula con

$$Q = 2\alpha_{ABS} I = 2\alpha_{ABS} \left(\text{Re} \frac{1}{2} p v \right), \quad (5.7)$$

donde α_{ABS} es el coeficiente de absorción acústica, I es la magnitud de intensidad acústica, p es la presión acústica, v es el vector velocidad de la partícula y Re número de Reynolds [51,57,58]. La intensidad acústica puede obtenerse una vez realizado el estudio para los cálculos de la presión acústica [52].

5.5.2.1. Condiciones contorno

La geometría utilizada para estos estudios se muestra en fig. 5.5. A cada dominio del contorno se le asignó una condición para la resolución del modelo de patrón de bioalentamiento y se describen a continuación.

- Bio-calor: Esta característica proporciona los términos de origen que representan la perfusión sanguínea y el metabolismo para modelar la transferencia de calor, se describen con

$$Q_{bio} = \rho_b C_b \omega_b (T_b - T) + Q_{met}, \quad (5.8)$$

donde ρ_b es la densidad de la sangre, C_b es el calor específico de la sangre, T la temperatura y Q_{met} es la fuente de calor metabólico.

- Fuente de calor: Describe la generación de calor dentro del dominio. Calentamiento y enfriamiento rápido con valores positivos y negativos



respectivamente. Todas las fuentes de calor dentro de un dominio contribuyen a la fuente de calor total. Esto es la suma de Ec. 5.7 y 5.8.

- **Temperatura:** Permite asignar una temperatura específica en algún lugar de la geometría, por ejemplo, las fronteras. La ecuación para esta condición es $T = T_0$, donde T_0 puede ser un valor especificado para cada contorno y se expresa en K.

5.5.2.2. Estudio del patrón de bioalentamiento

El estudio se realizó en el dominio del tiempo. Se estableció un intervalo de tiempo de entre 0 y 120 s con pasos de 1 s. El objetivo fue observar el patrón de calentamiento provocado por la interacción de las ondas ultrasónicas y los tejidos. Las propiedades térmicas de los tejidos se presentan en la Tabla 5.3.

Tabla 5. 3: Propiedades térmicas de los tejidos [56].

Tejido	Capacidad calorífica, C_p (J/Kg·K)	Conductividad térmica, k (W/m·K)
Piel	3391	0.37
Cráneo	1313	0.32
Meninges (tejido conectivo)	2372	0.39
Cerebro	3696	0.49

5.5.3. Modelado del efecto de las craneotomías

Se realizaron estudios en frecuencia y en tiempo para observar el patrón de presión acústica y de bioalentamiento en la geometría de la Fig. 5.5. Sin embargo, con el fin de analizar los efectos de atenuación del cráneo y los demás tejidos, los dominios que representan las meninges y la parte del cráneo más próxima al transductor son modificados realizando aperturas que emulan craneotomías de diferentes dimensiones. Con el análisis del campo de presión acústica y de



biocalentamiento se determinó la apertura mínima que permite que las propiedades del foco no se vean afectadas.

5.6. Fabricación de *phantom* de cerebro

El uso de este *phantom* permitió realizar las pruebas para diseñar el protocolo de aplicación de FUS para los experimentos *in vivo*.

Para la fabricación del *phantom* se utilizaron los siguientes materiales:

- Gelatina de piel bovina (Gelatin from bovine skin, gel strength 225 g Bloom Type B, Sigma Aldrich®)
- Etilenglicol (Ethylene Glycol, anhydrous 99.8 %, Sigma Aldrich®)

Los equipos que fueron utilizados para la preparación del emulador de tejido fueron:

- Balanza (American Weigh Scales®, AWS-201)
- Termoagitador (Felisa®, FE 311I)
- Termómetro digital (Hanna®, HI 935002)

El procedimiento para realizar el *phantom* fue la siguiente: se pesa la gelatina bovina con la balanza según el volumen de etilenglicol; para las pruebas realizadas con este *phantom* se calcularon las proporciones de 16% de la gelatina bovina. A continuación, se vierte el etilenglicol en un vaso de precipitado y que se coloca sobre el termoagitador a una temperatura de 100 °C y con una velocidad de 100 rpm. La temperatura del etilenglicol es monitoreada con el termómetro digital. Cuando se tiene una temperatura de 80 °C, se agrega la gelatina bovina manteniendo la agitación, pero apagando el calentamiento. Cuando la solución se enfría hasta llegar a los 40 °C se vacía en el molde o recipiente donde se solidificará. El proceso de preparación se



obtuvo de [59]. Para la medición de las propiedades del *phantom* se siguieron los pasos descritos en [52].

5.7. Diseño del protocolo de aplicación de FUS

Dado que se pretende abrir la BHE elevando la temperatura en la *substantia nigra* sin producir ablación del tejido, es necesario tener un protocolo definido que permita lograr dicho incremento de temperatura de forma controlada. Para esto se propone excitar el transductor a su frecuencia de resonancia con una señal envolvente pulsada, con posibilidad de ajuste en su *duty cycle* y en su intensidad. Es por esto, que se deben hacer experimentos con diferentes condiciones de excitación para encontrar la señal de excitación adecuada que permita un adecuado incremento de temperatura durante el tiempo del tratamiento. Además, los efectos provocados por estos incrementos de temperatura sean reversibles en el menor tiempo posible. Esto con el fin de agilizar la recuperación de los roedores y evitar infecciones debido al paso de microorganismo por la BHE asía el SNC.

Tomando en cuenta las características del transductor, las propiedades acústicas del *phantom* de cerebro, y los resultados de las simulaciones, se procedió a diseñar el tipo de señal de excitación del transductor, con respecto a los tiempos de encendido y apagado, buscando alcanzar una temperatura de 8° por encima de la temperatura inicial en el foco. Para esto, se midió la temperatura en el foco para diferentes *duty cycles* y potencias acústicas en el transductor.

Los equipos y materiales que se utilizaron para el diseño del protocolo de aplicación fueron:

- Generador de funciones (Tektronic®, modelo AFG3021B)
- Generador de funciones (LeCroy®, modelo 2052)



- Amplificador de potencia (Amplifier Research®, 500A250)
- Medidor de potencia (Amplifier Research®, PM2002)
- Sonda termopar hipodérmica (Omega®, Engineering, Inc)
- Tarjeta de adquisición (NI®, cDAQ-9172 y 9211)
- Transductor para FUS (Onda Corporation® 2-20-20/4)
- Acoplador de impedancia del transductor
- Phantom de cerebro al 16%
- Cráneo de rata Wistar

Para realizar las pruebas de calentamiento y obtener resultados más precisos, es necesario reproducir las condiciones en las cuales se realizarán los experimentos *in vivo*. Para lograr este objetivo se utilizó un *phantom* de cerebro con un cráneo de rata inmerso. A este cráneo se le colocaron 3 termopares para medir los incrementos de temperatura sobre su superficie, como se aprecia en figura 5.7. Con el fin de obtener la temperatura en el foco, se utilizó otro *phantom* al que se le colocó una hoja de cristal líquido para poder ubicarlo. Una vez encontrada la posición del foco se incrustó un tubo capilar de cristal y a través de él se insertó un termopar para registrar la temperatura en el foco (Fig. 5.8). Con la tarjeta de adquisición de *National Instrument* 9172 y una computadora personal se registraron los datos de temperatura cada 1 s.

El uso de termopares o fibras ópticas para la medición de los incrementos de temperaturas provocados por los campos ultrasónicos, presentan errores debido a la interferencia que el ultrasonido causa en ellos. Para el caso de los termopares se han reportado errores ocasionados por la viscosidad del medio y la vibración del sensor.



Este tipo de calentamiento es conocido como “calentamiento-viscoso” y puede inducir un incremento de varios grados Celsius, según la intensidad del ultrasonido y las dimensiones del sensor [60, 61]. Para corregir este problema se siguió la solución propuesta por Hynynen en 1983 [62], en el que se considera que la temperatura ocasionada por el calentamiento-viscoso se estabiliza durante los primeros segundos del calentamiento. Una vez que se estabiliza, los incrementos de temperatura medidos corresponden a la absorción de la energía. Si se localiza la temperatura de estabilización, ésta se puede restar de la parte de calentamiento para obtener una aproximación de la temperatura causada por la absorción de la energía. Para hacer las correcciones y el postprocesamiento de los datos obtenidos se utilizó Matlab®

Para hacer las pruebas y obtener el protocolo de aplicación se configuraron los equipos de la siguiente manera: el generador LeCroy® produce una señal senoidal con



Fig. 5. 7: Colocación de termopares sobre cráneo de rata para registrar el aumento de temperatura que provocan las ondas ultrasónicas.

una amplitud de -10 dBm y frecuencia de 1.965 MHz. Esta señal estaba modulada mediante un generador Tektronic®, el cual crea un pulso con amplitud de 6 Vpp. La señal obtenida era amplificada mediante un amplificador de potencia Amplifier Research®. Con este amplificador se variaba la ganancia con el fin de ajustar la potencia a 2, 5, 6 W para realizar las pruebas sobre el phantom. Otra variable que se



modificó fue el *duty cycle*, el cual tuvo valores de 20, 30, 40, 50 y 60 por ciento. La tabla 5.4 muestra las combinaciones de los valores que se obtuvieron.

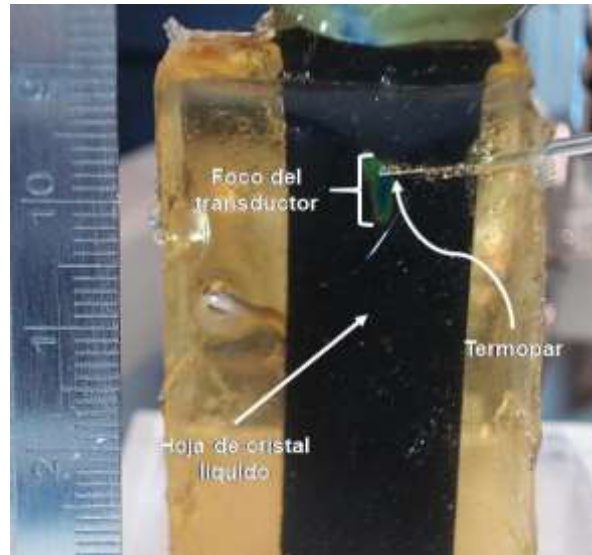


Fig. 5. 8: Inserción de termopar dentro de *phantom* posicionado sobre el foco del transductor.

5.8. Experimentos in vivo

Las pruebas in vivo permiten observar si se logra permear la BHE. Este resultado fue evaluado utilizando azul de Evans (EB, por sus siglas en ingles). Este colorante se eligió ya que, al ser administrado de forma intravenosa en el roedor, todos sus tejidos se tiñen a excepción del SNC. Esto se debe a que su tamaño y peso molecular le impiden pasar por si solo a través de la BHE. Además, estas propiedades son

Tabla 5. 4: Protocolos obtenidos con la combinación de valores de *cycle duty*.

Protocolo	Duración de calentamiento (s)	Conformación	
		<i>Cycle duty</i> (%)	Duración (s)
P1	60	60	10
		50	10
		20	40
P2	60	50	15
		40	15
		20	30
P3	60	60	10
		30	50



semejantes a las del fármaco desarrollado en el departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV.

Para observar la apertura y cierre de la BHE, se probó el protocolo de excitación resultante de las pruebas con *phantom* y las craneotomías obtenidas con los estudios en FEM. Todos los animales que se utilizaron durante las pruebas *in vivo* fueron ratas machos de la sepa Wistar con un peso entre 210 g y 230 g. El comité aprobó los procedimientos de usos de animales (protocolo 165-12). A demás se sigue la norma mexicana para el manejo de animales NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 [58].

5.8.1. Localización del sitio de aplicación

Antes de hacer las pruebas con el protocolo diseñado es necesario localizar con el estereotáxico las coordenadas de la zona de aplicación. En nuestro caso la zona de interés es *la substantia nigra*. Por lo que se debe posicionar el centro del transductor sobre esta estructura. Para esto se utilizaron los siguientes materiales y equipos:

- Anestésico: Este es una mezcla de 990 μL de Xilacina (PISA[®] agropecuaria, Reg. S.A.G.A.R.P.A. Q-7833-099) y 2540 μL de Ketamina (PISA[®] agropecuaria, Reg. S.A.G.A.R.P.A. Q-7833-028).
- Lidocaína (Xylocaína[®], solución inyectable al 2 %)
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
- Azul de Evans (Sigma-Aldrich[®], Evans Blue)
- Rasuradora para mascotas (Wahl[®], Clipper Pet)
- Estereotáxico para rata (Stoelting[®], 51600)



- Bomba de inyección (Stoelting®, 53100)

Para obtener las coordenadas de la zona de aplicación se realizó lo siguiente: la rata es anestesiada con una dosis de la mezcla de 0.32 mL por 220 g, una vez que la rata esta inconsciente se rasura y se fija en el estereotáxico. En seguida se localiza la sutura lambda, mostrada en la Fig. 5.9, y se posiciona sobre ella la barra del estereotáxico. Tomando este punto como referencia se recorren 2 mm en el eje trasversal y 2.1 mm en el eje anteroposterior [59]. Estando con las nuevas coordenadas se hace un orificio por donde se incide una aguja 6.7 mm en la coordenada ventral a partir del cráneo. Mediante esta aguja se inyecta 2 μ L de EB a una velocidad de 12 μ L/h mediante la bomba de inyección. Tras terminar de inyectar el volumen total de colorante, la rata es sacrificada. Se extrae el cerebro del roedor y se hacen cortes para observa si la tinción se encuentra sobre la *substantia nigra*. Para asegurar la repetibilidad de la coordenada se realizó este procedimiento con 3 ratas.

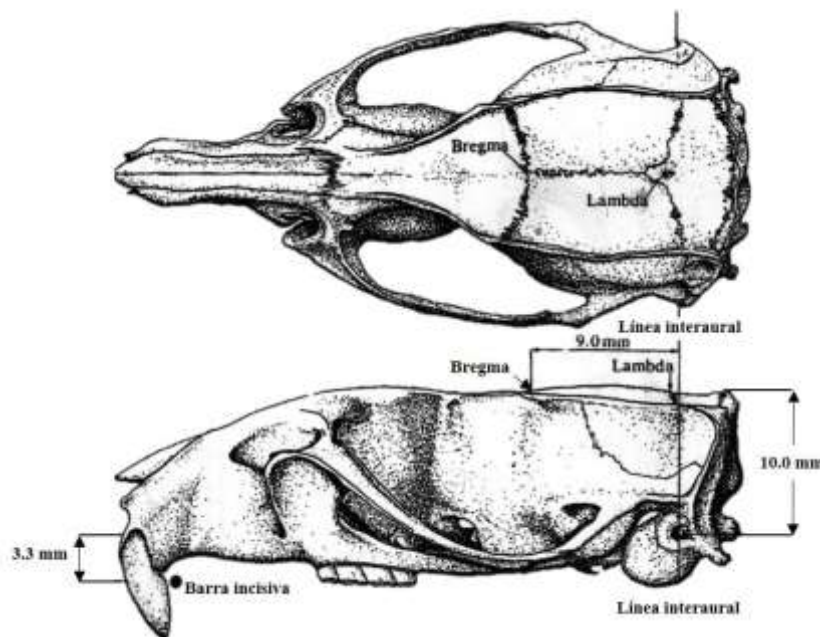


Fig. 5. 9: Cráneo de una rata de la sepa Wistar. Se aprecian las suturas craneales bregma y lambda. Para este trabajo se tomó como referencia la sutura lambda [65].

5.8.2. Rata control



Estas pruebas se llevaron a cabo para observar el tejido cerebral de una rata sin aplicar el protocolo de sonicación con FUS, así como también para prestar atención a la tinción de los tejidos de todo cuerpo de la rata después de la inyección de EB. La inyección del EB se realizó vía intravenosa. La vena en la cual se inyectó el colorante fue la vena dorsal de la cola de la rata, como se ve en la figura 5.10.

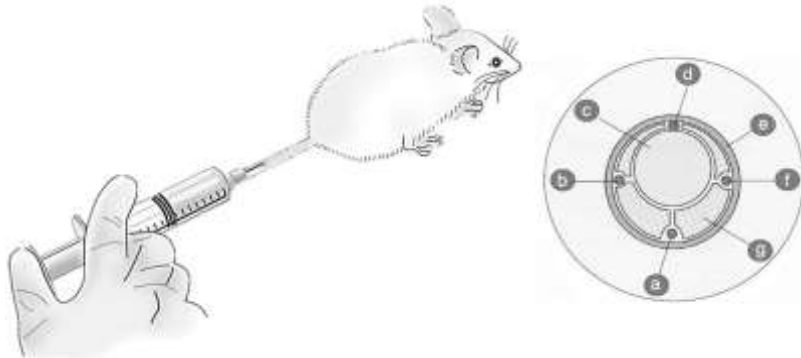


Fig. 5. 10: A la izquierda se aprecia la inyección de Azul de Evans vía intravenosa. La imagen de la derecha muestra un corte transversal de la cola de una rata: arteria ventral (a), venas laterales (b, f), vertebra (c), vena dorsal (d), piel (e) y tendones (g)

5.8.3. Apertura de la BHE con FUS en ratas

Con los datos obtenidos de las simulaciones y los experimentos en el simulador de tejido. Se procedió a realizar la experimentación con ratas. Los materiales y los equipos utilizados para estas pruebas son los mismos de la sección 5.6 y 5.7.1. La metodología que se siguió se describe a continuación.

La rata es pesada para calcular la dosis de anestésico. El anestésico se inyecta vía intraperitoneal. Cuando la rata está inconsciente se le rasura la cabeza para retirar el exceso de pelo, (fig. 5.11). En seguida la rata se coloca en el estereotáxico. Primero se sujeta la cabeza mediante las barras laterales introduciéndolas por los canales auditivos, manteniendo la simetría de la posición. En seguida se sujeta la parte anterior del animal apoyando los dientes incisivos superiores en la proyección frontal del equipo estereotáxico, como se aprecia en la Fig. 5.12.



Fig. 5. 11: Se retira el exceso de pelo de la cabeza de la rata sobre la zona del procedimiento.

Cuando la rata esté en posición, y sujeta correctamente, se procede a realizar una incisión de 2 cm aproximadamente. Antes de comenzar la incisión se inyecta 0.2 mL de lidocaína de forma subcutánea con el fin de disminuir el sangrado. Se utiliza un bisturí para realizar la incisión, la cual se realiza en un solo movimiento desde la parte anterior hasta la parte posterior, finalizando el corte a la altura de las orejas de la rata. Se utiliza agua oxigenada para limpiar el cráneo y se retira el periostio con la intención de visualizar la sutura lambdaidea. Se toma esta coordenada como referencia y se mueven 2 mm en el eje transversal y 2.1 mm en el eje anteroposterior, para posicionar el centro del transductor sobre la *substantia nigra*.



Fig. 5. 12: Rata sujeta al estereotáxico previo a la aplicación de Ultrasonido.



Para evitar los efectos de atenuación que causa el cráneo se realizaron diferentes aperturas en el cráneo, de 1 mm, 3 mm, 6 mm y 10 mm por lado. Para llevar a cabo la craneotomía se utilizó un taladro (Dremel®, Multipro™, modelo 395) y brocas de 1 mm. Se tomó como centro de las craneotomías la coordenada que posiciona el centro del transductor sobre la zona deseada. Partiendo de ese punto se marca el fragmento de hueso que se retirará y se prosigue con la remoción de este, como se aprecia en la figura 5.13. Las craneotomías obtenidas se observan en la figura 5.14.

Antes de comenzar el tratamiento se inyectó 1 mL de EB por medio de la vena dorsal de la cola de la rata. El transductor es fijado en el brazo de profundidad utilizando las coordenadas fijadas anteriormente. Se utiliza el aplicador cónico relleno de agua como medio de propagación entre el transductor y la zona de aplicación. Entre el cono y la cabeza de la rata se aplica gel para ultrasonido para mejorar el acoplamiento. El transductor será excitado mediante una onda sinodal de 1.965 MHz modulada por un pulso cuadrado de 10 Hz. Se realizan dos aplicaciones con una pausa de 30 s entre ellas. Esto con el fin de permitir que la temperatura de la rata se estabilice y no provocar daños. La Fig. 5.15 muestra la configuración del experimento. Al finalizar la aplicación de FUS la porción de cráneo retirada se coloca de nuevo sobre la cabeza



Fig. 5. 13: La zona de la craneotomía es marcada tomando como centro la coordenada sobre la sustancia negra (izquierda). En seguida se procede a retirar el fragmento del hueso marcado utilizando el Dremel® (derecha).

de la rata. Para evitar que la tapa de hueso se mueva, se fija con cera de hueso como se puede ver en la figura 5.16. En seguida se sutura la incisión que se practicó previo



a la sonicación y se mantiene bajo observación al roedor. Después de 24 h la rata es sacrificada.

5.8.4. Cierre de la BHE con FUS en ratas

Con el fin de demostrar que el protocolo permita la reversibilidad de los efectos logrados, es necesario verificar que la BHE sea capaz de regresar a su estado normal al transcurrir unas horas después de la aplicación del FUS. Para poder observar esto, se aplicó el protocolo descrito en la sección anterior, con la diferencia de que el EB fue administrado después de la sonicación. Es decir, se inyectó EB a 6 h, 8 h, 12 h, 24 h y 48 h después de aplicar el FUS a los roedores. Tras realizar las inyecciones en los horarios mencionados se sacrificó a las ratas 24 h después con el fin de permitir al colorante circular totalmente dentro del torrente sanguíneo.

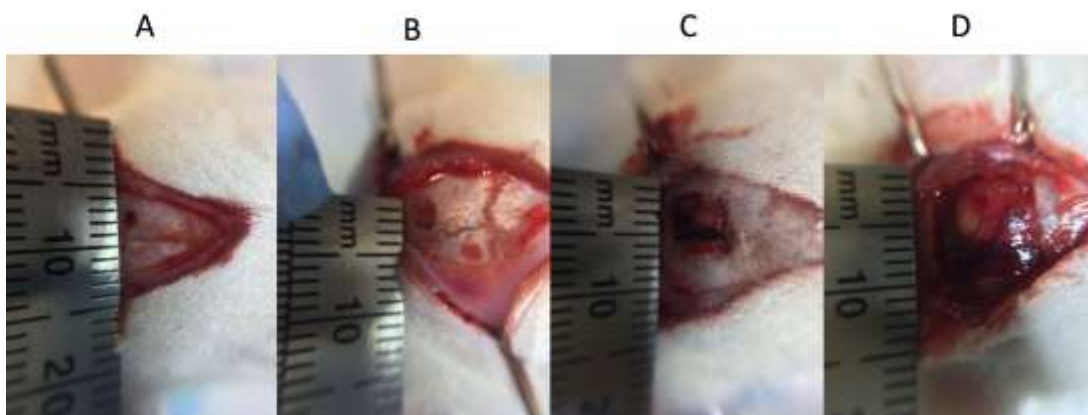


Fig. 5. 14: Trépanos y craneotomías realizadas. A y B muestran los orificios con diámetros de 1 mm y 3 mm respectivamente, C y D muestran las craneotomías de 6 mm y 10 mm por lado, respectivamente.

5.9. Sacrificio, extracción del cerebro y obtención de cortes

Para poder analizar los resultados de la aplicación del FUS, es necesario sacrificar las ratas, extraer su cerebro y realizar cortes de éste. Para realizarlo se utilizan los siguientes equipos y materiales.

- Pentobarbital sódico (Pisabental, PISA® agropecuaria, Reg. S.A.G.A.R.P.A. Q-7833-215)



- Guillotina para rata (Nemi scientific USA)
- Vibratomo (VT1200S, Leica, USA)
- Hielo y solución salina.
- Pinzas de disección, tijeras de disección y gubias quirurgicas



Fig. 5. 16: A la izquierda se aprecia el fragmento de hueso reincorporado al cráneo de la rata y fijado con cera. En la derecha se puede observar a la rata con la cabeza suturada tras recibir la aplicación de FUS.

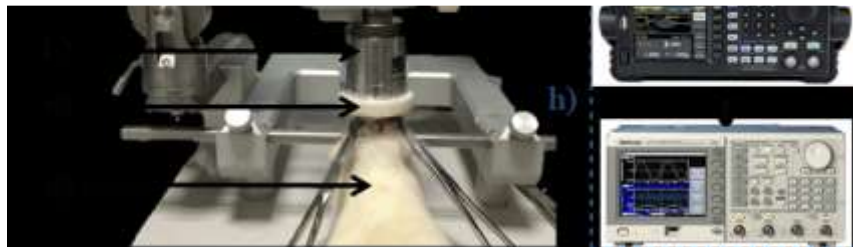


Fig. 5. 15: Montaje experimental. a) Acoplador de impedancias, b) transductor de ultrasonido focalizado, c) como aplicador lleno de agua, d) rata Wistar, e) medidor de potencia, f) amplificador de potencia, g) osciloscopio, h) generador de señal.

La rata es anestesiada con pentobarbital sódico con una dosis de 0.7 mL por 220 gr. Cuando la rata esta inconsciente se sacrifica degollándola con la guillotina. Después del sacrificio se extrae el cerebro de la rata. Para mantener la consistencia del tejido y facilitar su corte, el cerebro es colocado en solución salina fría. Después de unos minutos se retira el cerebelo para colocar el resto del cerebro en la base del vibratomo (Fig. 5.17). En este equipo se realizan los cortes del encéfalo con un espesor



de 200 μm . Estos cortes se llevan a cabo con una velocidad de 1.5 mm/s y un desplazamiento de la navaja de 2 mm.

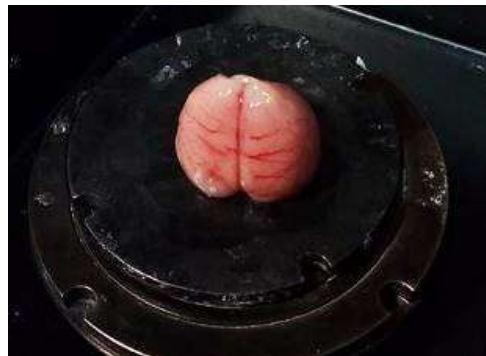


Fig. 5. 17: Cerebro sin cerebelo fijo en la base del vibratomo antes de realizar los cortes



CAPÍTULO 6

Resultados y Discusión

6.1. Transductor y su caracterización

Como se mencionó en la sección 5.1, la caracterización del transductor se realizó en [52]. Solo se presentarán los resultados obtenidos de la medición de frecuencia de resonancia del transductor, debido a que estas mediciones se utilizaron para mejorar los modelos computacionales.

6.1.1. Resultado de la medición y simulación de la frecuencia de resonancia.

Las propiedades eléctricas del transductor se obtuvieron siguiendo la metodología descrita en el apartado 5.1.1. Como se mencionó con anterioridad tanto en la medición como en la simulación en FEM, se realizó un estudio de la impedancia del transductor en un intervalo de 10 kHz a 4 MHz con pasos de 1 kHz. Estas mediciones se hicieron en aire y agua sin utilizar el acoplador de impedancia. En fig. 6.1 (a) se muestra el resultado de la simulación y de la medición ambos en aire. Se aprecia que la frecuencia de resonancia en la medición es de 2.078 MHz con una impedancia de 1.1742 Ω mientras que en la simulación se obtuvo una frecuencia de resonancia de 2.048 MHz y una impedancia de 2.5343 Ω . Estos cambios están relacionados a variaciones en las propiedades del material piezoeléctrico real, al espesor y a las diferencias en la curvatura del disco en contraste con la geometría simulada. En Fig. 6.1 (b) se presenta

las mediciones y la simulación en agua. En este caso los resultados fueron una frecuencia de resonancia de 2.053 MHz y 2.044 MHz para la medición y simulación respectivamente. Y con impedancias de 11.41 Ω para la medición y 8.274 Ω en la simulación.

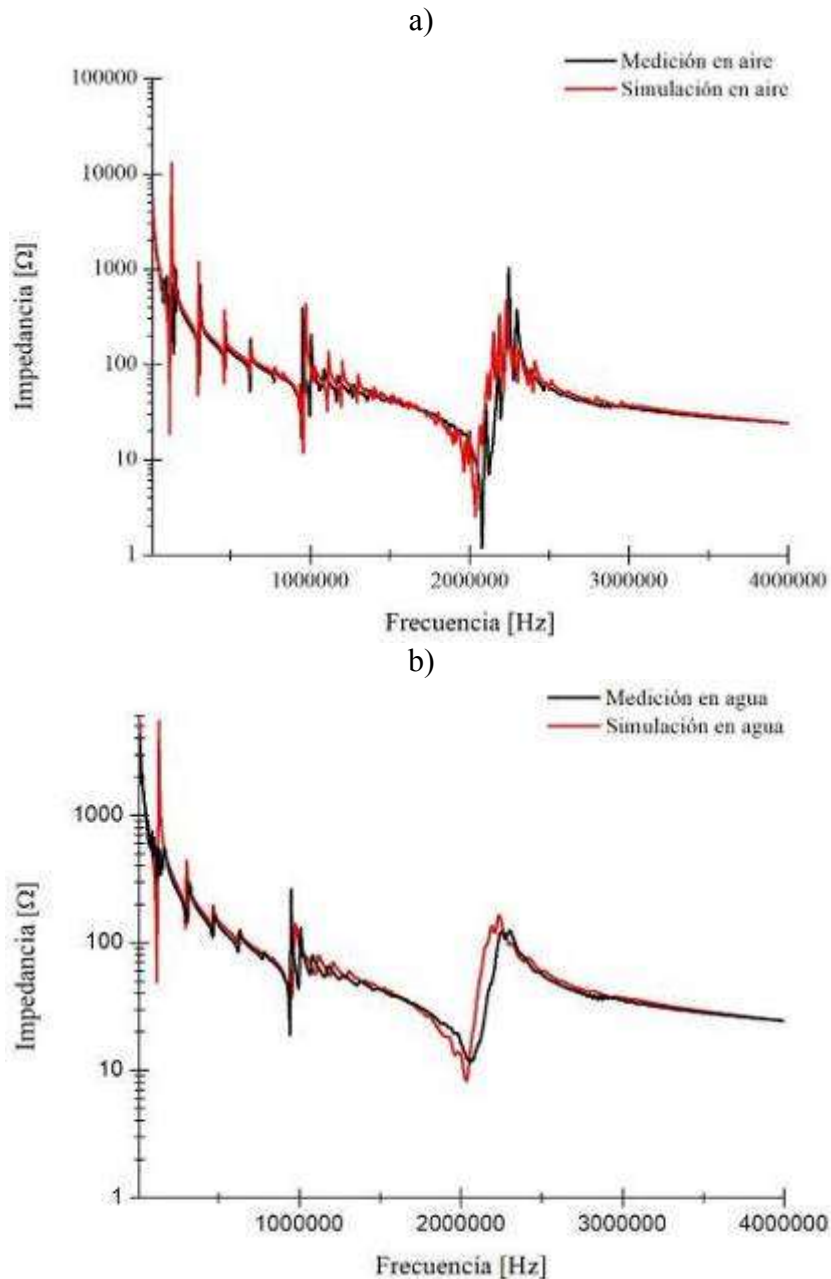


Fig. 6. 1: Frecuencia de resonancia del transductor simulada y medida. a) presenta los resultados obtenidos en aire y b) muestra los resultados en agua.



6.2. Resultados de las simulaciones en FEM

En este apartado se muestran y discuten los resultados obtenidos en los modelos en FEM. Estos modelos incluyen el patrón de campo acústico del transductor solo, el diseño del cono aplicador, el campo acústico a través de los tejidos de la cabeza de la rata, el patrón de calentamiento que generan las ondas ultrasónicas sobre estos tejidos y el estudio de las craneotomías.

6.2.1. Discretización del dominio

Para obtener el número de elementos por longitud de onda se realizó un estudio de convergencia aplicado al modelo. El resultado obtenido de este análisis permitió determinar que con 9 elementos por longitud de onda obtenemos un error menor de 2%. La malla utilizada en el modelo fue triangular dado que la geometría utilizada presenta curvaturas [55, 65].

6.2.2. Resultados del modelado de campo acústico

Como se ha mencionado con anterioridad las mediciones de campo acústico del transductor utilizado se realizaron en [52]. En esta sección se presenta los resultados del modelo en FEM descrito en la sección 5.5.1. La presión acústica obtenida en la simulación sobre el eje x y el eje y respecto a los 20 mm de eje "Z" se muestran en Fig. 6.2 (A) y (B) respectivamente, así como la presión medida. Es posible observar que la presión medida en el centro del eje x es de 1.62 MPa, así como el valor obtenido en ese mismo punto en la simulación fue de 1.59 MPa. El resultado de la simulación de la presión en el eje y respecto a los 20 mm del eje z , tuvo un valor de 1.61 MPa. Por su parte el valor medido fue de 1.63 MPa. Ambos encontrando este valor en el centro del eje y . La presión acústica a lo largo del eje z se muestra en Fig. 6.2 (C). Se puede observar que el valor más alto se encuentra sobre la distancia focal del transductor, es decir 20 mm. Los valores obtenidos en la medición y la simulación fueron de 1.63 MPa y de 1.61 MPa respectivamente.

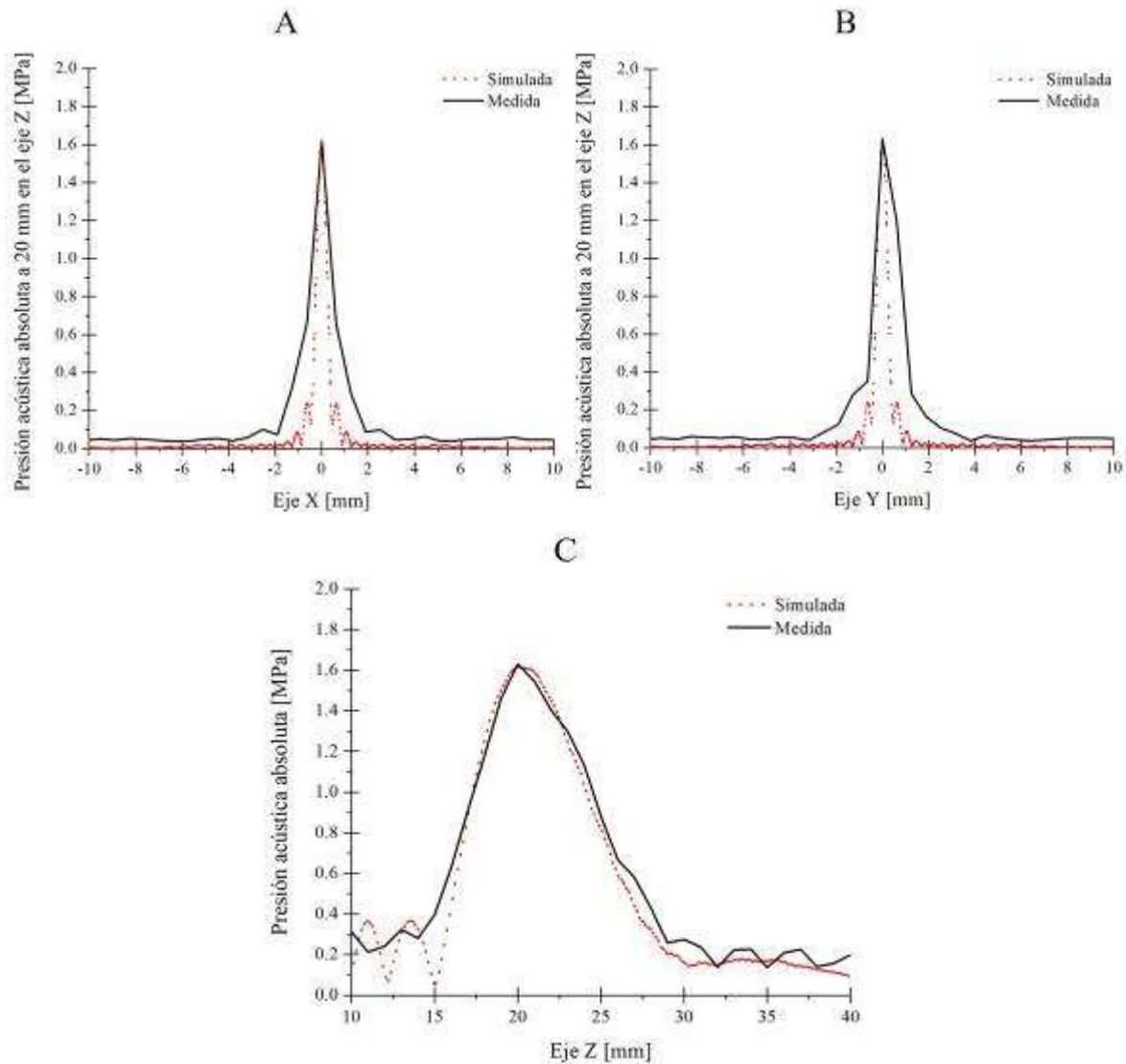


Fig. 6. 5: Presión acústica obtenida en la simulación con FEM y su comparación con las mediciones. Se presentan los valores de la presión en los ejes X (A), Y(B) y Z(C).

Las gráficas mostradas en la figura 6.2 también permiten observar las dimensiones del foco. Los valores obtenidos en la simulación son muy aproximados a los medidos, esto da la pauta para utilizar el modelo en los estudios posteriores.

6.2.2.1. Resultado del diseño del aplicador cónico para FUS

Los requerimientos para el diseño del aplicador son mencionados en la sección 5.5.1.5. En las simulaciones realizadas se varió la inclinación de la pared del cono para observar la presión que incidía sobre él y las alteraciones que generaban al patrón de



campo acústico. La Fig. 6.3 muestra la presión sobre el eje z , que tras la simulación en diferentes inclinaciones de la pared, se obtuvo un cono cuya pared interna tiene un ángulo de inclinación de $\sim 51^\circ$ y un radio de 5.2 mm en su parte posterior. La geometría cónica con las características mencionadas no afecta la geometría del foco, pero sí lo desplaza 0.77 mm en dirección z .

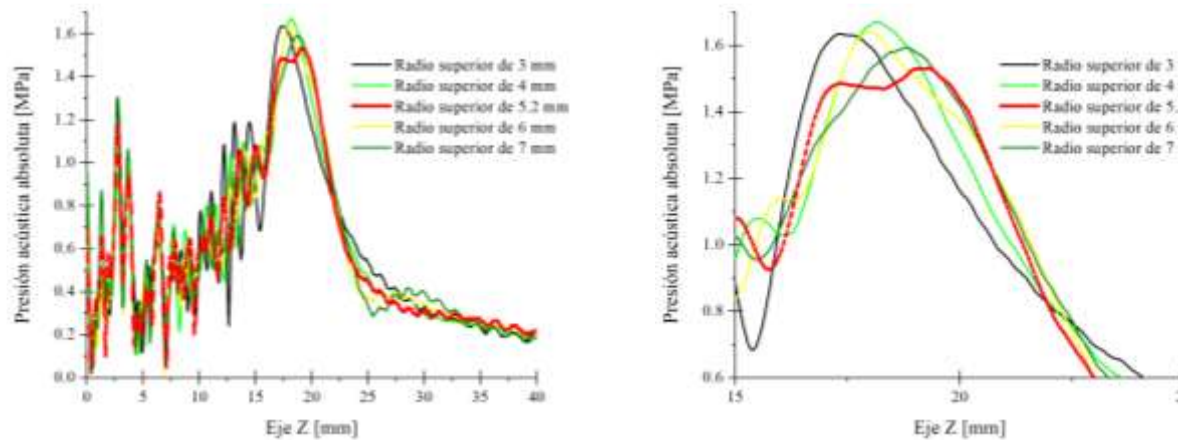


Fig. 6. 9: Presión acústica absoluta a lo largo del eje Z con diferentes radios superiores (izquierda). El gráfico de la derecha presenta las mismas curvas, pero con mayor detalle.

El plano axial obtenido con las características anteriores se utilizó para generar el modelo en 3D. Este modelo fue impreso en TPU con una densidad del 15 % ya que una densidad mayor no ofrece la flexibilidad que el aplicador necesita para facilitar su montaje en el transductor. El cono resultante es llenado con agua por lo que se acondiciono con una película de látex con el fin de evitar un derrame del líquido que servirá como medio de propagación (Fig. 6.4).



Fig. 6. 13: Cono obtenido e impreso en 3D. Se acopló una película de látex para evitar el derrame del agua con la que será llenado con el fin de brindar un medio de propagación.



6.2.2.2. Resultado de la simulación del campo acústico sobre la cabeza de una rata

Con el fin de estudiar el efecto que causan el cráneo, las meninges y el propio cerebro a la propagación de las ondas de ultrasonido, se realizó un estudio del campo acústico en la cabeza de la rata. La figura 6.5 nos muestra como el hueso absorbe la mayor cantidad de energía acústica, provocando una deformación del foco y atenuando la presión que debería llegar a éste.

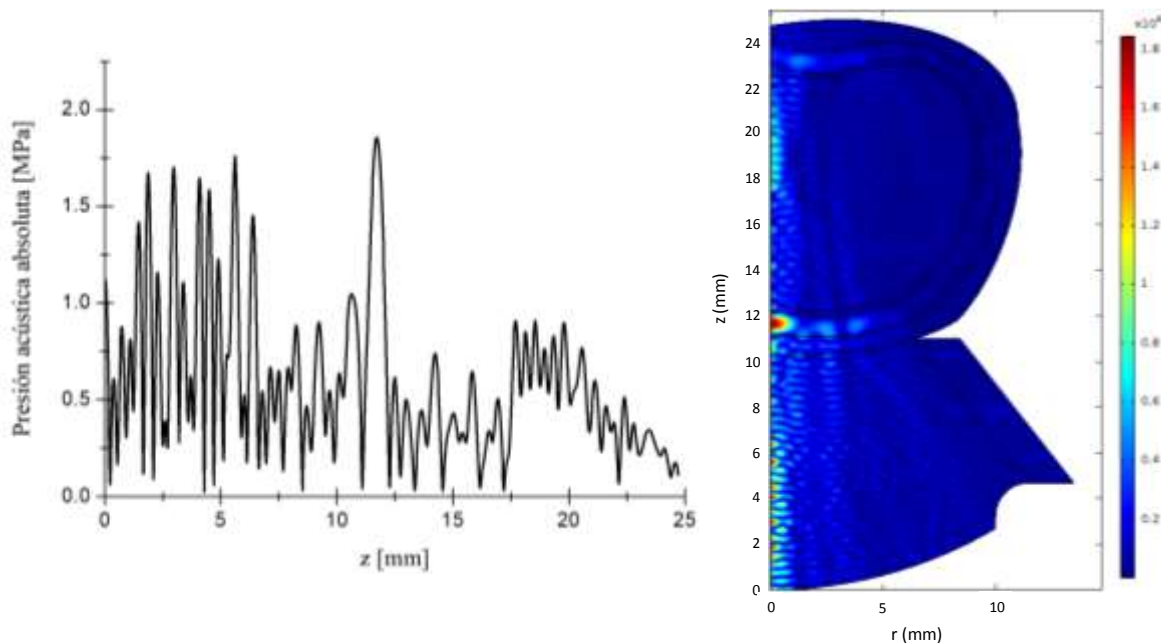


Fig. 6.17: Resultados de la simulación de presión acústica. A la izquierda se presenta el gráfico que muestra la propagación de la presión acústica absoluta a lo largo de eje de simetría. En la derecha se presenta el patrón de campo acústico en toda la geometría.

6.2.3. Resultados de los estudios de patrón de calentamiento

Las simulaciones del calentamiento provocado por el FUS en el la cabeza de la rata generan un patrón de calentamiento sobre los tejidos que la componen, así como se aprecia en Fig. 6.6. Como se mencionó en la sección anterior, la absorción de energía del hueso provoca un incremento de temperatura que limitaría la apertura de la BHE a la corteza del cerebro del roedor. Estos modelos nos permitieron tener una idea del patrón de calentamiento que se generará en los experimentos *in vivo*.

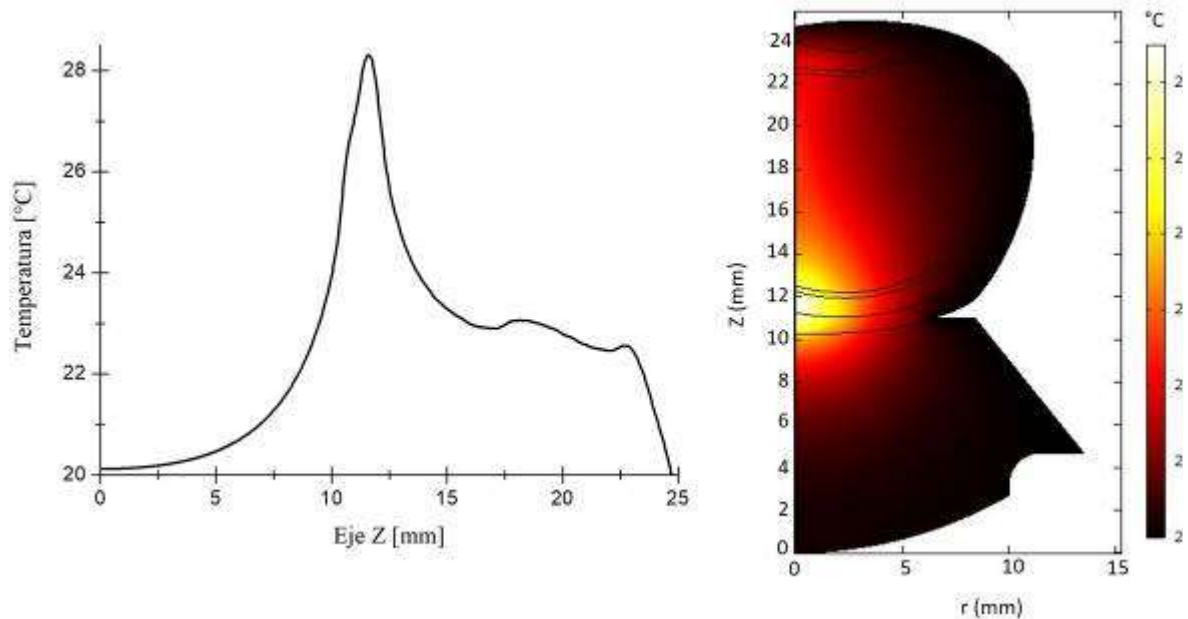


Fig. 6. 21: Resultado del estudio de calentamiento provocado por las ondas de ultrasonido. A la izquierda se presenta la temperatura a lo largo del eje Z. A la derecha se observa el patrón de calentamiento sobre los tejidos de la cabeza de rata.

6.2.4. Resultado del modelado del efecto de craneotomías

Con el fin de evitar los efectos negativos que provoca el cráneo de la rata en la aplicación de FUS para la apertura de la BHE, se propuso realizar craneotomías en las ratas. Se realizó un estudio para evaluar la menor dimensión que permite a las ondas de ultrasonido propagarse por el tejido cerebral sin afectar la distancia focal y la geometría del foco. Dicho estudio se describió en la sección 5.5.3. Se analizaron aperturas en el cráneo de 0.5, 1.5, 3.0, y 5 mm de longitud. Para cada caso se estudió la presión acústica y las elevaciones de temperatura que estas generaban. La Fig. 6.7 muestra las presiones acústicas para cada caso mencionado. Se observa que una craneotomía de 5 mm permite una buena propagación de las ondas de ultrasonido sobre el eje z . En comparación con el caso ideal, el cual sería la cabeza sin cráneo, este resultado solo varía 6%.

Con el fin de entender los incrementos de temperatura que se generan para cada craneotomía, se realizó un estudio del patrón de calentamiento para cada caso. Las

curvas que se generan se presentan en la Fig. 6.8. Los picos que se forman a partir de los 22.5 mm en el eje z se deben al reflejo que provoca el dominio que emula la base del cráneo. El mejor resultado obtenido de estos estudios fue la craneotomía de 5 mm de radio. Esta apertura permite a las ondas de ultrasonido una propagación tal que no deforma ni el foco, ni la distancia focal.

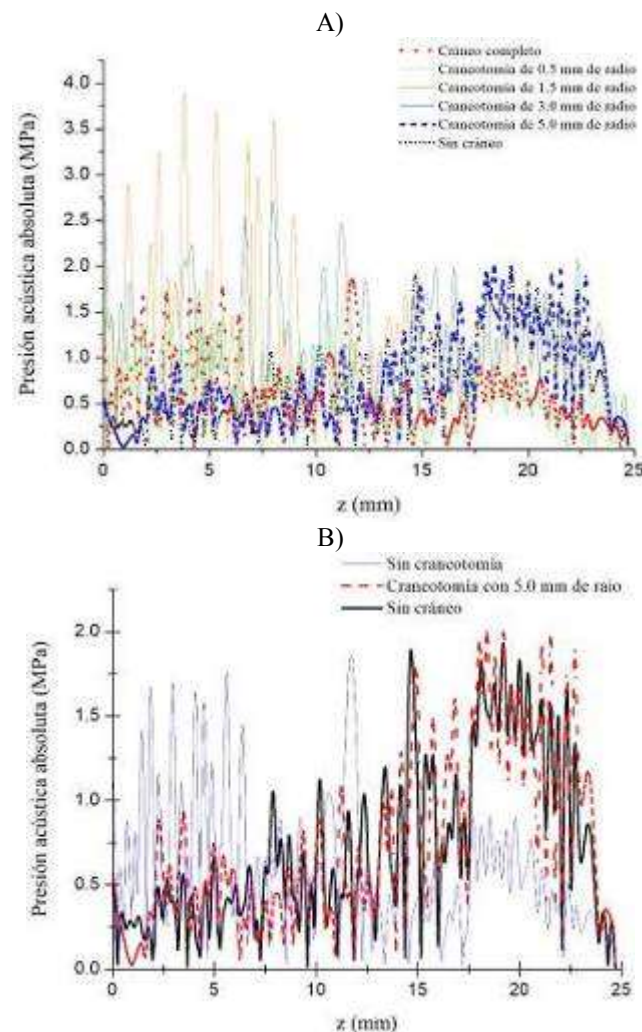


Fig. 6. 25: A) Muestra la presión acústica absoluta para cada craneotomía sobre el eje Z . B) muestra de forma detallada la propagación de la presión en la apertura de 5 mm de radio.

6.3. Resultado del diseño del protocolo de aplicación.

En la sección 5.7 se describe el proceso de las pruebas realizadas para obtener el protocolo de aplicación de FUS. Se propuso utilizar una mayor potencia y tiempos de

exposición cortos para evitar la ablación que se causaba con protocolos anteriores. En las primeras pruebas registramos la temperatura sobre el cráneo con el fin de encontrar una combinación de potencias y *duty cycles* que provoque el mínimo calentamiento sobre éste. La Fig. 6.9 muestra los incrementos de temperatura registrados por los termopares en la parte superior del cráneo con los protocolos mostrados en la Tabla 5.4. y su corrección. Para esta gráfica se eliminó la parte del enfriamiento debido a que no fue posible determinar el efecto de enfriamiento viscoso, el cual en esta región está combinado con el enfriamiento por conducción.

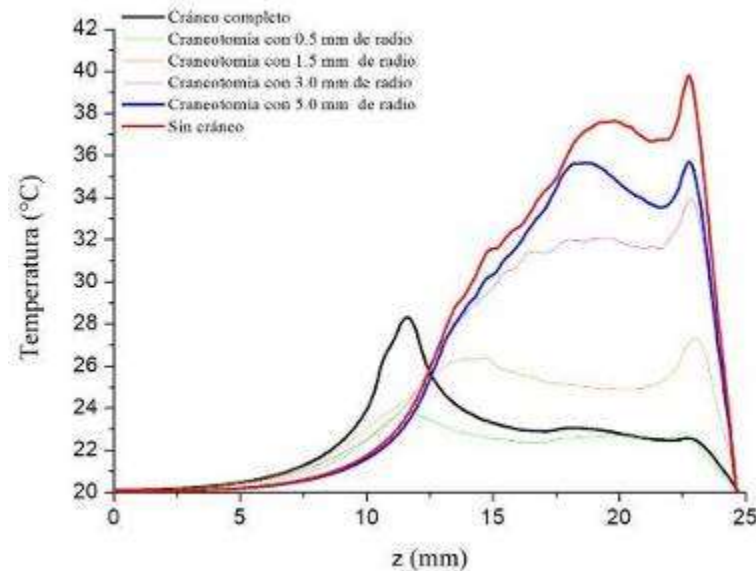


Fig. 6. 29: Incremento de temperatura para caso del estudio de las craneotomías.

Todas las mediciones se comenzaron a los 22 °C. En los protocolos 1 y 2 se registraron mediciones hasta 59.1 °C y 59.6 °C respectivamente. Sin embargo, estas mediciones fueron corregidas debido al artefacto causado por el calentamiento viscoso y se obtuvo una temperatura de 50.9 °C y 49.9 °C. El protocolo 3 registro un mejor comportamiento alcanzando una temperatura de 59.0 °C según las mediciones. No obstante, con la corrección que se le hizo se obtuvo una temperatura de 35.1 °C.



Considerando que se realizarán craneotomías se realizó la medición de la temperatura en el foco del transductor. La Fig. 6.10 muestra el registro de la temperatura sobre el foco con el protocolo 3 así como su corrección.

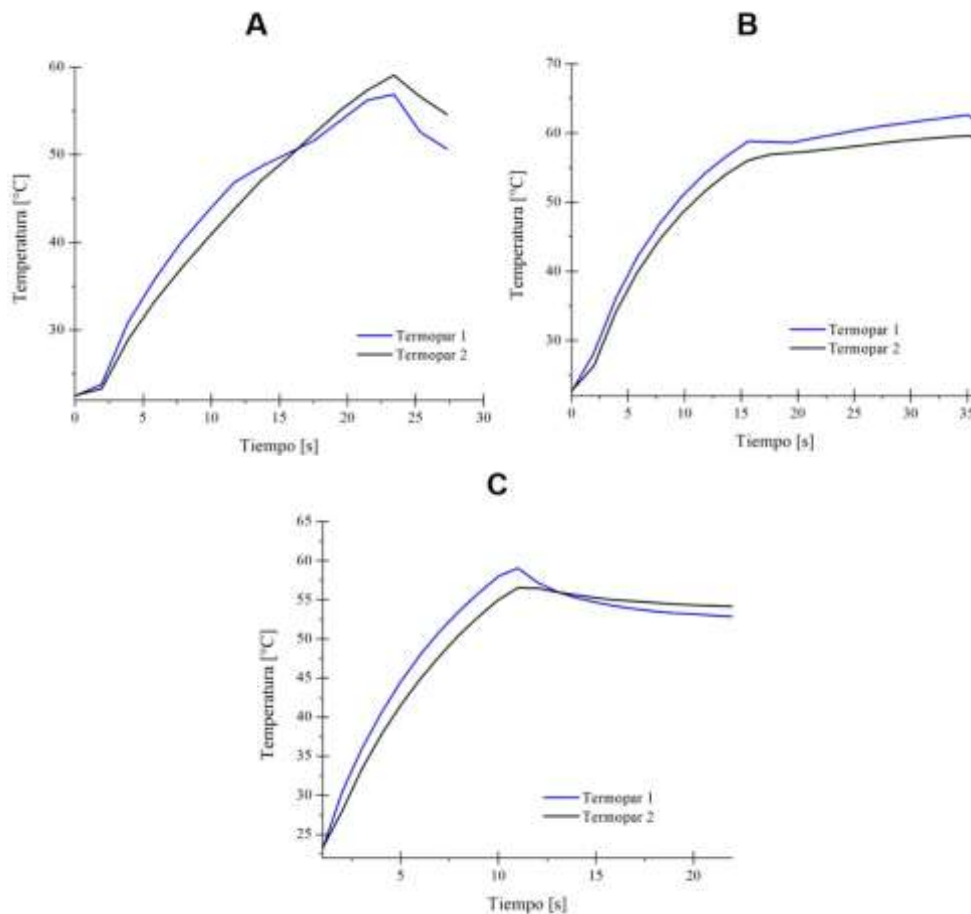


Fig. 6. 33: Calentamiento medido con termopares sobre el cráneo de la rata con los distintos protocolos

Los incrementos de temperatura obtenidos no presentan el efecto de calentamiento. Debido a los incrementos de amplitud de la temperatura sobre el cráneo y el foco obtenidos con el protocolo 3, se decidió utilizar éste para los experimentos *in vivo*. Con estos calentamientos moderados se pretende evitar la ablación del tejido en la zona de aplicación.

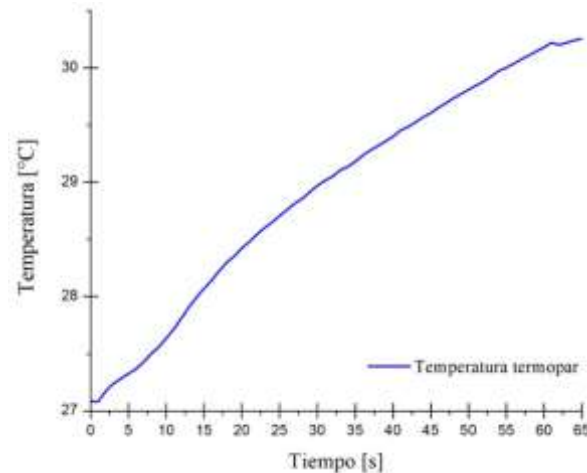


Fig. 6. 37: Incremento de temperatura producido por el protocolo 3 en el foco del transductor.

6.4. Resultado de la experimentación *in vivo*

La experimentación con ratas *in vivo* se llevó a cabo con 38 ratas macho de la sepa Wistar con un peso entre 210 g y 230 g. Se utilizó el protocolo 3 con una potencia de 5 W, en 2 aplicaciones con un descanso de 30 s entre cada una. Las características de cada rata y los procedimientos realizados se registraron en el apéndice 1. Las metodologías para cada prueba realizada se describen en la sección 5.8.

6.4.1. Resultados de las pruebas para la localización del sitio de aplicación

Utilizando las coordenadas de [64] como base, se ajustaron los ejes del estereotáxico y se posiciono sobre la *substantia nigra* el foco del transductor. Estas coordenadas serán las utilizadas durante todos los experimentos con roedores y se ajustan dependiendo de las dimensiones de su cabeza. Para asegurarnos de esto, se utilizó una tinción tal como se describe en la sección 5.8.1. La Fig. 6.11 muestra los resultados de los sitios de aplicación. Se corroboró que si toma la sutura lambda como referencia y se recorren 2 mm en el eje transversal y 2.1 mm en el eje anteroposterior aseguramos que el foco del transductor se sitúe sobre la zona de interés. Otra coordenada importante que debe mantenerse fija es la de la barra frontal que sujetara



por los dientes incisivos a la rata. Esta coordenada debe fijarse a 5 mm por debajo de la referencia 0 de la proyección frontal del equipo estereotáxico (Fig. 6.12).

6.4.2. Resultados de las pruebas con la rata control

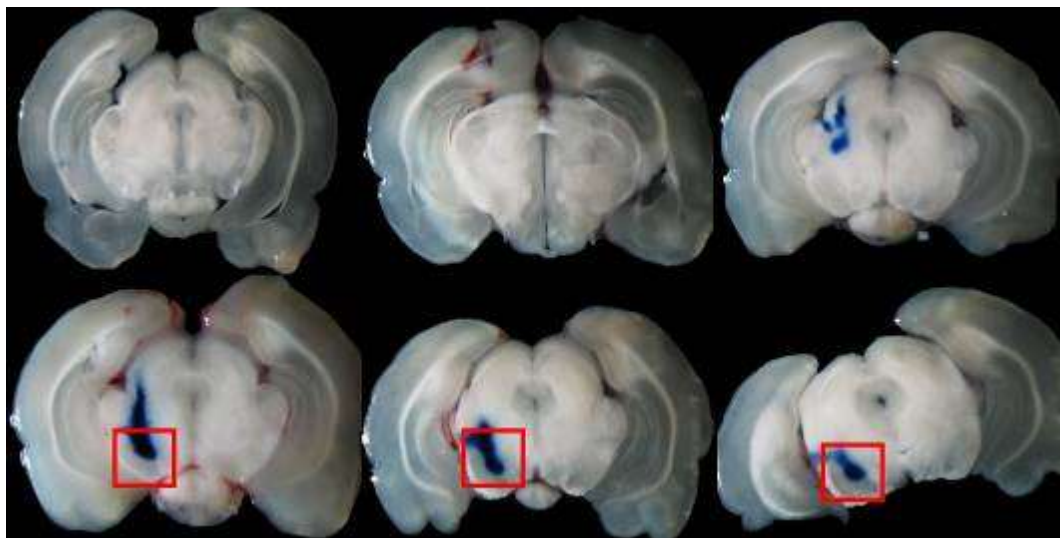


Fig. 6. 41: Se muestran los cortes que se obtuvieron tras realizar la localización del sitio de aplicación. Los cuadros rojos marcan la *substantia nigra*. Se puede observar que la tinción esta sobre la misma zona corroborando que el posicionamiento es correcto.

Estos resultados permitieron observar la impermeabilidad de la BHE. En [52] Contreras utilizó la inyección intraperitoneal para la realización de los experimentos. Sin embargo, usando este medio de ingreso, la propagación del EB por el torrente sanguíneo tarda entre 6 y 8 h. Por lo que se propuso una administración intravenosa como se describió en la sección 5.8.2. La naturaleza de la inyección nos asegura que el colorante está dentro del torrente sanguíneo al instante de ser administrada.

El peso molecular del EB es de 960.81 g/mol, un peso similar al fármaco desarrollado en el departamento de fisiología y neurociencias del CINVESTAV, lo que impide que tanto el fármaco como el colorante entren en el SNC cruzando a través de la BHE. Esto se puede observar en la Fig. 6.13 los tejidos de la cabeza y del resto de la rata están totalmente teñidos de azul mientras que el cerebro conserva su color natural.



Fig. 6. 45: Sujetador frontal de la rata, fijo a 5 mm. Esta coordenada asegura un sitio correcto en ratas de 210 y 230 g.

6.4.3. Resultados de los experimentos in vivo para generar la apertura de la BHE

Utilizando la metodología de la sección 5.8.3 se procedió a la aplicación del FUS mediante el protocolo 3 en conjunto con las craneotomías diseñadas para generar la apertura de la BHE. Se probaron las diferentes dimensiones de las craneotomías con el protocolo 3 con el fin de validar experimentalmente los resultados obtenidos en las simulaciones. La presencia de EB en diferentes zonas de los cortes obtenidos evaluará que la BHE ha sido permeada.

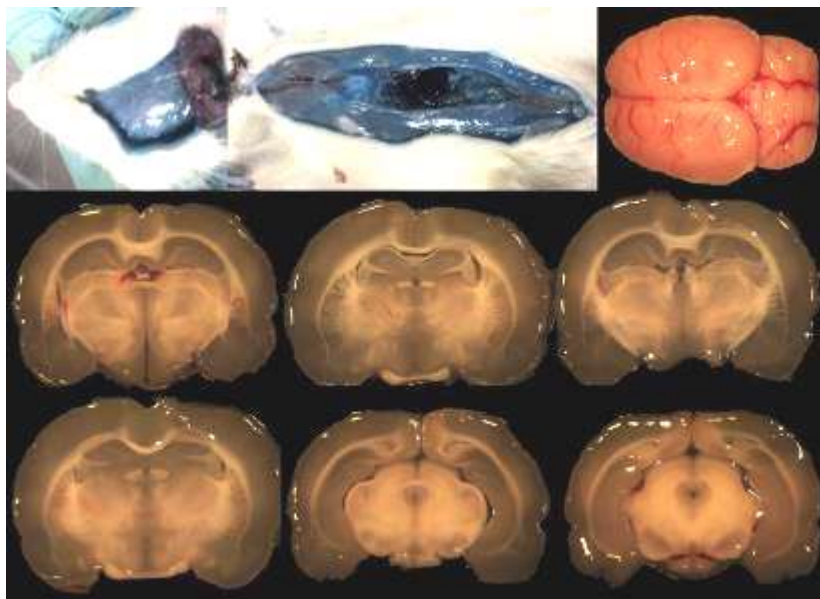


Fig. 6. 46: Rata control con inyección de azul de Evans vía intravenosa. Se muestran los tejidos de la rata teñidos, excepto el cerebro y su interior.



Los resultados de sonicación en conjunto con una craneotomía de 1 mm por lado se muestran en la Fig. 6.14. Es posible observar la presencia de EB sobre la corteza cerebral de la rata. Esto concuerda con los resultados de la simulación, los valores más altos de presión acústica se siguen encontrando en el hueso del cráneo provocando un incremento temperatura en las zonas próximas. Caso contrario con los resultados de craneotomía de 3 mm donde a pesar de retirar una porción mayor, los valores de temperatura no permitieron la apertura de la BHE (Fig. 6.15).

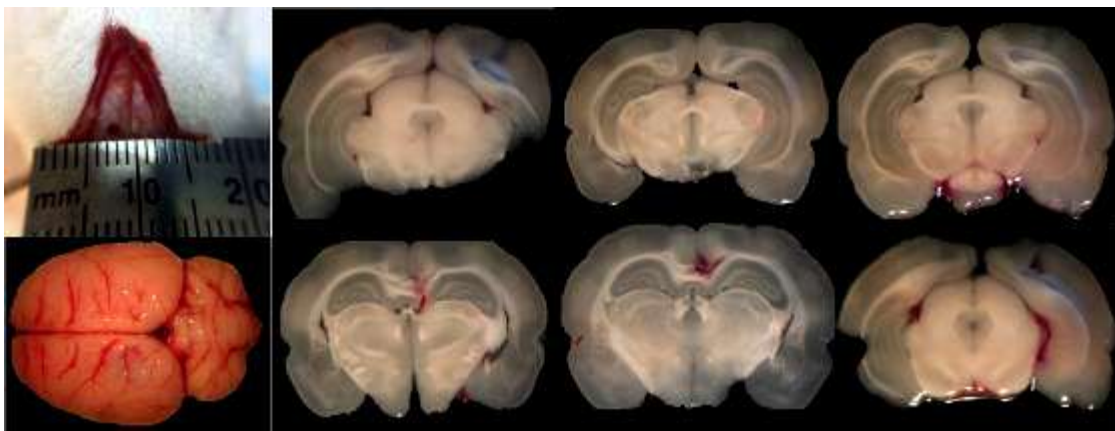


Fig. 6. 50: Cortes de cerebro realizados tras la aplicación del protocolo 3 sobre la cabeza de una rata con una craneotomía de 1 mm (izquierda superior).

Las craneotomías de 6 mm y 10 mm ofrecen mejores condiciones para la propagación de las ondas de ultrasonido. Debido a que porciones de mayor área son retiradas, eliminando la alta atenuación acústica que causaba el hueso. Ésta mejor

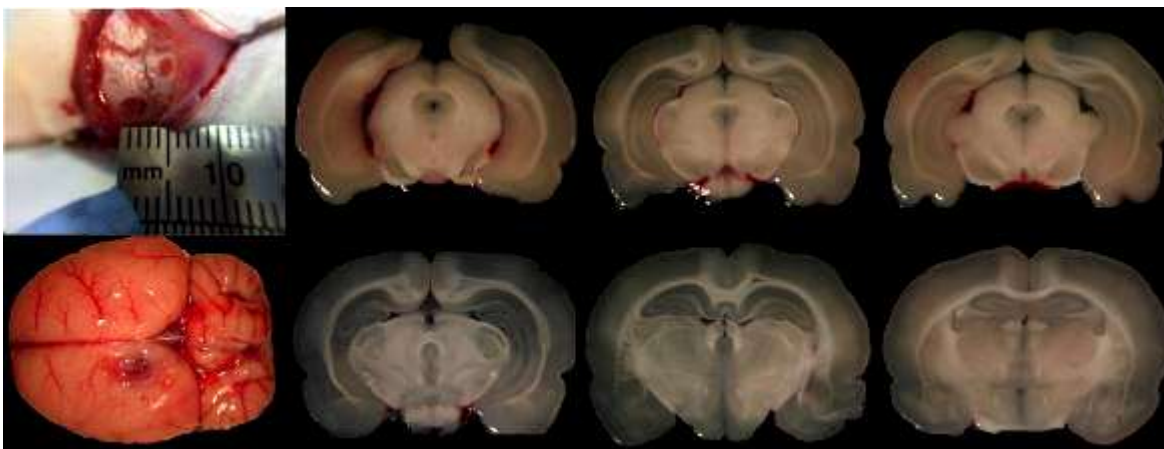


Fig. 6. 54: Cortes resultado de la aplicación del protocolo 3 en conjunto con una craneotomía de 3mm.



propagación permite que los incrementos de temperatura en el foco alcancen valores de 8 °C por arriba de la temperatura corporal interna de la rata provocando así la apertura de la BHE [52].

En la Fig. 6.16 se puede observar el resultado de la sonicación y una craneotomía de 6 mm. Se aprecia la coloración del tejido con la forma del foco sin deformaciones en su geometría, sin embargo, la posición de éste esta modificada. Esto puede deberse a la interacción que parte de las ondas tiene con el hueso antes de atravesar los tejidos del cerebro.

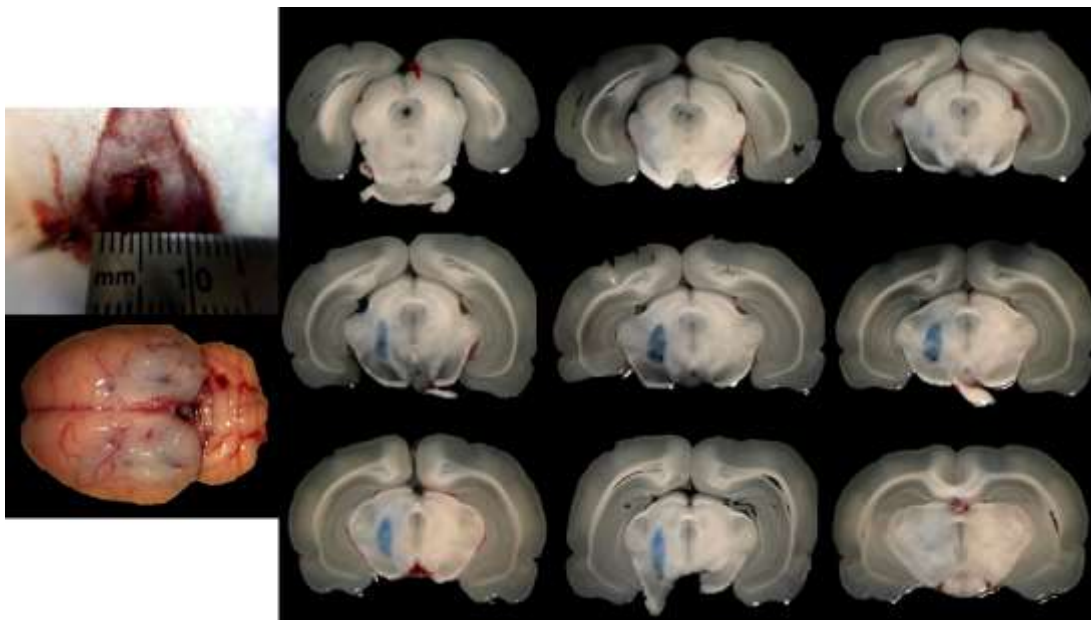


Fig. 6. 58: Resultados del protocolo 3 con sobre la cabeza de una rata con craneotomía de 6 mm. La formación del foco está bien definida por la tinción provocada por el EB, sin embargo, su ubicación se encuentra desplazada así a la parte superior del cerebro.

Por último, se presentan los resultados de una craneotomía de 10 mm y la aplicación de FUS con el protocolo 3. Esta dimensión de craneotomía permitió que el patrón de campo acústico no se afectara. Así el foco del transductor se formó exactamente sobre la zona de interés, que para nuestro caso de estudio es la *substantia nigra* (Fig. 6.17). Esto se puede observar gracias a la tinción que el EB genera en el tejido cerebral a su paso por la BHE por lo que se puede afirmar que se



obtuvieron resultados satisfactorios. Además, la apertura no causó ablación en las demás estructuras cerebrales circundantes.

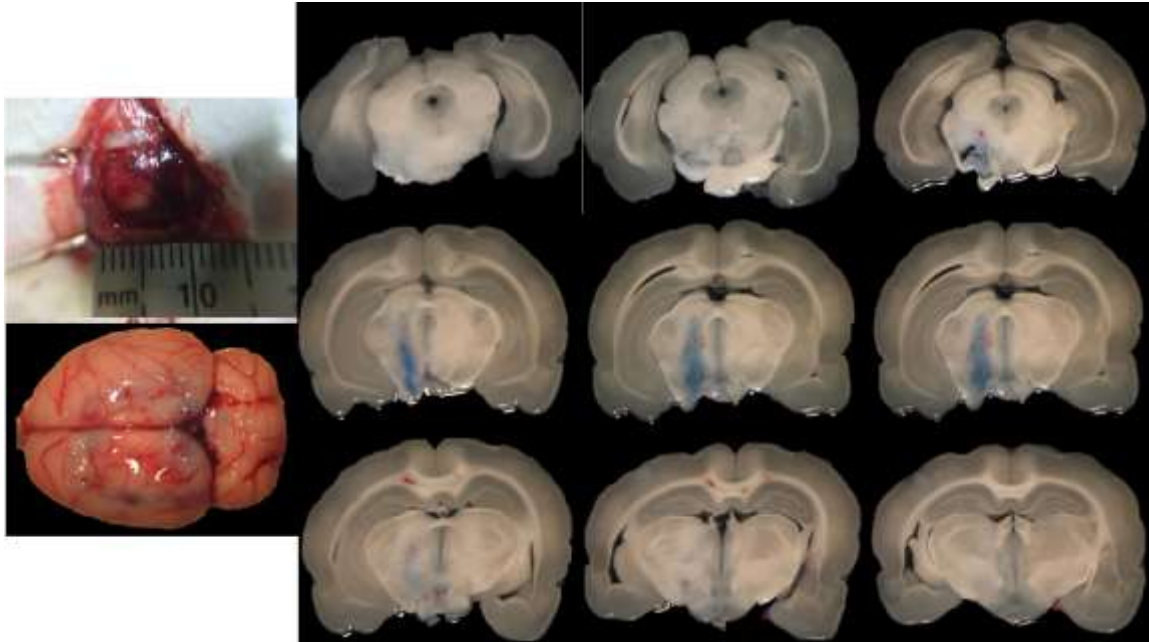


Fig. 6. 62: Apertura de la BHE puntal sobre la *substantia nigra*. Cortes realizados después de aplicar el FUS con el protocolo 3 en conjunto con una craneotomía de 10 mm.

6.4.4. Resultado de los experimentos *in vivo* para verificar el cierre de la BHE

Al ser el SNC el centro de control del cuerpo, es necesario que la homeostasis se mantenga para evitar desórdenes mayores. Esta es la razón por la que la apertura de la BHE debe ser reversible en las horas posteriores a la aplicación. Para probar esto se realizaron las aplicaciones del protocolo 3 y la craneotomía con la diferencia que la inyección del EB se realizó a diferentes horas después de la sonicación.

La Fig. 6.18 presenta, los cerebros y sus cortes con los diferentes tiempos post aplicación, para la administración del EB. El cierre de la BHE se da aproximadamente a las 8 h de haberse aplicado el FUS. A las 6 h aún es posible observar la tinción del EB sobre los cortes. Tras 12 h y en adelante la BHE está totalmente cerrada. Estos experimentos demostraron la reversibilidad de la apertura de BHE con FUS, y



confirmando el uso de ultrasonido como una herramienta viable en posibles tratamientos para enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson.

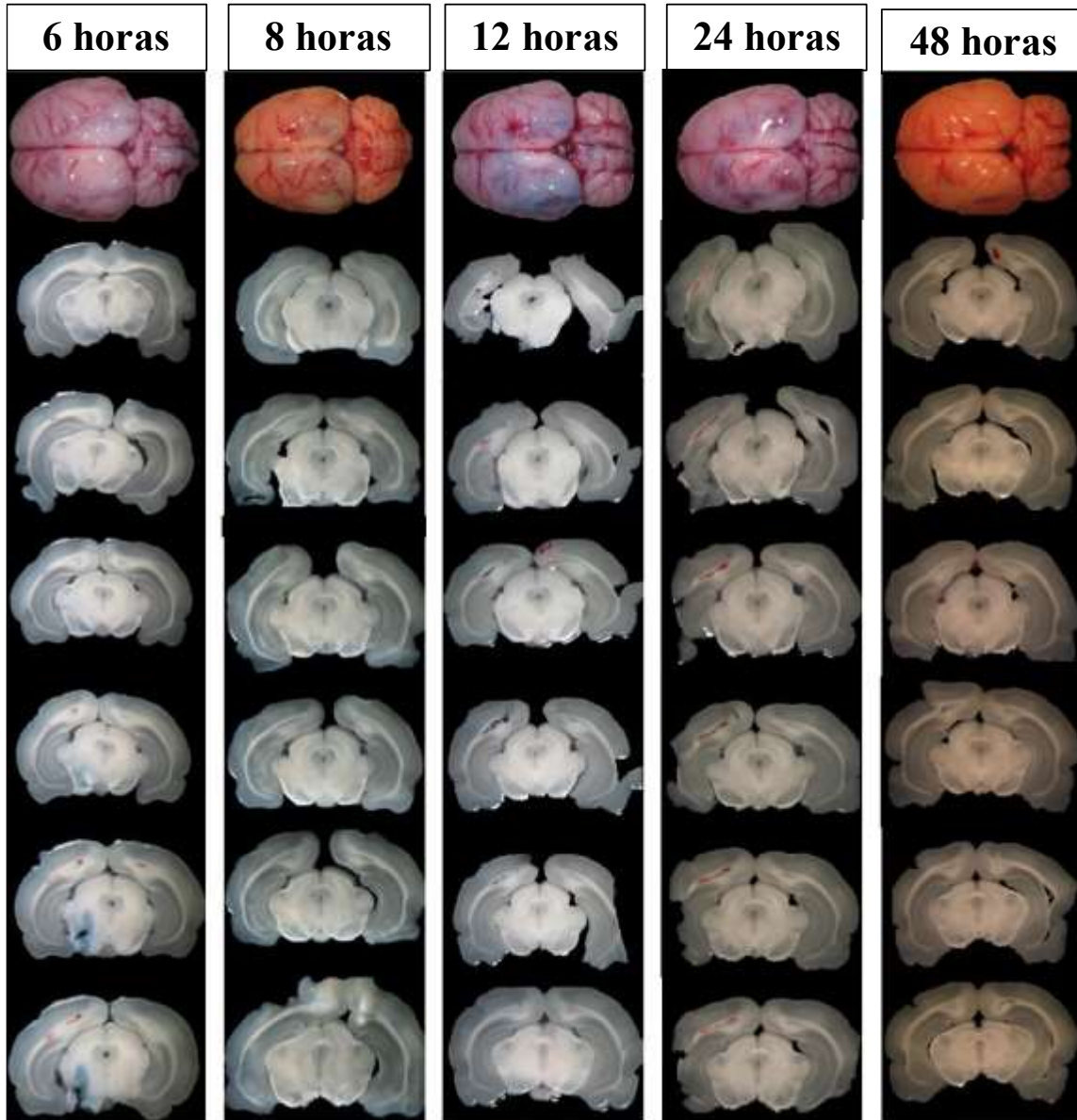


Fig. 6. 66: Resultado de la experimentación para corroborar la reversibilidad de la apertura de la BHE. Los cortes presentados corresponden a diferentes horarios de administración del EB post aplicación del FUS.



CAPÍTULO 7

Conclusiones y Perspectivas

7.1. Conclusiones

Las investigaciones realizadas en torno al uso de ultrasonido focalizado han permitido desarrollar novedosas aplicaciones en el área médica. Entre estas aplicaciones se encuentra lograr la apertura de la barrera hematoencefálica de manera temporal utilizando los efectos termomecánicos, provocados por la interacción de las ondas acústicas y diversos medios de contraste ultrasónicos. En la actualidad esta técnica se encuentra en pruebas con primates y algunos grupos de investigación ya han comenzado la aplicación con humanos. Sin embargo, estos estudios aún no han logrado explicar en su totalidad los fenómenos físicos que se provocan en la interacción del ultrasonido y las microburbujas presentes en los medios de contraste ultrasónicos.

En el LAREMUS de la sección de Bioelectrónica del departamento de Ingeniería Eléctrica, se ha conseguido demostrar que los incrementos de temperatura provocados por el ultrasonido focalizado permiten abrir temporalmente la barrera hematoencefálica. En México no se ha reportado el uso de esta técnica clínicamente y aunque los resultados mostrados en este trabajo son en modelos murinos, se han obtenido los conocimientos necesarios para que, en un futuro cercano, se pueda aplicar en otros mamíferos de mayor tamaño y, por qué no, en humanos.



El incremento de temperatura controlado que se logró con el protocolo 3 descrito en la sección 6.4.3 y el uso de craneotomías logra la apertura puntual y reversible de la barrera hematoencefálica en ratas Wistar sobre la *substantia nigra*. El uso de un marcador exógeno de gran tamaño molecular como el azul de Evans para evaluar la apertura de la BHE permite que esta técnica sea utilizada para probar fármacos experimentales con dimensiones moleculares semejantes.

Otro aspecto importante en este trabajo de tesis fue el uso del modelo computacional mediante el método de elemento finito. Los resultados de las simulaciones realizadas permiten entender los fenómenos físicos que se generan en las interacciones del ultrasonido y los tejidos biológicos. El uso del método de elemento finito permite obtener aproximaciones precisas de sistemas complejos permitiendo su estudio y modelado.

Finalmente, el uso de ultrasonido focalizado y craneotomías es una práctica viable que permite la liberación de marcadores y fármacos sobre estructuras cerebrales en roedores. Todos los estudios y procedimientos realizados nos permitieron llegar a las siguientes conclusiones:

- El uso de los modelos nos dio una aproximación de los posibles patrones de calentamiento sobre la cabeza de la rata. Así mismo, nos permitió conocer los valores aproximados de temperatura que alcanzan los tejidos debido a la radiación con ultrasonido. El agregar los tejidos que conforman la cabeza de la rata nos permitió obtener buenas aproximaciones a las mediciones realizadas.
- Las simulaciones de craneotomías dentro de los modelos computacionales, nos permitió observar que la propagación del campo acústico mejora con respecto a la simulación donde el cráneo completo interactúa con las ondas ultrasónicas, tal como se esperaba. Las aperturas con tamaños menores de 6 mm provocan que los incrementos de temperatura con mayor amplitud se localicen sobre zonas cercanas al cráneo. Por otra parte, una craneotomía de 10 mm de lado



permite una focalización sin afectar su posición provocando calentamientos eficientes sobre la zona de interés.

- Los modelos simulados fueron validados con los experimentos en *phantoms* bajo las mismas condiciones de las simulaciones. Los resultados obtenidos fueron muy cercanos tanto en los incrementos de la magnitud de temperatura como en los valores de presión acústica. Esto nos permite generalizar los modelos realizados a geometrías, donde la experimentación sería poco viable.
- La experimentación *in vivo* realizada aportó el mayor peso a este trabajo de tesis. Gracias al protocolo desarrollado se pudo corroborar que el aumento controlado de temperatura logra abrir la barrera hematoencefálica en la *substantia nigra* a ratas con craneotomías. Retirar una porción de hueso del cráneo de la rata asegura una propagación eficiente de las ondas acústicas sobre los tejidos de la cabeza sin afectar las propiedades del foco.
- El incremento controlado de temperatura producido por el protocolo desarrollado no causa ablación ni afecta a otras estructuras cerebrales que rodean nuestra zona de interés.
- Por último, los incrementos de temperatura controlados que produce el protocolo 3, permite a la barrera hematoencefálica regresar a su estado natural, ya que no se provoca ablación sobre el tejido. La reversibilidad que se logra tras aplicar las craneotomías y el protocolo 3 evitan el paso de agente extraños hacia el SNC, así como infecciones. Nuestra aplicación logra una apertura temporal de 8 h aproximadamente.

7.2. Perspectivas y trabajo futuro

Aunque los resultados de este trabajo son muy alentadores, se debe seguir trabajando para mejorar los protocolos de aplicación mucho menos invasivos y que permitan una recuperación más rápida de las ratas. Es necesario seguir trabajando



multidisciplinariamente para mejorar cada etapa del procedimiento de aplicación de ultrasonido focalizado. Aún falta mucho por desarrollar en especial en los siguientes puntos:

- **La geometría de modelos computacionales:** mejorar las geometrías de las estructuras biológicas del modelo, tomando en cuenta las propiedades de los tejidos de la rata reales.
- **Mejoras de los modelos computacionales:** agregar variables a los modelos para obtener resultados más cercanos a la realidad. Esto es el implementar modelos de microburbujas para simular su interacción con las ondas de ultrasonido.
- **Phantoms:** diseñar *phantom* multicapas, que asemejen las estructuras reales de las zonas de aplicación, y que sean dinámicos, esto es, que involucren la simulación del flujo sanguíneo.
- **Protocolo de aplicación:** el proceso mediante el que se realiza la aplicación de FUS en este trabajo necesita la práctica de una craneotomía. Este proceso puede ser traumatizante para la rata, por lo que el uso de medios de contraste ultrasónicos podría reducir daños colaterales.



CAPÍTULO 8

Productos de investigación obtenidos

8.1. Congresos Internacionales

D. A. Hernández, V. H. Contreras, L. Leija, A. Vera, D. Martínez-Fong and M. I. Gutiérrez, “Modeling a Conical Applicator for High Intensity Focused Ultrasound with the Finite Element Method,” in 13th Int. Conf. Electr. Eng. Comput. Sci. Autom. Control, no. 1, pp. 3-6, 2016.


D. A. Hernández, V. H. Contreras, L. Leija, A. Vera, and M. I. Gutiérrez, “Acoustic Field Simulation for Focused Ultrasound on Skull with Craniotomy for Drug Delivery in Rat Brain.,” Glob. Med. Eng. Phys. Exch. Am. Heal. CARE Exch. (GMEPE / PAHCE), pp. 81–85, 2017.

D. A. Hernández, M. I. Gutiérrez, A. Vera, D. Martínez-Fong and L. Leija, “Simulation and in vivo Validation of Craniotomies in Rats for the Disruption of the Blood Brain Barrier with Focused Ultrasound for Drug Delivery,” in 14th Int. Conf. Electr. Eng. Comput. Sci. Autom. Control, 2017.





Referencias

- [1] C. L. Crankshaw. Biofiles, Neurodegenerative Diseases. Volumen 7, número 2. Mayo 29de 2017. Disponible en: http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Brochure/1/biofiles_v7_n2.pdf
- [2] GUÍA DE PRÁCTICA CLÍNICA. Diagnóstico y tratamiento de la ENFERMEDAD DE PARKINSON Inicial y avanzada en el tercer Inicial y avanzada en el tercer Nivel de atención. Secretaria de Salud. Mayo 29 de 2017.
Disponible en:
http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/305_SS_A_10_PARKINSON_3ER_NVL/GRR_Parkinson.pdf
- [3] D. Benjamín, M. Argüelles, and D. M. Fong, “Modernos caballos de Troya,” *Av. y Perspect.*, vol. 21, pp. 15–20, 2002
- [4] E. Alfonso and G. G. Beatriz, “Barrera hematoencefálica. Neurobiología, implicaciones clínicas y efectos del estrés sobre su desarrollo,” *Rev. Mex. Neurocienc.*, vol. 9, no. 5, pp. 395–405, 2008
- [5] J. A. Zagzebski, *Essential of Ultrasound physics*, Mosby an Affiliate of Elsevier, Philadelphia, USA, 1996.
- [6] M. S. Joseph, W. Kane, “El Sonido”, in *Física*, Reverté S. A., Barcelona España, 2007.
- [7] D. A. Hutchins, G. Hayward, *Ultrasonic Measurement Methods*, R. N. Thurston, A. D. Pierce, Academic Press, 1990.
- [8] P. Cracknell, *Ultrasonidos*, Ediciones Parainfo S. A., 2da Edición, España, 1983.
- [9] M. I. Gutiérrez, R. Martínez, A. Vera, L. Leija, “Technology in Ultrasonic Hyperthermia,” in *Hyperthermia Recognition, Prevention And Treatment*, New York, Nova Science Publishers, Inc., 2012, pp. 41-84.

- 
- [10] J. A. Vásquez, “Elemento finito,” in *Análisis y diseño de piezas de máquinas con CATIA V5 (Método de elementos finitos)*, MARCOMBO. S. A. Barcelona, España, 2012.
- [11] Y. Serlin, I. Shelef, B. Knyazer, A. Friedman, C. Biology, and B. Sciences, “Anatomy and Physiology of the Blood-Brain Barrier,” *Semin Cell Dev Biol*, pp. 2–6, 2016..
- [12] E. Tornabene and B. Brodin, “Stroke and Drug Delivery - In Vitro Models of the Ischemic Blood-Brain Barrier,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 105, no. 2, pp. 398–405, 2016.
- [13] J. Gruetzmacher, “Piezoelektrischer Kristall mit Ultraschallkonvergenz,” *Zeitschrift für Phys.*, vol. 96, no. 5–6, pp. 342–349, 1935.
- [14] W. J. Fry, W. H. Mosberg, J. W. Barnard, and F. J. Fry, “Production of focal destructive lesions in the central nervous system with ultrasound.,” *J. Neurosurg.*, vol. 11, no. 119, pp. 471–478, 1954.
- [15] J. F. Fry, W J. Barnard, J W. Fry, F J. Krumins, R F. Brennan, “Ultrasonic Lesions in the Mammalian Central Nervous System,” *Science*, vol. 122, no. 5, pp. 517–518, 1955.
- [16] J. W. BARNARD, W. J. FRY, F. J. FRY, and R. F. KRUMINS, “Effects of high intensity ultrasound on the central nervous system of the cat.,” *J. Comp. Neurol.*, vol. 103, no. 3, pp. 459–84, Dec. 1955.
- [17] F. J. Fry, “Precision High intensity focusing ultrasonic machines for surgery,” *American journal of physical Medicine*, vol. 37, no. 3. pp. 152–156, 1958.
- [18] K. Burov, G. Adreevskaya, “The effect of ultra-acoustic oscillation of high intensity on malignant tumors in animals and man,” *Dokl Akad Nauk SSSR*, vol. 106, pp. 445-448, 1956.
- [19] M. Oka, “Application of intense focused ultrasound in brain surgery and other fields,” *Clinica All-Round, Japan*, 1964;13:1514.
- [20] N. T. Sanghvi, R. S. Foster, R. Bihrlé, R. Casey, T. Uchida, M. H. Phillips, J. Syrus, A. V. Zaitsev, K. W. Marich, and F. J. Fry, “Noninvasive surgery of prostate tissue by high intensity focused ultrasound: An updated report,” *Eur. J. Ultrasound*, vol. 9, no. 1, pp. 19–29, 1999.

- [21] D. J. Coleman, F. L. Lizzi, J. Driller, A. L. Rosado, S. E. P. Burgess, J. H. Torpey, M. E. Smith, R. H. Silverman, M. E. Yablonski, S. Chang, and M. J. Rondeau, "Therapeutic Ultrasound in the Treatment of Glaucoma I. Experimental Model," *Ophthalmology*, vol. 92, no. 3, pp. 347–353, 1985.
- [22] D. J. Coleman, F. L. Lizzi, J. Driller, A. L. Rosado, S. E. P. Burgess, J. H. Torpey, M. E. Smith, R. H. Silverman, M. E. Yablonski, S. Chang, and M. J. Rondeau, "Therapeutic Ultrasound in the Treatment of Glaucoma II. Clinical Applications," *Ophthalmology*, vol. 92, no. 3, pp. 347–353, 1985.
- [23] S. E. Burgess, R. H. Silverman, D. J. Coleman, M. E. Yablonski, F. L. Lizzi, J. Driller, A. Rosado, and P. H. Dennis Jr., "Treatment of glaucoma with high-intensity focused ultrasound," *Ophthalmology*, vol. 93, no. 6, pp. 831–838, 1986.
- [24] A. A. Deshpande, C. Tabatabay, P. M. Hughes, and R. Gurny, "Therapeutic applications of retinoids in ophthalmology," *Int. J. Pharm.*, vol. 157, no. 1, pp. 1–15, 2012.
- [25] F. Valtot, J. Kopel, and J. Haut, "Treatment of glaucoma with high intensity focused ultrasound.," *Int. Ophthalmol.*, vol. 13, no. August, pp. 167–70, 2015.
- [26] E. J. Davies, S. Bazerbashi, S. Asopa, G. Haywood, and M. Dalrymple-Hay, "Long-term outcomes following high intensity focused ultrasound ablation for atrial fibrillation," *J. Card. Surg.*, vol. 29, no. 1, pp. 101–107, 2014.
- [27] R. Garcia, F. Sacher, P. Oses, N. Derval, L. Barandon, A. Denis, M. Hocini, X. Roques, M. Haïssaguerre, L. Labrousse, and P. Jaïs, "Electrophysiological study 6 months after Epicor™ high-intensity focused ultrasound atrial fibrillation ablation.," *J. Interv. Card. Electrophysiol.*, vol. 41, no. 3, pp. 245–51, 2014.
- [28] D. Day, "Microfocused ultrasound for facial rejuvenation: current perspectives," *Res. Reports Focus. Ultrasound*, vol. Volume 2, pp. 13–17, 2014.
- [29] M. Alam, L. E. White, N. Martin, J. Witherspoon, S. Yoo, and D. P. West, "Ultrasound tightening of facial and neck skin: A rater-blinded prospective cohort study," *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 62, no. 2, pp. 262–269, 2010.

- 
- [30] M. H. Gold, W. Sensing, and J. Biron, "Use of Micro-Focused Ultrasound with Visualization to Lift and Tighten Lax Knee Skin," *J Cosmet Laser Ther*, no. April, pp. 1–15, 2014.
- [31] D. Day, "Microfocused ultrasound for facial rejuvenation: current perspectives," *Res. Reports Focus. Ultrasound*, vol. Volume 2, pp. 13–17, 2014.
- [32] S. G. Fabi, "Noninvasive skin tightening: Focus on new ultrasound techniques," *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.*, vol. 8, pp. 47–52, 2015.
- [33] K. Hynynen, V. Colucci, A. Chung and F. Jolesz, "Noninvasive Arterial Occlusion Using MRI-Guided Focused Ultrasound," *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 22, no. 8, pp. 1071–1077, 1996.
- [34] N. McDannold, N. Vykhodtseva, F. A. Jolesz, and K. Hynynen, "MRI Investigation of the Threshold for Thermally Induced Blood-Brain Barrier Disruption and Brain Tissue Damage in the Rabbit Brain," *Magn. Reson. Med.*, vol. 51, no. 5, pp. 913–923, 2004.
- [35] N. Sheikov, N. McDannold, N. Vykhodtseva, F. Jolesz, and K. Hynynen, "Cellular mechanisms of the blood-brain barrier opening induced by ultrasound in presence of microbubbles," *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 30, no. 7, pp. 979–989, 2004.
- [36] M. Kinoshita, N. McDannold, F. A. Jolesz, and K. Hynynen, "Targeted delivery of antibodies through the blood-brain barrier by MRI-guided focused ultrasound," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 340, no. 4, pp. 1085–1090, 2006.
- [37] N. Vykhodtseva, N. McDannold, and K. Hynynen, "Progress and problems in the application of focused ultrasound for blood-brain barrier disruption," *Ultrasonics*, vol. 48, no. 4, pp. 279–296, 2008.
- [38] J. J. Choi, S. A. Small, and E. Konofagou, "Optimization of Blood-Brain Barrier Opening in Mice using Focused Ultrasound," *2006 IEEE Ultrason. Symp.*, pp. 540–543, 2006.

- 
- [39] J. J. Choi, M. Pernot, S. A. Small, and E. E. Konofagou, "Noninvasive, transcranial and localized opening of the blood-brain barrier using focused ultrasound in mice," *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 33, no. 1, pp. 95–104, 2007.
- [40] J. J. Choi, S. Wang, Y. S. Tung, B. Morrison, and E. E. Konofagou, "Molecules of Various Pharmacologically-Relevant Sizes Can Cross the Ultrasound-Induced Blood-Brain Barrier Opening in vivo," *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 36, no. 1, pp. 58–67, 2010.
- [41] J. J. Choi, S. Member, J. A. Feshitan, B. Baseri, S. Wang, Y. Tung, M. A. Borden, and E. E. Konofagou, "Microbubble-Size Dependence of Focused," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 57, no. 1, pp. 145–154, 2010.
- [42] Y.-S. Tung, F. Vlachos, K. Selert, and E. E. Konofagou, "Bubble dependence of the mechanism for FUS-induced blood-brain barrier opening in mice in vivo," *161st Meet. Acoust. Soc. Am.*, pp. 1898–1901, 2011.
- [43] A. Shutao Wang, Gesthimani Samiotaki, Oluyemi Olumolade, Jameel A. Feshitan and E. E. Konofagou, "Microbubble Type and Distribution Dependence of Focused Ultrasound Induced Blood Brain Barrier Opening," *Ultrasound in medicine & biology*, vol. 4, no. 164, pp. 130–137, 2011.
- [44] G. Samiotaki, F. Vlachos, Y. S. Tung, and E. E. Konofagou, "Permeability and reversibility timeline study of the focused-ultrasound induced blood-brain barrier opening at distinct pressures and microbubble sizes in vivo," *IEEE Int. Ultrason. Symp. IUS*, pp. 1494–1497, 2011.
- [45] G. Samiotaki and E. E. Konofagou, "Dependence of the reversibility of focused-ultrasound-induced blood-brain barrier opening on pressure and pulse length in vivo," *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control*, vol. 60, no. 11, pp. 2257–2265, 2013.
- [46] P. C. Chu, M. C. Hsiao, Y. H. Yang, J. C. Chen, and H. L. Liu, "Investigation of the Effect of Acoustic Pressure and Sonication Duration on Focused-Ultrasound Induced Blood-Brain Barrier Disruption," *2008 13th Int. Congr. Biol. Med. Eng.*, vol. 23, pp. 1094–1097, 2009.
- [47] C.-H. Fan, C.-Y. Ting, C. Lin, H.-L. Chan, Y.-C. Chang, Y.-Y. Chen, H.-L. Liu, and C.-K. Yeh, "Noninvasive, Targeted, and Non-Viral Ultrasound-Mediated

- GDNF-Plasmid Delivery for Treatment of Parkinson's Disease," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. January, p. 19579, 2016.
- [48] C. Y. Lin, H. Y. Hsieh, C. M. Chen, S. R. Wu, C. H. Tsai, C. Y. Huang, M. Y. Hua, K. C. Wei, C. K. Yeh, and H. L. Liu, "Non-invasive, neuron-specific gene therapy by focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening in Parkinson's disease mouse model," *J. Control. Release*, vol. 235, pp. 72–81, 2016.
- [49] C. Fan, C. Ting, E. Chang, H. Liu, H. Chan, Y. Chen, C. Yeh, S. Biology, and N. Y. Ming, "Ultrasound-triggered and targeted gene delivery by using cationic microbubbles to enhance GDNF gene transfection in a rat Parkinson's disease model," pp. 11–14, 2015.
- [50] L. Long, X. Cai, R. Guo, P. Wang, L. Wu, T. Yin, S. Liao, and Z. Lu, "Treatment of Parkinson's disease in rats by Nrf2 transfection using MRI-guided focused ultrasound delivery of nanomicrobubbles," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 482, no. 1, pp. 1–6, 2016.
- [51] M. I. Gutiérrez, "Modelado del calentamiento de radiación acústica generada por equipos de fisioterapia ultrasónica, validación experimental en medios homogéneos y diseño de la instrumentación," CINVESTAV-IPN, Ingeniería Eléctrica, sec. Bioelectrónica, CDMX, 2011.
- [52] V. H. Contreras, "Apertura de la barrera hematoencefálica en ratas con ultrasonido focalizado (FUS) para la administración de fármacos experimentales para el tratamiento de Parkinson," CINVESTAV-IPN, Ingeniería Eléctrica, sec. Bioelectrónica, CDMX, 2015
- [53] Exelis, "Electro-Ceramic Products and Material Specification," Salt Lake City, USA, 2013.
- [54] S. Marburg, "Discretization requirements: How many elements per wavelength are necessary?," in *Computational Acoustics of Noise Propagation in Fluids Finite and Boundary Element Methods*, Springer, Ed. Dresden, Germany, 2008, pp. 309–332.
- [55] J. Kocbach. "Finite Element Modeling of Ultrasonic Piezoelectric Transducers Influence of geometry and material parameters on vibration, response

- functions and radiated field.” Phd, Universidad de Bergen, Noruega, Departamento de Fisica, Bergen, Noruega, Septiembre 2000.
- [56] IT’IS Foundation, Copyright 1’ 2010–2015, Tissues Properties [En línea], Disponible: <http://www.itis.ethz.ch/virtual-population/tissue-properties/database/>
- [57] A. Bejan, Heat Transfer, John Wiley & Sons, 1993
- [58] H. H. Pennes. Analysis of Tissue and Arterial Blood Temperatures in the Resting Human Forearm. *Journal of Applied Physiology*, 1(2):93–122, 1948.
- [59] J. M. Martínez and B. J. Jarosz, “3D perfused brain phantom for interstitial ultrasound thermal therapy and imaging: design, construction and characterization.,” *Phys. Med. Biol.*, vol. 60, no. 5, pp. 1879–900, 2015.
- [60] W. J. Fry & R. B. Fry. Determination of Absolute Sound Levels and Acoustic Absorption Coefficients by Thermocouple Probes—Theory. *Journal of the Acoustical Society of America*, 26(3):294–310, 1954.
- [61] W. J. Fry & R. B. Fry. Determination of Absolute Sound Levels and Acoustic Absorption Coefficients by Thermocouple Probes—Experiment. *Journal of the Acoustical Society of America*, 26(3):311–317, 1954
- [62] K. Hynynen, C. J. Martin, D. J. Watmough, and J. R. Mallard, “Errors in temperature measurement by thermocouple probes during ultrasound induced hyperthermia,” *Br. J. Radiol.*, vol. 56, no. 672, pp. 969–970, 1983.
- [63] NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.
- [64] G. Paxinos, C. Watson, *The Rat Brain in stereotaxic coordinates*, Academic Press, San Diego, California, USA, 1997.
- [65] D. A. Hernández, V. H. Contreras, L. Leija, A. Vera, and M. I. Gutiérrez, “Modeling a Conical Applicator for High Intensity Focused Ultrasound with the Finite Element Method,” 2016 13th Int. Conf. Electr. Eng. Comput. Sci. Autom. Control, no. 1, pp. 3–6, 2016.



Apéndice 1

Registro de los Protocolos Realizados a Rata



Apéndice 2

Artículos en extenso de congresos
