HOLOGRAMAS ACÚSTICOS PARA LA ADMINISTRACIÓN LOCALIZADA DE FÁRMACOS EN EL CEREBRO: VALIDACIÓN EX-VIVO EN PRIMATES

PACS: 43.35.-c, 43.35.Yb, 43.60.Sx, 43.58.Ls

Diana Andrés[1], Alicia Carrión[1], Nathalie Lamothe[1], José A. Pineda-Pardo[2], Noé Jiménez[1], Francisco Camarena[1]

[1]Instituto de Instrumentación para Imagen Molecular, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) – Universitat Politècnica de València (UPV), Valencia, España.

[2]HM CINAC, Fundación HM Hospitales de Madrid, Universidad Hospital HM Puerta del Sur, Universidad CEU-San Pablo, Móstoles, Madrid, España.

Palabras Clave: Hologramas acústicos, ultrasonidos terapéuticos, proyección holográfica.

ABSTRACT

Focused ultrasound has gained relevance in the medical field for non-invasive neurological applications. The aim of this work is to validate a preclinical system based on a large-diameter ultrasonic transducer with a holographic lens for blood-brain barrier opening in the post-commissural putamen of *macaca mulatta* primate. The holographic lens was designed using time-reversal methods and numerical simulations. Its performance was empirically evaluated using an ex-vivo macaque skull by direct measurements with a piezoelectric hydrophone and holographic reconstructions of the experimental data. The results of the simulations, direct measurements and holographic projections are very similar. A focus size (-3 dB) of 3 x 3 x 3 x 14 mm^3 in the simulation, 4.5 x 4.5 x 15.5 mm^3 in direct measurements, and 4 x 4 x 4 x 14 mm^3 with holographic projection techniques is observed. The maximum focal spot appeared in the desired location in all cases, with 40% of the focal volume located within the left post-commissural putamen. These results validate the robustness and accuracy of the preclinical system, which will be used for localised drug delivery with real-time monitoring in primates.

RESUMEN

Los ultrasonidos focalizados han ganado relevancia en el campo de la medicina para aplicaciones neurológicas no invasivas. El objetivo de este trabajo es validar un sistema preclínico basado en un transductor ultrasónico de gran diámetro con lente holográfica para la apertura de la barrera hematoencefálica en el putamen post-comisural de primates *macaca mulatta*. La lente holográfica se diseñó con métodos de inversión temporal y simulaciones numéricas. Su rendimiento se evaluó empíricamente empleando un cráneo ex-vivo de macaco mediante medidas directas con un hidrófono piezoeléctrico y reconstrucciones holográficas de los datos experimentales. Los resultados de las simulaciones, las medidas directas y las proyecciones holográficas son muy similares. Se observa un tamaño de foco (-3 dB) de 3 x 3 x 14 mm^3 en la simulación, 4,5 x 4,5 x 15,5 mm^3 en medidas directas, y de 4 x 4 x 14 mm^3 con técnicas de proyección holográfica. El punto focal máximo apareció en la ubicación deseada en todos los casos, con el 40% del volumen focal situado en el interior del putamen post-comisural izquierdo. Estos resultados validan la robustez y precisión del sistema preclínico, que será usado para la administración localizada de fármacos con monitorización en tiempo real en primates.

1. INTRODUCCIÓN

Los ultrasonidos focalizados están emergiendo como una alternativa a las actuales técnicas médicas para el tratamiento de diversos trastornos neurológicos, principalmente por su capacidad de ser aplicados de forma no invasiva. Además, el carácter no ionizante de las ondas acústicas, incluso a altas intensidades, las distinguen de los tratamientos de radioterapia para aplicaciones de ablación térmica en el cerebro [1]. Una aplicación muy prometedora de los ultrasonidos terapéuticos es su uso para la administración de fármacos en el sistema nervioso central. Ello se logra mediante la apertura segura y reversible de la barrera hematoencefálica empleando un haz de ultrasonidos focalizados en el interior del cráneo en combinación con microburbujas inyectadas previamente junto al fármaco en el torrente sanguíneo [2], [3]. A esto se suman las múltiples evidencias de estimulación y supresión neuronal logradas al focalizar ondas ultrasónicas de baja intensidad en estructuras específicas del cerebro [4], [5].

A pesar de lo prometedor de esta tecnología para terapia transcraneal, la dificultad recae en la necesidad de una precisa focalización del haz acústico en la diana terapéutica dentro del cerebro. A esto se suma que los huesos del cráneo presentan una compleja estructura interna y una gran dureza que provoca que los ultrasonidos se propaguen de una manera no trivial, sufriendo reflexión, refracción y atenuación, lo que afecta a la calidad del foco. Una solución ampliamente estudiada y con un buen resultado es el uso de sistemas multielemento (phased arrays) guiados con imagen de resonancia magnética (MRI) [6]. Estos sistemas presentan la desventaja de requerir un gran sistema de electrónica que aumenta considerablemente su complejidad y coste. Una alternativa en auge son las lentes holográficas impresas en 3D [7], que, acopladas a transductores monoelemento, son capaces de corregir las aberraciones introducidas por el cráneo, generando un foco acústico de calidad y adaptado a la diana terapéutica en el cerebro [8]. Con la evolución de las técnicas de impresión 3D y la gran variedad de materiales disponibles [9], esta tecnología permite un gran control de la terapia a un bajo coste y de forma personalizada para cada paciente.

Múltiples estudios sobre el desempeño de las lentes holográficas se han hecho a nivel de simulación numérica y se ha estudiado el campo generado por los mismos en agua e incluso a través de tejido de cráneo ex-vivo [10]–[14]. Las medidas experimentales mostradas en la literatura evalúan el campo acústico generado por el sistema transductor-lente en planos o cortes determinados. Sin embargo, de forma directa no se evalúan el volumen y la forma total del foco debido a la gran cantidad de datos y coste temporal que ello implica.

En este trabajo se estudia el diseño y desempeño de lentes holográficas acopladas a un transductor focalizado de gran apertura y radio de curvatura para tratar pequeñas estructuras del sistema nervioso central de un primate de la especie *macaca mulatta*. El objetivo es focalizar en el putamen post-comisural izquierdo para lograr la apertura de la barrera hematoencefálica en esta pequeña estructura. A través de simulaciones numéricas se ha hecho el diseño y posterior evaluación de la lente holográfica. Para la validación experimental del sistema se dispone de un cráneo exvivo cortado y vaciado de macaco. No solo se han tomado medidas directas del campo acústico, sino que además se propone el empleo de proyecciones holográficas para poder recuperar todo el volumen del foco acústico.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Diseño de la lente holográfica

En este estudio se ha empleado un transductor focalizado de gran apertura (OD = 100 mm de diámetro y R = 140 mm de radio de curvatura) cuya frecuencia central es de f = 500 kHz, con una apertura central de ID = 20 mm. Esta apertura central permitiría el emplazamiento de un detector de cavitación pasivo para la localización y monitorización de la apertura de la barrera hematoencefálica.

Para la generación del holograma acústico óptimo en el interior del cráneo es necesario conocer la morfología y las propiedades acústicas del hueso. Así mismo, el holograma estará posicionado

de acuerdo con la segmentación de la diana terapéutica correspondiente, el putamen post-comisural izquierdo en este caso. La forma y las propiedades del hueso se extraen de las imágenes CT del cráneo de macaco exvivo, cortado y vaciado. Los valores de densidad y velocidad del sonido medias en el cráneo del macaco son de ρ_m = 1563 kg/m^3 y c_m = 2191 m/s, obtenidos al convertir los valores de atenuación de rayos-X (unidades Hounsfield) a impedancia acústica [15], [16]. De acuerdo a valores reportados previamente en la literatura [17], la atenuación del cráneo se fija constante con valor α_m = 9.6 dB/(cm·MHz^y), con y = 1,1. La posición y la segmentación de la diana terapéutica se ha obtenido a partir de imágenes de resonancia magnética. Tanto el cráneo exvivo como las imágenes CT y MRI empleadas para la caracterización, y la segmentación de la diana terapéutica, han sido proporcionadas por el personal del hospital HM CINAC.

Para la creación del holograma acústico, se han empleado métodos de inversión temporal y realizado simulaciones acústicas empleando un método pseudoespectral en el dominio temporal implementado en el software k-Wave [18]. Siguiendo el procedimiento descrito en la Ref. [8], se posiciona una fuente virtual en el objetivo, en este caso en el putamen post-comisural izquierdo, y se captura la información de fase en una superficie semiesférica frente al transductor (superficie holográfica) de las señales acústicas producidas por dicha fuente virtual a la frecuencia de trabajo del transductor. La lente holográfica introducirá el cambio de fase del campo capturado complejo-conjugado, que irá entre 0 y 2π, a través de la altura de cada píxel y las propiedades intrínsecas del material de la lente. Esta altura se calcula en coordenadas esféricas para ajustarse a la curvatura del transductor, siendo cada píxel perpendicular a la superficie vibrante (como se describe en el material suplementario de la Ref. [19]). Este diseño permite su posterior impresión 3D con técnicas de estereolitografía para la validación ex-vivo del prototipo. Los valores de densidad, velocidad del sonido y atenuación del polímero empleado (Clear, Formlabs, USA) son de ρ_l = 1186 kg/m^3, c_l = 2599 m/s y α_l = 3.4 dB/(cm·MHz^y), medidos de forma experimental en nuestro laboratorio.

2.2. Proyección holográfica

Para validar el sistema, se realizan medidas experimentales directas del campo acústico y se emplean técnicas holográficas a partir de las medidas realizadas en un plano para reconstruir todo el campo acústico del holograma. De esta manera, a partir de una medida 2D del campo se puede reconstruir todo el volumen 3D de una manera rápida, sin necesidad de medir el campo punto a punto. Para realizar la proyección holográfica, se emplea la técnica de inversión temporal con las señales grabadas en el plano de medida 2D, considerando propagación homogénea en agua, sin pérdidas acústicas, para que se cumpla la simetría temporal de las ecuaciones de onda.

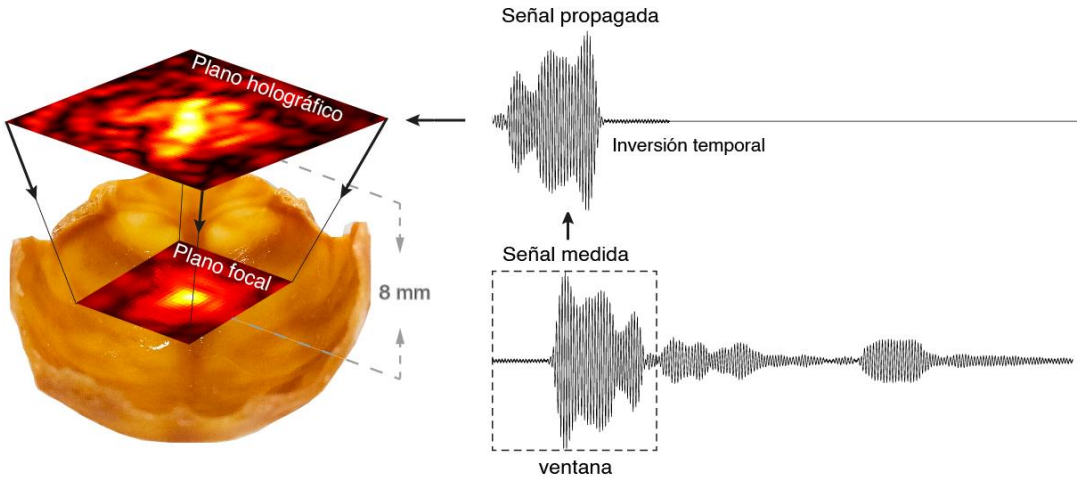


Figura 1: Esquema del proceso de reconstrucción del campo acústico en el foco a partir de una medida en un plano holográfico.

Las señales se miden en un plano situado 8 mm encima del foco del holograma (más alejado del transductor). Las dimensiones del plano deben ser suficientemente grandes para capturar en él la información de todas las ondas acústicas que conforman el foco, y con una resolución de al menos λ/2 (en nuestro caso λ/6) para poder representar totalmente el campo en ausencia de ondas evanescentes, como es este caso, al encontrarnos a una distancia de la fuente mucho mayor que una longitud de onda (λ = 3 mm). Estas señales se enventanan según el tiempo de llegada y longitud del pulso generado para evitar la propagación de reflexiones de las ondas con la superficie del agua y con el cráneo, se invierten temporalmente y se propagan para reconstruir todo el campo acústico que conforma el holograma. Un esquemático del proceso de proyección holográfica se muestra en la Figura 1. La duración de la ventana temporal es de 0.085 ms, obtenido del tiempo que tarda la señal en llegar al hidrófono (65 mm en agua – 0.045 ms) y el tiempo que tarda en propagarse el paquete de ondas (20 ciclos a 500 kHz – 0.04 ms).

2.3. Montaje experimental

Las medidas experimentales se han realizado en un tanque con agua degasificada a temperatura ambiente de dimensiones 40 x 80 x 60 cm^3 (alto x largo x ancho). El transductor empleado está compuesto por una cerámica piezoeléctrica, con las dimensiones físicas descritas en la Sección 2. Materiales y métodos, montada en una carcasa personalizada de acero inoxidable. Para localizar y fijar el cráneo respecto de la lente, de forma que el experimento sea repetible y en las mismas condiciones que la simulación, se diseñó un soporte en 3D que se adapta a la anatomía del hueso. La lente se acopla al transductor con gel de acoplo de altas temperaturas (Sonotech Sono 600) para evitar su disolución en agua y asegurar un acople continuo de la lente al transductor durante todo el experimento. Un esquema del sistema experimental se presenta en la Figura 2. El transductor se excitó con un tren de pulsos sinusoidales de 20 ciclos, a 500 kHz, con un generador de señales (14 bits, 100 MS/s, modelo PXI-5412, National Instruments, USA) y amplificado con un amplificador lineal RF (ENI 1040L, 400 W, 55 dB, ENI, Rochester, NY, USA). El campo acústico se midió con un hidrófono piezoeléctrico (-225.5 dB re 1 V/µPa at 1 MHz, modelo Y-104, Sonic Concepts, USA), calibrado de 40 kHz a 2 MHz, unido a un sistema de ejes 3D (5 µm precisión, PI Micos GmbH, Germany).

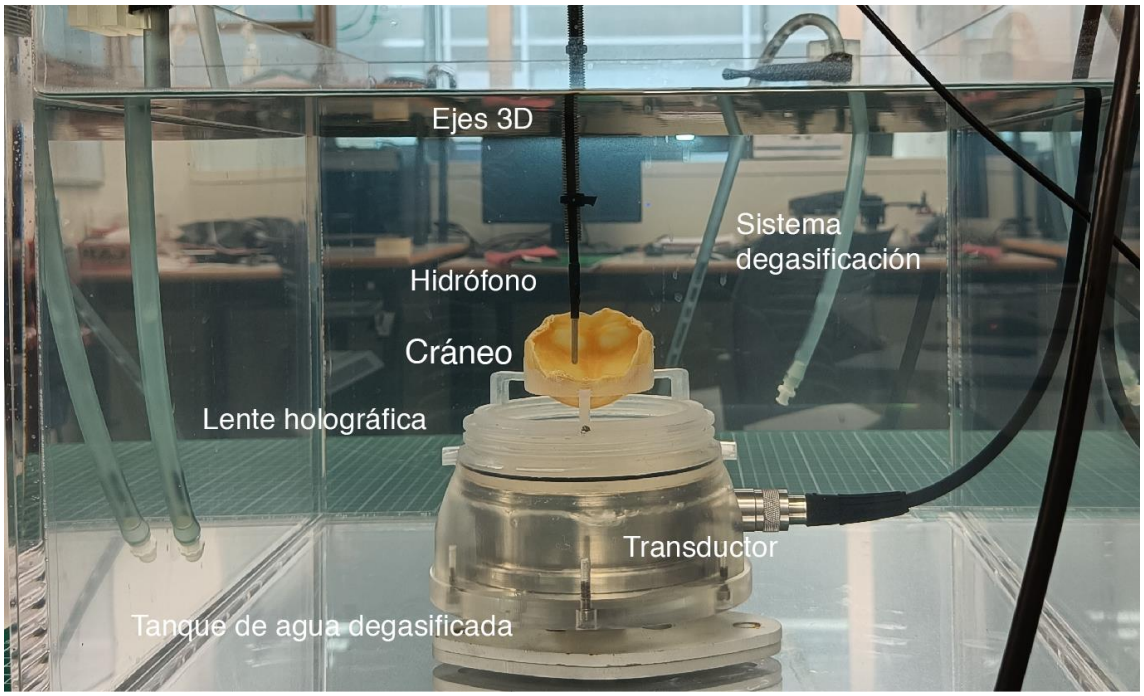


Figura 2. Montaje experimental para la validación ex-vivo del sistema transductor-lente.

3. RESULTADOS

En primer lugar, se obtuvo el campo acústico resultante del empleo de la lente holográfica en simulación. El tamaño del foco considerando una presión superior a la mitad de la presión máxima es de 3 x 3 x 14 mm^3, con un total del 55% del volumen del foco cayendo en la región a tratar. Numéricamente se obtuvo que se sonificaba un total del 14% del volumen del putamen post-comisural izquierdo (349 mm^3). Los planos XY e YZ localizados en el máximo de presión se muestran en las Figuras 3. a) y b), respectivamente.

Las medidas experimentales directas constan de tres planos (XY, XZ e YZ) de dimensiones 14 x 14 mm^2, 14 x 27 mm^2 y 14 x 27 mm^2, respectivamente, con una resolución espacial de 0.5 mm en todas las direcciones, centradas en el máximo de presión experimental (Figuras 3. d), e)). El tamaño del foco localizado en la diana terapéutica es 4.5 x 4.5 x 15.5 mm^3, algo mayor que el resultado esperado de acuerdo con las simulaciones. El campo acústico obtenido a partir de la proyección holográfica de las medidas realizadas en el plano XY holográfico, localizado a 8 mm del foco experimental y de dimensiones 37 x 32 mm^2 con resolución de 0.5 mm, muestra un tamaño del foco de 4 x 4 x 14 mm^3. Con la proyección holográfica del campo se obtiene que el 40% del volumen del foco cae en la región a tratar. El volumen del putamen post-comisural izquierdo sonificado es de un 38%. Si comparamos estos valores con los obtenidos directamente en simulación, el volumen de la diana terapéutica tratado es mayor (un 38% experimental frente al 14% obtenido numéricamente), pero también es mayor el tamaño del foco. Los resultados de la proyección holográfica en los mismos planos XY e YZ que las medidas directas se muestran en las Figuras 3. g) y h), respectivamente.

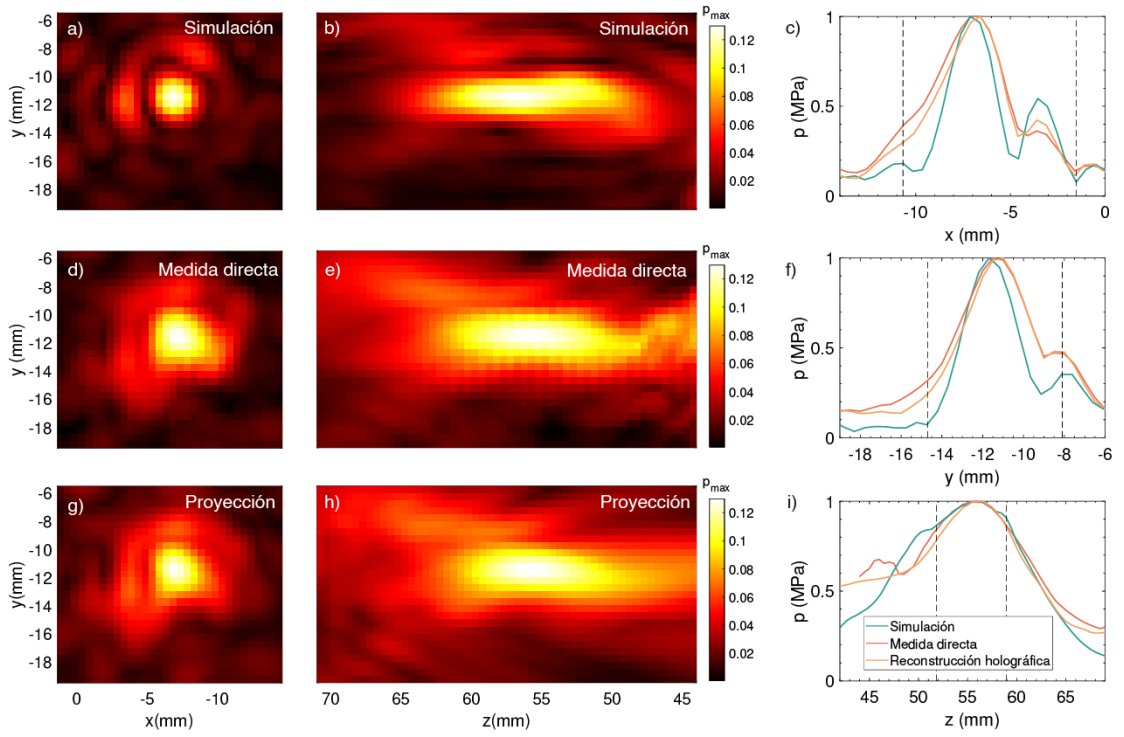


Figura 3. a,d,g) Planos XY en el máximo focal para a) simulación, d) medida directa y g) proyección holográfica. b,e,h) Planos ZY en el máximo focal para b) simulación, e) medida directa y h) proyección holográfica. c,f,i) Cortes lineales en el máximo focal para los resultados de simulación, medida directa y proyección holográfica.

Gracias al uso de la proyección holográfica como método para reconstruir todo el volumen focal solo ha sido necesaria la medida de un plano 2D (4736 medidas), cuyo tiempo experimental con nuestro sistema ha sido de cuatro horas (tiempo por medida medio de 3 segundos para realizar el promediado de 15 adquisiciones y el movimiento de ejes). La hipotética medida directa de todo

el volumen con las mismas dimensiones (14 x 14 x 27 mm^3) y resolución espacial (0.5 mm), consistiría en 42336 medidas, lo que equivaldría a un tiempo de medida de 35.3 horas. Es importante tener en cuenta que, si se pretende ampliar este volumen mediante medida directa, ello requiere de la realización de experimentos adicionales, mientras empleando el método de la proyección holográfica se puede ampliar solo con un nuevo postprocesado de los datos originales.

Las medidas directas en el máximo focal se realizaron en un amplio rango de potencias acústicas, llegando a obtener valores de presión superiores a 0.5 MPa en agua a 500 kHz, demostrando así que el sistema transductor-lente tiene suficiente potencia para abrir la barrera hematoencefálica en combinación con algún agente de contraste [20].

4. CONCLUSIONES

En este trabajo se ha demostrado que el uso de lentes holográficas permite, por una parte, la corrección de las aberraciones introducidas por el cráneo en el camino de propagación de los ultrasonidos, y por otra, la adaptación del foco de un transductor de gran apertura y radio de curvatura a pequeñas estructuras de interés en el cerebro de un macaco de la especie *macaca mulatta*. Las medidas experimentales realizadas verifican la forma y localización de los focos acústicos obtenidos con las simulaciones.

Además, la proyección holográfica reconstruye correctamente el foco, con resultados muy similares a la medida experimental directa en un mismo plano. Se ha demostrado que esta técnica permite reconstruir todo el campo acústico en las inmediaciones del foco y así poder cuantificar su volumen con una sola medida experimental a la vez que se evitan artefactos que pueden aparecer por la cercanía del hidrófono al cráneo y, además, reduciendo en gran medida el tiempo y los recursos necesarios para realizar la caracterización.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido apoyada por el Ministerio Español de Ciencia e Innovación y el Ministerio de Universidades a través de las subvenciones Juan de la Cierva – Incorporación IJC2018-037897-I, Juan de la Cierva – Formación FJC2019-040453-I, Formación de Profesorado Universitario FPU19/00601, y el plan nacional Retos PID2019-111436RB-C22, por la Agencia Valenciana de la Innovació a través de la subvención INNVA2/2022/11, y por la Generalitat Valenciana con las subvenciones FDEGENT/2019/004, el proyecto de ayudas emergentes CIGE/2021/175, el programa Prometeo CIPROM/2021/003 y el programa Equipamiento e Infraestructuras FEDER 2021-22 IDIFEDER/2021/004.

REFERENCIAS

[1] A. Franzini *et al.*, “Ablative brain surgery: an overview,” *International Journal of Hyperthermia*. 2019, doi: 10.1080/02656736.2019.1616833.

[2] N. McDannold, C. D. Arvanitis, N. Vykhodtseva, and M. S. Livingstone, “Temporary disruption of the blood-brain barrier by use of ultrasound and microbubbles: Safety and efficacy evaluation in rhesus macaques,” *Cancer Res.*, 2012, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0128.

[3] A. N. Pouliopoulos, S. Y. Wu, M. T. Burgess, M. E. Karakatsani, H. A. S. Kamimura, and E. E. Konofagou, “A Clinical System for Non-invasive Blood–Brain Barrier Opening Using a Neuronavigation-Guided Single-Element Focused Ultrasound Transducer,” *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 46, no. 1, pp. 73–89, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2019.09.010.

[4] W. Legon *et al.*, “Transcranial focused ultrasound modulates the activity of primary somatosensory cortex in humans,” *Nat. Neurosci.*, vol. 17, no. 2, pp. 322–329, Feb. 2014, doi: 10.1038/nn.3620.

[5] W. Legon, L. Ai, P. Bansal, and J. K. Mueller, “Neuromodulation with single-element transcranial focused ultrasound in human thalamus,” *Hum. Brain Mapp.*, vol. 39, no. 5, pp. 1995–2006, May 2018, doi: 10.1002/hbm.23981.

[6] A. Abrahao *et al.*, “First-in-human trial of blood–brain barrier opening in amyotrophic lateral sclerosis using MR-guided focused ultrasound,” *Nat. Commun.*, 2019, doi:

10.1038/s41467-019-12426-9.

[7] K. Melde, A. G. Mark, T. Qiu, and P. Fischer, “Holograms for acoustics,” *Nature*, vol. 537, no. 7621, p. 518, 2016.

[8] S. Jiménez-Gambín, N. Jiménez, J. M. Benlloch, and F. Camarena, “Holograms to Focus Arbitrary Ultrasonic Fields through the Skull,” *Phys. Rev. Appl.*, vol. 12, no. 1, p. 014016, Jul. 2019, doi: 10.1103/PhysRevApplied.12.014016.

[9] A. Antoniou, N. Evripidou, M. Giannakou, G. Constantinides, and C. Damianou, “Acoustical properties of 3D printed thermoplastics,” *J. Acoust. Soc. Am.*, vol. 149, no. 4, 2021, doi: 10.1121/10.0004772.

[10] G. Maimbourg, A. Houdouin, T. Deffieux, M. Tanter, and J.-F. Aubry, “3D-printed adaptive acoustic lens as a disruptive technology for transcranial ultrasound therapy using single-element transducers,” *Phys. Med. Biol.*, vol. 63, no. 2, p. 25026, 2018.

[11] S. Jiménez-Gambín, N. Jiménez, and F. Camarena, “Transcranial Focusing of Ultrasonic Vortices by Acoustic Holograms,” *Phys. Rev. Appl.*, vol. 14, no. 5, p. 54070, 2020, doi: 10.1103/PhysRevApplied.14.054070.

[12] G. Maimbourg, A. Houdouin, T. Deffieux, M. Tanter, and J. F. Aubry, “Steering capabilities of an acoustic lens for transcranial therapy: Numerical and experimental studies,” *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 67, no. 1, 2020, doi: 10.1109/TBME.2019.2907556.

[13] S. Jimenez-Gambin, N. Jimenez, A. Pouliopoulos, J. M. Benlloch, E. Konofagou, and F. Camarena, “Acoustic Holograms for Bilateral Blood-Brain Barrier Opening in a Mouse Model,” *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 69, no. 4, 2022, doi: 10.1109/TBME.2021.3115553.

[14] D. Andrés, N. Jiménez, J. M. Benlloch, and F. Camarena, “Numerical Study of Acoustic Holograms for Deep-Brain Targeting through the Temporal Bone Window,” *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 48, no. 5, 2022, doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2022.01.010.

[15] U. Schneider, E. Pedroni, and A. Lomax, “The calibration of CT Hounsfield units for radiotherapy treatment planning,” *Phys. Med. Biol.*, vol. 41, no. 1, p. 111, 1996.

[16] T. D. Mast, “Empirical relationships between acoustic parameters in human soft tissues,” *Acoust. Res. Lett. Online*, vol. 1, no. 2, pp. 37–42, 2000.

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

[18] B. E. Treeby and B. T. Cox, “k-Wave: MATLAB toolbox for the simulation and reconstruction of photoacoustic wave fields,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 15, no. 2, 2010, doi: 10.1117/1.3360308.

[19] D. Andrés, J. Vappou, N. Jiménez, and F. Camarena, “Thermal holographic patterns for ultrasound hyperthermia,” *Appl. Phys. Lett.*, vol. 120, no. 8, 2022, doi: 10.1063/5.0081565.

[20] N. McDannold, N. Vykhodtseva, and K. Hynynen, “Use of Ultrasound Pulses Combined with Definity for Targeted Blood-Brain Barrier Disruption: A Feasibility Study,” *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 33, no. 4, 2007, doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2006.10.004.