



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

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA ELÉCTRICA
SECCIÓN DE BIOELECTRÓNICA

“Apertura de la BHE empleando FUS y microburbujas en sangre para la
introducción de un vector farmacológico en un modelo murino”

Tesis que presenta

Claudia Jocelyn Reyes Hernández

para obtener el Grado de

Maestra en Ciencias

en la Especialidad de

Ingeniería Eléctrica

Directores de la Tesis: Dr. Lorenzo Leija Salas
Dr. Arturo Vera Hernández

Ciudad de México

Noviembre 2018.

A Dios por darme la oportunidad de vivir esta experiencia de vida y académica, y no abandonarme en los tiempos difíciles.

A mi madre, María Concepción Hernández Barrera, por darme la mejor lección de vida, por enseñarme a luchar mis batallas, por ser mi compañera de aventuras, por motivarme a dar lo mejor de mi misma, por quererme, por apoyarme en mis ideas más locas, por ser ella.

A mi hermano, Jorge Alberto Reyes Hernández, por ser el mejor hermano mayor que cualquier persona pudiera tener, por su apoyo, su confianza, su amistad, por quererme.

A mi papá, Clemente Reyes, por su apoyo y confianza, por enseñarme con su ejemplo que el trabajo duro, es la respuesta a todo para salir adelante.

A mi hermana, Cinthia Reyes, por su amor incondicional.

Al Dr. Lorenzo Leija Salas, por abrirme las puertas de su laboratorio, por su apoyo y confianza para la realización de este proyecto, por su calidez y amabilidad.

Al Dr. Arturo Vera Hernández, por darme la confianza para el desarrollo de este proyecto, por sus enseñanzas, por su paciencia, por su amistad.

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

Al M. en C. José Hugo Zepeda Peralta, por su apoyo técnico durante la realización de este proyecto, por sus ideas, por ayudarme en todos los experimentos y acompañarme en cada una de las etapas de desarrollo de este proyecto, y brindarme otros puntos de vista para solucionar las dificultades presentadas en este proyecto y sobre todo su paciencia para enseñarme a utilizar los equipos. Por su amistad, los desayunos, las clases de yoga, etc.

Al M. en C. Rubén Pérez Valladares, por su amabilidad y las bromas que compartimos.

Al auxiliar de investigación Biol. José Ayala por la ayuda en las pruebas *in vivo*, por enseñarme el manejo de ratas, por tener disposición para ayudarme no importando los días o la hora, por su amistad, por las bromas que ayudaron a bajar la tensión que a momentos surgía durante el desarrollo de este trabajo

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

A Jaime Escobar Herrera, por su ayuda con el microscopio CONFOCAL para la determinación de las pruebas con microburbujas, a la Q.F.I. Isabel Wens Flores, Dr. José Luis Reyes del departamento de Fisiología y a su auxiliar la en M. en C. Carmen Namorado, por su ayuda técnica en la dosificación de las microburbujas

A mis compañeros de laboratorio por su compañía y apoyo Adriana Vera, Adriana Manzanares, Héctor Maldonado, Rafael Bayareh en especial a Jorge Rodríguez por escucharme y su apoyo en la parte experimental, al M. en C. Daniel Hernández, por su paciencia y apoyo en enseñarme el manejo de los animales, y el desarrollo de ultrasonido, por su amistad.

A mis compañeros del departamento de Fisiología y Neurociencias, en especial a la Dra. Yasmin Montserrat Flores Martínez, por su ayuda en la experimentación *in-vivo*, a la M. en C. Claudia Luna Herrera, por sus consejos y ayuda en la experimentación, al M. en C. Uriel Mascotte por su apoyo en las inmunos.

A mis compañeros de generación por su apoyo durante la etapa de clases, en especial a Frank Martínez, por su amistad, apoyo incondicional y motivarme a dar lo mejor de mí.

A los doctores de la sección, y a los que me impartieron clases durante este periodo por darme herramientas para mi futuro, en especial a la Dra. Citlali Trujillo.

A las secretarías, Paty, por su ayuda en los trámites, y a las que ya no están Luisita y Gina, por sus bromas, amistad, por darle un aire de calidez a la sección.

Al M. en C. Juan Marcelo Miranda Gómez, por ser mi mentor desde la licenciatura, por su apoyo durante todas las etapas cruciales de mi formación, por su amistad y consejos de vida, por exigirme desde siempre a dar lo mejor de mí, y enseñarme que siempre se pueden hacer mejor las cosas, por abrirme las puertas e introducirme en el laboratorio.

A Dinorah Hernández, por ser mi amiga, y ayudarme a creer en mi y ser parte de mi vida, a Sarahí Rodríguez, por las tardes de café.

A Carolina Islas, por ser mi compañera de aventuras laborales, aunque estemos lejos físicamente, por su amistad, por las bromas cuando más lo necesitaba, por escucharme.

A Eva y Arely, por ser mis compañeras de aventuras desde hace muchos años, por ser como son, por su paciencia y apoyo.

Agradecimientos Especiales

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, CINVESTAV, por permitirme realizar mis estudios de Maestría en Ciencias y estadía.

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

A mi sinodal el Dr. Pablo Rogelio Hernández, por su apoyo, sus enseñanzas y su paciencia durante mi formación, por su amistad. Agradezco la revisión de este trabajo y sus comentarios para mejorarlo.

A mi sinodal, Dr. Mario Ibrahin Gutiérrez Velasco, por su apoyo, por sus consejos para el desarrollo de este proyecto. Gracias por los comentarios hacia este trabajo.

Dedicatoria

A mi madre, por ser mi conexión entre el mundo espiritual y el
mundo físico

Contenido

Dedicatoria	iv
Índice de Figura.....	ix
Índice de Tablas.....	xii
Resumen.....	xiii
Abstract.....	xv
CAPÍTULO 1	1
1.1 Organización de la tesis	2
CAPÍTULO 2	4
2.1 Ultrasonido.....	4
2.2 Generación del ultrasonido	6
2.3 Efecto piezoeléctrico y relaciones constitutivas	6
2.4 El transductor piezoeléctrico.....	11
2.5 Medios de propagación.....	13
2.6 Tipos de onda en un medio sólido con espesor finito	13
2.7 Parámetros acústicos	14
2.7.1 Intensidad acústica.....	14
2.7.2 Presión acústica.....	15
2.7.3 Atenuación	15
2.7.4 Velocidad de propagación.....	16
2.7.5 Impedancia acústica.....	16
2.7.6 Reflexión y refracción.....	17
2.8 Transductores planos	18
2.9 Focalización del ultrasonido por medio de transductores cóncavos	19

2.10 Barrera hematoencefálica (BHE)	21
2.11 Azul de Evans (EB).....	23
2.12 <i>Phantoms</i> ultrasónicos.....	24
2.13 Microburbujas	25
2.13.1 Microburbujas SonoVue®	26
2.14 Inmunofluorescencia.....	26
2.14.1 Primaria o IFD	27
2.14.2 Secundaria o IFI	28
2.15 Microscopia CONFOCAL.....	32
2.16 Método de Elemento Finito	32
2.17 COMSOL Multiphysics	33
2.17.1 Módulo Acústica	34
2.17.2 Modelado basado en ecuaciones (Ecuaciones Diferenciales Ordinarias).....	34
CAPÍTULO 3	36
3.1 Ultrasonido Focalizado para la disrupción de la Barrera Hematoencefálica (BHE)	36
3.2 Investigaciones realizadas en LAREMUS (Laboratorio de Radiación Electromagnética y Ultrasónica)	37
CAPÍTULO 4	39
4.1 Definición del problema	39
4.2 Justificación de la tesis	39
4.3 Objetivos de la tesis.....	40
4.3.1 Objetivo general	40
4.3.2 Objetivos Particulares	40
CAPÍTULO 5	42

5.1 Experimentación <i>In Vivo</i>	44
5.1.1 Aplicación de Anestesia	44
5.1.2 Estereotaxía	44
5.1.3 Inyección en Vena Caudal	45
5.1.4 Inyección por vía retroftálmica	46
5.1.5 Ubicación del sitio de inyección	46
5.1.6 Craneotomías.....	48
5.1.7 Cortes en Vibratomo	49
5.2 Microburbujas	51
5.2.1 Dosificación	51
5.2.2 Conservación	51
5.2.3 Aplicación.....	51
5.2.4 Validación de la presencia de Microburbujas	52
5.2.5 Estudio de la dinámica de la microburbuja por medio del modelo de Rayleigh-Plesset.	52
5.3 Protocolo de aplicación del ultrasonido.....	56
5.3.1 Transductor FUS y su caracterización	56
5.3.2 Determinación de la frecuencia de resonancia	58
5.3.3 Diseño del aplicador cónico	59
5.3.4 Características del Protocolo de Aplicación	60
5.3.6 Pruebas in vivo para la disminución de potencia de aplicación con respecto al protocolo A	62
5.3.7 Propuesta de un nuevo protocolo de aplicación de FUS.....	64
5.3.8 Phantom de Cerebro	64
5.4 Inmunofluorescencia.....	65

5.4.1 Perfusión intracardiaca.....	65
5.4.2 Cortes en el microtomo	66
5.4.3 Inmunodetección TH y GFAP.....	66
CAPÍTULO 6	69
6.1 Reproducibilidad Protocolo de Chávez[4]	69
6.1.1 Inmunodetección Protocolo A	69
6.1.2 Estimación de la temperatura en el foco del cerebro	72
6.2 Validación de microburbujas.....	74
6.3 Protocolo de FUS utilizando microburbujas	76
6.3.1 Aplicación de FUS a 3 W	76
6.3.3 Tiempo de cierre de la BHE, protocolo 3 W	80
6.4 Modelado de la dinámica de una microburbuja	81
6.4.1 Presión Acústica (Frecuencia)	81
Capítulo 7	84
7.1 Conclusión.....	84
7.2 Perspectivas y Trabajo a Futuro	86
APENDICES.....	88
PRODUCTOS OBTENIDOS DE LA TESIS	88

Índice de Figura

Fig.2.1.	Espectro de sonido.	5
Fig.2.2.	. Intervalo de frecuencias para el ultrasonido médico.	6
Fig.2.3.	Efecto piezoeléctrico.	7
Fig.2.4.	Propagación longitudinal en un cubo.	8
Fig.2.5.	Transductor ultrasónico.....	12
Fig.2.6.	Reflexión y refracción de la onda acústica en dos medios diferentes.	18
Fig.2.7.	Distribución de presión en el eje de propagación para en transductor plano. 19	
Fig.2.8.	Focalización del ultrasonido (A) elemento cóncavo, (B) lentes acústicas, (C) arreglo en fase [13].	20
Fig.2.9.	Geometría de un transductor esférico cóncavo.	20
Fig.2.10.	Dibujo esquemático de la barrera hematoencefálica en sección [24]. ...	22
Fig.2.11.	Etapas de Inmunofluorescencia.....	29
Fig.2.12.	Permeabilización de una célula.	31
Fig.5.1.	Etapas del proyecto apertura de la BHE.	43
Fig.5.2.	Aplicación de inyección intraperitoneal.	44
Fig.5.3.	Rata fija en el estereotáxico.....	45
Fig.5.4.	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.5.5.	Inyección por la vía retroftálmica.	46
Fig.5.6.	Se aprecian las suturas craneales <i>bregma</i> y <i>lambda</i> [57].....	47
Fig.5.7.	Aguja para provocar el sitio.....	47
Fig.5.1.	Validación del paralelismo en la aguja.	48

Fig.5.8.	Craneotomía de 1 cm de ancho x 1 cm de largo.	49
Fig.5.9.	Cerebro colocado para la realización de cortes de 300 µm de espesor. ..	50
Fig.5.10.	Representación en el modelo del cloruro de sodio.....	54
Fig.5.11.	Representación gráfica de la burbuja de Hexafluoruro de Azufre.....	54
Fig.5.12.	Enmallado de la geometría utilizada en el modelo.	55
Fig.5.13.	Transductor FUS Onda Corporation® utilizado para la experimentación. Se observa la cara curva del transductor, el cual va a generar la focalización del ultrasonido.	58
Fig.5.14.	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.	59
Fig.5.15.	Montaje experimental. a) Acoplador de impedancias, b) transductor de ultrasonido focalizado, c) cono aplicador lleno de agua desgasificada y bidestilada, d) rata Wistar, e) medidor de potencia, f) amplificador de potencia, g) osciloscopio, h) generador de señal.	60
Fig.5.16.	Resultados obtenidos en modelo murino con la aplicación del protocolo realizado por Hernández Chávez	61
Fig.5.17.	5.3.5 Estimación de la temperatura en el foco del US en la zona de interés de la BHE.	61
Fig.6.1.	Resultados obtenidos en modelo murino con la aplicación del protocolo realizado por Hernández Chávez [4]	69
Fig.6.2.	Visualización de la expresión del anticuerpo TH y GFAP en cerebro de roedor en el hemisferio izquierdo (Hemisferio de aplicación ultrasónica) después de 24 horas de aplicación de la terapia de ultrasonido con una amplificación de 40x.	70
Fig.6.3.	Visualización de la expresión del anticuerpo TH y GFPA en cerebro de roedor en el hemisferio derecho después de 24 horas de aplicación de la terapia de ultrasonido con una amplificación de 40x.....	71

Fig.6.4.	Visualización de la expresión del anticuerpo TH y GFPa en rata control.	71
Fig.6.5.	Visualización de la expresión del anticuerpo TH y GFPa en rata control.	72
Fig.6.6.	Temperatura registrada en el foco de potencia en el cerebro de una rata,	72
Fig.6.7.	Temperatura Inicial en la superficie del cerebro de la rata antes del protocolo de FUS.	73
Fig.6.8.	Temperatura después de la aplicación de FUS.	74
Fig.6.9.	Microburbujas con fluorescencia verde.....	74
Fig.6.10.	Microburbujas con fluorescencia roja.	75
Fig.6.11.	Microburbujas con fluorescencia en escala de grises.....	75
Fig.6.12.	Cerebro con exposición de FUS a 3 W, no se utilizaron microburbujas.	76
Fig.6.13.	Cerebro con aplicación de FUS a 3 W con microburbujas.	77
Fig.6.14.	Focalización en la <i>sustantia nigra</i> del cerebro del roedor.	77
Fig.6.15.	Variación de la temperatura en la zona de aplicación de FUS.	78
Fig.6.16.	Temperatura estimada en la zona del foco de aplicación de FUS en un <i>phantom</i> de cerebro.	79
Fig.6.17.	Resultado de la experimentación para corroborar la reversibilidad de la apertura de la BHE, los cortes corresponden a diferentes horarios de administración del EB, posterior a la aplicación de FUS	80
Fig.6.18.	Variación del campo de presión acústica a los 85 s.	81
Fig.6.19.	Variación del campo de presión acústica con respecto al tiempo. Eje x: tiempo (s), eje y Presión acústica (Pa).....	82
Fig.6.20.	Presión Acústica en la pared interna de la burbuja.....	82
Fig.6.21.	Variación del tamaño de la burbuja a una frecuencia de excitación de 1.956 MHz.	83

Índice de Tablas

Tabla.2.1. Propiedades del Azul de Evans.....	24
Tabla.2.2. Características de los diferentes fijadores utilizados en inmunofluorescencias.....	30
Tabla.3.1. Estado del arte Ultrasonido Focalizado para la apertura de la BHE.....	38
Tabla.5.1. Parámetros utilizados para la simulación de la dinámica de una microburbuja.....	53
Tabla.5.2. Características del enmallado.....	55
Tabla.5.3. Características el elemento enmallado.....	55
Tabla.5.4. Propiedades del material piezoeléctrico del transductor.....	57
Tabla.5.5. Protocolo propuesto por Hernández [4].....	61
Tabla.5.6. Protocolos experimentados para la apertura de la BHE.....	62
Tabla.5.7. Protocolo establecido durante el desarrollo de esta tesis.....	64
Tabla.6.1. Protocolo propuesto por Chávez [4].....	69

Resumen

La enfermedad de Parkinson (EP) afecta al sistema nervioso y es la segunda condición neurodegenerativa más frecuente del mundo tras el Alzheimer, ataca aproximadamente al 3 por ciento de la población mayor de 50 años a nivel mundial (entre 4.1 a 4.6 millones de personas). La OMS calcula que para el año 2030 esta cifra será duplicada, lo que conlleva a un problema de salud pública, y se agrava porque el diagnóstico suele tardar entre uno y tres años como mínimo. En el año 2013, en México se tenían registrados más de 500 mil casos y, de acuerdo con el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, se estima una prevalencia de 40 a 50 casos nuevos por cada 100 mil habitantes al año[1]. Se observa que la enfermedad se manifiesta en personas cuya edad oscila entre los 40 y 65 años, aunque hay casos en los que se presenta en rangos de menor edad, lo que se conoce como Parkinson juvenil[2].

En los últimos años, se han diseñado diversos fármacos especializados para atender esta enfermedad neurodegenerativa, pero su acción se ve obstaculizada por la barrera hematoencefálica (BHE), que actúa de manera natural como barrera de protección contra medicamentos o moléculas con cargas positivas, e impide su paso 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 venido trabajando desde 2015 con ultrasonido focalizado (FUS, por sus siglas en inglés: Focalised Ultrasound), demostrando que con el uso controlado del FUS y siguiendo un protocolo de aplicación, se puede lograr la apertura temporal de la BHE en ratas, gracias a los efectos térmicos y mecánicos inducidos puntualmente de manera controlada [3,4].

El FUS demuestra ser una herramienta efectiva no invasiva que, gracias a la pequeña dimensión del foco, permite que los efectos se produzcan de una manera puntual en la zona deseada, evitando lesiones tisulares en las zonas fuera del foco objetivo en la zona de prueba.

Este trabajo busca lograr la apertura de la BHE, para permitir la liberación de fármacos sobre la *substantia nigra* en ratas de la cepa Wistar. Se propone aprovechar los fenómenos termomecánicos y de cavitación que producen las ondas ultrasónicas combinadas con la inserción de medios de contraste ultrasónico (microburbujas). Como resultado de este trabajo, se propone un protocolo de aplicación de ultrasonido (US) en un modelo murino, con trepanación. Obteniendo como resultado el efecto de aumento de temperatura en la zona nigra de 2°C, con una potencia del aplicador de US de 3 W, con un tiempo de aplicación de 1 min, seguido de 30 s de descanso y finalmente 1 min de aplicación, dando un total el periodo de aplicación 2 min con 30 s; se tiene un tiempo de apertura de la BHE de 4 h. Se ha demostrado la apertura temporal siguiendo el comportamiento de absorción del indicador azul de Evans en la pared interna del cerebro del modelo murino. No se tienen el resultado de análisis histopatológico del posible daño en las células cerebrales. Con lo anterior podemos decir que el objetivo del trabajo se cumple.

Abstract

Parkinson's disease (PD) is related to the nervous system and is the second most common neurodegenerative condition in the world after Alzheimer's, approximately 3 percent of the population over 50 years of age worldwide (between 4.1 to 4.6 million people) . The WHO estimates that by the year 2030 this figure will be doubled, which leads to a public health problem, and it gets worse because the diagnosis usually takes between one and three years at least. In 2013, in Mexico there are more than 500 million cases and according to the National Institute of Neurology and Neurosurgery, a prevalence of 40 to 50 new cases per 100 million inhabitants per year is estimated [1]. Note that the disease manifests itself in people of the same age ranging between 40 and 65 years, although there are some cases in which it occurs in the ranges of younger age, which is known as juvenile Parkinson [2].

In recent years, various specialized drugs have been designed to treat this neurodegenerative disease, but its action is hampered by the blood-brain barrier (BBB), which acts naturally as a protective barrier against drugs or molecules with positive charges, and prevents its passage to the cells of the central nervous system (CNS). In the LAREMUS laboratory of the Bioelectronics section of the Center for Research and Advanced Studies of IPN (CINVESTAV-IPN), work has been carried out since 2015 with focused ultrasound (FUS), demonstrating that with the controlled use of the FUS and following an application protocol, the temporary opening of the BBB in rats can be achieved, thanks to the thermal and mechanical effects induced in a controlled manner [3,4].

The FUS proves to be an effective non-invasive tool that, thanks to the small dimension of the focus, allows the effects to be produced in a specific way in the desired area, avoiding tissue lesions in the areas outside the target focus in the test area.

This work seeks to achieve the opening of the BBB, to allow the release of drugs on the substantia nigra in Wistar rats. It is proposed to take advantage of the thermomechanical and cavitation phenomena produced by ultrasonic waves combined

with the insertion of ultrasonic contrast media (microbubbles). As a result of this work, an ultrasound application protocol (US) is proposed in a murine model, with trepanation. Obtaining as a result the effect of temperature increase in the nigra zone of 20C, with a power of the US applicator of 3 W, with an application time of 1 min, followed by 30 s of rest and finally 1 min of application, giving a total of the application period 2 min with 30 s; you have an opening time of the BHE of 4 h. Temporal opening has been demonstrated by following the absorption behavior of the Evans blue indicator on the inner wall of the murine model brain. The result of histopathological analysis of possible damage to brain cells is not obtained. With the above we can say that the objective of the work is fulfilled.

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.

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 de entre 10 y 13 años una vez declarada la enfermedad. 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 propiedad 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 posterior a 6 meses de aplicación [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 Ultrasonido Focalizado (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 con ayuda de elementos de contraste que contienen microburbujas, para reducir la potencia empleada en el ultrasonido aplicado y con ello evitar el daño térmico que el calentamiento del FUS produce sobre las células del tejido cerebral. Hay una pregunta fundamental que debe de responderse en este trabajo y en futuros trabajos ¿Cuál es la relación de temperatura mínima en la zona nigra para provocar la apertura de la BHE y la medición del efecto térmico que se produce en las células cerebrales próximas? Cuando se establezca un protocolo que produzca la apertura temporal de la BHE con un daño tolerable en las células cerebrales próximas, bajo esta condición se podrá pensar que se tiene cubierto el objetivo general de inducir fármacos a través de la BHE.

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 inglés) con una craneotomía en un modelo murino de la sepa Wistar, 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 aplicado con un protocolo de aplicación. El objetivo de abrir temporalmente la BHE es probar la acción de una terapia génica que se ha desarrollado para el tratamiento de Parkinson en el departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV. Las pruebas en *in-vivo* fueron realizadas en conjunto con el Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV, bajo un protocolo aprobado por el comité ético para realizar los procedimientos de uso de animales protocolo # 162-15. Este protocolo busca eliminar los daños al tejido cercano al foco del FUS, ocasionados por el incremento de temperatura que provocan las ondas de ultrasonido y su interacción con el tejido. Se

propone el uso de medios de contraste (microburbujas de Hexafluoruro de azufre) con el propósito de aumentar la eficiencia térmica del FUS y disminuir el efecto térmico dañino en el tejido próximo, es decir esperamos una disminución de potencia del FUS y una temperatura suficiente para producir la apertura temporal de la BHE en la *substantia nigra*.

Para el desarrollo de este trabajo, se basó en los protocolos desarrollados anteriormente por LAREMUS (Laboratorio de Radiación Electromagnética) de la Sección de Bioelectrónica. Se realizaron estudios histopatológicos del tejido (cerebro) para evaluar los daños en las células del cerebro. A partir de allí se planteó la reducción de la potencia. Para cumplir el objetivo de focalizar la energía en determinado punto y evitar el daño en el tejido se utilizaron microburbujas, las cuales estimuladas acústicamente producen un fenómeno físico llamado cavitación. El fenómeno de cavitación fue estudiado por medio del análisis por elemento finito (FEM), empleando el módulo de ecuaciones diferenciales ordinarias (EDO), y el modelo de estudio fue el de Rayleigh-Plesset.

Para la presentación de esta tesis, se dividió en 8 capítulos. El capítulo 2, presenta la terminología y los conceptos básicos en el uso del ultrasonido y conceptos utilizados para el desarrollo de la experimentación *in-vivo*, que son necesarios para la comprensión de este trabajo multidisciplinario. Los trabajos de investigación realizados por otros autores sobre este tema se presentan en el capítulo 3. El planteamiento del problema a abordar en esta tesis se presenta en el capítulo 4, así como también se expone el objetivo general y los objetivos particulares de este trabajo de tesis. En el capítulo 5 se desarrollan los métodos utilizados durante la experimentación, así como la descripción de la experimentación realizada en ratas. Los resultados obtenidos se muestran en el capítulo 6. El capítulo 7 expone las conclusiones alcanzadas tras finalizar el trabajo, así también el trabajo futuro y las perspectivas de este trabajo. Finalmente, el capítulo 8 presenta los productos académicos obtenidos durante este trabajo de investigación.

En este capítulo se plantean los conceptos básicos de ultrasonido, tales como la producción del fenómeno y los diferentes tipos de ultrasonido que existen y las ecuaciones que rigen el funcionamiento de este fenómeno físico. Además, se definen conceptos tales como la Barrera hematoencefálica, la cuál es el tema de estudio, ya que se busca lograr la disrupción temporal de ésta. Al abarcar este concepto fisiológico, surgen también otros nombres como el azul de Evans, que es el compuesto químico que nos permite verificar que la barrera se está abriendo y la zona en la cual el FUS está provocando la apertura.

2.1 Ultrasonido

El ultrasonido es una onda mecánica cuya frecuencia supera el límite perceptible por el oído humano, es decir, superior a 20,000 Hz. Para su difusión, requiere un medio elástico, ya sea sólido, líquido o gaseoso. A las frecuencias que se encuentran por debajo del límite inferior al audible se les conoce como infrasonido. Por el contrario, a las frecuencias que se encuentran por encima del límite superior audible se llama ultrasonido (Fig. 1).

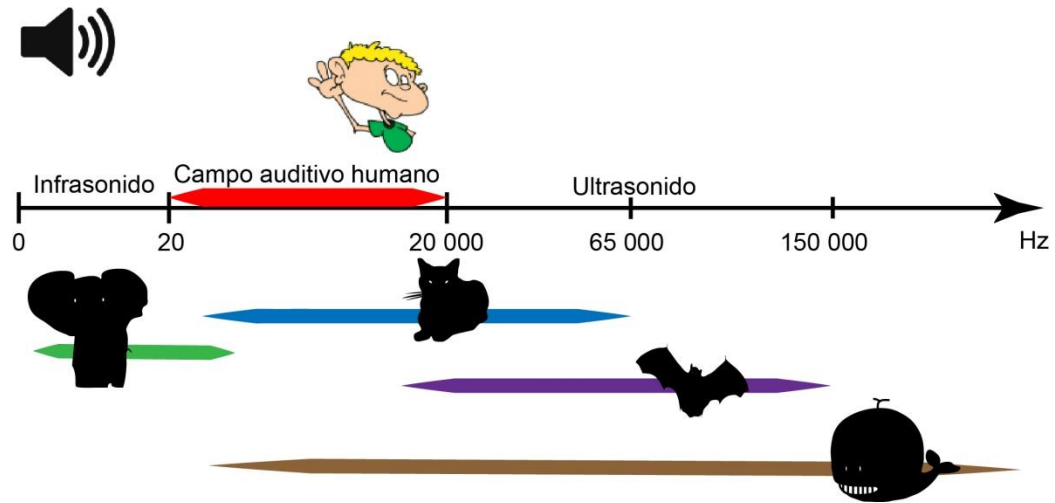


Fig.2.1. Espectro de sonido.

El ultrasonido médico, generalmente, se encuentra en el intervalo de frecuencias de 1 MHz a 10 MHz. En éste, se identifica fácilmente el ultrasonido de diagnóstico el cual utiliza intensidades acústicas bajas; también se encuentra la aplicación en fisioterapia, donde la intensidad acústica se considera como media. En terapias oncológicas o terapias de ablación la intensidad acústica es muy alta (ver Fig. 2). Por otra parte, el uso del ultrasonido en la industria para detección de fallas se conoce como ensayos no destructivos (NDT, por sus siglas en inglés: Non Destructive Test) en el que se trata de interferir lo menos posible con la muestra; otra aplicación puede ser en microscopia ultrasónica.

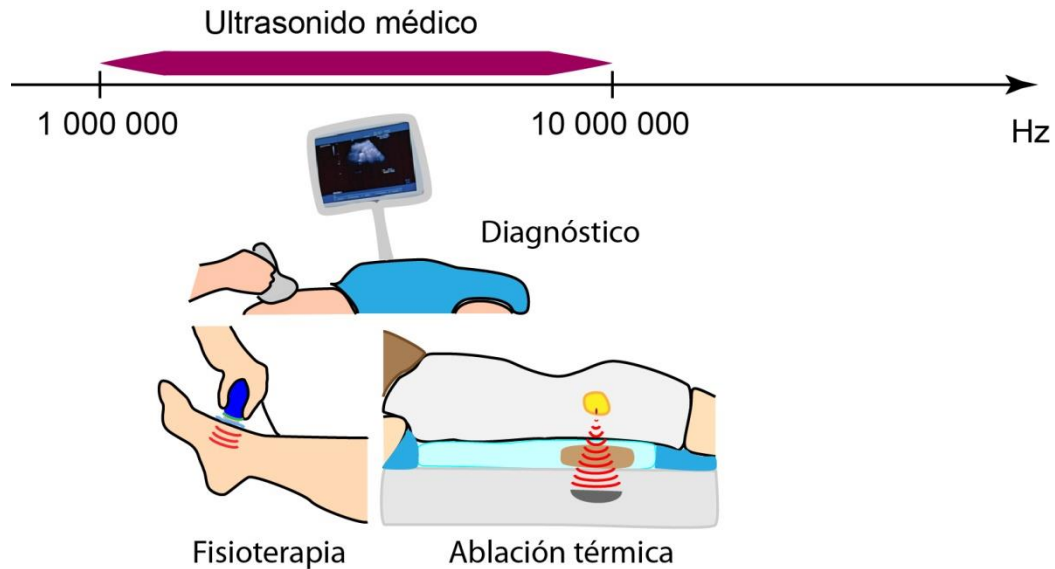


Fig.2.2. Intervalo de frecuencias para el ultrasonido médico.

2.2 Generación del ultrasonido

La generación del ultrasonido inicia en un radiador ultrasónico que está formado por un material que responde al efecto piezoeléctrico. Éste puede generar una diferencia de potencial entre sus caras al ser expuesto a un esfuerzo mecánico o una deformación mecánica al someterlo a un campo eléctrico. La difracción acústica se origina a partir del desplazamiento de la partícula en la superficie de un radiador. En ensayos no destructivos, diagnóstico y terapia con ultrasonido, las cerámicas piezoeléctricas se polarizan para que tengan un modo de vibración tipo *thickness-extensional*. Este modo predominante se logra colocando los electrodos que excitarán al radiador en las superficies con mayor área en relación a su grosor.

2.3 Efecto piezoeléctrico y relaciones constitutivas

Los materiales cristalinos naturales como los cuarzos y las sales de Rochelle presentan efectos piezoeléctricos, es decir, cuando se aplica una presión sobre el material se genera una polarización eléctrica (ver Fig. 2.3). La capacidad que tiene un material de producir un potencial eléctrico debido a una tensión externa es llamado efecto piezoeléctrico directo. El efecto piezoeléctrico inverso ocurre cuando un material

crystalino, después de haber sido polarizado, presenta una deformación mecánica resultado de ser sometido a un potencial eléctrico externo.

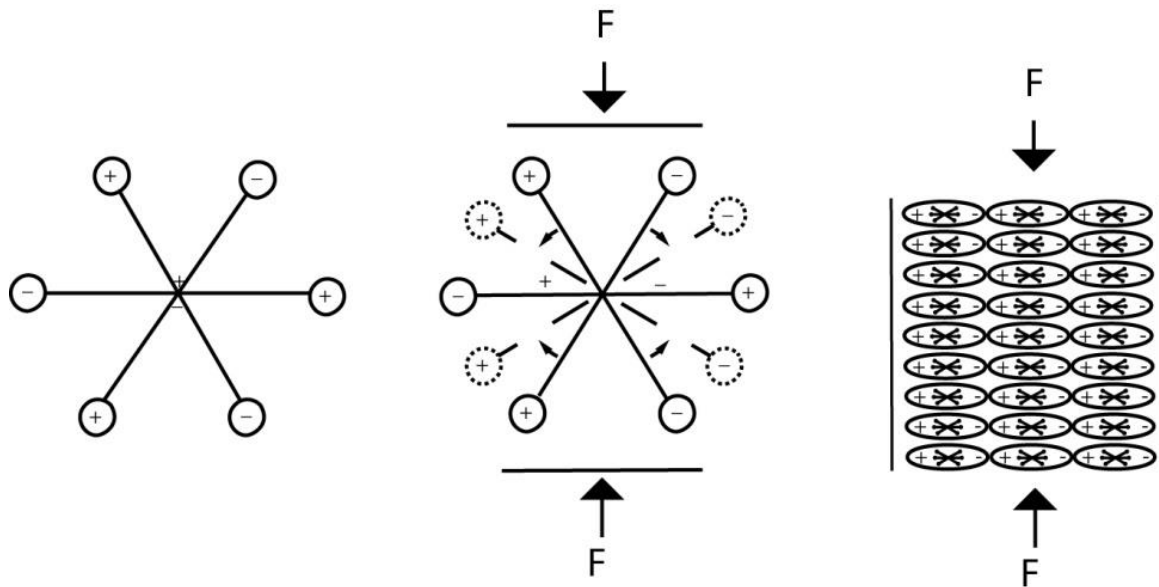


Fig.2.3. Efecto piezoeléctrico.

Las cerámicas piezoeléctricas están constituidas por materiales ferroeléctricos policristalinos. Estos tipos de materiales tienen una estructura cristalina, los cuales pierden su polarización instantánea al llegar a su temperatura de Curie. Bajo esta temperatura, el material tiene un dipolo eléctrico en su estructura, mismo que puede ser invertido o redireccionado al someterlo a un campo eléctrico fuerte. Entre los años 1935 y 1938, Busch y Scherrer fabricaron la primera serie de cristales ferroeléctricos a partir de fosfato deshidrogenado (KH_2PO_4) [2, 3]. En 1943, se descubrió el titanato de bario (BaTiO_3) y, a partir de ese momento los materiales cerámicos fueron analizados [7]. Tanto el titanato de plomo (PbTiO_3) como el zirconato de plomo (PbZrO_3) se encontraban entre los materiales desarrollados. Al combinar ambos materiales, se fabricó el titanato zirconato de plomo (PZT). Este último presentó mejores características que los anteriores [8].

Dependiendo de sus características, las cerámicas PZT pueden ser clasificadas como “suaves” o “duras”. Las PZT suaves pueden ser polarizadas a temperatura

ambiente bajo un campo eléctrico alto y son comúnmente usadas para aplicaciones de baja potencia. Las cerámicas PZT duras son polarizadas a temperaturas mayores a 300°C y son utilizadas en aplicaciones de alta potencia[9]. Además, las cerámicas piezoeléctricas de PZT son frecuentemente utilizadas en aplicaciones médicas debido a su alto acoplamiento electromecánico, variedad de constantes dieléctricas y, bajas pérdidas eléctricas y mecánicas[10].

Desde el punto de vista del material, tomando como ejemplo un pequeño cubo (ver Fig. 4), el desplazamiento longitudinal u en dirección Z debido a una presión S puede cambiar como $u + du$. El cambio en u en una longitud l es du , donde

$$du = \frac{\partial u}{\partial z} l = Sl ,$$

$$S = \frac{\partial u}{\partial z} \quad (1)$$

A partir de la ley de Hooke para pequeños esfuerzos aplicados a un sistema unidimensional, el esfuerzo T es proporcional a la presión, es decir, $T=cS$ donde c es la constante elástica del material.

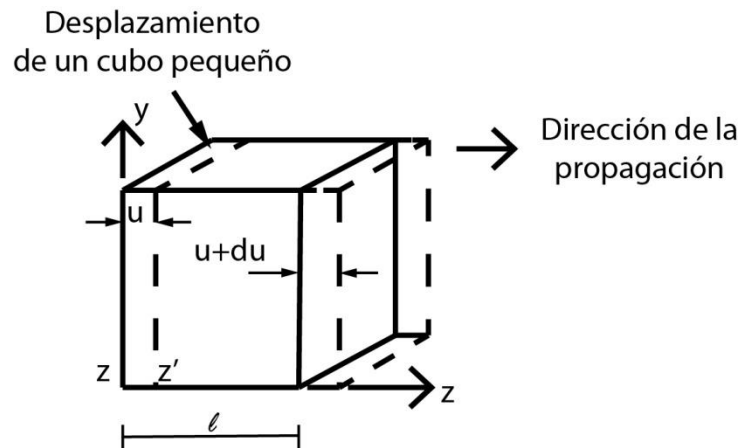


Fig.2.4. Propagación longitudinal en un cubo.

Ahora bien, si consideramos que en un punto del cubo se aplica un pequeño esfuerzo dependiente del tiempo, y utilizando la segunda ley de Newton que dice que la fuerza total por unidad de área aplicada en el material es $l \frac{\partial T}{\partial z}$, tenemos que

$$\frac{dT}{dz} = \rho_{m0} \ddot{u} = \rho_{m0} \dot{v}, \quad (2)$$

donde $v = \partial u / \partial z$ es la velocidad de la partícula del material, y ρ_{m0} es la densidad de masa en estado estacionario. Hemos definido la velocidad como el cambio en el desplazamiento en la dirección z , entonces, utilizando la ley de la conservación de la masa y aplicándola a una pequeña longitud l en el caso unidimensional, el cambio de velocidad de partícula es

$$dv = \frac{\partial v}{\partial z} l,$$

$$dv = \frac{d}{dt} \partial u = l \frac{\partial S}{\partial t}, \quad (3)$$

por lo tanto,

$$\frac{\partial S}{\partial t} = \frac{\partial v}{\partial t}, \quad (4)$$

Definiendo así la ecuación de conservación de la masa para el material para ondas longitudinales.

Cuando una presión mecánica es aplicada a un cristal se producen tanto cambios en los espacios intermoleculares como en la polarización del material debido a la orientación del dipolo $\Delta P = eS$, donde ΔP es el cambio de polarización, e es la constante de estrés piezoeléctrico y S es una presión de deformación del material.

Para el caso de la presión, el desplazamiento total eléctrico en la presencia de un campo eléctrico donde la constante dieléctrica es la permitividad con presión cero o constante ϵ^S es

$$D = \epsilon^S E + eS, \quad (5)$$

El estrés total aplicado al medio piezoeléctrico es la suma del estrés externo T aplicado y el estrés interno $T_E = eE$, el cual es el promedio del estrés en el medio debido a un campo eléctrico,

$$T = c^E S - eE, \quad (6)$$

donde c^E es la constante elástica cuando el campo eléctrico es constante o cero. Las ecuaciones (5) y (6) son conocidas como ecuaciones constitutivas para un material piezoeléctrico[3, 8], las cuales describen la relación entre las fuerzas eléctricas y mecánicas que actúan en el material de acuerdo a sus propiedades.

Los coeficientes elásticos, dieléctricos y piezoeléctricos son expresados en una matriz simétrica (9x9), mientras que el campo eléctrico, la tensión, el estrés y el desplazamiento se representan por tensores de 9 elementos. En un caso de mínima simetría, se presentan 45 coeficientes distintos (21 constantes elásticas, 6 constantes dieléctricas y 18 constantes piezoeléctricas)[12]. Sin embargo, para una cerámica piezoeléctrica cuyo espesor t es mucho mayor que sus dimensiones laterales l ($l \ll t$), los dominios del material se polarizan en el eje Z y los electrodos se depositan en la superficie de mayor área en el elemento, es decir, se obtiene una vibración en modo espesor predominante [10]. Por lo tanto, las ecuaciones constitutivas del piezoeléctrico pueden ser expresadas como,

$$T_3 = c_{33}^E S_3 - e_{33} E_3,$$

$$D_3 = \epsilon_{33}^S E_3 + e_{33} S_3, \quad (7)$$

En las ecuaciones de arriba, el subíndice 3 en los tensores y en las matrices denota la dirección de polarización. Las propiedades piezoeléctricas de un material dependen de sus condiciones de frontera, su geometría, su manufactura, etc.[3,10, 11]. No obstante, en un caso real, la vibración de la cerámica piezoeléctrica puede presentar altas variaciones en los modos laterales, las cuales son respuestas superpuestas no deseadas para el modo de vibración principal: espesor [15,16].

Las propiedades más importantes de una cerámica piezoeléctrica son los factores de acoplamiento piezoeléctrico. Éste está definido como la relación mutua entre la densidad de energía elástica y dieléctrica con el promedio geométrico de las densidades intrínsecas de las energías elásticas y dieléctricas. Así como la dependencia en la manufactura de las cerámicas piezoeléctricas, ya que la tolerancia en la medida de los coeficientes no debe variar más de 5% para las constantes elásticas, 10% para las piezoeléctricas, y 20% para las constantes dieléctricas [6,16]. Los cambios en las propiedades se deben en mayor parte a las pequeñas diferencias químicas, variación en densidad, composición química heterogénea, variaciones en tamaño de los granos, variación en la respuesta durante la polarización, etc. [6].

2.4 El transductor piezoeléctrico

Un transductor electromecánico es un dispositivo que convierte energía eléctrica en mecánica, y viceversa. En frecuencias bajas menores de 20 kHz se pueden emplear como micrófonos o altavoces. Para frecuencias altas, los transductores piezoeléctricos son más útiles. Por ejemplo, en aplicaciones médicas se suelen utilizar transductores que trabajen en el intervalo de frecuencia de 1 MHz a 10 MHz.

El transductor piezoeléctrico está constituido por diferentes partes (ver Fig. 2.5):

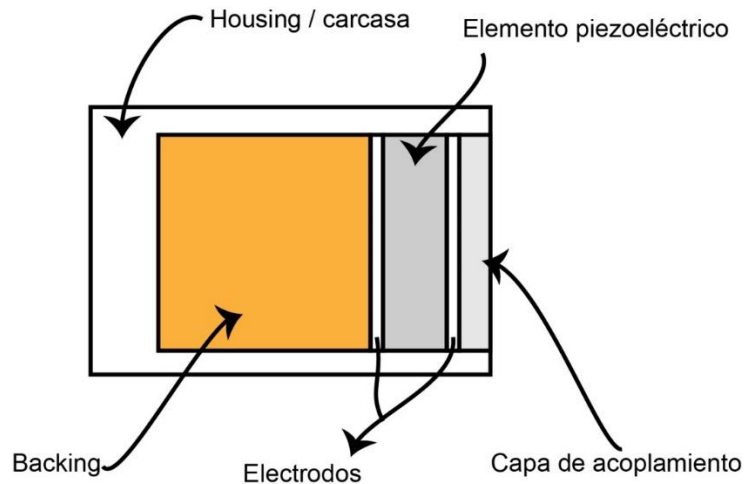


Fig.2.5. Transductor ultrasónico.

1. **Elemento piezoeléctrico:** es el elemento encargado de hacer la conversión de energía eléctrica a mecánica y viceversa.
2. **Electrodos:** dependiendo del modo de vibración para el cual ha sido diseñado el transductor, se depositan por medio de pulverización o evaporación en vacío. Se trata de capas muy delgadas del grosor de una longitud de onda.
3. **Capas de acoplamiento:** puede colocarse una o varias capas de acoplamiento las cuales, dependiendo del material, tienen una impedancia acústica que se aproxima a la impedancia del medio que será radiado. Usualmente el grosor de las capas de acoplamiento es de un cuarto de longitud de onda.
4. **Backing:** un transductor piezoeléctrico puede contar con backing o no en la parte posterior del elemento piezoeléctrico. Dependiendo de la aplicación, se puede colocar un material cuya impedancia acústica sea mayor a la del radiador para así cambiar el ancho de banda del transductor. En aplicaciones de alta potencia, los transductores suelen presentar un backing de aire para asegurar que la potencia eléctrica sea transmitida con mayor eficiencia en potencia acústica.

5. **Housing:** es la carcasa del transductor. Contiene la cerámica piezoeléctrica y el backing, así como los cables de excitación. Cuenta con una terminal que permite la fácil conexión con el sistema de excitación.

2.5 Medios de propagación

La propagación del sonido en un medio se determina mediante la solución de la ecuación de onda. Esta propagación se realiza a través de un medio en forma de vibraciones mecánicas. El medio puede ser sólido, líquido o gaseoso, y la velocidad de la propagación está determinada por la densidad y la elasticidad del medio. En medios líquidos y gaseosos (viscoelásticos) se pueden propagar únicamente ondas longitudinales, pero en medios sólidos se pueden propagar tantas ondas longitudinales, transversales y todas sus combinaciones.

Sin considerar la acción de alguna fuente de energía, la ecuación de onda en coordenadas cartesianas está dada por:

$$\left(\frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2} \right) p(\vec{r}, t) = \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} p(\vec{r}, t) \quad (8)$$

donde c es la velocidad del sonido en el medio, p es la presión acústica; \vec{r} , es un punto en el campo y t , representa el tiempo. Una solución que satisfaga la ecuación de onda en el medio y en su frontera (el contorno) es el objetivo del modelado computacional. No obstante, existen fenómenos presentes durante la propagación de una onda ultrasónica en un medio.

2.6 Tipos de onda en un medio sólido con espesor finito

1. **Cizalladura:** las ondas de cizalladura se presentan cuando el desplazamiento de la partícula del medio es de manera transversal a la dirección de propagación.
2. **Longitudinales:** estas ondas se presentan cuando el desplazamiento de la partícula del medio es paralelo a la dirección de propagación.

3. **Lamb:** este tipo de ondas producen un desplazamiento de la partícula en dirección transversal y longitudinal
4. **Rayleigh o superficiales:** este tipo de ondas se presentan solo cerca de la superficie de un medio semi-infinito. El ejemplo típico de este tipo de ondas es aquella que se propaga a través de la superficie del agua. Las ondas acústicas superficiales concentran su energía en una región relativamente pequeña, aproximadamente una longitud de onda de profundidad de la superficie.

2.7 Parámetros acústicos

2.7.1 Intensidad acústica

Para que una onda se propague a través de un medio, ésta requiere de energía. En un plano transversal en un punto P del radiador, el medio está realizando un trabajo continuo que transmite a otro punto cercano. Para una onda plana, la tasa de promedio temporal al que el trabajo se realiza en ese plano transversal por unidad de área se llama intensidad,

$$I = I_0 e^{-2\alpha z}, \quad (9)$$

donde I_0 es la intensidad inicial y puede encontrarse como

$$I_0 = \frac{1}{2} \frac{p_0^2}{\rho c}, \quad (10)$$

donde p_0 es la presión inicial, ρ es la densidad del medio y c es la velocidad del sonido en el medio [7].

2.7.2 Presión acústica

La presión acústica es el resultado de la propia propagación de las ondas acústicas. Cuando una onda viaja, se producen cambios en la densidad del medio por donde viaja y por lo tanto cambios locales en la presión que las moléculas se ejercen entre sí. Esta presión se denomina presión acústica y se mide en pascales [Pa]. La presión acústica puede ser medida temporal (presión acústica instantánea), o como la relación con la cantidad de energía efectiva (presión eficaz o r.m.s.) [17].

2.7.3 Atenuación

Una onda mecánica al propagarse en un medio interactúa con éste de acuerdo con las propiedades intrínsecas del medio. La intensidad o amplitud de la onda disminuye con respecto a la distancia que recorre por pérdidas como absorción y dispersión. La combinación de las pérdidas de energía de la onda acústica se denomina atenuación. La atenuación del sonido de una onda plana se puede expresar como

$$A = A_0 e^{-\alpha z}, \quad (11)$$

donde A_0 es la amplitud de la onda sin atenuar, A es la amplitud reducida después de que la onda ha viajado una distancia z desde el punto inicial. Y, α [Nepers/ unidad de distancia] es el coeficiente de atenuación de la onda que viaja en la dirección z [2, 8]. Los factores que influyen en la atenuación se definen a continuación:

1. **Dispersión:** se presenta cuando una onda que viaja en un medio se esparce en diferentes direcciones a la dirección de propagación original. En medios no-homogéneos, tejidos biológicos, la onda acústica atraviesa diversas capas de tejido con estructura interna propia, dispersores intrínsecos, que difractan la onda en diferentes direcciones.
2. **Absorción:** es la conversión de la energía de la onda mecánica en otras energías como el calor. En un medio viscoelástico, la onda acústica produce oscilaciones en las moléculas. Éstas al responder al proceso de compresión y

relajación a la frecuencia de la onda comienzan a tener fricción entre las superficies de contacto, produciendo calor.

2.7.4 Velocidad de propagación

La velocidad de propagación del sonido depende de las propiedades intrínsecas del material (densidad y constantes elásticas) y es independiente de la amplitud de la onda. Retomando la ecuación (2), podemos ver que la velocidad v está directamente relacionada al desplazamiento de la partícula u . Si el desplazamiento de la partícula aumenta, también lo hará su aceleración, y por lo tanto su velocidad. Mientras que el tiempo que le toma a la partícula regresar a su punto de equilibrio es independiente de la fuerza que se le aplique. En general, la relación entre la velocidad del sonido y su densidad y sus constantes elásticas está dada por la siguiente ecuación:

$$v = \sqrt{\frac{c}{\rho}}, \quad (12)$$

donde v es la velocidad de propagación, c es la constante elástica y ρ es la densidad del material. En un fluido tiene la forma

$$v = \sqrt{\frac{B}{\rho}}, \quad (13)$$

donde B es el módulo de elasticidad.

2.7.5 Impedancia acústica

Análogamente a la resistencia eléctrica, existe un término que se llama impedancia acústica Z [Rayls] de un material que es el producto de la densidad ρ y la velocidad del sonido c_s :

$$Z = \rho c_s. \quad (14)$$

Cuando la onda mecánica viaja a través de diferentes medios, la cantidad de energía transmitida o reflejada dependerá de la diferencia de impedancia acústica en la frontera de ambos medios. Este parámetro es y se debe considerar para el diseño de transductores y su uso específico. Asimismo, como para estimar el acoplamiento entre transductores y medios de propagación.

2.7.6 Reflexión y refracción

Cuando una onda plana viaja a través de dos medios, ésta puede ser reflejada o refractada por la diferencia de impedancia de éstos. Parte de la energía que lleva la onda incidente es reflejada y viaja a la misma velocidad que la onda incidente. La onda transmitida o refractada viaja en el segundo medio a una velocidad diferente [18]. Si se conocen las impedancias acústicas de los medios, Z_1 y Z_2 , la fracción de la intensidad de onda incidente que es reflejada puede ser calculada con la siguiente ecuación,

$$R = \left(\frac{Z_2 - Z_1}{Z_2 + Z_1} \right)^2, \quad (15)$$

donde Z_1 es la impedancia acústica del medio 1, Z_2 es la impedancia del medio 2 y R es el coeficiente de reflexión. La dirección de las ondas reflejadas y refractadas está gobernada por la ley de Snell. Ésta describe la relación entre los ángulos y las velocidades de las ondas, es decir, iguala la relación de las velocidades de los materiales con la relación de los ángulos incidente y refractado (ver Fig. 6).

$$\frac{\sin \theta_i}{c_1} = \frac{\sin \theta_t}{c_2}, \quad (16)$$

donde θ_i es el ángulo de la onda incidente, θ_t es el ángulo de la onda refractada, c_1 es la velocidad del medio 1, y c_2 es la velocidad del medio 2. Como la superficie o la interfaz entre ambos medios es plana, $\theta_i = \theta_r$.

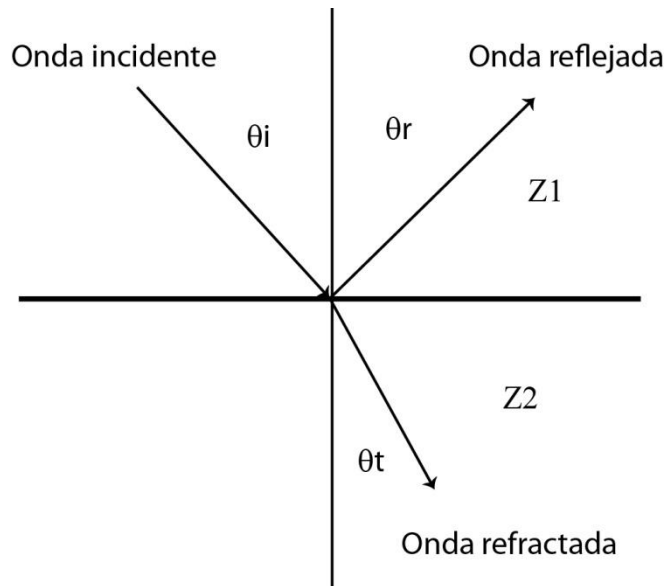


Fig.2.6. Reflexión y refracción de la onda acústica en dos medios diferentes.

Cuando la onda viaja de un medio que tiene menor velocidad de propagación a otro más rápido ($c_1 < c_2$) existe un ángulo de incidencia que provoca que la onda refractada tenga un ángulo de 90° . Éste se llama ángulo crítico, y no existe transmisión de energía de un medio a otro.

2.8 Transductores planos

Las ondas mecánicas generadas por un transductor ultrasónico no se producen en un solo punto, sino que se origina en muchos puntos a lo largo de la superficie de elemento piezoeléctrico. El resultado de la difracción acústica es la suma de muchas ondas que interactúan o interfieren entre ellas. En los transductores planos, el área transversal que cubre el transductor es amplia, por lo que suelen ser utilizados para aplicar energía en zonas grandes. La distribución de la presión producida por estos

transductores pretende ser un haz colimado que diverge después de alcanzar su punto máximo, foco natural del transductor, de presión (ver Fig. 7).

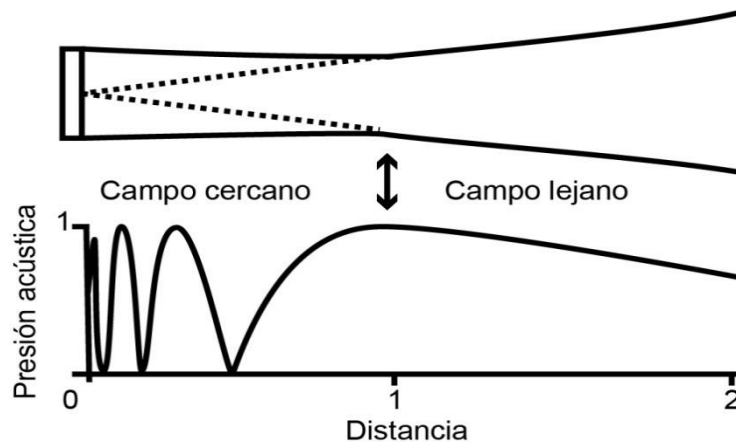


Fig.2.7. Distribución de presión en el eje de propagación para un transductor plano.

En el campo acústico de un radiador plano se pueden distinguir dos zonas importantes conocidas como campo cercano o zona de Fresnel y campo lejano o zona de Fraunhofer. El campo cercano está formado por la superposición de las ondas que interactúan en él, por lo que la presión en un punto es la suma de amplitudes de las ondas. El campo lejano presenta menos irregularidades que el campo cercano, por lo que realizar mediciones o aplicar terapia en éste es lo deseable.

2.9 Focalización del ultrasonido por medio de transductores cóncavos

La focalización del ultrasonido se puede llevar a cabo de diferentes maneras. En la Fig. 8, se muestran algunos ejemplos de cómo se puede concentrar la energía en un punto específico a cierta distancia del transductor. Por medio de un elemento cóncavo, se obtiene un foco definido a una distancia fija. Adaptando lentes acústicas a transductores, la distancia focal se puede variar en función de la curvatura de la lente. Otra manera de focalizar es por medio de excitación en fase de arreglos lineales de elementos piezoeléctricos; de esta manera se controla la ubicación del foco. Sin embargo, en esta última, se requiere de equipos de excitación robustos.

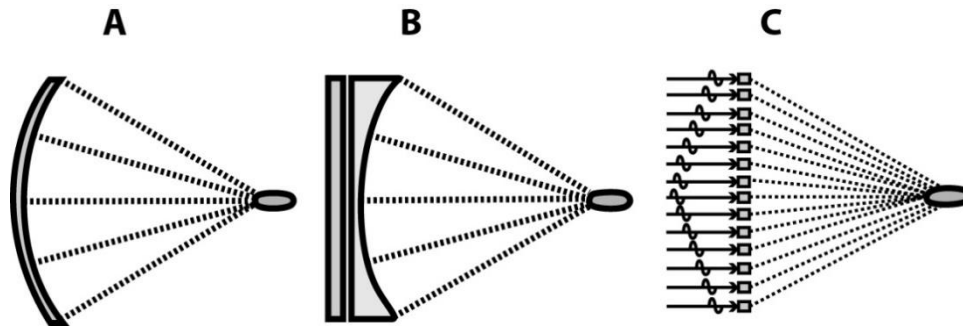


Fig.2.8. Focalización del ultrasonido (A) elemento cóncavo, (B) lentes acústicas, (C) arreglo en fase [13].

En general, la geometría de los transductores esféricos cóncavos es la que se muestra en la Fig. 9. La focalización del haz depende del radio de apertura a y el radio de curvatura A .

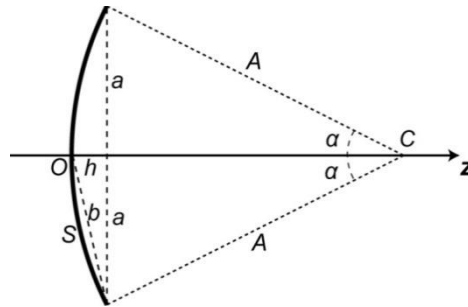


Fig.2.9. Geometría de un transductor esférico cóncavo.

De acuerdo al análisis de los campos focalizados realizado por O'Neil [19] el cual está basado en la Fig. 9, el radio de apertura a está dado por

$$a = A \sin(\alpha); \tag{17}$$

el radio de curvatura A puede ser expresado en términos de h y el ángulo α por

$$A = \frac{h}{1 - \cos(\alpha)}. \tag{18}$$

Para las ecuaciones anteriores, se consideró que

$$h = \frac{b^2}{2A}, \quad (19)$$

donde h es la profundidad de la superficie cóncava y b es la cuerda desde el centro de la superficie S hasta el borde del transductor.

El propósito de focalizar el ultrasonido es concentrar la energía en una pequeña región llamada “foco”. Usualmente, la forma del foco se describe como un “puro” o arroz [20] o como una región elipsoidal [21]. Sin embargo, las dimensiones del foco varían de acuerdo al dispositivo que se utilice. El tamaño del foco puede ser determinado por su longitud (a lo largo del haz) y su ancho (transversal al haz en la distancia focal) como longitud a mitad de la intensidad máxima (FLHM) y anchura a mitad de la intensidad máxima (FWHM), respectivamente[19-20].

2.10 Barrera hematoencefálica (BHE)

La barrera hematoencefálica es parte medular de este trabajo ya que se plantea la apertura de esta estructura de manera no invasiva y reversible por lo cual es necesario conocer la fisiología de la misma. La barrera hematoencefálica (BHE) es una barrera de transporte estructural y bioquímica, altamente especializada, que consta de vasos formados por células endoteliales, conectadas por uniones estrechas y rodeadas por los pies de los astrocitos. La BHE impide el paso de ciertas sustancias al intersticio cerebral con criterio selectivo. Muchos fármacos son útiles en el tratamiento de trastornos sistémicos, pero resultan ineficaces con respecto a trastornos similares del sistema nervioso central (SNC), debido a su incapacidad para cruzar la barrera: los neuropéptidos, las proteínas y los antineoplásicos son ejemplos importantes de agentes terapéuticos que tienen dificultad para traspasar esta barrera [24].

Hay tres barreras que limitan el transporte de medicamentos al parénquima cerebral: la BHE, formada en la interfaz entre el encéfalo y los vasos sanguíneos; la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo (BSLCR), localizada en el plexo coroideo, y una

tercera barrera, la barrera sangre-aracnoides, que es la capa aracnoides de las meninges.[25]

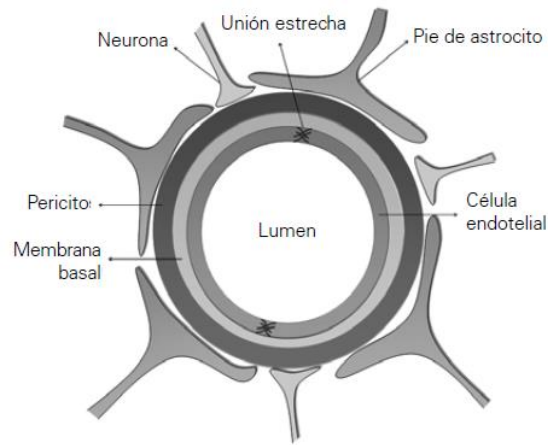


Fig.2.10. Dibujo esquemático de la barrera hematoencefálica en sección [24].

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:

1. Penetración por caveolas y transcitosis
2. Difusión transmembranal,
3. Mecanismos de acarreo y transportadores,
4. Transporte por vía retrógrada de flujo axónico que elude la BHE.

2.11 *Sustantia Nigra*

Esta zona del cerebro del roedor es de alta importancia, ya que se plantea focalizar el ultrasonido en este punto, debido a su importancia para la enfermedad del Parkinson. Se localiza en la parte del cerebro conocida como “mesencéfalo”. Esta región se considera parte del tronco cerebral y se relaciona con el movimiento, la

consciencia, la alerta, la visión y la audición. En el cerebro humano encontramos sustancia negra a ambos lados de la línea media. Es decir, que hay una sustancia negra en cada hemisferio del encéfalo. La neuromelanina, un pigmento de las neuronas dopaminérgicas (abundantes en esta región), confiere su nombre a la sustancia negra ya que la dota de su característico tono oscuro[26].

La sustancia negra se divide en dos secciones: la parte compacta y la parte reticulada. Cada una de ellas tiene sus propias funciones y conecta el mesencéfalo con distintas regiones del sistema nervioso. La parte compacta transmite señales al resto de ganglios basales. Proyecta neuronas dopaminérgicas al neostriado, por lo cual tiene un papel fundamental en el inicio y en la regulación de la motricidad fina. La parte reticulada envía referencias de los ganglios basales a otras zonas del encéfalo, como el tálamo, un núcleo clave para el intercambio de información entre las estructuras subcorticales y la corteza cerebral. Esta sección se relaciona íntimamente con el globo pálido y sus neuronas utilizan el neurotransmisor GABA, que tiene una función inhibitoria en el sistema nervioso, incluyendo en la actividad dopaminérgica de la sustancia negra compacta. La parte compacta es más oscura que la reticulada, puesto que como hemos dicho la neuromelanina se encuentra en las neuronas dopaminérgicas, más numerosas en la parte compacta que en la reticulada.

2.11 Azul de Evans (EB)

Para evaluar la apertura de la BHE, se utiliza un colorante, el cual va a penetrar el tejido cerebral, se elige el azul de Evans debido a que posee un peso superior al que la BHE permite pasar. El azul de Evans, es un colorante que tiene una afinidad muy alta por la albúmina sérica. Debido a esto, puede ser útil en fisiología para estimar la proporción de agua corporal.[27]

El colorante azul Evans se ha utilizado como ensayo de viabilidad sobre la base de su penetración en células no viables, aunque el método está sujeto a error porque supone que las células dañadas o alteradas de otro modo no son capaces de repararse y, por lo tanto, no son viables.

El azul de Evans también se usa para evaluar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica a las macromoléculas. Debido a que la albúmina sérica no puede atravesar la barrera y prácticamente todo el azul de Evans se une a la albúmina, normalmente el tejido neural permanece sin teñir. Cuando la barrera hematoencefálica se ha visto comprometida, el azul de Evans unido a la albúmina ingresa al SNC.

Tabla.2.1. Propiedades del Azul de Evans.

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

2.12 *Phantoms* ultrasónicos

Para evaluar los efectos del ultrasonido (focalización y aumento de temperatura) es necesario utilizar ciertos emuladores de tejido, es por ello que se emplean *phantoms* ultrasónicos. Son cuerpos de prueba utilizados para imitar el tejido humano, posibilitando así el estudio de la interacción del tejido con el haz de ultrasonido. En los *phantoms* encontrados comercialmente la velocidad de propagación de la onda (VPO) es considerada constante, alrededor de 1,540 m/s. En el cuerpo humano, la VPO varía según el tipo de tejido, dentro del intervalo entre 1,450 m/s y 1,650 m/s.[6] *Phantoms* con diferentes VPO proporcionarían informaciones adicionales, sobre el comportamiento del ultrasonido, a aquellas proporcionadas por los *phantoms* convencionales. La intensidad local se puede hallar a través de la presión acústica en el medio, que puede ser medida utilizando un hidrófono de banda ancha, o bien puede medirse directamente utilizando un método de transitorios térmicos (termistor

recubierto con material absorbente de ultrasonido) [28]. El agua sin gas puede ser utilizada generalmente como un *phantom* ($c=1480$ m/s, $\mu_{abs}=0.0025$ f_z neper/m para $T=20^{\circ}\text{C}$, con f en MHz). A través de la medición de perfiles, y algunos ajustes matemáticos, se puede estimar la atenuación presente en el tejido. Alternativamente, las distribuciones del SAR (tasa de absorción específica) pueden ser determinadas en materiales con absorción similar a la de los tejidos[24, 25].

2.13 Microburbujas

El aporte de esta tesis es el empleo de microburbujas, es por ello que se plantea el uso de este agente de contraste empleado mayormente en ecografía de contraste cardiovascular. Los productos de contraste ultrasónicos consisten en muy pequeñas burbujas gaseosas estabilizados por una pared de material biocompatible como las proteínas, los lípidos o los polímeros. Las microburbujas son más pequeñas que los glóbulos rojos y son por consecuencia inyectables por vía intravenosa. Los primeros productos de contraste estaban compuestos de microburbujas simples, pero su comportamiento resultó ser no satisfactorio por su inestabilidad y su tamaño incontrolado e inapropiado.

Una vez inyectadas, estas microburbujas desaparecían relativamente rápido, evitando la correcta realización del examen. A fin de permitir un uso óptimo de los productos de contraste, las microburbujas deben cumplir estas condiciones:

1. Las microburbujas deben ser administradas por vía intravenosa en bolos o por infusión.
2. Deben de ser suficientemente pequeñas y estables para asegurar el flujo pulmonar y su duración debe ser lo suficientemente larga para permitir realizar el examen ultrasónico y capturar las imágenes.
3. Con el fin de comportarse como un trazador perfecto las microburbujas deben tener la misma dinámica del flujo sanguíneo y deben ser metabolizadas.

4. Con el fin de satisfacer las propiedades anteriores, las propiedades físicas deben poder ser cuidadosamente seleccionadas. Las propiedades de interés son el diámetro de las microburbujas, las características físicas de la pared y las propiedades del gas que las compone. Además, se debe tener en cuenta los efectos del medio tales como la temperatura y la presión hidrostática.[31]

2.13.1 Microburbujas SonoVue®

Las microburbujas son la parte medular de este proyecto ya que se plantea utilizar éstas para lograr el fenómeno de cavitación y a su vez este fenómeno provoque un aumento de presión con la cual se logre la apertura de la barrera.

Estas microburbujas forman parte de la segunda generación de la compañía Braco. Están compuestas de hexafluoruro de azufre encapsulado de una mono pared de un fosfolípido sumamente elástico. El diámetro de las microburbujas SonoVue® es de 1 µm a 12 µm y la concentración es de 2×10^8 microburbujas/mL (17). SonoVue® está aprobado en Europa y ahora está disponible en numerosos países de la comunidad europea. Es utilizado para la opacificación y la mejora de la determinación de las paredes ventriculares izquierda y también en radiología.

2.14 Inmunofluorescencia

Para evaluar el daño en el tejido cerebral, es necesario realizar una técnica denominada inmunofluorescencia. La inmunofluorescencia es una técnica de inmunomarcación que hace uso de anticuerpos unidos químicamente a una sustancia fluorescente para demostrar la presencia de una determinada molécula. Es una técnica que tiene variantes cuantitativas y cualitativas (la inmunotinción de células para su observación por microscopía fluorescente).

La inmunofluorescencia, como todos los inmunoensayos, aprovecha la capacidad que tienen los anticuerpos para unirse con alta especificidad a una determinada molécula blanco; pero se diferencia de otras técnicas inmunohistoquímicas en que aquí la marca unida al anticuerpo es una molécula fluorescente tal como, por ejemplo, el isotiocianato de fluoresceína. El anticuerpo

marcado se hace reaccionar contra un preparado biológico y luego se expone la muestra así tratada a una fuente de luz de onda corta (ultravioleta o azul) seleccionada por medio de un monocromador. Esta luz de onda corta genera un fenómeno de fluorescencia en la molécula marcadora que a su vez emite luz a una longitud de onda más larga (verde, amarillo o naranja). Esta luz emitida puede ser cuantificada con facilidad por fotometría o en el caso de tratarse de preparados histológicos, puede ser observada por medio de un microscopio de fluorescencia. En el caso de la utilización de la inmunofluorescencia como método de tinción para microscopía óptica, el fluorescente revela la localización a nivel celular o subcelular de la molécula diana.

La inmunofluorescencia, como técnica de tinción, puede ser utilizada en cortes de tejidos, líneas celulares cultivadas, células individuales y secreciones que contengan células en suspensión (por ejemplo, esputo) con la finalidad de analizar la presencia y distribución de proteínas, glúcidos y moléculas pequeñas tanto de origen biológico como no. Esta técnica puede ser utilizada en combinación con otras técnicas de coloración fluorescente que no hagan uso de anticuerpos, como por ejemplo DAPI para marcar ADN.

Existen varios diseños de microscopios que pueden ser utilizados para el análisis de preparados histológicos marcados por inmunofluorescencia. El más simple de todos es el microscopio de epifluorescencia, aunque también es ampliamente utilizado el microscopio CONFOCAL. También es posible utilizar varios tipos de técnicas microscópicas de alta resolución.

2.14.1 Primaria o IFD

La inmunofluorescencia primaria, o directa, también conocida por sus siglas IFD (inmunofluorescencia directa), hace uso de un único anticuerpo que se encuentra químicamente unido a un fluorocromo. El anticuerpo reconoce la molécula diana y se une a ella directamente. En el caso de utilizarse como técnica de tinción inmunohistoquímica, la región donde se deposita la molécula diana puede ser identificada al microscopio de fluorescencia como una zona brillante.

Esta técnica presenta algunas ventajas con respecto a la IFI (indirecta). Reduce el número de etapas necesarias, por lo tanto, es más rápida y por otro lado es menos sensible a interferencias debidas a reactividad cruzada de los anticuerpos o a reacciones no específicas, las cuales tienden a aumentar el ruido de fondo de la técnica.

2.14.2 Secundaria o IFI

La inmunofluorescencia secundaria, o indirecta (también conocida por sus siglas IFI) hace uso de dos anticuerpos: el anticuerpo primario es el que reconoce y se une a la molécula diana, mientras que el secundario que es el que se encuentra marcado con el fluoróforo, reconoce al primario y se une a él. Esta técnica es un poco más compleja que la IFD, requiere más pasos y es más posible que sufra interferencias, pero en contrapartida es mucho más flexible que una técnica directa y debido a que es posible que un anticuerpo primario se una a más de un anticuerpo secundario, implica un efecto de amplificación que también aumenta la sensibilidad de la técnica.

Esta técnica es posible debido a que los anticuerpos constan de dos partes, una región variable (que es la que reconoce al antígeno) y una región constante (que es la reconocida por el anticuerpo secundario).

Es posible que existan varios anticuerpos que reconozcan diferentes antígenos (es decir que tengan diferentes regiones variables) pero que compartan la misma región constante. Todos estos anticuerpos con diferentes especificidades pueden ser reconocidos a su vez por un único anticuerpo secundario que reconozca la región constante. Esto ahorra el esfuerzo técnico y el costo de modificar cada uno de los anticuerpos primarios para acarrear el fluoróforo.

Típicamente se hace uso de diferentes anticuerpos primarios con diferentes regiones constantes generados por la estimulación en la producción de anticuerpos en diferentes especies. Por ejemplo, un investigador puede estimular la producción de un determinado anticuerpo primario en una cabra, y luego emplear un anticuerpo de

conejo que reconozca la región constante de los anticuerpos de cabra (anticuerpos de "conejo anti-cabro"). Y luego puede crear un segundo juego de anticuerpos en ratón que sean reconocidos por un tipo diferente de anticuerpos "burro anti-ratón". Esto permite reutilizar los anticuerpos marcados, que son muy difíciles de obtener, en múltiples experimentos.

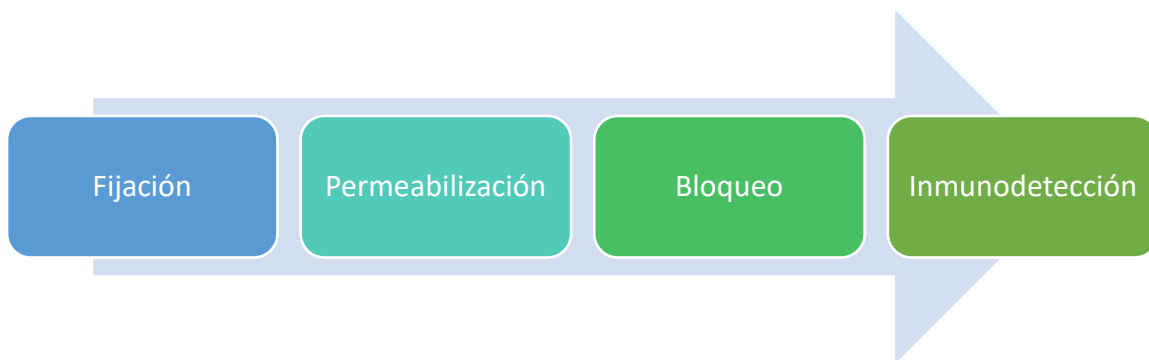


Fig.2.11. Etapas de Inmunofluorescencia.

1. Fijación

En esta etapa se busca preservar la localización, composición y estructura del material biológico a analizar manteniendo lo más fielmente posible a la situación que existe *in-vivo*. Existen distintos métodos de fijación de material biológico. Esto dependerá de distintos factores como: el tipo de microscopia a utilizar, la estructura subcelular que se quiera detectar, entre otras.

Tabla.2.2. Características de los diferentes fijadores utilizados en inmunofluorescencias

	Glutaraldehído	Paraformaldehído	Metanol/Acetona
Modo de Acción	Por puentes entre grupos aminos de las proteínas	Por puentes entre grupos aminos de las proteínas	Por precipitación de proteínas y carbohidratos
Uso más frecuente	Microscopia electrónica y algunos estudios de fluorescencia	Estudios de fluorescencia e inmunocitoquímicos	Gran variedad de estudios
Ventajas/Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> -Provee la mayor preservación de estructura fina. -Es el más severo de los fijadores. -Altera los epitopes. Provoca fluorescencia inespecífica 	<ul style="list-style-type: none"> -Produce menos autofluorescencia que el glutaraldehído. -Genera menos cantidad de puentes que el glutaraldehído. -Penetra más rápidamente dentro de la célula 	<ul style="list-style-type: none"> -La fijación es más rápida que con los aldehídos. -Puede alterar el patrón de localización de los antígenos. -Fija y permeabiliza al mismo tiempo. -Puede generar contracción en la muestra.

2. Permeabilización

Existen distintos métodos de permeabilización que son más “suaves” o más “fuertes”. Esto dependerá de la naturaleza del compuesto permeabilizante a utilizar. Se producen poros en las membranas celulares. Lo que permite el ingreso de los anticuerpos a la célula si se quiere detectar estructuras internas de la célula. Se utilizan generalmente detergentes no iónicos que solubilizan los lípidos de la

membrana produciendo de manera irreversible o reversible poros en la membrana (por ejemplo, Tritón X- 100, NP40).

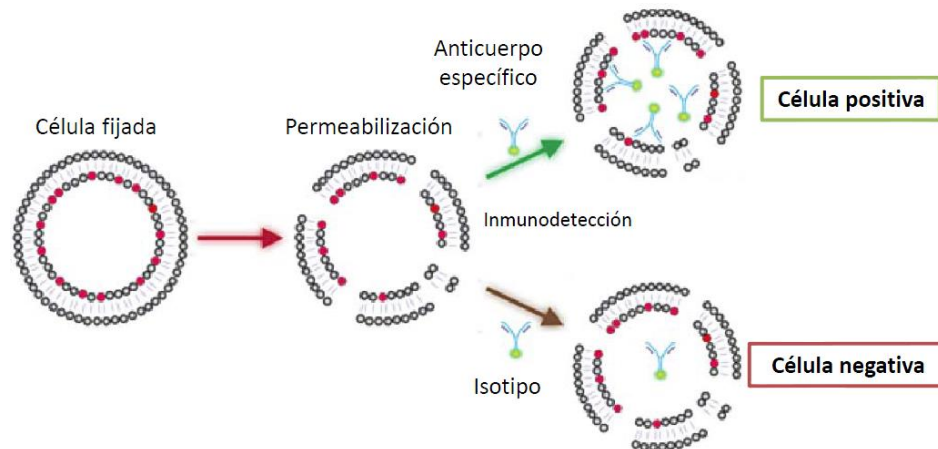


Fig.2.12. Permeabilización de una célula.

3. Bloqueo

1. Su función es impedir interacciones inespecíficas de los anticuerpos con el material biológico a analizar y así reducir la marcación inespecífica.
2. En general, se utilizan soluciones proteicas concentradas (Generalmente Albúmina bovina sérica o gelatina de pescado).
3. El anticuerpo primario debe competir con la proteína bloqueante para unirá su epítipo y así detectar la estructura de interés.
4. Se reduce la unión inespecífica del anticuerpo por epítipes no específicos.

4. Inmunodetección

1. Los anticuerpos son proteínas que tienen la capacidad reconocer específicamente y unirse con alta afinidad a otras moléculas (antígenos).
2. La molécula que es reconocida por los anticuerpos se denomina antígeno. Cada antígeno tiene al menos un epítipo o región reconocida por un anticuerpo.

2.15 Microscopia CONFOCAL

Para analizar las muestras obtenidas por medio de las inmunofluorescencias, se requieren técnicas de microscopia especializadas, es por ello por lo que se utiliza microscopia CONFOCAL. En la microscopía CONFOCAL se reconocen estructuras en las que la luz emitida o reflejada por una muestra es concentrada en un solo plano focal y se superpone a toda la luz que no procede de ese plano. En un barrido puntual CONFOCAL, las lentes del microscopio enfocan el haz de luz sobre un solo punto del objeto (el punto focal). Después, el haz explora la superficie del objeto punto por punto y genera la imagen barrida. El principio básico de operación del microscopio CONFOCAL, radica en la capacidad de eliminar la luz reflejada por el objeto de los planos fuera de foco, logrando así, mejorar la relación señal/ruido (S/N) de la imagen. Se ilumina cierta área de la muestra y con la ayuda de un diafragma o apertura, sólo se captura el haz de luz reflejado que proviene del plano focal del objetivo, eliminándose los haces procedentes de los planos ya sean superiores o inferiores. Así pues, el microscopio se basa en eliminar el “velo” o “sombras”, que generan las regiones que se encuentran fuera del plano de foco. Debido a que la cantidad de luz que incide sobre la muestra es muy pequeña, es necesario utilizar fuentes de iluminación con mucha energía, es por eso que la fuente de luz que se utiliza es la de un láser. El haz de luz se hace pasar por un colimador e incide en un divisor de haz, para enfocarlo posteriormente sobre la muestra utilizando el objetivo del microscopio. La luz reflejada por la muestra es recolectada por el mismo objetivo y proyectada nuevamente sobre el divisor de haz, la cual es enfocada por una lente al centro de un *pinhole*, proyectándose directamente hasta el fotodetector. La luz que incide fuera del plano focal (a menor o mayor profundidad en la muestra), incidirá por delante o por detrás del *pinhole* [32].

2.16 Método de Elemento Finito

El método de elemento finito se utilizo para resolver la ecuación diferencial de la dinámica de una microburbuja en este caso, el modelo de Rayleigh-Plesset.

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 [33].

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 hipermetría. Por ende, el número de ecuaciones será proporcional al número de nodos [33].

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, discreción, 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 [33].

2.17 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.

2.17.1 Módulo Acústica

El Módulo acústica es un complemento del software COMSOL Multiphysics® que proporciona herramientas para modelar acústica y vibraciones para aplicaciones como altavoces, dispositivos móviles, micrófonos, silenciadores, sensores, sonar y medidores de flujo. Puede usar las funciones especializadas para visualizar campos acústicos y crear prototipos virtuales de dispositivos o componentes.

Para estudios más detallados, la acústica puede combinarse con otros efectos físicos, como la mecánica estructural, la piezoelectricidad y el flujo de fluidos. El COMSOL® software contiene acoplamientos multifísicos para que pueda evaluar el desempeño de un producto o de diseño en un entorno que es lo más cerca posible al mundo real.

El Módulo de Acústica también incluye muchas formulaciones especializadas y modelos de materiales que se pueden utilizar para áreas de aplicación específicas, como la acústica termoviscosa utilizada en transductores en miniatura y dispositivos móviles o las ecuaciones de Biot para modelar ondas poroelásticas. El entorno de multifísica se amplía aún más con varios métodos numéricos dedicados, que incluyen el método de elementos finitos (FEM), el método de elementos de contorno (BEM), el trazado de rayos y el método discontinuo de elementos finitos de Galerkin (dG-FEM).

2.17.2 Modelado basado en ecuaciones (Ecuaciones Diferenciales Ordinarias)

Para ser realmente útil para los estudios científicos y de ingeniería y la innovación, un software tiene que permitir algo más que un entorno cableado. Debería ser posible proporcionar y personalizar sus propias definiciones de modelo basadas en ecuaciones matemáticas directamente en la interfaz de usuario. El software COMSOL Multiphysics® ofrece este nivel de flexibilidad con su intérprete de ecuaciones incorporado que puede interpretar expresiones, ecuaciones y otras descripciones matemáticas sobre la marcha antes de generar el modelo

numérico. Agregar y personalizar expresiones en las interfaces físicas permite acoplarlas libremente entre sí para simular fenómenos multifísicos.

Las capacidades de personalización van más allá. Con el generador de física, también puede usar sus propias ecuaciones para crear nuevas interfaces físicas para facilitar el acceso y la manipulación cuando desee incluirlos en modelos futuros o compartirlos con colegas.

3.1 Ultrasonido Focalizado para la disrupción de la Barrera Hematoencefálica (BHE)

Desde 1994, se reporta la apertura de la barrera hematoencefálica por medio de incrementos de temperatura en un rango de 42 a 46°C, demostrando que el azul de Evans (EB) pasaba a través de la BHE, con tiempos de exposición de 15 min a 60 min [34]. Posterior a ello, en 1996, se observó en una investigación de distribución de temperatura en ratas, generado cambios histológicos con respecto a la disrupción de la BHE en consecuencia al fenómeno de la hipertermia manejada en un rango de 37 a 45°C[35]. Estos resultados fueron obtenidos como resultado de radiaciones electromagnéticas RF. A partir del siglo XXI se comenzó a estudiar los efectos de medio de contraste ultrasónicos en conjunto con el ultrasonido [36], donde se estudia la posibilidad de utilizar las microburbujas como transporte para la liberación focalizada de fármacos. En el mercado se encuentran las siguientes marcas de microburbujas como Definity®, Optison®, o SonoVue®, los cuales son administrados por vía intravenosa, pueden abrir exitosamente la BHE de manera no invasiva, local y reversiblemente [28–31], por medio de ultrasonido focalizado (FUS).

Los fenómenos que intervienen en la generación del mecanismo de FUS para generar la apertura de la BHE se desconocen en gran parte, aunque a través de ciertos parámetros como la frecuencia [41], la frecuencia de repetición del pulso [33–35] el tiempo de aplicación [32,36], el tamaño de las microburbujas [37-40], y el ancho del pulso[33-34], son factores que intervienen en la apertura en la BHE, ayudando a la comprender la dinámica de las microburbujas bajo efectos ultrasónicos. En otras investigaciones se plantea que el ultrasonido focalizado por sí solo no es lo suficientemente eficiente, ya que no se genera una permeabilidad en la membrada como lo que se logra con la misma potencia de excitación para un tratamiento que

combina las microburbujas y el FUS [50]. Además de que estas terapias pueden generar daño tisular a causa del fenómeno de la hipertermia que se presenta [51].

Como demostró “*in vivo*” el grupo de Kaul S.[52] cuando se estimula a las MB con ultrasonido a índices mecánicos elevados se puede inducir la ruptura de vasos capilares y, por tanto, haciendo posible la extravasación de glóbulos rojos y de las propias MB. El grado de ruptura y el número de capilares afectados es directamente proporcional al índice mecánico con el que se emite el US[53].

3.2 Investigaciones realizadas en LAREMUS (Laboratorio de Radiación Electromagnética y Ultrasónica)

En LAREMUS se tiene una investigación bastante sólida con respecto al ultrasonido y los fenómenos que provoca a nivel físico y a nivel biológico. En 2011, Gutiérrez Velasco M. I. [54] desarrolla un sistema de fisioterapia ultrasónica a través del modelado del calentamiento producido por el ultrasonido, además de dar bases para la fabricación de phantoms con propiedades ultrasónicas. En 2015, Martínez Valdez R. [55] desarrolla de un aplicador de potencia ultrasónica, basándose en una geometría híbrida focalizada, mejorando rendimiento energético en aplicaciones térmicas como ablación y hemostasia probadas en modelo *in vivo* y *phantom*. Posterior a ello, en 2016, Contreras Machado [3], logra la apertura de la barrera de la barrera hematoencefálica, en modelo murino, por medio de incrementos de temperatura de 8°C, sin embargo, se observaba la ablación del tejido circundante, además de que no llegaba a la *substantia nigra*. Finalmente, en 2017, Hernández Chávez D.[4] reporta la apertura de la BHE con focalización de azul de Evans en la sustancia nigra, realizando craneotomías de 1 cm², sin observar aparentemente algún cambio a nivel tejido.

Tabla.3.1. Estado del arte Ultrasonido Focalizado para la apertura de la BHE.

Año	Autor	Técnica	Características
1994	N. Ikeda[34]	RF	Aumento de temperatura de 42°C-46°C.
1996	Y. Ohmoto[35]	RF	Hipertermia de 37°C a 45°C.
2001	E.A. Hynyen[23]	US	Ultrasonido para apertura de la BHE en conejos utilizando medios de contraste ultrasónicos.
2009	K.R. Bing[41]	US	Apertura de la BHE conjunto con medios de contraste ultrasónicos.
2013	W. Lin [39]	US	Análisis de los efectos del ultrasonido.
LAREMUS			
2011	Gutiérrez Velasco M.I.[56]	US	Sistema de fisioterapia ultrasónica a través del modelado del calentamiento producido por el ultrasonido.
2015	Martínez Valdez R.[55]	US	Aplicador de potencia ultrasónica basado en una geometría híbrida focalizada
2016	Contreras Machado V.[3]	FUS	Aumentos de 8°C de temperatura para la apertura reversible de la BHE.
2017	Hernández Chávez D.[4]	FUS	Apertura reversible de la BHE con focalización de EB en la <i>sustantia nigra</i> .

4.1 Definición del problema

En la actualidad, el tratamiento de los desórdenes neuronales y trastornos neurodegenerativos son difíciles de tratar debido a la presencia de la barrera hematoencefálica, la cual con su permeabilidad evita el paso de fármacos con un peso superior a 20 ng, es por ello por lo que el departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias de CINVESTAV ha desarrollado un vector para suministrar el fármaco para el tratamiento del Parkinson. La inserción del fármaco se ha desarrollado hasta ahora por medio de sitios de inyección, que como su nombre lo indica requieren de una inyección, lo cual puede provocar daño mecánico en el cerebro, además de una nueva técnica en la cual se involucra el US utilizando craneotomías, con la cuál se focaliza el fármaco en la región de interés del cerebro a tratar; sin embargo, el uso de craneotomías supone un trabajo detallado y preciso que muchas veces no es posible obtener. Actualmente, se realizan estudios para generar apertura en la BHC de manera no invasiva y reversible para que así los fármacos actúen puntualmente en zonas específicas del cerebro.

4.2 Justificación de la tesis

Diversos estudios han demostrado que el uso de FUS, en conjunto con MCU (Medios de Contraste Ultrasónicos), 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 la zona en 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 y en forma focalizada sobre la *substantia nigra*, mediante la realización de craneotomías, sin embargo, después de realizar estudios histopatológicos, se observa que existe daño a nivel tisular.

Se ha observado que el uso de medios de contraste ultrasónicos puede ayudar a disminuir la potencia de aplicación de ultrasonido, para provocar un fenómeno físico llamado cavitación, el cual ayuda a aumentar la presión acústica en el foco del ultrasónico utilizando menos potencia, con lo cual se traduce menor incremento de temperatura, lo que en términos fisiológicos provoca menos muerte de células. 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 en cuanto a la dosificación y empleo de microburbujas. Buscando reducir la potencia de excitación, y reducir los incrementos de temperatura causados por la alta potencia.

4.3 Objetivos de la tesis

4.3.1 Objetivo general

Desarrollo de un protocolo de FUS (Ultrasonido Focalizado) combinado con microburbujas para inducir la apertura temporal de la barrera hematoencefálica y permitir la difusión de un fármaco en un modelo murino.

4.3.2 Objetivos Particulares

1. Estudio de la factibilidad del empleo de las microburbujas para evitar craneotomías.
2. Estudio en phantom del efecto de la presión y de la temperatura al protocolo de apertura de la barrera hematoencefálica desarrollado en LAREMUS, usando la inducción de microburbujas en el modelo experimental.
3. Estudio en modelo murino del efecto de las microburbujas con y sin craneotomía.
4. Estudio histopatológico del tejido cerebral afectada por el empleo del FUS.
5. Verificar la expresión de un plásmido ingresado por la BHE en combinación con microburbujas y por FUS.

CAPÍTULO 5

Método de trabajo seguido

Este proyecto de tesis plantea la aplicación de ultrasonido focalizado (FUS) para la inducir la apertura de la barrera hematoencefálica (BHE) en ratas. Para lograr lo anterior, se propone la propagación ultrasónica con el menor incremento de temperatura en la zona de la cabeza. Para evitar la absorción de energía en el cráneo se propone una craneotomía, además de una reducción de potencia con respecto a otros protocolos establecidos.

Se describe la metodología realizada durante el desarrollo de esta tesis detallando los métodos seguidos, en la Fig. 5.1 se describe el desarrollo de esta tesis. Se dividió en 4 tópicos: manejo de roedores, inducción de microburbujas, protocolo de aplicación del ultrasonido focalizado y la inmunodetección (determinación del daño en tejido del cerebro), cada una de estas partes contiene además diferentes pruebas que se tuvieron que realizar para verificar el correcto avance del proyecto tanto en modelo *in-vivo* como en phantom.

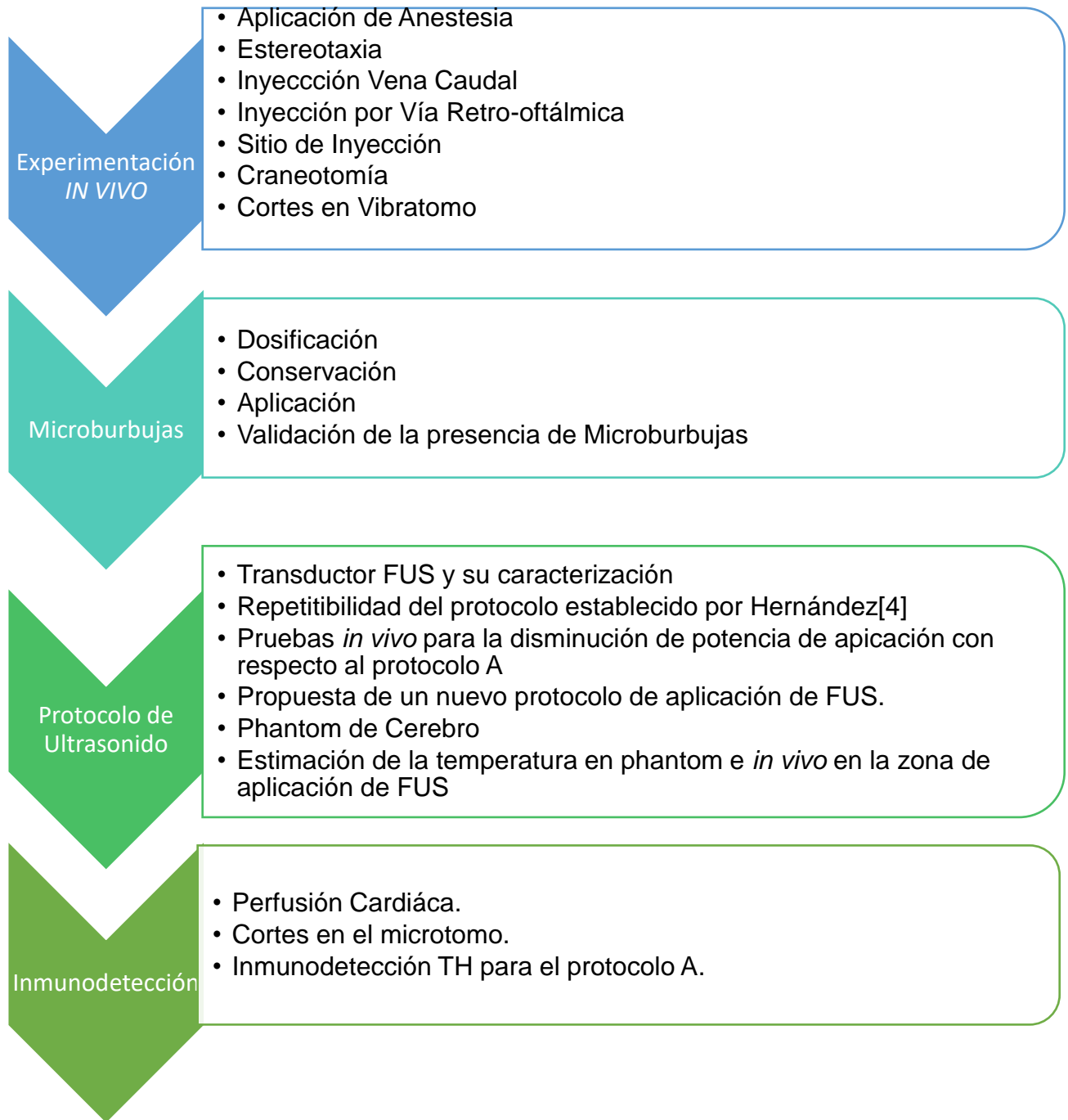


Fig.5.1. Etapas del proyecto apertura de la BHE.

5.1 Experimentación *In Vivo*

5.1.1 Aplicación de Anestesia

Para el manejo del animal, es necesario anestesiarlo previamente. Dicha práctica se lleva a cabo por medio de una mezcla de anestésico con 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). Para establecer la dosis necesaria de anestésico, se utiliza la siguiente relación 320 μL de la mezcla anteriormente mencionada por cada 230 g de peso del animal. Esta dosis se aplicará por vía intraperitoneal al roedor, y así, el roedor estará listo para someterlo a experimentación.



Fig.5.2. Aplicación de inyección intraperitoneal.

5.1.2 Estereotaxía

Para poder manejar a la muestra es necesario tener control e inmovilizar al roedor, por ello, se utiliza un estereotáxico para rata (Stoelting®, 51600), siguiendo las siguientes directrices para asegurar que el animal esté correctamente colocado.

1. La medición del tornillo de fijación tiene que tener la misma medida de cada lado.
2. El hocico de la rata debe de estar paralelo a la punta del sujetador.
3. Los dientes incisivos de la rata deben introducirse al fijador. Los postes se deben de introducir por el canal auditivo del roedor, para lograr con el

desplazamiento en el eje y del cráneo con entera libertad, y sin movimientos en el eje de las x.



Fig.5.3. Rata fija en el estereotáxico.

5.1.3 Inyección en Vena Caudal

Esta vía de aplicación se utilizó para la inserción del azul de Evans para ello se le introducen 300 μ L de colorante. La vena caudal se muestra en la Fig.5.4., y esta puede ser aplicada en las venas laterales o dorsales.

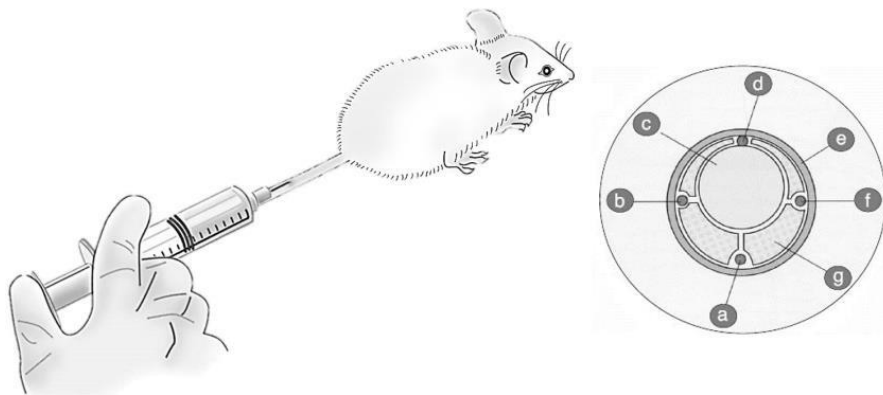


Fig.5.4. A la izquierda se aprecia la inyección de Azul de Evans vía intravenosa. La imagen de la derecha muestra un corte trasversal de la cola de una rata: artería ventral (a), venas laterales (b, f), vertebra (c), vena dorsal (d), piel (e) y tendones (g).

5.1.4 Inyección por vía retroftálmica

Esta vía de aplicación se utilizó para la aplicación de microburbujas, para lograr que éstas se focalizaran en la zona de cerebro y evitar que el azul de Evans pasará por todo el cuerpo del roedor, además de reducir el tiempo en el que estas llegaran al cerebro. Para aplicarlo es necesario que la rata se encuentre anestesiada, y una vez anestesiada se sujeta la cabeza, y con dos dedos, se estira la zona del ojo del roedor. La inyección se coloca justamente en la parte superior del lagrimal del roedor, con el bisel de la aguja mirando hacia arriba.

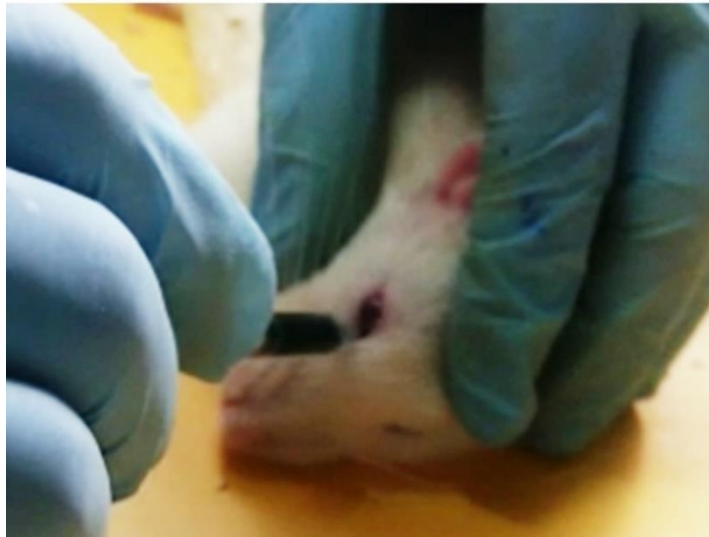


Fig.5.5. Inyección por la vía retroftálmica.

5.1.5 Ubicación del sitio de inyección

Este proceso de inyección es para la inserción de alguna sustancia, en este caso azul de Evans, para corroborar que la coordenada que se está estableciendo con ayuda de las suturas *lambda* es la correcta, y que se está focalizando el ultrasonido, en la zona de interés que es la *substantia nigra*.

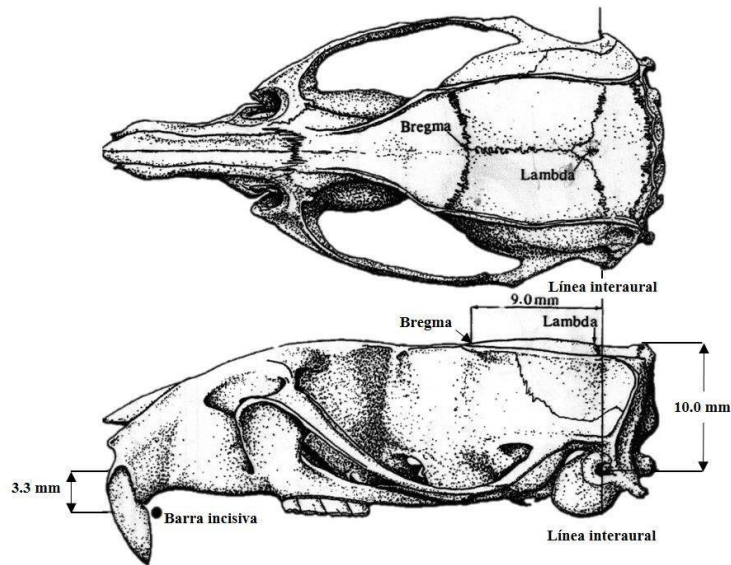


Fig.5.6. Se aprecian las suturas craneales *bregma* y *lambda*[57].

1. Se coloca como primera instancia la manguera en la aguja, la cual va a ir sujeta al estereotáxico. Esta misma aguja va a ser alimentada por medio de una bomba de inyección *Polystatic Pump BUCHLER®*.



Fig.5.7. Aguja para provocar el sitio.

2. Se valida el sistema con ayuda de una jeringa de insulina. Se le inyecta agua desionizada y desgasificada para corroborar la correcta inserción de la manguera y el paso de líquido correctamente.
3. Una vez corroborada que la vía tiene un flujo correcto se procede a colocarla en el estereotáxico, haciendo énfasis en colocar el bisel de la aguja hacia la

parte izquierda, y verificando que la aguja se encuentre colocada de forma paralela.

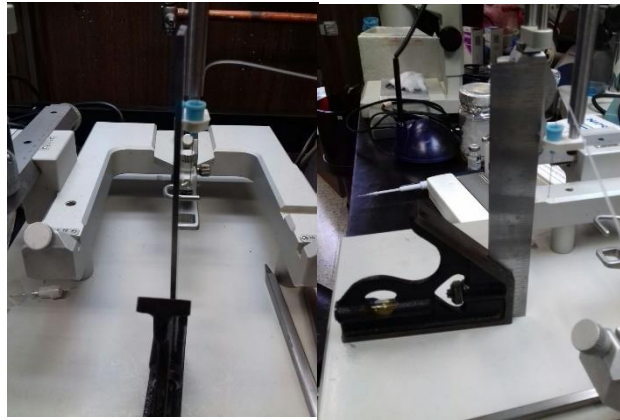


Fig. 5.1. Validación del paralelismo en la aguja.

- 4.
5. Una vez que el sistema está montado, se procede a la colocación del roedor, para verificar la posición de coordenadas del esterotáxico y evaluar si la coordenada utilizada si esta causando repercusión en la zona específica de la *sustancia nigra*.
6. En este caso, lo primero a realizar fue la ubicación de la sutura *lambda*. Una vez ubicado este punto, se realizó la adición de 2 mm en la coordenada media lateral y 2.1 mm en la coordenada de la interaural.

5.1.6 Craneotomías

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*[44].han reportado una atenuación del 18% de la presión acústica en la *substantia nigra* al pasar a través del hueso parietal de ratón. 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. Es por ello que retomando lo planteado por Hernández [4] en 2017, se sigue con la misma pauta: realizar craneotomías de 1 cm, para evitar los efectos descritos anteriormente. Esta

craneotomía fue realizada con un *mototool* de la marca Dremmel®, utilizando una broca de 1/16". La metodología empleada fue la siguiente:

1. Una vez ubicada la coordenada, con su respectiva corrección en función a *lambda*, se marca un punto y con ayuda de un lápiz y una regla se comienza a marcar el cuadro, que a su vez se barrenara siguiendo el trazo marcado anteriormente.
2. Una vez que se tiene barrenado todo el perímetro del cuadro, se levantará suavemente la tapa del cráneo y se coloca en una caja Petri con solución de cloruro de sodio al 0.9% (NaCl).
3. Se realiza la aplicación del protocolo de ultrasonido propuesto. Una vez terminado, se procede a colocar de nuevo la tapa de cráneo y con ayuda de cera de hueso se fija. Para terminar, suturando la piel del roedor y para finalizar y evitar eventuales infecciones, se coloca ungüento Terramicina®.



Fig.5.8. Craneotomía de 1 cm de ancho x 1 cm de largo.

5.1.7 Cortes en Vibratomo

Para evaluar si el ultrasonido está logrando la apertura de la BHE, es necesario realizar la disección de los cerebros, para ello se sacrifica al modelo murino, después de las

24 horas de aplicación de la terapia. La rata se sacrifica, comenzando con una dosis de 680 μ L de Pentobarbital Sódico (Pisabental®). Una vez la rata se encuentra anestesiada, se procede al sacrificio por medio de una guillotina, con la cual se separa la cabeza del cuerpo. Con ayuda de gubias y tijeras de punta fina se rompe el cráneo de la rata, evitando dañar el tejido del cerebro. Una vez teniendo el cerebro, éste se coloca en una solución de PBS, previamente enfriado a una temperatura aproximada de 4°C, para mantener la densidad del tejido y evitar que este se vuelva gelatinoso.

Se tomaron imágenes con ayuda de un microscopio (Leica®), al cual se le adaptó una cámara (Canon®) para tomar las fotografías. Se realizaron cortes al cerebro, primero se le removió la parte del cerebelo, para ayudar a la fijación del cerebro en una base magnética, con pegamento instantáneo (Kola Loka®); esta pieza forma parte del equipo vibratomo (Leica®, VT1200s), el cual se empleó para realizar cortes con un espesor de 300 μ m.

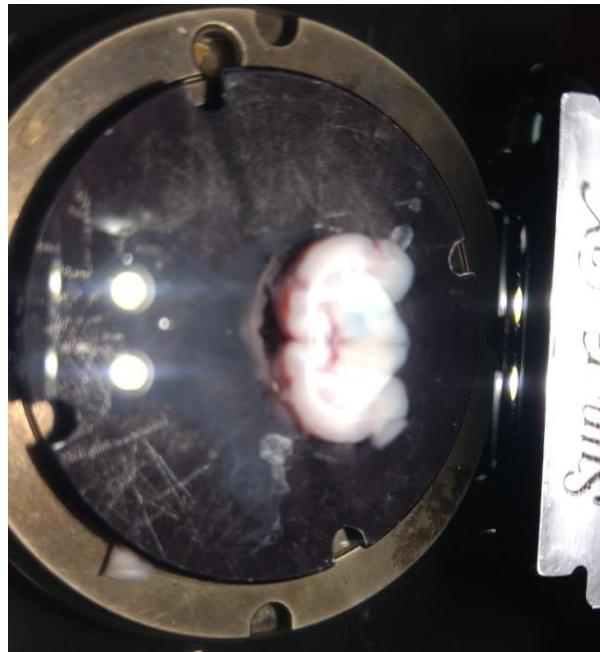


Fig.5.9. Cerebro colocado para la realización de cortes de 300 μ m de espesor.

5.2 Microburbujas

5.2.1 Dosificación

La presentación de las microburbujas de hexafluoruro de azufre SonoVue® es de un vial con 25 mg de un compuesto de hexafluoruro de azufre, y un disolvente al 0.9%. Esta dosis está diseñada para un humano de un peso promedio de 70 kg, y una vez mezclando la solución con el compuesto y agitarla vigorosamente, el tiempo de vida de las microburbujas es de 6 horas, es por ello que al tener el modelo un peso aproximado de entre 210- 250 g, y para evitar desperdiciar un vial de microburbujas, se realizó la siguiente equivalencia para dosificar las microburbujas en pequeños frascos, tratando de aproximarse a la cantidad de microburbujas que se le aplicarán por modelo.

$$\begin{array}{rcl} 70000 \text{ g (peso humano)} & - & 25 \text{ mg} \\ 210 - 250 \text{ g (peso rata)} & - & 75\mu\text{g} - 89 \mu\text{g} \end{array} \quad (20)$$

5.2.2 Conservación

La conservación de las microburbujas, una vez dosificadas, fue seguir las instrucciones indicadas por el fabricante, las cuales indican que éstas no deben de estar en ambientes cuya humedad supere el 80% a una temperatura ambiente de entre 20°C- 26°C. Es por esta razón que las microburbujas una vez dosificadas, se colocaron en un recipiente de plástico cerrado, el cuál además protege los viales de eventuales caídas y conservan la humedad.

5.2.3 Aplicación

La aplicación de las microburbujas se realizó por medio de la vía retroftálmica, esto con el objeto de que las microburbujas lleguen lo más rápido posible y con menor pérdida a la zona donde se sonificará, es decir la cabeza. Para validar los tiempos en que la sustancia llegaba a la cabeza de un roedor, se realizó en 6 modelos, la aplicación de azul de Evans, sacrificando al roedor en los siguientes lapsos de tiempo, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min y 30 min.

5.2.4 Validación de la presencia de Microburbujas

Después de la dosificación de las microburbujas se consideró necesario realizar pruebas para evaluar que las microburbujas, se formaran a partir de la disolución de cloruro de sodio NaCl, es por ello que se optó por la visualización de las microburbujas, por medio de un microscopio CONFOCAL Leica® TCS SP8, utilizando el objetivo 63x (el de mayor alcance para este tipo de microscopios). Para ello se tomó una muestra de las microburbujas con una cantidad muestra de 300 µg, disolviéndolo en 60 µL de cloruro de sodio (NaCl) al 0.9 %, de acuerdo a la relación masa-volumen indicada por el fabricante; se colocó una pequeña muestra, del tamaño aproximado de una gota, en un portaobjetos cuidadosamente manejado, y colocando un cubreobjetos en la parte superior de la muestra; para ayudar a mejorar la visibilidad de la muestra se vertió una gota de aceite especial para microscopía.

5.2.5 Estudio de la dinámica de la microburbuja por medio del modelo de Rayleigh-Plesset.

Para comprender como es que las microburbujas interactúan con la señal ultrasónica, se realizó el modelado de una microburbuja en un medio acuoso (NaCl). Para ello se utilizó el módulo de Presión Acústica Transitoria y Ecuaciones Diferenciales Ordinarias (ODE), del software COMSOL® *Multyphysics*.

5.2.5.1 Modelo de Rayleigh-Plesset

Es una ecuación diferencial ordinaria que gobierna la mecánica de una burbuja de gas inmersa en un líquido infinito. La ecuación de Rayleigh–Plesset se puede obtener de las ecuaciones de Navier-Stokes con el radio de la burbuja como un parámetro dinámico. Considerando una simetría esférica en una burbuja de radio variable en el tiempo, $R(t)$ se puede asumir que contiene vapor homogéneamente distribuido con una temperatura uniforme. En el exterior de la burbuja existe un dominio líquido de tamaño infinito con densidad constante y viscosidad dinámica siendo la temperatura y presión lo bastante alejados de la burbuja como para que ésta no afecte al líquido. Sin embargo, en las proximidades de la burbuja el fluido se ve afectado por ésta, por lo

que se pueden definir parámetros en función de la distancia radial al centro de la burbuja.

$$\frac{p_b(t) - p_\infty(t)}{\rho_L} = R \frac{d^2 R}{dt^2} + \frac{3}{2} \left(\frac{dR}{dt} \right)^2 + \frac{4\nu_L}{R} \frac{dR}{dt} + \frac{2S}{\rho_L R} \quad (21)$$

dónde:

1. $p_\infty(t)$: Presión ambiente.
2. $p_b(t)$: Presión acústica en la burbuja.
3. S : Tensión superficial.
4. ρ_L : Densidad del líquido constante.
5. ν_L : Viscosidad dinámica
6. R : Radio Inicial.

5.2.5.2 Parámetros Utilizados

Tabla.5.1. Parámetros utilizados para la simulación de la dinámica de una microburbuja.

Nombre	Expresión	Valor	Descripción
p_l	6.17[g/L]	6.17 kg/m ³	Densidad de la burbuja
S	0.0727[N/m]	0.0727 N/m	Tensión Superficial
R₀	0.0001[μm]	1E-10 m	Diámetro de la burbuja inicial
P_b	2340[Pa]	2340 Pa	Presión acústica
P_{inf}	1000[Pa]	1000 Pa	Presión de la pared de la burbuja

ν_l	1.06	1.06	Viscosidad dinámica
---------	------	------	---------------------

5.2.5.3 Geometría

Se utilizó una geometría axisimétrica 2D, en la cual se simuló el medio líquido donde se encuentra la microburbuja con su tamaño inicial.

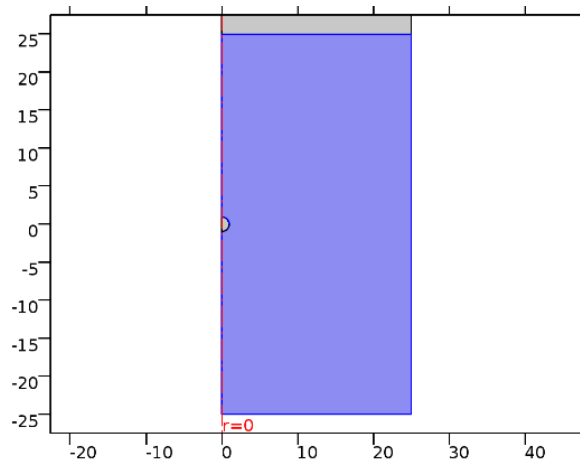


Fig.5.10. Representación en el modelo del cloruro de sodio.

En la figura 5.11 se muestra la representación gráfica de la burbuja con su talla inicial, dentro de la cual se establecieron las siguientes características acústicas: densidad de 6.17 kg/m^3 y velocidad de sonido de 146.71 m/s .

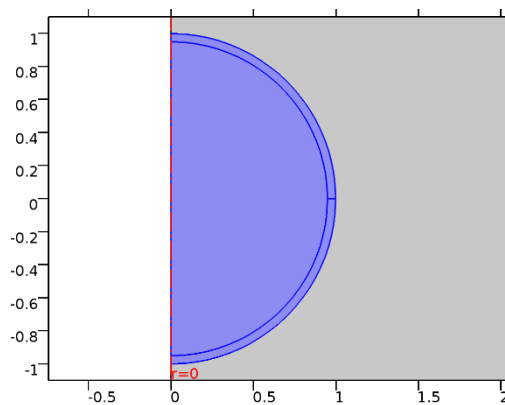


Fig.5.11. Representación gráfica de la burbuja de Hexafluoruro de Azufre.

5.2.5.4 Malla

Se utilizó un enmallado triangular con las siguientes características.

Tabla.5.2. Características del enmallado.

Descripción	Valor
Calidad mínima del elemento	0.6052
Calidad promedio de los elementos	0.9578
Elementos triangulares	2483
Elementos de borde	233
Elementos vértices	12

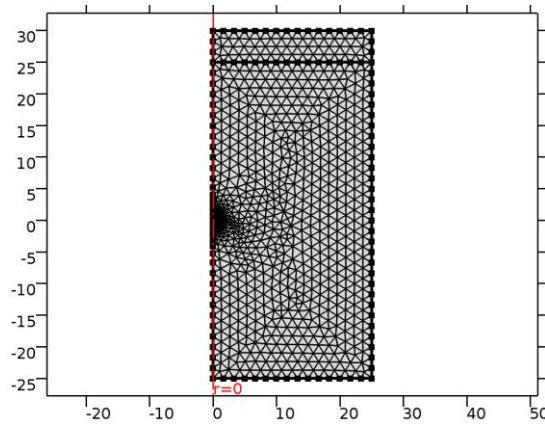


Fig.5.12. Enmallado de la geometría utilizada en el modelo.

Tabla.5.3. Características el elemento enmallado.

Descripción	Valor
Tamaño máximo del elemento	1.68
Tamaño mínimo del elemento	0.0075
Factor de curvatura	0.3
Velocidad máxima de crecimiento de elementos	1.3

5.3 Protocolo de aplicación del ultrasonido

5.3.1 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. 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 piezoeléctrico es PZT-8 (Exelis®, EC-67) [53] cuyas propiedades físicas se presentan en la tabla siguiente.

Tabla.5.4. Propiedades del material piezoeléctrico del transductor.

PZT-8 EC-67 [53]			
Propiedades Físicas	Módulo 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)	362×10^{-12}	$\frac{C}{N}$
	d_{15}	-107×10^{-12}	
	d_{31}	241×10^{-12}	
	d_{33}		
Constantes elásticas	Matriz de cumplimiento elástico (orden: $xx, yy, zz, yz,$ xz, zy)	10.8×10^{-12}	$\frac{1}{Pa}$
	S_{11}^E	-3.6×10^{-12}	
	S_{12}^E	13.7×10^{-12}	
	S_{33}^E		

La caracterización de este transductor se puede consultar en el trabajo de Contreras en 2015 [52].



Fig.5.13. Transductor FUS Onda Corporation® utilizado para la experimentación. Se observa la cara curva del transductor, el cual va a generar la focalización del ultrasonido.

5.3.2 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. 5.14. 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.

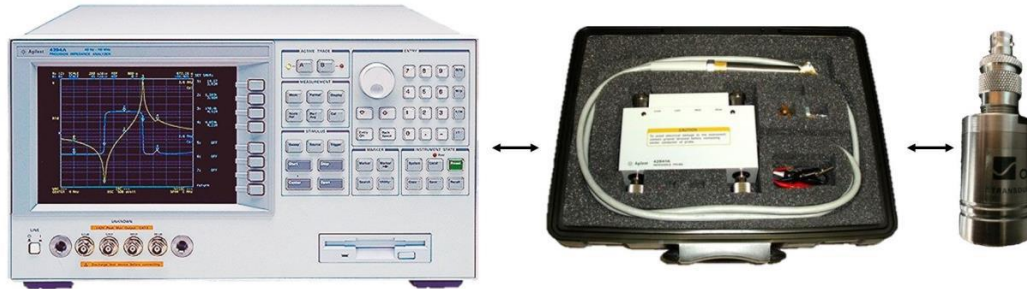


Fig.5.14. Configuración para la medición de la frecuencia de resonancia del transductor. De derecha a izquierda se presenta el analizador de impedancias, una sonda de impedancia incluida en el equipo y el transductor FUS.

5.3.3 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 poder guiar la radiación evitando pérdidas. Este cono se llega con agua desgasificada y bidestilada 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 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*. El diseño de éste cono fue realizado por Hernández [4].

5.3.4 Características del Protocolo de Aplicación

El transductor se fija en el estereotáxico, en el brazo de profundidad, con una ayuda de una pieza de plástico previamente diseñada, en el transductor se acopla el cono, el cuál este relleno de agua, que actuará como medio de propagación entre el transductor y la zona de aplicación, en este caso el cráneo de la rata. El transductor será excitado mediante una onda sinusoidal, con una frecuencia de 1.956 MHz, modulada por un pulso cuadrado de 10 Hz, y con un ciclo útil de 60% durante los primeros 10 s y 30 % durante los siguientes 50 s, teniendo una pausa de 30 s, para posteriormente reanudar la aplicación con el mismo protocolo.

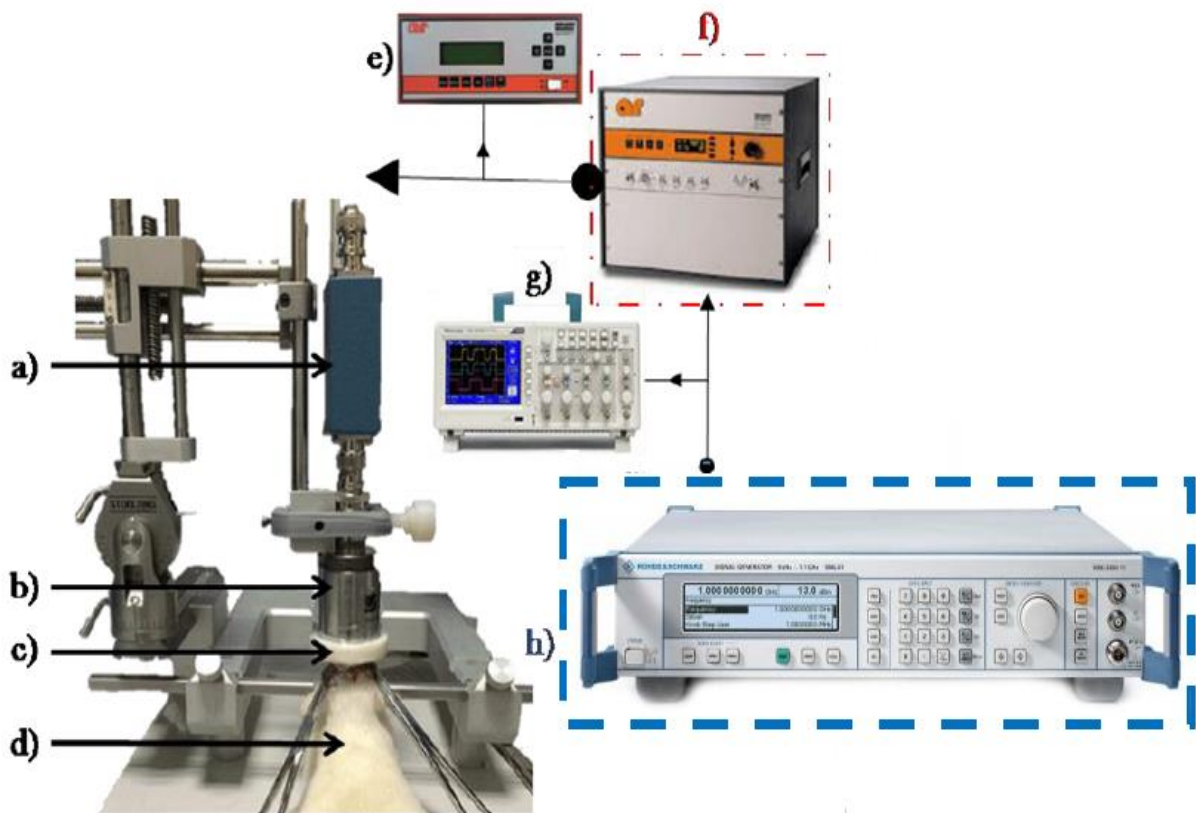


Fig.5.15. Montaje experimental. a) Acoplador de impedancias, b) transductor de ultrasonido focalizado, c) cono aplicador lleno de agua desgasificada y bidestilada, d) rata Wistar, e) medidor de potencia, f) amplificador de potencia, g) osciloscopio, h) generador de señal.

Tabla.5.5. Protocolo propuesto por Hernández [4]

Potencia Eléctrica	5 W-36.98 dB
Frecuencia Nominal	
Frecuencia de Trabajo	1.956 MHz
Ciclo Útil	60%- 10 s 30%-50 s
Tiempo del Procedimiento	2 min 30 s

Los resultados obtenidos fueron los siguientes, se realizaron cortes de 200 micras, con el vibratomo (Leica®, VT1200s) y observados por medio de un microscopio (Leica®), al cual se le adaptó una cámara (Canon®) para tomar fotografías.

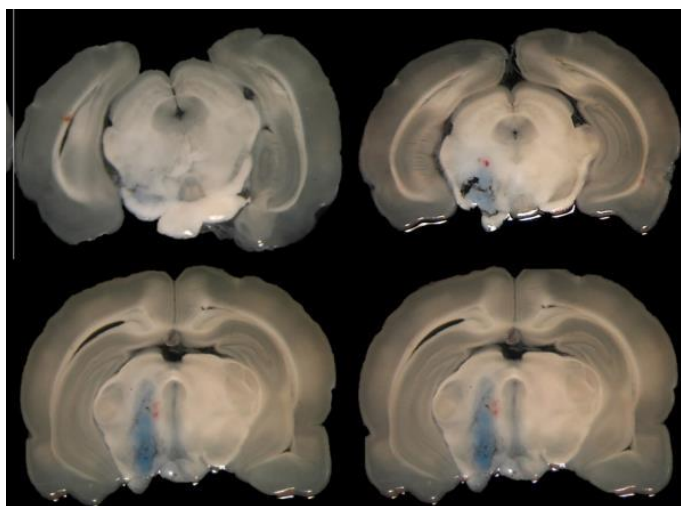


Fig.5.16. Resultados obtenidos en modelo murino con la aplicación del protocolo realizado por Hernández Chávez

Fig.5.17. 5.3.5 Estimación de la temperatura en el foco del US en la zona de interés de la BHE.

Como parte del análisis de los efectos físicos causados por el FUS, se plantea la medición de la temperatura en el foco del ultrasonido. Esto tiene la problemática de que es muy difícil asegurar que el instrumento de medición se encuentre exactamente en el foco. Para llegar a esta conclusión primero se comenzó por realizar una estimación de la temperatura en el foco, por medio de un termopar tipo “J”, y la tarjeta

de adquisición desarrollada por *National Instruments*®, la medición fue realizada en dos ratas de peso de 230 g y 220 g, respectivamente, registrando una temperatura ambiental de 21.7°C en la habitación en donde se realizó el experimento con ultrasonido.

El termopar fue insertado con una profundidad aproximada de 18 mm, que es donde se registró que se localizaba el foco de más temperatura, cuando se caracterizó el transductor.

5.3.6 Pruebas in vivo para la disminución de potencia de aplicación con respecto al protocolo A

Se realizaron pruebas para reducir la potencia conservando la craneotomía de 10 mm de aplicación de ultrasonido, por medio del uso de microburbujas de 100 µg disueltos en 100 µL de cloruro de sodio, para ello y, como primera aproximación, se partió desde una frecuencia de 5 W, 4 W, 3 W y 2 W. Se observó la apertura de la BHE, en todos los valores de potencia propuestos, excepto a los 2 W, a partir de ese resultado, se toma como referencia 3 W.

Una vez definidos los 3 W, se decide duplicar la dosis de microburbujas en 2 W, para observar si la concentración de las microburbujas juega un rol importante para inducir a apertura de la BHE; no se observa ningún cambio, por lo que la dosis se triplica y se sigue observando el mismo fenómeno, por lo cual se decide establecer el protocolo a los 3 W de potencia.

Tabla.5.6. Protocolos experimentados para la apertura de la BHE.

Protocolo	Potencia Eléctrica (W)	Frecuencia de Trabajo (Hz)	Ciclo Útil	Cantidad de Microburbujas	Tiempo del Procedimiento
A	5	1.956	60%-10 s 30%-50 s	0	2 min 30 s
B	4	1.956	60%-10 s 30%-50 s	100µg	2 min 30 s

C	3	1.956	60%-10 s 30%-50s	100µg	2 min 30 s
D	2	1.956	60%-10 s 30%-50 s	100 µg	2 min 30 s
E	2.5	1.956	60%-10 s 30%-50 s	100 µg	2 min 30 s
F	2	1.956	60%-10 s 30%-50 s	200 µg	2 min 30 s
G	2	1.956	60%-10 s 30%-50 s	300 µg	2 min 30 s
H	2.5	1.956	60%-10 s 30%-50 s	200 µg	2 min 30 s
I	2.5	1.956	60%-10 s 30%-50 s	300 µg	2 min 30 s

5.3.7 Propuesta de un nuevo protocolo de aplicación de FUS.

El protocolo que se plantea es el protocolo F.

Tabla.5.7. Protocolo establecido durante el desarrollo de esta tesis

Potencia Eléctrica	3 W
Ciclo Útil	60%-10 s
	30%-50 s
	0%-30 s
	60%-10 s
	30%-50 s
Frecuencia de Trabajo	1.956 MHz
Microburbujas	200 μ l
Tiempo del Procedimiento	2 min 30 s

5.3.8 Phantom de Cerebro

Este imitador de tejido se realizó con el objetivo de realizar pruebas con el FUS, y evaluar el incremento de temperatura y calcular la distancia focal del transductor

5.3.8.1 Materiales y equipo para la preparación del phantom

Los materiales empleados para la preparación de phantom de cerebro para una temperatura ambiente son los siguientes:

1. Gelatina de piel bovina (Gelatin from bovine skin, gel *strength* 225 g Bloom Type
2. B, Sigma Aldrich®)
3. Etilenglicol (Ethylene Glycol, anhydrous 99.8 %, Sigma Aldrich®)
4. Los equipos utilizados para la preparación del phantom son los siguientes.
5. Balanza (American Weigh Scales®, AWS-201)
6. Termoagitador (Felisa®, FE 311I)
7. Termómetro digital (Hanna®, HI 935002)

5.3.8.2 Procedimiento

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].

5.4 Inmunofluorescencia

En esta parte se describe el proceso de la inmunofluorescencia, la cual permite evaluar a nivel histopatológico el tejido, en este caso el tejido del cerebro en la zona central de la nigra. En esta parte se describen los pasos realizados una vez, se aplicó el protocolo de ultrasonido.

5.4.1 Perfusión intracardiaca

Para la perfusión intracardiaca, se abre la caja torácica de la rata, cuidando de no dañar ningún órgano interno y se separa el pericardio. Se secciona el ápice del ventrículo izquierdo (con unas tijeras de punta fina) y se introduce una cánula rígida que se conecta a la bomba peristáltica Polystatic Pump BUCHLER® produciendo así un flujo continuo de líquido a nivel de la aorta ascendente. La cánula se ajusta al ventrículo con la ayuda de unas pinzas planas. Una vez comenzada la perfusión se facilita la evacuación de fluidos de perfusión mediante un corte en la aurícula derecha. Bajo una anestesia profunda del animal, mediante la inyección intraperitoneal con pentobarbital sódico. En primer lugar, se realiza un lavado con PBC 1x. Seguidamente, se pasa la solución fijadora paraformaldehído. Los cerebros extraídos se postfijan en paraformaldehído durante 12 h a 4°C aproximadamente. Por último, se pasan a una solución de tampón sacarosa al 30% en tampón fosfato, para su crioprotección, durante 24 h o hasta que se sumergen en el fondo del recipiente

5.4.2 Cortes en el microtomo

Pasados aproximadamente 3 días, se sacan los cerebros de la solución de glucosa, y se procede a realizar los cortes, para poder realizar las inmunofluorescencias. Para ello se ocupó el siguiente material:

1. Hielo seco.
2. PBS 1x filtrado.
3. Microtomo Leica® SM2010 R.
4. Rejilla estéril.

Se coloca en la charola del micrótopo una cantidad suficiente de hielo seco, para adecuar la temperatura de la placa en donde se fijará el cerebro. Una vez que la placa está aproximadamente a 0°C, se coloca un poco de PBS 1x, y se coloca el cerebro, al cual previamente ya se le ha removido el cerebelo. Se sostiene hasta que el PBS se congele; esto ayuda a que el cerebro se fije en la placa. Posteriormente, se comienzan a realizar los cortes de 20 µ de espesor, tratando de que queden lo más simétricamente posible. Estos cortes se colocarán en una rejilla previamente estéril, la cual contiene PBS 1x (previamente filtrado), con ayuda de un pincel de cerdas finas. Una vez terminado el proceso de corte del cerebro, la rejilla con los cortes se colocará a una temperatura de 4°C.

5.4.3 Inmunodetección TH y GFAP.

El procedimiento que describe la inmunofluorescencia que se realizó para los cortes de cerebro, con el objetivo de analizar con dos tipos de marcadores diferentes, los cuales son llamados anticuerpos; uno de ellos para determinar la inflamación en el tejido y el otro de ellos para detectar las neuronas existentes en la zona de aplicación del ultrasonido.

1. Permeabilización: adicionar al pozo 200 µL de PBS tritón al 0.1% o con la cantidad que sea necesaria para cubrir por completo las muestras durante 10 min, repetir 3 veces este paso

2. Bloqueo de sitios inespecíficos: adicionar 200 μ L de una solución constituida por el 10% de suero de caballo y el resto de PBS Tritan al 0.1% a temperatura ambiente.
3. Lavar con PBS- tritón 0.05%, 3 veces por 5 min cada muestra.
4. Incubación con anticuerpo primario, para ello se realizará una mezcla que contenga:
 1. 1.5% de suero de caballo (preferentemente el suero deberá ser de la especie en la que está hecho el anticuerpo secundario)
 2. Dilución del anticuerpo contra TH que es 1×1000 el resto debe de ser de PBS-triton al 0.1%.

Incubar a 4°C, durante toda la noche en agitación constante, si se desea procesar al día siguiente con tal técnica. De lo contrario, la incubación deberá durar 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante.

5. Lavar 5 veces con PBS tritón 0.05% por 10 min.
6. Incubación con anticuerpos secundarios para ello se realizará una mezcla que contenga.
 1. 1.5% de suero de caballo con BSA o leche
 2. Dilución del Anticuerpo secundario correspondiente
 3. El resto debe ser de PBS-triton al 0.1%
7. Lavar 3 veces durante 10 min en PBS 1x durante 10 min.

Nota: Si se desea contrateñir con HO esscent, solo es necesario lavar 1 vez con PBS 1x durante 10 min.

Contratinción

8. Teñir inmediatamente por 5 min con una solución 1 μM de Hoechst en PBS triton 0.05%

6.1 Reproducibilidad Protocolo de Chávez[4]

Tabla.6.1. Protocolo propuesto por Chávez [4]

Potencia Eléctrica	5 W-36.98 dB
Frecuencia de Trabajo	1.956 MHz
Ciclo Útil	60%- 10 s 30%-50 s
Tiempo del Procedimiento	2 min 30 s

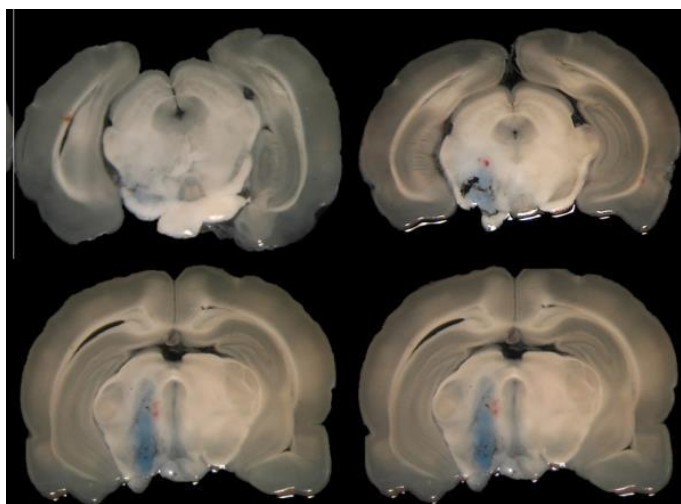


Fig.6.1. Resultados obtenidos en modelo murino con la aplicación del protocolo realizado por Hernández Chávez [4]

6.1.1 Inmunodetección Protocolo A

Se presentan los resultados obtenidos a partir de las inmunofluorescencias realizadas con anticuerpos TH. El anticuerpo TH ayuda a visualizar las neuronas en el tejido, las cuales se observan en las siguientes figuras, en color rojo. El color verde es la respuesta emitida por el anticuerpo GFAP ante inflamación en el tejido.

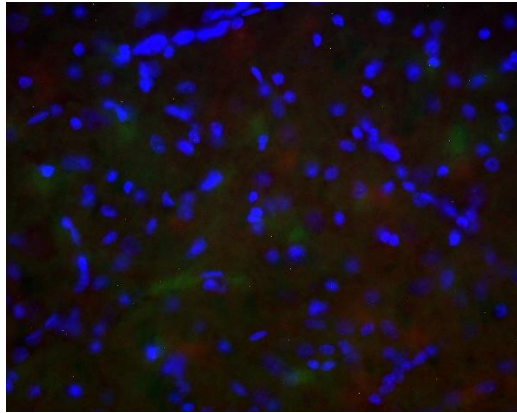


Fig.6.2. Visualización de la expresión del anticuerpo TH y GFAP en cerebro de roedor en el hemisferio izquierdo (Hemisferio de aplicación ultrasónica) después de 24 horas de aplicación de la terapia de ultrasonido con una amplificación de 40x.

En la Fig. 6.2 se puede observar la disminución de neuronas, además de que se observa reacción inflamatoria en el cerebro. Además, en la Fig. 6.3 se observa también daño en la contraparte del cerebro (hemisferio derecho), aclarando que esa zona del cerebro no es estimulada.

En las Fig. 6.3 y 6.4 se presentan la expresión a los mismos anticuerpos de una rata control, además que cabe señalar que a nivel conducta, el animal muestra signos de pérdida de la memoria, pérdida de peso, y cambios en la conducta, tales como pelo erizado, y giros erráticos hacia la parte derecha.

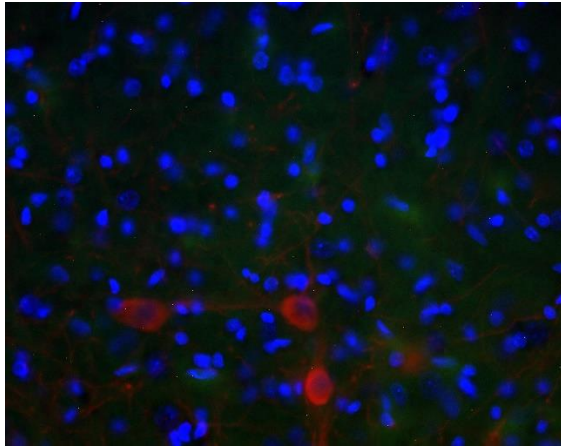


Fig.6.3. Visualización de la expresión del anticuerpo TH y GFP en cerebro de roedor en el hemisferio derecho después de 24 horas de aplicación de la terapia de ultrasonido con una amplificación de 40x.

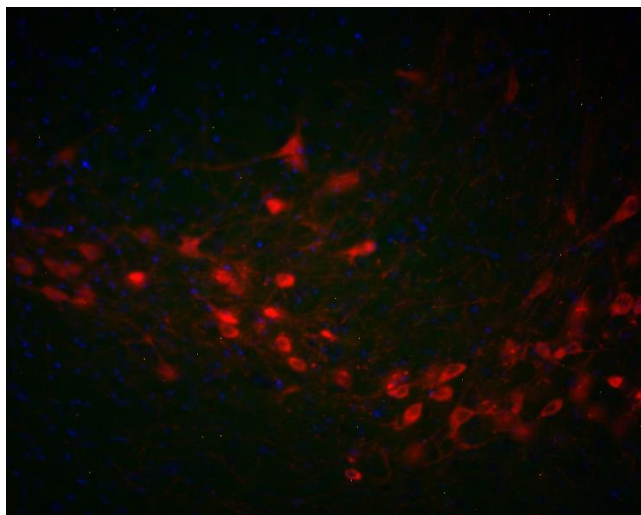


Fig.6.4. Visualización de la expresión del anticuerpo TH y GFP en rata control.

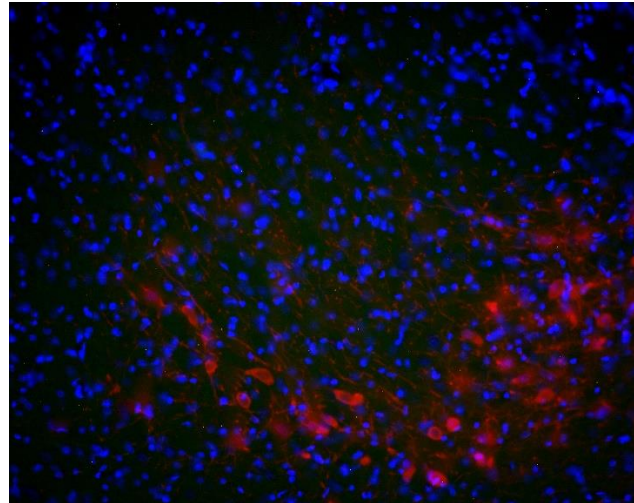


Fig.6.5. Visualización de la expresión del anticuerpo TH y GFPA en rata control.

6.1.2 Estimación de la temperatura en el foco del cerebro

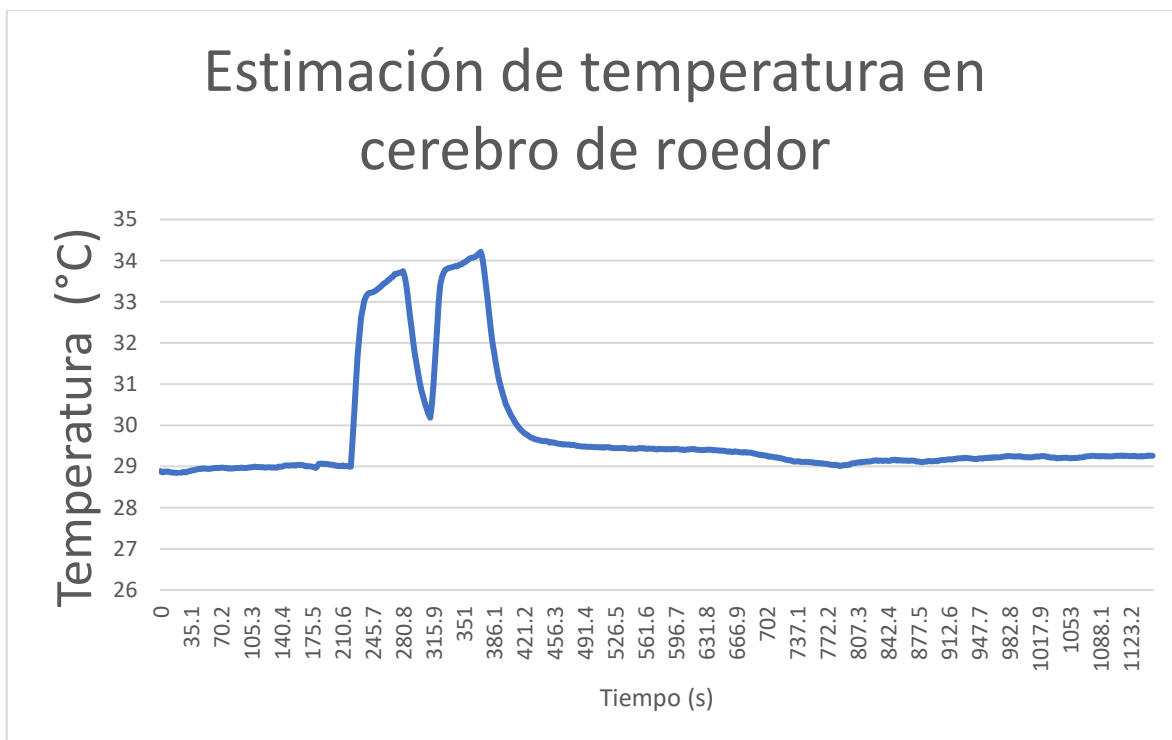


Fig.6.6. Temperatura registrada en el foco de potencia en el cerebro de una rata,

Como parte complementaria se realizó la medición de la temperatura con el prototipo de cámara infrarroja desarrollada en LAREMUS de medición termográfica IR[58], en la superficie del cerebro del roedor, antes de aplicar el protocolo de ultrasonido, en estas figuras se observa como la temperatura disminuye con respecto a la temperatura presentada a un inicio, antes de realizar la terapia en el roedor.

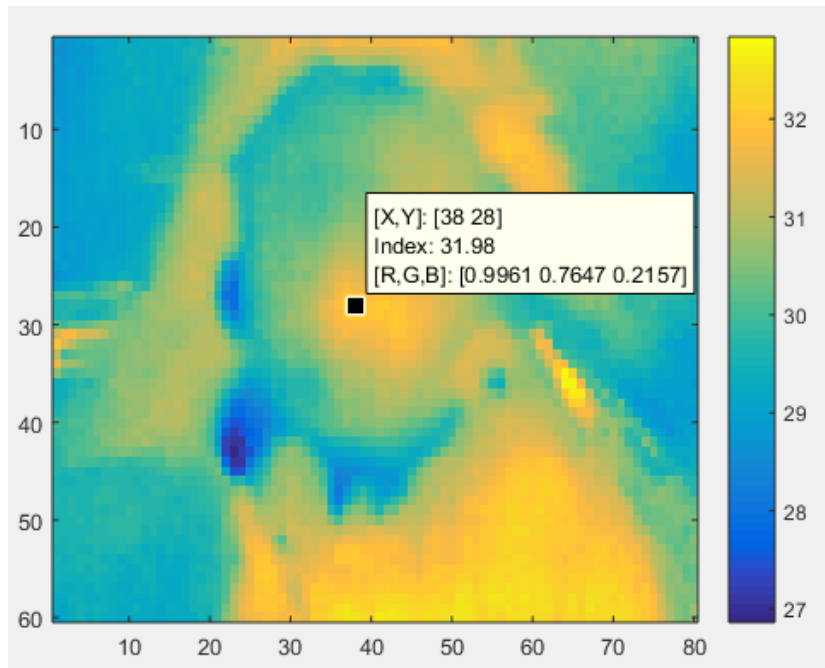


Fig.6.7. Temperatura Inicial en la superficie del cerebro de la rata antes del protocolo de FUS.

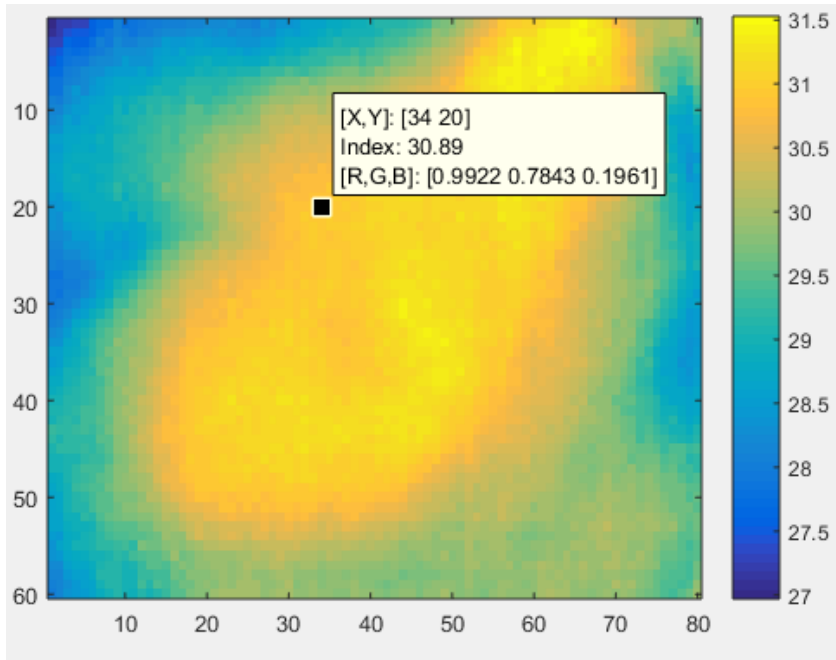


Fig.6.8. Temperatura después de la aplicación de FUS.

6.2 Validación de microburbujas

Como primera aproximación, se utilizó fluorescencia en color verde obteniendo los siguientes resultados, que se muestran en la Fig. 6.9. Como se observa se ven pequeños puntos.

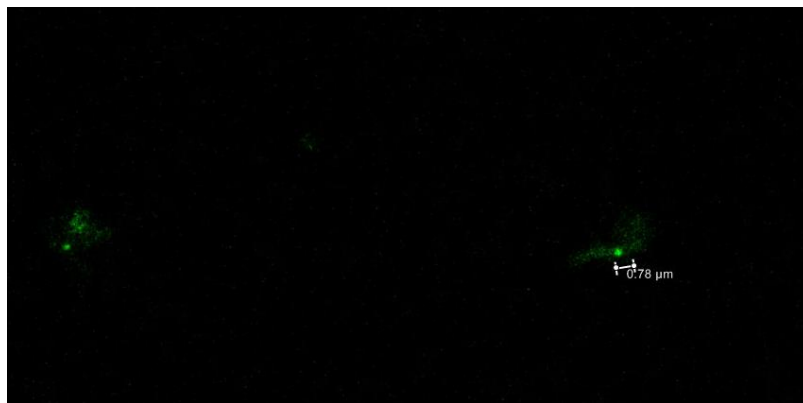


Fig.6.9. Microburbujas con fluorescencia verde.

Como segunda aproximación se realizó una fluorescencia, esta vez en color rojo, con lo cual se pudo observar la presencia de las microburbujas, con mayor facilidad, ya

que la composición, resulta ser más sensible a la longitud de onda emitida por el color rojo.

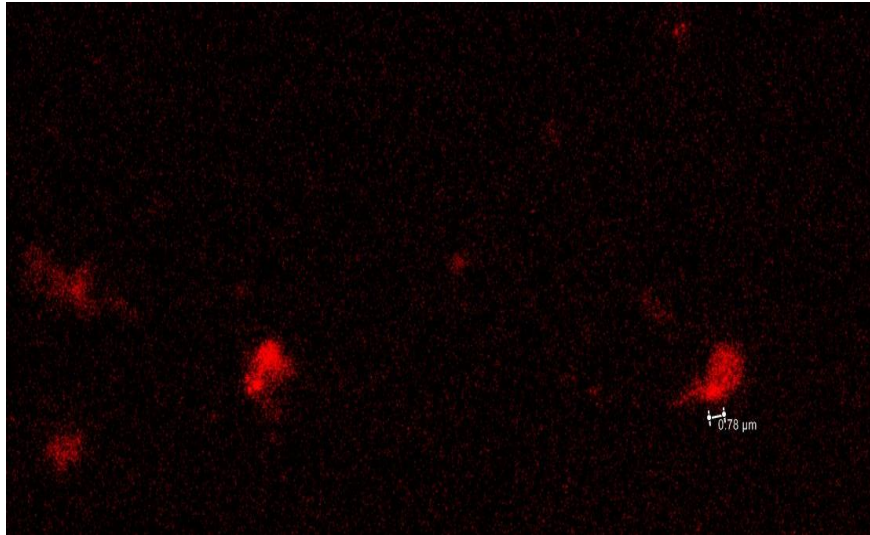


Fig.6.10. Microburbujas con fluorescencia roja.

Para finalizar el experimento, se realizó una prueba con la emisión de un haz, el cual reflejaba una imagen en escala de grises, en la cual se puede, además de la existencia de la microburbuja, la presencia de la pared de la microburbuja.

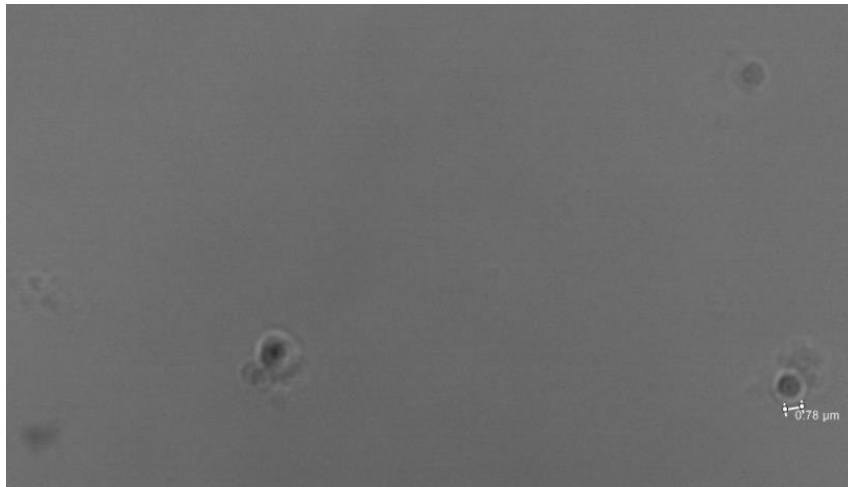


Fig.6.11. Microburbujas con fluorescencia en escala de grises.

6.3 Protocolo de FUS utilizando microburbujas

6.3.1 Aplicación de FUS a 3 W

No se inyectaron microburbujas, ni azul de Evans, ya que el objetivo era ver el efecto del ultrasonido a nivel tejido sin realizar craneotomías, para así tener una referencia en futuros experimentos.

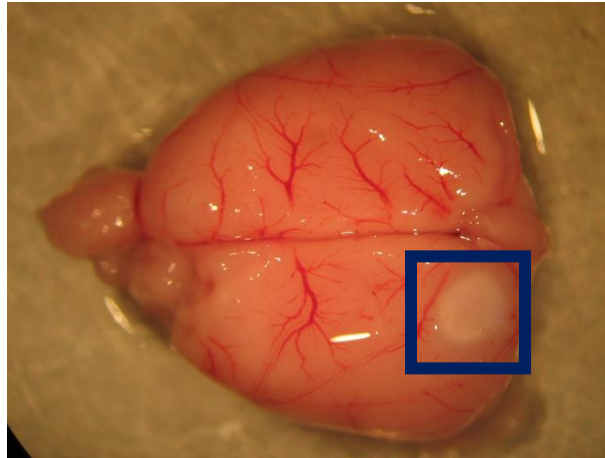


Fig.6.12. Cerebro con exposición de FUS a 3 W, no se utilizaron microburbujas.

Observaciones: se observa el tejido en la zona de aplicación de ultrasonido, claramente dañado por el incremento de temperatura. Se realizó con el fin de observar si los efectos logrados anteriormente se obtuvieron a causa de las microburbujas o se debe únicamente al calentamiento del cráneo el cual provoca el daño que se observa en la zona marcada con azul.

Se inyectaron 200 μ L de microburbujas por la vía retroftálmica y 300 μ L azul de Evans por la vena caudal para observar si las microburbujas potenciaban el efecto y lograr con esto que el azul de Evans se introdujera a la zona de interés en este caso la *sustantia nigra*.

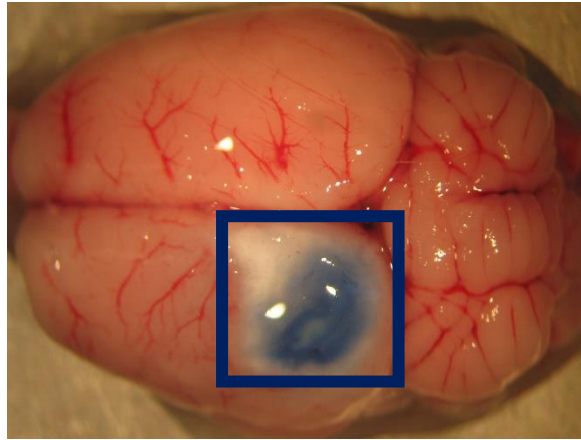


Fig.6.13. Cerebro con aplicación de FUS a 3 W con microburbujas.

Observaciones: Se observa la presencia del azul en la corteza cerebral sin embargo, debido a las altas temperaturas a la hora de realizar los cortes, no se pudo sacar una fotografía que pudiera ser de ayuda para visualizar hasta que altura se presenta el azul de Evans.

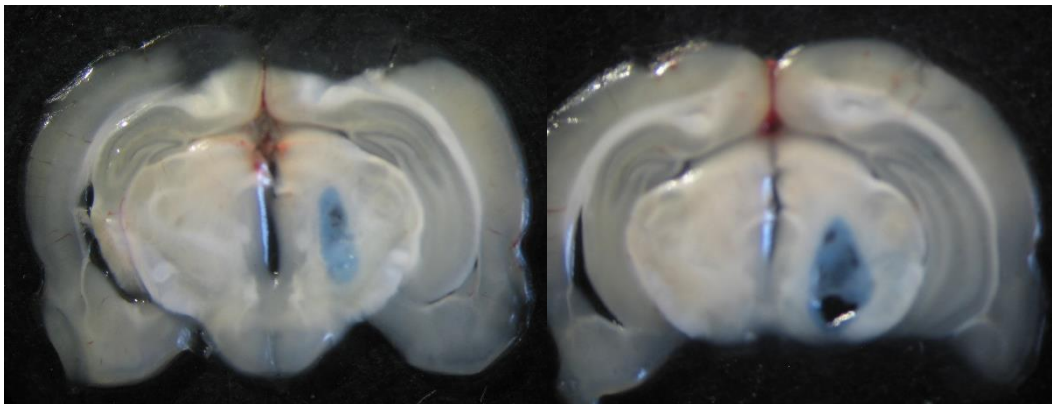


Fig.6.1. Focalización en la *sustantia nigra* del cerebro del roedor.

6.3.2 Estimación de temperatura en el foco de ultrasonido

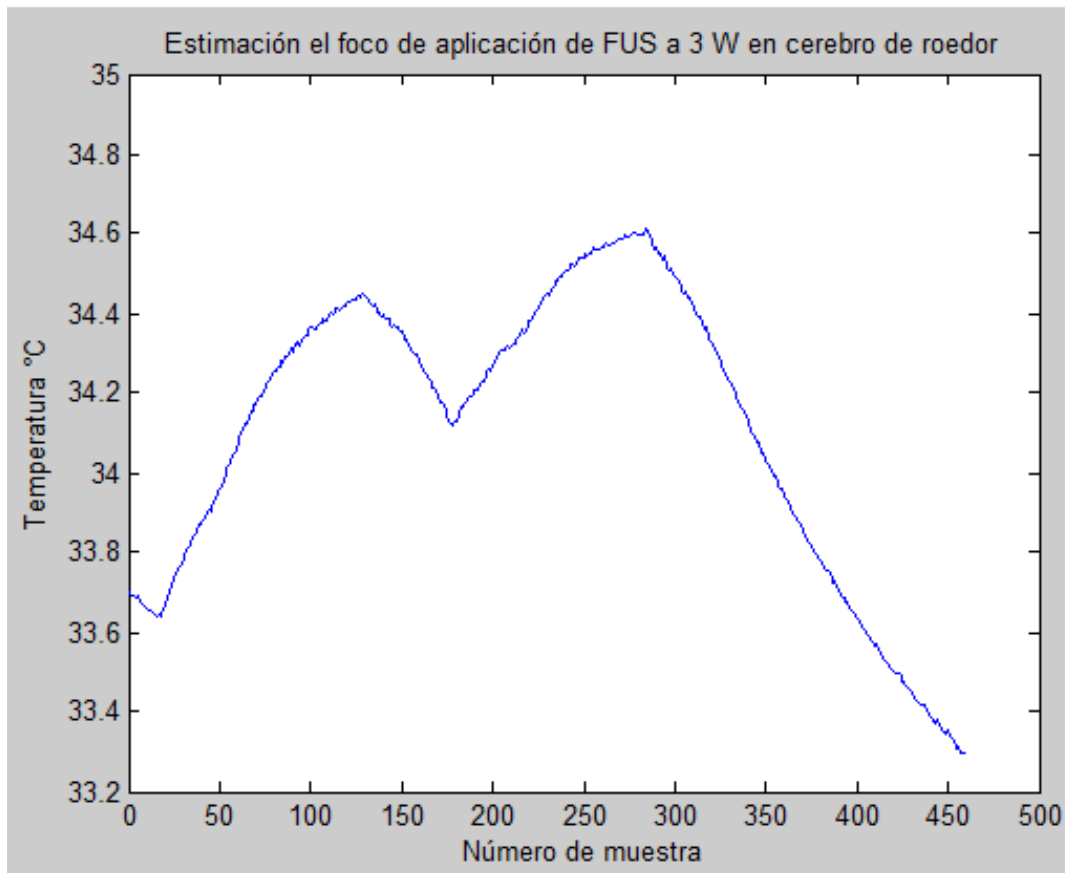


Fig.6.14. Variación de la temperatura en la zona de aplicación de FUS.

Se observa un aumento de 2.5 °C durante la aplicación del primer ciclo útil de FUS a 3 W. Posterior a ello, se observa la disminución de temperatura con una leve elevación en la segunda aplicación del ciclo útil. Una vez que se finaliza la aplicación de FUS, se observa que la temperatura disminuye en casi dos grados con respecto a la temperatura inicial.

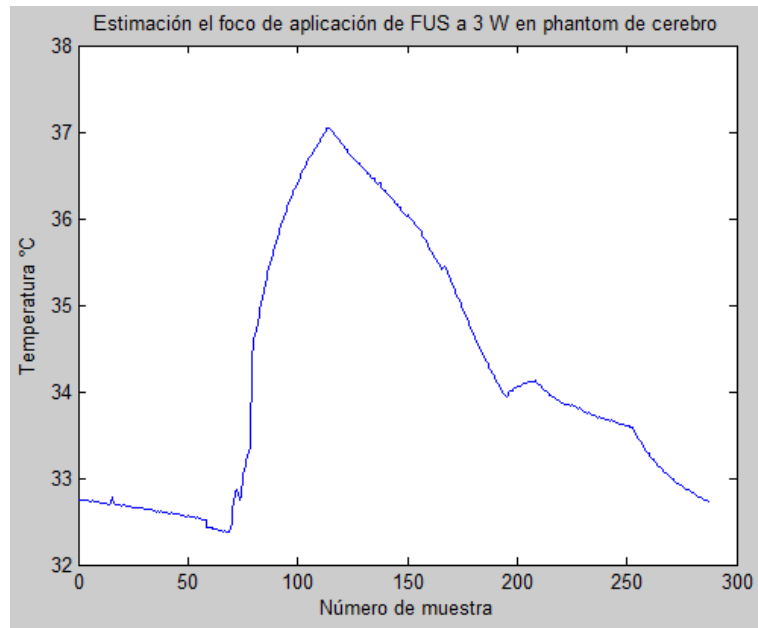


Fig.6.15. Temperatura estimada en la zona del foco de aplicación de FUS en un *phantom* de cerebro.

En *phantom* se observa un incremento de temperatura de 4°C a diferencia del experimento *in vivo*, en el que se observa un incremento de 2.5°C, esto puede deberse a las propiedades no simuladas en el *phantom*, tales como el flujo sanguíneo.

6.3.3 Tiempo de cierre de la BHE, protocolo 3 W

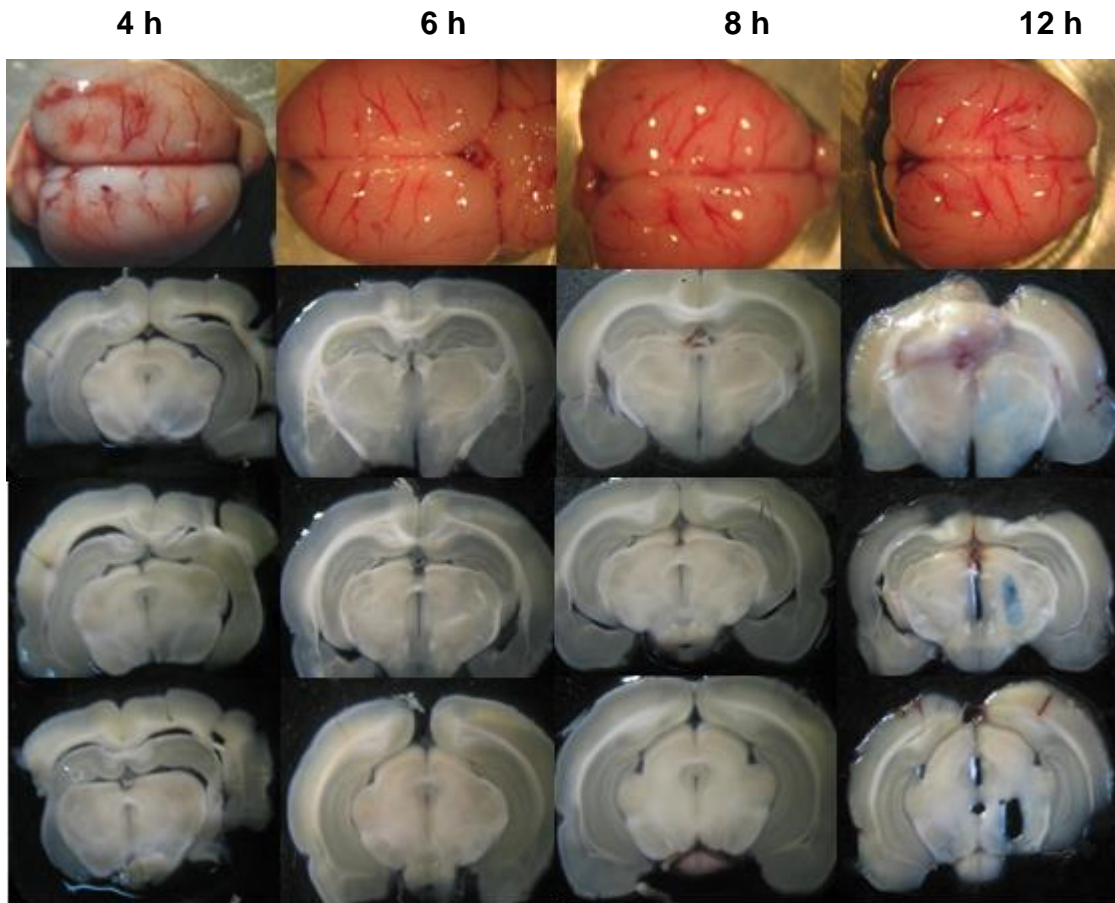


Fig.6.16. Resultado de la experimentación para corroborar la reversibilidad de la apertura de la BHE, los cortes corresponden a diferentes horarios de administración del EB, posterior a la aplicación de FUS

Otro de los objetivos de este trabajo, además de reducir la potencia de aplicación de FUS, es determinar si esta permeabilidad es reversible, por lo cual se realizaron pruebas en ratas, estableciendo un periodo de tiempo posterior a la aplicación de FUS, para la inserción de azul de Evans. En la Figura 46, se observan los resultados obtenidos. Se comenzó con un periodo de tiempo de 12 h, en donde se observa que ya no hay presencia de EB, lo cual indica que la BHE se ha cerrado, evitando el paso de azul de Evans a la corteza cerebral. Sucede el mismo fenómeno a las 8 h y 6 h, en el cerebro de la rata en la cual el EB, fue administrado a las 4 horas de aplicación de

FUS, se observa la presencia de EB en el tejido cerebral, por lo que se puede establecer que esta permeabilidad de la BHE es reversible, ante las condiciones de este protocolo propuesto.

6.4 Modelado de la dinámica de una microburbuja

En este apartado se muestran los resultados obtenidos en los modelos en FEM. Estos modelos incluyen el patrón de campo acústico en la microburbuja, la variación de la presión acústica en la pared interna de la microburbuja y la variación del tamaño de la microburbuja con respecto al tiempo obtenida por medio del software de simulación de COMSOL *Multiphysics*®.

6.4.1 Presión Acústica (Frecuencia)

Para observar el efecto que tienen las microburbujas bajo el ultrasonido, bajo las condiciones explicadas en 5.2.6.2, se observa que el campo acústico en la zona cercana al transductor es considerablemente más alto, con respecto a la parte más alejada del transductor, el campo generado varía considerablemente con respecto del tiempo.

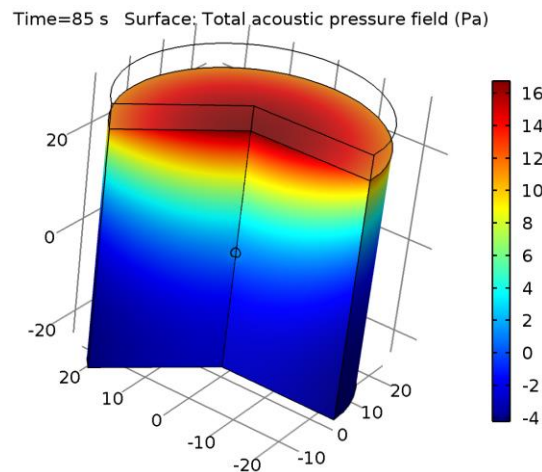


Fig.6.17. Variación del campo de presión acústica a los 85 s.

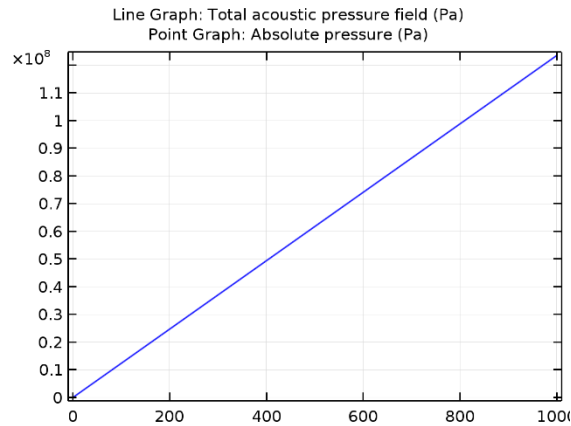


Fig.6.18. Variación del campo de presión acústica con respecto al tiempo. Eje x: tiempo (s), eje y Presión acústica (Pa)

Un parámetro importante a conocer, para poder realizar la simulación con el modelo de Rayleigh-Plesset, fue la presión de la pared interna de la microburbuja, ya que como se observa en la ecuación planteada en 5.2.6.1, es un parámetro que va a variar con respecto del tiempo. En este caso se tuvieron que hacer dos estudios por separado, el primero para obtener este valor y el campo acústico generado, y el segundo estudio, para obtener la variación con respecto del tiempo de la microburbuja.

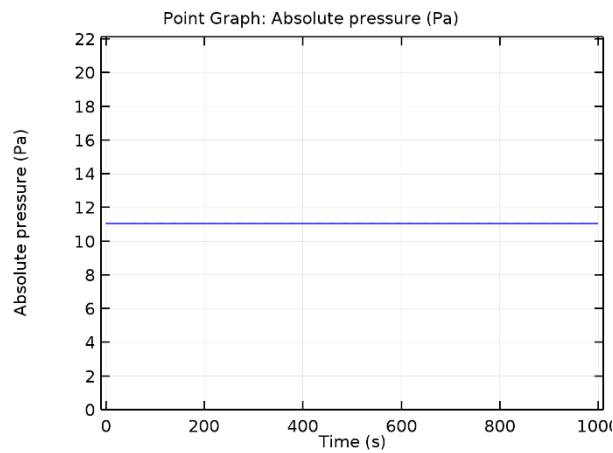


Fig.6.19. Presión Acústica en la pared interna de la burbuja.

En la figura 44 se observa el comportamiento de la microburbuja con respecto al tiempo. El comportamiento es similar al esperado, más sin embargo, se observa al

principio que la microburbuja toma un valor negativo, el cuál no se asemeja a lo esperado. Además , debido a limitaciones en cuanto al programa, no se puede delimitar la talla de 12 μm , que según el fabricante es el tamaño máximo, que ésta puede alcanzar.

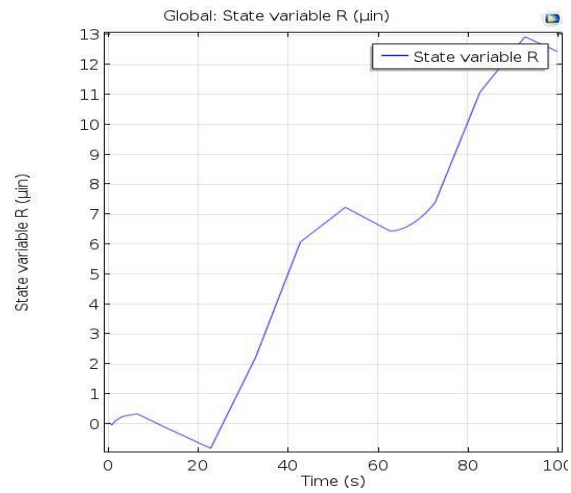


Fig.6.20. Variación del tamaño de la burbuja a una frecuencia de excitación de 1.956 MHz.

7.1 Conclusión

El objetivo general del desarrollo de esta tesis es proponer un protocolo de FUS (Ultrasonido Focalizado) combinado con material de contraste (microburbujas) en el torrente sanguíneo, para inducir la apertura temporal de la barrera hematoencefálica y permitir la difusión de un fármaco en un modelo murino, intentando llevar la energía aplicada a valores mínimos con la idea de minimizar el daño a zonas cercanas a la BHE (Barrera hematoencefálica). Luego de reproducir trabajos experimentales anteriores de apertura de la BHE, procedimos a experimentar induciendo el material de contraste (microburbujas) en el torrente sanguíneo y aplicando protocolos de aplicación ya probados en la apertura de la BHE. Los parámetros de los últimos experimentos realizados y con los cuales se caracterizó el protocolo, son los siguientes resultados obtenidos: Frecuencia de trabajo del transductor es de 1.956 MHz, 3 W de potencia y un ciclo útil de 60 % durante los primeros 10 s, 30%, durante los siguientes 50 s, se pausa durante 30 s la emisión de ondas ultrasónicas, posteriormente se vuelve a aplicar la misma secuencia de FUS, con lo que el procedimiento dura 2 min con 30 s. Se estimó una elevación de temperatura en el foco de 2⁰C y un tiempo aproximado de apertura de la BHE de 4 h. Se tiene pendiente el análisis histológico del tejido cerebral del modelo murino, para determinar el grado de daño de tejido por el calentamiento; tenemos confianza en que sea mínimo y así nos permita asegurar que el protocolo de aplicación del FUS en la apertura de la BHE con un nivel mínimo de daño.

El proceso experimental con sus resultados, lo detallo en los siguientes pasos.

1. **Caracterización del protocolo de aplicación establecido por Hernández Chávez en 2017**[4] para conocer los efectos térmicos y fisiológicos que provoca el ultrasonido focalizado en el tejido cerebral. Este objetivo se cumplió ya que se analizaron los efectos histopatológicos causados por el efecto de ultrasonido,

en el que se puede concluir degradación de las células dopaminérgica, ante un análisis del anticuerpo TH (Tirosina e Hidroxilasa), e inflamación ante el anticuerpo GFAP el cuál, ayuda a la visualización de inflamación en el tejido, además de obtener un aumento de temperatura de 6°C, durante la aplicación del protocolo de FUS anteriormente propuesto.

2. **Validación de la presencia de microburbujas, para su uso en modelo murino.** Este objetivo se cumplió, se verifico la presencia de microburbujas, una vez que éstas fueron dosificadas, y haber estado expuestas durante un periodo corto al medio ambiente. La verificación de la existencia se realizó con ayuda de microscopia CONFOCAL.
3. **Propuesta de un protocolo de aplicación de FUS en conjunto con microburbujas.** Este objetivo se satisface con la propuesta de un nuevo protocolo de aplicación con una frecuencia de excitación para el transductor de 1.956 MHz, 3 W de potencia y un ciclo útil de 60 % durante los primeros 10 s, 30%, durante los siguientes 50 s, se pausa durante 30 s la emisión de ondas ultrasónicas, posteriormente se vuelve a aplicar la misma secuencia de FUS, con lo que el procedimiento dura 2 min con 30 s.
4. **Caracterización del protocolo de aplicación de FUS propuesto estableciendo el tiempo que la BHE permanece abierta y conocer el incremento de temperatura causado por el mismo.** El objetivo se satisface por lo menos para conocer el tiempo de cierre de la barrera hematoencefálica el cuál es 4 h, realizando experimentos en periodos de tiempo de 4, 6, 8 y 12 h, además para conocer el aumento de temperatura generado por efectos de la terapia de FUS, el cual es de 2°C, aproximadamente; sin embargo, no se cuenta con el estudio histopatológico, del efecto causado por el protocolo
5. **Caracterización de una microburbuja de Hexafluoruro de azufre de la marca SonoVue, por medio del método de elemento finito, bajo la interacción de ondas ultrasónicas.** Se requiere continuar trabajando en el

modelo. Como primera aproximación resulta funcional, ya que la curva que se obtiene se asemeja en forma considerable a la esperada a dinámica de la microburbuja. Sin embargo, parámetros como el tiempo y talla faltan por definirse de forma correcta, para que esto se asemeje a lo esperado según la literatura, además de parámetros como la temperatura, que deben ser considerados para así poder tener una estimación más cercana.

7.2 Perspectivas y Trabajo a Futuro

El desarrollo e investigación de este trabajo, nos invita a continuar por este camino, de trabajo interdisciplinario, ya que se obtuvieron avances considerables sobre las técnicas a emplear para establecer un protocolo de ultrasonido focalizado en el que la aplicación de craneotomías ya no sea utilizada. Para esto es necesario hacer hincapié en lo siguiente.

1. **Modelos Computacionales:** Establecer otra ecuación para definir el comportamiento de la microburbuja, ya que el modelo actual obvia parámetros muy importantes tales como la temperatura. Además, en un medio real, no únicamente se cuenta con una microburbuja, son muchas de ellas, por lo que es necesario evaluar el comportamiento en conjunto de estas para así establecer parámetros acústicos que se acerquen más a la realidad.
 1. Trabajar en las condiciones de frontera del modelo, para así lograr observar el comportamiento lo más acercado a la realidad de la microburbuja.
 2. Establecer las condiciones reales, tales como el medio de las microburbujas, el cuál es una combinación de Cloruro de sodio y sangre.
2. **Phantoms:** Establecer un phantom de cerebro, el cuál sea capaz de resistir a temperaturas similares al entorno de aplicación además del diseño de un 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.

3. **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 combinados con la propuesta de otro transductor podría reducir daños colaterales.
4. **Inmunofluorescencia:** Realizar los estudios histopatológicos del protocolo propuesto, para así establecer el daño a nivel fisiológico de la estructura que se ve afectada por los efectos del ultrasonido.
5. **Caracterización de las microburbujas:** Conocer más a detalle el fenómeno de la cavitación y lograr cuantificar su efecto, ya sea bien, por medio de mediciones por medio de láseres y lentes ópticas, o la implementación de otro medio.

APENDICES

PRODUCTOS OBTENIDOS DE LA TESIS



2018 GLOBAL MEDICAL ENGINEERING PHYSICS EXCHANGES/PAN AMERICAN HEALTH CARE EXCHANGES (GMEPE / PAHCE)

Measurement of Ultrasound Speed and Attenuation Coefficient of Brain Phantom using Pulse Echo and Through Transmission Method.

C. J. Reyes Hernández¹, L. Lejja Salas¹, A. Vera Hernández¹

¹Department of Electrical Engineering/Bioelectronics, CINVESTAV-IPN, Mexico D.F., Mexico

Email: claudiaj.reyes@cinvestav.mx; lejja@cinvestav.mx; arvera@cinvestav.mx

Abstract — This paper presents the fabrication and characterization of ultrasound brain phantom, which was characterized with 3.5 MHz transducer. Etylenglicol and bovine gelatin was used in the fabrication. The study focuses in the measurement of the speed of sound and attenuation coefficient in the tissue by using the pulse-echo and transmission methods in order to compare the results and evaluate the methods. The obtained results in this study are useful for the development of ultrasound brain phantom similar to that of the human brain.

Keywords — attenuation coefficient, brain phantom, speed of sound.

I. INTRODUCTION

In ultrasound, a phantom is important to simulate the interaction of mechanical waves with biological tissues, in this case brain. Ultrasonic attenuation and speed are useful parameters for the development of medical therapy techniques. These two parameters have been measured with different methods, being through transmission and pulse-echo the most known and standardized methods. The speed of sound is well measured by using these two methods, having a 4.43% of error between them. However, it is important to consider artifacts and other sources of error in the measurement in order to have precise results.

These techniques are well known. In pulse-echo technique, the mechanical wave travels from the transmitter transducer to a reflector with known distance and travels back to be detected with the same transducer, going twice the distance. Parallelism is needed in this technique[1]. In through transmission technique, the ultrasonic wave travels from the transmitter to the receiver transducer and ultrasonic waves are compared for acquiring the attenuation coefficient with two different reference samples, in this case water and a brain phantom [2].

Ultrasonic attenuation equation is:

$$A = A_0 e^{-\alpha x} \quad (1)$$

where A is the amplitude of the final attenuated ultrasonic signal. A_0 is the amplitude of the ultrasonic signal at $t=0$, α is the attenuation coefficient and x is the distance that travels the ultrasonic wave.

A phantom at 16% in density was fabricated to measure the acoustic properties. This phantom was made of etylenglicol and bovine gelatin[3], because of the similarity to ultrasonic characteristics of brain [4]. The purpose of this work is to compare the results for through-transmission and pulse-echo techniques.

II. METHODOLOGY

To obtain the ultrasonic measurements in the phantom two measurements were done, through-transmission and pulse-echo, with the same phantom. The purpose of such methods is to obtain a comparison between them and establish the best method for measuring acoustic phantom properties.

A. Materials

The materials used were two 3.5 MHz Panametrics®-NDT A303S transducers, thermal bath Techne TU-20D Tempunit® of 8 L capacity at 20°C, excitation pulse of 100 V, power amplifier, electronic vernier, Lecroy 6100A waveRunner 1 GHz oscilloscope, brain phantom (16% density), thermometer Hanna HI935002.

B. Brain Ultrasonic Phantom Model

A brain phantom was fabricated to perform validation of the attenuation coefficient and speed of sound in the tissue obtained in the simulation [4]. A plastic cylindrical mold of 12.3 mm was used for the fabrication of the phantom.

A phantom is a model that reproduces certain characteristics of a biological tissue made from materials that granted the physical, mechanical or chemical properties of the emulated tissue [5]. The brain phantom helps to emulate real brain acoustic characteristics for the realization of experimental validation. The materials used for the fabrication of the breast phantom, are shown in the table I.

TABLE 1
MATERIALS OF BRAIN PHANTOM

Substance	Volume
Etylenglicol	50 ml
Bovine Gelatin	8 g

TABLE 2
ACUSTICAL PROPERTIES OF BRAIN TISSUE.

Property	Value
Speed of sound	1546.3 m/s
Attenuation Coefficient	34.673 Np/m @3.5MHz

C. Through-transmission Method

This technique compares the transmitted signals through material specimens of different thicknesses [6]. It uses two immersion planar transducers, one for transmitting and one for receiving the signal (Fig. 1). The two transducers operate at the same central frequency and gain to ensure an identical response. The phantom was positioned between the two transducers and preferably beyond the far field of the transmitting transducer, where constructive interference of waves produced at the face of the transducer create a uniform front that decays smoothly with distance. The first method was made in the thermal bath at $20^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ and ambient conditions were such that temperature just varied from 16.5°C to 18.13°C with a percentage of humidity of 34%.

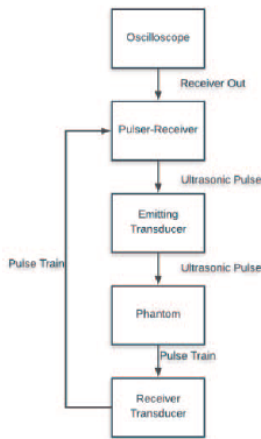


Fig. 1 Block diagram of transmission method.[7]

D. Pulse-Echo Method

In the pulse-echo technique, the same transmitter transducer was used, acting as well as a receiver. An aluminum tube with one interjection of 10 mm thick was employed as reflector. Transmitting transducer held fixed and the reflector was placed parallel to the ultrasonic source. A 100 V, 100 ns and 200 Hz pulse excited the ultrasonic transducer with an amplification

of 1. Ambient temperature measured was between 14.6°C and 17.5°C .

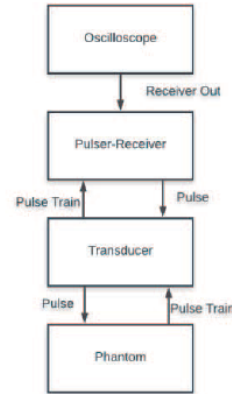


Fig. 2 Block diagram of Pulse Echo Method [7]

III. RESULTS

A. Brain Ultrasonic Model

The value obtained in density for this phantom was calculated using the following equation:

$$D = m/V, \quad (2)$$

where m is the final mass of the phantom and V de volume of the phantom. The obtained density of this phantom was 0.74 g/L.



Fig. 3 Brain phantom obtained.

B. Through-transmission Method

Measurements made by transmission method were obtained with the formula that describes the sound speed,

$$v = \frac{2 \times \text{sample length}}{\text{time flight 1} - \text{time flight 2}} \quad (3)$$

Time flight was given by the signal shown in the Fig. 2, and the sample length by the thickness of the phantom

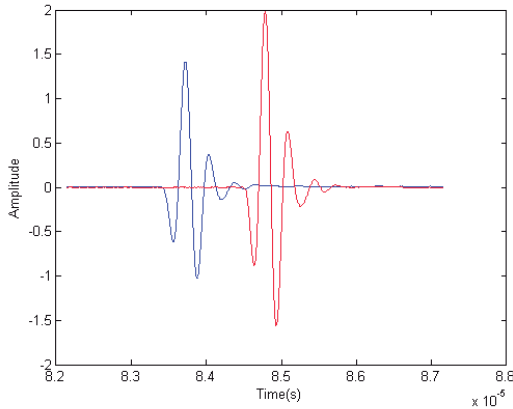


Fig. 4 Signal of through-transmission method, blue line shows the signal without sample and red line shows the signal with the brain phantom.

The obtained values for speed of sound with this method is 1478 m/s with an attenuation coefficient of 1.32 Np/m.

C. Pulse-echo Method

To obtain the values of the speed of the sound in the tissue, the time between the higher points in the first and second echo was measured and replaced in the formula that describes the speed of sound (Equation 3).

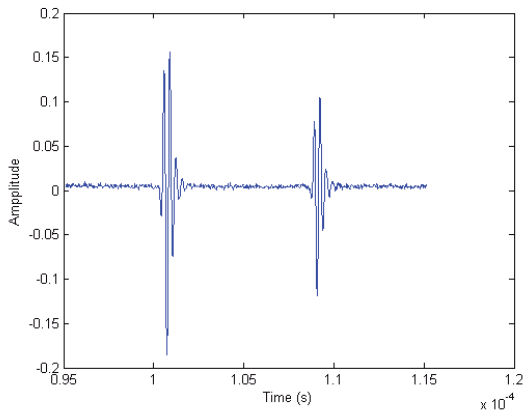


Fig. 5 Pulse-Echo graph obtained in brain phantom model.

The obtained value as speed of sound was 1481.91 m/s. For attenuation coefficient the equation 1 was taken, and the obtained value was 3.24 Np/m @ 3.5MHz.

IV. DISCUSSION

From the results we can conclude that the obtained

speed of sound is close to the values reported in literature; in the case of attenuation coefficient, we noticed that the values are different from those reported in literature. The differences could be caused for the measurement conditions like transducer, the material, temperature, characteristics of media, etc.

Nevertheless, under measurement conditions taken in this work, the speed of sound in the phantom is similar even attenuation coefficient not, as is shown in the Table 3.

TABLE 3
COMPARISON OF ACUSTICAL PROPERTIES OBTAINED WITH DIFFERENT METHODS.

Method	Attenuation Coefficient (Np/m) @3.5 MHz	Speed of sound in the tissue (m/s)
Through-Transmission	1.32 +/- 0.07	1478.0 +/- 2.27
Pulse-Echo	3.24 +/- 0.06	1481.9 +/- 1.50
Literature Value	34.67	1546.30

The accuracy percentage of this methods is shown in the Table 4, it is obtained of the literature values.

TABLE 4
ACCURACY BETWEEN PULSE-ECHO AND THROUGH TRANSMISSION.

Method	Speed of sound in the tissue (%)
Through-Transmission	95.60
Pulse-Echo	95.60

V. CONCLUSION

The proportion of reagents used for the manufacture of this phantom, still have to be worked on, since the attenuation coefficient is not the value to be approximated according to what has been reported by different authors, on the other hand the value referring to the speed of sound in tissue shows values similar to those reported by the literature.

ACKNOWLEDGMENT

A special thanks to MSc. José Hugo Zepeda Peralta for their collaboration in this work. We appreciate the funding for the development of the work presented project: CSIC-COOPB20166, ERANET-EMHE 200022 and CYTED-DITECROD-218RT0545

REFERENCES

- [1] "A Narrowband, pulse-echo technique for in vivo ultrasonic Attenuation, and Estimation", "J. Ophir, R. E. McWhirt, N.F. Maklad, P. M. Jaeger," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 32, pp. 205–212.
- [2] J. H. W. J. S. S. Lee, "Stress wave attenuation in thin structures by ultrasonic through-transmission," 1980.
- [3] J. M. Martínez and B. J. Jarosz, "3Dperfused brain phantom for interstitial ultrasound thermal therapy and imaging: Design, construction and characterization," *Phys. Med. Biol.*, vol. 60, no. 5, pp. 1879–1900, 2015.
- [4] I. Foundation, "Tissues Properties." [Online]. Available: <http://www.itis.ethz.ch/virtual-population/tissueproperties/%0Adatabase/>.
- [5] K. Zell, J. I. Sperl, M. W. Vogel, R. Niessner, and C. Haisch, "Acoustical properties of selected tissue phantom materials for ultrasound imaging," *Phys. Med. Biol.*, vol. 52, no. 20, 2007.
- [6] U. S, "Frequency dependent ultrasonic attenuation coefficient measurement.," pp. 234–238, 2008.
- [7] A. D. E. L. Ipn, M. C. José, and H. Zepeda, "Construcción de un Aditamento para medir la Velocidad ultrasónica, Atenuación y el Coeficiente de atenuación en líquidos y semisólidos ' AVAC - 1 ' NOVIEMBRE DEL 2009 Contenido," pp. 1–23, 2009.

REFERENCIAS

- [1] F. Zurita, "Las cifras del Parkinson," *Reporte Indigo*, 2017. [Online]. Available: <http://www.promocion.salud.gob.mx/cdn/?p=24859>. [Accessed: 01-Jan-2017].
- [2] G. Lugo, "EN MÉXICO, ALTA INCIDENCIA DE PARKINSON EN MENORES DE 40 AÑOS," *Gaceta UNAM*, 2015. [Online]. Available: <http://www.gaceta.unam.mx/20150416/en-mexico-alta-incidencia-de-parkinson-en-menores-de-40-anos/>.
- [3] V. H. C. Machado, "Apertura de la barrera hematoencefálica en ratas con focalizado (FUS) para la administración de fármacos experimentales," Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N., 2016.
- [4] Daniel Alberto Alberto Hernández Chávez, "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," Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N., 2017.
- [5] G. S. Kino, *Acoustic waves: devices, imaging, and analog signal processing*. Prentice Hall PTR, 1987.
- [6] M. Vázquez, A. Ramos, and L. Leija, "Sistema para la Caracterización Ultrasónica de Phantoms en Aplicaciones de Terapia," CINVESTAV-IPN, 2008.
- [7] J. Wu and W. Nyborg, *Emerging Therapeutic Ultrasound*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2006.
- [8] A. B. H. and J. Muthuswamy, "Ultrasound induced permeabilization of cell membranes as a therapy for cytotoxic neuronal edem," in *Conference Proceedings. Second Joint EMBS BMES Conference 2002 24th Annual International Conference of the Engineering in Medicine and Biology Society. Annual Fall Meeting of the Biomedical Engineering Society.*, 2002, pp. 23–26.

- [9] G. ter Haar, "Therapeutic ultrasound," *Eur. J. Ultrasound*, vol. 9, pp. 3–9, 1999.
- [10] J. Wojcik, "Conservation of energy and absorption in acoustic fields for linear and nonlinear propagation," *J. Acoust. Soc*, vol. 104, no.5, pp. 2654–2663, 1998.
- [11] NDT Resource Center, "Introduction to Ultrasound Testng." .
- [12] and J. H. H. T. J. Dubinsky, C. Cuevas, M. K. Dighe, O. Kolokythas, "High-intensity focused ultrasound: Current potential and oncologic applications," *Am. J. Roentgenol*, vol. 190, pp. 191–199, 2008.
- [13] M. I. Gutierrez, R. Martinez, A. Vera, and L. Leija, "Technology in ultrasonic hyperthermia," in *Hyperthermia: Recognition, Prevention and Treatment*, no. 2, X.-H. Gao and H.-D. Chen, Eds. NOVA Publishers, 2012, pp. 41–83.
- [14] H. T. O'Neil, "Theory of Focusing Radiators," *J Acoust Soc Am*, vol. 21, no. 5, pp. 516–526, 1949.
- [15] G. S. Kino, *Acoustic waves: devices, imaging, and analog signal processing*. Prentice Hall PTR, 1987.
- [16] D. A. Berlincourt, D. R. Curran, H. Jaffe, and W. P. Mason, "Piezoelectric and piezomagnetic materials and their function in transducer," in *Physical Acoustics*, vol. 1, New York: Academic Press, 1964.
- [17] D. A. Hutchins and G. Hayward, "The radiated field of ultrasonic transducers," in *Physical Acoustics*, vol. 19, R. N. Thurston and A. D. Pierce, Eds. Academic Press, 1990, pp. 1–80.
- [18] K. K. Shung, J. M. Cannata, and Q. F. Zhou, "Piezoelectric materials for high frequency medical imaging applications: A review," *J. Electroceramics*, vol. 19, no. 1, pp. 141–147, 2007.
- [19] W. A. Smith and B. A. Auld, "Modeling 1-3 composite piezoelectrics: thickness-mode oscillations," *Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control. IEEE Trans.*, vol. 38, no.

1, pp. 40–47, 1991.

- [20] K. K. Shung, *Diagnostic Ultrasound. Imaging and Blood Flow Measurements*. Boca Raton, Florida: Taylor & Francis Group, 2006.
- [21] and L. L. M. I. Gutierrez, R. Martinez, A. Vera, “Technology in ultrasonic hyperthermia,” in *Hyperthermia: Recognition, Prevention and Treatment*, NOVA Publishers, 2012, pp. 41–83.
- [22] X. Wu, A. E. Worthington, M. R. Gertner, J. W. Hunt, and M. D. Sherar, “Characterization of changes in therapeutic ultrasound transducer performance over time using the angular spectrum method,” *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control*, vol. 54, no. 5, pp. 1028–1035, 2007.
- [23] C. J. Diederich and K. Hynynen, “Ultrasound technology for hyperthermia,” *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 25, no. 6, pp. 871–887, 1999.
- [24] G. Loch-Neckel and J. Koepp, “La barrera hematoencefálica y la administración de medicamentos en el sistema nervioso central,” *Rev Neurol*, vol. 51, no. 3, pp. 165–174, 2010.
- [25] G. P. De Boer AG, “Drug targeting to the brain,” *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, pp. 323–55, 2007.
- [26] C. H. Deransart, C., Hellwig, B., Heupel-Reuter, M., Léger, J. F., Heck, D. & Lücking, “Single-unit analysis of substantia nigra pars reticulata neurons in freely behaving rats with genetic absence epilepsy,” *Epilepsia*, vol. 44, pp. 1513–1520, 2003AD.
- [27] B. T. Hawkins and R. D. Egleton, “Fluorescence imaging of blood-brain barrier disruption,” *J. Neurosci. Methods*, vol. 151, no. 2, pp. 262–267, 2006.
- [28] Mason W., “Physical acoustic and the properties of solids,” 1958.
- [29] T. V. Medical and P. M. Series, Eds., “Treatment Planning and Modelling in

Hyperthermia,” Postgraduate School of Medical Physics II University of Rome., 1992.

- [30] M. N. B. Field , Cafiero Franconi, “Physics and Technology of Hyperthermia,” Stanley Publishers, 1987, pp. 354–389.
- [31] F. Tranquart, J.-M. Correas, and A. Bouakaz, *Échographie De Contraste Methodologie et applications cliniques*. Paris: Springer US, 2011.
- [32] R. R. Morales, “Desarrollo de un microscopio confocal para la obtención de imágenes en 3D de dispositivos desarrollados con microlitografía,” Universidad Nacional Autónoma de México, 2009.
- [33] J. A. Vásquez, *Análisis y diseño de piezas de máquinas con CATIA V5 (Método de elementos finitos)*. Barcelona, España: MARCOMBO, 2012.
- [34] N Ikeda et al., “No Title‘Experimental study on thermal damage to dog normal brain,’ Int J Hyperthermia,” *Int J Hyperth.*, vol. 10, pp. 253–275, 1994.
- [35] Y. O. et Al., “Sequential changes in cerebral blood flow, early neuropathological consequences and blood-brain barrier disruption following radiofrequencyinduced localized hyperthermia in the rat” .,” *Int J Hyperth.*, vol. 10, pp. 253–275, 1996.
- [36] K. Masamichi, *Electromagnetics in Biology*, 1st ed. Springer, 2006.
- [37] and F. A. J. K. Hynynen, N. McDannold, N. Vykhodtseva, “Noninvasive MR imaging guided focal opening of the blood–brain barrier in rabbits,” *Radiology*, vol. 220, pp. 640–646, 2001.
- [38] and E. E. K. J. J. Choi, M. Pernot, T. R. Brown, S. A. Small, “Spatiotemporal analysis of molecular delivery through the blood–brain barrier using focused ultrasound,” *Phys. Med. Biol.*, vol. 52, pp. 5509–5530, 2007.
- [39] and W.-L. L. F.-Y. Yang, W.-M. Fu, R.-S. Yang, H.-C. Liou, K.-H. Kang,

“Quantitative evaluation of focused ultrasound with a contrast agent on blood–brain barrier disruption,” *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 33, pp. 1421–1427, 2007.

- [40] T.-H.-L. Liu, Y.-Y. Wai, W.-S. Chen, J.-C. Chen, P.-H. Hsu, X.-Y. Wu, W.-C. Huang and J.-J. W. C. Yen, “Hemorrhage detection during focused-ultrasound induced blood–brain-barrier opening by using susceptibility-weighted magnetic resonance imaging.,” *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 34, pp. 598–606, 2008.
- [41] K. R. N. K. F. Bing, G. P. Howles, Y. Qi, M. L. Palmeri, “Blood–brain barrier (BBB) disruption using a diagnostic ultrasound scanner and Definity in mice,” *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 35, no.8, pp. 1298–1308, 2009.
- [42] K. H. N. McDannold, N. Vykhodtseva, “Effects of acoustic parameters and ultrasound contrast agent dose on focused-ultrasound induced blood–brain barrier disruption,” *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 34, pp. 930–937, 2008.
- [43] E. E. K. J. J. Choi, K. Selert, Z. Gao, G. Samiotaki, B. Baseri, “Noninvasive and localized blood–brain barrier disruption using focused ultrasound can be achieved at short pulse lengths and low pulse repetition frequencies.,” *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 31, pp. 725–737, 2011.
- [44] E. E. K. J. J. Choi, K. Selert, F. Vlachos, A. Wong, “Noninvasive and localized neuronal delivery using short ultrasonic pulses and microbubbles,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 108, no. 40, pp. 16539–16544, 2011.
- [45] K. H. R. Chopra, N. Vykhodtseva, “Influence of exposure time and pressure amplitude on blood–brain-barrier opening using transcranial ultrasound exposures,” *ACS Chem Neurosci*, vol. 1, no. 5, pp. 391–398, 2010.
- [46] A. J. J. Choi, J. A. Feshitan, B. Baseri, S. Wang, Y.-S. Tung, M. A. Borden and E. E. Konofagou, “Microbubble-size dependence of focused ultrasound-induced blood–brain barrier opening in mice in vivo.,” *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 57, no. 1, pp. 145–154, 2010.

- [47] E. K. F. Vlachos, Y.-S. Tung, "Permeability dependence study of the focused ultrasound-induced blood–brain barrier opening at distinct pressures and microbubble diameters using DCE-MRI," *Magn. Reson. Med.*, vol. 66, no. 3, pp. 821–830, 2011.
- [48] E. E. K. G. Samiotaki, F. Vlachos, Y.-S. Tung, "A quantitative pressure and microbubble-size dependence study of focused ultrasound-induced blood–brain barrier opening reversibility in vivo using MRI.," *Magn. Reson. Med.*, vol. 67, no. 3, pp. 769–777, 2012.
- [49] E. E. K. Y.-S. Tung, F. Vlachos, J. A. Feshitan, M. A. Borden, "The mechanism of interaction between focused ultrasound and microbubbles in blood–brain barrier opening in mice.," *J. Acoust. Soc. Am.*, vol. 130, no. 5, pp. 3059–3067, 2011.
- [50] F. Y. and W. Lin, "The effects of ultrasound on blood-brain barrier," *J. Biosci. Med.*, vol. 2013, pp. 10–13, 2013.
- [51] K. H. N. McDannold, N. Vykhodtseva, F. A. Jolesz, "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.
- [52] K. SKYBA DM, PRICE RJ, LINKA AZ, SKALAK TC, "Direct In Vivo Visualization of Intravascular Destruction of Microbubbles by Ultrasound and its Local Effects on Tissue.," *Circ.* 1998;, vol. 98, pp. 290–293, 1998.
- [53] V. Volume and I. Ch, "Edigraphic.Com," vol. 75, 2005.
- [54] 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, 2011.
- [55] R. M. Valdez, "Estudio del ultrasonido focalizado de alta intensidad para

aplicaciones médicas extracorpóreas: modelado de propagación lineal, experimentación en phantom y validación en tejido ex vivo,” Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, 2015.

- [56] 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, Mexico City, 2011.
- [57] M. I. G. D. A. Hernández, V. H. Contreras, L. Leija, A. Vera, ““Modeling a Conical Applicator for High Intensity Focused Ultrasound with,” *13th Int. Conf. Electr. Eng. Comput. Sci. Autom. Control.*, vol. no. 1, pp. 3–6, 2016.
- [58] R. Bayareh, “Prototipo para la cuantificación térmica de zonas de la planta,” Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional., 2017.