

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Ultrasonidos focalizados de media intensidad para fisioterapia**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Silvia Ronda Peñacoba**

Director

**Francisco R. Montero de Espinosa Freijo**

Madrid

© Silvia Ronda Peñacoba, 2019

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS**



**ULTRASONIDOS FOCALIZADOS DE MEDIA  
INTENSIDAD PARA FISIOTERAPIA**

**TESIS DOCTORAL**

**Silvia Ronda Peñacoba**

**Director:**

**Dr. Francisco R. Montero de Espinosa Freijo**

**Madrid, 2019**



**DEPARTAMENTO DE ESTRUCTURA DE LA MATERIA, FÍSICA  
TÉRMICA Y ELECTRÓNICA**

**FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS**

**ULTRASONIDOS FOCALIZADOS DE MEDIA  
INTENSIDAD PARA FISIOTERAPIA**

**Memoria para optar al Grado de Doctor presentada por:**

**Autor: Silvia Ronda Peñacoba**

Licenciado en Ciencias Físicas

**Director: Dr. Francisco R. Montero de  
Espinosa Freijo**

Profesor de Investigación CSIC

**Madrid, 2019**







UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE  
MADRID

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS  
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. Silvia Ronda Peñacoba,  
estudiante en el Programa de Doctorado D9AD - Doctorado en Física,  
de la Facultad de Ciencias Físicas de la Universidad Complutense de  
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y  
titulada:

Ultrasonidos Focalizados de Media Intensidad para Fisioterapia

y dirigida por: Dr. Francisco R. Montero de Espinosa Freijo

**DECLARO QUE:**

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 9 de julio de 2019

Fdo.:

Silvia Ronda Peñacoba

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en  
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.



# Agradecimientos

---

Me gustaría agradecer a todas las personas que durante este tiempo han estado a mi lado y han hecho posible que esta Tesis haya salido adelante.

Sin duda la persona que más culpa tiene de que escriba estas palabras es mi Director, el que en la portada aparece con el nombre de Dr. Francisco R. Montero de Espinosa Freijo, pero que durante todo este tiempo siempre me ha permitido tratarle como Paco. Con más o menos acierto he intentado aprender, seguir sus consejos y aprovechar las oportunidades que me ha dado. En una sociedad en la que la Ciencia no está de moda, eres para mí una persona que me ha hecho sentir que se puede ser feliz dedicándose a ella. No solo profesionalmente, personalmente, te estoy agradecida por todo, lo bueno y lo malo, porque creo que contigo he aprendido muchas cosas que no se encuentran en los libros.

Quisiera agradecer también a los profesores Dr. José Luis Sebastián Franco y Dra. Sagrario Muñoz San Martín, quienes me guiaron con mis primeros pasos en la Investigación. Nunca me olvidaré de esa primera oportunidad y de mi hueco en el antiguo Departamento de Física Aplicada III de la Facultad de Ciencias Físicas. Gracias por animarme a embarcarme en esta Tesis. Sé que cada uno debe dirigir su futuro, pero poder contar con vuestro consejo me hace sentir muy afortunada.

Este tiempo en el CSIC no hubiera sido igual sin mis compañeros, en especial aquellos que han estado “mesa con mesa” conmigo y “tupper con tupper”. Gracias por vuestro apoyo y por intentar que siempre fuera hacia delante. Pasar este tiempo con vosotros me ha hecho ver que el trabajo es más fácil si tienes con quién quejarte y arreglar el mundo con un café.

No quiero olvidarme de todas esas personas que en este camino me han abierto las puertas de su casa y sus laboratorios (que para el caso muchas veces es lo mismo) para enseñarme cosas impresionantes. Toda la gente que ha colaborado en este Proyecto es para mí un referente de dedicación y conocimiento.

Por último, quiero agradecer a mi familia y mis amigos, especialmente a los que habéis compartido pupitre o vivido a mi lado durante esta etapa académica. No tenéis ni la más mínima idea de cuánto me habéis ayudado con esos paseos, carreras, charlas y viajes. Hablando de mi Tesis o ayudándome a ni siquiera pensar en ella. Espero haceros sentir la mitad de orgullosos de lo que yo me siento de teneros cerca.

En una de sus “lecciones” Paco intentó dejarme claro que no hace falta escribir mucho para que algo sea bueno... No sé si al final he conseguido ponerlo en práctica, pero esta, sin duda, ha sido la página más fácil de escribir de toda esta Tesis.



# Índice

---

<b>Resumen</b> .....	<b>V</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>VII</b>
<b>Lista de Tablas</b> .....	<b>IX</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>XIII</b>
<b>Lista de símbolos y acrónimos</b> .....	<b>XIX</b>
<b>Capítulo 1. Aplicaciones Terapéuticas de los Ultrasonidos</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Introducción y motivación de la Tesis</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Aplicaciones actuales de los Ultrasonidos en Fisioterapia</b> .....	<b>2</b>
<b>3. Propagación de los Ultrasonidos en un medio</b> .....	<b>5</b>
3.1 Introducción a la teoría lineal de los Ultrasonidos.....	5
3.2 Parámetros dosimétricos en un tratamiento con Ultrasonidos.....	7
<b>4. Efectos de los Ultrasonidos</b> .....	<b>10</b>
4.1 Efectos térmicos de los Ultrasonidos .....	10
4.2 Efectos no térmicos de los Ultrasonidos .....	11
<b>5. Objetivos y contenido de la Tesis</b> .....	<b>16</b>
<b>Capítulo 2. Estudio de los efectos térmicos de los Ultrasonidos con técnicas no invasivas</b> .....	<b>19</b>
<b>1. Introducción y motivación</b> .....	<b>19</b>
<b>2. Antecedentes</b> .....	<b>20</b>
<b>3. Materiales y métodos</b> .....	<b>21</b>
3.1 Método de Retardos de la señal recibida por dispersión .....	21
3.2 Simulaciones.....	21
3.3 Imagen Optoacústica .....	22
<b>4. Medida del incremento de temperatura durante una insonificación con técnicas no invasivas</b> .....	<b>24</b>

4.1 Cuantificación del incremento térmico con el Método de Retardos de la señal de dispersión ..	24
4.2 Simulación del incremento térmico que se produce con MIFU.....	26
4.3 Cuantificación del incremento térmico que se produce con MIFU con Imagen Optoacústica ...	28
4.4 Discusión .....	32
<b>5. Conclusiones .....</b>	<b>33</b>

### **Capítulo 3. Propuesta de una sistemática estándar de caracterización del campo acústico en un experimento de insonificación in vitro ..... 35**

<b>1. Introducción y motivación .....</b>	<b>35</b>
<b>2. Antecedentes .....</b>	<b>38</b>
<b>3. Materiales y métodos.....</b>	<b>40</b>
3.1 Simulaciones.....	40
3.2 Medidas experimentales.....	42
3.3 Configuración experimental.....	42
<b>4. Resultados .....</b>	<b>43</b>
4.1 Caracterización de la superficie de vibración y diseño del transductor para el modelo de simulación .....	43
4.2 Estudio del campo acústico en campo libre. Influencia de la no homogeneidad de la amplitud y fase de la superficie radiante .....	44
4.3 Estudio de la interferencia que se origina en presencia de una interfaz de aire.....	46
4.4 Estudio del campo acústico cuando se confina en un pocillo.....	49
<b>5. Discusión.....</b>	<b>56</b>
<b>6. Propuesta de una sistemática estándar para la caracterización de la dosis de energía acústica en un experimento de insonificación in vitro .....</b>	<b>60</b>
<b>7. Conclusiones .....</b>	<b>68</b>

### **Capítulo 4. Experimento in vitro: Insonificación de una monocapa de fibroblastos ..... 71**

<b>1. Introducción y motivación .....</b>	<b>71</b>
<b>2. Materiales y métodos.....</b>	<b>73</b>

2.1 Cultivo celular.....	73
2.2 Configuración experimental.....	73
2.3 Protocolos de insonificación .....	74
2.4 Caracterización del campo acústico .....	75
2.5 Medida de la viabilidad .....	76
2.6 Microscopía óptica: Número de células, superficie de ocupación y morfología .....	76
<b>3. Campo acústico en la configuración experimental.....</b>	<b>77</b>
3.1 Caracterización experimental de la superficie de vibración .....	77
3.1.1 Medida de la frecuencia óptima de emisión .....	77
3.1.2 Medida de la distribución de amplitud de vibración en la dirección transversal .....	78
3.1.3 Medida de la potencia emitida en campo libre .....	79
3.2 Simulación de la distribución de la presión acústica.....	79
3.2.1 Propagación en campo libre. Correspondencia entre el transductor real y el simulado .....	79
3.2.2 Emisión continua en la configuración experimental .....	81
3.2.3 Emisión de un pulso corto en la configuración experimental .....	83
3.3 Medidas experimentales de la distribución de presión acústica dentro del pocillo.....	84
3.3.1 Insonificación con un pulso largo (Protocolo A) .....	84
3.3.2 Insonificación con un pulso corto (Protocolo B) .....	87
3.4 Comparación de los parámetros dosimétricos obtenidos .....	88
3.5 Parámetros dosimétricos de los protocolos aplicados en los experimentos de insonificación de una monocapa de fibroblastos.....	89
<b>4. Resultados .....</b>	<b>91</b>
4.1 Protocolo A: Variación de la amplitud de un pulso largo .....	91
4.1.1 Discusión e interpretación de los resultados.....	95
4.2 Protocolo B: Variación de la PRF de un pulso corto.....	108
4.2.1 Discusión e interpretación de los resultados.....	112
<b>5. Conclusiones .....</b>	<b>116</b>
<b>Capítulo 5. MIFU: Propuesta de un protocolo de Ultrasonidos terapéuticos para el tratamiento de lesiones crónicas de tejido blando .....</b>	<b>119</b>
<b>1. Introducción y motivación .....</b>	<b>119</b>



<b>2. Antecedentes</b> .....	<b>121</b>
<b>3. Materiales y métodos</b> .....	<b>122</b>
3.1 Simulaciones.....	122
3.2 Medidas experimentales.....	124
<b>4. Simulación del efecto térmico producido con Ultrasonidos en un tejido según el tipo de transductor usado</b> .....	<b>125</b>
<b>5. Protocolo de Ultrasonidos terapéuticos</b> .....	<b>129</b>
5.1 Protocolo de insonificación combinado.....	129
5.1.1 Pulso largo .....	130
5.1.1.1 Efecto térmico del pulso largo .....	130
5.1.1.2 Relación para el cálculo de los parámetros de insonificación del pulso largo .....	131
5.1.1.3 Verificación de la relación propuesta para el pulso largo .....	137
5.1.2 Pulso corto.....	141
5.1.2.1 Efecto mecánico del pulso corto.....	141
5.1.2.2 Relación para el cálculo de los parámetros de insonificación del pulso corto .....	145
5.1.2.3 Verificación de la relación propuesta para el pulso corto .....	146
<b>6. Discusión</b> .....	<b>149</b>
<b>5. Conclusiones</b> .....	<b>158</b>
<b>Capítulo 6. Conclusiones y líneas de trabajo futuras</b> .....	<b>161</b>
<b>Bibliografía</b> .....	<b>163</b>

## Resumen

---

### Ultrasonidos Focalizados de Media Intensidad en Fisioterapia

**Introducción:** Los resultados que muestran los beneficios que se obtienen con las terapias con Ultrasonidos (US) en Fisioterapia evidencian la potencialidad de este tipo de radiación para mejorar la rehabilitación y la curación de lesiones de tejido blando. Existe cierta controversia sobre su efectividad basada en encuestas científicas, que induce a pensar que no se han trasladado bien a la clínica los conocimientos obtenidos de tipo físico y biológico sobre la interacción entre los US y los tejidos biológicos. En este sentido, la profundización de la investigación de carácter biofísico dentro de esta área es necesaria. Además, el intervalo de intensidades intermedias entre las que actualmente se consideran no dañinas (y se emplean en rehabilitación) y las que lograr ablacionar o destruir los tejidos por calor (y se emplean en oncología y cirugía), es un rango muy poco investigado. El trabajo realizado se centra en los efectos biofísicos de los US en esta ventana de intensidades, que se denomina MIFU (*Middle Intense Focused Ultrasound*), en la que se esperan encontrar resultados positivos en el tratamiento de lesiones de tejido blando, al poder combinar los efectos de las otras modalidades.

**Objetivos:** Establecer una metodología científica en la experimentación de los efectos de los US en células y tejidos biológicos y la correcta cuantificación y planificación de los protocolos en los tratamientos que se aplican en clínica son los objetivos principales de esta Tesis. Para lograr esto es necesario conocer los efectos de los US en un tejido biológico, que se agrupan en térmicos y no térmicos.

**Resultados:** El trabajo experimental que se ha realizado supone un avance en el asentamiento de la sistemática en la experimentación en tratamientos con US. Las medidas en el laboratorio se han reforzado con programas de simulación que emplean el Método de Elementos Finitos. Para llevar a cabo el estudio de los efectos de los US ha sido necesario desarrollar nuevas técnicas y experimentos en el laboratorio, así como sintetizar materiales artificiales con las propiedades de los tejidos biológicos.

Se ha llevado a cabo la medida del calentamiento que se produce debido a la absorción de los US en un tejido mediante métodos no invasivos (Método de retardos de la señal recibida por dispersión). Por primera vez, se ha logrado la monitorización de la distribución de temperatura durante una insonificación con MIFU con una novedosa técnica de imagen: la Imagen Optoacústica.

Se ha estudiado la propagación del campo acústico en una de las configuraciones más comúnmente empleadas en experimentación in vitro. Se han realizado medidas cuantitativas de

los parámetros acústicos que permiten entender e interpretar posteriormente de forma correcta los cambios celulares. Se ha hecho una crítica a la metodología experimental seguida hasta ahora, que dificulta la comparación entre trabajos publicados. Esta metodología se ha aplicado en un experimento de insonificación in vitro de una monocapa de fibroblastos en la que se estudian los efectos no térmicos de los US, p.e. cavitación y estimulación mecánica de las estructuras mecanosensoras debido a las variaciones de la presión externa inducida por los US.

Se ha propuesto un novedoso protocolo de tratamiento para rehabilitación de lesiones crónicas de tejido blando (músculo y tendón). Este protocolo combina los dos tipos de efectos térmicos y no térmicos consecutivamente. Los parámetros de dosificación se basan en toda la bibliografía revisada y el conocimiento adquirido en el desarrollo de la Tesis.

**Conclusiones:** Se ha realizado un completo estudio teórico y experimental de la cadena de experimentación que se debe seguir para estudiar la relación entre los US y las células y tejidos humanos. Se han estudiado los efectos y la capacidad de los US en el rango MIFU para dar resultados beneficiosos en el tratamiento de lesiones de tejido blando. Se propone una novedosa combinación de tratamientos con US como compendio de los resultados obtenidos en la Tesis y la información bibliográfica de los efectos biofísicos demostrados.

## Abstract

---

### Middle Intense Focused Ultrasound for Physiotherapy

**Introduction:** Exhaustive analyses of therapies with Ultrasound (US) in Physiotherapy prove a potential benefit of this type of radiation in order to enhance rehabilitation and healing of soft tissue injuries. Several scientific reviews show that there exists controversy regarding the effectiveness of this technique, leading to the conclusion that there is not an appropriate and accurate transfer to clinic of the physical and biological knowledge of the interaction effects of US with biological tissues. Comprehensive biophysical research is hence necessary in this direction. Moreover, not much research exists in the literature about intensity thresholds intervals between harmless (and therefore useful for rehabilitation) and ablative (useful in surgery and oncology) intensities. This work focuses on the study of biophysical effects of US with intensities within this threshold interval, denoted as MIFU (Middle Intense Focused Ultrasound), due its potentiality to obtain promising results in the treatment of soft tissue injuries, as it can combine the effects of other modalities.

**Objectives:** The main objectives of this thesis can be summarized into settling the scientific method in the experimental investigation of US effects in cells and biological tissues and a proper quantification and design of the treatment protocols which are applied in clinics. In order to achieve this task, it is necessary to understand US effects on biological tissues, which are grouped in thermal and non-thermal subcategories.

**Results:** Experimental work has been made ending up in a significant progress in the empirical methodology for US treatments research. The work has been supported and reinforced by simulation software based on the Finite Element Method. To study US effects, novel laboratory techniques have been developed, as well as artificial material mockups with biological tissues properties.

The measurement of tissue heating caused by the absorption of US with common non-invasive methods has been performed (Pulse Eco Shift Method). For the first time, real-time volumetric mapping of the temperature distribution during a sonication with MIFU has been achieved with the modern Optoacoustic Imaging technique.

An analysis of acoustic wave propagation in one of the most common in vitro US therapy set up has been done. Quantitative measurements of acoustic parameters, necessary to later understand and read correctly changes at the cellular level obtained in the experiments, have been made. A review to the conventional dosage methodology has been proposed, because of the inconvenient

that this methodology presents when comparing different works. This methodology is applied in a real experiment of sonication of a fibroblasts monolayer in vitro, where non-thermal effects of US are studied, i.e. cavitation and mechanic stimulation of mecanosensor structures of cells due to the external pressure variations induced by US.

A new promising treatment protocol designed for chronic diseases of soft tissue (muscle and tendon) has been proposed. The protocol combines consecutively the two different types of effects of US, thermal and non-thermal. Its dosage parameters are based in all the literature reviewed and the knowledge acquired during this Thesis development.

**Conclusions:** An exhaustive theoretical and experimental analysis of the suitable steps in empirical research has been done in order to understand the relation between US and cells and human tissues. US effects and potentiality of MIFU range to get results in order to enhance healing of soft tissue injuries has been analyzed. As an overview of the results of this Thesis and the literature information of demonstrated biophysical effects of this kind of radiation, a new promising combined treatment protocol with US has been proposed.

## Lista de Tablas

---

### Capítulo 1

<b>Tabla 1.1:</b> Aplicaciones actuales de los US en terapia .....	4
<b>Tabla 1.2:</b> Capa hemirreductora de los US en los tejidos blandos .....	7
<b>Tabla 1.3:</b> Siglas empleadas para especificar la intensidad de los US y esquema del convenio que se emplea. ....	8

### Capítulo 2

<b>Tabla 2.1:</b> Propiedades acústicas y térmicas empleadas en el modelo de simulación [Hasgall PA] .....	21
<b>Tabla 2.2:</b> Comparación de la medida por Imagen OA y el registro obtenido con un termopar para dos insonificaciones diferentes llevadas a cabo en un material artificial [Landa FJO 2019] .....	29

### Capítulo 3

<b>Tabla 3.1:</b> Configuraciones experimentales empleadas en los experimentos para estudiar los efectos de los US in vitro. ....	36
<b>Tabla 3.2:</b> Dimensiones y diseño de la secuencia de simulaciones llevadas a cabo.....	41
<b>Tabla 3.3:</b> Propiedades acústicas de los materiales empleados en las simulaciones [Hensel K] .....	41
<b>Tabla 3.4:</b> Comparación de la medida real y la simulación de la distribución 2D de amplitud de la presión máxima en un plano transversal. En la primera fila, cuando la interferencia da lugar a un máximo y en la segunda fila, cuando la interferencia da lugar a un mínimo .....	48
<b>Tabla 3.5:</b> Características de la simulación para el estudio del campo acústico cuando se confina en un pocillo de una placa de cultivo. Un esquema del modelo puede verse en la Fig.3.1 y en la Tabla 3.2 .....	50
<b>Tabla 3.6:</b> Distribución 2D de la amplitud de presión para diferentes instantes durante la propagación de los pulsos de la Fig.3.14.....	51
<b>Tabla 3.7:</b> Comparación de la medida real y la simulación de la distribución 2D de la amplitud de la presión máxima emitida cerca de la base del pocillo ( $\approx 0.8$ mm). En la primera fila, medida realizada para un pulso corto y en la segunda fila, resultados para un pulso largo.....	53
<b>Tabla 3.8:</b> Densidad de energía y presión máxima en los puntos de la base para un pulso de 5 ciclos .....	54
<b>Tabla 3.9:</b> Densidad de energía y presión máxima en los puntos de la base para un pulso de 30 ciclos.....	54
<b>Tabla 3.10:</b> Estimación de los parámetros acústicos en la base del pocillo para un caso como el estudiado en este trabajo .....	65
<b>Tabla 3.11:</b> Señal adquirida para estimar la caída de amplitud de la onda entre las sucesivas reflexiones .....	65
<b>Tabla 3.12:</b> Evolución temporal de la potencia integrada en la base del pocillo para un pulso de 5 ciclos. En rojo se indica el resultado que cabe esperar si no hay interferencia .....	66

**Tabla 3.13:** Evolución temporal de la potencia integrada en la base del pocillo para un pulso de 30 ciclos. En rojo se indica el resultado que cabe esperar si no hay interferencia ..... 68

## Capítulo 4

**Tabla 4.1:** Datos que se extraen de las medidas experimentales y de las simulaciones para el transductor de 1.9 MHz, calculándose los datos para un voltaje común de 10 Vpp ..... 88

**Tabla 4.2:** Parámetros de insonificación de los tratamientos del *Protocolo A*, en el que varía la amplitud del pulso..... 91

**Tabla 4.3:** Parámetros de insonificación de los tratamientos del *Protocolo B1*, en el que varía la PRF del pulso y se mantiene el tiempo de insonificación igual en todos los casos (300s) ..... 91

**Tabla 4.4:** Parámetros de insonificación de los tratamientos del *Protocolo B2*, en el que varía la PRF del pulso y se mantiene la energía total de insonificación igual en todos los casos ..... 91

**Tabla 4.5:** Imágenes tomadas con el microscopio óptico a 20x y 10x del control y del cultivo insonificado con MAP. .... 94

**Tabla 4.6:** Muestra representativa del estado del cultivo para los grupos del *Protocolo A* 24 h tras el tratamiento, en la zona más afectada por los US según la distribución de la Fig.4.19 ..... 94

**Tabla 4.7:** Parámetros obtenidos para el ajuste de los datos de la Fig.4.35 a una función de la forma  $y = ax^n$ . ..... 103

**Tabla 4.8:** Espectro de la señal de presión acústica adquirida para un pulso de excitación de 15 Vpp y 200 ciclos según varía el tramo de la señal que se analiza, centrado en  $t_{centro}$  ..... 104

**Tabla 4.9:** Valores del % de la viabilidad y el número de células respecto del control para los casos del Protocolo B. .. 110

**Tabla 4.10:** Muestra representativa del estado del cultivo para los grupos del *Protocolo B1* 24 h tras el tratamiento. . 111

**Tabla 4.11:** Muestra representativa del estado del cultivo para los grupos del *Protocolo B2* 24 h tras el tratamiento. . 111

**Tabla 4.12:** Ejemplo de fibroblasto binucleado y estimación de los presentes en cada imagen de los pocillos de *B2*.... 112

## Capítulo 5

**Tabla 5.1:** Pico de amplitud de presión positivo ( $P_+$ ), negativo ( $P_-$ ) y densidad de energía ( $\rho_E$ ) de las ondas de presión generadas por tres equipos de RSW a diferentes distancias del aplicador (z) ..... 122

**Tabla 5.2:** Propiedades acústicas y térmicas de tejidos biológicos [Hasgall PA] ..... 124

**Tabla 5.3:** Coeficiente de atenuación de los US en tejidos biológicos para las frecuencias que se emplean en Fisioterapia y resultado del ajuste a una función potencial de la forma  $\alpha = a f_0^b$  [Hasgall PA] ..... 124

**Tabla 5.4:** Volumen de tejido que sufre daño térmico en cada modelo ..... 128

**Tabla 5.5:** Efectos de los US presentes en cada tipo de insonificación y objetivo con el que se diseña cada uno ..... 129

**Tabla 5.6:** Resultados de la simulación para un transductor de  $I_{SATA} = 0.045 \text{ W/cm}^2$  que emite en músculo, con la aproximación de que la conductividad térmica es despreciable ( $k = 0$ ) ..... 133

<b>Tabla 5.7:</b> Resultados de la simulación para un transductor de $I_{SATA} = 0.045 \text{ W/cm}^2$ que trabaja en músculo.....	134
<b>Tabla 5.8:</b> Resultados de la simulación para un transductor de $I_{SATA} = 0.51 \text{ W/cm}^2$ que trabaja en músculo.....	135
<b>Tabla 5.9:</b> Resultados de la simulación para un transductor de $I_{SATA} = 0.25 \text{ W/cm}^2$ que trabaja en tendón.....	136
<b>Tabla 5.10:</b> Evolución del incremento de temperatura que se registra en los puntos del eje axial central para un tejido muscular insonificando con un transductor de 2 MHz que emite una $I_{SATA} = 0.51 \text{ W/cm}^2$ y resultados del ajuste de las curvas obtenidas a una función de la forma: $\Delta T = k e^{-a z (mm)}$ .....	136
<b>Tabla 5.11:</b> Significado y valor de los parámetros que aparecen en la eq.(5.26), según el tejido que corresponda .....	137
<b>Tabla 5.12:</b> Estudios del calentamiento in vivo con un tratamiento de US aplicado con un transductor tipo pistón .....	139
<b>Tabla 5.13:</b> Comparación de las tasas de calentamiento in vivo de estudios publicados y las obtenidas aplicando la eq.(5.26).....	139
<b>Tabla 5.14:</b> Propiedades acústicas de tejidos biológicos y coeficiente de reflexión en una interfaz de hueso .....	140
<b>Tabla 5.15:</b> Propiedades mecánicas de las células de tejido blando en mamíferos.....	142
<b>Tabla 5.16:</b> Significado y valor de los parámetros que aparecen en la eq.(5.37), según el tejido que corresponda. ....	145
<b>Tabla 5.17:</b> Valores de los parámetros acústicos de los dos protocolos del tratamiento combinado que se propone en este trabajo, para diferentes tejidos y según la profundidad de la lesión.....	150
<b>Tabla 5.18:</b> Órdenes de magnitud de los parámetros acústicos de las modalidades de US terapéuticos que se emplean en la actualidad y las propuestas en este trabajo.....	152
<b>Tabla 5.19:</b> Referencias bibliográficas que muestran resultados positivos en la aplicación de US terapéuticos in vivo y sugieren parámetros de dosificación clínicos .....	153
<b>Tabla 5.20:</b> Referencias bibliográficas que muestran resultados positivos en la aplicación de US terapéuticos y sugieren parámetros de dosificación en estudios in vitro.....	154
<b>Tabla 5.21:</b> Valores de los parámetros acústicos en la zona de la lesión de los dos protocolos del tratamiento combinado que se propone en este trabajo, para diferentes tejidos y según la frecuencia del transductor .....	157





## Lista de Figuras

---

### Capítulo 1

- Fig. 1.1:** Ilustración del diagrama de fases del agua ..... 12
- Fig. 1.2:** Ilustración de la evolución del radio de una burbuja bajo la acción de un campo de presión oscilante..... 13

### Capítulo 2

- Fig. 2.1:** Configuración experimental para la medida del calentamiento con el método de PES..... 21
- Fig. 2.2:** Ilustración de la geometría de simulación (A) Diseño 2D (B) 3D ..... 22
- Fig. 2.3:** Configuración experimental en la medida de temperatura con Imagen OA ..... 23
- Fig. 2.4:** Sistemática para obtener la variación de T entre dos imágenes con Imagen OA..... 23
- Fig. 2.5:** (A) Señal acústica registrada con el ecógrafo y (B) Zoom al tramo que contiene el termopar, para el instante en el que se inicia la insonificación y transcurridos 10 s y 20 s ..... 25
- Fig. 2.6:** Evolución térmica de la señal adquirida. (B): Comparación del registro del termopar y de la curva obtenida que contiene el máximo de temperatura ..... 26
- Fig. 2.7:** Distribución 2D de (A) amplitud de presión acústica y (B) intensidad ..... 27
- Fig. 2.8:** (A) Simulación de la distribución 2D del incremento de temperatura que se produce tras 15 s de insonificación. (B) Evolución térmica del foco (C) Isocontornos del volumen que posee al menos el 50 % de presión (en azul) y de temperatura (en rojo) respecto de los máximos obtenidos ..... 27
- Fig. 2.9:** (A) Localización del eje radial analizado, representado en rojo. (B) Incremento térmico obtenido en esos puntos para diferentes instantes en la simulación ..... 28
- Fig. 2.10:** Profundidad del foco dentro del tejido respecto de la superficie que está enfrentada al transductor de OA:  $a=0$  mm,  $b=1.5$  mm y  $c=3$  mm ..... 30
- Fig. 2.11:** Distribuciones de intensidad de la Imagen OA correspondientes al instante de máximo incremento térmico según la posición del foco (Fig.2.10)  $a=0$  mm,  $b=1.5$  mm y  $c=3$  mm [Landa FJO 2019] ..... 31
- Fig. 2.12:** Monitorización 3D de las distribuciones de temperatura durante un tratamiento de MIFU en una muestra de tejido ex vivo..... 31
- Fig. 2.13:** Evolución térmica de los puntos señalados en la Fig.2.12 durante un tratamiento de MIFU, (A) calculado con Imagen OA y (B) resultado de la simulación para puntos similares..... 32
- Fig. 2.14:** (A) Distribución 2D y (C) radial de la amplitud relativa en el plano transversal del foco emitido por el transductor usado comparadas con las del simulado, (B) y (D), respectivamente..... 33

### Capítulo 3

<b>Fig. 3.1:</b> Esquema de la configuración experimental estudiada. Insonificación del cultivo colocando el transductor en la base de la placa.....	37
<b>Fig. 3.2:</b> Distribución de la amplitud de presión de rarefacción de un pulso de 5 ciclos de $200 \text{ kPa}_{pp}$ y 1MHz propagándose en la dirección +z en un plano (a) xz y (b) xy, cuando se simula el caso de insonificación de un pocillo desde su base. Con una altura de líquido de 9 mm, una capa de acoplamiento de 0.4 mm y un grosor de la base de poliestireno de 1.25 mm [Hensel K] .....	38
<b>Fig. 3.3:</b> (a) Simulación y (b) medida de la distribución de presión en la base del pocillo para una altura de líquido de 10 mm y un pulso de 10 ciclos [Hensel K].....	39
<b>Fig. 3.4:</b> Amplitud de vibración en la dirección transversal del transductor comercial de 1 MHz <i>Panametrics V314</i> . (A) Barrido de toda la superficie. (B) Datos a lo largo de un diámetro (en azul) y promedio correspondiente a las diferentes zonas para su simulación (en rojo) .....	43
<b>Fig. 3.5:</b> Desfase de la señal adquirida en 101 puntos a lo largo de un diámetro del transductor .....	44
<b>Fig. 3.6:</b> Representación del transductor diseñado para simular el comportamiento del transductor comercial de 1 MHz .....	44
<b>Fig. 3.7:</b> Distribución 2D de la amplitud de presión máxima cuando el transductor emite en agua para (A) un pistón ideal de 19 mm y (B) una superficie no homogénea como la del transductor <i>Panametrics V314</i> . .....	45
<b>Fig. 3.8:</b> Distribución 2D de la amplitud de la presión máxima en agua en un plano transversal a una distancia de 1 mm de la superficie de emisión para (A) un pistón ideal de 19 mm y (B) una superficie no homogénea como la que tiene el transductor <i>Panametrics V314</i> .....	45
<b>Fig. 3.9:</b> Distribución 2D de la amplitud de la presión acústica máxima en agua en un plano transversal a una distancia de $\approx 1.3 \text{ mm}$ .....	46
<b>Fig. 3.10:</b> Distribución 2D de la amplitud de la presión acústica máxima en agua en un plano transversal calculada a una distancia de 1.3 mm.....	46
<b>Fig. 3.11:</b> Distribución 2D de la amplitud de presión máxima en un plano transversal (A) en condiciones de campo libre, (B) en un plano con un máximo de interferencia y (C) en un plano con un mínimo de interferencia, debido a la presencia de una interfaz de aire a $\approx 7.4 \text{ mm}$ de distancia.....	48
<b>Fig. 3.12:</b> Distribución 2D de la amplitud de presión máxima cuando el transductor emite en modo continuo desde la base del pocillo .....	50
<b>Fig. 3.13:</b> Distribución 2D de la amplitud de presión máxima en un plano transversal situado en la base del pocillo .....	50
<b>Fig. 3.14:</b> Pulsos de excitación del transductor empleados en el análisis de la evolución temporal del campo acústico confinado en el pocillo. (A) Pulso corto y (B) largo.....	51
<b>Fig. 3.15:</b> Evolución temporal de la amplitud de presión en el centro de la base del pocillo para un pulso de 5 ciclos (azul) y de 30 ciclos (rojo) (A) Datos medidos (B) Simulación.....	52
<b>Fig. 3.16:</b> Evolución temporal de la amplitud de presión calculada en puntos a una distancia r del centro. (A) Para un pulso de excitación del transductor de 5 ciclos como el mostrado en la Fig.3.14A. (B) Para un pulso de excitación del transductor de 30 ciclos como el mostrado en la Fig.3.14B .....	54

<b>Fig. 3.17:</b> Evolución temporal del valor máximo de la amplitud de presión en la base del pocillo .....	55
<b>Fig. 3.18:</b> Comparación de la evolución temporal del valor máximo de amplitud de presión en la base (curva sólida) y la amplitud en el centro (curva punteada) .....	55
<b>Fig. 3.19:</b> Distribución 2D de la amplitud de presión máxima (A) cuando el tamaño del transductor ( $D_1 = 10$ mm) es menor que el diámetro del pocillo ( $D_p = 22,2$ mm), (C) cuando es mayor ( $D_2 = 24$ mm) (B y D) ajustándose el valor máximo de la escala a un décimo del máximo en cada caso, para apreciarse la transmisión por las paredes .....	56
<b>Fig. 3.20:</b> Sistemática propuesta para conocer los valores acústicos en un experimento de insonificación in vitro .....	64
<b>Fig. 3.21:</b> Relaciones entre los parámetros acústicos del transductor cuando emite en campo libre y los que se tienen en la configuración experimental .....	69

## Capítulo 4

<b>Fig. 4.1:</b> (A) Esquema y (B) situación real de la configuración experimental.....	74
<b>Fig. 4.2:</b> (A) Esquema y (B) onda de presión acústica dentro del pocillo para el Protocolo A .....	74
<b>Fig. 4.3:</b> (A) Esquema y (B) onda de presión acústica dentro del pocillo para el Protocolo B .....	74
<b>Fig. 4.4:</b> Ejemplo de la sistemática seguida para el conteo celular y la cuantificación de la superficie ocupada a partir de las imágenes de microscopía .....	77
<b>Fig. 4.5:</b> (A) Fibroblasto control, (B) fibroblasto más estrecho y con prolongaciones más largas que el control y (C) restos celulares.....	77
<b>Fig. 4.6:</b> Módulo de impedancia de la piezocerámica empleada en las insonificaciones a fibroblastos (PZT-4, 25 mm de diámetro). El mínimo se encuentra en 1.91 MHz .....	77
<b>Fig. 4.7:</b> Distribución 2D de la amplitud de vibración de la superficie de emisión del transductor .....	78
<b>Fig. 4.8:</b> Desfase de la señal adquirida en 126 puntos a lo largo de un diámetro del transductor .....	78
<b>Fig. 4.9:</b> Relación entre la potencia registrada en la balanza de fuerza radiación (W) y el voltaje aplicado (Vpp) .....	79
<b>Fig. 4.10:</b> (A) Distribución 2D de la amplitud de presión máxima de la apertura plana circular de 1.9 MHz y 25 mm, con 4 nm de amplitud de desplazamiento en agua. (B) Amplitud de presión en cada punto del eje axial central ( $r=0$ ).....	80
<b>Fig. 4.11:</b> Distribución 2D de la intensidad ( $I_{SPTP}$ ).....	80
<b>Fig. 4.12:</b> Evolución de la potencia (W) transmitida por el transductor conforme aumenta la profundidad .....	80
<b>Fig. 4.13:</b> Distribución 2D de la amplitud de presión máxima dentro del pocillo cuando el transductor vibra con 4 nm de amplitud de desplazamiento .....	82
<b>Fig. 4.14:</b> Puntos con un factor $\geq 2$ de amplitud de presión respecto al máximo para campo libre (140 kPa) .....	82
<b>Fig. 4.15:</b> Distribución 2D de la amplitud de presión máxima en la base del pocillo cuando el transductor vibra con 4 nm de amplitud de desplazamiento .....	82
<b>Fig. 4.16:</b> Pulso del desplazamiento impuesto a la superficie del transductor en la simulación para un pulso corto .....	83

<b>Fig. 4.17:</b> Distribución 2D de la amplitud de presión máxima para diferentes instantes cuando el transductor emite en el pocillo un pulso como el de la Fig.4.16.....	83
<b>Fig. 4.18:</b> Evolución temporal de la amplitud de presión en un punto a 1 mm de la superficie. ....	84
<b>Fig. 4.19:</b> Distribución 2D del valor $P_{rms}$ de un pulso de 200 ciclos en un plano transversal próximo a la base del pocillo .....	84
<b>Fig. 4.20:</b> Valor de la integral, media, rms y máximo de la amplitud de la señal de presión acústica registrada en unidades relativas al máximo en cada caso.....	85
<b>Fig. 4.21:</b> Representación de los puntos sobre los que se adquiere la señal acústica .....	86
<b>Fig. 4.22:</b> Ejemplos ilustrativos de las señales adquiridas, para un pulso de excitación del transductor de 10 Vpp y 200 ciclos en el punto (A) 0 y (B) 4 de la Fig.4.21 .....	86
<b>Fig. 4.23:</b> Valores de (A) amplitud de presión máxima y (B) densidad de energía en las 11 posiciones del hidrófono ilustradas en la Fig.4.21, para un pulso de excitación del transductor de 200 ciclos y 10 Vpp .....	86
<b>Fig. 4.24:</b> Señal adquirida para un pulso de excitación del transductor de 5 ciclos de 18 Vpp .....	87
<b>Fig. 4.25:</b> Señal para un pulso de excitación del transductor de de 10 Vpp y 5 ciclos en el punto 0 de la Fig.4.21 .....	87
<b>Fig. 4.26:</b> Valores de (A) amplitud de presión máxima y (B) densidad de energía en las 11 posiciones del hidrófono ilustradas en la Fig.4.21, para un pulso de excitación del transductor de 5 ciclos y 10 Vpp .....	88
<b>Fig. 4.27:</b> % Viabilidad respecto del control en los grupos insonificados con el Protocolo A, a las 24 h, 48 h y 7 d .....	91
<b>Fig. 4.28:</b> Estado del cultivo para el caso control (A) a las 24 h (B) a las 48 h y (C) a los 7 d, tras la insonificación .....	92
<b>Fig. 4.29:</b> % Número de células en los grupos insonificados con el Protocolo A, a las 24 h.....	93
<b>Fig. 4.30:</b> % Superficie ocupada por los fibroblastos en los grupos insonificados con el Protocolo A, a las 24 h .....	93
<b>Fig. 4.31:</b> Comparación entre la distribución relativa del valor $P_{rms}$ para una señal de 200 ciclos y el resultado de la tinción a los 8 d tras la insonificación. El barrido corresponde a un área de 14 x 14 mm y el diámetro del pocillo es de 22.2 mm.....	95
<b>Fig. 4.32:</b> Registro del incremento de temperatura en la posición en la que se sitúa el cultivo celular (base del pocillo) durante la insonificación de mayor intensidad (MAP). .....	96
<b>Fig. 4.33:</b> Amplitud de $f_0/2$ y del ruido blanco con la corriente de excitación del transductor [Neppiras EA].....	101
<b>Fig. 4.34:</b> Variación de la amplitud relativa de los ultra armónicos $2f_0$ y $3f_0$ respecto del armónico fundamental $f_0$ para un pulso de 200 ciclos según varía el voltaje aplicado al transductor .....	103
<b>Fig. 4.35:</b> Factor de aumento de la componente espectral (A) $f_0$ y (B) $2f_0$ respecto del factor que se ha aumentado el voltaje aplicado al transductor y ajuste lineal a una función polinómica de los datos .....	103
<b>Fig. 4.36:</b> Variación de la amplitud relativa de los ultra armónicos (A) $2f_0/f_0$ y (B) $3f_0/2f_0$ para un pulso de 200 ciclos y 15 Vpp aplicados al transductor según varía el instante en el que está centrada la adquisición (Tabla 4.8).....	104
<b>Fig. 4.37:</b> Variación de la amplitud relativa de los ultra armónicos $2f_0$ y $3f_0$ respecto del armónico fundamental $f_0$ para un pulso de 15 Vpp aplicados al transductor según varía el número de ciclos .....	105

<b>Fig. 4.38:</b> % Viabilidad respecto del control en los grupos insonificados con el Protocolo B1, a las 24 h, 48 h y 7 d .....	108
<b>Fig. 4.39:</b> % Viabilidad respecto del control en los grupos insonificados con el Protocolo B2, a las 24 h, 48 h y 7 d. ....	109
<b>Fig. 4.40:</b> % Número de células respecto del control, medidas a las 24 h, para los casos de: (A) B1, mismo tiempo total de insonificación (300 s) y (B) B2, misma energía total ( $\rho_{E\ total} = 88.8\ mJ/mm^2$ ).....	109
<b>Fig. 4.41:</b> % Superficie ocupada por los fibroblastos, medida a las 24 h, para los casos de: (A) B1, mismo tiempo total de insonificación (300 s) y (B) B2, misma energía total ( $\rho_{E\ total} = 88.8\ mJ/mm^2$ .....	110
<b>Fig. 4.42:</b> (A) Comportamiento de la célula ante un estímulo mecánico. (B) Saturación que se produce si los estímulos se dan muy seguidamente .....	115

## Capítulo 5

<b>Fig. 5.1:</b> Ilustración de la geometría de simulación para cada modelo (A) Pistón (B) Focalizado .....	123
<b>Fig. 5.2:</b> Módulo de impedancia eléctrica del transductor para ensayos con animales. El mínimo está en 2.04 MHz ...	125
<b>Fig. 5.3:</b> Distribución 2D de la amplitud de presión máxima para el transductor (A) plano (B) focalizado, cuando tienen la misma amplitud de desplazamiento de la onda emitida (7 nm) .....	125
<b>Fig. 5.4:</b> Distribución 2D de la intensidad para el transductor (A) plano (B) focalizado, cuando tienen la misma amplitud de desplazamiento de la onda emitida (7 nm) .....	125
<b>Fig. 5.5:</b> Distribución 2D del incremento térmico al final de la insonificación y datos en el eje transversal en el centro del tendón para el transductor (A) y (B) plano, y (C) y (D) focalizado, con la misma amplitud de desplazamiento de la onda emitida (7 nm) .....	126
<b>Fig. 5.6:</b> (A) Distribución 2D del incremento térmico al final de la insonificación y (B) datos en el eje transversal en el centro del tendón para el transductor plano para una amplitud de desplazamiento de la onda emitida de 47 nm .....	127
<b>Fig. 5.7:</b> (A) Localización de los puntos que se analizan dentro del tejido, en rojo. Resultados de la evolución térmica en esos puntos para el transductor (B) plano y (C) focalizado .....	127
<b>Fig. 5.8:</b> Señal de presión acústica registrada con un hidrófono en una muestra de tejido muscular ex vivo para un pulso de 200 ciclos de 2 MHz y un voltaje de excitación del transductor de 30 Vpp .....	138
<b>Fig. 5.9:</b> (A) Disposición en laboratorio del sistema para medir el incremento de temperatura en el tejido. (B) Registro obtenido para una insonificación de 300 s, $1.66\ W/cm^2$ , DC = 0.1.....	138
<b>Fig. 5.10:</b> Amplitud de desplazamiento impuesta a la apertura circular plana de 1 cm de diámetro .....	146
<b>Fig. 5.11:</b> Distribución 2D de la amplitud de presión máxima para (A) $t = 1\ \mu s$ , (B) $t = 3\ \mu s$ ( $z \approx 4\ mm$ ) y (C) $t = 12.3\ \mu s$ ( $z \approx 20\ mm$ ).....	147
<b>Fig. 5.12:</b> (A) Amplitud de desplazamiento impuesta a la apertura circular plana de 1 cm de diámetro. (B) Registro de la señal acústica en puntos situados a 5 mm de profundidad. Distribución 2D de la amplitud máxima de presión los instantes señalados en un plano (C) xy y (D) zx .....	148
<b>Fig. 5.13:</b> Evolución temporal en el plano transversal a $z = 5\ mm$ de (A) superficie con una amplitud $\geq 0.8\ MPa$ y (B) la presión acústica máxima puntual .....	149

**Fig. 5.14:** Procesos biológicos derivados de la estimulación térmica debida a la absorción de los US que se propone en nuestro tratamiento con el primer protocolo ..... 158

**Fig. 5.15:** Procesos biológicos derivados de la estimulación mecánica debida a los US que se propone en nuestro tratamiento con el segundo protocolo ..... 159

## Lista de símbolos y acrónimos

Símbolo	Descripción	Unidades SI
$\mu$	Viscosidad dinámica	[Pa · s]
<b>a</b>	Radio de la apertura radiante	[m]
<b>B</b>	Factor de escala de aumento de las reacciones enzimáticas con la temperatura (Factor de Boltzman)	Adim.
<b>c</b>	Velocidad de propagación del sonido	[m/s]
<b>C</b>	Parámetro asociado a la perfusión sanguínea para el cálculo de la dosis	Adim.
<b>C<sub>p</sub></b>	Calor específico	[J/kg K]
<b>D</b>	Diámetro de la apertura radiante	[m]
<b>DC</b>	Ciclo de trabajo	%
<b>D<sub>p</sub></b>	Diámetro del pocillo	[m]
<b>E</b>	Energía acústica	[J]
<b>ε</b>	Parámetro asociado a la perfusión sanguínea para el cálculo de la dosis	Adim.
<b>E<sub>i</sub></b>	Energía de activación de una reacción	[eV]
<b>ERA</b>	Área radiante efectiva	[m <sup>2</sup> ]
<b>f</b>	Frecuencia	[Hz]
<b>F</b>	Fuerza	[N]
<b>FFT</b>	Transformada de Fourier de la señal	[dB]
<b>f<sub>r</sub></b>	Frecuencia de resonancia de la burbuja	[Hz]
<b>F<sub>rad</sub></b>	Fuerza de radiación del campo acústico	[N]
<b>γ</b>	Coefficiente de calor específico	Adim.
<b>H</b>	Densidad de energía óptica	[J/m <sup>3</sup> ]
<b>hl</b>	Altura de medio de cultivo dentro de un pocillo de experimentación in vitro	[m]
<b>I</b>	Intensidad de la onda acústica	[W/m <sup>2</sup> ]
<b>ISATA</b>	Promedio espacial y temporal de la intensidad	[W/m <sup>2</sup> ]
<b>ISATP</b>	Promedio espacial de la intensidad en un instante	[W/m <sup>2</sup> ]
<b>ISPTA</b>	Promedio temporal del máximo de intensidad espacial	[W/m <sup>2</sup> ]
<b>ISPTP</b>	Máximo de intensidad espacial en un instante	[W/m <sup>2</sup> ]



<b>k</b>	Conductividad térmica	[W/m K]
<b>K</b>	Módulo de compresibilidad	[Pa]
<b>k<sub>B</sub></b>	Constante de Boltzman	[eV/K]
<b>k<sub>f</sub></b>	Número de onda	[m <sup>-1</sup> ]
<b>k<sub>h</sub></b>	Tasa de variación de la velocidad del sonido con el calentamiento	[m/ s °C]
<b>l<sub>p</sub></b>	Longitud espacial del pulso de US	[m]
<b>MI</b>	Índice Mecánico	Adim.
<b>n</b>	Número de ciclos del pulso de US	Ud.
<b>nf<sub>o</sub></b>	Frecuencia del armónico n	[Hz]
<b>P</b>	Presión	[Pa]
<b>P<sub>-</sub></b>	Amplitud máxima del ciclo de rarefacción de la onda acústica	[Pa]
<b>P<sub>+</sub></b>	Amplitud máxima del ciclo de compresión de la onda acústica	[Pa]
<b>P<sub>A</sub></b>	Presión ambiente	[Pa]
<b>P<sub>F</sub></b>	Amplitud máxima de la onda acústica en el límite de Fraunhofer	[Pa]
<b>PRF</b>	Frecuencia de repetición del pulso de US	[s] ó [Hz]
<b>P<sub>rms</sub></b>	Valor del promedio cuadrático de la presión	[Pa]
<b>Q</b>	Tasa de calentamiento	[W/m <sup>3</sup> ]
<b>Q<sub>met</sub></b>	Tasa de calentamiento asociada al metabolismo	[W/m <sup>3</sup> ]
<b>R</b>	Constante para el cálculo de la dosis térmica	Adim.
<b>r</b>	Posición radial	[m]
<b>R<sub>o</sub></b>	Radio de equilibrio de la burbuja	[m]
<b>R<sub>c</sub></b>	Radio de la célula	[m]
<b>r<sub>p</sub></b>	Radio del pocillo de experimentación in vitro	[m]
<b>S</b>	Tensión superficial	[kg/s <sup>2</sup> ]
<b>SF<sub>m</sub></b>	Factor de escala de aumento de la perfusión sanguínea con la temperatura en músculo	Adim.
<b>T</b>	Temperatura	[°C]
<b>t</b>	Tiempo	[s]
<b>t<sub>43</sub></b>	Dosis térmica equivalente a una temperatura de 43 °C. También se denomina CEM ( <i>Cumulative Equivalent Minutes</i> )	[min]
<b>T<sub>f</sub></b>	Período de la onda	[s]

<b>ton</b>	Tiempo que se mantiene encendido el transductor	[s]
<b>T<sub>p</sub></b>	Parámetro asociado a las propiedades del tejido para el cálculo de la dosis	Adim.
<b>u</b>	Velocidad de las partículas	[m/s]
<b>V</b>	Amplitud pico de voltaje de excitación del transductor	[V]
<b>Vol</b>	Volumen	[m <sup>3</sup> ]
<b>V<sub>pp</sub></b>	Amplitud pico-pico de voltaje de excitación del transductor	[V]
<b>w</b>	Frecuencia angular	[rad/s]
<b>W</b>	Potencia del campo acústico	[W]
<b>w<sub>b</sub></b>	Tasa de perfusión sanguínea	[kg/m <sup>3</sup> s]
<b>Y</b>	Módulo de Young	[Pa]
<b>Z</b>	Impedancia acústica	[kg/m <sup>2</sup> s]
<b>z</b>	Profundidad, coordenada del eje z	[m]
<b>α</b>	Coefficiente de atenuación del sonido	[Np/m]
<b>α<sub>a</sub></b>	Coefficiente de absorción óptico	[dB/m]
<b>β</b>	Coefficiente de no linealidad	Adim.
<b>δt</b>	Tiempo que la onda mantiene una amplitud mayor o igual a la mitad de su máximo	[s]
<b>λ</b>	Longitud de onda	[m]
<b>ρ</b>	Densidad del medio	[kg/m <sup>3</sup> ]
<b>ρ<sub>E</sub></b>	Densidad de energía acústica	[J/m <sup>2</sup> ]
<b>τ</b>	Tensión	[N/m]
<b>τ<sub>c</sub></b>	Tensión crítica de rotura de membrana plasmática	[N/m]
<b>τ<sub>act</sub></b>	Tensión de la membrana plasmática para la activación de los canales mecanosensibles	[N/m]
<b>τ<sub>rep</sub></b>	Tensión de la membrana plasmática en reposo	[N/m]
<b>Γ</b>	Coefficiente de reflexión de la onda en una interfaz	Adim.
<b>Γ<sub>G</sub></b>	Parámetro de Grüneisen	Adim.
<b>Φ</b>	Fluencia del haz de luz láser	[J/m <sup>2</sup> ]
<b>φ</b>	Tiempo de perfusión sanguínea	[s]



## Capítulo 1.

# Aplicaciones Terapéuticas de los Ultrasonidos

### 1. Introducción y motivación de la Tesis

Las Fisioterapia es una disciplina que comienza a tomar importancia desde finales del s. XIX. En España esta especialidad se crea por primera vez en un Decreto en 1957 con la denominación de ayudante de Fisioterapia y la Diplomatura en Fisioterapia surge en 1980 [Vidal IR]. Los Ultrasonidos (US) son una de las terapias más difundidas en las clínicas de Fisioterapia y Rehabilitación. Diversas encuestas a fisioterapeutas revelan resultados como que al menos el 20 % de los tratamientos que aplican en sus clínicas involucran US y un 64 % los usan todos los días [Watson T 2008] o que un 33 % de los encuestados tiene acceso a 3 o más unidades de US y sólo el 1 % no los han usado nunca [Warden SJ].

Hasta la fecha, las intensidades de los US que se emplean generalmente en terapia se agrupan en dos grandes grupos:  $\leq 3 \text{ W/cm}^2$  ó  $\geq 1 \text{ kW/cm}^2$ , con dos objetivos muy diferentes: el primer grupo para rehabilitación (TUS, *Therapeutic Ultrasound*) [Ter Haar G 1999, Miller DL 2012] y el segundo para ablación (HIFU, *High Focused Ultrasound*) [Ter Haar G 2007]. Existe por tanto un rango muy amplio de dosis cuya efectividad todavía no se ha estudiado en profundidad. Se ha comenzado a utilizar el concepto MIFU (*Middle Intense Focused Ultrasound*) para denominar a este intervalo. En esta Tesis se trabaja en ese rango.

La innovación tecnológica en el desarrollo de transductores debe ayudar para aplicar las dosis de manera cada vez más efectiva, mejorándose el rendimiento y la capacidad de restringir los efectos que se logran a zonas bien delimitadas. En relación a esto, los arrays y las lentes con capacidad de focalización deben sustituir al diseño convencional tipo pistón, que sólo debe emplearse en los primeros niveles de investigación para estudiar, p.e. los efectos de un nuevo tratamiento en cultivos in vitro o pequeños animales.

En cuanto a los efectos térmicos, el calentamiento que se produce con una insonificación puede predecirse gracias a herramientas de cálculo que resuelven las ecuaciones que lo rigen (p.e. ecuación de bio-calor de Pennes [Pennes HH]) o simplificaciones de las mismas que permiten dar un valor estimado. Muchos tratamientos basan su efectividad en alcanzar un umbral térmico y por ello es necesario desarrollar técnicas que permitan cuantificar la temperatura que se alcanza. Mantener la no invasividad de la medida también debe ser un requerimiento de la técnica empleada. En este sentido, existen en la actualidad métodos bien conocidos para cuantificar la temperatura (termografía infrarroja [Lahiri B], resonancia magnética [Hynynen K], medida de los retardos de la señal recibida por dispersión [Maass Moreno R Part I y Part II], ...). Sin embargo, el

desarrollo científico y tecnológico hace emerger nuevas posibilidades. La imagen optoacústica (OA) es una novedosa técnica de imagen que permite monitorizar con alta precisión parámetros como la distribución de la temperatura en un tejido [Ke H, Yao J]. Presenta grandes ventajas frente a técnicas más convencionales, aunque tiene una clara limitación respecto a la profundidad en el tejido.

Los efectos no térmicos en células y tejidos asociados a los US son considerados actualmente de gran importancia para la reparación y reconstrucción de lesiones músculo esqueléticas [Izadifar Z]. En los últimos años se ha hecho un esfuerzo por llegar a entender las implicaciones a nivel celular de las ondas de US, habiéndose avanzado mucho, pero quedando aún preguntas por resolver. Así, la investigación en cultivos *in vitro* es el primer paso para desvelar los mecanismos de mecanotransducción que se generan. En este tipo de estudios se echa en falta en la bibliografía una sistemática estándar en los experimentos. La metodología de experimentación muchas veces viene condicionada por las posibilidades de los laboratorios, pero debe hacerse un esfuerzo por establecer unas bases comunes para facilitar la comparación de resultados.

Esta Tesis se ha planteado para ayudar a sentar las bases físicas de la aplicación de US en experimentación y terapia. En ella se investigan nuevas técnicas no invasivas de cuantificación de los efectos térmicos en tejidos y se estudian los no térmicos en un cultivo celular con una monocapa de fibroblastos. Además, se propone en este trabajo un nuevo protocolo de insonificación que involucra intensidades en un rango hasta ahora no estudiado, MIFU. Supone, por tanto, un trabajo que correlaciona la acción de los US con efectos a nivel celular y que pretende dar un paso más en el conocimiento de las implicaciones a nivel fisiológico de la aplicación de una radiación de tipo no ionizante como son los US.

## 2. Aplicaciones actuales de los Ultrasonidos en Fisioterapia

Los US son ondas mecánicas con una frecuencia mayor de 20 kHz, por encima del umbral audible de los humanos. Típicamente, en Fisioterapia, se emplean frecuencias entre 1 y 3 MHz generadas por transductores basados en resonadores piezoeléctricos. Desde la década de los años 30 viene empleándose en Rehabilitación, cada vez con más frecuencia [Erikson KR, Miller DL 2012]. Para estas aplicaciones el campo acústico se transmite directamente al paciente a través de una fina capa de medio que sirve de acoplamiento (p.e. hidrogel o aceite).

El Ultrasonido Terapéutico (*TUS*), se emplea como agente reparador tisular a bajas y medias intensidades ( $0.125 - 3 \text{ W/cm}^2$ ) y como método quirúrgico para destruir tejido patológico o para litotricia con los niveles de energía más elevados ( $\geq 5 \text{ W/cm}^2$ ) [Ter Haar G 1995, Ter Haar G 1999].

En el caso concreto de la Fisioterapia, el uso de US con fines terapéuticos se emplea en lesiones de hueso, músculo, tendón y ligamentos desde hace más de 50 años [Watson T 2008] con intensidades promedio de hasta  $3 \text{ W/cm}^2$  [Robertson VJ, Yadollahpour A, Speed CA, Albornoz M]. A pesar de que se usan desde hace décadas, no se conoce con exactitud todos los efectos a nivel

fisiológico que hacen que los US resulten eficaces en un tratamiento de Fisioterapia. Entre otras consecuencias biológicas se ha demostrado que los US:

- Son un agente inflamatorio, teniendo un efecto estimulador sobre los tipos celulares que hacen de mediadores en este tipo de reacciones, p.e. mastocitos [Maxwell L, Fyfe MC].
- Estimulan la proliferación de tipos celulares implicados en los procesos de recuperación tisular en tejido blando, como son los fibroblastos [Doan N, Tasi WC 2011, Frairia R].
- Aumentan la secreción de sustancias favorecedoras, como son la expresión de colágeno, factores de crecimiento o proteínas, influyentes en la estimulación de la migración, proliferación y síntesis de las células [Tsai WC 2006, Webster DF 1978, Webster DF 1980].
- Aumentan la permeabilidad de la membrana plasmática a ciertos iones y sustancias, como el calcio [Sundaram J, Mortimer AJ].
- Estudios a largo plazo en la recuperación de lesiones tisulares demuestran que la aplicación de US durante la cicatrización ayuda a mejorar la orientación de las fibras de colágeno o a que se tengan estructuras con mejores propiedades elásticas, incrementándose la tensión de rotura y la movilidad [Watson T 2008].
- Disminuyen las limitaciones en el movimiento de articulaciones y mejoran de contracturas musculares [Enwemeka CS].
- Han dado buenos resultados en la recuperación de fracturas óseas [Claes L].
- Pueden dañar tejidos que naturalmente tienen alto contenido gaseoso como son pulmones e intestinos [Dalecki D 2004].
- Pueden dañar la microvasculatura y aumentar la angiogénesis [VanBabel E, Holfeld J].
- Pueden modificar el ritmo cardiaco y los reflejos musculares por influir sobre las fibras nerviosas [Dalecki D 2004].
- Tienen efecto analgésico, reduciendo el dolor [Szabo TL].

La elección de los parámetros acústicos debe adecuarse a la fase de evolución de la lesión. El pulso de US con parámetros que aumenten la temperatura puede agravar un sangrado o una inflamación, y, al revés, un pulso muy corto puede no ser efectivo en una fase crónica, ya que se requiere dar calor para facilitar la elongación y circulación en la zona. En una encuesta realizada a 171 fisioterapeutas del Grupo de Fisioterapia Deportiva de Australia se reporta que si se encuentran una patología aguda, el 86 % emplea intensidades entre  $0.51$  y  $1.5 \text{ W/cm}^2$  y el 81 % insonifica en modo pulsado, y si tienen una patología crónica el 90 % usa entre  $1$  y  $2 \text{ W/cm}^2$  y el 95 % lo hace en modo continuo [Warden SJ]. Por lo general son insonificaciones que duran una media de 5 minutos, comprendidas en un rango de entre 2 y 20 minutos, siendo las más largas las empleadas en las condiciones más persistentes. Los trastornos agudos se tratan diariamente y los procesos más crónicos lo hacen 2 o 3 veces por semana.

Los equipos de US capaces de trabajar con intensidades más altas que las empleadas para Fisioterapia ( $> 5 \text{ W/cm}^2$  y hasta varios  $\text{kW/cm}^2$ ) pueden llegar a intensidades acústicas capaces de lograr la ablación tisular. Esto, de manera controlada, brinda la oportunidad de usar los US para el tratamiento no invasivo de tejidos tumorales por aumento de temperatura o a la destrucción de

cálculos o piedras en el riñón u otros órganos por la amplitud de la onda de presión [Ter Haar G 1995, Ter Haar G 2007]. Las grandes intensidades y la precisión en la localización de la dosis que se requiere, hacen que en estos casos se usen campos acústicos focalizados. Esta tecnología logra que la energía se concentre en un volumen mucho menor que en el caso convencional (tipo pistón), incrementándose hasta dos órdenes de magnitud la intensidad en el punto focal del haz y alcanzándose así los valores requeridos para este tipo de intervenciones.

Para el caso de la litotricia se aprovecha el fenómeno no térmico de la cavitación, que tiene lugar cuando se emplean ondas mecánicas con una amplitud de presión muy alta ( $> 10$  MPa), denominadas ondas de choque (*SW, Shock Wave*) y que logra la rotura de estructuras rígidas como son los cálculos o calcificaciones [Lingeman JE].

Otro uso médico de los US de potencia que cada vez es más frecuente es el de mediador para la liberación de fármacos o la rotura de la barrera hematoencefálica [Pitt WG, Hussein GA, Konofagou EE]. Para estos casos se aprovecha el efecto de los US que se conoce como sonoporación y que consiste en la apertura de poros en la membrana plasmática de las células y el consecuente aumento de la permeabilidad.

A modo de resumen se recogen en la Tabla 1.1 las modalidades en las que actualmente se emplean los US como terapia y el rango de intensidades en el que se centra cada una de ellas.

**Tabla 1.1: Aplicaciones actuales de los US en terapia.**

Modalidad	Intensidad	Aplicación	Referencias
<b>US Terapéutico (TUS)</b>	Baja y media intensidad: $I_{SATA} = 0.1 \text{ a } 3 \text{ W/cm}^2$ Alta intensidad: $I_{SATA} > 5 \text{ W/cm}^2$	Recuperación de lesiones y fracturas de tejido blando Incremento de la perfusión sanguínea Sonoporación Hipertermia (Alta intensidad)	[Ter Haar G 1999] [Watson T 2017] [Warden SJ]
<b>US Pulsado de Baja Intensidad (LIPUS)</b>	$I_{SATA} \approx 30 \text{ mW/cm}^2$ $DC_{max} \approx 20\%$	Recuperación de fracturas óseas tempranas	[Claes L]
<b>US Focalizado de Alta Intensidad (HIFU)</b>	$I_{SPTP} > 1 \text{ kW/cm}^2$	Ablación de tumores Ablación de tejidos	[Ter Haar G 2007] [Kennedy JE] [Muratore R]
<b>US Terapéutico de Alta Intensidad (ITU)</b>	$I_{SPTP} > 80 \text{ W/cm}^2$	Ablación intersticial del hígado	[Makin IRS] [Mast TD]
<b>Litotricia con Onda de Choque (SWL)</b>	50 a 400 $\text{mJ/cm}^2$	Pulverización de piedras o cálculos	[Lingeman JE]
<b>Onda de Choque Extracorpórea Terapéutica (ESW)</b>	Baja energía: 10 a 12 $\text{mJ/cm}^2$ Media energía: 10 a 40 $\text{mJ/cm}^2$ Alta energía: 30 a 100 $\text{mJ/cm}^2$	Alivio del dolor Regeneración y reparación a nivel celular de los tejidos Recuperación de fracturas	[Cheing GL] [Chung B]

### 3. Propagación de los Ultrasonidos en un medio

#### 3.1 Introducción a la teoría lineal de los Ultrasonidos

Al ser una onda de tipo mecánico, los US necesitan de un medio material para propagarse. A medida que la onda avanza, se producen en los puntos del medio variaciones de la presión respecto a su valor ambiente. Esta variación de la presión absoluta en el medio se traduce en el movimiento de las partículas, que adquieren una velocidad  $u$  [Humphrey VF]. La relación entre ambas variables viene dada por el parámetro de la impedancia acústica,  $Z$ , que es en definitiva una medida de la resistencia que el medio opone este movimiento. Se puede calcular conociendo la densidad,  $\rho$ , y la velocidad de propagación de los US,  $c$ , de manera que:

$$Z = \frac{P(z, t)}{u(z, t)} = \rho(z, t) \cdot c \quad (1.1)$$

Dado que la composición de los tejidos biológicos es en gran parte agua (p.e.  $\approx 75\%$  en músculo [Ward SR]) propiedades como la velocidad de propagación o la densidad son muy similares a las de este líquido. Este hecho justifica que en muchas aplicaciones teóricas se usen las ecuaciones de propagación en fluidos. Así, la propagación de los US en un tejido se basa en la ecuación de movimiento de Euler para un fluido, extraída a partir de la segunda ley de Newton, que cuando sólo existe dependencia de la coordenada cartesiana  $z$  y del tiempo  $t$  puede escribirse [Temkin S]:

$$-\frac{\partial P}{\partial z} = \frac{\partial}{\partial t}(\rho u) + \frac{\partial}{\partial z}(\rho u^2) \quad (1.2)$$

La ecuación de continuidad (obtenida a partir del principio de conservación de la masa) se escribe:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \frac{\partial}{\partial z}(\rho u) = 0 \quad (1.3)$$

Haciendo un desarrollo teórico lineal de las eq.(1.2) y eq.(1.3), considerando que las perturbaciones y variaciones locales de  $\rho$  son pequeñas, y que el medio es homogéneo se llega a la ecuación de onda de presión [Bruneau M]:

$$\frac{\partial^2 P}{\partial z^2} = \frac{1}{c^2} \cdot \frac{\partial^2 P}{\partial t^2} \quad (1.4)$$

Las soluciones de la eq.(1.4) pueden escribirse como ondas armónicas de la forma:

$$P(z, t) = P_0 e^{i(\omega t - k_f z)} \quad (1.5)$$

donde  $k_f$  se representa el número de onda,  $\omega$  es la frecuencia angular y  $P_0$  su amplitud máxima. Si se consideran las partes reales de esta expresión se tiene que la presión de los puntos del medio varía sinusoidalmente de la forma:



$$P(z, t) = P_o \cos (wt - k_f z) \quad (1.6)$$

Sustituyendo  $P$  en la eq.(1.1), la velocidad de las partículas viene dada por:

$$u(z, t) = \frac{P_o}{\rho c} \cos (wt - k_f z) \quad (1.7)$$

La tasa de energía liberada al medio se cuantifica con el parámetro de intensidad, que es uno de los más importantes cuando se están considerando posibles bioefectos. La intensidad instantánea en un punto vendrá dada por el producto de la presión y la velocidad de las partículas, de manera que:

$$I(z, t) = P(z, t) \cdot u(z, t) = \frac{P_o^2}{\rho c} \cos^2 (wt - k_f z) \quad (1.8)$$

Promediada en el tiempo, la intensidad, definida como el flujo de energía por unidad de tiempo y área, será:

$$I = \frac{P_o^2}{2 \rho c} \quad (1.9)$$

La potencia total del transductor puede calcularse integrando esta componente en toda el área insonificada.

En su propagación, la onda sufre una pérdida progresiva de amplitud causada por los fenómenos de difracción, dispersión y absorción. La difracción depende de la geometría de la apertura acústica y de la frecuencia. La dispersión es consecuencia de pequeñas inhomogeneidades presentes en el medio, que hacen que la impedancia acústica tenga discontinuidades, produciéndose cambios de dirección en la onda y haciendo que pierda intensidad en la dirección original de propagación. Lo mismo ocurre si el medio tiene interfaces, ya que se producen disminuciones en la transmisión. La absorción se produce si el sistema es capaz de disipar la energía acústica que recibe (deja de ser puramente elástico) y las fuerzas viscosas entre partículas causan una atenuación de la onda incidente, básicamente por conversión de la energía mecánica en calor. Matemáticamente,  $c$  adquiere carácter de variable compleja y se introduce el parámetro del coeficiente de atenuación  $\alpha$ , que engloba estos fenómenos. La caída en la amplitud de la presión vendrá dada por la expresión:

$$P(z) = P_{0z=0} e^{-\alpha z} \cos (wt - k_f z) \quad (1.10)$$

siendo  $P_{0z=0}$  la presión máxima a la salida del transductor. El parámetro  $\alpha$  depende no solo de las propiedades del medio, sino que también varía con las características onda, de manera que aumenta con la frecuencia de la misma siguiendo la relación:

$$\alpha(f) = \alpha_0 \cdot \left(\frac{f}{f_0}\right)^b \quad (1.11)$$

donde  $\alpha_0$  es el valor del coeficiente de atenuación para una frecuencia  $f_0$ . El valor del exponente  $b$  depende del medio y suele considerarse que es aproximadamente igual a la unidad en los tejidos biológicos [Kuc R].

La cuantificación de  $\alpha$ , es una de las propiedades acústicas de los tejidos más importantes para estudiar los efectos de este tipo de radiación, ya que da cuenta de la conversión de la energía acústica en otros tipos de energía (p.e. térmica) y de la capacidad de penetración de la radiación. La Tabla 1.2 muestra la profundidad a la que se estima que la energía del campo acústico ha decaído a la mitad para algunos tejidos para el caso sencillo de una onda plana propagándose [Watson T 2017].

**Tabla 1.2: Capa hemirreductora de los US en los tejidos blandos.**

	1 MHz	3 MHz
<b>Músculo</b>	9 mm	3 mm
<b>Grasa</b>	50 mm	16.5 mm
<b>Tendón/Ligamento</b>	6.2 mm	2 mm

### 3.2 Parámetros dosimétricos en un tratamiento con Ultrasonidos

La Comisión Internacional Electrotécnica, (*IEC, International Electrotechnical Comission*) es el grupo de trabajo responsable de generar los estándares internacionales de los parámetros de funcionamiento de los equipos de US, basándose en umbrales de seguridad y efectividad que se extraen a partir de los estudios que se realizan. Actualmente los fabricantes e investigadores emplean una amplia variedad de magnitudes para cuantificar las características de las insonificaciones en sus trabajos e informes [Livett AJ, Harris GR 1985]. Esto hace que, para facilitar la comparación de resultados entre trabajos de investigación, siempre se debe especificar qué criterio se ha usado para cuantificar los valores dosimétricos. Se definen a continuación los parámetros más comunes en la caracterización del campo acústico en un tratamiento de US y se denotan con las siglas que los identificarán a lo largo de todo este trabajo.

- *Tipo de emisión o modalidad*: continua, si la insonificación no se interrumpe, o pulsada, si se interrumpe en forma de pulsaciones.

- *Frecuencia (f)*: Frecuencia central de trabajo del transductor. El periodo de la señal,  $T_f$ , corresponde al inverso de la frecuencia de trabajo.

$$T_f = 1/f \quad (1.12)$$

- *Número de ciclos (n)*: Número de longitudes de onda que se emiten en cada pulso.

- *Frecuencia de repetición del pulso (PRF, Pulse Repetition Frequency)*: Periodicidad con la que se emite el pulso de US.

- *Ciclo de trabajo (DC, Duty Cycle)*: Razón entre el tiempo que dura el pulso de US y la periodicidad con la que se repite. En emisión continua el DC es 1.

$$DC = n \cdot T_f / PRF \quad (1.13)$$

- *Presión acústica (P)*: Amplitud de presión de la señal acústica.

- *Presión acústica máxima (P<sub>max</sub>)*: Módulo de la amplitud máxima que alcanza la onda.

- *Presión cuadrática promedio (P<sub>rms</sub>, Root Mean Square)*: Promedio cuadrático de la amplitud de presión, calculado como:

$$P_{rms} = \sqrt{\frac{\sum P_i^2}{N}} \quad (1.14)$$

donde  $P_i$  es el valor de la amplitud de la señal acústica en cada punto y N el número total de puntos adquiridos.

- *Área efectiva del transductor (ERA, Effective Radiating Area)*: área del plano transversal al eje de propagación que engloba los puntos en los que el módulo de la presión acústica máxima o la amplitud de desplazamiento del material piezoeléctrico es al menos el 50 % del valor máximo registrado (lo que corresponde a una caída de - 6 dB).

- *Intensidad acústica (I)*: Para una onda plana sinusoidal, se define como el promedio del producto de  $P$  y la velocidad adquirida por las partículas en un período,  $u$ . Viene dada por la eq.(1.9). Para éste parámetro de intensidad se tienen varias definiciones. Cada una de ellas se puede identificar por sus siglas, cuyo significado se recoge en la Tabla 1.3.

**Tabla 1.3: Siglas empleadas para especificar la intensidad de los US y esquema del convenio que se emplea.**

Sigla	S	T	P	A	Dónde	Cuándo
Significado	Espacial (Spatial)	Temporal (Temporal)	Pico (Peak)	Promedio (Average)	SP	TP
					SA	TA

Como esquematiza la figura de la Tabla 1.3, en la nomenclatura empleada, las dos primeras siglas identifican el lugar donde está calculada la intensidad y las dos últimas el instante o período en el que se determina. Así se tiene que:

-  $I_{SPTP}$  = Intensidad calculada en el punto en que se alcanza la máxima amplitud de presión y en un instante.

$$I_{SPTP} = \frac{P_{max}^2(z, t)}{2 \rho c} \quad (1.15)$$

-  $I_{SPTA}$  = Intensidad calculada en el punto en que se alcanza la máxima amplitud de presión y promediada temporalmente en toda la duración del pulso. Si es emisión continua coincide con la  $I_{SPTP}$ , si no, ha de promediarse con el DC.

$$I_{SPTA} = \frac{P_{max}^2(z, t)}{2 \rho c} \cdot DC \quad (1.16)$$

- $I_{SATP}$  = Intensidad promediada en la sección transversal y en un instante.
- $I_{SATA}$  = Intensidad promediada en la sección transversal y promediada temporalmente.

Hay casos en los que la sigla  $T$  se cambia por una  $P$  haciendo referencia al tiempo que dura el pulso ( $P$ , *Pulse*). Así, se tiene que p.e.:

-  $I_{SAPA}$  = Intensidad promediada en la sección transversal y promediada temporalmente sólo en el tiempo que dure el pulso.

Si la onda no puede considerarse sinusoidal, para el cálculo de la intensidad debe emplearse la integración a lo largo del pulso, de manera que:

$$I_{SPTA} = \frac{\int_0^t P^2(z, t) dt}{\rho c} \cdot DC \quad (1.17)$$

- *Potencia de trabajo del transductor (W)*: se define como la intensidad que transmite en el área de emisión ( $ERA$ ). Se calcula como:

$$W [W] = I_{SATA} [W/cm^2] \cdot ERA (cm^2) \quad (1.18)$$

También se calcula integrando los valores puntuales de intensidad en una superficie transversal a la propagación. Experimentalmente y por lo general, en metrología, el parámetro de potencia se mide empleando una balanza de fuerza de radiación [IEC 61161 1.3:2013] y la amplitud de presión e intensidad con adquisiciones puntuales con un hidrófono calibrado [IEC 62127 2:2017].

- *Densidad de energía transmitida ( $\rho_E$ )*: Intensidad que se transmite durante una insonificación a lo largo de todo el tiempo que dura la aplicación de la misma. Puede definirse o bien la densidad de energía en un pulso, si sólo se tiene en cuenta el tiempo que dura el mismo, o bien la total del tratamiento.

$$\rho_E [J/cm^2] = I [W/cm^2] \cdot t (s) \quad (1.19)$$

## 4. Efectos de los Ultrasonidos

El transductor transmite un campo que se propaga en un medio con propiedades viscoelásticas. La acción terapéutica de los US depende de la interacción directa del campo acústico con las estructuras que componen el tejido. Los parámetros que se emplean en la insonificación condicionan los efectos que estarán presentes, agrupados en la actualidad en dos tipos: térmicos y no térmicos.

### 4.1 Efectos térmicos de los Ultrasonidos

Como se ha introducido, los US son ondas de tipo longitudinal que provocan la compresión y rarefacción del medio por el que se propagan. Esto hace que las partículas que hay presentes oscilen en consecuencia y parte de la energía mecánica se libere en forma de calor, provocando un cambio de temperatura en la zona. Este proceso por el cual la energía acústica se convierte en calor de forma irreversible es conocido como absorción. De esta manera, a medida que la onda avanza y penetra en el medio disminuye su energía al irse transfiriendo ésta al material, siguiendo el decaimiento exponencial de la eq.(1.10).

La distribución de calor en el medio viene condicionada por la del campo acústico, influyendo también otros factores, sobre todo la conductividad térmica. La tasa de calentamiento por unidad de volumen debida al campo acústico, es decir, el calor generado en un punto,  $Q$ , es proporcional a la intensidad de los US de la forma [Szabo TL].

$$Q = 2 \alpha I \quad (1.20)$$

Es decir, es directamente proporcional al coeficiente de absorción del medio,  $\alpha$ . Este parámetro depende de varios factores, entre los que se incluye el contenido proteico o la orientación de las fibras del tejido [Watson T 2017]. Así los tejidos que mejor absorben los US son los huesos, cartílagos, ligamentos y tendones. Considerando  $Q$  la fuente de calor asociada a los US, se puede estimar el incremento de temperatura,  $T$ , que sufre un tejido biológico con la ecuación de bio-calor de Harry H. Pennes. [Pennes HH, Cho YI, Mast TD]:

$$\rho C_p \frac{dT}{dt} = Q + Q_{met} + \nabla(k \nabla T) - \rho_b C_{pb} w_b (T - T_b) \quad (1.21)$$

siendo  $\rho$  la densidad,  $C_p$  el calor específico,  $k$  la conductividad térmica y denotándose con el sin subíndice los parámetros correspondientes al tejido o medio y con  $b$  los referentes a la sangre. Se pueden distinguir cuatro contribuciones a la variación de temperatura: el primer término de la eq.(1.21) corresponde a la fuente de calor generada por la absorción del campo acústico ( $Q$ , eq.(1.20)), el segundo término tiene en cuenta una posible fuente de calor metabólico ( $Q_{met}$ ), el tercero hace referencia al proceso de difusión debido a la conductividad térmica y el último tiene en cuenta el posible efecto de la perfusión sanguínea, condicionado por la tasa de perfusión de la sangre,  $w$ , y negativo porque tiende a reestablecer las condiciones iniciales. Esta ecuación

considera que la deposición de energía térmica es instantánea. Modelos basados en ecuaciones más complejas, como el TWMBT (*Thermal Wave Model of Bioheat Transfer* [Zhou LX]) tienen en cuenta, p.e. el tiempo de relajación térmico y que el flujo de calor no es instantáneo, sino que toma relevancia gradualmente tras la aplicación de un gradiente de temperatura.

La respuesta de los tejidos y células a las variaciones térmicas es muy variada. Con incrementos moderados ( $T \leq 43$  °C) se producen efectos beneficiosos: vasodilatación, aumento del aporte de oxígeno y nutrientes, mayor actividad enzimática o un aumento en la velocidad de conducción de los nervios periféricos. Así, un calentamiento moderado, de unos 3 – 4 °C respecto de la temperatura basal, alivia el dolor, promueve el flujo sanguíneo, aumenta la tasa metabólica y reduce la visco-elasticidad del tejido (haciéndolo más elástico) [Cambier D]. Sin embargo, si se alcanza una temperatura suficientemente alta ( $\approx 50$  °C) las proteínas comienzan a desnaturalizarse [Diederich CJ 2005, Miller MW 1989]. Hay situaciones en las que controlar el efecto térmico es muy importante, p.e. en presencia de fetos o en insonificaciones cerca del cráneo, donde un cambio irreversible puede ser devastador. La recomendación es no sobrepasar un incremento de 1.5 °C en diagnóstico, siendo el límite 4 °C durante no más de 5 minutos [Szabo TL]. En terapias puramente de hipertermia como HIFU, el calentamiento que se produce se logra de forma muy rápida. Los US provocan la necrosis instantánea con temperaturas  $\geq 60$  °C [Nell DM]. El volumen de tejido ablacionado refleja la región focal del campo, que tiene por lo general una forma elipsoidal.

#### 4.2 Efectos no térmicos de los Ultrasonidos

La fuerza de radiación, las corrientes que se generan en los fluidos, que provocan "streaming", y la cavitación son los efectos de los US que provocan cambios celulares agrupados dentro de los denominados efectos no térmicos [Izadifar Z, Dalecki D 2004, Dyson M].

Dentro del medio, a medida que la onda acústica se propaga se producen gradientes de energía debido a los procesos de interacción que tienen lugar. La fuerza de radiación acústica se define como la fuerza de presión estacionaria y en promedio que experimenta un cuerpo interpuesto en la propagación de un campo acústico en un fluido [Cinbis C]. En los procesos de scattering, reflexión o absorción se produce una transferencia de parte del momento del campo acústico al medio y la fuerza de radiación aparece en consecuencia [Szabo TL]. Ésta fuerza da lugar al desplazamiento de las partículas, torques, streaming y fenómenos como la levitación acústica o la aparición de fuentes y jets en la superficie de las interfaces [Dalecki D 2004]. En la actualidad la fuerza de radiación acústica se emplea para generar el desplazamiento diferencial de tejidos y localizar y cuantificar así variaciones en su rigidez, ya que son inversamente proporcionales. Ésta técnica se conoce como elastografía y viene desarrollándose desde los años 90, pudiéndose emplear incluso un único transductor para generar el "empuje" y detectar los desplazamientos que se originan [Doherty JR, Nightingale KR, Sigrist RMS].

La fuerza de radiación acústica no es la única consecuencia de la transferencia de momento del campo acústico al medio. Los gradientes de presión que se tienen en el seno del medio inducen diferentes tipos de movimientos, que deforman el material no sólo en la dirección de propagación del campo, sino también en la transversal [Jiménez N]. Otro efecto conocido es el fenómeno de streaming acústico [Lighthill J]. En la literatura se describe como un “remolino a pequeña escala” de fluido cerca de las estructuras que vibran consecuencia de la oscilación de presión [Watson T 2017, Wu J 2018]. Entre otros sistemas, se ven afectados las membranas celulares o la superficie de las burbujas. Los efectos biológicos que se han reportado consecuencia del streaming acústico son, p.e., la alteración del transporte y difusión de sustancias a través de la membrana, lo cual modifica el metabolismo de la célula [Szabo TL, Watson T 2017, Wu J 2018].

Las estructuras mecanosensoras están integradas entre los diversos componentes de la membrana. Entre las unidades que desempeñan esta funcionalidad están los canales iónicos, las integrinas y los complejos citoplasmáticos, la mayoría formados por proteínas. Estas estructuras regulan la viabilidad celular a través de su interacción con la matriz extracelular y el citoesqueleto (a través de las adhesiones focales que sirven de puente) [Wang JHC, Lecuit T, Frairia R]. Así, son capaces de sentir las fuerzas mecánicas que surgen en el exterior y convertir estos estímulos en señales químicas capaces de modular los mecanismos de mecanotransducción. Una de las consecuencias de la activación de estas unidades con el streaming acústico es el aumento de la permeabilidad de la membrana a ciertos iones y sustancias. Esto puede llevar por ejemplo al alivio de dolor (relacionado con cambios en las bombas de ATP de sodio-potasio en la membrana plasmática de las células neuronales) o a una mayor secreción de sustancias como el colágeno [Dinno MA].

La cavitación es el efecto no térmico asociado a los US más estudiado e investigado en la literatura. Se define como la formación de burbujas de gas en el medio y su oscilación (entendida como variación de tamaño) bajo la acción, en este caso, de un campo de US. Si no están ya presentes en el medio, las burbujas se generan como consecuencia de la vaporización local de líquido inducida por una reducción en la presión externa tal que se superan las fuerzas de cohesión naturales del líquido (véase Fig.1.1).

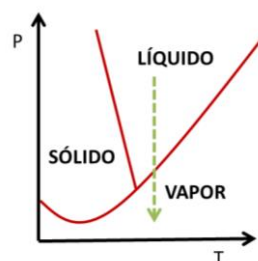


Fig. 1.1: Ilustración del diagrama de fases del agua.

Una vez presente en el medio, una buena aproximación a la dinámica radial de una burbuja que contiene gas en su interior puede describirse mediante la ecuación de Rayleigh-Plesset [Plesset MS]. Ocurre que, durante el ciclo de rarefacción de la onda, la presión transmitida al medio es negativa y como consecuencia la burbuja se expande, mientras que, en el ciclo de compresión,

disminuye de tamaño. Durante la compresión la concentración interior de gas aumenta y se produce una difusión de gas hacia el medio exterior a través de la superficie de la burbuja. Lo contrario ocurre cuando la burbuja se expande, el flujo adquiere sentido opuesto, como ilustra la Fig.1.2. El área de intercambio es menor cuando la burbuja está comprimida que cuando se encuentra expandida, por lo que se difunde menor cantidad de gas hacia el exterior y el resultado neto es que hay una difusión de gas hacia el interior de la burbuja. Esto es lo que se conoce como proceso de “difusión rectificada”, que conlleva el crecimiento gradual de la burbuja [Eller A].

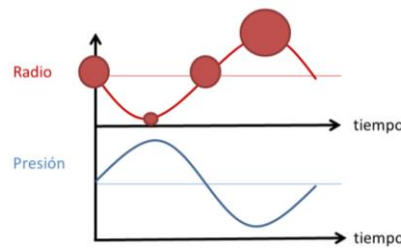


Fig. 1.2: Ilustración de la evolución del radio de una burbuja bajo la acción de un campo de presión oscilante.

Se distinguen dos tipos de cavitación [Izadifar Z, Wu J 2008]:

- *Cavitación no inercial o estable*: se identifica con la oscilación de la burbuja en torno a su radio de equilibrio. La frecuencia de resonancia para la que el comportamiento puede considerarse armónico depende del tamaño de la burbuja y de sus propiedades. Se tiene que para amplitudes de presión del campo de US,  $P$ , no mucho mayores que la presión ambiente,  $P_A$ , la frecuencia de resonancia de la burbuja,  $f_r$ , en función de su radio en equilibrio,  $R_0$ , viene dada por la expresión [Noltingk BE]:

$$(2 \pi f_r)^2 = \frac{3 \gamma \left( P + \frac{2S}{R_0} \right)}{\rho R_0^2} \quad (1.22)$$

donde  $\gamma$  es el coeficiente de calor específico del gas que encierra la burbuja,  $S$  es la tensión superficial del líquido y  $\rho$  su densidad. Si la presión acústica es mucho mayor que la ambiente lo que ocurre es que la evolución del radio de la burbuja no puede simplificarse a un movimiento armónico y obtener una expresión como la anterior se complica. En cualquier caso, en base a la eq.(1.22) se puede obtener un orden de magnitud del tamaño de las burbujas de gas sensibles a una insonificación dada y se puede concluir que, cuanto mayor es el tamaño de la burbuja, se excitará a una frecuencia más baja [Leighton T, Brennen CE]. Las consecuencias de esta oscilación son la transmisión de calor al medio, microstreaming y fuerzas de cizalla sobre elementos circundantes.

- *Cavitación inercial o inestable*: ocurre cuando el campo de US es lo suficientemente intenso como para que se produzca la implosión de la burbuja. Cuando la oscilación radial es muy grande, las fases de expansión y compresión no son simétricas y después de llegar a su radio máximo de expansión, la burbuja colapsa de forma violenta en tiempos del orden de unos pocos  $\mu s$  [Noltingk BE]. Dado que es un proceso adiabático, se concentra en el interior de la cavidad una gran



densidad de energía que da lugar a presiones y temperaturas locales muy altas ( $\geq 100$  MPa  $\geq 1000$  K [Suslick KS]). Estas variaciones locales dan lugar a fenómenos de sonoluminiscencia, hidrólisis, aparición de radicales libres y reacciones químicas [Miller MW 1996]. También se asocia microstreaming e incluso la inyección de microjets si hay superficies cercanas y el colapso es asimétrico. Además, el movimiento de la burbuja justo antes de implosionar da lugar a una onda de presión de frente esférico y con forma de onda de choque que se propaga por el medio [Brujan EA].

La probabilidad de que se dé cavitación es mayor cuando [Hill CR 1972]:

- Aumenta la amplitud acústica de la onda de US.
- Aumenta la duración del pulso, al aumentar el tiempo en el que se facilita la “difusión rectificadora”.
- Por el contrario, decrece si la separación temporal entre pulsos es muy grande, al disolverse los núcleos de gas entre pulsos sucesivos.
- Decrece también con el aumento de la presión atmosférica exterior.

Para que el fenómeno de cavitación se origine es necesaria la presencia de micronúcleos, que es como se denomina a los agentes que potencialmente son sensibles a este fenómeno (microburbujas disueltas en el medio o introducidas artificialmente, conocidos comercialmente como agentes de contraste). Además, los parámetros y condiciones de insonificación deben ser los adecuados para que el fenómeno sea posible (p.e. amplitud umbral y frecuencia cercana a la de resonancia según el tamaño de los micronúcleos). Para que la cavitación tenga relevancia a nivel biológico los agentes cavitantes han de encontrarse en las proximidades del lugar u organismo sobre el que se quiere lograr el efecto.

Relacionados con la cavitación se han observado los siguientes efectos biológicos en cultivos in vitro: [Miller MW 1996]:

- Efectos líticos en las células debido a la rotura y destrucción de la membrana o la creación de poros irreversibles [Prentice P].
- Cambios en la permeabilidad de la membrana celular a algunos iones y sustancias. Esto es en lo que se basa la actual técnica de sonoporación [Lentacker I, Sundaram J].
- Aumento del consumo de calcio [Tsukamoto A].
- Alteraciones morfológicas de algunos orgánulos. Es común la aparición de vacuolas en el interior del citoplasma, identificados como agentes potenciales para cavitación [Prat F].
- Rotura en la cadena de ADN y daño y aberraciones cromosómicas [Miller DL 1995].

Todos estos efectos son resultado de la reacción de los tipos celulares ante los cambios de temperatura locales que se producen, la estimulación mecánica que sufre la membrana debido al microstreaming, los flujos hidrodinámicos alrededor de las burbujas y las colisiones directas entre burbujas y células. También es conocido que la liberación de ciertos radicales libres o sustancias sonoquímicas como el peróxido de hidrógeno tiene un efecto perjudicial sobre la síntesis del ADN.

En una situación in vivo o in vitro, como ya se ha mencionado, la posición relativa entre agentes cavitantes y las células es fundamental para tener un efecto biológico [Lentacker I]. En este sentido, la configuración experimental juega un papel crucial, pudiendo condicionar por completo el resultado del experimento [Miller MW 1996]. Se comprueba que la rotación o agitación del sistema durante el tratamiento impide que las burbujas queden fijas en una posición y favorece que se “reciclen”, moviéndose por toda la muestra. Esto es condicionante en el caso de sistemas con predisposición a la formación de ondas estacionarias, donde las células en suspensión se agrupan en los nodos de presión y las burbujas, dependiendo de si son mayores que el tamaño óptimo de resonancia o menores, en los nodos y antinodos de presión, respectivamente [Ter Haar G 1978, Lawrence A]. En la mayoría de estudios, rotar el sistema durante la insonificación tiene como consecuencia un aumento en el efecto lítico sobre la muestra. A pesar de la segregación entre células y burbujas que se produce, los estudios experimentales también observan daño celular en insonificaciones con ondas estacionarias, por lo que hay indicaciones de que no todos los micronúcleos se segregan o de que otro mecanismo provoca el daño (p.e. colisiones con las células en el movimiento de traslación de las burbujas hacia los máximos de presión).

En las paredes, si estas no son de un material absorbente, se producen reflexiones y microstreaming (asimétrico) [Wu J 2008]. La diferencia en la lisis producida con un tipo de paredes u otro no es relevante, por lo que los estudios realizados al respecto concluyen que la mayoría del daño se produce en el seno del medio [Miller MW 1996].

La tensión que se produce sobre la membrana debido a la variación de la presión externa es proporcional al radio celular [Boal D], por lo que cuanto menor sea el tamaño de las células, las fuerzas de cizalla necesarias para provocar una rotura en la membrana son mayores. Además, la probabilidad de interacción entre las burbujas y los blancos celulares es mayor cuanto más grandes son estos últimos, o cuanto mayor es su concentración. Sin embargo, se ha reportado que una mayor concentración celular disminuye el daño relativo en el cultivo [Guzmán HR]. Esto se debe a que las células tienden a formar agregados que dificultan la traslación y oscilación del gas. Por otro lado, la concentración de gas varía con la manipulación de la muestra, su historial térmico o las grietas presentes en las paredes (lugar de alta concentración de micronúcleos). Cabe esperar que mayor número de burbujas tengan un mayor efecto lítico. El estado del líquido de cultivo también afecta a la cavitación. En medios más viscosos la cavitación inercial se produce con menor probabilidad.

Debido al uso cada vez más frecuente de agentes de contraste en diagnóstico con US y dado que desde el punto de vista terapéutico la cavitación ha dado resultados positivos en técnicas como la litotricia [Lingeman JE] o la sonoporación [Lentacker I], el estudio de sus efectos y de los niveles de presión para los que la cavitación se hace efectiva en condiciones in vivo es un tema de gran relevancia que en la actualidad continua investigándose [Ter Haar G 2009].

## 5. Objetivos y contenido de la Tesis

Los objetivos generales sobre los que se ha desarrollado esta Tesis son:

- Estudiar teóricamente, mediante simulación, y experimentalmente de la propagación del campo acústico y sus efectos, tanto térmicos como no térmicos.
- Establecer una sistemática para caracterizar correctamente a nivel metrológico los parámetros dosimétricos de los equipos de US que se emplean, en emisión en campo libre y en la configuración experimental.
- Interpretar los resultados en un experimento de insonificación en un cultivo in vitro no realizado anteriormente, diseñado para estudiar los efectos no térmicos de los US a nivel celular.
- Proponer un nuevo protocolo de tratamiento dentro del rango MIFU, basado en todo lo estudiado, y con potencialidad para dar resultados positivos en el tratamiento de una lesión de tejido blando.

Para mostrar la consecución de estos objetivos la Tesis se estructura:

- En el Capítulo 1 se han introducido las bases teóricas de la propagación de los US en un medio y cómo se emplea en la actualidad este tipo de radiación en Medicina y, más concretamente, en Fisioterapia. En este capítulo se hace referencia a la nomenclatura y el significado de los parámetros dosimétricos que van a emplearse en el resto de la Tesis.
- En el Capítulo 2 se realizan medidas de incremento de temperatura con una técnica convencional y conocida que se ha implantado en el laboratorio durante el desarrollo de esta Tesis: el Método de Retardos de la señal recibida por dispersión. Los programas para el análisis de las señales acústicas que debe llevarse a cabo se han elaborado y verificado con medidas experimentales. Por otro lado, en este mismo capítulo, se presentan los resultados de un trabajo de colaboración con un grupo especializado en Imagen Optoacústica que ha permitido, por primera vez, monitorizar con esta técnica el calentamiento que se produce con una insonificación de MIFU.
- Analizando en el Capítulo 3 la propagación en una guía con la forma de un pocillo de una placa de cultivo convencional se muestra la sistemática correcta para establecer los parámetros de las dosis reales que se aplican en los experimentos de insonificación de cultivos in vitro.
- En el Capítulo 4 se realiza un completo trabajo de investigación sobre los efectos no térmicos que se logran en cultivos celulares con dos tipos de pulso de US: uno largo y otro corto. El razonamiento de los resultados se lleva a cabo estudiando las bases de la interacción de los US con las estructuras del medio: la generación de cavitación y la activación de mecanismos de mecanotransducción. La línea celular escogida son fibroblastos, uno de los tipos más frecuentes en el tejido blando tratado en Fisioterapia.

- La recopilación de todo lo estudiado y obtenido a lo largo del desarrollo de esta Tesis ha permitido que se plantee en el Capítulo 5 una propuesta de tratamiento con US con la finalidad de mejorar la recuperación en una lesión crónica de tejido muscular o tendinoso. El tratamiento que se propone es completamente novedoso por incluir dos aspectos hasta ahora no investigados: la combinación de dos pulsos diferentes en una misma insonificación, y el hecho de que las amplitudes de presión acústicas con las que se trabaja se encuentran en un rango que todavía no ha sido ampliamente investigado, MIFU.

Esta Tesis tiene una fuerte componente experimental, que se ha verificado con simulaciones basadas en elementos finitos (*FEM, Finite Element Method*) y con resultados de trabajos previos en la misma área. Los transductores que se emplean en la mayoría de experimentos son de diseño propio y han sido calibrados en el laboratorio. Esto ha permitido su modelización en las simulaciones.

Aunque todos los capítulos se discuten y concluyen por separado, indicándose en cada uno el avance y la utilidad de lo que se ha logrado, en el Capítulo 6, finalmente, se dan a conocer las conclusiones más relevantes obtenidas de esta Tesis y se proponen posibles líneas de trabajo futuras.



## Capítulo 2.

# Estudio de los efectos térmicos de los Ultrasonidos con técnicas no invasivas.

### 1. Introducción y motivación

Uno de los efectos que producen los US cuando se propagan en un medio es el incremento de temperatura debido al calor que produce su absorción, introducido en el apartado 4.1 del Capítulo 1 de esta Tesis (eq.1.20). Esto hace que se empleen en Fisioterapia para calentar tejidos y promover así su recuperación [Ter Haar G 1999] o incluso para lograr su ablación, como ocurre en la aplicación de US para el tratamiento de tumores [Dubinsky TJ]. Los tratamientos con hipertermia por US son cada vez más frecuentes y para su correcta aplicación debieran usarse campos focalizados. Esto permite trabajar con intensidades mayores sin afectar a los tejidos sanos [Diederich CJ 1999, Diederich CJ 2005].

El estudio de la distribución del calentamiento que se produce en un tejido cuando está siendo insonificado es fundamental para optimizar el efecto térmico de los US. Además, el control de la temperatura en tiempo real durante un tratamiento permite confirmar la correcta aplicación del tratamiento.

Es conocido que el efecto térmico de los US puede dar lugar a fenómenos que son favorecedores en la recuperación tisular, como es el incremento de la actividad metabólica (se estima que la actividad enzimática se dobla cada incremento de 10 °C [Szabo TL]), pero también puede llegar a dañar un tejido si la temperatura alcanzada es lo suficientemente alta y se mantiene el tiempo suficiente para ello [Miller MW 1989, O'Brien WD Jr, Dewhirst MW, Sapareto SA]. Así, la aplicación efectiva de los US requiere del conocimiento y control de las distribuciones térmicas que se inducen en los tratamientos y de su evolución espacio-temporal.

En este capítulo se estudia el incremento de temperatura que se produce en un tejido biológico con técnicas no invasivas. En primer lugar, se muestra una técnica conocida como es el método basado en los retardos de la señal recibida por dispersión (*PES, Pulse Echo Shift*). A continuación, se emplean herramientas de simulación para conocer las distribuciones que cabe esperar en un tejido muscular con un transductor que emite en modo focalizado con un equipo de MIFU. Estos resultados se comparan con las medidas con la técnica de Imagen Optoacústica (OA) realizadas en un trabajo de colaboración con el Helmholtz Zentrum de Múnich con el que se ha logrado

monitorizar tanto espacialmente, en 3D, como temporalmente, el calentamiento de una muestra de tejido ex vivo que se produce con US focalizados en el rango MIFU, insonificando con un equipo desarrollado en el ITEFI-CSIC [Landa FJO 2019].

## 2. Antecedentes

Hasta la fecha se han empleado diversas técnicas invasivas y no invasivas para conocer la distribución térmica en un tejido biológico. Entre las no invasivas, se han realizado estudios con métodos como la Termografía Infrarroja (DITI, *Digital Infrared Thermal Imaging*) [Lahiri B, Hildebrandt C], la Tomografía Computerizada (CT, *Computed Tomography*) [Fani F] o la Imagen por Resonancia Magnética (MRI, *Magnetic Resonance Imaging*) [Hynynen K]. Estas técnicas presentan algunas limitaciones, como son la baja resolución espacial, dificultad para obtener registros en zonas profundas o el coste de las mismas.

Como modalidad de imagen médica, la técnica de OA combina las ventajas de la radiación de la luz láser infrarroja con las de los US. Por un lado, se tiene una gran discretización entre diferentes tipos de tejido debido a que los espectros ópticos de absorción dependen del biomaterial, más concretamente de su composición molecular. Esto hace que sea posible incluso distinguir tejidos en función de la concentración de hemoglobina, lípidos y otras moléculas absorbentes de la luz [Beard P]. Por otro lado, posee también la resolución espacial del sistema ultrasónico que se use en recepción. En la actualidad se llega a resoluciones de  $\approx 100 \mu\text{m}$  para profundidades de  $\approx \text{cm}$  y de hasta  $\approx 10 \mu\text{m}$  en los primeros centos de  $\mu\text{m}$ . Esto hace que en los últimos años se haya desarrollado extensivamente la técnica OA.

La imagen OA se presenta cada vez con más frecuencia como una alternativa para monitorizar los cambios debido al calor que tienen lugar durante un tratamiento. Combinada con HIFU, se encuentran trabajos que emplean esta técnica para visualizar las lesiones térmicas producidas [Chitnis PV] o confirmar la ablación tumoral [Cui H]. Estos trabajos logran monitorizar los cambios en las propiedades ópticas del tejido debidos a la lesión térmica, que modifica su composición molecular y, en consecuencia, su respuesta OA. Se encuentran trabajos con otros tipos de tratamientos en lugar de US, p.e, ablación por radiofrecuencia [Pang GA], en los que se evidencia la potencialidad de esta técnica para realizar el seguimiento en tiempo real de la reconstrucción tridimensional de las lesiones con una alta resolución espacial (cientos de  $\mu\text{m}$ ). También se ha empleado para obtener las distribuciones de temperatura en tejidos que provoca el calentamiento con placas calefactoras, reportando un error menor de  $1 \text{ }^\circ\text{C}$  respecto de medidas simultáneas con un termopar [Ke H, Yao J]. Hasta la realización del trabajo que se describe, la imagen OA no se había empleado para estudiar su validez como una técnica para conocer el valor y la distribución del calentamiento que sufre un tejido mientras se insonifica con MIFU.

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1 Método de Retardos de la señal recibida por dispersión

Se ha elaborado un programa en MATLAB® para obtener el cambio de la temperatura con el método de PES. Para aplicar este método se dispone en el laboratorio de un ecógrafo de diagnóstico de 6 MHz (*Sono DIAGNOST 360, Philips*). Cuando el ecógrafo funciona en el Modo M se adquiere la señal acústica a lo largo de un eje que atraviesa la zona de interés usando un osciloscopio digital (*Teledyne Lecroy Wavesurfer 3024*). La medida del retardo que va adquiriendo la señal conforme se calienta, analizado en diferentes ventanas temporales, permite cuantificar las variaciones térmicas que se producen. Para verificar el código empleado, se realiza la medición simultánea de la temperatura con un termopar (*RoHS 847-1132*). En la Fig.2.1 se esquematiza el sistema experimental utilizado.

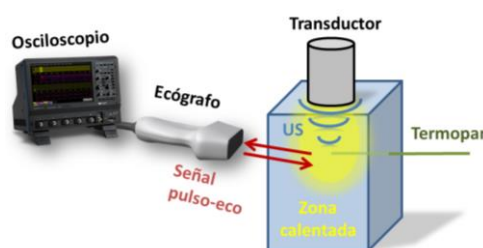


Fig. 2.1: Configuración experimental para la medida del calentamiento con el método de PES.

#### 3.2 Simulaciones

Para simular el incremento de temperatura que se provoca en un tejido muscular al aplicar sobre él un haz ultrasónico emitido por un transductor focalizado se han realizado modelos utilizando el software de *COMSOL Multiphysics® 5.2a*, basado en el método de FEM. Concretamente se ha usado el módulo de *Pressure Acoustics* para calcular la distribución del campo acústico del transductor y el módulo de *Bioheat Transfer* para el cálculo de las distribuciones y evolución de la temperatura.

Para la realización de los experimentos se ha utilizado un sistema de excitación multicanal programable y un transductor tipo array anular 2D de 2 MHz de frecuencia central y 3 cm de diámetro total. Para la simulación se ha diseñado un transductor cóncavo de 50 mm de radio de curvatura y con una superficie emisora de 14 mm de radio que emite a una frecuencia de 2 MHz, parámetros similares a los del sistema experimental. En contacto con el transductor, en la geometría de simulación, se coloca una capa de agua de 4 cm antes del músculo, como ilustra la Fig.2.2. Los valores de los parámetros necesarios para los modelos de simulación se recogen en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1: Propiedades acústicas y térmicas empleadas en el modelo de simulación [Hasgall PA].

Material	$\rho$ [kg/m <sup>3</sup> ]	c [m/s]	$\alpha$ [Np/m] (2 MHz)	k [W/m K]	$C_p$ [J/kg K]
Agua	994	1482	0.025	0.47	4178
Músculo	1090	1588	15.1	0.49	3421



Dada la simetría del problema, se resuelve únicamente para una superficie bidimensional con simetría axial y rotacional. En la zona focal, la de mayor interés, se incluye un dominio elipsoidal, como se muestra en la ilustración de la geometría diseñada de la Fig.2.2.

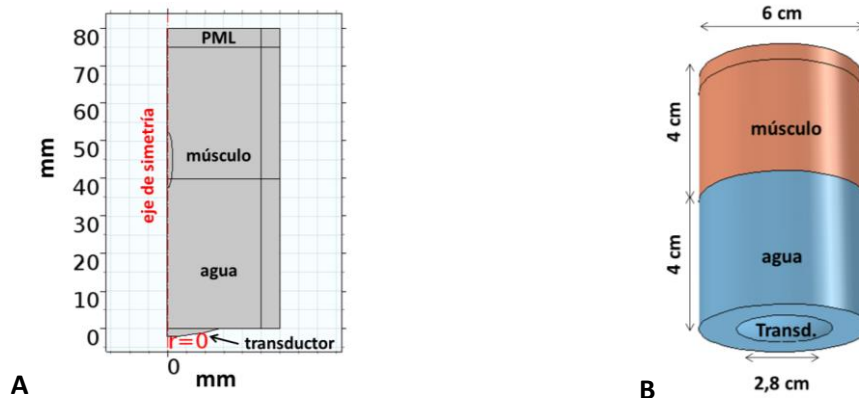


Fig. 2.2: Ilustración de la geometría de simulación (A) Diseño 2D (B) 3D.

El mallado impuesto para el cálculo de la distribución de presión acústica es de elementos triangulares con un tamaño máximo de  $\lambda/5$  en todo el medio y de  $\lambda/6$  en la zona elipsoidal. Para los estudios térmicos se emplea el mallado extrafino que por defecto posee COMSOL® y un mallado triangular de un tamaño máximo de  $\lambda/8$  en la zona elipsoidal.

El medio se rodea de una capa de 5 mm con la condición de *Perfectly Match Layer (PLM)*, lo cual impone una superficie teórica no reflectora. Para el estudio térmico se considera que el medio está aislado térmicamente.

### 3.3 Imagen Optoacústica

La Imagen OA es en esencia una técnica de imagen en la que el contraste que se tiene depende de las propiedades ópticas del medio: de su absorción y conversión termoelástica. Se basa en el efecto optoacústico, reportado por Alexander G. Bell ya en 1880 [Bell AG].

La luz que emite un láser con una  $\lambda$  en el rango del infrarrojo cercano ( $\lambda = 550 \text{ nm}$  a  $900 \text{ nm}$ ; *NIR*, *Near Infrared*) es absorbida por las moléculas del medio y convertida irreversiblemente en calor. Esto conlleva la dilatación de las partículas debido al efecto de conversión termoelástica, lo cual produce un incremento de presión local y la emisión de ondas acústicas de baja amplitud (menos de 10 kPa), que son detectadas por un transductor [Beard P].

En la configuración experimental empleada en la medida del calentamiento que se produce con MIFU en una muestra de tejido *ex vivo* mediante la técnica de Imagen OA, el transductor array que se emplea para detectar la señal OA se posiciona ortogonalmente respecto del que produce el calentamiento, como se ilustra en la Fig.2.3.

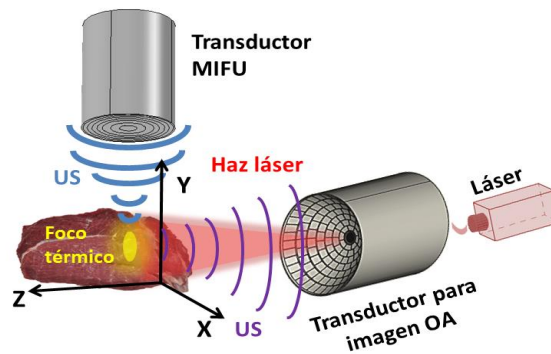


Fig. 2.3: Configuración experimental en la medida de temperatura con Imagen OA.

El transductor usado para las insonificaciones es un array anular de 2 MHz diseñado y realizado en nuestro laboratorio. La electrónica de excitación se controla mediante software específico controlado con un código de MATLAB® (*SITAU, Dasel Sistemas*). En el foco, éste transductor puede emitir presiones de hasta 3 MPa con una excitación de 150 Vp, alcanzándose intensidades de hasta  $I_{SPTP} = 300 \text{ W/cm}^2$ , por encima de las empleadas convencionalmente en TUS (< 1 MPa) y por debajo de las empleadas para lograr ablación tisular con HIFU (> 10 MPa). Nos encontramos por tanto en el rango MIFU.

El transductor usado para Imagen OA es un array esférico de 256 elementos de  $9 \text{ mm}^2$  con una frecuencia central de 4 MHz y un ancho de banda > 80 %. Con este transductor se obtienen imágenes con una resolución de  $\approx 200 \mu\text{m}$  [Dean-Ben XL (2) 2013]. Para generar la excitación OA en el tejido se emplea un láser de 720 nm y  $11 \text{ mJ/cm}^2$  de fluencia óptica (*InnoLas Laser GmbH*). Éste trabaja en modo pulsado con una PRF de 10 Hz.

Las imágenes OA se reconstruyen con un procesador gráfico y un algoritmo específico a partir de las señales registradas en el laboratorio [Dean-Ben XL (1) 2013]. El valor de la temperatura se calcula a partir de la intensidad de las imágenes, midiendo su variación respecto de la imagen original (sin foco térmico) a medida que se produce el calentamiento. Se muestra en la Fig.2.4 un ejemplo ilustrativo de la metodología que se sigue para una prueba realizada durante nuestros experimentos con una muestra de silicona.

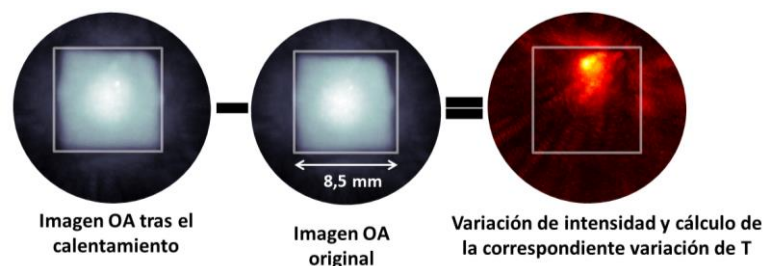


Fig. 2.4: Sistemática para obtener la variación de T entre dos imágenes con Imagen OA.

Para evitar la interferencia entre la señal de US que produce el calentamiento acústico y la de los US que se generan en consecuencia, y que debe detectar el sistema OA, el transductor de MIFU se apaga 0.05 s antes de cada adquisición OA. El transductor de MIFU opera por tanto en modo

pulsado, emitiendo cada ms pulsos de 255 ciclos, hasta un total de 50, apagándose luego y volviéndose a repetir la insonificación con una frecuencia de 10 Hz, como la del láser, habiendo un retardo de 100  $\mu$ s entre ambos. Para garantizar la transmisión de los US se sumerge todo el sistema en agua.

## 4. Medida del incremento de temperatura durante una insonificación con técnicas no invasivas

### 4.1 Cuantificación del incremento térmico con el Método de Retardos de la señal de dispersión

El Método de Retardos (*PES*) se basa en la variación en la velocidad de propagación del sonido en un medio debido al cambio de temperatura [Maass-Moreno R Part I y Part II, Seip R, Chinchurreta F]. Es conocido que en medios acuosos las ondas de sonido viajan más rápido a temperaturas más altas, puesto que se trata de una onda mecánica y su propagación está relacionada con el estado de agitación de las moléculas y éste a su vez con la temperatura. Dado el alto contenido en agua en los tejidos biológicos, esto también ocurre. *Lubbers J et al* presentan la relación de la eq.(2.1) para cuantificar la variación de la velocidad de propagación de los US,  $c$ , en agua, para un rango de temperaturas entre 15 °C y 35 °C y a presión atmosférica [Lubbers J].

$$c = 1405.03 + 4.624 \cdot T - 3.83 \cdot 10^{-2} \cdot T^2 \quad (2.1)$$

Los autores afirman que el máximo error que se comete con la eq.(2.1) es de aproximadamente 0.18 m/s en comparación con medidas experimentales, como son las de *Greenspanan M et al* [Greenspanan M 1957, Greenspanan M 1959] y datos obtenidos con ecuaciones más elaboradas, como son las de *Bilaniuk N et al* [Bilaniuk N]. Esto lleva a calcular el incremento de velocidad debido a un incremento de temperatura,  $\Delta T$ , como:

$$\Delta c = \int_T^{T+\Delta T} \frac{dc}{dT} dT = \int_T^{T+\Delta T} (4.624 - 0.0766 \cdot T) dT \quad (2.2)$$

Para una temperatura inicial de 20 °C la tasa de variación de la velocidad del sonido con el calentamiento,  $k_h$  ( $\Delta c = k_h \Delta T$ ) obtenida con la eq.(2.2) es de 3.05 m/s °C. Para nuestras medidas en un material artificial de tejido blando basado en una disolución de agua y agar, se ha obtenido el mejor ajuste de los datos calculados y los medidos con un una  $k_h$  de 3 m/s °C, también muy parecido a los 2.95 m/s °C medidos por *Greenspanan M et al* en agua para temperatura ambiente (22 °C) [Greenspanan M 1959].

Desarrollado el código de MATLAB® necesario para el procesamiento de las señales y la cuantificación de la temperatura, basado en la eq.(2.2), se ha realizado una medida con este método en nuestro laboratorio. Para ello, la señal acústica que se extrae del ecógrafo es adquirida antes de producirse el calentamiento y se correlaciona con la que se tiene tras el mismo. Esta señal

se divide en ventanas temporales que contienen, al menos, 6 períodos de la señal. Puesto que la frecuencia de trabajo del ecógrafo es de 6 MHz, este muestreo corresponde a tramos de al menos 1  $\mu$ s. Así, cada uno de estos “paquetes” de la señal original es correlacionado con el mismo paquete tras aplicar los US, extrayéndose el desfase temporal entre ellas ( $\Delta t$ ). Con este valor se calcula el cambio en la temperatura que se ha producido como:



El espacio recorrido por ambas ondas es el mismo, por lo que:

$$c_0 \cdot t_0 = c_1 \cdot t_1 \rightarrow c_0 \cdot t_0 = (c_0 + \Delta c) \cdot (t_0 - \Delta t) \rightarrow c_0 \cdot t_0 = (c_0 + k_h \Delta T) \cdot (t_0 - \Delta t)$$

$$\Delta T = \left( \frac{c_0}{k_h} \cdot \frac{\Delta t}{t_0 - \Delta t} \right) \quad (2.3)$$

Según la eq.(2.3), si se considera que el medio tiene las propiedades del agua, una variación de 1 °C corresponde a un corrimiento de la señal de un  $\approx 0.3$  %. Teniendo en cuenta que se trabaja en órdenes de tiempos de  $\mu$ s, esto implica que si el calentamiento es de varios °C, la señal se desplazará unas pocas centésimas de  $\mu$ s (varios ns).

Para realizar un experimento de calibración se ha fabricado un material artificial que simula las características de los tejidos biológicos en cuanto a sus propiedades de absorción e impedancia acústica. Éste material se elabora a base de agua y un 3.02 % de agar, con una concentración de polvos de alúmina ( $Al_2O_3$ ) del 1.8 % y un 0.53 % de carburo de silicio ( $SiC$ ), que es responsable de provocar la dispersión para poder realizar imagen [Souza RM]. Para la calibración, se inserta un termopar, a  $\approx 1.5$  cm de la superficie enfrentada al ecógrafo. En el Modo M de imagen del ecógrafo es posible escoger el mismo eje axial donde se encuentra el sensor. La insonificación se realiza con un transductor tipo pistón y dura 20 s. La evolución térmica se mide también en los 50 s sucesivos, para registrar la curva de enfriamiento. En la Fig.2.5 se tienen registros de la señal en los instantes inicial (en azul), tras 10 s de insonificación (en rosa) y a los 20 s (en rojo).

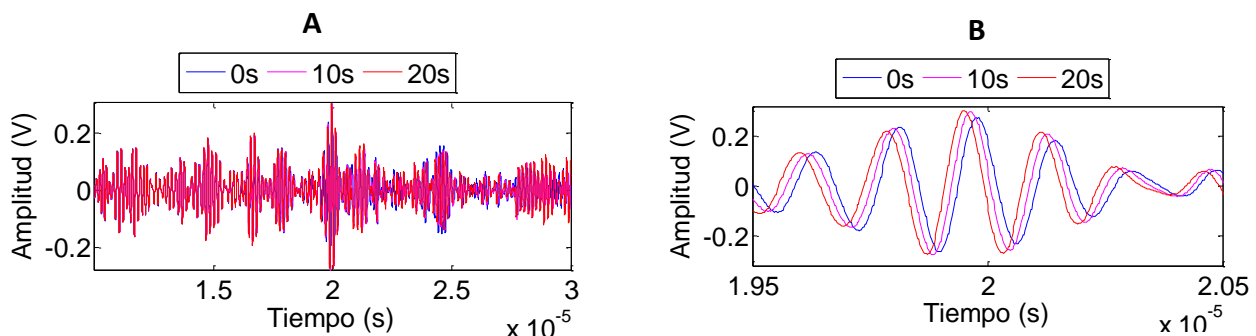


Fig. 2.5: (A) Señal acústica registrada con el ecógrafo y (B) Zoom al tramo que contiene el termopar, para el instante en el que se inicia la insonificación y transcurridos 10 s y 20 s.

En la Fig.2.5A, el termopar se sitúa en el punto de la señal a 20  $\mu$ s, que corresponde a una profundidad de  $\approx 1.48$  cm. La Fig.2.5B muestra que el corrimiento de la señal en ese punto es de 20 ns cada 10 s. Se toman en total 20 ventanas temporales en la señal de la Fig.2.5A. Analizando el desfase en cada tramo y para la secuencia completa de señales adquiridas (97 en total en los 80 segundos que dura la medida) se obtiene la evolución térmica en toda la línea, mostrada en la Fig.2.6A. El calentamiento del punto que contiene el máximo de temperatura se compara con la medida del termopar en la Fig.2.6B quedando así calibrada la técnica no invasiva.

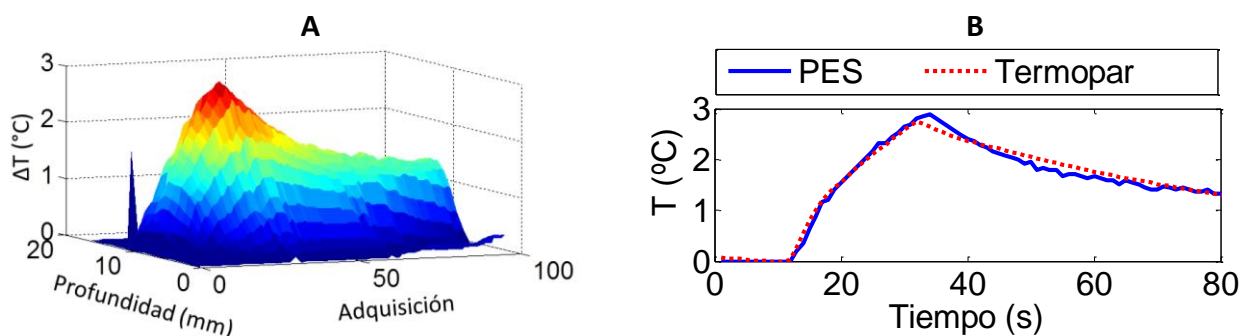


Fig. 2.6: (A): Evolución térmica de la señal adquirida. (B): Comparación del registro del termopar y de la curva obtenida que contiene el máximo de temperatura.

Según la Fig.2.6B, el incremento de temperatura máximo obtenido es de 2.9  $^{\circ}$ C, que corresponde a un desfase máximo medido entre tramos de la señal de 45 ns. Este resultado es concordante con el calentamiento de 2.3  $^{\circ}$ C calculado según la tasa de desfase de  $\approx 20$  ns/ $^{\circ}$ C teóricamente predicho por *Maass-Moreno R et al* [Maass-Moreno R Part I] y el de 2.5  $^{\circ}$ C con los  $\approx 18$  ns/ $^{\circ}$ C obtenidos experimentalmente por este mismo autor ya en un estudio con un tejido muscular ex vivo [Maass-Moreno R Part II]. En estos trabajos se da cuenta de que la tasa de desfase en la fase de calentamiento de un tejido es diferente de la que se tiene en el enfriamiento para una misma variación de temperatura (calculan 20.7 ns/ $^{\circ}$ C y 18.6 ns/ $^{\circ}$ C para las fases de calentamiento y enfriamiento, respectivamente). Esta puede ser la causa que justifica que los datos en nuestro caso se ajustan mejor en la etapa de calentamiento que de enfriamiento. La desviación estándar entre los datos calculados y los medidos en el laboratorio es de 0.77  $^{\circ}$ C.

#### 4.2 Simulación del incremento térmico que se produce con MIFU

El transductor array de MIFU del que se dispone en el laboratorio trabaja a 2 MHz y genera una presión en el foco de 3 MPa, que corresponde a una intensidad de 300 W/  $cm^2$ . En nuestra simulación se modela un transductor cóncavo, de manera que las ondas emitidas desde la superficie tenderán, por interferencia, a focalizarse en el centro de curvatura [O'Neil HT]. Así, imponiendo a una membrana cóncava de 5 cm de radio de curvatura la amplitud de desplazamiento necesaria para lograr los mismos niveles que emite el transductor usado (10 nm) se obtienen en la Fig.2.7 la distribución de la amplitud de presión y de la intensidad en el medio, formado por agua y músculo (Fig.2.2).

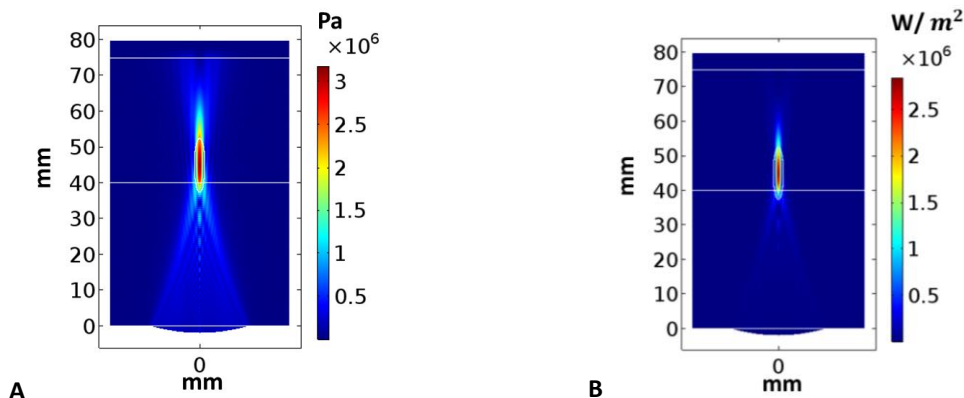


Fig. 2.7: Distribución 2D de (A) amplitud de presión acústica y (B) intensidad.

Los máximos de amplitud de presión acústica que se tienen son de 3.1 MPa, que corresponden a máximos de intensidad de  $284 \text{ W/cm}^2$  dentro del músculo. En el foco, la zona que tiene una amplitud de presión al menos del 50 % del máximo (- 6 dB) tiene una extensión de 1.8 mm de diámetro y 18.8 mm en profundidad.

Tras simular la distribución del campo acústico, se simula la distribución y evolución del incremento de temperatura teniendo en cuenta que en el experimento que se realiza para la medida con Imagen OA se insonifica la muestra de tejido muscular ex vivo durante  $\approx 15 \text{ s}$  con un DC del 13 % (255 ciclos de 2 MHz con una PRF de 1 kHz). Para adaptarnos al caso real se considera que no hay fuente de calor metabólica ni efecto de la perfusión sanguínea. En nuestra simulación el transductor opera en modo continuo, por lo que para tener en cuenta el efecto del modo pulsado, se impone que el calor que se disipa sea un 13 % del calculado, igual que el DC empleado en el laboratorio. En total se estudia la evolución temporal de la distribución térmica durante 35 s, obteniendo así también la curva de enfriamiento durante los 20 s tras la insonificación, como en el experimento. Se calcula la simulación con un paso de 0.1 s. En la Fig.2.8A se muestra la distribución del incremento térmico en el tejido para el instante en el que se alcanza el máximo, justo antes de parar la insonificación ( $t = 15 \text{ s}$ ). La evolución térmica del punto central del foco, a 45 mm de profundidad, se muestra en la Fig.2.8B. En la Fig.2.8C se muestra la comparación entre las isosuperficies que contienen los puntos que se insonifican con una presión acústica de al menos un 50 % respecto al máximo ( $P \geq 1.55 \text{ MPa}$ ) y los que registran un incremento térmico de al menos un 50 % respecto al del foco ( $\Delta T \geq 4.5 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

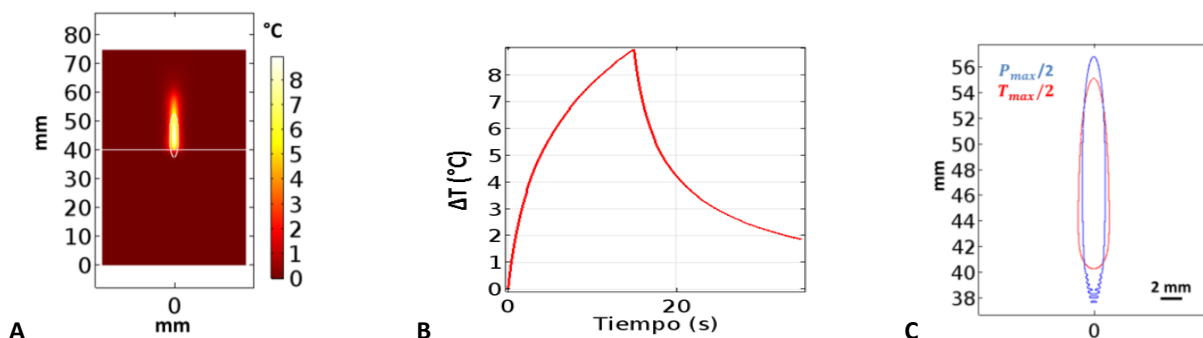


Fig. 2.8: (A) Simulación de la distribución 2D del incremento de temperatura que se produce tras 15 s de insonificación. (B) Evolución térmica del foco (C) Isocontornos del volumen que posee al menos el 50 % de presión (en azul) y de temperatura (en rojo) respecto de los máximos obtenidos.

En la Fig.2.8A puede verse que el incremento de temperatura máximo logrado en el músculo en  $t = 15$  s es de  $9\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La zona que sufre un calentamiento de al menos el 50 % del máximo cubre una distancia de 2.4 mm y 15 mm en la dirección radial y axial, respectivamente. Puede verse en la Fig.2.8C que corresponde con el área que se insonifica con una presión de al menos la mitad de la máxima, si bien la coincidencia no es exacta por los efectos de la conductividad térmica.

En los puntos del eje radial que contiene al foco, representado en rojo en la Fig.2.9A, se calcula el incremento de temperatura que se tiene en función del tiempo, para  $t = 5$  s, 10 s y 15 s, instantes en los que el transductor está encendido, y para  $t = 20$  s, 25 s, 30 s y 35 s, cuando ya está apagado. El resultado se representa en la Fig.2.9B.

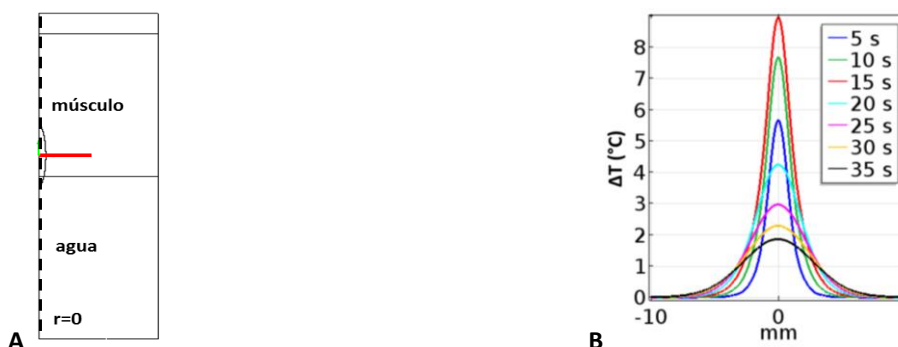


Fig. 2.9: (A) Localización del eje radial analizado, representado en rojo. (B) Incremento térmico obtenido en esos puntos para diferentes instantes en la simulación.

Puede apreciarse que las distribuciones que se obtienen se van ensanchando conforme se avanza en el tiempo, consecuencia de la conducción de calor que se produce en el medio, que hace que zonas cada vez más alejadas del foco vayan adquiriendo temperatura.

Esta simulación se emplea más adelante en la verificación de los registros de temperatura obtenidos con el método no invasivo de Imagen OA.

### 4.3 Cuantificación del incremento térmico que se produce con MIFU con Imagen Optoacústica

La distribución de presión en un punto arbitrario,  $r$ , originada por la iluminación de una fuente láser puede calcularse como [Wang LV 2012]:

$$P_0(r) = H(r) \cdot \Gamma_G(r) = \alpha_a(r) \cdot \Phi(r) \cdot \Gamma_G(r) \quad (2.4)$$

donde  $H$  representa la energía óptica absorbida, que viene dada por el coeficiente de absorción óptica ( $\alpha_a$ ) y por la fluencia de haz láser ( $\Phi$ ). El parámetro  $\Gamma_G$  es conocido como parámetro de Grüneisen, que indica la fracción de energía óptica incidente que se convierte en energía acústica por efecto optoacústico. Así, la presión acústica recibida por el transductor es proporcional al valor de  $\Gamma_G$ , que tiene una dependencia con la variación de temperatura del medio de la forma:

$$\Gamma_G(r, \Delta T) = \Gamma_{G_0}(r) + \Gamma'_{G_0}(r) \Delta T \quad (2.5)$$



Donde  $\Gamma_{G_0}'$  es la tasa de variación del valor de  $\Gamma_{G_0}$  con la temperatura. Para medios acuosos, esta relación puede aproximarse:

$$\Gamma_G(r, \Delta T) = 0.0043 + 0.0053 \Delta T \quad (2.6)$$

Así, el cambio en la intensidad de la señal OA,  $\Delta P_0$ , relativo a su intensidad original,  $P_0$ , en función del incremento de temperatura vendrá dado por [Landa FJO 2017]:

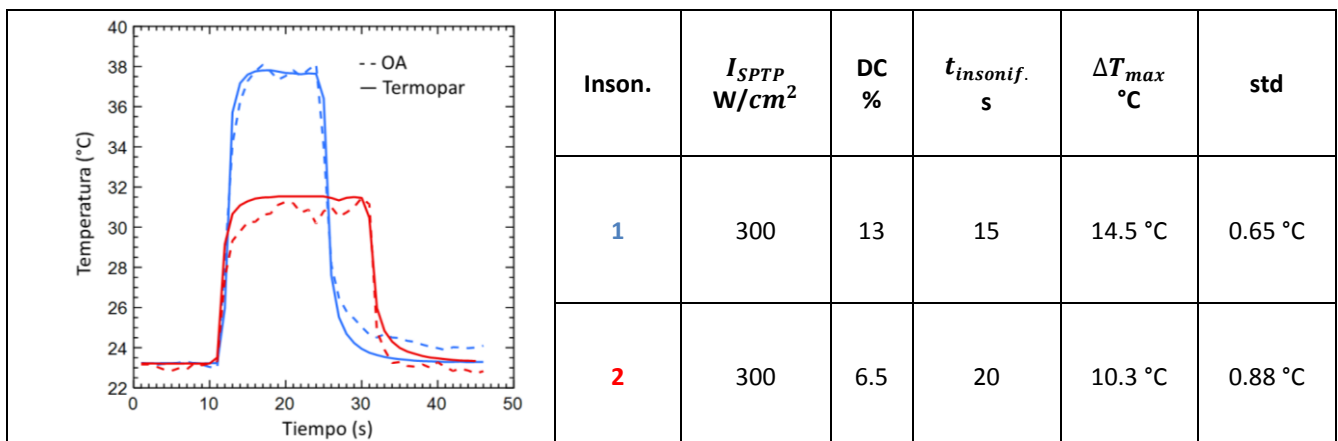
$$\frac{\Delta P_0}{P_0} = \frac{0.0053 \Delta T}{0.0043 + 0.0053 T_0} \quad (2.7)$$

En consecuencia, se estima con la eq.(2.7) que la amplitud de la señal OA aumenta un 4.4 % y un 2.7 % cada °C para temperaturas alrededor de la ambiente ( $T_0 = 22$  °C) y la de los organismos biológicos ( $T_0 = 36$  °C), respectivamente.

Antes de hacer el experimento de cuantificación de aumento de temperatura en un tejido biológico real se realiza un experimento para verificar la relación de la eq.(2.7) con un material fabricado en el laboratorio. Este material se elabora con una disolución de agua purificada con un 1.3 % de agar y un 7.8 % de alúmina ( $Al_2O_3$ ), responsable de la absorción de los US y que hace que el material adquiera un coeficiente de atenuación acústica,  $\alpha$ , de  $\approx 3.6$  dB/cm, medido en el laboratorio con el método de transmisión [Harris GR 1983]. Éste es mayor que el estimado para tejido muscular (de 1.09 dB/cm). Esto se debe a que la proporción de alúmina que se ha empleado aquí es mayor que el generalmente usado para la modelización de tejidos blandos (p.e. para un hacer un material artificial de un tejido que tenga 0.5 dB/cm de atenuación se emplea un 1.8 % de alúmina [Souza RM]). La absorción óptica se logra añadiendo tinta negra hasta lograr que  $\alpha_a \approx 3.5$  dB/cm.

En una muestra de este material se realizan dos medidas con el transductor de MIFU enfocando a 5 cm de profundidad. Los parámetros dosimétricos de cada insonificación se recogen en la Tabla 2.2. El calentamiento que se produce calculado por Imagen OA se compara gráficamente con la adquisición simultánea de un termopar situado en el foco (*Physitemp Instruments Inc.*).

**Tabla 2.2: Comparación de la medida por Imagen OA y el registro obtenido con un termopar para dos insonificaciones diferentes llevadas a cabo en un material artificial [Landa FJO 2019].**





La correspondencia entre ambas medidas verifica la validez de las relaciones propuestas, lo cual se justifica dado el alto contenido en agua del material. Las diferencias son atribuibles al posicionamiento del termopar y la zona donde se analizan las Imágenes de OA.

Comprobada la validez de la técnica de Imagen OA para cuantificar el incremento de temperatura, se realiza una medida para estudiar su capacidad para la localización tridimensional del foco térmico. Para ello se emplea una muestra ex vivo de músculo de ternera. Dado el alto contenido acuoso de este tejido ( $\approx 75\%$ , [Ward SR]) es esperable que puedan emplearse las mismas relaciones usadas en el caso del material de test.

Se insonifica la muestra con el transductor de MIFU trabajando a máxima intensidad ( $300 \text{ W/cm}^2$ ) emitiendo pulsos de 255 ciclos con un PRF de 1 kHz ( $\text{DC} = 13\%$ ). La insonificación se mantiene durante 15 s. Para estudiar cómo afecta a la medida la profundidad a la que se encuentra el foco térmico se realizan, en la misma muestra, tres insonificaciones, ilustradas en la Fig.2.10. En la primera se sitúa el foco justo en la superficie del tejido que está enfrentada al transductor OA (a), en la segunda a 1.5 mm de profundidad (b) y en la tercera a 3 mm (c).

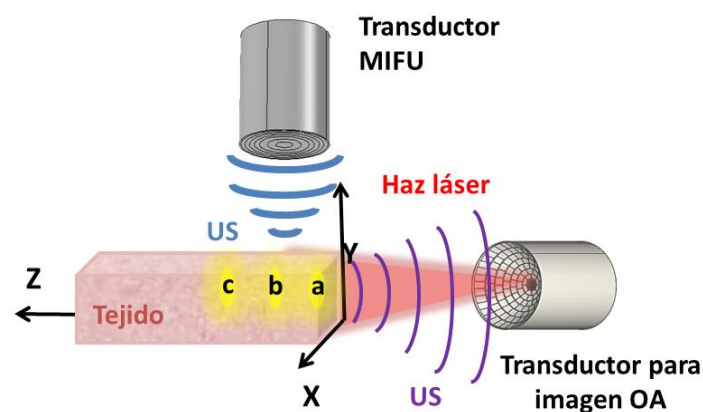


Fig. 2.10: Profundidad del foco dentro del tejido respecto de la superficie que está enfrentada al transductor de OA: a= 0 mm, b= 1.5 mm y c = 3 mm.

En la Fig.2.11 se muestran las distribuciones que se obtienen tras calcular la diferencia de intensidad de la señal OA en el instante de máximo incremento térmico ( $t = 15 \text{ s}$ ) respecto de la imagen original para los tres casos, siguiendo la metodología mostradas en la Fig.2.4. La línea que limita la superficie del tejido enfrentada al sistema de OA se representa con una línea discontinua de color blanco en la Fig.2.11.

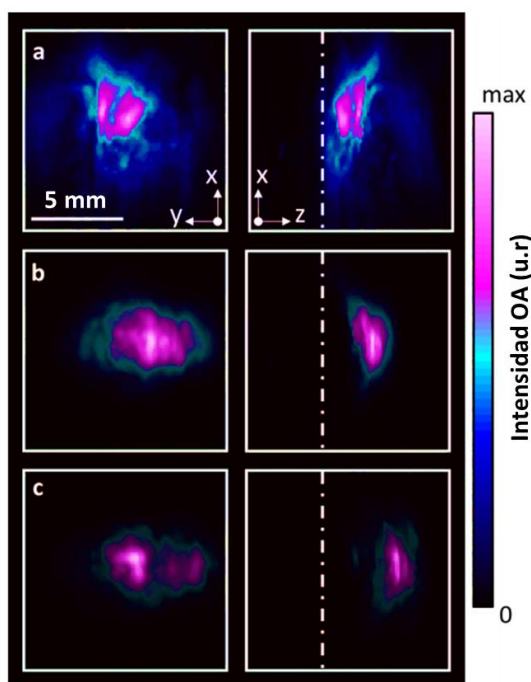


Fig. 2.11: Distribuciones de intensidad de la Imagen OA correspondientes al instante de máximo incremento térmico según la posición del foco (Fig.2.10) a= 0 mm, b= 1.5 mm y c = 3 mm [Landa FJO 2019].

La disminución en la intensidad entre las sucesivas imágenes se debe a la atenuación de la luz láser que se tiene a medida que aumenta la profundidad, que además conlleva una menor relación señal ruido, lo que empeora la resolución en la delimitación del foco térmico.

Finalmente, se combinan las dos posibilidades de la Imagen OA: la localización de la región que se calienta y la cuantificación de la evolución de este calentamiento. Situando el foco de MIFU en un punto cercano a la superficie para garantizar buena señal OA, se obtiene la evolución de la distribución de la temperatura para la misma insonificación que en el caso anterior. La adquisición de las imágenes dura 40 s, de manera que el transductor se enciende 5 s después de comenzar con el registro y este se mantiene 20 s adicionales tras los 15 s de insonificación, para obtener también la curva de enfriamiento. Las distribuciones obtenidas con la técnica de Imagen OA se muestran en la Fig.2.12 para un instante antes de que se apliquen los US (2.5 s), cuando llevan 5 s y 10 s aplicándose (10 s y 15 s, respectivamente), en el momento justo antes de apagar el transductor (20 s) y tras 4 s en los que el sistema se está enfriando (24 s).

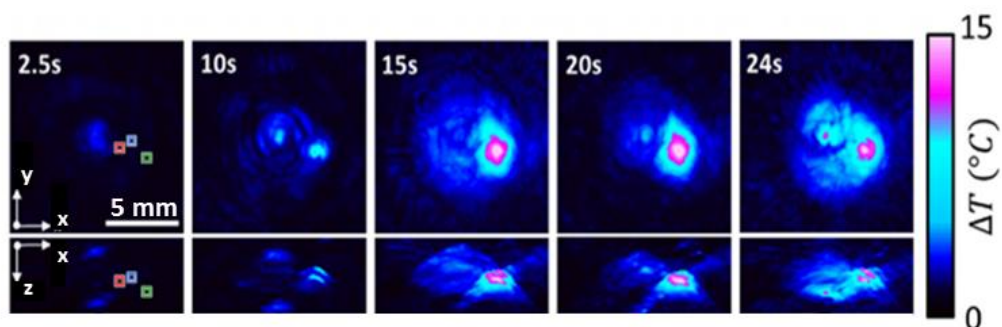


Fig. 2.12: Monitorización 3D de las distribuciones de temperatura durante un tratamiento de MIFU en una muestra de tejido ex vivo.

En los 3 puntos señalados en rojo, azul y verde en la Fig.2.12 se calcula la evolución térmica obtenida con Imagen OA y la predicha con la simulación del apartado 4.2 de este capítulo para puntos similares respecto del foco. El resultado se muestra en la Fig.2.13.

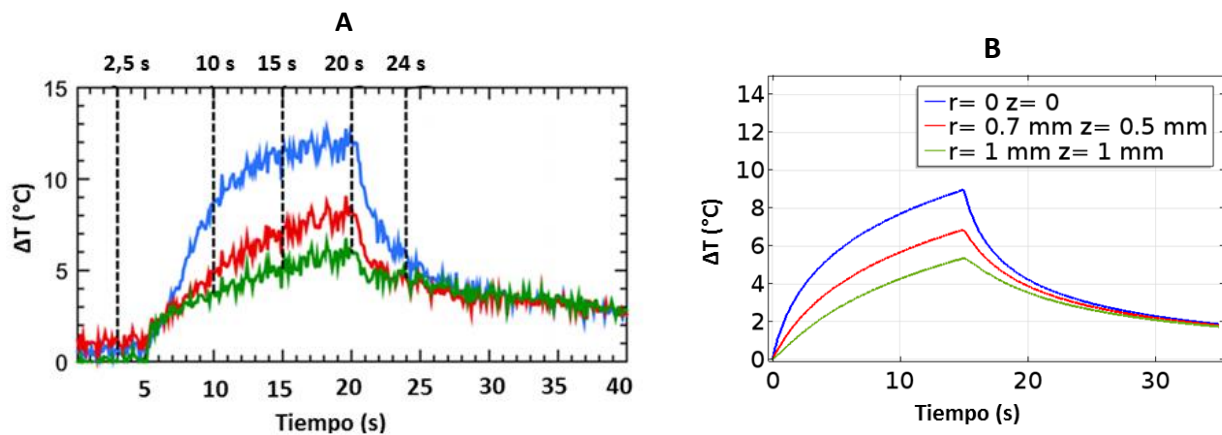


Fig. 2.13: Evolución térmica de los puntos señalados en la Fig.2.12 durante un tratamiento de MIFU, (A) calculado con Imagen OA y (B) resultado de la simulación para puntos similares.

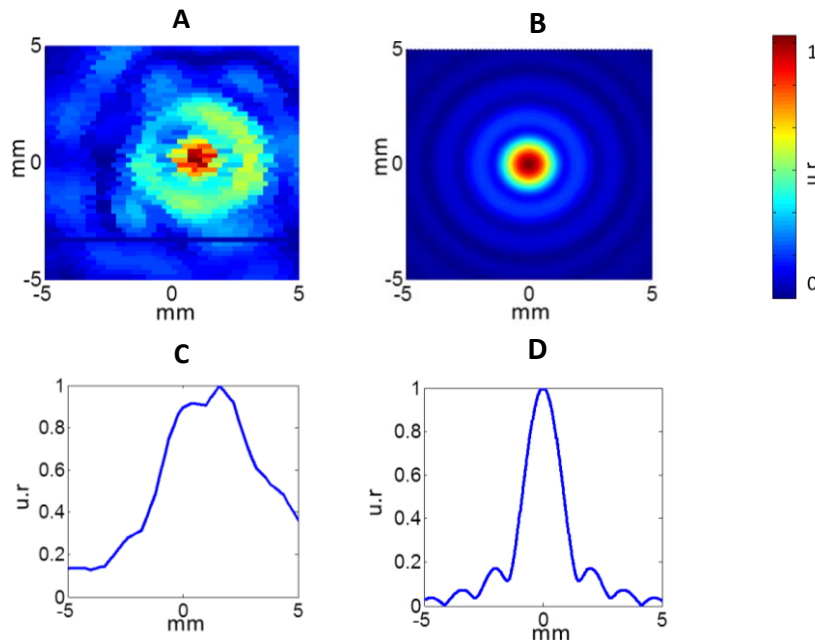
Comparando los datos de la medida en el laboratorio con los de la simulación se observa que la técnica de Imagen OA estima que se produce un incremento térmico máximo en el foco de 12 °C, mayor que los 9 °C predichos por la simulación. Lo mismo ocurre para los máximos alcanzados en los otros puntos: frente a los 8 °C y 6 °C obtenidos en puntos próximos al foco, se había predicho un aumento de 6.8 °C y 5.3 °C, respectivamente. El error promedio es de un 17 % y se justifica en el próximo apartado.

#### 4.4 Discusión

La medida realizada en el laboratorio en un material artificial con el método de PES muestra una desviación estándar de los datos medidos con el termopar respecto de los calculados de 0.77 °C, parecida a la obtenidas con Imagen OA, de 0.65 °C y 0.88 °C, por lo que ambas técnicas tienen una precisión similar. Sin embargo, la Imagen OA tiene la ventaja de poder realizar un registro tridimensional frente al de una línea del método de PES. Además, la resolución espacial del foco es mucho mayor. Con el código en este trabajo empleado, en el análisis de la señal para calcular los desfases, se comparan tramos que son de 1  $\mu$ s, por lo que se tienen resoluciones espaciales del orden del mm, mientras que con Imagen OA se trabaja con 0.2 mm de resolución.

Las diferencias obtenidas en la comparativa de las curvas obtenidas con Imagen OA y simulación en un tejido ex vivo son atribuibles al tipo de transductor empleado en la simulación. En el modelo se ha considerado un transductor cóncavo con una proyección transversal con el mismo área que el transductor usado en los experimentos ( $\approx 7 \text{ cm}^2$ ), sin embargo esta geometría focal no coincide con la real. El sistema experimental usado es un array anular con ocho elementos discretos a los que se les excita con retardos calculados considerando el centro geométrico de cada uno de ellos como referencia de distancia al foco. El foco real no es por tanto el de una geometría esférica

continua. Para visualizar este hecho, se mide en el laboratorio y se calcula la distribución transversal en el foco de la amplitud de presión acústica para ambos casos y se comparan en la Fig.2.14 para un área de 10 x 10 mm. En el laboratorio la medida se obtiene haciendo un barrido con un hidrófono de aguja (*DAPCO 54389*), adquiriendo el máximo de la señal acústica con un paso de 0.2 mm.



**Fig. 2.14:** (A) Distribución 2D y (C) radial de la amplitud relativa en el plano transversal del foco emitido por el transductor usado comparadas con las del simulado, (B) y (D), respectivamente.

Si se observan las distribuciones radiales de las Fig.2.14C y 2.14D, se comprueba que el foco en el transductor usado en las insonificaciones para la medida de Imagen OA es más ancho. Si se considera la extensión del mismo que posee una amplitud de al menos el 50 % del máximo se obtienen 5.2 mm para el primer caso, frente a 1.8 mm para el simulado. Esto implica que las zonas de alrededor del foco reciben más intensidad acústica que la predicha y por tanto incrementan la temperatura que se alcanza.

Otra fuente de error es que en la simulación las propiedades de los materiales se consideran homogéneas y constantes. Es conocido que el valor del coeficiente de atenuación es sensible a factores como la orientación de las fibras o el contenido proteico, por lo que, dado que el tejido empleado (muestra de ternera) no es homogéneo ni tiene exactamente las mismas propiedades que un músculo in vivo como el considerado, también cabe esperar que la correspondencia no sea exacta, al usarse en la simulación los valores reportados para tejidos humanos.

## 5. Conclusiones

En este capítulo se ha mostrado la utilidad de la Imagen OA, una técnica novedosa y que se encuentra en un desarrollo exponencial respecto a sus aplicaciones, para medir de forma no

invasiva la distribución espacial y evolución temporal del calentamiento que se produce con un tratamiento de MIFU.

La imagen OA permite resolver las zonas que se calientan con una alta resolución espacial ( $\approx 200 \mu\text{m}$ ) y con un período temporal lo suficientemente alto para poder prevenir daños durante un tratamiento en clínica (0.1 s). Su penetrabilidad viene condicionada por la absorción óptica del láser, que hace que en la actualidad se emplee para hacer imagen a profundidades de 1-2 cm [Wang LV 2009]. Grupos especializados en el área trabajan para superar las limitaciones en el campo de visión que se tiene con esta técnica [Wang L]. También se plantean alternativas para alcanzar grandes profundidades como p.e. la de guiar el haz láser mediante un catéter [Rebling J]. El hecho de que la Imagen OA se base en la detección de US también abre la posibilidad de diseñar sistemas híbridos de TUS/OA que puedan emplearse simultáneamente para terapia e imagen, área conocida como OPUS (*Optoacoustic Ultrasound*) [Dean-Ben XL 2017].

## Capítulo 3.

# Propuesta de una sistemática estándar de caracterización del campo acústico en un experimento de insonificación in vitro

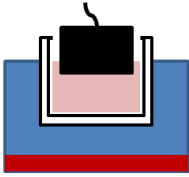
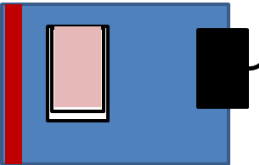
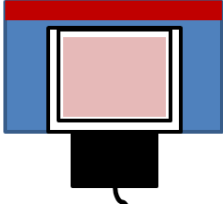
### 1. Introducción y motivación

La interacción de los US con las células y tejidos biológicos se estudia a nivel más básico en cultivos in vitro, permitiendo así a los investigadores conocer sus efectos a este primer nivel. Este tipo de experimentos constituyen el primer paso en la investigación de la aplicación terapéutica de los US, pues resultan fundamentales para entender la acción biológica de este tipo de radiación. Las revisiones bibliográficas realizadas dan cuenta de una aparente falta de reproducibilidad y de que la extracción de conclusiones es contradictoria entre trabajos [Robertson VJ]. La causa de ello es atribuible a que no hay un consenso en la estandarización de la configuración experimental empleada y en la manera de cuantificar las dosis de los US. Por ello se requiere estudiar todos los factores que intervienen y hacer una propuesta de cuantificación de los parámetros físicos de los tratamientos que se aplican.

Para llevar a cabo los experimentos in vitro, se han empleado hasta la fecha distintas configuraciones, colocando el transductor y el cultivo a diferentes distancias y posiciones relativas. Algunos ejemplos de situaciones comúnmente dadas en la literatura se muestran en la Tabla 3.1, donde, además de una ilustración y las referencias, se describe la principal característica. Además del transductor (representado en negro) y el pocillo que contiene las células (en blanco), adheridas a la base o en suspensión en el líquido de cultivo (en rosa), pueden emplearse baños térmicos (en azul) o absorbentes acústicos (en rojo). La disposición empleada en cada caso se elige según criterios de posibilidad de implementación en el laboratorio, para un mejor control y reproducibilidad del experimento o para fijar condiciones de propagación (p.e emplear el campo cercano/lejano, evitar/no evitar el calentamiento, insonificar con una onda progresiva o estacionaria...)

Propuesta de una sistemática estándar de caracterización del campo acústico en un experimento de insonificación in vitro

Tabla 3.1: Configuraciones experimentales empleadas en los experimentos para estudiar los efectos de los US in vitro.

Descripción del set up	Esquema	Referencia
<p>Cultivo insonificado desde la superficie. Esta configuración dificulta el mantener la esterilidad del cultivo.</p>		<p>[Doan N] [Secomski W] [Patel US] [Zhang Y (1) 2012] [Zhang Y (2) 2012] [Tsuru H] [Katiyar A]</p>
<p>Cultivo inmerso en un baño térmico y transductor alejado. Esta configuración asegura una insonificación más homogénea si se coloca el pocillo en la zona de campo lejano. Se evita el incremento de temperatura del cultivo por calentamiento de la superficie del transductor.</p>		<p>[Mortimer AJ] [Karshafian R]</p>
<p>Cultivo insonificado desde la base. Garantiza la esterilidad. Fácil reproducibilidad e implantación.</p>		<p>[Secomski W] [Unsworth J] [Hassan MA] [Maalouf JE] [Yumita N 1989] [Yumita N 2002]</p>

En un análisis del campo acústico que se tiene en experimentos de insonificación in vitro de este tipo, *Hensel K et al* muestran en su trabajo cómo las condiciones de la configuración experimental empleada modifican el campo acústico [Hensel K]. Empleando simulaciones y medidas experimentales estudian la aparición de patrones de interferencia y ondas estacionarias como consecuencia de las reflexiones que se producen en el sistema. Afirman que pueden alcanzarse incrementos de amplitud de la presión acústica de hasta un factor 5 debido a la confinación del campo en un pocillo de una placa de cultivo. Sin embargo, aun siendo uno de los trabajos referentes, su análisis no considera la interferencia de múltiples reflexiones y variaciones temporales de las distribuciones de amplitud, como ocurre en el caso real.

En función de lo anterior, en este capítulo se ha profundizado en el estudio del caso real de la configuración más usada: la insonificación de una placa de cultivo colocando el transductor en contacto con su base, con el fin de mostrar el tipo de propagación de los US y los valores de presión e intensidad acústica reales que se aplican a los cultivos. De esta forma se pretende crear un corpus de conocimiento que permita correlacionar los efectos con la señal que se emplee. Un esquema detallado de la disposición de los elementos del sistema experimental en estudio puede verse en la Fig.3.1. Se asegura la transmisión de los US colocando una capa muy delgada de gel intermedia

entre la placa y el transductor. Esta configuración experimental es muy común ya que es fácil de implementar, es reproducible y garantiza la esterilidad al no ser necesario quitar la tapa que cubre la placa de cultivo.

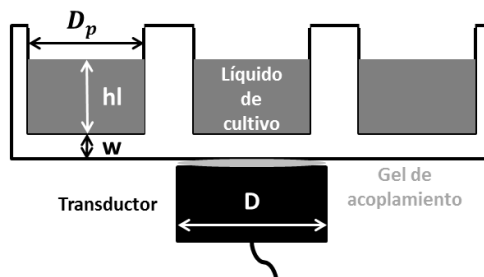


Fig. 3.1: Esquema de la configuración experimental estudiada. Insonificación del cultivo colocando el transductor en la base de la placa.

La presencia de interfaces hace que puedan darse diferentes situaciones físicas como consecuencia de las múltiples reflexiones y la superposición de ondas. Para no modificar estas reflexiones durante las insonificaciones, el sistema debe mantenerse estático (no usar ningún tipo de agitación como en las bandejas de las estufas de cultivo). Así, en este tipo de experimentos, aparecerá un campo estacionario si el pulso es lo suficientemente largo en comparación con la altura del líquido con la que se rellena el pocillo ( $h_l$  en la Fig.3.1). Esta situación de estacionariedad se evita en algunos estudios p.e. colocando absorbentes en la interfaz, insonificando con pulsos cortos o agitando el sistema para romper el plano paralelismo. Trabajos como el de *Secomski W et al* demuestran que el efecto que se obtiene sobre el cultivo está condicionado por la configuración de experimentación y que la aparición de un campo estacionario y reflexiones múltiples influyen en el resultado, de manera que se precisan intensidades del transductor menores para lograr el mismo efecto que en condiciones de propagación libre [Secomski W].

El objetivo de este capítulo es el de identificar los efectos dominantes de algunos de los parámetros que se pueden controlar en este tipo de experimentos sobre la distribución de campo acústico, como son: la altura de la interfaz liquido-aire ( $h_l$ ), la duración del pulso, el tamaño del transductor ( $D$ ) y su alineación con el sistema. Este estudio se lleva a cabo con un transductor de 1 MHz comercial (*Panametrics V314*), que tiene la misma frecuencia que el utilizado en el trabajo de referencia de *Hensel K et al* [Hensel K], para corregir y complementar dicho estudio. Además, en base a lo analizado en este capítulo, se propone una sistemática estándar de caracterización del campo acústico en un experimento de insonificación in vitro. Ésta será la seguida en el capítulo posterior en un experimento real llevado a cabo en nuestro laboratorio.

Para estudiar la distribución de presión acústica, se llevan a cabo simulaciones, así como medidas experimentales con hidrófonos calibrados y con balanzas de fuerza de radiación, siguiendo los estándares metrológicos correspondientes.



## 2. Antecedentes

El trabajo más relevante que se ha publicado sobre el análisis del campo acústico que se tiene en la configuración experimental es de *Hensel K et al* [Hensel K]. En él se estudian las distribuciones de presión acústica para pulsos cortos (de 5 ciclos) y largos (de 10 y de 30 ciclos) emitidos por un transductor ideal tipo pistón en las condiciones de experimentación in vitro más empleadas. Las conclusiones que extraen de sus resultados para un caso similar al nuestro son:

(i) En la simulación de la propagación de un pulso de 5 ciclos de  $200 \text{ kPa}_{pp}$  y 1 MHz, mostrada en la Fig.3.2, la superposición de la onda incidente y las generadas en las reflexiones forman, debido a la geometría del pocillo y el campo cercano del transductor, una distribución de presiones en la base con un patrón anular y con una amplitud máxima en el centro. Por otro lado, cerca de la interfaz entre el líquido y el aire muestran la interferencia que se produce entre la onda incidente y la reflejada.

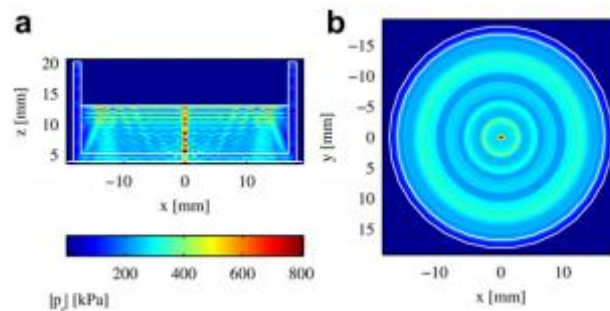


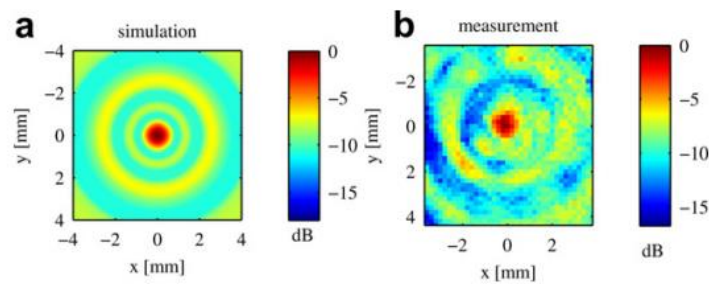
Fig. 3.2: Distribución de la amplitud de presión de rarefacción de un pulso de 5 ciclos de  $200 \text{ kPa}_{pp}$  y 1MHz propagándose en la dirección  $+z$  en el plano (a)  $xz$  y (b)  $xy$ , cuando se simula el caso de insonificación de un pocillo desde su base. Con una altura de líquido de 9 mm, una capa de acoplamiento de 0.4 mm y un grosor de la base de poliestireno de 1.25 mm [Hensel K].

En esta simulación muestran la aparición del patrón de interferencia en la base del pocillo (Fig.3.2b). Esta distribución implica que la insonificación en ese plano, donde crecen las células en el caso de un cultivo adherido a la base, no es uniforme. Sin embargo, este resultado es incompleto por no tenerse en cuenta la variación temporal de la distribución ni las múltiples reflexiones que se producen en la cavidad.

(ii) Cuando el pulso es largo, con una longitud espacial mayor que dos veces la altura del medio líquido, el sistema se convierte en una cavidad resonante. Estudiando, para un pulso de 30 ciclos, la presión en la base del pocillo para diferentes combinaciones de parámetros (altura del líquido, espesor de la base de poliestireno y de la capa de gel de acoplamiento) concluyen que la altura del líquido es el parámetro más condicionante, evidenciando la importancia de controlar la distancia exacta entre la base y la interfaz de aire para obtener resultados reproducibles.

(iii) Para un pulso de 10 ciclos muestran las distribuciones anulares de presión en la base del pocillo, con diferencias entre el centro y las posiciones radiales de un factor entre 2 y 3.20 (6 dB y 10 dB) (Fig.3.3).

**Propuesta de una sistemática estándar de caracterización del campo acústico en un experimento de insonificación in vitro**



**Fig. 3.3: (a) Simulación y (b) medida de la distribución de presión en la base del pocillo para una altura de líquido de 10 mm y un pulso de 10 ciclos [Hensel K].**

Para este caso, no se especifica en qué parámetro de la señal de presión acústica está basada esta distribución (valor máximo, promedio, o valor en un instante). Es conocido que, dado que con 10 ciclos no se ha alcanzado la estacionariedad, la amplitud dependerá del intervalo temporal del pulso en el que se mida la amplitud, pues la interferencia va cambiando.

(iv) Demuestran que para un diámetro de transductor mayor que el del pocillo, aparecen ondas de presión que se transmiten por las paredes. Estas ondas, de tipo guiado, emiten energía al líquido, dando lugar a interferencias constructivas en ciertos puntos e incrementando la presión, sobretodo en el eje central del pocillo, por su simetría. Sin embargo, afirman que cuando el transductor es más pequeño que el pocillo no hay ondas que se propaguen por las paredes y la distribución de presión en la base está condicionada por las características del campo acústico en el campo cercano. Esto no es exacto ya que debido a la difracción del campo siempre se transmite parte de la energía por las paredes.

(v) Demuestran que la desalineación del sistema transductor-placa sigue dando lugar a la superposición constructiva en el centro pero que el patrón deja de ser anular.

En nuestro trabajo, para realizar una simulación más cercana a la realidad se han tomado en cuenta aspectos que no han sido consideradas en la literatura antes. En primer lugar, no se realizan las simulaciones con un transductor ideal tipo pistón sino con la distribución real en módulo y fase del transductor usado para las medidas experimentales. Para ello se mide con un vibrómetro interferométrico láser la amplitud y fase de su desplazamiento en la dirección perpendicular a su superficie emisora. Esta distribución de amplitud será un input en las simulaciones del campo acústico.

La cadena de modelos de simulación realizados muestra la variación del campo acústico transmitido por el transductor utilizado según se va restringiendo su propagación en el medio: primero se muestra su comportamiento en campo libre, luego se le impone una interfaz de aire a una distancia de  $5\lambda$  y finalmente se analiza el caso de confinarlo en el pocillo. En las simulaciones se considera tanto el caso de una emisión continua, como emisión pulsada, con pulsos de 5 ciclos y de 30 ciclos. La emisión continua conlleva una distribución de presión estacionaria en el tiempo, pero cuando se emiten pulsos, debe analizarse la presión en cada punto a lo largo del tiempo, pues no es constante, como erróneamente sugieren los resultados de *Hensel K et al* [Hensel K].

Nuestro transductor es de dimensiones menores pero cercanas a las del diámetro del pocillo (tiene un diámetro de 19 mm de frente a los 22.2 mm de diámetro interno de la pared del pocillo) en comparación con el pistón plano de 38 mm insonificando la base de un pocillo de 33.7 mm en que centra su análisis *Hensel K et al.*

### 3. Materiales y métodos

Como ya se ha introducido, en este capítulo se van a comparar resultados de simulación con medidas experimentales en el laboratorio del campo acústico emitido por un transductor comercial de 1 MHz.

#### 3.1 Simulaciones

Para simular la distribución de presión acústica se emplea COMSOL Multiphysics® 5.2a. Concretamente se utiliza el módulo de *Pressure Acoustics*, con el que se puede trabajar tanto en el dominio de la frecuencia, en el que se presupone una emisión continua del transductor, como en el dominio temporal, para estudiar la evolución de la propagación del pulso de US. En el dominio de la frecuencia se resuelve la ecuación de Helmholtz, dada por:

$$\nabla \left( -\frac{\nabla P}{\rho} \right) - \left( \frac{w^2 P}{c^2 \rho} \right) = 0 \quad (3.1)$$

Para el caso transitorio la ecuación de onda clásica, expresada como:

$$\frac{1}{c^2 \rho} \frac{\partial^2 P}{\partial t^2} + \nabla \left( -\frac{\nabla P}{\rho} \right) = 0 \quad (3.2)$$

donde  $P$  es la presión total en un punto,  $w$  la frecuencia angular de la onda y  $\rho$  y  $c$  la densidad y velocidad del sonido en el medio, respectivamente. Se asume propagación lineal.

Dadas las simetrías del problema se emplea un diseño bidimensional con simetría axial y rotacional. El mallado se realiza con una distribución de elementos triangulares cuyo tamaño máximo no supere  $\lambda/5$  en cada parte de la configuración, formada por diferentes materiales. En todos los modelos de simulación, en los materiales que limitan en cada caso la geometría, se incluyen capas de 5 mm con las propiedades de *Perfectly Matched Layer (PML)*.

Se estudian varias situaciones: se simula la propagación del campo acústico del transductor como si emitiera en un medio infinito de agua (campo libre), en un medio finito de agua (aparición de interfaces agua-aire y agua-PZT), y cuando se confina este campo en una guía como es un pocillo de una placa de cultivo real como los empleados en los experimentos in vitro, con un volumen de líquido finito. El esquema de la geometría diseñada para estas simulaciones, así como algunas dimensiones de cada modelo, se recogen en la Tabla 3.2.

Propuesta de una sistemática estándar de caracterización del campo acústico en un experimento de insonificación in vitro

Tabla 3.2: Dimensiones y diseño de la secuencia de simulaciones llevadas a cabo.

	Diseño para el transductor de 1 MHz	
	Se emplea un diseño de transductor formado por 7 anillos concéntricos con 19 mm de diámetro, basado en las medidas de la amplitud de vibración del transductor utilizado.	
Simulación del campo acústico	Esquema	
<b>Campo libre en agua (Medio infinito)</b>		Con un transductor de 19 mm de diámetro, el campo lejano aparece a una distancia de $\approx 61$ mm. Se simula una profundidad de 100 mm para el campo libre.
<b>Interfaz de aire en agua (Medio finito)</b>		Se impone que el volumen de agua sea finito. La interfaz de aire se sitúa a 7.4 mm de altura.
<b>Confinado en un pocillo de experimentación in vitro</b>		Se confina el campo en una guía con las dimensiones de un pocillo de experimentación in vitro de una placa comercial de 12 pocillos, relleno con una altura de líquido de cultivo de 7.7 mm ( $\approx 3$ ml). El sistema se rodea de aire.

Los parámetros de las propiedades acústicas de interés de los materiales empleados en las simulaciones se recogen en la Tabla 3.3 [Hensel K].

Tabla 3.3: Propiedades acústicas de los materiales empleados en las simulaciones [Hensel K].

Material	$\rho$ (kg/m <sup>3</sup> )	c (m/s)	Z (kg/m <sup>2</sup> s)	$\alpha$ (Np/m)
Agua (20 °C)	998	1480	$1.47 \cdot 10^6$	0.025
Líquido de cultivo (37 °C)	998	1543	$1.54 \cdot 10^6$	0.016
Poliestireno	1050	2400	$2.52 \cdot 10^6$	4.025
Aire	1.24	344	426	2.875

En los modelos de simulación no se incluyen ni la capa de gel, que luego se coloca en un caso real entre el transductor y la placa de cultivo, ni la presencia de las células en el líquido de cultivo, pues se ha considerado que no influyen en la distribución de presión acústica del campo. El comportamiento del transductor se simula imponiendo un desplazamiento en la dirección normal a una superficie que está en contacto con la base del pocillo. Se ignora por tanto el grosor de la cerámica de PZT. La interfaz de aire es plano paralela, por lo que tampoco se considera el menisco. Se ignoran posibles pequeñas inclinaciones y desalineaciones que pudiera haber en las condiciones experimentales. Se trata por tanto de una situación simplificada (e idealizada) de la realidad.

### 3.2 Medidas experimentales

En primer lugar, se realizan medidas de la amplitud de vibración del transductor en aire en la dirección perpendicular a su superficie con un interferómetro laser (*Polytec OFV 50000*). Este procedimiento sirve para conocer cómo es la distribución de la superficie de vibración del transductor en amplitud y fase y, por tanto, cuánto se aleja de una suposición de un pistón plano ideal, que corresponde a una superficie de vibración completamente homogénea y en fase. Esta suposición de pistón plano es la utilizada en la bibliografía revisada [Hensel K].

La medida en 3D de la presión acústica se realiza con un hidrófono de aguja de 0.6 mm de diámetro activo (*DAPCO 54389*). Su localización se controla mediante sistemas mecánicos de posicionamiento 3D asistidos por ordenador. La curva de sensibilidad de este hidrófono se ha medido en el laboratorio siguiendo las normas internacionales [IEC 62127-2:2017]. Concretamente, para una frecuencia de 1 MHz se obtiene una sensibilidad de 0.98  $\mu\text{V}/\text{Pa}$ . Para el registro y la visualización de la señal acústica se utiliza un osciloscopio digital (*Teledyne Lecroy Wavesurfer 3024*).

### 3.3 Configuración experimental

El transductor utilizado para este trabajo es un *Panametrics V314* de 19 mm de diámetro. Tiene una frecuencia central de 1 MHz. Este tipo de transductor es de onda longitudinal, de elemento único y posee una capa de acoplamiento  $\lambda/4$  y sección de amortiguación. Se conecta a un generador de funciones *HP 8116 A*.

La configuración experimental escogida para realizar el estudio es la ya mostrada en la Fig.3.1. El transductor se coloca en contacto directo con la base de una placa comercial de poliestireno de 12 pocillos redondos de fondo plano, con una fina capa de gel (*Aquasonic 100, Parker Lab. Inc*), para asegurar la transmisión del campo acústico. En los experimentos de insonificación in vitro, el pocillo se rellena con un volumen controlado y reproducible de líquido de cultivo (DMEM) y las células se cultivan o bien en suspensión o adheridas a la base de la placa como será nuestro caso. La placa está siempre cubierta con su correspondiente tapa para mantener la esterilidad durante las insonificaciones. No se emplean elementos absorbentes que eviten las reflexiones ni baño térmico.

La onda acústica que sale del transductor atravesará el poliestireno y el líquido de cultivo, encontrándose con la primera interfaz de aire, lo cual supone una reflexión prácticamente total de la onda. Conocida la impedancia acústica del líquido de cultivo (Tabla 3.3) el coeficiente de reflexión  $\Gamma$  se calcula como [Humphrey VF]:

$$\Gamma = \frac{|Z_{\text{aire}} - Z_{\text{liquido}}|}{|Z_{\text{aire}} + Z_{\text{liquido}}|} \approx \frac{|426 - 1.54 \cdot 10^6|}{|426 + 1.54 \cdot 10^6|} \approx 0.9994 \quad (3.3)$$

Si en lugar del líquido de cultivo se considera agua, se obtiene un  $\Gamma \approx 0.9999$ .

Tras esta primera reflexión, la onda se propagará de nuevo por el líquido, se transmite a continuación al poliestireno, lo que implica una reflexión de  $\Gamma \approx 0.2376$ .

Posteriormente se encuentra con otra interfaz: la que existe entre el poliestireno y el transductor. Conocida la impedancia para el poliestireno (Tabla 3.3) y sabiendo que la impedancia del PZT-4 asciende a  $3.4 \cdot 10^7 \text{ kg/m}^2 \text{ s}$  [NTD Resource Center], puede calcularse que  $\Gamma \approx 0.8630$ .

Adicionalmente, se producen reflexiones de las ondas que se propagan a través de las paredes como consecuencia de la interfaz entre el poliestireno y el aire ( $\Gamma \approx 0.9997$ ).

Todas estas reflexiones dan lugar a ondas que viajan en sentidos diferentes y convierten el problema de propagación acústica en un sistema con múltiples interferencias que tienen como consecuencia, como se va a desarrollar a continuación, un campo acústico que no se corresponde con lo comúnmente descrito en la literatura.

## 4. Resultados

### 4.1 Caracterización de la superficie de vibración y diseño del transductor para el modelo de simulación

En la Fig.3.4 se muestra el resultado del barrido de interferometría láser de la amplitud de desplazamiento máxima en la dirección transversal del transductor *Panametrics V314* para un paso espacial de 0.1 mm y un área de 20 x 20 mm. Puede apreciarse que se corresponde con un patrón de anillos con diferentes amplitudes. Este patrón es el resultado de la superposición de la vibración del modo thickness con los modos radiales que se originan debido a las dimensiones finitas del disco [Ronda S, 2018]. Para simular el campo acústico que emite esta apertura utilizada, se divide la superficie emisora en zonas concéntricas con diferente amplitud. Con esta finalidad, se extraen los datos de amplitud de vibración a lo largo de un diámetro, representado en la Fig.3.4A con una línea discontinua, y se promedia su valor en diferentes zonas, obteniéndose así el gráfico de la Fig.3.4B. Dado que el problema en el modelo de simulación tiene simetría axial, se trabaja sólo con una mitad de la geometría completa (curva roja).

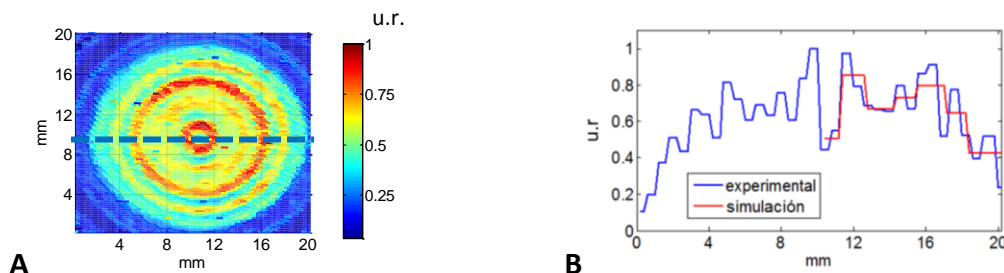
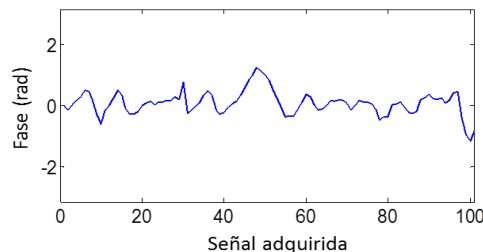


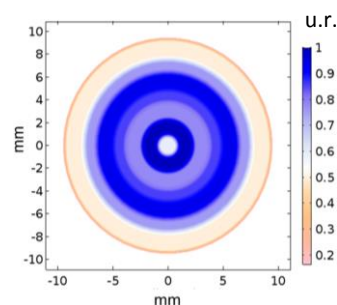
Fig. 3.4: Amplitud de vibración en la dirección transversal del transductor comercial de 1 MHz *Panametrics V314*. (A) Barrido de toda la superficie. (B) Datos a lo largo de un diámetro (en azul) y promedio correspondiente a las diferentes zonas para su simulación (en rojo).

Para conocer el corrimiento de la fase, se registra la señal de interferometría a lo largo de un diámetro. En total se adquieren 101 puntos con un paso de 0.2 mm y el resultado de la diferencia de fase entre ellos se muestra en la Fig.3.5. Para este caso el máximo desfase apenas llega a  $\pi/4$  (es de 1.23 rad) y sólo afecta a unos pocos puntos de la zona central (que representan tan sólo el 10 % de la superficie total).



**Fig. 3.5: Desfase de la señal adquirida en 101 puntos a lo largo de un diámetro del transductor.**

En base a estos resultados, se distinguen 7 zonas, cada una con una amplitud diferente (Fig.3.4B) y la misma fase, dado que el corrimiento de la misma obtenido es despreciable (Fig.3.5). La geometría de simulación del transductor será por tanto una sucesión de 7 anillos concéntricos con una amplitud de vibración relativa igual a la mostrada en la Fig.3.6.



**Fig. 3.6: Representación del diseño para simular el comportamiento del transductor comercial de 1 MHz**

Para este transductor, se simulan y se estudian en el laboratorio tres situaciones, ya introducidas en la Tabla 3.2:

- Distribución de presión acústica en campo libre. Medio infinito de agua.
- Distribución de presión acústica con una altura finita de agua (7.4 mm,  $5\lambda$ ).
- Distribución de presión acústica cuando se confina el campo en un pocillo de una placa de cultivo como las empleadas en los experimentos in vitro, con un volumen finito de líquido (3 ml, que corresponden a una altura de 7.7 mm,  $5\lambda$ ).

#### **4.2 Estudio del campo acústico en campo libre. Influencia de la no homogeneidad de la amplitud y fase de la superficie radiante**

En primer lugar, se estudia el efecto que tiene considerar que el transductor es un pistón ideal (homogeneidad de amplitud y fase), como se ha hecho hasta ahora en la bibliografía, o bien usar la apertura real del transductor que se emplea experimentalmente.

La distancia límite entre el campo cercano y lejano, que se conoce como límite de Fraunhofer,  $l$ , para un transductor plano de 1 MHz de radio  $a$  de 9.5 mm emitiendo en medio acuoso es [Kinsler LE]:

$$l = \frac{a^2}{\lambda} = \frac{(9.5 \cdot 10^{-3}m)^2}{1480 \text{ m/s} / 10^6 \text{ Hz}} = \frac{90.25 \text{ mm}^2}{1.48 \text{ mm}} = 60.98 \text{ mm} \approx 61 \text{ mm} \quad (3.4)$$

Se simula la distribución de presión acústica que se tiene en los primeros 100 mm de un volumen semi infinito de agua para dos transductores diferentes: una apertura plana ideal (pistón) de 19 mm y el transductor con la superficie de vibración mostrada en la Fig.3.6, compuesto por 7 anillos con amplitudes relativas diferentes. Para esta comparación se impone que el anillo de máximo desplazamiento (el segundo según la Fig.3.6) tenga una amplitud igual al desplazamiento del pistón (4 nm) y el resto tengan la amplitud relativa correspondiente. El resultado cuantitativo de la distribución bidimensional de presión se muestra en la Fig.3.7.

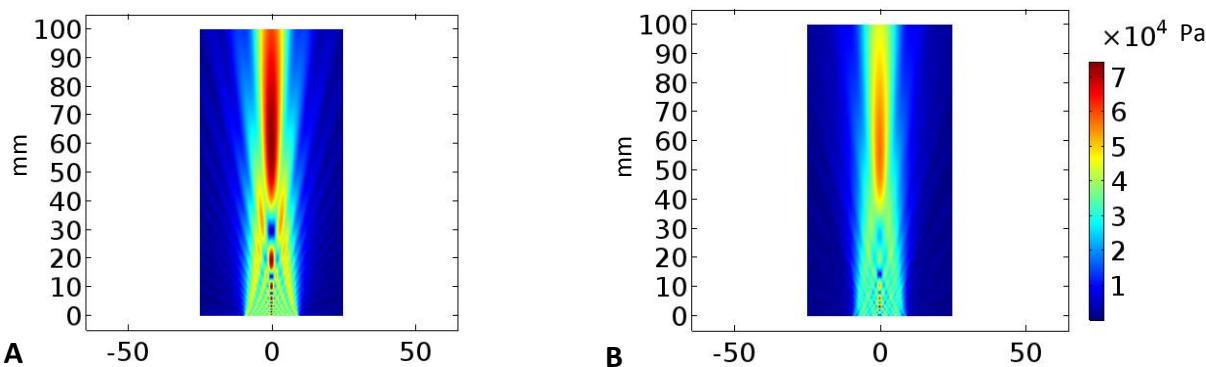


Fig. 3.7: Distribución 2D de la amplitud de presión máxima cuando el transductor emite en agua para (A) un pistón ideal de 19 mm y (B) una superficie no homogénea como la del transductor *Panametrics V314*.

Observando las diferencias en la representación de ambas distribuciones con la misma escala puede afirmarse que la consideración de pistón ideal no es correcta. En el campo lejano, el valor del máximo decae de 75 kPa hasta 57 kPa. En el campo cercano, se tienen amplitudes promedio menores y la distribución de los máximos es diferente. Esto se comprueba en la Fig.3.8 al compararse la distribución de presiones en un plano transversal situado a 1 mm de distancia de la superficie de emisión para ambos casos.

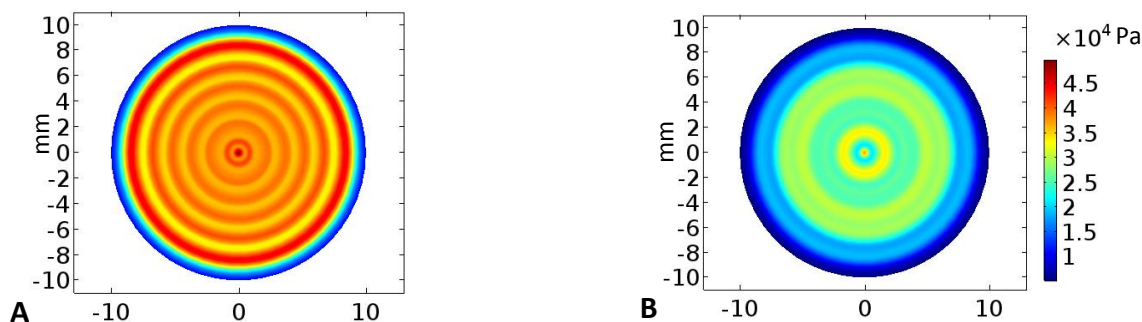
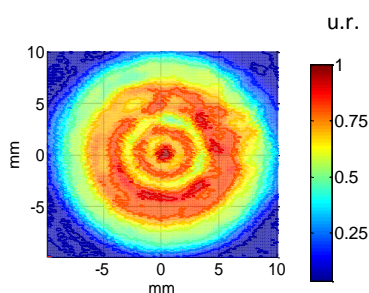


Fig. 3.8: Distribución 2D de la amplitud de la presión máxima en agua en un plano transversal a una distancia de 1 mm de la superficie de emisión para (A) un pistón ideal de 19 mm y (B) una superficie no homogénea como la que tiene el transductor *Panametrics V314*.



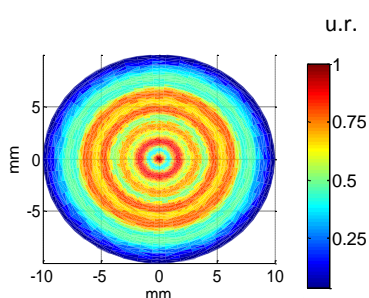
Se ha comprobado que imponer en el modelo de simulación el desfase medido no tiene efecto significativo sobre el resultado. Al respecto, es importante mencionar que hay transductores que pueden tener desfases más drásticos (sobre todo entre la zona central y el exterior [Ronda S, 2017]) y será necesario considerarlo.

La medida experimental del campo acústico del transductor utilizado (*Panametrics V314*) en condiciones de campo libre se ha llevado a cabo colocando la cara de emisión en la superficie de un recipiente de agua con dimensiones laterales mucho más grandes que el diámetro del transductor y de profundidad tal que se puedan distinguir la señal incidente y sus ecos. La longitud temporal del pulso es lo suficientemente larga para que el transductor emita en situación estacionaria (200 ciclos). Con un hidrófono de aguja se realiza un barrido de la distribución de la presión acústica en un plano transversal a una distancia de la cara de emisión de  $\approx 1.3$  mm. En la Fig.3.9 se muestra el resultado para el valor máximo de amplitud de la señal de presión acústica. El barrido cubre un área de 20 x 20 mm, con un paso de 0.1 mm



**Fig. 3.9:** Distribución 2D de la amplitud de la presión acústica máxima en agua en un plano transversal a una distancia de  $\approx 1.3$  mm.

Se compara el resultado experimental con la simulación de la distribución para una distancia similar (1.3 mm), mostrada en la Fig.3.10. Las diferencias obtenidas se deben a las aproximaciones tomadas con la superficie de vibración y al tamaño de la parte sensible del hidrófono (0.6 mm).



**Fig. 3.10:** Distribución 2D de la amplitud de la presión acústica máxima en agua en un plano transversal calculada a una distancia de 1.3 mm.

### 4.3 Estudio de la interferencia que se origina en presencia de una interfaz de aire

Conocer la distribución de presión acústica para una configuración en la que hay interferencias, es crucial en el caso en el que, p.e., el cultivo celular se encuentre fijado en la placa, ya que, si se sitúa en un plano nodal o el resultado de la interferencia es destructivo, no estaremos aplicándole ninguna dosis y la interpretación de los resultados será errónea (p.e. no es que los US sean inefectivos, sino que se han situado las células en crecimiento en puntos con presión nula). Como

se ha mencionado, el campo resultante en el medio es consecuencia de la superposición de la onda que sale del transductor y las reflejadas en las interfaces, de manera que, según resulte la superposición de todas ellas, pueden sumarse o bien anularse, dando lugar a lo que se conoce como interferencia constructiva o destructiva, respectivamente.

Para una altura de medio  $hl$  se tiene que la interferencia entre la onda original y la reflejada, igual pero que viaja en sentido opuesto, será constructiva cuando:

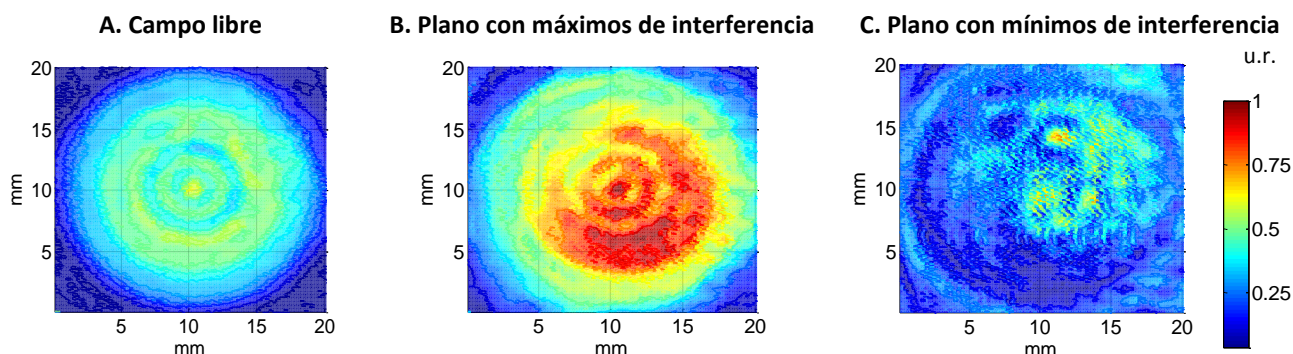
$$hl = (2m) \frac{\lambda}{4} \quad m = 1,2,3 \dots \quad (3.5)$$

Y será destructiva para:

$$hl = (2m + 1) \frac{\lambda}{4} \quad m = 1,2,3 \dots \quad (3.6)$$

Es decir, para el caso ideal de una onda plana, hay alturas de medio que dan, o bien un campo estacionario con una distribución de presiones con máximos y mínimos, separados una distancia de  $\lambda/4$ , o bien un campo nulo en todo el volumen. Para el primer caso, la dosis que se esté aplicando al cultivo dependerá de su posición, y, para el segundo, no se está insonificando las células. Para un transductor de 1 MHz que emite en agua se tiene una  $\lambda$  de 1.48 mm. Con las dimensiones de un pocillo comercial de una placa de 12 cultivos como la aquí considerada, la altura de medio de  $\lambda/4$  corresponde a una diferencia de la posición axial de la interfaz de tan solo 0.37 mm. Esto equivale a un volumen de líquido de  $\approx 0.14$  ml. Este hecho refleja la importancia del control experimental en la altura de líquido para asegurar la reproducibilidad en los resultados.

Para estudiar el fenómeno real de superposición e interferencia de ondas en presencia de una interfaz, se dispone el transductor de 1 MHz emitiendo en un recipiente con un ancho mucho más grande que su diámetro y se rellena con una altura de agua de  $\approx 7,4$  mm ( $5\lambda$ ). Se usa un pulso de US lo suficientemente largo para que se dé el caso de estacionariedad. Para ello se emplean 200 ciclos, que corresponden a una longitud espacial de cerca de 300 mm, mucho mayor que la distancia del campo lejano (61 mm) y los 7.4 mm de agua, garantizándose así la interferencia en todo el volumen. Con el hidrófono de aguja, se realiza primeramente un barrido en un plano donde se localiza un máximo de interferencia (Fig.3.11B). Se adquiere el valor del máximo de amplitud en un intervalo estacionario de la señal acústica. A continuación, se desplaza axialmente el hidrófono una distancia aproximada de  $\lambda/4$  (0.37 mm) y se repite la adquisición (Fig.3.11C). Los barridos se realizan con un paso de 0.1 mm y cubriendo un área total de 20 x 20 mm, igual que la analizada para el caso anterior de propagación en campo libre (medio infinito) y con un voltaje de excitación del transductor similar. Para facilitar la comparación se iguala la escala entre todas las situaciones medidas y se muestran en la Fig.3.11.

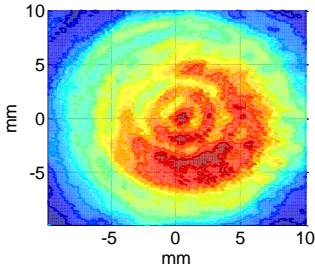
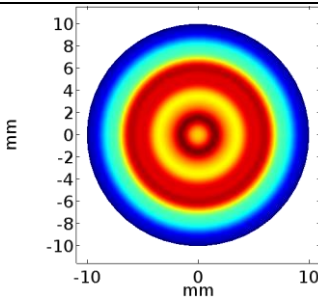
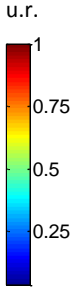
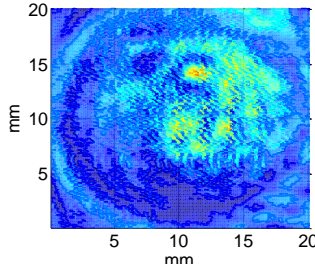
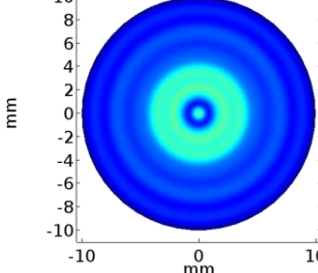


**Fig. 3.11:** Distribución 2D de la amplitud de presión máxima en un plano transversal (A) en condiciones de campo libre, (B) en un plano con un máximo de interferencia y (C) en un plano con un mínimo de interferencia, debido a la presencia de una interfaz de aire a  $\approx 7.4$  mm de distancia.

Puede verse que en el caso en el que se tiene un máximo de interferencia (Fig.3.11B), se registran amplitudes en la zona estacionaria de la señal que son el doble que en el caso de propagación en campo libre (Fig.3.11A). En el plano de mínimo de interferencia la amplitud cae, pero no es nula por no encontrarnos ante un caso de onda plana.

Realizándose la simulación para un caso similar (véase Tabla 3.2) se extraen también las mismas distribuciones transversales de la presión que las medidas experimentalmente. Para facilitar la comparación entre ambas situaciones, en la Tabla 3.4 se muestran de nuevo los resultados experimentales y la correspondiente distribución de presión calculada mediante simulación a una distancia en la que se registra un máximo (a 1.5 mm de la superficie de emisión) y para un plano correspondiente a un mínimo de interferencia (a 1.03 mm).

**Tabla 3.4:** Comparación de la medida real y la simulación de la distribución 2D de amplitud de la presión máxima en un plano transversal. En la primera fila, cuando la interferencia da lugar a un máximo y en la segunda fila, cuando la interferencia da lugar a un mínimo.

Experimental	Simulación	
		
		

En la medida experimental no se obtiene una perfecta simetría circular, que sí que se apreciaba en el caso de campo libre (Fig.3.9) y que se obtiene en las simulaciones. La causa de esto es atribuible a una pequeña inclinación del sistema que modifique ligeramente el paralelismo de la interfaz. Teniendo en cuenta que una diferencia de  $\lambda/4$  entre lados opuestos del pocillo corresponde a una inclinación de tan solo  $1^\circ$ , se considera que este hecho está dentro de los posibles errores experimentales.

#### **4.4 Estudio del campo acústico cuando se confina en un pocillo**

Demostrada ya la relevancia de la presencia de una interfaz de aire, se ha estudiado el efecto de confinar el campo en una guía con la forma de un pocillo de poliestireno, como ocurre en los experimentos con células cultivadas en placas, cuando se les insonifica desde su base. El diseño de la configuración experimental es la ya mostrada en la Fig.3.1. Dada la altura del líquido empleada, 7.7 mm (3 ml), pueden darse dos situaciones condicionadas por la duración del pulso de US:

- Que se emplee un pulso lo suficientemente corto para que la interferencia solo tenga lugar cerca de las interfaces y lo que se produzca en la cavidad sean reflexiones múltiples del mismo. Para estudiar este caso experimentalmente se empleará un pulso de 5 ciclos.
- Que se emplee un pulso lo suficientemente largo para que se origine un campo estacionario. Para estudiar este caso experimentalmente se empleará un pulso de 200 ciclos.

Para el primer caso, de un pulso muy corto, se aplica sobre el cultivo una onda progresiva que sufre numerosas reflexiones en las interfaces, que también serán recibidas por las células. De esta manera, lo que en realidad recibe el cultivo que se encuentra adherido a la base es un primer pulso inicial con la distribución similar al campo cercano y sucesivos paquetes correspondientes a su reflexión que estarán cada vez más afectados por la difracción e interferencia entre ondas.

Para el segundo caso, el del pulso largo, la distribución de presión es resultado de múltiples reflexiones e interacciones. Si el transductor es mucho más pequeño que el pocillo el efecto de las paredes se puede ignorar y se puede aproximar el resultado al obtenido para un medio finito. Pero, para el caso real, si un pocillo de una placa de 12 pocillos tiene un diámetro de 22.2 mm más el grosor de las paredes de poliestireno (1.22 mm) se ha de considerar que, con un transductor de dimensiones semejantes o mayores, hay que tener en cuenta efectos adicionales asociados a la transmisión de parte del campo acústico por el material de la placa. En nuestro caso el diámetro del transductor es de 19 mm, por lo que las paredes influyen.

Para la simulación de esta situación se diseña un modelo con los elementos descritos en la Tabla 3.5. Las letras que aparecen se corresponden con los parámetros representados en la Fig.3.1.

Tabla 3.5: Características de la simulación para el estudio del campo acústico cuando se confina en un pocillo de una placa de cultivo. Un esquema del modelo puede verse en la Fig.3.1 y en la Tabla 3.2.

Medio	Dimensiones	Otras características
Transductor	19 mm de diámetro total (D) Compuesto por 7 anillos (Fig. 3.6) 1 MHz	Aceleración normal. Amplitud máxima de 4nm
Aire	40 mm x 25 mm	Capa de 5 mm de PML
Pocillo	24.54 mm x 18 mm	Paredes de grosor 1.22 mm (w)
Líquido	22.2 mm ( $D_p$ ) x 7.7 mm (hl)	hl correspondiente a 3 ml

En primer lugar, se muestra en la Fig.3.12 el resultado de la simulación de la distribución de presión acústica emitida por el transductor *Panametrics V314* cuando el campo está confinado en el pocillo. Se considera que el transductor emite de forma continua y se alcanza una situación estacionaria.

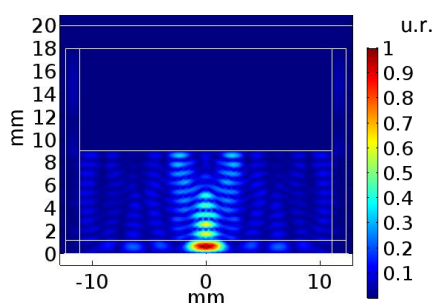


Fig. 3.12: Distribución 2D de la amplitud de presión máxima cuando el transductor emite en modo continuo desde la base del pocillo.

La distribución en la base del pocillo se muestra en la Fig.3.13.

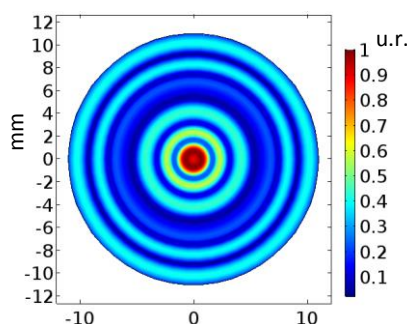


Fig. 3.13: Distribución 2D de la amplitud de presión máxima en un plano transversal situado en la base del pocillo.

Como cabe esperar dada la simetría del problema, el máximo de presión se localiza en la parte central. Entre el centro y las diferentes zonas radiales se obtienen variaciones de entre un factor 2 y 10.

Experimentalmente en lugar de emisión continua se ha trabajado con modos pulsados. Para profundizar en el análisis de estos casos se simula en el dominio temporal la transmisión de dos pulsos: el primero dura 6  $\mu$ s (longitud espacial  $\approx$  8.8 mm) y se estudia su evolución durante 50  $\mu$ s y el otro abarca 30  $\mu$ s (longitud espacial  $\approx$  44.4 mm) y el estudio se alarga hasta los 100  $\mu$ s. La representación de ambos se muestra en la Fig.3.14.

Propuesta de una sistemática estándar de caracterización del campo acústico en un experimento de insonificación in vitro



Fig. 3.14: Pulsos de excitación del transductor empleados en el análisis de la evolución temporal del campo acústico confinado en el pocillo. (A) Pulso corto y (B) largo.

Cada 5  $\mu\text{s}$  la onda avanza  $\approx 7.72$  mm, de manera que recorre la totalidad del medio, alcanza la interfaz correspondiente (aire o PZT) y se refleja. En la Tabla 3.6 se muestra la distribución de presión acústica en el pocillo según el pulso de excitación para diferentes instantes de tiempo.

Tabla 3.6: Distribución 2D de la amplitud de presión para diferentes instantes durante la propagación de los pulsos de la Fig.3.14.

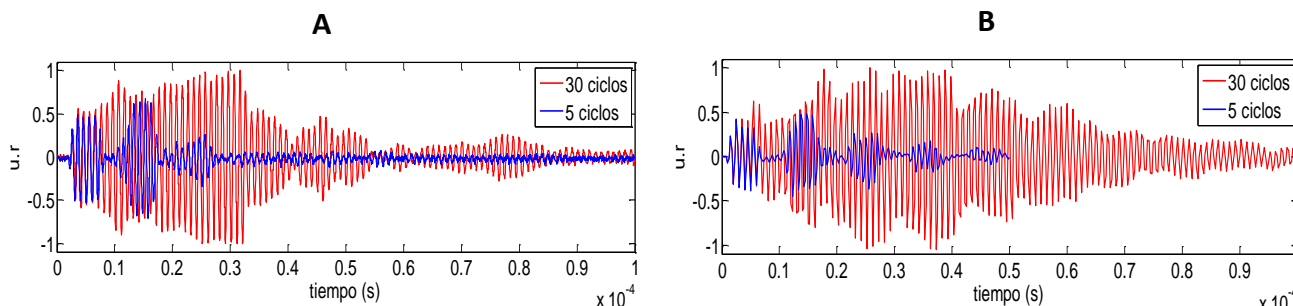
Pulso	$t = 2.5 \mu\text{s}$	$t = 7.5 \mu\text{s}$	$t = 12.5 \mu\text{s}$	$t = 22.5 \mu\text{s}$
<b>Corto</b> 5 ciclos				
<b>Largo</b> 30 ciclos				

Las presiones acústicas máximas que se alcanzan son mayores para el caso de un pulso largo dado que se produce la interferencia entre un número mayor de ondas. Observando las imágenes se confirma que lo que se tiene en el sistema es una distribución de presión acústica que varía en cada posición espacial dentro del volumen y en cada instante temporal, a no ser que se alcance la estacionariedad. Esto implica que la presión y energía que recibe cada célula es diferente según dónde se encuentre dentro del pocillo y de la longitud temporal del pulso. Se puede afirmar que:

- (i) Dependiendo del tipo de pulso con el que se trabaja, la onda acústica que reciben las células cambia, pudiendo ser propagativa o estacionaria.
- (ii) Han de tenerse en cuenta las múltiples reflexiones que se producen antes de que la onda se atenúe en el medio completamente.
- (iii) Debido a la difracción que sufre el campo acústico a lo largo de su propagación, se forman en los diferentes planos transversales zonas con una distribución de presión anular, que va variando con el tiempo hasta que en el sistema se alcance el estado estacionario.

**Propuesta de una sistemática estándar de caracterización del campo acústico en un experimento de insonificación in vitro**

Para demostrar (i) e (ii) se calcula en la Fig.3.15B la evolución de la presión en un punto en el centro ( $r = 0$ ) y cerca de la base (a 1 mm) para los dos pulsos de excitación de la Fig.3.14. Se compara este resultado con la medida experimental en un punto similar (Fig.3.15A). Para la medida en el laboratorio se excita el transductor con un pulso de 5 ciclos de 1 MHz y con otro de 30 ciclos. La comparativa se muestra en la Fig.3.15, en unidades relativas al máximo en cada caso.



**Fig. 3.15: Evolución temporal de la amplitud de presión en el centro de la base del pocillo para un pulso de 5 ciclos (azul) y de 30 ciclos (rojo) (A) Datos medidos (B) Simulación.**

Tanto en la señal simulada como en la utilizada, se tiene que, en los instantes iniciales, ambos registros son similares, pero después la interferencia incrementa los valores para el caso del pulso largo (curva roja). Para el caso del pulso corto (curva azul) el valor de la presión en el centro aumenta con la segunda reflexión, resultado de la superposición constructiva que se produce cerca de la base entre la onda incidente (que es la que previamente se refleja en la interfaz de aire) con la que se refleja en la base. Las diferencias observadas entre las simulaciones y los resultados experimentales son debidas a la dificultad de ajustar la posición del hidrófono en el punto deseado, al hecho de que la interfaz aire agua no es totalmente plana debido al menisco y a diferencias en los parámetros de disipación (viscosidad) que se imponen en el modelo respecto al caso real.

Para el pulso corto, en la señal acústica registrada se comprueba que son apreciables al menos 2 reflexiones del pulso (Fig.3.15A). A partir del tercer paquete, la amplitud es muy pequeña comparada con la del original (< 10 %). En base a esto, se ha de tener en cuenta que: para insonificaciones de este tipo, puede haber puntos en los que la dosis sea incluso un factor 3 mayor comparado con el valor si no se consideran estas reflexiones y que es posible que los pulsos sucesivos tengan más amplitud que el original si la interferencia es constructiva en la base.

Para el caso del pulso largo, se produce una interferencia entre múltiples ondas. A partir de cierto instante, se alcanza la estacionariedad en la amplitud de la señal acústica debido a que la señal se mantiene un tiempo finito en el sistema antes de disiparse. En base a los 2 rebotes con una amplitud significativa (> 25 % respecto de la original) obtenidos para el pulso corto (Fig.3.15A), se puede afirmar que el pulso recorre una distancia  $z \approx 6 hl$  antes de disiparse. Se considera por tanto que el pulso se mantiene en el sistema durante un tiempo adicional de:

$$6 hl \rightarrow t = \frac{z}{c} = \frac{6 \cdot 7.7 \text{ mm}}{1543 \text{ m/s}} \approx 30 \mu\text{s} \quad (3.7)$$

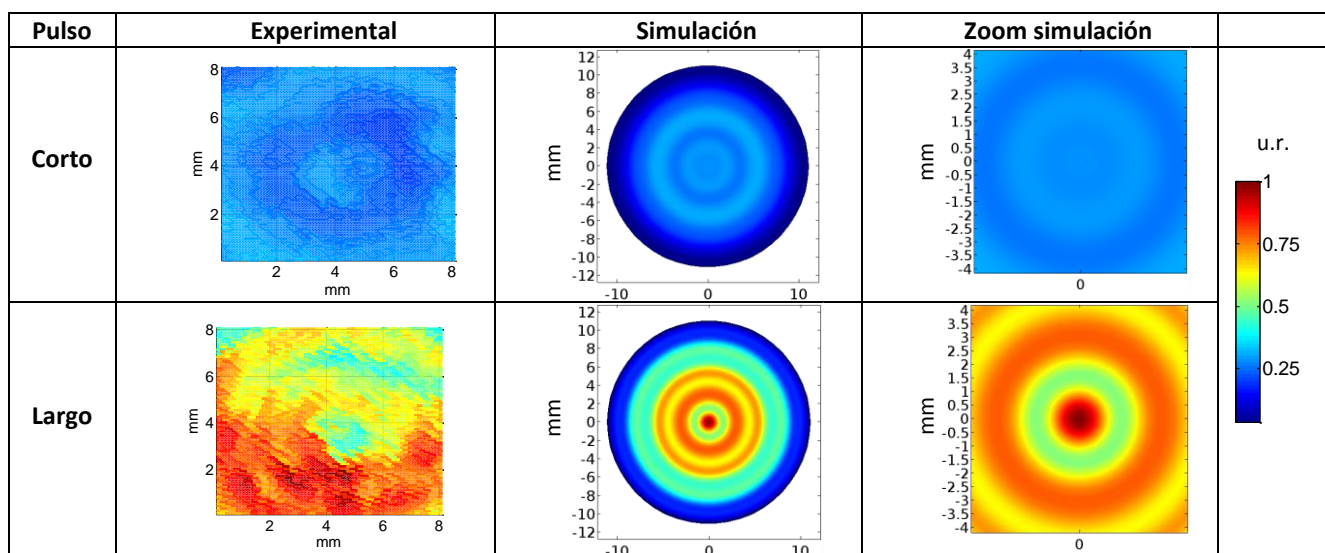


En base a esto,  $6hl$  es la longitud de pulso que supone el umbral para que pueda alcanzarse la estacionariedad en el sistema. Esto es concordante con el registro experimental de la Fig.3.15A para el pulso de 30 ciclos ( $\approx 6hl$ ) en el que puede aproximarse que la señal comienza a tener una amplitud constante al final ( $\approx 30 \mu s$ ) y el pulso se alarga respecto de su duración esperada (30 ciclos,  $30 \mu s$ ) hasta los  $60 \mu s$ .

La superposición constructiva hace que en ciertos puntos del volumen la presión acústica se incremente respecto de su valor original, de manera similar a lo que ocurre en los puntos del campo cercano donde se sitúan los máximos. Viendo el registro de la Fig.3.15A se obtiene que experimentalmente, a 1 mm de la superficie, este incremento puede llegar a un factor 3 para un pulso de 30 ciclos.

A parte de medidas puntuales, se estudia la distribución bidimensional. Para ello se realiza un barrido en el laboratorio con el transductor de 1 MHz con dos tipos de pulsos: 5 y 200 ciclos. El hidrófono de aguja se sitúa a  $\approx 0.8$  mm de la base del pocillo. Debido a las limitaciones de espacio sólo es posible barrer con el hidrófono una superficie de  $8 \times 8$  mm, con un paso de 0.1 mm. Se rellena el pocillo con una cantidad de agua similar a la de líquido empleado en los experimentos (3 ml). Se comparan en la Tabla 3.7 las distribuciones de la amplitud de presión relativa obtenida, tanto experimentalmente como las calculadas mediante simulación.

**Tabla 3.7: Comparación de la medida real y la simulación de la distribución 2D de la amplitud de la presión máxima emitida cerca de la base del pocillo ( $\approx 0.8$  mm). En la primera fila, medida realizada para un pulso corto y en la segunda fila, resultados para un pulso largo.**



En base a estos resultados puede afirmarse que: cuando el campo se confina en un pocillo de experimentación in vitro, la onda acústica que emite el transductor sufre interferencias que le llevan a incrementar su amplitud hasta un factor 4 en puntos e instantes concretos con un pulso largo ( $\geq 6hl$ ). En la simulación para un pulso largo, en este caso de 30 ciclos, la distribución de presiones que se muestra corresponde al instante en el que en el centro se alcanza la máxima



amplitud. Se obtiene un patrón anular en la base del pocillo y variaciones entre zonas de hasta un factor 2, como ocurre para las medidas experimentales. Experimentalmente las distribuciones no son simétricas, atribuible a pequeñas inclinaciones o desalineaciones entre el transductor y la placa que se incluyen entre las posibles fuentes de error.

Demostrado que el cultivo va a sufrir una sobredosis respecto a los valores esperados, se debe tener en cuenta que las distribuciones cambian con el tiempo y que la dosis que se aplica en cada punto (y por tanto a cada célula) será diferente. Para cuantificar este hecho, se simula la evolución temporal de la amplitud de presión en diferentes puntos a lo largo de un diámetro cerca de la base del pocillo en un plano de interferencia constructiva (a 2.5 mm). Se toman puntos a 0, 2, 4, 6 y 8 mm de distancia al centro. Los registros para ambos pulsos, de 5 y 30 ciclos, se muestran en la Fig.3.16.

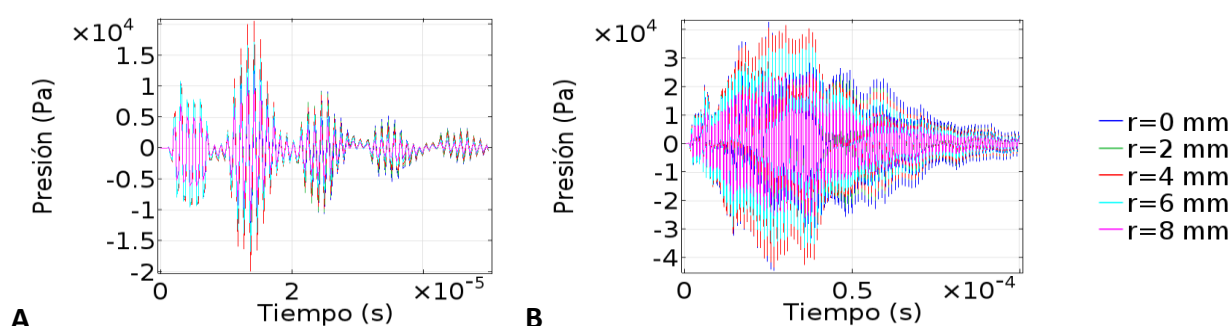


Fig. 3.16: Evolución temporal de la amplitud de presión calculada en puntos de la base del pocillo a una distancia  $r$  del centro. (A) Para un pulso de excitación del transductor de 5 ciclos como el mostrado en la Fig.3.14A. (B) Para un pulso de excitación del transductor de 30 ciclos como el mostrado en la Fig.3.14B.

Se comprueba por tanto que la dosis que recibe una célula situada en el centro (curva azul) es diferente de la recibida por una situada más cerca del borde del pocillo (curva rosa).

Para cada una de las señales de la Fig.3.16, se calculan los siguientes parámetros, recogidos en las Tablas 3.8 y 3.9:

- $\rho_{E\text{ calc}}$ : Densidad de energía de la señal de presión acústica calculada en el tiempo total que dura (el tiempo de simulación).
- $P_{max}$ : Máximo del valor absoluto de la amplitud de la presión acústica.

Tabla 3.8: Densidad de energía y presión máxima en los puntos de la base para un pulso de 5 ciclos.

Ciclos	Posición radial	$\rho_{E\text{ calc}}$ $mJ/mm^2$	$P_{max}$
5	0 mm (centro)	$8.33 \cdot 10^{-7}$	18 kPa
	2 mm	$8.49 \cdot 10^{-7}$	19 kPa
	4 mm	$8.84 \cdot 10^{-7}$	20 kPa
	6 mm	$6.53 \cdot 10^{-7}$	17 kPa
	8 mm	$3.09 \cdot 10^{-7}$	12 kPa

Tabla 3.9: Densidad de energía y presión máxima en los puntos de la base para un pulso de 30 ciclos.

Ciclos	Posición radial	$\rho_{E\text{ calc}}$ $mJ/mm^2$	$P_{max}$
30	0 mm (centro)	$1.98 \cdot 10^{-5}$	44 kPa
	2 mm	$1.71 \cdot 10^{-5}$	42 kPa
	4 mm	$1.85 \cdot 10^{-5}$	43 kPa
	6 mm	$1.43 \cdot 10^{-5}$	36 kPa
	8 mm	$0.71 \cdot 10^{-5}$	23 kPa

Para el caso de un pulso corto (Tabla 3.8) se obtienen variaciones de hasta un factor 1.5 en la amplitud máxima, que corresponden a variaciones de un factor 2.7 en densidad de energía (esto es concordante al depender la intensidad del cuadrado de la amplitud). Para un pulso largo (Tabla 3.9) las diferencias son hasta de un factor 1.7 en la amplitud máxima y 2.8 en la densidad de energía.

Si se calcula la evolución del valor máximo de la presión cerca de la base, sin importar su posición radial, se obtiene el gráfico de la Fig.3.17. Éste gráfico da cuenta de que, en caso de que se requiera una presión umbral a partir de la cual se causa un daño en la célula, se ha de tener en cuenta que conforme el pulso se propaga y se superponen las ondas, la amplitud puede ser mayor.

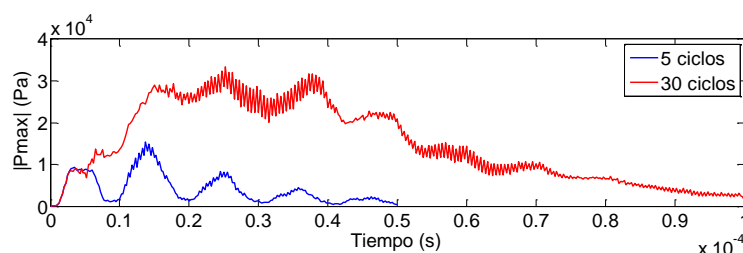


Fig. 3.17: Evolución temporal del valor máximo de la amplitud de presión en la base del pocillo.

Dada la geometría del pocillo, generalmente, los valores máximos se alcanzan en el centro, pero esto no es siempre cierto. Esto se comprueba comparando en la Fig.3.18 la evolución del valor de amplitud de presión acústica máxima en toda la superficie, para un pulso de 30 ciclos, frente al valor de la presión en el centro. Se obtiene que hay una ventana temporal en la que el máximo no se encuentra en el centro (desde los 11  $\mu$ s hasta los 32  $\mu$ s). En la Tabla 3.6 p.e. puede verse que para 22.5  $\mu$ s estos máximos están en ambos laterales.

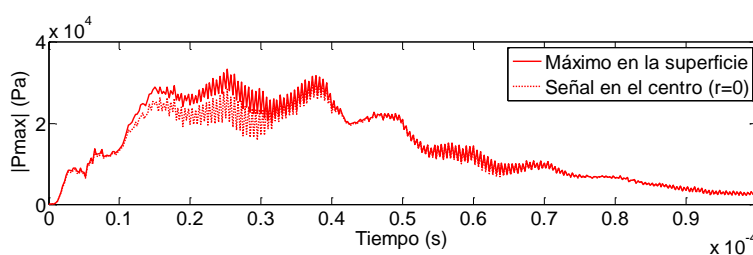


Fig. 3.18: Comparación de la evolución temporal del valor máximo de amplitud de presión en la base (curva sólida) y la amplitud en el centro (curva punteada).

Finalmente, para demostrar la influencia de la interacción con las paredes se simula la transmisión de dos pistones ideales (superficie de vibración homogénea y en fase) de 1 MHz con la misma amplitud de desplazamiento (4 nm) pero diferente diámetro: el del primero ( $D_1 = 10$  mm) es más pequeño que el pocillo ( $D_p = 22.2$  mm) y el otro llega a tocar las paredes de poliestireno, ( $D_2 = 24$  mm). Las distribuciones de presión acústica en el medio para una emisión continua del transductor se muestran en la Fig.3.19.

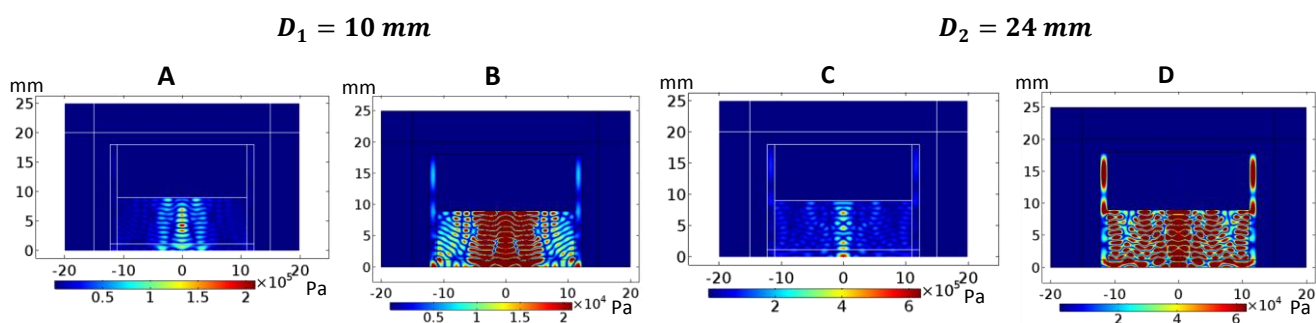


Fig. 3.19: Distribución 2D de la amplitud de presión máxima (A) cuando el tamaño del transductor ( $D_1 = 10 \text{ mm}$ ) es menor que el diámetro del pocillo ( $D_p = 22,2 \text{ mm}$ ), (C) cuando es mayor ( $D_2 = 24 \text{ mm}$ ) (B y D) ajustándose el valor máximo de la escala a un décimo del máximo en cada caso, para apreciarse la transmisión por las paredes.

Se comprueba que en ambos casos hay transmisión de parte del campo acústico por las paredes, siendo ésta más relevante cuando el transductor es más grande (Fig.3.19D). Estos resultados corrigen a *Hensel K et al*, que niega en su trabajo que haya transmisión en las paredes para un transductor pequeño y afirma que la distribución que se obtiene es la del campo cercano [Hensel K]. La distribución que se obtiene para el caso del transductor pequeño sí está influenciada por las paredes (Fig.3.19B) y es diferente de la predicha para el campo cercano. Para el caso en el que el diámetro es mayor ( $D_2 = 24 \text{ mm}$ ), hay localizaciones en el volumen en las que la interferencia da valores de amplitud de presión hasta un factor 3 más altos que para el caso en el que el transductor no toca las paredes.

## 5. Discusión

El análisis realizado en este capítulo del campo acústico transmitido por un transductor de 1 MHz comercial en diferentes situaciones (campo libre, en presencia de una interfaz de aire o confinado en un pocillo) muestra que la configuración experimental influye decisivamente en los valores de amplitud y la distribución de la presión acústica en el fluido. Esto es especialmente importante para correlacionar los posibles efectos de la presión acústica en el crecimiento de las células en un experimento de insonificación in vitro.

Trabajos previos como el de *Hensel K et al* previenen de que la confinación del campo acústico emitido por el transductor en una guía como es un pocillo de una placa de experimentación con cultivos celulares, con interfaces, convierte al sistema en una cavidad resonante en la que se incrementa la amplitud de presión respecto a la propagación libre, debido a la superposición de ondas [Hensel K]. La distribución de presión, contrariamente a lo que sus resultados sugieren, no es constante en el tiempo a no ser que el sistema alcance la estacionariedad, como se ha demostrado en este trabajo. No se menciona que el máximo de presión acústica puede no localizarse siempre en el mismo punto. El resultado de la interferencia varía según la posición axial y el instante analizados. Una mejora que se ha introducido en esta Tesis respecto a los trabajos previos es la consideración de la apertura real de emisión del transductor. Así, se ha demostrado que considerar

que el transductor que se está empleando vibra como un pistón ideal es una aproximación que debe ser superada.

Los resultados que se han obtenido, tanto de simulación como experimentales, llevan a afirmar que el campo acústico depende de:

- (i) La apertura radiante.
- (ii) El punto dentro del volumen de líquido donde se mide.
- (iii) El tipo de pulso que se emite.

Se ha analizado en este trabajo cómo afecta cada uno de estos factores en particular. En base a los resultados obtenidos se puede afirmar que:

(i) Se debe considerar en las simulaciones el patrón de vibración del transductor que se usará en la configuración experimental.

Como ejemplo, se ha visto en el estudio de la transmisión en campo libre, que al considerar el transductor con su comportamiento vibracional real, de amplitud y fase, disminuyen los máximos de presión que alcanzan en el medio un 24 % respecto a considerar que es un pistón.

(ii) La presencia de interfaces provoca la reflexión y consecuente interferencia entre ondas. En el análisis realizado cuando no hay confinación lateral y se tiene una interfaz de aire a una distancia de  $\approx 5\lambda$  se demuestra la presencia de planos transversales en los que la interferencia da como resultado un mínimo de amplitud de presión, y planos con una presión máxima hasta 2 veces mayor respecto la propagación en campo libre, distribuidos a lo largo del eje axial y separados una distancia de  $\lambda/4$  (0.37 mm) (Fig.3.11). Este hecho refleja la importancia de la altura de líquido para obtener la presión buscada al nivel en el que se tiene la capa celular.

Cuando se confina el campo en una guía como la de un pocillo se obtiene en las simulaciones que, para un pulso largo (30 ciclos), la amplitud que se alcanza se ve incrementada hasta un factor 4.4 respecto de la onda inicial que se transmite (véase en la Fig. 3.16B que la amplitud de presión en el centro pasa de 10 kPa al comienzo de la señal hasta alcanzar los 44 kPa). Las distribuciones que se obtienen tienen un patrón anular. El máximo no siempre está localizado en el centro, sino que hay instantes en los que el resultado de la interferencia intensifica la presión en puntos más alejados (Tabla 3.6). En un mismo plano transversal, en las simulaciones, se han obtenido variaciones de la amplitud de presión máxima entre zonas de hasta un factor 2 para un pulso de 30 ciclos (Tabla 3.7) y de un factor 10 para el caso de emisión continua (Fig.3.13). Estos resultados de simulación concuerdan con las medidas experimentales, para las que se ha obtenido con un pulso de 200 ciclos que, al confinar el campo en el pocillo, se incrementa un factor 4 la presión en la parte estacionaria del pulso respecto a amplitud inicial de la onda y que, entre zonas, las diferencias son de un factor 2 (Tabla 3.7).

(iii) Puesto que la presión acústica que se aplica en cada punto es resultado de la interferencia de múltiples ondas, ésta depende tanto de la longitud espacial del pulso como de su evolución temporal.

En el caso de un pulso corto se incrementa la dosis de energía ultrasónica aplicada sobre el cultivo debido a los sucesivos paquetes que se tienen. Para el caso del pulso de 5 ciclos se ha obtenido en las simulaciones que, en la señal que se registra en el centro de un plano similar a en el que está el cultivo celular (base del pocillo), el máximo de presión es de 18 kPa y la densidad total de energía que recibe la célula es de  $8.33 \cdot 10^{-7} \text{ mJ/mm}^2$  si se considera el pulso completo (Fig.3.16). Sin embargo, si sólo se tiene en cuenta el primer paquete de ondas, sin considerar las múltiples reflexiones, se tiene un máximo de 11 kPa y una densidad de energía de  $2.02 \cdot 10^{-7} \text{ mJ/mm}^2$ . Es decir, al considerar la señal temporal completa aumenta la amplitud máxima un factor 1.6 y la densidad de energía un factor 4.1. Experimentalmente, para la señal de la Fig.3.15 se tienen incrementos para las mismas consideraciones de un factor 1.3 y 3.1, respectivamente.

En el caso del pulso largo de 30 ciclos, la densidad de energía que se obtiene en el centro de la base del pocillo en la simulación decae de los  $1.98 \cdot 10^{-5} \text{ mJ/mm}^2$  calculados si se considera el pulso completo a  $0.89 \cdot 10^{-5} \text{ mJ/mm}^2$  si sólo se tienen en cuenta los primeros 30  $\mu\text{s}$  de duración. Es decir, al considerar el pulso completo aumenta la densidad de energía un factor 2.2. Experimentalmente se obtiene un factor 1.45. Estos hechos alertan sobre el incremento de la dosis de energía que se aplica a las células del cultivo en los experimentos reales debido a las múltiples reflexiones que se producen en el sistema.

La relevancia de estos resultados se relaciona con los valores umbrales para que se originen ciertos fenómenos asociados a los US. La potencialidad de los US para dar lugar a efectos no térmicos (p.e. cavitación) viene dada por el Índice Mecánico (*MI*, *Mechanical Index*) que se calcula como [Rubin DM, Voig JU]:

$$MI = \frac{P_-}{\sqrt{f_0}} \quad (3.8)$$

donde  $P_-$  es la amplitud de rarefacción del ciclo de US. Cabe esperar que si la amplitud de presión se ve incrementada un factor 4 como se ha obtenido en nuestro trabajo, se den fenómenos de oscilaciones de burbujas que no se preveían. Aunque los umbrales de presión acústica para que se originen fenómenos de cavitación son en la actualidad tema de investigación, pues dependen de las propiedades materiales de la superficie de la burbuja y del gas que contiene [Brennen CE], se reporta que con  $MI < 0.1$ , la cavitación que se origina en el medio es de tipo estable y cuando se supera un umbral de  $MI > 0.6$  cabe esperar que los agentes cavitantes colapsen violentamente [Postema M], dando lugar al segundo tipo de cavitación, la inercial. Así, el incremento de los niveles de presión acústica debido a la interferencia, puede conllevar que se superen los límites para que se produzcan en las células efectos dañinos (p.e lisis por ablación debido a las altas temperaturas

que se generan o por la liberación de sustancias químicas nocivas si se da el fenómeno de cavitación inercial)

Estos resultados pueden emplearse para hacer una revisión de trabajos ya publicados. En sus experimentos, *Maalouf JE et al* obtienen una variabilidad de la intensidad que han de emitir con el transductor de hasta un factor 2 para obtener el mismo índice de cavitación inercial (CI). Hay ocasiones en las que han de aplicar una intensidad de  $1.68 \text{ W/cm}^2$  para registrar cierto CI y en otras lo logran con tan solo  $0.9 \text{ W/cm}^2$ , en las mismas condiciones experimentales [Maalouf JE]. Este hecho se justifica por las posibles variaciones en la amplitud de presión acústica que se producen si no se ha procurado la reproducibilidad de las condiciones (en su descripción del experimento no se especifica que se emplee un volumen de líquido exacto). *Hassan MA et al* afirman obtener producción de radicales libres (signo de la presencia de cavitación inercial) en su experimento con un MI  $< 0.1$  [Hassan MA]. Discuten lo contradictorio de este hecho y lo atribuyen a la influencia del grado de saturación del gas y del medio, sin tener en cuenta que las presiones que están aplicando, en la configuración experimental, son mayores que las programadas y tiene por tanto un MI mayor. Aplican un pulso de 1000 ciclos que, al estar confinando en la cavidad, da lugar a puntos de presión hasta un factor 4 mayores que la original, según nuestros resultados.

Por otro lado, los promedios de la potencia y la energía acústicas son parámetros relacionados con efectos globales del campo acústico sobre el cultivo como sería un decaimiento de la viabilidad o un aumento metabólico. *Secomski W et al* estudian en su trabajo la influencia de la aparición de ondas estacionarias y reflexiones múltiples sobre cierta línea celular (*C6 glioma*) con pulsos de US de 1000 ciclos de 1 MHz [Secomski W]. Para ello posicionan la placa de cultivo en una configuración experimental con interfaces, induciendo reflexiones como en nuestro caso, y en otra en la que evitan las reflexiones colocando un absorbente. Obtienen que, para lograr el mismo efecto en las células para el caso en el que insonifican una placa de 12 pocillos como la aquí considerada (reducción del 50 % de la viabilidad en el cultivo), se precisa de una  $I_{SATA}$  un factor 18.4 mayor con el absorbente que cuando se tienen en el sistema múltiples reflexiones y un campo estacionario ( $I_{SATA} = 5.89 \text{ W/cm}^2$  para el primer caso frente a un  $I_{SATA} = 0.32 \text{ W/cm}^2$  para el segundo). Esto supone que se precisan amplitudes de presión de un factor 4.3 mayores. Este hecho es coherente con nuestros resultados, ya que se ha obtenido que cuando se alcanzan condiciones de campo estacionario, experimentalmente se alcanza un incremento de un factor 4 en la amplitud de presión en los planos de interferencia constructiva respecto a la propagación en campo libre.

Por otro lado, trabajos como el de *Unsworth J et al* advierten sobre la presencia de ondas estacionarias en su configuración experimental, similar a la aquí analizada, pero afirman erróneamente que la interferencia que se produce en el sistema no es constructiva al emplearse una altura de medio de  $2.078 \lambda$  [Unsworth J]. Esto no es cierto ya que la altura es muy cercana a  $2 \lambda$  y habrá planos de interferencia constructiva con presiones mayores a la original. La dosis de  $30 \text{ mW/cm}^2$  que se está aplicando se convierte en una de un orden de magnitud más.

A no ser que se compruebe que las intensidades medidas en la calibración del equipo en campo libre no varían en la configuración experimental, como hacen *Yumita N et al* midiendo con un hidrófono [Yumita N, 1989], no puede afirmarse que ésta es la dosis aplicada. Este mismo autor en un trabajo posterior advierte de que la amplitud de presión real in situ en un campo estacionario puede ser varias veces mayor que en un caso propagativo y que por tanto el fenómeno de cavitación puede aparecer, aunque se emitan intensidades más bajas [Yumita N, 2002]. Sin embargo, para este caso, no cuantifica la intensidad real que tiene en su experimento y extrae conclusiones en base a la intensidad calibrada en un modo progresivo. En su trabajo, *Kerr CL et al* cometen el error de, siendo conscientes de la formación de un campo estacionario en su experimento que aumenta la intensidad, infravaloran cuánto al considerar sólo un factor 4 como predice la teoría simple para una reflexión total de una onda plana y en fase [Kerr CL]. No tienen por tanto en cuenta que pueda darse más de una reflexión.

## **6. Propuesta de una sistemática estándar para la caracterización de la dosis de energía acústica en un experimento de insonificación in vitro**

Para poder comparar los resultados entre distintos experimentos referentes a la insonificación de cultivos celulares de mono capas en líquidos usando placas de cultivo comerciales, se propone una sistemática para la cuantificación de los parámetros acústicos que se usan. Los pasos que se propone que han de seguirse deben considerar la dependencia del campo acústico que se mide en la configuración experimental con:

- (i) La apertura radiante
- (ii) El punto dentro del volumen de líquido donde se mide.
- (iii) El tipo de pulso que se emite.

En base a esto, se desarrolla a continuación cada uno de los pasos que se propone que se han de seguir para una correcta cuantificación de parámetros dosimétricos que se tienen en este tipo de experimentos cuando se insonifica el cultivo colocando el transductor en la base del pocillo, como muestra la configuración de la Fig.3.1. Los parámetros a determinar se presentan secuenciados numéricamente.

### **1. Caracterización del transductor y la señal acústica que emite**

Para la realización de los experimentos se puede emplear un equipo comercial sin acceso a su electrónica (p.e equipo de US terapéuticos –*Osteotron IV-*, US para litotricia –*Sonicmaster ES-2-*), un transductor comercial con equipos de excitación de laboratorio (p.e *Panametrics-NTD*) o un transductor especialmente diseñado y fabricado en el laboratorio excitado con equipos comerciales o no, pero con acceso a la programación de la señal eléctrica que se le transmite. En el primer caso, si no se dispone de equipos para medir la vibración del transductor y la presión acústica, deben

conocerse todos los datos posibles a través de los fabricantes y, en todo caso, indicar en el trabajo el modelo concreto que se emplea. Los datos más relevantes del transductor son:

### *1.1 Frecuencia de trabajo*

Definida una frecuencia de trabajo y en el caso de disponer de un transductor no asociado a una electrónica específica, es muy útil conocer cuál es la frecuencia del máximo de la función de transferencia en emisión de ese transductor (*FTE*) para optimizar su eficiencia. Suponiendo que es un transductor basado en un resonador piezoeléctrico, se debe medir el módulo de la impedancia eléctrica de entrada del transductor,  $|Z|$ . La frecuencia del mínimo de  $|Z|$  corresponde con la de máxima *FTE*. Para esta medida se precisa de un analizador de impedancia eléctrica. Es necesario realizar la medida en las mismas condiciones de experimentación (p.e. transductor en contacto con el pocillo con el líquido de cultivo).

### *1.2 Amplitud y fase de la vibración de la apertura*

Para este tipo de experimentos in vitro, en los que se pueden llegar a usar altos voltajes de excitación, es normal utilizar transductores no amortiguados. Este tipo de transductores, por lo general, no poseen una apertura tipo pistón si no se diseñan para que específicamente así sea (p.e. buscando evitar la propagación de modos radiales). Por ello, se ha de medir o calcular la distribución de amplitud y fase.

La amplitud y fase de la vibración en la dirección transversal a la superficie de emisión de un transductor puede medirse en el laboratorio con un vibrómetro interferométrico láser (p.e. *Polytec OFV 50000*). Otra opción, si se conocen todos los elementos que conforman el transductor (secciones del transductor y sus características elásticas, así como el resonador piezoeléctrico que se tiene), es emplear herramientas de simulación por Elementos Finitos para calcular la distribución de amplitud y fase. Hay software ya desarrollado que calcula el comportamiento vibracional en cualquier frecuencia para un diseño específico de transductor (p.e. Módulo de Dispositivos piezoeléctricos de Mecánica Estructural de COMSOL Multiphysics 5.2a [Ronda S 2018]).

### *1.3 Intensidad*

En el caso de usar equipos comerciales, se ha de disponer de la carta de calibración de la intensidad que emite el transductor según el modo de funcionamiento que se programe. Generalmente el valor de intensidad que dan los fabricantes se expresa en  $W/cm^2$ . Si no se dispone de esta calibración o se usa un transductor fabricado en el laboratorio, se ha de medir la intensidad en función del voltaje en bornes que se le aplique.

La intensidad emitida por un transductor a una cierta frecuencia se puede medir con una balanza de fuerza de radiación según las normas internacionales de calibración de equipos de US [IEC 61161 1.3:2013].



Si no se dispone de una balanza de fuerza de radiación y se trabaja con un transductor con forma de disco de radio  $a$  que tiene una superficie de vibración tipo pistón, otra opción es medir la amplitud de presión acústica en agua en el límite de Fraunhofer,  $P_F$ . Para esta medida se deben usar pulsos suficientemente largos para que el transductor alcance el régimen estacionario y suficientemente cortos para que en el punto de medida no haya interferencia de ecos producidos en el sistema. El área de la superficie insonificada a esa distancia con esa amplitud es un cuarto del área total de emisión. Por tanto, la potencia total transmitida por el transductor será:

$$W = \frac{P_F^2}{2 \rho_{agua} c_{agua}} \cdot 0.25 \cdot \pi \cdot a^2 \quad (3.9)$$

Dividiendo ese valor entre el área efectiva del traductor ( $ERA$ ), que se supone es el de la apertura circular a la que corresponde ( $\pi \cdot a^2$ ), se puede calcular la intensidad (densidad de potencia) como:

$$I_{SATP} = \frac{P_F^2}{2 \rho_{agua} c_{agua}} \cdot 0.25 \quad (3.10)$$

Otra opción es medir la amplitud de la onda plana de presión ( $P_{op}$ ) que transmite el transductor. Para ello debe situarse el hidrófono en un punto muy cercano a la superficie de emisión y próximo al centro del transductor. Para esta medida se deben usar pulsos suficientemente largos para que el transductor alcance el régimen estacionario y ha de controlarse que no interfieran las ondas de borde. La intensidad se obtiene aplicando la relación:

$$I_{SATA} = \frac{P_{op}^2}{2 \rho_{agua} c_{agua}} \quad (3.11)$$

Las expresiones eq.(3.10) y eq.(3.11) son equivalentes si se tiene en cuenta que la amplitud en los máximos de presión acústica del eje axial son el doble que la amplitud en el origen ( $P_F = 2P_{op}$ ).

#### 1.4 Parámetros del pulso que se emplea

Tanto en el caso en el que se realice el experimento con equipos de laboratorio como si se emplea un equipo comercial deben especificarse los siguientes parámetros:

- Duración del pulso ( $t_{ON}$ ) o número de ciclos ( $n$ ), siendo la relación entre ambos:

$$t_{ON} = n \cdot 1/f_o \quad (3.12)$$

- $PRF$  y  $DC$ , siendo la relación entre ambos:

$$DC = t_{ON}/PRF \quad (3.13)$$

A la hora de seleccionar un modo de funcionamiento del transductor, en la mayoría de los equipos comerciales se puede escoger el modo de onda continua o el modo pulsado, con un cierto DC. Debe conocerse la equivalencia entre las diferentes notaciones (p.e el modo pulsado 1:4 implica un DC del 0.2). Cada dispositivo tiene diferentes posibilidades, especificadas en los manuales y deben indicarse los detalles del modo de funcionamiento que se ha usado para conocer la energía final aplicada a las células.

## 2. Caracterización de la cavidad acústica

### 2.1 Factores de la configuración experimental que influyen en la amplitud de presión acústica que reciben las células.

- *Altura del líquido:* Debe ser conocida y reproducible ya que condiciona la distribución del campo acústico en el volumen de líquido. En el caso de un cultivo tipo monocapa, para que la interferencia dé lugar a máximos de presión en el plano donde están las células (fondo de la columna de líquido) ha de emplearse una altura de líquido,  $hl$ , que corresponda con la dada por la eq.(3.5).

Para alcanzar una  $hl$  concreta, el volumen de líquido de cultivo,  $Vol$ , que se ha de emplear en un pocillo de radio  $r_p$  se calcula:

$$Vol = \pi \cdot r_p^2 \cdot hl \quad (3.14)$$

- *Posición de las células:* Si el cultivo está en suspensión debe tenerse en cuenta que si se forma en el medio un campo estacionario las células tienden a migrar hacia los nodos, produciéndose el efecto conocido como *banding* [Ter Haar G 1978, Dyson M]. Para el caso de células creciendo adheridas al fondo del pocillo, es en esa posición donde debe conocerse la distribución de presión.

- *Alineación del sistema y reproducibilidad en la posición:* Para una apertura tipo pistón o con simetría circular se ha de procurar que los centros del transductor y el pocillo coincidan y que la inclinación del pocillo sea nula. Con esta configuración se puede presuponer una simetría circular en las distribuciones de presión acústica. Si se tienen desalineaciones, inclinaciones o bien se modifica la forma de la interfaz durante las insonificaciones (p.e agitando el sistema) se rompe la simetría y la distribución de presión se complica. Para estos casos el campo acústico no es reproducible y se dificulta la comparación con otros trabajos.

3. Señal acústica real aplicada a las células en la base del pocillo

Si se puede considerar que el sistema posee simetría circular, debe registrarse la señal temporal completa en puntos distribuidos a lo largo de un radio. Para ello se debe emplear un hidrófono que tenga una superficie efectiva más pequeña que la  $\lambda$  con la que se trabaja y que esté calibrado. De las señales que se registren deben extraerse, al menos, los valores de amplitud de presión acústica máxima,  $P_{max}$ , y la integración de la densidad de energía que está siendo transmitida,  $\rho_E$ .

Resumidamente, la secuencia de la sistemática que se acaba de proponer se muestra en la Fig.3.20.

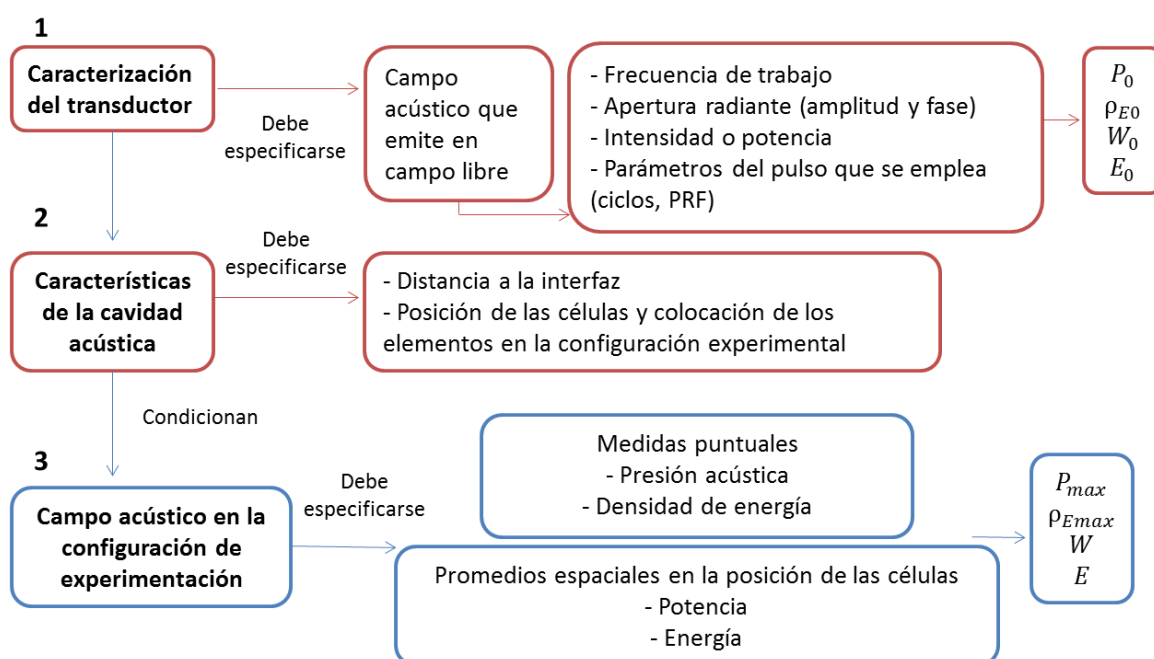


Fig. 3.20: Sistemática propuesta para conocer los valores acústicos en un experimento de insonificación in vitro.

Puede ocurrir que no sea posible hacer una medida de la presión real que insonifica a las células (Paso 3 en la Fig.3.20) p.e. por no disponer de medios. Para estos casos se puede estimar la presión acústica a través de la potencia nominal del transductor en función de las condiciones experimentales. Mediante un análisis como el realizado en este capítulo pueden obtenerse relaciones que permiten estimar los valores máximos de los parámetros acústicos que se van a alcanzar en el cultivo y el valor integrado de la intensidad total y la energía transmitida en la base, donde se sitúan las células.

En el caso particular de que: la configuración experimental usada sea la de la Fig.3.1, se usa un transductor de tipo *Panametrics-NTD*, con una capa de acoplamiento de  $\lambda/4$  y con un diámetro del orden del tamaño del pocillo, se rellena el pocillo con un volumen de líquido correspondiente a una altura de  $5\lambda$  y el pulso se mantiene antes de decaer más del 25 % (- 12 dB) respecto de su amplitud inicial tres rebotes en el medio líquido, conocida la intensidad que emite el transductor en campo

**Propuesta de una sistemática estándar de caracterización del campo acústico en un experimento de insonificación in vitro**

libre se pueden estimar los valores puntuales de presión acústica máxima y densidad de energía a través de las relaciones mostradas en la Tabla 3.10. La deducción de los campos de la Tabla 3.10 se desarrolla a continuación en base a los resultados obtenidos en este trabajo. Las relaciones dependen de la longitud espacial del pulso,  $lp$ . La discretización se establece según se pueda considerar que se tiene una onda propagativa ( $lp < 2hl$ , pulso corto) o bien sea estacionaria ( $lp \geq 6hl$ , pulso largo). El parámetro  $P$  representa la presión de la onda inicial que se transmite al líquido.

**Tabla 3.10: Estimación de los parámetros acústicos en la base del pocillo para un caso como el estudiado en este trabajo.**

Pulso	$P_{max}$	$\rho_E max$	Potencia y energía promedio que recibe el cultivo en la base
Corto	$1.4 P$	$\rho_E = 3.12 \cdot I_{SATP} \cdot \frac{n}{f_o}$	La potencia total integrada en la superficie del pocillo que recibe el cultivo en el instante de máxima amplitud del pulso será un factor 2.7 mayor que la emitida por el transductor en campo libre. La energía total que se está aplicando a lo largo de la duración del tratamiento será un factor 3.8 mayor.
Largo	$4 P$	$\rho_E = 16 \cdot I_{SATP} \cdot \frac{n}{f_o}$	La potencia total integrada en la superficie del pocillo que recibe el cultivo en el instante de máxima amplitud del pulso será un factor 12.5 mayor que la emitida por el transductor en campo libre. La energía total que se está transmitiendo a lo largo de la duración del tratamiento será un factor 12.5 mayor.

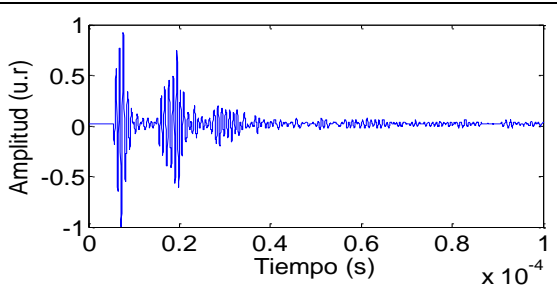
Se justifican a continuación los campos de la Tabla 3.10.

1) Si  $lp < 2hl$  (pulso corto)

Presión acústica máxima

La presión acústica máxima que reciben las células situadas en la base del pocillo es mayor que la original debido a la superposición de ondas. En la configuración experimental real ocurre que con cada reflexión la onda de presión pierde amplitud debido a factores disipativos. Si se mide la disminución de la amplitud de presión de la onda en la configuración experimental en el caso concreto de una  $hl$  de  $5\lambda$  en las sucesivas reflexiones que sufre. El resultado para el transductor comercial de 1 MHz se recoge en la Tabla 3.11.

**Tabla 3.11: Señal adquirida para estimar la caída de amplitud de la onda entre las sucesivas reflexiones.**

Señal adquirida	Amplitud pulso 1	Amplitud pulso 2	Amplitud pulso 3
	1.92 u.r pp	1.35 u.r pp	0.39 u.r pp
<b>Respecto del original</b>		<b>Caída</b>	<b>Caída</b>
<b>dB</b>		1.84 dB	13.84 dB
<b>%</b>		70 %	20 %

En base a esto, se puede considerar que existen 3 reflexiones en la interfaz de aire antes de que el pulso decaiga al menos una cuarta parte de su amplitud original (25 %, -12 dB). De esta manera, se esperan presiones acústicas máximas un factor 1.4 mayores que la original (debido a la superposición de las dos ondas con una amplitud un 70 % respecto de la original). Este resultado es concordante con lo previamente mostrado en este trabajo, en el que se ha obtenido para un pulso de 5 ciclos un aumento de la presión en el segundo pulso respecto del original un factor 1.6 en las simulaciones y un factor 1.3 en las medidas experimentales (Fig.3.15).

Densidad de energía del pulso

La densidad de energía de la señal completa puede calcularse sumando la de cada uno de los paquetes (teniendo en cuenta la dependencia cuadrática con la amplitud), como:

$$\rho_{E\ total} \approx (1 + 1.96 + 0.16) \cdot \rho_E = 3.12 \cdot \frac{P^2}{2 \rho_{\text{liquido}} c_{\text{liquido}}} \cdot \frac{n}{f_0} \quad (3.17)$$

Este resultado es concordante con los incrementos que se han obtenido para un pulso de 5 ciclos de un factor 3.1 en las medidas experimentales.

Puesto que lo más común es que los fabricantes proporcionen el valor de la intensidad emitida por el transductor ( $I_{SATP}$ ), si se consideran las propiedades del líquido de cultivo (donde se propaga el pulso) y el agua (donde se realiza la medida de calibración de intensidad) similares, esta expresión se puede aproximar a:

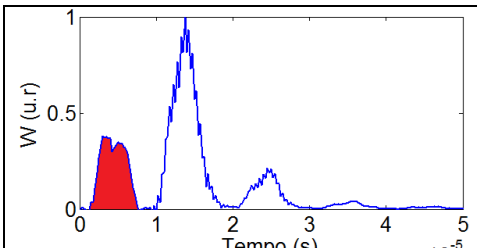
$$\rho_E = 3.12 \cdot I_{SATP} \cdot \frac{n}{f_0} \quad (3.18)$$

Con esta aproximación, en base a los parámetros de  $\rho$  y  $c$  de la Tabla 3.3, el error es del 4 %.

Promedio espacial de los parámetros acústicos en el plano de la base del pocillo

En la simulación del campo acústico para un pulso corto del apartado 4.4 se calcula la integral espacial de la intensidad (es decir, la potencia,  $W$ ) que se está transmitiendo en el plano de la base del pocillo. La evolución temporal del valor que se obtiene se muestra en la Tabla 3.12.

**Tabla 3.12: Evolución temporal de la potencia integrada en la base del pocillo para un pulso de 5 ciclos. En rojo se indica el resultado que cabe esperar si no hay interferencia.**

		Considerando sólo el primer paquete	Considerando la señal completa
	<b>Amplitud máx.</b>		0.37
<b>Integral</b>		1	3.8

En base a esto se puede afirmar que la potencia total que se está dando al cultivo en ciertos instantes será un factor 2.7 mayor que la supuesta sin considerar las reflexiones y la energía total que se aplica durante el tiempo que dura el tratamiento es un factor 3.8 veces mayor de la que se espera si se considera sólo el pulso inicial. Dado que estos valores se estiman a partir de la simulación se han de tener en cuenta posibles diferencias que deriven de, p.e., el menisco, que hace que las reflexiones no sean totalmente en fase.

2) Si  $lp > 6hl$  (pulso largo)

### Presión acústica máxima

Para este tipo de pulso la interferencia que se origina incrementa los máximos de presión por encima de un factor 2. En una primera aproximación, si se considera que se dan en el sistema 3 reflexiones antes de que el pulso se disipe en el medio, todas las ondas que se han considerado en la Tabla 3.11 se superponen constructivamente en ciertos puntos de la base. De esta manera, se estima una presión máxima correspondiente a:

$$P_{m\acute{a}x} = 2P + 1.4P + 0.4P = 3.8P \quad (3.19)$$

En la simulación realizada para un pulso de 30 ciclos ( $6hl$ ) se ha obtenido que, en el instante y en la localización en el que se tiene el máximo de la señal acústica, éste es un factor 4.4 mayor en amplitud que en la parte inicial (Fig.3.16B). Experimentalmente, para un pulso de 200 ciclos, se ha obtenido un incremento de un factor 4 (Tabla 3.7). La infraestimación obtenida con la eq.(3.19) puede atribuirse a que no se han tenido en cuenta las ondas que se propagan en otras direcciones además de la transversal y que también interfieren.

### Densidad de energía del pulso

Puesto que el pulso se mantiene en el sistema más tiempo del programado, la señal adquirida con un hidrófono en la configuración experimental se alarga respecto de su duración esperada. Considerando que la onda sufre 3 reflexiones, el tiempo que se mantiene en el sistema es el correspondiente a lo que tarda en recorrer una distancia de  $6hl$ . Así, para un caso en el que la altura de líquido sea de  $5\lambda$ , se espera que el pulso se alargue una duración de  $30/f_0$ . Esta aproximación puede confirmarse para los registros obtenidos en el caso de un pulso largo (30 ciclos) donde se ha estimado que la duración del mismo se alarga hasta los  $60 \mu s$ , donde su amplitud ya ha decaído por debajo de los 12 dB respecto del máximo del pulso (Fig.3.15A).

Se aproxima que la amplitud promedio de la señal acústica corresponde con el valor de la amplitud en la parte estacionaria. Este valor de amplitud depende de la localización en la que se registra la onda. Se espera que los máximos se alcancen cerca del centro, y, en base a lo

mencionado anteriormente, se puede afirmar que alcanzan un valor un factor 4 mayor que la amplitud original. Por lo tanto, se tiene que:

$$\rho_{E\ max} \approx \frac{(4P)^2}{2 \rho_{\text{liquido}} c_{\text{liquido}}} \cdot \frac{n}{f_0} = 16 \cdot \rho_E \quad (3.20)$$

Si se consideran las propiedades del líquido de cultivo y del agua similares, esta expresión se aproxima:

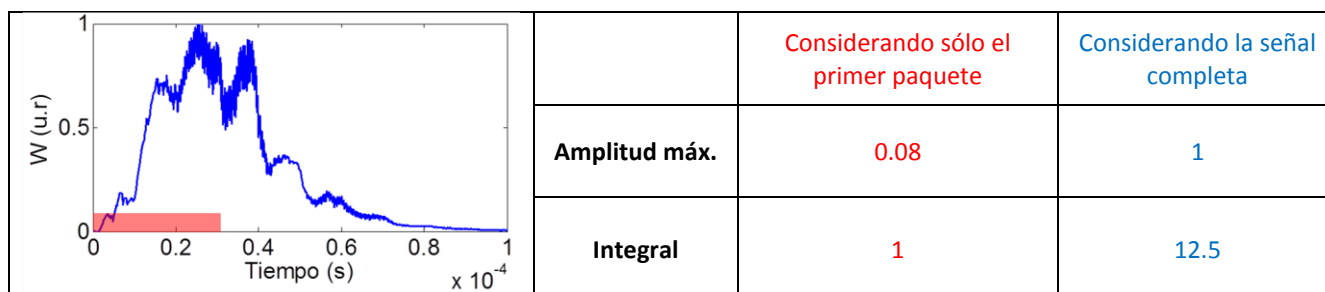
$$\rho_{E\ max} = 16 \cdot I_{SATP} \cdot \frac{n}{f_0} \quad (3.21)$$

Este resultado no consideraría la parte del pulso que se alarga por lo que se ha de tener presente que es una infraestimación.

Promedio espacial de los parámetros acústicos en el plano de la base del pocillo

Siguiendo con la metodología mostrada para el pulso corto, se obtiene en la simulación para un pulso de 30 ciclos la densidad de potencia que se transmite, integrada en toda la superficie en un plano en el que se tiene un máximo de interferencia. Se calcula así la evolución temporal de la potencia, *W*, en ese plano. El resultado se muestra en la Tabla 3.13.

**Tabla 3.13: Evolución temporal de la potencia integrada en la base del pocillo para un pulso de 30 ciclos. En rojo se indica el resultado que cabe esperar si no hay interferencia.**



En base a esto se puede afirmar que la potencia total que se está dando al cultivo en ciertos instantes será un factor 12.5 mayor que la que emite el transductor en campo libre y la energía total es también un factor 12.5 veces mayor que si no se producen las múltiples reflexiones e interferencias.

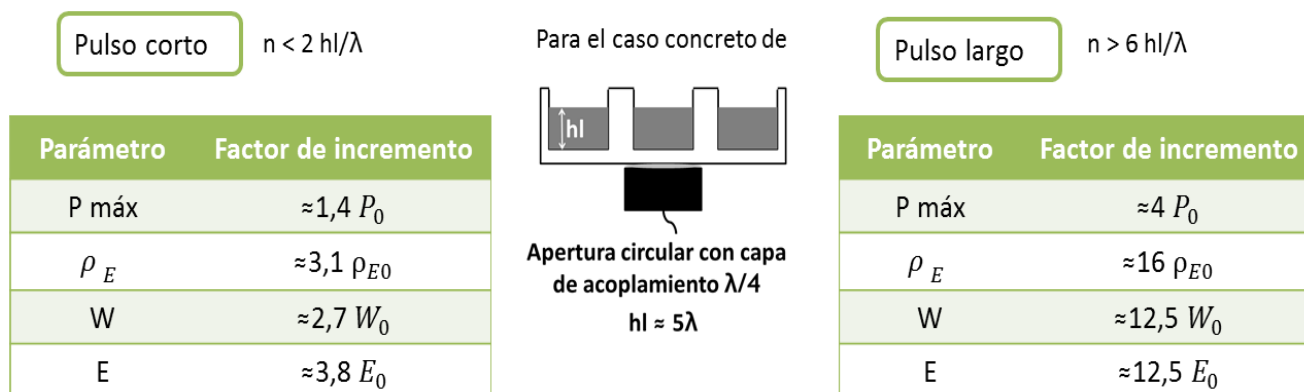
**7. Conclusiones**

En este capítulo se ha demostrado la alta dependencia del campo acústico con las características de la configuración experimental, cuando se confina en un pocillo de cultivo celular. En concreto, se ha particularizado el estudio para una de las configuraciones experimentales más comúnmente empleadas: la insonificación de una placa de cultivo colocando el transductor en contacto directo

**Propuesta de una sistemática estándar de caracterización del campo acústico en un experimento de insonificación in vitro**

con su base (Fig.3.1). En estas condiciones, el factor más influyente es la existencia de interfaces debido al volumen finito del líquido que se emplea. Se ha mostrado cómo este hecho cambia el valor de las amplitudes de presión acústica que se tienen y, por tanto, de la dosis, respecto de los valores previstos. Se ha obtenido experimentalmente incrementos de la amplitud máxima de presión cuando se confina el campo acústico en un pocillo en comparación con condiciones de propagación de campo libre de un factor 4 para un pulso largo ( $lp \geq 6 hl$ ) y de un factor 1.4 para uno corto ( $lp < 2 hl$ ).

De los resultados obtenidos en el análisis del campo acústico que se ha realizado se extraen las correspondencias mostradas en la Fig.3.21, que relacionan los parámetros acústicos del transductor cuando emite en campo libre y los que se tienen en la configuración experimental.



**Fig. 3.21: Relaciones entre los parámetros acústicos del transductor cuando emite en campo libre y los que se tienen en la configuración experimental.**

Los parámetros acústicos que se han cuantificado son condicionantes para los efectos que se producen en un experimento con US. En base a los resultados que se obtienen en este trabajo, se advierte sobre la infraestimación que pudiera haber en la cuantificación de la dosis hecha en algunos estudios [Maalouf JE, Hassan MA, Unsworth J, Yumita N 2002, Kerr CL]. Con las relaciones aquí obtenidas, se pueden realizar reinterpretaciones de algunos trabajos relevantes que emplean la misma configuración experimental y que observan efectos con supuestas bajas intensidades.

Las relaciones obtenidas justifican estudios como los de *Secomski et al* en el que los resultados que se tienen indican que son necesarias intensidades promedio espaciales un factor 18 menores para dañar la misma cantidad de células bajo condiciones de onda estacionaria y múltiples reflexiones en comparación con una exposición en campo libre [Secomski W]. El factor 18 que obtienen es del orden del incremento que se calcula que se produce en este trabajo, de 12.5 (Fig.3.21).



Para un caso en el que se tenga una configuración experimental diferente, se ha propuesto en el apartado 6 de este trabajo una sistemática que permite caracterizar correctamente la dosis que se aplica. Ésta se resume en la Fig.3.20. De esta manera se facilita la comparación posterior entre trabajos y se evitan interpretaciones incorrectas de los resultados. Con esta guía se pretende establecer las bases de la requerida estandarización en la metodología de experimentación in vitro con US terapéuticos.

## Capítulo 4.

# Experimento in vitro: Insonificación de una monocapa de fibroblastos

### 1. Introducción y motivación

Entender cómo afectan los US en los niveles orgánicos más simples, las células, es fundamental para conocer su efecto sobre los tejidos. Por ello, los experimentos in vitro debe ser el primer paso para entender cómo deben emplearse luego los US en un tratamiento con animales y a nivel clínico.

En este capítulo se realiza un experimento de insonificación in vitro de señales ultrasónicas en el rango MIFU. Se emiten insonificaciones sobre un cultivo monocapa de fibroblastos, las células principales del tejido conectivo, uno de los más comúnmente tratados con US en Fisioterapia. Los fibroblastos son fundamentales en la síntesis de la matriz extracelular (*ECM*), que da sustento a la musculatura.

En comparación con la acción térmica de los US, que es bien conocida, se encuentra en la bibliografía que todavía existe falta de entendimiento en cuanto a sus efectos no térmicos a nivel celular y cómo estos pueden optimizarse. Por ello este estudio se centra en este tipo de efectos. Así, para descartar el calentamiento del cultivo como agente, se emplean US pulsados, con DC cortos, no superándose el 10 % en ninguno de los protocolos empleados. La frecuencia de trabajo del transductor es 1.9 MHz, intermedia entre las dos más usadas en Fisioterapia, 1 MHz y 3 MHz. Con esta frecuencia se tiene mayor capacidad de penetración en el tejido que en el caso de 3 MHz y una absorción mayor que para 1 MHz.

En los trabajos revisados relacionados con los efectos no térmicos de los US en cultivos in vitro, la cavitación es el principal agente al que se le atribuyen los resultados observados [Webster DF 1978, Webster DF 1980, Dinno MA, Tsukamoto A, Chen Y, Zhang Y (2) 2012, Feng Y, Hu Y, Jia Y, Kondo T]. Sin embargo, hay casos en los que se está trabajando con intensidades por debajo de los umbrales de cavitación o no se registra dicha actividad en el laboratorio y aun así hay diferencias significativas entre el grupo control y los grupos insonificados [Cárdenas Sandoval RP, Mortimer AJ, Atherton P, Zhou S, Mostafa NZ, Roper J, Domenici F, Doan N, De Deyne PG]. Esto lleva a hipotetizar que la propia onda es capaz de interactuar con las células y produce en ellas reacciones según la amplitud de la misma y su frecuencia, no tanto la intrínseca como sí la de repetición de los pulsos (PRF). Se han diseñado por tanto protocolos de insonificación para investigar este hecho en nuestros experimentos.

En este experimento se ha empleado una de las configuraciones más comúnmente usadas: colocando el transductor en contacto directo con la base de una placa de cultivo comercial y con el cultivo adherido a la base del pocillo. Dada la altura finita del líquido de cultivo que se emplea, la presencia de interfaces supone múltiples reflexiones de la onda. Como se ha mostrado en el Capítulo 3, este hecho modifica el campo acústico previsto para el caso de propagación libre, por lo que su caracterización en las condiciones de experimentación es fundamental. Por todo esto, el primer objetivo del presente trabajo es el de, caracterizar el campo acústico para nuestras insonificaciones.

En base a los resultados obtenidos en los experimentos con fibroblastos se proponen hipótesis para explicar los mecanismos de interacción de los US y los organismos celulares cuando la acción es únicamente de tipo mecánico. Así, se explica, dependiendo de las condiciones de experimentación y los parámetros del pulso de US que se emplea, cuáles son los mecanismos de interacción de este tipo de radiación y cómo afectan a un organismo celular, en concreto en este caso, un fibroblasto.

Se han llevado a cabo insonificaciones con dos tipos de protocolos distintos con US de 1.9 MHz. El primero de ellos consiste en un pulso largo (200 ciclos) similar a los comúnmente empleados en terapia y que, dadas sus dimensiones espaciales ( $\approx 154$  mm), implica la aparición de un campo estacionario en el volumen finito del pocillo (3 ml,  $\approx 7.7$  mm). El segundo protocolo emplea un pulso muy corto (5 ciclos,  $\approx 3.9$  mm), menos frecuente en este tipo de estudios. Este tipo de insonificación se asemeja más a un tratamiento de ondas de choque (*SW*, *Shock Wave*), pero de muy baja amplitud (del orden de MPa frente a las decenas de MPa de estos últimos, ya que la pretensión no es causar daño en las células). Para cada uno de estos protocolos se ha estudiado el efecto de variar un parámetro diferente (amplitud de presión para el caso de pulsos largos y PRF para el de pulsos cortos).

Los trabajos revisados en esta misma línea, es decir, que producen o simulan la interacción de una onda de tipo ultrasónico con diferentes tipos celulares, muestran que los mecanismos de la radiación no térmicos que esperan encontrarse en un experimento de este tipo incluyen: streaming, cavitación y fuerza de radiación [Dyson M]. El conocimiento de las características de cada uno de ellos facilita la interpretación de los resultados (véase apartado 4.2 del Capítulo 1 de esta Tesis). También es importante conocer los fundamentos de los mecanismos de mecanotransducción que poseen las células, que permiten entender cuál es su respuesta a nivel fisiológico ante un estímulo mecánico [Wang JHC, Hamill OP, Bao G, Diaz Chiguer D]. Este trabajo correlaciona los mecanismos físicos y sus efectos biológicos, para dos situaciones diferentes: campo estacionario (pulso largo) y campo propagativo (pulso corto), que actúan sobre una monocapa de fibroblastos.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1 Cultivo celular

El cultivo celular, la deposición de la monocapa en las placas y la medida de viabilidad en los pocillos han sido realizados por el Grupo de Biomateriales del ICTP-CSIC. Las células empleadas son fibroblastos obtenidos a partir del tejido de la dermis humano (HDF, *Human Dermal Fibroblasts*) proporcionados por Innoprot®. Las células se cultivan en frascos de poliestireno de 75 cm<sup>2</sup> utilizando como medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma-Aldrich*) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SBF, *Gibco*), 2 % de L-Glutamina y 1 % de penicilina-estreptomicina (*Sigma-Aldrich*), en un incubador a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Cuando las células alcanzan la confluencia total, son levantadas con tripsina-edta y contadas con Countess™ Automated Cell Counter (*Invitrogen*®) para conseguir una densidad celular de 90000 células/ml. El cultivo se siembra en placas comerciales de poliestireno de 12 pocillos redondos de fondo plano, en cuya base se adhieren los fibroblastos, creciendo hasta formar una monocapa durante 24 horas. Las células son insonificadas a continuación.

Transcurridas estas 24 horas se cambia el medio de cultivo con 3 ml de medio fresco (DMEM), para asegurar que la distancia de la interfaz de líquido-aire, donde tiene lugar una reflexión prácticamente total del campo acústico ( $\Gamma = 0.9994$ ), sea siempre la misma y garantizar la reproducibilidad de los resultados. Las placas se mantienen en el incubador a una temperatura de 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> durante todo el estudio, salvo cuando se extraen de la cámara de cultivo y se llevan al laboratorio para ser insonificadas, permaneciendo ese tiempo a temperatura ambiente ( $\approx 22$  °C). Para comprobar que este hecho no influye significativamente en la tasa de crecimiento de las células, se mantiene siempre una placa en el incubador y se le hacen las medidas de viabilidad a las horas y días en las que se miden también las placas tratadas, siendo así una medida de control para comprobar que no se están introduciendo alteraciones por el cambio de temperatura durante la insonificación. No obstante, por seguridad, los resultados de los grupos tratados siempre se comparan con el grupo de control de cada placa, que ha sido expuesta a las mismas condiciones ambientales que los insonificados.

### 2.2 Configuración experimental

El transductor que se ha empleado consta de un resonador piezoeléctrico PZT-4 con forma de disco de 25 mm de diámetro y de frecuencia nominal de 2 MHz. El disco de PZT-4 se monta en un cilindro metálico hueco. La FTE en las condiciones de trabajo de este transductor es de 1.9 MHz. Para la transmisión del pulso de excitación, se conecta a un generador de funciones (*HP 8116 A*) y a un amplificador de potencia (*AR 100A250A RF Power Ampl.*). El voltaje en bornes que está siendo transmitido al transductor es medido con un osciloscopio (*Tektronix TDS210*) y se cuantifica en este capítulo en unidades de amplitud pico-pico ( $V_{pp}$ ).

La configuración experimental que se emplea consiste en la colocación de la placa de cultivo sobre la superficie emisora del transductor, en contacto directo. Para optimizar el acoplamiento y la transmisión del campo acústico se emplea una fina capa de gel intermedia entre el transductor y la placa (*Aquasonic 100, Parker Lab. Inc.*). El uso de una plantilla con marcas de posicionamiento asegura que la colocación del transductor en cada pocillo es la misma en experimentos sucesivos. La tapa de la placa se mantiene siempre colocada, lo cual garantiza la esterilidad. Un esquema y la situación real para una insonificación en el laboratorio pueden verse en la Fig.4.1.

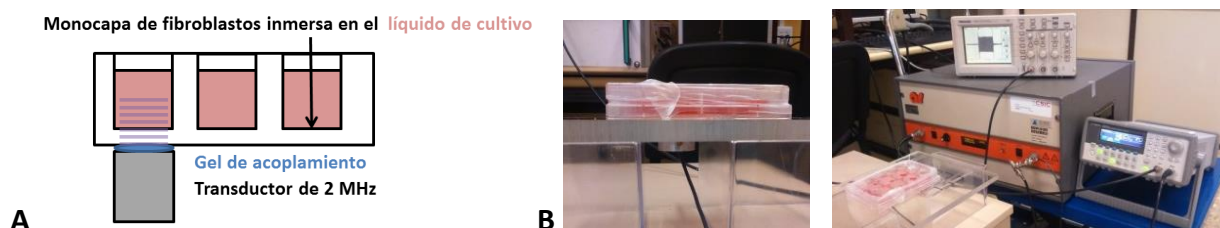


Fig. 4.1: (A) Esquema y (B) situación real de la configuración experimental.

### 2.3 Protocolos de insonificación

Se han llevado a cabo dos tipos de insonificación. El primer grupo de insonificaciones, *Protocolo A*, emplea pulsos que constan de 200 ciclos de 1.9 MHz y se varía la intensidad de los mismos, con amplitudes de la onda de presión que alcanzan los 770 kPa y disminuyen hasta un factor 10. El PRF es de 1 kHz y se mantiene por tanto un valor de DC del 10 %. Éste tipo de insonificación se asemeja a los tratamientos convencionales de terapia pulsada empleados en la actualidad (TUS).

En el segundo grupo, *Protocolo B*, se usan pulsos muy cortos, pero más intensos. En este caso se excita el transductor con un pulso de solo 5 ciclos y se varía la PRF con la que se emiten desde 0.1 ms hasta los 100 ms. Este tipo de onda se asemeja más al modo de insonificación de los tratamientos de ondas de choque de tipo radial (RSW), sólo que en nuestro caso se emiten amplitudes de presión un orden de magnitud menores ( $\approx 1$  MPa).

Una idea ilustrativa de ambos protocolos, *A* y *B*, así como un ejemplo representativo de la adquisición de la onda de presión en un punto en la base del pocillo, puede verse en la Fig.4.2 y 4.3.

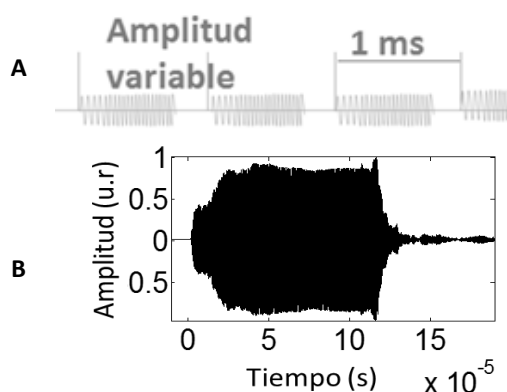


Fig. 4.2: (A) Esquema y (B) onda de presión acústica dentro del pocillo para el Protocolo A.

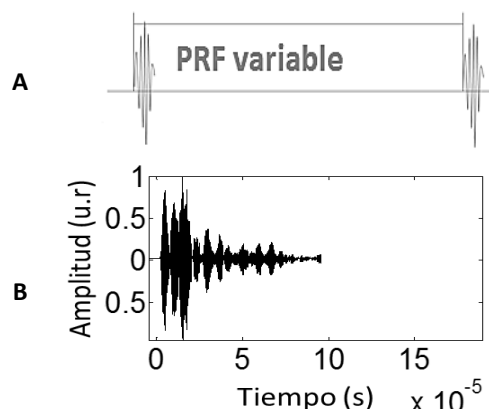


Fig. 4.3: (A) Esquema y (B) onda de presión acústica dentro del pocillo para el Protocolo B.

Para los tratamientos del *Protocolo A*, el valor de la presión acústica alcanza una situación estacionaria (Fig.4.3A). Para los del *Protocolo B*, puede considerarse que se propaga en el medio una onda que sufrirá múltiples reflexiones y que conforme avanza irá mostrando los efectos de la difracción (Fig.4.3B).

Se ha comprobado que el nivel de presión en un pocillo cercano a otro que se insonifica es despreciable. En cada experimento, una de las columnas (3 pocillos) siempre se mantiene como control y cada uno de los 9 pocillos restantes recibe en cada caso un tratamiento diferente, llevándose a cabo de manera similar en 3 placas. De esta manera, una de las placas se emplea para el análisis de los efectos producidos a las 24 horas (24 h), otra para el análisis a las 48 horas (48 h) y la tercera se analiza a los 7 días (7 d).

## 2.4 Caracterización del campo acústico

En el capítulo anterior de esta tesis se propone una sistemática a seguir para caracterizar de forma correcta el campo acústico que se tiene en este tipo de experimentos (Apartado 6 del Capítulo 3). Siguiendo los pasos propuestos, se realizan las medidas en el laboratorio con dispositivos específicos para la determinación de los parámetros en las condiciones de experimentación, como son:

- Medida de la impedancia eléctrica del transductor con un analizador de impedancias (*Agilent 4294A*).
- Medida de la amplitud de vibración en la dirección transversal a la superficie del transductor cuando emite en aire. Para esto se emplea un interferómetro láser (*Polytec OFV 50000*).
- Medida de la amplitud de presión y adquisición de la señal acústica con un hidrófono de aguja calibrado de 0.6 mm de diámetro activo (*DAPCO 54389*). Para una frecuencia de 2 MHz se tiene para este hidrófono una sensibilidad de 1.66  $\mu\text{V}/\text{Pa}$ . Para el registro y la visualización de la señal que se tiene se emplea un osciloscopio (*Teledyne Lecroy Wavesurfer 3024*).
- Medida con una balanza de fuerza de radiación de la potencia,  $W$  [IEC 61161 1.3:2013].
- Medida del incremento de temperatura que se está produciendo en el pocillo durante las insonificaciones con un termopar (*PTFE Type K, TM Electronics UK*).

Por otro lado, se llevan a cabo simulaciones con el software de simulación de *COMSOL Multyphysics 5.2a*. El transductor se simula como una apertura plana circular de 25 mm de diámetro. Los parámetros para propiedades acústicas de cada uno de los materiales que componen el diseño de la configuración experimental son los mismos que los recogidos en la Tabla 3.3.

## 2.5 Medida de la viabilidad

Tras su insonificación, las placas se introducen de nuevo en el incubador y se cultivan hasta su extracción para el análisis de los efectos producidos. Este análisis consiste, en primer lugar, en medir la viabilidad con el ensayo de AlamarBlue®. Este parámetro da cuenta de la cantidad de células viables en el momento de la medición. Se basa en que el compuesto activo, *resazurim*, es un indicador redox que cambia de color en respuesta a la reducción química del medio de cultivo que ocurre como consecuencia del crecimiento y proliferación de las células. Se detecta por fluorescencia (460 /630 em/ex) en un lector de placas (*Biotek Synergy HT*) [Nakayama GR]

Para la correcta interpretación de los resultados se ha de tener presente que esta medida es resultado de un promedio del estado global del cultivo y es dependiente de la población total del mismo. Para el caso de los fibroblastos, es conocido que cuando hay menor densidad de individuos, el metabolismo promedio de cada uno es mayor por su tendencia a la replicación. De esta manera, la viabilidad promedio por individuo es más alta cuando son pocos que cuando casi toda la monocapa se ha formado. Para una alta densidad poblacional se produce lo que se conoce como inhibición de crecimiento por contacto [Abercrombie M], que consiste en la disminución de la capacidad proliferativa de los fibroblastos y su metabolismo individual.

Cada experimento se realiza varias veces (al menos dos) y los resultados para la viabilidad de los mismos tratamientos se calculan de la forma *media ± desviación estándar* de todas ellas.

## 2.6 Microscopía óptica: Número de células, superficie de ocupación y morfología

Tras medir la viabilidad se realiza un tintado del cultivo con cristal violeta (*Sigma-Aldrich*). A los tiempos establecidos se fijan las células con glutaladehído al 2 % en agua durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo se lavan con PBS (*Buffer Salino de Fosfato*, pH 7.4), se añade una solución al 10 % de cristal violeta (CV) en PBS y se deja en oscuridad durante 15 minutos a 37 °C. Posteriormente se elimina el exceso de CV con agua y se deja secar a temperatura ambiente. Las células vivas que hayan sobrevivido a los tiempos de medida quedan teñidas de un color violeta pudiendo observar su morfología con un equipo de microscopía óptica (*Nikon Eclipse 50i*).

Para la adquisición de las imágenes se emplean los objetivos de 10x y 20x. En cada caso se incluye una barra de color que especifica la escala de cada imagen que se muestra en este trabajo. El color blanco indica la equivalencia con un tamaño de 200 μm y el rojo corresponde a 50 μm.

Se adquiere una imagen de cada pocillo en al menos 5 localizaciones separadas una distancia de 2 mm. La posición del objetivo se controla con el movimiento de la pletina donde se sitúa la placa mediante ejes x e y calibrados. En cada imagen se realiza un conteo de las células que hay presentes y la superficie ocupada por las mismas. Para ello se hace uso de un software de tratamiento de imagen (*ImageJ*®). Los resultados que se obtienen, para cada grupo de imágenes del mismo pocillo se muestran de la forma *media ± desviación estándar*. A modo de ejemplo se ilustra en la Fig.4.4 el procedimiento que se lleva a cabo para el estudio de una imagen.

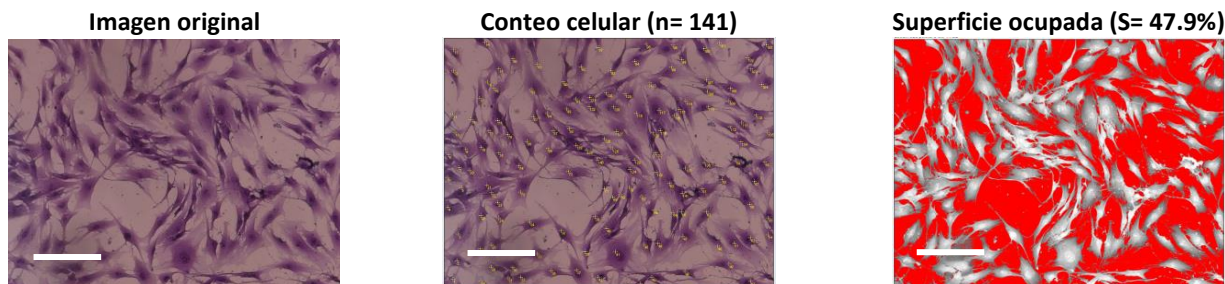


Fig. 4.4: Ejemplo de la sistemática seguida para el conteo celular y la cuantificación de la superficie ocupada a partir de las imágenes de microscopía.

La visualización de la monocapa con el microscopio óptico permite detectar cambios morfológicos. Comparando las imágenes del control con los grupos insonificados se han observado modificaciones en los fibroblastos tratados (p.e. individuos más pequeños, prolongaciones más estrechas, ...). Se recogen en la Fig.4.5 ejemplos ilustrativos, ya que luego se particularizarán las conclusiones para cada protocolo.

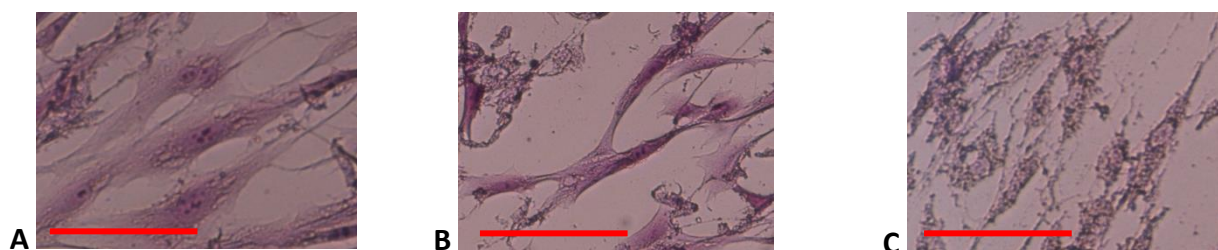


Fig. 4.5: (A) Fibroblasto control, (B) fibroblasto más estrecho y con prolongaciones más largas que el control y (C) restos celulares.

### 3. Campo acústico en la configuración experimental

#### 3.1 Caracterización experimental de la superficie de vibración

Tras diseñar en el laboratorio el transductor, se analiza su comportamiento en emisión.

##### 3.1.1 Medida de la frecuencia óptima de emisión

Se realiza un barrido del módulo de su impedancia eléctrica del transductor para un intervalo de frecuencias comprendido entre 1 y 3 MHz. El resultado de la medida se muestra en la Fig.4.6.

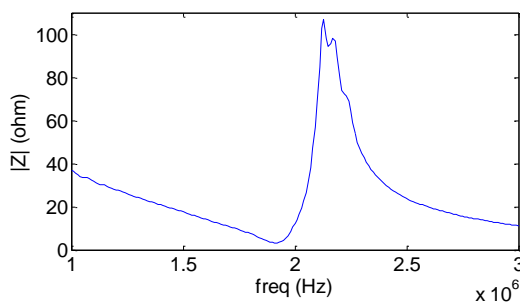


Fig. 4.6: Módulo de impedancia de la piezocerámica empleada en las insonificaciones a fibroblastos (PZT-4, 25 mm de diámetro). El mínimo se encuentra en 1.91 MHz.



El mínimo del módulo de la impedancia eléctrica de la piezocerámica se localiza en 1.9 MHz, por lo que esa es su frecuencia óptima de emisión y es en ella en la que se decide trabajar.

### 3.1.2 Medida de la distribución de amplitud de vibración en la dirección transversal

Se mide con interferometría láser la amplitud de vibración en la dirección transversal a la superficie de emisión del transductor, cuando éste emite en aire. El resultado del barrido para un paso espacial de 0.1 mm y un área de 25 x 25 mm se muestra en la Fig.4.7. En la distribución se incluye un círculo blanco que representa el contorno que limita el pocillo que se coloca encima del transductor.

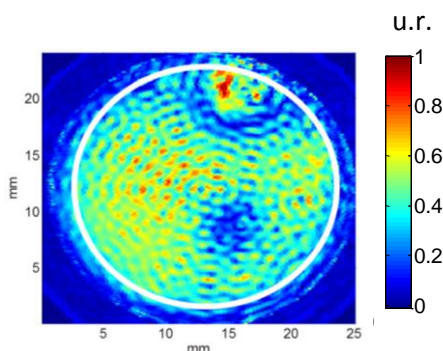


Fig. 4.7: Distribución 2D de la amplitud de vibración de la superficie de emisión del transductor.

Observando la distribución de la Fig.4.7 puede afirmarse que el comportamiento de este transductor es próximo al de una apertura plana circular, ya que es bastante homogéneo. Se obtienen dos zonas de menor amplitud de vibración (en la parte superior e inferior derecha en la Fig.4.7). Estas inhomogeneidades son debidas a la despolarización que sufre la piezocerámica por las partes en las que se han realizado los contactos eléctricos en el laboratorio. A partir de esta imagen se cuantifica que el área radiante eficiente de este transductor (*ERA*) es de  $3.5 \text{ cm}^2$ , medido como la superficie del mismo que según el barrido de interferometría láser tiene una amplitud de al menos un 50 % del máximo.

Para el estudio de la fase de vibración se adquiere la señal registrada por el interferómetro en distintos puntos a lo largo de un diámetro, evitando las zonas despolarizadas. Se realizan adquisiciones en un total de 126 puntos con un paso de 0.2 mm y se obtiene el desfase entre ellas (Fig.4.8).

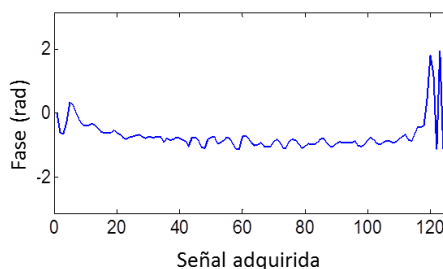


Fig. 4.8: Desfase de la señal adquirida en 126 puntos a lo largo de un diámetro del transductor.

La fase es constante en toda la superficie, salvo en los puntos muy cerca de los extremos. Puede afirmarse por tanto que la parte del transductor que insonifica el pocillo vibra en fase.

En base a estos resultados, de amplitud y fase, puede considerarse para las simulaciones que una primera aproximación al campo acústico transmitido por este transductor se corresponderá con el predicho por la teoría para una apertura plana circular de 1.9 MHz de frecuencia de trabajo y 25 mm de diámetro.

### 3.1.3 Medida de la potencia emitida en campo libre

Se dispone en el laboratorio de una balanza de fuerza de radiación calibrada con la que es posible establecer la relación entre el voltaje aplicado en bornes al transductor,  $V_{pp}$  (en unidades *pico-pico*), y la potencia registrada,  $W$ , en agua, que es el medio que generalmente se emplea para realizar esta medida [IEC 61161 1.3:2013]. Los valores que se han obtenido cuando el transductor trabaja en modo continuo, se recogen en la Fig.4.9.

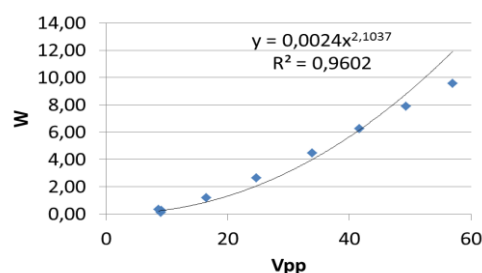


Fig. 4.9: Relación entre la potencia registrada en la balanza de fuerza de radiación ( $W$ ) y el voltaje aplicado ( $V_{pp}$ ).

Ajustando estos valores a una función potencial se obtiene una relación aproximadamente cuadrática, como cabe esperar, de la forma:

$$W = 0.0024 \cdot V^{2.1037} [W] \quad (4.1)$$

Considerando que el  $ERA$  es de  $3.5 \text{ cm}^2$  se obtiene que la intensidad instantánea promediada espacialmente que se emite ( $I_{SATP}$ ) se calcula:

$$I_{SATP} = \frac{0.0024 \cdot V^{2.1037}}{3.5 \text{ cm}^2} = 6.85 \cdot 10^{-4} \cdot V^{2.1037} [W/cm^2] \quad (4.2)$$

## 3.2 Simulación de la distribución de la presión acústica

### 3.2.1 Propagación en campo libre. Correspondencia entre el transductor real y el simulado.

El campo acústico del transductor se simula imponiendo un desplazamiento en la dirección normal en la apertura plana circular. Es necesario establecer cuál es la amplitud de desplazamiento que corresponde a cada voltaje de excitación del transductor en el laboratorio, para luego comparar resultados.

La potencia medida experimentalmente en el apartado 3.1.3 con la balanza de radiación, se mide para condiciones de propagación de campo libre, por ello se simula el campo acústico para

esta situación. Se calcula con la eq.(3.4) que para una apertura plana circular de 25 mm de diámetro y 1.9 MHz la distancia límite del campo cercano,  $l$ , cuando emite en medio acuoso es de  $\approx 20$  cm. Teniendo esto en cuenta a la hora de diseñar la geometría en la simulación, se obtiene en la Fig.4.10A la distribución bidimensional de la amplitud máxima de presión en agua para un valor de la amplitud de desplazamiento de 4 nm. Adicionalmente, se representa su valor a lo largo del eje axial central ( $r=0$ ) en la Fig.4.10B.

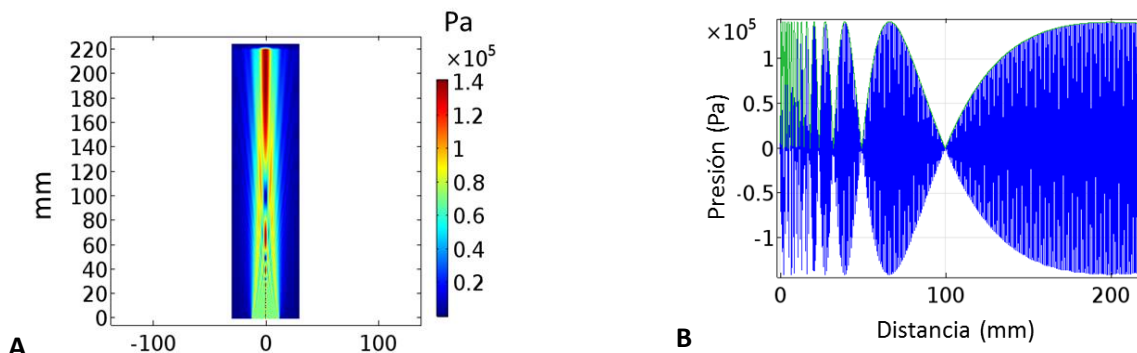


Fig. 4.10: (A) Distribución 2D de la amplitud de presión máxima de la apertura plana circular de 1.9 MHz y 25 mm, con 4 nm de amplitud de desplazamiento en agua. (B) Amplitud de presión en cada punto del eje axial central ( $r=0$ ).

Se obtiene en la Fig.4.11 la distribución espacial de  $I_{SPTP}$ .

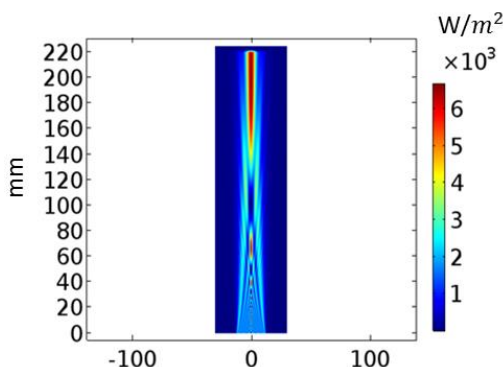


Fig. 4.11: Distribución 2D de la intensidad ( $I_{SPTP}$ ).

La integración de esta intensidad en una superficie transversal se corresponde con la potencia promediada en la misma. Con los datos de la simulación se calcula esta integral para varias distancias. Se representa en la Fig.4.12 la evolución de este parámetro según aumenta la profundidad,  $z$ .

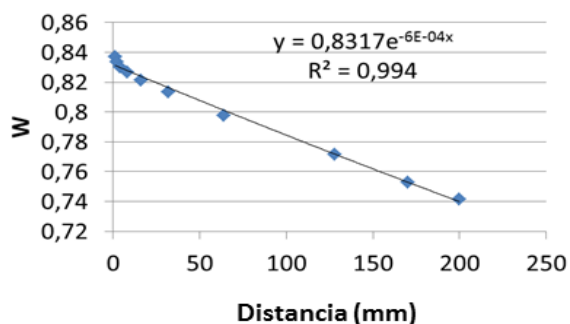


Fig. 4.12: Evolución de la potencia (W) transmitida por el transductor conforme aumenta la profundidad.

Realizando un ajuste del comportamiento de los datos según aumenta  $z$  se tiene que siguen una tendencia de decaimiento exponencial de la forma:

$$W = 0.8317 e^{-6 \cdot 10^{-4} z} \quad (4.3)$$

Este es el comportamiento esperado debido a la atenuación (eq.1.10). En base a este resultado se puede afirmar que la potencia acústica que emite inicialmente el transductor es la que se tiene en el origen ( $z = 0$ ) según la eq.(4.3). En este caso se obtienen 0.83 W. Según esto, este valor corresponde con la que se hubiera medido en el laboratorio con el sistema de la balanza de fuerza de radiación si se transmite al transductor de la Fig.4.7 una excitación que le provoque un desplazamiento transversal en su superficie de 4 nm de amplitud.

Asumiendo que el área que ocupa el campo acústico es similar al área del transductor de radio  $r$ , lo cual se cumple muy bien en los primeros mm de propagación (cuando el efecto de la difracción todavía no es notorio y no hay lóbulos secundarios) la intensidad instantánea promedio se calcula como:

$$I_{SATP} = \frac{W}{\pi r^2} = \frac{0.83 W}{\pi \cdot (12.5 \cdot 10^{-3} m)^2} \approx 0.17 W/cm^2 \quad (4.4)$$

Finalmente, con la relación de la eq. (4.2) entre  $V_{pp}$  e  $I_{SATP}$  para el transductor real obtenida con la balanza de fuerza de radiación puede deducirse el voltaje de trabajo al que corresponden experimentalmente los 4 nm de desplazamiento empleados en las simulaciones, de la forma:

$$I_{SATP} = 6.85 \cdot 10^{-4} \cdot V^{2.1037} \rightarrow V = \sqrt[2.1037]{\frac{I_{SATP}}{6.85 \cdot 10^{-4}}} = \sqrt[2.1037]{\frac{0.17}{6.85 \cdot 10^{-4}}} \approx 13.8 V_{pp} \quad (4.5)$$

De esta manera, se puede afirmar que los resultados en las simulaciones obtenidos en los que se impone al transductor una amplitud de desplazamientos de 4 nm equivalen a que el transductor real opere a 13.8 Vpp.

### 3.2.2 Emisión continua en la configuración experimental.

Se simula el campo acústico cuando se coloca el transductor en contacto con la base de un pocillo, como se dispone en la configuración de nuestros experimentos. El pocillo contiene una altura de líquido de cultivo de 7.7 mm ( $\approx 3$  ml) y el transductor tiene un diámetro mayor que las dimensiones del pocillo ( $D_p = 22.2 mm < D_{2MHz} = 25 mm$ ). La distribución de presión que se obtiene para el caso de emisión continua, cuando se alcanza una situación estacionaria, se muestra en la Fig.4.13.

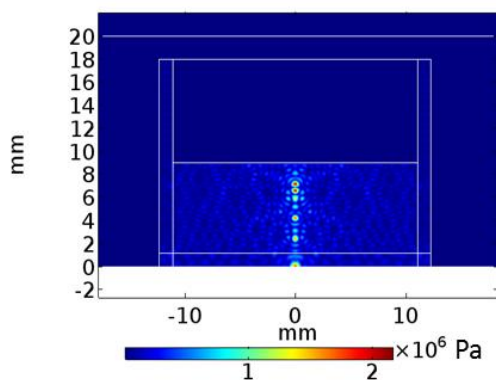


Fig. 4.13: Distribución 2D de la amplitud de presión máxima dentro del pocillo cuando el transductor vibra con 4 nm de amplitud de desplazamiento.

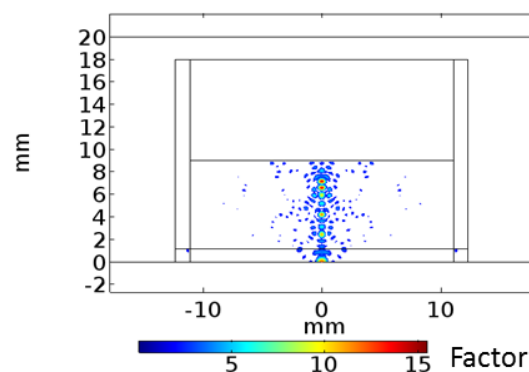


Fig. 4.14: Puntos con un factor  $\geq 2$  de amplitud de presión respecto al máximo para campo libre (140 kPa).

Para este caso se alcanzan presiones en algunos puntos del medio de cerca de 2.2 MPa. En comparación con los máximos de 140 kPa de la distribución calculada en la Fig.4.10 para el caso de campo libre, esto supone que hay puntos con una presión acústica cerca de un factor 15 mayor cuando se confina el campo en el pocillo, en condiciones de emisión continua. En la Fig.4.14 se representan las zonas que tienen al menos un factor 2 o más de presión acústica respecto del máximo para el caso de propagación en campo libre ( $P \geq 140$  kPa). Estos puntos se localizan en la zona cercana al eje de propagación, como cabe esperar dada la simetría circular del problema.

En nuestro caso la monocapa de fibroblastos está adherida a la base de la placa y es en esa zona donde interesa conocer bien la distribución transversal, calculada en la Fig.4.15.

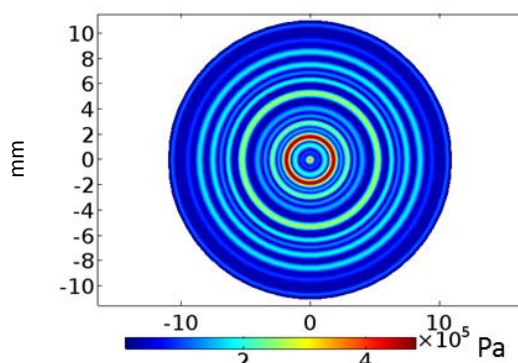


Fig. 4.15: Distribución 2D de la amplitud de presión máxima en la base del pocillo cuando el transductor vibra con 4 nm de amplitud de desplazamiento.

Se obtiene una distribución de presiones con un patrón anular y con zonas con una presión de hasta 480 kPa. Para un desplazamiento de 4 nm se calcula que la onda que se emite en agua es de 70.5 kPa, por lo que los 480 kPa máximos alcanzados suponen un incremento de un factor 6.8.

Puesto que en los experimentos con fibroblastos no se emplea emisión continua sino pulsada se realiza también la simulación de la propagación de un pulso corto en el sistema, de manera que no llega a alcanzarse estado estacionario.

### 3.2.3 Emisión de un pulso corto en la configuración experimental.

Se diseña un pulso de excitación del transductor como el mostrado en la Fig.4.16 con una forma similar a la que se tiene en el caso experimental cuando se excita el transductor con 5 ciclos de 1.9 MHz.

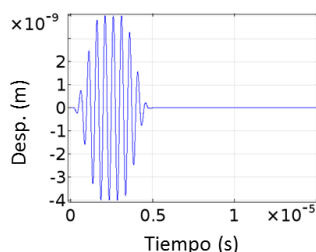


Fig. 4.16: Pulso del desplazamiento impuesto a la superficie del transductor en la simulación para un pulso corto.

Como puede verse en la Fig.4.16, este pulso tiene una amplitud máxima de 4 nm, es decir, según la relación en el apartado anterior obtenida, corresponde a una excitación de 13.8 Vpp en el caso real. Se estudia la evolución temporal de la presión acústica en sistema durante 15  $\mu$ s, con un paso temporal de 0.1  $\mu$ s (se calculan 150 instantes en total). Dada la velocidad de propagación del sonido en el líquido de cultivo ( $c = 1543$  m/s), el pulso recorre en ese tiempo,  $t$ , una distancia aproximada de  $\approx 23$  mm.

En el tiempo de simulación tienen lugar dos reflexiones completas del pulso: la primera en la interfaz de aire y la segunda en la base del pocillo. Al comienzo ( $\approx 25$   $\mu$ s), los primeros ciclos se transmiten al medio con la forma de una onda plana que avanza en la dirección axial. Al llegar a la superficie ( $\approx 88$   $\mu$ s) se produce la interferencia cerca de la superficie entre los ciclos que avanzan y los que se reflejan en la interfaz, aumentándose la presión hasta el doble en los planos de interferencia constructiva. La onda acústica continúa propagándose en sentido opuesto hasta volver a encontrarse con la base del pocillo, donde de nuevo se producirá la reflexión ( $\approx 125$   $\mu$ s). A medida que avanza, el pulso estará cada vez más afectado por la difracción y deja de tener la forma de un frente plano. Para ilustrar este comportamiento, se muestran en la Fig.4.17 las distribuciones bidimensionales de presión máxima en el pocillo para los diferentes instantes descritos.

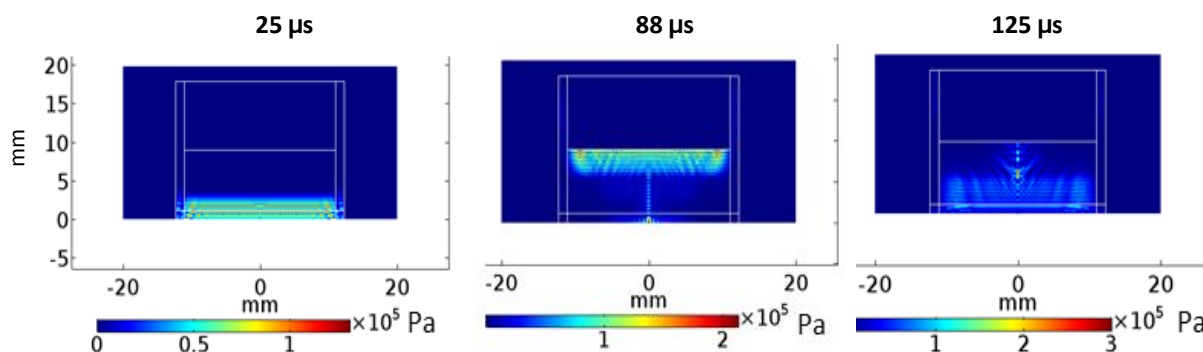


Fig. 4.17: Distribución 2D de la amplitud de presión máxima para diferentes instantes cuando el transductor emite en el pocillo un pulso como el de la Fig.4.16.

El registro de la evolución temporal de la presión acústica en un punto situado a 1 mm de la superficie se muestra en la Fig.4.18.

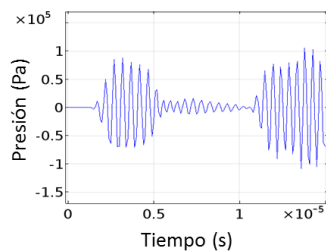


Fig. 4.18: Evolución temporal de la amplitud de presión en un punto a 1 mm de la superficie.

Observando la amplitud del primer paquete se obtiene que la onda acústica que sale del transductor tiene una amplitud de 88 kPa. Esto supone un aumento de un factor 1.2 respecto de la onda plana que se transmite en agua (de 70.5 kPa).

### 3.3 Medidas experimentales de la distribución de presión acústica dentro del pocillo

Aunque las herramientas de simulación ayudan a visualizar qué es lo que ocurre con el campo acústico y dan cuenta de las distribuciones que cabe esperar, es necesario verificarlas en el laboratorio. Las medidas de la dosis en las condiciones experimentales otorgan al investigador un conocimiento real del tratamiento que se aplica para luego extraer conclusiones en sus resultados. Por ejemplo, en base a la distribución de campo acústico, se puede predecir dónde es esperable el mayor efecto y justificar inhomogeneidades en zonas dentro del mismo pocillo. Se realizan las medidas con los pulsos que se aplican en los protocolos de insonificación diseñados para los experimentos con fibroblastos.

#### 3.3.1 Insonificación con un pulso largo (Protocolo A)

Algunos autores sugieren el valor de  $P_{rms}$  (eq.(1.14)) como un buen parámetro para cuantificar la dosis, dado que considera variaciones de la amplitud durante la duración completa del pulso y da cuenta de un promedio [Secomski W]. Para conocer su distribución bidimensional, se adquiere el valor  $P_{rms}$  de un pulso de 200 ciclos en un plano transversal, registrando la señal adquirida con un hidrófono situado a 1 mm de la base del pocillo, sin llegar al contacto para evitar dañar el sensor. En el barrido, se emplea un paso de 0.1 mm y en total se analiza una superficie dentro del pocillo de 14 x 14 mm. La medida se realiza en las mismas condiciones que los experimentos, es decir, con 3 ml de líquido. El resultado de la distribución obtenida se muestra en la Fig.4.19.

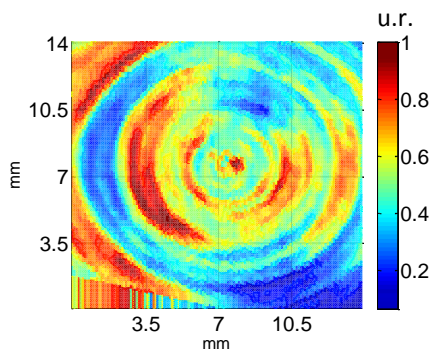
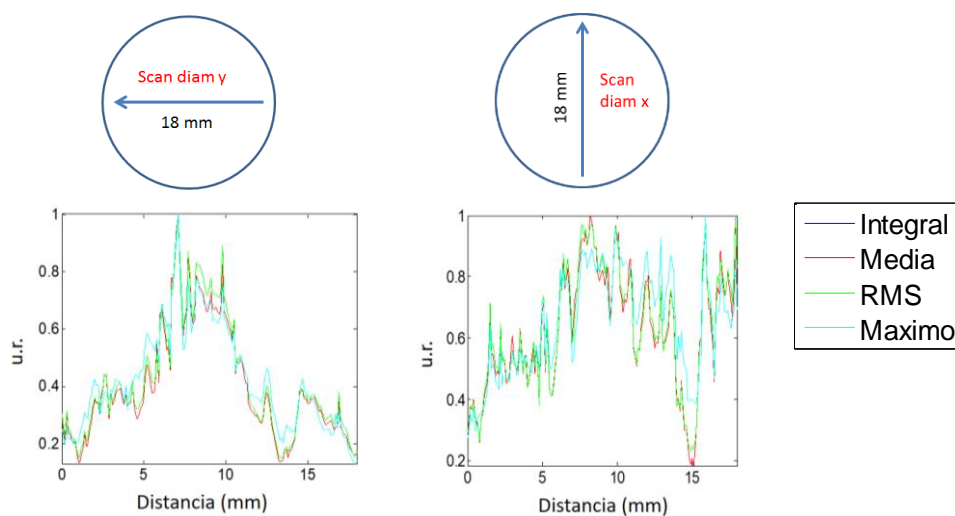


Fig. 4.19: Distribución 2D del valor  $P_{rms}$  de un pulso de 200 ciclos en un plano transversal próximo a la base del pocillo.

Se obtiene que, en toda la superficie, entre los puntos de máximo  $P_{rms}$  y los mínimos, hay un factor 4. El promedio de  $P_{rms}$  en la distribución es de un factor 0.52 respecto del máximo. El mayor efecto cabe esperarse en la zona más intensa de la Fig.4.19, que corresponde con el lado izquierdo.

A pesar de que para una apertura circular se predice una distribución anular, es evidente que ésta se ve afectada en el caso real por ciertos factores que hacen que no se obtenga una simetría circular perfecta. Posibles causas atribuibles a este hecho son: la no completa uniformidad en la eficiencia de la cerámica (Fig.4.7), que la interfaz entre el líquido y el aire no es del todo plana debido al menisco, pequeñas inclinaciones del sistema debidas, p.e., a inhomogeneidades en la capa de gel, ... Todos estos factores afectan a la interferencia que se produce y la alejan del caso ideal simulado. Este hecho evidencia de nuevo la importancia de realizar medidas del campo acústico en las condiciones experimentales reales.

Para comprobar que la distribución de los demás parámetros de la señal acústica se puede considerar similar a la de la Fig.4.19 se realiza un barrido de la señal a lo largo de dos diámetros, perpendiculares entre sí y se calcula el valor de: densidad de energía, valor medio, valor *rms* y valor máximo. En total se cubre un diámetro de 18 mm y el paso con el que se registra la señal es de 0.1 mm (se realizan un total de 181 adquisiciones en cada línea). En los gráficos de la Fig.4.20 se recogen los valores obtenidos, en unidades relativas al máximo en cada caso.



**Fig. 4.20: Valor de la integral, media, rms y máximo de la amplitud de la señal de presión acústica registrada en unidades relativas al máximo en cada caso.**

Dada la similitud entre todas las curvas obtenidas se puede aproximar que las distribuciones bidimensionales que cabe esperar son similares a las de la Fig.4.19 para los máximos de presión, el valor medio y la integral de la señal, que es equivalente a la densidad de energía.

A continuación, se adquiere la señal colocando el hidrófono sobre los puntos mostrados en la Fig.4.21. De nuevo se procura que el sensor esté lo más cerca posible de la base del pocillo y que se tengan las mismas condiciones que en los experimentos.



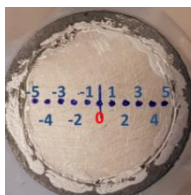


Fig. 4.21: Representación de los puntos sobre los que se adquiere la señal acústica.

Para estas adquisiciones, se aplica al transductor un voltaje en bornes de 10 Vpp y 200 ciclos de 1.9 MHz. En la Fig.4.22 se muestran dos de las once señales adquiridas dentro del pocillo.



Fig. 4.22: Ejemplos ilustrativos de las señales adquiridas, para un pulso de excitación del transductor de 10 Vpp y 200 ciclos en el punto (A) 0 y (B) 4 de la Fig.4.21.

De cada señal se extraen los valores del máximo de presión,  $P_{max}$ , y la densidad de energía,  $\rho_E$ . Se obtienen así los gráficos de la Fig.4.23. Cabe mencionar que la  $P_{max}$  corresponde al valor de máxima amplitud del pulso completo, y dado que es resultado de interferencias múltiples, puede situarse en la parte central si nos encontramos en un punto de interferencia constructiva (Fig.4.22A), o bien en el comienzo de la señal si la interferencia es destructiva (como ocurre en el caso de la Fig.4.22B).

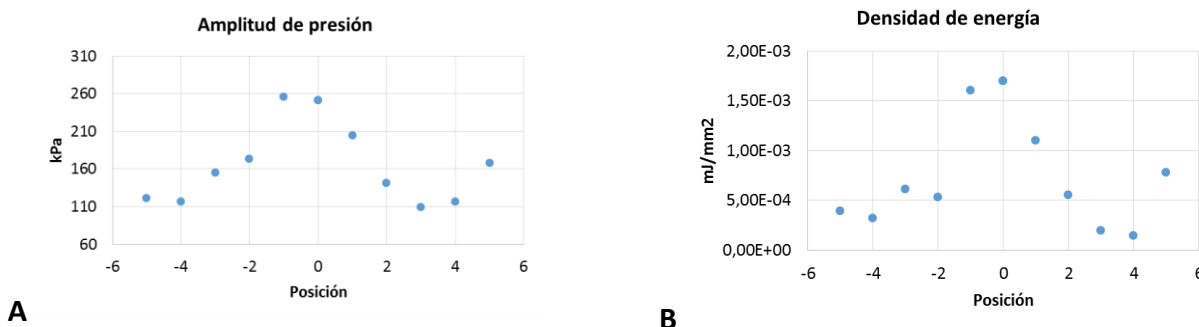


Fig. 4.23: Valores de (A) amplitud de presión máxima y (B) densidad de energía en las 11 posiciones del hidrófono ilustradas en la Fig.4.21, para un pulso de excitación del transductor de 200 ciclos y 10 Vpp.

Para una excitación de 10 Vpp la intensidad que emite el transductor según la eq.(4.2) es de 0.09  $W/cm^2$ . Según la eq.(1.9) esto corresponde a la emisión de una onda acústica en agua de 51.5 kPa y de 62 kPa dentro del pocillo (según el incremento de un factor 1.2 estimado en el apartado 3.2.3 en base a los resultados de simulación al confinarse el campo). Experimentalmente, para el pulso de 200 ciclos se tiene que para, 10 Vpp, se alcanzan  $P_{max}$  de hasta 256 kPa, es decir, un factor 5 mayor que si se considera la amplitud original en agua y un factor 4.1 mayor que la que se tiene originalmente en el pocillo. Este incremento es menor que el factor 6.8 obtenido en la simulación del apartado 3.2.2 para el caso de emisión continua. La diferencia es atribuible a las aproximaciones

tomadas en el modelo. Este factor es muy próximo al factor 4 que se propone en el capítulo anterior para un caso parecido.

En cuanto a la integración, se tienen señales con una  $\rho_E$  promedio de  $8.01 \cdot 10^{-4} \text{ mJ/mm}^2$ , siendo la máxima de  $17 \cdot 10^{-4} \text{ mJ/mm}^2$  y la mínima un factor 11.8 menor, de  $1.44 \cdot 10^{-4} \text{ mJ/mm}^2$ . Puesto que la  $P_{max}$  mínima registrada es de 109 kPa, que es mayor que los 62 kPa transmitidos, se puede afirmar que la interferencia que se produce intensifica la amplitud de la onda respecto de la original en ciertos instantes y en las posiciones estudiadas.

### 3.3.2 Insonificación con un pulso corto (Protocolo B)

Se dispone en el laboratorio el sistema para realizar la medida de la señal acústica cuando se excita el transductor con un pulso corto, de 5 ciclos. La señal adquirida con el hidrófono a 1 mm de la superficie se muestra en la Fig.4.24. Se aplica al transductor un voltaje en bornes de 18 Vpp.

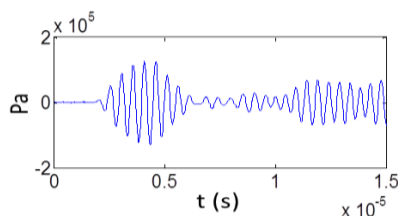


Fig. 4.24: Señal adquirida para un pulso de excitación del transductor de 5 ciclos de 18 Vpp.

La onda que se registra tiene una amplitud inicial máxima de 121 kPa. Dada la proporcionalidad que existe, se estima que para un  $V_{pp}$  de 13,8 Vpp se transmite al medio una amplitud de 93 kPa en la superficie, cercanos a los 88 kPa obtenidos en la simulación, con el desplazamiento de 4 nm equivalente (Fig.4.18). La variabilidad es aceptable dadas las diferencias entre el modelo de simulación y el caso real.

La amplitud del segundo paquete es menor en el caso real comparada con la simulación (Fig.4.18). Esto es justificable por la difracción real que no es perfectamente simétrica y por la directividad del hidrófono.

Siguiendo con la metodología llevada a cabo para el pulso largo, se adquiere la señal con el hidrófono de aguja en los once puntos mostrados en la Fig.4.21. Al transductor se le aplica una excitación de 10 Vpp y 5 ciclos de 1.9 MHz. Se muestra en la Fig.4.25 un ejemplo ilustrativo de la señal que se adquiere.

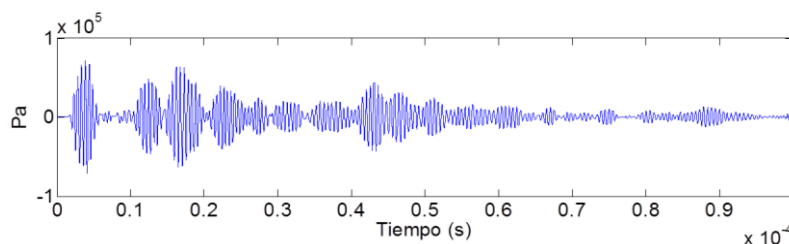


Fig. 4.25: Señal para un pulso de excitación del transductor de 10 Vpp y 5 ciclos en el punto 0 de la Fig.4.21.

En la señal registrada se aprecian sucesivos paquetes de pulsos correspondientes a las reflexiones de la onda en las interfaces. Si se compara con la señal que se obtenía en el capítulo anterior para el transductor comercial (Fig.3.15A) en ese caso hay menos reflexiones. Esto es debido a que el transductor comercial es globalmente un reflector bien acoplado al poliestireno

Tras adquirir cada una de las señales acústicas, en la Fig.4.26 se muestran los resultados de calcular la  $P_{max}$  y  $\rho_E$  en todas ellas.

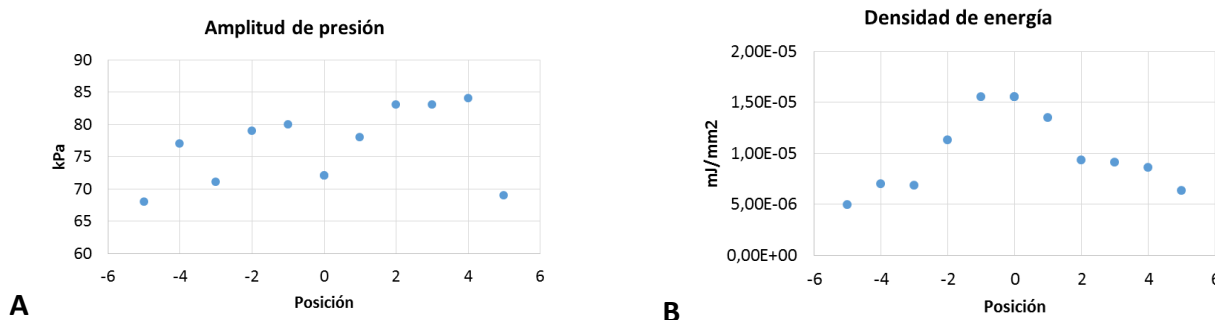


Fig. 4.26: Valores de (A) amplitud de presión máxima y (B) densidad de energía en las 11 posiciones del hidrófono ilustradas en la Fig.4.21, para un pulso de excitación del transductor de 5 ciclos y 10 Vpp.

Según los datos se tiene que para una excitación de 5 ciclos y 10 Vpp se alcanzan  $P_{max}$  de entre 69 kPa y 84 kPa. Puesto que el valor de la onda original se calcula que es de 67 kPa, la presión acústica se ve incrementada hasta un factor 1.3, debido a la interferencia en la base. El promedio de todas las  $P_{max}$  es de 76 kPa. La  $\rho_E$  promedio es de  $1.03 \cdot 10^{-5} \text{ mJ/mm}^2$ , siendo la máxima de  $1.57 \cdot 10^{-5} \text{ mJ/mm}^2$  y la mínima un factor 3.2 menor, de  $0.49 \cdot 10^{-5} \text{ mJ/mm}^2$ .

Comparando las distribuciones de las Fig.4.23 y Fig.4.26 se puede concluir que cuando se realiza la adquisición de la señal a lo largo de un diámetro de un pulso con pocos ciclos (5) la variación espacial de la señal es menor que en el caso de un número de ciclos grande (200). Para el pulso corto la diferencia entre los valores extremos de  $P_{max}$  es de un factor 1.2, mientras que para el largo alcanza un factor 2.3. En cuanto a la  $\rho_E$ , para el pulso corto, la diferencia máxima es de un factor 3.2, mientras que para el pulso largo alcanza un factor 11.8.

### 3.4 Comparación de los parámetros dosimétricos obtenidos

En la Tabla 4.1 se recopilan los resultados que se obtienen en las simulaciones y en las medidas experimentales. Para facilitar la comparación se han extrapolado ambas situaciones a un valor de voltaje de excitación común, de 10 Vpp.

Tabla 4.1: Datos que se extraen de las medidas experimentales y de las simulaciones para el transductor de 1.9 MHz, calculándose los datos para un voltaje común de 10 Vpp.

Situación	Vpp (Vpp)	W (W)	$I_{SATA}$ ( $W/cm^2$ )	P onda plana que se transmite (kPa)		P máx en la base pocillo (kPa)		$\rho$ máx en la base pocillo ( $mJ/mm^2$ )	
				agua	pocillo	Pulso corto	Pulso largo	Pulso corto	Pulso largo
Sim.	10	0.44	0.09	51.1	64	-	347 (cont.)	-	-
Exp.	10	0.30	0.09	51.5	63	84	256 (200 c)	$1.6 \cdot 10^{-5}$	$17 \cdot 10^{-4}$

Analizando los datos de la Tabla 4.1 se observa que:

(i) Para un mismo voltaje,  $V_{pp}$ , la potencia,  $W$ , que transmiten el transductor usado y la apertura circular simulada es menor para el primero. Esto se debe a que el ERA es un 29 % menor que la superficie total como consecuencia de la presencia de zonas despolarizadas por los contactos eléctricos (véase Fig.4.7). Esto justifica la disminución del 32 % en el valor de  $W$ . Esta diferencia desaparece cuando se promedia la potencia total emitida entre el ERA, para obtener la intensidad ( $I_{SATA}$ ). Los valores son similares en ambas situaciones.

(ii) Cuando se alcanza el estado estacionario, la presión máxima en la base del pocillo es un factor 1.4 mayor en la simulación que en la medida en el laboratorio con un pulso de 200 ciclos. La diferencia se debe a las aproximaciones consideradas en la simulación (emisión continua, paralelismo de la interfaz, ...).

### 3.5 Parámetros dosimétricos de los protocolos aplicados en los experimentos de insonificación de una monocapa de fibroblastos

En la configuración experimental, cuando se emite un pulso de 200 ciclos y una PRF de 1 ms (DC = 10 %) se observa que a partir de cierto voltaje de excitación del transductor ( $\approx 30$  Vpp) es apreciable a simple vista la vibración de la superficie del líquido y, por tanto, la distribución de la presión acústica sobre la monocapa de fibroblastos cambia radicalmente, apareciendo además flujos caóticos por todo el medio. Este efecto ya ha sido reportado por otros autores y se produce como consecuencia de la rotura de la tensión superficial del líquido por la presión ejercida sobre su superficie debida a la fuerza de radiación [Cinbis C]. En experimentos previos se ha observado que para este voltaje se obtienen ya efectos dañinos en el cultivo celular, por lo que se establece como el tratamiento de mayor amplitud para los experimentos del *Protocolo A*. A partir de éste, se fijan tres niveles de presión acústica: el máximo, con 30 Vpp, (*Muy Alta Presión, MAP*), una quinta parte, con 6 Vpp, (*Alta Presión, AP*) y un décimo, con 3 Vpp, (*Baja Presión, BP*).

Para el pulso de 5 ciclos se pretende que el estímulo, a pesar de ser muy corto en el tiempo, sea de alta presión acústica. Por ello se decide excitar el transductor con 120 Vpp. De esta manera se transmite al medio una onda progresiva de amplitud de hasta 1.01 MPa. Manteniendo esta misma amplitud, lo que se va a ir variando entre tratamientos es la frecuencia de repetición con la que se emiten estos pulsos (*PRF*) desde la 0.1 ms hasta 100 ms, según el caso. En base a la bibliografía revisada para los casos de estudios in vitro en los que se varía la PRF de las insonificaciones, se diseñan dos tipos de experimentos:

- *Protocolo B1*: en todos los tratamientos se mantiene el mismo tiempo total de insonificación (300 s) y se va variando la PRF de los pulsos, desde 1 ms, a 10 ms y a 100 ms. En consecuencia, cada vez se emite un número total de pulsos menor.

- *Protocolo B2*: en todos los tratamientos se mantienen el mismo número total de pulsos aplicados (60.000), y por tanto la energía total transmitida. La PRF varía desde 0.1 ms a 1 ms, y, en

consecuencia, se ha de modificar el tiempo que dura el tratamiento desde los 6 s a 60 s, respectivamente.

En la bibliografía en estudios de insonificación in vitro de cultivos celulares no hay un parámetro estándar para la cuantificación de la dosis que se encuentra. Generalmente los parámetros usados para cuantificar la dosis acústica son: la intensidad, la amplitud de presión y la densidad de energía. Las relaciones para calcular los mismos en nuestros protocolos en base a las medidas realizadas en los apartados anteriores de este trabajo se muestran a continuación.

- La intensidad emitida por el transductor ( $I_{SATP}$ ). Para este caso se calcula con la eq.(4.2).
- Valor de la presión acústica máxima que se registra en la base del pocillo ( $P_{max}$ ) y la intensidad a la que equivale ( $I_{SPTP}$ ). Estos parámetros corresponden a valores puntuales en las condiciones de experimentación. Se calculan, a partir de las medidas mostradas en la Tabla 4.1 en las que se obtiene que para una excitación de 10 Vpp la  $P_{max}$  registrada es de 256 kPa para el pulso largo y de 84 kPa para el pulso corto. Con estos datos, el valor máximo de presión se calcula como (ver valores en las Tablas 4.2, 4.3 y 4.4):

$$P_{max} \text{ 200 ciclos [kPa]} = 25.6 \cdot Vpp \quad (4.6)$$

$$P_{max} \text{ 5 ciclos [kPa]} = 8.4 \cdot Vpp \quad (4.7)$$

La  $I_{SPTP}$  se obtiene a partir del valor de la  $P_{max}$  aplicando la eq.(1.15).

- Valor de la densidad de energía del pulso completo,  $\rho_E$ , teniendo en cuenta todas las reflexiones que se producen. Puesto que es conocido que la distribución no es homogénea se dan los valores de la  $\rho_E$  máxima que cabe encontrarse en la base ( $\rho_{E \text{ max}}$ ) y del promedio de todas las señales que se registran a lo largo de un diámetro ( $\overline{\rho_E}$ ) en base a los valores obtenidos para una excitación de 10 Vpp (Fig.4.23B y 4.26B). Cabe recordar la dependencia cuadrática de este parámetro con la amplitud de presión y, por tanto, con el voltaje de excitación. Se tiene para ambos protocolos las relaciones (ver valores en las Tablas 4.3, 4.4 y 4.5):

$$\rho_{E \text{ max}} \text{ 200 ciclos [mJ/mm}^2\text{]} = 17 \cdot 10^{-6} \cdot Vpp^2 \quad (4.8)$$

$$\rho_{E \text{ max}} \text{ 5 ciclos [mJ/mm}^2\text{]} = 1.57 \cdot 10^{-7} \cdot Vpp^2 \quad (4.9)$$

$$\overline{\rho_E} \text{ 200 ciclos [mJ/mm}^2\text{]} = 8.01 \cdot 10^{-6} \cdot Vpp^2 \quad (4.10)$$

$$\overline{\rho_E} \text{ 5 ciclos [mJ/mm}^2\text{]} = 1.03 \cdot 10^{-7} \cdot Vpp^2 \quad (4.11)$$

- Valor de la densidad de energía total ( $\rho_{E \text{ total}}$ ) en función del número de pulsos,  $n$ , que se han emitido durante todo el tiempo que dura cada tratamiento, calculada como:

$$\rho_{E \text{ total}} \text{ [mJ/mm}^2\text{]} = \overline{\rho_E} \cdot n \quad (4.12)$$

Con estas relaciones propuestas se particularizan los parámetros según el protocolo. Los valores dosimétricos resultantes para cada uno de los tratamientos se recogen en la Tabla 4.2 (*Protocolo A*) Tabla 4.3 (*Protocolo B1*) y Tabla 4.4 (*Protocolo B2*).

Tabla 4.2: Parámetros de insonificación de los tratamientos del *Protocolo A*, en el que varía la amplitud del pulso.

	Vpp V	Ciclos n	PRF ms	t s	Pulsos n	$I_{SATP}$ $mW/cm^2$	$P_{max}$ kPa	$I_{SPTP}$ $W/cm^2$	$\rho_{E\ max}$ $mJ/mm^2$	$\overline{\rho_E}$ $mJ/mm^2$	$\rho_{E\ total}$ $mJ/mm^2$
MAP	30	200	1	300	300 $10^3$	880	770	19.25	15.3 $10^{-3}$	7.21 $10^{-3}$	2163
AP	6	200	1	300	300 $10^3$	30	154	0.77	6.12 $10^{-4}$	2.88 $10^{-4}$	86.4
BP	3	200	1	300	300 $10^3$	7	77	0.19	1.53 $10^{-4}$	0.72 $10^{-3}$	21.6

Tabla 4.3: Parámetros de insonificación de los tratamientos del *Protocolo B1*, en el que varía la PRF del pulso y se mantiene el tiempo de insonificación igual en todos los casos (300s).

	Vpp V	Ciclos n	PRF ms	t s	Pulsos n	$I_{SATP}$ $W/cm^2$	$P_{max}$ MPa	$I_{SPTP}$ $W/cm^2$	$\rho_{E\ max}$ $mJ/mm^2$	$\overline{\rho_E}$ $mJ/mm^2$	$\rho_{E\ total}$ $mJ/mm^2$
1msx300	120	5	1	300	300 $10^3$	16.2	1.01	33.1	2.26 $10^{-3}$	1.48 $10^{-3}$	444
10msx300	120	5	10	300	30 $10^3$	16.2	1.01	33.1	2.26 $10^{-3}$	1.48 $10^{-3}$	44.4
100msx300	120	5	100	300	3 $10^3$	16.2	1.01	33.1	2.26 $10^{-3}$	1.48 $10^{-3}$	4.4

Tabla 4.4: Parámetros de insonificación de los tratamientos del *Protocolo B2*, en el que varía la PRF del pulso y se mantiene la energía total de insonificación igual en todos los casos.

	Vpp V	Ciclos n	PRF ms	t s	Pulsos n	$I_{SATP}$ $W/cm^2$	$P_{max}$ MPa	$I_{SPTP}$ $W/cm^2$	$\rho_{E\ max}$ $mJ/mm^2$	$\overline{\rho_E}$ $mJ/mm^2$	$\rho_{E\ total}$ $mJ/mm^2$
0.1msx6	120	5	0.1	6	60 $10^3$	16.2	1.01	33.1	2.26 $10^{-3}$	1.48 $10^{-3}$	88.8
1msx60	120	5	1	60	60 $10^3$	16.2	1.01	33.1	2.26 $10^{-3}$	1.48 $10^{-3}$	88.8

## 4. Resultados

### 4.1 Protocolo A: Variación de la amplitud de un pulso largo

En la Fig.4.27 se muestran las medidas de la viabilidad del cultivo respecto del control transcurridas 24 h, 48 h y 7 d tras el tratamiento. Los resultados corresponden a un promedio de datos de entre al menos 2 y hasta 5 experimentos diferentes.

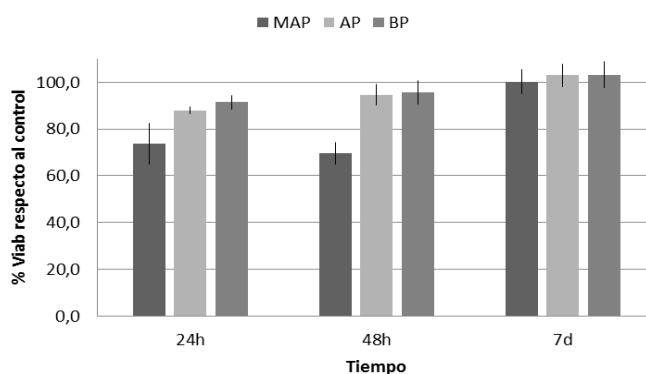


Fig. 4.27: % Viabilidad respecto del control en los grupos insonificados con el Protocolo A, a las 24 h, 48 h y 7 d.

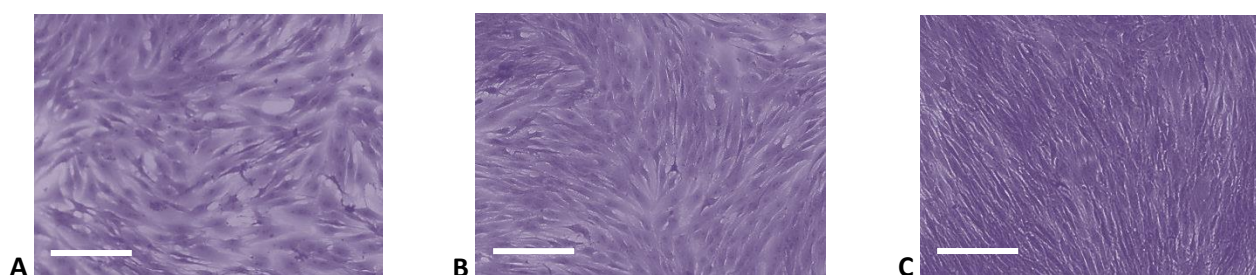
En los resultados puede observarse una disminución significativa y gradual de la viabilidad respecto del control a las 24 h. Ésta pasa del 91 % al 88 % y al 74 % conforme se aumenta la intensidad para los tratamientos de BP, AP y MAP, respectivamente.

Transcurridas 48 h tras la insonificación, el cultivo que ha recibido más intensidad, el de MAP, sigue teniendo una viabilidad significativamente menor que el control, del 69 %, mientras que los otros dos grupos se recuperan (viabilidad del 96 % y del 95 % para BP y AP respectivamente). Este hecho es una indicación de que en el grupo de MAP se tienen, a las 24 h, células apoptóticas que no han logrado recuperarse y terminan muriendo en 48 h.

A los 7 d, todos los grupos muestran valores de viabilidad sin diferencias significativas respecto al control, pero con promedios mayores en el caso de AP y BP, del 103 %.

En base a estos resultados, se concluye que: conforme se ha aumentado la intensidad, el número de células lisadas o que han sufrido apoptosis en las primeras 24 h tras la irradiación aumenta conforme aumenta la intensidad de la insonificación y que para el caso de más alta intensidad parte de la población sigue muriendo transcurridas 24 h tras el tratamiento, mientras que los demás grupos se recuperan y proliferan a tasas mayores que el control.

Tras la primera medida de viabilidad, a las 24 h, se realiza un tinte para facilitar la visualización con un microscopio óptico de la monocapa de fibroblastos, que queda adherida a la base. Como se explica en el apartado 2.6 de este capítulo, se realiza un conteo de las células que hay presentes, siguiendo la metodología mostrada en la Fig.4.4. Para cada grupo (control, MAP, AP y BP) y para cada experimento se toman al menos 5 imágenes en puntos diferentes del pocillo. A partir de las 48 h, la confluencia del cultivo es tal (> 80 % en todos los casos) que el conteo no es fiable por estar muchas células empaquetadas (véase Fig.4.28B). A los 7 d toda la monocapa está completa y hay incluso varias capas superpuestas (véase Fig.4.28C). Por ello, sólo se analizan los datos de las imágenes del cultivo transcurridas 24 h tras el tratamiento.



**Fig. 4.28:** Estado del cultivo para el caso control (A) a las 24 h (B) a las 48 h y (C) a los 7 d, tras la insonificación.

En la Fig.4.29 se muestra, en %, el número de células que hay presentes a las 24 h en cada cultivo teniendo como referencia el conteo obtenido para el grupo control (cuyo valor corresponde con el 100 %).

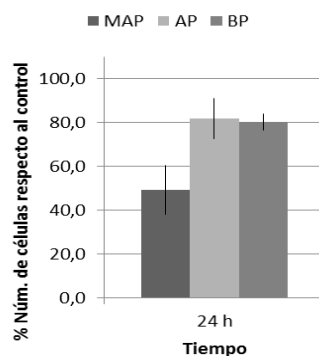


Fig. 4.29: % Número de células en los grupos insonificados con el Protocolo A, a las 24 h.

En concordancia con los resultados de viabilidad a las 24 h (Fig.4.27), se obtiene una disminución significativa del número de células presentes en la superficie del pocillo en los grupos insonificados. Los datos reflejan pérdidas del 51 %, 18 % y 20 % para los tratamientos de MAP, AP y BP respectivamente. Las células que contribuyen al conteo están vivas en el momento de producirse la tinción, ya que las que están muertas no se quedan adheridas. Según los datos obtenidos, el grupo de MAP refleja una reducción mucho más significativa respecto de los otros dos, quedando incluso por debajo de la confluencia original. En los grupos de AP y BP, a pesar de obtenerse una disminución respecto del control, no se obtienen diferencias significativas entre ellos. Esto es razonable si se tiene en cuenta que entre los tratamientos de MAP y AP hay un factor 10 y 2 en amplitud de presión respecto al de BP y, en consecuencia, un factor 100 y 4 en intensidad, respectivamente.

Se concluye por tanto que conforme se ha aumentado la intensidad, se ha producido una mayor disminución del número de individuos remanentes en el cultivo como consecuencia de la muerte de parte de la población al sufrir lisis o bien apoptosis en las primeras 24 horas.

En las mismas imágenes en las que se realiza el conteo de los fibroblastos se promedia también la superficie ocupada por los mismos, como se ilustra en la Fig.4.4. Los resultados obtenidos para la fracción de la superficie total de la base de la placa que se encuentra ocupada en cada caso se muestra en la Fig.4.30.

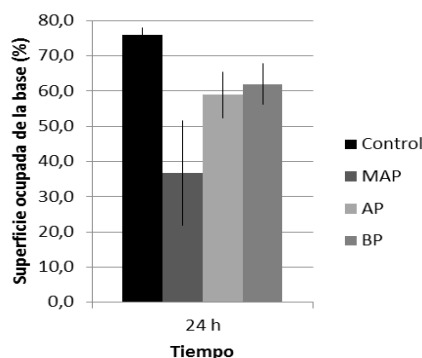


Fig. 4.30: % Superficie ocupada por los fibroblastos en los grupos insonificados con el Protocolo A, a las 24 h.

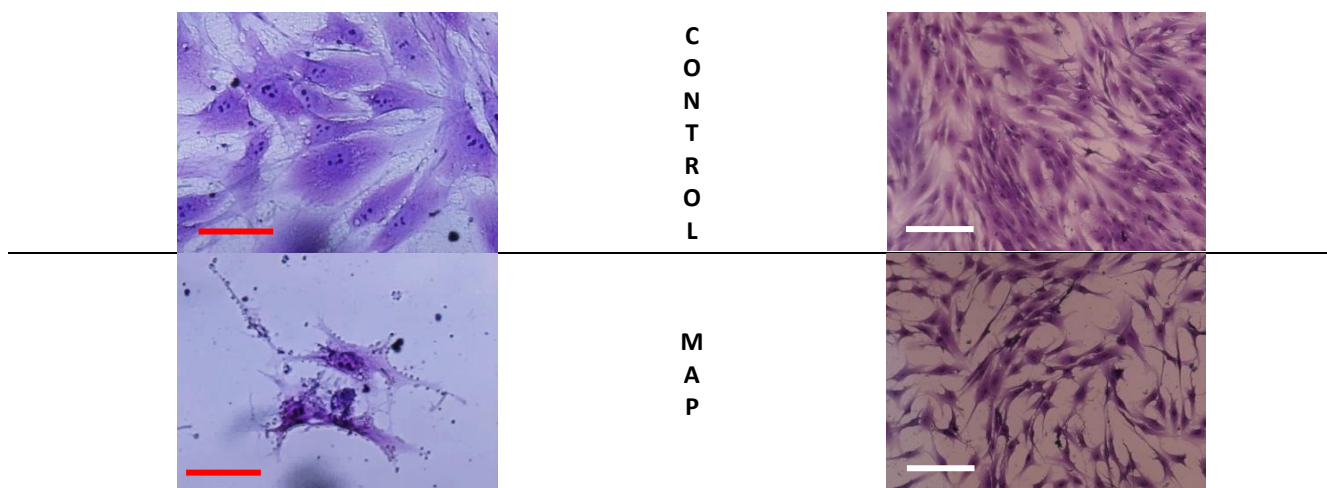
La tendencia de la superficie ocupada por los fibroblastos es la misma que para el caso del número de individuos, con una ocupación del 37 %, 59 % y 62 % frente al 76 % del control para los casos de MAP, AP y BP, respectivamente. Puede afirmarse por tanto que conforme se aumenta la



intensidad de la insonificación la confluencia de la monocapa de fibroblastos a las 24 horas es menor.

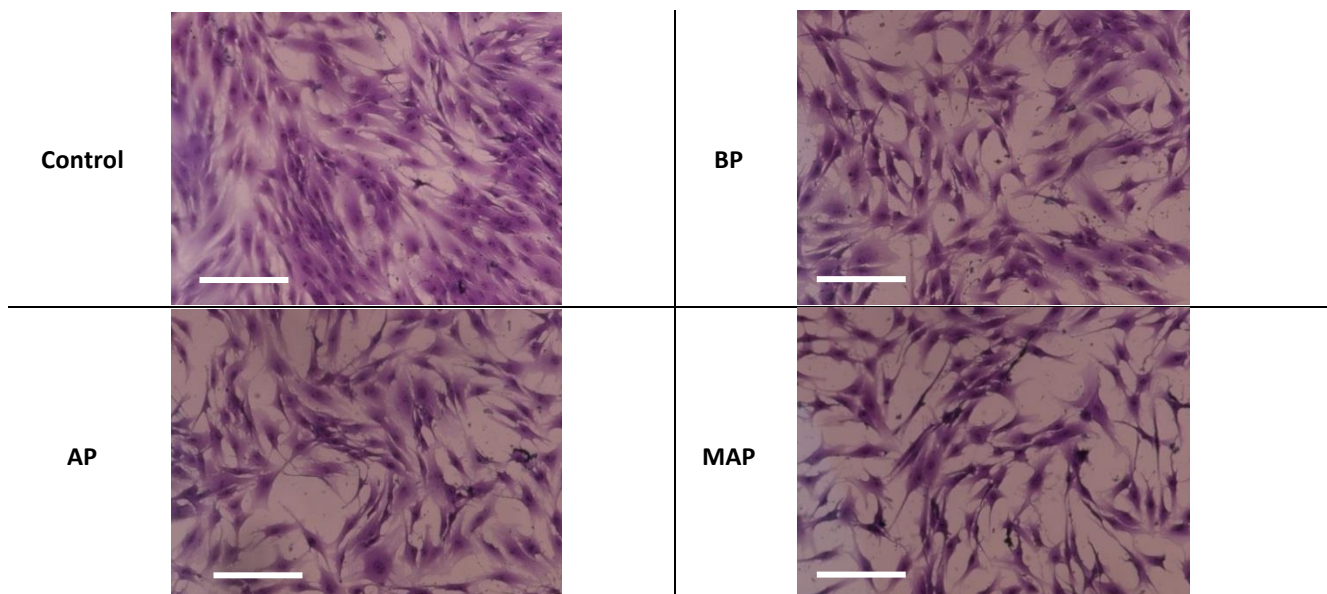
En base a los datos mostrados, el resultado de las insonificaciones del *Protocolo A* aparenta tener un efecto inicial dañino en el cultivo. Esta suposición se confirma si se analiza la morfología de los grupos tratados y se compara con los individuos sanos que hay en el control. Se muestran en la Tabla 4.5 imágenes de los restos celulares presentes en los grupos de MAP, consecuencia del daño producido.

Tabla 4.5: Imágenes tomadas con el microscopio óptico a 20x y 10x del control y del cultivo insonificado con MAP.



Las imágenes de microscopía muestran también cambios morfológicos en los grupos de AP y BP. Se recogen en la Tabla 4.6 imágenes representativas del estado del cultivo en la zona de mayor intensidad acústica para todos los casos, transcurridas 24 horas tras la insonificación.

Tabla 4.6: Muestra representativa del estado del cultivo para los grupos del *Protocolo A* 24 h tras el tratamiento, en la zona más afectada por los US según la distribución de la Fig.4.19.



Al no ser la insonificación del cultivo homogénea, los efectos que se observan tampoco. En un mismo pocillo de los tratados con US se distinguen zonas en las que hay una muy baja densidad poblacional y con fibroblastos dañados y zonas en las que aparenta no haber efecto. Observando en la Fig.4.19 la distribución de presión acústica en la base del pocillo para un pulso como el empleado en estos experimentos, cabe esperar que, en las imágenes tomadas en las zonas de máxima amplitud (en este caso el centro y el lado izquierdo), sea donde más efecto se tiene. Entre zonas próximas se encuentran caídas del 50 % en la amplitud de presión, lo que corresponde a intensidades de la cuarta parte, por lo que es justificable que el efecto en los fibroblastos sea diferente.

Comparando las imágenes de la Tabla 4.6 se observan restos celulares en los grupos insonificados, así como una morfología más irregular y fibroblastos más estrechos y con las prolongaciones más alargadas y finas que en el grupo control. La membrana de las células que aparecen en las imágenes está íntegra, pues son células viables. En las zonas de menor densidad de población puede verse que los fibroblastos están desorientados, si bien esto puede ser consecuencia de que no se ha alcanzado una confluencia poblacional tal que active en las células los mecanismos de reorganización de su citoesqueleto para adecuarse al de sus vecinas, propiedad que caracteriza a esta línea celular [Abercrombie M].

En algunos experimentos realizados se produce el efecto mostrado en la Fig.4.31. Para la intensidad alta (AP) ocurre que incluso transcurridos 8 días tras el tratamiento hay zonas en las que la monocapa no crece, correspondientes a las zonas de mayor amplitud de presión acústica. Estas zonas no tintadas están ocupadas por restos celulares y los fibroblastos no generan monocapa en las mismas.

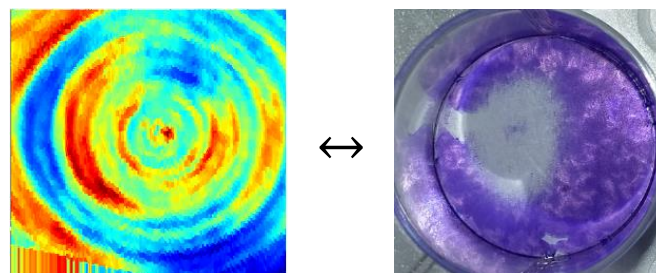
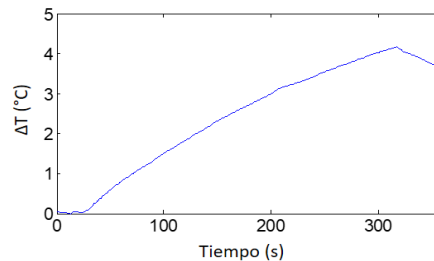


Fig. 4.31: Comparación entre la distribución relativa del valor  $P_{rms}$  para una señal de 200 ciclos y el resultado de la tinción a los 8 d tras la insonificación. El barrido corresponde a un área de 14 x 14 mm y el diámetro del pocillo es de 22.2 mm.

#### 4.1.1 Discusión e interpretación de los resultados

Los resultados obtenidos para este tipo de tratamiento (pulsos de 200 ciclos de 1.9 MHz, PRF de 1 kHz y DC del 10 %) sugieren que hay un efecto dañino que aumenta conforme se aumenta la intensidad de los US.

Para descartar que se esté produciendo el daño celular por un incremento de temperatura en el medio debido a la absorción de los US, se realizan medidas del calentamiento que se produce en el líquido del pocillo en las mismas condiciones del tratamiento para el que la intensidad es mayor (MAP). Puede afirmarse que, si para éste se desprecian los efectos térmicos como agentes líticos, en los demás, de menor intensidad, también. El registro térmico de un termopar situado en la base del pocillo cuando se aplica el tratamiento de MAP se muestra en la Fig.4.32.



**Fig. 4.32: Registro del incremento de temperatura en la posición en la que se sitúa el cultivo celular (base del pocillo) durante la insonificación de mayor intensidad (MAP).**

En base a los datos obtenidos, se estima que el cultivo sufre un incremento de temperatura de cerca de 4 °C. Se conoce que la máxima temperatura que las células pueden soportar sin sufrir daños es de 45 °C, que supone el umbral a partir del cual el calentamiento es nocivo [O'Brien WD]. Si la temperatura inicial del cultivo es de 37 °C, esto implica que debe alcanzarse un incremento térmico de, al menos, 8 °C. Al extraer las placas del incubador y exponerlas a temperatura ambiente durante las insonificaciones (no se emplea baño térmico), la temperatura del cultivo desciende de los 37 °C durante unos minutos. Teniendo esto en cuenta y considerando que el máximo incremento de temperatura que se va a alcanzar es de 4 °C y éste dura sólo unos segundos (en el instante en el que se apaga el transductor la temperatura comienza volver a descender como puede observarse en la Fig.4.32) puede descartarse el efecto térmico como el responsable del daño celular para nuestros experimentos.

Entre los efectos dañinos para las células que se reportan en la bibliografía *De Deyne PG et al* observan un efecto lítico en fibroblastos debido a la rotura de la membrana plasmática con  $I_{SATP} = 1 \text{ W/cm}^2$  y DC del 20 %, junto con aberraciones cromosómicas en los grupos insonificados [De Deyne PG]. En otro trabajo del mismo área, *Udroiu I et al* reportan un efecto genotóxico y un aumento en la permeabilidad de la membrana plasmática en fibroblastos con intensidades de  $I_{SPTA} < 0.1 \text{ W/cm}^2$ , del orden de las aquí empleadas ( $I_{SPTA} = I_{SPTP} \cdot DC$ ) [Udroiu I 2014]. En un estudio posterior, este mismo autor hace referencia también a daño genómico y fallos en la síntesis de ADN en fibroblastos con intensidades  $I_{SPTA} = 0.3 \text{ W/cm}^2$  [Udroiu I 2018]. *Kondo T et al* atribuyen al fenómeno de cavitación la degradación y menor síntesis de ADN observada para  $I_{SPTA} = 0.8 \text{ W/cm}^2$  [Kondo T]. *Jia Y et al* obtienen una disminución de la viabilidad, daño en las membranas y la peroxidación de lípidos de la misma con intensidades de hasta  $I_{SATA} = 0.75 \text{ W/cm}^2$  [Jia Y]. *Hu Y et al* observan perforaciones en la membrana plasmática con tan sólo un pulso de 10 ciclos con picos de presión de 0.85 MPa debido al colapso de micronúcleos cavitantes artificialmente introducidos [Hu Y]. *Feng Y et al* sugieren en su estudio que para intensidades muy altas ( $I_{SATA} = 10 \text{ W/cm}^2$ ) se produce la lisis las células en tiempos del orden del minuto, mientras

que para intensidades más bajas ( $I_{SATA} = 3 \text{ W/cm}^2$ ) se están desencadenando mecanismos de apoptosis, es decir, se producen en las células cascadas de señalización que las llevan a una muerte posterior programada [Feng Y].

En nuestros experimentos se obtiene una disminución en la viabilidad y en el número de individuos asociados a un daño físico en la célula, observable con el microscopio, compatible con que también se hayan originado aberraciones en el ADN que deriven en apoptosis. Puesto que se emplean intensidades de hasta  $I_{SPTA} = 1.9 \text{ W/cm}^2$ , nos encontramos con valores que en la bibliografía ya han reportado tanto daño en la membrana como una síntesis errónea de ADN, lo cual lleva a los fibroblastos a la muerte. Este hecho justifica los resultados.

Sin embargo, no todas las consecuencias que se han observado en estudios in vitro de fibroblastos insonificados son dañinas. *Oliveira PD et al* obtienen una mayor proliferación en fibroblastos tratados con  $I_{SPTP} = 0.5 \text{ W/cm}^2$  y DC de entre el 10 % y el 20 %, parámetros del orden de los usados este estudio para AP y BP [Oliveira PD]. Atribuyen este hecho a efectos no térmicos, responsables de la estimulación del transporte de sustancias y aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática, descartando que se esté produciendo su rotura. *Cárdenas Sandoval RP et al* también detectan una mejora en la curva de crecimiento cuando insonifican con  $I_{SPTP} = 1 \text{ W/cm}^2$  y DC del 50 %, atribuyéndolo al efecto de la señal mecánica de compresión transmitida a las células, que conlleva una señal química y desencadena la transmisión al medio de sustancias que aumentan la proliferación [Cárdenas Sandoval RP]. Este resultado concuerda con el estudio llevado a cabo por *Mortimer AJ et al* en el que demuestran que una  $I_{SPTP} = 0.5$  y hasta  $1 \text{ W/cm}^2$  con un DC del 20 % aumenta la permeabilidad y el consumo de calcio (Ca) en los fibroblastos [Mortimer AJ]. *Webster DF et al* afirman que los US con intensidades de  $I_{SPTP} = 0.5 \text{ W/cm}^2$  y DC del 20 % aumentan en los fibroblastos la síntesis de proteínas [Webster DF 1978] y de colágeno [Webster DF 1980], observando cambios morfológicos en la membrana y en el retículo endoplasmático, que no suponen la muerte celular ya que no detecta variación en el número de células. Atribuyen sus resultados al fenómeno de cavitación y lo demuestran disminuyendo el efecto observado al aumentar la presión hidrostática externa.

Una de las posibles causas de las diferencias entre los trabajos publicados es que las condiciones de insonificación (configuración experimental y parámetros acústicos) no son las mismas. Se encuentra que hay autores que enriquecen el medio con burbujas de tamaño óptimo (agentes de contraste para ecografía), que se ha demostrado que potencian la cavitación y aumentan, p.e. la transfección [Chen Y] o el daño en la membrana celular [Miller DL 1998]. Por otro lado, la sensibilidad de los cultivos a este tipo de insonificación depende del tipo de células que se tienen e incluso del momento del ciclo celular en el que éstas se encuentran. Incluso emplear un cultivo en suspensión o una monocapa adherida al pocillo puede alterar el resultado. La probabilidad de interacción con las burbujas presentes en el medio es diferente, o el hecho de que haya una superficie rígida en contacto con las células modifica las consecuencias, como hipotetiza *Zhang Y et al* en su estudio tras demostrar que en suspensión hay mejor tasa de transfección y mayor viabilidad que para el caso de células adheridas [Zhang Y (1) 2012].

El mecanismo no térmico concreto por el cual se desencadena la acción terapéutica de los ultrasonidos todavía no está claro. Entre los efectos no térmicos asociados a la acción de la presión acústica sobre un cultivo celular, pueden distinguirse [Dyson M]:

- (i) La acción de la fuerza de radiación.
- (ii) La interacción de la onda con la célula, más concretamente con su membrana plasmática y con los receptores de presión que en ella se encuentran (mecanorreceptores).
- (iii) La interacción de la onda con los micronúcleos de gas (burbujas) naturalmente disueltos en el medio y que daría lugar a los fenómenos de cavitación.

En cuanto a la fuerza de radiación (i), la magnitud de ésta puede aproximarse como [Beissner K]:

$$F_{rad} = \frac{2 \cdot W}{1480 \text{ m/s}} \quad (4.13)$$

En nuestros experimentos se obtiene que la máxima potencia empleada en los experimentos corresponde a:

$$W_{max} = I_{SATA\ max} \cdot ERA = I_{SATP\ max} \cdot DC \cdot ERA \approx 0.88 \text{ W/cm}^2 \cdot 0.1 \cdot 3.5 \text{ cm}^2 \approx 0.31 \text{ W} \quad (4.14)$$

En base a esto, para las potencias con las que se han trabajado ( $W < 1 \text{ W}$ ), según la eq.(4.13), la  $F_{rad}$  es del orden del  $mN$ , que corresponde, en áreas de  $cm^2$  como las que se tienen, a presiones del orden de 10 Pa. Éstas no son mucho mayores que las que se asocian a procesos biológicos como p.e. el flujo sanguíneo (0.1-4 Pa) [Davies PF].

Según el modelo para una bicapa lipídica de *Leontiadou H et al*, la tensión requerida para generar un poro en una membrana es de  $\approx 38 \text{ mN/m}$  [Leontiadou H]. Esta estimación es del orden de los 12 mN/m propuestos como tensión crítica para producir lisis en la membrana de las células del músculo esquelético según *Morris CE et al* [Morris CE]. Esto implica que las tensiones que provocan la lisis celular son del orden de varios mN/m al producir la separación de los componentes de la bicapa, cuya distancia máxima antes de separarse y crear el poro del orden de los nm. La presión a la que corresponde esta tensión puede calcularse como:

$$P = \frac{\text{Fuerza}}{\text{Sup}} = \frac{\text{Tensión}}{\text{longitud}} \approx \frac{N/m}{m} = \frac{38 \cdot 10^{-3} \text{ N}}{10^{-9} \text{ m}^2} = 38 \cdot 10^6 \text{ Pa} \quad (4.15)$$

El resultado implica que son necesarias fuerzas del orden de decenas de MPa para dar lugar a la rotura de la membrana plasmática. Esto descarta que la fuerza de radiación sea responsable de posibles daños en la membrana.

Sin embargo, el fenómeno que sí que es atribuible a la fuerza de radiación es el desplazamiento observado durante el tratamiento de mayor intensidad (MAP) de la superficie de la interfaz líquido-aire y que provoca una vibración visible de la misma [Cinbis C]. El valor de la tensión superficial del agua es de 0.073 N/m, por lo que para romper el estado de equilibrio de una superficie como la del pocillo, del orden del cm, se precisa una fuerza de:

$$P \approx \frac{73 \cdot 10^{-3} \text{ N}}{10^{-2} \text{ m}^2} = 7.3 \text{ Pa} \quad (4.16)$$

Es decir, del orden de las decenas de Pa, que son las que se tienen.

En cuanto al punto (ii), relacionado con la interacción de la propia onda de US con la célula, pueden distinguirse los siguientes mecanismos:

- Generación de una estimulación mecánica de la membrana plasmática de la célula como consecuencia de los cambios de presión que sufre al interactuar con la onda de US (y que provocan su compresión y elongación).
- Recepción del estímulo de presión por parte de los mecanorreceptores (integrinas o canales mecanosensibles) situados en la membrana y que desencadenan una reacción en la célula de tipo mecanoquímica (p.e apertura de canales iónicos de cierto tipo o ajustes y reorganizaciones en el citoesqueleto [Wang JHC, Hamill OP, Bao G, Diaz Chiguer D]). Este proceso es conocido como mecanotransducción.

Según el modelo de “bilayer sonophore” de *Krasovitski B et al*, la respuesta dinámica de la membrana ante una onda de US es inmediata y conlleva la oscilación sinusoidal de la bicapa, de manera que ambos extremos se separan y aproximan sucesivamente una distancia proporcional a la amplitud de la onda de presión [Krasovitski B]. Esto puede llevar a la fragmentación de la membrana o bien a la aparición de poros. En este sentido es importante tener en cuenta que, para la misma amplitud de presión, el desplazamiento producido será inversamente proporcional a la frecuencia de la onda, por lo que cabe esperar que frecuencias menores sean más efectivas en lo que respecta a esta interacción.

Dadas las dimensiones de la longitud de onda de los US ( $\approx 0.77 \text{ mm}$ ) y el tamaño de las células ( $\approx \mu\text{m}$ ), éstas reciben el estímulo de presión como una variación de la presión hidrostática externa. Los estudios previos que hablan del efecto de la aplicación de una presión hidrostática mantenida en el tiempo sobre cultivos celulares reportan retraso en el crecimiento [Healey C], cambios en la tasa de síntesis de sustancias [Smith RL], aumento en los niveles de *Ca* intracelular [Matsuo T], despolarización de la membrana [Wright MO] o alteraciones en el citoesqueleto [Wu MJ]. Las presiones que se emplean en estos estudios son como máximo del orden de la decena del MPa [Tworkoski E]. Aunque coinciden con las presiones registradas con el hidrófono en nuestro experimento, estos trabajos suponen una aplicación de presión constante y mantenida que nada tiene que ver con lo que provocaría una onda de US oscilante y pulsada. Aun así, el hecho de que las células alteren su crecimiento cuando son sometidas a presión hidrostática con esos órdenes de magnitud lleva a pensar que los mecanorreceptores de su membrana son sensibles a las mismas, lo cual sí es interesante para nuestro estudio.

Es conocido que el citoplasma celular se comporta con material poroso viscoelástico e incompresible, y los tiempos que tarda en readaptarse morfológicamente a un cambio de presión

son del orden de varios segundos [Thoumine O]. Dado que en nuestro caso se trabajan con ondas de frecuencia propia del orden de  $\mu\text{s}$  y PRF de ms, si se produce un cambio morfológico con el pulso de presión no da tiempo a que la célula se adapte (p.e. mediante flujos de líquido a través de la membrana).

La mecanotransducción ocurre de manera jerárquica en todos los niveles (membrana-citoesqueleto-núcleo), de manera que la aplicación de una fuerza externa local puede llegar a afectar a la funcionalidad de la célula en tiempos del orden de milisegundos, que es lo que tardan en desencadenarse las mecanorrespuestas [Diaz Chiguer D]. En los trabajos de investigación acerca del mecanismo de mecanotransducción que se genera con la aplicación de señales ultrasónicas en fibroblastos, se han realizado estudios con técnicas de baja intensidad (LIPUS), por debajo de los umbrales de cavitación. En su trabajo, *Atherton P et al* trata de identificar los efectos tempranos en fibroblastos, tras aplicarles un tratamiento con US de 1.5 MHz de LIPUS con  $I_{SATA} = 30 \text{ mW/cm}^2$ , un DC del 20 % y una PRF de 1 kHz [Atherton P]. Concluye que el estímulo mecánico producido por el LIPUS es detectado por las proteínas de vinculina, que actúan como mecanorreceptoras y desencadenan procesos que conllevan un incremento en la endocitosis y el aumento de movilidad celular, resultado fundamental para el proceso de recuperación tisular, ya que las células han de migrar a la zona afectada. Otros autores encuentran que con tratamientos similares se activan los receptores de integrina (mecanorreceptores que transmiten el impulso mecánico entre la matriz extracelular y los fibroblastos) [Zhou S], se aumenta la síntesis de HGF [Mostafa NZ], un factor de crecimiento que promueve la activación y diferenciación de células satélite [Miller KJ], se activan proteínas Rac1, involucradas en la regeneración tisular [Roper J], o que aumenta el consumo de Ca y la permeabilidad de la membrana [Domenici F], en este último caso con  $I_{SATA}$  de tan solo  $19.3 \text{ mW/cm}^2$  pero DC del 75 %.

En nuestros tratamientos se ha trabajado con  $I_{SATA}$  de entre  $88 \text{ mW/cm}^2$  y  $0.7 \text{ mW/cm}^2$ , en el orden de los valores promedio empleados en los estudios de LIPUS que han evidenciado la activación de receptores involucrados en la mecanotransducción, pero teniendo valores instantáneos de intensidad más altos en nuestro caso, por lo que se espera que también se den este tipo de mecanismos. Por lo tanto, en nuestras insonificaciones se activan las proteínas mecanorreceptoras de la membrana y en consecuencia aumenta la permeabilidad y la actividad sintética de sustancias favorables para la migración y la proliferación de nuevas células. Esto se ve reflejado en la recuperación de la tasa metabólica promedio a las 48 h y en que se tienen valores más altos respecto del control a los 7 d (Fig.4.27)

En lo que respecta al tercer efecto no térmico, la cavitación (iii), éste implica la interacción de la célula con los micronúcleos de gas disueltos en el medio que oscilan en consecuencia a las variaciones de presión. Estas oscilaciones periódicas provocan un microstreaming local sobre la membrana mucho más intenso que en el caso de la interacción con la onda (p.e. una burbuja de  $3 \mu\text{m}$  resonando a 1 MHz amplificaría un factor 6 la presión sobre la membrana y un factor 50 si se trabaja con 2.79 MHz, próxima a su frecuencia de resonancia [Krasovitski B]). Este microstreaming

da lugar a un fenómeno conocido como sonoporación, que consiste en la apertura de poros en la membrana [Lentacker I, Prentice P].

La cavitación estable crea un movimiento de fluido alrededor de la burbuja que se traduce en un microstreaming sobre la membrana celular, pudiendo ser suficiente para provocar poros en las membranas como consecuencia del estrés mecánico. Estos poros pueden repararse en el orden de decenas de segundos si no son demasiado grandes [Hu Y].

El fenómeno de cavitación inestable da lugar a presiones y temperaturas locales muy altas, que conllevan la liberación de sustancias químicas al medio como son radicales libres o ROS (*Reactive Oxygen Species*) o la aparición de sonoluminiscencia [Miller MW 1996, Suslick KS]. Estas sustancias provocan la modulación de canales iónicos de la membrana o su rotura por peroxidación de los lípidos de la misma [Stark G], pudiendo llevar a la célula a la muerte.

Una técnica para confirmar y cuantificar la actividad de burbujas cavitantes en el laboratorio es el método de sonoespectroscopía o espectroscopía acústica. Este método consiste en detectar modificaciones en el espectro de la señal que se producen debidas a la oscilación e implosión de las burbujas en el medio [Brennen CE, Neppiras EA, Tzanakis I, Hussein GA, Frohly J]. Cuando un líquido con contenido gaseoso se insonifica es conocido que aparecen componentes ultra y sub armónicos, como consecuencia de la oscilación estable de las burbujas. Por otro lado, para detectar la cavitación inestable se mide el aumento de nivel de ruido blanco atribuido a la emisión de banda ancha producida por las ondas de choque resultantes de las implosiones. En su trabajo, Neppiras EA, muestra la dependencia de la amplitud del primer subarmónico ( $f_0/2$ ) y la presencia de ruido blanco en la señal espectral en función de la amplitud de la excitación del transductor y, en definitiva, de la presión transmitida al medio [Neppiras EA]. Puede concluirse que la aparición de  $f_0/2$  es abrupta y coincide con el umbral para que lo haga también el ruido blanco (véase Fig.4.33). Esto indica que, para su caso, los umbrales de la cavitación estable e inestable coinciden.

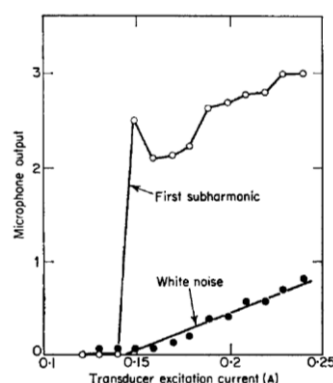


Fig. 4.33: Amplitud de  $f_0/2$  y del ruido blanco con la corriente de excitación del transductor [Neppiras EA].

Para la aparición del componente de  $f_0/2$ , es necesario que burbujas con tamaño óptimo para que su resonancia sea  $f_0/2$ , al excitarse con una frecuencia diferente pero cercana a un múltiplo de ésta, oscilen a su frecuencia y contribuyan así a ese componente espectral. Si estas burbujas están ya presentes en el medio, el componente de  $f_0/2$  aparecerá antes que el de ruido blanco, pero si



no lo están, la causa de que el umbral de  $f_0/2$  y el del ruido coincidan es que es la cavitación inestable la responsable de fomentar la aparición de las mismas (mediante la aglomeración de núcleos pequeños, la implosión de otros más grandes,...). En estos últimos casos, como es también el de nuestro experimento, se necesitan intensidades muy altas para poder detectar el componente  $f_0/2$  ya que la presión acústica del transductor debe aumentar hasta el límite para la cavitación inercial, para que el subarmónico aparezca. Esto hace que algunos autores sugieran también la aparición del componente  $f_0/2$  como evidencia de cavitación inestable [Husseini GA]. Hay trabajos que correlacionan los bioefectos dañinos observados en cultivos celulares con la detección de este subarmónico, como son, daños en la membrana [Miller DL 1998] o muerte celular [Morton KI]. Para nuestro experimento, la cavitación ha de surgir a partir de los micronúcleos naturales, al no introducirse agentes de contraste ni otro tipo de burbujas artificiales. Estos micronúcleos han de aumentar de tamaño hasta comenzar a oscilar, por lo que es esperable que, si no se llega a los umbrales de cavitación inercial no aparezca la componente  $f_0/2$ .

En relación al motivo por el que aparecen los armónicos superiores ( $2f_0, 3f_0, \dots$ ) se conoce que, cuando se analiza la vibración de una burbuja bajo la acción de una onda sinusoidal de presión basándose en la ecuación de Navier Stokes, los resultados son lineales hasta superarse cierto umbral de intensidad. A partir de ahí, aparecen no linealidades como consecuencia de la asimetría entre las fases de contracción y dilatación de la burbuja y la subsecuente emisión de ultra armónicos en el espectro. *Miller DL et al* afirma que la emisión del segundo armónico es la más evidente a intensidades por debajo de la cavitación inestable [Miller DL 1998]. Por otro lado, *Gudra T et al* observan cambios en el espectro especialmente en el primer subarmónico y el tercer armónico [Gudra T]. En nuestro experimento son los micronúcleos presentes naturalmente en el medio los que darían lugar a la cavitación. Éstos deben alcanzar, por difusión rectificadora, un tamaño mínimo para oscilar y dar lugar a los componentes espectrales correspondientes. Puesto que la frecuencia de resonancia de una burbuja es inversamente proporcional al radio de la misma, burbujas más pequeñas dan lugar a componentes espectrales más altos [Leighton T, Brennen CE, Noltingk BE]. Dado que las burbujas van aumentando su tamaño, es esperable que, en primer lugar, aparezcan los armónicos más altos, p.e. segundo y tercero antes que, p.e. el subarmónico.

Teniendo esto en cuenta, se han realizado medidas de sonoespectroscopía en las mismas condiciones en las que se han llevado a cabo las insonificaciones de la monocapa de fibroblastos. Se ha adquirido la señal de la presión acústica en un punto dentro del pocillo cercano a la localización de la monocapa del cultivo celular y se han analizado los cambios en el espectro de esta señal al variar ciertos parámetros del tratamiento que se aplica. Para ello, se ha empleado el hidrófono de aguja (*DAPCO 54389*) calibrado utilizado previamente en otros apartados de esta tesis.

En la Fig.4.34 se muestra, para el caso de un pulso de 200 ciclos, el resultado obtenido para la amplitud relativa al armónico fundamental del segundo,  $2f_0$ , y tercer armónico,  $3f_0$ , en función del voltaje en bornes aplicado al transductor,  $V_{pp}$ . Cabe recordar que en los tratamientos del *Protocolo A*, para el caso de BP se aplican 3 Vpp, para el de AP, 6 Vpp y para el de MAP se llega 30 Vpp (véase Tabla 4.2). El análisis por lo tanto se realiza con 6 valores de V comprendidos entre los 3 Vpp y hasta

los 20 Vpp. Se han llevado a cabo ciclos de aumento y disminución de voltaje de excitación para estudiar el fenómeno de histéresis.

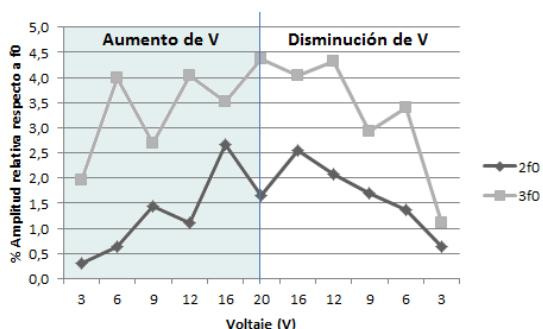


Fig. 4.34: Variación de la amplitud relativa de los ultra armónicos  $2f_0$  y  $3f_0$  respecto del armónico fundamental  $f_0$  para un pulso de 200 ciclos según varía el voltaje aplicado al transductor.

El hecho de que en la Fig.4.34 el tercer armónico en todos los casos sea mayor que el segundo es signo de que estas emisiones no son debidas únicamente a la distorsión no lineal [Duck FA]. En la Fig.4.35 se realiza el ajuste de los datos del comportamiento de  $f_0$  y  $2f_0$  según varía la amplitud de la onda a una función potencial de la forma  $y = ax^n$ . Los parámetros del ajuste se recogen en la Tabla 4.7.

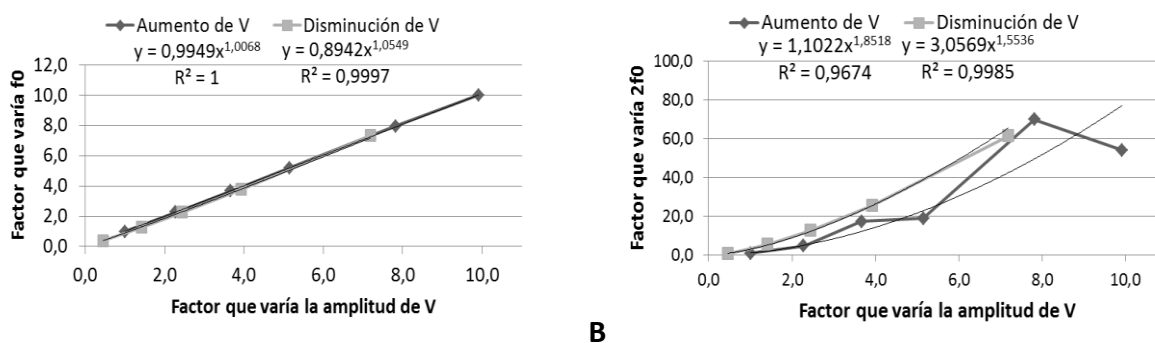


Fig. 4.35: Factor de aumento de la componente espectral (A)  $f_0$  y (B)  $2f_0$  respecto del factor que se ha aumentado el voltaje aplicado al transductor y ajuste lineal a una función polinómica de los datos.

Tabla 4.7: Parámetros obtenidos para el ajuste de los datos de la Fig.4.35 a una función de la forma  $y = ax^n$ .

Armónico	n cuando se incrementa el V	n cuando se disminuye el V
$f_0$	1.0068	1.0549
$2f_0$	1.8518	1.5536

Si se observa en la Fig.4.35B la evolución de  $2f_0$  en el proceso de histéresis, puede notarse el efecto que Frohly et al obtienen en su trabajo: la presencia de  $2f_0$  es mayor en la curva donde se ha ido decreciendo el voltaje que cuando éste se va aumentando. Esto es debido a que una vez generado en un líquido un estado de cavitación, se necesita menor potencia para mantenerlo [Frohly J]. Ésta es otra prueba de que se ha generado cavitación estable.

Se ha estudiado también la evolución de los dos armónicos superiores a lo largo de la duración de la onda tomando ventanas temporales de diferentes de la misma con una excitación de 15 Vpp.

La secuencia puede observarse en la Tabla 4.8. En azul se representa el tramo completo y en rojo el empleado para el cálculo de la FFT.

Tabla 4.8: Espectro de la señal de presión acústica adquirida para un pulso de excitación de 15 Vpp y 200 ciclos según varía el tramo de la señal que se analiza, centrado en  $t_{centro}$ .

$t_{centro}$	Señal	FFT
25 $\mu$ s		
50 $\mu$ s		
75 $\mu$ s		
100 $\mu$ s		

La amplitud relativa del segundo armónico respecto la del fundamental ( $2f_0/f_0$ ) y la del tercer armónico respecto del segundo ( $3f_0/2f_0$ ) en función del instante en el que está centrada la señal ( $t_{centro}$ ) se muestra en la Fig. 4.36.

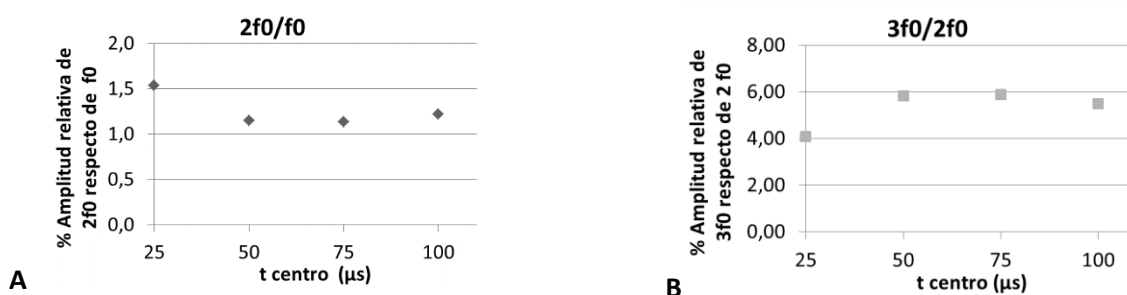


Fig. 4.36: Variación de la amplitud relativa de los ultra armónicos (A)  $2f_0/f_0$  y (B)  $3f_0/2f_0$  para un pulso de 200 ciclos y 15 Vpp aplicados al transductor según varía el instante en el que está centrada la adquisición (Tabla 4.8).

Se comprueba en la Fig.4.36A que, desde el comienzo la importancia del componente  $2f_0$  no aumenta a medida que se avanza en la señal. Si se debiera al fenómeno de propagación no lineal, esta relación debiera cambiar con la distancia de propagación de la onda. Para el caso ideal de una onda plana con frecuencia  $f_0$  y de amplitud  $P_0$  que ha viajado una distancia  $z$  en un medio con velocidad de propagación  $c$ , densidad  $\rho$  y coeficiente de no linealidad  $\beta$ , se tendrá una evolución de la importancia relativa del segundo armónico con amplitud  $P_2$  que viene dada por [Wallace KD]:

$$\frac{P_2}{P_0} = \frac{\pi \beta f_0 P_0}{\rho c^3} z \quad (4.17)$$

Se tiene por tanto que la importancia relativa de  $2f_0$  con respecto de  $f_0$  aumenta de forma lineal con la distancia y con la amplitud de presión inicial de la onda cuando se trata de no linealidades asociadas a la propagación de la onda en el medio. Esto no ocurre en nuestro caso, por lo que, de nuevo, se reafirma la implicación de la cavitación estable.

Al representar el cociente entre  $3f_0$  y  $2f_0$  en la Fig.4.36B se observa que la importancia relativa de éste es mayor transcurridos 50  $\mu$ s. Esto es atribuible a que en ese intervalo temporal la cavitación se ha hecho efectiva y estable (superada ya la fase de nucleación).

Manteniendo el mismo voltaje de 15 Vpp, se han realizado medidas variando el número de ciclos desde 20 hasta 400. En la Fig.4.37 se tiene la variación de la amplitud relativa de los armónicos  $2f_0$  y  $3f_0$  obtenida.

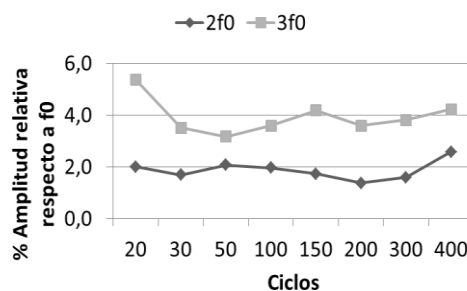


Fig. 4.37: Variación de la amplitud relativa de los ultra armónicos  $2f_0$  y  $3f_0$  respecto del armónico fundamental  $f_0$  para un pulso de 15 Vpp aplicados al transductor según varía el número de ciclos.

La amplitud relativa se mantiene aproximadamente constante. Esto indica que, como sugiere *Atchley AA et al*, a partir de un número umbral de ciclos los micronúcleos alcanzan un tamaño óptimo y comienzan a oscilar de manera asimétrica, emitiendo estos componentes espectrales. Aumentar el tiempo de insonificación (o como en este caso el número de ciclos) supone un aumento del tiempo de oscilación, pero no de su intensidad, ya que la amplitud se mantiene constante, por lo que la importancia relativa de los ultra armónicos es la misma, como ocurre.

Cuando el pulso tiene un número muy pequeño de ciclos ( $< 10$ ) no se ha detectado cavitación en el laboratorio a pesar de incrementar el voltaje hasta los 120 Vpp. Sin embargo, el tercer armónico aparece con un pulso de 10 ciclos con tan solo un voltaje de 15 Vpp. El segundo armónico emerge para este mismo voltaje al aumentar el número de ciclos hasta 20, consecuencia de que se precisa de más tiempo al ser las burbujas que oscilan más grandes. Por ello puede afirmarse que, es necesario un número umbral de ciclos, cercano a 10, para que aparezcan los armónicos superiores en nuestro experimento. Esto se debe a que para un medio sin microburbujas artificiales, como el que se tiene, éstas deben surgir a partir de los micronúcleos disueltos naturalmente. Para ello, debe darse primeramente la fase de nucleación. A partir de ahí la burbuja comienza a oscilar y crecer debido a la difusión rectificada. Entonces, estas burbujas se convierten en unos potenciales agentes para producir cavitación e introducir modificaciones en el espectro del campo acústico. *Atchley AA*

*et al* encuentran también que es necesario un número de ciclos umbral para que puedan darse todas las fases de la cavitación y la burbuja pueda implosionar. Basan esta afirmación en que obtienen que, para una frecuencia cercana a la nuestra, de 2.3 MHz, a partir de un cierto número de ciclos el umbral de presión que se necesita para que aparezca la cavitación inercial es independiente de la duración del pulso [Atchley AA]. Confirman la presencia de la cavitación inercial a partir de la formación de una nube de burbujas que puede ser detectada debido al scattering que provoca en la señal. Esto implica que con esos ciclos ya se ha completado la fase inicial de las burbujas para responder ante la onda de presión y colapsan a continuación. Este umbral está en el entorno de los 10 ciclos. Es por tanto concordante con el número mínimo de ciclos con el que se comienza a observar la componente  $3f_0$  en el laboratorio y que se ha establecido en nuestro caso como límite para el comienzo de la oscilación estable.

Según todo lo anterior, puede afirmarse que:

- No hay evidencias de cavitación inercial para ninguno de los tratamientos, pues el nivel de ruido de las señales no se ve alterado y tampoco se detecta la aparición del componente  $f_0/2$ .
- Con un pulso largo, de 200 ciclos, con tan solo un voltaje en el transductor de 3 Vpp ya se observa la presencia del componente  $3f_0$  y ésta es mayor que la del  $2f_0$ , lo cual sólo se justifica en este caso con la presencia de cavitación estable. La intensidad del fenómeno aumenta con la amplitud de presión del campo.
- Con un pulso corto, de 5 ciclos, no hay evidencias de cavitación pues se ha visto que se precisa de un número de ciclos umbral, en el entorno de 10, para que los micronúcleos naturalmente disueltos en el medio den lugar a la misma.

La segunda afirmación implica que el umbral para el efecto de cavitación estable está incluso por debajo de las amplitudes del caso de BP ( $P_{max} = 77 \text{ kPa}$ ). Esto puede reafirmarse con los cálculos teóricos de *Lewin PA et al* para el umbral a partir del cual se provoca difusión rectificada, y por tanto crecimiento y oscilación de una burbuja, que, para micronúcleos de frecuencia de resonancia mayor que la de la onda aplicada, da resultados en el orden de 100 kPa [Lewin PA]. Esta afirmación también se fundamenta en estudios como el de *Hauser J et al* que obtienen mayor actividad endocitótica en fibroblastos con presiones máximas de sólo 100 kPa [Hauser J], sin observar daño aparente ni cambios estructurales en la membrana salvo la aparición de vesículas. Los autores sugieren que la causa es la cavitación, pero no lo demuestran. En este trabajo se ha medido que con esos umbrales es posible que la cavitación sea la responsable del incremento de la endocitosis.

Según todo lo mencionado hasta ahora, además del efecto atribuible al fenómeno de cavitación, durante los 300 s que dura cada tratamiento, las células interaccionan con la propia onda de US. Si el streaming que se genera es lo suficientemente fuerte, esta interacción mecánica genera perforaciones o poros en la membrana. Adicionalmente, los mecanosensores dentro de la membrana y del citoesqueleto desencadenan mecanismos físico-químicos en consecuencia a este estímulo de presión recibido. La consecuencia final de la combinación de todos estos efectos sobre la célula (cavitación y streaming) es: un daño irreparable, físico o genómico, que le lleva a la

apoptosis, o, si sobrevive, un aumento de su metabolismo como consecuencia de una mayor permeabilidad, el flujo de iones, ... Esto concuerda con los estudios revisados en los que en los grupos celulares insonificados se secretan al medio más sustancias (proteínas, colágeno, ...) o que tienen un consumo de  $Ca$  mayor, como le ocurre a *Webster DF et al* o *Tsukamoto A et al*, en cuyos trabajos sí se demuestra que la consecuencia de los resultados es la cavitación (en el primer caso por la supresión del efecto cuando se aumenta la presión hidrostática externa [Webster DF 1978, Webster DF 1980] y en el segundo con medidas de sonoespectroscopía que detectan la aparición del componente  $f_0/2$  [Tsukamoto A]).

En los experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio se ha obtenido para todos los casos (MAP, AP y BP) una disminución del número de individuos y de la viabilidad del cultivo en las primeras 24 h (véase Fig.4.27 y Fig.4.29). La densidad de fibroblastos en el caso de MAP es incluso menor que aquella con la que se inicia el experimento, por lo que es evidente que se produce lisis debido a los altos niveles de presión transmitidos en las zonas de máxima amplitud ( $P_{max} = 770 \text{ kPa}$ ) y que dan lugar a fenómenos lo suficientemente intensos de cavitación para provocar daño irreparable en los fibroblastos. Cabe mencionar que, para un cultivo de estas características, el hecho de que la caída en viabilidad no sea tan significativa como la caída en número de células es esperable, pues es conocido que cuando la monocapa se va completando, se reduce la capacidad de proliferación y el metabolismo por el mecanismo de inhibición de crecimiento por contacto [Abercrombie M].

Por otro lado, para los casos de AP y BP la disminución de viabilidad e individuos en las primeras 24 h se ve prácticamente recuperada a las 48 h. Se conoce que el tiempo de duplicación de este tipo de línea celular está en el entorno de las 48 h [Angello JC]. Se tiene por tanto que el efecto que se produce para estos casos es reparable ya que estos fibroblastos ralentizan su crecimiento en las primeras 24 h debido a daño producido por los US, pero los remanentes son capaces de proliferar, incluso a tasas mayores que el control, al tener valores similares a éste a las 48 h. Incluso, los datos de viabilidad a los 7 d sugieren que hay más actividad metabólica (103 % respecto del control para ambos casos). Esto no les ocurre a los fibroblastos del grupo de MAP, que siguen muriendo transcurridas 24 h. Las imágenes de microscopía reafirman estas hipótesis teniendo en cuenta que en el grupo de MAP se observan claramente zonas con fibroblastos muy dañados y que no van a ser capaces de proliferar (véase Tabla 4.5). En los grupos de AP y BP la aparición de individuos tan dañados es menos frecuente y se concentra en las zonas en las que la amplitud del transductor era mayor (véase Tabla 4.6).

#### 4.2 Protocolo B: Variación de la PRF de un pulso corto

En este segundo grupo de tratamientos a pesar de que lo que se transmite inicialmente al medio es un solo pulso de US, los fibroblastos situados en la base reciben un estímulo con varios paquetes adicionales, de amplitud y forma diferente, debidos a las reflexiones en las interfaces (véase Fig.4.25). En base a las medidas realizadas para este caso, puede afirmarse que se insonifica el cultivo con pulsos de  $53 \mu\text{s}$  de duración, con amplitud máxima de  $1.01 \text{ MPa}$  y una densidad energía media de  $1.48 \cdot 10^{-3} \text{ mJ/mm}^2$  (Tabla 4.3 y 4.4).

En la Fig.4.38 se muestran los resultados para las medidas de la viabilidad respecto del control 24 h, 48 h y 7 d tras el tratamiento en los pocillos insonificados con *B1*. Los resultados corresponden a un promedio de datos de entre al menos 2 y 3 experimentos diferentes.

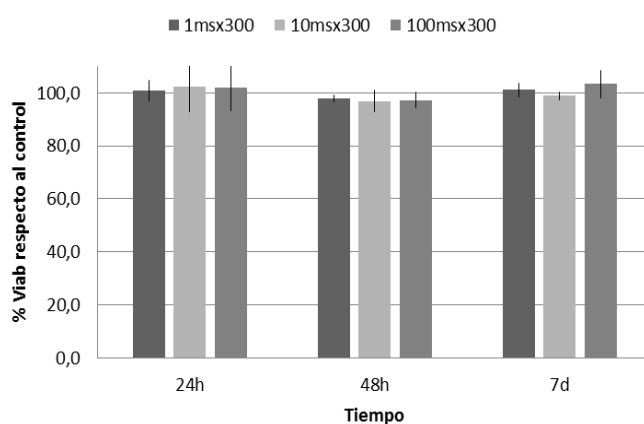


Fig. 4.38: % Viabilidad respecto del control en los grupos insonificados con el Protocolo B1, a las 24 h, 48 h y 7 d.

No se observa una disminución significativa de la viabilidad a las 24 h en ningún caso, por lo que puede concluirse que esta modalidad de tratamiento no causa lisis. A las 48 h los tres grupos tienen valores similares que se encuentran ligeramente por debajo del control (98 %, 97 % y 97 % para PRF de 1 ms, 10 ms y 100 ms, respectivamente). Aunque la disminución no es muy notable, estos datos sugieren que se ralentiza ligeramente el crecimiento en todos los casos al ser algo menores los valores que a las 24 h. A los 7 d todos los grupos tienen valores cercanos al control, siendo el de 100 ms el mayor (103 %). El resultado resulta interesante si se tiene en cuenta que, a pesar de darse un factor 100 más de pulsos entre los tratamientos extremos (PRF = 1 ms o 100 ms), el efecto logrado no es muy diferente (ralentización a las 48 h y posterior recuperación). Estos resultados sugieren que una PRF mayor logra mayor efecto.

Para investigar este hecho, se diseña otro protocolo (*B2*) en el que se emite el mismo número total de pulsos (60.000) y se varía la PRF. Para ello se aumenta el tiempo total de insonificación conforme se separan (pasando de 6 s a 60 s para PRF de 0.1 ms y 1 ms, respectivamente). En la Fig.4.39 se muestran los resultados para las medidas de la viabilidad respecto del control 24 h y 48 h tras los tratamientos de este protocolo. Los resultados corresponden a un promedio de datos de 2 experimentos.

Experimento in vitro: Insonificación de una monocapa de fibroblastos

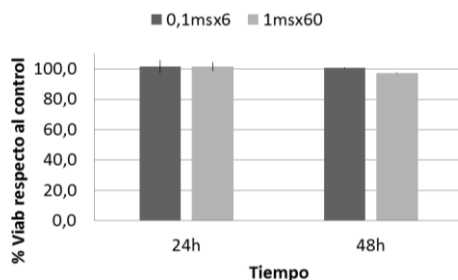


Fig. 4.39: % Viabilidad respecto del control en los grupos insonificados con el Protocolo B2, a las 24 h, 48 h y 7 d.

Como ocurre con B1, para estos casos tampoco hay una variación significativa de la viabilidad en las primeras 24 h y a las 48 h se puede ver que se ha ralentizado ligeramente el crecimiento, sobre todo en el tratamiento de mayor PRF (con una viabilidad del 97 %).

Siguiendo la misma metodología de trabajo que para los pocillos del Protocolo A, tras la medida de la viabilidad a las 24 h se realiza un tinte y posterior lavado de las placas de cultivo para visualizar y adquirir las imágenes de los fibroblastos con un microscopio óptico. Los resultados para el conteo celular de los pocillos insonificados con pulsos cortos se muestran en la Fig. 4.40. Los datos corresponden a un promedio de valores obtenidos de entre al menos 2 y 3 experimentos diferentes.

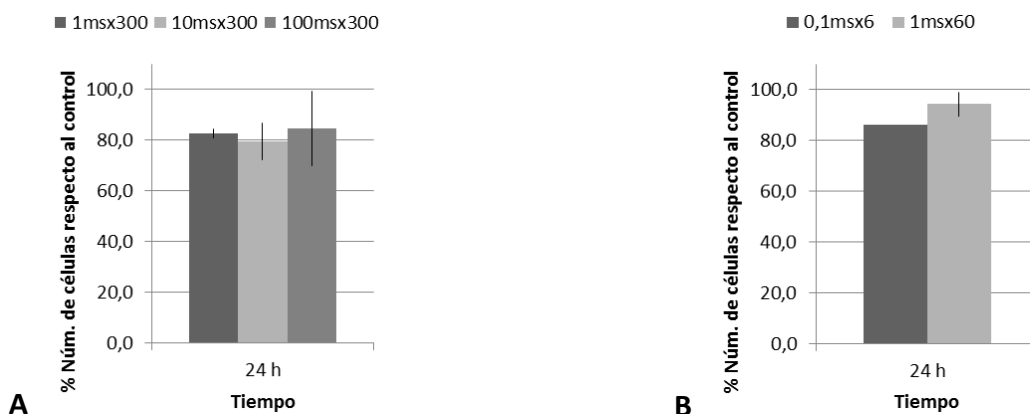
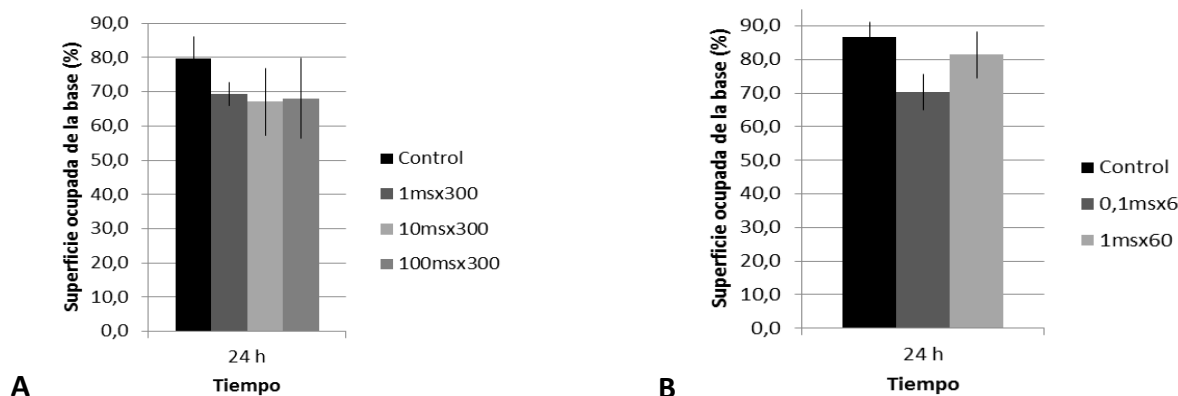


Fig. 4.40: % Número de células respecto del control, medidas a las 24 h, para los casos de: (A) B1, mismo tiempo total de insonificación (300 s) y (B) B2, misma energía total ( $\rho_{E\ total} = 88.8\ \text{mJ}/\text{mm}^2$ ).

El resultado del conteo de los fibroblastos presentes en las imágenes microscópicas lleva a afirmar que disminuye significativamente el número de células en todos los casos respecto del control. En los tratamientos del caso B1 (Fig.4.40A), la disminución ha sido parecida en todos los grupos (del 17 %, 20 % y 15 % para PRF de 1 ms, 10 ms y 100 ms, respectivamente) por lo que se puede afirmar que ésta no es proporcional al número de pulsos. Sin embargo, en los tratamientos del caso B2 (Fig.4.40B), se obtiene que el efecto es mayor para el caso en el que se han dado los pulsos más seguidos y la insonificación ha durado tan sólo 6 s (PRF 0.1 ms), para el cual la pérdida de individuos es del 14 %. Este resultado sugiere que el aumento de la periodicidad por encima del ms produce mayor efecto en cuanto a la pérdida de proliferación, para este tipo de insonificación y línea celular. Para el caso de PRF de 1 ms se obtiene una caída en el número de individuos del 4 % cuando la insonificación dura 60 s y del 17 % cuando dura 300 s, por lo que el efecto en la ralentización del crecimiento es proporcional al tiempo de insonificación.



El promedio de la superficie ocupada por los fibroblastos de los *Protocolos B1* y *B2* a las 24 h, calculado en las mismas imágenes, se muestra en la Fig.4.41.



**Fig. 4.41: % Superficie ocupada por los fibroblastos, medida a las 24 h, para los casos de: (A) B1, mismo tiempo total de insonificación (300 s) y (B) B2, misma energía total ( $\rho_{E\ total} = 88.8\ mJ/mm^2$ ).**

La tendencia de la superficie ocupada por el cultivo es la misma que en el caso del número de células. En todos los casos se obtiene una disminución significativa. Cuando el tiempo que dura el tratamiento es el mismo se tienen ocupaciones parecidas, del 69 %, 67 % y 68 % frente al 80 % del control, según se pasa de PRF de 1 ms, a 10 ms y 100 ms, respectivamente. Si lo que se mantiene es el mismo número total de pulsos, para la PRF menor, de 0.1 ms, se obtiene una ocupación del 70 % frente al 87 % del control. Para el otro tratamiento la disminución es menor, del 81 %.

Para facilitar la interpretación de los resultados se recogen en la Tabla 4.9 los valores medios de la viabilidad y el número de células para todos los casos mostrados.

**Tabla 4.9: Valores del % de la viabilidad y el número de células respecto del control para los casos del Protocolo B.**

Grupo	Núm. Cel. 24 h	Viab 24 h	Viab 48 h	Viab 7 d
0.1 ms x 6 s	86	102	100	-
1 ms x 60 s	94	102	97	-
1 ms x 300 s	83	101	98	101
10 ms x 300 s	80	103	97	99
100 ms x 300 s	85	102	97	103

Se puede afirmar que cuando la PRF es muy baja ( $< 1\ ms$ ), se produce la mayor disminución de la ocupación si se tiene en cuenta que tan sólo se mantienen los US durante 6 s. Para PRF más altas la comparación entre el caso de 1 ms y 60 s o 300 s muestra que el efecto sobre la proliferación es proporcional al tiempo de insonificación. Sin embargo, los datos de los grupos que duran el mismo tiempo sugieren que el hecho de usar una PRF en la que los pulsos estén más separados tiene más efecto, al lograrse una disminución parecida en el número de células a las 24 h y una viabilidad mayor a los 7 d. Que el resultado no sea proporcional al número de pulsos descarta que se esté produciendo daño físico. Por tanto, se puede afirmar que pulsos como los de este protocolo, cortos y de amplitud máxima del orden del MPa, dan lugar a una reacción en la célula desencadenada por el mecanismo de mecanotransducción, por lo que debe profundizarse en su funcionamiento en la posterior discusión de estos resultados.

Como se predice con los datos de viabilidad, el análisis de la morfología de las células en las imágenes adquiridas con el microscopio confirma que no hay daño físico en los fibroblastos tratados. Se recogen en la Tabla 4.10 y Tabla 4.11 imágenes representativas del estado de los grupos *B1* y *B2*, respectivamente, transcurridas 24 h tras el tratamiento.

Tabla 4.10: Muestra representativa del estado del cultivo para los grupos del *Protocolo B1* 24 h tras el tratamiento.

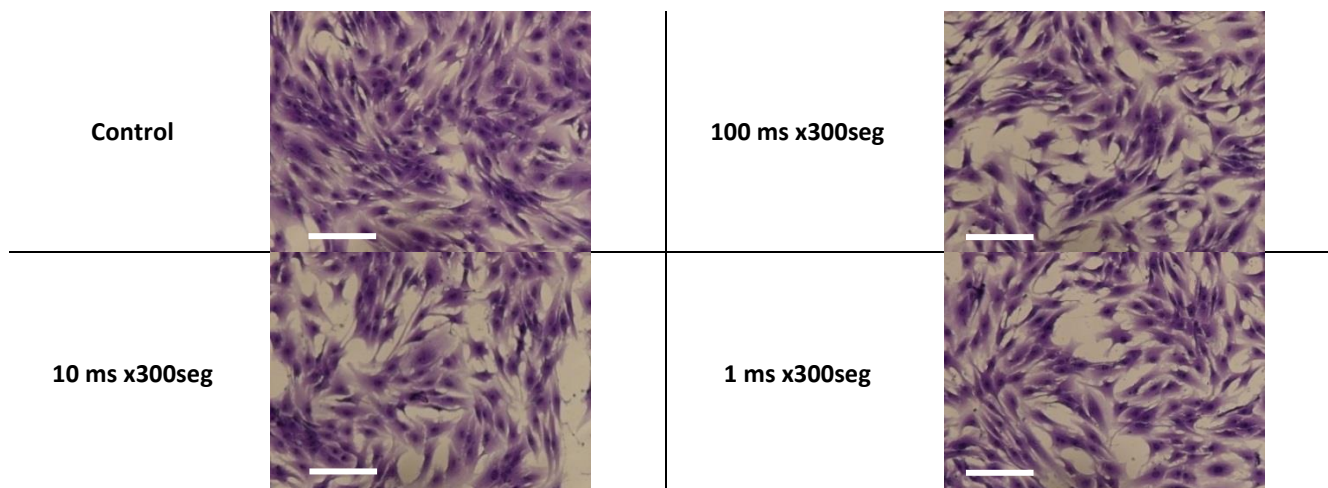
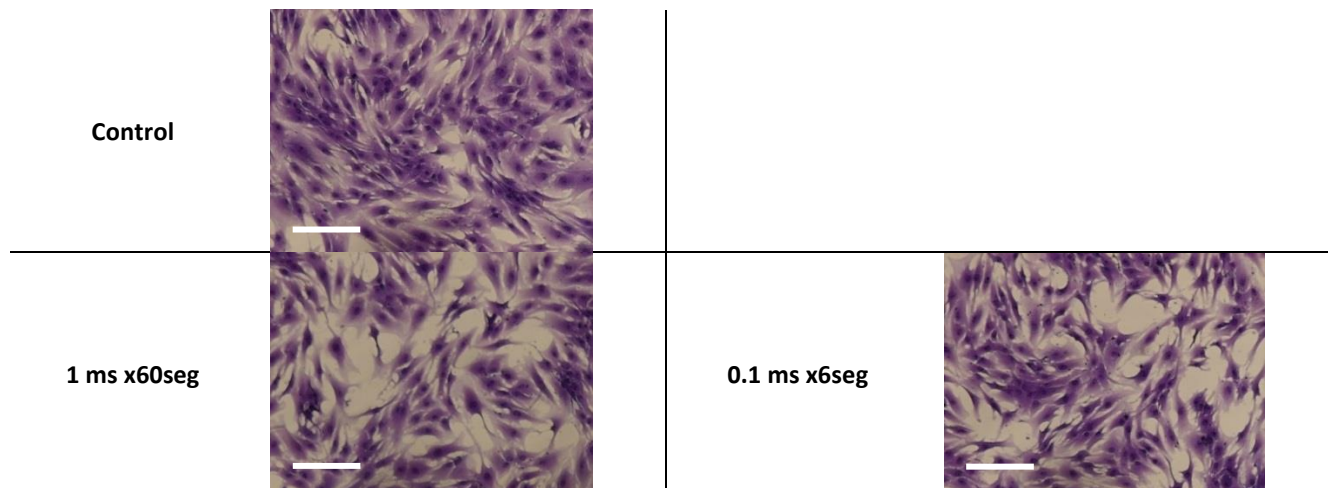


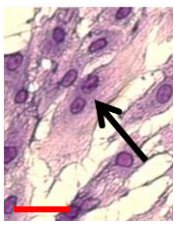
Tabla 4.11: Muestra representativa del estado del cultivo para los grupos del *Protocolo B2* 24 h tras el tratamiento.



Para este tipo de insonificaciones, las diferencias a simple vista apreciables entre las imágenes no resultan tan evidentes como para los casos del *Protocolo A* (Tabla 4.6.). Puede intuirse la disminución de la densidad de población de fibroblastos confirmada por los datos de conteo y superficie (Fig.4.40 y 4.41). En cuanto a la morfología de las células, los grupos tratados presentan más fibroblastos con una morfología estrellada e irregular, es decir, que poseen un cuerpo redondeado y prolongaciones estrechas y más cortas que en el caso del control. Los contactos entre células y el empaquetamiento es menos frecuente en los grupos tratados.

En el grupo insonificado con la menor PRF (0.1 ms x6seg) aparecen más fibroblastos que presentan doble nucleación que en los demás grupos. Un ejemplo de un fibroblasto con esta peculiaridad se muestra en la Tabla 4.12. Para confirmar este hecho se realiza, en un barrido de 10 imágenes de cada grupo del *Protocolo B2* (5 imágenes de cada experimento diferente), un conteo de las células con esta característica. El resultado que se obtiene se recoge en la Tabla 4.12.

**Tabla 4.12: Ejemplo de fibroblasto binucleado y estimación de los presentes en cada imagen de los pocillos de B2.**

	Grupo	Imágenes tomadas	Binúcleos contados	Proporción (Binuc/imagen)
	Control	9	10	1,1
	0.1ms x6s	10	23	2,3
	1ms x60s	10	21	2,1

Se confirma que hay mayor número de fibroblastos binucleados para los grupos tratados con PRF menores. De nuevo se tiene que, al darse los pulsos muy seguidos, se obtiene más morfologías celulares anómalas

#### 4.2.1 Discusión e interpretación de los resultados

El propósito del diseño de los tratamientos del *Protocolo B* es el de investigar el efecto de una onda progresiva de US evitando la implicación en los resultados de la formación de un campo estacionario y descartar el fenómeno de cavitación estable, empleando un pulso corto para no dejar tiempo para que los micronúcleos naturalmente disueltos en el medio aumenten de tamaño y den lugar a burbujas que oscilan. Esto se confirma con el hecho de que el fenómeno de cavitación estable no es detectado en el laboratorio con las medidas de sonoespectroscopía.

Descartada la cavitación y la fuerza de radiación, en estos experimentos tipo *B* puede haber implicados los siguientes fenómenos no térmicos:

(i) La estimulación mecánica (compresión y elongación) de la membrana plasmática como consecuencia de su interacción con la onda de presión. Si ésta es muy fuerte o se mantiene en el tiempo puede llegar a generar su rotura, pero esto no ocurre pues no se observa muerte celular o daño físico en el análisis de los resultados.

(ii) Mecanismos de mecanotransducción originados como consecuencia de los cambios de presión.

En la bibliografía revisada se encuentra que los trabajos más similares al nuestro en relación a la forma del pulso acústico que se emplea son los que estudian los efectos de las *SW* en cultivos in vitro. Este tipo de insonificaciones emplea ondas de presión de amplitudes por lo menos un orden de magnitud mayores a las nuestras (> 10 MPa), por lo que, en la mayoría de los casos, los

resultados que obtienen se cuantifican en función del daño observado. Las densidades de energía de cada pulso para una SW son del orden de las décimas de  $mJ/mm^2$ , es decir, 100 veces mayores que las aquí empleadas (véase Tablas 4.3 y 4.4).

*Feigl T et al* estudian la influencia de los parámetros de pulsos de US de alta energía (ondas con amplitudes entre 10 y 30 MPa y unos 2  $\mu s$  de duración) en diferentes líneas celulares, entre ellas fibroblastos. Obtienen un decaimiento de la viabilidad que sigue una tendencia exponencial conforme aumenta el número de pulsos y lineal con la amplitud [Feigl T]. En otro experimento se varía la PRF con la que se aplican las ondas, desde 0.6 a 8 Hz, pero emitiendo siempre el mismo número de ellas (400). Obtiene que cuanto menor PRF (pulsos más separados) más daño producen. *Feigl T et al* justifican este hecho planteando como hipótesis que, al esperar más tiempo entre pulsos, los efectos del anterior (p.e. nube de cavitación creada) ya se han disuelto y no hay atenuación, por lo que el daño se maximiza. Sus resultados coinciden con el “efecto acumulativo” notado por *Johannes EJ et al*, que afirma que la nocividad de las SW con  $\rho_E$  entre  $0.37 \cdot 10^{-2} mJ/mm^2$  y  $1.2 mJ/mm^2$  en fibroblastos aumenta también con la amplitud y el número de pulsos, siendo este último parámetro más influyente [Johannes EJ]. Estos trabajos revelan que, en el caso de que el pulso sea capaz de causar un daño físico instantáneo a la célula, como ocurre con las SW (p.e. perforación de la membrana), el efecto se agrava con el número de pulsos y disminuye cuando éstos se emiten más seguidamente. Esto es concordante también con trabajos como los de *Feng Y et al*, *Chen Y et al*, *Udroiu I et al*, *Zhang Y et al* que observan más daño en las primeras 24 h en sus cultivos conforme aumentan el tiempo de insonificación [Feng Y, Chen Y, Udroiu I, Zhang Y (2) 2012].

En nuestro caso se descarta el daño físico en la célula y la lisis para un pulso con estas características tras ver la integridad de la membrana de los fibroblastos y que no hay diferencias significativas en la viabilidad de los grupos tratados respecto del control tras las primeras 24 h (Fig.4.38 y 4.39). A pesar de esto, el resultado para el conteo del número de fibroblastos presentes en el cultivo a las 24 h es menor (Fig.4.40), lo que sugiere que, para que la viabilidad promedio se mantenga, los que hay han de ser más activos metabólicamente. Esto puede atribuirse al hecho ya mencionado de que, en un cultivo de fibroblastos, cuando la población es menor, tiende a una mayor actividad de replicación y aumenta por tanto su actividad promedio. Así, el efecto que se ha producido retarda la capacidad proliferativa de los individuos afectados, de manera que, los no afectados, al ser menor en número tienen una actividad metabólica mayor debido a su predisposición a replicarse.

Se realiza una revisión de trabajos en los que se estudia cómo afecta la variación del PRF de los pulsos de US. En estos trabajos lo general es que se usen pulsos de US más parecidos a los empleados convencionalmente en TUS, con un DC más largo que el de nuestros experimentos. Para evitar confusiones cabe mencionar que los datos de PRF en este trabajo se han cuantificado en unidades de tiempo (s), pero pueden expresarse también en unidades de frecuencia (Hz), como ocurre en muchos trabajos bibliográficos, siendo la correspondencia inversa: mayor PRF, en Hz, menor tiempo entre pulsos, en s.

En el trabajo de *Karshafian R et al* insonifican con un pulso de 32  $\mu$ s de 0.5 MHz variando la PRF desde 10 Hz hasta 3 kHz, manteniendo siempre el mismo tiempo de insonificación (3 min), como se ha hecho en nuestro *B1*. En este trabajo se introducen agentes de contraste y se obtiene que la viabilidad de las células disminuye con PRF cada vez más altas [Karshafian R]. Simultáneamente realizan medidas de permeabilidad en las células y ésta aumenta, por lo que es posible que se esté perforando la membrana debido a la acción de la cavitación estable. En nuestro caso no se usan agentes de contraste y no se observa un efecto dañino. En otro experimento mantienen la energía total, como en nuestro *B2*, de manera que, conforme aumentan la PRF (lo expresan como aumento de DC), disminuyen el tiempo de insonificación. Obtienen que la viabilidad es menor para los grupos de mayor PRF, lo cual concuerda con nuestros resultados de que el grupo que se ha visto más afectado es el de mayor PRF (en Hz) (0.1 ms durante 6 s). A pesar de que en su estudio hay cavitación, los resultados de *Karshafian R et al* no correlacionan del todo con las medidas que realizan de ruptura de las burbujas, por lo que concluyen que pudiera haber otros mecanismos implicados.

*Buldakov MA et al* trabajan con US de 1 MHz y a medida que aumentan el PRF acortan el pulso, de manera que siempre tienen el mismo DC (50 %). Obtienen que hay menos células viables para los pulsos más largos, es decir, los de menor PRF [Buldakov MA]. En sus resultados sugieren que hay una PRF umbral a partir de la cual se comienzan a producir efectos líticos (muerte inmediata) y por debajo de la cual el efecto sería más bien apoptótico (muerte programada), el cual aumenta si los pulsos están más espaciados temporalmente. Esto lleva a pensar, que si no se llega a dañar la célula ocurre que, dejar más tiempo de reacción entre pulsos sucesivos optimiza el efecto que se logra. Este hecho se vería reflejado en nuestro resultado de que al dar los pulsos cada 10 ms o dar un factor 10 más cada 1 ms tenga los mismos efectos.

*Zhang Y et al* con US de 2 MHz y manteniendo un DC del 10 % (acortan el pulso si aumenta la PRF) obtienen la misma tendencia: la viabilidad es menor para PRF menores [Zhang Y (2) 2012]. *Tata DB et al* trabajando de manera similar con US de 0.93 MHz y un DC del 20 % obtienen de nuevo resultados similares. En su trabajo el valor de la viabilidad va aumentando con el PRF hasta que, cuando el pulso es lo suficientemente corto, con PRF del orden del kHz, deja de haber variación en la viabilidad [Tata DB]. Sin embargo, cuando aumenta mucho (10 kHz) la viabilidad disminuye. Esto es concordante con que en nuestro caso haya mayor diferencia para la PRF más alta (0.1 ms). En su estudio también realizan otro experimento manteniendo la energía total igual, pero con un PRF de 5 kHz y aumentando entre insonificaciones el número ciclos, y, en consecuencia, el DC. Obtienen que la viabilidad disminuye cuando el pulso es más largo. *Rahim A et al* en su experimento estudian la tasa de transfección usando pulsos de 40 ciclos de US de 1 MHz de baja amplitud (0.25 MPa) e insonificando siempre el mismo tiempo (40 s). Encuentra que el aumento de PRF, de 0.5 kHz a 2.5 kHz, no tiene un efecto significativo en la viabilidad, lo cual concuerda con nuestros resultados [Rahim A].

En nuestros experimentos, cuando se han emitido los pulsos muy seguidos, con PRF de 0.1 ms, a pesar de insonificar durante tan sólo 6 s, se ha obtenido la mayor ralentización del crecimiento.

Además, se observa que los fibroblastos tienen una morfología más irregular (p.e con más prolongaciones y más cortas) y, al realizarse el conteo de aquellos que presentan un posible doble núcleo, la proporción se dobla respecto del control (Tabla 4.12). Se obtiene por tanto que, con esta PRF, se está incrementando el efecto respecto a las PRF menores, haciendo que se desencadene una reacción en los fibroblastos que perjudica su duplicación, pero no reduce su metabolismo (p.e. aberraciones en el ADN que darían lugar a la binucleación).

Una posible causa que justifique esta intensificación es que para PRF tan altas (> kHz) el espacio temporal entre pulsos sucesivos es lo suficientemente pequeño para no dar tiempo a que se disuelvan los micronúcleos de gas activados y pueden estarse produciendo fenómenos de cavitación aunque no han sido detectados en el laboratorio con el método de sonoespectroscopía.

Otra posibilidad es que, la reacción de mecanotransducción que está teniendo lugar sea diferente para PRF bajas o altas. En estudios realizados para entender cómo las células sienten y se deforman ante los estímulos mecánicos se explican las complejas respuestas que se generan y cómo éstas dependen de la magnitud, pero también de la tasa a la que se transfieren [Haase K]. Experimentos dinámicos con AFM sugieren que la rigidez de la célula aumenta con la frecuencia de la fuerza aplicada y que las células responden ante las perturbaciones externas con un comportamiento viscoelástico. Cuando se les aplica ciclos de tensión/compresión se demuestra que las células son capaces de responder de una manera adaptativa, y probablemente protectora, ante la perturbación externa. Considerando este comportamiento viscoelástico de las células y de las estructuras que las forman se plantea como hipótesis que se está desencadenando el efecto ilustrado en la Fig.4.42.

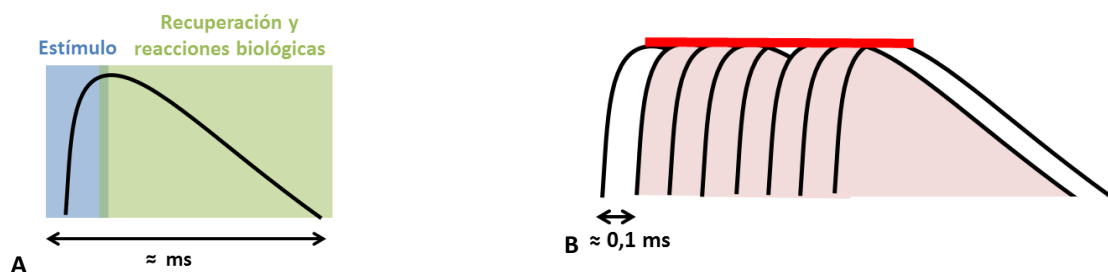


Fig. 4.42: (A) Comportamiento de la célula ante un estímulo mecánico. (B) Saturación que se produce si los estímulos se dan muy seguidamente.

Para PRF muy bajas (pulsos muy seguidos) no se deja tiempo entre estímulos para que se finalicen los procesos de adaptación y las estructuras mecanosensoras se quedan en un estado de “continua” estimulación, como se representa en la Fig.4.42B. Esto hace que, al mantenerse durante toda la insonificación, el efecto sea mayor. Según la bibliografía consultada, los procesos de mecanotransducción se desarrollan en tiempos del orden de ms [Bao G, Diaz Chiguer D], por lo que son más lentos que el tiempo entre pulsos aquí empleado (0.1 ms), lo cual concuerda con esta hipótesis.

En definitiva, se plantea que con este tipo de pulso (5 ciclos de  $P_{max} = 1.01 \text{ MPa}$ ) se transmite a los fibroblastos un estímulo mecánico que no le produce un daño físico irreparable, sino que

desencadena una reacción de mecanotransducción. Si estos estímulos se dan muy seguidos ( $PRF < ms$ ) no se da tiempo a que la célula complete la reacción biológica de adaptación. Esto intensifica la señal que reciben los organismos mecanosensores y el efecto consecuente. Cuando sí se da tiempo para que la célula complete la reacción, a la tasa o periodicidad a la que se transfiere el estímulo influye en la reacción, siendo más efectivas tasas menores. Esto es atribuible a la capacidad de las células para adaptarse y protegerse de las perturbaciones externas, que provoca que, si el tiempo entre estímulos es pequeño, se encuentre en un régimen de protección cuando recibe el siguiente, minimizándose el efecto [Haase K]. Así, para insonificaciones en las que no se produce un daño físico irreversible en la célula, como es nuestro caso, hay un tiempo entre estímulos mecánicos umbral ( $\approx$  varios ms), para el cual los efectos de un pulso son revertidos antes del siguiente.

Este comportamiento celular se observa también en trabajos sobre electroporación de membranas (perforación de la membrana plasmática mediante estímulos eléctricos), donde se logra mayor eficiencia con tiempos entre estímulos más altos. Esto se justifica con modelos relacionados con la velocidad de remodelación de las membranas y su capacidad para percibir nuevos estímulos. Si se pretenden generar nuevas estructuras conductoras, poros o canales, es necesario establecer una diferencia de potencial por encima de un umbral, por lo que, si la membrana todavía tiene los canales abiertos debido al estímulo anterior, establecer esta diferencia de potencial es más difícil [Silve A].

## 5. Conclusiones

En comparación con estudios previos del mismo tipo, a los que se ha hecho referencia a lo largo de este capítulo, la relevancia de este trabajo radica en que se ha llevado a cabo teniendo en cuenta todos los factores posibles que pudieran afectar al resultado:

- El uso de herramientas de simulación para estudiar el campo acústico que se tiene en las condiciones experimentales, analizando la propagación del pulso y la aparición de un campo estacionario.
- La medida de los parámetros de dosificación de los protocolos no solo con herramientas generalmente empleadas en la calibración de equipos (p.e balanza de fuerza de radiación), sino también en las condiciones de experimentación.
- El uso de valores reales de la distribución de la presión acústica sobre la monocapa de fibroblastos para la interpretación de los resultados.
- El control de que los parámetros y disposición de la configuración sean siempre los mismos (p.e. altura del líquido) para asegurar la reproducibilidad en los experimentos.
- La valoración de los efectos térmicos para descartar su implicación en los resultados obtenidos.
- La discusión sobre los efectos no térmicos que puede haber implicados y la verificación de la presencia de cavitación estable con métodos indirectos (sonoespectroscopia)

De los resultados que se han obtenido insonificando la monocapa de fibroblastos con un pulso largo (200 ciclos de 1.9 MHz, amplitud de presión máxima entre 770 kPa y 77 kPa, PRF 1 ms y DC 10 %) se puede afirmar que:

- Con la intensidad más alta empleada (MAP) se produce lisis en las primeras 24 h en los fibroblastos y se desencadenan reacciones de apoptosis transcurridas 48 h.
- En los tratamientos de AP y BP no se ha alcanzado una intensidad para producir un daño irreparable en las células (AP y BP con  $I_{SPTP}$  de  $0.77 W/cm^2$  y  $0.19 W/cm^2$ , respectivamente). En las primeras 24 h estas células disminuyen su capacidad de proliferación, pero el efecto se revierte en 48 h, próximo al tiempo de duplicación de esta línea celular. Esto implica que transcurridas las primeras 24 h se tiene un período en el que los fibroblastos poseen una actividad metabólica y de síntesis de sustancias igual o mayor que si no sufren estimulación mecánica. Esto es concordante también con el hecho de que el número de individuos sea cerca de un 20 % menor y sin embargo la viabilidad promedio no decaiga más de un 10 %, signo del aumento en el metabolismo.

El principal mecanismo de acción de los US al que se le atribuyen estos efectos es la cavitación estable, presente en todos los casos y detectada en las condiciones de experimentación por el método de sonoespectroscopía, estudiando la presencia de los armónicos superiores en el espectro de la señal ( $2f_0$  y, más notablemente,  $3f_0$ )

De los resultados que se han obtenido para las insonificaciones llevadas a cabo con un pulso corto (5 ciclos de 1.9 MHz, amplitud de presión máxima de 1.01 MPa y PRF entre 0.1 ms y 100 ms)) se puede concluir que:

- Con un pulso de esas características no se produce daño físico ni lisis en la célula.
- Se descarta en este caso la presencia de cavitación al no detectarse en el laboratorio. El mecanismo de acción para este tipo de tratamiento es atribuible a la recepción por parte de las estructuras mecanosensores de un estímulo de presión, resultado de la interacción de la onda de US con la célula. Esto lleva al fibroblasto a desencadenar reacciones, consecuencia de los complejos mecanismos de mecanotransducción. Se ha observado que cuando los estímulos se dan a una tasa mayor que a la que estas estructuras son capaces de realizar los procesos biológicos de adaptación (PRF < ms) el efecto se ve potenciado al mantenerse la célula en un estado “continuo” de excitación. Cuando las tasas son más lentas y sí se deja tiempo suficiente de reacción entre estímulos, equiespaciados más los pulsos intensifica el efecto logrado al encontrarse la célula en un estado más parecido al original cuando llega el siguiente pulso. Si el tiempo no es muy grande, el fibroblasto es capaz de adaptarse, p.e, modificando su rigidez, por lo que la percepción será menor.

A la hora de discutir la aplicabilidad de estos estudios in vitro en una situación in vivo ha de tenerse en cuenta que, en un organismo, los fibroblastos se encuentran inmersos en la matriz extracelular (MEC) que compone el tejido conectivo. Una pérdida en el número de individuos como la observada en este trabajo pueden desencadenar a nivel tisular señales en consecuencia (p.e. liberación de más factores de crecimiento) que provoquen una reacción en varias líneas celulares (p.e migración de células satélite, monocitos, macrófagos, ...). La combinación de estos procesos a



nivel celular hace que se promuevan los mecanismos de reparación y se acelere el proceso de recuperación normal de un tejido, como se ha visto que ocurre con US pulsados terapéuticos [Robertson VJ]. Resulta sobretodo interesante la aplicación de este tipo de tratamientos en lesiones crónicas donde el modificar o incluso reponer el tejido cronicado, en principio disfuncional, con nuevas células con plena capacidad es de interés. De hecho, los US pulsados han dado buenos resultados en el tratamiento de lesiones en tendones [Tsai WC 2011] o músculos [Matsumoto Y], donde las terapias invasivas, como sería p.e. la punción seca, se emplean también en la actualidad [Tough EA].

No obstante, se ha de tener en cuenta que el medio que rodea a las células en un cultivo no es el mismo que se tiene in vivo y que éste incluso cambia entre tejidos, dependiendo de su composición (p.e los tendones, ligamentos o músculos tienen mucho más contenido proteico que la piel o el tejido adiposo y, por esa razón, absorben más los US). Para el caso de un pulso largo, dado que la cavitación es el agente mayormente responsable de los efectos observados, es importante tener en cuenta que la probabilidad de que se produzca este fenómeno in vivo varía según el contenido gaseoso del tejido. Es conocido que, en general, la posibilidad de cavitación in vivo es baja, pero no nula [Maxwell AD, Holland CK, Hill CR 1972, Hill CR 2004]. Por otro lado, la introducción de agentes de contraste óptimamente diseñados puede cambiar esto y aumentar considerablemente las probabilidades de que se produzca efecto. Además de la composición, otros factores como la densidad celular, mucho mayor en tejidos que en un cultivo, también influyen en el efecto que se logra con los US [Guzmán HR]. Para el caso de un pulso corto, si se quiere lograr la misma estimulación mecánica que en el experimento in vitro, ha de tenerse en cuenta que, para alcanzar ese nivel de presión en una zona, deben considerarse factores como la atenuación que sufre la onda al propagarse en el medio o los cambios de dirección por la presencia de interfaces entre tejidos diferentes (p.e entre músculo y el hueso).

## Capítulo 5.

# MIFU: Propuesta de un protocolo de Ultrasonidos terapéuticos para el tratamiento de lesiones crónicas de tejido blando

## 1. Introducción y motivación

Las lesiones crónicas en tejido blando son unas de las patologías que más comúnmente se tratan con Fisioterapia y su correcta recuperación es muy importante debido a su alta funcionalidad en el organismo. En los últimos años se ha observado que mediante la estimulación con US se puede, p.e. acelerar el proceso de reparación de las lesiones de tendón [Robertson VJ, Tsai WC 2011] o aliviar el dolor o incluso liberar contracturas musculares muy fuertes como son los puntos gatillo miofasciales (*PGM*) [Draper DO (2) 2010].

Las fases de recuperación de una lesión desde el momento de su generación hasta que el tejido cicatrizante sustituye al dañado son: tras el sangrado, se inicia una primera fase inflamatoria. A continuación, en la fase proliferativa las células especializadas migran a la zona afectada y comienzan a sintetizar y secretar las sustancias del tejido cicatrizante. Por último, en la fase remodeladora se termina de refinar la cicatriz y ésta adopta las características funcionales propias del tejido en reparación. Cuando una lesión se vuelve crónica, ya se encuentra en los últimos estadios. La patología se crea al no remodelarse correctamente el tejido y adoptar disfuncionalidades. El tratamiento debe diseñarse teniendo en cuenta el estadio de la lesión que se tiene (p.e. en un tendón se puede tener inflamación sin alteración de la estructura en estadio I o una tendinosis con fallo estructural macroscópico en estadio III. Para el primer caso interesa favorecer procesos anti inflamatorios mientras que, para el segundo, interesa provocar una inflamación de la zona que desencadene cascadas de señalización que optimicen la regeneración del tejido). En este sentido los US han dado buenos resultados en todas las fases de recuperación de una lesión de tejido blando:

- En la fase inflamatoria es conocido que los US tienen un efecto inflamatorio debido al efecto estimulante que tienen sobre los tipos celulares implicados (p.e macrófagos), de manera que se aumenta la eficiencia de los procesos que se desencadenan [Maxwell L]
  
- En la fase proliferativa los US aumentan la actividad metabólica de las células haciendo que se secreten al medio más sustancias como colágeno o factores de crecimiento [Doan N, Webster DF]

1978, Webster DF 1980, Tsai WC 2006]. Esto da lugar a cascadas de procesos biológicos que aceleran la recuperación (p.e. migración de más células a la zona afectada)

- En la fase remodeladora los US mejoran la orientación de las fibras [Yeung CK] y promueve que el colágeno de tipo III se transforme en colágeno de tipo I, más resistente [Tsai WC 2006, Berta L]. Los tejidos de cicatrización que se regeneran cuando se aplica un tratamiento de US poseen más movilidad y son más resistentes [Enwemeka CS]

Una patología ya crónica se origina cuando el tejido ha sufrido un proceso degenerativo como consecuencia de una alteración de su estado homeostático mantenida durante un tiempo largo, como sería: una sobrecarga muscular, sobreuso, malas prácticas durante el proceso de recuperación de una lesión... Durante ese tiempo se liberan en la zona sustancias nocivas para las células que provocan la pérdida de capacidades y dolor (p.e toxinas) [Mense S]. En estos casos, el tejido no es capaz de revertir esta situación de manera natural y es necesario un procedimiento externo. Las zonas lesionadas carecen de una irrigación adecuada por lo que es común la isquemia local y la disminución del metabolismo. Llegado a este estado crónico un tejido es, en principio, disfuncional. El tratamiento que se diseña por tanto debe, por un lado, terminar con el ciclo de crisis energética que mantiene al tejido en ese estado crónico de dolor y disfunción y, por otro lado, potenciar a partir de ahí su recuperación.

Un estudio que proponga cualquier tipo de tratamiento novedoso que posteriormente pretende ser aplicado en clínica, debe ser investigado gradualmente: primero en el laboratorio, con cultivos in vitro, luego en pequeños animales y posteriormente en humanos. Esto permite que sea aprobado por los Comités Éticos pertinentes. Para el caso concreto de un nuevo protocolo con US, éste debe suponer un trabajo multidisciplinar. En el estudio se deben concretar las características del campo acústico que se aplica y los efectos que se logran en las células, tejidos y animales para después optimizar y particularizar sus parámetros en función de los factores de cada paciente.

En este capítulo se propone un nuevo tratamiento de US terapéuticos para el tratamiento de lesiones en tejido blando que se encuentren en la fase posterior al sangrado e inflamación y en las que el tejido carece de plenas capacidades funcionales (lesiones en fase avanzada o crónicas). El tratamiento que se propone es novedoso por combinar dos tipos de insonificación, cada uno de los cuales se aplica con una finalidad.

La hipótesis inicial del tratamiento es que la efectividad de los US pulsados en la recuperación de un tejido en fase crónica aumenta si se combinan los dos grupos de efectos de los US en Fisioterapia: los térmicos y no térmicos. Así, en primer lugar, se pretende provocar la activación de procesos de reparación en la zona lesionada. Es conocido que la aplicación de calor en esta fase resulta favorecedora. Para lograr este primer efecto se emplea un pulso largo de US para calentar la zona, manteniendo siempre los niveles de temperatura por debajo de la ablación tisular. A continuación, se estimularán los tipos celulares implicados en la recuperación empleando un protocolo de US cuyo efecto sea puramente de tipo mecánico. Para esto, se aplica seguidamente al

pulso largo un pulso corto, que será recibido por las células como una señal mecánica de alta intensidad que desencadena mecanismos de mecanotransducción y potencia su actividad metabólica.

En el capítulo anterior se ha realizado un estudio de experimentación *in vitro* con fibroblastos. Se ha de tener en cuenta que el comportamiento de las células en un cultivo o integradas en un tejido del organismo es completamente diferente. Este hecho hace que sea necesario un análisis de todos los factores que van a variar al pasar de una experimentación *in vitro* a una *in vivo* y cómo deben modificarse las dosis en consecuencia. En el desarrollo de la propuesta se presentan medidas experimentales y simulaciones que refuerzan la aplicabilidad del tratamiento en un caso real. Un razonamiento de las dosis como el que se desarrolla en este capítulo puede servir como sistemática para adecuar los parámetros de una insonificación al efecto terapéutico que se pretende lograr.

## 2. Antecedentes

No se encuentran en la bibliografía estudios previos que analicen los posibles efectos de una insonificación que combina dos pulsos de US con una amplitud y número de ciclos diferentes. Sí que se han publicado trabajos que combinan US con dos frecuencias [Feng R] o que emplean este tipo de radiación junto a otro tipo de tratamiento, como p.e. hipertermia [Feril LB], láser [Demir H] o radioterapia [Corry PM], para potenciar sus efectos.

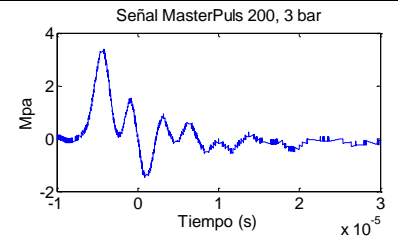
Los equipos comerciales que actualmente se emplean para la aplicación de terapias con US (*TUS*) tienen una intensidad promedio de funcionamiento de entre  $1 \text{ W/cm}^2$  y un máximo de  $3 \text{ W/cm}^2$ . En una encuesta realizada sobre el uso de los US en sus clínicas se obtuvo que el 90 % de los fisioterapeutas emplea una intensidad entre  $1 \text{ W/cm}^2$  y  $2 \text{ W/cm}^2$  en el tratamiento de lesiones crónicas y el 95 % emplea el modo continuo durante una media de 5 minutos [Warden SJ]. La razón por la cual se emplea la emisión continua es para optimizar el incremento de temperatura. Sin embargo, en la actualidad hay una fuerte evidencia de que los US pulsados son eficientes en la curación de lesiones, por lo que se está haciendo un esfuerzo por entender cuáles son los efectos mecánicos de este tipo de radiación, que todavía no están del todo claros [Dalecki D 2004].

Un problema conocido es que, por lo general, los equipos comerciales no usan sistemas de transducción focalizados. Esto dificulta la correcta insonificación tanto respecto a la energía que se debe dar como a su aplicación en el lugar adecuado. Además, la insonificación se extiende también a zonas sanas y con niveles que pueden ser dañinos. En este sentido, los US focalizados suponen un avance técnico necesario en cualquier tratamiento de US. En las aplicaciones de alta intensidad ( $\geq 1000 \text{ W/cm}^2$ ) para ablación de tejidos por US se usan obligadamente sistemas focalizados [Ter Haar G 2007].

Otra de las modalidades de ondas elásticas que está dando resultados positivos en la curación de lesiones crónicas son las ondas de choque (SW) [Romeo P, Notarnicola A, Ogden JA]. Dada la falta

de cuantificación de los parámetros acústicos en la configuración experimental en los estudios que emplean este tipo de tratamiento, se ha caracterizado en el laboratorio la onda de presión de un equipo típico de SW radiales (*MasterPuls 200 Ultra, Storz Medical AG*). La onda acústica se mide colocando el hidrófono calibrado (*Brüel and Kjaer 8130*) a una distancia de 10 mm del aplicador. La señal que se adquiere puede verse en la imagen de la Tabla 5.1, en la que también se recogen los parámetros adquiridos en un trabajo previo para otros equipos comerciales [Császár NBM].

**Tabla 5.1: Pico de amplitud de presión positivo ( $P_+$ ), negativo ( $P_-$ ) y densidad de energía ( $\rho_E$ ) de las ondas de presión generadas por tres equipos de RSW a diferentes distancias del aplicador ( $z$ ).**

Equipo	$P_{RSW}$ [bar]	$z$ [mm]	$P_+$ [MPa]	$P_-$ [MPa]	$\rho_E$ [mJ/cm <sup>2</sup> ]	Ref.
MasterPuls 200 Ultra	3	10	3.4	-1.4	1.7	 <p>Señal MasterPuls 200, 3 bar</p>
D-Actor 200	3	10	4.9	-4.2	2	
		1	8.6	-6.7	10	
Swiss DolorClast	3	10	5.9	-3	2	
		1	10.1	-5.7	10	

Según los valores mostrados en la Tabla 5.1, para la misma configuración de funcionamiento (3 bar y  $z = 10$  mm), según el equipo que se mida se obtienen diferencias en las amplitudes de presión un factor 1.7 y 3 en el máximo positivo y negativo de presión, respectivamente. Esto dificulta la comparativa entre trabajos si no se emplea el mismo equipo. En base a los datos experimentales de los equipos medidos por *Császár NBM et al* puede estimarse que si se aplica una SW con  $\rho_E = 10$  mJ/cm<sup>2</sup>, la amplitud de la onda cerca del origen tiene un máximo de  $\approx 10$  MPa. Con este dato se tiene la relación de la eq.(5.1) para estudios que empleen otras densidades de energía:

$$P_+ [MPa]_{z=0} \approx 10 \cdot \sqrt{\frac{\rho_E}{10}} \quad (5.1)$$

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1 Simulaciones

Se realizan simulaciones con COMSOL Multiphysics® 5.2a. En primer lugar, se compara el resultado que se obtiene en el campo acústico que se emite y la distribución de calor cuando se emplea una apertura circular plana o una focalizada. Según el caso, el transductor corresponde en nuestros modelos con una membrana plana (pistón) o curvada (focalizado) vibrando sinusoidalmente. El sistema en el que se aplican los US se compone de un medio infinito de músculo que contiene un tendón de 0.5 cm a una profundidad de 1 cm. Los US se aplican

colocando el transductor en contacto con la superficie en el caso del pistón y de manera que el foco se localice en el tendón en el caso focalizado. Puesto que el transductor focaliza a una distancia de 4 cm se coloca una capa de 3 cm de agua entre su superficie y el músculo en este modelo. Una ilustración de la geometría diseñada en cada caso se recoge en la Fig.5.1. Al igual que en las simulaciones del apartado 4.2 del Capítulo 2 de esta Tesis, se incluye una zona elipsoidal con un mallado más fino en la zona de mayor interés, la del foco.

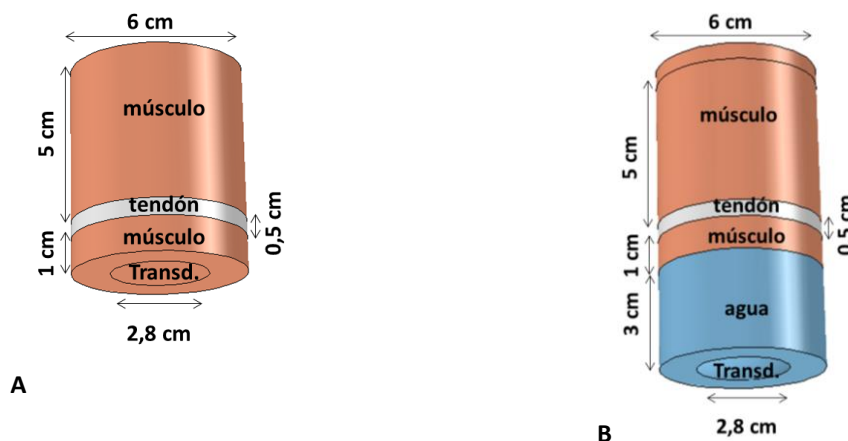


Fig. 5.1: Ilustración de la geometría de simulación para cada modelo (A) Pistón (B) Focalizado.

Por otro lado, en los modelos de simulación diseñados para verificar la propuesta del protocolo de tratamiento que se presentará en este trabajo se considera el caso en el que se emplea un transductor con una apertura plana circular, colocado en contacto con el tejido, ya que ésta es la manera en la que actualmente se aplican los US para ensayos con pequeños animales y en clínica (sería por tanto una situación similar a la de la Fig.5.1A).

Se impone como única fuente térmica el calor originado por la absorción de los US para obtener estudios temporales de las distribuciones de temperatura. El mallado es el mismo que el empleado en modelos anteriores (véase Capítulo 2, apartado 3.2)

Para diseñar correctamente cada protocolo se han de tener en cuenta los factores que afectan a la propagación de los US en un tejido in vivo y los efectos que producen, como son: el efecto disipativo de la perfusión sanguínea y la conductividad térmica, la posible presencia de interfaces (p.e. músculo-hueso) o la atenuación del campo acústico a medida que se propaga en el medio. Para ello deben particularizarse los modelos según las propiedades de cada tejido.

El tejido muscular se compone de células musculares (miocitos) y tejido conectivo (principalmente compuesto por fibroblastos) y tiene como función principal la de sostener e integrar el organismo. Los ligamentos y tendones son dos tejidos conectivos que conectan huesos entre sí y el hueso y el músculo, respectivamente. Éstos últimos son similares en composición, por lo que se les considera con las mismas propiedades acústicas, lo que cambia es su localización [Birch HL]. La absorción de los US en un tejido es mayor cuanto más contenido proteico tiene [Watson T 2008]. Se estima que el % de colágeno en un tendón es de cerca de un 31 %, mientras

que en los músculos es de un 18.5 % [Pohlhammer J]. Las propiedades acústicas y térmicas necesarias para estimar la intensidad que ha de aplicarse en el tratamiento de US se recogen en la Tabla 5.2. Puesto que en este trabajo se realizan simulaciones con diferentes frecuencias de insonificación, para el coeficiente de atenuación, en la Tabla 5.3 se establecen relaciones de su valor en función de la frecuencia del transductor.

Tabla 5.2: Propiedades acústicas y térmicas de tejidos biológicos [Hasgall PA].

Medio	$\rho$ $kg/m^3$	$c$ $m/s$	$C_p$ $J/kg\ ^\circ C$	$k$ $W/m\ ^\circ C$	$w_b$ $ml/min\ kg$	$w_b$ $kg/m^3\ s$
Sangre	1050	1578	3617	0.52	10000	183.82
Músculo	1090	1588	3421	0.49	37	0.71
Tendón/Ligamento	1142	1750	3432	0.47	29	0.58
Agua	994	1482	4178	0.60	0	0

Tabla 5.3: Coeficiente de atenuación de los US en tejidos biológicos para las frecuencias que se emplean en Fisioterapia y resultado del ajuste a una función potencial de la forma  $\alpha = a f_0^b$  [Hasgall PA].

Medio	$\alpha$ (1MHz) $Np/m$	$\alpha$ (2MHz) $Np/m$	$\alpha$ (3MHz) $Np/m$	$\alpha$ ( $f_0$ ) $Np/m$
Músculo	7.1	15.1	23.3	$7.1 f_0^{1.08}$
Tendón/Ligamento	14.5	32.7	52.6	$14.5 f_0^{1.17}$
Agua	0.025	0.05	0.075	$0.025 f_0$

### 3.2 Medidas experimentales

Se realizan medidas de la señal acústica en muestras ex vivo con un hidrófono de aguja de 0.6 mm de diámetro efectivo (DAPCO 54389). Para registrar y visualizar la señal se emplea un osciloscopio (Teledyne Lecroy Wavesurfer 3024). La evolución del calentamiento producido en estas mismas muestras durante las insonificaciones se mide con un termopar (PTFE Type K, TM Electronics UK) y el sistema de adquisición PicoLog®.

El transductor que se emplea para las medidas de verificación se ha diseñado específicamente para ensayos con pequeños animales. Se compone de un disco piezocerámico de PZT-4 de frecuencia nominal de 2 MHz y con 1 cm de diámetro efectivo adherido a un casquillo de aluminio. En la Fig.5.2 se muestra su módulo de impedancia eléctrica de entrada en función de la frecuencia.

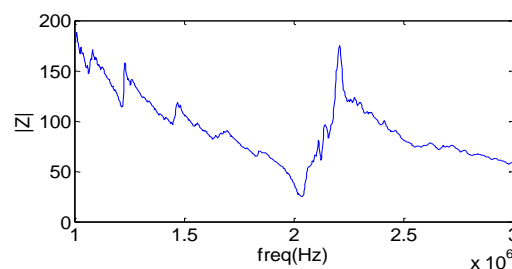


Fig. 5.2: Módulo de impedancia eléctrica del transductor para ensayos con animales. El mínimo está en 2.04 MHz.

#### 4. Simulación del efecto térmico producido con Ultrasonidos en un tejido según el tipo de transductor usado

Se estudia el caso en el que se trabaja con una apertura circular plana (Fig.5.1A) y el caso en el que el campo acústico es emitido por un transductor focalizado, con el foco situado a 4 cm de profundidad (Fig.5.1B), emitiendo ondas de 2 MHz en un tejido muscular que tiene un tendón a 1 cm de profundidad. Se impone en ambos transductores la misma amplitud de desplazamiento de la onda emitida (7 nm). La distribución de la amplitud de presión que se obtiene en cada caso se muestra en la Fig.5.3. Aparecen complementariamente los límites de las secciones de los diferentes medios que hay presentes (músculo, tendón y agua).

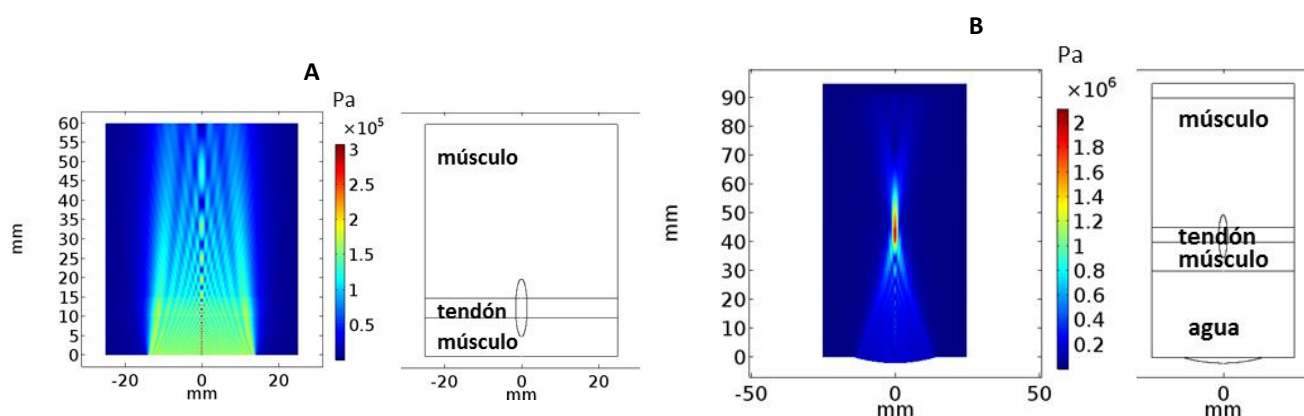


Fig. 5.3: Distribución 2D de la amplitud de presión máxima para el transductor (A) plano (B) focalizado, cuando tienen la misma amplitud de desplazamiento de la onda emitida (7 nm).

La amplitud máxima de presión acústica en la apertura plana circular es de 0.3 MPa (Fig5.3A), mientras que en el foco se llega a 2.1 MPa (Fig5.3B), un factor 7 mayor. La distribución de la intensidad que se obtiene en cada caso se muestra en la Fig.5.4.

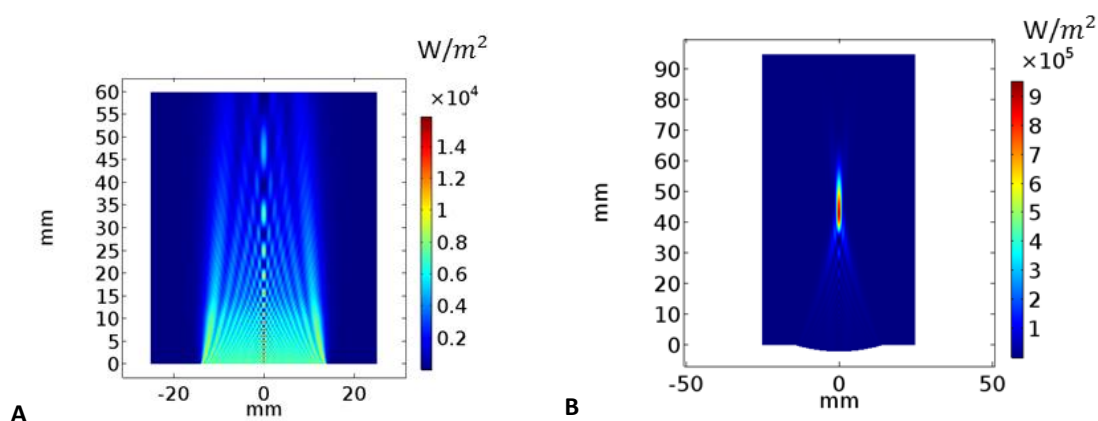


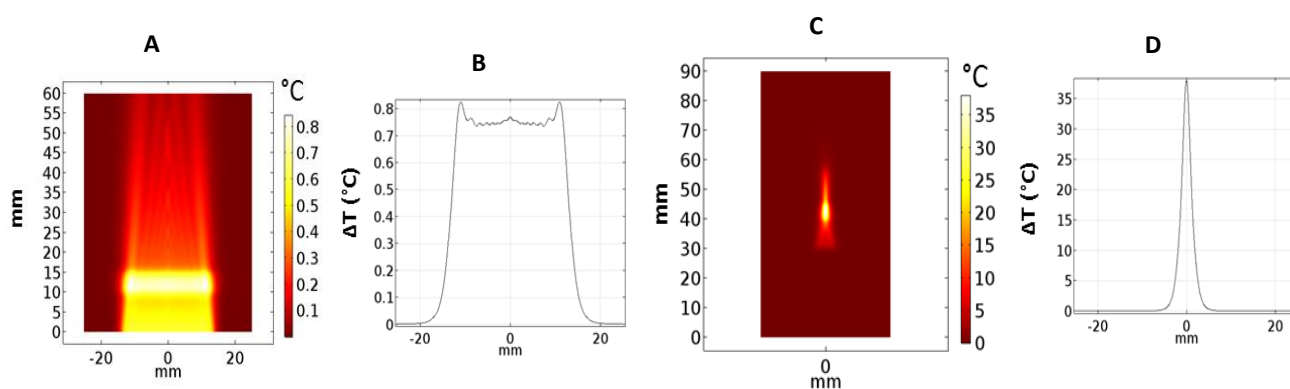
Fig. 5.4: Distribución 2D de la intensidad para el transductor (A) plano (B) focalizado, cuando tienen la misma amplitud de desplazamiento de la onda emitida (7 nm).

La intensidad puntual máxima emitida por la apertura plana circular es de  $1.6 \text{ W/cm}^2$  y en el caso focalizado es de  $95.4 \text{ W/cm}^2$ , un factor 60 mayor. La potencia en el plano transversal situado



en el centro del tendón, calculada como la integral de la intensidad en esa superficie, es de 2.8 W para el primer caso y 2.4 W para el segundo. A pesar de ser menor en el caso del transductor focalizado, al concentrarse en una zona mucho más pequeña, los valores puntuales que se alcanzan son mayores.

Teniendo en cuenta el efecto de la conductividad térmica y la perfusión sanguínea (Tabla 5.2), se simula a continuación el calentamiento que se tiene en el tejido, producido por la insonificación durante 10 s en modo continuo. Se estudia también su enfriamiento durante 20 s adicionales. En total se estudia la evolución temporal de la distribución térmica durante 30 s, con un paso de 0.5 s. En la Fig.5.5 se muestran las distribuciones térmicas en el tejido para el instante de mayor incremento térmico ( $t = 10$  s) y el registro de temperatura a lo largo del eje radial para la zona central del tendón, a 12.5 mm de profundidad respecto de la superficie muscular.



**Fig. 5.5:** Distribución 2D del incremento térmico al final de la insonificación y datos en el eje transversal en el centro del tendón para el transductor (A) y (B) plano, y (C) y (D) focalizado, con la misma amplitud de desplazamiento de la onda emitida (7 nm).

El incremento de temperatura máximo logrado por la apertura circular plana en  $t = 10$  s es de 0.84  $^{\circ}\text{C}$ , mientras que en el foco se alcanza un incremento de hasta 38.1  $^{\circ}\text{C}$  ( $\approx 45$  veces mayor). La zona que sufre un calentamiento de al menos el 50 % del máximo cubre una distancia radial total de 26.4 mm en el primer caso y de 2.4 mm en el segundo.

La distribución térmica de la Fig.5.5A evidencia que, si se pretende lograr un incremento térmico de 38  $^{\circ}\text{C}$  en el tendón con una apertura circular plana, se sobre calentará buena parte de tejido muscular previo. Para cuantificar este hecho se simula el mismo transductor emitiendo con una amplitud que logre este incremento térmico máximo de 38  $^{\circ}\text{C}$  (47 nm) y se comparan los resultados respecto del tratamiento focalizado, que precisa de una amplitud menor (los 7 nm anteriores). En la Fig.5.6 se muestran las nuevas distribuciones térmicas en el tejido para el instante de mayor incremento térmico ( $t = 10$  s) en las nuevas condiciones impuestas para el transductor plano.

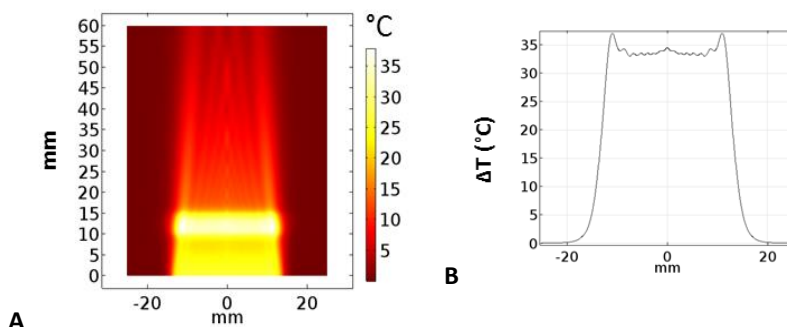


Fig. 5.6: (A) Distribución 2D del incremento térmico al final de la insonificación y (B) datos en el eje transversal en el centro del tendón para el transductor plano para una amplitud de desplazamiento de la onda emitida de 47 nm.

Para facilitar la comparación entre ambos casos, se calcula la evolución térmica de 4 puntos: dos que preceden al tendón, a 3 mm y 6 mm de profundidad, uno en el centro del tendón, a 12.5 mm de profundidad y otro también en ese plano pero a una distancia de 5 mm del eje axial central. La representación de estos puntos y los resultados que se obtienen se muestran en la Fig.5.7.

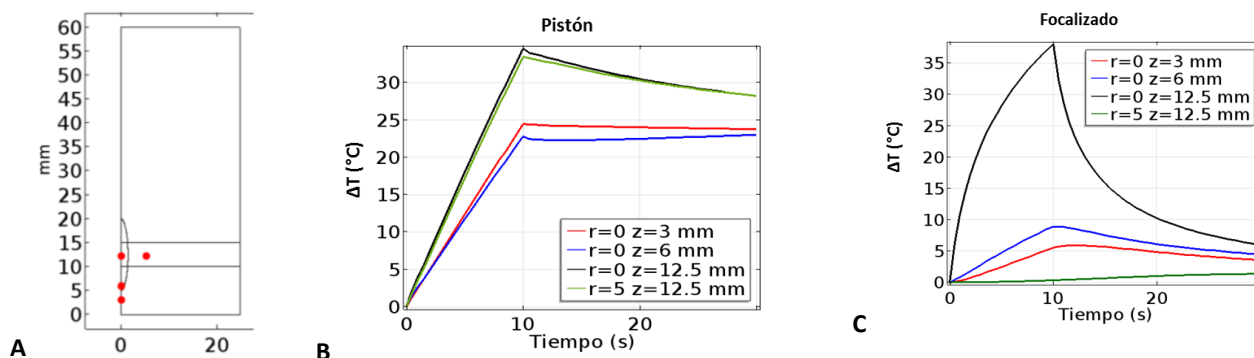


Fig. 5.7: (A) Localización de los puntos que se analizan dentro del tejido, en rojo. Resultados de la evolución térmica en esos puntos para el transductor (B) plano y (C) focalizado.

Se observa que los tejidos que preceden al tendón resultan más afectados en el caso del pistón, sobre todo a profundidades pequeñas. Además, con el transductor focalizado se comprueba que el calentamiento de los puntos separados del eje central del foco es muy pequeño, mientras que con el pistón esto no ocurre.

El riesgo de efectos adversos aumenta con la duración de la exposición. En la literatura, el parámetro  $t_{43}$  representa el tiempo para que una temperatura de 43 °C cause daño en un tejido. Miller MW *et al* establecen un  $t_{43}$  de 1 min para la insonificación de fetos [Miller MW 1989]. Con este umbral, se deduce para imagen médica una relación empírica para la temperatura,  $T$ , y el tiempo de exposición,  $t$ , por debajo del cual no se observan efectos adversos [O'Brien WD Jr]:

$$t \text{ (min)} = 4^{(43^\circ\text{C} - T^\circ\text{C})} \quad (5.2)$$

Sin embargo, ésta ecuación es muy conservadora y en la actualidad se tiene que para observar daño en tejido blando se reportan umbrales de  $t_{43}$  que van desde los 10 hasta los 250 min, dependiendo del tejido [O'Brien WD, Miller MW 1989]. Así, en terapia, la eq.(5.2) se modifica [Sapareto SA, Dewhirst MW]:

$$t \text{ (min)} = t_{43} \cdot R^{(T(^{\circ}C)-43^{\circ}C)} \quad (5.3)$$

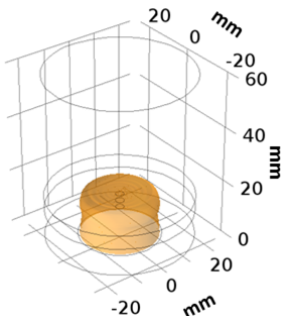
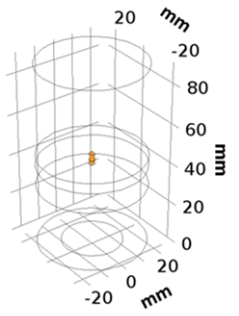
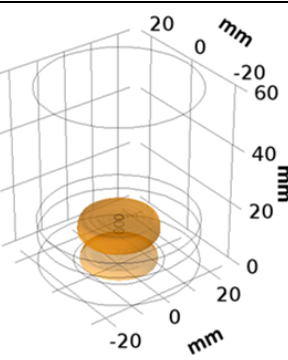
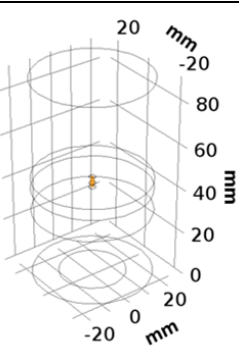
Donde  $R$  es una constante que vale 0.5 para temperaturas mayores que  $43^{\circ}C$  y 0.25 para menores. Considerando un valor promedio de  $t_{43} = 120 \text{ min}$  se calcula que, manteniendo la temperatura a  $56^{\circ}C$  durante 1 s, se estaría dañando el tejido (eq.(5.4)), y que con  $62^{\circ}C$  basta con 0.01 s (eq.(5.5)).

$$1 \text{ s} \approx 120 \text{ min} \cdot 0.5^{56^{\circ}-43^{\circ}} \quad (5.4)$$

$$0.01 \text{ s} \approx 120 \text{ min} \cdot 0.5^{62^{\circ}-43^{\circ}} \quad (5.5)$$

Respecto de una temperatura basal de  $37^{\circ}C$ , esto supone incrementos térmicos de  $19^{\circ}C$  y  $25^{\circ}C$  respectivamente. Para dar cuenta de la afectación que se tiene si los US no se aplican correctamente, se calcula el volumen de tejido que en las simulaciones ha alcanzado un incremento térmico de  $\geq 19^{\circ}C$  o  $\geq 25^{\circ}C$  con nuestra insonificación. Los resultados se recogen en la Tabla 5.4.

Tabla 5.4: Volumen de tejido que sufre daño térmico en cada modelo.

$\Delta T_{umbral}$	Pistón	$cm^3$	Focalizado	$cm^3$
$\geq 19^{\circ}C$ Ablación en 1 s		8.16		$2.2610^{-2}$
$\geq 25^{\circ}C$ Ablación en 0.01 s		3.67		$1.01 \cdot 10^{-2}$

Se comprueba que el volumen de tejido que supera el umbral es mucho mayor en el caso del transductor que tiene una apertura circular plana, obteniéndose que es un factor 361 y 363 mayor respecto del focalizado para  $19^{\circ}C$  y  $25^{\circ}C$ , respectivamente. Este hecho, unido a que es necesario que el transductor emita amplitudes de presión iniciales mucho más altas (un factor 6.7 en nuestra simulación), evidencia la necesidad del uso de transductores focalizados en Fisioterapia clínica.

Para estudiar los efectos de un nuevo tratamiento, antes de implantarse en clínica, es necesaria la experimentación con pequeños animales. Dadas las dimensiones de las extremidades de estos animales, la focalización complica el sistema experimental por lo que se usan transductores no focalizados y se estudia el campo a profundidades inferiores a 10 mm. Por ello, se desarrolla a continuación una sistemática para la toma de decisiones con un transductor tipo pistón de pequeñas dimensiones (1 cm de diámetro activo). Se proponen las dosis que debería emitir este transductor, teniendo en cuenta que, si se dispone de un transductor focalizado, las dosis de interés son las que en este trabajo se refieren a las alcanzadas en la zona patológica.

## 5. Protocolo de Ultrasonidos terapéuticos

### 5.1 Protocolo de insonificación combinado

Cada una de las insonificaciones que se combinan en esta propuesta se diseña por separado. Se resumen en la Tabla 5.5 las características y objetivos de cada uno de los tipos del tratamiento.

Tabla 5.5: Efectos de los US presentes en cada tipo de insonificación y objetivo con el que se diseña cada uno.

Pulso	Efecto térmico	Efecto mecánico	Objetivo
1	Sí	Sí (Baja amplitud)	Terminar con la hipoxia y la toxicidad (crisis energética) y reactivar el metabolismo de células disfuncionales o en estado latente.
2	No	Sí (Alta amplitud)	Favorece la difusión de sustancias (iones de Ca, K,...) debido al aumento de la permeabilidad de la membrana y potencia así el metabolismo celular, secretándose al medio sustancias favorables (factores de crecimiento, colágeno,...) y aumentando la migración y la proliferación. No produce calentamiento debido a absorción.

Se ha tomado como variable fija un tiempo total de tratamiento de 10 minutos y por tanto de 5 minutos para cada tipo de pulso, dado que éste es un tiempo típico en Fisioterapia clínica por US.

Es conocido que los cambios conformacionales de las estructuras proteicas y canales de las membranas plasmáticas asociados a la mecanotransducción se producen en tiempos comprendidos entre 1 ps y 1  $\mu$ s [Parker KK, Kolahi KS], por lo que el rango de frecuencias en el entorno de los MHz es adecuado para dar tiempo a este tipo de estructuras a reaccionar ante los cambios de presión asociados a los US. Dado que el estándar actual en Fisioterapia es de aplicar US de entre 1 y 3 MHz, se ha decidido hacer la propuesta dentro de dicho rango, consecuente con la elección de 2 MHz para el experimento in vitro descrito en el Capítulo 4.

La PRF con la que deben aplicarse los pulsos debe ser  $\geq 1$  ms en base a los resultados que se han obtenido en los experimentos con fibroblastos en el Capítulo 4, ya que la mayoría de procesos biológicos en las células ocurren en tiempos del orden del ms [Bao G, Diaz Chiguer D].

### 5.1.1 Pulso largo

#### 5.1.1.1 Efecto térmico del pulso largo

En base a lo comentado en el apartado de efectos térmicos del Capítulo 2 se ha tomado la decisión de que el tratamiento propuesto produzca un aumento de temperatura máximo ( $\Delta T_{max}$ ) en el tejido de 4 °C respecto a la temperatura basal.

Entre los efectos derivados de este calentamiento, es conocido que la tasa de perfusión sanguínea en un tejido aumenta, ya que es un mecanismo para mantener la homeostasis y disipar esa variación. *Zhang J et al* demuestran en su trabajo que el calentamiento predicho en un tratamiento de HIFU se ajusta mejor a los datos reales si consideran en sus modelos una tasa de perfusión sanguínea linealmente variable con la temperatura [Zhang J]. Para estimar el factor que aumenta la perfusión sanguínea con la temperatura respecto de su valor en músculo, *SF<sub>m</sub>*, *Drizdal T et al* emplean la expresión [Drizdal T]:

$$SF_m = \begin{cases} 1 + 7.9 e^{-\frac{(T-45)^2}{12}} & T \leq 45 \text{ °C} \\ 8.9 & T \geq 45 \text{ °C} \end{cases} \quad (5.6)$$

donde T es la temperatura del tejido. La expresión eq.(5.6) permite estimar que este  $\Delta T_{max}$  de 4 °C respecto de una T basal de 36 °C, produce un aumento del flujo de sangre de un factor 2.

La temperatura afecta también directamente a la tasa metabólica de muchos mecanismos biológicos gobernados por reacciones químicas. La cinética de las reacciones enzimáticas bioquímicas es proporcional al parámetro *B*, que varía con la temperatura de acuerdo al factor de Boltzman, *B*, de manera que se cumple que [Gillooly JF]:

$$B \approx e^{-E_i/k_B T} \quad (5.7)$$

donde  $E_i$  es la energía de activación, que posee un promedio de  $\approx 0.6$  eV y  $k_B$  es la constante de Boltzman, que vale  $8.62 \cdot 10^{-5}$  eV/K. Según la eq.(5.7), un incremento de 10 °C aumenta un factor 2.1 la tasa metabólica, lo cual concuerda con los valores que se recogen en la bibliografía [Szabo TL]. Para nuestro caso, empleando la eq.(5.7), se calcula que un incremento de 4 °C supone un incremento del metabolismo un factor 1.35.

Otro efecto conocido es la variación de la elasticidad del tejido cuando se calienta. En su trabajo, *De Broses ES et al* establecen una relación lineal entre el módulo de elasticidad y la dosis térmica (*CEM*, *Cumulative Equivalent Minutes* o  $t_{43}$ ), dada por [De Broses ES]:

$$CEM = t \cdot 0.25^{(43-T)} \quad (5.8)$$

donde *t* es el tiempo que se mantiene la *T*. Explican que la disminución de la rigidez se debe a la agregación de la miosina y estiman que con cada minuto de *CEM*, el modulo elástico decrece un 1.5 %. Si se mantienen los 4 °C durante los 5 minutos que dura el tratamiento, se obtiene una *CEM* de

0.08 minutos, con lo cual la variación en este parámetro es menor del 1 %. Esto permite afirmar que las propiedades del medio que dependen de los parámetros elásticos del medio (p.e.  $c$ ,  $Z$ ,  $\alpha$ ) se mantienen constantes durante el tratamiento.

En cuanto al modo de emisión, para este primer pulso se propone aplicar un DC corto (10 %) para poder incrementar la intensidad y tener una onda de amplitud mayor, dado que así se potencian también los posibles efectos no térmicos adicionales que puedan tener lugar.

### 5.1.1.2 Relación para el cálculo de los parámetros de insonificación del pulso largo

La evolución de la temperatura en un punto del tejido debido a la absorción de los US viene dada por la ecuación de bio-calor de Pennes, explicada en el apartado 4.1 del Capítulo 1 de esta tesis (eq.(1.21)).

Para simplificar su resolución analítica se consideran las siguientes simplificaciones:

- La atenuación se debe a la absorción de los US (se ignora el efecto del scattering).
- La única fuente de calor es la debida a la absorción del campo acústico ( $Q_{met} = 0$ ).
- Las propiedades de los tejidos son isótropas, constantes y no varían con la temperatura.
- Puede despreciarse la conducción térmica ( $\nabla(\kappa \nabla T) = 0$ ).
- El medio es infinito.

Con estas aproximaciones, la eq.(1.21) de bio-calor se reduce a:

$$\frac{\partial T}{\partial t} = \frac{Q}{\rho C_p} - \frac{C_{pb} w_b}{\rho C_p} (T - T_b) \quad (5.9)$$

donde  $w_b$  se mide en unidades de  $[\text{kg}/\text{m}^3 \text{ s}]$ . Llamando  $\varphi$  a  $\rho C_p / C_b w_b$ , la solución analítica de la ecuación es [Mast TD]:

$$\Delta T = \frac{Q t}{\rho C_p} \cdot \frac{1 - e^{-t/\varphi}}{t/\varphi} \quad (5.10)$$

Donde  $t$  es el tiempo que dura el tratamiento y  $\varphi$  representa el tiempo de perfusión sanguíneo característico para cada tejido. Si  $t/\varphi \rightarrow 0$  (bien porque el tiempo de tratamiento es mucho menor que  $\varphi$ , o bien porque la perfusión es muy lenta,  $\varphi \rightarrow \infty$ ) la eq.(5.10) se reduce a:

$$\Delta T = \frac{Q t}{\rho C_p} \quad (5.11)$$

$\varphi$  supone un umbral de duración para el cual el efecto de la perfusión sanguínea disminuye el calentamiento un factor  $1 - e^{-1}$  ( $\approx 37\%$ ). Con los valores de la perfusión en cada tejido (Tabla 5.2) el parámetro de  $\varphi$  se calcula:

$$\varphi_{musc} = \frac{\rho_{musc} \cdot C_{p_{musc}}}{C_b \cdot w_b} = \frac{1090 \frac{kg}{m^3} \cdot 3421 \frac{J}{kg \cdot ^\circ C}}{3617 \frac{J}{kg \cdot ^\circ C} \cdot 0.71 \frac{kg}{m^3 s}} \approx 1452 s \quad (5.12)$$

$$\varphi_{tend} = \frac{\rho_{tend} \cdot C_{p_{tend}}}{C_b \cdot w_b} = \frac{1142 \frac{kg}{m^3} \cdot 3432 \frac{J}{kg \cdot ^\circ C}}{3617 \frac{J}{kg \cdot ^\circ C} \cdot 0.58 \frac{kg}{m^3 s}} \approx 1868 s \quad (5.13)$$

Ambos tiempos son de un orden mayor que la duración impuesta para la insonificación ( $t = 300$  s). Sustituyendo el valor de  $Q$  (eq.(1.20)) en la eq.(5.10), se tiene que:

$$\Delta T = \frac{Q t}{\rho C_p} \cdot \frac{1 - e^{-t/\varphi}}{t/\varphi} \approx \frac{2 I_{SPTA} \alpha \cdot t}{\rho C_p} \cdot \varepsilon \quad (5.14)$$

donde  $\varepsilon$  es un parámetro asociado a la perfusión sanguínea. Sustituyendo el valor  $t/\varphi$  correspondiente en nuestro caso, se calcula que  $\varepsilon = 0.90$  para tejido muscular y  $\varepsilon = 0.92$  para tendón y ligamento. En base a esto se puede aproximar que el aumento de la temperatura será entre un 10 % y un 8 % menor si se tiene en cuenta la perfusión sanguínea respecto a si se ignora, lo cual se comprueba más adelante mediante simulación.

En la eq.(5.14) se puede ver que el  $\Delta T$  depende de varias características del medio ( $\alpha, \rho, C_p$ ). Llamando  $T_p$  a un parámetro que englobe estas propiedades del tejido, éste vendrá dado por:

$$T_p = \frac{2 \alpha}{\rho C_p} \quad (5.15)$$

Sustituyéndolo en la eq.(5.14), ésta se expresa ahora como:

$$\Delta T = T_p \cdot \varepsilon \cdot I_{SPTA} \cdot t \quad (5.16)$$

El parámetro  $T_p$  para músculo y tendón o ligamento se calcula sustituyendo los valores de la Tabla 5.2 en la eq.(5.15) como:

$$T_{p_{musc}} = \frac{2 \alpha_{musc}}{\rho_{musc} C_{p_{musc}}} = \frac{2 \cdot 7.1 f_0^{1.08}}{1090 \frac{kg}{m^3} \cdot 3421 \frac{J}{kg \cdot ^\circ C}} = 0.038 f_0^{1.08} \frac{^\circ C cm^2}{J} \quad (5.17)$$

$$T_{p_{tend}} = \frac{2 \alpha_{tend}}{\rho_{tend} C_{p_{tend}}} = \frac{2 \cdot 14.5 f_0^{1.17}}{1142 \frac{kg}{m^3} \cdot 3432 \frac{J}{kg \cdot ^\circ C}} = 0.074 f_0^{1.17} \frac{^\circ C cm^2}{J} \quad (5.18)$$

Cabe hacer notar que la proporción entre este parámetro para ambos tejidos se puede aproximar que es de 0.51. Esto implica que, si se insonifican con la misma intensidad, el  $\Delta T$  que se espera producir en el músculo es cerca de la mitad que el que se va a originar en un tendón o un ligamento.

Tomando un  $\Delta T_{max}$  de 4 °C, se calcula a continuación, despejando de la eq.(5.16) la intensidad de US necesaria para lograr dicho aumento en un músculo para una insonificación de 300 s con un transductor de 2 MHz.

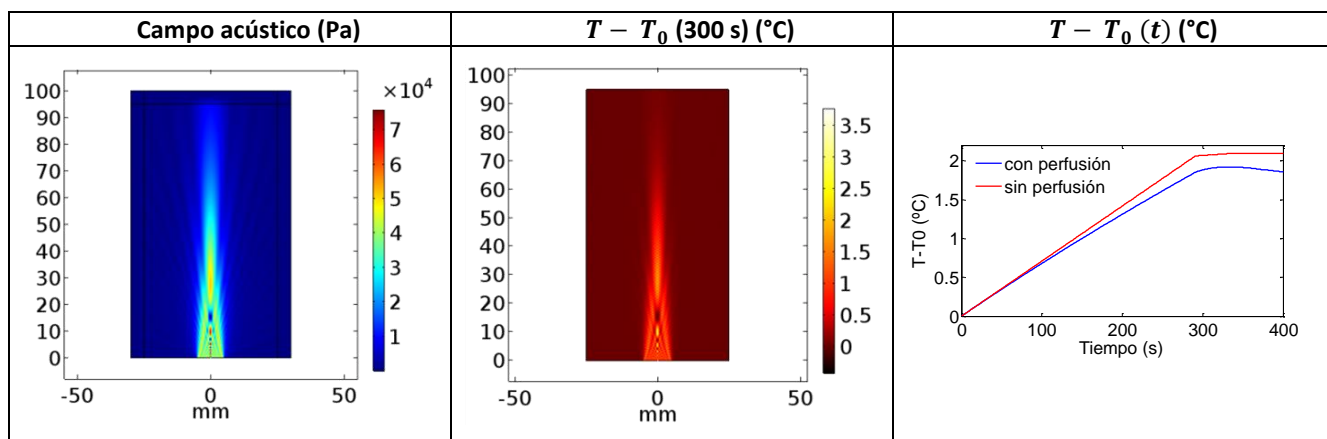
$$I_{SPTA} = \frac{\Delta T_{max}}{T_p \cdot \varepsilon \cdot t} = \frac{4 \text{ }^\circ\text{C}}{0.038 f_0 \frac{1.08 \text{ }^\circ\text{C cm}^2}{\text{J}} \cdot 0.90 \cdot 300 \text{ s}} \approx 0.18 \text{ W/cm}^2 \quad (5.19)$$

En un transductor tipo pistón la intensidad máxima puntual,  $I_{SPTA}$ , que se tiene en la distribución del campo acústico es cuatro veces la intensidad promedio que se emite,  $I_{SATA}$ , por lo que:

$$I_{SATA} = 0.25 \cdot I_{SPTA} = 0.25 \cdot 0.18 \text{ W/cm}^2 = 0.045 \text{ W/cm}^2 \quad (5.20)$$

Para comprobar este resultado se simula la evolución térmica de un tejido muscular semi infinito cuando se insonifica de forma continua con una apertura plana de 1 cm de diámetro que emite una potencia  $I_{SATA} = 0.045 \text{ W/cm}^2$  durante 300 s. Los resultados de la distribución del campo acústico que se transmite al músculo, el incremento de temperatura,  $T - T_0$ , que se produce transcurridos 300 s y su evolución en un punto situado en el centro y a 2 mm de profundidad, considerando y sin considerar la perfusión sanguínea, se muestran en la Tabla 5.6. La simulación se calcula con un paso temporal de 0.5 s, durante un tiempo total de 400 s.

Tabla 5.6: Resultados de la simulación para un transductor de  $I_{SATA} = 0.045 \text{ W/cm}^2$  que emite en músculo, con la aproximación de que la conductividad térmica es despreciable ( $k = 0$ ).



Se obtiene que la amplitud promedio de presión acústica cerca del origen es de 40 kPa, que corresponde con el valor que se calcula en músculo para un transductor con una intensidad  $I_{SATA} = 0.045 \text{ W/cm}^2$  con la expresión teórica que se deduce de la eq.(1.9):

$$P = \sqrt{2 \cdot I_{SATA} \cdot \rho_{musc} \cdot c_{musc}} \approx 39.6 \text{ kPa} \quad (5.21)$$

En la distribución del aumento de temperatura se tiene un incremento promedio de 0.9 °C. y un máximo puntual de 3.7 °C, próximos al  $\Delta T_{max}$  de 4 °C pretendido. Estos puntos coinciden con los

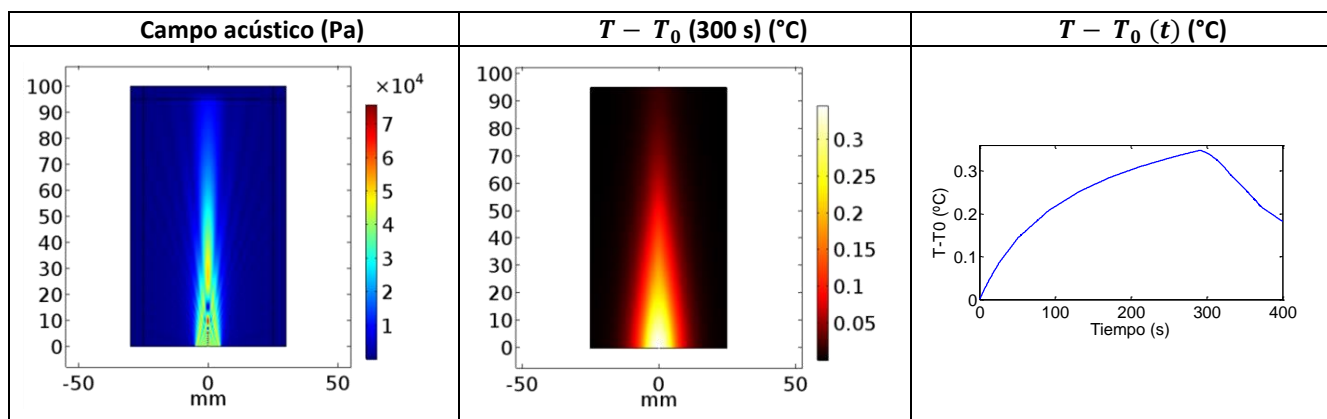


máximos de amplitud de presión e intensidad del campo acústico. Este hecho, en un caso real, no es tan acusado debido al efecto disipativo de la conductividad térmica, que hace que estos “puntos calientes” transfieran calor a su alrededor y el incremento térmico se homogenice en la zona.

Del registro de la evolución térmica de un punto situado a 2 mm de profundidad puede confirmarse que el efecto de la perfusión sanguínea reduce el calentamiento máximo de 2.07 °C a 1.88 °C. Esto implica una disminución de un 10 %, similar al calculado para músculo al establecer el valor del parámetro  $\varepsilon$  (eq.(5.14)). Además, puede notarse en el gráfico de la Tabla 5.6 que la temperatura cuando se apaga el transductor desciende más lentamente en el caso de desprejiciarse la perfusión sanguínea.

Para aproximarnos más a un caso real, se recalcula la simulación de este mismo modelo pero teniendo en cuenta, además de la perfusión sanguínea, la conductividad térmica del músculo. Los resultados se recogen en la Tabla 5.7.

Tabla 5.7: Resultados de la simulación para un transductor de  $I_{SATA} = 0.045 \text{ W/cm}^2$  que trabaja en músculo.



Siendo el campo acústico el mismo que en caso anterior, comparando esta distribución del incremento de temperatura con la mostrada en la Tabla 5.6 (sin conducción térmica) se puede ver que el efecto de la conducción térmica hace que la temperatura se homogeneice en la zona insonificada. Se reduce el calentamiento que se obtiene y los “puntos calientes” desaparecen. El registro para un punto en el centro y a 2 mm decae de un máximo de 1.88 °C a 0.35 °C. En base a esto, para dar cuenta del efecto de la conductividad térmica en nuestra expresión se introduce un nuevo parámetro,  $C$ , a la eq.(5.16), que ahora se expresa:

$$\Delta T = \frac{T_p \cdot \varepsilon \cdot I_{SPTA} \cdot t}{C} \quad (5.22)$$

Para músculo, en base a los resultados de la simulación, este parámetro  $C$  se calcula: frente a un  $\Delta T_{max}$  puntual esperado de 4 °C, obtenido sin considerar la conductividad, se ha obtenido un  $\Delta T_{max}$  de 0.35 °C (Tabla 5.7), es decir, el máximo se reduce un factor 11.4, que corresponde al valor de  $C$ .

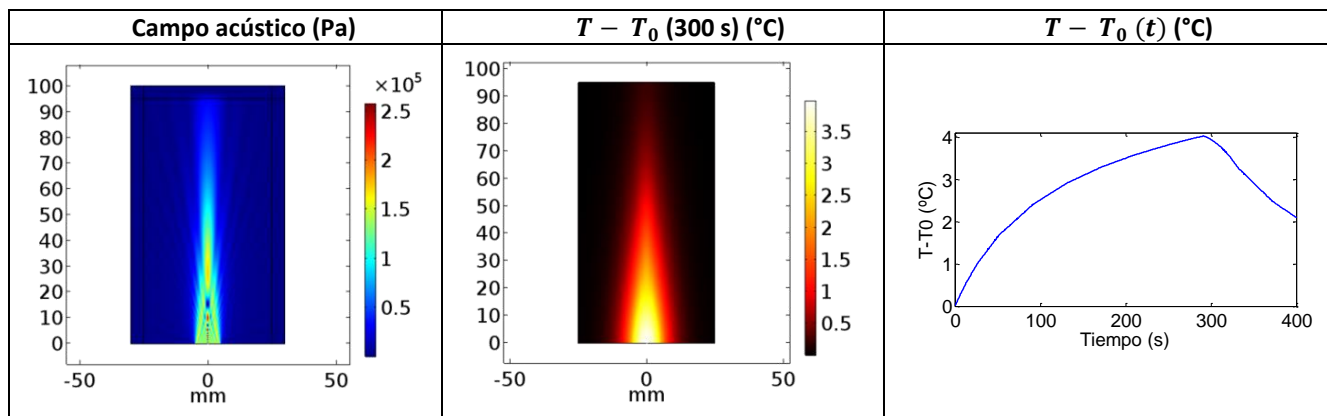
Así, la intensidad promedio que debe emitir en su superficie un transductor para lograr un  $\Delta T_{max}$  en el medio vendrá dada por:

$$I_{SATA} = \frac{1}{4} \cdot \frac{\Delta T_{max}}{T_p \cdot \varepsilon \cdot t} \cdot C \quad (5.23)$$

Con esta ecuación, de forma similar a como se ha hecho en la eq.(5.19), se calcula que, para lograr en tejido muscular un  $\Delta T_{max}$  de 4 °C con un transductor de 2 MHz, éste debiera trabajar con una intensidad en modo continuo de 0.51 W/cm<sup>2</sup>.

Para verificar este resultado, se realiza la simulación para este caso, considerándose tanto la perfusión sanguínea como la conductividad térmica del medio. Se obtienen las distribuciones de presión y temperatura mostradas en la Tabla 5.8. Se muestra también la evolución térmica de un punto a 2 mm de profundidad.

Tabla 5.8: Resultados de la simulación para un transductor de  $I_{SATA} = 0.51 \text{ W/cm}^2$  que trabaja en músculo.



La amplitud promedio de presión acústica que se obtiene cerca del origen es de 133 kPa. En la distribución del calentamiento se obtiene que el registro térmico máximo es de 4 °C y ocurre cerca de la superficie.

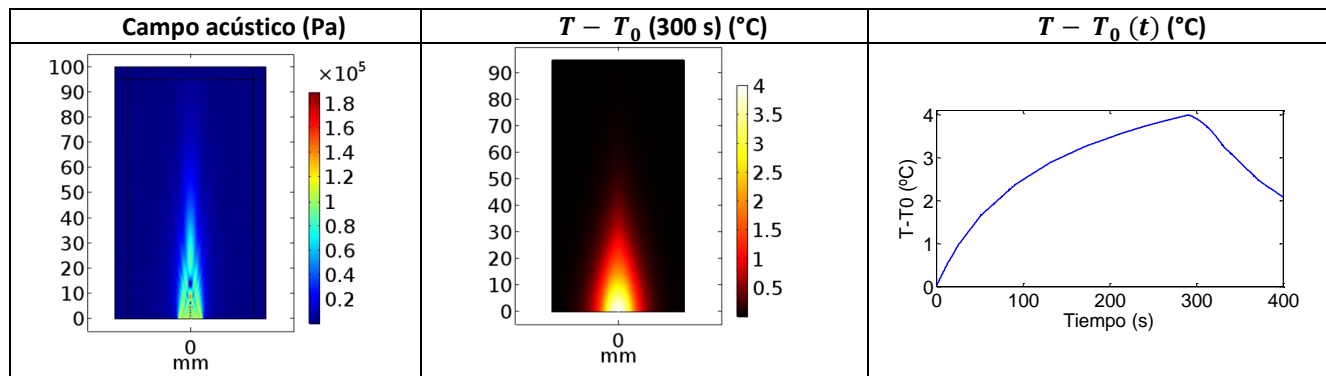
Siguiendo la misma metodología que para el caso del músculo se realizan las simulaciones para obtener el valor del parámetro C para el caso del tendón (datos no mostrados). Cuando se considera la conductividad térmica el calentamiento máximo en el medio pasa de 4 °C a 0.36 °C, obteniéndose por tanto que se reduce un factor 11.1, que corresponde a C en la eq.(5.22).

Así, sustituyendo en la eq.(5.23), se calcula que para lograr en 300 s en tejido tendinoso o ligamento un  $\Delta T_{max}$  de 4 °C con un transductor plano de 2 MHz se debe emitir en modo continuo una intensidad de:

$$I_{SATA} = \frac{1}{4} \cdot \frac{4 \text{ }^\circ\text{C}}{0.074 f_0^{1.17} \frac{\text{ }^\circ\text{C cm}^2}{\text{J}} \cdot 0.92 \cdot 300 \text{ s}} \cdot 11.1 \approx 0.25 \text{ W/cm}^2 \quad (5.24)$$

Simulando este caso, como se ha hecho en la Tabla 5.8 para músculo, se obtienen las distribuciones de presión y temperatura recogidas en la Tabla 5.9, para un tejido tendinoso.

Tabla 5.9: Resultados de la simulación para un transductor de  $I_{SATA} = 0.25 \text{ W/cm}^2$  que trabaja en tendón.



La amplitud promedio de presión acústica que se obtiene cerca del origen es de 100.1 kPa. En la distribución del incremento de temperatura se obtienen los 4 °C esperados.

En las distribuciones del incremento de T obtenidas, tanto para el caso muscular como de tendón (Tabla 5.8 y 5.9, respectivamente), se observa que el aumento más relevante se produce en las zonas próximas a la superficie y el calentamiento que se obtiene decae con la profundidad. Esto ocurre para transductores no focalizados. Para cuantificar este hecho se registra en la simulación para músculo el incremento de temperatura que se obtiene en función de la profundidad en los puntos del eje axial central ( $r=0$ ) para diferentes instantes: 100 s, 200 s y 300 s. Los resultados se recogen en la Tabla 5.10. Cabe esperar que la tendencia de los datos sea la misma que se tiene para la amplitud de presión acústica, es decir, decaigan con una tendencia exponencial, como se expresa en la eq.(1.5). En base a esto, se realizan ajustes de las curvas obtenidas a una función de la forma  $\Delta T = k e^{-a z (mm)}$ .

Tabla 5.10: Evolución del incremento de temperatura que se registra en los puntos del eje axial central para un tejido muscular insonificando con un transductor de 2 MHz que emite una  $I_{SATA} = 0.51 \text{ W/cm}^2$  y resultados del ajuste de las curvas obtenidas a una función de la forma:  $\Delta T = k e^{-a z (mm)}$ .

Gráfico	Instante	k	a	R
	100 s	3.05	0.031	0.9810
	200 s	4.17	0.031	0.9885
	300 s	4.67	0.032	0.9915

El valor de  $a$  que se obtiene para todos los casos es muy próximo a  $2 \alpha_{musc}$  para una frecuencia de 2 MHz, que valdría 0.0302 Np/mm según los parámetros de la Tabla 5.3. Se tiene, por tanto, que

si lo que se quiere es calentar una zona que está a una profundidad  $z$  de cierto tejido, se ha de incrementar el valor de la  $I_{SATA}$  que habría que aplicar por un factor que tenga en cuenta la atenuación que va a sufrir, y que valdrá:

$$e^{2 \alpha_{tejido} \left(\frac{Np}{m}\right) z (m)} \quad (5.25)$$

Si se emplea un modo pulsado en lugar de emisión continua se pueden aplicar en la zona intensidades más altas sin sobre calentar el tejido. Aproximando que el incremento de temperatura que se produce es directamente proporcional al tiempo total de insonificación y, por tanto, al DC se puede proponer la siguiente ecuación general que establezca la intensidad que debe emitir el transductor tipo pistón mientras está funcionando para alcanzar un  $\Delta T_{max}$ :

$$I [W/cm^2] = \frac{1}{4} \cdot \frac{\Delta T_{max}}{T_p \cdot \varepsilon \cdot t \cdot DC} \cdot C \cdot e^{2 \alpha_{tejido} \left(\frac{Np}{m}\right) z (m)} \quad (5.26)$$

A modo de resumen, se recoge en la Tabla 5.11 la explicación de lo que representa cada parámetro de la eq.(5.26) y su valor correspondiente, según se trate de un músculo o un tendón o ligamento.

Tabla 5.11: Significado y valor de los parámetros que aparecen en la eq.(5.26), según el tejido que corresponda.

Parámetro	Significado	Valor mús.	Valor tend.	Observaciones
$I$	Intensidad que emite el transductor	-	-	Valor en $W/cm^2$ , mientras el transductor está funcionando ( $I_{TP}$ )
$\Delta T_{max}$	Incremento máximo de temperatura que se quiere alcanzar en el tejido	-	-	Valor en °C
$t$	Tiempo de tratamiento	-	-	Valor en s
$DC$	Ciclo de trabajo con el que emite el transductor	-	-	Valor en tanto por 1. Es decir, un modo continuo corresponde a un valor de DC de 1 y un modo 1:1 o 50 % a un DC de 0.5.
$T_p$	Parámetro que considera el tipo de tejido	$0.038 f_0^{1.08}$	$0.074 f_0^{1.17}$	Calculados según las propiedades de cada tejido recogidas en las Tablas 5.2 y 5.3
$\varepsilon$	Parámetro que considera la perfusión sanguínea	0.90	0.92	
$C$	Parámetro que considera la conducción térmica	11.4	11.1	
$\alpha_{tejido}$	Parámetro que considera la atenuación del tejido	$7.1 f_0^{1.08}$	$14.5 f_0^{1.17}$	Valor en Np/m $f_0$ en MHz
$z$	Profundidad a la que se mide el incremento de temperatura	-	-	Valor en m

### 5.1.1.3 Verificación de la relación propuesta para el pulso largo

Para verificar experimentalmente la eq.(5.26), se dispone en el laboratorio de un transductor tipo pistón diseñado para ensayos con pequeños animales con una frecuencia de 2 MHz (Fig.5.2) y 1

cm de diámetro emitiendo sobre un tejido muscular ex vivo (muestra de codillo de ternera). En la Fig.5.9A puede verse una imagen tomada durante la insonificación. Se transmite un pulso de excitación al transductor de 200 ciclos con una PRF de 1 ms (DC = 0.1) y una amplitud de 30 Vpp durante 300 s. El registro de la señal acústica que se tiene, en el mismo punto donde se va a medir la temperatura dentro del tejido, a 2 mm de la superficie, se muestra en la Fig.5.8.

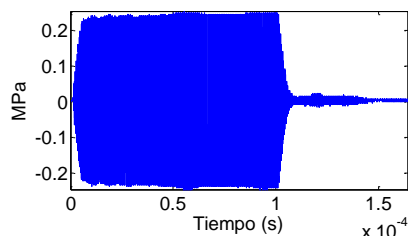


Fig. 5.8: Señal de presión acústica registrada con un hidrófono en una muestra de tejido muscular ex vivo para un pulso de 200 ciclos de 2 MHz y un voltaje de excitación del transductor de 30 Vpp.

Con una amplitud de presión acústica máxima de 0.24 MPa como la que se obtiene, se calcula con la eq.(1.9) que la intensidad a la que corresponde es de  $1.66 \text{ W/cm}^2$ .

Se calcula para esta intensidad el  $\Delta T$  que se espera con la eq.(5.26) propuesta. En la insonificación de un tejido ex vivo no hay perfusión sanguínea, por lo que se considera que  $\varepsilon$  para este caso vale 1. A una profundidad de unos 2 mm el factor que considera la atenuación vale:

$$e^{2 \alpha_{\text{tejido}} \left(\frac{Np}{m}\right) z(m)} = e^{2 \cdot 15 \left(\frac{Np}{m}\right) 2 \cdot 10^{-3} (m)} = 1.06 \quad (5.27)$$

Sustituyendo todos los parámetros que corresponden según lo mostrado en la Tabla 5.11 se tiene que el incremento de temperatura esperado es de:

$$\Delta T_{\text{max}} [^{\circ}\text{C}] = 4 \cdot \frac{T_p \cdot \varepsilon \cdot t \cdot DC}{C \cdot e^{2 \alpha_{\text{tejido}} \left(\frac{Np}{m}\right) z(m)}} \cdot I = 1.3^{\circ}\text{C} \quad (5.28)$$

Para verificar este resultado se introduce el termopar en la muestra de tejido a 2 mm de profundidad, como aparece en la Fig.5.9A y se aplican los US durante 5 minutos. El registro que se obtiene de la temperatura durante la insonificación se muestra en la Fig.5.9B

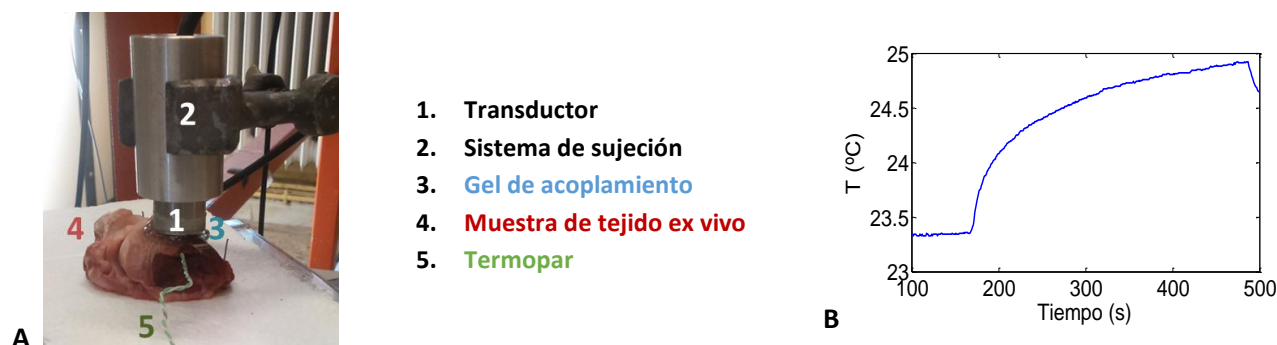


Fig. 5.9: (A) Disposición en laboratorio del sistema para medir el incremento de temperatura en el tejido. (B) Registro obtenido para una insonificación de 300 s,  $1.66 \text{ W/cm}^2$ , DC = 0.1.

**MIFU: Propuesta de un protocolo de Ultrasonidos terapéuticos para el tratamiento de lesiones crónicas de tejido blando**

El incremento de temperatura que se mide experimentalmente es de 1.6 °C. Este valor está 0.3 °C por encima de lo predicho con la eq.(5.28). El error es atribuible a las reflexiones que se producen debido a las dimensiones finitas del tejido, que hacen que haya más energía, y a diferencias en las propiedades acústicas entre un tejido in vivo y ex vivo.

Para verificar la aplicabilidad de la eq.(5.26) en tratamientos in vivo, se realiza una búsqueda bibliográfica de estudios clínicos que cuantifiquen el calentamiento que se produce en tejido muscular y tendinoso con US. Los resultados de estos trabajos y su referencia se recogen en la Tabla 5.12. Estos estudios se usan en la actualidad como base para establecer los parámetros relacionados con los efectos térmicos con US.

**Tabla 5.12: Estudios del calentamiento in vivo con un tratamiento de US aplicado con un transductor tipo pistón.**

$I_{SATA}$ $W/cm^2$	$f_0$ $MHz$	Tejido	Profundidad cm	Área insonificada	$\Delta T/min$ $^{\circ}C/min$	Referencia
1	1	músculo	2.5 y 5	2 ERA	0.16	[Draper DO 1995]
1	3	músculo	0.8 y 1.6	2 ERA	0.58	[Draper DO 1995]
1.4	3	músculo	3	3 ERA	0.55	[Franson J]
1.5	3	músculo	2.5	2 ERA	1.19	[Hayes BT]
0.5	3	músculo	2	2 ERA	0.28	[Gallo JA]
1	3	tendón	1	2 ERA	1.33	[Draper DO (1) 2010]
1	3	tendón	1	2 ERA	2.1	[Chan AK]
1	3	tendón	1	4 ERA	1.3	[Chan AK]

En estos trabajos el área insonificada es mayor que el cabezal del transductor ( $n$  veces ERA) por lo que el calentamiento que se obtiene es menor que si el transductor se quedara inmóvil, como considera nuestro modelo. En una primera aproximación, se asume una relación inversamente proporcional entre el área insonificada y el calor que se transmite a la misma y, en consecuencia, el incremento de temperatura. Teniendo esto en cuenta se comparan en la parte sombreada de la Tabla 5.13, las tasas de calentamiento ( $\Delta T/min \cdot ERA$ ) que se obtienen en estos trabajos con la que se predice si se aplica la eq.(5.26) propuesta.

**Tabla 5.13: Comparación de las tasas de calentamiento in vivo de estudios publicados y las obtenidas aplicando la eq.(5.26).**

Referencia	$I_{SATA}$ $W/cm^2$	$f_0$ $MHz$	Tejido	Profundidad cm	$\Delta T/min ERA$ $^{\circ}C/min$	$\Delta T/min ERA_{calc}$ $^{\circ}C/min$	Error %
[Draper DO 1995]	1	1	músculo	3.7	0.32	0.42	31
[Draper DO 1995]	1	3	músculo	1.2	1.16	1.35	16
[Franson J]	1.4	3	músculo	3	1.65	0.82	50
[Hayes BT]	1.5	3	músculo	2.5	2.38	1.11	53
[Gallo JA]	0.5	3	músculo	2	0.56	0.47	16
[Draper DO (1) 2010]	1	3	tendón	1	2.66	1.87	30
[Chan AK]	1	3	tendón	1	4.2	1.87	55
[Chan AK]	1	3	tendón	1	5.2	1.87	64

Las diferencias en la tasa del incremento de temperatura que se han obtenido entre los valores calculados con la eq.(5.26) respecto de medidas reales in vivo, están comprendidas entre un 16 % y un 64 %. Las desigualdades más altas corresponden a las obtenidas respecto al estudio de *Chan AK et al* en tendón [Chan AK]. En referencia a este resultado, se alega en la discusión del trabajo posterior de *Draper DO et al* que las diferencias entre ambos estudios pudieran surgir debido a la presencia de hueso en el campo de tratamiento de *Chan AK et al* [Draper DO (1) 2010]. Es conocido que, debido a la diferencia de impedancias acústicas, la capa cortical del hueso supone una reflexión de un porcentaje muy alto del campo acústico. Para dar cuenta de este hecho se muestran en la Tabla 5.14 los coeficientes de reflexión,  $\Gamma$ , obtenidos para el caso de una interfaz músculo/hueso o tendón/hueso.

**Tabla 5.14: Propiedades acústicas de tejidos biológicos y coeficiente de reflexión en una interfaz de hueso.**

Medio	$\rho$ <i>kg/m<sup>3</sup></i>	<i>c</i> <i>m/s</i>	<i>Z</i> <i>kg/m<sup>2</sup>s</i>	$\Gamma$ Tejido/hueso
Hueso (cortical)	1908	3515	$6.71 \cdot 10^6$	-
Músculo	1090	1588	$1.73 \cdot 10^6$	0.59
Tendón/Ligamento	1142	1750	$2.00 \cdot 10^6$	0.54

Según la Tabla 5.14, en la interfaz se refleja cerca del 60 % del campo y, por tanto, la intensidad que recibe el tejido se verá incrementada debido a la superposición de ondas.

Otro hecho al que se le puede atribuir nuestra infraestimación del calentamiento en comparación con los casos clínicos para tendón es que la eq.(5.26) considera que toda la atenuación es debida a tejido tendinoso, mientras que en el caso real hay piel y músculo antes del mismo, por lo que no será tan alta. Si se recalcula la eq.(5.26) considerando que la atenuación es debida a 0.5 cm de músculo y a 0.5 cm de tendón en lugar de únicamente 1 cm de tendón, la tasa de calentamiento calculada pasa de 1.87 °C/min a 2.96 °C/min, la cual supone una diferencia del 11 % respecto a la de *Draper DO et al* [Draper DO (1) 2010].

En los casos en los que se mide el calentamiento en tejido muscular, si se comparan los trabajos de *Draper DO et al* con los de *Franson J et al* y *Hayes BT et al*, posteriores, se tiene una controversia [Draper DO 1995, Franson J, Hayes BT]. Los tres trabajos se realizan en el músculo del tríceps sural, pero el incremento de temperatura en los dos últimos es mayor que el esperado si se tiene en cuenta que, a pesar de aplicarse mayor intensidad, también se mide a mayor profundidad y por tanto se tiene mayor atenuación. El error en este caso puede ser atribuible a la presencia de hueso en las proximidades de la zona a la que se está midiendo.

El valor del coeficiente de atenuación en tejido blando viene dado por un componente debido a la absorción y otro debido al scattering, que aquí se ha ignorado. Estudios como el de *Damianou CA et al* cuantifican que a 37 °C el fenómeno de absorción contribuye al 73 % de la atenuación total en músculo [Damianou CA]. Esto es concordante con la consideración de que la absorción supone entre el 60 % y el 80 % de la atenuación total en tejido blando, según *Ter Haar G* [Ter Haar G 1999].

Según esto, las tasas que se obtienen con la eq.(5.26) están sobrevaloradas. Este hecho justifica las diferencias obtenidas con los estudios de *Draper DO et al* en músculo [Draper DO 1995].

Otra posible fuente de error es el hecho de considerar que las propiedades de los tejidos se mantienen constantes durante toda la insonificación. En los 10 minutos que dura el tratamiento de *Draper DO et al* en el que se alcanzan  $\Delta T$  de 1.6 °C y 5.8 °C, dependiendo de la profundidad, se incrementa la perfusión en la zona un factor 1.08 y 4.36, respectivamente según la eq.(5.6) (considerando una T basal de 36 °C). Esto supone que el parámetro  $\varphi$  decrece ese mismo factor respecto al considerado y, en consecuencia, el valor de  $\varepsilon$  sería 0.89 o 0.66, según el caso, ambos menores que el 0.9 empleado en los cálculos. Este hecho justifica en parte por qué nuestras tasas de calentamiento son mayores que las de este autor.

Dadas las diferencias obtenidas y la justificación hecha de las mismas, se considera que la eq.(5.26) es una buena aproximación para calcular la intensidad que se ha de aplicar para lograr un incremento de temperatura en el tejido. En base a las diferencias obtenidas con estudios ya publicados (tabla 5.13), el error que se tiene, respecto a un caso in vivo en el que no se tienen interfaces de hueso se estima que es de un 30 %.

## 5.1.2 Pulso corto

### 5.1.2.1 Efecto mecánico del pulso corto

Con el pulso corto se pretende alcanzar un valor umbral de amplitud de presión que provoque en las células el efecto necesario para potenciar su metabolismo, en ausencia de agentes de contraste artificiales. De esta manera, la propia onda es la responsable de la estimulación mecánica en las células o de la activación de los micronúcleos naturalmente presentes en los tejidos.

Cuando la célula está en reposo, posee cierta presión intracelular positiva debido a la concentración osmótica que mantiene. Adicionalmente, las adhesiones entre el citoesqueleto y la membrana le llevan a mantener cierta rigidez. Estos factores hacen que en ausencia de fuerzas externas la membrana de las células de los tejidos humanos posea cierta tensión superficial, típicamente en el orden de  $\tau_{rep} = 10^{-5} N/m$  [Gauthier NC, Charras GT].

Cuando se somete la célula a una presión externa o a una tensión que supera un valor crítico ( $\tau_c$ ) se produce su rotura ya que la superficie de la membrana solamente es capaz de incrementar su área cerca de un 3-5 % antes de que los enlaces entre bilípidos se rompan [Morris CE]. Este umbral depende de factores como son la composición y enlaces presentes en la membrana [Olbrich K], si hay poros ya presentes o no y, dado que es un proceso dinámico, depende también de la tasa a la que se aplique esta tensión, siendo el umbral menor si ésta se transfiere más lentamente [Leontiadou H].




Se recogen en la Tabla 5.15 valores representativos de las propiedades reportadas en la bibliografía para células de tejido blando en mamíferos.

**Tabla 5.15: Propiedades mecánicas de las células de tejido blando en mamíferos.**

Propiedad	Valor	Referencia
Tamaño	6 a 40 $\mu\text{m}$	[Rubin DM]
Módulo de compresibilidad citoplasma (K)	4 TPa	[Rubin DM]
Módulo de Young membrana (Y)	20 MPa	[Picas L]
Tensión en reposo en la membrana de las células de mamíferos ( $\tau_{rep}$ )	0.01-0.04 mN/m	[Gauthier NC]
Tensión para producir lisis en la membrana de células de músculo esquelético ( $\tau_c$ )	12 mN/m	[Morris CE]
Tensión para la activación de los canales mecanosensibles ( $\tau_{act}$ )	1 mN/m	
Fuerza activación de los canales mecanosensibles	10-20 pN	

Las dimensiones de las células ( $\approx 10 \mu\text{m}$ ) son mucho menores que la  $\lambda$  de los US ( $\approx \text{mm}$ ) por lo que éstas reciben el estímulo de US como una variación de presión hidrostática. En una primera aproximación la célula puede considerarse como una esfera de radio  $R_c$ , sometida a una presión hidrostática externa,  $P$ , que varía con la frecuencia de la señal de manera que:



$$P = \frac{F}{S} = \frac{F}{4 \pi R_c^2} \rightarrow F = P \cdot 4 \pi R_c^2 \quad (5.29)$$

Esta presión tiene una gran influencia sobre la tensión cortical en la membrana. Dado el alto módulo de compresibilidad de las células ( $K \approx 4 \cdot 10^{12} \text{ Pa}$ , Tabla 5.15) se comportan como cuerpos incompresibles [Yang T], por lo que se puede considerar que su forma y volumen se mantienen constantes [Gauthier NC]. De esta manera, la tensión a la que está sometida la membrana debida a esta presión externa es:

$$\tau = \frac{F}{l} = \frac{P \cdot 4 \pi R_c^2}{2 \pi R_c} = P \cdot 2 \cdot R_c \quad (5.30)$$

Con la eq.(5.30) y los valores de la Tabla 5.15 para la tensión de la membrana celular en reposo,  $\tau_{rep}$ , y crítica,  $\tau_c$ , se puede estimar el factor de variación de la presión respecto de la situación de reposo que produce lisis celular como:

$$\frac{\tau_c}{\tau_{rep}} \approx \frac{P_c}{P_{rep}} \approx \frac{12 \text{ mN/m}}{0.025 \text{ mN/m}} \approx 500 \quad (5.31)$$

Considerando que la presión en reposo es la atmosférica (1 atm), se puede aproximar que:

$$P_c \approx 500 \cdot P_{rep} = 500 \cdot 1 \text{ atm} = 500 \cdot 0.101 \text{ MPa} \approx 50 \text{ MPa} \quad (5.32)$$

Es decir, con presiones del orden de 50 MPa se logra provocar la rotura de la membrana. Este umbral es concordante con los 20 MPa a los que *Leontitiadou H et al* estima que se comienzan a reorganizar los lípidos de la membrana y se forman poros [Leontitiadou H]. Este resultado justificaría por qué en ausencia de agentes de contraste no se observa daño en el tejido hasta amplitudes de 40 MPa [Izadifar Z].

Siguiendo el mismo razonamiento con la  $\tau_{act}$  necesaria para la activación de los canales mecanosensibles [Morris CE] se calcula que con una amplitud de un orden menor, 5 MPa se logra su estimulación. Este valor es parecido al estimado en la eq.(5.33) considerando el valor de la fuerza necesaria para producir este efecto (Tabla 5.15), teniendo en cuenta que las dimensiones de las estructuras mecanosensoras de la membrana son del orden de los nm.

$$P = \frac{F}{S} \approx \frac{10 \text{ pN}}{\text{nm}^2} = \frac{10 \cdot 10^{-12}}{(10^{-9})^2} \text{ Pa} = 10 \text{ MPa} \quad (5.33)$$

En base a esto, se establece que en nuestro pulso se deben emplear amplitudes comprendidas entre 5 y 10 MPa si se pretende estimular mecánicamente a la célula sin causarle daño físico. Este rango de presión está por debajo de los niveles comúnmente usados en HIFU y SW ( $\geq 10 \text{ MPa}$ ) pero es mayor que los empleados en US terapéuticos convencionales ( $3W/cm^2 \approx 0.3 \text{ MPa}$ ). Nos encontramos por tanto en un rango de amplitud de presión acústica intermedio (MIFU).

La presencia de agentes de contraste magnifica la acción de la presión acústica debido a la oscilación de las burbujas [Krasovitski B] por lo que los umbrales para observar daño son menores. Así, con una amplitud de tan solo 2 MPa ya se ha observado daño en las células endoteliales de la microvasculatura de los músculos [Izadifar Z]. La potencialidad de un pulso de US para dar lugar a fenómenos no térmicos viene dada por su índice mecánico (MI) (eq.(3.8)). La FDA (*Food and Drug Administration*) establece un umbral de MI = 1.9 para la aplicación diagnóstica de los US en presencia de microagentes de contraste, considerándose ya peligroso un MI  $\geq 0.7$  [Rubin DM, Voig JU]. A partir de estos valores empiezan a tenerse en cuenta sus posibles aplicaciones terapéuticas. Un MI de 1.9 supone una amplitud de 3.3 MPa, 2.7 MPa y 1.9 MPa para una frecuencia de 3 MHz, 2 MHz y 1 MHz, respectivamente, todos menores que los 5 MPa propuestos para nuestro caso, pero se ha de tener en cuenta que no se incluyen agentes de contraste.

La aplicabilidad de una insonificación con un pulso corto de 5 MPa de amplitud puede apoyarse en trabajos como el de *Schratzberger P et al*, que obtiene con pulsos de 30 ciclos de US de 1 MHz con un MI de 1.8 ( $100 \text{ W/cm}^2, \approx 1.8 \text{ MPa}$ ) un aumento de hasta un factor 20.4 en la permeabilidad de las membranas plasmáticas de las células del cuádriceps en una muestra de conejos [Schratzberger P]. Comprueban que la integridad del tejido no se ve modificada y no se produce un aumento relevante de la temperatura, por lo que esta consecuencia es atribuible a una estimulación mecánica. *Dalecki D et al* obtienen que el umbral para crear hemorragia debido a la rotura de las células endoteliales en la cabeza de fetos de ratones con US de 1.2 MHz supone una presión de compresión y rarefacción de 4 MPa y 2.5 MPa (MI = 2.3), respectivamente [Dalecki D

1999]. Sin evidencias de efectos térmicos ni agentes cavitantes, este estudio sugiere que la causa del daño sea puramente mecánica. Es conocido que el tejido circundante afecta a la rigidez de la membrana, y que las células endoteliales de la parte interna de los vasos son las primeras en dañarse. *VanBavel E* en su revisión sobre los efectos del estrés mecánico en las células endoteliales explica que el uso de una amplitud de rarefacción de 2 MPa conlleva la apertura de canales y la síntesis de compuestos oxidativos (p.e. *NO*) [VanBavel E].

En nuestros experimentos realizados con fibroblastos en el Capítulo 4 se estudia el efecto de un pulso de 5 ciclos con una amplitud máxima de 1.01 MPa. No se observa daño físico (la membrana está íntegra) pero hay pequeñas variaciones en el número de individuos (Tabla 4.9) y diferencias en la morfología nuclear (presencia binucleos, Tabla 4.12) por lo que sí se confirma que hay un efecto mecánico. Si se aumenta el nivel de presión hasta los 5 MPa se prevé lograr una mayor estimulación de las células del tejido muscular y tendinoso, sin todavía causar un daño irreversible y aumentando su permeabilidad, según los valores de tensión de la membrana plasmática reportados en la Tabla 5.15. Con esta amplitud, en base a los umbrales de presión de *VanBavel et al* y *Dalecki D et al*, puede producirse daño en las células endoteliales de pequeños vasos sanguíneos. Esto no tiene por qué tener un efecto perjudicial en el individuo [Dalecki D 1999, VanBavel E], dado que aumenta la transfección de nutrientes y promueve la angiogénesis. De hecho, uno de los efectos observados en estudios con US es el aumento de la producción de VEGF, una proteína señalizadora implicada en el crecimiento de vasos sanguíneos, insonificando diferentes tipos celulares [Doan N].

El umbral de cavitación de fluidos biológicos se sitúa entre 11 y 24 MPa [Hill CR 2004]. Dado que se propone emplear una amplitud menor y el pulso dura muy poco tiempo ( $\approx \mu\text{s}$ ) se descarta que este fenómeno pueda estar presente en una situación in vivo.

El pulso corto que se propone tiene cierto parecido con una onda de choque de las generadas con los equipos comerciales de tipo radial para Fisioterapia. Para este tipo de terapias se emplean del orden de 1000 pulsos, separados tiempos del orden del s (PRF  $\approx$  Hz) y con amplitudes de presión acústica cerca de un orden de magnitud mayor que las nuestras (entre 10 y 100 MPa). En las investigaciones realizadas sobre la aplicación de SW a cultivos celulares se concluye que el efecto que se logra es más dependiente del número de pulsos que del incremento de la amplitud [Feigl T, Johannes EJ].

Buscando una magnitud física que permita comparar los resultados que se obtienen con SW y los que se puedan obtener con el tratamiento que se propone, se ha elegido la energía total entregada al tejido. Por ello, el número de estímulos que deben darse a las células con el pulso corto propuesto debe ser dos órdenes mayor que los empleados en SW. Dado que se dispone de 300 s de tratamiento, si quisieran darse 100.000 pulsos, éstos han de emitirse con una PRF de 3 ms. Para la PRF ha de tenerse en cuenta el umbral del *ms* establecido en el capítulo anterior como la separación mínima para que los estímulos sean recibidos por la célula de manera individual.

**5.1.2.2 Relación para el cálculo de los parámetros de insonificación del pulso corto**

En un experimento con pequeños animales para estudiar el efecto de un pulso corto de US, la profundidad a la que se encuentran las estructuras es pequeña ( $\approx$  mm). Aunque los efectos de la difracción están presentes, se decide que una primera aproximación para conocer la intensidad que se necesita emitir con el transductor es la que se obtiene con las relaciones para la propagación de una onda plana en el medio. La expresión para la amplitud inicial de la onda de presión,  $P_0$ , transmitida al medio por un transductor tipo pistón que trabaja con una intensidad  $I_{SATA}$  es:

$$P_0 = \sqrt{2 \cdot I_{SATA} \cdot \rho_{tejido} \cdot c_{tejido}} \quad (5.34)$$

Sabiendo que ésta se atenúa conforme se propaga siguiendo la ley exponencial de la eq.(1.10), sustituyendo el valor de  $P_0$ , puede escribirse:

$$P(z) = \sqrt{2 \cdot \rho_{tejido} \cdot c_{tejido} \cdot I_{SATA} [W/cm^2] \cdot 100} \cdot e^{-\alpha_{tejido} \left(\frac{Np}{m}\right) z (m)} \quad (5.35)$$

Siguiendo con el procedimiento llevado a cabo para el pulso largo, se introduce un parámetro  $T'_p$  con las características del medio, dado por:

$$T'_p = \sqrt{2 \cdot \rho_{tejido} \cdot c_{tejido} / 10} \quad (5.36)$$

Despejando de la eq.(5.35) se tiene que la intensidad que debe emitir el transductor para lograr alcanzar una amplitud de presión acústica  $P(z)$  en un punto a profundidad  $z$  se obtiene como:

$$I [W/cm^2] = \left[ \frac{P(z) [kPa]}{T'_p \cdot e^{-\alpha_{tejido} \left(\frac{Np}{m}\right) z (m)}} \right]^2 \quad (5.37)$$

La eq.(5.37) depende de varios parámetros, dados por las expresiones de la Tabla 5.16 según se trate un músculo o un tendón o ligamento.

**Tabla 5.16: Significado y valor de los parámetros que aparecen en la eq.(5.16), según el tejido que corresponda.**

Parámetro	Significado	Valor mús.	Valor tend.	Observaciones
$I$	Intensidad con la que debe emitir el transductor	-	-	Valor en $W/cm^2$ , mientras el transductor está funcionando ( $I_{TP}$ )
$P(z)$	Amplitud de presión acústica que se quiere alcanzar en el tejido	-	-	Valor en kPa
$T'_p$	Parámetro que considera el tipo de tejido	186.1	199.9	Calculados según las propiedades de cada tejido recogidas en las Tablas 5.2 y 5.3
$\alpha_{tejido}$	Parámetro que considera la atenuación del tejido	$7.1 f_0^{1.08}$	$14.5 f_0^{1.17}$	Valor en Np/m $f_0$ en MHz
$z$	Profundidad a la que se mide el incremento de temperatura	-	-	Valor en m

### 5.1.2.3 Verificación de la relación propuesta para el pulso corto

La eq.(5.37) es válida para el caso de una onda plana. En nuestro caso, debido al tamaño finito de la apertura, la difracción se hace efectiva y aleja el campo acústico del caso ideal. Para dar cuenta de las diferencias que se tienen se realiza la simulación de la evolución temporal de un pulso corto de US emitido por una apertura plana circular de 2 MHz y 1 cm de diámetro en un tejido muscular semi infinito. Con la eq.(5.37) se calcula que, para que a 2 cm de profundidad se tenga una onda progresiva de 1 MPa ( $10^3 \text{ kPa}$ ) en tejido muscular, la intensidad a la que debe funcionar un transductor tipo pistón es de:

$$I_{SATA} [W/cm^2] = \left[ \frac{10^3 \text{ kPa}}{186.1 \cdot e^{-15 \left(\frac{Np}{m}\right) 0.02 (m)}} \right]^2 = 52.6 [W/cm^2] \quad (5.38)$$

Por lo tanto, según la eq.(5.34) la onda que se emite originalmente al medio tiene una amplitud de 1.35 MPa.

En los estudios temporales de simulación, en lugar de un parámetro de atenuación, se ha de especificar la viscosidad del medio. Se considera para nuestro modelo que el parámetro de viscosidad dinámica,  $\mu$ , cumple la relación [Stokes GG]:

$$\alpha = \frac{2 \mu (2\pi f_0)^2}{3 \rho c^3} \quad (5.39)$$

De manera que para este caso el valor de  $\mu$  en tejido muscular es de:

$$\mu = \frac{15 \text{ Np/m} \cdot 3 \cdot 1090 \text{ kg/m}^3 \cdot (1588 \text{ m/s})^3}{2 \cdot 4\pi^2 \cdot (2 \cdot 10^6)^2} = 0.63 \text{ Pa} \cdot \text{s} \quad (5.41)$$

Con estas condiciones se simula la evolución temporal de un impulso de 6 ciclos como el mostrado en la Fig.5.10, con la amplitud de desplazamiento necesaria para que el transductor emita al medio una onda de presión inicial de 1.35 MPa (40 nm). El estudio temporal se lleva a cabo durante un tiempo total de 20  $\mu\text{s}$ , con un paso de 0.01  $\mu\text{s}$ . En ese tiempo el pulso recorre una distancia de  $\approx 31.8 \text{ mm}$ .

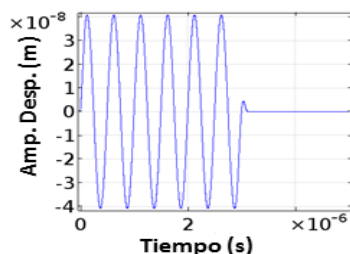


Fig. 5.10: Amplitud de desplazamiento impuesta a la apertura circular plana de 1 cm de diámetro

En las Fig.5.11A, Fig.5.11B y Fig.5.11C se calcula la distribución de la amplitud de presión cuando el pulso se está propagando, justo al inicio ( $\approx 0.5 \text{ mm}$ ,  $t = 1 \mu\text{s}$ ), a una distancia cerca de la

superficie de emisión ( $\approx 4$  mm,  $t = 3$   $\mu$ s) y cuando está en un punto más alejado ( $\approx 2$  cm,  $t = 12.3$   $\mu$ s). En las distribuciones, puede notarse que el pulso está afectado por la interferencia a partir del segundo ciclo.

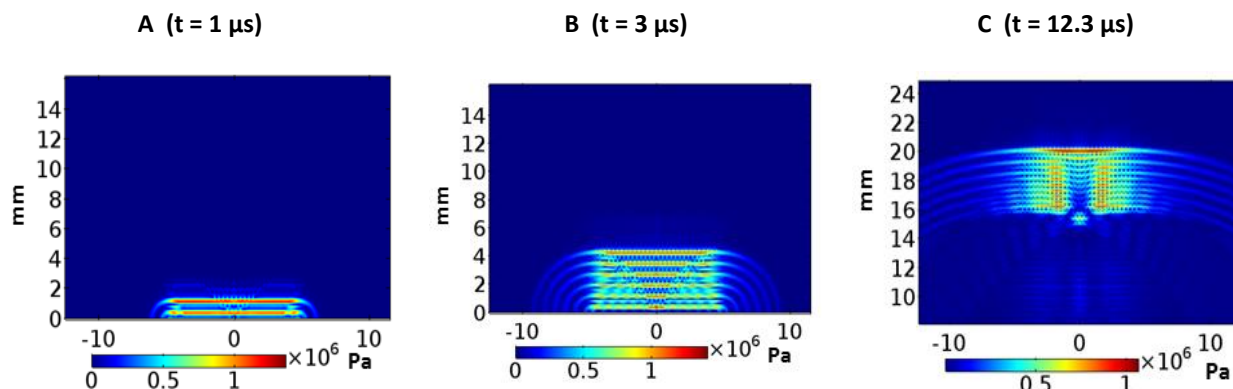


Fig. 5.11: Distribución 2D de la amplitud de presión máxima para (A)  $t = 1$   $\mu$ s, (B)  $t = 3$   $\mu$ s ( $z \approx 4$  mm) y (C)  $t = 12.3$   $\mu$ s ( $z \approx 20$  mm).

Se cumple que para una amplitud inicial de 1.36 MPa (Fig.5.11A), la amplitud de presión con la que llega el primer ciclo a una profundidad de 2 cm es de 1.07 MPa (Fig.5.11C), sin embargo, el resto del pulso se ve modificado por la difracción. En base a esto, sólo puede aproximarse que el primer ciclo cumple las relaciones deducidas en el apartado 5.1.2.2 de este capítulo para una onda plana. Este resultado alerta de que ha de tenerse en cuenta que con los transductores que convencionalmente se emplean en este tipo de estudios, el estímulo que se reciba en cada punto en una insonificación de pequeños animales o en clínica será diferente si no se emplea un pulso de un solo ciclo.

Para profundizar más en este hecho, se considera el caso en el que se insonifica con el pulso de la Fig.5.12A la extremidad de un animal pequeño, p.e una rata. Esta forma del pulso es más similar a la que emite un transductor de terapia que el de la Fig.5.10. Esta simulación se lleva a cabo durante un tiempo total de 15  $\mu$ s, con un paso de 5 ps.

Reproduciendo la colocación de un hidrófono a 5 mm de profundidad, en el gráfico de la Fig.5.12B se representa la señal que se registra en el punto central ( $r = 0$ ), a 2 mm y a 4 mm del eje axial. En los instantes señalados en este gráfico (1:  $t = 4.185$   $\mu$ s; 2:  $t = 4.895$   $\mu$ s, 3:  $t = 5.69$   $\mu$ s, 4:  $t = 6.975$   $\mu$ s) se obtienen en la Fig.5.12C la distribución en el plano transversal ( $xy$ ) a 5 mm de profundidad del valor absoluto de la presión acústica máxima. Debajo, en la Fig.5.12D, se muestra la distribución en esos mismos instantes en el plano axial ( $zx$ ). Se señala en esta última con una línea discontinua blanca la localización del plano transversal correspondiente que se ha representado encima. En las proyecciones  $xy$  se incluye un círculo negro que representa el contorno del transductor ( $r = 5$  mm).

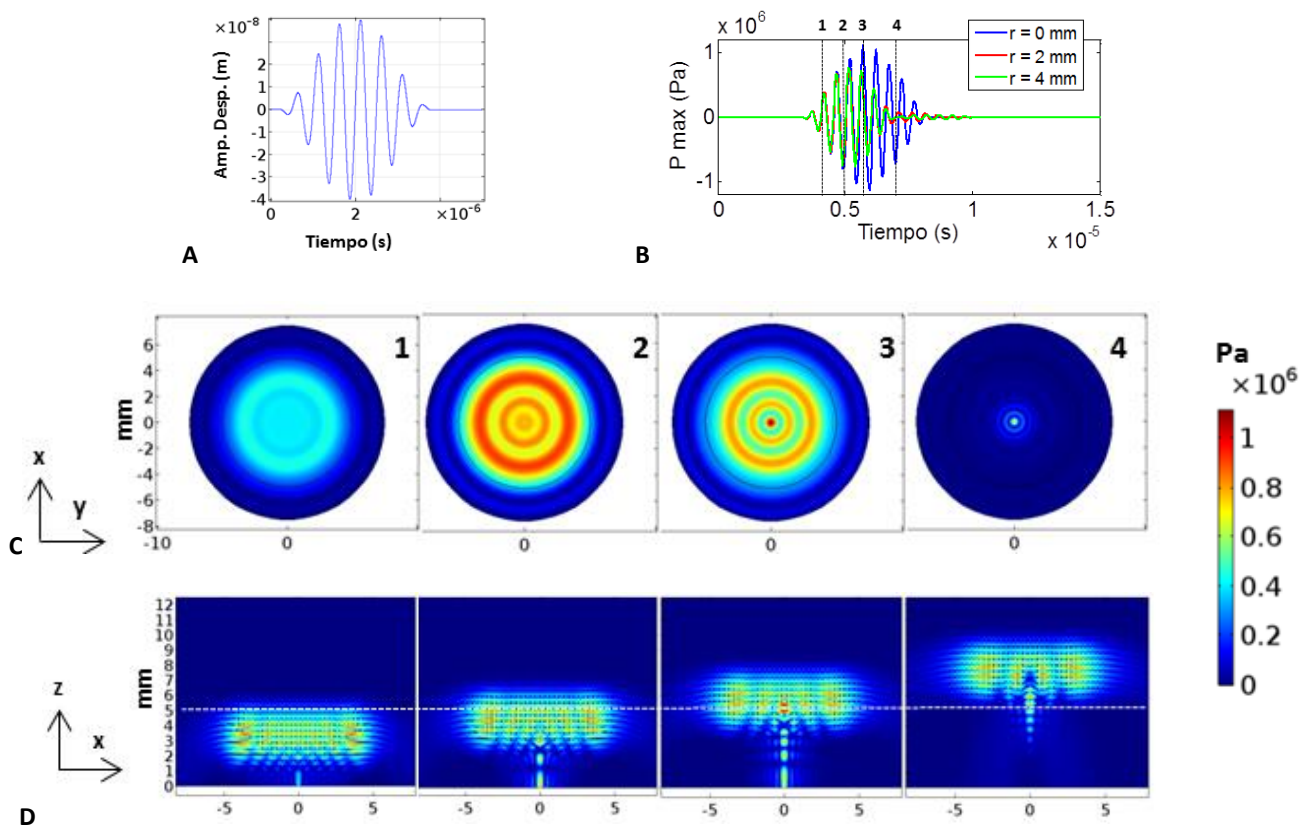


Fig. 5.12: (A) Amplitud de desplazamiento impuesta a la apertura circular plana de 1 cm de diámetro. (B) Registro de la señal acústica en puntos situados a 5 mm de profundidad. Distribución 2D de la amplitud máxima de presión los instantes señalados en un plano (C) xy y (D) zx.

En la Fig.5.12B se comprueba que los registros son diferentes para cada punto. El máximo para puntos alejados del centro es de 0.77 MPa, frente a los 1.13 MPa que se alcanzan en el centro. En las distribuciones de la Fig.5.12C puede apreciarse que el efecto de la difracción hace que, a partir del segundo ciclo, la amplitud adquiera un patrón anular.

Este transductor emite una onda inicial de 0.87 MPa para el desplazamiento impuesto (Fig.5.12A), por lo que a 5 mm se esperan obtener amplitudes de 0.8 MPa, dada la atenuación del músculo (Tabla 5.3). Se observa en las distribuciones de la Fig.5.12D que se alcanzan estas presiones, pero no en la homogeneidad de la superficie ni durante toda la duración del pulso. Para cuantificar este hecho se calcula la evolución temporal de la superficie total del plano transversal situado a 5 mm que tiene una amplitud de presión de, al menos, 0.8 MPa. El resultado se representa en la Fig.5.13A.

Ha de tenerse también en cuenta que, debido a la superposición de las ondas originadas por difracción, se alcanzarán máximos mayores que los esperados para el caso de una onda plana propagándose, sobretodo en la parte central del eje axial. Se calcula en la Fig.5.13B el máximo de presión acústica que se registra en cada instante en el mismo plano.

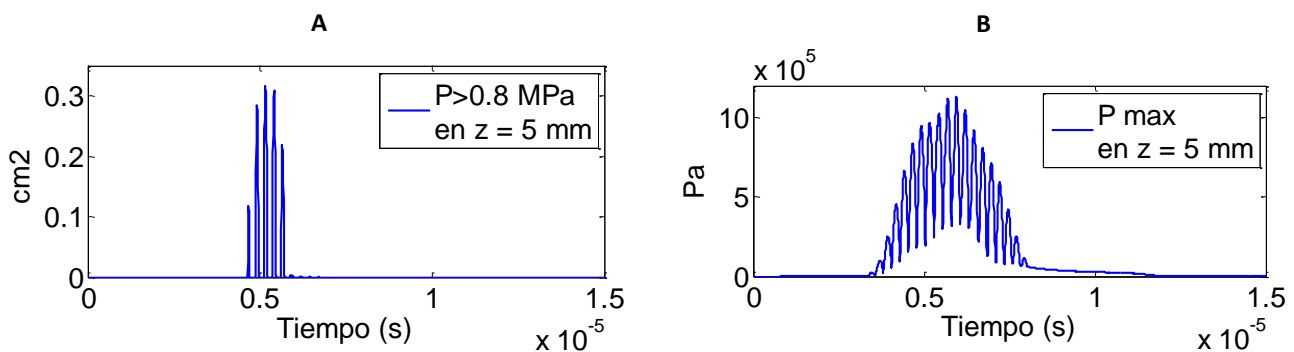


Fig. 5.13: Evolución temporal en el plano transversal a  $z = 5$  mm de (A) superficie con una amplitud  $\geq 0.8$  MPa y (B) la presión acústica máxima puntual.

Si se considera que la superficie insonificada puede aproximarse a la del transductor ( $\approx 0.78$   $cm^2$ ) se obtiene que, el 41 % ( $0.32$   $cm^2$ ) recibirá al menos un ciclo con la amplitud umbral. Sin embargo, ha de tenerse también en cuenta que se alcanzan presiones puntuales de hasta 1.13 MPa, un 40 % mayor que las esperadas, y los posibles efectos derivados que éstas puedan tener. Estos resultados alertan sobre la necesidad de hacer un estudio previo del campo acústico que se tiene para asegurarnos que se está dando la dosis que se pretende. No obstante, a pesar de que no se logra la insonificación homogénea, cabe esperar que efectos puntuales que se desencadenen a nivel celular tengan repercusión sobre los organismos circundantes y se obtengan luego efectos biológicos promedio en la zona.

## 6. Discusión

En este trabajo se propone una sistemática para establecer las características de la insonificación que se ha de aplicar en un tratamiento novedoso que combina los efectos térmicos y mecánicos de los US. Se proponen la eq.(5.26) y la eq.(5.37) que permiten calcular los parámetros de dosificación de los dos protocolos que se combinan, según se tenga la lesión en un músculo o en un tendón o ligamento.

Para poder comparar los niveles que se obtienen con los de la bibliografía, se calculan las dosis para las frecuencias más comunes: 1 MHz y 3 MHz. En los manuales y trabajos en los que se basa la dosificación que actualmente se aplica en Fisioterapia se sugiere una única insonificación con una frecuencia de 3 MHz para lesiones superficiales y 1 MHz para profundas, el modo continuo o pulsos largos para lesiones crónicas y pulsos cortos en agudas [Watson T 2002].

En la actualidad las dosis se cuantifican en términos de intensidad ( $I$ ) y ciclo de trabajo ( $DC$ ) en la modalidad de TUS, similar a la de nuestro primer protocolo. Por otro lado, se emplea el parámetro de densidad de energía ( $\rho_E$ ) y número de pulsos ( $n$ ) en SW, que es la modalidad más parecida a nuestro segundo protocolo. Para nuestro protocolo se considera que, en el caso del pulso largo, la duración del mismo sea de 100  $\mu s$  ( $DC = 0.1$  y  $PRF = 1$  ms). Para el pulso corto, para poder



**MIFU: Propuesta de un protocolo de Ultrasonidos terapéuticos para el tratamiento de lesiones crónicas de tejido blando**

aproximar que se tiene una insonificación homogénea, se considera que se emite un pulso de tan sólo un ciclo de 1 MHz (en base a lo mostrado en el apartado 5.1.2.3). En los casos prácticos deberán comprobarse los niveles de presión acústica que se tienen según el voltaje en bornes del transductor para asegurar que se alcanzan las amplitudes oportunas (en este caso 5 MPa). El tiempo total que el transductor está funcionando es de 300 s con cada pulso. En el caso del corto se considera que en total se emiten 100.000 pulsos.

Se calculan con las relaciones propuestas (eq.(5.26) y eq.(5.37)) tanto los parámetros de salida del transductor, es decir, los que se medirían en su superficie de emisión, como lo que se tienen en el punto donde se localiza la lesión, z, con la intensidad que corresponde, recogidos estos últimos en la parte sombreada y denotados con el índice (z) en la Tabla 5.17, para los dos tejidos estudiados y para diferentes profundidades de la lesión (1 mm, 1 cm o 2 cm).

**Tabla 5.17: Valores de los parámetros acústicos de los dos protocolos del tratamiento combinado que se propone en este trabajo, para diferentes tejidos y según la profundidad de la lesión.**

Profundidad de la lesión	Pulso largo para lograr un $\Delta T$ de 4 °C con un transductor de 3 MHz, un DC del 10 %				Pulso corto para lograr una P de 5 MPa con un transductor de 1 MHz		
	1 mm	1 cm	2 cm		1 mm	1 cm	2 cm
Músculo	3.5	5.4	8.6	$I_{SATP}$ (W/cm <sup>2</sup> )	732.1	832	958.9
	0.35	0.43	0.55	$P_0$ (MPa)	5	5.4	5.8
	107	162	258	$\rho_E total$ (J/cm <sup>2</sup> )	73	83	96
	0.34	0.34	0.34	$P_z$ (MPa)	5	5	5
	3.4	3.4	3.4	$I_{SATP(z)}$ (W/cm <sup>2</sup> )	722	722	722
	0.34	0.34	0.34	$\rho_E pulso(z)$ (mJ/cm <sup>2</sup> )	0.72	0.72	0.72
	102	102	102	$\rho_E total(z)$ (J/cm <sup>2</sup> )	72	72	72
Tendón Ligamento	1.7	4.3	12.2	$I_{SATP}$ (W/cm <sup>2</sup> )	644	836.1	1117.4
	0.26	0.41	0.7	$P_0$ (MPa)	5.1	5.8	6.7
	50	129	367	$\rho_E total$ (J/cm <sup>2</sup> )	64	84	112
	0.24	0.24	0.24	$P_z$ (MPa)	5	5	5
	1.5	1.5	1.5	$I_{SATP(z)}$ (W/cm <sup>2</sup> )	625.6	625.6	625.6
	0.15	0.15	0.15	$\rho_E pulso(z)$ (mJ/cm <sup>2</sup> )	0.63	0.63	0.63
	45	45	45	$\rho_E total(z)$ (J/cm <sup>2</sup> )	63	63	63

Comparando las intensidades de salida del transductor propuestas para tejido tendinoso o muscular (primeras filas de la Tabla 5.17), se obtiene que para un caso en el que la lesión se sitúe a poca profundidad ( $\approx$  mm) y el efecto de la atenuación sea muy pequeño, para lograr el mismo efecto térmico se debe aplicar en el tendón una intensidad menor, al ser su absorción mayor debido su alto contenido proteico ( $I_{SATP} = 1.7 W/cm^2$  en tendón frente a  $I_{SATP} = 3.5 W/cm^2$  en músculo). En el caso de querer potenciar los efectos mecánicos con un pulso muy corto, la intensidad requerida también es menor al ser la impedancia acústica del tendón un factor 1.15 mayor respecto de la del músculo y, en consecuencia, la amplitud de presión de la onda transmitida mayor ( $I_{SATP} = 644 W/cm^2$  en tendón frente a  $I_{SATP} = 732.1 W/cm^2$  en músculo). Estas diferencias se mantienen en las dosis requeridas en la zona patológica (filas sombreadas de la Tabla 5.17), por las mismas razones.

Cuando la lesión se localiza a una profundidad media ( $\approx 1$  cm) la atenuación comienza a hacerse notable. Para lograr el mismo efecto térmico, sigue necesitándose menor intensidad en el tendón ( $I_{SATP} = 4.3 W/cm^2$  en tendón frente a  $I_{SATP} = 5.4 W/cm^2$  en músculo) pero se obtiene una diferencia mucho menor que en el caso anterior, al compensarse el  $\Delta T$ , proporcional al coeficiente de atenuación, con la disminución de intensidad a medida que la onda acústica penetra en el medio. Sin embargo, para lograr el mismo efecto mecánico, puesto que se emplea una frecuencia con una atenuación más pequeña, se compensa la diferencia de impedancia acústica con el efecto de la atenuación y las intensidades que se precisan son parecidas ( $I_{SATP} = 836.1 W/cm^2$  en tendón frente a  $I_{SATP} = 832 W/cm^2$  en músculo).

Para una profundidad grande ( $\approx 2$  cm) la atenuación ya tiene un efecto relevante, sobre todo en el pulso largo, donde se emplea la frecuencia más alta. En el tendón el transductor emite con una intensidad mayor para lograr el calentamiento y los tejidos previos resultarán también más afectados ( $I_{SATP} = 12.2 W/cm^2$  en tendón frente a  $I_{SATP} = 8.6 W/cm^2$  en músculo). En el pulso corto, aunque sigue requiriéndose mayor intensidad para lograr la misma amplitud de presión acústica en la zona, la diferencia es menor al emplearse una frecuencia con menor atenuación ( $I_{SATP} = 1117.4 W/cm^2$  en tendón frente a  $I_{SATP} = 958.9 W/cm^2$  en músculo).

Para lograr la misma dosis terapéutica en la zona, la  $I_{SATP}$ , la  $P_0$  y la  $\rho_{E\ total}$  que se ha de emitir al medio desde la superficie de un transductor tipo pistón es mayor según la profundidad a la que se quiere alcanzar esta dosis. Esto supone la sobredosificación y posibles efectos adversos sobre los tejidos previos (p.e. debido a un sobre calentamiento como se ha demostrado en el apartado 4 de este capítulo). La alternativa para evitar esto es la focalización de los US. Logrando esto, los parámetros relevantes únicamente son los que se han de alcanzar en la lesión (parte sombreada de la Tabla 5.17).

En base a la bibliografía revisada, que se muestra más adelante en las Tablas 5.19 y 5.20, en la Tabla 5.18 se recogen los órdenes de los parámetros dosimétricos correspondientes a cada una de las tres modalidades terapéuticas que se usan actualmente: TUS, LIPUS y SW, comparadas con las que se proponen en este trabajo (Pulso largo y Pulso corto).

Tabla 5.18: Órdenes de magnitud de los parámetros acústicos de las modalidades de US terapéuticos que se emplean en la actualidad y las propuestas en este trabajo.

Modalidad	P (MPa)	$\rho_E$ pulso ( $\text{mJ}/\text{cm}^2$ )	I ( $\text{W}/\text{cm}^2$ )	$\rho_{E_{total}}$ ( $\text{J}/\text{cm}^2$ )	$t_{tratam.}$ (min)
TUS	0.1	1-10	1	10-100	1
LIPUS	0.01	0.01	0.1	10-100	10
SW	10	10-100	1000	10-100	10
Pulso largo	0.1-1	0.1-1	1-10	10-100	5
Pulso corto	1	0.1-1	100	10-100	5

El parámetro común a las tres modalidades usadas es la densidad de energía total que se libera ( $\rho_{E_{total}}$ ). Esto sugiere que existen efectos biológicos relacionados con esta magnitud. Si se observa la Tabla 5.18, las densidades que se aplican en la zona patológica con nuestros dos protocolos también son del mismo orden que las que se recomienda emplear en la actualidad para obtener efectos beneficiosos con otros tratamientos. Esto nos permite deducir que, si este es un parámetro guía, podemos plantear que los efectos encontrados y reportados con las terapias convencionales pueden también producirse con nuestro tratamiento.

Lo que particulariza a nuestra modalidad de tratamiento respecto a las que están ya implantadas en clínica, aparte de la combinación de protocolos, es que implica amplitudes de presión acústica e intensidades instantáneas mayores que las de LIPUS y TUS pero menores que las de SW, emitidas con pulsos con densidades de energía menor, lo que en promedio lleva a una energía total similar.

La densidad de energía que se libera por pulso ( $\rho_{E_{pulso}}(z)$ ) en nuestros protocolos es al menos un orden de magnitud menor que en el caso de los pulsos convencionales de TUS y las SW ( $0.1 \text{ mJ}/\text{cm}^2$  frente a los  $10 \text{ mJ}/\text{cm}^2$  empleados en la actualidad) y mayores que las que tienen los pulsos de LIPUS. Esto es debido a que los pulsos largos que se emplean en nuestro caso son más cortos que los comúnmente empleados en TUS (de 0.1 ms frente a los 1-5 ms de estos últimos) y a que las amplitudes que se emiten en el pulso corto son menores que las que emplean las SW ( $> 10 \text{ MPa}$ ).

Según lo obtenido en la Tabla 5.17, con el protocolo del pulso largo se transfieren a la zona patológica del músculo o tendón  $102 \text{ J}/\text{cm}^2$  o  $45 \text{ J}/\text{cm}^2$ , respectivamente. Con el protocolo del pulso corto la dosis en el punto patológico es de  $72 \text{ J}/\text{cm}^2$  o  $63 \text{ J}/\text{cm}^2$ , según se trate de un músculo o un tendón. Para facilitar la comparación entre estos resultados y las dosis empleadas en estudios bibliográficos que corroboran la efectividad de los US terapéuticos in vivo, se recogen en la Tabla 5.19 los parámetros de éstos últimos.

**MIFU: Propuesta de un protocolo de Ultrasonidos terapéuticos para el tratamiento de lesiones crónicas de tejido blando**

**Tabla 5.19: Referencias bibliográficas que muestran resultados positivos en la aplicación de US terapéuticos in vivo y sugieren parámetros de dosificación clínicos.**

Modalidad	Patología	Tratamiento	$\rho_E$ pulso (mJ/cm <sup>2</sup> )	$P_0$ (MPa)	$\rho_E$ total (J/cm <sup>2</sup> )	Referencia
TUS	Lesión crónica	1 W/cm <sup>2</sup> DC=1 2 W/cm <sup>2</sup> DC=0.5	10	0.19 0.26	60	[Watson T 2002]
	Contractura lumbar	1.5 W/cm <sup>2</sup> DC=1 2 W/cm <sup>2</sup> DC=0.5	10	0.23 0.26	50	[Rodríguez Martín JM]
	Atrofia muscular	1 W/cm <sup>2</sup> DC=0.2	10	0.42	180	[Matsumoto Y]
	Tendinitis crónica	0.5 W/cm <sup>2</sup> DC=1 1 W/cm <sup>2</sup> DC=0.5	5	0.14 0.20	45	[Rodríguez Martín JM]
	Tendinitis con calcificaciones	2.5 W/cm <sup>2</sup> DC=0.2	5	0.29	150	[Ebenbichler GR]
LIPUS	Contractura articular de rodilla	150mW/cm <sup>2</sup> DC=0.2	0.03	0.07	18	[Watanabe M]
	Tendinitis	150mW/cm <sup>2</sup> DC=0.2	0.03	0.07	36	[Hsu AR]
SW	Tendinitis	1000 pulsos	23	15*	23	[Sems A]
	Tendinitis	1500 pulsos	29	17*	44	[Hsu RWW]
	Tendinitis	500 pulsos	12	11*	6	[Wang CJ]
	Tendinitis	200 pulsos	16	13*	3	[Chen YJ]
	Isquemia muscular	300 pulsos	10	10*	3	[Holfeld J]

\*Estimando que para una SW con una amplitud de 10 MPa se tiene una  $\rho_E$  de 10 mJ/cm<sup>2</sup>, eq.(5.1)

En lesiones musculares, el *Rodríguez Martín JM* sugiere aplicar el modo continuo o bien un DC de 0.5 hasta emitir una energía total de 50 J/cm<sup>2</sup>, similar a la energía total que se obtiene con un tratamiento como el propuesto por *Watson T*, de 60 J/cm<sup>2</sup> [Rodríguez Martín JM, Watson T 2002]. En estos tratamientos los autores sugieren 1 min como tiempo total de insonificación. En nuestro caso, se mantiene el transductor funcionando 5 min, pero se aplica un DC menor. En la bibliografía se encuentra que la mayoría de Fisioterapeutas tratan este tipo de lesiones en sus clínicas aplicando US en modo continuo con intensidades de entre 1 W/cm<sup>2</sup> y 2 W/cm<sup>2</sup> durante una media de 5 minutos [Warden SJ], por lo que superarían las dosis recomendadas en estos manuales. Las densidades de energía que se aplican en estudios in vivo con TUS [Ebenbichler GR, Matsumoto Y] son del orden de las obtenidas con nuestros protocolos.

En los tratamientos de una lesión crónica con SW, a pesar de emitirse una forma de pulso completamente diferente que con TUS o LIPUS, se tiene que en clínica se termina aplicando una  $\rho_E$  total del mismo orden (decenas de J/cm<sup>2</sup>). Generalmente los tratamientos con energías menores corresponden a estudios en pequeños animales [Holfeld J, Chen YJ, Wang CJ].

Entre los efectos no térmicos asociados a los US que caben esperar a nivel celular, se recogen en la Tabla 5.20 algunos de los que se han reportado en trabajos que han empleado diferentes tipos de insonificación, incluidos los obtenidos en nuestros experimentos con fibroblastos en el Capítulo 4.

**MIFU: Propuesta de un protocolo de Ultrasonidos terapéuticos para el tratamiento de lesiones crónicas de tejido blando**

**Tabla 5.20: Referencias bibliográficas que muestran resultados positivos en la aplicación de US terapéuticos y sugieren parámetros de dosificación en estudios in vitro.**

Modalidad	Efecto logrado	Tratamiento	$\rho_E \text{ pulso}$ (mJ/cm <sup>2</sup> )	$P_0$ (MPa)	$\rho_E \text{ total}$ (J/cm <sup>2</sup> )	Referencia
TUS	Alteraciones cromosómicas	1 W/cm <sup>2</sup> DC=0.2	2	0.17	18	[De Deyne PG]
	Mayor consumo de Ca	5 W/cm <sup>2</sup> DC=0.2	10	0.38	60	[Mortimer AJ]
	Mayor síntesis de ADN, proteínas y citoquinas	2 W/cm <sup>2</sup> DC=0.2	4	0.24	120	[Doan N]
LIPUS	Mayor consumo de calceína	26 mW/cm <sup>2</sup> DC=0.75	0.02	0.03	70	[Domenici F]
	Formación de adhesiones focales y activación de proteínas	150mW/cm <sup>2</sup> DC=0.2	0.03	0.07	36	[Roper J]
	Mayor síntesis de factores de crecimiento	150mW/cm <sup>2</sup> DC=0.2	0.03	0.07	18	[Mostafa NZ]
	Mayor síntesis de ADN y proliferación	150mW/cm <sup>2</sup> DC=0.2	0.03	0.07	20	[Zhou S]
	Mayor migración y endocitosis	150mW/cm <sup>2</sup> DC=0.2	0.03	0.07	36	[Atherton P]
	Formación de vesículas endocitóticas	322 mW/cm <sup>2</sup> DC=0.2	0.06	0.1	23	[Hauser J]
SW	Decaimiento de la viabilidad	1000 pulsos	120	34*	120	[Johannes EJ]
	No afecta la viabilidad. Aumento en la síntesis de colágeno y la tasa de proliferación	1000 pulsos	14	12*	14	[Vetrano M]
	Decaimiento inicial de la viabilidad, pero aumento posterior de la proliferación y en la síntesis de sustancias como factores de crecimiento y colágeno	1000 pulsos	22	15*	22	[Berta L]
	Aumento de Ca intracelular	1	0.17	3.8	0.17 10 <sup>-3</sup>	[Takahashi T]
MIFU	Disminución de la viabilidad en las primeras 48 h (apoptosis) y posterior aumento de la tasa de proliferación	0.88 W/cm <sup>2</sup> DC=0.1	1.5	0.7	26.4	Exp. Fibroblastos Cap.4
	No hay daño celular. Malformaciones nucleares y alteraciones morfológicas	60.000 pulsos	0.2	1	9	Exp. Fibroblastos Cap.4

\*Estimando que para una SW de 10 MPa se tiene una  $\rho_E$  de 10 mJ/cm<sup>2</sup> con la eq.(5.1)

Nuestro primer pulso emplea amplitudes de presión en el orden de 0.1 MPa, cercanas a las de TUS y LIPUS, por lo que se espera que haya también efectos no térmicos asociados. Con una amplitud acústica de 0.17 MPa, *De Deyne PG et al* detectan hasta 3 veces más figuras mitóticas, la mayor parte con aberraciones, por lo que confirman que han ocurrido cambios a nivel nuclear [De Deyne PG]. *Mortimer AJ et al* obtienen cerca de un 10 % más de nivel de Ca intracelular en 5 minutos y demuestran que éste aumenta con el tiempo de insonificación, al igual que le ocurre a *Domenici F et al* con la eficiencia en el consumo de calceína, quien alcanza % hasta un factor 38 mayores [Mortimer AJ, Domenici F]. Asocian este efecto a alteraciones en la estructura lipídica de la membrana. *Atherton P et al* afirman que su tratamiento induce reorganizaciones en el

citoesqueleto e incrementa la movilidad, afectando a la velocidad hasta un 50 % [Atherton P]. Esto está asociado a la detección de mayor activación de la proteína *RaC1*, relacionada con la organización del citoesqueleto y la movilidad. *Doan N et al* obtienen una síntesis de ADN un factor 1.2 mayor, signo de aumento en la proliferación, y una síntesis de colágeno que se incrementa un factor 1.6 [Doan N]. También se secretan al medio más citoquinas, relacionadas con la angiogénesis, y factores de crecimiento. *Zhou S et al* también detectan mayor síntesis de ADN, un factor 2.8, y *Vetrano M et al* obtienen 4 veces más síntesis de colágeno [Zhou S, Vetrano M]. *Mostafa NZ et al* estudian el aumento de factores relacionados con la diferenciación celular (*APL*) y otros tipos de proteínas (*OPN*), obteniendo incrementos de entre un factor 1.15 y 2, respectivamente [Mostafa NZ].

En nuestros experimentos in vitro con fibroblastos con MIFU, para el protocolo que más se parece al que se propone para lograr el efecto térmico (Protocolo A), se ha obtenido un efecto lítico conforme se aumenta la intensidad (decaimiento de la viabilidad y daño visible, Fig.4.27 y 4.31)). Esto se atribuye principalmente al fenómeno de cavitación que se detecta en el laboratorio con el método de sonoespectroscopía. Por lo tanto, no se espera que ocurra en una situación in vivo ya que, que dadas las amplitudes de presión acústicas empleadas, estamos por debajo de los umbrales para que este fenómeno ocurra en ausencia de microagentes de contraste (> 11 MPa [Hill CR 2004]).

En base al razonamiento realizado en el apartado 5.1.2.1 de este trabajo, con el segundo pulso de los dos que se proponen combinar, se espera que al someter a las células a una variación de la presión hidrostática de 5 MPa se activen los canales mecanosensibles de la membrana y se abran en consecuencia. Según *Charras GT et al* el 50 % de los canales estarían abiertos si la membrana plasmática de la célula está sometida a una tensión la mitad de la empleada para calcular nuestro umbral (de 0.05 mN/m [Charras GT]) por lo que se puede afirmar que, al menos, esa cantidad de estructuras estarán activadas. Esto da lugar a un aumento de la permeabilidad y la tasa de transfección de las células, lo cual se corrobora con estudios experimentales in vivo como el de *Schratzberger P et al*, que obtiene con un pulso de 1.8 MPa un aumento de hasta un factor 20.4 en la tasa de transfección de dos plásmidos (moléculas de ADN). Uno de los que este autor emplea (*phVEGF165*) se relaciona con la promoción de angiogénesis, que se refleja en medidas de un aumento de un factor 2 en la tasa de capilares y de un factor 1.8 en el flujo sanguíneo cuando se inyecta éste compuesto y se insonifica el tejido. En nuestro caso se propone aplicar amplitudes mayores, pero con una duración de pulso menor que las usadas por *Schratzberger P et al*, quien emplea un pulso de 30 ciclos de 1 MHz.

Con amplitudes del pulso muy altas (> 10 MPa) se prevé la apertura de poros en la membrana. Si estas roturas son irreversibles, desencadenan mecanismos que llevan a la muerte celular. En cambio, si son reversibles, aumentará también la permeabilidad. Éste fenómeno es conocido en la literatura como sonoporación, y es frecuente que se produzca en presencia de burbujas [Lentacker

I, Prentice P]. El umbral para que una onda de choque de amplitud  $P$  produzca sonoporación de en la membrana celular se calcula [Takahashi T]:

$$P \cdot \delta t \geq 4 \text{ Pa} \cdot \text{s} \quad (5.42)$$

donde  $\delta t$  es el tiempo en el que la onda posee una amplitud mayor o igual a la mitad de su máximo. Se estima que para nuestra forma de pulso, si se emplea una frecuencia de 2 MHz ( $T_f = 0.5 \mu\text{s}$ ), puede aproximarse que:

$$P \cdot \delta t \approx 5 \cdot 10^6 \text{ Pa} \cdot 0.25 \cdot 10^{-6} \text{ s} = 1.25 \leq 4 \text{ Pa} \cdot \text{s} \quad (5.43)$$

De esta manera, nuestra propuesta está por debajo de estos valores de amplitud y también por debajo de los umbrales de lisis de las células de tejido musculo esquelético, situados en el entorno de 40 MPa [Izadifar Z] (igualmente ocurre si se calcula para 1 MHz y 3 MHz).

No obstante, sí se estaría provocando rotura de células endoteliales de pequeños vasos sanguíneos, que poseen un umbral de lisis menor ( $\approx 2 \text{ MPa}$ ) lo que conllevaría pequeñas fugas de flujo sanguíneo (hemorragias) debido a la rotura de las paredes de los vasos [VanBavel E, Dalecki 1999]. Es esperable que el organismo reaccione en consecuencia aumentando la angiogénesis, lo cual es observado por *Holfeld J et al* en su trabajo, en el que emplea ondas de choque de baja energía ( $\rho_E = 10 \text{ mJ/cm}^2$ ). Tras el tratamiento obtiene un aumento en la expresión de factores de crecimiento relacionados con la formación de nuevos capilares en músculo isquémico, correspondiente a un factor 6.8 para el caso de VEGF y un factor 3 para el PIGF [Holfeld J]. La relevancia de estos datos se comprueba con el aumento de un factor 3 medido en los capilares que se forman en el músculo y un aumento de un factor 1.5 en la tasa de perfusión sanguínea. *Wang CJ et al* obtienen un aumento de un factor 2.3 en la presencia de VEGF en la primera semana tras el tratamiento con US, que lleva a cerca del doble de nuevos capilares a partir de las 4 semanas y *Chen YJ et al* también observan tras su tratamiento hasta el doble de pequeños capilares [Wang CJ, Chen YJ].

A nivel celular, *Vetrano M et al* obtienen 4 veces más síntesis de colágeno en sus cultivos de tenocitos a partir de la primera semana tras la insonificación [Vetrano M]. *Berta L et al* obtienen que el tratamiento con SW, tras producir un decaimiento inicial en el número de fibroblastos de un 19 %, aumenta tras la primera semana (9 días) la proliferación un factor 1.2, la expresión del factor de crecimiento TGF (una proteína de secreción que tiene implicaciones sobre el crecimiento, proliferación y diferenciación celular) un factor 1.3 y la síntesis de colágeno tipo I y tipo III aumentan factores 1.3 y 1.6 respectivamente [Berta L]. Esto es concordante con el estudio in vivo de *Chen YJ et al* en que obtiene en la primera semana aumentos de un factor 2.7 en la expresión de factores de crecimiento como el TGF y el IGF [Chen YJ]. Tras un periodo de tiempo mayor, a las 4 semanas, *Hsu RWW et al* comprueban que en los conejos insonificados la concentración de hidroxiprolina es un factor 1.4 mayor [Hsu RWW]. Éste es un aminoácido que constituye el 10 % de la molécula de colágeno, por lo que puede afirmarse que el contenido en colágeno es mayor en los

**MIFU: Propuesta de un protocolo de Ultrasonidos terapéuticos para el tratamiento de lesiones crónicas de tejido blando**

tendones insonificados, lo cual también se refleja en el aumento de un 7 % en la tensión de rotura de los mismos. El estudio de *Takahashi T et al* cuantifica la energía mínima umbral de un solo pulso de SW para que éste provoque un aumento de Ca intracelular, descartando la sonoporación como causa y atribuyéndose a una estimulación de los canales y los microfilamentos de actina (proteínas) del citoesqueleto [Takahashi T]. Se obtiene un valor de  $0.17 \text{ mJ/cm}^2$ , del mismo orden que las que se propone emplear en nuestro pulso (véase Tabla 5.17).

La comparación de las dosis de nuestra propuesta respecto de las empleadas en la actualidad se ha hecho en las frecuencias de 1 MHz y 3 MHz. Sin embargo, si sólo se dispone de un transductor que trabaje a una única frecuencia y no se tiene la posibilidad de focalizar el campo acústico, la más óptima es la de 2 MHz. Al ser la intermedia, se garantiza una penetración mayor que con 3 MHz y una mayor absorción que con 1 MHz. Para dar cuenta de cómo afecta el parámetro de frecuencia, se calcula en la Tabla 5.21 la dosis terapéutica que se aplica a la zona de la lesión con nuestros protocolos, para diferentes frecuencias de emisión del transductor (1 MHz, 2 MHz y 3 MHz). Estos valores son independientes de la profundidad y del modo de funcionamiento del transductor (plano o focalizado) ya que corresponden a la dosis que debe recibir el tejido.

**Tabla 5.21: Valores de los parámetros acústicos en la zona de la lesión de los dos protocolos del tratamiento combinado que se propone en este trabajo, para diferentes tejidos y según la frecuencia del transductor.**

	Pulso largo para lograr un $\Delta T$ de 4 °C en 300 s con un pulso largo de un DC del 10 % y PRF = 1 ms				Pulso corto para lograr una P de 5 MPa con un pulso corto, aplicando 100.000 pulsos (PRF = 3 ms durante 300 s)		
	1 MHz	2 MHz	3 MHz		1 MHz	2 MHz	3 MHz
$f_0$							
<b>Músculo</b>	100	200	300	<i>ciclos</i>	1	1	1
	0.62	0.43	0.34	$P_z$ (MPa)	5	5	5
	11.1	5.3	3.4	$I_{SATP}(z)$ ( $W/cm^2$ )	722	722	722
	11.1	0.53	0.34	$\rho_{E \text{ pulso}}(z)$ ( $mJ/cm^2$ )	0.72	0.36	0.24
	333	158	102	$\rho_{E \text{ total}}(z)$ ( $J/cm^2$ )	72	36	24
<b>Tendón Ligamento</b>	100	200	300	<i>ciclos</i>	1	1	1
	0.47	0.31	0.24	$P_z$ (MPa)	5	5	5
	5.4	2.41	1.5	$I_{SATP}(z)$ ( $W/cm^2$ )	625.6	625.6	625.6
	0.54	0.24	0.15	$\rho_{E \text{ pulso}}(z)$ ( $mJ/cm^2$ )	0.63	0.31	0.21
	163	72	45	$\rho_{E \text{ total}}(z)$ ( $J/cm^2$ )	63	31	21

Comparando los valores para 1 MHz, 2 MHz y 3 MHz, se obtiene que para lograr el efecto térmico es necesario emplear una amplitud de presión y una densidad de energía un factor 1.44 y 2.1 menor, respectivamente, si se emplea un transductor de 2 MHz que en el caso de 1 MHz. Esto



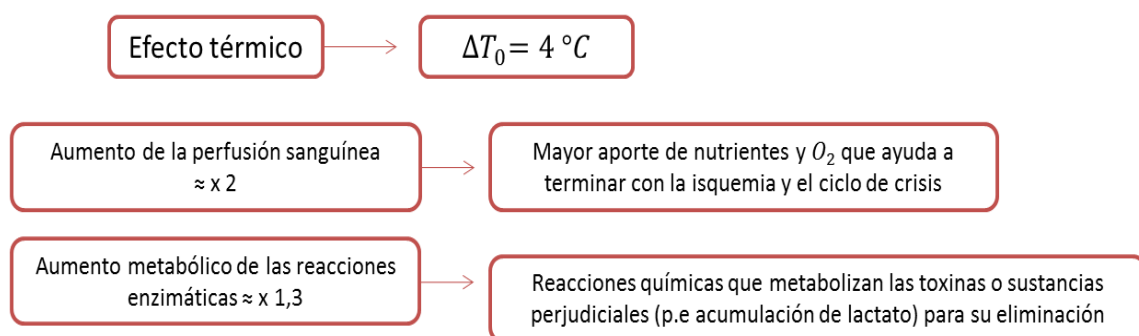
se debe a que el tejido absorbe más los US de mayor frecuencia y, a igualdad de dosis, el calentamiento es mayor. Por otro lado, para un pulso de características similares (mismo  $n$ ), para lograr la estimulación mecánica, se está aplicando con 2 MHz una densidad de energía que es la mitad que para el caso de 1 MHz, dado que la frecuencia es mayor y el tiempo que dura el pulso, en consecuencia, menor. Esto mantiene la misma fuerza del estímulo de presión, pero previene de causar daño celular.

La frecuencia de 3 MHz sólo es aconsejable si la profundidad de la lesión es muy pequeña ya que, debido a la gran atenuación que sufrirá la onda acústica, para lesiones profundas debe aplicarse inicialmente una energía muy alta, pudiendo causar daños irreversibles en el tejido más superficial.

## 7. Conclusiones

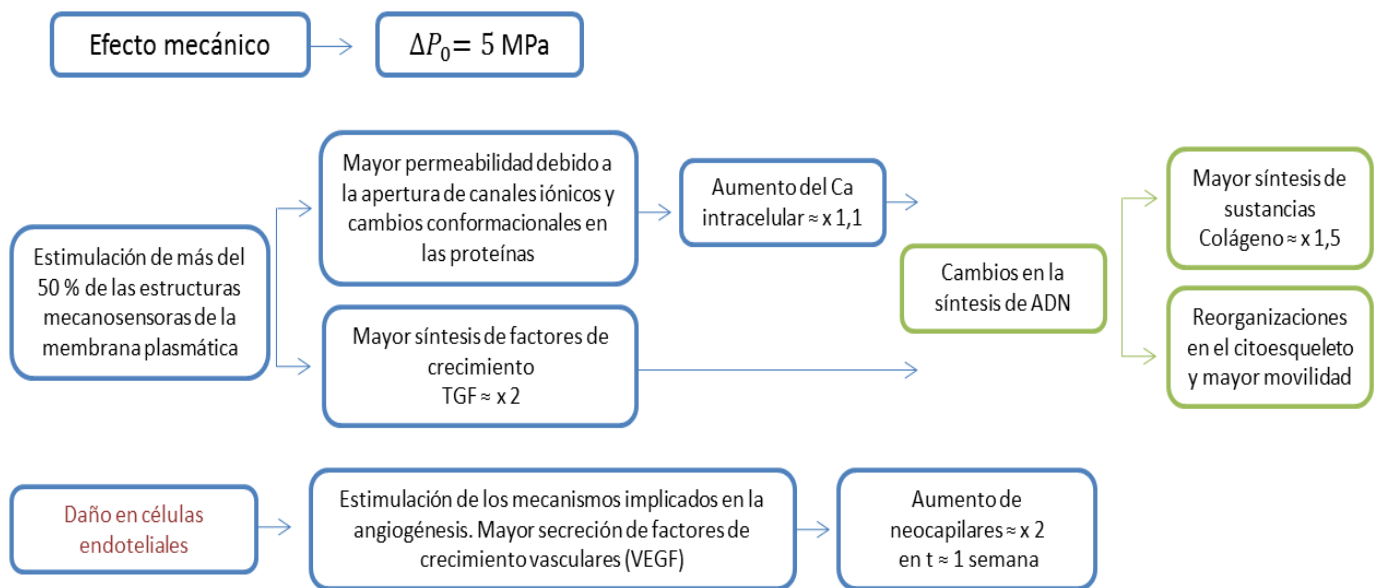
En este capítulo se ha propuesto un novedoso tratamiento con US para lesiones músculo esqueléticas (lesiones musculares y tendinosas) en estado avanzado o crónico. Se han estudiado los parámetros acústicos de las señales a utilizar considerando transductores clásicos sin geometría focalizadora. Particularizados los objetivos para el caso en el que se requiera tratar una lesión crónica, se establece que se debe lograr en la zona un incremento térmico inicial de 4 °C y una estimulación mecánica de los tipos celulares implicados con una amplitud de presión acústica de 5 MPa. Para ello, se propone una metodología que hasta ahora no ha sido estudiada: emplear dos insonificaciones sucesivas, para que cada una de ellas potencie los efectos térmicos y los no térmicos consecutivamente.

El primero de los pulsos persigue el incremento térmico, esperando que se desencadenen los efectos secuenciados en la Fig.5.14.



**Fig. 5.14: Procesos biológicos derivados de la estimulación térmica debida a la absorción de los US que se propone en nuestro tratamiento con el primer protocolo.**

El segundo pulso busca la estimulación mecánica más relevante y se espera que se desencadenen los efectos secuenciados en la Fig.5.15.



**Fig. 5.15: Procesos biológicos derivados de la estimulación mecánica debida a los US que se propone en nuestro tratamiento con el segundo protocolo.**

El tratamiento en clínica para lograr la dosificación adecuada en el tejido debe diseñarse teniendo en cuenta el equipo ultrasónico que se emplea (transductor y señal acústica). Para el caso de un equipo con un transductor tipo pistón (apertura circular y en fase) pueden emplearse las relaciones mostradas en este capítulo, desarrolladas para diseñar un protocolo para un tejido y una profundidad en particular. Para este caso de un transductor tipo pistón, y por tanto de una señal no enfocada, debe tenerse en cuenta que la insonificación que logre los efectos térmicos puede afectar a tejidos circundantes con dosis incluso mayores que las aplicadas a la zona patológica.

En el tratamiento de pulso corto, que logra la estimulación mecánica, se prevé que, a una profundidad pequeña, a pesar de la difracción, en el caso real de usarse un pulso con varios ciclos, al menos el 41 % del volumen enfrentado al transductor recibe la presión acústica umbral deseada, según lo mostrado en el apartado 5.1.2.3 de este capítulo.



## **Capítulo 6.**

### **Conclusiones y líneas de trabajo futuras**

En la búsqueda por establecer una correcta sistemática basada en el método científico para estudiar los efectos de los US en tratamientos de Fisioterapia se han desarrollado a lo largo de los capítulos de esta Tesis los trabajos que se enumeran a continuación:

- Se han investigado nuevas técnicas de imagen para monitorizar el calentamiento que se produce durante un tratamiento con MIFU. Con la técnica de Imagen Optoacústica se ha logrado cuantificar el incremento de temperatura con una alta precisión espacial ( $\approx 200 \mu\text{m}$ ) y temporal (0.1 s).
- Se ha hecho un completo estudio de la distribución del campo acústico que se tiene en un experimento de insonificación in vitro y de cómo varía según las características de la configuración experimental. Siendo los estudios in vitro el primer paso que debiera darse en el estudio de los efectos de un nuevo protocolo de insonificación, se ha propuesto una sistemática para la correcta cuantificación de la dosis en este tipo de experimentos.

Para el caso concreto en el que se trabaje colocando el transductor en la base de la placa de cultivo y se insonifique con un volumen finito de medio, sin evitar la reflexión en las interfaces y manteniendo el sistema estático, se han extraído correspondencias entre los parámetros acústicos de emisión del transductor en campo libre y los que realmente se tienen en el pocillo. Los incrementos que se obtienen suponen factores de hasta un factor 4 en amplitud de presión y de un factor 12.5 en la energía total que se estaría dando al cultivo.

- Profundizando en la investigación de los efectos no térmicos de los US sobre las células, que en la actualidad son todavía materia de estudio, se ha realizado un experimento de insonificación in vitro de una monocapa de fibroblastos. Previo al experimento, se ha puesto en práctica la sistemática de caracterización del campo acústico propuesta también en esta Tesis. Teniendo una exhaustiva cuantificación de los parámetros y las distribuciones del campo acústico que se emite sobre las células, se han desarrollado interpretaciones de los resultados que se han obtenido. En base al conocimiento encontrado en la bibliografía sobre la acción de los US en cultivos biológicos, se ha profundizado en los efectos de la cavitación que se genera en el medio con un pulso largo de US sobre los fibroblastos, detectados mediante el método de sonoespectroscopía, y en las reacciones de mecanostransducción que se desencadenan con un pulso corto.

Estos primeros trabajos teóricos y experimentales han permitido que se adquiriera el conocimiento de las bases teóricas de los US, estudiar y cuantificar sus efectos en sistemas simples que simulan tejidos biológicos y en un cultivo in vitro. Esto es fundamental para dar el paso al siguiente nivel: la aplicación de los US en un sistema in vivo. De esta manera, todo lo anterior, ha servido para desarrollar el último de los trabajos.

- Se ha propuesto un nuevo protocolo de insonificación que resulte efectivo en el tratamiento de lesiones de tejido blando en estado avanzado o crónico. La combinación de los efectos térmicos y no térmicos de los US con la aplicación de dos pulsos consecutivos optimizaría la curación respecto de los tratamientos convencionales aplicados en la actualidad, que constan de un solo tipo de insonificación. En este tratamiento se trabaja dentro de MIFU, un rango de intensidad hasta ahora no implantado, con intensidades entre los tratamientos actuales de baja (TUS) y muy alta intensidad (HIFU).

La propuesta final de este tratamiento supone la recopilación de un trabajo completo de investigación dentro del área de las aplicaciones terapéuticas de los ultrasonidos. Su estudio experimental ha sido aprobado por los comités éticos responsables para su estudio en pequeños animales. También se ha hecho una propuesta para experimentación clínica que está a la espera de los resultados con pequeños animales. Esto supone la continuidad y aplicabilidad de este trabajo.

Como líneas futuras de trabajo, nuevas e interesantes líneas de investigación se pueden abrir a raíz de este trabajo:

- Simulación de la propagación de las ondas ultrasónicas en otro tipo de configuraciones y anatomías complejas.
- Estudio de la influencia en las relaciones teóricas deducidas para los protocolos de tratamiento propuestos en esta Tesis con factores como, por ejemplo, la no homogeneidad de los parámetros acústicos de los tejidos biológicos.
- Desarrollo de nuevos modelos de dosis para otro tipo de lesiones o patologías.
- Estudios comparativos con otras líneas celulares o con otras técnicas de análisis para cuantificar otros efectos no estudiados en este trabajo (medición de la secreción de sustancias o la permeabilización de la membrana celular).
- Uso de las técnica de Imagen Optoacústica como técnica complementaria para seguir la evolución térmica en una insonificación in vivo.
- Desarrollo de transductores piezoeléctricos y electrónica asociada para aplicar en zonas localizadas protocolos de tratamiento personalizados y combinar diferentes insonificaciones.

## Bibliografía

---

- Abercrombie M; "Contact inhibition in tissue culture" *In Vitro*; 1970; Vol: 6(2); pp: 128–142
- Albornoz M, Guerrero H; "Electroterapia Práctica. Capítulo 24: Ultrasonoterapia" Elsevier España; 2016; pp: 283-298
- Angello JC; "Replicative potential and the duration of the cell cycle in human fibroblasts: coordinate stimulation by epidermal growth factor" *Mech. Ageing. Dev.*; 1992; Vol: 62(1); pp: 1-12
- Atchley AA, Frizzell LA, Apfel RE, Holland CK, Madanshetty S, Roy RA; "Thresholds for cavitation produced in water by pulsed ultrasound" *Ultrasonics*; 1988; Vol: 26(5); pp: 280-285
- Atherton P, Lausecker F, Harrison A, Ballestrem C; "Low-intensity pulsed ultrasound promotes cell motility through vinculin-controlled Rac1 GTPase activity" *J. Cell Sci.*; 2017 ; Vol: 130(14); pp: 2277-2291
- Bao G; "Protein Mechanics: A New Frontier in Biomechanics" *Exp. Mech.*; 2009; Vol: 49(1); pp: 153–164
- Beard P; "Biomedical photoacoustic imaging" *Interface Focus*; 2001, Vol: 1; pp: 602-631
- Beissner K; "Primary measurement of ultrasonic power and dissemination of ultrasonic power reference values by means of standard transducers" *Metrologia*; 1999; Vol: 36; pp: 313-320
- Bell AG; "The production of sound by radiant energy" *Science*; 1881; Vol: 2(49); pp: 242-253
- Berta L, Fazzari A, Ficco AM, Enrica PM, Catalano MG, Frairia R; "Extracorporeal shock waves enhance normal fibroblast proliferation in vitro and activate mRNA expression for TGF-beta1 and for collagen types I and III" *Acta Orthop.*; 2009; Vol: 80(5); pp: 612-617
- Bilaniuk N, Wong GSK; "Speed of sound in pure water as function of temperature" *J. Acoust. Soc. Am.* 1993; Vol: 93(3); pp: 1609-1612
- Birch HL, Thorpe CT, Rumian AP; "Specialisation of extracellular matrix for function in tendons and ligaments" *Muscles Ligaments Tendons J.*; 2013 Jan-Mar; Vol: 3(1); pp: 12–22.
- Boal D; "Mechanical Characteristics of Very Small Cells" National Research Council (US); 1999
- Brennen CE; "Cavitation and Bubble Dynamics" Cambridge University Press, 2014
- Brujan EA, Ikeda T, Matsumoto Y; "On the pressure of cavitation bubbles" *Experimental Thermal and Fluid Science*; 2008; Vol: 32(5); pp: 1188-1191
- Bruneau M; "Fundamentals of Acoustics" ISTE Ltd; 2006
- Buldakov MA, Hassan MA, Zhao QL, Feril LB Jr, Kudo N, Kondo T, Litvyakov NV, Bolshakov MA, Rostov VV, Cherdyntseva NV, Riesz P; "Influence of changing pulse repetition frequency on chemical and biological effects induced by low-intensity ultrasound in vitro" *Ultras. Sonochem.*; 2009; Vol: 16(3); pp: 392-397
- Cambier D, D'Herde KK, Witvrouw E, Beck M, Soenens S, Vanderstraeten G; "Therapeutic Ultrasounds: Temperature increase at different depths by different modes in a human cadaver" *J. Rehab. Med.*; 2001; Vol: 33; pp: 212–215

- Cárdenas Sandoval RP, Malagón Romero DH, Grazón-Alvarado DA; "Effect of Therapeutic Ultrasound on Fibroblast Proliferation In Vitro" IFMBE Proceedings; 2015; Vol: 49
- Chan AK, Myrer JW, Measom GJ, Draper DO; "Temperature changes in human patellar tendon in response to therapeutic ultrasound" J. Athl. Train.; 1998; Vol: 33(2); pp: 130-135.
- Charras GT, Williams BA, Sims SM, Horton MA; "Estimating the Sensitivity of Mechanosensitive Ion Channels to Membrane Strain and Tension" Biophys. J.; 2004; Vol: 87(4); pp: 2870–2884
- Cheing GL, Chang H; "Extracorporeal shock wave therapy." J. Orthop. Sports Phys. Ther.; 2003; Vol: 33(6); pp: 337-343
- Chen Y, Huang D, Li K, Zhihui W, Kai H, Fen W, Qingping Z; "Ultrasound and Microbubbles: Their Functions in Gene Transfer In Vitro" J. of Huazhong University of Science and Technology; 2007; Vol: 27(4); pp: 479-482
- Chen YJ, Wang CJ, Yang KD, Kuo YR, Huang HC, Huang YT, Sun YC, Wang FS; "Extracorporeal shock waves promote healing of collagenase-induced Achilles tendinitis and increase TGF-beta1 and IGF-I expression" J. Orthop. Res.; 2004; Vol: 22(4); pp: 854-61
- Chinchurreta F, Hekkenberg R; "Non-invasive temperature estimation on TMM based on the echo-shift method" Proceedings of the 46th Spanish Congress on Acoustics; 2015; pp: 1609-1616
- Chitnis PV, Brecht HP, Su R, Oraevsky AA; "Feasibility of optoacoustic visualization of high-intensity focused ultrasound-induced thermal lesions in live tissue". J. of Biomedical Optics; 2010; Vol: 15(2); 021313
- Cho YI; "Bioengineering Heat Transfer" Academic Press; 1992
- Chung B, Wiley JP; "Extracorporeal shockwave therapy: a review" Sports Med.; 2002; Vol: 32(13); pp: 851-865
- Cinbis C, Mansour MN, Khuri Yakub BT; "Effect of surface tension on the acoustic radiation pressure-induced motion of the water-air interface" J. Acoust. Soc. of Am.; 1993; Vol: 94; pp: 2365-2372
- Claes L, Willie B; "The enhancement of bone regeneration by ultrasound" Prog. Biophys. Mol. Biol.; 2007; Vol: 93(1-3); pp: 384-398
- Corry PM, Spanos WJ, Tilchen EJ, Barlogie B, Barkley HT, Armour EP; "Combined ultrasound and radiation therapy treatment of human superficial tumors" Radiology; 1982; Vol:145(1); pp:165-169
- Császár NBM, Angstman NB, Milz S, Sprecher CM, Kobel P, Farhat M, Furia JP, Schmitz C; "Radial Shock Wave Devices Generate Cavitation" PLoS One; 2015; Vol: 10(10)
- Cui H, Yang X; "In vivo imaging and treatment of solid tumor using integrated photoacoustic imaging and high intensity focused ultrasound system" Med. Phys.; 2010; Vol: 37(9); pp: 4777-4781.
- Dalecki D; "Mechanical bioeffects of ultrasound" Annu. Rev. Biomed. Eng.; 2004; Vol: 6; pp: 229-248
- Dalecky D, Child SZ, Raeman CH, Cox C; "Hemorrhage in murine fetuses exposed to pulsed ultrasound" Ultrasound in Med. and Biol. 1999; Vol: 25(7); pp: 1139-1144
- Damianou CA, Sanghvi NT, Fry FJ, Maass-Moreno R; "Dependence of ultrasonic attenuation and absorption in dog soft tissues on temperature and thermal dose" J. Acoust. Soc. of Am.; 1997; Vol: 102(1); pp: 628-634.
- Davies PF; "Flow-mediated endothelial mechanotransduction" Physiol. Rev.; 1995; Vol: 75(3); pp: 519-560
- De Brosses ES, Gennisson JL, Pernot M, Fink M, Tanter M; "Temperature dependence of the shear modulus of soft tissues assessed by ultrasound" Phys. Med. Biol.; 2010; Vol: 55; pp: 1701-1718

- De Deyne PG, Kirsch-Volders M; "In vitro effects of therapeutic ultrasound on the nucleus of human fibroblasts" *Physical Therapy*; 1995; Vol: 75 (7); pp: 629-634
- Dean-Ben XL (1), Ozbek A, Razansky D; "Volumetric real-time tracking of peripheral human vasculature with GPU-accelerated three-dimensional optoacoustic tomography" *IEEE Trans. Med. Imaging*; 2013; Vol: 32, pp: 2050-2055
- Dean-Ben XL (2), Razansky D; "Portable spherical array probe for volumetric real-time optoacoustic imaging at centimeter-scale depths" *Opt. Express*; 2013; Vol: 21; pp: 28062-28071
- Dean-Ben XL, Merčep E, Razansky D; "Hybrid-array-based optoacoustic and ultrasound (OPUS) imaging of biological tissues" *Appl. Phys. Lett.*; 2017, Vol: 110; 203703
- Demir H, Menku P, Kirnap M, Calis M, Ikizceli I; "Comparison of the effects of laser, ultrasound, and combined laser + ultrasound treatments in experimental tendon healing" *Lasers Surg. Med.*; 2004; Vol: 35(1); pp: 84-89.
- Dewhurst MW, Viglianti BL, Lora-Michiels M, Hanson M, Hoopes PJ; "Basic principles of thermal dosimetry and thermal thresholds for tissue damage from hyperthermia" *Int. J. Hyperthermia*; 2003; Vol: 19; pp: 267-294
- Diaz Chiguer D, Rodríguez Hernández A, Buendía Padilla M, Reynoso Ducoing O, Fernández Retana J, Ambrosio J; "Mecanostrucción: Cómo la célula percibe los estímulos" *Tamé*; 2015; Vol: 4811; pp: 396-401
- Diederich CJ, Hynynen K; "Ultrasound technology for hyperthermia" *Ultrasound in Med. and Biol.*; 1999; Vol: 25(6); pp: 871-887
- Diederich CJ; "Thermal ablation and high-temperature thermal therapy: overview of technology and clinical implementation" *Int. J. Hyperthermia*; 2005; Vol: 21(8); pp: 745-753.
- Dinno MA, Dyson M, Young SR, Mortimer AJ, Hart J, Crum LA; "The significance of membrane changes in the safe and effective use of therapeutic and diagnostic ultrasound" *Phys. Med. Biol.*; 1989; Vol: 34(11); pp: 1543-1552
- Doan N, Reher P, Meghji S, Harris M; "In vitro effects of therapeutic ultrasound on cell proliferation, protein synthesis and cytokine production by human fibroblasts, osteoblasts and monocytes" *J. Oral Maxillofac. Surg.*; 1999 Vol: 57; pp: 409-419
- Doherty JR, Trahey GE, Nightingale KR, Palmeri ML; "Acoustic radiation force elasticity imaging in diagnostic ultrasound" *IEEE Trans. Ultras. Ferroelectr. Freq. Control*; 2013; Vol: 60(4); pp: 685-701
- Domenici F, Giliberti C, Bedini A, Palomba R, Luongo F, Sennato S, Olmati C, Pozzi D, Morrone S, Castellano AC, Bordi F; "Ultrasound well below the intensity threshold of cavitation can promote efficient uptake of small drug model molecules in fibroblast cells" *Drug Deliv.*; 2013; Vol:20(7); pp: 285-295
- Draper DO, Castel JC, Castel D; "Rate of temperature increase in human muscle during 1 MHz and 3 MHz continuous ultrasound" *J. Orthop. Sports Phys. Ther.*; 1995; Vol: 22(4); pp: 142-150
- Draper DO (1), Edvalson CG, Knight KL, Eggett D, Shurtz J; "Temperature increases in the human Achilles tendon during ultrasound treatments with commercial ultrasound gel and full-thickness and half-thickness gel pads" *J. Athl. Train.*; 2010; Vol: 45(4); pp: 333-337
- Draper DO (2), Mahaffey C, Kaiser D, Eggett D, Jarmin J; "Thermal ultrasound decreases tissue stiffness of trigger points in upper trapezius muscles" *Physiother. Theory Pract.*; 2010; Vol: 26(3); pp: 167-72
- Drizdal T, Togni P, Visek L, Vrba J; "Comparison of Constant and Temperature Dependent Blood Perfusion in Temperature Prediction for Superficial Hyperthermia" *Radioengineering*; 2010; Vol: 19(2); pp:281-289



- Dubinsky TJ, Cuevas C, Dighe MK, Kolokythas O, Hwang JH; "High-intensity focused ultrasound: Current potential and oncologic applications" *Am. J. Roentgenol.*; 2008; Vol: 190(1); pp: 191–199
- Duck FA; "Nonlinear acoustics in diagnostic ultrasound" *Ultrasound in Med. and Biol.*; 2002; Vol: 28(1); pp: 1-18
- Dyson M; "Non-thermal cellular effects of ultrasound" *Br. J. Cancer Suppl.*; 1982; Vol: 5; pp: 165-171.
- Ebenbichler GR, Erdogmus CB, Resch KL, Funovics MA, Kainberger F, Barisani G, Aringer M, Nicolakis P, Wiesinger GF, Baghestanian M, Preisinger E, Fialka-Moser V; "Ultrasound therapy for calcific tendinitis of the shoulder" *N. Engl. J. Med.*; 1999; Vol: 340(20); pp: 1533-1538.
- Eller A, Flynn HG; "Rectified Diffusion during Nonlinear Pulsations of Cavitation Bubbles" *J. Acoust. Soc. of Am.*; 1965; Vol: 37, pp: 493-503
- Enwemeka CS; "The effects of therapeutic ultrasound on tendon healing. A biomechanical study" *Am. J. Phys. Med. Rehabil.*; 1989; Vol: 68; pp: 283-287
- Erikson KR, Fry FJ; Jones JP; "Ultrasound in Medicine-A Review" *IEEE Transactions on Sonics and Ultrasonics*; 1974; Vol: 21(3)
- Fani F, Schena E, Saccomandi P, Silvestri S; "CT-based thermometry: an overview" *Int. J. Hyperth.*; 2014; Vol: 30; pp: 219-227
- Feigl T, Völklein B, Iro H, Ell C, Schneider T; "Biophysical effects of high-energy pulsed ultrasound on human cells" *Ultrasound in Med. and Biol.*; 1996; Vol: 22(9); pp:1267-1275
- Feng R, Zhao Y, Zhu C, Mason TJ; "Enhancement of ultrasonic cavitation yield by multi-frequency sonication" *Ultrasound Sonochem.*; 2002; Vol: 9(5); pp: 231-236
- Feng Y, Tian Z, Wan M; "Bioeffects of low-intensity ultrasound in vitro: apoptosis, protein profile alteration, and potential molecular mechanism" *J. of Ultrasound in Med.*; 2010; Vol: 29(6); pp: 963-974
- Feril LB, Kondo T, Zhao QL, Ogawa R; "Enhancement of hyperthermia-induced apoptosis by non-thermal effects of ultrasound" *Cancer Lett.*; 2002; Vol: 178(1); pp: 63-70
- Frairia R, Berta L; "Biological Effects of Extracorporeal Shock Waves on Fibroblasts. A Review" *Muscles Ligaments Tendons J.*; 2011; Vol: 1(4); pp: 138–147
- Franson J; "Heat Penetration into Soft Tissue with 3 MHz Ultrasound" *BYU Scholars Archive*; 2013
- Frohly J, Labouret S, Bruneel C, Looten-Baquet I I, Torguet R; "Ultrasonic cavitation monitoring by acoustic noise power measurement" *J. Acoust. Soc. of Am.*; 2000; Vol: 108(5 Pt 1); pp: 2012-2020
- Fyfe MC, Chahl LA; "Mast cell degranulation and increased vascular permeability induced by therapeutic ultrasound in the rat ankle joint" *Br. J. Exp. Pathol.*; 1984; Vol: 65(6), pp: 671-676
- Gallo JA, Draper DO, Brody LT, Fellingham GW; "A comparison of human muscle temperature increases during 3-MHz continuous and pulsed ultrasound with equivalent temporal average intensities" *J. Orthop. Sports Phys. Ther.*; 2004; Vol: 34(7); pp: 395-401.
- Gauthier NC, Masters TA, Sheetz MP; "Mechanical feedback between membrane tension and dynamics" *Trends Cell Biol.*; 2012; Vol: 22(10); pp: 527-35.

- Gillooly JF, Brown JH, West GB, Savage VM, Charnov EL; "Effects of Size and Temperature on Metabolic Rate" *Science*; 2001; Vol: 293(5538); pp: 2248-2251
- Greenspanan M, Tschiegg CE; "Speed of sound in water by a direct method" *J. Res. Natl. Bur. Stand.*; 1957; Vol: 59; pp: 249–254
- Greenspanand M, Tschiegg CE; "Tables of the speed of sound in water" *J. Acoust. Soc. of Am.*; 1959; Vol: 31; pp: 75–76
- Gudra T, Opielinski KJ; "Applying spectrum analysis and cepstrum analysis to examine the cavitation threshold in water and in salt solution" *Ultrasonics*; 2004; Vol: 42; pp: 621–627
- Guzman HR, Mc Namara AJ, Nguyen DX, Prausnitz MR; "Bioeffects caused by changes in acoustic cavitation bubble density and cell concentration: a unified explanation based on cell-to-bubble ratio and blast radius" *Ultrasound in Med. and Biol.*; 2003; Vol: 29(8); pp: 1211-1222
- Haase K, Pelling AE; "Investigating cell mechanics with atomic force microscopy" *J. R. Soc. Interface*; 2015; Vol. 12(104); 20140970
- Hamill OP, Martinac P; "Molecular Basis of Mechanotransduction in Living Cells" *Physiological Reviews*; 2001 Apr; Vol: 81(21); pp: 685-740
- Harris GR, Herman BA, Smith SW, Bodine WJ; "Through Transmission Technique for Ultrasonic Attenuation Measurement Using Broadband Plane Wave Pulses" *Ultrasonics Symposium*; 1983
- Harris GR; "A discussion of procedures for ultrasonic intensity and power calculations from miniature hydrophone measurements" *Ultrasound in Med. and Biol.*; 1985; Vol: 11(6); pp: 803-817
- Hasgall PA, DI Gennaro F, Baumgartner C, Neufeld E, Lloyd B, Gosselin MC, Payne D, Kligenböck A, Kuster N; "IT'IS Database for thermal, acoustic and electromagnetic parameters of biological tissues" Version 4.0; 2018 <https://itis.swiss/virtual-population/tissue-properties/database/>
- Hassan MA, Feril LB, Suzuki K, Kudo N, Tachibana K, Kondo T; "Evaluation and comparison of three novel microbubbles: Enhancement of ultrasound-induced cell death and free radicals production" *Ultrasonics Sonochemistry*; 2009; Vol: 16; pp: 372–378
- Hauser J, Ellisman M, Steinau HU, Stefan E, Dudda M, Hauser M; "Ultrasound enhanced endocytotic activity of human fibroblasts" *Ultrasound in Med. and Biol.*; 2009; Vol: 35(12); pp: 2084–2092
- Hayes BT, Merrick MA, Sandrey MA, Cordova ML; "Three-MHz Ultrasound Heats Deeper Into the Tissues Than Originally Theorized" *J. Athl. Train.*; 2004; Vol: 39(3); pp: 230–234
- Healey C, Forgione P, Lounsbury KM, Corrow K, Osler T, Ricci MA, Stanley A; "A new in vitro model of venous hypertension: the effect of pressure on dermal fibroblasts" *J. Vasc. Surg.*; 2003; Vol: 38(5); pp:1099-1105
- Hensel K, Mienkina MP, Schmitz G; "Analysis of ultrasound fields in cell culture wells for in vitro ultrasound therapy experiments" *Ultrasound in Med. and Biol.*; 2011 ; Vol: 37(12); pp: 2105-2115
- Hildebrandt C, Raschner C, Ammer K; "An Overview of Recent Application of Medical Infrared Thermography in Sports Medicine in Austria" *Sensors (Basel)*; 2010; Vol. 10(5); pp: 4700-4715
- Hill CR, Bamber JC, Ter Haar G; "Physical Principles of Medical Ultrasonics" John Wiley & Sons, Ltd; 2004
- Hill CR; "Ultrasonic Exposure Thresholds for Changes in Cells and Tissues" *J. Acoust. Soc. of Am.*; 1972; Vol: 52(2); pp: 667-672

- Holfeld J, Tepeköylü C, Blunder S, Lobenwein D, Kirchmair E, Dietl M, Kozaryn R, Lener D, Theurl M, Paulus P, Kirchmair R, Grimm M; "Low Energy Shock Wave Therapy Induces Angiogenesis in Acute Hind-Limb Ischemia via VEGF Receptor 2 Phosphorylation" *PLoS One*. 2014; Vol: 9(8); e103982
- Holland CK, Deng CX, Apfel RE, Alderman JL, Fernandez LA, Taylor KJ; "Direct evidence of cavitation in vivo from diagnostic ultrasound" *Ultrasound in Med. and Biol.* 1996; Vol: 22(7); pp: 917-925
- Hsu AR, Holmes GB; "Preliminary Treatment of Achilles Tendinopathy Using Low-Intensity Pulsed Ultrasound" *Foot Ankle Spec.*; 2016; Vol: 9(1); pp: 52-57
- Hsu RWW, Hsu WH, Tai CL, Lee KF; "Effect of shock-wave therapy on patellar tendinopathy in a rabbit model" *J. Orthop. Res.*; 2004; Vol: 22(1); pp: 221-227
- Hu Y, Wan JM, Yu AC; "Membrane perforation and recovery dynamics in microbubble-mediated sonoporation" *Ultrasound in Med. and Biol.*; 2013; Vol: 39(12); pp: 2393-2405
- Humphrey VF; "Ultrasound and matter: physical interactions" *Prog. Biophys. Mol. Biol.*; 2007; Vol: 93(1-3); pp: 195-211
- Husseini GA, Diaz de la Rosa MA, Richardson ES, Christensen DA, Pitt WG; "The role of cavitation in acoustically activated drug delivery" *J Control Release.*; 2005; Vol: 107(2); pp: 253-61
- Hynynen K, Freund WR, Cline HE, Chung AH, Watkins RD, Vetro JP, Jolesz FA; "A clinical, noninvasive, MR imaging-monitored ultrasound surgery method" *Radiographics*; 1996; Vol: 16(1); pp: 185-195
- IEC 61161 1.3:2013; "Ultrasonics - Power measurement - Radiation force balances and performance requirements"
- IEC 62127 2:2017; "Ultrasonics - Hydrophones - Part 2: Calibration for ultrasonic fields up to 40 MHz"
- Izadifar Z, Babyn P, Chapman D; "Mechanical and Biological Effects of Ultrasound: A Review of Present Knowledge" *Ultrasound in Med. and Biol.*; 2017; Vol: 43(6); pp: 1085-1104
- Jia Y, Yuan W, Zhang K, Wang J, Wang P, Liu Q, Wang X; "Comparison of cell membrane damage induced by the therapeutic ultrasound on human breast cancer MCF-7 and MCF-7/ADR cells" *Ultras. Sonochem.*; 2015; Vol: 26; pp: 128-135
- Jiménez N; "Nonlinear Acoustic Waves in Complex Media. Chapter 9 : Nonlinear Acoustic Radiation Forces in Biological Media" PhD at Universitat Politècnica de València; 2015; pp: 251-271
- Johannes EJ, Sukul K, Bijma AM, Mulder PG; "Effects of high energy shock waves on normal human fibroblasts in suspension" *J. Surg. Res.*; 1994; Vol: 57; pp: 677-681
- Karshafian R, Bevan PD, Williams R, Samac S, Burns PN; "Sonoporation by ultrasound-activated microbubble contrast agents: effect of acoustic exposure parameters on cell membrane permeability and cell viability" *Ultrasound in Med. and Biol.*; 2009; Vol: 35(5); pp: 847-860
- Katiyar A, Duncan RL, Sarkar K; "Ultrasound stimulation increases proliferation of MC3T3-E1 preosteoblast-like cells" *J. Ther. Ultrasound*; 2014; Vol: 2(1)
- Ke H, Tai S, Wang LV; "Photoacoustic thermography of tissue" *J. Biomed. Opt.*; 2014; Vol: 19(2); 026003
- Kennedy JE; "High-intensity focused ultrasound in the treatment of solid tumors" *Nat. Rev. Cancer.*; 2005; Vol 5(4); pp: 321-327.

- Kerr CL, Gregory DW, Shammari M, Watmough DJ, Wheatley DN; "Differing effects of ultrasound-irradiation on suspension and monolayer cultured hela cells, investigated by scanning electron microscopy" *Ultrasound in Med. and Biol.*; 1989; Vol: 15 (4), pp: 397-401
- Kinsler LE, Frey AR, Coppens AB, Sanders JV; "Fundamentals of Acoustics" John Wiley and Sons Inc.; 2000
- Kolahi KS, Mofrad MR; "Mechanotransduction: a major regulator of homeostasis and development" *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.*; 2010; Vol: 2(6); pp: 625-39.
- Kondo T, Yoshij G; "Effect of intensity of 1.2 MHz ultrasound on change in DNA synthesis of irradiated mouse L cells" *Ultrasound in Med. and Biol.*; 1985; Vol: 11(1); pp: 113-119
- Konofagou EE, Tung YS, Choi J, Deffieux T, Baseri B, Vlachos F; "Ultrasound-induced blood-brain barrier opening" *Curr. Pharm. Biotechnol.*; 2012; Vol: 13(7); pp: 1332-45
- Krasovitski B, Frenkel V, Shoham S, Kimmel E; "Intramembrane cavitation as unifying mechanism for ultrasound-induced bioeffects" *PNAS*; 2011; Vol: 108 (8); pp: 3258-3263
- Kuc R, Schwartz M, Von Micsky L; "Parametric estimation of the acoustic attenuation coefficient slope for soft tissues," *IEEE Ultrasonics Symp.Proc.*; 1976; pp. 44-47
- Lahiri B, Bagavathiappan S, Jayakumar T, Philip J; "Medical applications of infrared thermography: a review" *Infrared Phys. Techn.*, 2012; Vol: 55; pp. 221-235
- Landa FJO, Dean-Ben XL, Sroka R, Razansky D; "Volumetric optoacoustic temperature mapping in photothermal therapy" *Sci. Rep.-UK*; 2017; Vol: 7; pp: 9695
- Landa FJO, Penacoba SR, de Espinosa FM, Razansky D, Deán-Ben XL; "Four-dimensional optoacoustic monitoring of tissue heating with medium intensity focused ultrasound" *Ultrasonics*; 2019; Vol: 94; pp: 117-123
- Lawrence A, Crum, Eller AI; "Motion of Bubbles in a Stationary Sound Field" *J. Acoust. Soc. of Am.*; 1970; Vol: 48, pp: 181-189
- Lecuit T, Lenne PF, Munro E; "Force generation, transmission, and integration during cell and tissue morphogenesis" *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*; 2011; Vol: 27(1); pp: 157-184
- Leighton T; "The acoustic bubble" Academic Press Inc.; 1994
- Lentacker I, De Cock I, Deckers R, De Smedt SC, Moonen CT; "Understanding ultrasound induced sonoporation: definitions and underlying mechanisms" *Adv. Drug. Deliv. Rev.*; 2014; Vol: 72; pp: 49-64
- Leontiadou H, Mark AE, Marrink SJ; "Molecular Dynamics Simulations of Hydrophilic Pores in Lipid Bilayers" *Biophys. J.*; 2004; Vol: 86(4); pp: 2156-2164.
- Lewin PA, Bjorno L; "Acoustic pressure amplitude thresholds for rectified diffusion in gaseous microbubbles in biological tissue" *J. Acoust. Soc. of Am.*; 1981; Vol: 69(3), pp: 846-862
- Lighthill J; "Acoustic streaming" *Journal of Sound and Vibration*; 1978; Vol: 61(3); pp: 391:418
- Lingeman JE, McAteer JA, Gnessin E, Evan AP; "Shock wave lithotripsy: advances in technology and technique" *Nat. Rev. Urol.*; 2009; Vol 6(12); pp: 660-670
- Livett AJ, Preston RC; "A comparison of the AIUM/ NEMA, IEC and FDA definitions of various acoustic parameters for ultrasonic transducers" *Ultrasound in Med. and Biol.*; 1985; Vol: 11; pp: 793- 802

- Lubbers J, Graaff R; "A simple and accurate formula for the sound velocity in water" *Ultrasound in Med. and Biol.* 1998; Vol: 24(7); pp: 1065-1068
- Maalouf JE, Béra JC, Alberti L, Cathignol D, Mestas JL; "In vitro sonodynamic cytotoxicity in regulated cavitation conditions" *Ultrasonics*; 2009; Vol: 49(2); pp: 238-243
- Maass Moreno R, Damianou CA, Sanghvi N; "Noninvasive temperature estimation in tissue via ultrasound echo shifts. Part II. In vitro study" *J. Acoust. Soc. of Am.*; 1996; Vol: 100; pp: 2522-2530
- Maass Moreno R, Damianou CA; "Noninvasive temperature estimation in tissue via ultrasound echo-shifts. Part I. Analytical model" *J. Acoust. Soc. of Am.*; 1996; Vol: 100; pp: 2514-2521
- Makin IRS, Mast TD, Faidi W, Runk MM, Barthe PG, Slayton MH; "Miniaturized Ultrasound Arrays for interstitial ablation and imaging" *Ultrasound in Med. and Biol.*; 2005; Vol. 31(11); pp: 1539–1550
- Mast TD, Makin IRS, Faidi W, Runk MM, Barthe PG, Slayton MH; "Bulk ablation of soft tissue with intense ultrasound: Modeling and experiments" *J. Acoust. Soc. of Am.*; 2005; Vol: 118(4); pp: 2715-2724
- Matsumoto Y, Nakano J, Oga S, Kataoka H, Honda Y, Sakamoto J, Okita M; "The non-thermal effects of pulsed ultrasound irradiation on the development of disuse muscle atrophy in rat gastrocnemius muscle" *Ultrasound in Med. and Biol.*; 2014; Vol: 40(7); pp: 1578-1586
- Matsuo T, Matsuo N; "Intracellular calcium response to hydraulic pressure in human trabecular cells" *Br. J. Ophthalmol.*; 1996; Vol: 80(6); pp. 561-566
- Maxwell AD, Cain CA, Hall TL, Fowlkes JB, Xu Z; "Probability of cavitation for single ultrasound pulses applied to tissues and tissue-mimicking materials" *Ultrasound in Med. and Biol.*; 2013; Vol: 39(3); pp: 449-465
- Maxwell L; "Therapeutic Ultrasound: Its Effects on the Cellular and Molecular Mechanisms of Inflammation and Repair" *Physiotherapy*; 2010; Vol: 78(6); pp: 421-426
- Mense S, Simons DG, Russell IJ; "Muscle pain. Understanding its nature, diagnosis and treatment" Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia; 2001
- Miller DL, Bao S; "The relationship of scattered subharmonic, 3.3-MHz fundamental and second harmonic signals to damage of monolayer cells by ultrasonically activated Albutex<sup>®</sup>" *J. Acoust. Soc. of Am.*; 1998; Vol: 103(2); pp: 1183-1189
- Miller DL, Smith NB, Bailey MR, Czarnota GJ, Hynynen K, Makin IR; "Overview of therapeutic ultrasound applications and safety considerations" *J. Ultrasound Med.*; 2012; Vol: 31(4); pp: 623-634
- Miller DL, Thomas RM, Buschbom RL; "Comet assay reveals DNA strand breaks induced by ultrasonic cavitation in vitro" *Ultrasound in Med. and Biol.*; 1995; Vol: 21(6); pp: 841-848.
- Miller KJ, Thaloor D, Matteson S, Pavlath GK; "Hepatocyte growth factor affects satellite cell activation and differentiation in regenerating skeletal muscle" *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*; 2000; Vol: 278(1); pp: C174-C181
- Miller MW, Miller DL, Brayman AA; "A Review of in Vitro Bioeffects of Inertial Ultrasonic Cavitation from a Mechanistic Perspective," *Ultrasound in Med. and Biol.*; 1996; Vol: 22(9); pp. 1131- 1154
- Miller MW, Ziskin MC; "Biological consequences of hyperthermia" *Ultrasound in Med. and Biol.*; 1989; Vol: 15(8); pp: 707-722

- Morris CE, Homann U; "Cell Surface Area Regulation and Membrane Tension" *J. Membrane Biol.*; 2001; Vol: 179; pp: 79-102
- Mortimer AJ, Dyson M; "The effect of therapeutic ultrasound on calcium uptake in fibroblasts" *Ultrasound in Med. and Biol.*; 1988; Vol: 14 (6), pp: 499-506
- Morton KI, Ter Haar G, Stratford IJ, Hill CR; "Subharmonic emission as an indicator of ultrasonically-induced biological damage" *Ultrasound in Med. and Biol.*; 1983; Vol: 9(6); pp: 629-633
- Mostafa NZ, Uludag H, Dederich DN, Dosxhak MR, El-Bialy TH; "Anabolic effects of low-intensity pulsed ultrasound on human gingival fibroblasts" *Archives of oral biology.*; 2009; Vol: 54; pp: 743-748
- Muratore R, Akabas T, Muratore IB; "High-Intensity Focused Ultrasound Ablation of Ex Vivo Bovine Achilles Tendon" *Ultrasound in Med. and Biol.*; 2008; Vol 34(12); pp: 2043-2050
- Nakago-Matsuo C, Matsuo T, Nakago T; "Intracellular calcium response to hydraulic pressure in human periodontal ligament fibroblasts" *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.*; 1996; Vol: 109(3); pp. 244-248
- Nakayama GR, Caton MC, Nova MP, Parandoosh Z; "Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro" *J. Immunol. Methods.*; 1997; Vol: 204(2); pp: 205-208.
- Nell DM, Myers MR; "Thermal effects generated by high-intensity focused ultrasound beams at normal incidence to a bone surface" *J. Acoust. Soc. of Am.*; 2010; Vol: 127(1); pp: 549-559
- Neppiras EA; "Measurement of Acoustic cavitation" *IEEE Transactions on Sonics and Ultrasonics*; 1968; Vol 15(2); pp: 81-88
- Nightingale KR, Palmeri ML, Nightingale RW, Trahey GE; "On the feasibility of remote palpation using acoustic radiation force" *J. Acoust. Soc. of Am.*; 2001; Vol. 110(1); pp: 625-634
- Noltingk BE, Neppiras EA; "Cavitation Produced by Ultrasonics" *Proceedings of the Physical Society*; 1950; Vol: 63; pp: 674-685.
- Notarnicola A, Moretti B; "The biological effects of extracorporeal shock wave therapy (ESWT) on tendon tissue" *Muscles Ligaments Tendons J.*; 2012; Vol: 2(1); pp: 33-37.
- NTD Resource Center; "UT Material Properties"  
[https://www.nde-ed.org/GeneralResources/MaterialProperties/UT/ut\\_matlprop\\_piezoelectrics.htm](https://www.nde-ed.org/GeneralResources/MaterialProperties/UT/ut_matlprop_piezoelectrics.htm)
- O'Brien WD Jr, Deng CX, Harris GR, Herman BA, Merritt CR, Sanghvi N, Zachary JF; "The risk of exposure to diagnostic ultrasound in postnatal subjects: thermal effects" *J. Ultrasound Med.*; 2008; Vol: 27(4); pp: 517-35; quiz 537-40.
- O'Brien WD; "Ultrasound: Biophysics mechanisms" *Prog. Biophys. Mol. Biol.*; 2007; Vol: 93(1-3); pp: 212-255
- Ogden JA; "Principles of Shock Wave Therapy" *Clinical Orthopedics and related research*; 2001; Vol: 38; pp: 8-17
- Olbrich K, Rawicz W, Needham D, Evan E; "Water permeability and mechanical strength of polyunsaturated lipid bilayers" *Biophys J.*; 2000; Vol: 79(1); pp: 321-327
- Oliveira PD, Pires-Oliveira DAA, Pacheco-Soares C, Martignago CC, Poli-Frederico RC, Oliveira RF; "Effect of low-intensity pulsed ultrasound therapy on a fibroblasts cell culture." *Fisioter. Pesq.*; 2015; Vol: 22(2); pp: 112-118
- O'Neil HT; "Theory of Focusing Radiators" *J. Acoust. Soc. of Am.*; 1949; Vol. 21(5), pp: 516-526

- Pang GA, Bay E, Dean Ben XL, Razansky D; "Three-Dimensional Optoacoustic Monitoring of Lesion Formation in Real Time During Radiofrequency Catheter Ablation" *J. of Cardiovascular Electrophysiology*; 2015; Vol: 26(3); pp: 339-345
- Parker KK, Ingber DE; "Extracellular matrix, mechanotransduction and structural hierarchies in heart tissue engineering" *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*; 2007; Vol: 362(1484); pp: 1267-1279.
- Patel US, Ghorayeb SR, Yamashita Y, Atanda F, Walmsley AD, Scheven BA; "Ultrasound field characterization and bioeffects in multiwell culture plates" *J. Ther. Ultrasound*; 2015; Vol: 3(8)
- Pennes HH; "Analysis of tissue and arterial blood temperatures in the resting human forearm"; *J. Appl. Physiol.*; 1998; Vol: 85(1); pp: 5-34
- Picas L, Rico F, Scheuring S; "Direct Measurement of the Mechanical Properties of Lipid Phases in Supported Bilayers" *Biophys J.*; 2012; Vol:102(1); L:01-03
- Pitt WG, Hussein GA, Staples BJ; "Ultrasonic drug delivery. A general review" *Expert Opinion on Drug Delivery*; 2004; Vol: 1(1); pp: 37-56
- Plesset MS; "Bubble dynamics and cavitation" *Ann. Rev. Fluid Mech.*; 1977; Vol: 9; pp: 145-185
- Pohlhammer J, O'Brien WD; "Dependence of the ultrasonic scatter coefficient on collagen concentration in mammalian tissues" *J. Acoust. Soc. of Am.*; 1981; Vol: 69(1); pp: 283-285
- Postema M, Van Wamel A, Lancée CT, de Jong N; "Ultrasound-induced encapsulated microbubble phenomena" *Ultrasound in Med. and Biol.*; 2004; Vol: 30(6); pp: 827-840
- Prat F, Chapelon JY, Chauffert B, Ponchon T, Cathignol D; "Cytotoxic effects of acoustic cavitation on HT-29 cells and a rat peritoneal carcinomatosis in vitro" *Cancer Res.*; 1991; Vol: 51(11); pp: 3024-3029
- Prentice P, Cuschieri A, Dholakia K, Prausnitz M, Campbell P; "Membrane disruption by optically controlled microbubble cavitation" *Nature Physics*; 2005; Vol: 1; pp: 107-110
- Rahim A, Taylor SL, Bush NL, Ter Haar G, Bamber JC, Porter CD; "Physical parameters affecting ultrasound/microbubble-mediated gene delivery efficiency in vitro" *Ultrasound in Med. and Biol.*; 2006; Vol: 32(8); pp: 1269-1279
- Rebling J, Oyaga Landa FJ, Deán-Ben XL, Douplik A, Razansky D; "Integrated catheter for simultaneous radio frequency ablation and optoacoustic monitoring of lesion progression" *Opt. Lett.*; 2018; Vol: 43(8); pp: 1886-1889
- Robertson VJ, Baker KG; "A review of Therapeutic Ultrasound: effectiveness studies" *Phys. Ther.*; 2001; Vol: 81; pp: 1339-1350
- Rodríguez Martín JM; "Propuesta para el perfeccionamiento de la dosificación en Ultrasonoterapia" *Prácticas de electroterapia en fisioterapia*, EPUB; 2014
- Romeo P, Lavanga V, Pagani D, Sansone V; "Extracorporeal shock wave therapy in musculoskeletal disorders: a review" *Med. Princ. Pract.*; 2014; Vol: 23(1); pp: 7-13
- Ronda S, Aragón JL, Iglesias E, Montero de Espinosa F; "The Use of Phononic Crystals to Design Piezoelectric Power Transducers" *Sensors*; 2017; Vol: 17(4); pp: 729.
- Ronda S, Montero de Espinosa F; "Design of piezoelectric piston-like piezoelectric transducers based on a phononic crystal" *Advances in Applied Ceramics*; 2018; Vol: 117(3); pp: 177-181

- Roper J, Harrison A, Bass MD; "Induction of Adhesion-dependent Signals Using Low Intensity Ultrasound" J. of Visualized Experiments; 2012; Vol: 63(e4024); pp: 1-6
- Rubin DM, Anderton N, Smalberger C, Polliack J, Nathan M, Postema M; "On the Behaviour of Living Cells under the Influence of Ultrasound" Fluids; 2018; Vol: 3(82)
- Sapareto SA, Dewey WC; "Thermal dose determination in cancer therapy" Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.; 1984; Vol: 10(6); pp: 787-800
- Schratzberger P, Krainin JG, Schratzberger G, Silver M, Ma H, Kearney M, Zuk RF, Brisken AF, Losordo DW, Isner JM; "Transcutaneous Ultrasound Augments Naked DNA Transfection of Skeletal Muscle" Mol. Ther.; 2002; Vol: 6(5); pp: 576-583
- Secomski W, Bilmin K, Kujawska T, Nowicki A, Grieb P, Lewin PA; "In vitro ultrasound experiments: Standing wave and multiple reflections influence on the outcome" Ultrasonics; 2017; Vol: 77; pp: 203-213
- Seip R, Van Baren P, Simon C, Ebbini ES; "Non-invasive spatio-temporal temperature change estimation using diagnostic ultrasound" Proc. IEEE Ultrason. Symp.; 1995; pp. 1613-1616
- Sems A, Dimeff R, Iannotti JP; "Extracorporeal Shock Wave Therapy in the treatment of Chronic Tendinopathies" J. Am. Acad. Orthop. Surg.; 2006; Vol: 14(4); pp: 195-204
- Sigrist RMS, Liao J, Kaffas AE, Chammas MC, Willmann JK; "Ultrasound Elastography: Review of Techniques and Clinical Applications" Theranostics; 2017; Vol: 7(5); pp: 1303-1329
- Silve A, Guimerà Brunet A, Al-Sakere B, Ivorra A, Mir LM; "Comparison of the effects of the repetition rate between microsecond and nanosecond pulses: Electroporation-induced electro-desensitization?" Biochimica et Biophysica Acta; 2014; Vol: 1840; pp: 2139-2151
- Smith RL, Rusk SF, Ellison BE, Wessells P, Tsuchiya K, Carter DR, Caler WE, Sandell LJ, Schurman DJ; "In vitro stimulation of articular chondrocyte mRNA and extracellular matrix synthesis by hydrostatic pressure" J. Orthop. Res.; 1996; Vol: 14(1); pp: 53-60
- Souza RM, Santos TQ, Oliveira DP, Souza, Alvarenga AV, Costa-Felix RPB "Standard operating procedure to prepare agar phantoms" J. of Physics: Conference Series; 2016; Vol: 733; 012044
- Speed CA; "Therapeutic ultrasound in soft tissue lesions" Rheumatology; 2001; Vol: 40(12); pp: 1331-1336
- Stark G; "Functional consequences of oxidative membrane damage" J. Membr. Biol.; 2005; Vol: 205(1); pp: 1-16
- Stokes GG; "On the Effect of the Internal Friction of Fluids on the Motion of Pendulums" Transactions of the Cambridge Philosophical Society; 1851; Vol. 9; pp: 8
- Sundaram J, Mellein BR, Mitragotri S; "An experimental and theoretical analysis of ultrasound-induced permeabilization of cell membranes" Biophys. J.; 2003; Vol: 84(5); pp: 3087-3101
- Suslick KS, Flannigan DJ; "Inside a collapsing bubble: sonoluminescence and the conditions during cavitation" Annu. Rev. Phys. Chem.; 2008; Vol: 59; pp: 659-683
- Szabo TL; "Diagnostic Ultrasound Imaging: Inside Out. Chapter 15: Ultrasound-induced Bioeffects" Elsevier; 2014; pp: 653-697
- Takahashi T, Nakagawa K, Tada S, Tsukamoto T; "Low-energy shock waves evoke intracellular Ca<sup>2+</sup> increases independently of sonoporation" Scientific Reports; 2019; Vol: 9(3218)



- Tata DB, Dunn F, Tindall DJ; "Selective clinical ultrasound signals mediate differential gene transfer and expression in two human prostate cancer cell lines: LnCap and PC-3" *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 1997; Vol: 234(1); pp: 64-67
- Temkin S; "Elements of Acoustics" John Wiley and Sons, New York; 1981
- Ter Haar G, Wyard SJ; "Blood cell banding in ultrasonic standing wave fields: A physical analysis" *Ultrasound in Med. and Biol.*; 1978; Vol: 4(2); pp: 111-123
- Ter Haar G, Coussios C; "High intensity focused ultrasound: physical principles and devices" *Int. J. Hyperthermia*; 2007; Vol 23(2); pp: 89-104
- Ter Haar G; "Safety and bio-effects of ultrasound contrast agents" *Med. Biol. Eng. Comput.*; 2009; Vol: 47(8); pp: 893-900
- Ter Haar G; "Therapeutic ultrasound" *European Journal of Ultrasound*; 1999; Vol 9(1); pp: 3-9
- Ter Haar G; "Ultrasound focal beam surgery" *Ultrasound in Med. and Biol.*; 1995; Vol. 21 (9) pp. 1089-1100
- Thoumine O, Ott A; "Time scale dependent viscoelastic and contractile regimen in fibroblasts probed by microplate manipulation" *J. Cell Sci.*; 1997; Vol: 110; pp: 2109-2116
- Tough EA, White AR, Cummings TM, Richards SH, Campbell JL; "Acupuncture and dry needling in the management of myofascial trigger point pain: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials" *Eur. J. Pain*. 2009; Vol: 13(1); pp: 3-10
- Tsai WC, Pang JHS, Hsu CC, Chu NK, Lin MS, Hu CF; "Ultrasound Stimulation of Types I and III Collagen Expression of Tendon Cell and Upregulation of Transforming Growth factor  $\beta$ " *J. of Orth. Res.*; 2006; Vol. 24 (6) pp. 1310-1316
- Tsai WC, Tang ST, Liang FC; "Effect of Therapeutic Ultrasound on Tendons" *Am. J. Phys. Med. Rehabil.*; 2011; Vol: 90(12); pp: 1068-1073
- Tsakamoto A, Higashiyama S, Yoshida K, Watanabe Y, Furukawa KS, Ushida T; "Stable cavitation induces increased cytoplasmic calcium in L929 fibroblasts exposed to 1-MHz pulsed ultrasound" *Ultrasonics*; 2011.; Vol: 51(8); pp: 982-990
- Tsuru H, Shibaguchi H, Kuroki M, Yamashita Y, Kuroki M; "Tumor growth inhibition by sonodynamic therapy using a novel sonosensitizer" *Free Radic. Biol. Med.*; 2012; Vol: 53(3); pp: 464-72
- Tworokski E, Glucksberg MR, Johnson M; "The effect of the rate of hydrostatic pressure depressurization on cells in culture" *PLoS One*; 2018; Vol:13(1); e0189890
- Tzanakis I, Lebon GS, Eskin DG, Pericleous KA; "Characterizing the cavitation development and acoustic spectrum in various liquids" *Ultras. Sonochem.*; 2017; Vol: 34; pp: 651-662
- Udroiu I, Domenici F, Giliberti C, Bedini A, Palomba R, Luongo F, Pozzi D, Bordi F, Castellano AC; "Potential genotoxic effects of low-intensity ultrasound on fibroblasts, evaluated with the cytokinesis-block micronucleus assay" *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*; 2014; Vol: 772; pp:20-24
- Udroiu I, Marinaccio J, Bedini A, Giliberti C, Palomba R, Sgura A; "Genomic damage induced by 1-MHz ultrasound in vitro" *Environ. Mol. Mutagen.*; 2018; Vol: 59(1); pp: 60-68
- Unsworth J, Kaneez S, Harris S, Ridgway J, Fenwick S, Chenery D, Harrison A; "Pulsed low intensity ultrasound enhances mineralization in preosteoblast cells" *Ultrasound in Med. and Biol.*; 2007; Vol: 33(9); pp: 1468-1474

- VanBabel E; "Effects of shear stress on endothelial cells: Possible relevance for ultrasound applications" *Progress in Bioph. and Mol. Biol.*; 2007; Vol: 93(1-3); pp: 374-383
- Vetrano M, D'Alessandro F, Torrisi MR, Ferretti A, Vulpiani MC, Visco V; "Extracorporeal shock wave therapy promotes cell proliferation and collagen synthesis of primary cultured human tenocytes" *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.*; 2011; Vol: 19; pp:2159-2168.
- Vidal IR, Cervantes RF, Rodríguez AM, Gómez JMS, Insua MC, Seoane MB; "La Fisioterapia en España durante los siglos XIX y XX hasta la integración en escuelas universitarias de Fisioterapia" *Fisioterapia*; 2001; Vol: 23(4); pp: 206-217
- Voigt JU; "Ultrasound molecular imaging" *Methods*; 2009; Vol: 48(2); pp: 92-97
- Wallace KD, Lloyd CW, Holland MR, Miller JG; "Finite amplitude measurements of the nonlinear parameter  $B/A$  for liquid mixtures spanning a range relevant to tissue harmonic mode" *Ultrasound in Med. and Biol.*; 2007; Vol: 33(4); pp: 620-629
- Wang CJ, Wang FS, Yang KD, Weng LH, Hsu CC, Huang CS, Yang LC; "Shock wave therapy induces neovascularization at the tendon-bone junction" *Journal of Orthopaedic Research*; 2003; Vol: 21; pp: 984-989
- Wang JHC, Thampatty BP; "An introductory review of cell mechanobiology" *Biomech. Model Mechanobiol.*; 2006; Vol: 5(1); pp: 1-16
- Wang L, Li G, Xia J, Wang LV; "Ultrasonic-heating-encoded photoacoustic tomography with virtually augmented detected view" *Optica*; 2015; Vol 2(4); pp: 307-312
- Wang LV, Wu HI; "Biomedical Optics: Principles and Imaging" John Wiley & Sons; 2012
- Wang LV; "Multiscale photoacoustic microscopy and computed tomography" *Nat. Photonics*; 2009; Vol: 3(9), pp: 503-509
- Ward SR, Lieber RL; "Density and hydration of fresh and fixed human skeletal muscle" *J. Biomech.*; 2005; Vol: 38(11); pp: 2317-2320
- Warden SJ, McMeeken JM; "Ultrasound usage and dosage in sports physiotherapy" *Ultrasound in Med. and Biol.*; 2002; Vol: 28(8); pp: 1075-1080
- Watanabe M, Kojima S, Hosono M; "Effect of low-intensity pulsed ultrasound therapy on a rat knee joint contracture model" *J. Phys. Ther. Sci.*; 2017; Vol: 29(9); pp: 1567-1572
- Watson T "Therapeutic Ultrasound" *Electrotherapy on the Web* 2017  
<http://www.electrotherapy.org/assets/Downloads/Therapeutic%20Ultrasound%202017.pdf>
- Watson T; "Ultrasound Dose Calculations" *In Touch*; 2002; Vol. 101, pp. 14-17
- Watson T; "Ultrasound in contemporary physiotherapy practice" *Ultrasonics*; 2008; Vol: 48(4); pp: 321-329
- Webster DF, Harvey W, Dyson M, Pond JB; "The role of ultrasound-induced cavitation in the 'in vitro' stimulation of collagen synthesis in human fibroblasts" *Ultrasonics*; 1980; Vol: 18(1); pp: 33- 37
- Webster DF, Pond JB, Dyson M, Harvey W; "The role of cavitation in the in vitro stimulation of protein synthesis in human fibroblasts by ultrasound" *Ultrasound in Med. and Biol.*; 1978; Vol: 4; pp: 343-351
- Wright MO, Stockwell RA, Nuki G; "Response of plasma membrane to applied hydrostatic pressure in chondrocytes and fibroblasts" *Connect Tissue Res.*; 1992; Vol: 28(1-2); pp: 49-70

- Wu J, Nyborg WL; "Ultrasound, cavitation bubbles and their interaction with cells" *Adv. Drug Deliv. Rev.*; 2008; Vol: 60(10); pp: 1103-1116
- Wu J; "Acoustic Streaming and Its Applications" *Fluids*; 2018; Vol: 3(4) 108
- Wu MJ, Gu ZY, Sun W; "Effects of hydrostatic pressure on cytoskeleton and BMP-2, TGF-beta, SOX-9 production in rat temporomandibular synovial fibroblasts" *Osteoarthritis Cartilage*; 2008; Vol: 16(1); pp: 41-47
- Yadollahpour A, Mostafa J, Samaneh R, Zohreh R; "Ultrasound Therapy for Wound Healing: A Review of Current Techniques and Mechanisms of Action" *J. of pure and Applied Microbiol.*; 2014; Vol. 8(5); pp: 4071-4085
- Yang T, Francesca B, Giovanni N, Ilaria C, Chiara M, Roberto O; Kirstine BS, Ilaria C, Paolo M; "A comprehensive strategy for the analysis of acoustic compressibility and optical deformability on single cells " *Sci. Rep.*; 2016; Vol: 6(23946)
- Yao J, Ke H, Tai S, Zhou Y, Wang LV; "Absolute Photoacoustic Thermometry in Deep Tissue" *Opt Lett.* 2013; Vol: 38(24); pp: 5228-5231
- Yeung CK, Guo X, Ng YF; "Pulsed ultrasound treatment accelerates the repair of Achilles tendon rupture in rats" *J. Orthop. Res.*; 2006; Vol: 24(2); pp: 193-201
- Yumita N, Kawabata K, Sasak Ki, Umemura S; "Sonodynamic effect of erythrosin B on sarcoma 180 cells in vitro" *Ultras. Sonochem.*; 2002; Vol: 9; pp: 259-265
- Yumita N, Nishigaki R, Umemura K, Umemura S; "Hematoporphyrin as a sensitizer of cell-damaging effect of ultrasound" *Jpn. J. Cancer Res.*; 1989; Vol: 80(3); pp: 219-222
- Zhang J, Hor PH, Fischer J, Partanen A, Karjalainen T, Muthupillai R; "A Temperature Dependent Perfusion Rate Model for Simulating Temperature Evolution in Tissue for Magnetic Resonance Imaging guided High Intensity Focused Ultrasound (MR-HIFU) Therapy: Initial Experience in a Pig Model" *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.*; 2011; Vol: 19
- Zhang Y (1), Azuma T, Sasaki A, Yoshinaka K, Takagi S, Matsumoto Y; "Ultrasound-mediated gene transfection: A comparison between cells irradiated in suspension and attachment status" *AIP Conference Proceedings*; 2012; Vol: 1481(1); pp: 481-487
- Zhang Y (2), Tachibana R, Okamoto A, Azuma T, Sasaki A, Yoshinaka K, Tei Y, Takagi S, Matsumoto Y; "Ultrasound-mediated gene transfection in vitro: effect of ultrasonic parameters on efficiency and cell viability" *Int. J. Hyperthermia*; 2012; Vol: 28(4); pp: 290-299
- Zhou LX, Yi Z, Fei Z, Fen GX; "Estimation of temperature elevation generated by ultrasonic irradiation in biological tissues using the thermal wave method" *Chin. Phys. B.*; 2013; Vol: 22 (2); 024301
- Zhou S, Schmelz A, Seufferlein T, Zhao J, Max G; "Molecular mechanisms of low intensity pulsed ultrasound in human skin fibroblasts" *J. Biol. Chem.*; 2004; Vol: 279(52); pp: 54463-54469