



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

Unidad Monterrey

**CARACTERIZACIÓN DE UN ACARREADOR DE FÁRMACOS PARA SU
LIBERACIÓN CONTROLADA**

Tesis que presenta:

Carlos Antonio Franco Urquijo

Para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en:

Ingeniería y Física Biomédicas

Director de tesis:

Dr. Bruno Alfonso Escalante Acosta

Monterrey, Nuevo León

Agosto 2017

Caracterización de un acarreador de fármacos para su liberación controlada

© Carlos Franco, 2017.

Asesor: Dr. Bruno A. Escalante Acosta

Sinodal: Dr. Daniel P. Sánchez Herrera

Sinodal: Dr. Jesús G. Rodríguez González

Tesis de Maestría 2017

Centro de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV)

México Nuevo León

Telefono: +01 81 1156 1740

Abstract

The use of liposomes to release therapeutic agents has already been established. However, their lipid composition interacts with the plasma membrane of the cells resulting in imprecise and poorly specific release of the drug. Recently, microbubbles with gaseous core have been developed; this microbubble can be manipulated by ultrasonic waves, thus providing a controlled and focused release. Consequently, we hypothesize that liposomes as drug carriers attached to microbubbles can be used as carriers that their contents can be released more precisely by the use of ultrasound. The objective of this work was to develop a coupled system of liposomes and microbubbles for the transport of hydrophilic and hydrophobic molecules with controlled release and with a biological effect on vascular tissue. Unilamellar liposomes containing phenylephrine (0.1M) coupled to microbubbles with a perfluoropropane core were prepared. The microbubble-liposome complex was obtained by a biotin-avidin bridge. The size distribution, the polydispersity index and the biotin-avidin linkage were analyzed and quantified by processing of images acquired by a confocal microscope. The size of the microbubble-liposome complex was on average $1.39 \mu\text{m}$ and the polydispersity index was 78.62%. The release of the drug from the complex was demonstrated by showing the vasoconstrictor effect and can be observed post-controlled release with ultrasound. When the phenylephrine was encapsulated in liposomes and they were in contact with the artery rings producing a spontaneous and slow vasoconstriction effect. However, phenylephrine encapsulated in the microbubble-liposome complex did not produce vasoconstriction and only when the complex was sonicated the vasoconstriction was generated by phenylephrine. The microbubble-liposome complex was exposed to ultrasonic pulses for 30 minutes before being added to the isolated organ bath. The contractile response of the aortic rings released by the complex was 62.63% compared to the control ($1\mu\text{M}$ of phenylephrine) and greater than the response to liposomes (21.6%). In conclusion, we can say that our system represents a carrier with controlled release very promising for therapeutic use.

Resumen

El uso de liposomas para liberar agentes terapéuticos ya ha sido establecido. Sin embargo, su composición lipídica interactúa con la membrana plasmática de las células resultando en la liberación imprecisa y poco específica del fármaco. Recientemente, se han desarrollado microburbujas con núcleo gaseoso que pueden ser manipuladas por ondas ultrasónicas, facilitando así una liberación controlada y focalizada. Consecuentemente, nosotros planteamos la hipótesis de que liposomas como transportadores de fármaco unidos a microburbujas, pueden utilizarse como acarreadores que cuyo contenido puede ser liberado en forma más precisa mediante el uso de ultrasonido. El objetivo de este trabajo fue el desarrollo de un sistema acoplado de liposomas y microburbujas para el acarreamiento de sustancias tanto hidrofílicas como hidrofóbicas con una liberación controlada y con un efecto biológico en tejido vascular. Se prepararon liposomas unilaminares conteniendo fenilefrina (0.1M) acoplado a microburbujas con un núcleo de perfluoropropano. El complejo microburbuja-liposoma se obtuvo mediante un puente de biotina-avidina. Se evaluó la distribución de tamaños, el índice de polidispersidad y el enlace biotina-avidina fueron analizados y cuantificados utilizando procesamiento de imágenes adquiridas mediante un microscopio confocal. El tamaño del complejo microburbuja-liposoma fue en promedio de $1.39 \mu\text{m}$ y el índice de polidispersidad fue de 78.62%. La liberación del fármaco del complejo se comprobó mediante la demostración de que el efecto vasocontractil de fenilefrina y puede ser observado posterior a la liberación controlada con el ultrasonido. Cuando la fenilefrina fue encapsulada en liposomas, estas al estar en contacto con los anillos de arteria produjeron un efecto vasoconstrictor, espontáneo y lento. Sin embargo, la fenilefrina encapsulada en el complejo microburbuja-liposoma no produce vasoconstricción y solo cuando el complejo fue sonificado se produjo la liberación y consecuente vasoconstricción por la fenilefrina. El complejo microburbuja-liposoma se expuso a pulsos ultrasonido por 30 min antes de agregarse al baño de órgano aislado. La respuesta contráctil de los anillos aórticos a la fenilefrina liberada por el complejo fue de 62.63% comparada con el control ($1\mu\text{M}$ de fenilefrina) y mayor que la respuesta a los liposomas (21.6%). En conclusión, podemos decir que nuestro sistema representa un acarreador con liberación controlada muy prometedor para uso terapéutico.

Agradecimientos

A Conacyt

Carlos Franco, México, 07 2017

Índice general

Índice de figuras	XI
1. Introducción	1
1.1. Liposomas	2
1.2. Microburbujas	4
1.3. Antecedentes	5
2. Justificación	11
3. Hipótesis	13
4. Objetivos	15
4.1. Objetivo General	15
4.1.1. Objetivos Particulares	15
5. Métodos	17
5.1. Diseño del acarreador	17
5.1.1. Liposomas unilaminares	17
5.1.2. Microburbujas	18
5.1.2.1. Caracterización de las microburbujas	19
5.1.3. Unión microburbuja-liposomas	20
5.1.3.1. Caracterización de sistema microburbujas-liposoma . .	21
5.1.3.1.1. Caracterización del enlace biotina-avidina . .	21
5.2. Estudios funcionales	21
5.2.1. Preparación de los anillos aórticos	21
5.2.2. Montaje de los anillos aórticos en el sistema de órgano aislado para tejido vascular.	22
5.2.3. Estabilización de tensión en los anillos aórticos	22
5.2.4. Prueba de viabilidad	22
5.3. Procotolo experimental	22
5.3.1. Procotolo experimental 1: Curva dosis respuesta de un vasocon- strictor	22

5.3.2.	Protocolo experimental 2: Respuesta biológica de los anillos aórticos generada por los liposomas	23
5.3.3.	Protocolo experimental 3: Respuesta biológica de los anillos aórticos generada por el sistema microburbuja-liposoma	25
5.3.4.	Protocolo experimental 4: CDR del sistema microburbuja-liposoma	26
5.3.5.	Análisis estadístico de los resultados	27
5.3.6.	Fármacos	27
6.	Resultados	29
6.1.	Curva dosis respuesta de fenilefrina	29
6.2.	Cálculo de la dosis Eficiente 50 y dosis Eficiente 80	29
6.3.	Caracterización del sistema microburbuja liposoma	31
6.3.1.	Caracterización de las microburbujas	31
6.3.2.	Caracterización del enlace de unión entre las microburbujas y liposomas.	31
6.4.	Respuesta biológica de los anillos aórticos generada por los liposomas.	35
6.5.	Respuesta biológica generada por el sistema microburbuja-liposoma . .	35
6.6.	Curva dosis-respuesta del sistema microburbuja-liposoma	38
7.	Discusión	41
8.	Conclusión	45
9.	Perspectivas	47
	Bibliografía	49
A.	Apéndice 1	I
A.1.	Código de programación	I
B.	Apéndice 2	III
B.1.	Soluciones Empleadas	III
B.1.1.	Krebs-Heinselt (10X)	III
B.1.2.	Buffer HEPES 20mM pH 7.6	IV
B.2.	Fármacos empleados	IV
B.2.1.	(R)-(-) Fenilefrina 0.1M	IV
B.3.	Fosfolípidos empleados	IV

Índice de figuras

1.1.	Procesos Farmacocinéticos donde F: Fármaco libre.	2
1.2.	Representación de un liposoma "stealth" con un fármaco hidrofóbico incorporado en el núcleo acuoso.	3
1.3.	Representación de una microburbuja con núcleo de perfluoropropano (C_3F_8).	4
1.4.	Representación esquemática de los efectos acústicos producidos en las microburbujas. a) cavitación estable b) cavitación inercial ^[22]	5
1.5.	Comparación del AA libre contra el AA encapsulado en liposomas ^[25]	6
1.6.	a) Medición de la expresión de GFP b) comparación de eficiencia de transfección en diferentes líneas celulares, se emplea una [4×10^7 microburbujas/mL] de microburbujas a una frecuencia de 2.0 W/cm^2 por 3 min y se observa una mayor transfección del material genético en las células de riñón humano. donde: b.END.3 son células endoteliales de cerebro de ratón, SVEC4-10 son células del ganglio linfático axilar, SV-LEC son células endoteliales Linfáticas y HEK 293 son células embrionarias de riñón humano ^[26]	7
1.7.	Micrografía y distribución de tamaños del sistema microburbuja-liposoma A) imagen confocal B) microburbuja-liposoma marcada con bodipy C) Distribución de tamaños del sistema microburbuja-liposoma en negro liposomas cargados con DOX y en gris liposomas sin la droga ^[24]	9
1.8.	Medición de la viabilidad celular de células de melanoma bajo diversos tratamientos, la concentración empleada de DOX fue de $0.5 \mu\text{g/ml}$ ^[24]	10
5.1.	Procesos para la fabricación de liposomas unilaminares. a) hidratación del film para la formación de liposomas multilaminares b) Extrusión de los liposomas multilaminares a través de una membrana de policarbonato de 200 nm para la obtención de liposomas unilaminares c) Centrifugación de los liposomas unilaminares para remover el exceso de la molécula no encapsulada. d) Representación gráfica de los liposomas unilaminares con una molécula encapsulada.	18

5.2.	Procesos para la fabricación de las microburbujas. a) Hidratación del film para la formación de liposomas multilaminares b) Aplicación de vacío a los liposomas multilaminares c) Sustitución del vacío con el gas perfluoropropano. d) Fabricación de las microburbujas por medio de agitación mecánica. e) Centrifugación de las microburbujas para remover el exceso de fosfolípidos f) Representación gráfica de las microburbujas.	19
5.3.	Dispositivo microfluidico empleado para la caracterización de las microburbujas	19
5.4.	Procesos de fabricación del sistema microburbuja-liposoma. a) Representación gráfica de las microburbujas b) Incubación de las microburbujas con avidina conjugada con fluoresceína. c) Centrifugación para remover el exceso de avidina. d) Representación gráfica de los liposomas unilaminares. e) Incubación de las microburbujas con los liposomas unilaminares f) Centrifugación para remover el exceso de liposomas unilaminares g) Representación gráfica del sistema microburbujas-liposoma.	20
5.5.	Sistema microburbuja-liposoma, se observa la unión de los liposomas a la microburbuja por medio del enlace biotina-avidina	20
5.6.	Protocolo experimental 1.- Curva dosis respuesta de fenilefrina.	23
5.7.	Liberación controlada del acarreado a través de pulsos de ultrasonido.	24
5.8.	Protocolo experimental 2.- Diseño del protocolo experimental para la respuesta biológica generada por los liposomas	24
5.9.	Liberación controlada del sistema a través de pulsos de ultrasonido.	25
5.10.	Protocolo experimental 3.- Diseño del protocolo experimental para la respuesta biológica generada por el sistema microburbuja-liposoma	26
5.11.	Protocolo experimental 4.- Diseño del protocolo experimental para estimar la concentración del sistema microburbuja-liposoma	26
6.1.	Curva dosis-respuesta a fenilefrina, Contracción expresada en gramos en función del tiempo del musculo liso vascular inducido por fenilefrina ($1 \times 10^{-9} \text{M} - 1 \times 10^{-5} \text{M}$). La concentración está dada en forma logarítmica en dosis crecientes de 0.5 unidades.	30
6.2.	Curva dosis-respuesta normalizada con respecto al valor máximo. El porcentaje de contracción producido por fenilefrina en dosis creciente ($1 \times 10^{-9} \text{M} - 1 \times 10^{-5} \text{M}$) a los anillos aórticos. Los datos corresponden a la media \pm EEM, N=18.	30
6.3.	Estimación de la dosis eficiente 50 y dosis eficiente 80. Fue ajustada por medio de una regresión no lineal (Michaelis-Menten) y calculada en MATLAB. Los datos corresponden a la media \pm EEM, N=18	31
6.4.	Distribución de tamaños de las microburbujas.	32
6.5.	Micrografía de las microburbujas con avidina conjugada.	32
6.6.	Distribución de tamaños de las microburbujas unidas a avidina conjugada con fluoresceína.	33

6.7.	Imagen de microscopia confocal del sistema microburbuja-liposoma, en tonalidad verde se observa a la microburbuja y en tonalidad roja a los liposomas.	34
6.8.	Histograma del sistema microburbuja-liposoma.	34
6.9.	Respuesta de los anillos aórticos a los liposomas sin sonicar (magenta), sonicados (rojo).	35
6.10.	Respuesta de los anillos aórticos producida por la fenilefrina encapsulada en el sistema microburbuja-liposomas. Los anillos fueron incubados con el sistema microburbuja-liposoma sin sonicar (verde) o con el sistema microburbuja-liposoma expuestos a ultrasonido sonicados (cyan).	36
6.11.	Cuantificación de la fenilefrina presente en cada uno de los componentes del sistema microburbuja liposoma. FE: Fenilefrina; L5: Lavado 5; MBs:Microburbujas; LP: Liposomas; US: Ultrasonido. Los datos representan el promedio \pm EEM, n=5. $P < 0.05$, * f vs d, * * f vs e	37
6.12.	Curva dosis respuesta de la contracción de las arterias aorticas producida por la Fenilefrina liberada del sistema microburbuja-liposoma	38
6.13.	Comparación y cálculo de la dosis eficiente 50 y dosis eficiente 80 del sistema microburbuja-liposoma (línea negra) vs curva dosis-respuesta estándar de fenilefrina(línea azul).	39

1

Introducción

Cuando un fármaco es administrado, inicialmente debe de ser absorbido por el organismo para posteriormente ser distribuido a través del torrente sanguíneo, mediante esta forma llega al órgano o tejido blanco y se genera el efecto farmacológico deseado, sin embargo, al estar el fármaco libre en el torrente sanguíneo llega a otros sitios produciendo efectos no deseados, por lo que dichos efectos pueden ser relacionados con la toxicidad del fármaco, adicionalmente cabe resaltar que el fármaco al estar en torrente sanguíneo llega a ser metabolizado principalmente por el hígado (vía hepática) o es secretado por el riñón a través de la orina por lo que las concentraciones del fármaco se ven afectadas^[1,2].

Por lo que podemos sugerir que los procesos normales de un fármaco son: la biodistribución, su farmacocinética y su degradación, estos procesos pueden dificultar el uso de un fármaco, tratando de disminuir estas dificultades se han desarrollado diversos sistemas de administración de los fármacos que modifican la biodistribución y la farmacocinética, para ofrecer tal función el sistema de liberación necesita tener una selectividad muy elevada, así como una alta especificidad al sitio de acción en la célula o en el tejido, esto se ha logrado gracias a los avances en los sistemas biológicos y genómicos los cuales han podido identificar nuevos sitios de acción^[3,4].

Estos diseños tecnológicos son denominados sistemas de liberación de drogas, estos acarreadores son diseñados basados en diferentes propiedades que presentan diversas moléculas tales como lípidos^[5], polímeros^[6] y nanopartículas^[7].

En este trabajo nos enfocaremos a los sistemas de liberación de drogas de pequeña escala conformados por fosfolípidos (liposomas y microburbujas), cabe destacar que el uso de los fosfolípidos es debido a la biocompatibilidad y la baja toxicidad con el organismo en las diversas vías de administración y también debido a la practicidad que muestran

los fosfolípidos de formular productos farmacológicos que son fácilmente adaptables a diversas patologías, modificando por ejemplo el tiempo de estabilidad, la capacidad de acarreo del sistema de liberación, entre otras características^[8].

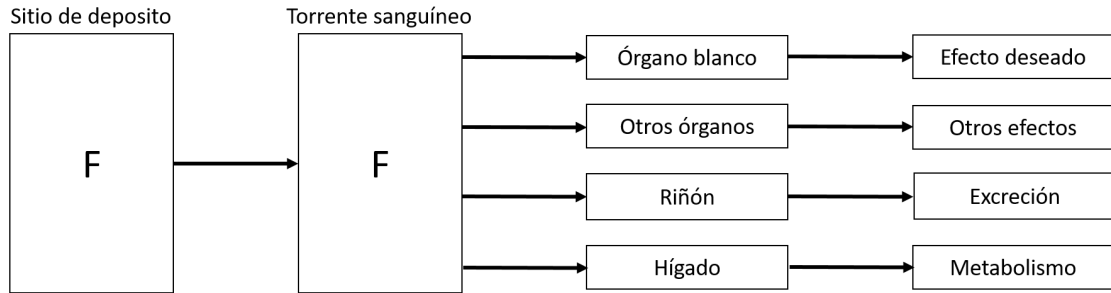


Figura 1.1: Procesos Farmacocinéticos donde F: Fármaco libre.

1.1. Liposomas

Al establecerse el modelo de sistemas de membrana^[9] se descubrieron estructuras conformadas por bicapas de fosfolípidos que inicialmente se denominaron “Banghasomes” y luego liposomas^[10] estos son estructuras cerradas con núcleo acuoso conformadas por fosfolípidos organizadas en una bicapa^[11]. La técnica de fabricación de los liposomas multilaminares fue desarrollada por Bangham et al^[12], la cual se ha ido modificando para mejorar la eficiencia de captura y la homogeneidad. Un avance importante en la modificación de la homogeneidad fue el desarrollo de los liposomas unilaminares, los cuales se logran mediante extrusión, es decir el pase de los liposomas multilaminares a través de membranas de policarbonato con un tamaño de poro de 100 o 200 nm^[9].

Recientemente se ha empleado el uso de ultrasonido para desarrollar liposomas unilaminares de menor tamaño (50nm) que el de los liposomas sometidos al proceso de extrusión, brindando así una mejor distribución de tamaños en los liposomas^[13].

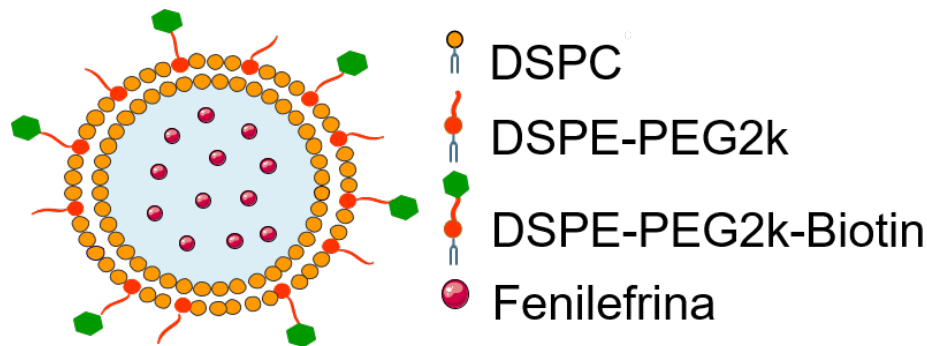


Figura 1.2: Representación de un liposoma "stealth" con un fármaco hidrofóbico incorporado en el núcleo acuoso.

En las últimas décadas han surgido novedosas innovaciones en el desarrollo de los liposomas como la modificación de la carga agregando nanopartículas^[14], así como también se ha logrado modificar la superficie de los liposomas a través de la incorporación de un carbohidrato (polietilenglicol (PEG)) y de colesterol, el resultado fue el incremento de la vida media de los liposomas en el torrente sanguíneo, estos liposomas fueron denominados stealth liposomes^[9,15].

Gregory Gregoriadis estableció que los liposomas son capaces de atrapar diversas sustancias y que pueden ser usados como sistemas de liberación de drogas^[11]. Cabe resaltar que las propiedades biológicas más destacadas de los liposomas son: Biocompatibilidad, la captura de sustancias hidrofóbicas entre sus membranas y la captura de sustancias hidrofílicas en su núcleo, lo cual le brinda protección al fármaco y a su vez proporcionan un suministro de fármacos a las células o incluso dentro de los compartimentos intra celulares^[13,14]. La última generación de liposomas ha sido tan revolucionaria que se ha podido incorporar numerosos elementos, tales como DNA, lípidos y/o polímeros sensibles a estímulos, péptidos penetrantes de células, componentes virales y partículas magnéticas^[13].

La liberación del contenido de los liposomas se ha logrado tanto de forma local como remota, la activación de forma local se ha realizado a través de difusión pasiva, orientación mediada por ligandos^[14], enzimas como la fosfolipasa C^[16] y cambios de pH^[17], de forma remota la activación se realiza por medio de luz^[18], calor^[19] y ultrasonido^[20].

1.2. Microburbujas

Con el auge del ultrasonido y su implementación en la medicina para el diagnóstico clínico, se lograron captar imágenes de órganos, tumores e incluso mediciones del flujo sanguíneo, sin embargo, para visualizar vasos pequeños se requiere un aumento de contraste en la imagen para poder discriminar la sangre de los tejidos para esto se desarrollaron medios de contrastes. Uno de los más recientes medios de contrastes aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) son las microburbujas, estas micro esferas (1-10 μm) de núcleo gaseoso estabilizadas por una monocapa de lípidos, polímeros o proteínas^[21].(Figura 1.3)

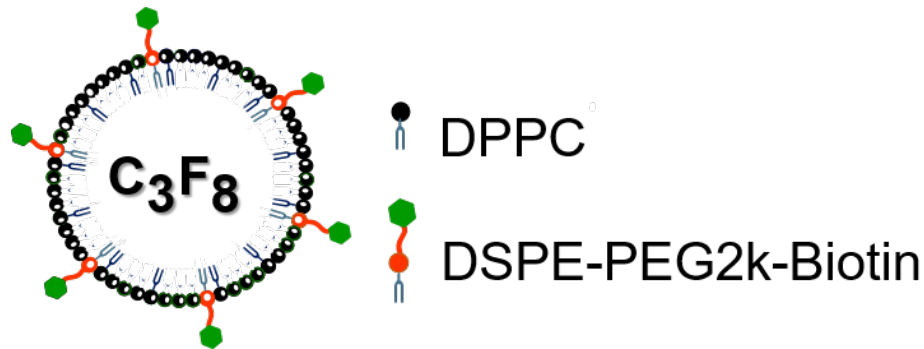


Figura 1.3: Representación de una microburbuja con núcleo de perfluoropropano (C_3F_8).

Debido al núcleo gaseoso, en presencia de ondas de ultrasonido presentan un fenómeno de oscilaciones conocido como cavitación, que se divide en dos tipos: la cavitación estable ocurre cuando la microburbuja oscila en frecuencias acústicas bajas generando esfuerzos cortantes y micro corrientes, mientras que la cavitación inercial ocurre en frecuencias acústicas altas generando una rápida expansión y compresión de la microburbuja propiciando así un colapso abrupto de las microburbujas, dicho colapso genera altas temperaturas y presiones locales que a su vez están acompañados por fenómenos secundarios tales como ondas de shock, microjets y generación de radicales libres. Esta destrucción de la microburbuja ayuda a mejorar el contraste de las imágenes obtenidas por ultrasonido^[22].

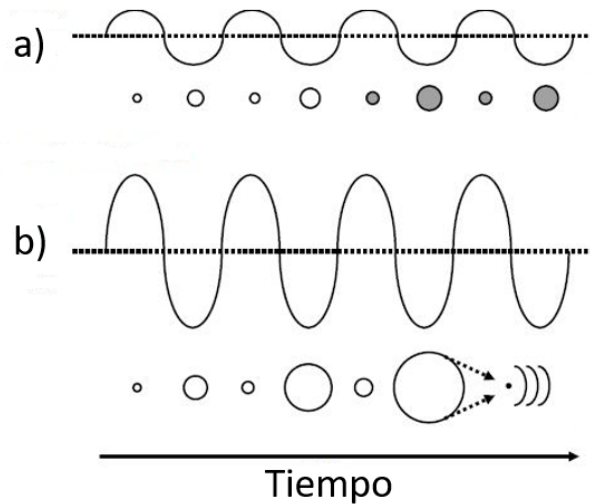


Figura 1.4: Representación esquemática de los efectos acústicos producidos en las microburbujas. **a)** cavitación estable **b)** cavitación inercial^[22].

Cuando la microburbuja es destruida cercana a una célula los microjets y ondas de shock generan poros transitorios en la membrana celular y el resultado es un fenómeno conocido como sonoporación^[23], el uso de microburbujas combinado con ultrasonido ha generado un nuevo sistema de liberación de drogas, cabe resaltar que el fármaco estará inactivo hasta que este sea liberado. Adicionalmente se ha demostrado que las microburbujas se pueden cargar con diversas moléculas y ser liberados a través de la destrucción de la microburbuja, así mismo el efecto del fármaco se ve incrementado debido al fenómeno de sonoporación facilitando la incorporación del fármaco a la célula^[24].

1.3. Antecedentes

Tanto los liposomas como las microburbujas ya han sido estudiados como acarreadores, Filipeanu y colaboradores evaluaron los efectos del ácido araquidónico (AA) encapsulado en liposoma comparado con el ácido araquidónico libre en anillos aórticos de rata, ellos observaron que el ácido araquidónico encapsulado en los liposomas produce un efecto mayor que el Araquidónico libre. Esto sugiere que los liposomas favorece el efecto biológico del AA y que los liposomas permiten una mejor incorporación del

AA en el tejido. Ellos demostraron que la contracción generada por el AA modula la activación de la proteína kinasa C^[25]. (Figura 1.5)

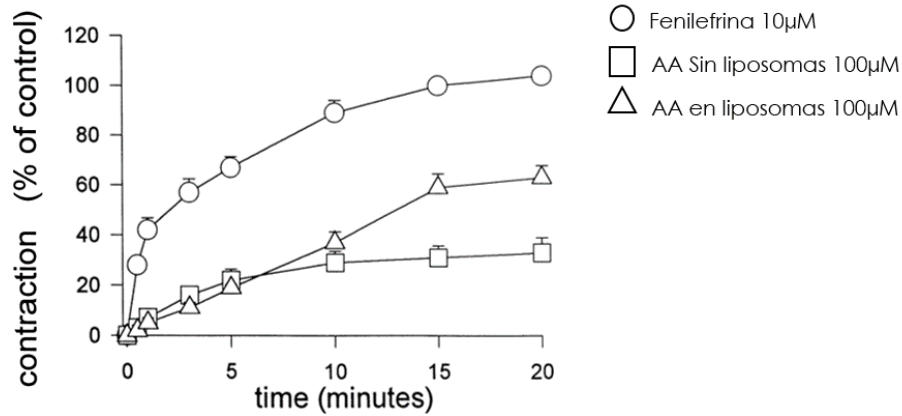


Figura 1.5: Comparación del AA libre contra el AA encapsulado en liposomas^[25]

Para las microburbujas Tlaxca y colaboradores demostraron la eficiencia de transfección en la incorporación de plásmidos en células embrionarias de riñón humano (HEK 293), mediante el efecto de sonoporación causado por pulsos de ultrasonido. Los resultados que obtuvieron demuestran que al incubar DNA con los lípidos de las microburbujas se logra incorporar el DNA a las microburbujas, siendo mayor en las microburbujas catiónicas^[26]. (Figura 1.6 a)

Posteriormente para demostrar los efectos directos de la unión del plásmido con las microburbujas compararon la eficiencia de transfección del plásmido incorporado a las microburbujas mediante la expresión de GFP logrando una mayor transfección de DNA en las microburbujas catiónicas en la cepa HEK-293^[26].(Figura 1.6 b)

Con los avances tecnológicos se ha introducido un novedoso y prometedor sistema acarreador basado en la unión de microburbujas y liposomas, Geers y colaboradores desarrollan un sistema microburbuja-liposoma unidos mediante enlaces sulfhidrilo, el resultado es un sistema acarreador efectivo capaz de resolver la problemática de liberación controlada del fármaco empleando pulsos de ultrasonido para fomentar la liberación de las moléculas encapsuladas, por lo que he aquí una base fuerte para desarrollar un sistema acarreador a base de fosfolípidos^[24] y evalúan la eficiencia de

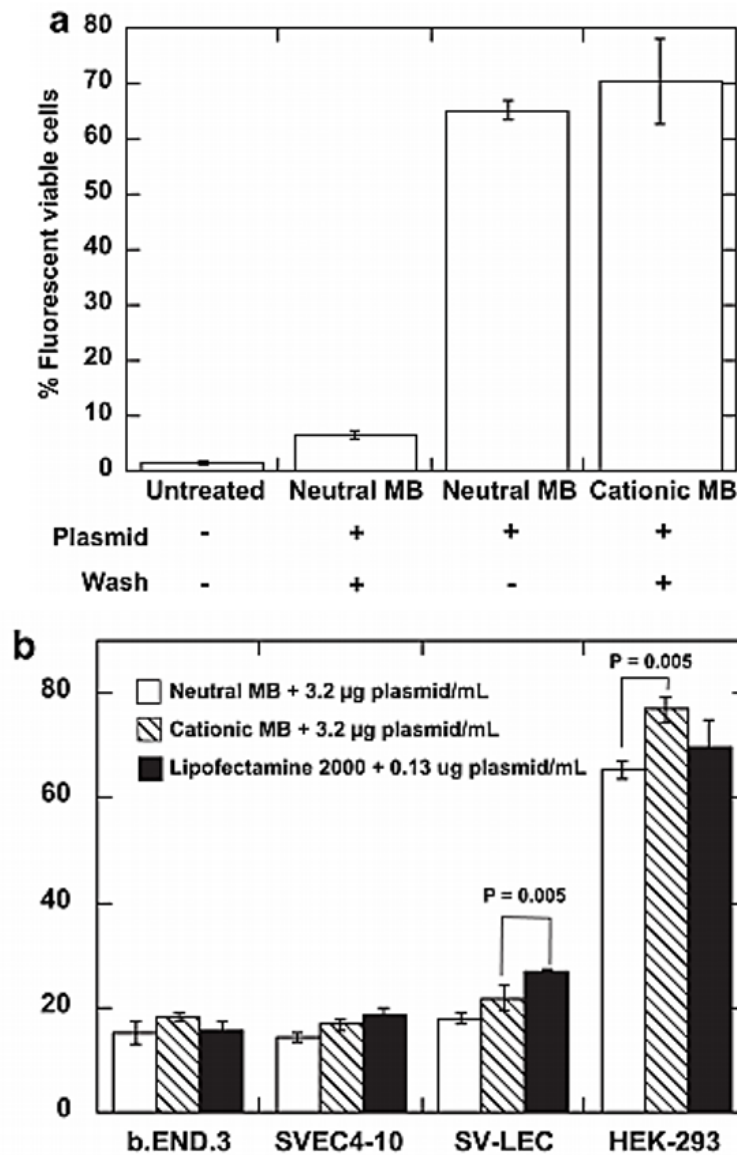


Figura 1.6: a) Medición de la expresión de GFP b) comparación de eficiencia de transfección en diferentes líneas celulares, se emplea una $[4 \times 10^7]$ microburbujas/mL de microburbujas a una frecuencia de 2.0 W/cm^2 por 3 min y se observa una mayor transfección del material genético en las células de riñón humano. donde: b.END.3 son células endoteliales de cerebro de ratón, SVEC4-10 son células del ganglio linfático axilar, SV-LEC son células endoteliales Linfáticas y HEK 293 son células embrionarias de riñón humano^[26].

muerte celular empleando una droga modelo (DOX), primeramente, los autores desarrollan las microburbujas a base de 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC), 1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine-Polyethylene Glycol-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate (DSPE-PEG-SPDP) mediante el método de hidratación y agitación mecánica, con un núcleo gaseoso de decanofluorobutano. Los liposomas fueron mediante el método de hidratación y preparados por la siguiente composición de fosfolípidos: DPPC, DSPE-PEG-MALEIMIDE, finalmente para obtener una distribución homogénea en el tamaño de los liposomas estos fueron extruidos a través de una membrana de policarbonato ($200\mu\text{m}$) a 60°C para posteriormente incorporar la droga modelo. Por último, la unión de las microburbujas y liposomas se enlazan a través de un enlace covalente entre MALEIMIDE y SPDP^[24].

Los autores demostraron por medio de micrografía que el sistema microburbuja-liposoma era posible de realizarse, así mismo los autores emplearon un contador coulter para obtener la distribución de tamaños de su sistema microburbuja-liposoma, esta medición se realizó con los liposomas cargados (DOX) y sin cargar. Ellos observaron que el promedio del tamaño de los liposomas sin carga es de $3.6\mu\text{m}$ mientras que el tamaño promedio de los liposomas cargados con DOX fue de $4.0\mu\text{m}$. Este incremento del tamaño promedio los autores lo atribuyen a la unión de los liposomas a las microburbujas^[24]. Finalmente los autores evaluaron el efecto biológico del sistema microburbuja-liposoma expuesto a ultrasonido, para esto ellos estudiaron los efectos citotóxicos que produce su sistema en células de melanoma y ellos encontraron que al exponer las microburbujas, la droga encapsulada en liposomas y el sistema microburbujas-liposoma sin ser expuesto a ultrasonido observaron que la viabilidad celular no se modificó, sin embargo, cuando el sistema microburbuja-liposoma es expuesto al ultrasonido el efecto de la droga se potencializa, logrando así un incremento en la mortalidad celular^[24].

Por todo lo anterior podemos inferir que los liposomas nos brindan una alta capacidad de captura de cualquier molécula (hidrofóbica o hidrofílica) sin embargo la liberación de éstas es impredecible para que tenga un efecto.

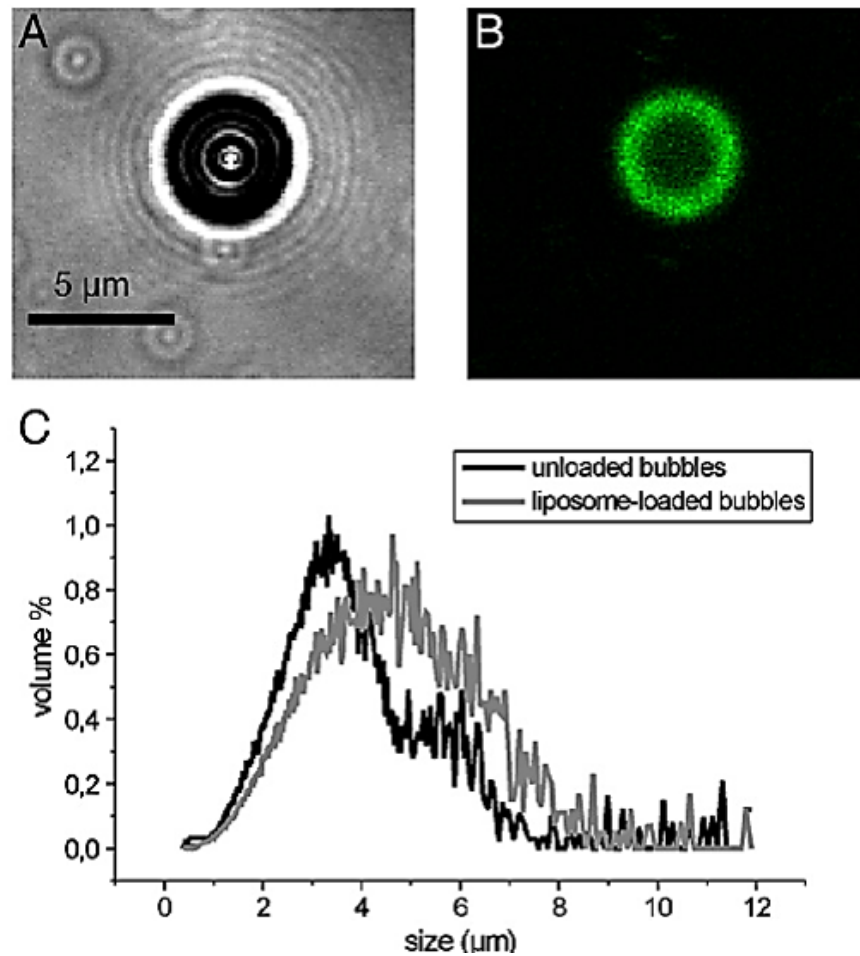


Figura 1.7: Micrografía y distribución de tamaños del sistema microburbuja-liposoma A) imagen confocal B) microburbuja-liposoma marcada con bodipy C) Distribución de tamaños del sistema microburbuja-liposoma en negro liposomas cargados con DOX y en gris liposomas sin la droga^[24].

Por otro parte las microburbujas nos permiten la captura de sustancias hidrofílicas y al ser expuestas a pulsos de ultrasonidos, las microburbujas son destruidas liberando de manera controlada la molécula capturada. Por lo que al combinar ambos sistemas acarreadores podemos lograr una mayor capacidad de acarreo de la molécula sin importar su naturaleza (hidrofóbica o hidrofílica) y al ser expuestas a pulsos de ultrasonido se obtendrá una liberación controlada.

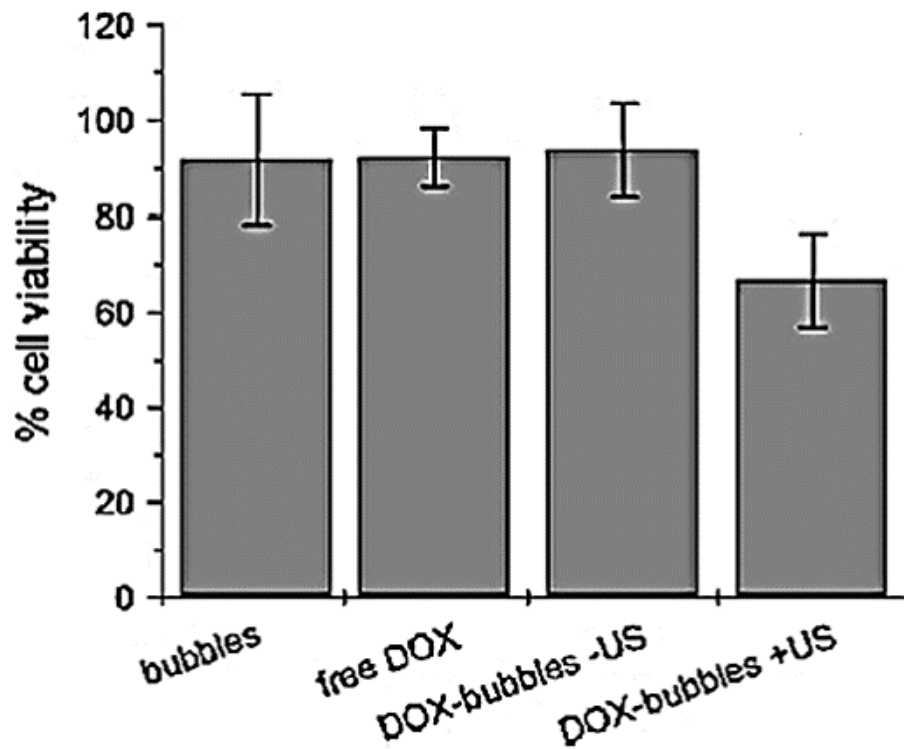


Figura 1.8: Medición de la viabilidad celular de células de melanoma bajo diversos tratamientos, la concentración empleada de DOX fue de $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ ^[24].

2

Justificación

Investigaciones recientes que se han enfocado en el desarrollo y evaluación de sistemas de liberación de fármacos han propuesto un efectivo sistema de liberación controlada por medio de la unión de liposomas a microburbujas, este novedoso sistema potencializa las ventajas individuales de cada acarreador y disminuye las desventajas de cada uno, por lo que permite mejorar la entrega de diferentes moléculas hidrófobas y aumentar su efecto terapéutico *in vitro*.

Por otro lado, existe un gran número de moléculas hidrófilas utilizadas en el tratamiento de diferentes condiciones patológicas en las que la liberación específica y controlada es deseada. Sin embargo, las microburbujas no permiten encapsular sustancias hidrófilas por lo que su uso terapéutico para la liberación de este tipo de moléculas es imposible, pero se pueden aprovechar las propiedades de los liposomas de encapsular sustancias hidrófilas y a través del ensamble de estos dos sistemas evaluar si es posible controlar la liberación del fármaco hidrófilo de la misma manera en la que ha sido demostrado para las sustancias hidrofóbicas.

Con todo lo anterior podemos resolver la problemática de focalizar y liberar de manera controlada una molécula hidrófila con actividad vascular a través de la unión de liposomas y microburbujas permitiendo liberar el fármaco ante un estímulo controlado sobre un modelo de tejido *in vitro* que nos ayude a evaluar de manera directa una respuesta fisiológica.

2. Justificación

3

Hipótesis

El uso de un acarreador que use microburbujas y liposomas permitirá incorporar y transportar moléculas hidrofílicas y facilitará su liberación controlada.

4

Objetivos

4.1. Objetivo General

Demostrar la liberación de un fármaco utilizando un acarreador de liposomas y microburbujas lipídicas tienen efectos biológicos predecibles en un sistema cardiovascular *in vitro*.

4.1.1. Objetivos Particulares

- Caracterizar el efecto biológico de un agonista vascular.
- Caracterizar el sistema microburbuja-liposoma.
 - Caracterización de las microburbujas.
 - Distribución de tamaños.
 - Índice de Polidispersidad (PDI).
 - Comprobación de la unión de los liposomas a las microburbujas.
 - Distribución de tamaños y PDI del sistema microburbuja-liposoma.
 - Caracterización del efecto biológico de los liposomas en un modelo *in vitro*.
- Caracterizar el efecto biológico del complejo microburbuja-liposoma en un modelo *in vitro*.

4. Objetivos

5

Métodos

Los protocolos empleados en este trabajo fueron aprobados por el comité de ética del Comité Interno para el Cuidado y el Uso de Animales de Laboratorio del CINVESTAV.

5.1. Diseño del acarreador

Para el diseño del acarreador se desarrolla dos sistemas de liberación a base de fosfolípidos, el primero de ellos son: liposomas y el otro son las microburbujas dichos acarreadores serán unidos mediante un enlace biotina-avidina.

5.1.1. Liposomas unilaminares

Para la fabricación de los liposomas multilaminares se fabricaron de la siguiente manera: se prepara una mezcla de fosfolípidos 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine: 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(amino(polyethylene glycol)-2000): (DSPC: DSPE-PEG2000: 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[biotinyl (polyethylene glycol)-2000] (DSPE-PEG2000-biotin) con una relación molar de 90:5:5 mol en cloroformo, luego el cloroformo es removido mediante una corriente de nitrógeno a temperatura ambiente.

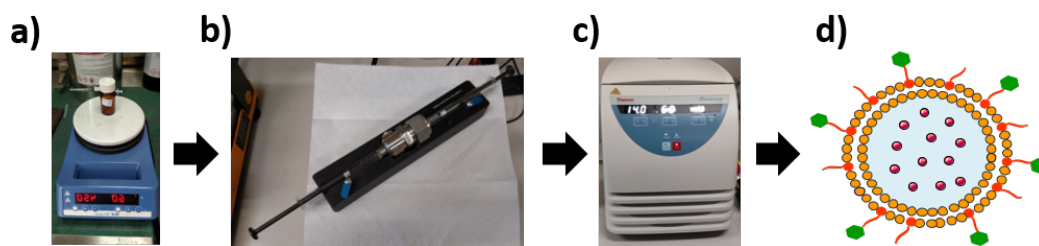


Figura 5.1: Procesos para la fabricación de liposomas unilaminares. **a)** hidratación del film para la formación de liposomas multilaminares **b)** Extrusión de los liposomas multilaminares a través de una membrana de policarbonato de 200 nm para la obtención de liposomas unilaminares **c)** Centrifugación de los liposomas unilaminares para remover el exceso de la molécula no encapsulada. **d)** Representación gráfica de los liposomas unilaminares con una molécula encapsulada.

Posteriormente se hidrata la mezcla de fosfolípidos con fenilefrina resuspendida en HEPES (20mM, 7.4) y se agita a 450 rpm a una temperatura de 60°C por 20 minutos para facilitar su disolución. La solución de liposomas multilaminares se somete a extrusión mediante el equipo mini-extruder (Avanti Polar Lipids) siguiendo el procedimiento establecido por el fabricante. Por último, los liposomas unilaminares son centrifugados 5 veces a 14000 rpm para eliminar el exceso de fenilefrina no encapsulada y finalmente son suspendidos en 1 ml de HEPES (Figura 5.1).

5.1.2. Microburbujas

Para la fabricación de las microburbujas se fabricaron de la siguiente manera: se prepara una mezcla de fosfolípidos (DPPC: DSPE-PEG2000-biotin) con una relación molar de 95:5 mol en cloroformo, luego el cloroformo es removido mediante una corriente de nitrógeno a temperatura ambiente. Posteriormente se hidrata la mezcla de fosfolípidos con HEPES (20nM pH 7.4) y se agita a 450 rpm a una temperatura de 55°C por 20 minutos para facilitar su disolución. Se aplica vacío al recipiente de los liposomas multilaminares para luego ser sustituido por perfluoropropano, posteriormente la suspensión es agitada a 4500 osc/seg durante 46 seg las microburbujas resultantes son resuspendidas en 500 μ l de HEPES. Finalmente, las microburbujas son centrifugadas 2 veces a 470 g durante 5 minutos para eliminar los fosfolípidos que no formaron microburbujas y son resuspendidas en 1 ml de HEPES. La caracterización de distribución de

tamaños, e índice de polidispersidad de las microburbujas se realiza a través de análisis de imágenes. (Figura 5.2)

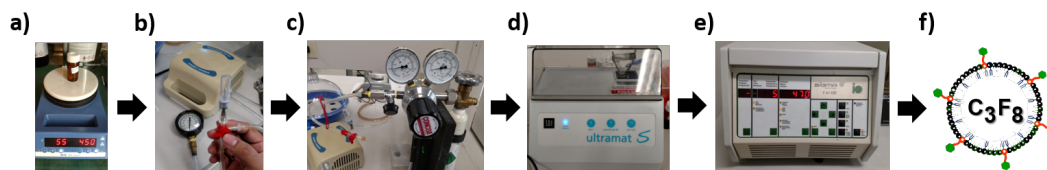


Figura 5.2: Procesos para la fabricación de las microburbujas. **a)** Hidratación del film para la formación de liposomas multilaminares **b)** Aplicación de vacío a los liposomas multilaminares **c)** Sustitución del vacío con el gas perfluoropropano. **d)** Fabricación de las microburbujas por medio de agitación mecánica. **e)** Centrifugación de las microburbujas para remover el exceso de fosfolípidos **f)** Representación gráfica de las microburbujas.

5.1.2.1. Caracterización de las microburbujas

La caracterización de las microburbujas se realiza de la siguiente manera: a través de una dispositivo microfluidico se capturan una serie de imágenes (6 en total) empleando el equipo de microscopia confocal se estima el tamaño promedio de las Microbubujas y el índice de polidispersidad (coeficiente de variación) mediante análisis de imágenes en imagej.

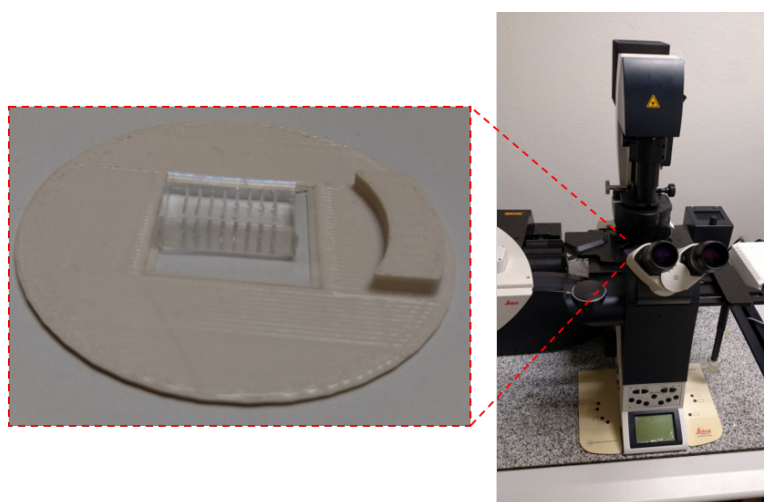


Figura 5.3: Dispositivo microfluidico empleado para la caracterización de las microburbujas

5.1.3. Unión microburbuja-liposomas

La unión de ambos acarreadores se realiza mediante un puente de biotina-avidina, dicho enlace no covalente está caracterizado por una constante de afinidad de 10^{15} L. mol⁻¹ siendo esta 10^3 - 10^6 veces más grande que la interacción de ligando-receptor por lo que teniendo una afinidad tan grande nos asegura que una vez formado la unión el complejo no se verá afectado por cambios de pH y manipulaciones tales como múltiples lavados^[27]. Para determinar la unión biotina-avidina y corroborar la presencia de los liposomas en la microburbuja se tomará imágenes de fluorescencia el cual tiene una Abs/Em = 492/517 nm.

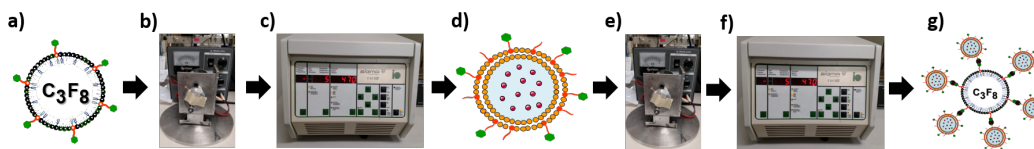


Figura 5.4: Procesos de fabricación del sistema microburbuja-liposoma. **a)** Representación gráfica de las microburujas **b)** Incubación de las microburujas con avidina conjugada con fluoresceína. **c)** Centrifugación para remover el exceso de avidina. **d)** Representación gráfica de los liposomas unilaminares. **e)** Incubación de las microburujas con los liposomas unilaminares **f)** Centrifugación para remover el exceso de liposomas unilaminares **g)** Representación gráfica del sistema microburujas-liposoma.

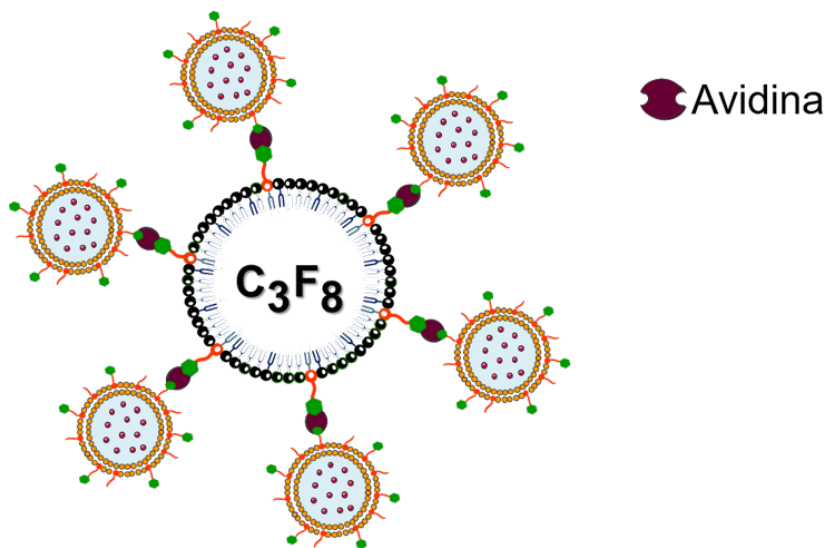


Figura 5.5: Sistema microburbuja-liposoma, se observa la unión de los liposomas a la microburbuja por medio del enlace biotina-avidina

5.1.3.1. Caracterización de sistema microburbujas-liposoma

Se realiza la caracterización del sistema microburbuja-liposoma para el cálculo del diámetro medio de igual manera que en el apartado 5.1.2.1

5.1.3.1.1. Caracterización del enlace biotina-avidina El proceso de caracterización del enlace Biotina-Avidina se realiza por medio de imágenes de fluorescencia tal y como se describe a continuación: primero para la comprobar que la avidina está unida a las microburbujas se emplea avidina conjugada con fluoresceína, un fluoroforo que emite alrededor de los 520nm en una tonalidad verde, para los liposomas estos se incuban durante 30 min a temperatura ambiente con vybrant dil, su rango de emisión es alrededor de los 580nm en tonalidad roja. Por lo que si el enlace entre las microburbujas y liposomas es satisfactorio se podrá observar a la microburbuja en tonalidad verde con una leve tonalidad roja.

5.2. Estudios funcionales

5.2.1. Preparación de los anillos aórticos

Se emplean rata macho de la cepa wistar con un peso de 250-350grs se anestesia la rata aplicando una dosis de pentobarbital y de heparina en una relación de 100 μ l por cada 100 grs de peso. Luego se administra isoflurano utilizando el equipo EZ-Anesthesia, WPI, USA. Después se sacrifica disecando la aorta descendiente, desde su emergencia en el cayado aórtico hasta la bifurcación de las arterias ilíacas. Inmediatamente después se coloca en solución Krebs (118 mM de NaCl, 4.7 mM de KCl, 1.2 mM de MgSO₄7H₂O, 2.5 mM de CaCl₂ 2H₂O, 25 mM de NaHCO₃, 11.7 mM de dextrosa) y bajo oxigenación con carbógeno (95 % O₂ y 5 % CO₂.) para retirar el tejido conectivo circundante para luego proceder a cortarlas en anillos de aproximadamente 3 mm de ancho. Para todos los estudios se utilizan 4 anillos torácicos por cada animal.

5.2.2. Montaje de los anillos aórticos en el sistema de órgano aislado para tejido vascular.

Cada anillo se monta en dos ganchos de acero inoxidable en forma de “L” para después colocarlos en una cámara de órgano aislado con capacidad de 10 ml, la cámara contiene solución Krebs y está se mantiene a 37°C con un burbujeo constante de carbógeno (95 % O₂ y 5 % CO₂). Uno de los extremos de los ganchos está conectado a la cámara mientras que el otro está conectado a un transductor de tensión modelo MLT0201 de ADINSTRUMENT este transductor está conectado a un amplificador FE224 de ADIINSTRUMENTS, el amplificador está conectado a un módulo PowerLab/4sp que transforma la señal analógica a digital para poder ser visualizado en tiempo real a través del programa LabChart v7 en entorno Windows.

5.2.3. Estabilización de tensión en los anillos aórticos

Cada anillo se le aplica una tensión inicial de 2 gramos, posteriormente se realiza 3 lavados (1 cada 10 minutos, nos referimos a lavado al cambio de la solución Krebs en las cámaras de órgano aislado). Por último, el valor basal es reiniciado a 0.

5.2.4. Prueba de viabilidad

Una vez que el valor basal es colocado a 0, a los anillos aórticos se le aplica un estímulo de fenilifrina (1x10⁻⁶ M), posteriormente se realiza 3 lavados (1 cada 10 minutos) para remover la fenilifrina presente en la cámara de órgano aislado, finalmente el valor basal es colocado a 0. Se repite 3 veces la prueba de viabilidad y los anillos aórticos cuyo valor sea menor a 0.8grs (tras finalizar la prueba de viabilidad) son descartados.

5.3. Procotolo experimental

5.3.1. Procotolo experimental 1: Curva dosis respuesta de un vasoconstrictor

Una vez montado los anillos aórticos y realizada la prueba de viabilidad, se realiza una curva dosis-respuesta acumulativa de fenilefrina iniciando con una dosis mínima de

$1 \times 10^{-9} \text{M}$ hasta una dosis máxima de $1 \times 10^{-5} \text{M}$, esta curva se realiza en incrementos de 0.5 en unidades logarítmicas.

De los datos obtenidos se toma como máxima respuesta (100 %) los gramos de tensión obtenidos con la dosis máxima y con respecto a esta respuesta se normaliza cada dato es decir el valor máximo de la respuesta entre cada dato obtenido. Se calcula por medio de un ajuste no lineal (Michaelis-menten) las dosis eficientes 50 y dosis eficiente 80.

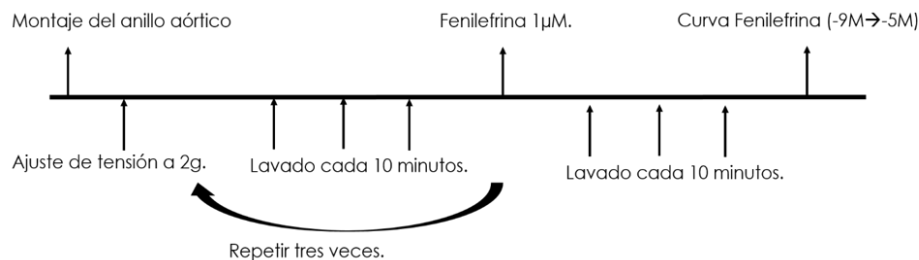


Figura 5.6: Protocolo experimental 1.- Curva dosis respuesta de fenilefrina.

5.3.2. Protocolo experimental 2: Respuesta biológica de los anillos aórticos generada por los liposomas

Una vez preparada la suspensión de los liposomas unilaminares cargados con fenilefrina se toma $500 \mu\text{l}$, se colocan en un baño ultrasónico ultrasonic cleaner marca Fisher Scientific modelo FS30 a una frecuencia de 42kHz durante 30 minutos esto para liberar la fenilefrina encapsulada en los liposomas. (Figura 5.7) Una vez realizada la liberación por ultrasonido de la fenilifrina se procede a observar la respuesta generada en los anillos aórticos de las diferentes condiciones (sin sonicar y con sonicar) para esto primeramente se montan los anillos aórticos en la cámara de órgano aislado seguido de la prueba de viabilidad, debido a que desconocemos la concentración de nuestra solución de liposomas utilizamos el mismo volumen requerido para la prueba de viabilidad ($10 \mu\text{l}$) por lo que agregamos $10 \mu\text{l}$ de la solución de los liposomas sin sonicar y observamos la respuesta generada en un periodo de tiempo de 10 minutos. Se realiza 3 lavados para eliminar los restos de fármacos y tras esto se agrega a la cámara de órgano aislado $10 \mu\text{l}$ de la solución de liposomas expuestas a ondas de ultrasonido y se observa la respuesta generada durante un periodo de 10 minutos.

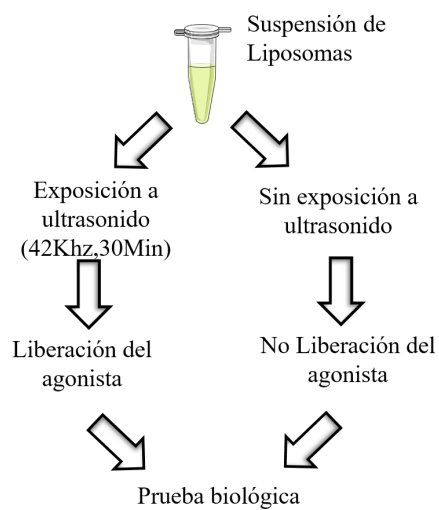


Figura 5.7: Liberación controlada del acarreado a través de pulsos de ultrasonido.

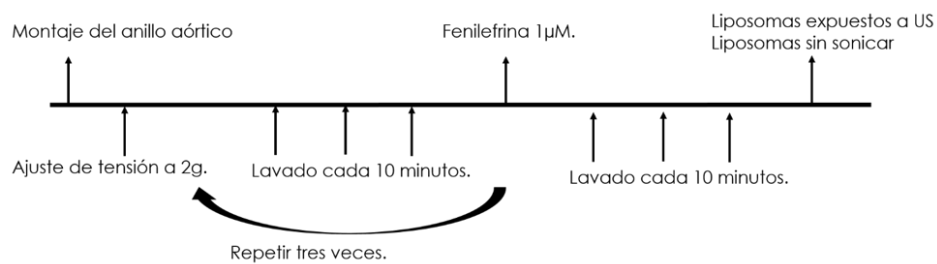


Figura 5.8: Protocolo experimental 2.- Diseño del protocolo experimental para la respuesta biológica generada por los liposomas

5.3.3. Protocolo experimental 3: Respuesta biológica de los anillos aórticos generada por el sistema microburbuja-liposoma

Una vez preparada la suspensión del sistema microburbuja-liposoma se toma 200 μl y se colocan en un baño ultrasónico ultrasonic cleaner marca Fisher Scientific modelo FS30 (42khz) durante 30 minutos esto para liberar la fenilefrina encapsulada en el sistema. (Figura 5.9)

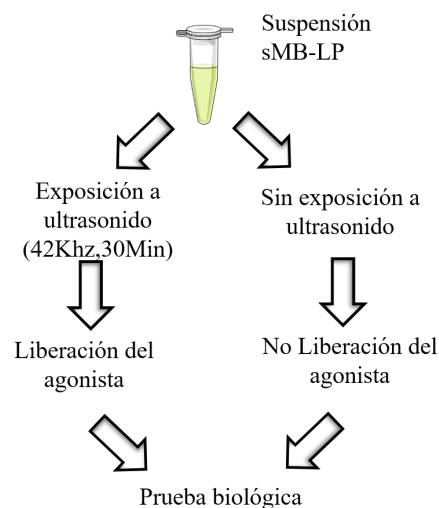


Figura 5.9: Liberación controlada del sistema a través de pulsos de ultrasonido.

Una vez realizada la liberación controlada de la fenilfrina se procede a observar la respuesta generada en los anillos aórticos de las diferentes condiciones (sin sonicar y con sonicar) para esto primeramente se montan los anillos aórticos en la cámara de órgano aislado seguido de la prueba de viabilidad, debido de igual manera como se desconoce la concentración de nuestra solución del sistema utilizamos el volumen requerido para la prueba de viabilidad (10 μl) por lo que agregamos 10 μl de la solución del sistema sin sonicar y observamos la respuesta generada en un periodo de tiempo de 10 minutos. Se realiza 3 lavados para eliminar los restos de fármacos y tras esto se agrega a la cámara de órgano aislado 10 μl de la solución del sistema expuesto a ondas de ultrasonido y se observa la respuesta generada durante un periodo de 10 minutos

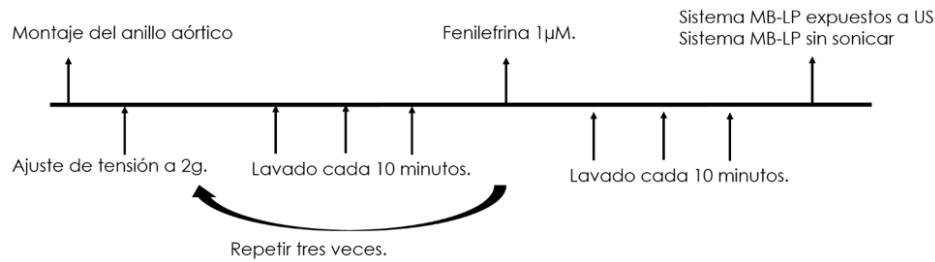


Figura 5.10: Protocolo experimental 3.- Diseño del protocolo experimental para la respuesta biológica generada por el sistema microburbuja-liposoma

5.3.4. Protocolo experimental 4: CDR del sistema microburbuja-liposoma

Una vez montado los anillos aórticos y realizada la prueba de viabilidad, se realiza una curva dosis-respuesta a fenilefrina generada por la suspensión del sistema microburbuja-liposoma expuestos a ultrasonido, puesto que desconocemos la concentración de nuestra solución emplearemos volúmenes conocidos para posteriormente a través de un ajuste no lineal (Michaelis-Menten) estimar la concentración de nuestra suspensión de microburbujas-liposomas. Los volúmenes empleados para generar la curva dosis-respuesta son los siguientes: 1 μ l, 2 μ l, 5 μ l, 10 μ l y 20 μ l. Posteriormente los datos obtenidos se normalizan contra la respuesta máxima promedio obtenido en el apartado 5.3.1 es decir el valor máximo de la respuesta entre cada dato obtenido. Finalmente se estima por medio de un ajuste no lineal (Michaelis-Menten) las concentraciones partiendo de -9M hasta -5M, esto con la finalidad de poder comparar contra una curva dosis-respuesta estándar de fenilefrina.

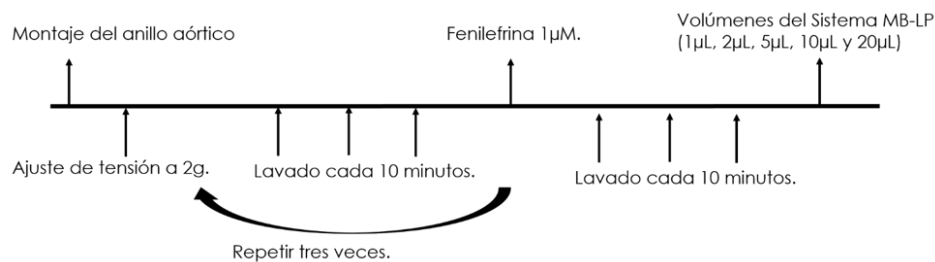


Figura 5.11: Protocolo experimental 4.- Diseño del protocolo experimental para estimar la concentración del sistema microburbuja-liposoma

5.3.5. Análisis estadístico de los resultados

Se utiliza la prueba de ANOVA, se considera como diferencia significativa cuando $p < 0.05$. Para el análisis de datos y el ajuste no lineal se emplea MATLAB y para las gráficas se emplea OriginPro8.

5.3.6. Fármacos

Los fármacos se obtuvieron de Sigma-Aldich: (R)-(-) fenilefrina. %

6

Resultados

6.1. Curva dosis respuesta de fenilefrina

Para entender la respuesta biológica generada en los anillos aórticos por la fenilefrina, se realizaron curvas dosis-respuesta. En la figura 6.1 se aprecia un trazo típico de una curva dosis-respuesta, como podemos observar a dosis pequeña existe cambios muy pequeños en la contracción del tejido, sin embargo, al llegar a una concentración logarítmica de $-7.5M$ se observa un incremento significativo en la tensión de la arteria. Al seguir incrementando las dosis se produce un incremento en la respuesta contráctil hasta llegar a una concentración en la cual no produce cambios en la respuesta del tejido aórtico, al llegar en este punto se considera que hemos llegado a una respuesta máxima. Dicha respuesta máxima se toma como el 100 % de la respuesta contráctil, para las respuestas intermedias se dividirán entre el valor máximo obteniendo así su porcentaje correspondiente.

6.2. Cálculo de la dosis Eficiente 50 y dosis Eficiente 80

Para estimar la Dosis Eficiente 50 y Dosis Eficiente 80 se implementó un ajuste no lineal utilizando el modelo cinético de Michaelis-Menten, este ajuste se elaboró en MATLAB, los resultados obtenidos son los siguientes: la media ($n=18$) de la Dosis Eficiente 50 fue de $55.92nM \pm 0.071M$ y de la Dosis Eficiente 80 fue de $223.68nM \pm 41.2nM$. La figura 6.3 nos muestra el ajuste implementado a los datos experimentales, los círculos son los datos experimentales obtenidos en el laboratorio con su respectivo EEM. La línea de color rojo es el ajuste no lineal aplicado a los datos experimentales.

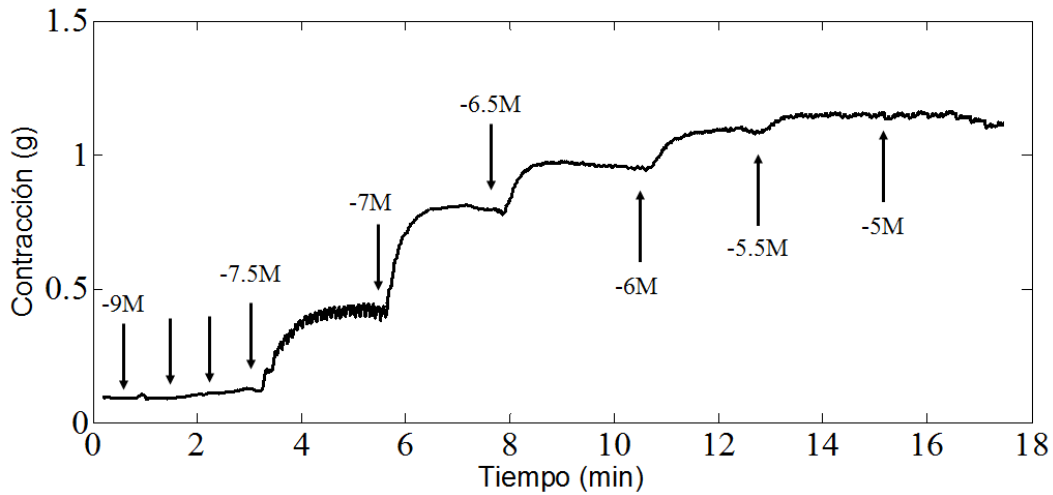


Figura 6.1: Curva dosis-respuesta a fenilefrina, Contracción expresada en gramos en función del tiempo del músculo liso vascular inducido por fenilefrina (1×10^{-9} M – 1×10^{-5} M). La concentración está dada en forma logarítmica en dosis crecientes de 0.5 unidades.

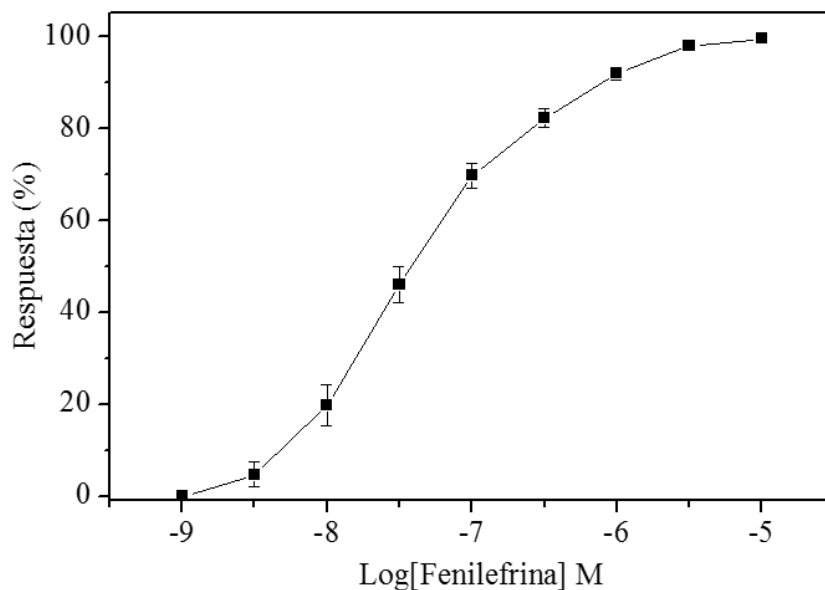


Figura 6.2: Curva dosis-respuesta normalizada con respecto al valor máximo. El porcentaje de contracción producido por fenilefrina en dosis creciente (1×10^{-9} M – 1×10^{-5} M) a los anillos aórticos. Los datos corresponden a la media \pm EEM, N=18.

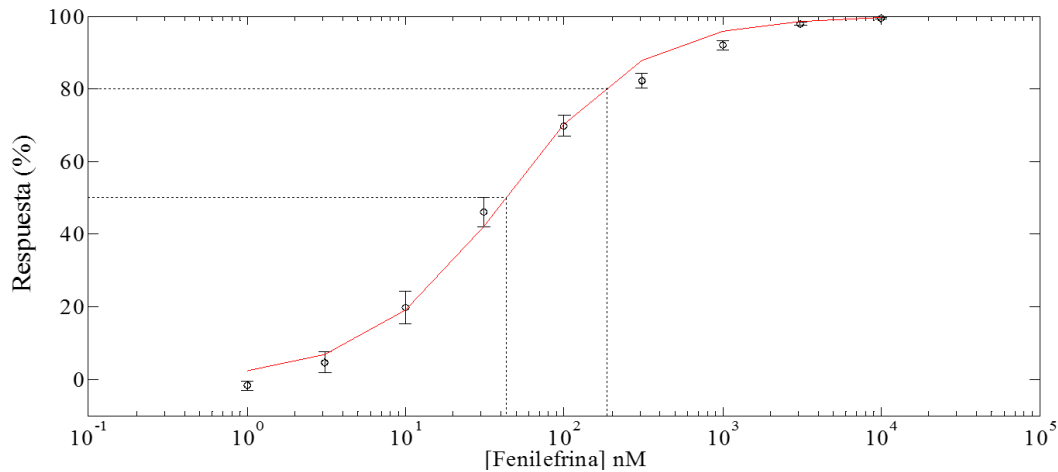


Figura 6.3: Estimación de la dosis eficiente 50 y dosis eficiente 80. Fue ajustada por medio de una regresión no lineal (Michaelis-Menten) y calculada en MATLAB. Los datos corresponden a la media \pm EEM, N=18

6.3. Caracterización del sistema microburbuja liposoma

6.3.1. Caracterización de las microburbujas

En la figura 6.4 podemos apreciar un histograma típico de las microburbujas obteniendo un tamaño medio promedio de $1.09 \mu\text{m}$.

Una vez obtenido la distribución de tamaños se procede a calcular el índice de polidispersidad (PDI), para esto se emplea la siguiente fórmula $\text{PDI} = \sigma / D_m * 100$ donde: PDI: es el índice de polidispersidad, σ : desviación estándar y D_m : diámetro promedio. El PDI de nuestra población de microburbujas es de 56.16 %.

6.3.2. Caracterización del enlace de unión entre las microburbujas y liposomas.

Primeramente, se comprobó que la avidina se estuviera uniendo a las microburbujas, para esto se empleó avidina conjugada con fluoresceína, en la figura 6.5 se observa una microfotografía confocal de fluorescencia donde se aprecia en tonalidad verde la avidina conjugada con fluoresceína unida a las microburbujas. De igual manera se analiza la distribución de tamaños y el PDI tal y como se realiza en el apartado 5.2.1 obtenien-

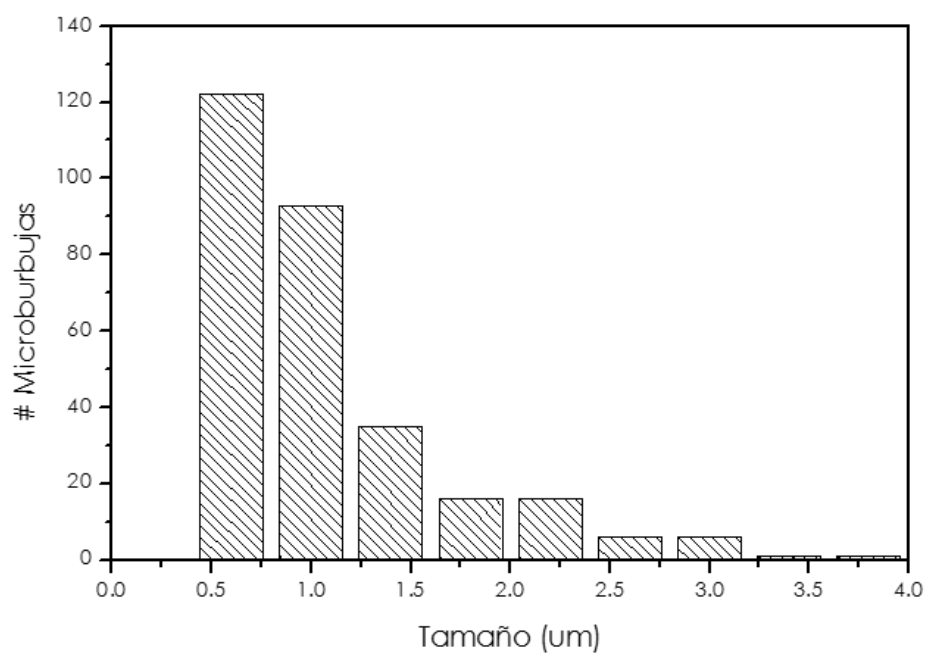


Figura 6.4: Distribución de tamaños de las microburbujas.

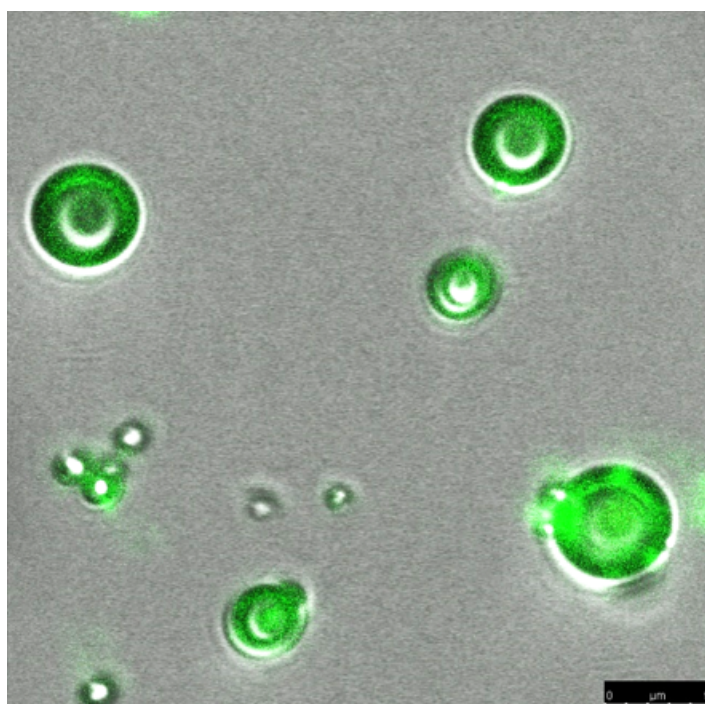


Figura 6.5: Micrografía de las microburbujas con avidina conjugada.

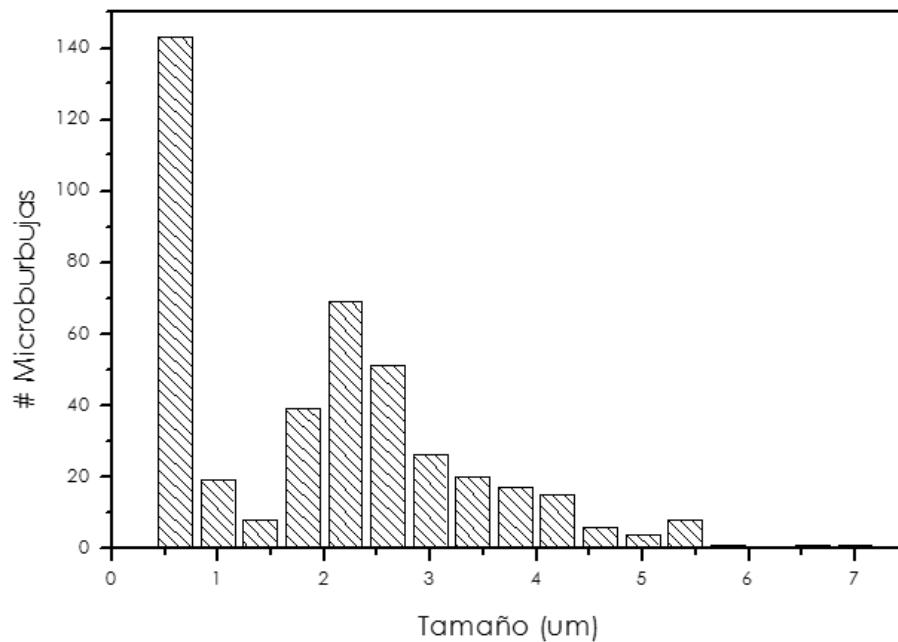


Figura 6.6: Distribución de tamaños de las microburbujas unidas a avidina conjugada con fluoresceína.

do de resultado un tamaño promedio de $1.47 \mu\text{m}$ y un PDI de 85.06% , en la figura 6.6 se muestra un histograma típico de la distribución de tamaños de las microburbujas unidas con avidina.

El siguiente objetivo fue comprobar la unión de los liposomas a las microburbuja con avidina. La figura 6.7 nos muestra una imagen de microscopia confocal, en ella podemos observar en tonalidad verde a la microburbuja, ya que como se mencionó con anterioridad dicha tonalidad es transmitida por la avidina, en tonalidad roja se observa a los liposomas, esta tonalidad está dada por el fluoroforo Vybrant Dil, mediante esta imagen podemos asegurar que el enlace de las microburbujas y liposomas es viable y satisfactorio. Por último, se analizó la distribución de tamaño y PDI siguiendo el procedimiento del apartado 5.2.1, como resultado tenemos un tamaño promedio de $1.39\mu\text{m}$ y un PDI de 78.62% , la figura 6.8 muestra un histograma típico del sistema microburbuja-liposoma.

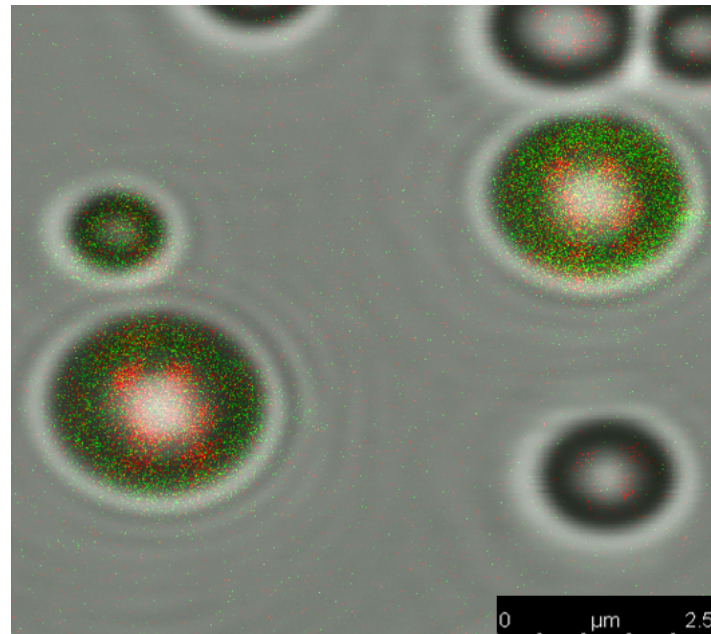


Figura 6.7: Imagen de microscopia confocal del sistema microburbuja-liposoma, en tonalidad verde se observa a la microburbuja y en tonalidad roja a los liposomas.

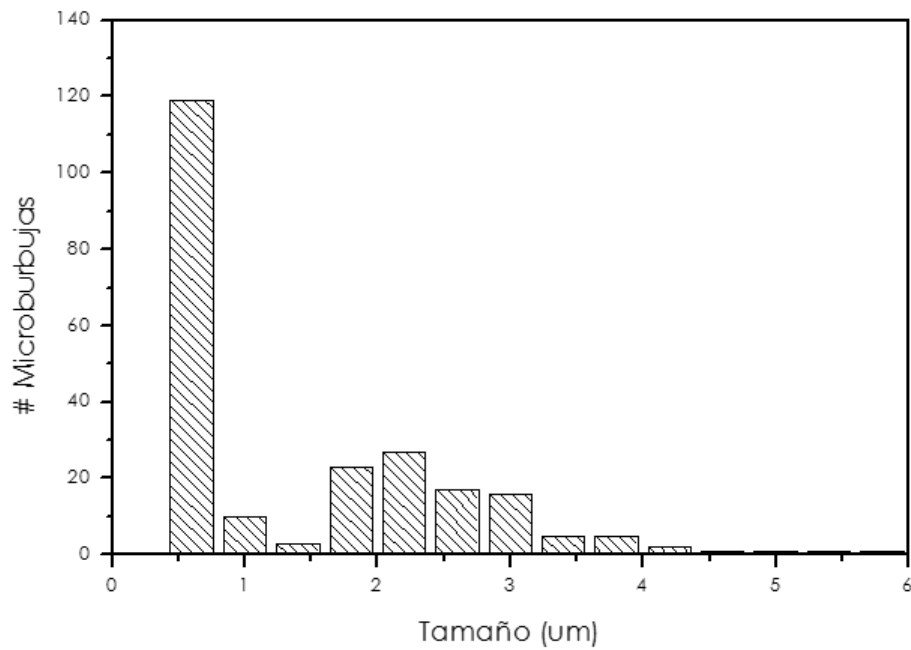


Figura 6.8: Histograma del sistema microburbuja-liposoma.

6.4. Respuesta biológica de los anillos aórticos generada por los liposomas.

En la figura 6.9 se aprecia un trazo representativo en el cual podemos observar la contracción generada en respuesta a la adición de los liposomas en los anillos aórticos en el sistema de órgano aislado, los liposomas sin sonicar (color magenta) generan una respuesta lenta y gradual, sin embargo, cuando los liposomas son expuestos a pulsos de ultrasonido (color rojo) la respuesta generada en los anillos aórticos es rápida y de mayor amplitud que la de los liposomas sin sonicados. Este experimento se realizó en 18 anillos provenientes de 5 animales diferentes.

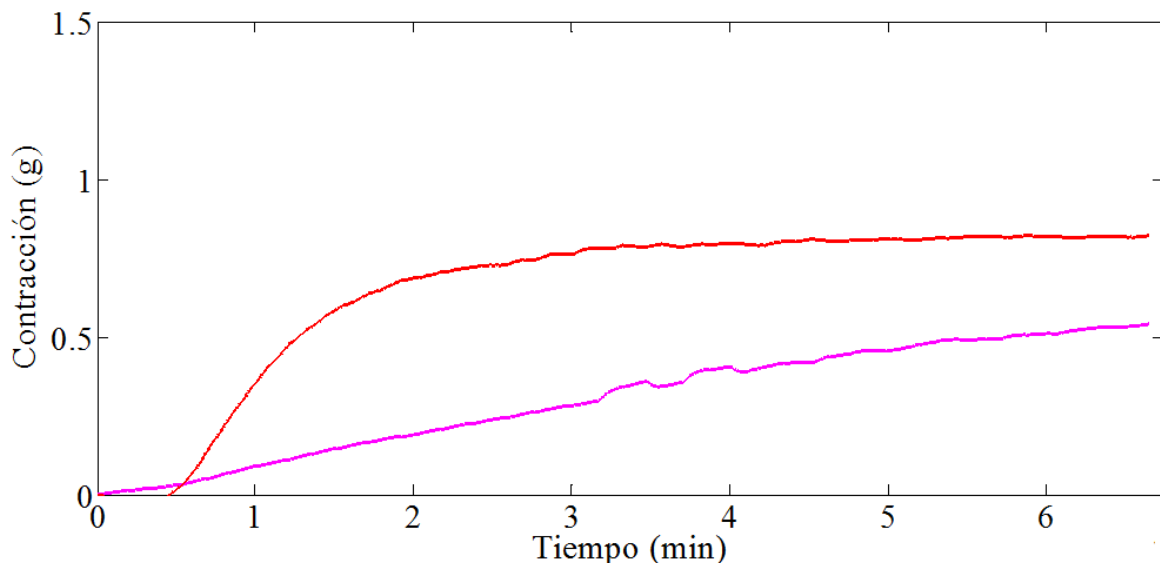


Figura 6.9: Respuesta de los anillos aórticos a los liposomas sin sonicar (magenta), sonicados (rojo).

6.5. Respuesta biológica generada por el sistema microburbuja-liposoma

En la figura 6.10 se aprecia un trazo representativo en el cual podemos observar la respuesta generada por el sistema microburbuja-liposoma en los anillos aórticos, al agregar la suspensión de microburbujas-liposomas al baño de órgano aislado podemos observar que no se produce una respuesta contractil en el tejido aórtico (color verde).

Sin embargo, cuando el sistema microburbuja-liposoma fue roto mediante la exposición a pulsos de ultrasonido (color cyan) se produce una contracción en los anillos aórticos. Se cuantificaron los siguientes tratamientos: primeramente se emplea como control $1\mu\text{M}$ de fenilefrina generando una respuesta contractil del 100%, para el lavado 5 es decir, el último sobrenadante de la última centrifugación de los liposomas observamos que producen una respuesta contractil de: 3.65%, mientras que para el sistema microburbuja-liposoma la respuesta contractil fue de: 2.03%, interesantemente la respuesta contractil producida por los liposomas fue de: 21.17%, para los liposomas sonicados fue de: 52.28% y por último la respuesta contractil generada por el sistema microburbuja liposoma expuestos a ultrasonido fue de: 62.63%, los resultados se muestran en la figura 6.11. Este experimento se realizó en 18 anillos provenientes de 5 animales diferentes.

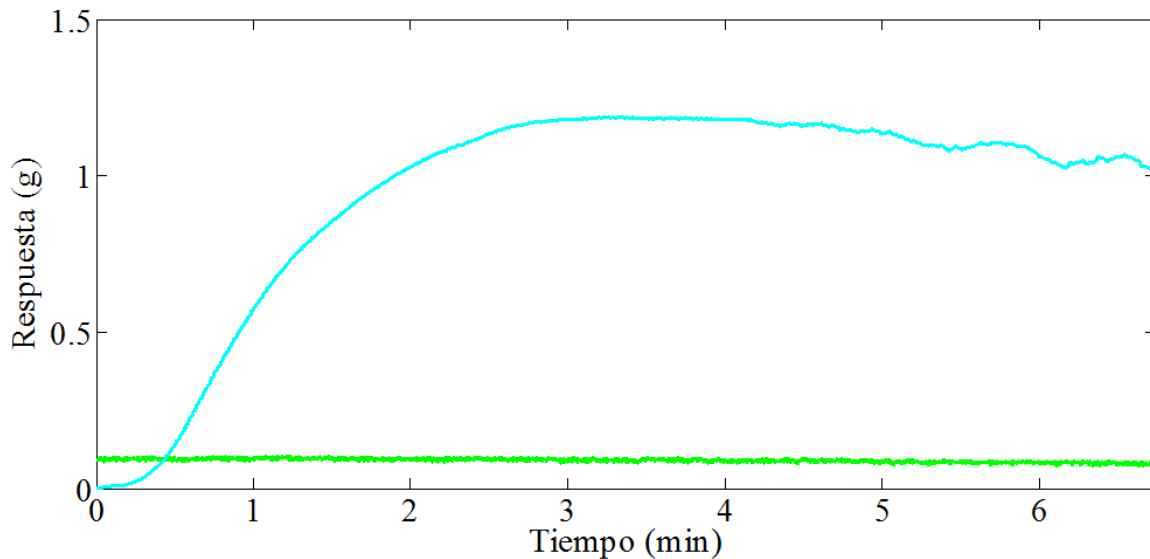


Figura 6.10: Respuesta de los anillos aórticos producida por la fenilefrina encapsulada en el sistema microburbuja-liposomas. Los anillos fueron incubados con el sistema microburbuja-liposoma sin sonicar (verde) o con el sistema microburbuja-liposoma expuestos a ultrasonido sonicados (cyan).

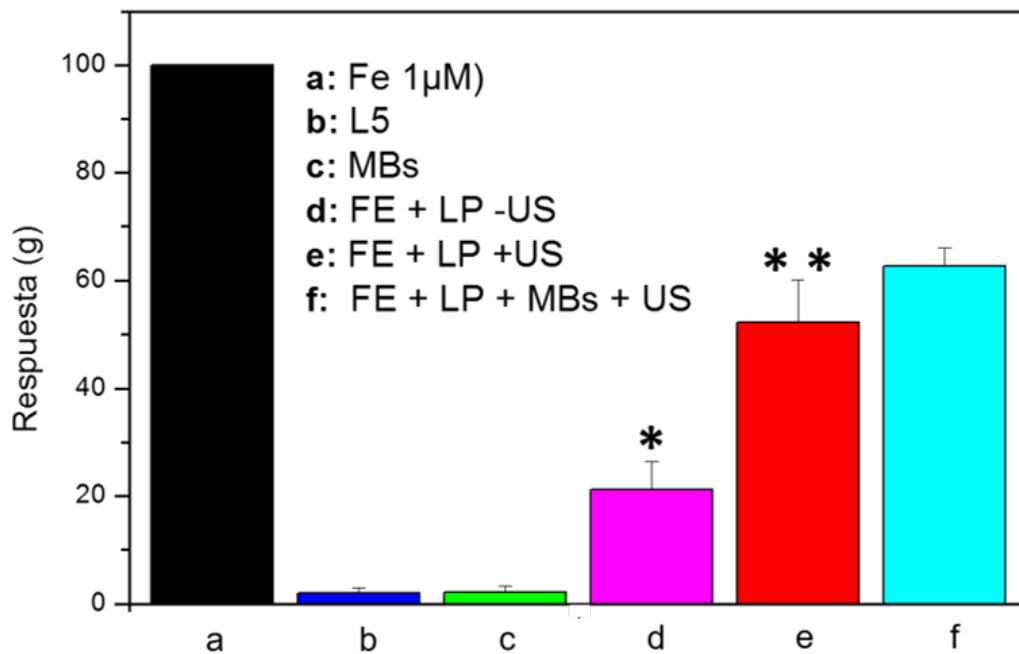


Figura 6.11: Cuantificación de la fenilefrina presente en cada uno de los componentes del sistema mmicroburbuja liposoma. FE: Fenilefrina; L5: Lavado 5; MBs:Microburbujas; LP: Liposomas; US: Ultrasonido. Los datos representan el promedio \pm EEM, n=5. $P < 0.05$, * f vs d, ** f vs e

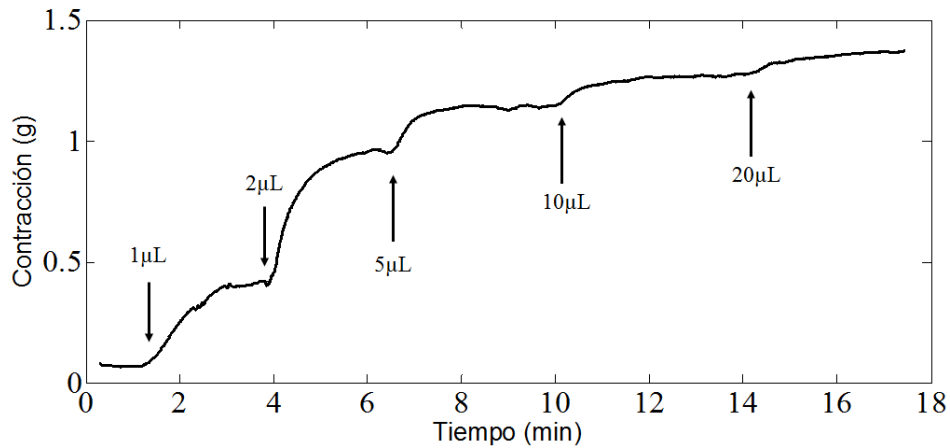


Figura 6.12: Curva dosis respuesta de la contracción de las arterias aórticas producida por la Fenilefrina liberada del sistema microburbuja-liposoma

6.6. Curva dosis-respuesta del sistema microburbuja-liposoma

Al ir agregando volúmenes crecientes ($1\mu\text{l}$, $2\mu\text{l}$, $5\mu\text{l}$, $10\mu\text{l}$ y $20\mu\text{l}$) de la solución de microburbujas-liposomas que fueron expuestos al ultrasonido observamos que se genera una respuesta contráctil en los anillos aórticos dependiente de la dosis (volumen agregado), la figura 6.12 muestra un trazo representativo de los resultados obtenidos. Una vez que observamos que la suspensión de microburbujas-liposomas expuestos a ultrasonido tiene un comportamiento dependiente de la dosis podemos comparar nuestros resultados experimentales contra una curva dosis estándar promedio y así estimar la concentración de fármaco. En la figura 6.13 observamos la estimación de la concentración del fármaco de la suspensión de microburbujas-liposomas dicha estimación se realizó a través del ajuste no lineal mencionado con anterioridad obteniendo una dosis eficiente 50 de 47.3 nM y una dosis eficiente 80 de 185.90 nM .

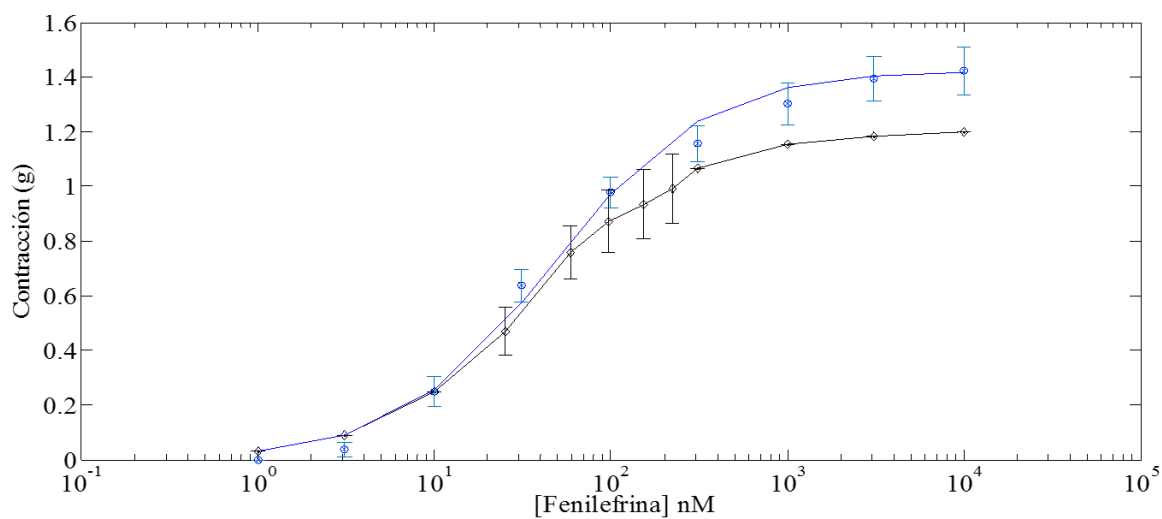


Figura 6.13: Comparación y cálculo de la dosis eficiente 50 y dosis eficiente 80 del sistema microburbuja-liposoma (línea negra) vs curva dosis-respuesta estándar de fenilefrina (línea azul).

7

Discusión

En la literatura se hayan diversos estudios que han desarrollado acarreadores a base de fosfolípidos, por ejemplo, los liposomas^[25] y las microburbujas^[26] tal y como se mencionó cada uno de ellos nos brindan ciertas ventajas y desventajas individuales.

Paskaloglu et al.^[28], Nak doo kim et al.^[29] determinaron el efecto contráctil generado por fenilefrina en anillos aórticos de rata, por medio de curvas dosis respuesta empleando concentraciones desde $-9M$ hasta $-5M$ y observamos comportamientos similares entre los resultados obtenidos en la literatura con los resultados obtenidos en este proyecto.

En el proceso de caracterización del sistema microburbuja-liposoma se observó que el tamaño promedio de las microburbujas, microburbujas-avidina y microburbujas-liposoma cumplen con el rango de tamaño reportados en la literatura para poder ser utilizadas en aplicaciones biomédicas, así como la distribución de tamaños establecidos por la FDA^[30]. De igual manera el índice de polidispersidad de las microburbujas fabricadas por agitación mecánica concuerda con el reportado en la literatura (mayores al 50 %), incluso tras el desarrollo del sistema microburbuja-liposoma el índice de polidispersidad sigue estando dentro de lo reportado^[31].

Al igual que Geers, et al.^[24], Kheiolomoom, et al.^[32] observamos resultados similares en las imágenes de confocal del sistema microburbuja-liposoma, observando la fluorescencia en el contorno de la microburbuja y la fluorescencia de los liposomas en la microburbuja.

Autores como Filipeanu et al.^[25], Betageri^[33] lograron encapsular moléculas en liposomas y liberar el contenido de estos. Catalin observó una respuesta biológica en anillos aórticos de rata generada por AA, respuesta similar a la generada por los liposomas preparados en este proyecto, nosotros suponemos que al interactuar el liposoma con la membrana plasmática genera una liberación paulatina del fármaco provocando así un incremento en la tensión en los anillos aórticos, sin embargo, desconocemos el mecanismo de como la fenilefrina encapsulada en los liposomas producen una respuesta contractil en el tejido aórtico^[25].

De igual manera que Geers y colaboradores^[24] lograron encapsular una molécula hidrofóbica en su sistema microburbuja liposoma y liberarla ante un estímulo de ultrasonido sobre un cultivo celular, nuestros resultados confirman que es posible encapsular una molécula hidrofílica en el sistema microburbuja liposoma y liberarla de manera controlada mediante pulsos de ultrasonido. Sin embargo, Geers y colaboradores trabajaron en un modelo simple (cultivo celular) y se sabe que estos modelos aportan conocimientos fundamentales únicamente sobre la interacción célula-microburbuja. Por lo tanto, se requiere seleccionar modelos más complejos que proporcionen información fisiológica relevante^[34]. De acuerdo con esto, en nuestro proyecto utilizamos un modelo *in vitro* montado en un sistema de órgano aislado bajo condiciones fisiológicas que nos permite evaluar directamente una función biológica y con ello acercarnos más a lo que ocurriría en un escenario *in vivo*.

Diversos estudios indican que al exponer las microburbujas a pulsos de ultrasonido el fármaco encapsulado en estos es liberado de manera controlada, cuando aplicamos pulsos de ultrasonido tanto a los liposomas cargados con fenilefrina como al sistema microburbuja-liposoma observamos que efectivamente la liberación del fármaco ocurre.^[24,26] Interesantemente la liberación del fármaco es mayor en el sistema microburbuja liposoma puesto que de acuerdo con la teoría existen numerosos fenómenos que se generan al exponer las microburbujas a pulsos de ultrasonidos dichos efectos ya han sido observados por diversos autores tales como Tlaxca^[26] y Geers^[24] estos fenómenos afectan directamente a los liposomas adheridos a las microburbujas destruyéndolos y liberando el contenido de ellos.

Por el contrario, al exponer los liposomas a pulsos de ultrasonido la molécula es liberada

en menor cantidad, esto se debe a que existe una destrucción parcial de los liposomas o a una reestructuración y formación de liposomas unilaminares de menor tamaño esto lo sustentamos ya que en la literatura se ha reportado la fabricación de liposomas por sonicación sin embargo se necesitaría realizar estudios de medición de partículas empleando el equipo Zetasizer para poder determinar concretamente esta sugerencia^[12,35]. Dado que nuestro sistema tiene un comportamiento dependiente de la dosis se puede realizar una comparación entre la curva dosis-respuesta del sistema microburbuja-liposoma contra nuestra curva dosis estándar de fenilefrina lo cual dicho comportamiento sugiere que el fármaco no ha sufrido modificaciones durante todo el proceso de fabricación del acarreador dado que las respuestas de las curvas son similares.

8

Conclusión

Se ha desarrollado un sistema acarreador funcional empleando liposomas unidos a microburbujas.

Los liposomas son capaces de encapsular un agonista vascular y permiten la liberación controlada del mismo solo si son expuestos a pulsos de ultrasonido.

Dicho sistema acarreador genera una acción biológica en condiciones más específicas de tiempo y sitio de acción.

8. Conclusión

9

Perspectivas

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, en un futuro se pretende realizar y mejorar nuestros protocolos experimentales de la siguiente manera:

- Mejorar la caracterización del sistema microburbuja liposoma
 - Estimar parámetros óptimos para la fabricación de microburbujas (Presión de inyección de gas, tiempo de agitación).
 - Determinar tamaños y PDI con los nuevos parámetros estimados.
 - Estimar los parámetros de ruptura del sistema microburbuja liposoma (frecuencia, intensidad de potencia, tiempo de exposición).
- Demostrar y caracterizar el sistema microburbuja liposoma encapsulando una molécula con efecto vasodilatador.
- Diseñar un arreglo experimental para aplicar el ultrasonido directamente al tejido en el sistema de órgano aislado y provocar de manera instantánea la liberación del fármaco. Esto nos permitirá evaluar si el tejido no presenta daños funcionales cuando está en presencia de las ondas ultrasónicas.

Bibliografía

- [1] Armijo, J. A. (1997). Absorción, distribución y eliminación de los fármacos. *Farmacología humana*. Masson, SA, Barcelona, 47-72.
- [2] Kazunori, K., Masayuki, Y., Teruo, O., & Yasuhisa, S. (1993). Block copolymer micelles as vehicles for drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 24(1-3), 119-132.
- [3] Yamashita, F., & Hashida, M. (2013). Pharmacokinetic considerations for targeted drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 65(1), 139-147.
- [4] Zhang, Y., Chan, H. F., & Leong, K. W. (2013). Advanced materials and processing for drug delivery: the past and the future. *Advanced drug delivery reviews*, 65(1), 104-120.
- [5] Osada, K., Christie, R. J., & Kataoka, K. (2009). Polymeric micelles from poly (ethylene glycol)–poly (amino acid) block copolymer for drug and gene delivery. *Journal of The Royal Society Interface*, 6(Suppl 3), S325-S339.
- [6] Pridgen, E. M., Langer, R., & Farokhzad, O. C. (2007). Biodegradable, polymeric nanoparticle delivery systems for cancer therapy.
- [7] Lavan, D. A., McGuire, T., & Langer, R. (2003). Small-scale systems for in vivo drug delivery. *Nature biotechnology*, 21(10), 1184.
- [8] van Hoogevest, P., & Wendel, A. (2014). The use of natural and synthetic phospholipids as pharmaceutical excipients. *European journal of lipid science and technology*, 116(9), 1088-1107.
- [9] Allen, T. M., & Cullis, P. R. (2013). Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Advanced drug delivery reviews*, 65(1), 36-48.
- [10] Deamer, D. W. (2010). From “Banghasomes” to liposomes: A memoir of Alec Bangham, 1921–2010. *The FASEB Journal*, 24(5), 1308-1310.

- [11] Gregoriadis, G. (1973). Drug entrapment in liposomes. *FEBS letters*, 36(3), 292-296.
- [12] Bangham, A. D., Standish, M. M., & Watkins, J. C. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of molecular biology*, 13(1), 238-IN27.
- [13] Torchilin, V. P. (2005). Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature reviews Drug discovery*, 4(2), 145-160.
- [14] Malam, Y., Loizidou, M., & Seifalian, A. M. (2009). Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. *Trends in pharmacological sciences*, 30(11), 592-599
- [15] Maruyama, K., Yuda, T., Okamoto, A., Kojima, S., Suginaka, A., & Iwatsuru, M. (1992). Prolonged circulation time in vivo of large unilamellar liposomes composed of distearoyl phosphatidylcholine and cholesterol containing amphipathic poly (ethylene glycol). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1128(1), 44-49.
- [16] Hesketh, T. R., Payne, S. N., & Humphrey, J. H. (1972). Complement and phospholipase C lysis of lipid membranes. *Immunology*, 23(5), 705.
- [17] Simões, S., Moreira, J. N., Fonseca, C., Düzgüneş, N., & de Lima, M. C. P. (2004). On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times. *Advanced drug delivery reviews*, 56(7), 947-965.
- [18] Yavlovich, A., Singh, A., Blumenthal, R., & Puri, A. (2011). A novel class of photo-triggerable liposomes containing DPPC: DC 8, 9 PC as vehicles for delivery of doxorubicin to cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1808(1), 117-126.
- [19] Viroonchatapan, E., Sato, H., Ueno, M., Adachi, I., Tazawa, K., & Horikoshi, I. (1996). Magnetic targeting of thermosensitive magnetoliposomes to mouse livers in an in situ on-line perfusion system. *Life sciences*, 58(24), 2251-2261.
- [20] Yan, F., Li, X., Jin, Q., Jiang, C., Zhang, Z., Ling, T., ... & Zheng, H. (2011). Therapeutic ultrasonic microbubbles carrying paclitaxel and LyP-1 peptide: preparation, characterization and application to ultrasound-assisted chemotherapy in breast cancer cells. *Ultrasound in medicine & biology*, 37(5), 768-779.

-
- [21] Dijkmans, P. A., Juffermans, L. J. M., Musters, R. J. P., van Wamel, A., Ten Cate, F. J., van Gilst, W., ... & Kamp, O. (2004). Microbubbles and ultrasound: from diagnosis to therapy. *European Journal of Echocardiography*, 5(4), 245-246.
- [22] Newman, C. M. H., & Bettinger, T. (2007). Gene therapy progress and prospects: ultrasound for gene transfer. *Gene therapy*, 14(6), 465.
- [23] Tlaxca, J. L., Anderson, C. R., Klibanov, A. L., Lowrey, B., Hossack, J. A., Alexander, J. S., ... & Rychak, J. J. (2010). Analysis of in vitro transfection by sonoporation using cationic and neutral microbubbles. *Ultrasound in medicine & biology*, 36(11), 1907-1918.
- [24] Geers, B., Lentacker, I., Sanders, N. N., Demeester, J., Meairs, S., & De Smedt, S. C. (2011). Self-assembled liposome-loaded microbubbles: The missing link for safe and efficient ultrasound triggered drug-delivery. *Journal of controlled release*, 152(2), 249-256.
- [25] Filipeanu, C. M., Brailoiu, E., Petrescu, G., & Nelemans, S. A. (1998). Extracellular and intracellular arachidonic acid-induced contractions in rat aorta. *European journal of pharmacology*, 349(1), 67-73.
- [26] Tlaxca, J. L., Anderson, C. R., Klibanov, A. L., Lowrey, B., Hossack, J. A., Alexander, J. S., ... & Rychak, J. J. (2010). Analysis of in vitro transfection by sonoporation using cationic and neutral microbubbles. *Ultrasound in medicine & biology*, 36(11), 1907-1918.
- [27] Diamandis, E. P., & Christopoulos, T. K. (1991). The biotin-(strept) avidin system: principles and applications in biotechnology. *Clinical chemistry*, 37(5), 625-636.
- [28] Paskaloglu, K., Şener, G., & Ayançolu-Dülger, G. (2004). Melatonin treatment protects against diabetes-induced functional and biochemical changes in rat aorta and corpus cavernosum. *European journal of pharmacology*, 499(3), 345-354.
- [29] Kim, N. D., Kang, S. Y., & Schini, V. B. (1994). Ginsenosides evoke endothelium-dependent vascular relaxation in rat aorta. *General Pharmacology: The Vascular System*, 25(6), 1071-1077.
- [30] Ferrara, K., Pollard, R., & Borden, M. (2007). Ultrasound microbubble contrast agents: fundamentals and application to gene and drug delivery. *Annual review of biomedical engineering*, 9.

- [31] Seo, M., Gorelikov, I., Williams, R., & Matsuura, N. (2010). Microfluidic assembly of monodisperse, nanoparticle-incorporated perfluorocarbon microbubbles for medical imaging and therapy. *Langmuir*, 26(17), 13855-13860.
- [32] Kheirilomoom, A., Dayton, P. A., Lum, A. F., Little, E., Paoli, E. E., Zheng, H., & Ferrara, K. W. (2007). Acoustically-active microbubbles conjugated to liposomes: characterization of a proposed drug delivery vehicle. *Journal of Controlled Release*, 118(3), 275-284.
- [33] Betageri, G. V., & Parsons, D. L. (1992). Drug encapsulation and release from multilamellar and unilamellar liposomes. *International journal of pharmaceutics*, 81(2-3), 235-241.
- [34] Lajoinie, G., De Cock, I., Coussios, C. C., Lentacker, I., Le Gac, S., Stride, E., & Versluis, M. (2016). In vitro methods to study bubble-cell interactions: Fundamentals and therapeutic applications. *Biomicrofluidics*, 10(1), 011501.
- [35] Lapinski, M. M., Castro-Forero, A., Greiner, A. J., Ofoli, R. Y., & Blanchard, G. J. (2007). Comparison of liposomes formed by sonication and extrusion: rotational and translational diffusion of an embedded chromophore. *Langmuir*, 23(23), 11677-11683.

A

Apéndice 1

A.1. Código de programación

```
%programa para ajuste de curvas signmoideas
clear all;
close all;
clc;

RT=100;
h=1;
x=[-9,-8.5,-8,-7.5,-7,-6.5,-6,-5.5,-5];
y=[-1.669667788,4.657149165,19.79779211,46.07300456,69.79197054,
82.21548273,91.97139486,97.86178494,99.47865278];
e=[1.190901271,2.79034829,4.545307493,4.005081802,2.788590245,
2.011955194,1.323727656,0.478042707,0.222197363];
L=[1,3.1,10,31,100,310,1000,3100,10000]; %m

RL=@(KD,L) RT.*L./(L+KD);
x0=[100];
[xunc,~]=lsqcurvefit(RL,x0,L,y);
figure(1);
F1=@(L) RT.*L./(L+xunc);
semilogx(L,y,'ko');
hold on
errorbar(L,y,e,'kd')
semilogx(L,F1(L),'r')
xlabel('[ Fenilefrina ] nM','FontSize',20)
ylabel('Respuesta (%)','FontSize',20)

EC1=((80/(100-80))^(1/h))*xunc; % 50 para EC50 y 80 para EC80
```


B

Apéndice 2

B.1. Soluciones Empleadas

B.1.1. Krebs-Heinselt (10X)

Reactivo	Cantidad
Cloruro de Sodio (NaCl)	69.2 gr
Cloruro de Potasio (KCl)	3.54 gr
Fosfato de Potasio monobásico (KH ₂ PO ₄)	1.63 gr
Sulfato de Magnesio (MgSO ₄)	1.34 gr
Sulfato de Magnesio hepta hidratado (MgSO ₄ ·7H ₂ O) *	2.94 gr
Cloruro de Calcio (CaCl ₂)	2.80 gr
Cloruro de Calcio dihidratado (CaCl ₂ ·2H ₂ O)*	3.66 gr
Dextrosa (C ₆ H ₁₂ O ₆) ⊗	2.00 gr
Bicarbonato de Sodio (NaHCO ₃) ⊗	2.10 gr

Mezclar uno a uno los reactivos en aproximadamente 500 ml de agua ultrapura. Mezclar en agua por separado el CaCl₂, hasta disolverse por completo, verter poco a poco en la disolución anterior. Aforar a un litro, y proceder a filtrar la solución para llevarla a esterilizar. En caso de ser necesarios sustituir los reactivos marcados con * en caso de no contar con los reactivos no hidratados. Los reactivos marcados con ⊗ se emplearán sólo cuando se prepare solución 1X y se vaya a emplear inmediatamente.

B.1.2. Buffer HEPES 20mM pH 7.6

Reactivo	Cantidad
HEPES buffer 1M	10 mL
Agua ultra pura	490.0 mL
Disolver HEPES buffer y ajustar el pH con Hidroxido de sodio	gotas

B.2. Fármacos empleados

B.2.1. (R)-(-) Fenilefrina 0.1M

Reactivo	Cantidad	Compañía
(R)-(-) Fenilefrina	20.36 mg	Sigma Aldrich
HEPES (20nM pH 7.6)	1 mL	Sigma Aldrich

B.3. Fosfolípidos empleados

Reactivo	Número de catalogo	Compañía
DPPC	P0763	Sigma Aldrich
DSPC	P1138	Sigma Aldrich
PEG2000	880160	Avanti Polar Lipids
DSPE-PEG(2000) Biotin	880129	Avanti Polar Lipids