

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 736 276**

51 Int. Cl.:

**A61N 7/00** (2006.01)  
**A61N 5/06** (2006.01)  
**A61N 5/067** (2006.01)  
**C12N 13/00** (2006.01)  
**A61B 5/00** (2006.01)  
**A61B 5/0476** (2006.01)  
**C12N 5/0793** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.07.2009 E 14182336 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019 EP 2821103**

54 Título: **Dispositivos de modulación de la actividad celular utilizando ultrasonido**

30 Prioridad:

**14.07.2008 US 80666 P**  
**04.05.2009 US 175413 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.12.2019**

73 Titular/es:

**ARIZONA BOARD OF REGENTS FOR AND ON  
BEHALF OF ARIZONA STATE UNIVERSITY  
(100.0%)  
699 South Mill Avenue, Suite 601  
Tempe, AZ 85281, US**

72 Inventor/es:

**TYLER, WILLIAM JAMES P.**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 736 276 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Dispositivos de modulación de la actividad celular utilizando ultrasonido

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a la modulación por ultrasonido de las actividades celulares, incluidos de los nervios y otras células que se encuentran en seres humanos y animales.

**Antecedentes de la invención**

10 El ultrasonido (US) se ha utilizado para muchas aplicaciones médicas, y generalmente se conoce como presión acústica cíclica con una frecuencia mayor que el límite superior de la audición humana. La producción de ultrasonido se utiliza en muchos campos distintos, normalmente para penetrar en un medio y medir la señal de reflexión o suministrar energía enfocada. Por ejemplo, la señal de reflexión puede revelar detalles sobre la estructura interna del medio. Una aplicación muy conocida de esta técnica es su uso en la ecografía para producir una imagen de un feto en un útero. Existen otras aplicaciones que pueden proporcionar efectos terapéuticos, tales como la litotricia para la destrucción de cálculos renales o el ultrasonido enfocado de alta intensidad para la destrucción térmica de tumores cerebrales.

15 Un beneficio de la terapia por ultrasonido es su naturaleza no invasiva. Por ejemplo, los procedimientos para modular la actividad neural incluyen técnicas tanto invasivas como no invasivas.

20 Las técnicas de neuromodulación, tal como la estimulación cerebral profunda (ECP) y la estimulación magnética transcraneal repetitiva, han ganado atención debido a su utilidad terapéutica en el tratamiento de numerosas enfermedades neurológicas/psiquiátricas. Se ha demostrado que estos procedimientos para estimular circuitos neuronales son prometedores para el tratamiento de tales enfermedades y trastornos como la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, coma, epilepsia, ictus, depresión, esquizofrenia, adicción, dolor neurogénico, disfunción cognitiva/de la memoria, y otros. En el contexto del laboratorio, trabajos recientes demostraron eficacia para el control óptico de milisegundos de neuronas individuales y de sinapsis en circuitos cerebrales intactos.

25 El documento US 2005/249667 desvela un dispositivo para la estimulación celular ultrasónica, en el que la frecuencia y la potencia del estímulo ultrasónico son variables.

30 Los objetivos actuales de las técnicas de neuroestimulación son modular la actividad neuronal y, de este modo, la función del sistema nervioso mediante el suministro de energía exógena a los circuitos intactos. Sin embargo, muchas de estas técnicas, tales como la ECP y la estimulación del nervio vago (ENV) precisan la implantación quirúrgica de electrodos de estimulación, un procedimiento invasivo, costoso e incluso peligroso. Por ejemplo, la implantación quirúrgica de electrodos estimulantes aumenta los riesgos médicos secundarios, tales como la infección. El costo primario asociado a la implantación quirúrgica de los dispositivos de neuroestimulación es de aproximadamente 15.000 € a 53.000 € por paciente, costos que no tienen en cuenta los costos significativos de la atención pre y posoperatoria.

35 Ultrasonido se refiere a vibraciones cíclicas en un intervalo de frecuencias por encima de la audición humana, es decir, por encima de unos 20 mil ciclos por segundo (kilohercio, kHz) e incluye frecuencias vibratorias de decenas y cientos de millones de ciclos por segundo (megahercio, MHz), por ejemplo, un intervalo de alrededor de 0,02 a 200 MHz. Se demostró por primera vez que el ultrasonido era capaz de modular la actividad neuronal mediante la inducción de la supresión reversible. Anteriormente se demostró que el ultrasonido administrado al núcleo geniculado lateral de los gatos *in vivo*, suprimía de forma reversible potenciales evocados por la luz en la corteza visual.

40 Las estrategias para afectar la actividad neuronal en el cerebro utilizando ultrasonido han empleado frecuencias ultrasónicas por encima de aproximadamente 0,6 MHz aplicadas durante largos períodos de tiempo (de varios segundos a varios minutos) y a niveles de intensidad por encima de aproximadamente 10 vatios por centímetro cuadrado ( $mW/cm^2$ , donde  $1 mW = 10^{-3}$  Vatios, y  $1 cm = 10^{-2}$  metros). Muchas de estas estrategias están destinadas a producir efectos macroscópicos, tales como la destrucción del tejido con un ultrasonido enfocado de alta intensidad (HIFU, forma siglada de *high intensity focused ultrasound*). Las frecuencias ultrasónicas utilizadas para la obtención de imágenes varían normalmente de 2,5 y 7,5 MHz.

45 Lo que se necesita son terapias no invasivas y eficaces para modular la actividad celular, incluida la actividad de las neuronas y otros tipos de células.

**Sumario de la invención**

50 El objeto de la invención se expone en las reivindicaciones adjuntas, presentándose otras realizaciones únicamente con fines ilustrativos. Los dispositivos de la presente invención comprenden uno o más componentes para generar ondas ultrasónicas, tales como emisores ultrasónicos, transductores o transductores piezoeléctricos, transductores compuestos, los CMUT (forma siglada de *capacitive micromachined ultrasound transducers*: transductores de ultrasonido capacitivos micromaquinados), y pueden proporcionarse como transductores simples o múltiples o en una

variedad de configuraciones. Las ondas ultrasónicas pueden ser de cualquier forma y pueden ser enfocadas o desenfoadas, dependiendo de la aplicación deseada. El ultrasonido puede tener una intensidad en un intervalo de 0,0001 a 900 mW/cm<sup>2</sup>.

**Descripción de las figuras**

5 Se describen a continuación los dibujos adjuntos, que se incorporan en y constituyen una parte de la presente memoria descriptiva.

La Figura 1 muestra un diagrama de bloques que ilustra un sistema para modular la actividad neuronal.

La Figura 2 muestra un gráfico que ilustra una forma de onda ultrasónica para modular la actividad neuronal.

10 La Figura 3 muestra un diagrama de flujo que ilustra, a un mayor nivel, un transductor de ultrasonido para modular la actividad neuronal.

La Figura 4A muestra una ilustración de una configuración experimental para demostrar los efectos sobre la actividad neuronal de una forma de onda ultrasónica.

La Figura 4B muestra un gráfico que ilustra una señal acústica recibida en una ubicación del tejido neural.

La Figura 4C muestra un gráfico que ilustra un espectro de la señal acústica representada en la FIG. 4B.

15 La Figura 5 muestra un gráfico que ilustra la respuesta temporal de la actividad neuronal después de la modulación.

La Figura 6A muestra un gráfico que ilustra las respuestas temporales comparativas de la actividad neuronal después de la modulación por impulsos eléctricos y después de la modulación por una forma de onda ultrasónica.

La Figura 6B muestra un gráfico que ilustra una respuesta eléctrica temporal de una neurona después de la modulación mediante una forma de onda ultrasónica.

20 La Figura 7 muestra un gráfico que ilustra los efectos ejemplares de algunos inhibidores de proceso sobre la actividad neuronal modulada por una forma de onda ultrasónica, de acuerdo con una realización; es una imagen que ilustra un efecto ejemplar sobre transitorios de sodio (Na<sup>+</sup>) neurales después de la modulación mediante una forma de onda ultrasónica.

25 La Figura 8 muestra un gráfico que ilustra un efecto temporal sobre transitorios de sodio (Na<sup>+</sup>) neurales después de la modulación mediante una forma de onda ultrasónica.

La Figura 9 muestra un gráfico que ilustra efectos temporales sobre transitorios de sodio (Ca<sup>2+</sup>) neurales y gliales después de la modulación mediante una forma de onda ultrasónica.

La Figura 10 muestra un gráfico que ilustra un efecto temporal sobre la actividad presináptica neural mediante la modulación con una forma de onda ultrasónica.

30 La Figura 11 muestra un gráfico que ilustra los efectos potenciados sobre la actividad neural mediante la modulación con formas de onda ultrasónicas particulares.

La figura 12 muestra un diagrama de bloques que ilustra un sistema informático en el que se puede implementar una realización de la invención.

35 La figura 13 muestra un dibujo de la estimulación de los eferentes del nervio vago para estimular la síntesis de insulina y/o las secreciones pancreáticas, y/o la activación de células β u otras células del páncreas.

La figura 14 muestra un dibujo de la estimulación directa del páncreas y sus células para estimular la síntesis de insulina y/o las secreciones pancreáticas, y/o la activación de células β u otras células del páncreas. Esto se puede usar solo o junto con la estimulación del nervio vago.

40 La figura 15 muestra un dibujo de la provisión de un campo de ultrasonido de barrido para suministrar ondas desenfoadas de ultrasonido de baja intensidad a múltiples regiones gastrointestinales.

La figura 16 muestra un dibujo de un sistema de componentes de transductor para afectar la actividad aferente y eferente del nervio vago para el tratamiento de la obesidad.

45 La Figura 17 muestra dibujos del uso de un sistema de transductores para el tratamiento de lesiones en la cabeza que pueden transportarse, o utilizarse sin trasladar al paciente, por el personal sanitario que aplica los primeros auxilios o el personal sanitario del servicio de urgencias.

La Figura 18A muestra la ilustración de la transmisión de formas de onda de estimulación de ultrasonido enfocadas lateralmente a la corteza motora intacta.

La Figura 18B muestra un ejemplo de la estrategia y los parámetros utilizados en la construcción de formas de onda de estimulación de US De baja intensidad.

50 La Figura 18C muestra la actividad de unidades múltiples (MUA, forma siglada de *multi-unit activity*) evocada por ultrasonido sin procesar y promedio registrada a partir de la corteza MI.

La Figura 18D muestra una estrategia para estimular los tractos corticoespinales descendentes con ultrasonido transcraneal.

55 La Figura 18E muestra trazados del electromiograma (EMG) para un suceso espontáneo y uno evocado por ultrasonido.

La Figura 19A muestra un gráfico de la latencia de respuesta por electromiograma del tríceps braquial izquierdo en respuesta a la activación de la MI derecha en función del número de ensayos repetitivo.

La Figura 19B muestra histogramas de la probabilidad de fallo del electromiograma para cuatro ITI (forma siglada de *inter-trial interval*, intervalo entre ensayos) que disminuyen progresivamente.

60 La Figura 19C muestra trazados de electromiograma sin procesar que ilustran la aplicación de tetrodotoxina (TTX) a la corteza motora que bloquea la actividad del circuito corticoespinal descendente evocado por ultrasonido.

La Figura 19D muestra registros de temperatura de M1 en respuesta a la transmisión de formas de onda ultrasónicas.

La Figura 19E muestra histogramas de amplitud de electromiograma evocado por ultrasonido normalizados representados para cuatro frecuencias ultrasónicas.

La Figura 19F muestra amplitudes de electromiograma evocado por ultrasonido normalizadas representadas en función intensidades de ultrasonido.

5 La Figura 20A muestra histogramas para la densidad sináptica media, la densidad media de vesículas sinápticas del botón axónico, la longitud de la densidad postsináptica media y el número medio de vesículas acopladas que ocupan zonas activas.

La Figura 20B muestra histogramas para la densidad media de neuronas y gliocitos positivos para caspasa 3 escindida en la corteza motora de hemisferios estimulados por ultrasonido y de control.

10 La Figura 20C muestra histogramas para los tiempos medios de marcha en la varilla giratoria y los tiempos medios de colgado del cable a las 24 h de pretratamiento y 24 h y 7 d postratamiento.

La Figura 21 muestra la estrategia para construir formas de onda ultrasónica de baja intensidad.

La figura 22 muestra la atenuación de las formas de onda ultrasónica de estímulo por transmisión transcraneal.

15 La Figura 23A muestra un gráfico de trama de picos (*spike raster plot*) que ilustra un aumento de los picos corticales en función del tiempo en respuesta a la estimulación con ultrasonido.

La Figura 23B muestra los trazados de actividad neuronal extracelular registrados en respuesta a la estimulación con ultrasonido.

La Figura 23 C muestra un histograma de tiempo posestímulo que ilustra el recuento promedio de picos de actividad de unidades múltiples (MUA) antes y después de la estimulación con ultrasonido.

20 La Figura 24A muestra un histograma que ilustra la densidad media de células positivas para c-fos de los hemisferios estimulados con ultrasonido en función de la región que se tiene como objetivo.

La Figura 24B muestra un histograma que ilustra el área media de agrupamientos que contienen células positivas para c-fos.

La Figura 25A muestra perfiles de presión normalizados después de la estimulación con ultrasonido.

25 La Figura 26A muestra una ilustración que representa algunas de las acciones mecánicas de fluidos propuestas mediante las cuales el ultrasonido puede modular la actividad neuronal,

La Figura 26B muestra una ilustración de un modelo compuesto de tejido cerebral, donde distintas interfaces celulares establecen sitios de límite que tienen distintas propiedades debido a desajustes de impedancia acústica.

30 La Figura 27A muestra una ilustración de 10 ciclos de un pulso de ultrasonido generado por onda sinusoidal a 0,50 MHz.

La Figura 27B muestra una ilustración de 10 ciclos de un pulso de ultrasonido generado por onda sinusoidal a 0,25 MHz.

La Figura 27C muestra una ilustración de 10 ciclos de un pulso de ultrasonido generado por onda cuadrada a 0,25 MHz.

35 La Figura 28A muestra una ilustración de la repetición de 10 ciclos de pulsos de ultrasonido generados por onda sinusoidal a 0,50 MHz.

La Figura 28B muestra una ilustración de la repetición de 10 ciclos de pulsos de ultrasonido generados por onda sinusoidal a 0,25 MHz.

40 La Figura 28C muestra una ilustración de la repetición de 10 ciclos de pulsos de ultrasonido generados por onda cuadrada a 0,25 MHz.

La Figura 28D muestra una ilustración de la repetición de 10 ciclos alternos de pulsos de ultrasonido generados por onda sinusoidal a 0,50 y 0,25 MHz.

La Figura 28E muestra una ilustración de la repetición de 10 ciclos alternos de pulsos de ultrasonido generados por onda cuadrada a 0,25 MHz y pulsos de ultrasonido generados por onda sinusoidal a 0,50 MHz.

45 La Figura 28F muestra una ilustración de la repetición de 10 ciclos alternos de pulsos de ultrasonido generados por onda sinusoidal a 0,25 MHz y pulsos de ultrasonido generados por onda cuadrada a 0,20 MHz.

### **Descripción detallada**

50 Los dispositivos de la presente invención comprenden uno o más componentes para generar ondas ultrasónicas, incluidos, pero sin limitación, emisores ultrasónicos, transductores o transductores piezoeléctricos, transductores compuestos, los CMUT (transductores de ultrasonido capacitivos micromaquinados), y pueden proporcionarse como transductores simples o múltiples o en una variedad de configuraciones. Las ondas ultrasónicas pueden ser de cualquier forma y pueden ser enfocadas o desenfocadas, dependiendo de la aplicación deseada. El ultrasonido puede tener una intensidad en un intervalo de 0,0001 a 900 mW/cm<sup>2</sup>.

55 Como se desvela en el presente documento, los aspectos de la invención se describen en el contexto de proporcionar ultrasonido a tejido cerebral de mamífero *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, la invención no se limita a este contexto. Por ejemplo, la actividad del tejido neural se puede modular *in vivo* en el cerebro de un organismo vivo, o en una muestra *in vitro* montada en un recipiente de cualquier tipo, para cualquier propósito, que incluye dilucidar el funcionamiento del tejido neural normal o con un trastorno, o diagnosticar o tratar un trastorno neural en un organismo vivo. Como se usa en el presente documento, un trastorno neural incluye cualquier anomalía o lesión funcional o fisiológica, o trastorno psiquiátrico, tal como el estrés y la depresión. Como se usa en el presente documento, el tejido neural incluye tejido con neuronas dentro de él, o células precursoras neurales, tales como células madre neurales, neuronas, axones, cuerpos de células neurales, ganglios, dendritas, regiones sinápticas, tejido neuronal u otras células situadas entre neuronas en un organismo vivo, tales como los gliocitos, las oligodendritas o los astrocitos. El tratamiento del

tejido neural es ejemplar y no pretende limitar la invención.

Se ha demostrado que el ultrasonido influye en la actividad neuronal al suprimir las amplitudes y/o la velocidad de conducción de los potenciales de acción evocados. Sin embargo, faltan investigaciones detalladas y los mecanismos subyacentes de estos efectos siguen siendo desconocidos. Además, casi todos estos estudios previos que examinan los efectos del ultrasonido en la actividad neuronal han implementado largos tiempos de irradiación (minutos) con ultrasonido de alta frecuencia (> 1 MHz) proporcionado a niveles de intensidad moderada (> 500 mW/cm<sup>2</sup>). El uso del ultrasonido de alta frecuencia de intensidad moderada y alta, y los largos tiempos de exposición para controlar la actividad neuronal, minimiza la practicidad del ultrasonido para modular la actividad neuronal en organismos vivos. La presente invención puede comprender ultrasonido de baja intensidad (< 500 mW/cm<sup>2</sup>) y baja frecuencia (< 0,9 MHz), y efectos en la modulación celular para influir en la actividad neuronal. Por ejemplo, baja intensidad puede comprender aproximadamente 450 mW/cm<sup>2</sup>, 400 mW/cm<sup>2</sup>, 350 mW/cm<sup>2</sup>, 300 mW/cm<sup>2</sup>, 250 mW/cm<sup>2</sup>, 200 mW/cm<sup>2</sup>, 150 mW/cm<sup>2</sup>, 100 mW/cm<sup>2</sup>, 50 mW/cm<sup>2</sup>, 25 mW/cm<sup>2</sup>, 10 mW/cm<sup>2</sup> y niveles de intensidad del ultrasonido dentro de estas cantidades establecidas, que incluyen desde aproximadamente 450 mW/cm<sup>2</sup> a aproximadamente 1 mW/cm<sup>2</sup>. El ultrasonido de baja frecuencia puede comprender intervalos de aproximadamente 0,88 MHz a aproximadamente 0,01 MHz, de aproximadamente 0,80 MHz a aproximadamente 0,01 MHz, de 0,80 MHz a aproximadamente 0,1 MHz, de aproximadamente 0,70 MHz a aproximadamente 0,1 MHz, de aproximadamente 0,60 MHz a aproximadamente 0,1 MHz, de aproximadamente 0,50 MHz a aproximadamente 0,1 MHz, de aproximadamente 0,40 MHz a aproximadamente 0,1 MHz, de aproximadamente 0,30 MHz a aproximadamente 0,1 MHz, de aproximadamente 0,20 MHz a aproximadamente 0,1 MHz, de aproximadamente 0,10 MHz a aproximadamente 0,1 MHz, y niveles de frecuencias ultrasónicas dentro de estas cantidades establecidas.

Como se usa en el presente documento, las intensidades y frecuencias citadas son los niveles de intensidad y frecuencia en el sitio del tejido efectivo, no el número de salida real del transductor. Por ejemplo, la forma de onda de presión experimentada en el sitio del tejido diana está por debajo de aproximadamente 0,9 Mhz o 900 mW/cm<sup>2</sup>. La salida de un transductor puede tener que ser mucho mayor que la cantidad efectiva resultante en el sitio del tejido diana. Por ejemplo, un transductor puede generar 90 W para su transmisión a un cráneo intacto para que la cantidad efectiva en el cerebro sea inferior a aproximadamente 0,9 Mhz o 900 mW/cm<sup>2</sup>, dado que el cráneo absorbe una parte significativa de las ondas ultrasónicas. Por lo tanto, las frecuencias e intensidades establecidas y reivindicadas en el presente documento son las frecuencias e intensidades experimentadas en el sitio del tejido diana, no la salida de los transductores de ultrasonido.

Como se usa en el presente documento, proporcionar un tratamiento de ultrasonido o ultrasonido a un sitio diana para modular la actividad celular comprende proporcionar a un sujeto una forma de onda de estimulación de ultrasonido. Alternativamente, forma de onda de estimulación de ultrasonido también se puede denominar en el presente documento como una forma de onda, y los dos términos se usan indistintamente como pueden entender los expertos en la materia. Se puede proporcionar una forma de onda de estimulación a un sujeto, ser humano, animal u otros sujetos, una o múltiples veces en un solo tratamiento, o en un régimen de tratamiento continuo que continúa por un día, días, semanas, meses, años durante toda la vida del sujeto. La determinación de la duración del tratamiento necesario está dentro de las competencias de los profesionales médicos y/o de investigación. La presente invención contempla que una forma de onda de estimulación tiene las características que se describen en el presente documento. Por ejemplo, en tratamientos particulares, una forma de onda de estimulación de ultrasonido pulsado se puede transmitir durante aproximadamente 10 microsegundos, durante aproximadamente 25 microsegundos, durante aproximadamente 50 microsegundos, durante aproximadamente 100 microsegundos, durante aproximadamente 250 microsegundos, durante aproximadamente 500 microsegundos, durante aproximadamente 1000 microsegundos, durante aproximadamente 2000 microsegundos, durante aproximadamente 3000 microsegundos, durante aproximadamente 4000 microsegundos, durante aproximadamente 5000 microsegundos, durante aproximadamente 1 segundo, durante aproximadamente 2 segundos, durante aproximadamente 3 segundos, durante aproximadamente 4 segundos, durante aproximadamente 5 segundos, durante aproximadamente 6 segundos, durante aproximadamente 7 segundos, durante aproximadamente 8 segundos, durante aproximadamente 9 segundos, durante aproximadamente 10 segundos, y después este tratamiento puede repetirse durante el mismo lapso de tiempo o uno distinto, una o más veces. Por ejemplo, se puede proporcionar una forma de onda de estimulación cada 11 segundos durante aproximadamente 250 microsegundos durante años, o durante la vida del sujeto.

La FIG. 1 es un diagrama de bloques que ilustra un sistema 100 para modular la actividad celular, de acuerdo con una realización en la que el sitio diana es tejido neural. Para ilustrar el funcionamiento del sistema 100, se representa un cuerpo 190 con una superficie externa 192 que abarca el tejido neural 194. Sin embargo, el sistema 100 no incluye el cuerpo 190 o su superficie externa 192, o el tejido neural 194. El cuerpo 190 puede ser un organismo vivo, tal como un ser humano o animal u otro sujeto, o una parte del mismo, tal como una cabeza y un cráneo. El cuerpo puede ser un recipiente que contenga una muestra *in vitro*, tal como un cilindro de vidrio lleno de agua o líquido cefalorraquídeo artificial y un corte suspendido extraído del cerebro de un organismo.

El sistema 100 incluye componentes para generar ondas ultrasónicas tales como transductores de ultrasonido 110, que incluyen el transductor 110a y el transductor 110b, y el controlador 150. En algunos aspectos, el transductor puede ser un transductor emisor, un transductor receptor y transmisor, o un transductor receptor. Los transductores de ultrasonido 110 están conectados al controlador 150 para recibir la forma de onda y la energía, y los transductores son accionados por el controlador. Los transductores están acoplados acústicamente a la superficie externa 192 del cuerpo 190 para introducir energía acústica en el cuerpo 190. Los transductores 110 utilizan la forma de onda y la

energía recibidas para emitir haces acústicos de frecuencias ultrasónicas 120, tal como el haz 120a desde transductor 110a y el haz 120b desde transductor 110b. El controlador 150 incluye un procedimiento 154 para la formación de formas de onda, que determina la forma de onda que emitirán los transductores 110a al cuerpo 190. En algunas realizaciones, los transductores funcionan con baterías y reciben solo información de formas de onda del controlador 150.

Aunque a fines ilustrativos en la FIG. 1 se representa un número particular de transductores y controladores, en otras realizaciones, se incluye más o menos o el mismo número de transductores, y el controlador 150 se reemplaza por uno o más dispositivos, cada uno de los cuales realiza una función distinta, o redundante, del controlador 150, incluido el procedimiento de formación de formas de onda 154. Aunque la FIG. 1 representa conexiones cableadas separadas entre los transductores 110 y el controlador 150 para enviar energía y formas de onda a los transductores 110, en otras realizaciones, una o más conexiones pueden ser inalámbricas, o transmitir energía o formas de onda para múltiples transductores 110.

En la realización ilustrada, los dos transductores 110 transmiten cada uno un haz acústico al cuerpo 190, que se intersecan en la región de intersección de haces 122. En algunas realizaciones, la forma de onda transmitida en un haz es eficaz en la modulación de la actividad neural en todos los lugares en que el haz interseca el tejido neural. En algunas realizaciones, la forma de onda transmitida en un haz solo es eficaz (o más eficaz) en una región de intersección 122 con otro haz. En algunas realizaciones, las formas de onda transmitidas son eficaces solo en una parte de la región de intersección 122, dependiendo de los patrones de interferencia de interferencia constructiva y destructiva entre las formas de onda en los haces que se intersecan.

La intensidad del haz acústico viene dada por la cantidad de energía que incide en un plano perpendicular al haz por unidad de tiempo dividido por el área del haz en el plano, y se da en energía por unidad de tiempo por unidad de área, es decir, la densidad de energía por unidad de área, por ejemplo, vatios por centímetro cuadrado ( $W/cm^2$ ). Esta es la intensidad promedio temporal y de pico espacial ( $I_{spta}$ , forma siglada de *spatial-peak temporal-average intensity*); y se usa rutinariamente para la intensidad de aquí en adelante en el presente documento. En las realizaciones ilustradas, la  $I_{spta}$  es menor que  $500\text{ mW/cm}^2$ . Otra definición de intensidad ampliamente utilizada en la técnica es la intensidad promedio de pulso de pico espacial ( $I_{pa}$ ); para los pulsos de ciclos múltiples utilizados en la realización ilustrada, el  $I_{pa}$  es normalmente menor que  $10\text{ W/cm}^2$ .

Para transmitir un haz acústico 120 a un cuerpo 190 se puede usar cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar los transductores Archimedes SI (Array Therapeutic, Scottsdale, Arizona, EE. UU.), que son un tipo de transductores piezoeléctricos (TPZ). Un Archimedes SI tiene dos frecuencias de respuesta pico en las que la presión acústica transmitida es del 71 % (-3 dB) de su valor máximo. Por ejemplo, los transductores Arquímedes tuvieron un pico a 0,44 MHz y otro a 0,67 MHz. Se pueden usar otros transductores de ultrasonido, incluidos, pero sin limitación, los transductores de frecuencia central de 0,5 MHz Olympus NDT/Panametrics, así como los transductores de frecuencia central de 0,5 y 0,35 MHz Ultran.

En algunas realizaciones, se puede aplicar tecnología de transductor ultrasónico capacitivo micromecanizado (CMUT). Por ejemplo, los CMUT se pueden disponer en diseños de sistemas flexibles que permiten de forma cómoda la formación y el enfoque de haces adaptativos. Y en otras realizaciones, los CMUT pueden montarse dentro de una cavidad corporal para transmitir ultrasonido a células, tejidos u órganos. Además, los CMUT se pueden montar en el cráneo para transmitir el ultrasonido a diversas regiones del cerebro.

En el controlador 150 se puede usar cualquier dispositivo conocido en la técnica. En una realización ilustrada, las formas de onda se generaron utilizando un generador de funciones Agilent 33220A (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, California, EE. UU.) y se amplificaron utilizando un amplificador ENI 240L RF. Los pulsos en algunas formas de onda se desencadenaron utilizando un segundo generador de funciones 33220A de Agilent. Los datos que controlan los dispositivos anteriores pueden generarse mediante el proceso de formación de forma de ondas 154, utilizando un ordenador de uso general con instrucciones por programa informático, como se describe con más detalle en una sección posterior.

Aunque el sistema 100 está representado con dos transductores y los haces correspondientes, pueden incluirse en un sistema más o menos transductores o haces, o ambos.

Los sistemas y dispositivos para proporcionar ultrasonido para la presente invención pueden comprender materiales que doblan la luz o el sonido y pueden enfocar las ondas. Dichos materiales se han utilizado para fabricar súper lentes. Dichos materiales, súper lentes y otros componentes similares pueden usarse para enfocar las ondas ultrasónicas en los dispositivos de la presente invención. Por ejemplo, los transductores, de cualquier tipo, junto con un elemento de enfoque, tal como una súper lente o metamaterial, se utilizan para enfocar las ondas ultrasónicas utilizadas para modular la actividad celular. Dichos materiales pueden refractar la luz hacia atrás o tener un índice de refracción negativo, y se han denominado "metamateriales". Un ejemplo de un metamaterial es un dispositivo de enfoque de sonido que comprende una matriz de aluminio de cavidades de resonancia de cuello estrecho con dimensiones que están ajustadas para interactuar con las ondas ultrasónicas. Las cavidades pueden estar llenas de agua. Se puede utilizar un elemento de enfoque, tal como un metamaterial, junto con uno o más transductores y/o con series de transductores en fase.

La FIG. 2 es un gráfico que ilustra una forma de onda ultrasónica 200 para modular la actividad neuronal. El eje horizontal 202 indica el tiempo, y el eje vertical 204 indica la presión, ambos en unidades arbitrarias. La forma de onda 200 moduladora contiene uno o más pulsos, tal como el pulso 220a y el pulso 220b, y el pulso 220c. Cada pulso incluye uno o más ciclos a una frecuencia ultrasónica. Por ejemplo, el pulso 220a incluye cinco ciclos de una frecuencia ultrasónica con un período ( $\tau$ ) 210 en segundos igual a la inversa de la frecuencia ( $f$ ) en hercios (es decir,  $\tau = 1/f$ ). El número de ciclos en un pulso se designa como ciclos por pulso ( $c/p$ ). La longitud de pulso 222 se designa  $PL$  y se da en segundos por el producto del período  $\tau$  y el número de ciclos por pulso  $c/p$ , es decir,  $PL = \tau * c/p$ .

Los pulsos están separados por períodos de inactividad que están relacionados con el tiempo entre los inicios del pulso, mostrado en la FIG. 2 como tiempo de repetición de pulsos 230. La inversa del tiempo de repetición de pulsos 230 en segundos es la tasa de repetición de pulsos en hercios, denominada en el presente documento frecuencia de repetición de pulsos PRF (forma siglada de *pulse repeat frequency*), para distinguirla de la frecuencia ultrasónica  $f$ . La frecuencia de repetición de pulsos PRF puede ser constante para una forma de onda 200. La frecuencia de repetición de pulsos PRF puede aumentar de un mínimo ( $PRF_{\min}$ ) a un máximo ( $PRF_{\max}$ ) en un intervalo de tiempo llamado tiempo de rampa. Por ejemplo, la PRF aumenta de una  $PRF_{\min} = 0$  a una  $PRF_{\max} = 3000 \text{ Hz}$  durante tiempo de rampa = 5 segundos. La PRF varía entre 0,001 y 10 KHz en la presente invención. La forma de onda continúa durante una duración de forma de onda 234 que termina con el último pulso en la forma de onda. El número de pulsos en la forma de onda se designa  $Np$ .

La amplitud de presión de la onda ultrasónica es proporcional a un intervalo de voltaje utilizado para accionar un transductor piezoeléctrico (PZT). Por ejemplo, en las realizaciones ilustradas, el intervalo de voltaje se selecciona entre 100 milivoltios (mV,  $1 \text{ mV} = 10^{-3}$  voltios) y 500 mV, lo que corresponde a niveles de intensidad menores que  $500 \text{ mW/cm}^2$ . Los pulsos se muestran en la FIG.2 como ondas sinusoidales que tienen una única frecuencia ultrasónica.

La FIG. 3 es un diagrama de flujo que ilustra, de forma general, el uso de un transductor de ultrasonido 300 para modular la actividad neural. Aunque a fines ilustrativos se muestra un número particular de etapas en un orden particular, una o más etapas se pueden realizar en un orden distinto o solapantes en el tiempo, en serie o en paralelo, o se pueden omitir o añadir una o más etapas, o se pueden cambiar en alguna combinación de formas.

En la etapa 310, uno o más transductores de ultrasonido están acoplados acústicamente a una superficie exterior de un cuerpo que puede incluir o abarcar tejido neural u otros tejidos. Uno o más transductores pueden ser series de transductores en fase. El cuerpo puede ser un recipiente con líquido cerebral producido artificialmente, en el cual se suspende un corte de tejido neural. El acoplamiento puede ser el contacto directo de un hidrófono piezoeléctrico de ultrasonido con el líquido en el recipiente, o un acoplamiento mecánico de un material piezoeléctrico a una pared del recipiente. Para terapia, el cuerpo es un paciente y los transductores están acoplados acústicamente a la piel del paciente, tal como en la cabeza o la espalda. El acoplamiento acústico puede verse afectado por un gel u otra sustancia, bien conocida en la técnica, que impida la pérdida de energía acústica en el aire que rodea al paciente. La etapa 310 incluye el afeitado de pelo de una parte de la cabeza de un paciente. Los transductores de ultrasonido acoplados por aire pueden transmitir pulsos de ultrasonido a través del aire de manera que se dirijan al tejido neural penetrando en la piel, los huesos, los músculos y la fascia subyacente. Se pueden atornillar uno o más transductores de ultrasonido directamente a una estructura, tal como el cráneo debajo de la piel, o se pueden montar transductores de ultrasonido en la cavidad de un paciente, tal como en la cavidad peritoneal o torácica.

En la etapa 320, el uno o más transductores (o series de transductores en fase) acoplados al cuerpo se accionan a frecuencias ultrasónicas y baja intensidad en múltiples pulsos cortos que son eficaces en la modulación de la actividad neural en al menos una parte del tejido neural. Por ejemplo, el haz intersecta solo una parte del tejido neural, o múltiples haces intersectan en una parte del tejido neural y solo se modula el tejido en las regiones de interferencia constructiva y/o destructiva. Cabe destacar que la escala de patrones de interferencia constructiva es de milímetros, basándose en la longitud de onda ultrasónica en el tejido neural. Por ejemplo, la velocidad del sonido en el agua se aproxima a la velocidad del sonido en el tejido corporal blando y es de aproximadamente 1500 metros por segundo. Por lo tanto, a frecuencias ultrasónicas de 0,1 a 1 MHz, la longitud de onda del ultrasonido está entre aproximadamente 1,5 mm y aproximadamente 15 mm. Los patrones de interferencia constructiva y/o destructiva están en el mismo orden que estas longitudes de onda.

Las frecuencias ultrasónicas pueden seleccionarse para que penetren en el tejido neural o en el tejido diana. Para muestras suspendidas en recipientes y transductores unidos al exterior de todo el recipiente, la frecuencia ultrasónica se selecciona en un intervalo que pase de forma eficaz a través de la pared del recipiente (por ejemplo, vidrio) con poca atenuación. Para los transductores que están en contacto directamente con el líquido cerebral, la penetración de un material distinto no es un problema significativo. Para los transductores colocados en la cabeza de un paciente, la frecuencia ultrasónica debe pasar a través del cráneo con poca absorción, para evitar que se caliente el cráneo, lo que puede provocar incomodidad o lesiones al paciente. Se ha descubierto que las frecuencias ultrasónicas entre aproximadamente 0,2 MHz y aproximadamente 0,9 MHz pasan a través del cráneo con poco calentamiento perjudicial, incluso a alta intensidad si se implementan las precauciones de enfriamiento adecuadas. La intensidad del ultrasonido se elige para que tenga un efecto modulador en el tejido neural sin dañar el tejido. Se ha descubierto que las intensidades por debajo de aproximadamente  $500 \text{ mW/cm}^2$  son eficaces para modular la actividad neural sin que se detecte daño a las neuronas y otras células en el tejido cerebral.

En la etapa 330, se determina un efecto sobre la actividad neural. El efecto puede ser la estimulación o supresión de la actividad neural. Por ejemplo, se detecta un aumento o disminución de la fluorescencia que indica actividad neural, o se detecta un cambio en el voltaje de membrana. Se pueden verificar otros fenómenos que reflejan la actividad neural, tal como tomografías por emisión de positrones (PET) y señales de metabolitos cerebrales en imágenes de resonancia magnética nuclear (RM) u otras medidas de la actividad neural, tal como el electroencefalograma (EEG) o la magnetoencefalografía (MEG). Se puede determinar un cambio en la progresión o síntoma de una enfermedad o trastorno. Cuando la eficacia terapéutica está bien establecida, la etapa 330 puede omitirse.

La FIG. 4A es un diagrama de bloques que ilustra una configuración experimental 400 para demostrar los efectos sobre la actividad neuronal de una forma de onda ultrasónica. La configuración 400 incluye un recipiente que contiene líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa) 490 y un corte de tejido neural 494 cargado con un marcador fluorescente, que se utiliza para detectar la actividad neural. Un transductor de ultrasonido 410 está acoplado al LCRa e introduce uno o más pulsos de ultrasonido de baja energía 422 en un haz acústico 420 dirigido sobre el corte de tejido neural 494. El corte se monta a una distancia del transductor que se indica en la FIG. 4 por la columna de LCRa 492. La configuración incluye un microscopio de formación de imágenes confocal de barrido láser 480 que inspecciona el tejido neural antes, durante y después de la exposición a ultrasonido, para detectar cambios en la actividad neural.

Se puede montar un cerebro completo en el LCRa 490, en lugar del corte 494. Para determinar la intensidad acústica que incide en la ubicación del corte 494, en una etapa de calibración realizada en algunas realizaciones de la etapa 320, un hidrófono reemplaza el corte 494 mientras se acciona el transductor 410. En diversas realizaciones se ajusta la altura de la columna de LCRa 492. Por ejemplo, en diversas realizaciones, la altura de la columna 492 se varió de 4,5 a 45 mm.

La FIG. 4B es un gráfico 430 que ilustra una señal acústica 436 recibida en una ubicación de tejido neural, medido por un hidrófono. El eje horizontal 432 indica el tiempo en microsegundos ( $\mu\text{s}$ ,  $1 \mu\text{s} = 10^{-6}$  segundos). El eje vertical 434 indica presión en megapascales (MPa,  $1 \text{ MPa} = 10^6$  pascales =  $10^6$  newtonios por metro cuadrado y es aproximadamente diez veces la presión atmosférica). La señal 436 se midió a una altura de aproximadamente 2 mm por encima del transductor 410, que se accionó a una frecuencia ultrasónica de 0,44 MHz en un solo pulso que incluía 10 ciclos y pulsos con un intervalo de voltaje de 500 mV p-p, y se amplificó adicionalmente utilizando un amplificador de RF de ganancia de 50 dB.

La FIG. 4C es un gráfico 440 que ilustra un espectro 446 de la señal acústica representada en la FIG. 4B. El eje horizontal 442 indica la frecuencia en megahercios. El eje vertical 444 indica la amplitud en unidades arbitrarias. El espectro 446 se calculó a partir de la señal de presión 436 utilizando una transformada rápida de Fourier (TRF) digital, y contiene un pico destacado 447 a 0,44 MHz, la frecuencia de accionamiento de ultrasonido para el transductor 410.

Una forma de onda ultrasónica de referencia designada USW-1 consta de 250 pulsos de ultrasonido, consistiendo cada pulso en 10 ciclos de onda cuadrada a 0,44 MHz, para una longitud de pulso de 22,7 microsegundos. La frecuencia de repetición de pulsos (PRF) asciende en cinco segundos de la  $\text{PRF}_{\text{mín}} = 0$  hasta la  $\text{PRF}_{\text{máx}} = 100$  Hz (promediando así 50 pulsos por segundo durante los primeros 5 segundos). La duración total de la forma de onda es, por lo tanto, de 5 segundos. La amplitud de onda cuadrada de pico a pico que acciona el transductor de la realización ilustrada era de 500 mV. La intensidad de ultrasonido promedio del pulso correspondiente es de  $23 \text{ mW/cm}^2$ .

Se puede usar histología para observar la actividad neuronal modulada. Por ejemplo, al final de la forma de onda, 5 segundos después del inicio de la modulación por USW-1, las emisiones fluorescentes en las regiones CA1 SP (forma siglada de *stratum pyramidale*: estrato piramidal) y CA1 SR (forma siglada de *stratum radiatum*: estrato radiado) son mayores que las emisiones fluorescentes en las mismas regiones 2 segundos antes de la modulación por la forma de onda ultrasónica. Dicha comparación histológica indica una modulación significativa de la actividad neural por esta forma de onda ultrasónica a esta intensidad baja.

La FIG. 5 es un gráfico 530 que ilustra la respuesta temporal de la actividad neuronal después de la modulación. El eje horizontal 532 es tiempo en segundos; y la escala horizontal está proporcionada por el segmento 531 que corresponde a 10 segundos. El eje vertical 534 indica  $\Delta F$  en porcentaje (%); y la escala vertical está proporcionada por el segmento 535 que corresponde a 10 %. El inicio de USW-1 se indica mediante la indicación 533. Las respuestas individuales después de cada forma de onda ultrasónica se dan mediante los trazados 540. Una curva 540 gruesa de luz indica la respuesta temporal promedio. Como se puede ver en el gráfico 530, la actividad neural indicada por la spH (forma siglada *synaptopHluorin*: sinaptopHluorina) aumenta fuertemente durante los cinco segundos de duración de la forma de onda ultrasónica hasta casi el 20 %, y permanece elevada, aunque a un nivel cada vez menor, durante más de 10 segundos después de que termina la forma de onda. Esto indica una modulación significativa y persistente de la actividad neural por esta forma de onda ultrasónica a esta intensidad baja.

La FIG. 11 es un gráfico de barras que ilustra los efectos potenciados sobre la actividad neural mediante la modulación con formas de onda ultrasónicas particulares. El eje horizontal indica distintas formas de onda de baja intensidad, a intensidades menores que  $500 \text{ mW/cm}^2$ . El eje vertical indica el pico de  $\Delta F$  medio obtenido para muchas neuronas en respuesta a la forma de onda, normalizado por el pico de  $\Delta F$  medio obtenido de muchas neuronas en respuesta al USW-1.



La barra 1210 indica la  $\Delta F$  normalizado para USW-1 y es igual a 1 por definición. Recordemos que USW-1 se caracteriza por  $f = 0,44$  MHz,  $c/p = 10$ ,  $Np = 250$ ,  $PRF =$  rampa (para una duración de forma de onda de 5 segundos). La barra 1220 indica la  $\Delta F$  normalizada para una forma de onda (denominada USW-1220 de aquí en adelante en el presente documento) caracterizada por  $f = 0,44$  MHz,  $c/p = 80$ ,  $Np = 10$ ,  $PRF = 10$  Hz (para una duración de forma de onda de 1 segundo). La barra 1230 indica la  $\Delta F$  normalizada para una forma de onda (denominada USW-1230 de aquí en adelante en el presente documento) caracterizada por  $f = 0,44$  MHz,  $c/p = 80$ ,  $Np = 3$ ,  $PRF = 10$  Hz (para una duración de forma de onda de solo 0,3 segundos). La barra 1240 indica la  $\Delta F$  normalizada para una forma de onda (denominada USW-1240 de aquí en adelante en el presente documento) caracterizada por  $f = 0,44$  MHz,  $c/p = 80$ ,  $Np = 30$ ,  $PRF = 10$  Hz (para una duración de forma de onda de 3 segundos). La barra 1250 indica la  $\Delta F$  normalizada para una forma de onda compuesta (denominada USW-1250 de aquí en adelante en el presente documento) caracterizada por múltiples frecuencias ultrasónicas, ciclos por pulso y frecuencias de repetición de pulsos, como se describe con más detalle a continuación.

USW-1 produce efectos comparables a los efectos terapéuticos producidos por la estimulación eléctrica de electrodos implantados quirúrgicamente. Como puede verse en el gráfico 1200, varias formas de onda producen efectos, aproximadamente tres veces el efecto de USW-1 y más, sin la intrusión y el peligro de los electrodos implantados.

Los efectos de USW-1220 y USW-1230 muestran que menos pulsos en la misma frecuencia son eficaces. El efecto de USW-1240 a la misma frecuencia ultrasónica pero de mayor duración disminuye ligeramente, y el efecto del USW-1 a la misma frecuencia pero incluso de mayor duración disminuye sustancialmente, lo que sugiere un efecto de saturación en componentes particulares de la membrana celular afectados por esta frecuencia ultrasónica.

Para evitar tal saturación, USW-1250 cambia varios aspectos de los pulsos. En concreto, USW-1250 se caracteriza por  $f = 0,22$  MHz,  $c/p = 10$ ,  $Np = 25$ ,  $PRF =$  rampa de 0 a 50 Hz durante 1 segundo; seguido de  $f = 0,44$  MHz,  $c/p = 10$ ,  $Np = 150$ ,  $PRF =$  rampa de 0 a 100 Hz durante 3 segundos; seguido de  $f = 0,67$  MHz,  $c/p = 7$ ,  $Np = 150$ ,  $PRF =$  rampa de 0 a 150 Hz durante 2 segundos (durante una duración de forma de onda de 6 segundos). USW-1250 produce casi cuatro veces el efecto de USW-1 y ninguna de las saturaciones sugeridas por USW-1240 y USW-1.

Otras formas de onda con múltiples características de pulsos son eficaces para modular la actividad neuronal y la actividad celular. Otra forma de onda eficaz se caracteriza por  $f = 0,44$  MHz,  $c/p = 10$ ,  $Np = 10$ ,  $PRF = 1$  Hz (para una duración de diez segundos). Esta forma de onda produjo una depresión de la actividad neuronal en los experimentos.

El transductor de ultrasonido (US) se puede acoplar acústicamente a una superficie externa de un sujeto o, alternativamente, el transductor de US puede estar en un intervalo acústicamente eficaz del tejido diana, y el transductor de ultrasonido se puede accionar para formar formas de onda de estimulación en el tejido, célula u órgano con una intensidad inferior a aproximadamente 900 milivatios por centímetro cuadrado ( $mW/cm^2$ ).

Accionar el transductor de ultrasonido comprende adicionalmente accionar el transductor de ultrasonido para formar una forma de onda de fluctuación de presión o una forma de onda de estimulación que incluye una pluralidad de pulsos. La duración del pulso puede ser variable dependiendo de un dispositivo en particular, y tiene una duración de 10 segundos o menos, tal como de aproximadamente 100 a 10000 microsegundos. Accionar el transductor de ultrasonido puede comprender adicionalmente accionar transductores de ultrasonido para formar una forma de onda de fluctuación de presión o una forma de onda de estimulación que sea menor de diez segundos (s). Esto comprende solo una forma de onda de estimulación y esta forma de onda puede repetirse un número casi infinito de veces. Como se usa en el presente documento, la forma de onda de fluctuación de presión y la forma de onda de estimulación se usan de indistintamente.

Accionar el transductor de ultrasonido puede comprender adicionalmente accionar transductores de ultrasonido para formar una forma de onda de estimulación a una frecuencia por encima de 0,20 MHz. La forma de onda puede ser una o más de las formas de onda conocidas arbitrarias o no, incluyendo, pero sin limitación, sinusoidal, cuadrada, dentada y triangular. Las ondas ultrasónicas pueden enfocarse para proporcionar acción en un sitio particular en o sobre el sujeto, o las ondas pueden estar desenfocadas y proporcionar acción en múltiples sitios. La frecuencia o intensidad puede ser uniforme a lo largo de un período de tratamiento, o puede alternar o barrer de un número a otro, y volver al número original. Los expertos en la materia pueden determinar tales parámetros para la aplicación deseada. En el presente documento se desvelan ejemplos.

El ultrasonido de baja intensidad y baja frecuencia descrito en el presente documento se puede usar para estimular rutas moleculares celulares en las células, y, por ejemplo, para provocar que (i) secreten moléculas de señalización (es decir, insulina de las células beta, BDNF, GDNF de las neuronas y la glía, CCK de células intestinales, etc.), (ii) aumente la proliferación celular, (iii) se induzca la diferenciación celular, (iv) se module la transcripción, (v) se module la traducción o (vi) una combinación de los mismos. Estas acciones pueden implicar un proceso dependiente de calcio. Por ejemplo, el calcio puede provenir de depósitos intracelulares tales como IP3, RyR y TRP, o de otros canales iónicos de membrana, tales como canales sensibles al voltaje, mecanosensibles y TRP.

El uso de ultrasonidos de baja intensidad y baja frecuencia puede activar las rutas de señalización de calcio para el uso de diversas terapias en diversos tipos de tejidos/células (tales como las células beta en el páncreas para el tratamiento de la diabetes, las cardiocitos para el tratamiento de trastornos cardíacos y otros, como se describe en el presente documento). La acción del ultrasonido descrito en el presente documento puede funcionar tanto en las células

neurales como en las no neurales activando rutas de señalización y, de este modo, tener un valor terapéutico. Por ejemplo, para tratar la lesión cerebral traumática, el ultrasonido puede usarse para estimular la liberación de agentes neuroprotectores sin provocar que las células activen potenciales de acción, aunque el ultrasonido puede usarse para inducir potenciales de acción, si se desea. Para un tratamiento de la diabetes, se puede proporcionar ultrasonido para la estimulación de la secreción de insulina (a través de acciones directas sobre las células beta o mediante la neuroestimulación de los eferentes vagales), así como provocar que las células beta proliferen al estimular el páncreas directamente con ultrasonido.

Los dispositivos de la presente invención pueden usarse para modificar la dinámica de fluidos de los órganos y líquidos dentro de los órganos, tales como líquidos cerebrales y/o membranas neuronales viscoelásticas, de una manera que aumenta o disminuye la actividad neuronal. El dispositivo de ultrasonido de la presente invención puede modificar canales para regular iones, así como la mecánica de fluidos de una manera como para modificar directamente la actividad de las células que residen en los líquidos extracelulares o las ondas ultrasónicas pueden modificar la dinámica de fluidos y la permeabilidad de la membrana de las células directamente. Proporcionar ondas ultrasónicas a un tejido diana puede modificar la dinámica de fluidos de ese tejido diana, tal como se ve afectado. El US puede actuar sobre los líquidos extracelulares e intracelulares, así como sobre las propias membranas celulares, dando como resultado al menos la modificación de la actividad de las células.

La modulación de la actividad celular por ultrasonido puede comprender un cambio en la secreción de moléculas de señalización, de la proliferación de células, de la diferenciación de células, de la modulación de la transcripción de proteínas, de la modulación de la traducción de proteínas, de la modulación de la fosforilación de proteínas, de la modulación de la estructura de proteínas, tal como mediante el cambio de estructura de la proteína en sí o mediante la dimerización u otra formación de multímeros de proteínas, la activación de caspasas u otras proteínas, o una combinación de las mismas. Dichos cambios en la actividad o actividades celulares pueden detectarse en las propias células, en los resultados de tales cambios celulares sobre estructuras tales como cambios en la actividad nerviosa u otros cambios físicos, tales como el uso o la liberación alterada de insulina por parte de las células, una actividad cerebral restablecida o el cese de la actividad cerebral, u otros parámetros físicos que puedan medirse para el sujeto tratado. Los expertos en la materia conocen procedimientos para detectar un cambio en la actividad celular. Dichas pruebas incluyen pruebas desde el nivel de la biología molecular hasta determinaciones anatómicas macroscópicas, por ejemplo, tasas de transcripción de ADN, cambios en la fosforilación de proteínas y determinaciones fisiológicas tales como análisis de sangre, pruebas de liberación y uso de hormonas, pruebas de la función nerviosa e informes sobre la salud, dolor, cese o aumento de la libido o pulsiones de los sujetos.

El dispositivo de la presente invención se puede usar para modular la actividad celular de las células neurales. El dispositivo se puede usar para modular la actividad celular de una manera no invasiva, mediante la transmisión de conjuntos específicos de formas de onda ultrasónica (US) pulsado a circuitos neuronales intactos. Sin el deseo de quedar ligados a ninguna teoría en particular, actualmente se cree que el patrón (o patrones) espaciotemporal de la energía del US en sí, así como sus acciones sobre un circuito neuronal, puede estar relacionado con la modulación de la actividad neuronal. La secuencia (o secuencias) de pulsos proporcionada al tejido puede estar relacionada con la estimulación/inhibición satisfactoria de la actividad neuronal. El dispositivo de la presente invención puede usarse para la modulación de células, incluyendo células neuronales, en cortes de cerebro, en cerebros completos *ex vivo* y en circuitos cerebrales intactos. Dichos dispositivos pueden comprender distintos tipos de transductores de ultrasonido y pueden adquirirse de distintos fabricantes, por ejemplo, Array Therapeutic, LLC, Olympus NDT/Panametrics y Ultrason.

Se pueden utilizar pulsos de US *in vivo* que tengan integrales de intensidad de pulso inferiores en comparación con los utilizados *in vitro*. Para lograr una intensidad temporal promedio similar a las utilizadas *in vitro*, los pulsos de US se proporcionaron al cerebro intacto con una frecuencia de repetición de pulsos más alta que las utilizadas *in vitro*. Las intensidades que varían de aproximadamente 0,0001 a 900 mW/cm<sup>2</sup> con frecuencias (de múltiples componentes; véanse las FIG. 27 y 28) que varían de aproximadamente 0,1 a 0,9 MHz, son eficaces para modular la actividad neuronal. Una intensidad temporal promedio ( $I_{TA}$ , forma siglada de *temporal average intensity*) para pulsos de US de más de 20 mW/cm<sup>2</sup>, y de aproximadamente 50 mW/cm<sup>2</sup> en el sitio de las células, son útiles para estimular la actividad neuronal. Para modular la actividad neuronal en el cerebro intacto de un organismo, la invención comprende el uso de valores de intensidad menores que 100 W/cm<sup>2</sup> y frecuencias menores a 0,9 MHz, que se producen en el circuito neuronal que se tiene como objetivo.

La presente invención comprende el uso de ultrasonido pulsado de baja intensidad y baja frecuencia para afectar la modulación de células neuronales. El US puede proporcionarse solo o con otros agentes. Dichos otros agentes pueden proporcionarse al sujeto antes, durante o después de la exposición al US. Dichos agentes incluyen, pero sin limitación, genes exógenos, productos químicos, proteínas, productos farmacéuticos, gases, antibióticos, moléculas sustrato, moléculas iónicas u otros agentes activos

Las formas de onda de US pulsado útiles para modular la actividad neuronal pueden crearse usando distintos procedimientos. Por ejemplo, los circuitos neuronales se pueden excitar de manera clara y robusta utilizando ultrasonido pulsado que tenga < 0,9 y > 0,2 MHz. Por ejemplo, se ha descubierto que una onda continua de US a frecuencias de 0,2 a 0,9 MHz no produce estimulación neuronal, sino más bien inhibición de la actividad, de forma que no se obtienen respuestas. El US se puede usar en un conjunto específico de secuencias de pulsos para la estimulación de la actividad neuronal dentro de ese intervalo de frecuencias. El US se puede proporcionar en pulsos

de ultrasonido enfocados, o se puede proporcionar como ondas planas colimadas o desenfocadas. Dichas ondas ultrasónicas se pueden proporcionar usando componentes de ultrasonido individuales, tales como un transductor, o de 1 a 299 transductores, y algunos dispositivos de componentes pueden contener hasta 1000 transductores para el control del enfoque y la resolución.

5 El dispositivo de la presente invención se puede usar para estimular la actividad cerebral utilizando formas de onda de US construidas con distintos pulsos de US (de 1 a 50.000 ciclos) que tengan una frecuencia particular, y después alternando la longitud y la frecuencia de los pulsos de US de manera que toda la forma de onda de estimulación está compuesta de pulsos de US que tengan frecuencias y duraciones fundamentales variables. Sin el deseo de quedar ligados a ninguna teoría en particular, actualmente se cree que alternando las frecuencias de US dentro de una forma  
10 de onda de estimulación, se evita que la membrana neuronal y su entorno se adapten a los cambios de presión acústica, lo que permite una modulación más eficaz y robusta en comparación a las formas de onda de US compuestas de una única frecuencia fundamental.

Por ejemplo, la presente invención para circuitos cerebrales intactos, *in vivo*, puede usar transductores de ultrasonido PZT (fabricados por Ultrason y/o Olympus NDT/Panametrics), con una frecuencia central de resonancia óptima media de 0,5 MHz. Para crear formas de onda de estimulación de US que tuvieran múltiples componentes de frecuencia, los transductores se accionaron a una frecuencia fundamental fuera de la frecuencia central utilizando pulsos de voltaje de onda cuadrada, lo que produjo formas de onda de estimulación de US que tenían diversas frecuencias de pulsaciones y frecuencias de armónicos.

La presente invención contempla los pulsos de US como se muestra en las FIG. 27 y 28, que pueden accionarse utilizando pulsos de voltaje de 10 ciclos, pero el número de ciclos de voltaje que accionan los transductores puede variar de 1 a 50.000 o más.

La FIG. 27A ilustra un pulso de US de 10 ciclos generado usando un pulso de voltaje de onda sinusoidal de 10 ciclos de 0,5 MHz proporcionado al transductor. El transductor tiene una frecuencia central de 0,5 MHz. El espectro de potencia de la TRF (derecha) de esta forma de onda, muestra un pico único que representa la frecuencia fundamental de 0,5 MHz. La FIG. 27B ilustra de forma similar un pulso de US de 10 ciclos de acuerdo con la invención generado usando un pulso de onda sinusoidal de 10 ciclos de 0,25 MHz proporcionado al mismo transductor. En el espectro de potencia de la TRF a la derecha se observa un pico correspondiente a la frecuencia fundamental (0,25 MHz), así como el armónico (0,75 MHz). Accionar el transductor fuera de su frecuencia central introduce energía fuera de resonancia. Las formas de onda de estimulación de US compuestas de componentes de frecuencia mixta parece que pueden ser eficaces para muchas aplicaciones de los dispositivos de la presente invención. Por ejemplo, en la FIG. 27C se muestran transductores que usan ondas cuadradas en frecuencias fundamentales fuera de su frecuencia central de acuerdo con la invención. La FIG. 27C ilustra un pulso de US de 10 ciclos generado usando un pulso de voltaje de onda cuadrada de 10 ciclos de 0,25 MHz proporcionado al mismo transductor anterior. El espectro de potencia de la TRF, a la derecha, tiene un pico que corresponde a la frecuencia fundamental (0,25 MHz), así como pueden observarse la frecuencia de batido (0,5 MHz) y el armónico (0,75 MHz). Por lo tanto, el pulso de US en sí introduce componentes de frecuencias múltiples.

Por ejemplo, en el dispositivo de la presente invención, el mismo pulso de US se puede repetir a lo largo del tiempo a alguna frecuencia de repetición de pulsos, en lugar de proporcionar pulsos distintos compuestos de distintas frecuencias fundamentales. Accionar los transductores con una onda cuadrada que tiene una frecuencia fundamental que coincide con la frecuencia central no produce el tipo de efecto que se ilustra en la FIG. 27C. Se pueden usar ondas cuadradas, pero los transductores se accionan muy cerca de su frecuencia central, por ejemplo, cuando el transductor tiene dos frecuencias pico de 0,44 y 0,67 MHz.

Las FIG. 28A-F ilustran cómo se pueden generar distintas secuencias de pulsos para usar ultrasonido con el fin de modular la actividad celular. En las FIG. 28A-F, cada segmento ilustra 3 pulsos de US repetidos a alguna frecuencia de repetición de pulsos (PRF). Cada pulso puede contener entre 1 y 50.000 o más ciclos de US por pulso (c/p) accionados por una onda sinusoidal, una onda cuadrada, un patrón dentado o una forma de onda arbitraria para producir una frecuencia fundamental de 0,1 a 0,9 MHz con o sin otras frecuencias de pulsaciones y/o de armónicos que varíen de 0,02 a 100 MHz. El número de pulsos de US por forma de onda de US puede variar, de forma similar, de 1 a 10.000.000, repetidos a frecuencias de repetición de pulsos de 0.0001 a 100 MHz para una duración total de las formas de onda de estimulación de aproximadamente 0.0001 segundos a una aplicación continua al sujeto. La FIG. 28A ilustra una forma de onda de US de referencia que tiene tres pulsos de US, teniendo cada pulso 10 ciclos de US producidos utilizando una onda sinusoidal de 0,5 MHz y un transductor de 0,5 MHz. La FIG. 28B ilustra una forma de onda de US de referencia que tiene tres pulsos de US, teniendo cada pulso 10 ciclos de US producidos utilizando una onda sinusoidal de 0,25 MHz y un transductor de 0,5 MHz.

La FIG. 28C ilustra pulsos de US utilizados en la creación de la forma de onda de estimulación de US introduciendo componentes de frecuencias múltiples en la forma de onda como se analizó anteriormente (Fig. 27C anterior). La forma de onda ilustrada tiene tres pulsos de US, cada pulso producido utilizando una onda cuadrada de 0,25 MHz y un transductor de 0,5 MHz. Las FIG. 28D-E ilustran resultados de procedimientos similares para crear formas de onda de estimulación de US, que utilizan múltiples frecuencias de US para lograr la modulación de la actividad celular, tal como la actividad neuronal. Las formas de onda de estimulación de US ilustradas en la FIG. 28D utilizan ondas

cuadradas para accionar los transductores muy cerca de las frecuencias de resonancia óptimas de los transductores.

Sin el deseo de quedar ligados a ninguna teoría en particular, actualmente se piensa que la modulación de la actividad de las células o tejidos por ultrasonido puede producirse al cambiar las membranas de las células, tal como alterando la actividad de los canales iónicos o la actividad de los transportadores iónicos. Adicionalmente, la modulación por ultrasonido de la actividad de las células o tejidos puede producirse por alteraciones de las estructuras que rodean a las células, lo que luego conduce a alteraciones de la actividad celular. Estos conceptos, y otros, están abarcados en las consideraciones de la presente invención de la modulación de la actividad o actividades de las células. Por ejemplo, la aplicación de ultrasonido puede modificar la dinámica de fluidos de los líquidos cerebrales y/o de las membranas neuronales viscoelásticas de una manera que aumenta o disminuye la actividad neuronal. El ultrasonido modificará los canales para regular iones, así como la mecánica de los fluidos de manera que, entonces, se modifique directamente la actividad de las células que residen en los líquidos extracelulares.

Las formas de onda de estimulación de ultrasonido pueden proporcionarse antes, simultáneamente o después de otros regímenes de tratamiento. Por ejemplo, cuando un sujeto se somete a cirugía cerebral utilizando técnicas quirúrgicas convencionales, las formas de onda de estimulación de ultrasonido como se describen en el presente documento pueden usarse antes, durante o después de una o más técnicas quirúrgicas.

Dispositivos para eliminar tejido tumoral cerebral utilizando ultrasonido de baja intensidad y baja frecuencia

La presente invención comprende usar los dispositivos de ultrasonido desvelados en el presente documento para tratar a un sujeto con un tumor cerebral. Se entiende que un "tumor cerebral" es un crecimiento anómalo de células dentro del cerebro o dentro del cráneo, que pueden ser cancerosas o no cancerosas (benignas). Puede ser cualquier tumor intracranial creado por una división celular anómala y descontrolada, normalmente en el cerebro en sí, implicando neuronas, gliocitos, astrocitos, oligodendrocitos, endimocitos, tejido linfático, vasos sanguíneos; en los pares craneales (células de Schwann productoras de mielina), en las membranas del cerebro (meninges), el cráneo, la hipófisis y la glándula pineal, o diseminadas a partir de cánceres emplazados principalmente en otros órganos (tumores metastásicos). Los tipos de tumores cerebrales incluyen, pero sin limitación, glioma, astrocitoma, meningioma y blastoma.

Para el tratamiento de tumores cerebrales, el ultrasonido de baja intensidad y baja frecuencia incluye intensidades acústicas que varían de aproximadamente  $0,1 \text{ mW/cm}^2$  a  $100 \text{ W/cm}^2$ , que se generan en la región de tratamiento del tejido tumoral cerebral.

El ultrasonido puede enfocarse en la región de tratamiento del tumor cerebral utilizando datos adquiridos con técnicas médicas de diagnóstico por imágenes, tales como RM (resonancia magnética), CT (tomografía computarizada), PET (tomografía por emisión de positrones) o ecografía, incluyendo la obtención de imágenes por fuerza de radiación acústica. Alternativamente, el ultrasonido se puede aplicar a la región de tratamiento del tumor cerebral de forma desenfocada. El ultrasonido se puede aplicar a la región de tratamiento del tumor cerebral de forma que la energía del ultrasonido actúe sobre las células del tumor cerebral de manera que induzca muerte celular y/o apoptosis en las células tumorales del cerebro en ausencia de un aumento perjudicial de la temperatura. La piel externa y el cráneo se pueden enfriar para evitar daños por temperatura, si los hay. Por ejemplo, el ultrasonido que utiliza la presente invención comprende cambios de temperatura donde la temperatura cerebral y/o del tejido tumoral del cerebro (excluyendo el cráneo) crea lesiones térmicas en el cerebro, donde la temperatura del tejido cerebral no excede los  $44 \text{ }^\circ\text{C}$ , o puede ser de  $35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 \text{ }^\circ\text{C}$  durante más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 segundos en cualquier punto durante el tratamiento. En un ejemplo, la temperatura del cerebro permanece entre  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $44 \text{ }^\circ\text{C}$  durante la proporción de ultrasonido a la región de tratamiento del tumor cerebral. En un ejemplo más concreto, la temperatura en el cerebro no excede de  $44 \text{ }^\circ\text{C}$  durante más de 10 segundos durante el tratamiento.

Se sabe que el calentamiento del tejido enfermo induce necrosis coagulativa y, así, destruye las células tumorales del cerebro. Además, se pueden generar altas temperaturas en los tejidos circundantes, tal como la vasculatura, el cráneo o el tejido cerebral normal, lo que enfrenta a riesgos médicos innecesarios a un paciente que se está tratando. Por lo tanto, aumentar la temperatura de los tumores cerebrales mediante la proporción de ultrasonido de alta intensidad para destruirlos puede dañar inadvertidamente los pares craneales circundantes (es decir, el nervio óptico cerca de la base del cráneo), la vasculatura (cerca de la base craneal y/o del cráneo), o el tejido cerebral normal. El tratamiento puede incluir terapias combinadas en las que se usa un ultrasonido de baja intensidad y baja frecuencia para inducir muerte celular mediante la activación de las células, conduciendo a la activación de las rutas de muerte celular, y la aplicación de un ultrasonido de alta frecuencia que proporciona altas temperaturas al tejido para la destrucción y/o la muerte celular debidas a las altas temperaturas.

La modulación o activación celular inducida por ultrasonido puede comprender la activación de rutas de muerte celular, incluyendo la activación de caspasas y/u otras proteínas citotóxicas (las denominadas enzimas de muerte), por modulación de canales iónicos o transportadores iónicos inducida por ultrasonido, los que actúan regulando la conductancia iónica y/o el transporte de calcio, potasio, cloruro o sodio a través de la membrana celular o a través de la membrana de orgánulos celulares tales como mitocondrias, núcleos y retículo endoplásmico que se encuentren en las células tumorales del cerebro.

Los tumores cerebrales consisten en numerosos tipos celulares cerebrales histopatológicos distintos. Los tumores cerebrales pueden identificarse como células originadas principalmente en gliocitos, incluyendo astrocitos y oligodendrocitos, neuroblastos u otro tipo de célula que se encuentran en los tejidos cerebrales. Los tipos de células que componen los tumores cerebrales tienen muchas diferencias fundamentales, sin embargo, todos estos tipos de células pueden ser susceptibles de muerte celular y/o apoptosis, las que se activan mediante diversas cascadas moleculares de señalización celular, incluyendo la activación de las proteínas caspasa y/u otras proteínas citotóxicas.

Actualmente, se cree que el uso de ultrasonido de baja intensidad y baja frecuencia reduce el riesgo de dañar el tejido cerebral normal debido a efectos térmicos y/o efectos de cavitación. El tratamiento de los tumores cerebrales con ultrasonido de baja intensidad y baja frecuencia reduce la probabilidad de aumentar la temperatura de la región de tratamiento del tumor cerebral o de los tejidos circundantes (pares craneales, vasculatura y hueso). El tratamiento de los tumores cerebrales utilizando ultrasonido de baja intensidad como se describe en el presente documento reduce la probabilidad de inducir cavitación en el tejido cerebral. Las intensidades descritas actualmente para el tratamiento de tumores cerebrales mediante la inducción de necrosis coagulativa a través de mecanismos térmicos mientras se transmite ultrasonido a través del cráneo intacto son normalmente  $> 100 \text{ W/cm}^2$ . Estas intensidades acústicas altas y las presiones acústicas asociadas pueden provocar daños térmicos y/o cavitacionales no deseados en el tejido cerebral normal. La probabilidad de inducir cavitación en el tejido cerebral también se reduce enormemente a intensidades acústicas  $< 100 \text{ W/cm}^2$ , por lo que las presiones acústicas picos son  $< 10 \text{ MPa}$ .

La presente invención comprende dispositivos para transmitir ultrasonidos de baja intensidad y baja frecuencia en un intervalo de aproximadamente  $0,1 \text{ mW/cm}^2$  a  $100 \text{ W/cm}^2$  a una región de tratamiento del tumor cerebral, a través del cráneo o al tejido expuesto, de manera enfocada o desenfocada. La intensidad de ultrasonido se refiere a la intensidad generada durante la proporción de un único suceso de tratamiento o suceso de transmisión de ultrasonido (onda pulsada o continua).

La presente invención comprende dispositivos para transmitir ultrasonido de baja intensidad a una región de tratamiento de tumor cerebral, a través del cráneo o al tejido expuesto, a través del cráneo intacto o craneotomizado, en una forma pulsada en una duración que varía de  $0,000001$  segundos a  $100.000$  segundos durante la proporción de un suceso cualquiera de tratamiento con ultrasonido (un único suceso de transmisión de ultrasonido). Un suceso de tratamiento con ultrasonido puede repetirse en frecuencias de repetición que varían de una vez aproximadamente cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 60, 100, 120, 150, 180, 200, 240, 280 o 360 días, o más. En un ejemplo, el tratamiento se proporciona cada 30 días hasta 10 KHz durante un tiempo de suceso de tratamiento con ultrasonido acumulado total que no exceda los  $94.700.000$  segundos ( $\sim 3$  años) utilizando cualquier frecuencia de repetición o una combinación de frecuencias de repetición en sesiones de tratamiento individuales o múltiples.

La presente invención comprende dispositivos para transmitir ultrasonido de baja intensidad en que el ultrasonido aplicado a una región de tratamiento de tumor cerebral induce presiones acústicas pico en la región tumoral del tratamiento cerebral que, por ejemplo, son menores que 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 MPa. En una realización, la presión acústica pico es menor que 10 MPa.

La presente invención comprende dispositivos compuestos de 1 a 1000 elementos transductores de ultrasonido en que se aplican voltajes de placa a los elementos transductores de ultrasonido utilizando formas de onda analógicas o digitalizadas compuestas individualmente o como una combinación de formas de onda cuadradas, sinusoidales, dentadas o arbitrarias, mientras que los transductores se activan de forma sincronizada o por fases. En una realización, el número de elementos transductores de ultrasonido es menor que 300.

El ultrasonido de baja intensidad puede administrarse a una región de tratamiento de tumor cerebral, por lo que la acción solo del ultrasonido induce muerte celular y/o apoptosis en células tumorales cerebrales, mediante la activación de proteínas celulares de señalización molecular, tales como las caspasas, mediante la modulación de la conductancia iónica o el transporte de cualquiera de los siguientes iones: calcio, potasio, sodio, y cloruro en las células tumorales mediante la regulación de la actividad de canales iónicos de proteínas endógenas o de transportadores iónicos en la membrana de la célula tumoral o en la membrana de orgánulos que se encuentran en la célula tumoral cerebral, tal como el núcleo, las mitocondrias o el retículo endoplásmico.

El tratamiento desvelado en el presente documento puede administrarse solo o en combinación con otros dispositivos, composiciones o procedimientos para su uso en el tratamiento de tumores cerebrales, otros tumores o para muerte celular en células particulares. Se describen composiciones que pueden potenciar la eficacia del tratamiento con ultrasonido o pueden usarse para aumentar el tratamiento de tumores cerebrales sin una facilitación específica del efecto de ultrasonido. Por ejemplo, el uso de ultrasonido enseñado en el presente documento puede combinarse con composiciones que comprenden proteínas recombinantes o moléculas orgánicas para inducir muerte celular y/o apoptosis en células tumorales cerebrales u otros tumores o tipos de células, mediante la activación de proteínas celulares de señalización molecular, tales como las caspasas, mediante la modulación de la conductancia iónica o el transporte de cualquiera de los siguientes iones: calcio, potasio, sodio, y cloruro en las células tumorales mediante la regulación de la actividad de canales iónicos de proteínas endógenas o de transportadores iónicos en la membrana celular o en la membrana de orgánulos que se encuentran en la célula tumoral cerebral, tal como el núcleo, las mitocondrias o el retículo endoplásmico.

Los datos procedentes de las modalidades médicas de diagnóstico por la imagen se pueden usar para enfocar la energía ultrasónica, incluyendo, pero sin limitación, ecografía, diagnóstico por la imagen por fuerza de impulso de radiación acústica, tomografía fotoacústica, RM, CT, PET o una combinación de las mismas. Estas se pueden usar antes, durante o después del tratamiento con ultrasonido como se describe en el presente documento.

- 5 Dispositivo que utiliza ultrasonido de baja intensidad y baja frecuencia para reducir el daño cerebral secundario después de una lesión cerebral traumática de un suceso de conmoción cerebral

El traumatismo craneoencefálico es una de las principales causas de muerte y morbilidad en América del Norte y es un problema sanitario global en aumento en todo el mundo. Entre los pacientes que mueren como resultado de un TCE, aproximadamente el 90 % muere dentro de las 48 horas posteriores a la lesión primaria. En los últimos años se ha demostrado que los sucesos fisiopatológico asociados con el TCE o traumatismo craneal son de naturaleza retardada y progresiva. Estos sucesos fisiopatológico retardados y progresivos después de un traumatismo craneal a menudo inducen "lesiones secundarias". La lesión secundaria después de un traumatismo craneal implica una serie de cascadas celulares de señalización molecular y respuestas en los gliocitos y neuronas, incluyendo toxicidad debida a especies reactivas de oxígeno (radicales libres), excitotoxicidad mediada por glutamato, hipoxia, daño mecánico debido a alta presión intracraneal, entrada excesiva de calcio, homeostasis iónica alterada, liberación de citocinas proinflamatorias y gliosis reactiva. Las lesiones secundarias también se producen después de un TCE o traumatismo craneal leve, incluso cuando la lesión puede parecer "leve" o cuando la lesión no induce pérdida de conciencia. Las lesiones secundarias también se producen en la sustancia blanca después de eventos traumáticos tal como un latigazo y pueden producir daño axónico difuso (DAD). La lesión secundaria tanto en la sustancia gris como en la blanca a menudo da como resultado excitotoxicidad mediada por glutamato, homeostasis alterada del calcio y activación de las rutas de muerte celular. Prevenir las consecuencias perjudiciales de estas lesiones secundarias atenuando los efectos que las cascadas celular de señalización molecular desencadenaron después de una TCE o un DAD puede conducir a mejores resultados funcionales durante los procesos de recuperación, así como a tasas aumentadas de supervivencia al minimizar el impacto de las secuelas retardadas y la patofisiología progresiva.

El tratamiento que comprende atención médica temprana durante la atención prehospitalaria y otras intervenciones médicas agudas puede reducir el daño asociado con la lesión secundaria después de una TCE o un DAD. Se ha atribuido que la atención médica temprana en la reducción de la presión intracerebral salva muchas vidas y reduce la muerte relacionada con lesiones secundarias después de un TCE. Se han examinado varias moléculas pequeñas y factores biológicos que ejercen efectos neuroprotectores y se cree que protegen al cerebro y el sistema nervioso del daño debido a una lesión secundaria después de un TCE o un DAD. Estos factores incluyen agentes antiinflamatorios, moduladores del receptor de glutamato (subtipo de receptor de glutamato AMPA y NMDA), factores neurotróficos tales como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), inhibidores apoptóticos, moduladores de canales de iones, moduladores del óxido nítrico y una serie de otros agentes farmacológicos. La presente invención describe un procedimiento y un dispositivo para proporcionar al cerebro o al sistema nervioso ultrasonido de baja intensidad y baja frecuencia de manera enfocada o desenfocada, de forma que la energía ultrasónica induzca neuroprotección para mitigar algunas de las consecuencias fisiopatológicas de una lesión secundaria después de un TCE o un DAD.

Un aspecto de la invención comprende proporcionar ultrasonido de baja intensidad y baja frecuencia de acuerdo con la invención, que penetra en el cráneo intacto y se transmite al cerebro de una manera enfocada y/o desenfocada. Dicho ultrasonido de baja intensidad y baja frecuencia desencadena efectos biológicos sobre numerosas cascadas moleculares celulares, de una manera que regulan al alza la producción y/o la secreción de uno o más factores para ejercer neuroprotección, propiciar la plasticidad neuronal y aumentar la supervivencia neuronal. El ultrasonido de baja intensidad puede aumentar el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), el receptor I del factor de crecimiento insulínico (IGF), la interleucina 8 (IL), el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y sucesos de señalización de óxido nítrico en muchos tipos de células distintos. Además de sus actividades angiogénicas, el bFGF modula la transmisión sináptica, es un potente regulador de la supervivencia neuronal y el VEGF, el TGF- $\beta$  y el bFGF también son neuroprotectores frente a lesiones y la neurodegeneración. Se sabe que el NF- $\kappa$ B regula la supervivencia neuronal y la plasticidad, y que la ruta de señalización de PI3K-Akt tiene la capacidad de bloquear la muerte celular y de estimular la supervivencia celular de muchos tipos de células neuronales. El ultrasonido de baja intensidad y baja frecuencia activa la ruta de señalización de Akt/NF- $\kappa$ B y PI3K/Akt en muchos tipos de células. El ultrasonido de baja intensidad y baja frecuencia aumenta la síntesis y la liberación de óxido nítrico en muchos tipos de células, así como aumenta la actividad de la óxido nítrico sintasa. El óxido nítrico (NO) puede mediar la neuroprotección, la muerte celular y la neurogénesis después de un traumatismo craneoencefálico. El BDNF es un factor neurotrófico que tiene efectos de neuroprotección y supervivencia celular y, además, es un potente regulador de la modulación de los canales iónicos, así como de receptores de neurotransmisores en todo el cerebro. En este caso, TCE se refiere a un traumatismo craneoencefálico grave o leve, en que un traumatismo craneal ha inducido una pérdida de conciencia o no.

La presente invención comprende dispositivos para usar ultrasonido de baja intensidad (0,001 mW/cm<sup>2</sup> a 100 W/cm<sup>2</sup>; enfocado o desenfocado) en el sitio del tejido cerebral para aumentar la actividad de señalización de las moléculas neuroprotectoras (incluyendo cualquiera de BDNF, NO, NOS, VEGF, TGF- $\beta$ , bFGF, NF- $\kappa$ B o PI3K-Akt) para proteger el cerebro (reducir la muerte celular) de cualquier individuo de las consecuencias perjudiciales de una lesión secundaria después de un TCE. La intensidad de ultrasonido se refiere a la intensidad generada durante la proporción de un único suceso de tratamiento.

La presente invención comprende dispositivos para reducir las consecuencias perjudiciales de una lesión secundaria después de un TCE mediante la transmisión de ultrasonido de baja intensidad de manera enfocada y/o desenfocada al cerebro o cualquier parte del mismo, donde el ultrasonido se aplica de una manera pulsada que varía en duración de 0,000001 segundos a 1.000.000 de segundos durante la proporción de cualquier suceso de tratamiento con ultrasonido (un único suceso de transmisión por ultrasonido). Un suceso de tratamiento con ultrasonido puede repetirse en frecuencias de repetición que varían de una vez aproximadamente cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 60, 100, 120, 150, 180, 200, 240, 280 o 360 días, o más. En un ejemplo, el tratamiento se proporciona cada 30 días hasta 10 KHz para un tratamiento de ultrasonido acumulado total que no exceda la vida del paciente que está siendo tratado.

La presente invención comprende dispositivos para reducir las consecuencias perjudiciales de una lesión secundaria después de un TCE mediante la transmisión de ultrasonido de baja intensidad de manera enfocada o desenfocada al cerebro o cualquier parte del mismo, de una manera que module la actividad del calcio. En todo momento, la expresión "modula la actividad del calcio" significa que los niveles de calcio en una célula aumentan o disminuyen en comparación con los niveles basales o con un control.

El tratamiento desvelado en el presente documento puede reducir las consecuencias perjudiciales de una lesión secundaria después de un TCE mediante la transmisión de ultrasonidos de baja intensidad de manera enfocada o desenfocada al cerebro o cualquier parte del mismo, en cualquier momento comenzando inmediatamente después del TCE hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días después de la lesión. El tratamiento puede continuar a intervalos regulares según sea necesario, tal como a diario, de forma semanal o mensual. Un dispositivo de la presente invención puede ser administrado por el personal sanitario de emergencia (es decir, paramédico, técnico médico en urgencias), en cualesquiera primeros auxilios prehospitalarios o durante la atención médica aguda (servicio de urgencias de un hospital). Además, puede ser administrado por un médico durante la atención de rutina, o puede ser autoadministrado por un paciente.

La presente invención comprende dispositivos para reducir las consecuencias perjudiciales de una lesión secundaria después de un TCE u otra lesión cerebral, mediante la transmisión de ultrasonido de baja frecuencia y baja intensidad de manera enfocada o desenfocada a al menos una parte del cerebro, en el que un dispositivo comprende de 1 a 1000 elementos transductores de ultrasonido y se aplican voltajes de placa a los elementos transductores utilizando formas de onda analógicas o analógicas o digitalizadas compuestas individualmente o como una combinación de formas de onda cuadradas, sinusoidales, dentadas o arbitrarias, mientras que los transductores se activan de forma sincronizada o por fases. En una realización el número de elementos transductores de ultrasonido es menor que 300.

La presente invención comprende dispositivos para reducir las consecuencias perjudiciales de una lesión secundaria después de un TCE u otra lesión cerebral mediante la transmisión de ultrasonidos de baja frecuencia y baja intensidad de manera enfocada o desenfocada a al menos una parte del cerebro, en que un dispositivo proporciona ultrasonido en al menos una parte del tratamiento de manera enfocada, y la proporción de ultrasonido enfocado utiliza datos adquiridos por modalidades médicas de diagnóstico por la imagen, tales como diagnóstico por la imagen por ultrasonidos, RM, PET u otras conocidas en la técnica. En una realización, el ultrasonido no está enfocado. En una realización, el ultrasonido está enfocado. En una realización, el ultrasonido puede proporcionarse en una combinación de las maneras enfocada y desenfocada.

La FIG. 17 es ilustrativa de dispositivos para el tratamiento rápido de la lesión cerebral con ultrasonido de baja frecuencia y baja intensidad. Un dispositivo puede comprender un transductor para proporcionar ultrasonido de baja frecuencia y baja intensidad o un dispositivo puede comprender múltiples transductores, tal como, por ejemplo, de 2 a 300 transductores dispuestos espacialmente para tratar la cabeza. Dichos transductores pueden estar acoplados acústicamente a la cabeza mediante elementos conocidos en la técnica. El acoplamiento acústico puede comprender aire, medios a base de agua, que incluyen, pero sin limitación, artículos rellenos de gel, agua o un fluido, tal como esponjas u otros materiales poliméricos, u otros materiales que tienen bajos coeficientes de atenuación acústica. Estos son útiles cuando el cráneo está bastante intacto. Un dispositivo también puede comprender accionadores piezoeléctricos o accionadores de micromotor, u otros componentes utilizados para trasladar la posición espacial de los transductores para dirigirse a regiones particulares a modular por ultrasonido. Dichos dispositivos pueden emplearse de una manera similar a la de los DEA utilizados para una respuesta cardíaca rápida. Los dispositivos de ultrasonido se pueden implementar en sitios de primeros auxilios, tal como ambulancias o helicópteros, o sin trasladar al paciente, en edificios tales como oficinas o aeropuertos. Los dispositivos también se pueden implementar en el servicio de urgencias para el tratamiento durante la priorización de pacientes y la intervención temprana aguda. Los dispositivos pueden usarse con individuos conscientes o inconscientes. La proporción de ultrasonido de baja frecuencia y baja intensidad es beneficiosa cuando se aplica lo más pronto posible al cerebro de una víctima de TCE, para proporcionar modulación de las actividades celulares en el cerebro y estimular cascadas de señalización molecular neuroprotectoras, que incluyen, pero sin limitación, la señalización del BDNF. La muerte celular y otras lesiones secundarias se reducen.

Dispositivo que utiliza ultrasonidos de baja intensidad y baja frecuencia para tratar otras enfermedades y afecciones neurológicas

Los dispositivos de la presente invención pueden usarse con sistemas de órganos para tratar patologías agudas y

crónicas mediante la modulación de las actividades celulares, incluyendo las células neurales, mediante la proporción de ultrasonido de baja frecuencia y baja intensidad. Un efecto de proporcionar ultrasonido de baja frecuencia y baja intensidad es estimular las rutas de señalización celular.

5 La presente invención comprende dispositivos para tratar a un sujeto en un estado de conciencia mínima, coma o estado vegetativo, comprendiendo el tratamiento el acoplamiento acústico de un dispositivo transductor de ultrasonido de baja intensidad al sujeto; y accionar el transductor de ultrasonido para formar una forma de onda de estimulación con una intensidad en un intervalo de 0,001 mW/cm<sup>2</sup> a 900 milivatios por centímetro cuadrado en el sitio del tejido. La prueba con otros procedimientos o la respuesta del paciente pueden indicar la eficacia del tratamiento y determinar la repetición del tratamiento con US o la modificación del mismo.

10 La presente invención comprende dispositivos para el tratamiento de un sujeto con síndrome de enclaustramiento, que comprende el acoplamiento de forma acústica de un dispositivo transductor de ultrasonido de baja intensidad al sujeto; y el accionamiento del transductor de ultrasonido para formar una forma de onda de estimulación con una intensidad en un intervalo de 0,001 a 900 milivatios por centímetro cuadrado (mW/cm<sup>2</sup>) en el sitio del tejido. La prueba con otros procedimientos o la respuesta del paciente pueden indicar la eficacia del tratamiento y determinar la repetición del tratamiento con US o la modificación del mismo.

15 La presente invención comprende dispositivos para el tratamiento de un sujeto con jaqueca, que comprende el acoplamiento de forma acústica de un dispositivo transductor de ultrasonido de baja intensidad al sujeto; y el accionamiento del transductor de ultrasonido para formar una forma de onda de estimulación con una intensidad en un intervalo de 0,001 a 900 milivatios por centímetro cuadrado (mW/cm<sup>2</sup>) en el sitio del tejido. La prueba con otros procedimientos o la respuesta del paciente pueden indicar la eficacia del tratamiento y determinar la repetición del tratamiento con US o la modificación del mismo.

20 La presente invención comprende dispositivos para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson el temblor esencial, que comprende el acoplamiento de forma acústica de un dispositivo transductor de ultrasonido de baja intensidad al sujeto; y el accionamiento del transductor de ultrasonido para formar una forma de onda de estimulación con una intensidad en un intervalo de 0,001 a 900 milivatios por centímetro cuadrado (mW/cm<sup>2</sup>) en el sitio del tejido o un circuito neuronal a tratar. La prueba con otros procedimientos o la respuesta del paciente pueden indicar la eficacia del tratamiento y determinar la repetición del tratamiento con US o la modificación del mismo.

Dispositivo que utiliza ultrasonido de baja intensidad y baja frecuencia para neuromodulación

30 La presente invención comprende dispositivos para la modulación de la actividad celular neuronal en un sujeto, que comprende la transmisión de forma transcraneal de conjuntos de formas de onda ultrasónica pulsado. La modulación de la actividad celular neuronal puede comprender el acoplamiento de forma acústica de un transductor de ultrasonido a una superficie externa de un sujeto, y el accionamiento del transductor de ultrasonido para formar una forma de onda de estimulación con una intensidad por debajo de aproximadamente 900 milivatios por centímetro cuadrado (mW/cm<sup>2</sup>) y una frecuencia ultrasónica por debajo de aproximadamente 0,9 megahercios (MHz) en el sitio del tejido. Las frecuencias comprenden múltiples componentes. Un aspecto de la presente invención comprende formas de onda ultrasónica que tienen una frecuencia ultrasónica que varía de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 0,50 MHz. En un aspecto de la presente invención, las formas de onda ultrasónica actúan de una manera no térmica sin provocar un calentamiento significativo del tejido que se está tratando.

40 La presente invención comprende dispositivos para la modulación de la actividad celular neuronal en un sujeto, que comprende la transmisión de forma transcraneal de conjuntos de formas de onda ultrasónica pulsado, en la que la forma de onda comprende una pluralidad de pulsos individuales. Un aspecto de la presente invención comprende pulsos individuales que tienen una duración de pulso que varía de aproximadamente 0,16 a aproximadamente 0,57 ms. Un aspecto la presente invención comprende pulsos individuales que se repiten a una frecuencia de repetición de pulso que varía de aproximadamente 1,2 a aproximadamente 3,0 KHz, para producir intensidades promedio temporales y de pico espaciales que varían de aproximadamente 21 a aproximadamente 163 mW/cm<sup>2</sup>. En un aspecto de la presente invención, los pulsos individuales comprenden entre aproximadamente 80 y aproximadamente 225 ciclos acústicos. Los pulsos pueden generarse mediante breves ráfagas de ondas. Las ondas pueden ser una o más de las ondas conocidas, incluyendo, pero sin limitación, sinusoidal, cuadrada, dentada y triangular. Las ondas ultrasónicas pueden enfocarse para proporcionar acción en un sitio particular en o sobre el sujeto, o las ondas pueden estar desenfocadas y proporcionar acción en múltiples sitios. La frecuencia o intensidad puede ser uniforme a lo largo de un período de tratamiento, o puede alternar o barrer de un número a otro, y volver al número original. Los expertos en la materia pueden determinar tales parámetros para la aplicación deseada. En el presente documento se desvelan ejemplos.

55 Un aspecto de la presente invención comprende dispositivos para la modulación de la actividad celular neuronal en un sujeto, que comprende la transmisión de forma transcraneal de conjuntos de formas de onda ultrasónica pulsado, en la que la duración de la transmisión transcraneal varía de aproximadamente 26 a aproximadamente 333 ms.

Un aspecto de la presente invención comprende dispositivos para la modulación de la actividad celular neuronal en un sujeto, que comprende la transmisión de forma transcraneal de conjuntos de formas de onda ultrasónica pulsado,



en la que la actividad celular neuronal se modula a través de la actividad de canales de iones o de transportadores iónicos. En un aspecto de la presente invención, el canal iónico o el transportador iónico regula la actividad del calcio, potasio, cloruro o sodio. En un aspecto de la presente invención, la actividad celular neuronal se refiere a la secreción de moléculas de señalización, la proliferación de células, la diferenciación de células, la modulación de la transcripción de proteínas, la modulación de la traducción de proteínas, o una combinación de las mismas.

La presente invención comprende dispositivos para la modulación de la actividad celular neuronal en un sujeto, que comprende la transmisión de forma transcraneal de conjuntos de formas de onda ultrasónica pulsado, en los que el transductor de ultrasonido comprende transductores piezoeléctricos, transductores compuestos, CMUT o una combinación de los mismos. En un aspecto de la invención, el transductor de ultrasonido puede implantarse en el cráneo del sujeto o montarse en el cráneo del sujeto. Por ejemplo, en un aspecto, se implanta un CMUT en el cráneo. En otro aspecto, un CMUT también se puede montar en el cráneo del sujeto en un dispositivo que se pueda usar de manera permanente.

La presente invención comprende dispositivos para la modulación de la actividad celular neuronal en un sujeto, que comprende la transmisión de forma transcraneal de conjuntos de formas de onda ultrasónica pulsado, en el que el transductor de ultrasonido comprende hasta aproximadamente 1000 elementos. En un aspecto de la presente invención, el número de elementos es de 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 o 1000 elementos. En un aspecto de la presente invención, el número de elementos varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 299.

La presente invención comprende dispositivos para la modulación de la actividad celular neuronal en un sujeto, que comprende la transmisión de forma transcraneal de conjuntos de formas de onda ultrasónica pulsado, en el que el dispositivo para la modulación de la actividad celular neuronal se usa junto con EEG, MEG, RM, PET, diagnóstico por la imagen por fuerza de impulso de radiación acústica, tomografía fotoacústica, o una combinación de los mismos. En un aspecto de la presente invención, el tratamiento para modular la actividad celular neuronal comprende adicionalmente el uso de un algoritmo de una manera de bucle cerrado o abierto para evaluar la retroalimentación de la actividad cerebral y modificar la forma de onda de estimulación basándose en esa retroalimentación.

En un aspecto de la presente invención, la forma de onda ultrasónica transcraneal se usa junto con un transductor de ultrasonido acoplado acústicamente que comprende una intensidad por debajo de aproximadamente 900 milivatios por centímetro cuadrado ( $mW/cm^2$ ) y una frecuencia ultrasónica por debajo de aproximadamente 0,9 megahercios (MHz), preferentemente, que varía de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 0,50 MHz. La forma de onda ultrasónica comprende una pluralidad de pulsos individuales. Un pulso individual puede tener una duración de pulso que varía de aproximadamente 0,16 a aproximadamente 0,57 ms. Los pulsos individuales pueden repetirse a una frecuencia de repetición de pulso que varía de aproximadamente 1,2 a aproximadamente 3,0 KHz, para producir intensidades promedio temporales y de pico espaciales que varían de aproximadamente 21 a aproximadamente 163  $mW/cm^2$ . Un pulso individual comprende entre aproximadamente 80 y aproximadamente 225 ciclos acústicos. En un aspecto de la presente invención, la duración de la transmisión transcraneal varía de aproximadamente 26 a aproximadamente 333 ms. En un aspecto de la presente invención, el accionamiento del transductor de ultrasonido acoplado acústicamente comprende transductores piezoeléctricos, transductores compuestos, CMUT o una combinación de los mismos.

La presente invención comprende dispositivos en los que se usa un ordenador. Por ejemplo, la FIG. 12 es un diagrama de bloques que ilustra un sistema informático 1300 en el que se puede implementar una realización de la invención. El sistema informático 1300 incluye un mecanismo de comunicación tal como un bus 1310 para pasar información entre otros componentes internos y externos del sistema informático 1300. La información se representa como señales físicas de un fenómeno medible, normalmente voltajes eléctricos, pero que incluyen, en otras realizaciones, fenómenos tales como interacciones magnéticas, electromagnéticas, de presión, químicas, atómicas moleculares y cuánticas. Por ejemplo, los campos magnéticos norte y sur, o un voltaje eléctrico cero y no cero, representan dos estados (0, 1) de un dígito binario (bit). Una secuencia de dígitos binarios constituye datos digitales que se utilizan para representar un número o código para un carácter. Un bus 1310 incluye muchos conductores paralelos de información para que la información se transfiera rápidamente entre los dispositivos acoplados al bus 1310. Están acoplados con el bus 1310 uno o más procesadores 1302 para procesar información. Un procesador 1302 realiza un conjunto de operaciones sobre la información. El conjunto de operaciones incluye trasladar información desde el bus 1310 y colocar información en el bus 1310. El conjunto de operaciones también incluir, normalmente, la comparación de dos o más unidades de información, el cambio de las posiciones de las unidades de información y la combinación de dos o más unidades de información, tal como la suma o la multiplicación. Una secuencia de operaciones que debe ejecutar el procesador 1302 constituye las instrucciones del ordenador.

El sistema informático 1300 también incluye una memoria 1304 acoplada al bus 1310. La memoria 1304, tal como una memoria de acceso directo (RAM) u otro dispositivo de almacenamiento dinámico, almacena información, incluidas las instrucciones de ordenador. La memoria dinámica permite que la información almacenada en ella sea cambiada por el sistema informático 1300. La RAM permite que una unidad de información almacenada en un emplazamiento llamado dirección de memoria se almacene y recupere independientemente de la información en direcciones vecinas. El procesador 1302 también utiliza la memoria 1304 para almacenar valores temporales durante la ejecución de las instrucciones del ordenador. El sistema informático 1300 también incluye una memoria solo de lectura (ROM) 1306 u

otro dispositivo de almacenamiento estático acoplado al bus 1310 para almacenar información estática, incluyendo las instrucciones, que no es modificada por el sistema informático 1300. Además, se acopla al bus 1310 un dispositivo de almacenamiento no volátil (persistente) 1308, tal como un disco magnético o un disco óptico, para almacenar información, incluyendo instrucciones, que persiste incluso cuando el sistema informático 1300 está apagado o pierde la alimentación de otra manera.

La información, incluyendo las instrucciones, se proporciona al bus 1310 para su uso por parte del procesador desde un dispositivo de entrada externo 1312, tal como un teclado que contiene teclas alfanuméricas operadas por un usuario humano o un sensor. Un sensor detecta condiciones cercanas y transforma esas detecciones en señales compatibles con las señales utilizadas para representar información en el sistema informático 1300. Otros dispositivos externos acoplados al bus 1310, utilizados principalmente para interactuar con seres humanos, incluyen un dispositivo de visualización 1314, tal como un tubo de rayos catódicos (CTR, forma siglada de *cathode ray tube*) o una pantalla de cristal líquido (LCD, forma siglada de *liquid crystal display*), o una pantalla compuesta por diodos emisores de luz (LED, forma siglada de *light emitting diodes*) o diodos orgánicos emisores de luz (OLED, forma siglada de *organic light emitting diodes*), para presentar imágenes, y un dispositivo de puntero 1316, tal como un ratón o una bola de seguimiento (*trackball*), o teclas de dirección del cursor, para controlar una posición de una pequeña imagen de cursor presentada en la pantalla 1314 y emitir comandos asociados con elementos gráficos presentados en la pantalla 1314.

En la realización ilustrada, un hardware de fines especiales, tal como un circuito integrado (CI) de aplicación específica 1320, está acoplado al bus 1310. El hardware de fines especiales está configurado para realizar operaciones que el procesador 1302 no realiza con la suficiente rapidez para fines especiales. Los ejemplos de CI de aplicación específica incluyen tarjetas aceleradoras de gráficos para generar imágenes para la pantalla 1314, tableros criptográficos para cifrar y descifrar mensajes enviados a través de una red, reconocimiento de voz e interfaces para dispositivos externos especiales, tales como brazos robóticos y equipos médicos de exploración que realizan repetidamente algunas secuencia compleja de operaciones que se implementan más eficazmente en un hardware.

El sistema informático 1300 también incluye una o más instancias de una interfaz de comunicaciones 1370 acoplada al bus 1310. La interfaz de comunicación 1370 proporciona una comunicación bidireccional acoplada a una diversidad de dispositivos externos que funcionan con sus propios procesadores, tal como impresoras, escáneres y discos externos. En general, el acoplamiento es con un enlace de red 1378 que está conectado a una red local 1380 a la que están conectados una diversidad de dispositivos externos con sus propios procesadores. Por ejemplo, la interfaz de comunicación 1370 puede ser un puerto paralelo o un puerto de bus universal en serie (USB, forma siglada de *universal serial bus*) en un ordenador personal. En algunas realizaciones, la interfaz de comunicaciones 1370 es una tarjeta de red digital de servicios integrados (ISDN, forma siglada de *integrated services digital network*) o una tarjeta de línea de abonado digital (DSL, forma siglada de *digital subscriber line*) o un módem telefónico que proporciona una conexión de comunicación de información a un tipo correspondiente de línea telefónica. En algunas realizaciones, una interfaz de comunicación 1370 es un módem por cable que convierte las señales en el bus 1310 en señales para una conexión de comunicación a través de un cable coaxial o en señales ópticas para una conexión de comunicación a través de un cable de fibra óptica. Como otro ejemplo, la interfaz de comunicaciones 1370 puede ser una tarjeta de red de área local (LAN, forma siglada de *local area network*) para proporcionar una conexión de comunicación de datos a una LAN compatible, tal como Ethernet. Además, se pueden implementar conexiones inalámbricas. Las ondas portadoras, tales como las ondas acústicas y electromagnéticas, incluyendo ondas de radio, ópticas e infrarrojas, viajan a través del espacio sin cables o de forma inalámbrica. Las señales incluyen variaciones hechas por el hombre en la amplitud, frecuencia, fase, polarización u otras propiedades físicas de las ondas portadoras. Para las conexiones inalámbricas, la interfaz de comunicaciones 1370 envía y recibe señales eléctricas, acústicas o electromagnéticas, incluyendo señales infrarrojas y ópticas que transmiten flujos de información, tales como datos digitales.

El término medio legible por ordenador se usa en el presente documento para referirse a cualquier medio que participe en proporcionar información al procesador 1302, incluyendo las instrucciones para la ejecución. Dicho medio puede tomar muchas formas, incluyendo, pero sin limitación, medios no volátiles, medios volátiles y medios de transmisión. Los medios no volátiles incluyen, por ejemplo, discos ópticos o magnéticos, tales como el dispositivo de almacenamiento 1308. Los medios volátiles incluyen, por ejemplo, la memoria dinámica 1304. Los medios de transmisión incluyen, por ejemplo, cables coaxiales, alambres de cobre, cables de fibra óptica y ondas que viajan a través del espacio sin cables o de forma inalámbrica, tales como las ondas acústicas y electromagnéticas, incluyendo las ondas de radio, ópticas e infrarrojas.

Las formas comunes de medios legibles por ordenador incluyen, por ejemplo, un disquete, un disco flexible, un disco duro, una cinta magnética, o cualquier otro medio magnético, una ROM por disco compacto (CD-ROM), un disco de video digital (DVD) o cualquier otro medio óptico, tarjetas de papel perforadas, o cualquier otro medio físico con patrones de agujeros, una RAM, una ROM programable (PROM), una PROM borrable (EPROM), una FLASH-EPROM, o cualquier otro chip o cartucho de memoria, una onda portadora, o cualquier otro medio desde el cual una computadora pueda leer.

El enlace de red 1378 normalmente proporciona comunicación de información a través de una o más redes a otros dispositivos que usan o procesan la información. Por ejemplo, el enlace de red 1378 puede proporcionar conexión a través de la red local 1380 a un ordenador central 1382 o al equipo 1384 operado por un proveedor de servicios de Internet (ISP, forma siglada de *internet service provider*). A su vez, el equipo del ISP 1384 proporciona servicios de

comunicación de datos a través de la red de redes de comunicación pública de conmutación de paquetes a nivel mundial, actualmente conocida como Internet 1390. Una computadora llamada servidor 1392 conectada a Internet proporciona un servicio en respuesta a la información recibida a través de Internet. Por ejemplo, el servidor 1392 proporciona información que representa datos de vídeo para presentación en la pantalla 1314.

5 La invención se refiere al uso del sistema informático 1300 para implementar las técnicas descritas en el presente documento. Las técnicas pueden realizarse mediante el sistema informático 1300 en respuesta al procesador 1302, que ejecuta una o más secuencias de una o más instrucciones contenidas en la memoria 1304. Dichas instrucciones, también llamadas programa informático y código de programa, pueden leerse en la memoria 1304 desde otro medio legible por ordenador, tal como el dispositivo de almacenamiento 1308. La ejecución de las secuencias de  
10 instrucciones contenidas en la memoria 1304 hace que el procesador 1302 realice las etapas del procedimiento descrito en el presente documento. En realizaciones alternativas, el hardware, tal como el circuito integrado de aplicación específica 1320, se puede usar en lugar de o en combinación con el programa informático para implementar la invención. Por lo tanto, las realizaciones de la invención no se limitan a ninguna combinación específica de hardware y software.

15 Las señales transmitidas a través del enlace de red 1378 y otras redes a través de la interfaz de comunicaciones 1370, llevan información hacia y desde el sistema informático 1300. El sistema informático 1300 puede enviar y recibir información, incluyendo el código del programa, a través de las redes 1380 y 1390, entre otras, a través del enlace de red 1378 y la interfaz de comunicaciones 1370. En un ejemplo que utiliza Internet 1390, un servidor 1392 transmite el código de programa para una aplicación particular, solicitado por un mensaje enviado desde la computadora 1300, a  
20 través de Internet 1390, el equipo del ISP 1384, la red local 1380 y la interfaz de comunicaciones 1370. El procesador 1302 puede ejecutar el código recibido a medida que lo recibe, o puede almacenarse en el dispositivo de almacenamiento 1308 u otro almacenamiento no volátil para su posterior ejecución, o ambos. De esta manera, el sistema informático 1300 puede obtener un código de programa de aplicación en forma de una señal en una onda portadora.

25 Pueden estar implicadas en transportar una o más secuencias de instrucciones o datos, o ambos, al procesador 1302 para su ejecución diversas formas de medios legibles por ordenador. Por ejemplo, las instrucciones y los datos pueden transportarse inicialmente en un disco magnético de un ordenador remoto tal como el central 1382. La computadora remota carga las instrucciones y los datos en su memoria dinámica, y envía las instrucciones y los datos a través de una línea telefónica utilizando un módem. Un módem local para el sistema informático 1300 recibe las instrucciones y los datos en una línea telefónica, y utiliza un transmisor de infrarrojos para convertir las instrucciones y los datos en una señal en una onda portadora de infrarrojos que actúa como enlace de red 1378. Un detector de infrarrojos que funciona como interfaz de comunicaciones 1370 recibe las instrucciones y los datos transportados en la señal de infrarrojos y coloca la información que representa las instrucciones y los datos en el bus 1310. El bus 1310 transporta la información a la memoria 1304 desde la cual el procesador 1302 recupera y ejecuta las instrucciones usando  
30 algunos de los datos enviados con las instrucciones. Las instrucciones y los datos recibidos en la memoria 1304 pueden almacenarse, opcionalmente, en el dispositivo de almacenamiento 1308, ya sea antes o después de la ejecución por el procesador 1302.

La forma de onda del estímulo de ultrasonido comprende al menos una frecuencia ultrasónica que varía de 0,10 a 0,90 MHz. La forma de onda de estimulación de ultrasonido comprende frecuencias de múltiples componentes. La  
40 duración de una o más formas de onda de estimulación de ultrasonido puede variar de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10000 ms. La forma de onda de estimulación de ultrasonido comprende una pluralidad de pulsos individuales, en los que un único pulso puede tener una duración de pulso que varía de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 10000 ms. En un aspecto de la presente invención, un pulso individual puede comprender entre aproximadamente 1 y aproximadamente 50.000 ciclos acústicos. En los procedimientos desvelados actualmente, se puede generar un pulso mediante breves ráfagas de ondas cuadradas, ondas sinusoidales, ondas dentadas, formas de onda de barrido o formas de onda arbitrarias, o combinaciones de una o más formas de onda. Las formas de onda pueden estar enfocadas o no enfocadas. Los componentes para generar ultrasonido, tal como el transductor de ultrasonido o sus elementos, se accionan utilizando formas de onda analógicas o digitalizadas. Los elementos transductores de ultrasonido pueden accionarse utilizando formas de onda individuales o una combinación de formas  
45 de onda cuadradas, sinusoidales, dentadas o arbitrarias.

En la presente invención, al menos un componente para generar ondas ultrasónicas comprende un emisor de ultrasonido, un transductor de ultrasonido, un transductor de ultrasonido piezoeléctrico, un transductor compuesto, un transductor ultrasónico capacitivo micromecanizado, o combinaciones de los mismos. En un aspecto de la presente invención, se usa más de un componente para generar ondas ultrasónicas y uno o más componentes pueden  
55 encontrarse en una configuración de conjunto. En un aspecto de la invención desvelada, el componente para generar ondas ultrasónicas puede unirse físicamente, unirse de forma portátil o implantarse en el sujeto. En un aspecto de la presente invención, el número de elementos de un componente, tal como el número de elementos que comprenden un transductor ultrasónico o CMUT, que puede usarse en un dispositivo de ultrasonido puede variar de aproximadamente 1 a 299 transductores o elementos CMUT, de aproximadamente 1 a 1000 transductor o elementos  
60 CMUT.

## **Definiciones**

Como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un vehículo farmacéutico" incluye mezclas de dos o más de tales vehículos y similares.

5 Los intervalos se pueden expresar en el presente documento como desde "aproximadamente" un valor particular, y/o hasta "aproximadamente" otro valor particular. Cuando se expresa tal intervalo, otra realización incluye desde el valor particular y/o hasta el otro valor particular. De manera similar, cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso del anterior "aproximadamente", se entenderá que ese valor particular forma otra realización. Se entenderá adicionalmente que los valores extremos de cada uno de los intervalos son significativos tanto en relación con el valor extremo como independientemente del valor extremo. Se entiende también que en el presente documento se desvela una serie de valores y que cada valor se desvela también en el presente documento como "aproximadamente" este valor particular además del propio valor. Por ejemplo, si se desvela el valor "10", entonces también se desvela "aproximadamente 10". Además, se entiende que cuando se desvela un valor, que también se desvelan "menor que o igual a" el valor, "mayor que o igual al valor" y los posibles intervalos entre los valores, como lo entiende apropiadamente el experto en la materia. Por ejemplo, si se desvela el valor "10", el "menor que o igual a 10", así como "mayor que o igual a 10", también se desvelan. Además, se entiende que en toda la solicitud los datos se proporcionan en varios formatos distintos, y que estos datos representan valores extremos finales y valores extremos iniciales, e intervalos para cualquier combinación de los puntos de datos. Por ejemplo, si se desvelan un punto de datos particular "10" y un punto de datos particular 15, se entiende que mayor que, mayor o igual a, menor que, menor que o igual a, e igual a 10 y 15 se consideran desvelados, así como entre 10 y 15. Además se entiende que también se desvela cada unidad entre dos unidades particulares. Por ejemplo, si se desvelan 10 y 15, entonces también se desvelan 11, 12, 13 y 14.

En la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones que se presentan a continuación, se hará referencia a una serie de términos que se definirán para que tengan los siguientes significados: "Opcional" u "opcionalmente" significa que el suceso o circunstancia que se describe posteriormente puede producirse o no, y que la descripción incluye casos en que dicho suceso o circunstancia se produce y casos en los que no.

El término "tratar" se refiere a inhibir, prevenir, curar, invertir, atenuar, aliviar, minimizar, suprimir o detener los efectos perjudiciales de una enfermedad y/o provocar la reducción, remisión o regresión de una enfermedad. Los expertos en la materia entenderán que pueden usarse diversas metodologías y ensayos para evaluar el desarrollo de una enfermedad y, de manera similar, pueden usarse diversas metodologías y ensayos para evaluar la reducción, remisión o regresión de la enfermedad.

"Aumento" se define de principio a fin como un aumento de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 150, 200, 250, 300, 400 o 500 veces en comparación con los niveles basales o un control.

Ejemplo de referencia 1: Cuantificación de la actividad sináptica en cultivos de cortes de hipocampo. Se prepararon cultivos de cortes de hipocampo a partir de ratones thy-l-sinaptopHluorina (spH). La SinaptopHluorina se expresa en las neuronas excitadoras e inhibitoras del hipocampo de los ratones thy-l-spH. La liberación de vesículas sinápticas (exocitosis) en un sitio de liberación individual de estos ratones está indicada por la spH, que emite fluorescencia a una longitud de onda particular (aproximadamente 530 nm) en la parte verde del espectro óptico, cuando se excita con la luz láser a 488 nm con el microscopio confocal de barrido láser. Se mide la intensidad de las emisiones fluorescentes (F) de todos los sitios a la vista para cuantificar la actividad sináptica. La AF expresada como porcentaje indica cambios porcentuales de la intensidad total de fluorescencia; y, por lo tanto, cambios porcentuales de la actividad sináptica. spH indicada actividad sináptica tanto en la región CA1 del estrato radiado (CA1 SR) como en la región CA1 del estrato piramidal (CA1 SP), esta última región con una densidad particularmente alta de sinapsis inhibitoras. Por lo tanto, la modulación de la actividad neural indicada por spH puede indicar modulación excitadora o inhibitora, o alguna combinación

#### **Ejemplo de referencia 2: Comparación de los efectos de la inducción de la actividad neuronal entre ultrasonido y medios convencionales**

50 Para determinar si los efectos de la modulación por ultrasonido son comparables a los cambios de actividad neuronal inducidos por medios más invasivos y convencionales, considerar la FIG. 6A y la FIG. 6B. La FIG. 6A es un gráfico 600 que ilustra las respuestas temporales comparativas de la actividad neuronal después de la modulación por impulsos eléctricos y después de la modulación por una forma de onda ultrasónica, de acuerdo con una realización. El eje horizontal 602 es tiempo en segundos; y la escala horizontal está proporcionada por el segmento 601 que corresponde a 5 segundos. El eje vertical 604 indica AF en porcentaje (%); y la escala vertical está proporcionada por el segmento 605 que corresponde a 10 %. El inicio de USW-1 se indica mediante la indicación 603. La curva 610 indica la respuesta temporal promedio del USW-1, a partir de más de 148 respuestas individuales, según lo dado por la respuesta promedio 540 en el gráfico 530. La curva 620a indica la respuesta de la fluorescencia de spH en las regiones colaterales de Schaffer del tejido neural a la estimulación eléctrica, usando electrodos monopolares a 40 potenciales de acción (AP, forma siglada de *action potentials*) y 20 Hz (promediado en n = 51 sinapsis individuales).

De manera similar, las curvas 620b y 620c indican la respuesta de fluorescencia de spH en colaterales de Schaffer a la estimulación eléctrica utilizando electrodos monopolares a 100 AP/20 Hz (n = 63) y 250 AP/50 Hz (n = 48), respectivamente.

5 Por lo tanto, el gráfico 600 muestra que la tasa temporal de cambio (cinética) y las amplitudes de la respuesta de SPH activada por ultrasonido, indicado por la curva 610, están en el mismo orden que las obtenidas en respuesta a la estimulación eléctrica, las curvas 620. La respuesta también es similar a las respuestas de spH informadas anteriormente para distintos estímulos. Esto indica que el ultrasonido es tan eficaz como la estimulación eléctrica para el tratamiento de enfermedades y trastornos neurales.

10 La FIG. 6B es un gráfico 650 que ilustra respuestas eléctricas temporales de una neurona después de la modulación mediante una forma de onda ultrasónica, de acuerdo con una realización. El eje horizontal 652 es tiempo en segundos; y la escala horizontal está proporcionada por el segmento 651 que corresponde a 1 segundo. El eje vertical 654 indica diferencia de voltaje a través de la membrana neuronal en milivoltios (mV); y la escala vertical está proporcionada por el segmento 655 que corresponde a 50 mV. En este caso, se utiliza una forma de onda ultrasónica distinta, a la que se hace referencia como USW-2. USW-2 consta de cinco pulsos, cada uno a 0,44 MHz para 10 ciclos de onda cuadrada durante una longitud de pulso de 22,7 ps. La PRF es una constante de 10 Hz, por lo que toda la forma de onda dura algo más de 0,5 segundos (una décima parte de la duración de USW-1). El inicio de USW-2 se indica mediante la indicación 653.

15 El trazado 660 indica los potenciales de acción (por ejemplo, voltaje de membrana) en respuesta a formas de onda ultrasónica pulsado durante registros de pinzamientos de corriente de célula entera de neuronas piramidales CA1. El trazado 660 incluye cinco máximos 662 que representan la activación neural (transmisión de un pulso eléctrico) a lo largo de la neurona durante los 0,5 segundos de la forma de onda. Sin embargo, en general, las estrategias electrofisiológicas de célula entera no fueron muy útiles en el estudio de la neuromodulación ultrasónica, debido a las resonancias de los electrodos que producen una pérdida del sellado de células enteras durante la propagación de la forma de onda ultrasónica. Por lo tanto, el gráfico 650 muestra que la tasa temporal de cambio (cinética) y las amplitudes del potencial de membrana de ultrasonido indicado por el trazado 660 muestra la activación de neuronas inducida por las formas de onda ultrasónica de baja intensidad.

20 No se observó cavitación u otra evidencia de daño pronunciado de la membrana a las bajas intensidades utilizadas en el presente documento. Los cultivos de cortes preparados a partir de 10 ratones thy-1-YFP se modularon crónicamente con USW-1 cada 8 minutos durante 36-48 horas. Las estructuras de membrana de las neuronas YFP+ que recibieron tal modulación crónica por ultrasonido fueron similares a los controles no modulados. La modulación crónica con formas de onda ultrasónica no provoca daños pronunciados a la membrana en la región CA1 SP. Usando técnicas histológicas, no son evidentes indicios de daño celular. La histología indica la presencia de estructuras finas, tales como espinas dendríticas, tanto para el control como para las condiciones crónicas moduladas. Las neuronas estimuladas de forma crónica parecen tener más dendritas. Por lo tanto, las formas de onda ultrasónica se repiten con una duración suficiente como para modular la morfología neuronal de maneras sutiles, lo que puede mediar la función neural.

Por lo tanto, las formas de ondas ultrasónicas pulsado de baja intensidad parecen ser altamente eficaces para modular la actividad neural, seguras para el uso prolongado y capaces de estimular cambios convenientes en la morfología neuronal.

40 **Ejemplo de referencia 3: Estimulación de la exocitosis de vesículas sinápticas mediada por SNARE y la transmisión sináptica por ultrasonido de baja intensidad y baja frecuencia**

45 Los cambios en la tensión de membrana producidos por la absorción de energía mecánica (por ejemplo, las ondas de sonido) alteran la actividad de las neuronas individuales debido a la naturaleza elástica de sus bicapas lipídicas y la mecánica de tipo resorte de sus canales proteicos transmembrana. De hecho, muchos canales iónicos activados por voltaje, así como los receptores de neurotransmisores, poseen propiedades mecanosensibles que les permiten ser activados de forma diferencial por cambios en la tensión de membrana. Por lo tanto, se utilizó un conjunto de procedimientos para investigar la influencia de la energía mecánica conferida a la actividad neuronal por ultrasonido. Usando estos procedimientos, se descubrió que el ultrasonido pulsado tiene la capacidad de estimular la transmisión sináptica mediada por SNARE, así como los canales de sodio (Na<sup>+</sup>) y de Ca<sup>2+</sup> calcio) activados por voltaje en las neuronas centrales. Las proteínas SNARE son una clase de proteínas que incluyen la sinaptobrevina neuronal (n-Syb), SNAP-25 y syntaxina 1A (Syx 1A) y Sinaptotagmina I (Syt I), que desempeñan un papel en la transmisión sináptica y la exocitosis de vesículas. Estas mediciones utilizaron los siguientes procedimientos.

55 Se tomaron cultivos de cortes de hipocampo de ratones thy-1-spH, thy-1-YFP o de tipo silvestre desde el día 7-8 posnatal, de manera similar a los procedimientos descritos anteriormente. Brevemente, se prepararon cortes transversales de hipocampo (aproximadamente 400 μm de espesor) con un cortador de alambre (MX-TS, Siskiyou, Inc., Grants Pass, Oregon, EE. UU.) y se mantuvieron *in vitro* en insertos de filtro Millicell-CM (PICMORG50, Millipore, Bedford, MA) a 36 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %, incubadora humidificada (99 %). Se utilizaron los cortes para experimentos entre los 7 y 12 días *in vitro*. Para escindir las proteínas SNARE en algunos experimentos, se añadió BoNT/A a 250 nanogramos por mililitro (ng/ml, 1 ng = 10<sup>-9</sup> gramos y 1 ml = 10<sup>-3</sup> litros) a los medios de cultivo de los cortes, 24-36

horas antes de los experimentos.

Tras la inhalación de CO<sub>2</sub>, los ratones se decapitaron rápidamente y se extrajo todo el cerebro, la duramadre se extrajo con cuidado y luego se colocó el cerebro en LCR artificial (LCRa) con disección enfriada con hielo que contenía 83 milimoles (mM, 1 mM = 10<sup>-3</sup> moles de un compuesto) de NaCl, KCl 2,5 mM, MgSO<sub>4</sub> 3,3 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, NaHCO<sub>3</sub> 26,2 mM, glucosa 22 mM, sacarosa 72 mM y CaCl 0,5 mM<sub>2</sub>, y equilibrado con O<sub>2</sub> al 95 %/CO<sub>2</sub> 5 %. Se dejó que los cerebros se recuperaran durante 5 minutos en LCRa enfriado con hielo antes de recuperarse durante aproximadamente 20 minutos a 37 °C antes de cargar la mayor parte para algunos experimentos con colorante OGB-1 AM a temperatura ambiente (21-23 °C).

Para cargar cultivos de cortes preparados a partir de ratones de tipo silvestre con CoroNa Green AM (Invitrogen, Carlsbad, California, EE. UU.), se añadieron 5 microlitros (AL, 1 µl = 10<sup>-6</sup> litros) de Pluronic F-127 20 % en DMSO (Invitrogen) a un vial de 50 microgramos (µg, 1 µg = 10<sup>-6</sup> gramos) de CoroNa Green AM. Después, la solución de colorante se agitó de forma vorticial durante 15 minutos antes de añadir 100 µl de medio de cultivo. Después, se añadieron 5 µl de la solución que contiene colorante a 1 ml de medio de cultivo por debajo de los insertos de cultivo, así como se añadieron 5 µl a la superficie de los cortes. Después de un tiempo de carga de 10 minutos a 36 °C, los cortes se lavaron tres veces con medio de cultivo de cortes, se dejaron recuperar 10 minutos adicionales y a continuación se usaron para los experimentos. Para cargar cultivos de cortes con OGB-1 AM (Invitrogen), se añadieron 2 µl de Pluronic F-127 (Invitrogen) al 20 % en DMSO y 8 µl a un vial de 50 µg de OGB-1 AM. Después, la solución que contenía colorante se agitó de forma vorticial durante 30 minutos antes de añadir 90 µl de medio de cultivo. Después, se añadieron 20 µl de esta solución que contenía colorante a 3 ml de medio de cultivo, y los cortes se incubaron en esta solución durante 30-40 minutos a 37 °C. Los cortes se lavaron tres veces con medio de cultivo de cortes, a continuación se cargaron con sulforrodamina 101 (Invitrogen; 10 µM en medio de cultivo de cortes durante 15 minutos) o se dejó que se recuperaran durante 30 minutos antes de utilizarlos en experimentos. Para cargar cerebros *ex vivo* con OGB-1 AM, se utilizó un procedimiento similar al descrito anteriormente, pero se sustituyó el medio de cultivo de cortes por LCRa de disección (véase más arriba), se añadieron 60 µl de la solución que contenía colorante a 9 ml de LCRa de disección. Los cerebros se cargaron durante 30 minutos a temperatura ambiente, a continuación se aclararon tres veces y se dejaron recuperar durante 30 minutos adicionales a temperatura ambiente antes de su uso.

Los cultivos de cortes o los cerebros *ex vivo* enteros se transfirieron a una cámara de registro que contenía LCRa normal. El LCRa normal contiene NaCl 136 mM, KCl 2,5 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,3 mM, HEPES 10 mM, glucosa 10 mM y CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM, pH 7,4, a temperatura ambiente. Las cámaras de registro se colocaron sobre transductores en una platina construida a medida en un microscopio confocal de barrido láser Olympus Fluoview FV-300 (Olympus America, Inc., Center Valley, Pennsylvania, EE. UU.). La excitación de spH, OGB-1 AM y CoroNa Green AM se realizó utilizando una longitud de onda óptica de 488 nanómetros (nm, 1 nm = 10<sup>-9</sup> metros) de un láser de argón y en algunos experimentos Dil se excitó usando un láser HeNe de 546 nm. Las imágenes de series de tiempo se adquirieron utilizando lentes de inmersión en agua Olympus UMPlanFL 20X (lente con apertura numérica de 0,5, NA) o 40X (0,8 NA).

Las cámaras de registro de cortes consistían en insertos de cultivo y un depósito de LCRa construido mantenido en su lugar mediante grasa de vacío o tensión superficial entre la cara de silicona de los transductores y el inserto. Esta estrategia produjo una distancia de separación de 4,5 mm entre la cara del transductor y el plano de imagen en la superficie de los cortes. En algunos casos, para probar la transmisión remota de formas de onda ultrasónica en la actividad neuronal, se montaron cultivos de cortes en la parte superior de una columna de LCRa en un vaso de precipitados de 500 ml que contenía transductores sumergidos, que se fijaron a los vasos de precipitados inferiores, lo que proporcionó una distancia de separación de 45 mm. La superficie ventral (inferior) de los cerebros *ex vivo* enteros se pegaron al fondo de placas de poliestireno de 6 pocillos utilizando "superglue", que se rellenaron con LCRa y se montaron sobre los transductores utilizando gel de acoplamiento ultrasónico. Se realizó una obtención de imágenes confocales de OGB-1 en los cerebros *ex vivo* en la superficie dorsal (parte superior) de los cerebros *ex vivo* durante y después de la transmisión de formas de onda ultrasónica pulsado a través del cerebro desde la superficie ventral.

Se realizaron registros de pinzamientos de corriente de célula entera de neuronas piramidales CA1 visualmente identificadas utilizando estrategias convencionales. Brevemente, las pipetas para electrodos de parche se llenaron con una solución intracelular que contenía KCl 130 mM, Na-HEPES 10 mM, Di-Tris-P-creatina 10 mM, EGTA 0,2 mM, Mg-ATP 3 mM y Na-GTP 0,5 mM, mOsm 280-290 mM, pH 7,2; la resistencia final de estos electrodos de parche sin pulir fue de 5-7 megaohmios (MΩ, 1 MΩ = 10<sup>6</sup> ohmios). Los registros de los pinzamientos de corriente se realizaron utilizando un amplificador de pinzamiento zonal MultiClamp 700B con el programa informático pCLAMP 10 (Molecular Devices, Sunnyvale, California, EE. UU.). Después de 5-10 minutos de acceso a células enteras, se registraron los cambios en el voltaje de membrana en respuesta a la estimulación con formas de onda ultrasónica pulsado.

Las imágenes confocales se analizaron fuera de línea utilizando ImageJ (véase, por ejemplo, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) o el programa informático Olympus Fluoview 5.0. Se expresaron los cambios en la fluorescencia de spH como un cambio porcentual con respecto a los niveles de fluorescencia iniciales. Para las señales OGB-1 y CoroNa Green, se calculó el  $\Delta F/F_0$  utilizando estrategias convencionales  $\Delta F = F - F_0$ . Las características de las formas de onda ultrasónica y los análisis electrofisiológicos se realizaron fuera de línea utilizando Igor Pro (WaveMetrics, Lake Oswego, Oregon, EE. UU.). Los datos mostrados son media ± E.T.M. Las mediciones resultantes proporcionan información sobre los mecanismos para el control por ultrasonido sobre la actividad neuronal.

La transmisión de USW-1 en los cortes desencadenó la exocitosis de vesículas sinápticas produciendo una AF debida a spH de 18,52 % ± 2,2 % en sitios de liberación individuales (148 muestras) en el estrato radiado CAI (como se muestra anteriormente en la Figura 5). Se identificaron varias otras formas de onda ultrasónica pulsado que fueron eficaces para desencadenar la liberación de vesículas sinápticas, como se enumera a continuación en la Tabla 1. Por ejemplo, una forma de onda ultrasónica compuesta de pulsos con  $f = 0,67$  MHz,  $PL = 74,5 \mu s$ ,  $c/p = 50.000$  proporcionada a  $PRF = 10$  Hz con  $Np = 5$  (para una duración de 0,5) también estimuló la liberación de vesículas sinápticas, como lo indica una AF debida a spH = 12,86 % ± 2,6 %, para 74 muestras.

Tabla 1. Eficacia de las formas de onda pulsadas de baja intensidad en la estimulación de la liberación de vesículas sinápticas de acuerdo con múltiples realizaciones

PL	c/p	F (MHz)	PRF	Np	amplitud de onda cuad. p-p	respuesta de spH
22,7 $\mu s$	10	0,44	Rampa de 5 s 0 - 100 Hz	250	500 mV	+
74,5 ms	50.000	0,67	10 Hz	5	150 mV	+
74,5 ms	50.000	0,67	10 Hz	150	100 mV	+
22,7 $\mu s$	10	0,44	Rampa de 5 s 0 - 100 Hz	250	100 mV	-
2,27 $\mu s$	1	0,44	Rampa de 5 s 0 - 100 Hz	250	500 mV	-
11,35 $\mu s$	5	0,44	Rampa de 5 s 0 - 100 Hz	250	500 mV	+
11,35 $\mu s$	5	0,44	Rampa de 5 s 0 - 100 Hz	250	100 mV	-
2,27 $\mu s$	1	0,44	20 Hz	100	500 mV	-
22,7 $\mu s$	10	0,44	20 Hz	100	500 mV	+
22,7 $\mu s$	10	0,44	250 Hz	250	500 mV	-
22,7 $\mu s$	10	0,44	Rampa de 10 s 0 - 100 Hz	500	500 mV	+
22,7 $\mu s$	10	0,44	Rampa de 15 s 0 - 100 Hz	750	500 mV	+
113,5 $\mu s$	50	0,44	Rampa de 5 s 0 - 200 Hz	500	500 mV	+
113,5 $\mu s$	50	0,44	Rampa de 5 s 0 - 100 Hz	250	500 mV	+
170,25 $\mu s$	75	0,44	Rampa de 5 s 0 - 100 Hz	250	500 mV	+
227,0 $\mu s$	100	0,44	Rampa de 5 s 0 - 100 Hz	250	500 mV	+
22,7 $\mu s$	10	0,44	50 Hz	250	500 mV	-

10 Utilizando una estrategia de marcaje diloístico para visualizar espinas dendríticas, se examinaron poblaciones de supuestas terminales excitadoras. No se encontró ninguna diferencia entre el  $\Delta F$  inducido por ultrasonido debido a spH obtenida de los terminales que inciden en las espinas dendríticas y las sinapsis somáticas que inciden en los cuerpos celulares. Las sinapsis de las espinas mostraron un  $\Delta F$  debido a spH = 19,94 % ± 1,7 %; y las sinapsis somáticas un  $\Delta F$  debido a spH = 20,55 % ± 2,7 %, con 45 muestras para cada una.

15 Para determinar los mecanismos afectados por las formas de onda ultrasónica de baja intensidad, se introdujeron en los cortes de tejido neural diversos inhibidores que se sabe que afectan determinados procesos. Por ejemplo, BoNT/A inhibe la exocitosis mediada por SNARE. La introducción de BoNT/A 250 ng/ml suprimió casi por completo la exocitosis en respuesta a las formas de onda ultrasónica de baja intensidad. Por lo tanto, se concluye que las formas de onda ultrasónica de baja intensidad excitan la exocitosis mediada por SNARE. El bloqueante de poros de canales de Na<sup>+</sup> activado por voltaje tetrodotoxina (TTX) inhibe la conductancia del ion sodio (Na<sup>+</sup>). La introducción de TTX 1  $\mu M$  suprimió casi por completo la exocitosis en respuesta a las formas de onda ultrasónica de baja intensidad. Por lo tanto, se concluye que las formas de onda ultrasónica de baja intensidad se basan en la conductancia de Na<sup>+</sup>. CNQX y APV bloquean la transmisión sináptica que no sea por exocitosis. La adición de CNQX 20  $\mu M$  y APV 100  $\mu M$  bloqueó la actividad de la red excitadora y redujo la  $\Delta F$  debido a la spH en aproximadamente 6 puntos porcentuales (50 % del efecto de ultrasonido de baja intensidad), indicando así que las formas de onda ultrasónica de baja intensidad estimulan la transmisión sináptica y no solo la exocitosis.

La FIG. 7 es un gráfico 700 que ilustra los efectos ejemplares de algunos inhibidores de proceso sobre la actividad neuronal modulada por una forma de onda ultrasónica. El eje horizontal 702 es tiempo en segundos; y la escala horizontal está proporcionada por el segmento 701 que corresponde a 5 segundos. El eje vertical 704 indica AF en porcentaje (%); y la escala vertical está proporcionada por el segmento 705 que corresponde a 5 %. El inicio de USW-1 se indica mediante la indicación 703. La curva 710 indica la respuesta temporal promedio a USW-1 cuando no se introducen inhibidores de proceso en el tejido neural. La curva 730 indica la respuesta temporal promedio cuando se añade CNQX 20  $\mu M$  y APV 100  $\mu M$  para bloquear la actividad de la red excitadora, reduciendo el efecto de USW-1 a la mitad, a aproximadamente el 6 %. La curva 740 indica la respuesta temporal promedio cuando se añade TTX 1  $\mu M$  para inhibir la conductancia de sodio (Na<sup>+</sup>), suprimiendo casi el efecto de USW-1. La curva 750 indica la respuesta temporal promedio cuando se añade BoNT/A 250 ng/ml para inhibir la exocitosis mediada por SNARE, otra vez suprimiendo casi todo el efecto de USW-1.

**Ejemplo de referencia 4: Estimulación de los transitorios de calcio dependientes de voltaje en neuronas por ultrasonido de baja intensidad y baja frecuencia**

Usando el indicador de Na<sup>+</sup> CoroNa Green AM, como se conoce en la técnica, en cultivos preparados a partir de ratones de tipo silvestre, se descubrió que USW-1 desencadenaba transitorios de Na<sup>+</sup> en las neuronas piramidales CA1 (CA1 SP). La FIG. 8 es un gráfico 810 que ilustra un efecto temporal ejemplar sobre transitorios de Na neurales después de la modulación mediante una forma de onda ultrasónica. El eje horizontal 812 es tiempo en segundos; y la escala horizontal está proporcionada por el segmento 811 que corresponde a 5 segundos. El eje vertical 814 indica AF debida a CoroNa Green en porcentaje (%); y la escala vertical está proporcionada por el segmento 815 que corresponde a 4 %. El inicio de USW-1 se indica mediante la indicación 813. Las respuestas individuales de transitorios de Na después de cada forma de onda ultrasónica se proporcionan mediante los trazados 820 y la respuesta promedio indicada por la curva 822. La máxima respuesta fue  $\Delta F/F_o = 5 \% \pm 0,6 \%$  para  $n = 18$  mediciones. Esta respuesta se bloqueó por la adición de tetrodotoxina (TTX) como lo indican las respuestas individuales 840.

Para determinar si las formas de onda ultrasónica pulsado también eran capaces de activar transitorios de Ca<sup>2+</sup>, se cargaron cultivos de cortes preparados a partir de ratones de tipo silvestre con el indicador de Ca<sup>2+</sup> Oregon Green 488 BAPTA-1 AM (OGB-1 AM) y Sulforhodamina 101 para diferenciar entre neuronas y gliocitos, como se conoce en la técnica. La activación por USW-1 de transitorios de Ca<sup>2+</sup> tanto en las neuronas como en los gliocitos se puede visualizar utilizando técnicas histológicas que incluyen, pero sin limitación, el uso de la fluorescencia verde procedente del OGB-1 en las neuronas y la fluorescencia amarilla de la sulforrodamina en los gliocitos.

La FIG. 9 es un gráfico 920 que ilustra efectos temporales ejemplares sobre transitorios de Ca neurales y gliales después de la modulación mediante una forma de onda ultrasónica. El eje horizontal 922 es tiempo en segundos; y la escala horizontal está proporcionada por el segmento 921 que corresponde a 20 segundos. El eje vertical 924 indica AF en porcentaje (%); y la escala vertical está proporcionada por el segmento 925 que corresponde al 100% para las neuronas y al segmento 926 que corresponde al 120% para las células gliales. El valor cero está desplazado para cada conjunto de curvas para separarlos visualmente. El inicio de USW-1 se indica mediante la indicación 923. Las respuestas individuales de transitorios de Ca<sup>2+</sup> después de cada uno de los cuatro casos de USW-1 están dados por los trazados 950a, 950b, 950c y 950d para las neuronas y por los trazados 960a, 960b, 960c y 960d para los gliocitos, respectivamente. Para las neuronas,  $F/F_o = 114 \% \pm 10 \%$  en 61 muestras. Para los gliocitos,  $\Delta F/F_o = 140 \% \pm 12 \%$  para 55 muestras. Hay algunas diferencias en la tasa temporal de cambio entre los dos tipos de células.

La modulación con USW-1 también indujo transitorios de Ca<sup>2+</sup> presinápticos en CA1 SR. La activación por USW-1 de transitorios de Ca<sup>2+</sup> presinápticos en CA1 se puede visualizar utilizando técnicas histológicas que incluyen, pero sin limitación, el uso de la fluorescencia verde procedente del OGB-1 en las neuronas. El  $\Delta F/F_o$  observado =  $76 \% \pm 7 \%$  para 31 muestras.

#### **Ejemplo de referencia 5: Activación de canales de sodio activados por voltaje en neuronas mediante ultrasonido de baja intensidad y baja frecuencia**

Para determinar si los transitorios de Ca<sup>2+</sup> desencadenados por ultrasonido están principalmente mediados por canales de Ca<sup>2+</sup> activados por voltaje, se añadió Cd<sup>++</sup> para bloquear los canales de Ca<sup>2+</sup> activados por voltaje. La adición de Cd<sup>++</sup> 500  $\mu$ M suprimió casi por completo las señales de OGB-1 en respuesta a USW-1. Asimismo, la adición de TTX bloqueó aproximadamente el 85 % de la señal de OGB-1 producida por USW-1. La FIG. 10 es un gráfico 1030 que ilustra un efecto temporal ejemplar sobre la actividad presináptica neural mediante la modulación con una forma de onda ultrasónica. El eje horizontal 1032 es tiempo en segundos; y la escala horizontal está proporcionada por el segmento 1031 que corresponde a 5 segundos. El eje vertical 1034 indica la  $\Delta F$  de OGB-1 en porcentaje (%); y la escala vertical está proporcionada por el segmento 1035 que corresponde a 70 %. El inicio de USW-1 se indica mediante la indicación 1033. La curva 1040 indica la respuesta temporal presináptica promedio de OGB-1 a USW-1 cuando no se introducen inhibidores de proceso en el tejido neural. La curva 1050 indica la respuesta temporal promedio cuando se añade TTX para inhibir la conductancia de Na<sup>+</sup>, suprimiendo casi por completo el efecto de USW-1. La curva 1060 indica la respuesta temporal promedio cuando se añade Cd<sup>++</sup> para bloquear los canales de Ca<sup>2+</sup> activados por voltaje, otra vez suprimiendo casi por completo el efecto de USW-1. Los transitorios de Ca<sup>2+</sup> residuales no bloqueados por Cd<sup>++</sup> o tetrodotoxina (TTX) probablemente involucren a otras fuentes de Ca<sup>2+</sup> tales como los receptores NMDA o TRPC 1, que de forma interesante poseen propiedades mecanosensibles y se expresan en neuronas del hipocampo. Utilizando formas de onda ultrasónica con una duración más corta (por ejemplo,  $f 0,44$  MHz,  $PL = 0,18$  ms,  $c/p = 80$ ,  $PRF = 10$  Hz y  $N_p = 3$ ), Se observaron en las neuronas transitorios de Ca<sup>2+</sup> ( $\Delta F/F_o = 38 \% \pm 2 \%$ , para 24 muestras) con una cinética más rápida.

Dado que las soluciones que contienen sal confieren una baja impedancia acústica ( $- 1,56 \times 10^6$  N·s/m<sup>3</sup>), se observaron transitorios de Ca<sup>2+</sup> en respuesta a las formas de onda ultrasónica pulsado de baja intensidad, incluso cuando los transductores se colocaron a 45 mm de distancia de los cortes (datos no mostrados). Los tejidos biológicos blandos (incluyendo el cerebro) tienen impedancias acústicas que varían de  $1,5 - 1,8 \times 10^6$  N·s/m<sup>3</sup>. Para determinar si las respuestas de Ca<sup>2+</sup> se podían obtener transmitiendo ultrasonido pulsado de baja intensidad a través del cerebro intacto, se midió la fluorescencia de OGB-1 en la superficie dorsal de cerebros *ex vivo* obtenidos de ratones adultos de tipo silvestre a la vez que se transmitían formas de onda ultrasónica pulsado de baja intensidad a través de sus superficies ventrales. En esta preparación de cerebro *ex vivo*, se observaron transitorios de Ca<sup>2+</sup> en respuesta a las formas de onda ultrasónica pulsado de baja intensidad, los cuales fueron similares a los observados en los cultivos de cortes.



Se observaron efectos potenciados para algunas formas de onda de baja intensidad. Por ejemplo, una de tales formas de onda de baja intensidad incluía tres pulsos ( $N p = 3$ ) a  $PRF = 10$  Hz con  $c/p = 80$ , pero con distintas frecuencias ultrasónicas en pulsos alternos, por ejemplo,  $f = 0,44$  MHz en el primer y el tercer pulso y  $f = 0,67$  MHz en el segundo pulso. Este pulso produjo una excitación sustancialmente mayor de la actividad neural en comparación con otras formas de onda analizadas a una intensidad menor que  $10 \text{ mW/cm}^2$ .

**Ejemplo de referencia 6: Examen de la influencia de las formas de onda de estimulación de ultrasonido en el cerebro intacto**

Para realizar la estimulación con ultrasonido (US) transcraneal de la corteza motora intacta, los ratones se anestesiaron utilizando un cóctel de ketamina-xilazina (ketamina 70 mg/kg, xilazina 7 mg/kg) administrado por vía intraperitoneal. Se recortó el pelo en la superficie dorsal de la cabeza sobre las regiones correspondientes a la corteza motora utilizando tijeras de microdissección. Los ratones se colocaron luego en un sistema de estereotaxia para ratón Cunningham y se fijaron a una mesa de aislamiento de vibración. Los transductores de ultrasonido con guías de enfoque fijas se bajaron hasta los puntos sobre la piel correspondientes a la corteza motora identificados utilizando las coordenadas convencionales. Después, se colocaron tubos de enfoque en la superficie dorsal de la piel por encima de la corteza motora y se acoplaron acústicamente a la piel utilizando un gel de acoplamiento de ultrasonido. Se proporcionaron formas de onda de estimulación de US pulsado transcraneales a la corteza motora que se tenía como objetivo, utilizando un protocolo desencadenante LTT convencional y un dispositivo de E/S digital (Digidata 1440; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE.UU.), conectado a una PC controlada mediante el programa informático pClamp (Molecular Devices) para activar los generadores de funciones. Los marcadores de señal de LTT indicaron el inicio y la longitud de las formas de onda de estimulación de US. Las grabaciones de vídeo de los ensayos de estimulación se obtuvieron utilizando una cámara de web convencional. Durante los ensayos de estimulación, se adquirieron datos electrofisiológicos (actividad de unidades múltiples (MUA), LFP (forma siglada de *local field potentials*: potenciales de campo locales) y EMG (forma siglada de *fine-wire electromyogram*: electromiograma de alambre fino); véase más abajo). Después de la estimulación, a los animales se les permitió recuperarse de la anestesia o se procesaron como se describe en los materiales y procedimientos a continuación.

Más específicamente, las formas de onda de US de baja intensidad se transmitieron a través de guías de enfoque acústico a la corteza motora intacta de ratones anestesiados ( $n = 127$ ). La FIG. 18A muestra una ilustración del procedimiento utilizado para transmitir formas de onda de estimulación de US enfocadas lateralmente a la corteza motora intacta de un ratón. Las ganancias óptimas entre la transmisión transcraneal y la absorción cerebral se producen para ultrasonido a frecuencias acústicas ( $f$ )  $< 1,0$  MHz. De este modo, se construyeron formas de onda de estimulación transcraneal en el intervalo de frecuencia de 0,25 a 0,50 MHz, mientras también se variaba la intensidad y se utilizaban pulsos de 80 a 225 ciclos.

Las FIG. 18B y 21 muestran ejemplos de la estrategia y los parámetros utilizados en la construcción de formas de onda de estimulación de US de baja intensidad. Las intensidades generadas por la forma de onda de estimulación ilustrada se proporcionan en el recuadro amarillo. Las formas de onda de estimulación de ultrasonido (US) se construyeron utilizando procedimientos similares a los descritos anteriormente. Se utilizaron transductores de US de banda ancha de veinticinco (25) mm de diámetro, adaptados al agua, con una frecuencia central de 0,5 MHz (V301-SU, Olympus NDT, Waltham, MA, EE. UU.). Los pulsos de ultrasonido (US) se generaron mediante breves ráfagas de ondas cuadradas (0,2  $\mu\text{seg}$ ; 0,5 mV pico a pico) utilizando un generador de función Agilent 33220A (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, California, EE. UU.). Las ondas cuadradas se amplificaron aún más (ganancia de 50 dB) utilizando un amplificador de RF ENI 240L. Los pulsos de US se repitieron a una frecuencia de repetición de pulsos activando el generador de funciones mencionado anteriormente con un segundo generador de funciones Agilent 33220A.

Los pulsos de ultrasonido individuales tuvieron una duración del pulso (PD, forma siglada de *pulse duration*) que duró de 0,16 a 0,57 ms, presiones pico rarefaccionales ( $p_r$ ) de 0,070 a 0,097 MPa, integrales de intensidad de pulso (PII (forma siglada de *pulse intensity integrals*)) de 0,017 a 0,095  $\text{mJ/cm}^2$ , e intensidades promedio de pulso de pico espaciales ( $I_{SPPA}$ ) de 0,075 a 0,229  $\text{W/cm}^2$ . Los pulsos individuales de US se repitieron a frecuencias de repetición de pulsos (PRF) que variaban desde 1,2 a 3,0 KHz para producir intensidades promedio temporales espaciales de pico espaciales ( $I_{SPTA}$ ) de 21 a 163  $\text{mW/cm}^2$  para duraciones de estímulo transcraneal de 26 a 333 ms. Las intensidades informadas anteriormente se midieron por vía transcraneal en los puntos correspondientes a la corteza motora intacta en cabezas en fresco *ex vivo*. Se observó una pérdida de intensidad  $< 10\%$  debido a la transmisión de formas de onda de US a través del pelo, la piel, el cráneo y la duramadre de los ratones (FIG. 22).

En la Fig. 22, se transmitió un ciclo único (parte superior) y un pulso de 100 ciclos (parte inferior) de 0,5 MHz a través del gel de acoplamiento ultrasónico, desde la superficie del transductor directamente a la superficie ara de un hidrófono (izquierda), o a través de una cabeza *ex vivo* en fresco (derecha) que contiene cabello, piel, cráneo y duramadre hasta la superficie de un hidrófono.

La Tabla 2 proporciona una descripción general de las formas de onda de estimulación de US utilizadas en este Ejemplo. En la Tabla 2, un solo asterisco (\*) indica que durante la investigación se utilizaron formas de onda de US convencionales. En la Tabla 2, un doble asterisco (\*\*) indica que se utilizaron formas de onda de US de relativamente alta intensidad para evaluar la seguridad.

Tabla 2. Propiedades de la forma de onda ultrasónica (US) transcraneal de baja intensidad utilizadas para estimular la corteza motora de ratón intacto

$f$	c/p	PD (ms)	PRF (KHz)	Np	Longitud de estim. de US (s)	$P_T$ (MPa)	$P_{II}$ (mJ/cm <sup>2</sup> )	ISPPA (W/cm <sup>2</sup> )	ISPTA (mW/cm <sup>2</sup> )	MI
*0,250	120	0,480	1500	80	0,053	0,089	0,082	0,167	123,40	0,18
0,250	80	0,320	1200	100	0,083	0,088	0,051	0,161	60,78	0,18
0,350	200	0,571	1500	40	0,027	0,071	0,044	0,077	65,98	0,12
0,350	180	0,514	1500	80	0,053	0,072	0,040	0,077	59,38	0,12
**0,350	80	0,229	2500	150	0,060	0,070	0,017	0,075	42,90	0,12
0,350	120	0,343	1500	80	0,053	0,071	0,027	0,076	40,76	0,12
0,350	125	0,357	1200	100	0,083	0,071	0,027	0,076	32,61	0,12
0,350	100	0,286	1500	80	0,053	0,072	0,022	0,076	32,40	0,12
0,350	80	0,229	1200	100	0,083	0,070	0,017	0,075	20,59	0,12
0,425	100	0,235	3000	1000	0,333	0,082	0,025	0,107	74,97	0,13
0,425	80	0,188	3000	150	0,050	0,083	0,019	0,103	57,80	0,13
0,425	80	0,188	3000	800	0,267	0,083	0,019	0,103	57,80	0,13
0,425	80	0,188	2750	200	0,073	0,083	0,019	0,103	52,98	0,13
0,425	80	0,188	1500	200	0,133	0,083	0,019	0,103	28,90	0,13
0,500	150	0,300	2500	150	0,060	0,097	0,065	0,225	162,74	0,14
*0,500	225	0,450	1500	80	0,053	0,092	0,095	0,216	142,20	0,13
0,500	200	0,400	1500	40	0,027	0,095	0,087	0,223	130,17	0,13
0,500	125	0,250	1500	100	0,067	0,097	0,054	0,225	80,78	0,14
*0,500	100	0,200	1500	80	0,053	0,097	0,043	0,228	64,53	0,14
0,500	80	0,160	1200	100	0,083	0,097	0,034	0,229	40,81	0,14

La influencia de las formas de onda de estimulación de US se examinó en la actividad cerebral intacta, registrando la actividad de unidades múltiples (MUA) de la corteza motora primaria (M1) de ratones ( $n = 6$ ). Las formas de onda de estimulación de US de baja intensidad restringidas de forma enfocada a M1 unilateral indujeron un aumento significativo de la frecuencia de picos corticales de una manera precisa de forma temporal (ANOVA,  $F_{19, 480} = 69,72$ ,  $P < 0,001$ ; FIG. 18C y la FIG. 23). La proporción de formas de onda de estimulación de US a M1 produjo potenciales de campo locales (LFP) con amplitudes medias de  $-350,59 \pm 43,34 \mu\text{V}$  (FIG. 18C). La aplicación de tetrodotoxina (TTX) a la corteza motora bloqueó la actividad cortical evocada por US, lo que indica que el US transcraneal suscita potenciales de acción mediados por canales de sodio activados por voltaje (FIG. 18C; control sin procesar (negro), control promedio (azul) y TTX promedio (rojo)).

#### Ejemplo de referencia 7: Determinación del área de corteza motora intacta activada por ultrasonido

Usando una técnica de marcaje por *c-fos* se realizaron estudios para determinar el área de la corteza motora activada por formas de onda de estimulación de US enfocadas de forma lateral ( $n = 5$  ratones). Un ANOVA reveló una densidad significativamente mayor de células activadas en la corteza motora que se tenía como objetivo en comparación con la corteza motora que no era el objetivo adyacente y la somatosensorial (S1) primaria ( $F_{4,45} = 17,1$ ,  $P < 0,001$ ; FIG. 24A). Otros análisis densiométricos revelaron agrupamientos significativamente más grandes de células activadas en la M1 que se tenía como objetivo, en comparación con la S1 que no era el objetivo y adyacente (área del agrupamiento de M1 objetivo =  $9,45 \pm 1,81 \text{ mm}^2$ , área del agrupamiento de S1 que no era el objetivo =  $3,01 \pm 1,54 \text{ mm}^2$ ; prueba de la  $t$ ,  $P < 0,05$ ; FIG. 24B). El tamaño del área activada es consistente con las longitudes de onda de US implementadas ( $\approx 3\text{-}6 \text{ mm}$  en el tejido cerebral), así como el área de los campos de presión acústica producidos por la envoltura espacial restringida de forma lateral de las formas de onda de estimulación de US generadas por las guías de enfoque ( $\approx 8\text{-}10 \text{ mm}^2$ ; FIG. 25).

Se obtuvieron perfiles de salida de presión multidimensionales, obtenidos utilizando un transductor de US plano de 25 mm solo (parte superior) y con una guía de enfoque de 5 mm de diámetro acoplada (parte central) o una guía de 5 mm acoplada, ahusada hasta un diámetro de salida de 2 mm (parte inferior), que se usa para dirigir de manera diferencial formas de onda de estimulación de US a la corteza motora. La FIG. 25 muestra los perfiles de presión normalizados obtenidos con un transductor plano de 25 mm (negro) y con una guía de enfoque de 5 mm (azul) o con un diámetro de salida de 2 mm ahusado (rojo) acoplada; se ilustra para los planos X (parte superior) e Y (parte inferior). Se ilustran para cada plano los valores de mitad del máximo de ancho máximo (FWHM, forma siglada de *full-width halfmaximum*).

#### Ejemplo de referencia 8: determinación de los efectos del ultrasonido sobre la actividad del sistema nervioso central intacto

Para determinar los efectos de la US transcraneal de baja intensidad sobre la actividad del sistema nervioso central (SNC) intacto, se investigó su influencia sobre los circuitos motores corticoespinales descendentes conocidos. Se

adquirieron registros de electromiograma (EMG) de alambres finos de la actividad muscular en respuesta a la proporción transcraneal de formas de onda de estimulación de US a la corteza motora intacta (n = 43 ratones; Fig. 18D y 18E). Por ejemplo, en la FIG. 18D, el esquema (parte superior) ilustra la estrategia experimental para estimular los tractos corticoespinales descendentes con ultrasonido transcraneal. Los trazados de electromiograma (EMG) sin procesar (parte inferior) en respuesta a la estimulación transcraneal derecha de M1 ilustran la actividad evocada por US del tríceps braquial izquierdo. La FIG. 18E muestra los trazados de EMG sin procesar (izquierda) y rectificadas por onda completa (FWR (forma siglada de *full-wave rectified*); derecha) para un suceso evocado por US promedio (10 ensayos) (parte inferior) y espontáneo (parte superior). La duración de la forma de onda de estimulación de US (negro), el trazado de EMG evocado por US promedio (gris) y la integral de EMG (verde) se superponen en la parte inferior derecha.

Los circuitos motores corticoespinales descendentes se estimulados de forma satisfactoria en el 90,3 % de los casos. La estimulación bilateral por US de la corteza motora produjo una activación motora bilateral de varios grupos musculares. Sin embargo, el US transcraneal proporcionado a través de guías de enfoque condujo a la activación selectiva de grupos musculares dependiendo de la región cortical que se tuviera como objetivo. Por ejemplo, la estimulación unilateral dirigida de M1 derecha desencadenó contracciones musculares de la pata delantera izquierda suficientes para inducir movimientos de la pata (FIG. 18D). En la mayoría de los casos, se cambió la ubicación de las guías de enfoque de US sobre la corteza motora para producir comportamientos de movimientos diferenciales (movimientos de bigotes en comparación con los movimientos de la pata delantera y de la cola). Aunque la resolución espacial para enfocar US actualmente está limitada por la longitud de onda acústica empleada, los avances recientes en el enfoque de US con óptica adaptativa permiten que el US tenga resoluciones espaciales por debajo de los límites de difracción, como se ha logrado en la microscopía óptica.

La estimulación unilateral con US de la corteza motora desencadenó la actividad de EMG en el músculo tríceps braquial contralateral (n = 17 ratones), con una respuesta media con una latencia de  $20,88 \pm 1,46$  ms que consistente en todos los ensayos. La FIG. 19A muestra la latencia de respuesta de EMG del tríceps braquial izquierdo en respuesta a la activación de M1 derecha; se representa como una función del número de ensayos repetitivos (izquierda) durante un ITI de 10 segundos. Se muestran los trazados sin procesar de EMG evocado por US individuales para distintos ensayos (derecha). La estimulación bilateral de la corteza motora para desencadenar movimientos de la cola fue, de forma similar, consistente y suscitó actividad de EMG en el músculo lumbosacrocaudal dorsal lateral (n = 26 ratones) con una latencia de respuesta de  $22,65 \pm 1,70$  ms. Estas latencias de respuesta son consistentes con las observaciones de otros que utilizan procedimientos optogenéticos y eléctricos para estimular la corteza motora. A continuación se estudió la repetibilidad de la función de la activación motora a medida que el intervalo entre ensayos (ITI) entre sucesos de estímulo por US disminuía. Un ANOVA reveló que la probabilidad de fallo de EMG aumentó significativamente ( $F_{3,92} = 120,40$ ;  $P < 0,001$ ) a medida que se redujo el ITI. La FIG. 19B muestra histogramas de probabilidad de fallo de EMG; se muestran para cuatro ITI que disminuyen progresivamente (izquierda). Se muestran los trazados de EMG evocado por US sin procesar para dos tiempos de ITI distintos (derecha). Para determinar si la actividad cortical evocada por US acciona la respuesta de EMG, en algunos experimentos se aplicó tetrodotoxina (TTX) a la corteza motora durante los ensayos de estimulación. Se observó que la aplicación de TTX a la corteza motora bloqueaba la actividad de EMG, lo que indica que el US transcraneal suscita potenciales de acción corticales para estimular actividad del circuito motor y las contracciones musculares periféricas (n = 4 ratones). La FIG. 19C muestra trazados de EMG sin procesar que ilustran la aplicación de TTX a la corteza motora, que bloquea la actividad del circuito corticoespinal descendente evocado por US.

### Ejemplo de referencia 9: Evaluación de los efectos del ultrasonido sobre la temperatura cerebral

Sin embargo, para evaluar la influencia del ultrasonido pulsado de baja intensidad sobre la temperatura del cerebro, la temperatura de la corteza motora se controló durante la transmisión de ultrasonido transcraneal mientras variaba la intensidad acústica y la duración del pulso (PD). Las ecuaciones para estimar la absorción térmica de US en tejidos biológicos predicen que los pulsos de US de 0,5 MHz que ejercen una  $p_r$  de 0,097 MPa para una PD de 0,57 ms pueden inducir un aumento de temperatura de  $2,8 \times 10^{-6}$  °C en el cerebro.

Brevemente, el cambio máximo de temperatura ( $\Delta T_{\text{máx}}$ ) se estima que es  $\Delta T_{\text{máx}} = \frac{Q\Delta t}{c_v}$  dónde  $\Delta t$  es el tiempo de exposición al pulso, donde  $c_v$  es la capacidad calorífica específica para el tejido cerebral  $\approx 3,6$  J/g/K y donde Q es la tasa a la que se produce el calor, definido por (Nyborg 1981):  $Q = \frac{ap_0^2}{\rho c}$  donde p es la densidad del medio, c es la velocidad del sonido en el medio como se describe anteriormente, donde a es el coeficiente de absorción del cerebro ( $\approx 0,03$  Np/cm para ultrasonido de 0,5 MHz), y  $p_0$  es la amplitud de presiones de las formas de onda de estimulación de US.

En algunos experimentos, antes de transmitir formas de onda ultrasónica transcraneales en cerebros intactos, se realizó una pequeña craneotomía (d  $\sim 2$  mm) en el hueso temporal del ratón. Después de retirar la duramadre, se insertó un termopar de 0,87 mm de diámetro (TA-29, Warner Instruments, EEC, Hamden, CT, EE. UU.) en la corteza motora, a través de la ventana craneal. El termopar se conectó a un dispositivo de control (TC-324B, Warner Instruments), que se conectó al Digidata 1440A para registrar la temperatura (señal de voltaje calibrada = 100 mV/°C) usando pClamp conectado a un PC. Para facilitar los análisis fuera de línea, los marcadores de señal LTT indicaron

el inicio de las formas de onda de estimulación de US.

Todas las formas de onda de estimulación de US usadas tenían valores de  $p_r < 0,097$  MPa y tiempos de PD  $< 0,57$  ms. Ninguna de las formas de onda de US utilizadas para estimular la actividad cortical suscitó un cambio significativo en la temperatura cortical dentro de los límites de resolución (FIG. 19D). Bajo estas condiciones experimentales, se precisaron pulsos de US con valores de  $p_r$  de 0,1 MPa y tiempos de DP  $> 50$  ms para producir un cambio de temperatura ( $\Delta T$ ) de  $\approx 0,02$  °C. La FIG. 19D muestra los registros de temperatura sin procesar (negro) y promedio (gris) procedentes de M1 en respuesta a la transmisión de formas de onda de US con distintas características de la intensidad. La FIG. 19D ilustra formas de onda de estimulación (parte superior) que no producen un aumento en la temperatura cortical como se observa con formas de onda de intensidad más alta (parte media e inferior). Estas observaciones refuerzan la idea de un mecanismo de acción predominantemente mecánico (no térmico) y resaltan los márgenes de seguridad de las formas de onda de estimulación.

**Ejemplo de referencia 10: Determinación de los efectos de las variaciones de la frecuencia acústica y la intensidad del ultrasonido sobre la actividad de circuitos neuronales**

Se diseñaron experimentos para determinar cómo la frecuencia e intensidad acústica de las formas de onda de estimulación de US influían en la actividad de circuitos neuronales. Se examinó el efecto de cuatro frecuencias de US distintas (0,25, 0,35, 0,425, 0,500 MHz) sobre las amplitudes de EMG producidas por el tríceps braquial en ratones ( $n = 20$ ). Un ANOVA bidireccional reveló un efecto principal significativo de la frecuencia del US sobre las amplitudes de EMG ( $F_{3,1085} = 3,95, P < 0,01$ ), por lo que las frecuencias más bajas produjeron respuestas de EMG más robustas (FIG. 19E). Para comprender mejor cómo la intensidad de las formas de onda de estimulación de US influye en la actividad neuronal, se centró la atención en la medida de la intensidad acústica  $I_{SPTA}$  dado que tiene en cuenta tanto la integral de la intensidad del pulso (PII) como la frecuencia de repetición de pulsos (PRF). A través del intervalo de frecuencias acústicas examinadas anteriormente, se estudiaron 20 formas de onda distintas que tienen distintos valores de  $I_{SPTA}$  (Tabla 2). El ANOVA bidireccional reveló un efecto principal significativo de la  $I_{SPTA}$  sobre la amplitud del EMG ( $F_{19,1085} = 9,78, P < 0,001$ ; FIG. 19F), lo que indica que valores de  $I_{SPTA}$  más bajos desencadenaron amplitudes de EMG más grandes. Específicamente, la FIG. 19F muestra las amplitudes de EMG evocadas por US normalizadas representadas en función de las intensidades de US ( $I_{SPTA}$ ) producidas por 20 formas de onda de estimulación distintas. En la Fig. 2G, la interacción entre la intensidad del US ( $I_{SPTA}$ ) y la frecuencia del US se representan como una función de las amplitudes de EMG normalizadas y el ANOVA bidireccional también reveló una frecuencia significativa por interacción de intensidades ( $F_{3,1085} = 7,25, P < 0,01$ ). En conjunto, estos datos indican que el US transcraneal de baja intensidad y baja frecuencia es eficaz para accionar la actividad de circuitos corticales en animales intactos.

**Ejemplo de referencia 11: Caracterización de la intensidad de las formas de onda de estimulación de ultrasonido**

Para caracterizar las características de la intensidad de las formas de onda de estimulación de US pulsado, se registraron los trazados de voltaje producidos por las ondas de presión de US, utilizando un hidrófono de aguja calibrado (HNR 500, Onda Corporation, Sunnyvale, California, EE. UU.) y un osciloscopio digital Agilent DSO6012A de 100 MHz conectado a un PC. Para confirmar que los transductores funcionaban a la frecuencia acústica deseada, se realizó una TRF sobre los trazados de voltaje del hidrófono, registrados en respuesta a las formas de onda de US. Usando un micromanipulador de xyz (MP-225, Novato, CA, EE. UU.) para explorar la colocación del hidrófono a través de los campos de US, todas las mediciones de intensidad se realizaron en el campo lejano mediante el registro de las presiones transmitidas a través cabezas frescas *ex vivo* (cabello, piel, cráneo y dura intactos) utilizando guías de enfoque. Más específicamente, las mediciones de intensidad se realizaron a partir de puntos que se tenían como objetivo, correspondientes a la corteza motora a 0,8 mm por debajo de la superficie del cráneo, así como a la misma distancia de la superficie del transductor sin transmitir a través de cabezas *ex vivo* (FIG. 22). Las formas de onda de US transcraneal se transmitieron a la corteza motora intacta desde transductores de US, utilizando guías de enfoque lateral diseñadas a medida que consistían en tubos de polietileno de 5 mm de diámetro o tubos de 5 mm de diámetro ahusados hasta una abertura de salida de 2 mm de diámetro (FIG. 25). Las guías de enfoque se rellenaron con gel de acoplamiento de ultrasonido.

Las características de la intensidad de las formas de onda de US se calcularon basándose en las normas y ecuaciones técnicas publicadas por el American Institute of Ultrasound Medicine (AIUM) y la National Electronics Manufacturers Association (NEMA) (NEMA 2004). La integral de la intensidad del pulso (PII) se definió como:  $PII = \int \frac{p^2(t)}{Z_0} dt$  donde  $p$  es la presión pico instantánea,  $Z_0$  es la impedancia acústica característica en Pas/m, definida como  $\rho c$ , donde  $\rho$  es la

densidad del medio y  $c$  es la velocidad del sonido en el medio. La  $p$  se estima en 1028 kg/m<sup>3</sup> y  $c$  en 1515 m/s para tejido cerebral, basándose en informes anteriores (Ludwig 1950). La intensidad promedio de pulso y de pico espacial (/SPPA)

se definió como:  $I_{SPPA} = \frac{PII}{PD}$  donde PD es la duración del pulso definida como  $(t)(0,9PII - 0,1 PII)$  1,25 como se indica en las normas técnicas establecidas por el AIUM y la NEMA (NEMA 2004). La intensidad promedio temporal y de pico espacial (/SPPA)

se definió como:

$$I_{SPTA} = PII(PRF)$$

donde PRF es igual a la frecuencia de repetición de pulsos en hercios. El índice mecánico (MI (forma siglada de mechanical index); véase la Tabla 2) se definió como:

$$MI = \frac{p_r}{\sqrt{f}}$$

### Ejemplo de referencia 12: examen de los efectos del ultrasonido sobre la infraestructura cerebral

Se implementaron varias estrategias experimentales para examinar los efectos del ultrasonido sobre la infraestructura celular y la vasculatura cerebral. Antes de todos estos experimentos, se entregó a la corteza motora una forma de onda de estimulación de US de intensidad relativamente alta (véase la Tabla 2) repetida a un ITI de 10 s durante > 20 min. Se usó microscopía electrónica de transmisión cuantitativa para examinar la ultraestructura de las sinapsis excitadoras en la corteza motora. El tejido se preparó para microscopía electrónica y la obtención de imágenes se realizó utilizando procedimientos convencionales. Después de la estimulación, los animales se perfundieron por vía transcardíaca con glutaraldehído al 2 %, formaldehído al 2,5 % en tampón de cacodilato de sodio. Posteriormente, se extrajeron los cerebros y se fijaron posteriormente en glutaraldehído al 2 %, formaldehído al 2,5 % en tampón cacodilato de sodio, durante una noche a 4 °C. Después de la fijación posterior, los cerebros se lavaron 3 veces en tampón de cacodilato de sodio y se cortaron en secciones de 300 pm utilizando un vibrátomo. Se identificaron los cortes que contenían corteza motora y se lavaron 5 veces (15 min cada vez) con tampón de cacodilato de sodio, con un lavado final durante una noche. La fijación secundaria se realizó al día siguiente con tetróxido de osmio 0,2 % en tampón de cacodilato de sodio, durante 1 hora a temperatura ambiente. Los cortes se lavaron 3 veces en tampón de cacodilato de sodio y 3 veces en agua, antes de teñirlos toda la noche a 4 °C con acetato de uranilo al 0,25 %. Las muestras se deshidrataron en una serie graduada de etanol al 20 %, 40 %, 60 %, 80 % y 100 % (3 lavados cada uno) y finalmente lavando dos veces en acetona al 100 %. Las muestras se infiltraron al 25 %, 50 %, 75 % y 100 % en resina de Spur (tres incubaciones cada vez) durante los siguientes 3 días antes de incluirlas de forma plana en portaobjetos de vidrio recubiertos con teflón y polimerizar durante la noche a 60 °C.

Después, se identificó la corteza motora al microscopio de disección y se recortó para el montaje en bloques. Los cortes recortados que contenían corteza motora se montaron en bloques de resina, se recortaron nuevamente y a continuación se cortaron de forma ultra fina a 70 nm en un ultramicrotomo (Leica Ultra Cut R, Leica Microsystems, Inc., Bannockburn, IL, EE. UU.). Las muestras se recogieron en rejillas de ranura de cobre recubiertas con formvar y se teñieron posteriormente con acetato de uranilo al 1 % en etanol y citrato de plomo de Sato durante 5 y 3 minutos, respectivamente. Se tomaron imágenes de las muestras a 80 kV en un microscopio electrónico de transmisión Phillips CM 12 y se adquirieron imágenes con una cámara CCD Gatan (modelo 791, Gatan, Inc., Warrendale, PA, EE. UU.). Las imágenes se adquirieron a 8.000x para el análisis de la ultraestructura global, a 19.500x para el análisis de la densidad sináptica y a 40.000x para análisis cuantitativo de los parámetros específicos de la sinapsis.

La FIG. 20A también muestra histogramas (derecha) de ratones de control (n = 5) y estimulados (n = 6) para densidad sináptica media (arriba a la izquierda), densidad media de las vesículas sinápticas de botón axónico (arriba a la derecha), longitud media de PSD (parte inferior izquierda) y número medio de DV (forma siglada de *docked vesicles*) que ocupan zonas activas (abajo a la derecha). Una prueba de la T de muestras independientes no reveló una diferencia significativa de la densidad de las sinapsis entre los grupos (control =  $16,59 \pm 0,81$  sinapsis/100  $\mu\text{m}^2$  de una corteza de 2,3  $\text{mm}^2$ , estim. con ultrasonido =  $22,99 \pm 4,07$  sinapsis/100  $\mu\text{m}^2$  de una corteza de 4,2  $\text{mm}^2$ ;  $P > 0,10$ ; FIG. 20A). Las pruebas de la t adicionales no revelaron diferencias significativas en la longitud de la densidad postsináptica (PSD) (control =  $0,225 \pm 0,009$   $\mu\text{m}$  a partir de 99 sinapsis, estim. con ultrasonido =  $0,234 \pm 0,009$   $\mu\text{m}$  a partir de 130 sinapsis;  $P > 0,10$ ), el área de los terminales presinápticos (control =  $0,279 \pm 0,02$   $\mu\text{m}^2$ , estim. con ultrasonido =  $0,297 \pm 0,02$   $\mu\text{m}^2$ ;  $P > 0,10$ ), la densidad de vesículas en los terminales presinápticos (control =  $206,89 \pm 9,52$  vesículas/ $\mu\text{m}^2$ , estim. con ultrasonido =  $209,85 \pm 8,14$  vesículas/ $\mu\text{m}^2$ ;  $P > 0,10$ ), o el número de vesículas acopladas (DV) que ocupan zonas activas (control =  $21,71 \pm 0,91$  DV/ $\mu\text{m}$ , estim. con ultrasonido =  $20,26 \pm 0,61$  DV/ $\mu\text{m}$ ;  $P > 0,10$ ) entre los grupos de tratamiento como se muestra en la FIG. 20A. En general, no hubo diferencias cualitativas en la ultraestructura del neuropilo cortical entre los grupos de tratamiento.

No se observó un cambio en la densidad de gliocitos apoptóticos (control =  $0,26 \pm 0,02$  células/100  $\text{mm}^2$  de una corteza de 17,0  $\text{cm}^2$  de 5 ratones, estim. con ultrasonido =  $0,22 \pm 0,02$  células/100  $\text{mm}^2$  de una corteza de 15,6  $\text{cm}^2$  de 5 ratones;  $P > 0,05$ ) o neuronas apoptóticas (control =  $0,032 \pm 0,02$  células/100  $\text{mm}^2$ , estim. con ultrasonido =  $0,067 \pm 0,02$  células/100  $\text{mm}^2$ ;  $P > 0,10$ ) en respuesta a la estimulación con ultrasonido según lo analizado mediante inmunocitoquímica cuantitativa de Caspasa-3 escindida (Figura 20B). Se obtuvieron imágenes confocales de células positivas para NeuN y Caspasa 3 escindida de cortes de 50  $\mu\text{m}$  de la corteza motora del control y de los hemisferios cerebrales estimulados por US a alto y bajo aumento. Los histogramas ilustran la densidad media de gliocitos (parte superior) y neuronas (parte inferior) positivos para caspasa 3 escindida en la corteza motora de hemisferios estimulados por US y de control.

### Ejemplo de referencia 13: Examen de los efectos del ultrasonido sobre la vasculatura cerebral

En otro conjunto de experimentos se examinó la integridad de la vasculatura cerebral. Antes de los experimentos, los ratones recibieron una administración intravenosa de isotiocianato de fluoresceína-dextrano (10 kDa), que no cruza la barrera hematoencefálica (BHE) en condiciones normales. Durante el análisis posestimulación del córtex que se tenía como objetivo utilizando microscopía confocal, se observó que las formas de onda de estimulación de US no produjeron daños en la vasculatura cerebral ni rompieron la barrera hematoencefálica (control = área cortical de 353,35 cm<sup>2</sup> y longitud de la vasculatura de 17,96 cm, examinadas en 5 ratones, estim. con ultrasonido = área cortical de 352,96 cm<sup>2</sup> y longitud de la vasculatura de 18,34 cm, examinadas en 5 ratones).

En un conjunto separado de experimentos, se coadministró isotiocianato de fluoresceína-dextrano por vía intravenosa con contraste de microburbujas de ecografía (Optison®) que se sabe provoca la ruptura de la BHE durante la administración de ultrasonido al cerebro intacto. Los resultados de estos experimentos de control positivo (n = 3 ratones) confirmaron la capacidad de detectar daño en la vasculatura cerebral o rotura de la BHE si se hubieron producido en respuesta a formas de onda de estimulación de ultrasonido. Se obtuvieron imágenes confocales de células marcadas con TO-PRO-3 y de la vasculatura cerebral rellena con fluoresceína-dextrano a partir de cortes de 75 µm de corteza motora de un cerebro control y estimulado por ultrasonido. Se realizó una estimulación con ultrasonido de control positivo en presencia de Optison®, un contraste de microburbujas de ecografía que se sabe que provoca daños en la vasculatura mediados por cavitación.

Aunque no se encontró evidencia histológica de daño tisular, se realizaron experimentos para determinar si la estimulación transcraneal por US de la corteza motora producía comportamientos motores deteriorados. El día antes de la estimulación, 24 horas posestimulación, y nuevamente 7 días posestimulación, se realizó una serie de experimentos diseñados para evaluar la función motora. Un ANOVA de medidas repetidas no reveló ningún efecto significativo de la estimulación por US (n = 9 ratones) en comparación con los controles tratados de forma simulada (n = 9 ratones) sobre el comportamiento motor, determinado por una tarea de marcha en varilla giratoria, que se diseñó para evaluar la coordinación, la estabilidad y el equilibrio ( $F_{1,9} = 0,211$ ,  $P > 0,1$ ; FIG. 20C). La función motora y la fuerza de agarre también se midieron al someter a los ratones a tareas de colgado del cable. Nuevamente, las medidas repetidas ANOVA no revelaron ningún efecto de grupo significativo sobre el tiempo de colgado ( $F_{1,9} = 0,05$ ;  $P > 0,1$ ; FIG. 20C). Durante el control diario, no se observaron diferencias en el comportamiento de alimentación, el comportamiento de acicalado o los reflejos de sobresalto entre los ratones estimulados con US y los controles simulados. Basándose en estas observaciones, la conclusión es que el US transcraneal de baja intensidad proporciona un modo seguro y no invasivo de estimulación de la actividad cortical.

#### 30 **Ejemplo de referencia 14: Examen de los efectos del ultrasonido sobre el comportamiento motor**

En esos experimentos que utilizan ensayos de comportamiento, se realizaron una serie de análisis de comportamiento para evaluar la influencia de la estimulación por US de la corteza motora sobre la coordinación, la estabilidad, el equilibrio y la fuerza de agarre. Los ratones de control tratados de forma simulada y estimulados con ultrasonido se sometieron a pruebas de comportamiento utilizando una tarea de varilla giratoria y una tarea de colgado del cable. Para ambos grupos, la prueba de referencia pretratamiento se realizó para ambas tareas 24 h antes del tratamiento. El día del tratamiento, los controles tratados de forma simulada y los animales estimulados con US se anestesiaron con ketamina/zilazina y se recortó el pelo como se describió anteriormente. Después de la estimulación con ultrasonido o el tratamiento simulado, se realizaron pruebas de destreza motora en las tareas de varilla giratoria y de colgado del cable nuevamente a las 24 h y 7 días más tarde. En cada día de prueba, los animales corrieron en la varilla giratoria (25,4 cm de circunferencia, 10,8 cm de ancho varilla) hasta un fallo (tiempo en segundos antes de caer de la varilla giratoria) en 5 ensayos, cada uno a dos velocidades (17 y 26 RPM). Después de las pruebas con la varilla giratoria, los animales realizaron pruebas de colgado del cable hasta el momento de fallo (tiempo en segundos antes de caerse del cable suspendido) en 5 ensayos. En las tareas de colgado del cable, los ratones se colgaron por sus patas delanteras de un cable (76,2 cm de largo x 0,16 cm de diámetro) suspendido a 51,0 cm sobre el suelo. Los datos de cada uno de los cinco ensayos se promediaron para cada tarea en cada día de prueba.

#### 50 **Ejemplo de referencia 15: Examen de los efectos de la presión acústica sobre los líquidos cerebrales**

Las propiedades mecánicas de onda de la presión acústica afectan estos líquidos cerebrales. Con respecto a las acciones locales del US, el espacio extracelular puede considerarse un medio continuo. Un examen del número de Knudsen ( $Kn = \lambda / L$ , donde  $\lambda$  es la longitud de la trayectoria libre media molecular y  $L$  es la escala de longitud característica para los límites físicos de interés). Por lo tanto, con respecto a los efectos del US sobre la dinámica del líquido cefalorraquídeo (LCR) en el espacio extracelular del cerebro, el X del agua ( $10^{-11}$  m) proporciona una estimación razonable para el del LCR (especialmente considerando que las proteínas moleculares grandes que se encuentran en el LCR y la presión intracraneal reducirían aún más los valores de  $\lambda$ ). Después, tomando el espacio extracelular entre las células en el cerebro ( $L$ ) como de  $\approx 10^{-8}$  m, se calcula un valor de Kn de 0,001. Cuando  $Kn < 1$ , las formulaciones de la Mecánica de medios continuos (opuestas a la mecánica cuántica para las cuales  $Kn \gg 1$ ) son válidas y pueden aplicarse. Adicionalmente, la combinación de un espacio extracelular continuo con la presencia de líquidos newtonianos (LCR) y no newtonianos (membranas celulares viscoelásticas) en el cerebro sustenta esta posición. El US puede modular de manera no invasiva la actividad neuronal a través de una combinación de acciones de presión/líquido/membrana que implican cavitación estable y corriente acústica (formación de microchorros, remolinos, y turbulencia) además de la fuerza de radiación acústica, tensión de cizalla, efectos de Bernoulli, y otras consecuencias de mecánica de fluidos, que se deben a pequeños desajustes de impedancia acústica (condiciones de

límites) entre las bicapas lipídicas, los líquidos intra/extracelulares circundantes y la vasculatura cerebral intercalada.

Por ejemplo, la Tabla 3 presenta la velocidad del sonido, la densidad del medio y la impedancia acústica en el cerebro y los tejidos circundantes. La velocidad del sonido ( $c$ ) varía en distintos medios (líquidos biológicos, incluyendo tejidos en este caso) dependiendo del módulo de compresibilidad y la densidad ( $\rho$ ) de un medio dado. Las propiedades físicas del medio determinan su impedancia acústica característica ( $Z$ ), definida como  $Z = \rho c$ . Un desajuste de impedancia acústica se define como la diferencia en  $Z$  a través de dos medios ( $Z_2 - Z_1$ ) y establece una condición de límite. Los desajustes de impedancia acústica en las interfaces celulares subyacen a muchos efectos biológicos del US y sirven como el principio básico que permite el diagnóstico por la imagen al hacer que el US se refleje y transmita de manera diferencial. Al considerar cómo se comporta e influye el US sobre la actividad cerebral, los coeficientes de transmisión, absorción, reflexión, refracción, dispersión y atenuación del US para dados medios son factores importantes a tener en cuenta. Las condiciones de límites establecidas por las interfaces celulares median los comportamientos de los líquidos, lo que puede influir en la actividad neuronal.

Tabla 3. Valores aproximados de la velocidad del sonido, la densidad de medios y la impedancia acústica

Tejido/Medios	$c$ (m/s)	$\rho$ (Kg/m <sup>3</sup> )	$Z$ (Kg/s/m <sup>2</sup> ) x 10 <sup>6</sup>
Aire	333	0,0012	0,0004
Agua	1480	1000	1,48
LCR	1515	1006	1,52
Cráneo	4080	1912	7,80
Cerebro	1505 - 1612	1030	1,55 - 1,66
Grasa	1446	920	1,33
Arteria	1532	1103	1,69
Sangre	1566	1060	1,66
Músculo	1542 - 1626	1070	1,65 - 1,74

Con respecto a los mecanismos que subyacen a la neuromodulación ultrasónica, los experimentos ilustran (1) las respuestas viscoelásticas de las neuronas producidas por US, (ii) que la presencia de corriente acústica y de flujo turbulento produjo burbujas compresibles que se aproximan al tamaño de las neuronas, y (iii) la presencia de cavitación estable en respuesta a los pulsos de US que aumentan la actividad neuronal. Por ejemplo, el uso de exploraciones de líneas confocales ilustra la influencia de la fuerza de radiación producida por el ultrasonido longitudinal sobre las neuronas piramidales CA1 en un corte de hipocampo agudo teñido con un colorante fluorescente de membrana (DiO). La compresión de membrana en respuesta a los pulsos de US se puede detectar mediante un aumento de la intensidad de fluorescencia dentro de las regiones de interés indicadas. Los efectos de la tensión de cizalla pueden observarse mediante intensidades de píxeles elevadas que se extienden de forma vertical más allá de las regiones de interés resaltadas. Un borrón horizontal de intensidades de píxeles elevadas después de la finalización de los pulsos de ultrasonido ilustra los tiempos de relajación de la membrana en milisegundos y la viscoelasticidad neuronal. Además, las imágenes confocales a intervalos de tiempo de microburbujas en una solución que contiene colorante fluorescente sirven para ilustrar la transmisión acústica, la formación de microchorros y la turbulencia del líquido en respuesta al ultrasonido. De manera similar, los experimentos proporcionaron ejemplos de una pequeña microburbuja que experimentaba cavitación estable y una microburbuja más grande que experimentaba cavitación inercial antes de explotar. La FIG. 26A muestra una ilustración que representa algunas de las acciones mecánicas de fluidos mediante las cuales el US puede modular la actividad neuronal. La FIG. 26B muestra un modelo compuesto de tejido cerebral, donde distintas interfaces celulares establecen sitios de límite que tienen distintas propiedades debido a desajustes de impedancia acústica.

En los experimentos que utilizan investigaciones histológicas de regiones cerebrales estimuladas y no estimuladas de ratones que reciben estimulación transcraneal por US de la corteza motora, el tejido se preparó de la siguiente manera. Los ratones se perfundieron por vía transcardíaca utilizando paraformaldehído al 4 % en PBS. Se extrajeron los cerebros de los ratones y se fijaron posteriormente en paraformaldehído al 4 % durante una noche. Después, se hicieron cortes frontales de la corteza motora estimulada y la adyacente no estimulada utilizando un vibrátomo o un criótomo. El análisis por microscopía de luz transmitida de las lesiones electrolíticas realizadas después de los registros extracelulares se realizó utilizando criocortes frontales de 30  $\mu$ m de grosor teñidos con violeta de cresilo.

Después de la perfusión transcardíaca y la posterior fijación, se prepararon cortes frontales (50  $\mu$ m) utilizando un vibrátomo y los cerebros de algunos ratones estimulados de forma unilateral mediante formas de onda de US. Los cortes de cerebro se marcaron de forma doble mediante inmunocitoquímica de fluorescencia como se describe de manera similar. Los cortes de cerebro se marcaron con anticuerpos frente a Caspasa-3 escindida (1:250; Asp 175-9661, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, EE. UU.) o c-fos (1:250; SC-253, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, EE. UU.) y NeuN (1:1000, MAB377, Millipore, Billerica, MA, EE. UU.). Después de la incubación con el anticuerpo primario, los cortes se lavaron y se incubaron con los anticuerpos secundarios con Alexa Fluor 568 (1:500; Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) y Alexa Fluor 633 (1:500; Invitrogen) apropiados. Luego, los cortes se lavaron 3 veces en PBS, se montaron en portaobjetos de vidrio y se cubrieron con una solución de montaje de fluorescencia (H-1000; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE. UU.). Se adquirieron imágenes de fluorescencia de dos canales en

un microscopio confocal de barrido láser Olympus Fluoview FV-300 (Olympus America, Inc., Center Valley, Pennsylvania, EE. UU.).

Antes de los ensayos de estimulación con US, algunos animales recibieron una infusión intravenosa de isotiocianato de fluoresceína al 5 % - dextrano (10 kDa; Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.) en una solución de cloruro de sodio al 0,9 % (0,35 ml), que no cruza la barrera hematoencefálica (BHE) en condiciones normales (Kleinfeld 1998). Después de la estimulación con US, los ratones se sometieron a eutanasia utilizando inhalación de CO<sub>2</sub> inhalación y rápidamente se decapitaron para impedir la pérdida de fluoresceína de la vasculatura. Los cerebros se extrajeron rápidamente y después de la fijación durante la noche en paraformaldehído al 4 %, se prepararon cortes frontales (75 µm) utilizando un vibrátomo. Después, los cortes flotantes se marcaron con TO-PRO-3 (1:1000; Invitrogen) para identificar cuerpos celulares. Después de lavar y montar como se describe anteriormente, se examinó la vasculatura cerebral de la corteza motora estimulada y no estimulada utilizando microscopía confocal. En un conjunto distinto de ratones, se confirmó la detección de la BHE o daño cerebrovascular utilizando la estrategia descrita anteriormente. En estos experimentos de control positivo, los ratones recibieron una infusión intravenosa de isotiocianato de fluoresceína-dextrano al 5 % junto con un contraste de microburbujas de ecografía (Optison®; GE Healthcare, Piscataway, NJ, EE. UU.), que se sabe provoca la ruptura de la BHE durante la administración de US al cerebro intacto (Raymond 2008). Los cortes de cerebro se prepararon procesándolos de manera similar a lo descrito anteriormente y se tomaron imágenes con microscopía confocal.

En los experimentos que utilizan registros extracelulares, la actividad extracelular se registró utilizando procedimientos convencionales con microelectrodos de tungsteno ( $\approx 1$  M $\omega$ , FHC, Inc., Bowdoin, ME, EE. UU.). Los ratones anestesiados se colocaron en un sistema de estereotaxia para ratón Cunningham y se realizó una craneotomía (d «1,5 mm) por encima de la corteza motora primaria (M1). Después, los microelectrodos de tungsteno se redujeron (0,3 a 0,8 mm) en el campo dendrítico apical de las neuronas piramidales de la capa 5 de M1 (Figura 23). Se conectaron microelectrodos de tungsteno a un Medusa PreAmp (RA16PA; Tucker-Davis Technologies, Alachua, FL, EE. UU.) y a una estación de trabajo de neurofisiología multicanal (Tucker-Davis Technologies) que consiste en una estación de base de multiprocesador Pentx RX5 para adquirir la actividad extracelular. La actividad extracelular sin procesar se adquirió a una frecuencia de muestreo de 24,414 kHz. La señal de MUA se filtró entre 0,3 y 6 kHz, mientras que la señal de LFP se filtró entre 1 y 120 Hz, y ambas señales se volvieron a muestrear a 1,017 kHz. Las formas de onda de US transcraneal se enviaron posteriormente al lugar de registro de M1 ipsilateral, colocando el borde lateral de los transductores acoplados a la guía de enfoque a  $< 1$  mm de forma caudal a la ventana craneal. Para facilitar los análisis fuera de línea, los marcadores de señal LTT indicaron el inicio de las formas de onda de estimulación de ultrasonido. Al final de los experimentos, se realizaron lesiones electrolíticas para confirmar los sitios de registro en las evaluaciones histológicas (FIG. 23). La FIG. 23A muestra un gráfico de trama de picos (*spike raster plot*) que ilustra un aumento de los picos corticales en función del tiempo en respuesta a la estimulación con US, mientras que la FIG. 23 B muestra los trazados de LFP sin procesar (*negro*) y promedio (*gris*) registrados en respuesta a la estimulación por US (*parte superior*). La FIG. 23C muestra la integral del EMG promedio registrado a partir del tríceps braquial izquierdo en respuesta a la estimulación transcraneal por US de la corteza motora derecha (*parte inferior*). La FIG. 23D muestra un histograma de tiempo postestímulo (en períodos de 50 ms) que ilustra el recuento promedio de picos de MUA registrados 500 ms antes y 500 ms después de la proporción de formas de onda de estimulación de US a la corteza motora.

En los experimentos que utilizaron registros de EMG, los registros de EMG de alambres finos se realizaron utilizando procedimientos convencionales y un amplificador de CA diferencial de cuatro canales (modelo 1700, A-M Systems, Inc., Sequim, WA, EE. UU.) con un filtro de paso de banda de 10-1000 Hz y una ganancia aplicada de 100 X. La interferencia eléctrica se rechazó utilizando un filtro de muesca de 60 Hz. Las señales de EMG se adquirieron a 2 kHz utilizando un Digidata 1440A y pClamp. Para facilitar los análisis fuera de línea, los marcadores de señal LTT indicaron el inicio de las formas de onda de estimulación de US. Se fabricaron pequeñas púas en un extremo sin recubrimiento de 2 mm de un alambre de acero recubierto de teflón (California Fine Wire, Co., Grover Beach, CA, EE. UU.). Después, se insertaron cables de registro individuales en los músculos apropiados con una jeringa hipodérmica de calibre 30, antes de conectarlos al amplificador. Los cables de conexión a tierra se construyeron de manera similar y se insertaron por vía subcutánea en la superficie dorsal del cuello.

Todos los datos electrofisiológicos (MUA, LFP y EMG) se procesaron y analizaron utilizando rutinas escritas a medida en Matlab (The Mathworks, Natick, MA, EE. UU.) o Clampfit (Molecular Devices). Las características de la forma de onda del ultrasonido se analizaron utilizando trazados de voltaje de hidrófono y rutinas personalizadas escritas en Matlab y Origin (OriginLab Corp., Northampton, MA, EE. UU.). Todas las imágenes histológicas confocales se procesaron utilizando *ImagenJ* (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Los datos de microscopía electrónica se cuantificaron utilizando *ImagenJ* y procedimientos similares a los descritos anteriormente. Los datos inmunohistoquímicos se analizaron utilizando procedimientos descritos anteriormente. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando SPSS (SPSS, Inc., Chicago, IL, EE. UU.). Los datos mostrados son media  $\pm$  E.T.M a menos que se indique otra cosa.

Los ejemplos descritos en el presente documento demuestran que las formas de onda de estimulación de ultrasonido estimulan la actividad neuronal en construcciones tanto *in vitro* como *in vivo*. En general, las formas de onda de estimulación construidas utilizando pulsos de ultrasonido que tienen una alta *P/II* ( $\approx 4,0$  J/cm<sup>2</sup>) repetidas a PRF más bajas ( $\ll 50$  Hz) durante períodos cortos ( $\ll 5$  s) modularon de forma eficaz la actividad neuronal *in vitro* (por ejemplo, cultivo de cortes de hipocampo). En general, las formas de onda de estimulación construidas utilizando pulsos de



ultrasonido que tienen una baja *P//* ( $<0,1 \text{ mJ/cm}^2$ ) repetidas a PRF altas (1,0 - 3,0 KHz) durante períodos cortos ( $< 0,4 \text{ s}$ ) modularon de forma eficaz la actividad neuronal *in vivo* (por ejemplo, cerebro intacto).

5 Debe entenderse que los compuestos, composiciones, artículos, dispositivos y/o procedimientos desvelados no se limitan a procedimientos o dispositivos específicos a menos que se especifique lo contrario, o a reactivos particulares a menos que se especifique lo contrario, y como tal, por supuesto, pueden variar. Además, debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento es únicamente con el fin de describir realizaciones particulares, y no se pretende que sea limitante.

10 En la descripción, a los efectos de la explicación, se exponen numerosos detalles específicos para proporcionar una comprensión completa de la presente invención. Sin embargo, será evidente para un experto en la materia que la presente invención puede ponerse en práctica sin estos detalles específicos. En otros casos, se muestran estructuras y dispositivos bien conocidos en forma de diagrama de bloques para evitar entorpecer innecesariamente la presente invención.

**REIVINDICACIONES**

1. Un dispositivo generador de ondas ultrasónicas para modular la actividad de las células neuronales de un sujeto, que comprende

5 al menos un componente para generar una onda ultrasónica, adaptado para proporcionar una forma de onda de estimulación a un sitio de células neuronales a modular, en el que el al menos un componente para generar una onda ultrasónica comprende un transductor de ultrasonidos, que tiene una frecuencia central;  
en el que la forma de onda de estimulación comprende una pluralidad de pulsos individuales y cada pulso incluye uno o más ciclos a una frecuencia ultrasónica,  
10 en el que cada dicho pulso individual de la pluralidad de pulsos individuales comprende múltiples frecuencias, en el que cada dicho pulso individual tiene una duración de pulso que varía de 0,001 ms a 10 segundos, en el que la pluralidad de pulsos individuales se repite a una frecuencia de repetición de pulsos que varía de 0,001 a 10 KHz,  
en el que la forma de onda de estimulación tiene una intensidad en un intervalo de 0,0001 a 100 W/cm<sup>2</sup>, y  
15 en el que el al menos un componente para generar una onda ultrasónica se acciona usando formas de onda analógicas o digitales;  
**caracterizado porque:**  
cada uno de los pulsos individuales de la forma de onda de estimulación comprende múltiples frecuencias en un intervalo de 0,1 a 0,9 MHz, en el que el al menos un componente está configurado para ser accionado fuera de su frecuencia central para introducir energía fuera de resonancia que comprende una frecuencia de batido o un armónico.  
20

2. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que el al menos un componente para generar ondas ultrasónicas comprende un transductor piezoeléctrico de ultrasonidos.

3. El dispositivo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que está adaptado para proporcionar la forma de onda de estimulación de manera enfocada o desenfocada.

25 4. El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la forma de onda de estimulación comprende ondas cuadradas, ondas sinusoidales, formas de onda dentadas, formas de onda de barrido o formas de onda arbitrarias, o combinaciones de una o más formas de onda.

5. El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el al menos un componente para generar ondas ultrasónicas comprende de 1 a 1000 elementos transductores de ultrasonidos.

30

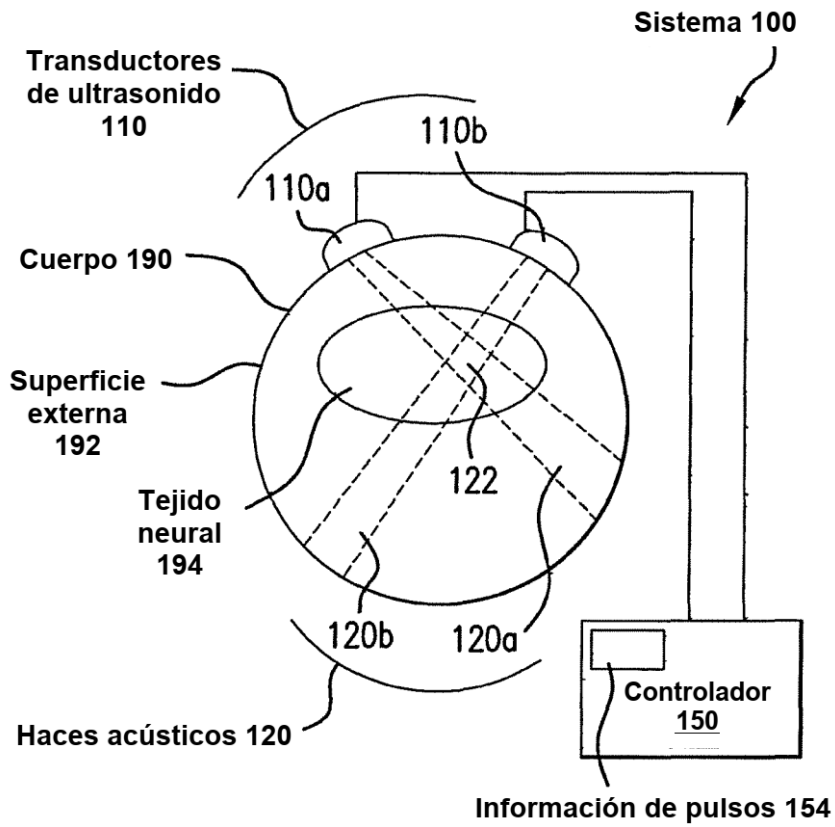


FIG. 1

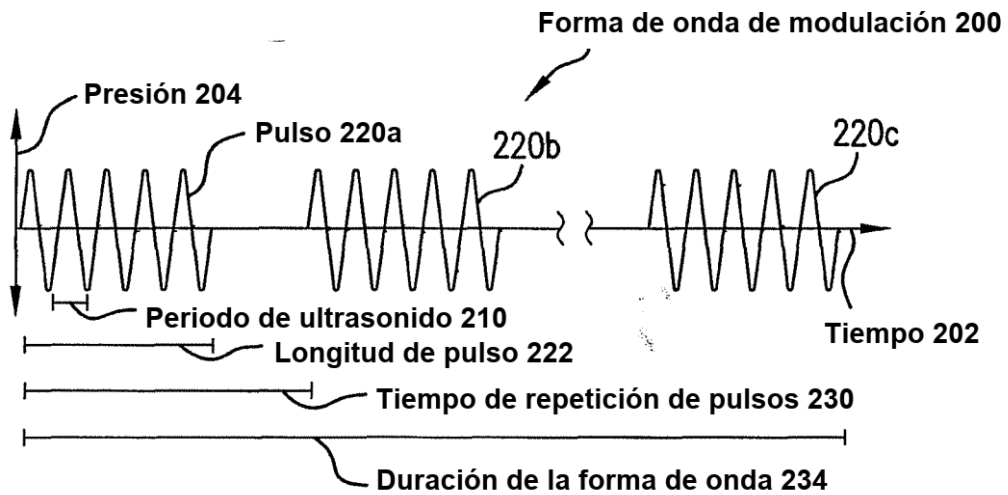


FIG. 2

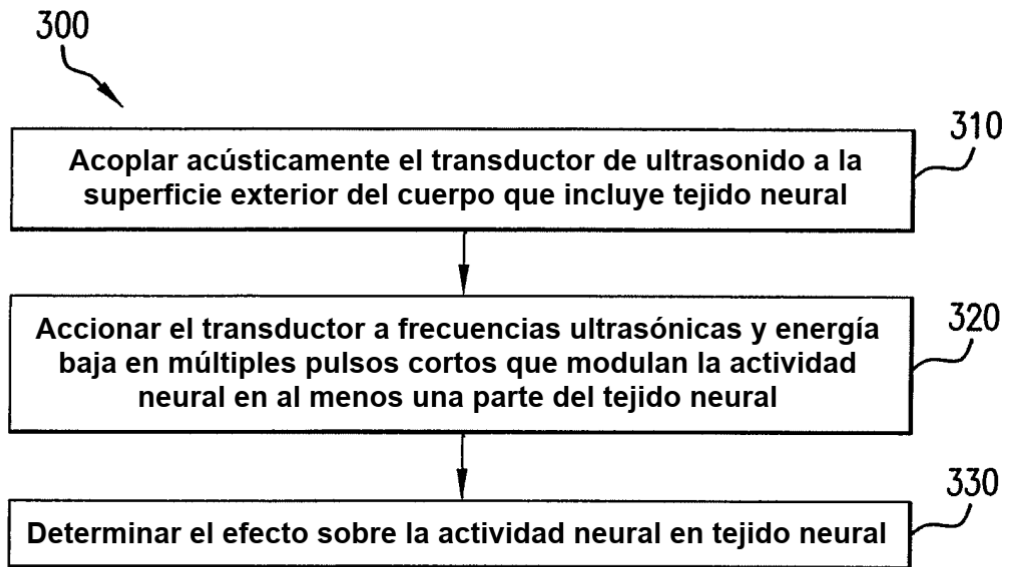


FIG.3

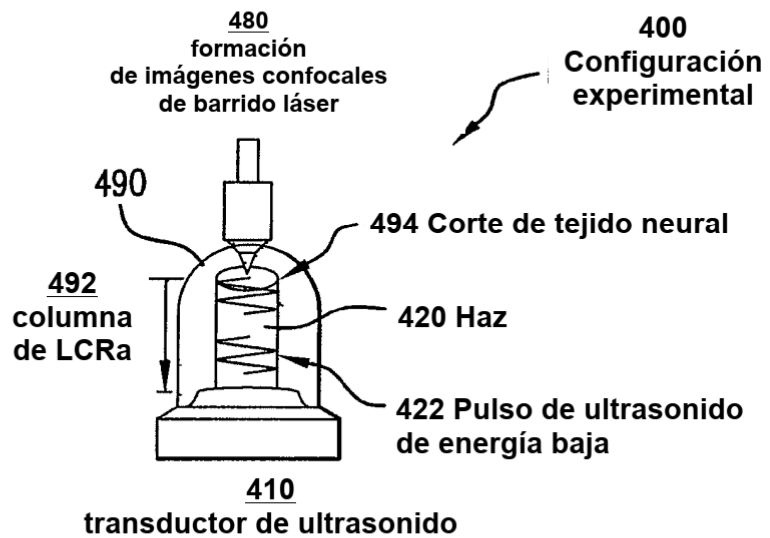


FIG.4A

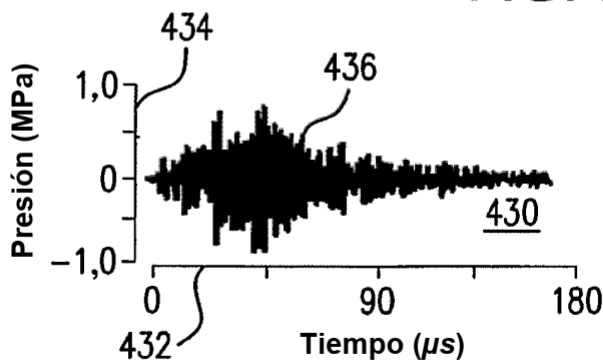


FIG.4B

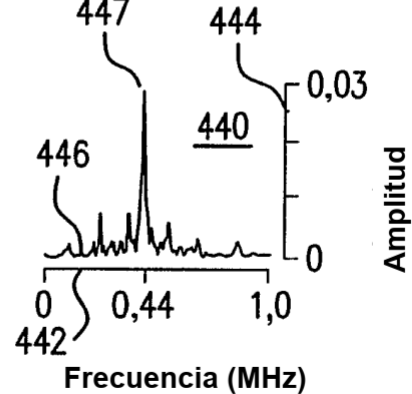


FIG.4C

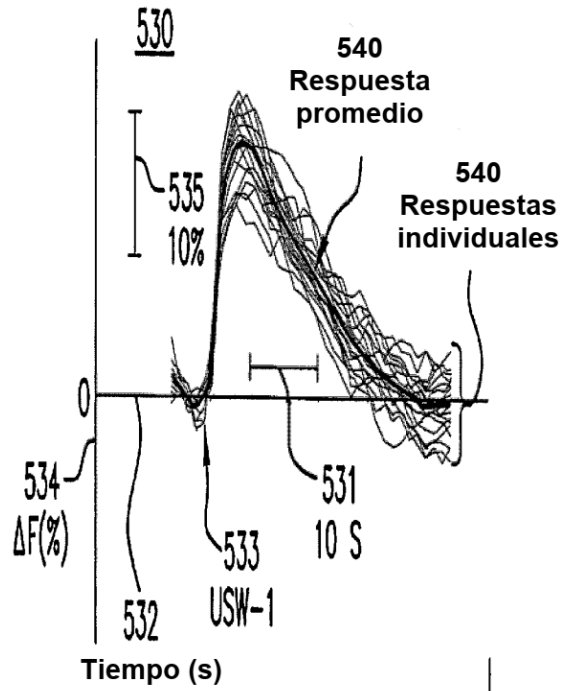


FIG. 5

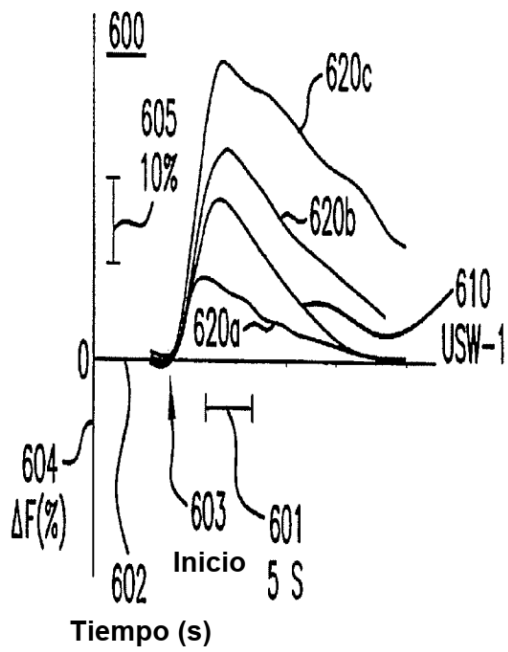


FIG. 6A

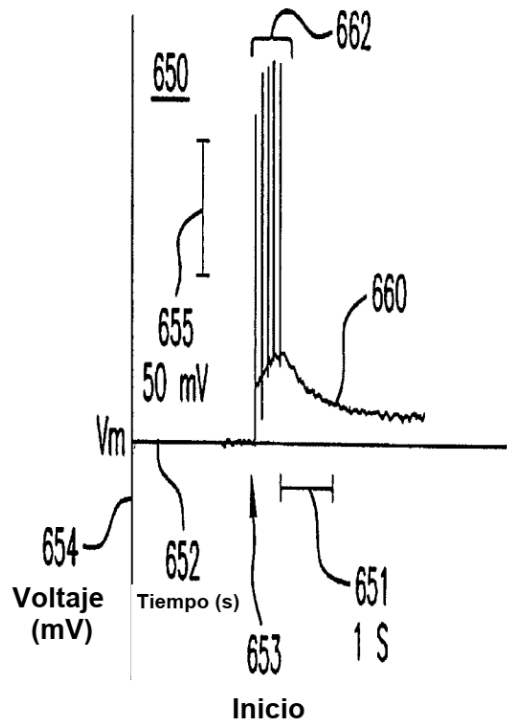


FIG. 6B

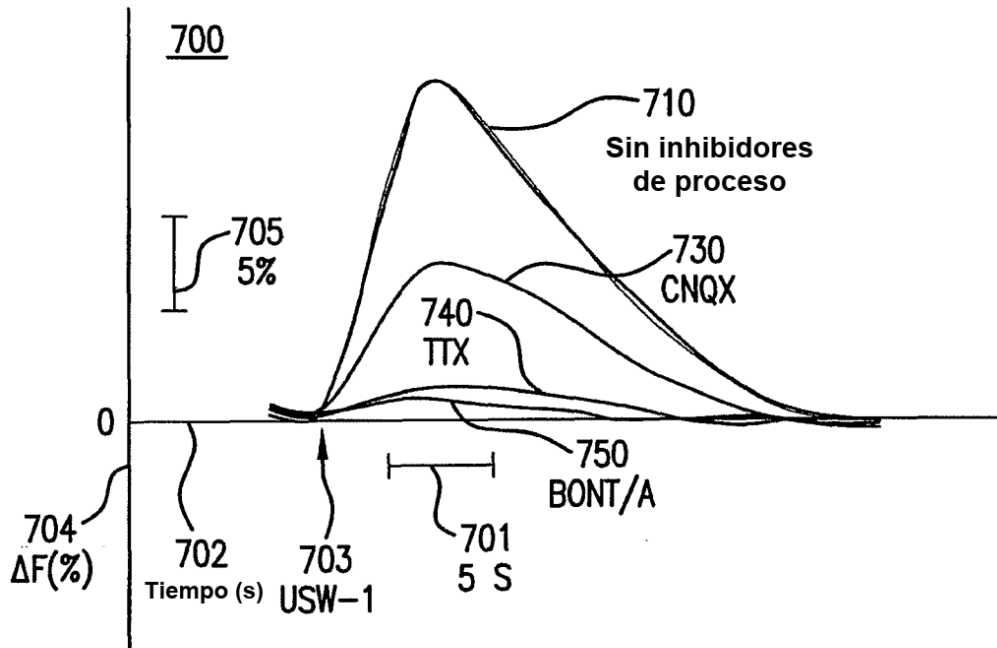


FIG.7

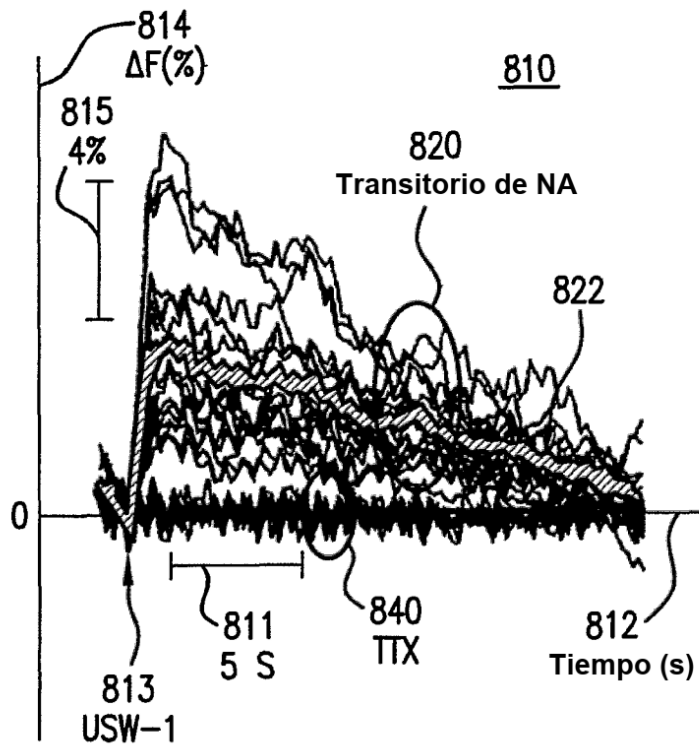


FIG.8

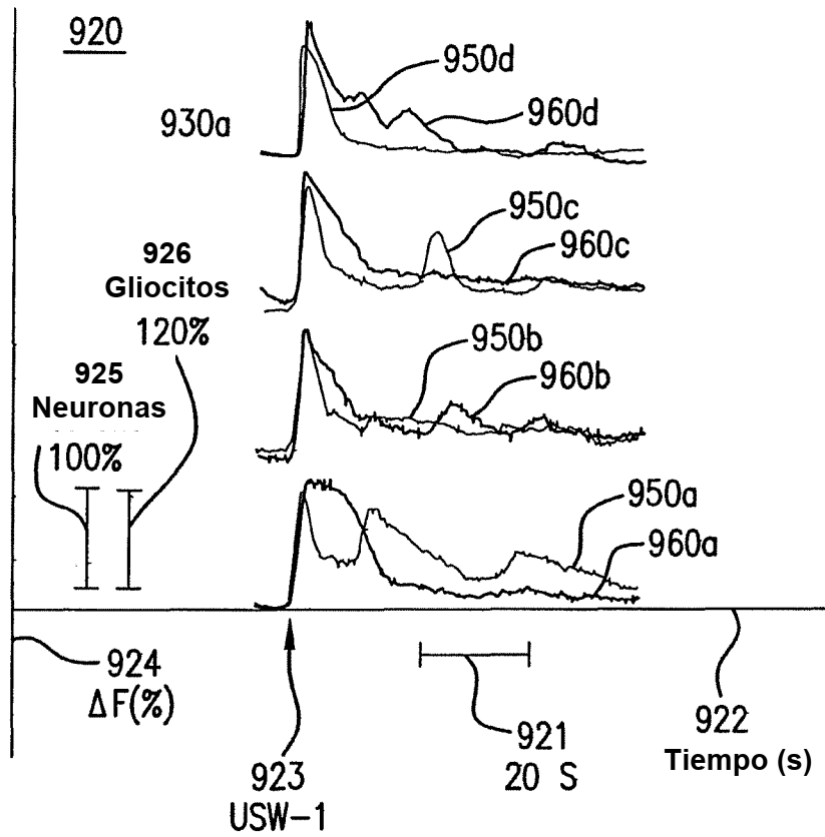


FIG.9

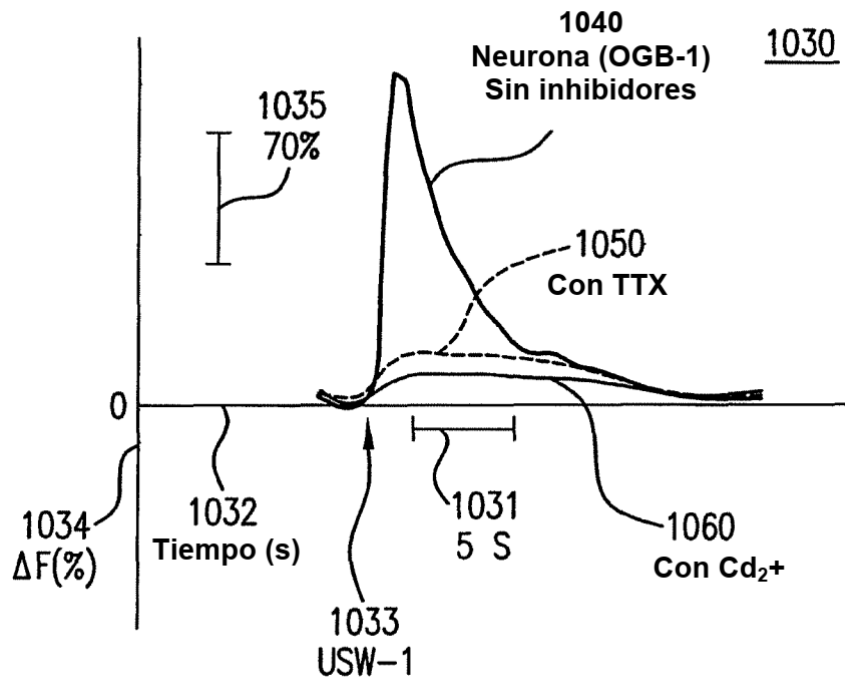


FIG.10

dF normalizada (normalizada respecto a USW-1)

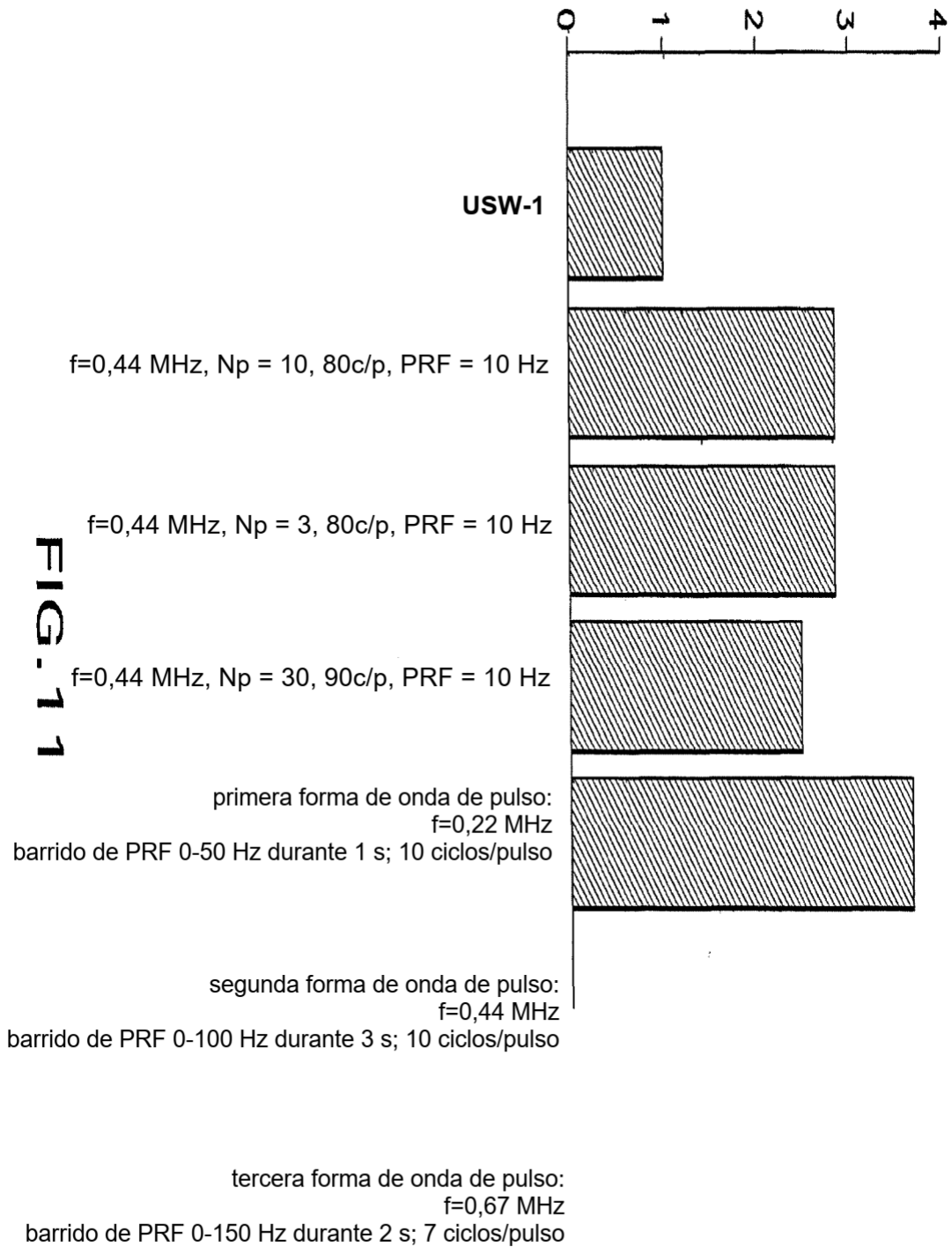


FIG. 11



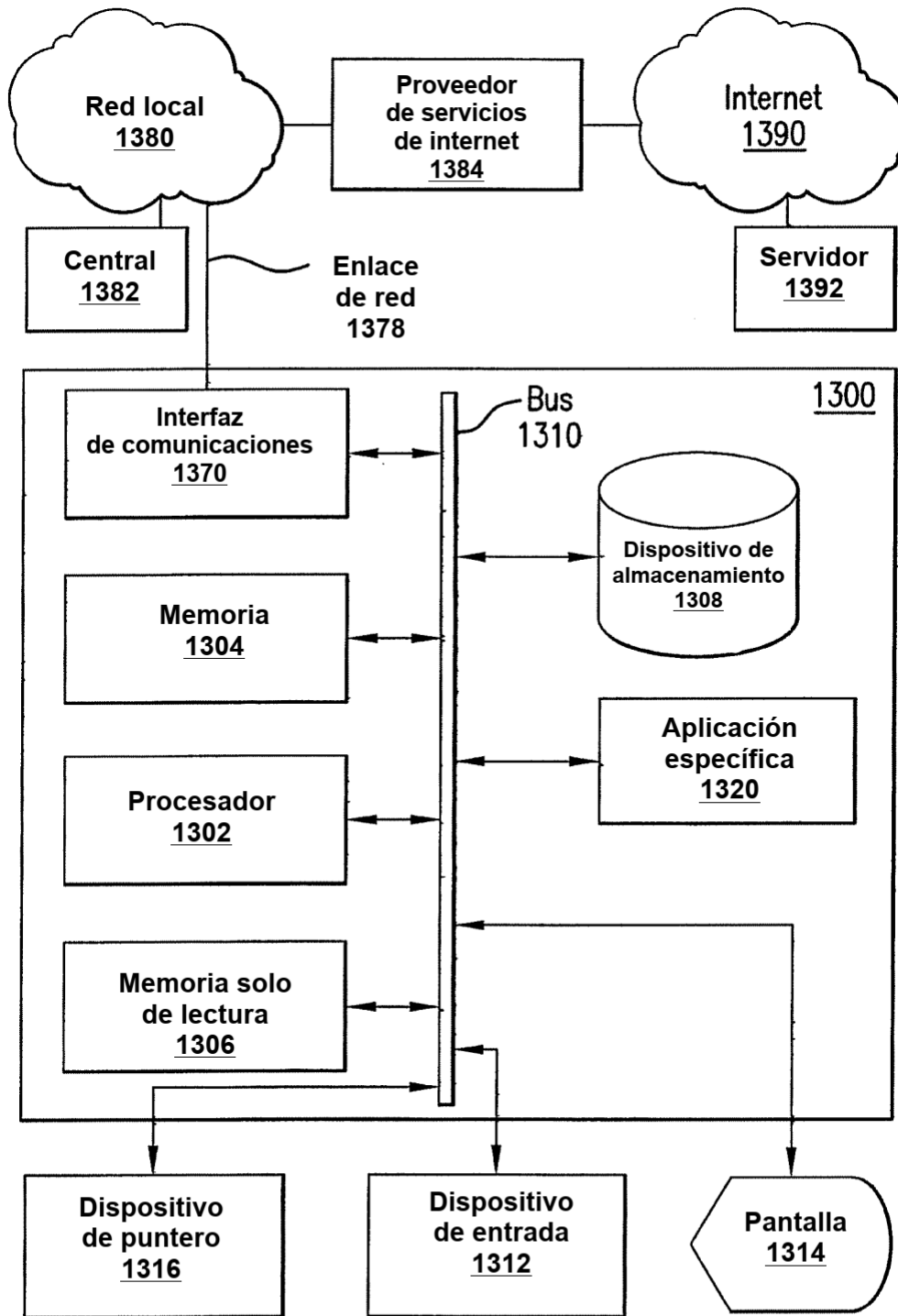


FIG.12

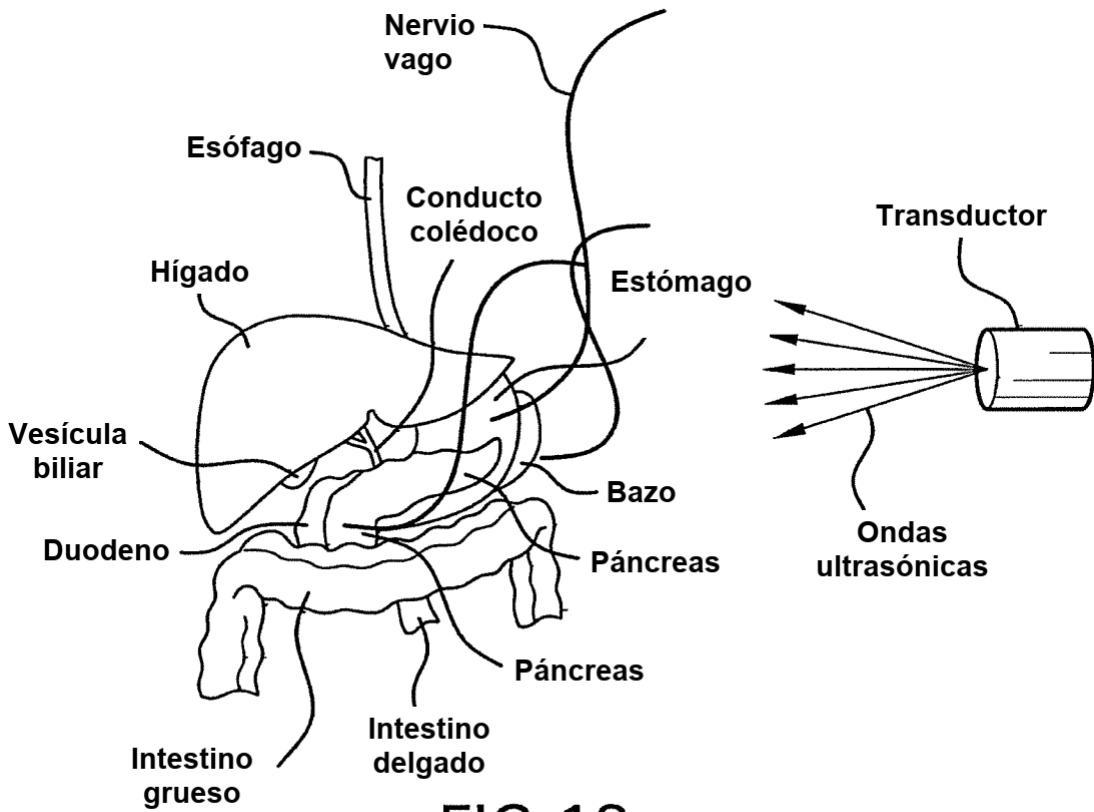


FIG.13

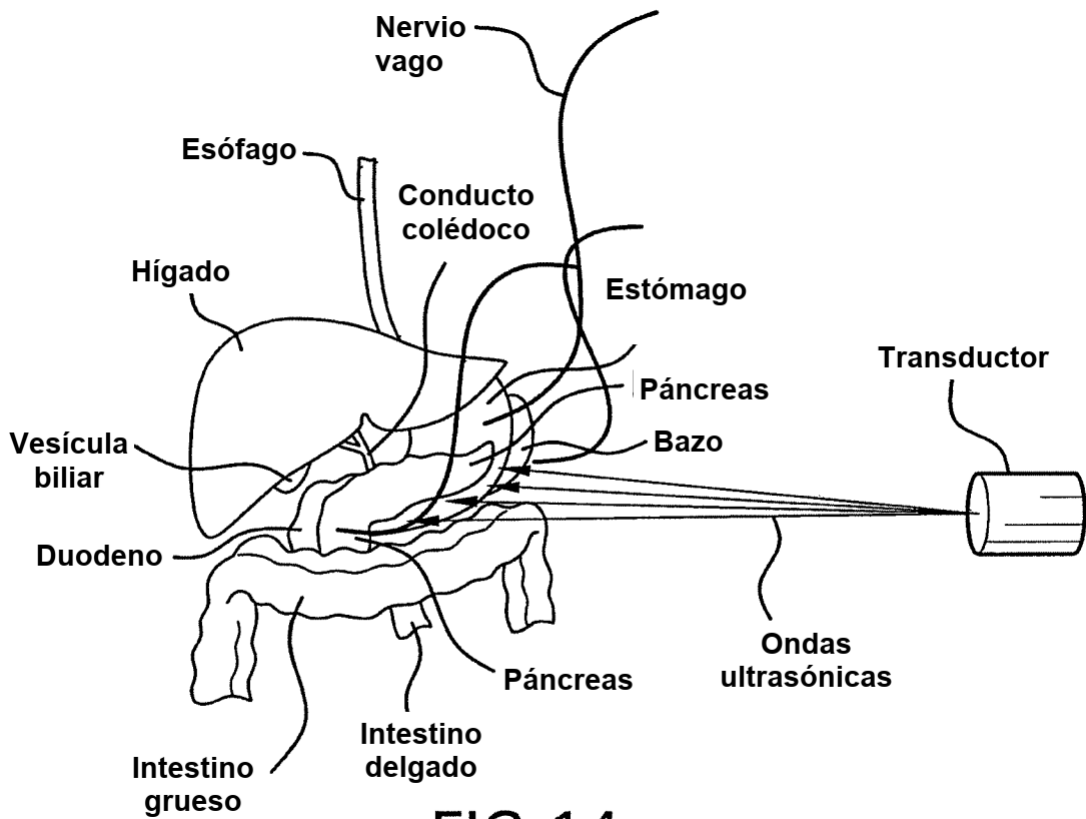


FIG.14

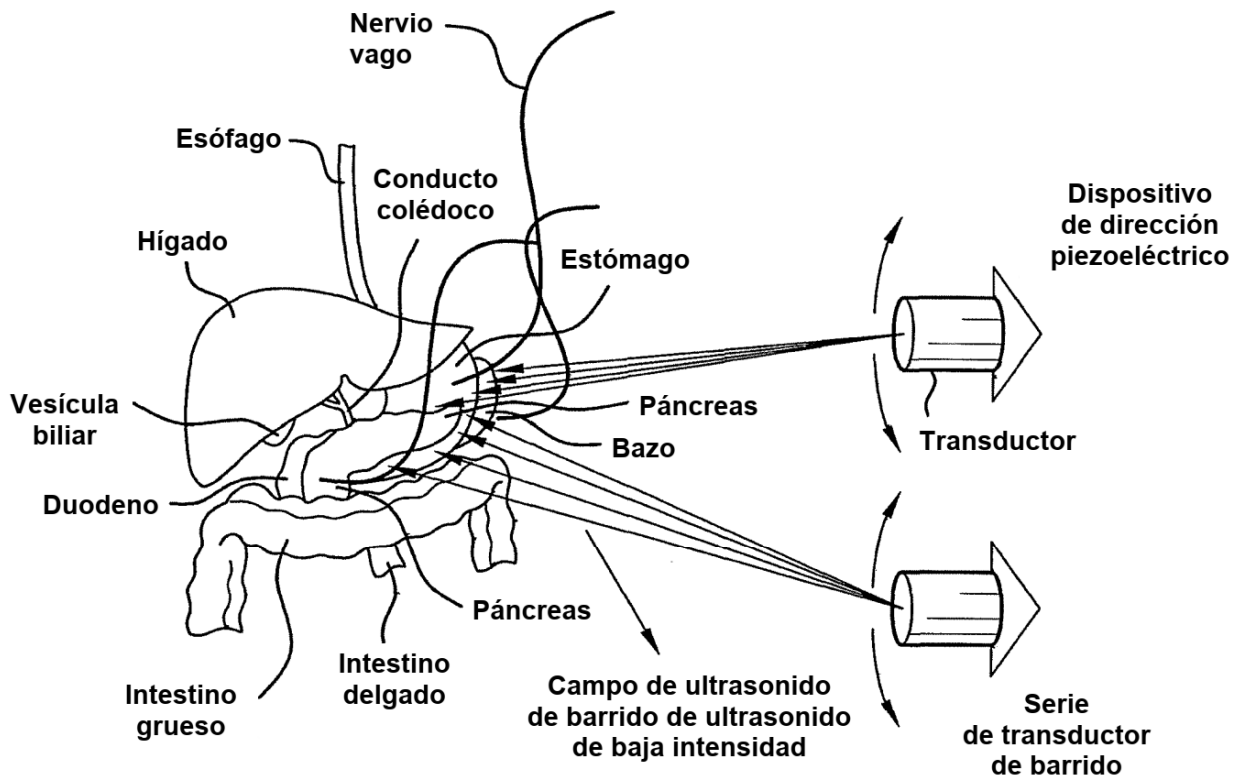


FIG.15

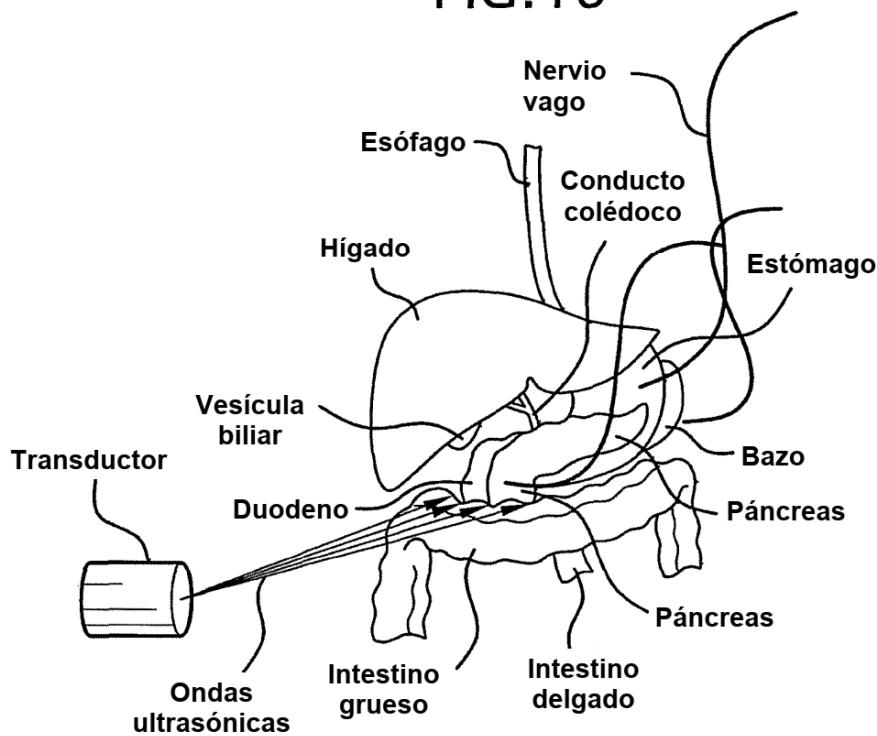


FIG.16

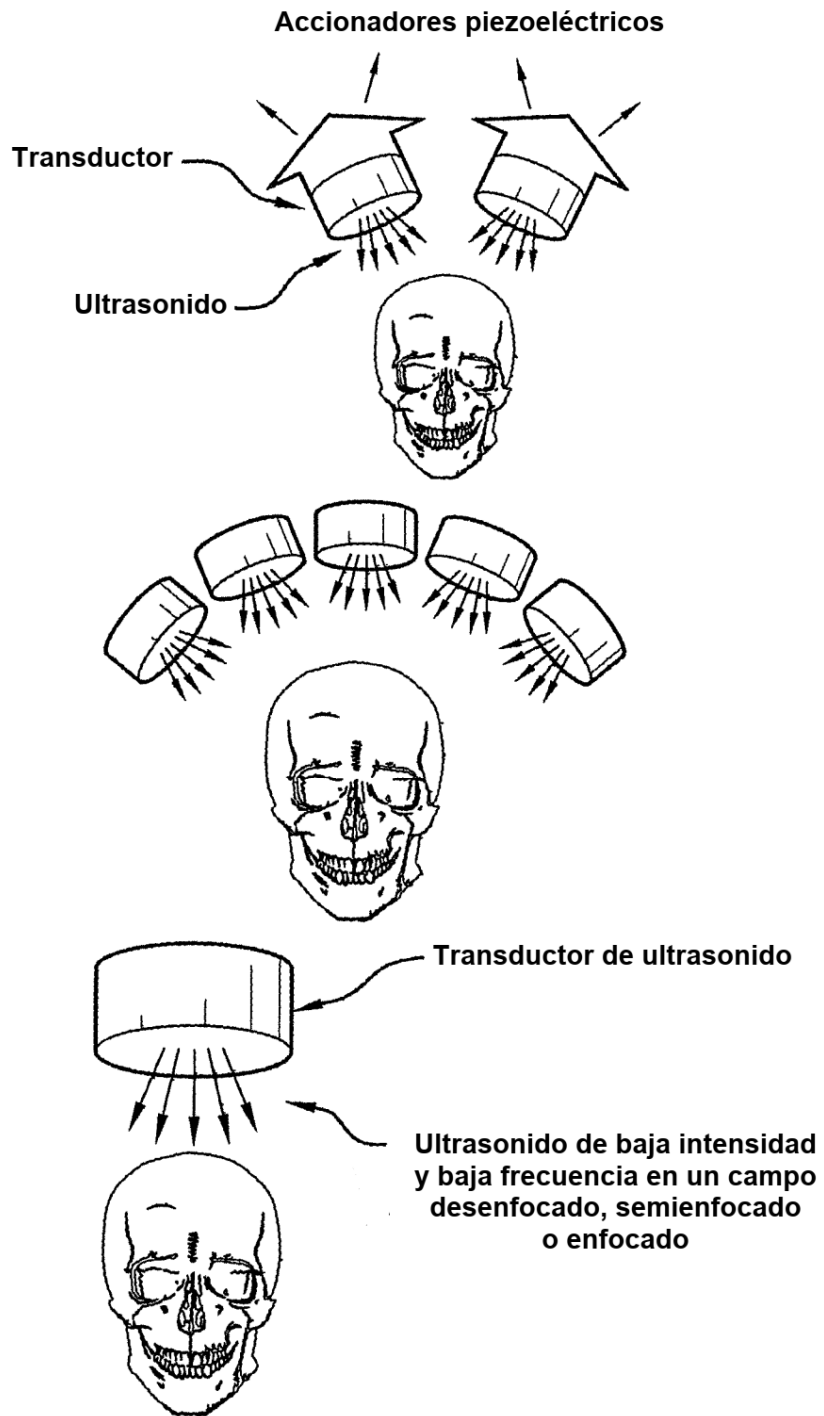


FIG.17

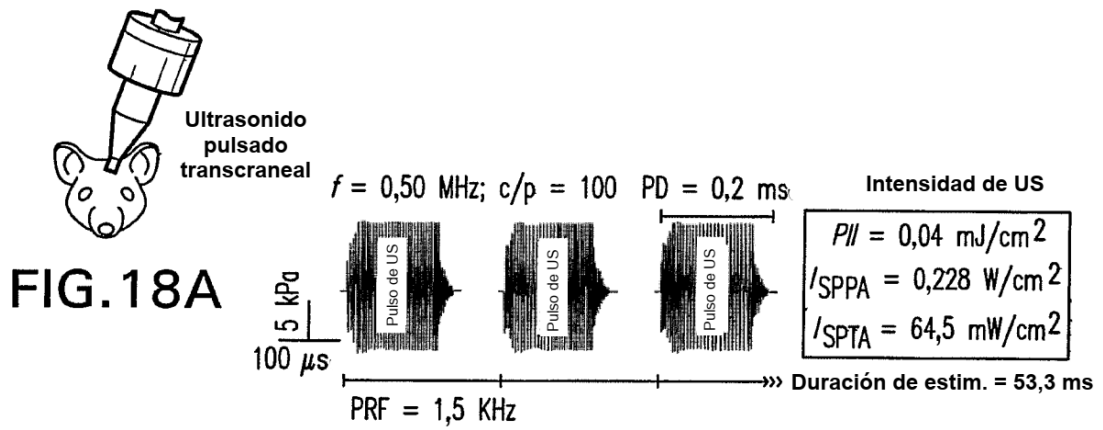


FIG. 18B

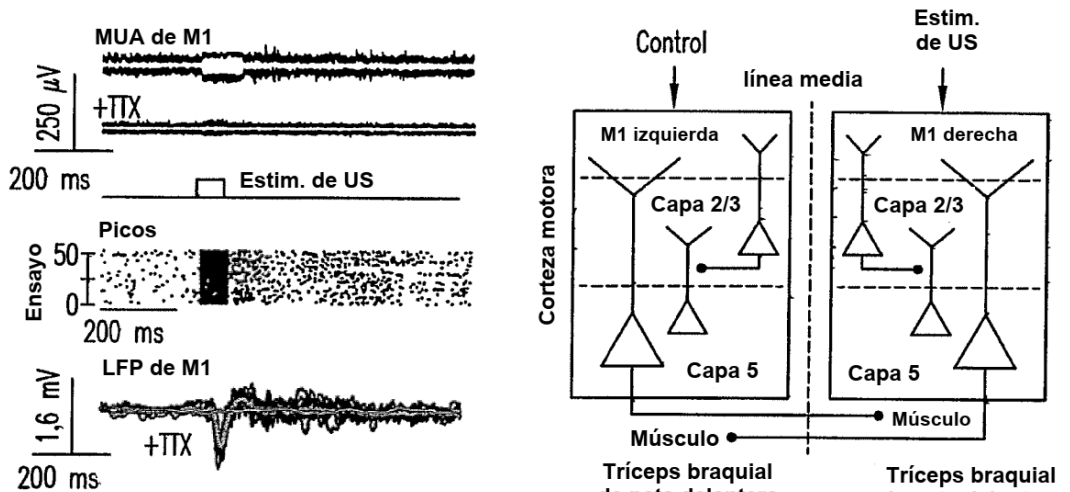


FIG. 18C

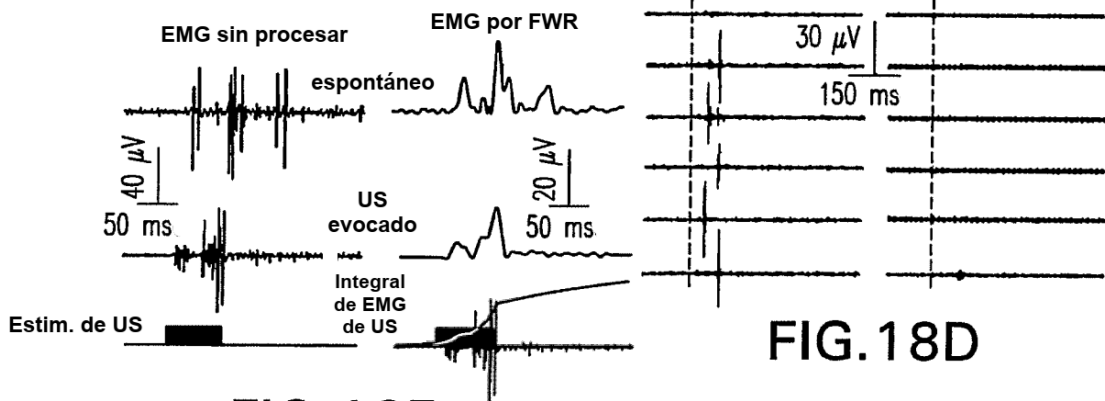


FIG. 18D

FIG. 18E

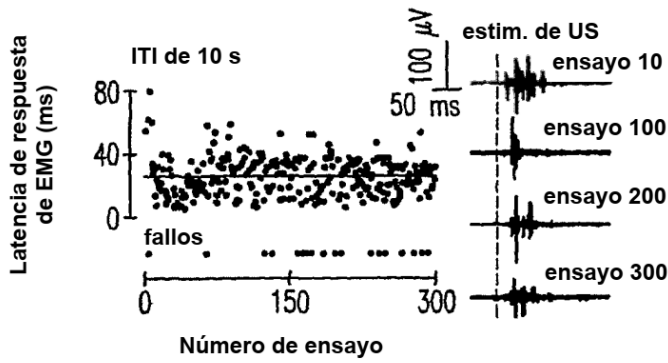


FIG. 19A

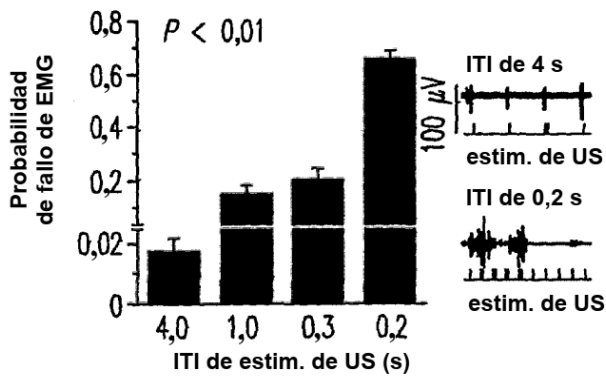


FIG. 19B

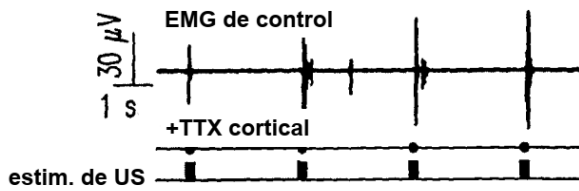


FIG. 19C

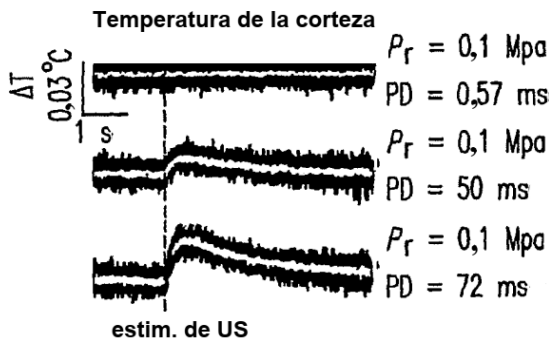


FIG. 19D

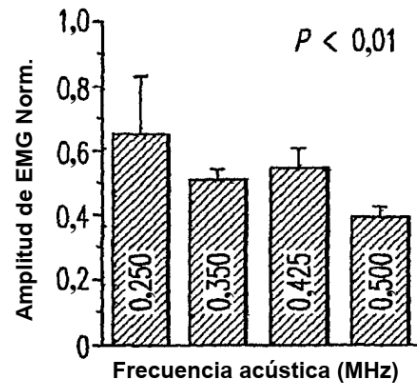


FIG. 19E

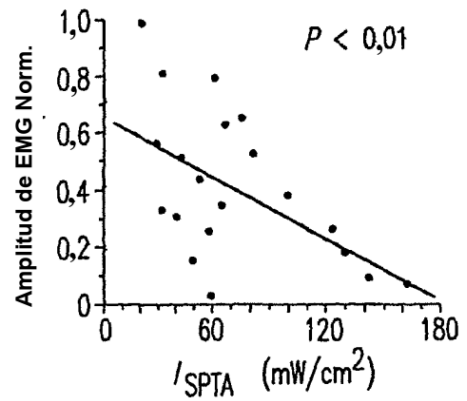


FIG. 19F

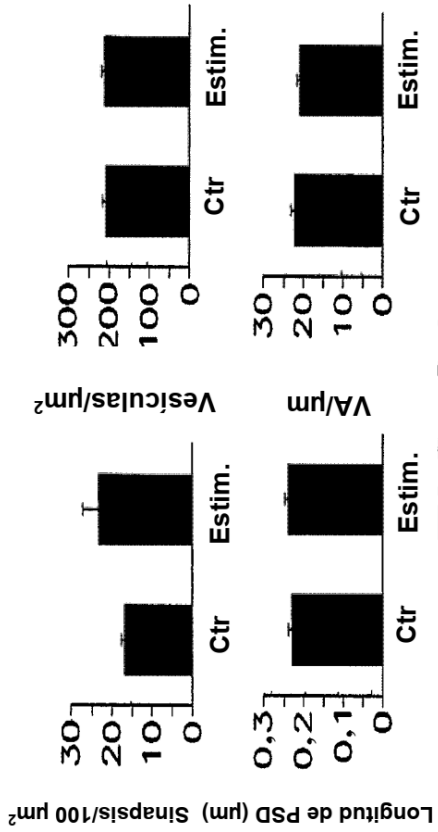


FIG. 20A

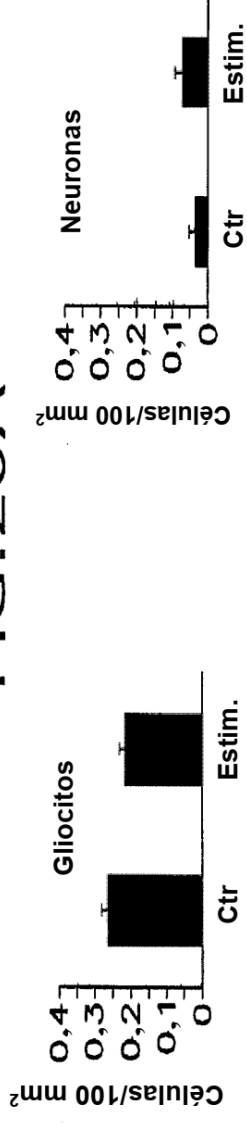


FIG. 20B

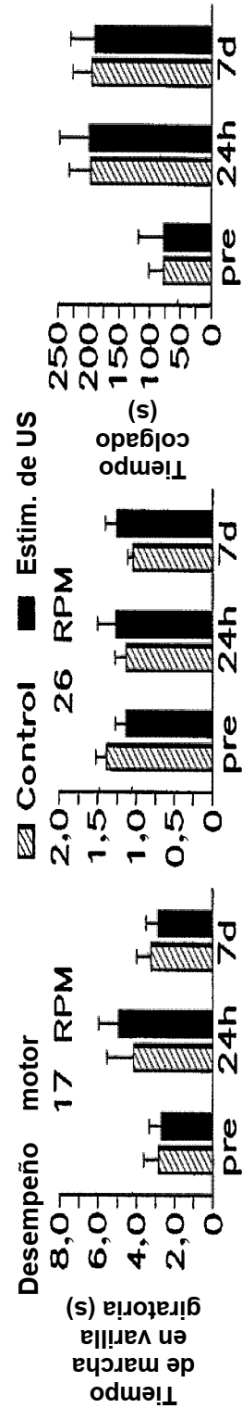


FIG. 20C

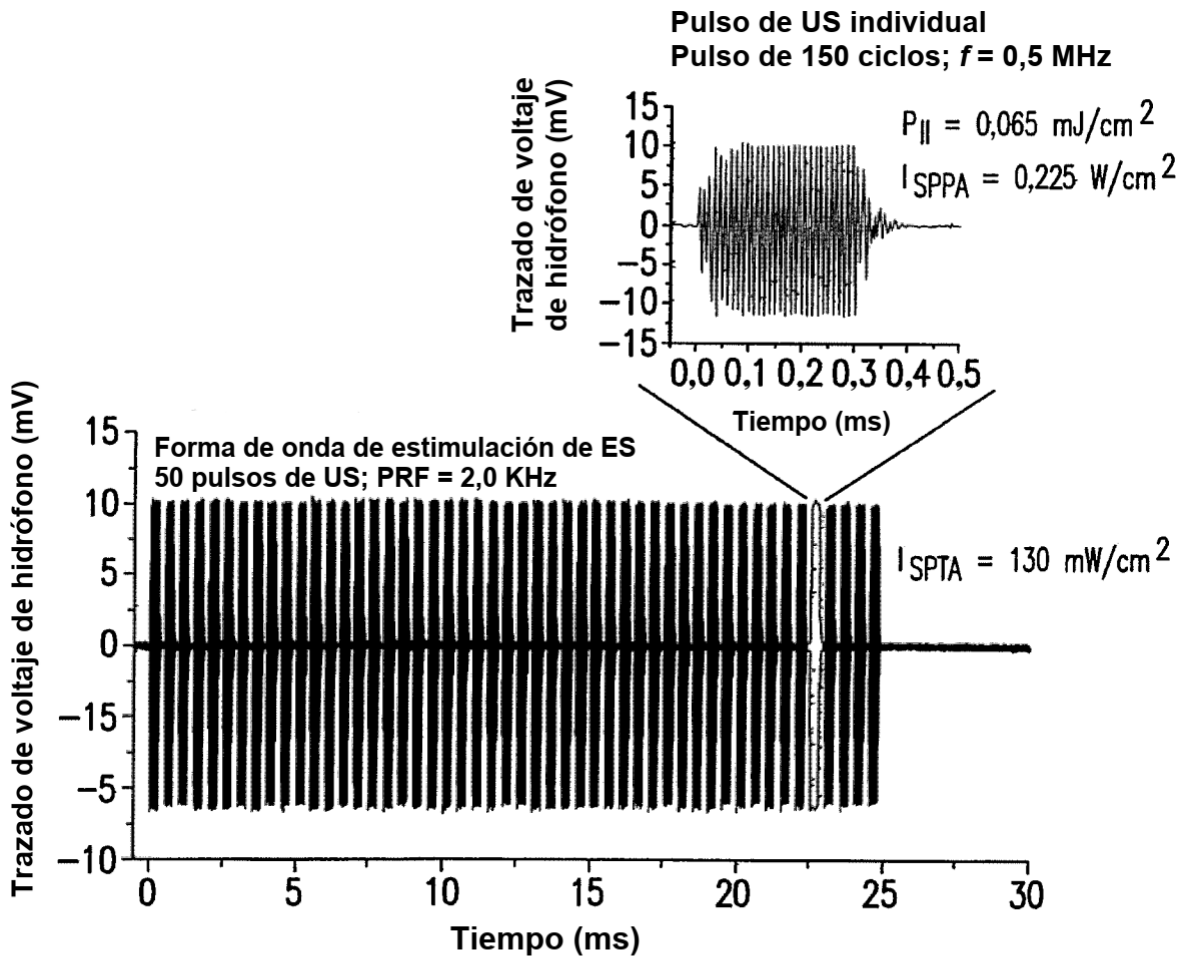


FIG.21



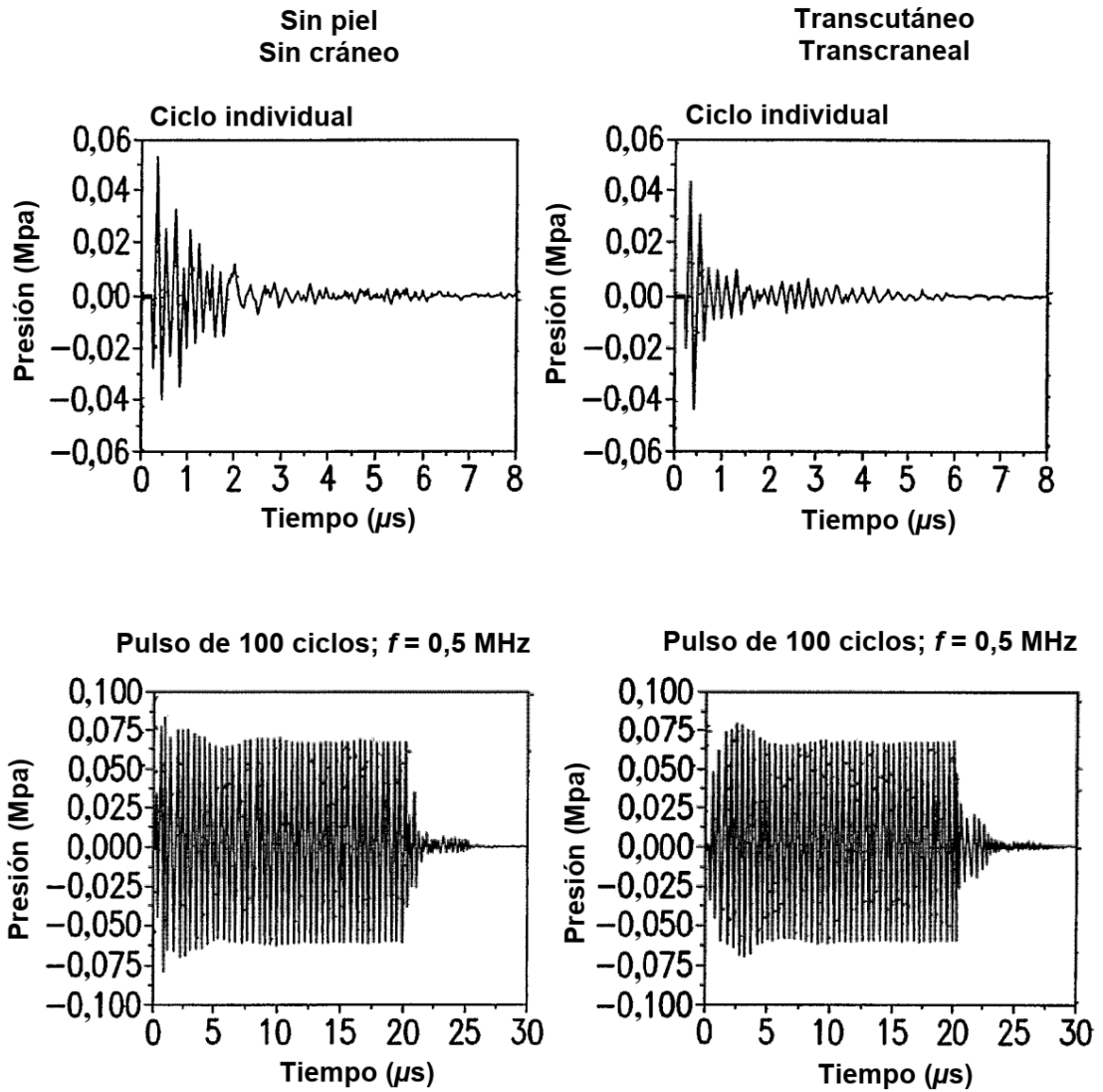


FIG.22

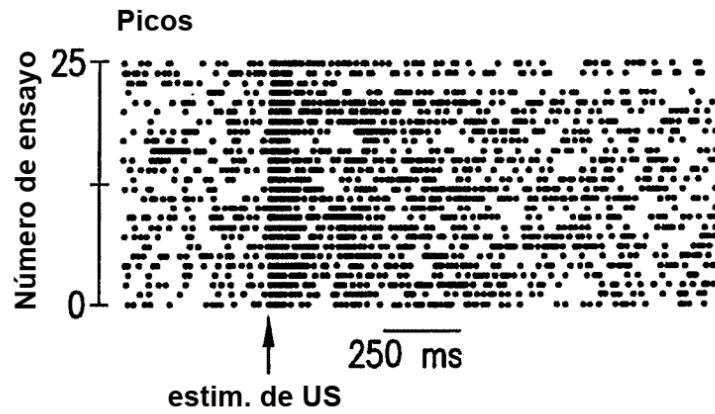


FIG.23A

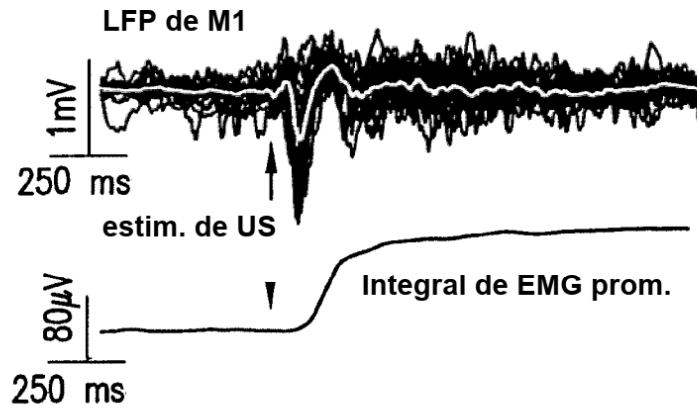


FIG.23B

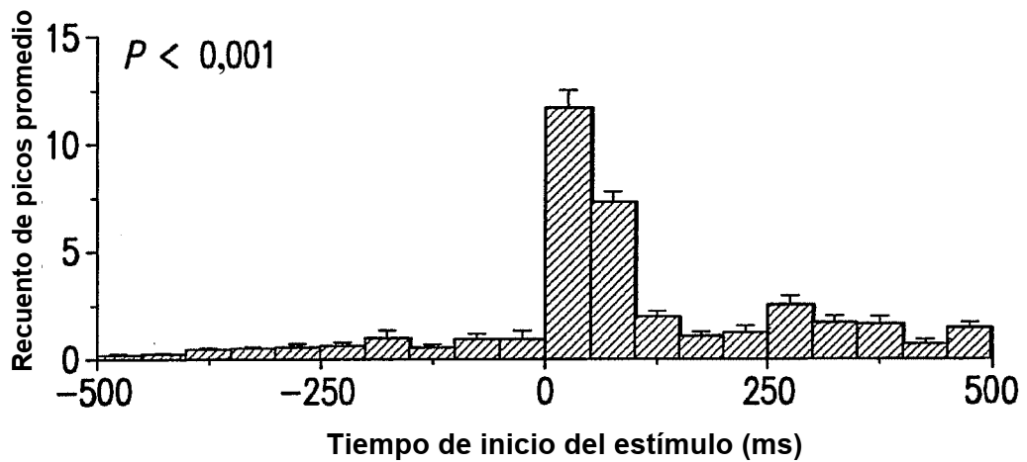
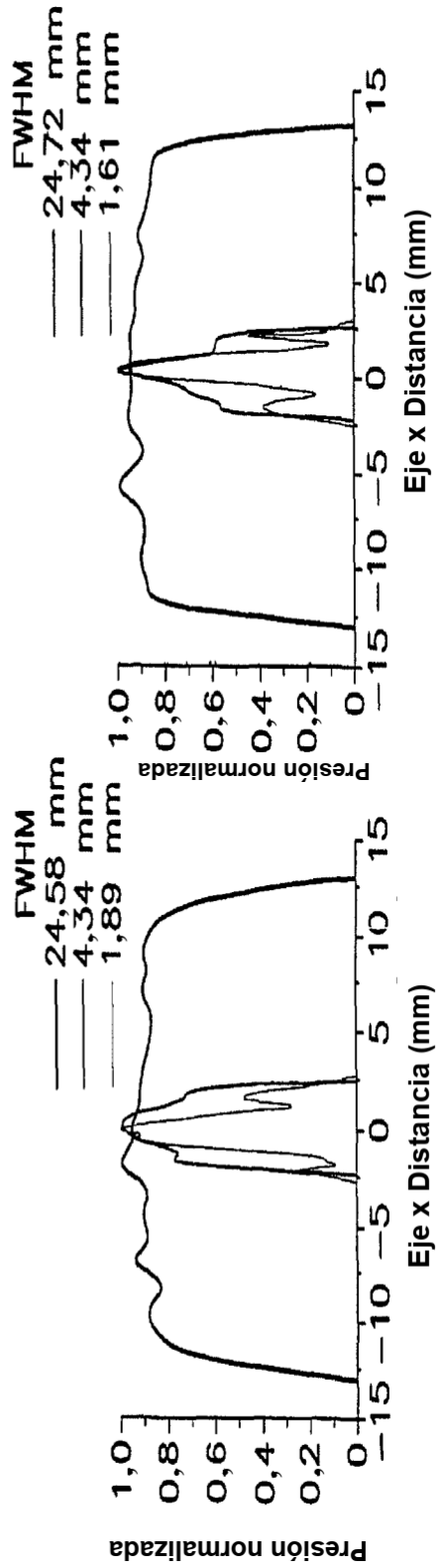
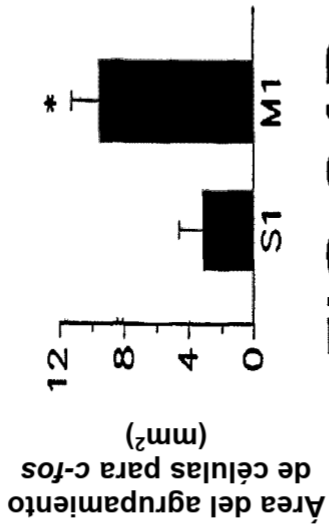


FIG.23C



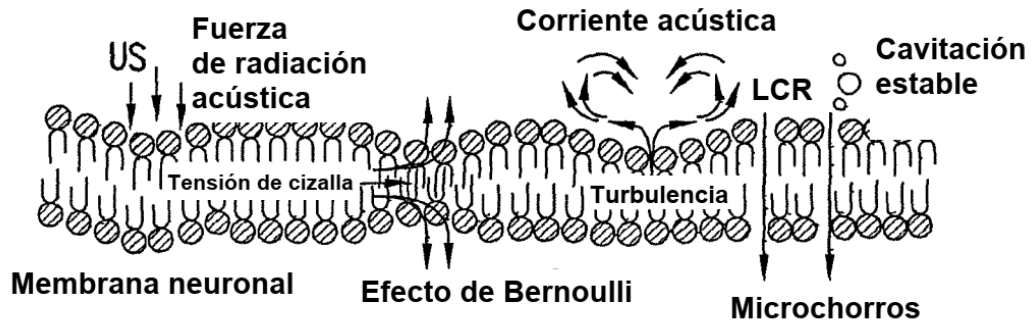


FIG.26A

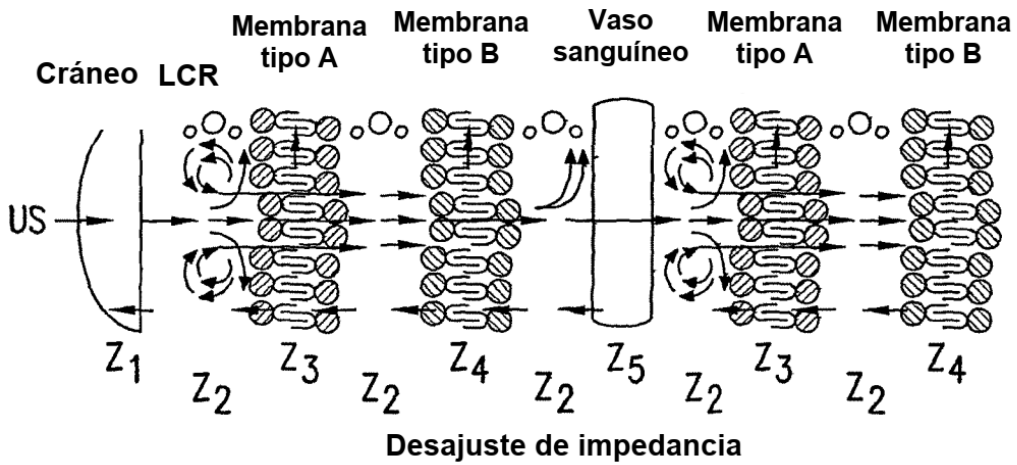


FIG.26B

Pulso de US de 10 ciclos de 0,50 MHz  
generado por onda sinusoidal

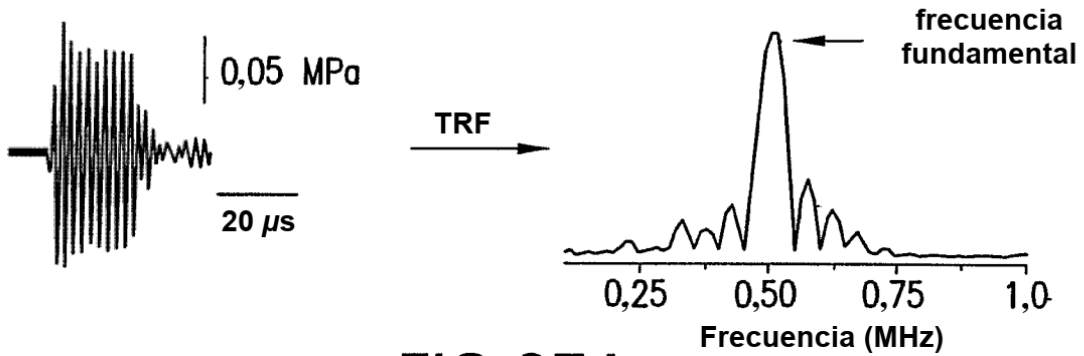


FIG.27A

Pulso de US de 10 ciclos de 0,25 MHz  
generado por onda sinusoidal

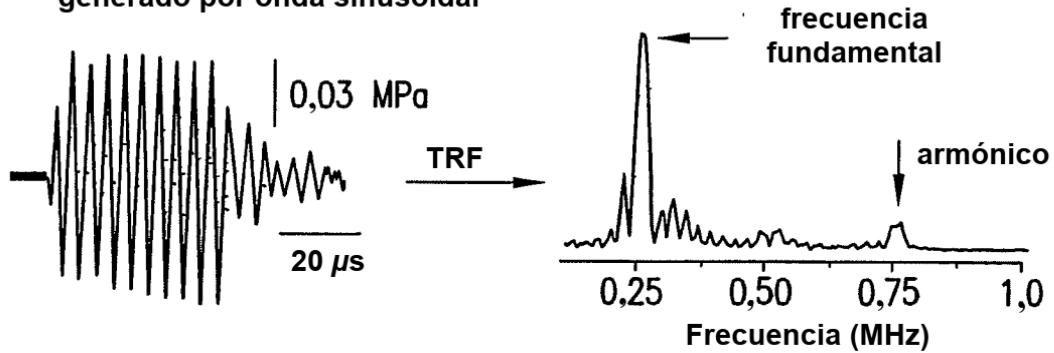


FIG.27B

Pulso de US de 10 ciclos de 0,25 MHz  
generado por onda sinusoidal

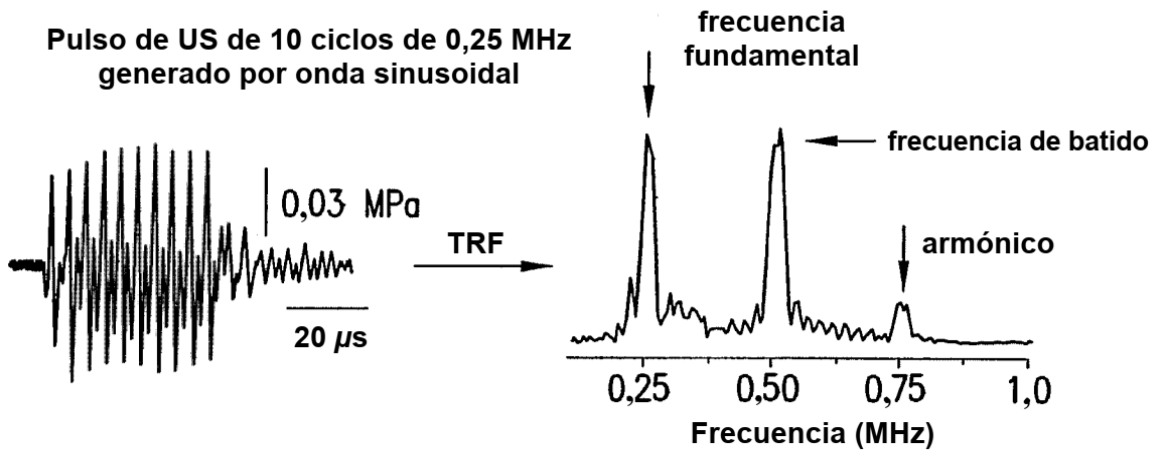
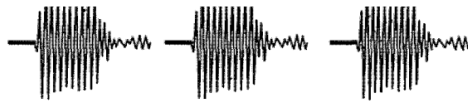


FIG.27C

Pulsos de 10 ciclos de 0,50 MHz generados por onda sinusoidal repetidos



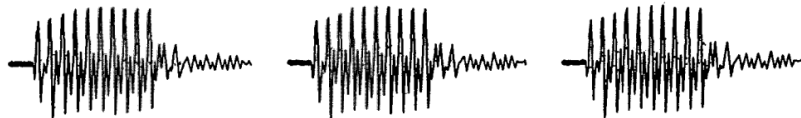
**FIG.28A**

Pulso de 10 ciclos de 0,25 MHz generados por onda sinusoidal repetidos



**FIG.28B**

Pulso de 10 ciclos de 0,25 MHz generados por onda sinusoidal repetidos



**FIG.28C**

Pulsos de 10 ciclos de 0,50 y 0,25 MHz generados por onda sinusoidal alternos repetidos



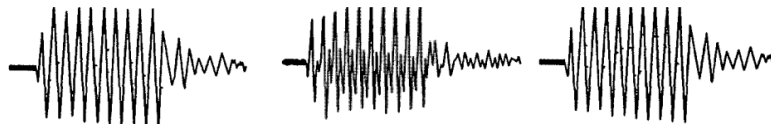
**FIG.28D**

Pulsos de 10 ciclos de 0,50 MHz generados por onda sinusoidal y 0,25 generados por onda cuadrada alternos repetidos



**FIG.28E**

Pulsos de 10 ciclos de 0,20 MHz generados por onda cuadrada y 0,25 generados por onda sinusoidal alternos repetidos



**FIG.28F**