Acústica 2020
XI Congreso Ibérico de Acústica
51º Congreso Español de Acústica
TECNIACÚSTICA 2020

HOLOGRAMAS ACÚSTICOS PARA LA APERTURA BILATERAL DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA EN RATONES IN VIVO

Sergio Jiménez-Gambín[1], Antonios N. Pouliopoulos[2], Noé Jiménez[1], José M. Benlloch[1], Elisa E. Konofagou[2], Francisco Camarena[1]

[1] Instituto de Instrumentación para Imagen Molecular, Universitat Politècnica de València - CSIC, Valencia, España
{serjigam@upv.es}
[2] Department of Biomedical Engineering, Columbia University, New York City, USA

Resumen
Los ultrasonidos focalizados con microburbujas permiten abrir la barrera hematoencefálica (BHE) de forma no invasiva, temporal y local, para el suministro de fármacos en el sistema nervioso central (SNC) en el tratamiento de enfermedades neurológicas. Sin embargo, los métodos convencionales no permiten atacar simultáneamente varios núcleos cerebrales. En este trabajo, se demuestra por primera vez la apertura simultánea de la BHE en dos núcleos del cerebro profundo en roedores con una lente acústica holográfica acoplada a un transductor monoelemento. El método es simple y económico, y permite corregir las aberraciones del cráneo y múltiples focos con una sola sonicación. La resonancia magnética muestra la extravasación de gadolinio en dos puntos esféricos, separados 3.0 ± 0.7 mm (n = 5 ratones) frente a 5.3 mm en simulación. Este trabajo demuestra la viabilidad de los hologramas acústicos para la apertura múltiple y simultánea de la BHE para la administración localizada de fármacos en el SNC.

Palabras clave: holograma acústico, apertura de la barrera hematoencefálica, ultrasonidos focalizados.

Abstract
Focused ultrasound (FUS) and microbubbles allow the blood-brain barrier (BBB) opening in a transient, local, and non-invasive manner, enabling the targeted drug delivery into the central nervous system (CNS) for the treatment of brain diseases. However, current FUS technologies do not allow the simultaneous targeting of different brain structures. In this work, we demonstrated for the first time the simultaneous BBB opening at two targets inside a murine brain using a holographic acoustic lens coupled to a single-element transducer. The approach is simple and low-cost, the skull aberrations are corrected, and one single sonication is enough to produce multiple foci. Contrast-enhanced, T1-weighted MRI scan showed gadolinium extravasation at two symmetric focal spots, separated by 3.0 ± 0.7 mm (n= 5 mice) compared to 5.3 mm in simulations. This work demonstrates the feasibility of hologram-assisted BBB opening for multiple and simultaneous targeted drug delivery in the CNS.

Keywords: acoustic hologram, blood-brain barrier opening, focused ultrasound.

PACS nº. 43.80.Sh, 43.60.Sx

1 Introducción

La baja perfusión de los fármacos terapéuticos en el sistema nervioso central (SNC) debido a la alta impermeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) es un factor limitante para el tratamiento de la mayoría de las enfermedades cerebrales. Sin embargo, los ultrasonidos focalizados (FUS) en combinación con microburbujas en el torrente sanguíneo permiten abrir la BHE de forma no invasiva, localizada y transitoria en roedores [1], [2], primates [3] y humanos [4] mostrando así una alta viabilidad para tratar estas enfermedades cerebrales.

Los métodos convencionales basados en transductores monoelemento o sistemas multielemento sí que permiten la apertura de la BHE pero no de forma simultánea en zonas distintas, por ejemplo, para el tratamiento bilateral de núcleos del cerebro profundo. Por un lado, los sistemas monoelemento en animales pequeños requieren un movimiento mecánico del transductor para la focalización múltiple [5], [6], siendo necesarias una serie de inyecciones de microburbujas ya que éstas se diluyen rápidamente en el torrente sanguíneo, por lo que el procedimiento es lento. La misma limitación se encuentra utilizando sistemas de neuronavegación en primates [3], ya que el movimiento mecánico del transductor es un factor que limita la rapidez para completar el procedimiento completo. Por otra parte, los sistemas multielemento empleados en ensayos clínicos en humanos [4] permiten controlar electrónicamente la amplitud y fase de cada elemento piezoeléctrico para dirigir el haz focalizado mientras el transductor permanece en una posición fija. Sin embargo, estos sistemas están limitados por su reducido ángulo de enfoque, su elevado coste y el requisito de monitorización por resonancia magnética (MRI).

Para superar estas limitaciones, las lentes acústicas holográficas han demostrado recientemente la generación de (1) múltiples focos simultáneamente, (2) campos acústicos cuya distribución espacial coincide con la geometría de las estructuras cerebrales, (3) haces autocurvados o (4) vórtices [7-10]. Los hologramas acústicos son la alternativa para evitar el ineficiente movimiento del transductor monoelemento convencional y, son una tecnología simple y económica frente a los costosos sistemas multielemento. Además, estas lentes son impresas en 3D y compatibles con monitorización por MRI, por lo que solo se requiere de un escaneo por MRI para identificar la alineación correcta con la cabeza del sujeto. Además, dado que estas lentes corrigen las aberraciones del cráneo, una única sonicación e inyección de microburbujas es suficiente para realizar todo el tratamiento.

El estado del arte de esta tecnología empleando lentes acústicas holográficas ha sido exitoso en experimentos dentro de tanques de agua, a través de phantoms de cráneo humano y cráneos *in vivo*, pero hasta la fecha no se ha realizado ningún ensayo *in vivo*. En este estudio, se demuestra por primera vez la viabilidad, capacidad y eficiencia de los hologramas acústicos empleando un transductor focalizado monoelemento en un ensayo *in vivo*, produciendo una apertura bilateral de la BHE en ratones.

2 Materiales y métodos

El método propuesto consiste en: (1) extraer la geometría y propiedades acústicas del cráneo a partir de imágenes de tomografía computarizada (μCT) por rayos x, e identificar la estructura cerebral objetivo mediante MRI; (2) diseñar e imprimir en 3D el cono de plástico contenedor del agua para el acoplo del transductor a la cabeza del animal; (3) obtener el frente de onda holográfico mediante simulación numérica de la propagación inversa desde las fuentes virtuales; (4) diseñar la lente a partir del conjugado complejo del campo holográfico e imprimirla mediante técnicas de estereolitografía 3D; (5) inyectar las microburbujas durante la sonicación junto con un agente de contraste MRI; (6) evaluar la apertura de la

BHE mediante la extravasación del agente de contraste. Un esquema del sistema experimental y la lente acústica holográfica (también llamado holograma acústico) construida se muestran en la Figura 1.

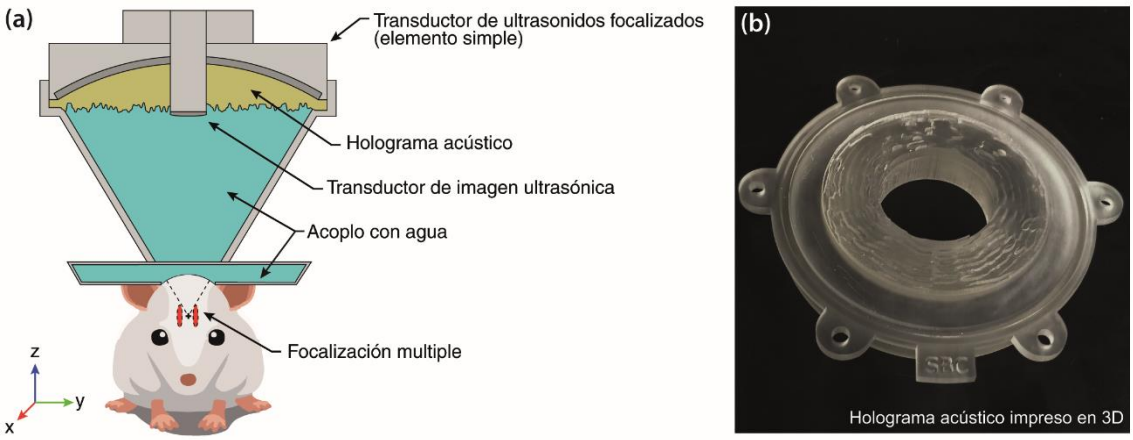


Figura 1. (a) Esquemático del sistema para el experimento *in vivo*. (b) Lente acústica holográfica impresa en 3D mediante estereolitografía en resina translúcida.

2.1 Simulación numérica

Las simulaciones numéricas se realizaron empleando el toolbox k-Wave [11] implementado en Matlab, basado en el método pseudoespectral en el dominio del tiempo y espacio-*k*. La ventaja de este modelo frente al de diferencias finitas en dominio temporal (FDTD) es que se consigue la misma precisión en resultados empleando mallados y/o muestreos de menor resolución tanto espacial como temporal [12]. La absorción de tejidos se comporta de acuerdo con una ley de potencia en frecuencia. Se empleó un paso espacial de $\Delta x = \Delta y = \Delta z = 176$ µm, que se corresponde con un muestreo de 6 puntos por longitud de onda en agua para la frecuencia de trabajo de 1.68 MHz, resultando así simulaciones de más de 300 millones de puntos de mallado, mientras que el paso temporal empleado fue de $\Delta t = 13.7$ ns, de forma que el número de Courant-Friedrichs-Lewy resultante fue de $CFL = 0.12$.

2.2 Tomografía computarizada del cráneo del roedor

Se empleó una µCT con resolución espacial isotrópica de 80 micras (remuestreada a 176 µm isotrópico para realizar la simulación). Las propiedades acústicas de densidad y velocidad de propagación longitudinal se calcularon a partir de las unidades Hounsfield tal y como se describe en las referencias [13] y [14]. La absorción se asumió homogénea [15] para simplificar el modelo, con un valor de 28.3 dB/cm a 1.68 MHz [16]. Para que el modelo numérico sea lo más parecido posible a la realidad, el cerebro también se incluyó, y su geometría se obtuvo por segmentación a partir de la µCT empleando el software ITK-SNAP [17], cuya velocidad de propagación es $c_{brain} = 1600$ m/s, una densidad de $\rho_{brain} = 1000$ kg/m^3 y una absorción de $\alpha_{brain} = 0.7$ dB/cm a 1.68 MHz [1].

2.3 Diseño y fabricación de la lente

La lente fue diseñada a partir del frente de onda complejo grabado sobre la superficie holográfica [8], generado por dos fuentes virtuales de presión omnidireccionales colocadas en las dianas acústicas en cada hemisferio del cerebro. A diferencia del transductor plano empleado en el método holográfico original [8], en este trabajo se empleó un transductor focalizado, por lo que la lente tendrá que compensar

el efecto parabólico de la focalización, además de las aberraciones debidas tanto al agujero central necesario para el transductor de imagen como al cono de plástico acoplador entre transductor y cabeza.

La información holográfica para diseñar la lente se calculó como:

$$H_{lens}(x,y) = H_T^*(x,y)\, H_F^*(x,y) \quad (1)$$

donde $H_T^*(x,y)$ es el complejo conjugado del frente de onda grabado sobre la superficie holográfica generado por la propagación inversa desde las fuentes virtuales, y $H_F^*(x,y)$ es el complejo conjugado del frente de onda grabado sobre la superficie holográfica generado por el transductor focalizado.

Por último, para calcular la altura de cada píxel o columna [8], y debido a la simplicidad de la geometría de doble foco, se simplificó el diseño ignorando la magnitud de $H_{lens}(x,y)$ y se empleó solamente la fase. Tanto la lente como el cono de acoplo diseñados fueron impresos en 3D mediante técnicas de estereolitografía con el material ClearResin (Form2, Formlabs), cuyas propiedades acústicas fueron obtenidas experimentalmente resultando una velocidad de propagación de $c_L = 2580$ m/s, una densidad de $\rho_L = 1171$ kg/m^3, y una absorción de $\alpha_L = 4.6$ dB/cm a 1.68 MHz, coincidiendo con los valores publicados en referencias previas [7], [8].

2.4 Procedimiento de apertura de la BHE

El transductor FUS monoelemento empleado fue el modelo H-204 de Sonic Concepts ($f = 1.68$ MHz, diámetro externo $OD = 84.2$ mm, diámetro interno $ID = 43.6$ mm, distancia focal $F = 61.65$ mm) montado confocalmente con un transductor de imagen (frecuencia central de 10 MHz) para localizar una rejilla metálica colocada en la sutura lamboidea, en la parte superior del cráneo. El transductor estaba acoplado a un sistema de posicionamiento 3D dirigido por ordenador (Velmex Inc., Lachine, QC, CAN), y controlado por un generador de funciones (Agilent, Palo Alto, CA, USA) y un amplificador de potencia de 50 dB (ENI Inc., Rochester, NY, USA). El transductor de imagen estaba controlado por un sistema de eco-impulso (Panametrics, Waltham, MA, USA), conectado a un digitalizador (Gage Applied Technologies, Inc., Lachine, QC, CAN) integrado en un ordenador personal (PC, Dell Inc., TX, USA). Un cono de acoplo customizado fue diseñado e impreso en 3D para fijar la lente al transductor FUS y contener el agua de acoplo.

Previamente al procedimiento de apertura de la BHE, se realizó una calibración acústica para evaluar experimentalmente la ganancia focal proporcionada por la lente sin el cráneo. Finalmente, para el ensayo de apertura de la BHE, se inyectó de forma intravenosa 1 µl/g de microburbujas Definity conjuntamente con la administración de los ultrasonidos focalizados a 1.68 MHz (400 kPa PNP, PRF: 5 Hz, longitud de pulso: 1 ms) durante 2 minutos [2], [18]. Después, se inyectó intraperitonealmente 0.2 ml del marcador gadolinio y se evaluó posteriormente la apertura *in vivo* de la BHE mediante MRI con ponderación T1. Los ratones fueron transferidos al escáner de resonancia magnética, anestesiados con un 1-2% de isoflurano, colocados en una caja específica de 3 cm y escaneados con un sistema MRI 9.4T para pequeños animales (Bruker, Billerica, MA, USA). Se adquirió un escaneo MRI 2D FLASH con ponderación T1 realzado por contraste (TR/TE: 230/3.3 ms, ángulo de giro: 70º, número de excitaciones: 18, resolución en plano: 85 µm x 85 µm, espesor de capa: 500 µm, ancho de banda en recepción: 50 kHz) durante 30-45 minutos tras la exposición por FUS, a lo largo de los planos axial y coronal de la cabeza.

3 Resultados

En primer lugar, la simulación de la distribución axial de la presión, normalizada al máximo en la región focal dentro del cerebro, incluyendo la cabeza del ratón [véase Figura 2(a,c)] y la distribución transversal [véase Figura 2(b)] muestran dos focos circulares bien distinguibles. Analizando los cortes axial y transversal [véase Figura 2(d,e), respectivamente], se consigue reconstruir la imagen acústica correspondiente a las dos fuentes virtuales con gran precisión. En lugar de generar focos elipsoidales, como ocurre convencionalmente, se observa la generación de focos quasiesféricos, cuyo tamaño es del orden de media longitud de onda. Este efecto se debe a que el holograma codifica tanto el campo acústico directo invertido temporalmente desde las fuentes virtuales como las múltiples reflexiones y la reverberación generadas por la cavidad craneal. De esta manera, el espectro angular efectivo de la propagación desde el transductor hasta las dianas acústicas se ve incrementado en comparación con el original del transductor FUS sin lente: el sistema holográfico actúa como una fuente equivalente con mucha mayor apertura. El tamaño en axial (profundidad de campo) del punto focal para el caso transcraneal es aproximadamente 0.5 mm (la longitud de onda a la frecuencia de trabajo en el cerebro es 0.95 mm), comparado con los 15 mm para el caso simulado de la calibración [véase Figura 2(d)]. Además, el ancho en transversal (ancho completo a la mitad del máximo) es aproximadamente 0.6 mm para el caso transcraneal en comparación a ≈ 1 mm para la calibración [véase Figura 2(e)].

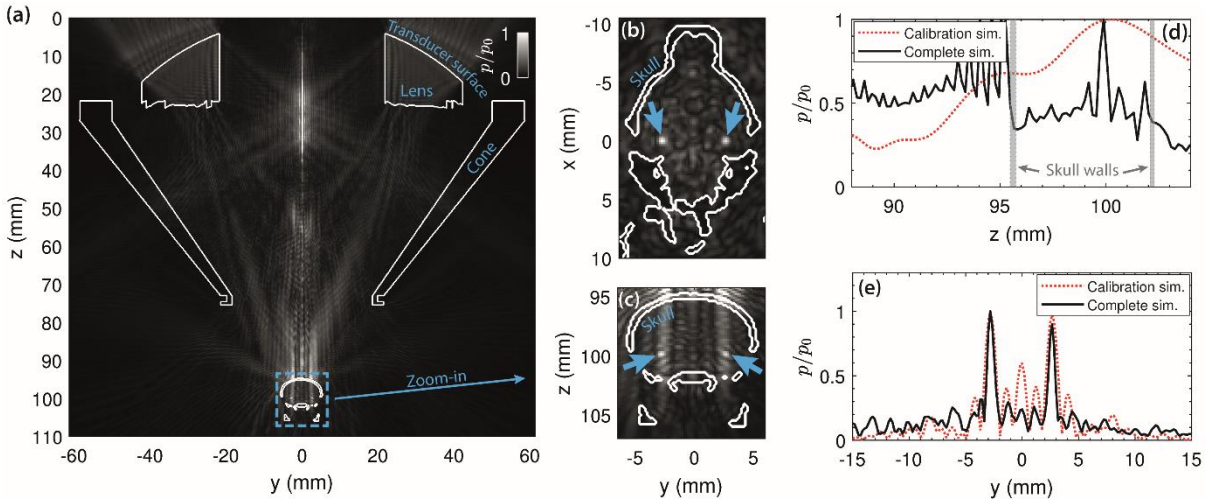


Figura 2. Simulación completa de la distribución de la presión acústica para la configuración del ensayo *in vivo*. (a) Plano axial en $x = 0$ mm. Los contornos de la lente, cono y cráneo se ilustran en línea continua blanca. (b,c) Plano transversal en $z = 100$ mm y zoom-in del plano axial de la subfigura (a), respectivamente, indicando los dos puntos focales con flechas azules. (d) Cortes axiales simulados del caso de calibración (línea roja de puntos) y del caso transcraneal (línea negra continua) en $y = 2.6$ mm y $x = 0$ mm. (e) Cortes transversales simulados del caso de calibración (línea roja de puntos) y del caso transcraneal (línea negra continua) en $z = 100$ mm y $x = 0$ mm.

Después, una vez impresa en 3D la lente, el sistema experimental empleado para la sonicación en conjunto con la inyección de microburbujas se muestra en la Figura 3(a). Posteriormente a la sonicación e inyección de microburbujas, se inyectó el marcador gadolinio y transcurridos 30-45 minutos se obtuvieron las imágenes de T1-MRI, mostrando la extravasación del marcador en dos puntos focales simétricos en los planos axial y coronal [véase Figura 3(b,c), respectivamente]. Se observó una apertura bilateral de la BHE en todos los ratones, con las dos regiones de mayor realzamiento por el agente de contraste separadas 3.0 ± 0.7 mm ($n = 5$ ratones) en comparación con los 5.3 mm de la simulación. Esta

discrepancia fue probablemente debida a las diferencias existentes entre el cráneo escaneado mediante μCT para el diseño de la lente y los cráneos particulares de cada ratón tratado.

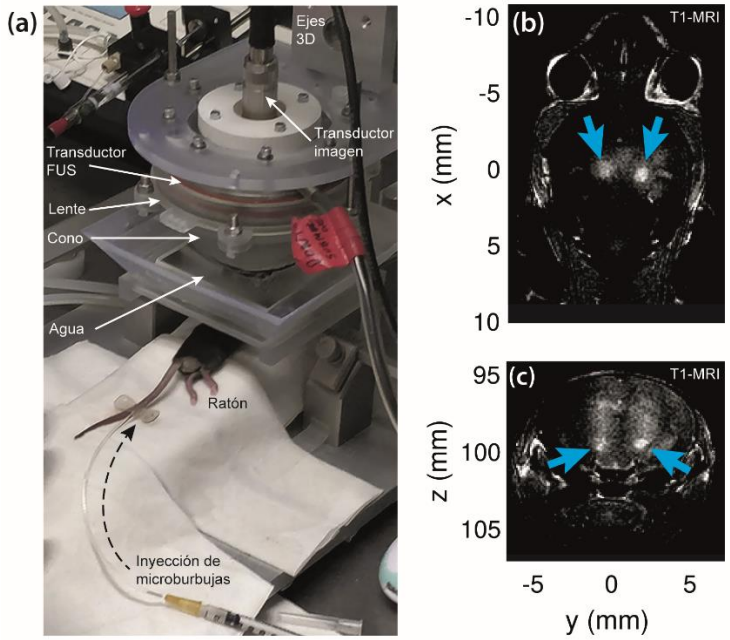


Figura 3. Apertura de la BHE *in vivo*. (a) Configuración experimental para la apertura de la BHE empleando una sonicación e inyección de burbujas. (b,c) Planos transversal y axial de la T1-MRI, respectivamente, indicando con flechas azules las dos zonas de apertura de la BHE que se observan en color claro.

Es interesante tener en cuenta que, al comienzo del procedimiento experimental, el reducido número-f del transductor ($N = 0.73$, cociente entre la distancia focal frente a la apertura de la fuente) hizo complicado el escaneo de la sutura lamboidea debido a la configuración experimental empleada. Por ello, las lentes desarrolladas en este trabajo muestran cómo la distancia focal puede ser fácilmente ajustada; en este caso permitiendo trabajar a $F = 100$ mm ($N = 1.19$) en lugar de a la distancia focal o radio de curvatura natural del transductor FUS de $F = 61.65$ mm.

4 Conclusiones

En este trabajo, demostramos *in vivo* y por primera vez que los hologramas acústicos se pueden emplear para producir la apertura bilateral de la barrera hematoencefálica en ratones. La lente holográfica impresa en 3D, que fue diseñada a partir de una simulación empleando la μCT de un cráneo de ratón, demostró la habilidad de focalizar simultáneamente en diferentes zonas cerebrales en cinco ratones, permitiendo así un procedimiento eficiente tanto en tiempo como en coste puesto que se requiere una única sonicación y una única inyección de microburbujas para el tratamiento completo.

La alta densidad de píxeles de la lente permite el control de 131784 elementos emisores, incrementando en torno a dos órdenes de magnitud a los sistemas terapéuticos que emplean multielemento (hasta 2048 elementos), proporcionando así un control excelente del campo acústico. Además, siendo mucho más económicos en comparación a los sistemas multielemento.

Las lentes acústicas holográficas permiten reducir el número de sonicaciones y por tanto de inyecciones de microburbujas puesto que permiten generar múltiples focos e incluso reconstruir acústicamente la

geometría de las estructuras cerebrales. Además, presentan una excelente calidad de focalización, es decir, permiten generar focos esféricos, dado que la lente codifica la información de la onda debida a múltiples reflexiones producidas internamente en la cavidad craneal, convirtiéndose así en una técnica muy localizada para la apertura de la BHE en el tratamiento de enfermedades cerebrales. Lo que en sí mismo supone un cambio de paradigma respecto a todas las tecnologías de focalización transcraneal actuales.

Este trabajo demuestra la viabilidad, capacidad y eficiencia de la tecnología patentada de hologramas acústicos para la apertura de la BHE de forma multifocal y altamente localizada. Es más, los beneficios de este enfoque pueden ser ampliamente útiles en otras aplicaciones como neuromodulación, quimioterapia o imagen transcraneal, definiendo así nuevos caminos para satisfacer los requerimientos tan complejos existentes en el ámbito biomédico.

Agradecimientos

Este trabajo de investigación ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades a través de las becas "Juan de la Cierva - Incorporación" (IJC2018-037897-I) y PID2019-111436RB-C22, por la Agència Valenciana de la Innovació a través de la subvención INNVAL10/19/016, por la Generalitat Valenciana a través de las subvenciones No. ACIF/2017/045 y BEFPI/2019/075, y por National Institutes of Health a través de las subvenciones 5R01EB009041 y 5R01AG038961. Acción cofinanciada por la Unión Europea a través del Programa Operativo del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) de la Comunitat Valenciana 2014-2020 (IDIFEDER/2018/022).

Referencias

[1] J. Choi, M. Pernot, T. Brown, S. Small, E. Konofagou. Spatiotemporal analysis of molecular delivery through the blood-brain barrier using focused ultrasound. *Physics in Medicine & Biology*, 52 (18), 2007, 5509.

[2] Y.-S. Tung, F. Vlachos, J. A. Feshitan, M. A. Borden, E. E. Konofagou. The mechanism of interaction between focused ultrasound and microbubbles in blood-brain barrier opening in mice. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 130 (5), 2011, 3059-3067.

[3] A. N. Pouliopoulos, S.-Y. Wu, M. T. Burgess, M. E. Karakatsani, H. A. Kamimura, E. E. Konofagou. A clinical system for non-invasive blood-brain barrier opening using a neuronavigation-guided single-element focused ultrasound transducer. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 46 (1), 2020, 73-89.

[4] N. Lipsman, Y. Meng, A. J. Bethune, Y. Huang, B. Lam, M. Masellis, N. Herrmann, C. Heyn, I. Aubert, A. Boutet. Blood-brain barrier opening in Alzheimer's disease using MR-guided focused ultrasound. *Nature Communications*, 9 (1), 2018, 1-8.

[5] R. Chopra, L. Curiel, R. Staruch, L. Morrison, K. Hynynen. An MRI-compatible system for focused ultrasound experiments in small animal models. *Medical Physics*, 36 (5), 2009, 1867-1874.

[6] M. E. Poorman, V. L. Chaplin, K. Wilkens, M. D. Dockery, T. D. Giorgio, W. A. Grissom, C. F. Caskey. Open-source, small-animal magnetic-resonance-guided focused ultrasound system. *Journal of Therapeutic Ultrasound*, 4 (1), 2019, 22.

[7] K. Melde, A. G. Mark, T. Qiu, P. Fischer. Holograms for acoustics. *Nature*, 537 (7621), 2016, 518.

[8] S. Jiménez-Gambín, N. Jiménez, J. M. Benlloch, F. Camarena. Holograms to focus arbitrary ultrasonic fields through the skull. *Physical Review Applied*, 12 (1), 2019, 014016.

[9] G. Maimbourg, A. Houdouin, T. Deffieux, M. Tanter, J.F. Aubry. 3D-printed adaptive acoustic lens as a disruptive technology for transcranial ultrasound therapy using single-element transducers. *Physics in Medicine & Biology*, 63 (2), 2018, 025026.

[10] S. Jiménez-Gambín, N. Jiménez, J. María. Benlloch, F. Camarena. Generating Bessel beams with broad depth-of-field by using phase-only acoustic holograms. *Scientific Reports*, 9 (1), 2019, 1-13.

[11] B. E. Treeby, B. Cox. Modeling power law absorption and dispersion for acoustic propagation using the fractional Laplacian. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 127 (5), 2010, 2741-2748.

[12] N. Jiménez, F. Camarena, J. Redondo, V. Sánchez-Morcillo, Y. Hou, E. E. Konofagou. Time-domain simulation of ultrasound propagation in a tissue-like medium based on the resolution of the nonlinear acoustic constitutive relations. *Acta Acustica united with Acustica*, 102 (5), 2016, 876-892.

[13] U. Schneider, E. Pedroni, A. Lomax. The calibration of CT Hounsfield units for radiotherapy treatment planning. *Physics in Medicine & Biology*, 41 (1), 1996, 111.

[14] T. D. Mast. Empirical relationships between acoustic parameters in human soft tissues. *Acoustics Research Letters Online*, 1 (2), 2000, 37-42.

[15] J.-F. Aubry, M. Tanter, M. Pernot, J.-L. Thomas, M. Fink. Experimental demonstration of non-invasive trans-skull adaptive focusing based on prior computed tomography scans. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 113 (1), 2003, 84-93.

[16] R. S. Cobbold. Foundations of biomedical ultrasound. *Oxford University Press*, 2006.

[17] P. A. Yushkevich, J. Piven, H. C. Hazlett, R. G. Smith, S. Ho, J. C. Gee, G. Gerig. User-guided 3D active contour segmentation of anatomical structures: significantly improved efficiency and reliability. *Neuroimage*, 31 (3), 2006, 1116-1128.

[18] K. Hynynen, N. McDannold, N. A. Sheikov, F. A. Jolesz, N. Vykhodtseva. Local and reversible blood-brain barrier disruption by non-invasive focused ultrasound at frequencies suitable for trans-skull sonications. *Neuroimage*, 24 (1), 2005, 12-20.