UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE FÍSICA

HERMES ARYTTO SALLES KAMIMURA

**Excitação multifrequencial e aspectos de segurança
para sonotrombólise transcraniana**

Ribeirão Preto - SP
2016

HERMES ARYTTO SALLES KAMIMURA

**Excitação multifrequencial e aspectos de segurança
para sonotrombólise transcraniana**

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Área de Concentração:

Física Aplicada à Medicina e Biologia

Orientador:

Prof. Dr. Antonio Adilton Oliveira Carneiro

Co-orientador:

Prof. Dr. Octávio Marques Pontes Neto

Versão corrigida

Versão original disponível na FFCLRP-

Ribeirão Preto - SP

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Kamimura, Hermes Arytto Salles

Excitação multifrequencial e aspectos de segurança para sonotrombólise transcraniana / Hermes Arytto Salles Kamimura; orientador Prof. Dr. Antonio Adilton Oliveira Carneiro. Ribeirão Preto - SP, 2016.

92 f.:il.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-graduação em Física Aplicada à Medicina e Biologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2016.

1. Acidente vascular cerebral; 2. barreira hematoencefálica; 3. cavitação; 4. neuromodulação; 5. sonotrombólise.

Nome: KAMIMURA, Hermes Arytto Salles

Título: Excitação multifrequencial e aspectos de segurança para sonotrombólise transcraniana

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para a obtenção do título de Doutor
em Ciências.

Aprovado em: ____/____/____.

Banca Examinadora

Prof. Dr. : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho aos meu pais, Osamu e Janette, por serem minha fonte de motivação e resiliência e à minha esposa, Aneta, pelo apoio, amor e por me fazer sempre dar um passo a mais do que eu acreditava ser possível.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, a quem sempre recorro para ter intuição, força e proteção.

Meus eternos agradecimentos pelas oportunidades e apoio para realização deste trabalho dados por meu orientador, Prof. Dr. Antonio A. O. Carneiro, meu co-orientador, Prof. Dr. Octávio M. P. Neto e meus supervisores no estágio no exterior junto a Columbia University, Prof. Dra. Elisa E. Konofagou e Prof. Dr. Qi Wang.

Agradeço a oportunidade, o apoio e o incentivo dado pela chefia e coordenação da pós-graduação do Departamento de Física que foram dirigidas com muita competência durante meu doutoramento pelos Prof. Dr. Oswaldo Baffa Filho, Prof. Dr. Marcelo Mulato e Prof. Dr. Antonio. J. da Costa Filho.

Agradeço também o apoio do neurologista Dr. Pedro T. C. Pinto que viabilizou grande parte dessa pesquisa como no auxílio na definição do projeto, na habilitação do projeto junto ao comitê de ética e na execução de experimentos. Agradeço também as enfermeiras Marjory Costa e Sabrina Mikael pelo apoio na coleta de amostras de sangue e ao Sr. Hermes M. Oliveira pelo apoio em testes pilotos com artérias animais.

Meus agradecimentos ao Prof. Dr. Theo Z. Pavan pelo apoio nos experimentos de sonotrombólise, aos Prof. Dr. Glauber J. F. T. da Silva, Prof. Dr. André L. Baggio e Prof. Dr. Henrique A. Lopes pelo apoio nos experimentos de avaliação da contribuição de efeitos não-lineares pelo duplo feixe e ao Prof. Dr. Iouri Borissevitch e Dr. Gustavo G. Parra pelo auxílio nos experimentos com espectroscopia.

Agradeço os técnicos do Departamento de Física, cuja competência permitem não só entender as necessidades (técnicas e administrativas) dos projetos como ainda

contribuem com grandes ideias que facilitam a vida de todos os pesquisadores. São eles: Agnelo S. B. Neto, Carlos A. Brunello, Carlos R. da Silva, Elcio A. Navas, Lourenço Rocha, José L. Aziani, Nilza M. L. Marino, Ricardo G. F. dos Santos e Sérgio O. B. da Silva.

Agradeço todos os colegas do Grupo de Inovação em Instrumentação Médica e Ultrassom (GIIMUS) da USP e *Ultrasound Elasticity Imaging Laboratory* (UEIL) da Columbia University pelos momentos de concentração e de descontração. Em especial:

- (GIIMUS) Alexandre C. Bruno, Diego R. T. Sampaio e Tenysson W. Lemos pelo apoio em revisões matemáticas e de processamentos; Felipe W. Grillo pelo apoio com phantoms; Danilo J. Câmara e Guilherme A. Braz pelo apoio com as calibrações de transdutores.

- (UEIL) Shutao Wang, Camilo Acosta, Shih-Ying Wu, Marilena Karakatsani pelo apoio com os experimentos de abertura da barreira hematoencefálica por ultrassom; Amanda Buch, Christian Aurup, Hong Chen, Hohetabarhan Getachew e Kathleen G. Fan pelo apoio com experimentos de neuromodulação; e Thomas P. Garanderie pelo apoio com as calibrações de transdutores.

Agradeço também minha esposa Aneta S. K. Chaloupková por fazer parte das ilustrações dessa tese.

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2011/10809-6 e 2013/08116-8) e pelo National Institutes of Health (R01EB009041 e R01AG038961).

RESUMO

KAMIMURA, H. A. S. **Excitação multifrequencial e aspectos de segurança para sonotrombólise transcraniana**. 2016. 92 f. Tese (Doutorado - Programa de Pós-graduação em Física Aplicada à Medicina e Biologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - SP, 2016.

A sonotrombólise pela combinação de ultrassom (US) e microbolhas com medicamento trombolítico tem indicado grande eficácia na quebra de coágulos *in vitro*, devido a efeitos de cavitação. Contudo, estudos *in vivo* sobre *drug delivery* demonstram que a cavitação de microbolhas é também capaz de abrir local e transientemente a barreira hematoencefálica (BHE) - estrutura de permeabilidade seletiva que protege o Sistema Nervoso Central. Um estudo clínico sobre sonotrombólise foi interrompido precocemente devido a evolução de casos de Acidente Vascular Cerebral isquêmicos para hemorrágicos associados a danos na BHE e formação de ondas estacionárias. Nesta tese, foram realizados estudos *in vitro* e *in vivo* sobre técnicas de US multifrequencial para trombólise. Além disso, verificou-se os limiares para a abertura da BHE e efeitos de neuromodulação ambos causados pelo ultrassom transcraniano. Foi demonstrado que o duplo feixe de US e a variação temporal de frequências (excitação codificada) são capazes de reduzir a formação de ondas estacionárias e gerar regiões focais mais confinadas do que feixes focalizados monofrequenciais. O duplo feixe foi incapaz de gerar ondas de baixa frequência para trombólise (≤ 1 Pa para feixes primários de 1,58 MPa). Exames histológicos e por imagens de ressonância magnética mostraram que a cavitação de microbolhas pode causar danos ao tecido cerebral para níveis de pressão de mesma ordem necessários para se observar efeito trombolítico. Além disso, foi observado que

o US é capaz de disparar atividade neuronal causando respostas motoras e indícios de respostas associadas a modulação de atividades cognitivas. A focalização de feixes por excitação multifrequencial é um grande avanço para sonotrombólise. Contudo, a potencialização do efeito trombolítico do US por cavitação e medicamento é limitada devido a danos a BHE e critérios de exclusão do medicamento.

Palavras-chave: 1. Acidente vascular cerebral; 2. barreira hematoencefálica; 3. cavitação; 4. neuromodulação; 5. sonotrombólise.

ABSTRACT

KAMIMURA, H. A. S. **Multifrequency excitation and safety for transcranial sonothrombolysis**. 2016. 92 f. Dissertation (Ph.D. - Graduate program in Physics Applied to Medicine and Biology) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto - SP, 2016.

Sonothrombolysis by combining ultrasound (US) and microbubbles with thrombolytic drugs has been demonstrated capable of breaking blood clots in *in vitro* studies, due to cavitation effects. However, *in vivo* drug delivery studies have demonstrated that cavitation of microbubbles is also capable of opening locally and transiently the blood-brain barrier (BBB) - structure with selective permeability that protects the Central Nervous System. A sonothrombolysis clinical study was interrupted prematurely because of the occurrence of intracerebral hemorrhages after treatment associated with damages in the BBB and standing waves formation. In this dissertation, *in vitro* and *in vivo* studies evaluated techniques of multifrequency US for thrombolysis. Furthermore, the ultrasound pressure threshold to obtain the BBB opening and neuromodulation effects were explored during transcranial insonation. It has been demonstrated that the double US beam and the time variation of frequencies (coded excitation) are capable of reducing standing wave formation and generating more confined focus zones than monofrequency focused beams. The double US beam was not capable of generating low frequency waves for thrombolysis (≤ 1 Pa obtained from primary beams with 1.58 MPa). Histological exams and magnetic resonance images demonstrated that microbubbles cavitation can damage the brain tissue with acoustic pressures of the same level necessary to observe thrombolytic effects. Furthermore, it was observed motor responses and other responses associated with cognitive activity triggered by US.

The capability of multifrequency excitation in focusing US beams is an important advance for sonothrombolysis. However, the enhancement of fibrinolytic effect of US by microbubbles cavitation and with thrombolytic drugs is limited by associated damages to the BBB and by exclusion criteria for the use of the thrombolytic drugs.

Key-words: 1. Stroke; 2. blood-brain barrier; 3. cavitation; 4. neuromodulation; 5. sonothrombolysis.

LISTA DE FIGURAS

1.1	Esquemático da organização da tese.	4
2.1	Solução analítica do gradiente de pressão em um meio linear e simulação para um meio não-linear com seus respectivos espectros de frequência.	13
2.2	Regimes de cavitação estável e inercial causadas por ultrassom. Modificado de Turanek <i>et al.</i> , 2015 [113].	20
2.3	Simulação de regimes de cavitação em uma microbolha de $1,4 \mu\text{m}$ imersa em sangue. O pulso de excitação de 1,5 MHz e 10 ciclos foi aplicado sobre a microbolha (preto). O raio da microbolha e a onda de pressão espalhada variaram com a pressão de excitação de 0,2 MPa (azul), 2 MPa (verde) e 20 MPa (vermelho).	21
2.4	Formação de ondas estacionárias. Mapas de pressão acústica gerados em simulação utilizando k-Wave Matlab Toolbox para: (a) fonte de ultrassom pontual de frequência 0,5 MHz em um meio homogêneo com impedância característica $Z_0 = 1,5 \text{ MRayl}$, (b) fonte de ultrassom centralizada em um cilindro com impedância característica $Z = 2.Z_0$ e (c) fonte deslocada do centro do cilindro com mesmas propriedades acústicas de (b).	22
2.5	Representação de pulsos de excitação ultrassônica codificados. (a) Codificação por chirp e (b) codificação aleatória de frequência.	22
3.1	Montagem experimental da acusto-ótica. (a) Avaliação da zona focal de baixa frequência utilizando um vibrômetro laser e (b) mapeamento do campo acústico de baixa frequência formado dentro de um cilindro de acrílico.	26

3.2	(a) Força de radiação acústica que vibra o alvo gerando uma componente linear de sinal de VA e (b) espalhamento não-linear das ondas que compõem os feixes primários de ultrassom. Os feixes primários se espalham e sofrem interferências que geram componentes de mais baixas frequências (kHz).	28
3.3	Arranjo experimental para análise do decaimento do sinal de VA. . .	29
3.4	Campo acústico de frequência 20 kHz devido à mistura de dois feixes acústicos (em MHz) mapeado pela técnica de acusto-ótica.	29
3.5	Campos acústicos de 20 kHz dentro de um cilindro de acrílico que simula um crânio humano. Da esquerda para direita encontram-se os resultados utilizando um transdutor planar, transdutor focalizado monoelemento e um transdutor confocal de dois elementos.	30
3.6	Decaimento com a distância do sinal de VA para 4 valores de diferenças de frequência.	31
4.1	Montagem experimental para abertura de BHE por ultrassom. Os animais foram posicionados em um sistema estereotáxico com uma mistura de 1% de isoflurano e oxigênio ($0.8 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$) sendo continuamente entregue durante a insonação. Microbolhas foram injetadas através da veia do rabo do animal imediatamente antes da insonação. Um recipiente de água degaseificada e gel acoplador foram usados para acoplar a cabeça do animal aos transdutores de ultrassom. Um transdutor terapêutico com banda de frequência 1,23-2,29 MHz foi energizado por um gerador de função e um segundo transdutor de 10 MHz foi utilizado para alinhar os focos dos transdutores ao putâmen. Este segundo transdutor de pulso-eco, também foi utilizado como o detector para a monitorização DCP durante as insonações.	39

4.2	Caracterização dos sinais Chirp e SPFA. (a) Resposta em frequência do transdutor (em água) e resposta em frequência do transdutor com atenuação do crânio (na região do putâmen), (b) fator de calibração $K(f(t))$ baseado na resposta em frequência do transdutor com atenuação do crânio, (c) sinal de chirp otimizado, (d) espectro do sinal de chirp otimizado, (e) sinal de SPFA otimizado e (f) espectro do sinal de SPFA otimizado.	44
4.3	Campos de pressão negativa simulados para: (a) insonação regular (1,5 MHz); (b) Chirp: 1,5-1,9 MHz, 10 kHz, 3 ciclos; (c) Chirp: 1,5-1,9 MHz, 10 kHz, 2 ciclos; (d) Chirp: 1,23-2,29 MHz, 10 kHz, 3 ciclos; (e) Aleatório: 1,5-1,9 MHz, 10 kHz, 3 ciclos; (f) Aleatório: 1,5-1,9 MHz, 1 kHz, 2 ciclos; e (g) Aleatório: 1,23-2,29 MHz, 1 kHz, 3 ciclos.	45
4.4	Perfis (a) axial e (b) lateral do feixe na região do foco obtidos das simulações mostradas na Fig. 4.3.	46
4.5	Monitoramento por detecção de cavitação passiva (DCP). Espectro de frequência do DCP para os métodos (a) chirp, (b) aleatório e (c) regular; níveis de cavitação para cada método durante o tempo de insonação ((d), (e) e (f), respectivamente); espectrograma em tempo real dos sinais de DCP para cada método ((g), (h) e (i), respectivamente) com a barra de cores representando a amplitude do espectro.	47
4.6	Análise estatística ANOVA dos níveis de cavitação para cada grupo. Não houve diferença estatística significativa (ns) entre os grupos chirp e aleatório. Diferenças significativas (*) foram encontradas entre os grupos chirp e regular e entre aleatório e regular para valor de p igual a 0,0122.	48
4.7	Avaliação da abertura da BHE. Imagens de RM T1-FLASH (a)(b)(c) coronal e (d)(e)(f) transversal mostrando a abertura da BHE utilizando o agente de contraste gadolínio para os métodos chirp, aleatório e regular, respectivamente e perfil vertical (g) extraído das imagens coronais de RM (ressonância magnética) (a)(b)(c).	49

4.8	Quantificação do volume de abertura da BHE para os métodos chirp, aleatório e regular. Não houve diferença estatística significativa (ns) entre os grupos chirp e aleatório. Diferenças significativas (*) foram encontradas entre os grupos chirp e regular e entre aleatório e regular.	50
5.1	Montagem experimental para ensaio de sonotrombólise com transdutores planares. (a) Montagem experimental com dois transdutores planares mono elementos em modo pulso-eco (transdutor de monitoramento) e por sinal modulado amplificado em modo CW (transdutor terapêutico). (b) Programa em Labview para controle sincronizado via PC do pulser/receiver, gerador de função e placa de aquisição.	57
5.2	Montagem para procedimento de sonotrombólise utilizando transdutor confocal côncavo de dois elementos.	60
5.3	(A) Amostra de sangue integral utilizada nas avaliações por ultrassom e (B) amostra de sangue diluído utilizada na avaliação por espectroscopia UV-VIS.	60
5.4	Insonação terapêutica por feixe modulado em 20 kHz. (a) Ecos médios adquiridos em sangue líquido (30 s) e sangue coagulado pós-insonação terapêutica (324 min), (b) variação da velocidade de propagação do som ao longo do tempo pelas amostras controle e insonadas e (c) variação da tensão RMS dos ecos ao longo do tempo.	61
5.5	Insonação terapêutica por feixe monofrequencial de 2,7 MHz. (a) Variação da velocidade de propagação do som ao longo do tempo pelas amostras controle e insonadas e (b) variação da tensão RMS dos ecos ao longo do tempo.	63
5.6	Insonação terapêutica por feixe monofrequencial de 2,7 MHz e 1 MPa. (a) Variação da velocidade de propagação do som ao longo do tempo pelas amostras controle e insonadas e (b) variação da tensão RMS dos ecos ao longo do tempo e (c) fotografia do coágulo enrijecido pós-insonação.	63

5.7	Pulso de ultrassom transmitido em água (caminho livre) e através de uma cubeta de acrílico preenchida com água. Os transdutores de excitação e de recepção estavam afastados de 10 cm. Estes sinais foram utilizados para compensar a diferença de velocidade na leitura com amostras de sangue, devido à parede de acrílico da cubeta. . . .	64
5.8	(a) Variação da velocidade do som do coágulo durante aplicação de ultrassom. (b) Fotografia do coágulo pós-insonação por feixe de ultrassom focalizado de 3,16 MHz com pressões na faixa de MPa. . .	65
5.9	Curvas obtidas pela espectroscopia UV-vis indicando uma fase da coagulação do sangue após adição de cloreto de cálcio.	66
5.10	(a) Espectros de absorção de sangue, sangue coagulado e sangue coagulado pós insonação por ultrassom de 3 MHz e 2,2 MPa, (b) Pico em 630 nm aparecendo pós-insonação por 1h e (c) quadros do vídeo mostrando a fragmentação do coágulo diluído em solução tampão (PBS) durante a insonação por feixe focalizado.	67
6.1	Potenciais mecanismos da abertura da BHE mediada por ultrassom. .	70
6.2	Representação das localizações dos pontos de insonação dadas pelas coordenadas estereotáticas: (a) Anterior/Posterior (AP)=6,0 mm; Medial/Lateral (ML)= ± 2 mm; Dorsal/Ventral (DV)=3 mm e (b) AV=6,5 mm e 3,5 mm; ML= ± 2 mm; Dorsal/Ventral=3 mm.	73
6.3	Aberturas da BHE obtidas para insonações a 0 s e 60 s após administração de microbolhas.	73
6.4	(a) Imagem de RM ponderada em T1 mostrando o extravasamento de gadolínio para 0,67 MPa por 15 s de insonação (1), 0,67 MPa por 45 s de insonação (2), 0,52 MPa por 60 s de insonação (3) e 0,67 MPa por 60 s de insonação (4). (b) Imagem de RM ponderada em T2 adquirida 24 h após o experimento e (c) fotografia de corte coronal do encéfalo do animal fixado em parafina mostrando hemorragia na região de insonação AP=3,5 mm, ML= ± 2 mm.	74

6.5	Abertura da BHE obtida por insonação: (a) chirp para 0,34 MPa (1), 0,40 MPa (2), 0,46 MPa (4) e 0,52 MPa (3); e (b) variação aleatória de frequência para 0,34 MPa (5), 0,40 MPa (7), 0,46 MPa (8) e 0,52 MPa (6).	75
6.6	Imagens (a) transversal e (b) coronal de RM ponderada em T1 indicando abertura da BHE obtida por insonação regular (à esquerda) e por método de codificação de pulso de excitação por chirp (à direita) com 0,52 MPa por 30 s.	76
6.7	Imagens histológicas com corante H&E. Nas Fig.(a) e (b) são mostrados exemplos de pequenos danos (<i>dark neurons</i>) ao tecido cerebral de dois camundongos causados pela insonação por pulso com variação de frequência aleatória.	76
7.1	Potenciais mecanismos de ação de ondas ultrassônicas sobre canais iônicos em neurônios provocando modulação. (a) Força de radiação acústica provocando deformações mecânicas na membrana (modificado de Tyler, 2012 [13]) e (b) cavitação dentro da bicamada da membrana de neurônios (modificado de Plaksin <i>et al.</i> , 2014 [161]). Ambos efeitos podem potencialmente alterar a capacitância da membrana alterando o potencial de ação do neurônio provocando seu disparo.	81
7.2	Montagem experimental para realização da neuromodulação por ultrassom.	83
7.3	Evocação de resposta motora por ultrassom focalizado. (a) EMG da pata traseira direita durante movimento contralateral para diferentes pressões acústicas e (b) movimento contralateral evocado nas coordenadas AP=+2 mm e ML= ± 2 mm (com referência a Lambda).	85

7.4	Dilatação da pupila por neuromodulação por ultrassom. (a) (i) e (ii) mostram o tamanho da pupila antes e depois da insonação de AP=0 mm e ML= +2 mm com 2,1 MPa, (iii) e (iv) mostram a movimentação ocular ocorrida em AP=0 mm e ML= +2 mm com 3,0 MPa. (b) Porcentagem de dilatação da pupila para AP=0 mm e ML= -2 mm e para AP= -1 mm e ML= +0,8 mm. (c) Pontos onde houveram dilatação da pupila e/ou movimento oculomotor.	86
7.5	Exame histológico. Seções do encéfalo corados com H&E não mostraram sinais de danos ao tecido cerebral. Regiões insonadas (A) AP= +2 mm e ML= -2 mm, (B) AP= +2 mm e ML= +2 mm. A barra de escala representa 500 μ m e 100 μ m nas imagens maiores e menores, respectivamente.	86
A.1	Esquemático do sistema de rastreo.	116
A.2	Aba do programa em Labview em que se escolhe entre os modos de aquisição contínuo e pulsado (<i>Burst</i>).	117
A.3	Redução de ruídos ambientais utilizando 2 hidrofones. Imagens de VA de uma esfera de 1 mm presa a um aro de PVC por fios de cabelo de 50 μ m geradas com frequência de batimento ajustada em 39 kHz. .	118
A.4	Eliminação da reverberação do hidrofone.	119
A.5	Algoritmo para processamento de sinais multifrequenciais.	120
A.6	Montagem experimental para aquisição de sinal multifrequencial por VA de um osso de frango.	120
A.7	Formação da imagem primária de um osso de frango por VA a partir da tensão pico-a-pico dos sinais adquiridos.	121
A.8	Processamento do sinal adquirido por VA de um osso de frango com interação do usuário. Nas figuras (b) e (c) os "X"'s mostram as regiões e frequências selecionadas pelo usuário.	122
A.9	Imagens de um osso de frango por VA para cada frequência selecionada pelo usuário.	123
A.10	Exemplo de aquisição por VA e processamento de imagens de osso bovino com duas frequências diferentes: 26 kHz e 37 kHz.	123

- C.1 Montagem experimental para calibração do transdutor terapêutico.
 (a) O transdutor e a amostra foram posicionados por dois sistemas de posicionamento 3D independentes, (b) esferas de metal de 1 mm utilizadas como referência para posicionamento por pulso/eco, (c) coordenadas em relação a Lambda (L) em milímetros dos pontos anatômicos de interesse putâmen (P) e hipocampo (H), (d) foco do transdutor e hidrofone alinhados à Lambda, (e) hidrofone posicionado no putâmen direito (AP=6 mm, ML=+2 mm, DV=3 mm) e (f) hidrofone posicionado no hipocampo direito (AP=2 mm, ML=+3 mm, DV=4 mm). 130
- C.2 Parâmetros de calibração em função da frequência, sendo: (a) Sensibilidade do hidrofone+pré-amplificador, (b) respostas em frequência para água, putâment e hipocampo, (c) respostas em frequência em água para diferentes tensões no gerador de função, (d) coeficiente $K(f)$ de correção da resposta do transdutor considerando calibrações no putâmen e hipocampo e (e) coeficientes angulares e lineares obtidos do ajuste linear de (c). 133
- C.3 Calibração em água. (a) Mapas de pressão acústica mostrando a variação da resolução lateral do foco para frequências de 0,5, 1,0, 1,5 e 1,94 MHz, (b) variação da resolução lateral (FWHM) em função da frequência, (c) mapas de pressão acústica para as mesmas frequências mostrando a variação do comprimento do foco e (d) variação da resolução axial (FWHM) do foco em função da frequência. 134
- C.4 Interface gráfica "GUI"em Matlab para conversão de tensão no gerador em função da frequência para pressão negativa de pico, pressão positiva de pico, intensidade acústica (este somente para água), resolução lateral e resolução axial. 135
- C.5 (a) Fotografia das amostras com esfera de metal utilizada como referência (1 mm) e respectivos C-scan e mapas de pressão acústica máxima. (b) Média dos mapas de pressão. 136

- D.1 Preparo do transdutor para estudos *in vivo*. (a) Desgaseificação de água deionizada, (b) preenchimento do conjunto de transdutores e acoplador cônico de acrílico com água deionizada e desgaseificada; (c) e (d) remoção de bolhas de ar das paredes internas do conjunto; (e) preenchimento com água até atingir nível superior ao da entrada do conjunto (usando a tensão superficial da água); (f) vedação do conjunto utilizando filme de PVC ou preservativo ("camisinha") e (g) fixação do conjunto ao sistema de posicionamento 3D. 138
- D.2 Identificação dos pontos de referência Lambda e Bregma do crânio de camundongos. Fotografias: (a) do animal fixado no sistema estereotáxico após remoção de pêlos da cabeça, (b) do crânio após remoção da pele e aplicação de água oxigenada durante treinamento de identificação de Lambda e Bregma e (c) de crânio e de encéfalo frescos. Lambda foi a região escolhida para referenciamento da posição do foco do transdutor de ultrassom por ser facilmente visualizado com a pele do animal intacta. 139
- D.3 Acoplamento acústico de transdutores à cabeça dos animais. (a) Limpeza completa da cabeça do animal com água em abundância, (b) aplicação de gel condutor de ultrassom desgaseificado, (c) posicionamento de recipiente com água (deionizada e desgaseificada) e de anteparo de metal para identificação de Lambda por imagens de ultrassom em C-scan e (d) posicionamento de transdutores no recipiente com água com auxílio de um sistema de posicionamento 3D. 140
- D.4 Fotografia durante treinamento para realização de procedimento de posicionamento do foco do transdutor terapêutico na região de interesse (em inglês *targeting procedure*). (a) Crânio expostos após remoção da pele, (b) posicionamento de anteparo na região Bregma, (d) imagem em modo C-scan do anteparo e (c) sinal pulso/eco após remoção de anteparo no qual se observa ecos (1) da vedação do conjunto de transdutores, (2) da janela acústica do recipiente e (3) do crânio do animal. 142

- E.1 Procedimento para histologia de seções do cérebro coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E). (A) e (B) Exposição do coração por incisão de animal mantido sob anestesia, (C) bombeamento de solução PBS e, posteriormente, de paraformaldeído a 4% através do ventrículo direito do coração, (D) e (E) decapitação e manutenção do cabeça em solução de paraformaldeído a 4% por 24 h, (F) e (G) remoção do encéfalo mantendo-o intacto, (H) encéfalo embebido em parafina, (I) seccionamento do encéfalo em espessuras de 1-10 μm e, após aplicação de corante H&E, aquisição de imagens microscópicas (J). 144
- E.2 Exemplos de imagens de histologia de seções do encéfalo de camundongos coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E). (a) Imagem do hemisfério esquerdo sem danos aparentes causados pela insonação por ultrassom de 1,9 MHz e 3,0 MPa sem microbolhas, (b) *dark neurons* caracterizando danos leves detectados pós insonação por pulso codificado de 0,52 MPa com uso de microbolhas e (c) danos severos com necrose e focos de hemorragia causados por exposição excessiva ao ultrassom focalizado durante várias sessões experimentais de neuroestimulação. 146
- F.1 Montagem experimental com dois transdutores planares para ensaio de sonotrombólise com coágulos de sangue humano. 147
- F.2 Calibração do transdutor planar terapêutico. (a) Montagem experimental e (b) código em Labview desenvolvido para aquisição trigada utilizando um gerador de função e uma placa de aquisição. . . 149
- F.3 Curva de sensibilidade do conjunto hidrofone + pré-amplificador + acoplador (DC) fornecida pelo fabricante. 150
- F.4 Resposta em frequência do transdutor planar terapêutico para (a) pico positivo de pressão (PPP) e (b) pico negativo de pressão (PNP) para diferentes tensões ajustadas no gerador de função (de 10 a 50mVpp). A barra de erro indica o desvio padrão amostral. 150

F.5	Resoluções espaciais do foco do transdutor planar terapêutico com região focal em $19,22 \pm 0,02$ mm. As resoluções lateral e axial foram respectivamente $3,25 \pm 0,02$ mm e $22,0 \pm 0,02$ mm. A barra de erro indica o desvio padrão amostral.	151
F.6	Calibração do transdutor de monitoramento de 25 MHz utilizado em modo pulso/eco. (a) Pulso adquirido pelo hidrofone para uma energização do transdutor de $100 \mu\text{J}$ pelo pulser/receiver e (b) curvas de calibração do transdutor de 25 MHz para diferentes níveis de energia nominais ajustadas no pulser/receiver em função da distância no eixo axial do transdutor.	152
F.7	Curvas de calibração do transdutor confocal côncavo de 2 elementos. (a) Resposta em frequência, (b) curva de pressão acústica em função da tensão aplicada no gerador de função, (c) perfis axiais da região focal para as duas cerâmicas e (d) perfis laterais da região focal para as duas cerâmicas.	153
F.8	Mapa de pico de pressão acústica das cerâmicas interna e externa do transdutor confocal côncavo (a) Mapa axial-lateral do foco gerado pela cerâmica externa, (b) mapa lateral-azimutal do foco gerado pela cerâmica externa, (c) mapa axial-lateral do foco gerado pela cerâmica interna e (d) mapa lateral-azimutal do foco gerado pela cerâmica interna.	154

LISTA DE TABELAS

2.1	Revisão de estudos sobre sonotrombólise.	9
3.1	Análise por efeito acusto-ótico de ondas estacionárias e de focalização geradas para 3 diferentes tipos de transdutores de ultrassom.	30
3.2	R-quadrado dos ajustes sobre os decaimentos do sinal de baixa frequência com a distância para as Equações. 3.5 e 2.9.	31
4.1	Propriedades das microbolhas. Medições* realizadas imediatamente após ativação.	40

LISTA DE ABREVIATURAS

AM	Amplitude modulada
ANOVA	Análise de variância (do inglês <i>Analysis of variance</i>)
AVC	Acidente vascular cerebral
AVCI	Acidente vascular cerebral isquêmico
AP	Anterior/posterior
BHE	Barreira hematoencefálica
CBEB	Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica
DCP	Detecção de Cavitação Passiva
DICOM	Comunicação de imagens digitais em medicina (do inglês <i>Digital Imaging and Communications in Medicine</i>)
DBS	Estimulação cerebral profunda (do inglês <i>Deep Brain Stimulation</i>)
EMG	Eletromiografia
FFT	Transformada rápida de Fourier (do inglês <i>Fast Fourier Transform</i>)
FWHM	Largura à meia altura (do inglês <i>full width at half maximum</i>)
H&E	Hematoxilina e eosina
HIFU	Ultrassom focalizado de alta potência (do inglês <i>High Intensity Focused Ultrasound</i>)

HMIFU	Imagem de movimento harmônico para ultrassom focalizado (do inglês <i>Harmonic Motion Imaging for Focused Ultrasound</i>)
HU	Unidade de Hounsfield (do inglês <i>Hounsfield unit</i>)
I_{SPPA}	Intensidade acústica média de pico de pulso espacial (SPPA do inglês <i>Spatial peak-pulse average</i>)
IP	Intraperitoneal
ML	Medial/lateral
MRI	Imagem de ressonância magnética (do inglês <i>Magnetic Resonance Imaging</i>)
NPL	Laboratório de física nacional (do inglês <i>National Physical Laboratory</i>)
PBS	Solução tampão fosfato-salino (do inglês <i>Phosphate-buffered saline</i>)
PDF	Produtos de degradação de fibrina
PNP	Pico negativo de pressão
PPP	Pico positivo de pressão
PVC	Cloreto de polivinil (do inglês <i>Polyvinyl chloride</i>)
RMS	Valor quadrático médio (do inglês <i>Root Mean Square</i>)
rt-PA	Ativador de plasminogênio do tipo tecidual recombinante (do inglês <i>recombinant tissue type plasminogen activator</i>)
SCDh	Dose de cavitação estável utilizando harmônicos (do inglês <i>Stable Cavitation Dose using harmonics</i>)
SPFA	Seleção periódica de frequências aleatórias
SWR	Relação de ondas estacionárias (do inglês <i>Standing Wave Ratio</i>)
TC	Tomografia computadorizada

TMS	Estimulação magnética transcraniana (do inglês <i>Transcranial Magnetic Stimulation</i>)
UV-vis	Ultravioleta-visível
VA	Vibroacustografia
μ CT	Microtomografia computadorizada (CT do inglês <i>Computed tomography</i>)

XXX

SUMÁRIO

Lista de Figuras	xiii
Lista de Tabelas	xxv
Lista de Abreviaturas	xxvii
1 Introdução	1
1.1 Objetivos	3
1.2 Organização da tese	3
2 Revisão bibliográfica	5
2.1 Acidente Vascular Cerebral	5
2.2 Sonotrombólise	7
2.3 Fundamentos Acústicos	10
2.3.1 Propagação Acústica	11
2.3.2 Força de radiação acústica	13
2.3.3 Atenuação do ultrassom pelo crânio	16
2.3.4 Cavitação acústica	19
2.3.5 Ondas estacionárias	20
3 Excitação multifrequencial por duplo feixe de ultrassom	23
3.1 Introdução	23
3.2 Materiais e métodos	25
3.3 Resultados e discussões	28
3.4 Conclusão	32

4	Excitação multifrequencial por codificação de pulsos	33
4.1	Introdução	33
4.2	Materiais e métodos	34
4.2.1	Métodos de excitação ultrassônica codificada	34
4.2.2	Simulações	36
4.2.3	Estudo <i>in vivo</i>	37
4.3	Resultados e discussão	42
4.4	Conclusão	51
5	Monitoramento da coagulação e sonotrombólise	53
5.1	Introdução	53
5.2	Materiais e Métodos	55
5.2.1	Sonotrombólise por feixe modulado (AM)	56
5.2.2	Sonotrombólise por duplo feixe de alta potência	59
5.2.3	Avaliação por espectroscopia UV-vis	59
5.3	Resultados e Discussões	60
5.4	Conclusão	66
6	Segurança do método	69
6.1	Introdução	69
6.2	Materiais e métodos	71
6.3	Resultados e discussões	72
6.4	Conclusão	77
7	Neuromodulação <i>in vivo</i> por ultrassom	79
7.1	Introdução	79
7.2	Materiais e métodos	82
7.3	Resultados e discussões	83
7.4	Conclusão	87
8	Considerações finais	89
8.1	Conclusões	89
8.2	Perspectivas	90
8.3	Lista de trabalhos gerados	91

Referências	97
A Sistema de vibro-acustografia	115
B Dedução da equação do chirp modificado	125
C Calibração de transdutor focalizado Imasonic	129
D Preparo de transdutores e de animais para estudos <i>in vivo</i>	137
E Histologia	143
F Calibração de transdutores utilizados para sonotrombólise	147

INTRODUÇÃO

O acidente vascular cerebral isquêmico (AVCI) é caracterizado pela oclusão de vasos cerebrais por coágulos patológicos que impedem o fluxo sanguíneo levando ao infarto cerebral que pode causar incapacidade física e mental graves, além da morte do indivíduo. O tratamento dessa condição consiste na administração de medicamentos fibrinolíticos por via intravenosa como o rt-PA (do inglês *recombinant tissue type plasminogen activator*) - capazes de dissolver a fibrina, principal proteína que forma a estrutura do coágulo - e no uso de trombectomia mecânica endovascular (dispositivos com a capacidade de desfazer o coágulo mecanicamente por meio de cateterismo da artéria obstruída). Contudo, as medicações fibrinolíticas possuem baixa eficácia para desobstrução (50% nas melhores condições [1]), chances de hemorragia cerebral grave associadas ao medicamento (5%) e, devido aos critérios de exclusão, apenas de 1,5 a 6% dos pacientes são elegíveis para a administração intravenosa de rt-PA [2, 3]. Por outro lado, o uso de trombectomia mecânica endovascular é mais invasivo e associado a sangramentos, danos vasculares, infecções e não está disponível na maioria dos hospitais devido à alta complexidade desta modalidade de tratamento [4].

A sonotrombólise é uma nova técnica promissora para o tratamento de AVCI. Estudos *in vivo* e *in vitro* apontam para um aumento da eficácia da dissolução de

coágulos por medicamento rt-PA quando combinado à exposição por ultrassom e microbolhas. Os mecanismos da sonotrombólise permanecem desconhecidos. Porém, algumas hipóteses apontam para o aumento da penetração do medicamento dentro do coágulo promovida pela força de radiação acústica, por microcorrentes causadas pela cavitação estável de microbolhas (oscilação forçada da microbolhas), por microjatos causados pela cavitação inercial de microbolhas (colapso de microbolhas produzindo ondas de choque) e por efeitos térmicos.

Contudo, a exposição de vasos sanguíneos ao ultrassom combinado com microbolhas pode induzir à abertura da barreira hematoencefálica (BHE) [5] - estrutura de permeabilidade seletiva que protege o Sistema Nervoso Central de substâncias potencialmente neurotóxicas. Esse efeito tem sido explorado para permitir a penetração de drogas no parênquima [6]. No entanto, a abertura BHE pode estar associada ao sangramento observado em estudos de sonotrombólise [7, 8]. Em estudos com animais [9], o uso do ultrassom de 20 kHz com e sem combinação com trombolítico causou a morte de ratos durante o tratamento. Portanto, o efeito de cavitação pode atuar tanto na dissolução do coágulo - enfraquecendo as redes de fibrina e aumentando a penetração do agente fibrinolítico [10] - quanto estar associado aos casos de hemorragias durante procedimento de sonotrombólise. Desta forma, o aumento da eficácia da sonotrombólise requer uma investigação cuidadosa dos efeitos colaterais sobre os vasos sanguíneos.

Além disso, outro efeito associado à exposição do tecido cerebral ao ultrassom é a neuromodulação [11]. A neuromodulação por ultrassom acontece devido à sensibilidade mecânica de canais iônicos dos neurônios que quando expostos a ondas mecânicas causam a despolarização do potencial da membrana [12]. Uma hipótese associa a modulação da atividade neuronal à deformação da membrana neuronal por força de radiação acústica [13] e, outra hipótese, por cavitação dentro da bicamada da membrana neuronal [14]. Assim, a neuromodulação é outro efeito envolvido em procedimentos utilizando ultrassom transcraniano. Este efeito pode ser explorado para a sonotrombólise, por exemplo, na confirmação do posicionamento do foco ou na avaliação funcional do tecido cerebral em torno da região do coágulo sonotrombolizado.

Para o sucesso da técnica de sonotrombólise é necessário obter um foco

suficientemente preciso para evitar que o tecido cerebral circundante, bem como a parede arterial sofram danos. Campos de pressão inadequados podem facilitar a formação de ondas estacionárias, causar efeitos térmicos fora da região do coágulo, além de permitir efeito de cavitação danosos ao tecido cerebral. Outra preocupação é que poucos pacientes são elegíveis ao uso de trombolítico o que limitaria o uso da técnica a menos de 6% dos pacientes, pela combinação da técnica com medicamento trombolítico. Sendo assim, buscar um limiar que, potencialmente, causaria hemorragia devido à quebra da BHE é fundamental para avaliar a segurança dos métodos.

1.1 Objetivos

Neste estudo, investigou-se técnicas de terapia baseadas em ultrassom não-invasivo para uso em dissolução de coágulos em caso de AVCI. Técnicas para melhoria de foco e redução de ondas estacionárias baseadas em excitação multifrequencial de ultrassom foram aplicadas para reduzir danos ao tecido adjacente ao coágulo. Além disso, efeitos de cavitação sobre a parede arterial foram explorados *in vivo* como forma de se avaliar os riscos e as perspectivas voltadas a pesquisas clínicas futuras.

1.2 Organização da tese

Nesta tese estão reportados estudos *in vitro* e *in vivo* de avaliações dos efeitos da força de radiação acústica e da cavitação associadas à sonotrombólise transcraniana. A organização da tese está representada na Fig. 1.1. No Cap. 2, é apresentada uma revisão bibliográfica que aborda o problema clínico (AVCI) e os métodos de tratamento, bem como, é apresentada uma fundamentação teórica da acústica envolvida na sonotrombólise. Nos Cap. 3 e 4 são abordados dois métodos de excitação multifrequencial para focalização de feixe de ultrassom. No Cap. 3, o duplo feixe foi avaliado quantitativamente em relação à formação da região focal de baixa frequência com experimentos de acusto-ótica e em relação às contribuições das múltiplas frequências no fenômeno da mistura dos feixes. No Cap. 4, são apresentadas duas técnicas de codificação de pulso de excitação baseadas em variação

de frequência que foram avaliadas em estudos *in vivo* com camundongos. No Cap. 5, são apresentados estudos de sonotrombólise com coágulos humanos. No Cap. 6 é discutida a segurança da sonotrombólise *in vivo* em termos da ruptura da BHE. No Cap. 7 são apresentados resultados sobre a modulação de atividade neuronal por ultrassom como efeito secundário da insonação transcraniana. No Cap. 8 conclui-se a tese dando-se uma perspectiva de todos os efeitos vistos aqui, que incluem: efeitos mecânicos da excitação multifrequencial, abertura da BHE e neuromodulação. Nesta mesma seção, são apresentadas as perspectivas para pesquisas futuras e os trabalhos gerados nesta tese. A seção de apêndices apresenta uma extensa descrição das várias metodologias citadas na tese, com intuito de facilitar os estudos futuros. Os apêndices incluem: A - implementações de métodos de excitação/aquisição de sinais, bem como de processamento para vibroacustografia; B - dedução da codificação por chirp; C - calibrações do transdutor utilizado nos experimentos *in vivo* com camundongos; D - preparos detalhados do transdutor e dos animais para estudos *in vivo* de ultrassom transcraniano terapêutico; E - breve descrição da metodologia utilizada para a avaliação por histologia com corantes hematoxilina e eosina; e, por fim, F - calibrações dos transdutores utilizados para os ensaios *in vitro* de sonotrombólise.

Figura 1.1: Esquemático da organização da tese.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Acidente Vascular Cerebral

A cascata de coagulação sanguínea é uma sequência complexa de reações enzimáticas que resulta na formação de um coágulo de fibrina. Esta cascata tem importância vital para o processo fisiológico de hemostasia - conjunto de mecanismos que o organismo emprega para conter uma hemorragia [15]. Por sua vez, o sistema fibrinolítico atua na dissolução de coágulos de fibrina criados após a ativação da cascata da coagulação sanguínea. Fisiologicamente, os coágulos de fibrina são dissolvidos pela ação da enzima plasmina em seu estado ativo. A ativação da plasmina pode ocorrer por diferentes agentes fibrinolíticos endógenos e farmacológicos, os quais tem sido utilizados terapeuticamente em doenças vasculares trombo-oclusivas [16]. Algumas das doenças mais graves e prevalentes da atualidade, associadas às altas chances de morte ou incapacidades física e mental graves, são caracterizadas pela formação de coágulos patológicos. Um coágulo patológico pode ocluir um vaso sanguíneo subitamente, obstruir seu fluxo sanguíneo, e levar a morte do tecido em seu território de suprimento ou drenagem. Exemplos dessa situação são: o acidente vascular cerebral isquêmico (AVCI), o infarto do miocárdio, a trombose

venosa cerebral, o infarto de estruturas intestinais, entre outros. O tratamento dessas condições consiste, em grande parte das vezes, na tentativa de dissolução desse coágulo anormalmente situado na luz de um vaso sanguíneo. Entretanto, as terapias médicas e cirúrgicas utilizadas hoje para este fim são muitas vezes ainda limitadas e de baixa eficiência.

Para as situações de obstrução de um vaso sanguíneo, como no AVCI ou no infarto do miocárdio, as terapias disponíveis para a ruptura do coágulo, ou trombólise, incluem a administração de medicamentos fibrinolíticos por via intravenosa [17] e o uso de trombectomia mecânica endovascular [18]. Por um lado, as medicações fibrinolíticas possuem uma baixa eficácia para desobstrução, e ainda estão associadas ao risco de hemorragias graves. No caso de oclusões de artérias intracranianas no AVCI, essa chance não ultrapassa os 50% nas melhores condições [1] e as chances de hemorragia cerebral grave giram em torno de 5%. Por outro lado, a trombectomia mecânica endovascular é aplicada a menos de 20% dos casos de AVCI, geralmente, em artérias proximais quando o medicamento fibrinolítico falha em desocluir. O uso da trombectomia mecânica implica inevitavelmente numa maior demora para desobstrução e não está disponível na maioria dos hospitais, tendo em vista a alta complexidade desta modalidade de tratamento [4].

Atualmente, o rt-PA é o principal medicamento fibrinolítico em uso [17]. Outras drogas fibrinolíticas como streptokinase e urokinase foram substituídas na maioria das clínicas devido aos efeitos adversos, principalmente, ligados a suas faltas de especificidade de reação com a fibrina [19]. Contudo, os critérios de exclusão limitam o uso do rt-PA a somente 1,5 a 6,0% dos casos de AVCI [20].

Nesse cenário, torna-se necessária a busca por alternativas terapêuticas para a trombólise, mais eficazes para desobstrução, de rápida aplicação e seguras quanto a ocorrência de hemorragias. Uma nova técnica terapêutica, chamada sonotrombólise, tem o potencial de aumentar a eficácia localmente de drogas trombolíticas ou permitir a quebra de coágulos de maneira segura e minimamente invasiva [21].

2.2 Sonotrombólise

Evidências clínicas apontam que um substancial aumento do efeito fibrinolítico pode ser obtido pela exposição de coágulos ao ultrassom. O uso de ultrassom para acelerar a quebra de coágulos em trombozes tem sido denominado como sonotrombólise. A sonotrombólise é reportada por diferentes nomenclaturas em inglês, tais como: *sonothrombolysis*, *ultrasound-enhanced thrombolysis*, *ultrasound thrombolysis*, *ultrasound-accelerated thrombolysis*, *ultrasound-improved thrombolysis*, *ultrasound-mediated thrombolysis* e *ultrasound-assisted thrombolysis*. Os mecanismos atribuídos ao efeito trombolítico do ultrassom divergem entre os diversos estudos. Experimentos *in vitro* mostram que ondas de ultrassom podem promover agitação do sangue próximo ao trombo e permeação do trombo por fluxo arterial, levando assim à exposição de uma maior área de superfície do trombo a maiores quantidades de medicações fibrinolíticas [22]. A elevação local de temperatura pelo ultrassom pode aumentar a atividade enzimática do medicamento e, por consequência, seu efeito trombolítico [23]. Contudo, há controvérsias se o aumento de temperatura é suficiente para trombólise [21]. No nível molecular, ocorre maior ligação de fibrinolíticos à rede de fibrina devido a agitação do fluido próximo ao coágulo pelo ultrassom [24, 25]. A energia ultrassônica parece também ser capaz de levar ao aumento da fibrinólise endógena mesmo na ausência de trombolítico farmacológico [26]. Contudo, estudos contradizem a eficácia do ultrassom por si só como trombolítico e defendem o uso de microbolhas para melhoria do tratamento [27]. Neste último mecanismo, ocorre a oscilação e ruptura de microbolhas que potencializam todos os mecanismos trombolíticos do ultrassom mencionados anteriormente, sendo eles: agitação do fluido em torno do coágulo, aumento de temperatura local, ruptura mecânica do coágulo por ondas de choque. Imagens microscópicas utilizando uma câmera de altíssima velocidade (5 Mfps, Mfps do inglês *Mega frames per second*) mostram deformações causadas pela ruptura de microbolhas próximas de coágulos [28]. Dessa forma, os estudos de sonotrombólise podem ser divididos entre ultrassom isolado e as referidas combinações de ultrassom com: medicamento trombolítico; microbolhas; microbolhas e medicamento trombolítico; e medicamento trombolítico encapsulado

em lipossomos. A Tab. 2.1 apresenta uma revisão dos estudos de sonotrombólise dividindo os estudos em grupos segundo essas combinações.

Quanto maior a energia dos pulsos de ultrassom e quanto mais baixas as frequências de ondas emitidas, maiores foram observados os efeitos pró-fibrinolíticos [34]. Estudos mostram que frequências em kHz induzem mais deformações mecânicas, já o ultrassom na faixa de MHz promove a fibrinólise por mecanismos enzimáticos [37, 40]. O uso de frequências abaixo de 1 MHz tem mostrado resultados favoráveis para sonotrombólise [34, 43]. Além disso, ondas de ultrassom com frequências menores têm maior poder de penetração nos tecidos, o que permitiria a insonação mais eficaz de coágulos situados em estruturas internas, especialmente quando há estruturas ósseas no trajeto, como é o caso das artérias intracranianas. O uso de ondas de ultrassom de frequências consideradas baixas (de 300 kHz) foi testado em seres humanos para a sonotrombólise de pacientes com AVCI [7]. O estudo, entretanto, teve de ser interrompido devido à alta taxa de hemorragias cerebrais graves, que foi atribuída ao fato de que a insonação não era localizada especificamente sobre o coágulo, mas espalhadamente sobre o encéfalo. Frequências mais baixas de 20 kHz com intensidade de $0,2 \text{ W.cm}^{-2}$ causaram alta taxa de mortalidade em estudos com ratos [9]. O uso de ondas de ultrassom na faixa de 2 MHz, por outro lado, mostrou-se seguro em testes clínicos, porém com um benefício pequeno [63]. Além disso, os efeitos da sonotrombólise em outras frequências ainda não foram amplamente explorados e a frequência ótima para dissolução de coágulos não está determinada.

Os estudos clínicos de maior destaque foram: CLOTBUST (do inglês *Combined Lysis of Thrombus in Brain Ischemia Using Transcranial Ultrasound and Systemic t-PA*) [36] que combinou ultrassom Doppler transcraniano de 2 MHz e medicamento trombolítico; TRUMBI (do inglês *Transcranial Low-Frequency Ultrasound-Mediated Thrombolysis in Brain Ischemia*) [7] que combinou ultrassom transcraniano de 300 kHz com medicamento trombolítico; e TUCSON (do inglês *Transcranial Ultrasound in Clinical SONothrombolysis*) [56] que combinou ultrassom Doppler transcraniano de 2 MHz com microbolhas e medicamento trombolítico. No entanto, um estudo posterior utilizando simulações mostra que o CLOTBUST atingiu níveis de pressão desprezíveis ($<0,07 \text{ MPa}$) que dificilmente causariam efeito

Tabela 2.1: *Revisão de estudos sobre sonotrombólise.*

Métodos	Tipo de estudo	Frequência	Modo	Pressão/Intensidade	Duração	Referências
US	Histotripsia	1 MHz	P	6-36 MPa	20 s-5 min	[29], [30]
	HIFU	0,5-1 MHz	P	120-270 W, 45 W.cm ⁻²	30 s-15 min	[31], [32], [33]
	LFUS	20-60 kHz	C	0,2-1,2 W.cm ⁻²	10-20 min	[34]
	TCCD	550 kHz, 2 MHz	P, D	2 W.cm ⁻²	18-60 min	[35],[22]
US+T	TCD	300 kHz e 2 MHz	P, D	<750 mW.cm ⁻²	90-120 min	[36], [7]
	TCCD	2 MHz	D	415 mW.cm ⁻²	1730-45 min	[26], [22]
	LFUS	20-170 kHz e 1 MHz	C, P	0,25-18 W.cm ⁻²	60 s e 30 min-3 h	[37], [38], [25], [39], [40], [41], [42], [43], [44]
	HFUS	1,7 MHz	P	180 W.cm ⁻² , 2,3 MPa	10 min	[45]
US+M	LFUS	20-40 kHz e 1 MHz	P	0,024-1,5 MPa, 0,8-2 W.cm ⁻²	24 min - 1 h	[46], [47], [48], [49], [50], [51], [28]
	TCCD	2 MHz	D	400 kPa, 455 mW.cm ⁻²	30 min	[52]
	Intra	37 kHz	P	103 kPa	15-60 min	[53]
	TCD	2 MHz	D	<720 mW.cm ⁻²	1,5-2h	[54], [55], [56]
US+M+T	TCCD	2 MHz	D	455 mW.cm ⁻²	1h	[52], [57]
	LFUS	20-170 kHz e 1 MHz	P	0,32-1,3 MPa, 0,5-0,8 W.cm ⁻²	30-60 min	[39], [46], [58], [59], [60], [61]
	HFUS	1,6 MHz	P	0,6-1 MPa	1 h	[27]
	TCCD	6,0 MHz	D,B	1,59 MPa	30 min	[62]

US: ultrassom, T: med. trombolítico, M: microbolhas, DE: droga encapsulada em lipossomos, HIFU: do inglês *High Intensity Focused Ultrasound*, LFUS: do inglês *Low Frequency Focused US*,

TCCD: do inglês *Transcranial Color-Coded Duplex*, TCD: do inglês *Transcranial Doppler*, HFUS: do inglês *High Frequency Ultrasound*, P: pulsado, C: contínuo, D: Doppler, B: modo-B

trombolítico [64]. Neste mesmo estudo [64], foi demonstrado que a provável causa de hemorragias observadas no estudo clínico TRUMBI foi a formação de ondas estacionárias que romperam o limiar de cavitação inercial, o que provavelmente danificou a BHE [8].

O uso de microbolhas ganhou grande destaque, devido sua capacidade de reduzir limiares de pressão para gerar cavitação (mais detalhes na seção 2.1). No entanto, estudos recentes questionam a capacidade do ultrassom e microbolhas sem o uso do rt-PA para causar trombólise [27, 61]. Neste estudo, a quebra de coágulo foi observada apenas para a combinação de ultrassom, microbolhas e medicamento fibrinolítico com níveis de pressão capazes de gerar cavitação inercial (1,3 MPa).

A mistura não-linear de feixes de ultrassom (em MHz) para geração de campos de pressão de baixa frequência (de Hz à kHz) proposta neste trabalho é sugerida como promissora técnica para execução da sonotrombólise. Esta técnica permite a exposição simultânea do coágulo a campos de pressão de diferentes frequências e, com isso, é possível avaliar-se os efeitos de cada faixa de frequência na contribuição para a trombólise. Estudos anteriores mostraram a capacidade do sinal multifrequencial gerado por um transdutor monoelemento em diminuir o limiar de cavitação inercial [65, 66]. Contudo, a avaliação da força de radiação acústica gerada pela mistura de feixes não foi abordada.

Muitos estudos clínicos vem sendo publicados sobre sonotrombólise [67, 68, 69, 70, 71]. Contudo, existe uma carência de propostas de novas técnicas de sonotrombólise que possam aumentar a eficácia dos tratamentos, bem como de estudos mais sistemáticos sobre a cavitação, a formação de ondas estacionárias no crânio, a aberração do foco do transdutor devido à barreira óssea e efeitos das microbolhas sobre o sistema vascular.

2.3 Fundamentos Acústicos

O potencial terapêutico do ultrassom focalizado não-invasivo em técnicas de *drug delivery* ou como um substituto para a intervenção cirúrgica tem sido demonstrado no tratamento de uma variedade de distúrbios neurológicos. No primeiro caso, a administração de ultrassom focalizado combinado com microbolhas

tem sido estudada para abrir transiente e localmente a BHE [5, 72] permitindo a passagem de agentes farmacológicos como: drogas terapêuticas para o tratamento de câncer [73], anticorpos terapêuticos [74], fatores neurotróficos [75], vírus adeno-associados [76, 77] e células tronco neurais [78]. O ultrassom tem se mostrado capaz de melhorar o efeito fibrinolítico de drogas utilizadas no tratamento de AVCI para dissolver coágulos [63, 67]. Além disso, o ultrassom focalizado de alta potência (HIFU) pode destruir térmicamente tumores cerebrais [79] ou reduzir a atividade de hiper-excitabilidade de neurônios em casos de tremor essencial [80, 81] e dor neuropatológica crônica [82]. Mais recentemente, o ultrassom foi mostrado capaz de modular a atividade neuronal [11, 83, 84, 85] abrindo um leque para possíveis aplicações como alternativa à estimulação transcraniana magnética (da sigla em inglês *TMS - Transcranial Magnetic Stimulation*), estimulação elétrica profunda e optogenética.

A utilização do ultrassom para o tratamento não-invasivo de distúrbios neurológicos permanece desafiadora devido ao crânio. O alto coeficiente de atenuação, espessura variável e heterogeneidade do crânio causam espalhamento, dispersão e absorção das ondas de ultrassom. Como resultado, o feixe de ultrassom pode ser distorcido devido a efeitos de aberração do foco e de ondas estacionárias, impedindo a correta focalização do feixe através do crânio. A distorção do foco, principalmente, em sonotrombólise e em ablação de tumores, pode levar a efeitos adversos severos como hemorragia e dano permanente ao tecido cerebral sadio [7, 56, 86]. Além disso, a combinação dessas técnicas com microbolhas pode agravar os efeitos adversos provocados por cavitação.

2.3.1 Propagação Acústica

Para se entender a formação de ondas dentro do crânio deve-se estudar a propagação da onda acústica e suas características em meio lineares e não-lineares. A equação da onda que se propaga em um meio fluido pode ser derivada da equação de estado, equação de continuidade e de força de Euler.

Equação da onda linear

Através das equações de continuidade, de força de Euler e do primeiro termo da expansão em série de Taylor da equação de estado, tem-se a equação de onda acústica linear em um meio fluido:

$$\nabla^2 p - \frac{1}{c_0^2} \frac{\partial^2 p}{\partial t^2} = 0 \quad (2.1)$$

em que c_0 é a velocidade de propagação do som e p é a pressão instantânea do meio.

Equação da onda não-linear

Para ondas de altas frequências e com pressões de alta amplitude, o efeito não-linear deve ser levado em conta. A não-linearidade é uma propriedade do meio que causa mudanças na forma e amplitude de uma onda em um determinado local tornando-a não mais proporcional à excitação inicial [87]. Uma consequência da não-linearidade é a mudança da velocidade de propagação da onda entre as fases de compressão e rarefação, devido à variação não linear da densidade do meio. Dessa forma, harmônicos são gerados durante a propagação da onda. As ondas harmônicas e fundamental se espalham pelo meio e podem sofrer interferências construtivas e destrutivas dando origem a ondas de frequências diferentes das originais. Westervelt [88] escreveu a equação da onda considerando o efeito não-linear do meio dada por

$$\left(\nabla^2 - \frac{1}{c_0^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \right) p = - \frac{\beta}{\rho_0 c_0^4} \frac{\partial^2 p^2}{\partial t^2} \quad (2.2)$$

sendo ρ_0 a densidade do meio no equilíbrio e β o coeficiente não-linear do meio.

Na Fig. 2.1 é mostrada a solução analítica para o gradiente de pressão em um meio totalmente linear e uma simulação para um meio não-linear. Os parâmetros da simulação foram: frequência de excitação 1 MHz, pressão da fonte 5 MPa, densidade do meio em repouso 1000 kg/m³, coeficiente de atenuação 0,5 dB.cm⁻¹. Para a simulação do meio não-linear adotou-se o parâmetro não linear igual a 12. Em um meio linear a onda se propaga como uma senóide, já em um meio não-linear a propagação da onda pode ser aproximada para uma onda dente-de-serra em que se observa a formação de harmônicos do sinal.

Figura 2.1: Solução analítica do gradiente de pressão em um meio linear e simulação para um meio não-linear com seus respectivos espectros de frequência.

2.3.2 Força de radiação acústica

Ondas de ultrassom sofrem absorção e espalhamento ao se propagar num meio, gerando uma força composta por componentes estática e dinâmica (ou oscilatória). A componente estática desloca o tecido na direção do gradiente de pressão aplicado e a componente oscilatória movimenta o tecido de acordo com a pressão acústica variante no tempo [89].

Ao aplicar-se duas ondas de ultrassom com frequências ligeiramente diferentes ω_1 e ω_2 num foco comum, a componente dinâmica da força de radiação é intensificada na região focal, tendo sua origem da combinação linear das ondas. A magnitude da força é proporcional a $\langle E \rangle$, densidade de energia média da onda incidente, e a S ,

área projetada do objeto [90], em que

$$\vec{F} = \vec{d}_r S < E > \quad (2.3)$$

sendo $\vec{d}_r$ o vetor coeficiente de arrasto, sendo $dr=1$ um meio totalmente absorvedor/espalhador e $dr=0$ um meio acusticamente transparente. Considerando uma onda plana, a densidade de energia pode ser expressa por

$$E = \frac{P^2(t)}{\rho c^2} \quad (2.4)$$

sendo $P(t)$ a pressão total no tempo t e ρ a densidade do meio de propagação.

Chen *et al.* [91] estudaram três formas diferentes para a formação da onda de baixa frequência utilizando: amplitude modulada (AM), transdutores confocal e X-focal. Assim, a força de radiação de baixa frequência pode ser produzida pela modulação de um único feixe ou pela interferência de dois ou mais feixes de frequências ligeiramente diferentes.

A força de radiação dinâmica pode ser gerada por dois feixes de ultrassom (em MHz) ajustados com frequências $\omega_1 = \omega_0 + \Delta\omega/2$ e $\omega_2 = \omega_0 - \Delta\omega/2$, sendo $\Delta\omega$ a diferença de frequência (de Hz à kHz). Com isso, geram-se dois campos de pressão $p_1(r : \omega_1)$ e $p_2(r : \omega_2)$ à distância r . Dessa forma, o campo de pressão gerado por um transdutor confocal no plano $z = 0$ pode ser descrito por [91]

$$p(\vec{r}, t) = p_1(\vec{r})\cos(\omega_1 t + \phi_1(\vec{r})) + p_2(\vec{r})\cos(\omega_2 t + \phi_2(\vec{r})) \quad (2.5)$$

sendo ϕ_1 e ϕ_2 as funções de fase das ondas de frequências ω_1 e ω_2 , respectivamente.

A média temporal de $p^2(t)$ é

$$\langle p^2(t) \rangle_T = \frac{(p_1^2 + p_2^2)}{2} + p_1 p_2 \cos(\Delta\omega t + \phi_1 - \phi_2) \phi_2(r) \quad (2.6)$$

Logo, a força resultante F no foco é dada por

$$\vec{F} = \frac{\vec{d}_r S}{\rho c^2} \left\{ \frac{p_1^2(r)}{2} + \frac{p_2^2(r)}{2} + p_1(r)p_2(r)\cos[(\omega_2 - \omega_1)t + (\phi_2(r) - \phi_1(r))] \right\} \quad (2.7)$$

E, assim, a componente dinâmica da força é dada por

$$\vec{F} = \frac{\vec{d}_r S}{\rho c^2} \{p_1(r)p_2(r)\cos[\Delta\omega t + \phi_2(r) - \phi_1(r)]\} \quad (2.8)$$

Um estudo quantitativo com duplo feixe incidentes de 60 kPa e frequências de $0,93 \pm \Delta f$ MHz, com $\Delta f = 100, 200$ e 400 Hz, mostrou que é possível gerar forças de radiação acústica estática e dinâmica da ordem de $3,5 \cdot 10^{-6}$ N [92]. Dessa forma, é estimada uma força dinâmica que vibra o alvo na frequência Δf da ordem de 31 mil vezes menor (ou 90 dB) do que a força do feixe incidente. Contudo, a vibração do alvo pela força de radiação acústica dinâmica é limitada para Δf 's baixas. A definição de quão baixa deve ser Δf para geração de vibração do alvo depende das propriedades acústicas do meio e a partir desse limite a pressão devido a oscilação do alvo passa a ser desprezível em comparação com a pressão gerada por efeitos não-lineares [93]. Os efeitos não-lineares envolvidos na mistura do duplo feixe (também conhecida por array paramétrico) gera campos de pressão iguais a soma e a diferença das frequências dos feixes primários pelo espalhamento som-por-som (mais conhecido pelo termo em inglês *sound-by-sound*) [88, 94, 95]. As equações para pressões geradas pelo efeito não-linear podem ser obtidas da equação de Westervelt (Eq. 2.2), sendo essas componentes de pressão não-lineares em função da distância r representadas simplificada por

$$p_{NL}(r) = \frac{d_1}{r} \ln \left(\frac{r}{d_2} \right) + \frac{d_3}{r} \quad (2.9)$$

sendo d_1 e d_3 constantes com unidades de pressão vezes distância e d_2 uma constante em unidade de distância.

Avaliação da força de radiação acústica

Alguns métodos experimentais para a avaliação das intensidades das forças de radiação acústica estática e dinâmica são possíveis através do uso de sensores magnéticos [96, 97]. Além disso, métodos que utilizam a força de radiação acústica para geração de imagens podem ser úteis na avaliação espacial da força dinâmica. A vibroacustografia (VA) é uma técnica de imagem que utiliza a mistura não-linear de feixes de alta frequência e a força de radiação acústica dinâmica gerada pela interferência entre esses feixes [98, 90]. A baixa frequência é detectada por um hidrofone acoplado ao sistema. A excitação de baixa frequência focalizada fornece imagens livres de *speckles* e com alta resolução lateral (submilímetros). A técnica de VA tem se mostrado viável, principalmente, em avaliações de tecidos moles tais como artérias [99], mama [100], tireóide [101] e rim [102].

Uma vez que o crânio pode ser um ambiente altamente reverberante é interessante se explorar o efeito dos diversos campos de pressão gerados pela mistura de feixes primários com diferenças de frequências mais altas. Dessa forma, neste estudo buscou-se explorar a contribuição dos campos de pressão sobre coágulos gerados pela força de radiação acústica dinâmica (que vibra o alvo) e pela interação não-linear dos feixes primários (que não vibra o alvo). Utilizando a técnica de VA é possível fazer uma varredura em frequência da onda gerada pela mistura não-linear das ondas ultrassom e, com isso, detectar a frequência de máxima transferência de momento para o objeto estudado.

2.3.3 Atenuação do ultrassom pelo crânio

A onda ultrassônica ao se propagar em um meio estará sujeita à perda de energia por atenuação. A atenuação ocorre por diferentes mecanismos de perdas. Parte da energia ultrassônica é perdida por absorção na qual ocorre sua conversão em outras formas de energia, tais como: calor, energia química ou luz [89]. Outro mecanismo de perda é o espalhamento que está associado ao redirecionamento das ondas devido a mudanças de compressibilidade e densidade do meio. Assim, a intensidade do ultrassom se propagando num meio na direção r é dada por

$$\vec{I}(r) = \vec{I}_0 e^{-2(\alpha_e + \alpha_a)r} = \vec{I}_0 e^{-2\alpha r} \quad (2.10)$$

em que α é o fator de atenuação total, α_e e α_a são os coeficientes de atenuação por espalhamento e por absorção, respectivamente.

O espalhamento pode ser dado por reflexão ou refração. Os coeficientes de reflexão e transmissão para uma onda acústica de pressão $p(\vec{r}, \omega) = p_0 e^{-jk\vec{r}}$ (em que k o número de onda) estão relacionados com a impedância acústica específica

$$Z_e(\vec{r}, \omega) = \frac{p(\vec{r}, \omega)}{v(\vec{r}, \omega)} \quad (2.11)$$

sendo $v(\vec{r}, \omega)$ o fasor de velocidade da partícula para uma onda de ultrassom incidente ω .

Para uma intensidade média dada por $I = \frac{|p|^2}{2Z_0}$, em que $Z_0 = \rho_0 c_0$ é a impedância característica do meio, os coeficientes de reflexão e transmissão são

dados, respectivamente, por

$$R_I = \left[\frac{Z_{o2}\cos\theta_i - Z_{o1}\cos\theta_t}{Z_{o2}\cos\theta_i + Z_{o1}\cos\theta_t} \right]^2 \quad (2.12)$$

$$T_I = \frac{4Z_{o1}Z_{o2}\cos^2\theta_i}{[Z_{o2}\cos\theta_i + Z_{o1}\cos\theta_t]^2} \quad (2.13)$$

em que os subíndices i e t indicam, respectivamente, os ângulos θ de incidência e transmissão de uma onda de ultrassom se propagando por dois meios com impedâncias características Z_{o1} e Z_{o2} .

Uma grande limitação da sonotrombólise aplicada a casos de AVC é a atenuação do ultrassom devido à barreira óssea. O crânio apresenta coeficiente de atenuação em função da frequência com valores entre 2 e 50 dB.cm⁻¹ [89]. Dada essa dificuldade, alguns estudos de sonotrombólise utilizaram baixas frequências por permitir maior penetração no tecido ósseo, uma vez que, o coeficiente de atenuação apresenta dependência com a frequência [34, 43, 7]. A dependência do coeficiente de atenuação com a frequência, a temperatura e a pressão é dada por

$$\alpha = \alpha'_0 f^n \quad (2.14)$$

em que α'_0 é o fator dependente da pressão e temperatura com unidade dB/(cm.MHz ^{n}), no qual n é o fator de dependência com a potência relacionado com o tecido (para o crânio humano $0,9 \leq n \leq 2,1$ [89]) e f é a frequência do ultrassom em MHz.

Ou seja, quanto menor a frequência menos atenuação a onda de ultrassom sofre e, conseqüentemente, atinge-se regiões mais profundas do tecido biológico. Em contrapartida, com a diminuição da frequência ocorre também o aumento da zona focal. A zona focal é determinada pelo comprimento de onda λ e pelo f -number - relação entre distância focal e diâmetro de abertura do transdutor. Para um transdutor côncavo, a largura focal L e o comprimento focal C são dados por [89]

$$L = 1,4\lambda f - number \quad (2.15)$$

$$C = 7,2\lambda(f - number)^2 \quad (2.16)$$

A propagação do ultrassom pelo osso é complexa devido suas estruturas trabecular e cortical. Os trabéculos são da ordem de 50 a 150 μm distanciados de 0,5 a 2 mm, ou seja, de mesma ordem do comprimento do ultrassom de 1 MHz geralmente utilizado em terapia [103]. Inicialmente, o ultrassom sofre reflexões que ocorre na interface entre o fluido utilizado para acoplamento do transdutor e o crânio. Dentro do osso parte da energia mecânica é espalhada devido a sua complexa microestrutura interna e parte é convertida em calor. Além disso, quando uma onda se propaga em materiais sólidos ocorre também o fenômeno de conversão de modo. Neste fenômeno a criação de modos vibracionais diferentes dos incidentes geram as chamadas ondas de cisalhamento. Um estudo *in vitro* demonstrou que apenas 2,7 dB/cm corresponde à perda de energia ultrassônica por absorção de um total de 16,6 dB.cm⁻¹ de atenuação de uma amostra de osso de crânio de 8 mm. Assim, a contribuição da absorção da energia dentro do osso é pequena em comparação com a reflexão, espalhamento e conversão de modo [104].

A alta complexidade da propagação do ultrassom transcraniano dificulta o planejamento e o avanço das técnicas terapêuticas. Uma alternativa para permitir a compreensão e o planejamento do ultrassom transcraniano terapêutico é o uso de simulações computacionais. Simulações computacionais ajudam na compreensão dos fenômenos [105], permite avaliar estudos em que houveram casos de hemorragias ocorridos em sonotrombólise [64], bem como permitem o desenvolvimento de técnicas e a exploração de parâmetros acústicos antes de estudos clínicos [106] e o desenvolvimento de ferramentas para a correção de aberração do foco e supressão de ondas estacionárias [107, 108, 109]. Muitas simulações se baseiam em imagens de tomografia computadorizada (TC) que permitem, através da conversão da unidade de Hounsfield, obter parâmetros acústicos do crânio como densidade [110] e velocidade de propagação do som [111]. Imagens DICOM (da sigla em inglês de *Digital Imaging and Communications in Medicine*) de TC fornecem o brilho em unidades de Hounsfield ou unidade de TC dadas por

$$HU = a * px + b \quad (2.17)$$

em que a é a inclinação corrigida, px é o valor do pixel e b é o coeficiente linear corrigido, todos fornecidos no arquivo DICOM. A unidade HU da água é dada como

referência e tem valor $HU=0$.

2.3.4 Cavitação acústica

A cavitação acústica ocorre em resposta à exposição de líquidos a pressões abaixo da pressão de vapor ou quando a temperatura do meio é elevada ao ponto de ebulição [112]. A cavitação pode tanto se referir à formação de bolhas quanto a oscilação de bolhas pré-existentes no meio. Este fenômeno pode trazer implicações tanto positivas quanto negativas em tecidos biológicos. Em biomedicina, diversas aplicações potenciais vem sendo desenvolvidas para fins terapêuticos, como por exemplo, sonotrombólise, *drug delivery*, sonoporação, litotripsia, entre outras. Os bioefeitos associados à cavitação nestes casos são abertura controlada da BHE, quebra celular, degradação de moléculas e ablação.

A cavitação acústica pode ocorrer em dois regimes em função de características do núcleo da cavidade e de limiares de pressão [113] (Fig. 2.2). Na cavitação inercial, cavidades aumentam de tamanho rapidamente e colapsam violentamente. Para níveis mais baixos de pressão acústica, a cavitação pode entrar em regime estável, na qual cavidades se mantem estáveis oscilando em tamanho. Os bioefeitos da cavitação inercial podem ser desejáveis ou não, fazendo necessário o controle deste regime de maneira a maximizar ou minimizar este regime de acordo com a aplicação clínica. A cavitação inercial é associada, por exemplo, a efeitos de ablação de tumores ou de quebra de coágulos. Já no caso de *drug delivery* pela abertura da BHE por ultrassom, a cavitação inercial é indesejada e associada a danos irreversíveis nas artérias, portanto, para esta técnica mantem-se a oscilação de microbolhas em regime estável.

A oscilação de microbolhas pode ser simulada utilizando o programa escrito em Matlab chamado *Bubblesim*¹. Simulando pulsos de ultrassom de 1,5 MHz, 10 ciclos, com pressão variando de 0,2 MPa, 2 MPa e 20 MPa, incidindo sobre uma microbolha de 1,5 μm imersa em sangue é possível observar os regimes estável e inercial de cavitação (Fig. 2.3). Na Fig. 2.3 observa-se os dois regimes de cavitação em função da pressão acústica aplicada. Para uma pressão de excitação igual a

¹Disponibilizado pela Norwegian University of Science and Technology em (último acesso em 29/11/2015): <http://home.online.no/~fam.hoff/Bubblesim/Bubblesim.htm>

Figura 2.2: Regimes de cavitação estável e inercial causadas por ultrassom. Modificado de Turanek et al., 2015 [113].

0,2 MPa, o regime de cavitação da microbolha é estável. No espectro da onda espalhada para essa pressão, observa-se a formação bem definida de harmônicos (em azul). Neste caso, a variação do raio da microbolha é estável e pequena ($<5 \mu\text{m}$). Para pressão igual a 2 MPa, o regime de cavitação começa a ser observado através do espectro mais amplo de frequência (em verde). A expansão da microbolha se torna muito superior ($10 \mu\text{m}$) e com oscilações menos estáveis. Já para a pressão de 20 MPa, o espectro se torna bem amplo (em vermelho), podendo se distinguir apenas o segundo harmônico do sinal de excitação. A variação do raio para este caso indica o colapso da microbolha em $5 \mu\text{s}$.

Em sonotrombólise, conforme discutido anteriormente, vários estudos *in vitro* demonstraram a eficácia trombolítica da cavitação de microbolhas. Contudo, a cavitação, especialmente em regime inercial, pode danificar a BHE e, consequentemente, causar hemorragia em estudos *in vivo*. Dessa forma, explorou-se nesta tese os efeitos da cavitação de microbolhas sobre vasos cerebrais *in vivo*.

2.3.5 Ondas estacionárias

Ondas estacionárias se formam devido a interferências construtivas e destrutivas de ondas acústicas em um meio reverberante. No ultrassom não-invasivo transcraniano, geralmente frequências inferiores a 1 MHz são utilizadas para evitar a atenuação demasiada das ondas pelo crânio, além de efeitos de aberração de fase. Mas, para evitar ondas estacionárias são necessárias técnicas avançadas de supressão.

A formação de ondas estacionárias em terapia é indesejada e pode provocar

Figura 2.3: Simulação de regimes de cavitação em uma microbolha de $1,4 \mu\text{m}$ imersa em sangue. O pulso de excitação de $1,5 \text{ MHz}$ e 10 ciclos foi aplicado sobre a microbolha (preto). O raio da microbolha e a onda de pressão espalhada variaram com a pressão de excitação de $0,2 \text{ MPa}$ (azul), 2 MPa (verde) e 20 MPa (vermelho).

sérios efeitos colaterais. Simulações computacionais baseadas no estudo clínico TRUMBI [7], associaram o aparecimento de hemorragias em 93% dos pacientes a prováveis danos sobre a BHE devido à formação de ondas estacionárias dentro do crânio [64]. Em terapias baseadas no uso de microbolhas, pontos de rarefação das ondas estacionárias podem ainda aprisionar microbolhas diminuindo o limiar de cavitação inercial [107]. Além disso, o padrão da onda incidente pode ser alterado entre o transdutor de ultrassom e o crânio provocando inconsistências na formação do foco e aquecimento nessa região.

Na Fig. 2.4 são mostradas simulações em k-Wave Matlab Toolbox [114], nas quais uma fonte pontual de ultrassom de $0,5 \text{ MHz}$ gera mapas de pressão acústica distintos de acordo com a impedância característica do meio. Na Fig. 2.4(a) a fonte pontual gera uma onda acústica que se propaga omnidirecionalmente em um meio homogêneo de impedância característica $1,5 \text{ MRayl}$ (aproximadamente equivalente

Figura 2.4: Formação de ondas estacionárias. Mapas de pressão acústica gerados em simulação utilizando *k-Wave Matlab Toolbox* para: (a) fonte de ultrassom pontual de frequência 0,5 MHz em um meio homogêneo com impedância característica $Z_0 = 1,5 \text{ MRayl}$, (b) fonte de ultrassom centralizada em um cilindro com impedância característica $Z = 2 \cdot Z_0$ e (c) fonte deslocada do centro do cilindro com mesmas propriedades acústicas de (b).

Figura 2.5: Representação de pulsos de excitação ultrassônica codificados. (a) Codificação por *chirp* e (b) codificação aleatória de frequência.

a água). Na Fig. 2.4(b) um cilindro com o dobro de impedância característica é simulado em torno da fonte. Neste caso, observa-se pontos de pico de pressão (vermelho) e de rarefação (cinza). Na Fig. 2.4(c) a fonte é colocada excêntrica ao cilindro gerando um padrão complexo de ondas estacionárias com pontos de pico de pressão e rarefação dispersos diametralmente opostos à fonte.

Técnicas de codificação de pulsos como o *chirp* [107] e variação aleatória de frequências [115], visam minimizar a formação de ondas estacionárias (Fig. 2.5). Nestas técnicas o padrão de interferência construtiva e destrutiva muda em função do tempo, devido à variação do comprimento de onda do sinal de excitação. Assim, ocorre uma distribuição mais homogênea da energia ultrassônica. Nesta tese, explorou-se a excitação multifrequencial como técnica para redução de ondas estacionárias e para melhoria do foco dentro do crânio.

EXCITAÇÃO MULTIFREQUENCIAL POR DUPLO FEIXE DE ULTRASSOM

3.1 Introdução

Estudos sobre sonotrombólise mostraram que apesar de ondas de ultrassom com frequências da ordem de kHz dissolverem melhor os coágulos e terem maior poder de penetração no crânio, o uso dessa faixa de frequência causou pontos de hemorragia no encéfalo, principalmente, devido à irradiação não pontual do coágulo [7]. Conforme citado na seção 2.2, um dos possíveis efeitos que causam a trombólise é a cavitação. A mistura de duplo feixe de ultrassom com frequências diferentes foi explorada em avaliações *in vitro* para diminuir o limiar de intensidade acústica para geração de cavitação inercial [65, 66]. Contudo, pouco se explorou a respeito do espalhamento das ondas dentro de crânios e de suas componentes lineares e não-lineares. Além disso, essas técnicas usaram ultrassom de alta potência que pode causar danos ao tecido cerebral, o que será abordado no Cap. 6 desta tese.

A mistura de duplo feixe de ultrassom permite a criação de campos de baixa frequência pelo uso de feixes incidentes de altas frequências na faixa de MHz (portanto, de alta resolução espacial) com uma pequena diferença de frequência entre eles (Hz-kHz). Dessa forma, é possível se criar uma região de excitação de

baixa frequência com altíssima resolução espacial, se comparada a uma excitação monofrequencial de mesma faixa entre Hz-kHz.

As propriedades mecânicas dos meios estão associadas a variações de amplitude e frequência do feixe espalhado resultante da diferença de frequência ou da modulação dos feixes. A vibroacustografia (VA) é uma técnica de imagem que utiliza a mistura de feixes de ultrassom para gerar ondas acústicas de baixa frequência [98, 90]. A baixa frequência é detectada por um hidrofone acoplado à amostra. A excitação de baixa frequência focalizada fornece imagens livres de *speckles* e com alta resolução lateral (submilímetros). A técnica de VA tem se mostrado viável na avaliação, por exemplo, de: artérias [99], mama [100], tireóide [101], rim [102] e implantes ósseos [116]. Na chamada *theranostic* - combinação de diagnóstico com terapia - a modulação em amplitude (AM) utilizada na imagem de movimento harmônico para ultrassom focalizado (ou HMIFU, sigla em inglês de *Harmonic Motion Imaging for Focused Ultrasound*) é capaz de monitorar mudanças das propriedades elásticas de meios durante o procedimento terapêutico de ablação de tecidos por ultrassom [117].

A interferência de dois feixes ultrassônicos com frequências próximas gera focos de baixa frequência por batimento (Equação 2.8). Utilizando um transdutor côncavo de dois elementos, essas regiões são fixas e a região focal de baixa frequência é bem definida. O sangue humano apresenta coeficiente de atenuação próximo de $0,147 \text{ dB.cm}^{-1}$, já um coágulo pode apresentar um coeficiente de atenuação de $1,477 \text{ dB.cm}^{-1}$ [118]. As diferenças nas características mecânicas do coágulo sanguíneo em relação ao meio circundante caracterizam uma diferença de impedância. Essa diferença de impedância está relacionada com o coeficiente de arrasto d_r da Equação 2.3. Assim, quando aplicada uma onda acústica, quanto maior o d_r maior a força de radiação acústica aplicada ao coágulo. Contudo, é necessário se avaliar a faixa de frequência adequada para se obter a vibração do coágulo pela força dinâmica. Do contrário, apenas a interação não-linear gerará campos de baixa frequência que, por sua vez, não vibram o coágulo.

Nesta seção serão apresentadas avaliações quantitativas espaciais do campo acústico gerado pelo duplo feixe de ultrassom focalizado dentro de modelos de crânios e avaliações quantitativas das componentes lineares e não-lineares do feixe espalhado

pela mistura de duplo feixe.

3.2 Materiais e métodos

Avaliação espacial do campo de pressão de baixa frequência por efeito acusto-ótico

No efeito acusto-ótico, a onda de ultrassom comprime o meio variando sua densidade que, por sua vez, está relacionada ao índice de refração ótico [119, 120, 121, 122]. Baseado nesse efeito, um método de medição que não perturba o meio utilizando um vibrômetro laser Doppler, foi utilizado para o mapeamento de campos acústicos. Utilizando uma montagem experimental similar à proposta por Harland *et. al* [123], realizou-se experimentos para avaliar o espalhamento da baixa frequência. Os feixes acústicos foram gerados dentro de um tanque acústico com água utilizando um transdutor côncavo de dois elementos com foco em 6,7 cm (Fig. 3.1(a)). O transdutor foi energizado por dois sinais pulsados de frequência $3,2 \pm \Delta f/2$ MHz, com Δf igual a 20 kHz, utilizando geradores de função (33220A, Agilent Technologies, CA, EUA) e um amplificador fabricado no laboratório com fator de amplificação de 20 dB. Um vibrômetro laser Doppler (Ometron modelo VQ-500-D-V, Hertfordshire, Reino Unido) foi posicionado fora do tanque com o feixe de laser incidindo normalmente à direção de propagação dos feixes de ultrassom (Fig. 3.1(b)). O transdutor de ultrassom foi movimentado por um sistema de posicionamento 3D de forma que o laser varresse o campo acústico produzido pelo transdutor.

A tensão de saída $V(t)$ do vibrômetro é proporcional à variação do índice de refração n da água, a pressão acústica P aplicada sobre o meio e a frequência f da onda acústica.

$$V(t) = S.K(P, f). \left(\frac{\partial n}{\partial P} \right)_l \quad (3.1)$$

em que S é o parâmetro de sensibilidade do vibrômetro, $K(P, f)$ é uma variável proporcional a amplitude P da pressão acústica e a frequência f da onda acústica. O parâmetro $\left(\frac{\partial n}{\partial P} \right)_l$ - ou coeficiente piezo-ótico adiabático - relaciona a variação do índice de refração n do meio com a pressão acústica P aplicada por um caminho l em que o laser cruza o campo acústico.

Figura 3.1: Montagem experimental da acusto-ótica. (a) Avaliação da zona focal de baixa frequência utilizando um vibrômetro laser e (b) mapeamento do campo acústico de baixa frequência formado dentro de um cilindro de acrílico.

Foram realizadas uma aquisição do campo de baixa pressão em água e três aquisições do espalhamento do campo acústico de baixa frequência por um cilindro de acrílico de 12,5 cm de diâmetro e espessura 3 mm imerso em água utilizado para simular um crânio humano. Foram testados três tipos de excitações para o experimento de espalhamento dentro do cilindro, sendo um com um transdutor plano com frequência de 2,25 MHz modulada em 20 kHz, outro com um transdutor focalizado monoelemento com frequência de 3,2 MHz modulada em 20 kHz e, por fim, outro com um transdutor confocal de 2 elementos excitados com frequências $3,2 \text{ MHz} \pm \Delta f$, sendo $\Delta f = 20 \text{ kHz}$.

Análise dos dados

A formação de onda estacionária foi avaliada através da relação entre as pressões nos antinodos e nodos da imagem. Assim, obteve-se o parâmetro SWR (do inglês *Standing Wave Ratio*):

$$SWR = \frac{\langle P_A \rangle}{\langle P_N \rangle} \quad (3.2)$$

em que $\langle P_A \rangle$ é a pressão média no antinodo e $\langle P_N \rangle$ é a pressão média nos nodos. Valores mais baixos de SWR indicam menor formação de ondas estacionárias.

A eficácia dos métodos para focalização do feixe foi medida através do parâmetro R dado por

$$R = \frac{P_{max}}{\langle P \rangle} \quad (3.3)$$

em que P_{max} é a pressão máxima e $\langle P \rangle$ é a pressão média do campo acústico. Valores maiores de R indicam maior focalização do feixe acústico.

Avaliação do decaimento da pressão acústica de baixa frequência com a distância

Conforme descrito no Cap. 2, a pressão acústica da diferença de frequência gerada pelo duplo feixe possui componentes lineares e não-lineares. Assim, a diferença de frequência é dada por

$$p_- = (p_{EA} + p_{AP} + p_{SS}) e^{-i\omega t} \quad (3.4)$$

em que p_{EA} é a pressão dada pela emissão acústica gerada pela força de radiação dinâmica [95], p_{AP} é a pressão do array paramétrico do duplo feixe [94] e p_{SS} é a pressão gerada pelo fenômeno de *sound-by-sound* [124].

Um estudo recente mostrou que somente o array paramétrico e a interação som-por-som tem contribuições significativas no sinal espalhado de baixa frequência da ordem de 50 kHz e que a componente de emissão acústica devido à força de radiação acústica tem valor 30 dB menor que essas componentes [93]. Dessa forma, a força de radiação acústica pelo método de duplo feixe seria desprezível e pouco influenciaria na sonotrombólise. Este estudo buscou quantificar a componente de baixa frequência com o intuito de se avaliar sua origem.

Uma maneira de se identificar a origem do sinal de baixa frequência e, portanto, se haveria vibração não-desprezível do coágulo pela força de radiação dinâmica, é avaliar o decaimento do sinal de baixa frequência ao longo do eixo de propagação do sinal a partir de um alvo. Assim, avaliou-se o decaimento do sinal de baixa frequência de uma esfera de metal de 1 mm excitada por um feixe duplo de ultrassom ao longo do eixo axial do transdutor. Segundo a teoria linear para VA [90], o sinal gerado pelo chacoalhar do meio devido à aplicação da força de radiação acústica (Eq. 2.3) decairia com a distância conforme [125]

$$p_{EA} = \frac{D_1}{r} \quad (3.5)$$

em que r é a distância axial e D_1 é uma constante com unidade de pressão que depende do feixe incidente e das propriedades acústicas do alvo. Já o sinal gerado

Figura 3.2: (a) Força de radiação acústica que vibra o alvo gerando uma componente linear de sinal de VA e (b) espalhamento não-linear das ondas que compõem os feixes primários de ultrassom. Os feixes primários se espalham e sofrem interferências que geram componentes de mais baixas frequências (kHz).

pelo espalhamento do som pela esfera decai segundo a Eq. 2.9 apresentada no Cap. 2 e repetida aqui por conveniência

$$p_{NL}(r) = \frac{d_1}{r} \ln\left(\frac{r}{d_2}\right) + \frac{d_3}{r} \quad (3.6)$$

sendo d_1 e d_3 constantes com unidades de pressão vezes distância e d_2 uma constante em unidade de distância. Na Fig. 3.2 é mostrada uma representação do sinal por efeito linear e do sinal por efeito não-linear (espalhamento).

Os feixes incidentes foram gerados por um transdutor confocal côncavo com foco fixo em 6,7 cm e diâmetros interno 14,8 cm e externo 22,5 cm. Um gerador de função (33220A, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) gerou sinais pulsados de 100 ms de $3,2 \pm f_-/2$ MHz com $f_- = 50, 60, 70, 100$ kHz que foram amplificados em 20 dB (amplificador construído no laboratório). O sinal de baixa frequência foi adquirido por um hidrofone (8106, Bruel&Kjaer, Dinamarca) que foi movimentado por um sistema de rastreamento no eixo axial do transdutor de 8 a 18 cm do alvo (Fig. 3.3). A pressão incidente no alvo foi medida com um hidrofone de agulha (SN 1861, Precision Acoustics, Dorchester, Reino Unido) que teve valor médio de 1,58 MPa. Adicionalmente, uma imagem de VA em modo contínuo do alvo foi gerada.

3.3 Resultados e discussões

Os dois feixes de ultrassom sobrepostos modularam o índice de refração da água nas faixas de MHz e kHz. O sinal de 20 kHz foi extraído através do

Figura 3.3: Arranjo experimental para análise do decaimento do sinal de VA.

processamento do sinal em Matlab, destacando as regiões onde os feixes de MHz se combinam e geram campos acústicos de 20 kHz (Fig. 3.4). A zona focal do transdutor é claramente observada na figura e possui dimensões conforme verificado na calibração do transdutor (Apêndice F).

Figura 3.4: Campo acústico de frequência 20 kHz devido à mistura de dois feixes acústicos (em MHz) mapeado pela técnica de acusto-ótica.

O duplo feixe de ultrassom com diferença de frequência de 20 kHz reduziu a formação de ondas estacionárias e permitiu a concentração da baixa frequência na região focal do transdutor. Na Fig. 3.5 são mostradas imagens dos campos acústicos formados por 3 tipos de excitações diferentes. Observa-se a formação de ondas estacionárias quando utilizada a modulação AM para ambos os transdutores plano e focalizado (monoelemento). A Tab. 3.1 apresenta os resultados para a formação de ondas estacionárias e focalização para os diferentes transdutores. Usando o transdutor confocal, a formação de ondas estacionárias foi reduzida em

Figura 3.5: Campos acústicos de 20 kHz dentro de um cilindro de acrílico que simula um crânio humano. Da esquerda para direita encontram-se os resultados utilizando um transdutor planar, transdutor focalizado monoelemento e um transdutor confocal de dois elementos.

Tabela 3.1: Análise por efeito acusto-ótico de ondas estacionárias e de focalização geradas para 3 diferentes tipos de transdutores de ultrassom.

Transdutor	Método para geração	Frequência central	SWR	R
	de baixa frequência	(MHz)		
Planar	AM	2,25	3.99	37,9
Focal	AM	3,2	1,18	44,8
Confocal	duplo feixe	3,2	0,95	60,3

76% e 20%, em comparação com os transdutores planar e focalizado em modo AM, respectivamente. O transdutor confocal apresentou também 35% maior eficiência na focalização do feixe de baixa frequência do que o transdutor focalizado. O feixe gerado pelo transdutor planar apresentou um padrão similar ao observado pelas simulações realizadas por Baron *et al.*, 2009 [64]. O uso do transdutor planar promove a formação de ondas estacionárias sobre áreas indesejadas do encéfalo que podem causar sangramentos devido a efeitos térmicos e cavitação.

Do experimento de avaliação do decaimento do sinal de baixa frequência com a distância obteve-se a imagem de VA da esfera presa a fios de cabelo mostrada na Fig. 3.6(a). Nesta imagem utilizou-se técnicas de aquisição e processamento

Tabela 3.2: *R-quadrado dos ajustes sobre os decaimentos do sinal de baixa frequência com a distância para as Equações. 3.5 e 2.9.*

Δf [kHz]	Emissão acústica	Espalhamento não linear
50	-0,3032	0,8630
60	-0,6313	0,9350
70	0,0444	0,9667
100	-0,3657	0,9441

de imagens desenvolvidas neste estudo e apresentadas com mais detalhes no Apêndice A. O sinal de baixa frequência detectado pelo hidrofone foi 20, 22, 21 e 25 dB abaixo do esperado pelo modelo de força de radiação acústica (Eq. 3.5) para os sinais de 50, 60, 70 e 100 kHz, respectivamente. Na Fig. 3.6(b) são mostrados os decaimentos das pressões obtidas ao longo do eixo radial do transdutor. Os dados experimentais ajustaram ao modelo não-linear (Eq. 2.9) com $R - quadrado \geq 0,86$ para todas as diferenças de frequências testadas (Tab. 3.2).

Figura 3.6: *Decaimento com a distância do sinal de VA para 4 valores de diferenças de frequência.*

A supressão de ondas estacionárias é muito importante para evitar que regiões fora do alvo atinjam o limiar de pressão acústica necessário para geração de cavitação inercial. Estes resultados indicam que a excitação focalizada do coágulo poderia

diminuir os casos de hemorragia. Contudo, a hipótese inicial dessa tese propunha que o aumento da força de radiação causada pela baixa frequência aumentaria os efeitos térmicos juntamente com a cavitação e deveriam ser os principais responsáveis pelo efeito trombolítico. No entanto, o decaimento do sinal de baixa frequência ao longo do seu eixo de propagação mostra que a emissão acústica gerada pela força de radiação acústica é desprezível. O sinal por efeito não-linear detectável pelo hidrofone indica que a contribuição do sinal é, principalmente, gerada pela interação das ondas incidentes com as espalhadas pelo alvo. Baseado no estudo apresentado por Ding, 2000 [94], pode-se estimar o valor das pressões no foco sendo aproximadamente 9 vezes o valor medido na menor distância de 8 cm. Assim, para a frequência de 50 KHz tem-se 0,24 Pa à 8 cm e, aproximadamente, 2,16 Pa no foco. Segundo o modelo não-linear, a contribuição da emissão acústica para essa faixa de frequência seria de menos de 30 dB do sinal medido [93]. Assim, a pressão devido à força de radiação dinâmica no foco seria da ordem de 68 mPa. Dessa forma, pode-se concluir que a contribuição das baixas frequências (de Hz à kHz) para causar a deformação mecânica e vibração do coágulo para facilitar o contato do medicamento fibrinolítico é desprezível.

3.4 Conclusão

A distribuição espacial do campo acústico de 20 kHz espalhado pelo cilindro de acrílico mostrou que a mistura não linear do duplo feixe de ultrassom suprime a formação de ondas estacionárias e aumenta a focalização do feixe de campos acústicos de kHz. Assim, a mistura de feixes focalizados permite a irradiação do coágulo mais pontualmente, o que, potencialmente, causaria menos danos ao tecido cerebral circundante. Contudo, de acordo com o decaimento do sinal com a distância observado, pode-se concluir que o sinal é originário do espalhamento não-linear dos feixes de ultrassom e não da vibração da amostra. Dessa forma, a força de radiação que incide sobre o alvo ocorre devido aos feixes de ultrassom primários, sendo a vibração do alvo em baixa frequência desprezível.

EXCITAÇÃO MULTIFREQUENCIAL POR CODIFICAÇÃO DE PULSOS

4.1 Introdução

Várias abordagens foram propostas e examinadas a fim de alcançar uma insonação transcraniana eficaz. Transdutores de muitos elementos têm sido utilizados para a correção do foco do ultrassom baseada em atrasos de fase e de amplitude de sinais de ultrassom calculados a partir de imagens de tomografia computadorizada [126, 127, 128, 108]. A codificação de pulsos de ultrassom pelo método chirp (varredura de senos) foi utilizada no ultrassom diagnóstico como uma técnica para melhorar a amplitude, a resolução, a relação sinal-ruído de imagens [129, 130, 89] e a técnica tem demonstrado ser capaz de reduzir ondas estacionárias tanto no ultrassom diagnóstico [131] quanto terapêutico [107]. As excitações ultrassônicas codificadas por pulsos curtos [132, 133] e por sinais de frequências aleatórias [134, 115] também demonstraram eficácia em terapia, gerando regiões focais mais confinadas.

A maioria das técnicas desenvolvidas para a supressão de ondas estacionárias e de correção de aberração de foco foram avaliadas em simulações computacionais,

experimentos *ex vivo* e experimentos em phantoms. Contudo, na prática clínica, muitos outros parâmetros interferem nos resultados da terapia de ultrassom transcraniano. Até o momento, nem todos os mecanismos envolvidos nesta forma de terapia são totalmente compreendidos e os modelos mencionados, infelizmente, não levam em conta a heterogeneidade de tecidos moles ou a variabilidade da absorção e liberação da droga entre os indivíduos. Portanto, estudos *in vivo* são fundamentais para a avaliação mais completa da eficácia terapêutica e para expandir a compreensão dos mecanismos envolvidos nas técnicas. A utilização de transdutores com muitos elementos e o uso da excitação ultrassônica codificada por pulsos curtos já se provaram valiosos em estudos *in vivo*. Porém, a avaliação *in vivo* da eficácia terapêutica dos métodos baseados na excitação ultrassônica por chirp e aleatória ainda não foi realizada.

Neste estudo, a capacidade da excitação ultrassônica baseada em métodos de codificação de pulsos por sinais chirp e aleatório é investigada para melhoria da focalização do ultrassom utilizando um protocolo de abertura da BHE por ultrassom em camundongos. Além disso, teve-se o objetivo de explorar a associação da abertura da BHE a sangramentos observados em estudos de sonotrombólise [7, 8], sendo este aspecto abordado com mais detalhes no Cap. 6.

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Métodos de excitação ultrassônica codificada

Foram utilizadas duas técnicas de codificação de pulso de ultrassom para a redução de ondas estacionárias e correção da aberração do foco para uso em aplicações transcranianas. A técnica chirp ou varredura de senos e a seleção periódica de frequências aleatórias (SPFA) [115] foram avaliadas em simulações computacionais e em estudos *in vivo* com camundongos. Simulações computacionais foram realizadas baseadas em imagens de μ CT. A avaliação do foco se deu pela quantificação do volume da BHE aberta utilizando agente de contraste e imagens de ressonância magnética (sigla em inglês MRI, *magnetic resonance imaging*). Imagens histológicas foram utilizadas para avaliar danos permanentes causados ao tecido cerebral.

Os métodos Chirp e SPFA consistem na geração de sinais de transmissão de ultrassom codificados que varrem larguras de banda de frequência de maneira linear ou aleatória. Os sinais são compostos de ondas senoidais com a frequência $f(t)$ variando linear ou aleatoriamente de acordo com o método escolhido. Os sinais são descritos por

$$s(t) = K(f(t)) \sin(\phi(t)) \quad (4.1)$$

sendo $\phi(t)$ a função de fase no domínio de tempo e $K(f(t))$ o fator de calibração experimental que corrige o sinal de ultrassom de acordo com a resposta em frequência do transdutor e atenuação do crânio também dependente da frequência $f(t)$.

Chirp

No método chirp convencional, a frequência instantânea varia linearmente com o tempo. Neste estudo, o sinal foi otimizado para permitir N ciclos completos de pulsos para cada $f(t)$, permitindo que $\phi(t)$ permanecesse constante por um período de tempo $\frac{N}{f(t)}$. O número mínimo de ciclos foi definido para permitir a oscilação de microbolhas aumentando a chance de abertura da BHE baseado em estudo anterior [133]. As frequências foram variadas de acordo com a série (demonstração no Apêndice B):

$$t_n = N \sum_{i=0}^{n-1} \frac{1}{f_i} \quad (4.2)$$

em que o índice n indica a frequência escolhida dentro da banda de frequência $f_n = f_0 + n\Delta f$, sendo f_0 a frequência inicial e Δf o passo de frequência. Integrando-se a série com intervalo entre f_0 e f_n , a frequência instantânea $f(t)$ é dada por

$$f_n(t) = f_0 e^{\frac{\Delta f}{N} t} \quad (4.3)$$

e o sinal de chirp é dado por

$$s(t) = K(f(t)) \sin\left(2\pi f_0 e^{\frac{\Delta f}{N} t} t\right) \quad (4.4)$$

PSRF

No método aleatório, os parâmetros foram mantidos iguais aos do método chirp, porém a escolha das frequências foi realizada de maneira aleatória, com a

derivada do ângulo de fase expresso por [115]

$$d\phi_{rand}(t) = 2\pi f_{rand}(t)dt \quad (4.5)$$

4.2.2 Simulações

As simulações computacionais foram desenvolvidas usando o k-Wave Matlab toolbox [114]. O toolbox trabalha com a solução no domínio do tempo do espaço-k das equações acústicas de primeira ordem para meios heterogêneos dadas por

$$\frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} = -\frac{1}{\rho_0} \nabla p, \quad (4.6)$$

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = -\rho_0 \nabla \cdot \mathbf{u} - \mathbf{u} \cdot \nabla \rho_0, \quad (4.7)$$

$$p = c_0^2 (\rho + \mathbf{d} \cdot \nabla \rho_0 - L\rho), \quad (4.8)$$

sendo $\mathbf{u}$ a velocidade da partícula, p a pressão acústica, ρ a densidade acústica, ρ_0 a densidade no equilíbrio, c_0 a velocidade do som isentrópica, $\mathbf{d}$ o deslocamento da partícula e L o operador integral-diferencial linear que relaciona a absorção acústica α que, por sua vez, segue a lei de potência de frequência na forma $\alpha = \alpha_0 \omega^y$. O toolbox limita o coeficiente de potência de α a um escalar. Esta limitação não permite a seleção de diferentes valores y para cada meio simulado (encefalo, crânio, água). Nesta simulação, y foi definido igual a 1, que é um valor adequado para tecidos moles [89].

As propriedades acústicas da cabeça de um camundongo (massa: 24 g, sexo: masculino, C57BL/6, Harlan, Indianápolis, IN, EUA) foram obtidas a partir de imagens de μ CT (R_mCT2, Rigaku, Tóquio, Japão) com volume de 512 por 512 por 512 pixels e resolução de 80 μ m. A densidade e a velocidade do som foram convertidas a partir das imagens de μ CT utilizando as unidades de Hounsfield de fatias coronais do putâmen (6 mm anterior à Lambda) baseadas em ajustes experimentais [110, 111] disponíveis pelo k-Wave Matlab toolbox [114]. O coeficiente de atenuação do encéfalo foi definido como 0,6 dB.cm⁻¹ baseado em valores de tecido mole [89]. O coeficiente de atenuação do crânio foi definido como 29 dB.cm⁻¹ baseado em calibrações realizadas com dois crânios extraídos de camundongos de mesmas características (espessura do crânio pela imagem de μ CT igual a 0,5 mm, atenuação do ultrassom na região do putâmen igual a 15% para 1 MHz). O encéfalo

e o crânio foram segmentados utilizando o mapa de impedância acústica obtido da multiplicação entre densidade e velocidade do som, sendo $Z_{encefalo} = 1,49$ e $2,00$ MRayls e $Z_{cranio} > 2,00$ MRayls, respectivamente.

A matriz computacional 2D cobriu uma área de 80 por 80 mm com $80 \mu\text{m}$ de resolução. Definiu-se uma fonte de ultrassom com dimensões iguais aos do transdutor terapêutico utilizado nos experimentos (foco = 60 mm, abertura = 70 mm, furo no interior da cerâmica = 20 mm). A fonte foi alimentada por sinais de pressão variantes no tempo baseados nos métodos chirp e SPFA (equação 4.1) com fator de calibração $K(f(t))$ definido constante e igual a 1. Além disso, um sinal monofrequencial foi simulado para comparar com os resultados obtidos a partir dos métodos chirp e SPFA.

$$S(t) = \sin(2\pi ft + \phi_o) \quad (4.9)$$

sendo $f = 1,5$ MHz. O foco do transdutor foi posicionado na região do putâmen (anterior/posterior: 6 mm, medial/lateral: 2,2 mm, dorsal/ventral: 3 mm referenciados a partir de Lambda). Os parâmetros acústicos variaram dentro da banda de frequência de 1,23 e 2,29 MHz, passos de frequência (para chirp e SFPA) de 1 kHz a 10 kHz e número de ciclos igual a 3. A pressão negativa máxima foi gravada em toda a matriz computacional 2D.

As simulações foram computadas em uma estação de trabalho de 64-bits (Precision WorkStation T7610, Dell, Austin, TX, EUA) com processadores Intel(R) Xeon(R) CPU E5-2630 v2 2,60 GHz processors, 64 GB de RAM e uma placa GPU de 6 GB (Tesla C2075, NVIDIA, Santa Clara, CA, EUA).

4.2.3 Estudo *in vivo*

Preparação dos animais

Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados e conduzidos de acordo com as normas do comitê de ética em pesquisa da Columbia University. Um total de 19 camundongos C57BL/6 (massa: 20-28 g, sexo: masculino, Harlan, Indianápolis, IN, EUA) foram usados neste estudo. Dois camundongos foram anestesiados com 4% de isoflurano misturado com oxigênio a $0,8 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ (SurgiVet, Smiths Medical PM, Inc., Wisconsin, EUA), sacrificados com deslocamento cervical

e usados na calibração. Os outros 17 camundongos foram anestesiados com 1,0 – 2,5% de isoflurano e oxigênio a 0,8 L.min⁻¹ e usados no estudo de abertura da BHE (mais detalhes no Apêndice D).

Fator de calibração $K(f(t))$

Conduziu-se a calibração do transdutor terapêutico (frequência central: 1,94 MHz; -6 dB banda de frequência: 1,28-2,31 MHz; diâmetro: 70 mm; Imasonic SAS, Voray-sur-l'Ognon, França) utilizando um hidrofone (modelo HGL-0200, ONDA Corp., Sunnyvale, CA, EUA) sobre 2 crânios frescos dentro de um tanque de água desgaseificada. Os crânios foram hidratados em água desgaseificada por 4h antes dos experimentos. O transdutor foi fixado a um sistema de posicionamento 3D (Velmex Inc., Lachine, QC, Canadá) e posicionado sobre o hidrofone com seu foco sobre o elemento sensor do hidrofone. Os crânios foram fixados a um segundo sistema de posicionamento 3D e, cuidadosamente, posicionados entre o hidrofone e o transdutor com o elemento sensível do hidrofone posicionado nas coordenadas correspondentes ao putâmen. Um PC controlou os sistemas de posicionamento 3D e a placa de aquisição de sinais (Gage Applied Technologies Inc., Lachine, QC, Canadá) que adquiriu sinais de 0,30 a 3,00 MHz com intervalos de 0,01 MHz nos putâmens direito e esquerdo de cada amostra.

Protocolo de insonação

Os camundongos foram mantidos sob isoflurano continuamente a 1,0% durante todo o procedimento. Os animais tiveram suas cabeças raspadas e imobilizadas em um sistema estereotáxico (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, EUA). Um recipiente cheio de água desgaseificada foi colocado por cima de cada camundongo com a cabeça acoplada ao fundo do recipiente utilizando gel de acoplamento. O transdutor terapêutico (descrito no Apêndice C) e um transdutor pulso-eco com os focos superposicionados foram montados juntos a um cone de acrílico preenchido com água desgaseificada. O transdutor pulso-eco (frequência central: 10 MHz, foco: 60 mm, diâmetro: 22,4 mm; modelo U8517133, Olympus NDT, Waltham, MA, EUA) foi usado para o posicionamento do foco e serviu também como detector de cavitação passiva para monitoramento da atividade de

Figura 4.1: Montagem experimental para abertura de BHE por ultrassom. Os animais foram posicionados em um sistema estereotáxico com uma mistura de 1% de isoflurano e oxigênio (0.8 L.min^{-1}) sendo continuamente entregue durante a insonação. Microbolhas foram injetadas através da veia do rabo do animal imediatamente antes da insonação. Um recipiente de água desgaseificada e gel acoplador foram usados para acoplar a cabeça do animal aos transdutores de ultrassom. Um transdutor terapêutico com banda de frequência 1,23-2,29 MHz foi energizado por um gerador de função e um segundo transdutor de 10 MHz foi utilizado para alinhar os focos dos transdutores ao putâmen. Este segundo transdutor de pulso-eco, também foi utilizado como o detector para a monitorização DCP durante as insonações.

cavitação durante a insonação do encéfalo. Essa montagem de transdutores foi fixada a um sistema de posicionamento 3D (Velmex Inc., Lachine, QC, Canadá) (Fig. 4.1). Ambos os sinais codificados por chirp e SPFA foram gerados em Matlab, carregados no gerador de função via USB (33220A, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA), energizando o transdutor terapêutico através de um amplificador de 50 dB (325LA, ENI Inc., Rochester, NY, EUA).

Imediatamente antes da insonação do putâmen, foram injetadas microbolhas de lipídio (Tab. 4.1) conforme procedimento descrito em [77]. O hemisfério esquerdo de cada camundongo foi deixado intacto como controle. Os camundongos foram divididos aleatoriamente em três grupos: Chirp, Aleatório e Regular ($n = 5$ por

	Quant. ^a	Média ^b	D.P. ^c	C.V. ^d	d10 ^e	d50 ^e	d90 ^e
	por mL	μm	μm		μm	μm	μm
Amostra 1	6,569e9	1,37	1,02	74,5%	0,729	1,07	2,20
Amostra 2	6,821e9	1,39	0,991	71,5%	0,729	1,10	2,21

* Multisizer 3 Coulter Counter, Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA.

^a número de partículas por mL

^b diâmetro médio (média)

^c desvio padrão da distribuição do diâmetro (DP)

^d coeficiente da variação do diâmetro (DP/média)

^e d10, d50, d90: percentis dos diâmetros

Tabela 4.1: *Propriedades das microbolhas. Medições* realizadas imediatamente após ativação.*

grupo). O grupo Chirp foi insonado usando o método chirp com $f_o = 1,5$ MHz, $f_f = 1,9$ MHz, $\Delta f = 10$ kHz, PNP = 0,52 MPa e $N = 3$ ciclos fornecendo um pulso de 70,7 μs repetido continuamente por 30 s sem intervalos entre pulsos. O grupo Aleatório foi insonado com o método SPFA usando os mesmos parâmetros. O grupo Regular foi insonado por ondas pulsadas com $f = 1,5$ MHz, 20 ms, 5 Hz de repetição de pulsos, 0,52 MPa por 5 min fornecendo um total de tempo de ultrassom ligado também de 30 s.

Detecção de Cavitação Passiva

Um segundo gerador de função (33220A, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) foi usado para sincronizar o transdutor terapêutico com o sistema de Detecção de Cavitação Passiva (DCP) a uma taxa de 5 Hz para todos tipos de sinais testados. O transdutor de monitoramento foi conectado a um pulser/receiver (NDT-5800, Panametrics, MA, EUA) em modo de recepção com 20-dB de amplificação. Os sinais do DCP foram digitalizados a 100 MHz (Gage Applied Technologies Inc., Lachine, QC, Canadá) e a transformada de Fourier do sinal de DCP foi calculada em Matlab fornecendo o espectro de frequência em tempo real. A aquisição de

DCP foi realizada durante toda a insonação, com pulsos de 20 ms salvos para a insonação Regular enquanto que para os métodos codificados a taxa de aquisição foi de 5 Hz com duração de 6,67 ms. Cinco segundos dos sinais de DCP foram adquiridos antes da injeção de microbolhas para serem usados como linha de base controle. A dose de cavitação estável utilizando harmônicos (sigla em inglês SCDh, *stable cavitation dose using harmonics*) foi medida baseada em método reportado em [135] e brevemente descrito aqui. Para o sinal Regular, o sinal harmônico ($n \cdot f$; $n = 2, 3, 4, 5, 6$; $f = 1,5$ MHz; amplitude máxima dentro da banda de 200 Hz em torno da frequência harmônica) foi filtrado depois de obter o valor quadrático médio (em inglês RMS, *root mean square*) da amplitude espectral de voltagem. Para os métodos codificados, sinais de banda de 3,0-3,8 MHz, 4,5-5,7 MHz, 6,0-7,6 MHz e 7,5-9,5 MHz foram filtrados de maneira a extrair harmônicas de 2^a à 6^a ordem da frequência varrida nestes métodos (1,5-1,9 MHz). A amplitude espectral da voltagem RMS foi integrada ao longo de toda a insonação e foi definida como a SCDh para cada insonação. Os valores de SCDh para os três grupos de animais ($n=5$ cada) insonados pelas técnicas regular, chirp e aleatória foram comparados por estatística ANOVA.

Imagem de Ressonância Magnética

Foi injetado gadolínio (287 mg/mL, OmniscanTM Novapulus, Novation LLC, TX, EUA) intraperitonealmente (IP) nos animais imediatamente após a insonação. Depois da injeção IP, aguardou-se 30 min antes da aquisição das imagens de ressonância magnética. As imagens (320 por 320 pixels, resolução espacial de $80 \mu\text{m}^2$, espessura entre imagens de $400 \mu\text{m}$) foram geradas em sequências ponderadas em 2-D FLASH T1 usando um equipamento de ressonância de 9,4-T (DRX400, Bruker BioSpin, Boston, MA, EUA). As imagens foram usadas para determinar o volume da abertura da BHE e para avaliar se os métodos causaram danos ao cérebro (por exemplo, edema). O volume da abertura foi calculado dentro de um elipsóide selecionado manualmente cobrindo o hemisfério insonado (direito) do cérebro [136]. O elipsóide apresentou diâmetros de 5,5 mm e 4,0 mm e altura de 0,4 mm por 9 fatias. Um limiar de intensidade foi determinado usando o hemisfério controle como referência e os voxels de alto contraste correspondentes às veias e

aos ventrículos foram excluídos. O volume de abertura da BHE foi determinado contando o número total de voxels com intensidade igual ou superior a 2,5 do desvio padrão da referência. Os volumes de abertura da BHE para os três grupos de animais (n=5 cada) insonados pelas técnicas regular, chirp e aleatória foram comparados por estatística ANOVA.

Histologia

Os possíveis danos que os métodos propostos poderiam causar ao tecido cerebral foram analisados com a histologia de seções do encéfalo coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E). Uma semana após a insonação, todos os camundongos passaram por procedimento de perfusão transcardíaca e fixação em 4% de paraformaldeído. Os encéfalos foram embebidos em parafina e depois seccionados horizontalmente com espessuras de 6 μm em 8 níveis separados por intervalos de 180 μm para cobrir todo o putâmen. A cada nível, 4 seções foram seccionadas, coradas com H&E e adquiridas imagens de microscópio (BX61; Olympus, Melville, NY, EUA). A avaliação histológica foi realizada por um técnico treinado sem conhecimento prévio da localização e dos parâmetros de insonação. As amostras foram avaliadas em busca de extravazamento de eritrócitos dentro do parênquima, assim como perda de células e tecido (mais detalhes do método no Apêndice E).

4.3 Resultados e discussão

As respostas em frequência do transdutor de ultrassom focalizado foram obtidas a partir da calibração em água e com o hidrofone posicionado atrás do crânio na região do putâmen conforme mostrado na Fig. 4.2(a). O fator de calibração $K(f(t))$ foi baseado na resposta em frequência do transdutor levando em consideração a atenuação do ultrassom causada pelo crânio na região do putâmen (Fig. 4.2(b)). A pressão acústica foi mantida constante dentro da banda de frequência de 1,5 a 1,9 MHz para os métodos chirp (Fig. 4.2(c)-(d)) e aleatório (Fig. 4.2(e)-(f)). A não-variabilidade da pressão com a frequência foi importante para evitar variações da frequência de ressonância das microbolhas com a pressão [137]. A forma de onda do método aleatório mostra mudanças súbitas

nas frequências selecionadas aleatoriamente. Essas mudanças súbitas de frequências instantâneas introduzem outras componentes no espectro de banda de frequência do sinal aleatório.

Na Fig. 4.3 são mostrados os campos de pressão simulados para os três métodos avaliados. A insonação regular apresenta formação de ondas estacionárias (Fig. 4.3(a)). Os métodos chirp e aleatório foram explorados variando-se a banda de frequência, os passos de frequência instantânea $f(t)$ e o número de ciclos. Para o método chirp, os melhores parâmetros foram banda de frequência 1,23 e 2,29 MHz (frequência de banda do transdutor terapêutico), 10 kHz de passo de frequência e 2 ciclos (Fig. 4.3(d)). Neste caso, a interferência das ondas melhoraram a focalização e reduziram a formação de ondas estacionárias. No pior caso (Fig. 4.3(c)) foram observados grandes lóbulos laterais e ondas estacionárias. Além disso, pontos de máximo foram encontrados fora da região focal devido ao padrão de interferência causado pelo múltiplo espalhamento de ondas dentro do encéfalo. O método SPFA apresentou melhor focalização para 1,23-2,29 MHz de banda de frequência, 1 kHz de passo de frequência e 3 ciclos (Fig. 4.3(g)). Na Fig. 4.4 são mostrados os perfis axial e lateral do feixe para os métodos chirp e aleatório comparados com o perfil obtido para a insonação regular. O perfil axial mostra a formação de ondas estacionárias produzidas pela insonação regular que não são observadas nos métodos codificados. O perfil lateral do feixe mostra os lóbulos laterais gerados pelas três técnicas. A insonação regular apresentou oscilações maiores no campo de pressão o que tende a promover cavitação no tecido. A simulação indica que maiores bandas de frequência permitem uma focalização mais efetiva (Fig. 4.3(d) e (g)). Contudo, na validação *in vivo* a abertura da BHE não ocorreu consistentemente usando bandas de frequência maiores. Desta forma, a frequência máxima estabelecida para os experimentos foi de 1,5 a 1,9 MHz (Fig. 4.3(b) e (e)). Mais estudos são necessários para explorar se a banda de frequência para obtenção de abertura da BHE mais eficaz é limitada pelo tamanho das microbolhas.

O DCP detectou componentes de frequências espalhadas pelas microbolhas dentro do sistema vascular durante a insonação. Os sinais de DCP em tempo real para os métodos chirp, aleatório e regular estão apresentados na Fig. 4.5(a), (b) e (c), respectivamente. Os gráficos das Fig. 4.5(d), (e) e (f) mostram o nível de

Figura 4.2: Caracterização dos sinais Chirp e SPFA. (a) Resposta em frequência do transdutor (em água) e resposta em frequência do transdutor com atenuação do crânio (na região do putâmen), (b) fator de calibração $K(f(t))$ baseado na resposta em frequência do transdutor com atenuação do crânio, (c) sinal de chirp otimizado, (d) espectro do sinal de chirp otimizado, (e) sinal de SPFA otimizado e (f) espectro do sinal de SPFA otimizado.

Figura 4.3: Campos de pressão negativa simulados para: (a) insonação regular (1,5 MHz); (b) Chirp: 1,5-1,9 MHz, 10 kHz, 3 ciclos; (c) Chirp: 1,5-1,9 MHz, 10 kHz, 2 ciclos; (d) Chirp: 1,23-2,29 MHz, 10 kHz, 3 ciclos; (e) Aleatório: 1,5-1,9 MHz, 10 kHz, 3 ciclos; (f) Aleatório: 1,5-1,9 MHz, 1 kHz, 2 ciclos; e (g) Aleatório: 1,23-2,29 MHz, 1 kHz, 3 ciclos.

cavitação SCDh calculados para harmônicos das componentes de frequência de cada método. Para o método chirp, observa-se no espectrograma da Fig. 4.5(g) o aumento linear dos harmônicos e ultra-harmônicos do sinal de DCP. Para o método aleatório, o espectrograma apresenta bandas mais largas de frequências caracterizando as múltiplas componentes de frequência espalhadas durante toda a insonação. Bandas de frequência mais largas indicam a presença de cavitação inercial e, em última análise, maior atividade de cavitação. A insonação regular apresenta componentes harmônicas de 1,5 MHz bem definidas. Na Fig. 4.6 é mostrada a análise estatística ANOVA do nível de cavitação (Fig. 4.5(d), (e) e (f)). O nível de cavitação médio para a insonação regular foi maior do que para os métodos de codificação de pulsos. Os níveis de cavitação foram $55, 40 \pm 28, 43$ V.s, $63, 87 \pm 29, 97$ V.s e $356, 52 \pm 257, 15$ V.s para as insonações chirp, aleatória e regular, respectivamente. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os métodos de codificação de pulso.

As Fig. 4.7(a)-(f) mostram imagens de RM (ressonância magnética) ponderadas em T1-FLASH para os três métodos. As regiões de maior contraste

Figura 4.4: Perfis (a) axial e (b) lateral do feixe na região do foco obtidos das simulações mostradas na Fig. 4.3.

no encéfalo mostram a difusão do agente de contraste dentro do parênquima e indicam onde a BHE foi aberta com sucesso. O método chirp (Fig. 4.7(a) e (d)) e o método aleatório (Fig. 4.7(b) e (e)) apresentaram aberturas menores em comparação com as encontradas pelo método regular (Fig. 4.7(c) e (f)). Na Fig. 4.7(g) são apresentados perfis verticais obtidos a partir de imagens de RM coronais (Fig. 4.7(a)-(c)). O primeiro pico é o crânio que foi usado para o alinhamento dos perfis. As aberturas da BHE observadas nos perfis revelaram que o foco do ultrassom estava a 3,60 mm de profundidade no caso da insonação por chirp e a 3,28 mm de profundidade para o caso aleatório. Embora os métodos

Figura 4.5: Monitoramento por detecção de cavitação passiva (DCP). Espectro de frequência do DCP para os métodos (a) chirp, (b) aleatório e (c) regular; níveis de cavitação para cada método durante o tempo de insonação ((d), (e) e (f), respectivamente); espectrograma em tempo real dos sinais de DCP para cada método ((g), (h) e (i), respectivamente) com a barra de cores representando a amplitude do espectro.

codificados apresentaram maior confinamento da abertura da BHE na região focal em comparação com o método regular, houve a abertura da BHE em regiões profundas próximas da base do crânio em 5,60 mm e 5,76 mm para os casos chirp e aleatório, respectivamente. As distâncias das aberturas da região focal e da região da base do crânio foram de 2 mm e 2,48 mm para os casos chirp e aleatório, respectivamente. Os volumes das aberturas para os três grupos são apresentados na Fig. 4.8. Os volumes de abertura médios avaliados a partir das imagens de RM foram $9,38 \pm 5,71 \text{ mm}^3$, $8,91 \pm 3,91 \text{ mm}^3$ e $35,47 \pm 5,10 \text{ mm}^3$ para as insonações chirp,

Figura 4.6: Análise estatística ANOVA dos níveis de cavitação para cada grupo. Não houve diferença estatística significativa (*ns*) entre os grupos chirp e aleatório. Diferenças significativas (*) foram encontradas entre os grupos chirp e regular e entre aleatório e regular para valor de *p* igual a 0,0122.

aleatória e regular, respectivamente. O método regular apresentou maior abertura. Os métodos codificados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas para o volume da abertura.

Nenhum dano ao encéfalo foi detectado nos exames histológicos para os animais do grupo chirp. Quatro de cinco animais do grupo aleatório apresentaram neurônios com pequenas deformações de tecido nas regiões do foco. Três de cinco animais do grupo regular morreram no dia seguinte a insonação durante a aquisição de imagens de RM. Os dois animais restantes do grupo regular apresentaram pequenos danos similares aos observados nos animais do grupo aleatório.

Os métodos de excitação codificada foram conduzidos por sinais contínuos para facilitar a formação de ondas estacionárias causada por múltiplos espalhamentos da onda ultrassônica no interior do encéfalo. Os métodos codificados foram capazes de evitar a formação de ondas estacionárias como previsto pelas simulações computacionais. No entanto, os métodos de excitação codificados não foram capazes de evitar as aberturas da BHE próximas à base do crânio, assim como no método regular. Os picos devido à formação de ondas estacionárias eram esperados com distâncias entre 0,4 mm e 0,5 mm que correspondem à metade dos comprimentos de onda dos limites da banda de frequência utilizada nos métodos codificados 1,9 MHz e 1,5 MHz, respectivamente (assumindo $c = 1540$ m/s). Essas distâncias não correspondem com as distâncias encontradas nas imagens de RM,

Figura 4.7: Avaliação da abertura da BHE. Imagens de RM T1-FLASH (a)(b)(c) coronal e (d)(e)(f) transversal mostrando a abertura da BHE utilizando o agente de contraste gadolínio para os métodos chirp, aleatório e regular, respectivamente e perfil vertical (g) extraído das imagens coronais de RM (ressonância magnética) (a)(b)(c).

Figura 4.8: Quantificação do volume de abertura da BHE para os métodos chirp, aleatório e regular. Não houve diferença estatística significativa (*ns*) entre os grupos chirp e aleatório. Diferenças significativas (*) foram encontradas entre os grupos chirp e regular e entre aleatório e regular.

2 mm e 2,48 mm. Múltiplos espalhamentos das ondas dentro do crânio podem ter causado a aberração do foco que causou as aberturas na base do crânio.

Os níveis baixos de cavitação detectados para os métodos codificados indicam baixa atividade das microbolhas que foi confirmada pela abertura da BHE mais confinada nas imagens de RM. Estes resultados corroboram outros estudos que demonstraram a redução da cavitação quando utilizados métodos aleatórios para codificação de pulsos [138, 115]. Portanto, os métodos foram capazes de melhorar o alvo da abertura da BHE.

Usando uma largura de banda maior obteve-se uma melhor focalização e redução da formação de ondas estacionárias para os métodos codificados. É importante notar que a escolha da largura de banda de frequência necessita levar em conta a resposta do transdutor, a atenuação do crânio dependente da frequência e o tamanho das microbolhas que define a frequência ótima de excitação. A capacidade de focalização mais elevada encontrada aqui melhora a precisão do ultrassom transcraniano segmentando regiões específicas do encéfalo a serem tratadas com drogas e outras substâncias farmacológicas. Os métodos codificados podem ser facilmente implementados em diferentes configurações. A utilização destes métodos em conjunto com transdutores de grande abertura e de muitos elementos pode melhorar a focalização e reduzir a formação de ondas estacionárias ainda mais. Portanto, outras técnicas podem se beneficiar destes métodos, por exemplo, para

redução de hemorragias observadas durante sonotrombólise.

4.4 Conclusão

A quebra da BHE foi um método proposto nesta pesquisa para avaliar quantitativamente a eficácia da focalização do ultrassom utilizando sinais multifrequenciais dentro do crânio em termos do tamanho da zona focal e da redução de ondas estacionárias e aberração do foco. Dessa forma, os ganhos com esta técnica não se restringem somente à quebra de BHE, mas contribuem enormemente para os avanços com estudos de sonotrombólise, entre outras técnicas terapêuticas de ultrassom transcraniano. Estes métodos proporcionam ainda a possibilidade de se explorar os efeitos da excitação multifrequencial como uma ferramenta para compreensão dos mecanismos envolvidos no ultrassom terapêutico transcraniano e os seus efeitos sobre o tecido cerebral. Contudo, a abertura da BHE observada neste estudo levanta dúvidas sobre a segurança dos métodos de sonotrombólise. Ou seja, para parâmetros acústicos da mesma ordem, danos à parede arterial poderiam ser causados antes da dissolução do coágulo. Dessa forma, no Cap. 6 serão discutidos limiares de pressão para obtenção da abertura da BHE.

MONITORAMENTO DA COAGULAÇÃO E SONOTROMBÓLISE

5.1 Introdução

Uma vez iniciado o processo de coagulação sanguínea, a trombina - enzima do tipo protease serina - converte o fibrinogênio em fibras de fibrina. As fibras de fibrina formam uma rede que aprisiona eritrócitos e plasma tornando-se uma estrutura gelatinosa [139]. Os métodos para a avaliação das propriedades de coagulação sanguínea envolvem princípios de impedância mecânica, eletromagnetismo e fotometria [140].

Baseado no princípio de impedância mecânica, diversos métodos para avaliação de coágulos utilizando ultrassom foram desenvolvidos. O espalhamento do ultrassom no sangue é, principalmente, atribuído ao eritrócito devido seu tamanho ($7,5 - 8,7 \mu\text{m}$) e concentração (5×10^6 células por μL de sangue) [141, 142]. A formação de agregados pelo aprisionamento de eritrócitos pela rede de fibrina causa um substancial aumento do sinal retroespalhado de ultrassom. Utilizando-se do método de retroespalhamento de ultrassom é possível obter diversas informações sobre o coágulo durante sua formação, tais como: tempo de coagulação, viscosidade, propriedades reológicas, atenuação e velocidade do som [143, 144, 145, 146, 147, 148]. A variação desses parâmetros permite identificar diferentes estágios da coagulação

como a agregação de eritrócitos, a redução de hematócrito e a formação do coágulo [148, 149]. A caracterização da coagulação sanguínea por ultrassom em modelos com fluxo sanguíneo é capaz ainda de mostrar a transformação do fluxo laminar do sangue em fluxo turbulento durante o processo de coagulação [150]. Além disso, técnicas de elastografia transiente fornecem informações sobre a atenuação e velocidade da onda de cisalhamento [151, 152]. Aplicando força de radiação acústica sobre artefatos dispersos no sangue é possível se determinar propriedades viscoelásticas (módulo de cisalhamento e viscosidade) do coágulo através da análise de seus deslocamentos [153, 154].

Conforme abordado no Cap. 2, a sonotrombólise combinada com medicamento fibrinolítico pode atuar de diferentes maneiras sobre o coágulo. Considerando a força de radiação acústica ou microjatos gerados por efeito de cavitação, o coágulo pode sofrer deformações mecânicas críticas causando sua fragmentação. Já a fibrinólise desencadeada pelo medicamento, expõe o coágulo à plasmina que provoca sua degeneração produzindo fragmentos chamados produtos de degradação de fibrina (PDF), entre eles o D-dímero [155] - melhor marcador fisiológico de fibrinólise utilizado em testes laboratoriais [156]. O D-dímero está presente na rede de fibrina do coágulo, mas permanece indetectável até que é liberado pela ação da plasmina [155].

A espectroscopia ultravioleta-visível (UV-vis) é um método ótico utilizado para caracterizar partículas em suspensão fornecendo informações tais como contagem, tamanho, formato e composição química de partículas [157]. Este método se baseia na teoria de espalhamento de luz e é bastante interessante na avaliação de partículas de alto índice de refração. A técnica se baseia na interação seletiva de ondas eletromagnéticas por moléculas e átomos. Segundo as leis da mecânica quântica a energia associada a um fóton é

$$E = h.\nu \quad (5.1)$$

sendo h a constante de Planck e ν a frequência.

A seletividade da interação se deve à discretização de pacotes de energia associada à estrutura atômica e aos possíveis estados energéticos que elétrons podem assumir na eletrosfera. Elétrons de valência em ligações covalentes podem ser

excitados para níveis energéticos mais elevados. A energia de excitação necessária para arrancar o elétron está diretamente relacionada à força de ligação associada ao elétron. Com isso, ligações simples necessitam de radiações mais energéticas com comprimento de onda no ultravioleta ($\lambda < 185$ nm). Absorções no UV-Vis dependem de elétrons de valência com energias de excitação menores, cujos grupos funcionais são chamados cromóforos. Segundo a lei de Lambert-Beer, a absorção de um composto é dada por [157]

$$A = \epsilon(\lambda).C.l \quad (5.2)$$

sendo $\epsilon(\lambda)$ o coeficiente de absorção em função do comprimento de onda λ , C a concentração da solução analisada e l o comprimento do caminho ótico percorrido pela luz dentro da solução.

O espectro do sangue integral obtido pela espectroscopia UV-vis evidencia os diversos componentes do sangue como eritrócitos, leucócitos, plaquetas e plasma. Cada um desses componentes exibe uma característica espectral única baseada em suas propriedades óticas [158]. Contudo, a alta absorção ótica do sangue integral dificulta a detecção de pequenas alterações estruturais no sangue.

Neste estudo, foram avaliadas as propriedades mecânicas do sangue integral coagulado durante o procedimento de sonotrombólise por feixe modulado em AM e por duplo feixe com o intuito de se avaliar a eficácia do ultrassom isoladamente no processo de sonotrombólise (ou seja, sem a utilização de fibrinolítico). Além disso, avaliou-se amostras de coágulos pós-insonação por espectroscopia UV-vis a fim de se quantificar o aparecimento de fragmentos gerados pela deformação mecânica do coágulo pelo ultrassom. Uma vez que o D-dímero resulta da degeneração do coágulo por plasmina, testes laboratoriais de avaliação de PDF não poderiam identificar a fragmentação mecânica causada pelo ultrassom isoladamente. Dessa forma, buscou-se utilizar a espectroscopia UV-vis com o objetivo de se detectar fragmentos maiores diferentes do D-dímero.

5.2 Materiais e Métodos

Todos os procedimentos envolvendo sangue humano foram aprovados pelo comitê de ética em pesquisa e protocolado na Plataforma Brasil sob número de

certificado de apresentação para apreciação ética 06347112.9.0000.5440.

Ondas de baixas frequências (de Hz a kHz) geradas por feixes primários de ultrassom em MHz podem ser obtidas por: transdutores monoelementos através da mistura de frequências do sinal de excitação [65, 66] ou por modulação em amplitude (AM); ou, ainda, por transdutores com dois ou mais elementos através da excitação dos elementos com sinais de diferentes frequências [91]. Duas metodologias de insonação multifrequencial foram testadas com coágulos humanos. A primeira envolve o uso do ultrassom em MHz modulado em kHz. Nesta metodologia foi utilizado um transdutor planar para insonação com baixa pressão acústica (kPa) do volume total da amostra permitindo a avaliação de mudanças das propriedades do coágulo como um todo. Em seguida, realizou-se testes com o duplo feixe altamente focalizado e com pressão acústica elevada (MPa).

Amostras de sangue humano com volume de 4 mL foram armazenadas na geladeira em tubos com anticoagulante (K_2 EDTA 7,2 mg, BD Vacutainer, BD Diagnostics, Franklin Lakes, NJ, EUA). O processo de coagulação foi iniciado com a adição de solução de 5% de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (CAS[10035-04-8], Dinâmica Química Contemporânea Ltda, Diadema, SP, Brasil) na proporção de 4 mL de solução para 100 mL de sangue. As amostras foram utilizadas no máximo em até 7 dias da coleta.

5.2.1 Sonotrombólise por feixe modulado (AM)

Neste ensaio verificou-se os efeitos sobre coágulos humanos integrais do ultrassom de 2,7 MHz modulado em 20 kHz (AM) e comparou-se os resultados com uma insonação monofrequencial em 2,7 MHz. Nesta montagem verificou-se a variação da velocidade de propagação do som e a atenuação do pulso/eco durante a coagulação e procedimento de sonotrombólise. A montagem experimental consistiu de um cilindro de acrílico, um transdutor de ultrassom utilizado para monitoramento (modelo 937215, 25MHz/.25", Olympus Corporation, Waltham, MA, EUA) e um transdutor de ultrassom utilizado como terapêutico (modelo 750347, V323 2.25 MHz/.25", Olympus Corporation, Waltham, MA, EUA) (Fig. 5.1(a)). Sangue líquido com coagulante (volume aproximado de 3,5 mL) foi colocado dentro do cilindro entre os transdutores. As calibrações dos transdutores encontram-se no Apêndice F.

(a)

(b)

Figura 5.1: Montagem experimental para ensaio de sonotrombólise com transdutores planares. (a) Montagem experimental com dois transdutores planares mono elementos em modo pulso-eco (transdutor de monitoramento) e por sinal modulado amplificado em modo CW (transdutor terapêutico). (b) Programa em Labview para controle sincronizado via PC do pulser/receiver, gerador de função e placa de aquisição.

Um programa foi desenvolvido em Labview (Labview 2009/ versão 9.0 (32-bits), National Instruments, Austin, TX, EUA) para controle sincronizado via PC dos equipamentos ligados aos transdutores. O transdutor de monitoramento foi conectado a um pulser/receiver (Panametrics-NDT modelo 5800, Olympus Corporation, Waltham, MA, EUA) e utilizado em modo pulso-eco. O pulser/receiver foi controlado via porta GPIB com o auxílio de um adaptador GPIB/USB (GPIB-USB-HS, National Instruments, Austin, TX, EUA). O transdutor terapêutico foi energizado por um gerador de função (33220A, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) com sinal amplificado em 50-dB (100A2, E&I Inc., Rochester, NY, EUA). Uma placa de aquisição conectada ao barramento PCI do computador (PCI-5112, National Instruments, Austin, TX, EUA) foi sincronizada ao pulser/receiver e realizou aquisições a uma taxa de 100 MHz. O software controlou todos os parâmetros dos equipamentos mostrando as aquisições em tempo-real e salvando os dados em arquivos .txt (Fig. 5.1(b)). Durante a insonação terapêutica, apenas o gerador de função era ativado, permanecendo o pulser/receiver inoperante. Por sua vez, durante o monitoramento por pulso/eco, apenas o pulser/receiver era ativado, permanecendo o gerador de função inoperante.

Amostras de sangue com coagulante foram monitoradas por ultrassom pulso/eco por um transdutor de 25 MHz alimentado pelo pulser/receiver com energia nominal mínima de $12,5 \mu\text{J}$. As aquisições foram realizadas com intervalos de 30 s sendo feitas 50 aquisições de $12,5 \mu\text{s}$ (1250 pontos amostrais) por intervalo. A amostra foi monitorada durante o período no qual se deu a coagulação completa do sangue. A partir da coagulação completa, o coágulo foi exposto ao ultrassom terapêutico. As aquisições de pulsos/ecos continuaram sendo realizadas da mesma forma. A influência do pulso/eco de monitoração para a trombólise foi considerada desprezível frente à insonação terapêutica. O monitoramento foi realizado com frequência de repetição de pulso de 1 kHz e pulso de $0,11 \mu\text{s}$. Dessa forma, apresentou intensidade acústica temporal média (I_{SPTA}) de $0,042 \text{ mW.cm}^{-2}$. A insonação terapêutica foi realizada em modo contínuo com intensidade acústica mínima de 10 W.cm^{-2} (calibração dos transdutores no Apêndice F).

Dois parâmetros foram monitorados durante a coagulação e sonotrombólise: a atenuação do sinal (através a tensão RMS do pulso) e a variação da velocidade

de propagação do ultrassom no sangue (através da variação do tempo de vôo dos pulsos). O eco médio refletido pelo transdutor terapêutico foi obtido da média dos 50 pulsos/ecos após janelamento do sinal no tempo e filtragem para retirar componentes DC. O monitoramento da variação do tempo de vôo dos pulsos foi realizado através da detecção de picos (função *findpeaks* do Matlab) do sinal.

5.2.2 Sonotrombólise por duplo feixe de alta potência

Para os ensaios com transdutor focalizado foram utilizadas cubetas de acrílico (1,5 mL; com caminho ótico de 10 mm; espessura de 0,8 mm; 280-800 nm em PMMA, Plastibrand, Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, EUA) para armazenamento do sangue. A cubeta foi posicionada no foco do transdutor côncavo de 3,16 MHz, que por sua vez, estava distanciado de um transdutor planar de mesma frequência a uma distância de 10 cm (Fig. 5.2) (calibração do transdutor côncavo no Apêndice F). Um software desenvolvido em Labview foi usado para adquirir os pulsos acústicos transmitidos atravessando a amostra de sangue com o auxílio do pulser/receiver. O transdutor côncavo foi excitado com pulsos de 1000 ciclos. Essa montagem permitiu o monitoramento do efeito do ultrassom em tempo real durante o procedimento de sonotrombólise. Adicionalmente, foram realizadas 10 aquisições da cubeta preenchida com água e 10 aquisições com o caminho livre entre os transdutores (sem a cubeta) utilizadas no processamento para compensar a contribuição devido às velocidades de propagação das paredes da cubeta (acrílico) e da água.

5.2.3 Avaliação por espectroscopia UV-vis

Utilizou-se a técnica de espectroscopia UV-vis para avaliação do sobrenadante da amostra com o objetivo de se detectar produtos de degradação de fibrina de coágulos gerados pela ação do ultrassom. O sangue fresco foi diluído em solução tampão PBS (sigla em inglês de *Phosphate-buffered saline*) a 10 μL /1000 μL . Posteriormente, foi adicionado 50 μL de cloreto de cálcio para iniciar a coagulação. A amostra foi posicionada rapidamente dentro do espectrofotômetro (DU 640, Beckman Coulter, Pasadena, CA, EUA) (Fig. 5.3) para monitoramento da absorbância da amostra entre comprimentos de onda de 300 e 800 nm.

Figura 5.2: Montagem para procedimento de sonotrombólise utilizando transdutor confocal côncavo de dois elementos.

Figura 5.3: (A) Amostra de sangue integral utilizada nas avaliações por ultrassom e (B) amostra de sangue diluído utilizada na avaliação por espectroscopia UV-VIS.

5.3 Resultados e Discussões

Sonotrombólise por feixe modulado AM

No procedimento de sonotrombólise por feixe modulado AM, as amostras de sangue foram monitoradas por pulso/eco durante 324 min. Aguardou-se a coagulação completa do sangue por 162 minutos. A partir deste instante a amostra foi insonada por um feixe de 2,7 MHz modulado em 20 kHz com pressão acústica de 383 kPa e 585 kPa em intervalos de 30 s e tempo entre intervalos de aproximadamente

Figura 5.4: Insonação terapêutica por feixe modulado em 20 kHz. (a) Ecos médios adquiridos em sangue líquido (30 s) e sangue coagulado pós-insonação terapêutica (324 min), (b) variação da velocidade de propagação do som ao longo do tempo pelas amostras controle e insonadas e (c) variação da tensão RMS dos ecos ao longo do tempo.

4 s (tempo para salvamento de arquivos .txt dos dados de monitoramento). Na Fig. 5.4(a) são mostradas as médias do primeiro e do último pulso/eco salvos em, respectivamente, 30 s e 324 min. Observa-se a diferença entre as amplitudes e tempos de voo dos sinais. Na Fig. 5.4(b) é mostrada a variação da velocidade de propagação do som pela amostra de sangue para as amostras controle e insonadas por diferentes níveis de pressão acústica. Na Fig. 5.4(c) são mostradas as tensões RMS dos sinais de eco para as mesmas três amostras. Na Fig. 5.4(b) e (c) a linha cinza indica o instante em que a insonação terapêutica foi iniciada (162 min).

Durante a coagulação ocorre o aumento da velocidade de propagação do ultrassom na amostra ao longo do tempo (Fig. 5.4(b)). Conforme discutido no Cap. 2, a variação da densidade aumenta a velocidade de propagação da onda. Dessa

forma, o aumento da velocidade indica o aumento da densidade do sangue durante a coagulação. Além disso, estudos anteriores mostram que durante a formação do coágulo a amostra se torna mais elástica e menos viscosa, propriedades que estão relacionadas à agregação de eritrócitos, redução de hematócritos e formação do coágulo [149]. Isso ocorre porque o módulo de cisalhamento e, portanto, a elasticidade é diretamente proporcional a densidade do coágulo [152]. Ao se iniciar a insonação terapêutica, a velocidade de propagação do ultrassom aumenta rapidamente indicando uma compressão do coágulo. A diminuição da tensão RMS do eco indica uma diminuição da atenuação durante a coagulação e um aumento da atenuação durante a insonação terapêutica (Fig. 5.4(c)). A formação de agregados de eritrócitos devido ao aprisionamento destes na rede de fibrina durante a coagulação altera o sinal retroespalhado de ultrassom e, portanto, sua atenuação. Ao se iniciar a insonação terapêutica, ocorre um salto na energia do pulso/eco com posterior estabilização em um platô. Ao final da insonação a tensão do pulso tende a retornar aos valores iniciais. Contudo, o sinal retroespalhado não sofre alterações significativas, para nenhuma das pressões acústicas testadas, que indiquem tendência de retorno dos valores para os encontrados inicialmente em sangue líquido. Portanto, não há quebra evidente do coágulo.

Foram realizadas também aquisições durante a insonação por feixe monofrequencial de mesma frequência (2,7 MHz) utilizando os mesmos transdutores (Fig. 5.5). As variações desses parâmetros são equiparáveis aos obtidos com o feixe modulado com mesmas pressões indicando que não houve efeito adicional da modulação de 20 kHz da insonação anterior. As diferenças são atribuídas às variações nas amostras de sangue.

Por fim, avaliou-se nesta mesma montagem experimental o efeito trombolítico do ultrassom monofrequencial com pressão acústica de 1 MPa. Na Fig. 5.6(a) e(b) são mostradas as curvas obtidas para variação de velocidade e de tensão dos ecos. Para essa faixa de pressão houve a ablação do coágulo indicada pela variação súbita dos parâmetros monitorados. A tendência de aumento de velocidade do coágulo durante a insonação indica um grande aumento da densidade. De fato, houve o enrijecimento do coágulo que é mostrado na Fig. 5.6(c).

Figura 5.5: Insonação terapêutica por feixe monofrequencial de 2,7 MHz. (a) Variação da velocidade de propagação do som ao longo do tempo pelas amostras controle e insonadas e (b) variação da tensão RMS dos ecos ao longo do tempo.

(c)

Figura 5.6: Insonação terapêutica por feixe monofrequencial de 2,7 MHz e 1 MPa. (a) Variação da velocidade de propagação do som ao longo do tempo pelas amostras controle e insonadas e (b) variação da tensão RMS dos ecos ao longo do tempo e (c) fotografia do coágulo enrijecido pós-insonação.

Figura 5.7: Pulso de ultrassom transmitido em água (caminho livre) e através de uma cubeta de acrílico preenchida com água. Os transdutores de excitação e de recepção estavam afastados de 10 cm. Estes sinais foram utilizados para compensar a diferença de velocidade na leitura com amostras de sangue, devido à parede de acrílico da cubeta.

Sonotrombólise por feixe focalizado de alta intensidade

Na Fig. 5.7 são mostrados os sinais das ondas de ultrassom transmitidas através da água e através da cubeta de acrílico preenchida com água. A partir desses sinais foram medidos os tempos de transmissão entre os transdutores posicionados a 10 cm de distância e, com isso, obteve-se a velocidade de propagação do acrílico. Estes sinais foram utilizados para compensar o aumento de velocidade causada pelas paredes da cubeta nas medições com sangue líquido e coagulado. O sangue líquido apresentou uma velocidade de 1542 ± 5 m/s. Este valor está próximo dos resultados reportados para células de sangue (1627 m/s) e plasma sanguíneo (1543 m/s) [89, 148].

Para esta montagem, não foi observado aumento da velocidade de propagação do som pelo coágulo durante uma insonação de 60 min utilizando feixe focalizado de 1,30 MPa (Fig. 5.8(a)). Aumentando-se a pressão do ultrassom para 2,16 MPa ocorre um rápido aumento da velocidade de propagação do som, mas que se mantém no mesmo nível durante a insonação de 12 min com essa pressão. Por fim, ativou-se o outro elemento do transdutor, gerando um duplo feixe com diferença de frequência de 3 Hz e pressão total de 2,20 MPa por outros 12 min de duração. Para essa combinação houve também um aumento súbito da velocidade com posterior estabilização da velocidade. Não houve variação significativa da atenuação. A oscilação nos sinais ocorreu devido às variações geradas pelo amplificador de potência

Figura 5.8: (a) Variação da velocidade do som do coágulo durante aplicação de ultrassom. (b) Fotografia do coágulo pós-insonação por feixe de ultrassom focalizado de 3,16 MHz com pressões na faixa de MPa.

utilizado com o transdutor terapêutico. Para nenhuma das combinações testadas nesta montagem houve a tendência de diminuição da velocidade. Pelo contrário, a ablação do coágulo conforme observado nos testes com modulação de frequência de insonação aumentou a velocidade de propagação das amostras. Na Fig. 5.8(b) é mostrada a região em que o foco do transdutor enrijeceu o coágulo.

Avaliação do produto de degradação de fibrina por espectroscopia UV-vis

Em um primeiro teste utilizando a espectroscopia UV-vis foi possível verificar variações na absorbância da amostra durante a coagulação realizando-se leituras de 30 em 30 segundos durante 20 minutos. Na Fig. 5.9 é mostrada a absorbância para dois comprimentos de ondas (556 e 590 nm) em que se observou os efeitos da coagulação em 7 min. A região do coágulo se tornou esbranquiçada conforme observado na Fig. 5.3.

Na Fig. 5.10(a) são apresentados os espectros do sangue líquido, do sangue coagulado e do coágulo pós-insonação por feixe focalizado de 3,16 MHz. Os espectros de absorção ótica indicam o espectro característico da oxihemoglobina [158]. Observa-se uma variação na amplitude do sinal em 345 nm (Fig. 5.10(a)) e um pequeno pico em 630 nm para o coágulo pós-insonação (Fig. 5.10(b)). O pico em 630 nm indica o surgimento de um componente no sobrenadante pós-insonação. Mais testes são necessários para se determinar o tipo de fragmento que está sendo

Figura 5.9: Curvas obtidas pela espectroscopia UV-vis indicando uma fase da coagulação do sangue após adição de cloreto de cálcio.

indicado por este pico. Nestas amostras, foram observadas fragmentações do coágulo durante a insonação que foram gravadas em um vídeo¹. Alguns quadros do vídeo são mostrados na Fig. 5.10(c). A cubeta com a amostra de coágulo diluída em PBS foi colocada no foco do transdutor à 6,7 cm. A insonação foi realizada em modo contínuo com frequência de 3,16 MHz e amplitude de pressão de 2,2 MPa. Nestas imagens fica evidente a atuação da força de radiação acústica na fragmentação do coágulo. Os testes com espectroscopia UV-VIS se mostraram úteis para avaliar o aparecimento de substâncias no sobrenadante das amostras. Ainda que este estudo apresente limitações devido à necessidade de dissolução da amostra em PBS (do contrário a absorção ótica bloqueia a passagem de luz por completo), pode-se tirar conclusões sobre a degradação de fibrina devido a atuação do ultrassom.

5.4 Conclusão

Nos ensaios apresentados neste capítulo foram utilizadas duas metodologias de insonação para obtenção de feixes multifrequenciais de ultrassom. A modulação AM foi utilizada para insonação do coágulo como um todo, simulando coágulos totalmente imersos na região focal de ultrassom focalizado. Na segunda metodologia, avaliou-se mudanças nas propriedades de coágulos insonados por duplo feixe de ultrassom com feixes altamente focalizados e com pressões mais elevadas. A

¹Link para vídeo de sonotrombólise de coágulo diluído em solução tampão: <https://youtu.be/GcfqLITHgrk> (disponibilizado em 27/11/2015).

Figura 5.10: (a) Espectros de absorção de sangue, sangue coagulado e sangue coagulado pós insonação por ultrassom de 3 MHz e 2,2 MPa, (b) Pico em 630 nm aparecendo pós-insonação por 1h e (c) quadros do vídeo mostrando a fragmentação do coágulo diluído em solução tampão (PBS) durante a insonação por feixe focalizado.

incidência do feixe ultrassônico sobre coágulos não causou a reversão dos parâmetros acústicos, aproximando-os dos encontrados para sangue líquido. O aumento da velocidade observado durante a insonação indica a compressão do coágulo pela força de radiação acústica e que não apresentou diferenças significativas quando utilizados feixes multifrequenciais. Quando utilizadas pressões da ordem de MPa houve o enrijecimento dos coágulos por ablação. Este efeito é indesejado durante a sonotrombólise pela possibilidade de gerar fragmentos rígidos que podem ocluir ramificações vasculares, causar danos à parede endotelial e, ainda, dificultar a dissolução do coágulo pelo medicamento fibrinolítico. Contudo, em coágulos diluídos, foi observado através de técnicas óticas, que a força de radiação acústica pôde fragmentar a rede de fibrina do coágulo. Os parâmetros acústicos ou

combinação de microbolhas e medicamento devem ser melhor estudados para potencializar este efeito e torná-lo quantificável em coágulo integral. Além disso, as altas pressões necessárias para se observar os efeitos reportados neste capítulo, levantam alertas sobre os riscos sobre danos da BHE. Dessa forma, no próximo capítulo (Cap. 6) foi investigado o limiar de pressão acústica para abertura da BHE em camundongos e dos possíveis riscos do ultrassom focalizado sobre o tecido cerebral.

SEGURANÇA DO MÉTODO

6.1 Introdução

A sonotrombólise tem como foco de aplicação o tratamento de AVC isquêmico. A segurança do método é de fundamental importância para a viabilização da técnica, principalmente, para evitar que um AVC isquêmico evolua para um AVC hemorrágico, conforme reportado em estudo anterior [7].

Estudos *in vitro* mostram que a combinação de medicamento fibrinolítico com a cavitação de microbolhas excitadas por ultrassom produz trombólise mais eficazmente [27]. O regime de cavitação que ocorre maior degradação do coágulo é o inercial [61]. A excitação bifrequencial mostrou-se capaz de diminuir o limiar de intensidade acústica para geração de cavitação inercial [65, 66]. Contudo, a cavitação por microbolhas injetadas na circulação sanguínea traz consigo outro efeito que é indesejado no procedimento de sonotrombólise - a abertura da BHE. Na técnica conhecida por abertura da BHE mediada por ultrassom [5], a oscilação de microbolhas em regime estável é capaz de abrir transiente e localmente a BHE, permitindo a passagem de moléculas de medicamentos antes bloqueadas pela barreira. Os potenciais mecanismos envolvidos nesta técnica estão associados à movimentação e a oscilação em tamanho das microbolhas gerando microjatos e

Figura 6.1: Potenciais mecanismos da abertura da BHE mediada por ultrassom.

pequenos deslocamentos da parede endotelial (Fig. 6.1). Contudo, este efeito parece ser uma consequência perigosa da aplicação de microbolhas e ultrassom em pacientes com quadro de AVCI. De fato, estudos anteriores revelaram a evolução de AVCI para hemorrágicos [7] quando pacientes foram expostos a pressões acústicas superiores ao limiar de cavitação inercial, o que pode estar associados à abertura da BHE [8].

Em simulações computacionais conduzidas sobre dados do estudo de Daffertshofer *et al.*, 2005 [7], mostrou-se que os parâmetros acústicos utilizados geraram campos de pressão suficientes para causar cavitação inercial sobre o tecido [64]. Além disso, o uso de baixa frequência (300 kHz) facilitou a formação de ondas estacionárias. Uma das possíveis razões para a evolução de AVC's isquêmicos para hemorrágicos observados nesse estudo, foi a abertura da BHE [8]. Essas complicações acabaram por forçar os pesquisadores a interromper o estudo prematuramente.

Dessa forma, a viabilização da sonotrombólise deve levar em conta aspectos de segurança antes de permitir estudos em humanos novamente. Esta preocupação de fato fez surgir muitos estudos *in vitro* nos últimos anos, mas que pouco permitem concluir a respeito da segurança dos métodos, principalmente em relação à abertura da BHE. Além da abertura da BHE, a ablação é outro efeito que se deve levar em

consideração em sonotrombólise com feixes de alta intensidade (Tab. 2.1). Modelos animais são necessários para definir parâmetros acústicos seguros para o estudo de sonotrombólise.

Neste estudo, realizou-se uma avaliação *in vivo* sobre o limiar para causar a abertura da BHE de camundongos utilizando a excitação multifrequencial.

6.2 Materiais e métodos

Estudo *in vivo*

O preparo dos animais e protocolo de insonação seguiram o mesmo procedimento descrito na Seção 4.2.3 (mais detalhes no Apêndice D). Conforme estudado no Cap. 4, dois métodos podem ser utilizados para excitação multifrequencial. A codificação de pulsos de excitação por chirp e por variação de frequência aleatória permite a geração de regiões focais mais definidas e suprime a formação de ondas estacionárias. O duplo feixe mostrou-se capaz de reduzir a formação de ondas estacionárias, porém a contribuição da baixa frequência é desprezível em termos de geração de força de radiação acústica. Assim, neste capítulo avaliou-se o limiar da codificação de pulsos por chirp.

As insonações foram realizadas na região do putâmen em profundidade igual a 3 mm (dorsal/ventral). Nesta metodologia, insonações no hemisfério esquerdo, tem coordenadas estereotáticas AP = 6,0 mm e ML = -2,0 mm e hemisfério direito, AP = 6,0 mm e ML = +2,0 mm em relação a Lambda (Fig. 6.2(a)).

Imagens por ressonância magnética

A abertura da BHE foi avaliada pelo extravasamento de gadolínio (287 mg/mL, OmniscanTM Novaplan, Novation LLC, TX, EUA) no tecido cerebral através de imagens de ressonância magnética. O contraste foi injetado intraperitonealmente (IP) nos animais imediatamente após a insonação. Imagens de 320 por 320 pixels, resolução espacial de 80 μ m, espessura entre imagens de 400 μ m foram geradas em sequências ponderadas em 2-D FLASH T1 30 min após insonação usando um equipamento de ressonância de 9,4-T (DRX400, Bruker BioSpin, Boston, MA, EUA). Além disso, imagens ponderadas em T2, sem uso de contraste foram

adquiridas no dia seguinte à insonação para se avaliar possíveis danos ao encéfalo com formação de edema.

Tempo de administração de microbolhas

As microbolhas foram administradas via injeção endovenosa no rabo do animal imediatamente antes da insonação. Avaliou-se então por imagens de RM com agente de contraste, se existia diferença na abertura da BHE com tempos de injeção de microbolhas variando entre 0 e 60 s de insonação. Este tempo é suficiente para permitir a insonação dos dois hemisférios, sendo 30 s de insonação e mais 30 s para mover o transdutor e iniciar a segunda insonação. Para tanto, realizou-se uma insonação primeiro no hemisfério esquerdo (AP=6,0 mm; ML=-2,0 mm; DV=3 mm) no instante $t = 0$ s da administração de microbolhas e outra insonação do lado direito (AP=6,0 mm; ML=+2,0 mm; DV=3 mm) no mesmo animal no instante $t = 60$ s da administração de microbolhas (Fig. 6.2(a)). Para este teste os parâmetros acústicos escolhidos foram baseados em estudos anteriores do *Ultrasound Elasticity Imaging Laboratory*, sendo eles: duração de 30 s, pulsado, 1,5 MHz, 10.000 ciclos, 0,56 MPa com taxa de repetição de 5 Hz.

Avaliação do limiar para abertura da BHE

Em seguida, avaliou-se o tempo de insonação e a pressão limiar para abrir a BHE utilizando o método chirp em modo contínuo ($f=1,5-1,9$ MHz). Para tanto, o ultrassom foi focalizado nas seguintes regiões mostradas na Fig. 6.2(b), variando-se o tempo de insonação entre 15 e 60 s e a pressão acústica entre 0,34 e 0,67 MPa.

6.3 Resultados e discussões

Tempo de administração de microbolhas

As regiões de maior brilho na imagem de RM ponderada em T1 (Fig. 6.3) mostram onde houve extravasamento de gadolínio no parênquima cerebral. O extravasamento de gadolínio indica que houve abertura da BHE através das insonações realizadas nos dois hemisférios do animal após uma única administração endovenosa de microbolhas. O tempo entre insonações foi de 60 s o que

Figura 6.2: Representação das localizações dos pontos de insonação dadas pelas coordenadas estereotáxicas: (a) Anterior/Posterior (AP)=6,0 mm; Medial/Lateral (ML)= ± 2 mm; Dorsal/Ventral (DV)=3 mm e (b) AV=6,5 mm e 3,5 mm; ML= ± 2 mm; Dorsal/Ventral=3 mm.

Figura 6.3: Aberturas da BHE obtidas para insonações a 0 s e 60 s após administração de microbolhas.

não apresentou diferenças significativas nas aberturas. Portanto, insonações no intervalo de 1 min após administração de microbolhas apresentam abertura da BHE equivalentes. Os testes seguintes seguiram com insonações realizadas após aplicações de microbolhas (< 5 s).

Avaliação do limiar para abertura da BHE

Na Fig. 6.4(a) é mostrada uma imagem transversal ponderada em T1 indicando aberturas para todas as combinações de tempo de exposição e pressões acústicas. As aberturas obtidas nas regiões AP=3,5 mm; ML= ± 2 mm; DV=3 mm

Figura 6.4: (a) Imagem de RM ponderada em T1 mostrando o extravasamento de gadolínio para 0,67 MPa por 15 s de insonação (1), 0,67 MPa por 45 s de insonação (2), 0,52 MPa por 60 s de insonação (3) e 0,67 MPa por 60 s de insonação (4). (b) Imagem de RM ponderada em T2 adquirida 24 h após o experimento e (c) fotografia de corte coronal do encéfalo do animal fixado em parafina mostrando hemorragia na região de insonação AP=3,5 mm, ML= ± 2 mm.

apresentam brilho muito superiores aos encontrados para as insonações das regiões AP=6,5 mm; ML= ± 2 mm; DV=3 mm. A imagem de RM ponderada em T2 adquirida 24 h após a insonação, mostra a formação de edema nas regiões 2, 3 e 4 indicadas na Fig. 6.4(b). O encéfalo do animal foi fixado em parafina e fatiado em busca de hemorragias. Na Fig. 6.4(c) são mostradas lesões no parênquima indicando pontos de hemorragia. Assim, conclui-se que a pressão de 0,67 MPa com tempo de insonação superior a 45 s provoca lesões graves ao tecido cerebral. A pressão de 0,52 MPa abriu uma região bem definida da barreira, mas causou uma pequena região de edema.

Em seguida, avaliou-se diferentes níveis de pressão inferiores a 0,52 MPa para um tempo de insonação igual a 60 s. Na Fig. 6.5(a) é indicada a abertura da BHE obtida para insonações utilizando chirp para 0,34 MPa (AP=6,5 mm; ML= -2 mm), 0,52 MPa (AP=6,5 mm; ML= +2 mm), 0,40 MPa (AP=3,5 mm; ML= -2 mm) e 0,46 MPa (AP=3,5 mm; ML= +2 mm). A insonação com pulso de excitação com variação aleatória de frequências apresentou resultados similares aos do chirp mostrados na Fig. 6.5(b). Somente insonações superiores a 0,40 MPa causaram a abertura da BHE.

Na Fig. 6.6 são mostradas as aberturas atingidas pela insonação regular e

Figura 6.5: Abertura da BHE obtida por insonação: (a) chirp para 0,34 MPa (1), 0,40 MPa (2), 0,46 MPa (4) e 0,52 MPa (3); e (b) variação aleatória de frequência para 0,34 MPa (5), 0,40 MPa (7), 0,46 MPa (8) e 0,52 MPa (6).

chirp. Na insonação regular houve uma abertura mais abrangente em comparação à abertura obtida pelo chirp. A região mais confinada obtida pelo chirp se dá pela supressão de ondas estacionárias e maior capacidade de focalização do método, conforme discutido no Cap. 4.

Na Fig. 6.7 são mostradas imagens representativas de histologia do encéfalo de camundongo utilizando corante H&E adquiridas após 7 dias da insonação por pulso de variação de frequência aleatória (descrição do método no Apêndice E). A imagem apresenta neurônios com coloração mais escura, conhecidos pelo termo em inglês *dark neurons*. Neurônios nessas condições indicam que sofreram danos e que estão em processo de morte celular [159].

Dessa forma, pode-se concluir que a aplicação de microbolhas seguidas de insonações superiores a 30 s e pressões superiores a 0,52 MPa causam a abertura da BHE. Pressões da ordem de 0,67 MPa causaram danos ao parênquima cerebral com focos de hemorragia. Mesmo pressões inferiores de 0,52 MPa aplicadas por 30 s causaram pequenos danos ao parênquima cerebral.

Figura 6.6: *Imagens (a) transversal e (b) coronal de RM ponderada em T1 indicando abertura da BHE obtida por insonação regular (à esquerda) e por método de codificação de pulso de excitação por chirp (à direita) com 0,52 MPa por 30 s.*

Figura 6.7: *Imagens histológicas com corante H&E. Nas Fig.(a) e (b) são mostrados exemplos de pequenos danos (dark neurons) ao tecido cerebral de dois camundongos causados pela insonação por pulso com variação de frequência aleatória.*

6.4 Conclusão

Estudos *in vitro* com sonotrombólise, apresentam bons resultados com a recanalização de artérias quando utilizadas microbolhas de contraste de ultrassom e pressões na faixa de 0,15 - 1,00 MPa [27]. Contudo, no estudo descrito neste capítulo verificou-se que há a quebra de BHE com a exposição de artérias a campos acústicos de 0,52 MPa com duração muito inferiores aos observados em sonotrombólise (30 s). Ou seja, conforme apontado por Reinhard *et al.* 2006 [8], casos de hemorragias reportados em estudos de sonotrombólise podem ter sido causados pela quebra inadvertida de BHE. Esta constatação poderia simplesmente tornar a técnica de sonotrombólise inviável, uma vez que os danos à parede arterial poderiam ocorrer para a mesma faixa de pressão acústica necessária para dissolver o coágulo. De fato, outras técnicas tem sido apresentadas para superar essa dificuldade, como por exemplo a microtripsia [30] que busca restringir o foco do ultrassom no interior de artérias através do uso de ultrassom com pulsos muito curtos (<2 ciclos). Aqui, idealizamos o uso do duplo feixe combinados com métodos de codificação de pulso para atingir maior resolução espacial. Além disso, o método de detecção de cavitação permite monitorar não-invasivamente se há cavitação durante a exposição do tecido biológico e coágulo ao ultrassom. A cavitação pode ser quantificada por pulsos refletidos revelando regiões hiperecóticas dinâmicas (em modo-B) ou sinais com componentes harmônicas (análise espectral do eco). Esse método pode alertar sobre os padrões de cavitação estável ou inercial e podem ser utilizados durante o procedimento de sonotrombólise para se definir os níveis de segurança do método.

NEUROMODULAÇÃO *in vivo* POR ULTRASSOM

Como visto nos Cap. 4 e 6, a cavitação de microbolhas induzida pela excitação ultrassônica é capaz de romper a BHE, sendo uma possível causa das hemorragias encontradas em estudo clínico anterior [7]. A faixa de pressão necessária para induzir a abertura da BHE é da mesma ordem de grandeza da pressão necessária para sonotrombólise (Cap. 2). Estudos recentes tem demonstrado ainda que as mesmas faixas de frequência e de pressão em que são observados esses efeitos podem produzir também o efeito de neuromodulação. Dessa forma, neste capítulo explorou-se o efeito de neuromodulação em camundongos pela excitação ultrassônica sem microbolhas.

7.1 Introdução

A capacidade do ultrassom em induzir atividade neuronal foi demonstrada em fatias de hipocampo de camundongos em cultura [11]. A conformação estrutural dos canais de íons pode ser alterada pelo ultrassom, modulando a abertura dos canais e a capacitância da membrana [13] (Fig. 7.1). Este efeito pode estar relacionado com canais iônicos mecanico-sensíveis [160]. Outra teoria aponta ainda para um possível efeito de cavitação causado pelo ultrassom dentro da bicamada da membrana do neurônio, que por sua vez, também altera a capacitância da membrana

modulando a atividade neuronal [161]. A técnica de neuromodulação por ultrassom tem ganhado muita atenção na comunidade científica devido sua capacidade de superar limitações das atuais técnicas tais como a necessidade de implantação de eletrodos da estimulação profunda (em inglês *Deep Brain Stimulation - DBS*), a baixa resolução espacial e pouca penetração da estimulação magnética transcraniana (em inglês *Transcranial Magnetic Stimulation - TMS*) e a necessidade de modificação genética necessária à optogenética [162, 163].

O uso do ultrassom focalizado com frequências menores que 690 kHz pode modular - suprimir ou estimular - partes específicas do cérebro tais como córtex motor, somatosensorial e visual, causando a ativação bilateral muscular [164, 165, 83, 166, 167]. Além disso, experimentos com macacos mostraram a capacidade do ultrassom em modular o comportamento cognitivo de alto nível [84]. Contudo, o ultrassom na faixa de kHz usado na maioria desses estudos falharam em demonstrar especificidade funcional da técnica devido ao grande tamanho de foco proporcionado por essa faixa de frequência. Apesar de um estudo ter demonstrado melhora da especificidade anatômica utilizando um foco de 1,5 mm, não obteve-se ativação motora contralateral e ipsilateral consistente [168].

Além da função motora, a resposta da pupila pode ser um bom indicador da ativação neuronal de regiões mais profundas do encéfalo. A avaliação da resposta da pupila à estimulação de luz é utilizada para a detecção de disfunção do nervo, avaliação da integridade do tronco cerebral e funções autônomas. Contudo, a pupilometria também pode ser usada para avaliar atividades cognitivas. Os músculos dilatadores do esfíncter da íris estão diretamente inervados por regiões cerebrais associadas ao processamento cognitivo e emocional [169]. A dilatação da pupila está associada a atividade mental [170, 171], excitação sexual [172, 173], dor [174, 175], ansiedade e danos causados por drogas [176].

Neste estudo, foi realizada a neuromodulação induzida por ultrassom a fim de se explorar regiões motoras e cognitivas do encéfalo de camundongos. Teve-se o objetivo de se confirmar a alta especificidade anatômica do método modulando-se a região cortical motora e de se confirmar a possibilidade de se modular estruturas mais profundas do encéfalo. A pupila foi monitorada como indicativo de variações cognitivas moduladas por ultrassom.

Figura 7.1: Potenciais mecanismos de ação de ondas ultrassônicas sobre canais iônicos em neurônios provocando modulação. (a) Força de radiação acústica provocando deformações mecânicas na membrana (modificado de Tyler, 2012 [13]) e (b) cavitação dentro da bicamada da membrana de neurônios (modificado de Plaksin et al., 2014 [161]). Ambos efeitos podem potencialmente alterar a capacitância da membrana alterando o potencial de ação do neurônio provocando seu disparo.

7.2 Materiais e métodos

Os experimentos foram realizados em camundongos C57BL-6 anestesiados com injeção intraperitoneal de sódio pentobarbital (65 mg/kg). Depois da injeção, os animais permaneceram na gaiola por um período de 20 a 30 min para aguardar o efeito da anestesia. O nível da anestesia foi avaliado através de reflexos das patas e monitoramento dos sinais vitais. Os animais tiveram a cabeça e o pescoço depilados e foram posicionados em um sistema estereotáxico (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, EUA) usando barras fixadoras de ouvido e de boca. Os animais foram mantidos sobre oxigênio a 0,8 L/min. O monitor de sinais vitais (MouseOx Plus, Starr Life Sciences Corp., Torrington, Connecticut, EUA) foi posicionado em torno do pescoço dos animais para medir os batimentos cardíacos e taxa respiratória antes e durante os experimentos (procedimento similar ao descrito no Apêndice D com exceção ao tipo de anestesia utilizada).

Um transdutor monoelemento focalizado foi energizado por um gerador de função (33220A, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) utilizando um amplificador de potência de 50 dB (ENI Inc., Rochester, NY, EUA). As insonações foram realizadas com frequência 1,9 MHz, 50% duty cycle, frequência de repetição de 1 kHz, duração de insonação de 1 s, intervalo interestímulos de 1 s, repetidos 10 vezes para cada região insonada. O transdutor foi fixado a um sistema de posicionamento 3D (VXM, Velmex Inc., Lachine, QC, Canadá) e movido aleatoriamente dentro de uma matriz de 8 por 8 mm com resolução de 1 mm. O centro da matriz foi posicionado nas coordenadas estereotáticas anterior/posterior (AP)= -2 mm e medial/lateral (ML)=0 mm com referência à Lambda (método de posicionamento descrito no Apêndice D).

Os sinais vitais foram gravados durante a insonação usando um sistema de aquisição (MP150, Biopac Systems Inc., Santa Barbara, CA, EUA) sincronizado com o gerador de função utilizado para energizar o transdutor focalizado. Os movimentos evocados pela modulação ultrassônica foram gravados em vídeos por câmeras focando a traseira do animal (EOS Rebel T3i, Canon, Melville, NY, EUA). A dilatação da pupila foi gravada por uma câmera de alta resolução (DMK 23U618, The Imaging Source, Bremen, Alemanha) posicionada ao lado do animal focando

Figura 7.2: *Montagem experimental para realização da neuromodulação por ultrassom.*

seu olho direito (Fig. 7.2). A atividade muscular foi medida por um sistema de eletromiografia (EMG) (BN-EMG2, Biopac Systems Inc., Santa Barbara, CA, EUA) com eletrodos de 26-gauges posicionados no bíceps femoral em ambas as pernas traseiras, com o eletrodo terra posicionado no rabo da animal. Todos os métodos foram aprovados pelo comitê de ética em pesquisa da Columbia University.

7.3 Resultados e discussões

Os animais permaneceram devidamente anestesiados e não-sensíveis aos testes de reflexo das patas durante toda a insonação. O experimento foi iniciado quando as taxas cardíaca e respiratória atingiram valores menores que 200 batimentos/min (bpm) e 70 respirações/min (rpm), respectivamente. Durante a insonação as respectivas taxas permaneceram abaixo de 400 bpm e 120 rpm. O efeito da anestesia durou aproximadamente 90 min permitindo um tempo suficiente para percorrer toda a matriz espacial para exploração. Devido a variabilidade do nível de anestesia entre animais, alguns apresentaram taxas cardíacas e respiratórias muito baixas. Nestes casos, aproximadamente 30 min após o efeito da anestesia (entre 30 min e 60 min depois da injeção da anestesia), não foram observadas respostas motoras evocadas pelo ultrassom. A partir deste estágio inicial da anestesia, os

primeiros sinais de resposta motora e dilatação da pupila foram observados. O tempo para a realização do experimento durou aproximadamente 60 min depois do primeiro estágio da anestesia.

Foram observadas atividades musculares contralaterais registradas com EMG (Fig. 7.3(a)) quando a neuromodulação por ultrassom foi realizada em AP= +2 mm e ML= ± 2 mm. A pressão mínima para evocar movimentos foi de 1,45 MPa (calibrado usando crânios frescos). Pressões maiores aumentaram a taxa de sucesso de 20% (limiar) para 70% (1,79 MPa). A latência estimada foi de 266 ± 37 ms. Na Fig. 7.3(b) são mostrados quadros do vídeo gravado mostrando movimentos contralaterais. O vídeo¹ mostra o transdutor sendo usado para insonar primeiro o lado esquerdo do cérebro e, imediatamente após, o lado oposto, o que evocou movimentos contralaterais das patas traseiras do animal. Movimentos ipsilaterais foram evocados para insonações realizadas em AP=0 mm e ML= ± 3 mm e gravados no mesmo vídeo. Na continuação do vídeo é mostrado o movimento da cauda do animal, no qual também é registrado o gerador de função ao fundo, mostrando o exato momento em que o ultrassom é aplicado.

Na Fig. 7.4(b) é mostrada a dilatação de até 20% da pupila e movimentos do globo ocular do animal. Um vídeo² registrou a dilatação da pupila e o movimento ocular quando insonada a região AP=0 mm e ML= +2 mm. Um limiar menor para evocar a dilatação da pupila foi observado quando insonações foram realizadas sobre AP=0 mm e ML= ± 2 mm. Limiares maiores foram necessários para AP= -1 mm e ML= $\pm 0,8$ mm.

O foco do ultrassom (zona focal: 8,73 mm de comprimento e 1,02 mm de diâmetro) varreu regiões relacionadas ao controle motor dos olhos e regiões associadas a ansiedade (Fig. 7.4(c)). O colículo superior apresentou menor limiar para evocar dilatação da pupila. Outras regiões associadas a ansiedade tais como hipocampo e locus cereulus apresentaram maior limiar para evocação de dilatação da pupila.

Exames histológicos com H&E revelaram que não houve danos em 5 camundongos insonados com 1,93 MPa em AP= +2 mm e ML= +2 mm e 3,0 MPa

¹Link para vídeo ainda não disponibilizado pelo periódico.

²Link para vídeo ainda não disponibilizado pelo periódico.

Figura 7.3: *Evocação de resposta motora por ultrassom focalizado. (a) EMG da pata traseira direita durante movimento contralateral para diferentes pressões acústicas e (b) movimento contralateral evocado nas coordenadas AP=+2 mm e ML= ±2 mm (com referência a Lambda).*

em AP= +2 mm e ML= -2 mm (Fig. 7.5).

As respostas motoras contralateral e ipsilateral evocadas por ultrassom revelaram a capacidade do ultrassom focalizado em modular regiões específicas do cérebro com milímetros de resolução. Os movimentos do globo ocular e dilatação da pupila revelaram a capacidade do ultrassom focalizado em estimular regiões relacionadas ao controle motor e associadas à ansiedade. A dilatação da pupila foi observada quando insonadas regiões como as regiões límbicas e locus cereulus. O colículo superior apresentou um limiar mais baixo para evocar a dilatação da pupila. O colículo superior conecta-se ao locus cereulus que, por sua vez, está associado às respostas ao estresse e pânico. A dilatação da pupila foi observada com um limiar mais elevado quando insonado o hipocampo (parte do sistema límbico), que é associado a funções como o fluxo de adrenalina, emoção e comportamento. Mais estudos precisam ser realizados para avaliar as propriedades mecanobiológicas dos neurônios e suas relações com a modulação por ultrassom.

Figura 7.4: Dilatação da pupila por neuromodulação por ultrassom. (a) (i) e (ii) mostram o tamanho da pupila antes e depois da insonação de AP=0 mm e ML= +2 mm com 2,1 MPa, (iii) e (iv) mostram a movimentação ocular ocorrida em AP=0 mm e ML= +2 mm com 3,0 MPa. (b) Porcentagem de dilatação da pupila para AP=0 mm e ML= -2 mm e para AP= -1 mm e ML= +0,8 mm. (c) Pontos onde houveram dilatação da pupila e/ou movimento oculomotor.

Figura 7.5: Exame histológico. Seções do encéfalo corados com H&E não mostraram sinais de danos ao tecido cerebral. Regiões insonadas (A) AP= +2 mm e ML= -2 mm, (B) AP= +2 mm e ML= +2 mm. A barra de escala representa 500 μ m e 100 μ m nas imagens maiores e menores, respectivamente.

7.4 Conclusão

A especificidade anatômica e funcional, bem como a penetração alcançada em regiões cerebrais relacionadas ao controle motor e cognitivo demonstram a viabilidade da técnica de neuromodulação por ultrassom focalizado. A possibilidade de utilizar a neuromodulação por ultrassom focalizado para o mapeamento funcional do encéfalo torna esta técnica uma ferramenta importante para auxiliar a compreensão de atividades complexas de rede neural e conexões no encéfalo. Com o mapeamento funcional do encéfalo, o tratamento de várias doenças psiquiátricas e neurológicas podem se tornar mais eficientes do que os tratamentos baseados em mapeamentos anatômicos. O ultrassom focalizado de alta intensidade utilizado para ablação de tecidos, pode se beneficiar da neuromodulação por ultrassom focalizado como uma importante ferramenta de planejamento para ajudar na focalização da região do encéfalo prescrita para tratamento. Além disso, a neuromodulação pode ser usada para facilitar a implementação da técnica de sonotrombólise não-invasiva de maneira a servir como uma técnica para confirmação da região a ser insonada ou, ainda, como técnica para avaliação funcional do tecido cerebral pós-procedimento de sonotrombólise tanto para a avaliação de danos ao tecido cerebral causados pelo procedimento quanto aos danos causados pelo próprio AVC.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

8.1 Conclusões

A capacidade trombolítica da combinação de ultrassom, microbolhas e medicamento fibrinolítico trazem consigo limitações devido aos critérios de uso do medicamento e riscos de danos à BHE pela ação das microbolhas. Neste estudo, foram observados indícios de efeito fibrinolítico pela força de radiação acústica sobre coágulos diluídos sem a presença de fibrinolítico ou microbolhas, o que tornaria mais pacientes elegíveis para o tratamento por sonotrombólise. Contudo, o efeito fibrinolítico não foi observado em coágulos integrais pela insonação mono ou multifrequencial avaliadas neste trabalho. A contribuição de campos de pressão devido às diferenças de frequências na faixa de 20 kHz (mais baixa frequência reportada em estudos anteriores) é desprezível para geração de força de radiação acústica. Com isso, pode-se concluir que o efeito fibrinolítico se deve, principalmente, à força de radiação acústica gerada pelos feixes primários de ultrassom e não pela diferença de frequência. Além disso, para pressões acústicas superiores a 1 MPa observou-se o enrijecimento dos coágulos por ablação. Este efeito pode ser impeditivo para a sonotrombólise, uma vez que, a ablação de coágulos pode gerar fragmentos rígidos que podem, potencialmente, entupir ramificações dos vasos, causar danos à parede endotelial com possível evolução de quadros isquêmicos para hemorrágicos, além de o enrijecimento poder diminuir a eficiência de medicamentos fibrinolíticos sobre esses fragmentos.

Um efeito colateral observado em experimentos *in vivo* com uso de microbolhas foi o rompimento da BHE para limiares de pressão de mesma ordem

para causar efeito de quebra de coágulo. Assim, a alteração da permeabilidade das artérias observadas aqui, pode estar relacionada com hemorragias observadas em estudos clínicos anteriores e levantam sérios riscos para a aplicação da técnica de sonotrombólise *in vivo*.

A técnica de excitação multifrequencial por codificação de pulsos demonstrou ser capaz de distribuir espacialmente os picos de pressão, homogenizando a deposição de energia no encéfalo através da redução de ondas estacionárias.

Outro efeito bastante interessante observado durante a insonação transcraniana *in vivo* foi a modulação de atividade neuronal por ultrassom que tem potencial para o auxílio na confirmação do alvo, verificação de dano funcional ao tecido cerebral pós-procedimento de sonotrombólise ou, ainda, como método com potencial para reabilitação de pacientes pós episódio de AVC.

8.2 Perspectivas

Estudos recentes tem demonstrado melhorias em técnicas de sonotrombólise pela combinação de ultrassom e medicamento fibrinolítico encapsulados em lipossomos marcados. Conforme mostrado aqui, técnicas de codificação de pulso de excitação de ultrassom melhoram a focalização de feixes de ultrassom e controlam melhor a oscilação de microbolhas. Dessa forma, esta técnica abre uma perspectiva para pesquisas que possam melhorar a entrega deste tipo de droga encapsulada.

Além disso, todos os efeitos (ablação, abertura da BHE, neuromodulação) observados neste estudo podem ser explorados isoladamente com importantes aplicações clínicas tais como: mapeamento funcional do encéfalo por neuromodulação, reabilitação por neuromodulação, tratamento de tumores cerebrais, epilepsia, Parkinson, tremor essencial, dor crônica, depressão, Alzheimer, entre outras doenças. Com isso, este trabalho traz novas linhas de pesquisas utilizando ultrassom terapêutico que não estão sendo exploradas no Brasil e que ainda são bastante incipientes mundialmente.

8.3 Lista de trabalhos gerados

Prêmios

- Melhor pôster na área de Física Médica no 2015 XXXVIII Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada (Brazilian Physical Society Meeting), Foz do Iguaçu, PR, Brazil
- Melhor pôster no 2014 Kavli Futures Symposium: The Novel Neurotechnologies, Columbia University NeuroTechnology Center/ Kavli Institute for Brain Science, New York, NY, EUA

Artigos

- KAMIMURA, H.A.S.; WANG, S.; CHEN, H.; WANG, Q.; AURUP, C.; ACOSTA, C.; CARNEIRO, A.A.O.; KONOFAGOU, E.E. Noninvasive ultrasound neurostimulation to stimulate cognitive- and motor-related brain regions, submetido a Brain Stimulation Journal (**em revisão**)
- KAMIMURA, H.A.S.; WANG, S.; WU, S.-S.; KARAKATSANI, M.E.; ACOSTA, C.; CARNEIRO, A.A.O.; KONOFAGOU, E.E. Chirp- and random based coded ultrasonic excitation for localized blood brain barrier opening, Physics in Medicine and Biology, v.60, p. 7695-7712, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1088/0031-9155/60/19/7695>
- KAMIMURA, H.A.S.; WANG, S.; CHEN, H.; WANG, Q.; AURUP, C.; FAN, K.; CARNEIRO, A.A.O.; KONOFAGOU, E.E. Ipsi- and contralateral motor response using ultrasound-induced neurostimulation in deeply anesthetized mice, 2015 International Congress on Ultrasonics, Metz, France, May 10-15, In: Physics Procedia, v.70, p. 1212-1215, 2015, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phpro.2015.08.261>
- MEDEIROS, L.; KAMIMURA, H.A.S.; ALTAFIM, R.A.; CARNEIRO, A.A.O.; AMORIM, M.; ALTAFIM, R.A. Piezoelectret-based hydrophone: an alternative device for vibro-acoustography, Measurement Science and

Technology, v. 26, p. 095102, 2015, DOI: <http://dx.doi.org/10.1088/0957-0233/26/9/095102>

- KAMIMURA, H.A.S.; WANG, L.; CARNEIRO, A.A.O.; KINNICK, R.R.; AN, K.; FATEMI, M. Vibroacoustography for the assessment of total hip arthroplasty, *Clinics*, v.68, p. 463-468, 2013, DOI: [http://dx.doi.org/10.6061/clinics/2013\(04\)05](http://dx.doi.org/10.6061/clinics/2013(04)05)

Congressos internacionais

- KAMIMURA, H.A.S.; WANG, S.; WU, S.-S.; KARAKATSANI, M.E.; ACOSTA, C.; CARNEIRO, A.A.O.; KONOFAGOU, E.E. Improving targeting of ultrasound-mediated blood-brain barrier opening using chirp and random-based modulations, 2015 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS), Taipei, Taiwan October 21-24, DOI: <http://dx.doi.org/10.1109/ULTSYM.2015.0072>
- KAMIMURA, H.A.S.; WANG, S.; CHEN, H.; WANG, Q.; AURUP, C.; ACOSTA, C.; CARNEIRO, A.A.O.; KONOFAGOU, E.E. Pupil dilation and motor response elicitation by ultrasound neurostimulation, 2015 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS), Taipei, Taiwan October 21-24, DOI: <http://dx.doi.org/10.1109/ULTSYM.2015.0070>
- KAMIMURA, H.A.S.; WANG, S.; CARNEIRO, A.A.O.; WANG, Q.; KONOFAGOU, E.E. Computational Simulations for Noninvasive Ultrasound Neurostimulation at the 2014 Kavli Futures Symposium: The Novel Neurotechnologies, Nov. 2014 (prêmio de melhor poster)
- KAMIMURA, H.A.S.; CARNEIRO, A.A.O. Noise reduction in vibro-acoustography using a first order differential hydrophone, In: 2013 International Congress on Ultrasonics, 2013. Proceedings of the 2013 International Congress on Ultrasonics. v. P0118., Singapura, DOI: http://dx.doi.org/10.3850/978-981-07-5938-4_P0118
- KAMIMURA, H.A.S.; PAVAN, T.Z.; CARNEIRO, A.A.O.; PINTO, P.T.C.; NETO, P.M.P. Nonlinear mixing of two ultrasonic beams for transcranial

- sonothrombolysis, In: 2013 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS), 2013, Prague. 2013 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS). p. 2103, DOI: <http://dx.doi.org/10.1109/ULTSYM.2013.0537>
- MEDEIROS, L.J.; BASSO, H.C.; ALTAFIM, R.A.C.; KAMIMURA, H.A.S.; CARNEIRO, A.A.O.; ALTAFIM, R.A.P. Multi-layer piezoelectret hydrophone for ultrasonic applications, In: 2012 IEEE International Ultrasonics Symposium, 2012, Dresden. 2012 IEEE International Ultrasonics Symposium, DOI: <http://dx.doi.org/10.1109/ULTSYM.2012.0629>
 - KAMIMURA, H.A.S.; FAGUNDES, M.A.; FATEMI, M.; CARNEIRO, A.A.O. Vibro-acoustography and B-mode integration for 3D imaging, In: 33rd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC 11), 2011, Boston, USA. Engineering in Medicine and Biology Society, EMBC, 2011 Annual International Conference of the IEEE, 2011. p. 421-424, DOI: <http://dx.doi.org/10.1109/IEMBS.2011.6090055>

Congressos nacionais

- KAMIMURA, H.A.S.; WANG, S.; WU, S.-S.; KARAKATSANI, M.E.; ACOSTA, C.; CARNEIRO, A.A.O.; KONOFAGOU, E.E. Codificação de pulsos para focalização de ultrassom transcraniano. In: VII Simpósio de Instrumentação e Imagens Médicas (SIIM), 2015, Campinas. Anais - SIIM 2015.
- BRAZ, G.A., KAMIMURA, H.A.S BAGGIO, A. GRILLO, F.W; CARNEIRO, A.A.O. Estudo da emissão acústica de meios de diferentes rigidezes excitados por um pulso ultrassônico. In: VII Simpósio de Instrumentação e Imagens Médicas (SIIM), 2015, Campinas. Anais - SIIM 2015.
- SIQUEIRA, R.B.; SAMPAIO, D.R.T.; CHALOUPOKOVA, A.S.K.; KAMIMURA, H.A.S.; NUNES, A.A. Índices de qualidade de imagem para Teleultrassonografia baseado em similaridade estrutural e histograma. In: Simpósio de Instrumentação e Imagens Médicas (SIIM), 2015, Campinas. Anais - SIIM 2015.

- KAMIMURA, H.A.S.; CARNEIRO, A.A.O.; WANG, S.; CHEN, H.; AURUP, C.; FAN, K.; KONOFAOU, E.E. Noninvasive Ultrasound Neurostimulation, in: 2015 Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada, Foz do Iguaçu, Brazil, May 24-28 (prêmio de melhor poster na área de Física Médica)
- BAGGIO, A.L.; KAMIMURA, H.A.S.; LOPES, J.H.; CARNEIRO, A.A.O.; SILVA, G.T. Quantitative Measurements In Vibro-Acoustography. In: XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, 2014, Uberlândia. Anais - CBEB 2014, http://www.canal6.com.br/cbeb/2014/artigos/cbeb2014_submission_734.pdf
- BRAZ, G.A.; KAMIMURA, H.A.S.; CARNEIRO, A.A.O. Estudo da emissão acústica de meios excitados com um pulso ultrassônico. In: Congresso Brasileiro de Física Médica, 18., Simpósio de Instrumentação e Imagens Médicas, 6., São Pedro. Rev. Bras. Fis. Med. (suplementar), 2013. p. P2.18.03.
- KAMIMURA, H.A.S.; GRILLO, F.W.; FAGUNDES, M.A.; ALMEIDA, T.W.J.; CARNEIRO, A.A.O. Diagnóstico de fraturas ósseas utilizando vibroacustografia. In: XXIII Congresso Brasileiro em Engenharia Biomédica, 2012, Porto de Galinhas. Anais - CBEB 2012
- MEDEIROS, L.J.; KAMIMURA, H.A.S.; ALTAFIM, R.A.P.; CARNEIRO, A.A.O.; ALTAFIM, R.A.C. Hidrofone baseado em piezoeletretos para aquisições de imagens por vibroacustografia. In: XXIII Congresso Brasileiro em Engenharia Biomédica, 2012, Porto de Galinhas. Anais - CBEB 2012
- GRILLO, F.W.; KAMIMURA, H.A.S.; LEMOS, T.W.; PAVAN, T.Z.; CARNEIRO, A.A.O. Caracterização de materiais para uso em objeto simulador antropomórfico de encéfalo. In: XXIII Congresso Brasileiro em Engenharia Biomédica, 2012, Porto de Galinhas. Anais - CBEB 2012

Pedidos de patentes

- KAMIMURA, H.A.S.; SIQUEIRA, R.B.; CAMARA, D.J.; ALMEIDA, T.W.J.; CARNEIRO, A.A.O. Dispositivo portátil para análise preditiva de

pressão acústica de transdutores de ultrassom. INPI, 2015

- KAMIMURA, H.A.S.; KONOAGOU, E.E. Invention Report: Noninvasive brain stimulation with ultrasound. General Counsel Columbia Technology Ventures, 2014

Atuação como avaliador de artigos em periódicos:

- 2015 *Measurement Science & Technology*
- 2015 *Journal of Neural Engineering*
- 2013 *IEEE Transactions on Medical Imaging*

REFERÊNCIAS¹

- [1] SAQQUR, M. et al. Site of arterial occlusion identified by transcranial doppler predicts the response to intravenous thrombolysis for stroke. *Stroke*, v. 38, n. 3, p. 948–954, 2007.
- [2] TURI, Z. G. et al. Dose-related efficacy and bleeding complications of double-chain tissue plasminogen activator in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*, v. 71, n. 12, p. 1009–1014, 1993.
- [3] ADEOYE, O. et al. Recombinant tissue-type plasminogen activator use for ischemic stroke in the united states a doubling of treatment rates over the course of 5 years. *Stroke*, v. 42, n. 7, p. 1952–1955, 2011.
- [4] ALEXANDROV, A. Current and future recanalization strategies for acute ischemic stroke. *J Internal Med*, v. 267, n. 2, p. 209–219, 2010.
- [5] HYNYNEN, K. et al. Noninvasive mr imaging-guided focal opening of the blood-brain barrier in rabbits 1. *Radiology*, v. 220, n. 3, p. 640–646, 2001.
- [6] HYNYNEN, K. et al. Focal disruption of the blood-brain barrier due to 260-khz ultrasound bursts: a method for molecular imaging and targeted drug delivery. *J Neurosurgery*, v. 105, n. 3, p. 445–454, 2006.
- [7] DAFFERTSHOFER, M. et al. Transcranial low-frequency ultrasound-mediated thrombolysis in brain ischemia: increased risk of hemorrhage with combined ultrasound and t-pa. *Stroke*, v. 36, n. 7, p. 1441–46, 2005.
- [8] REINHARD, M. et al. Blood-brain barrier disruption by low-frequency ultrasound. *Stroke*, 37, n. 6, p. 1546–1548, 2006.

¹De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

-
- [9] WILHELM-SCHWENKMEZGER, T. et al. Therapeutic application of 20-kHz transcranial ultrasound in an embolic middle cerebral artery occlusion model in rats - Safety concerns. *Stroke*, 38, n. 3, p. 1031–1035, 2007.
- [10] EVERBACH, E. C.; FRANCIS, C. W. Cavitation mechanisms in ultrasound-accelerated thrombolysis at 1 mhz. *Ultrasound Med Biol*, v. 26, n. 7, p. 1153–1160, 2000.
- [11] TYLER, W. J. et al. Remote excitation of neuronal circuits using low-intensity, low-frequency ultrasound. *PLOS One*, v. 3, n. 10, p. e3511, 2008.
- [12] BEYDER, A. et al. Mechanosensitivity of nav1. 5, a voltage-sensitive sodium channel. *J Physiology*, v. 588, n. 24, p. 4969–4985, 2010.
- [13] TYLER, W. J. The mechanobiology of brain function. *Nature Rev Neuroscience*, v. 13, n. 12, p. 867–878, 2012.
- [14] KRASOVITSKI, B. et al. Intramembrane cavitation as a unifying mechanism for ultrasound-induced bioeffects. *Proc Nat Acad Sci*, 2011.
- [15] FRANCO, R. F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. *Medicina (Ribeirao Preto Online)*, v. 34, n. 3/4, 2001.
- [16] COLLEN, D.; LIJNEN, H. Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood*, v. 78, n. 12, p. 3114–3124, 1991.
- [17] WARDLAW, J. M. et al. Recombinant tissue plasminogen activator for acute ischaemic stroke: an updated systematic review and meta-analysis. *The Lancet*, v. 379, n. 9834, p. 2364–2372, 2012.
- [18] FLINT, A. C. et al. Mechanical thrombectomy of intracranial internal carotid occlusion - Pooled results of the MERCI and multi MERCI part I trials. *Stroke*, 38, n. 4, p. 1274–1280, 2007.
- [19] PERLER, B. Thrombolytic therapies: the current state of affairs. *J Endovascular Ther*, v. 12, n. 2, p. 224–232, 2005.

-
- [20] GO, A. et al. Heart disease and stroke statistics 2013 update. *Circulation*, v. 127, n. 1, p. e1–e240, 2013.
- [21] BADER, K. B.; BOUCHOUX, G.; HOLLAND, C. K. Sonothrombolysis. In: ESCOFFRE, J.-M.; BOUAKAZ, A. (Ed.). *Therapeutic Ultrasound*. [S.l.]: Springer Int Pub, 2016, (Advances in Experimental Med and Biology, v. 880). p. 339–362.
- [22] HÖLSCHER, T. et al. In vitro sonothrombolysis with duplex ultrasound: first results using a simplified model. *Cerebrovascular Dis*, v. 28, n. 4, p. 365–370, 2009.
- [23] SAKHAROV, D. V.; HEKKENBERG, R. T.; RIJKEN, D. C. Acceleration of fibrinolysis by high-frequency ultrasound: the contribution of acoustic streaming and temperature rise. *Thrombosis Research*, v. 100, n. 4, p. 333–340, 2000.
- [24] LAUER, C. et al. Effect of ultrasound on tissue-type plasminogen activator-induced thrombolysis. *Circulation*, v. 86, n. 4, p. 1257–1264, 1992.
- [25] FRANCIS, C. et al. Ultrasound accelerates transport of rt-pa into clots. *Ultrasound Med Biol*, v. 21, n. 3, p. 419–424, 1995.
- [26] CINTAS, P.; TRAON, A. P. L.; LARRUE, V. High rate of recanalization of middle cerebral artery occlusion during 2-mhz transcranial color-coded doppler continuous monitoring without thrombolytic drug. *Stroke*, v. 33, n. 2, p. 626–628, 2002.
- [27] PETIT, B. et al. In vitro sonothrombolysis of human blood clots with br38 microbubbles. *Ultrasound Med Biol*, v. 38, n. 7, p. 1222–1233, 2012.
- [28] CHEN, X. et al. New insights into mechanisms of sonothrombolysis using ultra-high-speed imaging. *Ultrasound Med Biol*, v. 40, n. 1, p. 258 – 262, 2014.
- [29] MAXWELL, A. et al. Noninvasive thrombolysis using pulsed ultrasound cavitation therapy-histotripsy. *Ultrasound Med Biol*, v. 35, n. 12, p. 1982–94, 2009.

- [30] ZHANG, X. et al. Noninvasive thrombolysis using histotripsy beyond the intrinsic threshold (microtripsy). *IEEE Trans Ultrason Ferroelect Freq Control*, v. 62, n. 7, p. 1342–1355, 2015.
- [31] ROSENSCHEIN, U. et al. Ultrasound imaging-guided noninvasive ultrasound thrombolysis preclinical results. *Circulation*, v. 102, n. 2, p. 238–245, 2000.
- [32] STONE, M. J. et al. Pulsed-high intensity focused ultrasound enhanced tPA mediated thrombolysis in a novel in vivo clot model, a pilot study. *Thrombosis Research*, 121, n. 2, p. 193–202, 2007.
- [33] HOLSCHER, T. et al. Transcranial Clot Lysis Using High Intensity Focused Ultrasound. In: Hynynen, K and Souquet, J (Ed.). *9th Int Symp Therap Ultrasound*. [S.l.]: Am Inst Physics, 2010. (AIP Conf Proc, 1215), p. 23–6.
- [34] NEDELMANN, M. et al. Ultrasound-induced blood clot dissolution without a thrombolytic drug is more effective with lower frequencies. *Cerebrovascular Diseases*, v. 20, n. 1, p. 18–22, 2005.
- [35] WANG, Z. et al. In vitro evaluation of dual mode ultrasonic thrombolysis method for transcranial application with an occlusive thrombosis model. *Ultrasound Med Biol*, v. 34, n. 1, p. 96 – 102, 2008.
- [36] ALEXANDROV, A. V. et al. Ultrasound-enhanced systemic thrombolysis for acute ischemic stroke. *New Engl J Med*, v. 351, n. 21, p. 2170–2178, 2004.
- [37] BLINC, A. et al. Characterization of ultrasound-potentiated fibrinolysis in vitro. *Blood*, v. 81, n. 10, p. 2636, 1993.
- [38] HARPAZ, D. et al. Ultrasound enhancement of thrombolysis and reperfusion in vitro. *J Am College Cardiol*, v. 21, n. 6, p. 1507–1511, 1993.
- [39] TACHIBANA, K.; TACHIBANA, S. Albumin microbubble echo-contrast material as an enhancer for ultrasound accelerated thrombolysis. *Circulation*, v. 92, n. 5, p. 1148–1150, 1995.
- [40] SUCHKOVA, V. et al. Enhancement of fibrinolysis with 40-khz ultrasound. *Circulation*, v. 98, n. 10, p. 1030–1035, 1998.

-
- [41] BEHRENS, S. et al. Low-frequency low-intensity ultrasound accelerates thrombolysis through the skull. *Ultrasound Med Biol*, v. 25, n. 2, p. 269–73, 1999.
- [42] SPENGOS, K. et al. Acceleration of thrombolysis with ultrasound through the cranium in a flow model. *Ultrasound Med Biol*, 26, n. 5, p. 889–895, 2000.
- [43] SIEGEL, R. et al. Noninvasive transcutaneous low frequency ultrasound enhances thrombolysis in peripheral and coronary arteries. *Echocardiography*, v. 18, n. 3, p. 247–257, 2001.
- [44] SUCHKOVA, V.; CARSTENSEN, E. L.; FRANCIS, C. W. Ultrasound enhancement of fibrinolysis at frequencies of 27 to 100 khz. *Ultrasound Med Biol*, v. 28, n. 3, p. 377 – 382, 2002.
- [45] SOLTANI, A. Application of cavitation promoting surfaces in management of acute ischemic stroke. *Ultrasonics*, v. 53, n. 2, p. 580– 587, 2013.
- [46] PORTER, T. et al. Thrombolytic enhancement with perfluorocarbon-exposed sonicated dextrose albumin microbubbles. *Am Heart J*, v. 132, n. 5, p. 964–8, 1996.
- [47] PORTER, T. R. et al. Effectiveness of transcranial and transthoracic ultrasound and microbubbles in dissolving intravascular thrombi. *J Ultrasound Med*, v. 20, n. 12, p. 1313–1325, 2001.
- [48] CULP, W. C. et al. Intracranial clot lysis with intravenous microbubbles and transcranial ultrasound in swine. *Stroke*, v. 35, n. 10, p. 2407–2411, 2004.
- [49] CULP, W. C. et al. Successful microbubble sonothrombolysis without tissue-type plasminogen activator in a rabbit model of acute ischemic stroke. *Stroke*, v. 42, n. 8, p. 2280–2285, 2011.
- [50] BORRELLI, M. J. et al. Influences of microbubble diameter and ultrasonic parameters on in vitro sonothrombolysis efficacy. *J Vascular Interventional Rad*, v. 23, n. 12, p. 1677 – 1684, 2012.

-
- [51] CHUANG, Y.-H.; CHENG, P.-W.; LI, P.-C. Combining radiation force with cavitation for enhanced sonothrombolysis. *IEEE Trans Ultrason Ferroelect Freq Control*, v. 60, n. 1, p. –, 2013.
- [52] CINTAS, P. et al. Enhancement of enzymatic fibrinolysis with 2-mhz ultrasound and microbubbles. *J Thrombosis Haemostasis*, v. 2, n. 7, p. 1163–1166, 2004.
- [53] BIRNBAUM, Y. et al. Noninvasive in vivo clot dissolution without a thrombolytic drug recanalization of thrombosed iliofemoral arteries by transcutaneous ultrasound combined with intravenous infusion of microbubbles. *Circulation*, v. 97, n. 2, p. 130–134, 1998.
- [54] MOLINA, C. A. et al. Microbubble administration accelerates clot lysis during continuous 2-mhz ultrasound monitoring in stroke patients treated with intravenous tissue plasminogen activator. *Stroke*, v. 37, n. 2, p. 425–429, 2006.
- [55] ALEXANDROV, A. V. et al. A pilot randomized clinical safety study of sonothrombolysis augmentation with ultrasound-activated perflutren-lipid microspheres for acute ischemic stroke. *Stroke*, v. 39, n. 5, p. 1464–1469, 2008.
- [56] MOLINA, C. A. et al. Transcranial Ultrasound in Clinical Sonothrombolysis (TUCSON) Trial. *Annals Neurol*, 66, n. 1, p. 28–38, 2009.
- [57] PERREN, F. et al. Microbubble potentiated transcranial duplex ultrasound enhances iv thrombolysis in acute stroke. *J Thrombosis Thrombolysis*, v. 25, n. 2, p. 219–223, 2008.
- [58] DATTA, S. et al. Ultrasound-enhanced thrombolysis using definity as a cavitation nucleation agent. *Ultrasound Med Biol*, v. 34, n. 9, p. 1421–1433, 2008.
- [59] BROWN, A. et al. Microbubbles improve sonothrombolysis in vitro and decrease hemorrhage in vivo in a rabbit stroke model. *Investig Rad*, v. 46, n. 3, 2011.
- [60] HITCHCOCK, K. et al. Ultrasound-enhanced rt-PA thrombolysis in an ex-vivo porcine carotid artery model. *Ultrasound Med Biol*, 37, n. 8, p. 1240–51, 2011.

-
- [61] PETIT, B. et al. Sonothrombolysis: The contribution of stable and inertial cavitation to clot lysis. *Ultrasound Med Biol*, v. 41, n. 5, p. 1402–10, 2015.
- [62] SMITH, D. A. et al. Ultrasound-triggered release of recombinant tissue-type plasminogen activator from echogenic liposomes. *Ultrasound Med Biol*, v. 36, n. 1, p. 145–157, 2010.
- [63] ALEXANDROV, A. Ultrasound enhancement of fibrinolysis. *Stroke*, v. 40, n. 3, p. S107–S110, 2009.
- [64] BARON, C. et al. Simulation of intracranial acoustic fields in clinical trials of sonothrombolysis. *Ultrasound Med Biol*, v. 35, n. 7, p. 1148–58, 2009.
- [65] GILLES, B. et al. Reduction of ultrasound inertial cavitation threshold using bifrequency excitation. *Applied Physics Lett*, v. 89, n. 9, p. –, 2006.
- [66] SALETES, I.; GILLES, B.; BERA, J.-C. Promoting inertial cavitation by nonlinear frequency mixing in a bifrequency focused ultrasound beam. *Ultrasonics*, 51, n. 1, p. 94–101, 2011.
- [67] MEAIRS, S.; ALONSO, A.; HENNERICI, M. Progress in sonothrombolysis for the treatment of stroke. *Stroke*, v. 43, n. 6, p. 1706–1710, 2012.
- [68] ALEXANDROV, A.; BARLINN, K. Taboos and opportunities in sonothrombolysis for stroke. *Int J Hyperthermia*, v. 28, n. 4, p. 397–404, 2012.
- [69] SCHELLINGER, P.; MOLINA, C. Sonothrombolysis: Current status. *Perspectives Med*, 2012.
- [70] BOR-SENG-SHU, E. et al. Sonothrombolysis for acute ischemic stroke: a systematic review of randomized controlled trials. *Neurosurgical Focus*, v. 32, n. 1, p. 5, 2012.
- [71] ALEXANDROV, A. Current trends in sonothrombolysis for acute ischemic stroke. *Perspectives Med*, 2012.

-
- [72] CHOI, J. J. et al. Noninvasive, transcranial and localized opening of the blood-brain barrier using focused ultrasound in mice. *Ultrasound Med Biol*, 33, n. 1, p. 95–104, 2007.
- [73] KINOSHITA, M. et al. Noninvasive localized delivery of Herceptin to the mouse brain by MRI-guided focused ultrasound-induced blood-brain barrier disruption. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, n. 31, p. 11719–11723, 2006.
- [74] RAYMOND, S. et al. Ultrasound Enhanced Delivery of Molecular Imaging and Therapeutic Agents in Alzheimer’s Disease Mouse Models. *PLOS One*, 3, n. 5, 2008.
- [75] BASERI, B. et al. Activation of signaling pathways following localized delivery of systemically administered neurotrophic factors across the blood-brain barrier using focused ultrasound and microbubbles. *Physics Med Biol*, 57, n. 7, p. N65–N81, 2012.
- [76] ALONSO, A. et al. Focal Delivery of AAV2/1-transgenes Into the Rat Brain by Localized Ultrasound-induced BBB Opening. *Molec Ther Nucleic Acids*, 2, 2013.
- [77] WANG, S. et al. Noninvasive, neuron-specific gene therapy can be facilitated by focused ultrasound and recombinant adeno-associated virus. *Gene Therapy*, 22, n. 1, p. 104–110, 2015.
- [78] BURGESS, A. et al. Targeted Delivery of Neural Stem Cells to the Brain Using MRI-Guided Focused Ultrasound to Disrupt the Blood-Brain Barrier. *PLOS One*, 6, n. 11, 2011.
- [79] COLUCCIA, D. et al. First noninvasive thermal ablation of a brain tumor with mr-guided focused ultrasound. *J Therapeutic Ultrasound*, v. 2, n. 17, p. 1–7, 2014.
- [80] ELIAS, W. et al. A pilot study of focused ultrasound thalamotomy for essential tremor. *N Engl J Med*, v. 369, n. 7, p. 640–648, 2013.
- [81] CHANG, J. et al. Neurophysiologic correlates of sonication treatment in patients with essential tremor. *Ultrasound Med Biol*, v. 41, n. 1, p. 124–31, 2015.

-
- [82] MARTIN, E. et al. High-intensity focused ultrasound for noninvasive functional neurosurgery. *Annals Neurol*, v. 66, n. 6, p. 858–861, 2009.
- [83] KING, R. L. et al. Effective parameters for ultrasound-induced in vivo neurostimulation. *Ultrasound Med Biol*, 39, n. 2, p. 312–331, 2013.
- [84] DEFFIEUX, T. et al. Low-Intensity Focused Ultrasound Modulates Monkey Visuomotor Behavior. *Current Biol*, 23, n. 23, p. 2430–2433, 2013.
- [85] KAMIMURA, H. et al. Ipsi- and contralateral motor response using ultrasound-induced neurostimulation in deeply anesthetized mice. *Physics Procedia*, 70, n. C, p. 1214–1217, 2015.
- [86] TSIVGOULIS, G. et al. Safety and efficacy of ultrasound-enhanced thrombolysis a comprehensive review and meta-analysis of randomized and nonrandomized studies. *Stroke*, v. 41, n. 2, p. 280–287, 2010.
- [87] SZABO, T. L. Article. *Diagnostic ultrasound imaging: inside out*. [S.l.]: Academic Press, 2004.
- [88] WESTERVELT, P. J. Parametric acoustic array. *J Acoustical Soc Am*, v. 35, p. 535, 1963.
- [89] COBBOLD, R. S. C. Article. *Foundations of biomedical ultrasound*. New York: Oxford University Press, USA, 2007. 802 p.
- [90] FATEMI, M.; GREENLEAF, J. F. Vibro-acoustography: An imaging modality based on ultrasound-stimulated acoustic emission. *Proc Nat Acad Sci USA*, 96, n. 12, p. 6603–6608, 1999.
- [91] CHEN, S. et al. Comparison of stress field forming methods for vibro-acoustography. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, v. 51, n. 3, p. 313–321, 2004.
- [92] CHEN, S. et al. Measurement of dynamic and static radiation force on a sphere. *Phys Rev E*, v. 71, p. 056618, 2005.

- [93] SILVA, G.; BANDEIRA, A. Difference-frequency generation in nonlinear scattering of acoustic waves by a rigid sphere. *Ultrasonics*, v. 53, n. 2, p. 470–8, 2013.
- [94] DING, D. A simplified algorithm for the second-order sound fields. *J Acoustical Soc Am*, v. 108, n. 6, p. 2759–2764, 2000.
- [95] SILVA, G.; CHEN, S.; VIANA, L. Parametric amplification of the dynamic radiation force of acoustic waves in fluids. *Physical Rev Letters*, v. 96, n. 23, p. 234301, 2006.
- [96] PAVAN, T.; ALMEIDA, T.; CARNEIRO, A. Magnetic tracking of acoustic radiation force-induced micro-order displacement. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, v. 58, n. 5, p. 909–915, 2011.
- [97] KAMIMURA, H. et al. Pressure transducer for measuring acoustic radiation force based on a magnetic sensor. *Measurement Sci Tech*, v. 22, p. 015101, 2011.
- [98] FATEMI, M.; GREENLEAF, J. Ultrasound-stimulated vibro-acoustic spectrography. *Science*, v. 280, n. 5360, p. 82–85, 1998.
- [99] PISLARU, C. et al. In vivo vibroacoustography of large peripheral arteries. *Investigative Radiology*, v. 43, n. 4, p. 243, 2008.
- [100] ALIZAD, A. et al. Performance of vibro-acoustography in detecting microcalcifications in excised human breast tissue: A study of 74 tissue samples. *IEEE Trans Med Imaging*, v. 23, n. 3, p. 307–312, 2004.
- [101] ALIZAD, A. et al. Vibro-acoustography of thyroid. *J Acoustical Soc Am*, v. 122, p. 3026, 2007.
- [102] MITRI, F.; KINNICK, R. Vibro-acoustography imaging of kidney stones in vitro. *IEEE Trans Biomedical Eng*, n. 99, p. 1–1, 2012.
- [103] CHAFFAI, S. et al. Ultrasonic characterization of human cancellous bone using transmission and backscatter measurements: relationships to density and microstructure. *Bone*, v. 30, n. 1, p. 229–237, 2002.

-
- [104] PINTON, G. et al. Attenuation, scattering, and absorption of ultrasound in the skull bone. *Medical Physics*, 39, n. 1, p. 299–307, 2012.
- [105] KAUFMAN, J. J.; LUO, G.; SIFFERT, R. S. Ultrasound simulation in bone. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, v. 55, n. 6, p. 1205–1218, 2008.
- [106] PAJEK, D.; HYNYNEN, K. The design of a focused ultrasound transducer array for the treatment of stroke: a simulation study. *Physics Med Biol*, v. 57, n. 15, p. 4951, 2012.
- [107] DEFFIEUX, T.; KONOAGOU, E. Numerical Study of a Simple Transcranial Focused Ultrasound System Applied to Blood-Brain Barrier Opening. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, 57, n. 12, p. 2637–53, 2010.
- [108] PAJEK, D.; HYNYNEN, K. The application of sparse arrays in high frequency transcranial focused ultrasound therapy: A simulation study. *Medical Physics*, 40, n. 12, 2013.
- [109] AUBRY, J.-F. et al. Experimental demonstration of noninvasive transskull adaptive focusing based on prior computed tomography scans. *J Acoustical Soc Am*, v. 113, n. 1, p. 84–93, 2003.
- [110] SCHNEIDER, U.; PEDRONI, E.; LOMAX, A. The calibration of ct hounsfield units for radiotherapy treatment planning. *Physics Med Biol*, v. 41, n. 1, p. 111–124, 1996.
- [111] MAST, T. D. Empirical relationships between acoustic parameters in human soft tissues. *Acoustics Res Letters Online*, v. 1, n. 2, p. 37–42, 2000.
- [112] WAN, M.; FENG, Y.; HAAR, G. ter. Cavitation in biomedicine. Springer, 2015.
- [113] TURANEK, J. et al. Advances in bioengineering. In: _____. *Advances in Bioengineering*. [S.l.]: InTech, 2015. cap. Lipid-Based Nanoparticles and Microbubbles - Multifunctional Lipid-Based Biocompatible Particles for in vivo Imaging and Theranostics, p. 79–116.

-
- [114] TREEBY, B. E. et al. Modeling nonlinear ultrasound propagation in heterogeneous media with power law absorption using a k-space pseudospectral method. *J Acoustical Soc Am*, 131, n. 6, p. 4324–4336, 2012.
- [115] FURUHATA, H.; SAITO, O. Comparative study of standing wave reduction methods using random modulation for transcranial ultrasonication. *Ultrasound Med Biol*, v. 39, n. 8, p. 1440–50, 2013.
- [116] KAMIMURA, H. A. et al. Vibroacoustography for the assessment of total hip arthroplasty. *Clinics*, v. 68, n. 4, p. 463–468, 2013.
- [117] MALEKE, C.; KONOFAGOU, E. E. Harmonic Motion Imaging for Focused Ultrasound (HMIFU): a fully integrated technique for sonication and monitoring of thermal ablation in tissues. *Physics Med Biol*, v. 53, n. 6, p. 1773–93, 2008.
- [118] NAHIRNYAK, V. M.; YOON, S. W.; HOLLAND, C. K. Acousto-mechanical and thermal properties of clotted blooda). *J Acoustical Soc Am*, v. 119, n. 6, p. 3766–72, 2006.
- [119] RAMAN, C.; NATH, N. N. The diffraction of light by high frequency sound waves. part i. In: INDIAN ACAD SCI. *Proc Indian Acad Sci.* [S.l.], 1935. v. 2, n. 4, p. 406–412.
- [120] RAMAN, C.; NATH, N. N. The diffraction of light by sound waves of high frequency. part ii. In: INDIAN ACAD SCI. *Proc Indian Acad Sci.* [S.l.], 1935. v. 2, n. 4, p. 413–420.
- [121] RAMAN, C.; NATH, N. N. The diffraction of light by high frequency sound waves: Part iii. *Proc Mathematical Sci*, v. 3, n. 1, p. 75–84, 1936.
- [122] RAMAN, C.; NATH, N. N. The diffraction of light by high frequency sound waves. part iv. generalised theory. In: INDIAN ACAD SCI. *Proc Indian Acad Sci.* [S.l.], 1936. v. 3, n. 2, p. 119–125.
- [123] HARLAND, A.; PETZING, J.; TYRER, J. Nonperturbing measurements of spatially distributed underwater acoustic fields using a scanning laser doppler vibrometer. *J Acoustical Soc Am*, v. 115, p. 187, 2004.

-
- [124] DEAN, I.; WALLACE, L. Interactions between sound waves. *J Acoustical Soc Am*, v. 34, n. 8, p. 1039–1044, 1962.
- [125] SILVA, G.; MITRI, F. Difference-frequency generation in vibro-acoustography. *Physics Med Biol*, v. 56, p. 5985, 2011.
- [126] HYNYNEN, K.; JOLESZ, F. A. Demonstration of potential noninvasive ultrasound brain therapy through an intact skull. *Ultrasound Med Biol*, v. 24, n. 2, p. 275 – 283, 1998.
- [127] HYNYNEN, K. et al. Pre-clinical testing of a phased array ultrasound system for mri-guided noninvasive surgery of the brain: a primate study. *European J Radiol*, v. 59, n. 2, p. 149–156, 2006.
- [128] MARQUET, F. et al. Non-invasive ultrasonic surgery of the brain in non-human primates. *J Acoustical Soc Am*, 134, n. 2, p. 1632–1639, 2013.
- [129] O'DONNELL, M. Coded excitation system for improving the penetration of real-time phased-array imaging systems. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, v. 39, n. 3, p. 341–351, 1992.
- [130] PEDERSEN, H.; MISARIDIS, T.; JENSEN, J. Clinical evaluation of chirp-coded excitation in medical ultrasound. *Ultrasound Med Biol*, v. 29, n. 6, p. 895–905, 2003.
- [131] MITRI, F.; GREENLEAF, J.; FATEMI, M. Chirp imaging vibro-acoustography for removing the ultrasound standing wave artifact. *IEEE Tran Med Imaging*, IEEE, v. 24, n. 10, p. 1249–1255, 2005.
- [132] O'REILLY, M. et al. Focused-ultrasound disruption of the blood-brain barrier using closely-timed short pulses: Influence of sonication parameters and injection rate. *Ultrasound Med Biol*, 37, n. 4, p. 587–594, 2011.
- [133] CHOI, J. et al. Noninvasive and localized neuronal delivery using short ultrasonic pulses and microbubbles. *Proc Nat Acad Sci USA*, 108, n. 40, p. 16539–16544, 2011.

- [134] TANG, S. C.; CLEMENT, G. T. Standing-Wave Suppression for Transcranial Ultrasound by Random Modulation. *IEEE Trans Biomed Eng*, 57, n. 1, p. 203–205, 2010.
- [135] WU, S.-Y. et al. Transcranial Cavitation Detection in Primates During Blood-Brain Barrier Opening: A Performance Assessment Study. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, 61, n. 6, p. 966–978, 2014.
- [136] SAMIOTAKI, G. et al. A quantitative pressure and microbubble-size dependence study of focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening reversibility in vivo using MRI. *Magn Resonance Med*, 67, n. 3, p. 769–77, 2012.
- [137] DOINIKOV, A. A.; HAAC, J. F.; DAYTON, P. A. Resonance frequencies of lipid-shelled microbubbles in the regime of nonlinear oscillations. *Ultrasonics*, 49, n. 2, p. 263–268, 2009.
- [138] CHAPELON, J. et al. Reduction of cavitation using pseudorandom signals. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, 43, n. 4, p. 623–625, 1996.
- [139] THOMSON, J. *Blood Coagulation and Haemostasis: A Practical Guide*. [S.l.]: Churchill Livingstone, 1991.
- [140] GEDDES, L.; BAKER, L. *Principles of Applied Biomedical Instrumentation*. [S.l.]: Wiley, 1975.
- [141] LODISH, H. F. et al. *Molecular Cell Biology*. [S.l.]: Citeseer, 2000.
- [142] LICHTMAN, M. A. et al. *Williams Hematol*. [S.l.]: McGraw-Hill New York, 2006.
- [143] SHUNG, K. et al. Ultrasonic characterization of blood during coagulation. *J Clinical Ultrasound*, v. 12, n. 3, p. 147–153, 1984.
- [144] VOLEISIS, A. et al. Ultrasonic method for the whole blood coagulation analysis. *Ultrasonics*, v. 40, n. 1-8, p. 101–107, 2002.
- [145] VOLEISIS, A. et al. Ultrasonic technique for the investigation of structural properties of biological fluids. *J Acoustical Soc Am*, v. 105, p. 1369, 1999.

-
- [146] SHUNG, K.; SIGELMANN, R.; SCHMER, G. Ultrasonic measurement of blood-coagulation time. *IEEE Trans Biomedical Eng*, BM22, n. 4, p. 334–7, 1975.
- [147] HUANG, C.-C.; WANG, S.-H. Blood coagulation and clot formation studies using high frequency ultrasounds. In: *IEEE Ultrasonics Symposium*. [S.l.: s.n.], 2004. v. 3, p. 1757–1760.
- [148] OSSANT, F. et al. High frequency ultrasound characterization of the coagulation process of whole blood. In: *IEEE Ultrasonics Symposium*. [S.l.: s.n.], 2004. v. 2, p. 846–849.
- [149] HUANG, C.-C.; WANG, S.-H.; TSUI, P.-H. Detection of blood coagulation and clot formation using quantitative ultrasonic parameters. *Ultrasound Med Biol*, v. 31, n. 11, p. 1567–1573, 2005.
- [150] HUANG, C.-C.; WANG, S.-H. Assessment of blood coagulation under various flow conditions with ultrasound backscattering. *IEEE Trans Biomedical Eng*, v. 54, n. 12, p. 2223–2230, 2007.
- [151] GENNISSON, J.-L.; LEROUGE, S.; CLOUTIER, G. Assessment by transient elastography of the viscoelastic properties of blood during clotting. *Ultrasound Med Biol*, v. 32, n. 10, p. 1529–1537, 2006.
- [152] BERNAL, M. et al. Shear wave elastography quantification of blood elasticity during clotting. *Ultrasound Med Biol*, v. 38, n. 12, p. 2218–2228, 2012.
- [153] MACHADO, J. et al. An ultrasonic method to measure human plasma coagulation time. *J Acoustical Soc Am*, v. 90, n. 4, p. 1749–1753, 1991.
- [154] HUANG, C.-C. et al. Assessing the viscoelastic properties of thrombus using a solid-sphere-based instantaneous force approach. *Ultrasound Med Biol*, v. 37, n. 10, p. 1722–1733, 2011.
- [155] ADAM, S. S.; KEY, N. S.; GREENBERG, C. S. D-dimer antigen: current concepts and future prospects. *Blood*, v. 113, n. 13, p. 2878–2887, 2009.

- [156] MORESCO, R. *Associação entre os níveis de D-dímero, produtos de degradação da fibrina/fibrinogênio (PDF) e troponina cardíaca T na investigação dos distúrbios tromboembólicos*. Tese (Doutorado) — UFRGS, 2005.
- [157] KLESSINGER, M.; MICHL, J. *Excited states and photochemistry of organic molecules*. [S.l.]: VCH New York, 1995.
- [158] NONOYAMA, A. *Using multiwavelength UV-Visible spectroscopy for the characterization of red blood cells: an investigation of hypochromism*. Tese (Doutorado) — University of South Florida, 2004.
- [159] JORTNER, B. S. The return of the dark neuron. a histological artifact complicating contemporary neurotoxicologic evaluation. *Neurotoxicology*, v. 27, n. 4, p. 628–634, 2006.
- [160] BEYDER, A. et al. Mechanosensitivity of nav1. 5, a voltage-sensitive sodium channel. *J Physiology*, v. 588, n. 24, p. 4969–4985, 2010.
- [161] PLAKSIN, M.; SHOHAM, S.; KIMMEL, E. Intramembrane cavitation as a predictive bio-piezoelectric mechanism for ultrasonic brain stimulation. *Physical Rev X*, v. 4, n. 1, p. 011004, 2014.
- [162] SZOBOTA, S.; ISACOFF, E. Y. Optical control of neuronal activity. *Annual Rev Biophysics*, v. 39, p. 329–348, 2010.
- [163] HÄUSSER, M. Optogenetics: the age of light. *Nature Methods*, v. 11, n. 10, p. 1012–1014, 2014.
- [164] TUFAIL, Y. et al. Transcranial pulsed ultrasound stimulates intact brain circuits. *Neuron*, v. 66, n. 5, p. 681–694, 2010.
- [165] YOO, S.-S. et al. Focused ultrasound modulates region-specific brain activity. *Neuroimage*, v. 56, n. 3, p. 1267–1275, 2011.
- [166] YOUNAN, Y. et al. Influence of the pressure field distribution in transcranial ultrasonic neurostimulation. *Medical Physics*, v. 40, n. 8, p. 082902, 2013.

-
- [167] KING, R. L.; BROWN, J. R.; PAULY, K. B. Localization of ultrasound-induced in vivo neurostimulation in the mouse model. *Ultrasound Med Biol*, v. 40, n. 7, p. 1512–1522, 2014.
- [168] MEHIĆ, E. et al. Increased anatomical specificity of neuromodulation via modulated focused ultrasound. *PloS One*, v. 9, n. 2, 2014.
- [169] GRAUR, S.; SIEGLE, G. Pupillary motility: bringing neuroscience to the psychiatry clinic of the future. *Current Neurol Neuroscience Rep*, v. 13, n. 8, p. 1–9, 2013.
- [170] HESS, E.; POLT, J. Pupil size in relation to mental activity during simple problem-solving. *Science*, v. 143, n. 3611, p. 1190–2, 1964.
- [171] WOLFF, M. J. et al. Two visual targets for the price of one? pupil dilation shows reduced mental effort through temporal integration. *Psychonomic Bulletin Rev*, v. 22, n. 1, p. 251–257, 2015.
- [172] ZUCKERMAN, M. Physiological measures of sexual arousal in the human. *Psychological Bulletin*, v. 75, n. 5, p. 297, 1971.
- [173] RIEGER, G. et al. Sexual arousal: The correspondence of eyes and genitals. *Biol Psychology*, v. 104, p. 56–64, 2015.
- [174] CHAPMAN, C. R. et al. Phasic pupil dilation response to noxious stimulation in normal volunteers: relationship to brain evoked potentials and pain report. *Psychophysiology*, v. 36, n. 1, p. 44–52, 1999.
- [175] CONNELLY, M. A. et al. Pupillometry: a non-invasive technique for pain assessment in paediatric patients. *Arch Diseases Childhood*, 2014.
- [176] ROSSE, R. et al. Anxiety and pupil reactivity in cocaine dependent subjects endorsing cocaine-induced paranoia. *Addiction*, v. 90, n. 7, p. 981–4, 1995.

SISTEMA DE VIBRO-ACUSTOGRAFIA

Implementações no sistema de rastreo

O sistema de rastreo do laboratório foi aperfeiçoado através da implementação do modo pulsado para geração de imagens. O *software* do sistema foi desenvolvido em Labview e pode ser utilizado em diversas modalidades de imagens como, por exemplo, vibroacustografia, emissão pulso-eco, medidas magnéticas, entre outras. Na Figura A.1 é mostrada a arquitetura do sistema de rastreo do laboratório com as implementações em desenvolvimento na cor alaranjada. O *software* de rastreo controla três placas da *National Instruments* que são responsáveis por: controle dos motores de passo (modelo NI PCI-7344), aquisição em modo contínuo (modelo NI PCI-6034E) e aquisição em modo pulsado (modelo NI PCI-5122). A unidade de comunicação e potência possui uma placa de interface NI modelo UMI-7774 que faz a comunicação das placas do computador com os *drivers* de motor de passo e *encoders*. Os *drivers* de motor de passo recebem os pulsos do computador e comandam os motores de passo. Os *encoders* geram um retorno para o computador apontando a posição dos eixos. Dessa forma, os dados de rastreo são adquiridos através da movimentação dos motores nas direções desejadas e da confirmação dos pontos a serem adquiridos pelos *encoders*.

A placa *motion* modelo NI PCI-7344 permite a comunicação entre as placas da NI utilizando processamento próprio, através da conexão via cabo paralelo entre as placas. Dessa maneira, o controle do sistema se torna mais rápido e com maior precisão.

No modo pulsado, o sistema controla remotamente, através de uma placa

Figura A.1: Esquemático do sistema de rastreo.

de osciloscópio (NI PCI-5122), o disparo de excitação e de aquisição de dados. O *software* gera um sinal de disparo a cada posição programada para ser rastreada, no conector *Trigger* da placa de osciloscópio. Esse sinal inicia um dispositivo externo qualquer de excitação, por exemplo, um gerador de função. Ao mesmo tempo, inicia também a leitura do sinal de resposta através de um dos canais de leitura do osciloscópio.

A interface gráfica do *software* permite que o usuário ajuste os parâmetros de aquisição dos sinais: frequência de aquisição, o número de pontos a serem adquiridos por excitação, tensão de disparo do *Trigger* e tensão mínima e máxima de leitura. Na interface gráfica é possível acompanhar a aquisição de imagens em tempo real, visualizando-se a posição na malha de pontos e o sinal de cada aquisição (Figuras A.2).

Figura A.2: Aba do programa em Labview em que se escolhe entre os modos de aquisição contínuo e pulsado (Burst).

Melhorias no processamento de sinais de VA

Algumas melhorias no processamento da VA foram implementadas para redução de ruídos e para aquisição dos sinais multifrequenciais. Uma das técnicas de redução de ruídos se baseia na eliminação do ruído comum captado por dois hidrofones. A Figura A.3(a) mostra a configuração experimental utilizando dois hidrofones em que o hidrofone 1 posicionado frontalmente ao transdutor de ultrassom é responsável por adquirir o sinal de VA. O hidrofone 2 capta majoritariamente o ruído ambiental simultaneamente à aquisição do sinal pelo hidrofone 1. Os sinais captados pelos hidrofones 1 e 2 são subtraídos, reduzindo o ruído adquirido pelo hidrofone 1.

Em testes utilizando uma esfera metálica de 1 mm posicionada no foco do transdutor de ultrassom, esse arranjo experimental permitiu o aumento da relação sinal ruído SNR (do inglês, *signal-to-noise ratio*) em ambos os métodos de excitação contínuo e pulsado. Assim, para 1 hidrofone (método convencional de VA) as SNR's foram de -9,756 dB (pulsado) e -5,537 dB (contínuo) e para dois hidrofones -5,885 dB (pulsado) e -2,812 dB (contínuo). Esse aumento na SNR permitiu gerar imagens com baixo nível de ruído, como a mostrada na Figura A.3(c).

Figura A.3: Redução de ruídos ambientais utilizando 2 hidrofones. Imagens de VA de uma esfera de 1 mm presa a um aro de PVC por fios de cabelo de 50 μm geradas com frequência de batimento ajustada em 39 kHz.

Outra técnica de redução de ruídos desenvolvida se baseia na eliminação da reverberação do hidrofone, também conhecido como *ringing* do hidrofone. Quando o hidrofone recebe uma excitação acústica, este vibra em seus modos de ressonância inicialmente até entrar no modo de vibração da onda acústica que o excita. A frequência de ressonância do hidrofone é fornecida pelo fabricante, sendo 50 kHz para o modelo ITC-6050C. O *ringing* do hidrofone frequentemente atrapalha a leitura do sinal, principalmente para leituras em modo pulsado. Uma das dificuldades em se eliminar o *ringing* é sua variação de forma e amplitude em função da sua posição espacial em relação a fonte sonora. Diante dessa dificuldade foi desenvolvida uma técnica que elimina o *ringing* do hidrofone fazendo-se uma aquisição com a amostra testada e, em seguida, retira-se a amostra e realiza-se uma aquisição sem a amostra. A Figura A.4(a) mostra a aquisição de um sinal de uma esfera, a Figura A.4(b) mostra a aquisição do *ringing* do hidrofone sem esfera e a Figura A.4(c) mostra o sinal resultante da subtração de (a) e (b). O sinal resultante apresenta a baixa frequência muito melhor definida e permite aproveitar todos os ciclos do sinal.

Por fim, desenvolveu-se um processamento multifrequencial de sinais de VA. A aplicação de excitação multifrequencial por VA pode ser implementada

Figura A.4: *Eliminação da reverberação do hidrofone.*

realizando-se uma varredura em frequência por um curto período de tempo do sinal de umas das cerâmicas do transdutor. Outra maneira é compor o sinal de excitação por mais de uma frequência de uma só vez como, por exemplo, a aplicação de uma onda quadrada. De uma maneira ou de outra, é necessário o processamento do sinal adquirido de forma que se possa escolher as frequências para geração de imagem a partir das ondas acústicas espalhadas pela amostra. Dessa forma, foi implementado um algoritmo para processamento de um sinal multifrequencial qualquer, com possibilidade de escolha manual das frequências de interesse.

O programa foi desenvolvido em Matlab e uma representação do algoritmo é mostrada na Figura A.5. Os dados da aquisição devem ser informados manualmente e são descritos por: número de pontos adquiridos, taxa de aquisição, número de linhas rastreadas, número de colunas rastreadas, resolução espacial nas duas dimensões de rastreio. A implementação de um cabeçalho está sendo desenvolvida para o reconhecimento automático das características de aquisição. Em seguida, forma-se uma imagem a partir dos valores máximos adquiridos para cada posição excitada da amostra (cada posição define um pixel da imagem). Uma vez formada essa imagem primária da aquisição, o usuário deve escolher dois pixels sobre a imagem os quais ele pretende contrastar. O programa então mostra o espectro de frequência dos sinais correspondentes aos dois pixels escolhidos. Novamente o usuário interage selecionando quais frequências devem ser usadas para geração das imagens. O usuário pode escolher quantas frequências forem necessárias, contudo o tempo computacional aumenta com o número de frequências escolhidas. Por fim, o

programa gera imagens separadas para cada frequência escolhida pelo usuário.

Figura A.5: Algoritmo para processamento de sinais multifrequenciais.

Para exemplificar o funcionamento do programa, adquiriu-se sinais por VA de um osso de frango imerso em água. Utilizou-se um tanque acústico com sistema de rastreo, um transdutor confocal de 3 MHz (construído no laboratório) e um hidrofone (*International Transducer Corporation* modelo ITC-6050C). O tamanho da imagem foi de 20 por 20 mm com 0,5 mm de resolução. A taxa de aquisição foi de 100 kHz com 250 pontos por sinal. A Figura A.6 mostra uma representação do arranjo experimental.

Figura A.6: Montagem experimental para aquisição de sinal multifrequencial por VA de um osso de frango.

A Figura A.7(a) mostra o processo de formação de imagem passo-a-passo utilizando o valor de tensão máxima adquirido para cada posição rastreada. Os

gráficos na parte superior da figura representam: em azul, o sinal para aquele pixel amostrado; e, em verde, o máximo sinal adquirido até o momento (serve para comparação com o sinal corrente). A Figura A.7(b) é denominada primária e serve apenas para pré-visualização da aquisição e para permitir a seleção das regiões a serem contrastadas através do processamento mais refinado por frequência.

(a) Formação de imagem passo-a-passo.

(b) Imagem primária.

Figura A.7: Formação da imagem primária de um osso de frango por VA a partir da tensão pico-a-pico dos sinais adquiridos.

São dadas instruções para seleção das regiões em que se pretende contrastar (Figura A.8(a)). Então, seleciona-se as regiões de interesse na Figura A.8(b). O programa calcula a FFT dos sinais dos dois pontos selecionados e gera um espectro de frequência desses sinais (Figura A.8(c)). Foram selecionadas manualmente 5 frequências de interesse: 3859 Hz, 12039 Hz, 21025 Hz, 40495 Hz e 46716 Hz. Cada sinal é amostrado num gráfico junto com seu espectro de frequência correspondente (Figura A.8(d)).

Por fim, o programa gera imagens para cada frequência selecionada pelo usuário (Figura A.9). Verifica-se que a imagem do osso não é formada para todas as frequências selecionadas. Isso indica que para certas frequências ocorre maior sinal por VA, que pode ser dado por espalhamento ou por emissão acústica do osso devido ao fenômeno de ressonância.

Outro exemplo de aquisição e processamento com melhor resolução espacial utilizando os *softwares* desenvolvidos é mostrada na Figura A.10. Adquiriu-se imagens por VA de uma fatia de osso de fêmur bovino em duas frequências: 26 kHz e 37 kHz. Verifica-se que a frequência de 26 kHz contrasta melhor a região

Figura A.8: *Processamento do sinal adquirido por VA de um osso de frango com interação do usuário. Nas figuras (b) e (c) os "X"s mostram as regiões e frequências selecionadas pelo usuário.*

cortical (mais externa) do osso. Uma região mais interna também é destacada por essa frequência. Nessa região há maior densidade óssea.

Figura A.9: *Imagens de um osso de frango por VA para cada frequência selecionada pelo usuário.*

(a) Fotografia

(b) VA - 26 kHz

(c) VA - 37 kHz

Figura A.10: *Exemplo de aquisição por VA e processamento de imagens de osso bovino com duas frequências diferentes: 26 kHz e 37 kHz.*

DEDUÇÃO DA EQUAÇÃO DO CHIRP MODIFICADO

Os métodos de codificação de pulsos de excitação adotados nos Cap.4 e 6 geram sinais com variação de frequência ao longo do tempo. No caso do chirp, a variação da frequência pode ser linear, logarítmica ou quadrática e, ainda, crescente ou decrescente. Na caso do sinal gerado pela seleção periódica de frequências aleatórias (SPFA), a variação da frequência é aleatória ao longo do tempo. A dedução desta última codificação encontra-se em [115].

Tanto os pulsos por chirp quanto por SPFA foram modificados para manterem um número fixo de ciclos por frequência. O número mínimo de ciclos foi definido baseado em estudo anterior [133] para permitir a oscilação de microbolhas aumentando a abertura da BHE. No chirp linear convencional, a frequência instantânea varia linearmente com o tempo. Neste estudo, o sinal foi otimizado para permitir N ciclos completos de pulsos para cada $f(t)$, permitindo que $\phi(t)$ permanecesse constante por um período de tempo $\frac{N}{f(t)}$. As frequências foram variadas de acordo com a série:

Varição da frequência por iteração: instante t para cada variação de frequência:

$$\begin{array}{ll}
 f_0 = f_0 & t_0 = 0 \\
 f_1 = f_0 + \Delta f & t_1 = \frac{N}{f_0} \\
 f_2 = f_0 + 2.\Delta f & t_2 = \frac{N}{f_0} + \frac{N}{f_1} \\
 f_3 = f_0 + 3.\Delta f & t_3 = \frac{N}{f_0} + \frac{N}{f_1} + \frac{N}{f_3} \\
 \dots & \dots \\
 f_n = f_0 + n.\Delta f & t_n = N \sum_{i=0}^{n-1} \frac{1}{f_i}
 \end{array}$$

O índice n indica a frequência escolhida dentro da banda de frequência $f_n = f_0 + n\Delta f$, sendo f_0 a frequência inicial e Δf o passo de frequência. Para $\Delta f \ll f$ e $\frac{N}{\Delta f} \ll 1$, o tempo t_n pode-se integrar a série com intervalo entre f_0 e f_n , e frequência instantânea $f(t)$ de maneira que

$$t_n = N \sum_{i=0}^{n-1} \frac{1}{f_i} \cdot \frac{\Delta f}{\Delta f} \approx \frac{N}{\Delta f} \int_{f_0}^{f_n} \frac{df}{f} = \frac{N}{\Delta f} \ln(f) \Big|_{f_0}^{f_n} = \frac{N}{\Delta f} \ln \left(\frac{f_n}{f_0} \right)$$

Assim:

$$t = \frac{N}{\Delta f} \ln \left(\frac{f_n}{f_0} \right)$$

$$\frac{\Delta f}{N} t = \ln \left(\frac{f_n}{f_0} \right)$$

$$e^{\frac{\Delta f}{N} t} = \frac{f_n}{f_0}$$

Dessa forma a variação da frequência é dada por:

$$f_n(t) = f_0 e^{\frac{\Delta f}{N} t}$$

Com isso o sinal codificado por chirp dado por $s(t) = K(f(t)) \cdot \sin(\phi(t))$, pode ser escrito como:

$$s(t) = K(f(t)) \sin \left(2\pi f_0 e^{\frac{\Delta f}{N} t} t \right)$$

```

%% Script em Matlab para demonstração do pulso codificado por chirp
%% Parâmetros:
f0 = 1.5e6; % f inicial
f1 = 1.9e6; % f final
df = 10e3; % f passos
N = 3; % ciclos por frequência
f = f0:df:f1; % largura de banda de frequência
% Vetor de tempo:
t0 = 0;
t = zeros(length(f),1);
for ii = 2:length(f)%n
    t0 = t0 + N*(1/f(ii));
    t(ii) = t0;
end
% Ajuste exponencial:
subplot(211), plot(t,f,'+', t,f0*exp((df/N)*t))
xlabel('t(s)'), ylabel('f(Hz)')
axis ([0 max(t) f0 f1])
title('Ajuste exponencial')
% Sinal chirp
t_int = 0:1e-8:t(end);
subplot(212), plot(t_int,sin(2*pi*f0*exp((df/N).*t_int).*t_int))
xlabel('t(s)'), ylabel('Magnitude normalizada')
axis ([0 max(t) -1 1])
title('Sinal chirp')
% Tempo total para sequência chirp
display(['t(end) = ',num2str(t(end)), ' s'])

```


CALIBRAÇÃO DE TRANSDUTOR FOCALIZADO IMASONIC

Materiais e métodos

A calibração do transdutor terapêutico (Imasonic SAS, Voray-sur-l'Ognon, França) alimentado por um gerador de função (33220A, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) com sinal amplificado em 50 dB (faixa de frequência: 0,25-150 MHz, potência: 25 W, ganho: 50 dB, modelo 325LA, E&I Inc., Rochester, NY, EUA) foi realizada utilizando um hidrofone (faixa de leitura de frequência (± 3 dB): 0,25-40 MHz, abertura: 200 μm , sensibilidade nominal em circuito aberto: 45 nV/Pa, ângulo (-6 dB a 5 MHz): 100°, HGL-0200, Onda Corporation, Sunnyvale, CA, EUA) e um pré-amplificador (AH-2020, Onda Corporation, Sunnyvale, CA, EUA) calibrados pelo *National Physical Laboratory (NPL)*. A calibração foi realizada em um tanque com água desgaseificada (Gear Pump Drive, Cole Parmer, IL, EUA e Liqui-Cel membrane contactors, Polypore Corp., Charlotte, NC, EUA) por aproximadamente 2 h até que a porcentagem de oxigênio dissolvido fosse menor do que 20% (DO 6 Acorn series, Oakton, Vernon Hills, IL, EUA). Dois sistemas de posicionamento 3D (Velmex Inc., Lachine, QC, Canada) foram utilizados para posicionamento preciso do transdutor e das amostras. Duas amostras de crânios de camundongos C57BL/6 (massa: 20–28 g, sexo: masculino, Harlan, Indianapolis, IN, EUA) sacrificados de acordo com procedimentos descritos no Apêndice D foram utilizadas para se obter os coeficientes de atenuação das regiões anatômicas de interesse dessa pesquisa (Fig.C.1). Esferas de 1 mm (retiradas de canetas

Figura C.1: Montagem experimental para calibração do transdutor terapêutico. (a) O transdutor e a amostra foram posicionados por dois sistemas de posicionamento 3D independentes, (b) esferas de metal de 1 mm utilizadas como referência para posicionamento por pulso/eco, (c) coordenadas em relação a Lambda (L) em milímetros dos pontos anatômicos de interesse putâmen (P) e hipocampo (H), (d) foco do transdutor e hidrofone alinhados à Lambda, (e) hidrofone posicionado no putâmen direito ($AP=6$ mm, $ML=+2$ mm, $DV=3$ mm) e (f) hidrofone posicionado no hipocampo direito ($AP=2$ mm, $ML=+3$ mm, $DV=4$ mm).

esferográficas) foram coladas sobre Lambda para serem utilizadas como referência durante posicionamento do foco por pulso/eco. As amostras foram mergulhadas em água deionizada desgaseificada por 2 h antes da calibração para hidratação. O transdutor terapêutico foi preparado segundo procedimento descrito no Apêndice D.

Parte da metodologia de calibração seguida está descrita em <http://www.>

ondacorp.com/images/brochures/Onda_HydroCalMethod.pdf (último acesso em 07/11/2015). Com o auxílio de um dos sistemas de posicionamento, o foco do transdutor foi posicionado sobre o hidrofone fixo a um suporte. O ponto de máximo sinal lido pelo hidrofone (frequência de aquisição: 100 MHz, Gage Applied Technologies Inc., Lachine, QC, Canada) foi definido através de aquisições de sinais (frequência: 1,5 MHz, amplitude no gerador: 10 mVpp, número de ciclos: 100, período de pulsos: 100 ms) por uma linha axial e uma linha lateral. Em seguida, leituras da resposta em frequência do transdutor para amplitudes de voltagem V no gerador de 10 a 60 mVpp com intervalos de 5 mVpp foram realizadas em uma faixa de frequência f de 0,3 a 3,0 MHz. Os valores de leitura em volts foram convertidos em pressão e intensidade considerando a sensibilidade do hidrofone em circuito aberto $S_H(f)$ e o ganho do pré-amplificador em função da frequência $G(f)$. Dessa maneira, a sensibilidade do conjunto foi dada por:

$$S_l(f) = G(f) \cdot S_H(f) \cdot \frac{C_H}{C_H + C_A} \quad (C.1)$$

sendo C_A e C_H as capacitâncias do amplificador e hidrofone, respectivamente. C_A , C_H , $S_H(f)$ e $G(f)$ são fornecidos pelo fabricante em tabelas. As unidades de sensibilidades são dadas em V/Pa para pressão acústica P e V/(W/cm²) para intensidade acústica instantânea I .

A intensidade espacial média de pico de pulso I_{SPPA} (*SPPA* do inglês *Spatial peak-pulse average*) foi calculada por:

$$I_{SPPA} = \frac{\int \frac{P^2}{Z_0} dt}{T_p} \quad (C.2)$$

sendo Z_0 a impedância característica da água igual a 1,48 MRayls e T_p a duração do pulso. A integral da intensidade do pulso foi definida para intervalos de pulso com valores de pressão entre 10% e 90% do pico de pressão.

A largura de banda de frequência foi determinada por:

$$B = \frac{f_2 - f_1}{f_c} \cdot 100 \quad (C.3)$$

sendo f_c a frequência central (de pico) e f_2 e f_1 , respectivamente, a frequência máxima e mínima da largura à meia altura ou *FWHM* (do inglês *full width at half maximum*).

Resultados e discussão

A Fig.C.2(a) mostra a sensibilidade do hidrofone+pré-amplificador em função da frequência. A Fig.C.2(b) mostra a resposta em frequência do transdutor considerando a leitura em água e, também, com o hidrofone localizado nas regiões do putâmen e do hipocampo. A frequência central e largura de banda do transdutor em água foram $1,94 \pm 0,02$ MHz e 53% ($f = 1,28 - 2,31$ MHz), respectivamente. Para putâmen e hipocampo a frequência central foi $1,92 \pm 0,02$ MHz e as larguras de banda 55% ($f = 1,23 - 2,29$ MHz) e 57% ($f = 1,18 - 2,29$ MHz). A Fig.C.2(c) mostra as respostas em frequência em água para diferentes tensões ajustadas no gerador de função. Com isso, fez-se o ajuste linear da tensão no gerador em função de cada frequência, obtendo-se os coeficientes angulares e lineares em função da frequência em água mostrados na Fig.C.2(e). Da mesma forma obteve-se dados equivalentes para as calibrações no putâmen e hipocampo, gerando o coeficiente de correção da amplitude do gerador em função da frequência $K(f)$ mostrado na Fig.C.2(d). Nesta figura, o coeficiente $K(f)$ indica a amplitude da tensão no gerador de função para que a pressão em qualquer frequência na faixa entre 1,23 a 2,29 MHz se mantenha a 0,52 MPa para putâmen e hipocampo.

Além disso, fez-se aquisições 2D com o hidrofone para se obter a resolução lateral e axial (FWHM). A Fig.C.3(a) mostra campos de pressão para as frequências 0,5, 1,0, 1,5 e 1,94 MHz. A partir desses dados pôde-se traçar um ajuste de potência do tipo $f(x) = a.x^b$ da resolução lateral do foco do transdutor para diferentes frequências (Fig.C.3(b)). Da mesma forma obteve-se mapas do campo acústico (Fig.C.3(c)) para se determinar a resolução axial através do mesmo tipo de ajuste (Fig.C.3(d)). Para frequências abaixo de 1 MHz é possível se observar a formação de ondas estacionárias. Para esta frequência os 100 ciclos de frequência 1 MHz ocupariam um espaço de 14,8 cm em água, o que é superior ao dobro da distância entre o hidrofone e transdutor (distância entre transdutor e hidrofone igual a 6 cm). Para frequências abaixo de 1 MHz é necessário se utilizar menos ciclos para evitar a interferência das ondas incidentes e refletidas.

A partir desses ajustes, gerou-se um código em Matlab com interface gráfica "GUI"(Fig.C.4) em que o usuário indica a frequência, a amplitude do sinal no

Figura C.2: Parâmetros de calibração em função da frequência, sendo: (a) Sensibilidade do hidrofone+pré-amplificador, (b) respostas em frequência para água, putâment e hipocampo, (c) respostas em frequência em água para diferentes tensões no gerador de função, (d) coeficiente $K(f)$ de correção da resposta do transdutor considerando calibrações no putâmen e hipocampo e (e) coeficientes angulares e lineares obtidos do ajuste linear de (c).

Figura C.3: Calibração em água. (a) Mapas de pressão acústica mostrando a variação da resolução lateral do foco para frequências de 0,5, 1,0, 1,5 e 1,94 MHz, (b) variação da resolução lateral (FWHM) em função da frequência, (c) mapas de pressão acústica para as mesmas frequências mostrando a variação do comprimento do foco e (d) variação da resolução axial (FWHM) do foco em função da frequência.

gerador de função e o meio (putâmen, hipocampo ou água) e o software fornece a pressão negativa de pico, pressão positiva de pico, intensidade acústica (este somente para água), resolução lateral e resolução axial. A intensidade acústica para o putâmen e hipocampo não podem ser determinadas por este método devido a grande variação das impedâncias características deste meio. Para água adotou-se $Z_0=1,48$ MRayls.

Por fim, foi realizada uma varredura em 2D de uma região de 8x8 mm em torno de Λ com o hidrofone a uma profundidade de 2 mm das duas amostras mostradas na Fig.C.5(a). A figura mostra as imagens em C-scan utilizadas para alinhamento do foco e os respectivos mapas de pressão acústica máxima para cada

Figura C.4: Interface gráfica "GUI" em Matlab para conversão de tensão no gerador em função da frequência para pressão negativa de pico, pressão positiva de pico, intensidade acústica (este somente para água), resolução lateral e resolução axial.

amostra. No mapa de pressão da amostra 1 é possível visualizar uma região escura de alta atenuação onde a esfera foi posicionada. Uma montagem mais adequada seria fixar a esfera de referência em outra posição que não Lambda, de maneira a não obstruir o mapeamento das regiões de interesse. De qualquer forma, não foi possível realizar varreduras 2D acima da linha do putâmen (AP=6 mm) mantendo uma distância de 2 mm devido a curvatura interna do crânio (hidrofone estava a menos de 1 mm nessa linha). A Fig.C.5(b) mostra a média dos mapas de pressão acústica.

(a)

(b)

Figura C.5: (a) Fotografia das amostras com esfera de metal utilizada como referência (1 mm) e respectivos C-scan e mapas de pressão acústica máxima. (b) Média dos mapas de pressão.

PREPARO DE TRANSDUTORES E DE ANIMAIS PARA ESTUDOS *in vivo*

Preparo de transdutores

O transdutor terapêutico (frequência central: 1,94 MHz; -6 dB banda de frequência: 1,28-2,31 MHz; diâmetro: 70 mm; Imasonic SAS, Voray-sur-l'Ognon, França) possuía um vão na região central no qual foi fixado um transdutor secundário (frequência central: 10 MHz, foco: 60 mm, diâmetro: 22,4 mm; modelo U8517133, Olympus NDT, Waltham, MA, EUA) de maneira que os focos dos dois transdutores coincidiram espacialmente (calibração descrita no Apêndice C). O conjunto de transdutores possuía ainda um cone de acrílico que era preenchido com água deionizada degaseificada para permitir o acoplamento acústico dos transdutores com a cabeça do animal.

O preparo do transdutor seguia da seguinte forma: (a) degaseificação da água deionizada por aproximadamente 40 min (Kitassato; misturador Fisher Scientific, MA, EUA; e bomba de vácuo modelo 72R547, Gast Manufacturing Inc, MI, EUA), (b) o transdutor era preenchido quase totalmente com água; (c) as bolhas maiores fixadas nos cantos internos do cone era retiradas com o auxílio de uma pipeta descartável e (d) as bolhas menores nas paredes do cone e dos transdutores eram retiradas com um palito com algodão; (e) o transdutor era preenchido totalmente até a água atingir um nível superior ao da entrada do cone (utilizando a tensão superficial da água); (f) filme de PVC preso com elásticos eram utilizados para fixar água no cone (preservativos ou "camisinhas" também eram utilizados em substituição ao filme

Figura D.1: Preparo do transdutor para estudos *in vivo*. (a) Desgaseificação de água deionizada, (b) preenchimento do conjunto de transdutores e acoplador cônico de acrílico com água deionizada e desgaseificada; (c) e (d) remoção de bolhas de ar das paredes internas do conjunto; (e) preenchimento com água até atingir nível superior ao da entrada do conjunto (usando a tensão superficial da água); (f) vedação do conjunto utilizando filme de PVC ou preservativo ("camisinha") e (g) fixação do conjunto ao sistema de posicionamento 3D.

plástico); e, por fim, (g) o transdutor era fixado em um sistema de posicionamento 3D (Velmex Inc., Lachine, QC, Canada) (Fig.D.1).

Preparo dos animais

Nos estudos *in vivo* apresentados nesta tese foram utilizados camundongos C57BL/6 (massa: 20–28 g, sexo: masculino, Harlan, Indianapolis, IN, EUA). Inicialmente, os animais foram anestesiados com 2,5% de isoflurano e oxigênio a $0,8 \text{ L.min}^{-1}$ (SurgiVet, Smiths Medical PM, Inc., Wisconsin, EUA) em uma caixa de acrílico. Após cerca 3-5 minutos, os animais eram fixados em um sistema estereotáxico (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, EUA) e mantidos sob anestesia a 1,0 – 1,5% de isoflurano e oxigênio a $0,8 \text{ L.min}^{-1}$. Os pêlos da

Figura D.2: Identificação dos pontos de referência Lambda e Bregma do crânio de camundongos. Fotografias: (a) do animal fixado no sistema estereotáxico após remoção de pêlos da cabeça, (b) do crânio após remoção da pele e aplicação de água oxigenada durante treinamento de identificação de Lambda e Bregma e (c) de crânio e de encéfalo frescos. Lambda foi a região escolhida para referenciamento da posição do foco do transdutor de ultrassom por ser facilmente visualizado com a pele do animal intacta.

cabeça e do pescoço eram removidos com uma máquina elétrica convencional de cortar cabelo e removedor químico de pêlos (*Veet Hair Removal Cream*, Reckitt Benckiser, Slough, Reino Unido). Em seguida, o removedor químico remanescente era completamente limpo da pele do animal utilizando algodão embebido com água em abundância para evitar queimaduras e escurecimento da pele.

Com o animal fixado ao sistema estereotáxico era possível observar pontos anatômicos do crânio intacto (sem remoção da pele) (Fig.D.2(a)). A Fig.D.2(b) mostra o crânio do animal exposto após remoção da pele e aplicação de água oxigenada durante treinamento. O procedimento de remoção da pele não foi adotado em nenhum dos experimentos reportados nesta tese. O crânio era mantido intacto e, portanto, os procedimentos aqui descritos eram totalmente não-invasivos. Nas Fig.D.2 pode-se observar os pontos de referência Bregma - localizado na porção superior da calvária, formado pela junção das suturas coronal (ossos frontal e parietais) e sagital (ossos parietais) e Lambda - localizado na porção inferior da calvária, formado pela junção das suturas sagital e lambdóidea. A Fig.D.2(c) mostra um crânio e um encéfalo frescos nos quais pode-se identificar facilmente Lambda.

Após remoção dos pêlos, gel desgaseificado para acoplamento do ultrassom era aplicado sobre a cabeça do animal (Fig.D.3(b)). Um recipiente com uma

Figura D.3: *Acoplamento acústico de transdutores à cabeça dos animais. (a) Limpeza completa da cabeça do animal com água em abundância, (b) aplicação de gel condutor de ultrassom desgaseificado, (c) posicionamento de recipiente com água (deionizada e desgaseificada) e de anteparo de metal para identificação de Lambda por imagens de ultrassom em C-scan e (d) posicionamento de transdutores no recipiente com água com auxílio de um sistema de posicionamento 3D.*

janela acústica (abertura ao fundo vedada com filme de PVC) preenchido com água deionizada e desgaseificada era colocado sobre a cabeça do animal e um anteparo em forma de cruz era colocado sobre o ponto de referência Lambda (Fig.D.3(c)). O conjunto de transdutores preso ao sistema de posicionamento 3D era então imerso parcialmente na água dentro do recipiente com o cuidado de não permitir a formação de bolhas entre a vedação do conjunto e o recipiente com água (Fig.D.3(d)).

Um programa escrito em Matlab controlava o sistema de posicionamento 3D e o sistema de aquisição composto por: um pulser/receiver (NDT-5800, Panametrics, MA, EUA) e uma placa de aquisição (Gage Applied Technologies Inc., Lachine, QC, Canada). A Fig.D.4 mostra fotografias obtidas durante treinamento para execução

do procedimento de posicionamento dos transdutores (em inglês *targeting procedure*) de um crânio com a pele removida (ênfatiza-se que a remoção da pele não era realizada durante procedimento não-invasivo reportado nesta tese). Na Fig.D.4(b) é mostrado o anteparo posicionado sobre Bregma. A Fig.D.4(d) mostra a imagem correspondente do anteparo adquirida em modo C-scan. A profundidade do foco era determinada após remoção do anteparo através do pulso/eco realizado na região de interesse. A Fig.D.4(c) mostra um exemplo de sinal pulso/eco em que se observa (1) o eco da vedação dos transdutores, (2) eco da janela acústica do recipiente e (3) eco do crânio do animal.

O procedimento de sacrifício dos animais era realizado com uso de anestesia a 4% de isoflurano misturado com oxigênio a 0,8 L.min⁻¹ por tempo suficiente para deprimir consideravelmente a respiração do animal com posterior deslocamento cervical. Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados e conduzidos de acordo com as normas do comitê de ética em pesquisa da Columbia University.

Figura D.4: Fotografia durante treinamento para realização de procedimento de posicionamento do foco do transdutor terapêutico na região de interesse (em inglês *targeting procedure*). (a) Crânio expostos após remoção da pele, (b) posicionamento de anteparo na região Bregma, (d) imagem em modo C-scan do anteparo e (c) sinal pulso/eco após remoção de anteparo no qual se observa ecos (1) da vedação do conjunto de transdutores, (2) da janela acústica do recipiente e (3) do crânio do animal.

HISTOLOGIA

Um dos métodos utilizados para avaliação de danos ao tecido cerebral pelo ultrassom foi a histologia de seções coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E). O procedimento envolve a perfusão transtorácica, fixação do encéfalo em parafina, seccionamento do encéfalo, aplicação de corantes H&E e avaliação por microscopia. O uso de corante H&E permite a avaliação de microanatomia de órgãos e tecidos. A hematoxilina cora componentes celulares como heterocromatina e núcleo. Já a eosina cora componentes citoplasmáticos como grânulos citoplasmáticos, componentes extracelulares como colágeno e fibras elásticas, fibras musculares e eritrócitos. Neste estudo os corantes H&E foram utilizados para a avaliação de danos ao tecido cerebral pós procedimento de exposição do encéfalo ao ultrassom terapêutico. As amostras eram avaliadas em busca de extravazamento de eritrócitos dentro do parênquima assim como perda de células e tecido.

A Fig. E.1 mostra passo-a-passo os procedimentos da perfusão transtorácica, fixação e seccionamento do encéfalo. O animal é anestesiado com 1,5 – 2,5% de isoflurano e oxigênio a 0,8 L.min⁻¹ (SurgiVet, Smiths Medical PM, Inc., Wisconsin, EUA) em uma caixa de acrílico. Em seguida é transferido para uma capela e mantido sob mesmo nível de anestesia (A). Uma incisão no tórax é realizada de maneira a expor o coração do animal (B). Uma solução tampão fosfato-salino ou PBS (do inglês *Phosphate Buffered Saline*) é bombeada através do ventrículo direito do coração utilizando uma agulha e uma bomba peristáltica (Masterflex C/L, Cole Parmer, IL, EUA) por aproximadamente 10 min (C). Em seguida, uma solução de paraformaldeído a 4% é bombeada pelo mesmo sistema por mais 10 min para fixar o encéfalo. O animal é decapitado (D) e sua cabeça é mantida por 24 h em solução

Figura E.1: Procedimento para histologia de seções do cérebro coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E). (A) e (B) Exposição do coração por incisão de animal mantido sob anestesia, (C) bombeamento de solução PBS e, posteriormente, de paraformaldeído a 4% através do ventrículo direito do coração, (D) e (E) decapitação e manutenção da cabeça em solução de paraformaldeído a 4% por 24 h, (F) e (G) remoção do encéfalo mantendo-o intacto, (H) encéfalo embebido em parafina, (I) seccionamento do encéfalo em espessuras de 1-10 μm e, após aplicação de corante H&E, aquisição de imagens microscópicas (J).

de paraformaldeído a 4% (E). O crânio é removido (F) mantendo o encéfalo intacto (G). O encéfalo é então envolto em parafina (H) e seccionado (Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Alemanha) com espessuras de 1-10 μm (I). As amostras são depositadas em lâminas para microscopia, limpas e coradas com H&E. Por fim, imagens por microscopia de campo brilhante (BX61; Olympus, Melville, NY, EUA) são adquiridas (J).

A seguir seguem alguns exemplos de imagens adquiridas pelo método de histologia descrito. A Fig.E.2(a) mostra uma seção do hemisfério esquerdo do encéfalo de um animal exposto ao ultrassom focalizado de 1,9 MHz e 3,0 MPa (sem uso de microbolhas) na região AP=+2 mm, ML=-2 mm DV=3 mm. Não há sinais de danos nas regiões insonadas, bem como não foram encontrados focos de hemorragias ou extravasamento de eritrócitos. Na Fig.E.2(b) observa-se os chamados *dark neurons* que podem caracterizar neurônios que sofreram danos e que estão em processo de morte celular. Neste caso, o animal foi insonado com

o pulso codificado por sinal com variação de frequência aleatória a 0,52 MPa. Este tipo de dano é classificado como leve e pode ser confundido com artefatos do procedimento histológico descrito [159]. Por fim, a Fig.E.2(c) mostra danos severos ao tecido cerebral com necrose e perda de células. Neste caso ficou evidente o foco de hemorragia causado pela excessiva exposição do animal ao ultrassom focalizado por várias sessões experimentais durante treinamento e adaptação do sistema para realização de estudos sobre neuromodulação. Os resultados finais mostrados no estudo de neuromodulação teve grupos de animais insonados com parâmetros acústicos adequados para evitar este tipo de dano ao tecido cerebral.

(a)

(b)

(c)

Figura E.2: Exemplos de imagens de histologia de seções do encéfalo de camundongos coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E). (a) Imagem do hemisfério esquerdo sem danos aparentes causados pela insonação por ultrassom de 1,9 MHz e 3,0 MPa sem microbolhas, (b) dark neurons caracterizando danos leves detectados pós insonação por pulso codificado de 0,52 MPa com uso de microbolhas e (c) danos severos com necrose e focos de hemorragia causados por exposição excessiva ao ultrassom focalizado durante várias sessões experimentais de neuroestimulação.

CALIBRAÇÃO DE TRANSDUTORES UTILIZADOS PARA SONOTROMBÓLISE

Dois sistemas foram montados para monitoramento do sangue durante a coagulação e procedimento de sonotrombólise. Uma das montagens experimentais utilizou dois transdutores planares (Fig. F.1), sendo um ligado a um pulse-receiver em modo pulso/eco e outro ligado a um gerador de função com sinal amplificado. A outra montagem utilizou um transdutor focalizado e um transdutor planar (Fig. 5.2). Este apêndice apresenta a calibração dos transdutores utilizados nestas montagens.

Figura F.1: Montagem experimental com dois transdutores planares para ensaio de sonotrombólise com coágulos de sangue humano.

Transdutor planar terapêutico

A calibração do transdutor planar (750347, V323 2.25 MHz/.25", Olympus Corporation, Waltham, MA, EUA) energizado por um gerador de função (33220A, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) com sinal amplificado em 50-dB (100A2, E&I Inc., Rochester, NY, EUA) foi realizada utilizando um hidrofone de agulha (sensor: 1861 (agulha de 1 mm), pré-amplificador: PA12001, Acoplador DC: DCPS244, Precision Acoustics Ltd, Dorchester, UK) em um tanque acústico com sistema de posicionamento 3D (Fig.F.2). Foi desenvolvido um código em Labview (Labview 2009/ versão 9.0 (32-bits), National Instruments, Austin, TX, EUA) que controlava o gerador de função via USB e uma placa de aquisição de sinais (NI-5122, National Instruments, Austin, TX, EUA) para aquisições sincronizadas. O gerador de funções foi ajustado para gerar sinais de 100 ciclos e período de 100 ms entre trens de pulsos. A frequência de amostragem foi de 50 MHz.

A curva de calibração do hidrofone utilizado nesta calibração apresenta ganho fixo (nominal de 8 dB pelo pré-amplificador), de maneira que a curva de sensibilidade em função da frequência (1-20 MHz) leva em conta a montagem completa do hidrofone (sensor+pré-amplificador+acoplador DC) (Fig. F.3).

A resposta em frequência foi determinada pela média de 5 aquisições para cada uma das tensões ajustadas no gerador (10, 20, 30, 40 e 50 mVpp). Foram geradas as curvas de resposta considerando o pico positivo de pressão (PPP) e pico negativo de pressão (PNP) (Fig F.4). Dessas curvas fez-se ajustes lineares da pressão em função da frequência. Dessa forma, um script em Matlab foi escrito para indicar a pressão (PNP ou PPP) em função da amplitude e frequência do sinal ajustado no gerador de função. A frequência central encontrada foi de 2,7 MHz e a largura de banda foi de 81,5% com frequências de largura à meia altura iguais a 1,7 MHz e 3,9 MHz.

As resoluções lateral e axial do foco do transdutor foram determinadas pela média de 5 aquisições fazendo-se varreduras com resolução de 0,25 mm com o hidrofone pelo campo de pressão do transdutor nos eixos y e z indicados na Fig.F.2(a). A distância focal foi determinada pelo tempo de voo do ponto de máxima pressão. As resoluções lateral e axial foram determinadas pela largura à

(a)

(b)

Figura F.2: Calibração do transdutor planar terapêutico. (a) Montagem experimental e (b) código em Labview desenvolvido para aquisição trigada utilizando um gerador de função e uma placa de aquisição.

Figura F.3: Curva de sensibilidade do conjunto hidrofone + pré-amplificador + acoplador (DC) fornecida pelo fabricante.

Figura F.4: Resposta em frequência do transdutor planar terapêutico para (a) pico positivo de pressão (PPP) e (b) pico negativo de pressão (PNP) para diferentes tensões ajustadas no gerador de função (de 10 a 50mVpp). A barra de erro indica o desvio padrão amostral.

meia altura da pressão máxima média obtidas nessas varreduras. A distância focal foi de $19,22 \pm 0,02$ mm (considerando $c_{agua} = 1480$ m/s). As resoluções lateral e axial na região focal foram de $3,25 \pm 0,02$ mm e $22,0 \pm 0,02$ mm, respectivamente (Fig. F.5).

Transdutor planar de monitoramento

O transdutor para monitoramento em modo pulso/eco de frequência nominal de 25 MHz (937215, 25MHz/.25", Olympus Corporation, Waltham, MA, EUA) foi calibrado com montagem experimental similar ao da Fig. F.2, com exceção

Figura F.5: Resoluções espaciais do foco do transdutor planar terapêutico com região focal em $19,22 \pm 0,02$ mm. As resoluções lateral e axial foram respectivamente $3,25 \pm 0,02$ mm e $22,0 \pm 0,02$ mm. A barra de erro indica o desvio padrão amostral.

da energização que foi feita pelo pulser/receiver (Panametrics-NDT modelo 5800, Olympus, Waltham, MA, EUA). Foram levantadas as curvas de pressões para este transdutor em função da distância no axial (eixo z) entre 2 e 45 mm. As curvas de pressões foram obtidas da média de 5 aquisições para cada posição em z para diferentes níveis de energia disponíveis no pulser/receiver ($12,5 \mu\text{J}$, $25,0 \mu\text{J}$, $50,0 \mu\text{J}$ e $100 \mu\text{J}$). Na Fig. F.6 são mostradas as curvas de calibração do transdutor de 25 MHz para diferentes níveis de energia ajustadas no pulser/receiver. O erro da medida foi considerado o desvio padrão das 5 aquisições.

Transdutor confocal côncavo terapêutico

Na segunda montagem para sonotrombólise foi utilizado um transdutor confocal côncavo de dois elementos construído no laboratório (Fig. 5.2). O transdutor apresenta uma cerâmica interna em forma de disco com raio de 14,8 mm e uma cerâmica externa com formato anelar de raio interno 16,8 mm e raio externo 22,5 mm com região confocal em 6,7 cm. Foi realizada a calibração deste transdutor utilizando o mesmo hidrofone de agulha. O transdutor apresentou frequência central em 3,16 MHz e largura de banda percentual de 7,6% (3,04-3,28 MHz) (Fig. F.7(a)). A resolução do foco no eixo axial baseado na largura à meia altura foi de 21,6 mm para cerâmica interna e 14,5 mm para cerâmica externa (Fig. F.7(b)). A resolução

Figura F.6: Calibração do transdutor de monitoramento de 25 MHz utilizado em modo pulso/eco. (a) Pulso adquirido pelo hidrofone para uma energização do transdutor de 100 μJ pelo pulser/receiver e (b) curvas de calibração do transdutor de 25 MHz para diferentes níveis de energia nominais ajustadas no pulser/receiver em função da distância no eixo axial do transdutor.

lateral do foco foi de 1,50 mm para cerâmica interna e 0,89 mm para cerâmica externa (Fig. F.7(c)).

Na Fig. F.8 são mostrados os mapas de pressão da região focal para as duas cerâmicas do transdutor confocal côncavo. Como era esperado a cerâmica externa gera um foco com melhor resolução devido à sua maior abertura em relação à cerâmica interna. Porém a cerâmica externa apresenta maior formação de lóbulos laterais devido ao vão interno.

Figura F.7: Curvas de calibração do transdutor confocal côncavo de 2 elementos. (a) Resposta em frequência, (b) curva de pressão acústica em função da tensão aplicada no gerador de função, (c) perfis axiais da região focal para as duas cerâmicas e (d) perfis laterais da região focal para as duas cerâmicas.

Figura F.8: Mapa de pico de pressão acústica das cerâmicas interna e externa do transdutor confocal côncavo (a) Mapa axial-lateral do foco gerado pela cerâmica externa, (b) mapa lateral-azimutal do foco gerado pela cerâmica externa, (c) mapa axial-lateral do foco gerado pela cerâmica interna e (d) mapa lateral-azimutal do foco gerado pela cerâmica interna.