

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Unidad Monterrey

LIBERACIÓN CONTROLADA DE AGONISTAS VASCULARES HIDROFÍLICOS A  
PARTIR DE LIPOSOMAS CONJUGADOS A MICROBURBUJAS ACÚSTICAS:  
CARACTERIZACIÓN Y EFECTO EN EL TONO VASCULAR.

Tesis que presenta:

Carlos Antonio Franco Urquijo

Para obtener el Grado de Doctor en Ciencias en:

Ingeniería y Física Biomédicas

Director de tesis:

Dr. Bruno Alfonso Escalante Acosta

Monterrey, Nuevo León

Mayo 2022

Liberación controlada de agonistas vasculares hidrofílicos a partir de liposomas conjugados a microburbujas acústicas: Caracterización y efecto en el tono vascular.

© Carlos Franco, 2022.

Asesor: Dr. Bruno A. Escalante Acosta

Sinodal: Dr. Daniel P. Sánchez Herrera

Sinodal: Dr. Moisés Santillán Zerón

Sinodal: Dr. Jesús Santana Solano Sinodal:

Dra. Ana María Gámez Méndez Tesis de

Doctorado 2022

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV)

México, Nuevo León

Teléfono: +01 81 1156 1740

## Abstract

The vascular endothelium represents an important therapeutic target in pathologies such as: inflammation, thrombosis, hypertension, etc. Therefore, trying to focus and control the release of drugs directed to the endothelium, more advanced drug delivery systems have been developed, such as the combination of liposomes to microbubbles through chemical bonds, representing a good strategy to improve the delivery of both hydrophobic and hydrophilic drugs to the vascular endothelium.

Consequently, we hypothesize that the incorporation of hydrophilic drugs in a microbubble-liposome system could protect these drugs from the body and generate an instantaneous vascular biological response induced by controlled and focused release through the application of an external stimulus (ultrasound), producing an immediate vascular response after the release of the encapsulated drug. The objective of this work was to develop, characterize and demonstrate that a carrier combined by microbubble and liposomes allows to release a vascular agonist (hydrophilic character) in a controlled manner by simultaneously exposing the tissue and the microbubble-liposome system to ultrasound pulses both in an ex vivo and in vivo model.

Unilamellar liposomes containing phenylephrine or acetylcholine (O.1M) coupled to mi-

crobubbles with a perfluoropropane core were prepared. The microbubble-liposome system was obtained by a biotin-avidin bridge. The size distribution, the polydispersity index and the biotin-avidin bond were analyzed and quantified using image processing acquired by a confocal microscope. The release of the drug from the complex was verified by demonstrating the vasocontractile and vasodilator effect of phenylephrine and acetylcholine respectively, being observed immediately after the application of the external stimulus.

Regarding the development of the model of thrombosis induced by *FeCl3* after the application of the compound topically in the femoral artery, we were able to observe that it's dependent on both platelets and coagulation proteins, causing endothelial dysfunction and occlusive thrombosis. Finally, after 24 hours after the generation of the thrombus we confirmed that the flow was minimal, however, after the administration of the microbubbles together with the ultrasound pulses we observed a recovery of blood flow, obtaining a recovery of the flow rate around 78.83 %.

We achieved a controlled release of microbubbles with a slight effect on flow recovery. Demonstrating that the microbubble-liposome release system in combination with ultrasound pulses generates a controlled and focused release of a vascular agonist (hydrophilic character), promoting local and immediate changes in vascular tone and in the variation of the speed of aortic and femoral blood flow.

## Resumen

El endotelio vascular representa un objetivo terapéutico importante en patologías como: inflamación, trombosis, hipertensión, etc. Por lo que, tratando de focalizar y controlar la liberación de fármacos dirigidos al endotelio, se han desarrollado sistemas de suministros de fármacos más avanzados, tales como la combinación de liposomas a microburbujas a través de enlaces químicos, representando una buena estrategia para mejorar el suministro de fármacos tanto hidrofóbicos como hidrofílicos al endotelio vascular. Consecuentemente, nosotros planteamos la hipótesis de que la incorporación de fármacos hidrofílicos en un sistema microburbuja-liposoma podría proteger dichos fármacos del organismo y generar una respuesta biológica vascular instantánea inducida por la liberación controlada y focalizada mediante la aplicación de un estímulo externo (ultrasonido) produciendo una respuesta vascular inmediata tras la liberación del fármaco encapsulado. El objetivo de este trabajo fue el desarrollar, caracterizar y demostrar que un acarreador combinado por microburbuja y liposomas permita liberar un agonista vascular de carácter hidrofílico de manera controlada al exponer simultáneamente el tejido y el sistema microburbuja-liposoma a pulsos de ultrasonido tanto en un modelo *ex vivo* como *in vivo*.

Se prepararon liposomas unilaminares conteniendo fenilefrina o acetilcolina acoplado a microburbujas con un núcleo de perfluoropropano. El sistema 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. La liberación del fármaco del complejo se comprobó mediante la demostración del efecto vasocontractil y vasodilatador de fenilefrina y acetilcolina respectivamente, logrando ser observado inmediatamente tras la aplicación del estímulo externo.

En cuanto al desarrollo del modelo de trombosis inducida por *FeCl3* tras la aplicación del compuesto de manera tópica en la arteria femoral, logramos observar que es dependiente tanto de plaquetas como de proteínas de coagulación, causando disfunción endotelial y trombosis oclusiva. Por último, tras 24 horas después de la generación del trombo confirmamos que el flujo fue mínimo, sin embargo, tras la administración de las microburbujas conjuntamente con los pulsos de ultrasonidos observamos una recuperación del flujo sanguíneo, obteniendo una recuperación de la velocidad de flujo del

78.83 %. Logrando una liberación controlada de las microburbujas con un efecto ligero en la recuperación del flujo. Demostrando que el sistema de liberación microburbuja-liposoma en combinación con pulsos de ultrasonido nos genera una liberación controlada y focalizada de un agonista vascular, promoviendo cambios locales e inmediatos en el tono vascular y en la variación de la velocidad del flujo sanguíneo aórtico y femoral.

## **Agradecimientos**

Agradezco a mi padre Carlos Franco por su comprensión, apoyo incondicional y confianza en todos los momentos de mi vida.

A mi familia, por siempre estar presente en mi vida.

Al Dr. Ángel Navarro mi mentor y mi amigo, por su apoyo y dirección en el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Bruno Escalante & QF.B Amelía Ríos por su apoyo y por compartir su experiencia.

A mis sinodales el Dr. Daniel Sánchez, Dr. Moisés Santillán, Dr. Jesús Santana y a la Dra. Ana Gámez por ayudarme a enriquecer este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) y al Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV) Unidad Monterrey, por el apoyo brindado durante mi formación académica.

Al amor de mi vida, Beatriz Ávila, por ser la persona que me hace feliz, por el apoyo incuestionable demostrandome constantemente su cariño, bondad y amor incondicional. Y finalmente a mi gatita Isabel por acompañarme en las noches de desvelo y seguir enseñandome a disfrutar la vida.

Carlos Franco, México, 05 2022

## Índice General.

1. Introducción.....	12
2. Marco Teórico.....	20
1. Principios físicos del ultrasonido.....	20
2. Ultrasonido Doppler.....	25
3. Microburbujas y su interacción con el tejido.....	26
3. Justificación.....	32
4. HIPOTESIS.....	33
5. OBJETIVOS.....	34
1. Objetivo General.....	34
1. Objetivos Particulares.....	34
6. MÉTODOS.....	35
1. Reactivos.....	35
2. Preparacion del sistema microburbuja-liposoma.....	35
1. Preparación de liposomas biotinilados unilaminares cargados con fenilefrina o Acetilcolina.....	35
2. Preparación de microburbujas recubiertas de avidina.....	36
3. Conjugación de liposomas biotinilados unilaminares con microbur bujas-avidina ..	37
4. Caracterización del sistema microburbuja-liposoma.....	37
5. Parámetros de exposición a ultrasonido.....	38
3. Experimentos ex vivo.....	38
1. Preparación de anillos aórticos de rata.....	38
2. Análisis de funcionalidad de anillos aórticos.....	40
3. Grupo Experimental 1: Comparación del efecto vascular en el sistema Microburbuja-liposoma sin colesterol y con colesterol.....	40
4. Grupo Experimental 2: Efectos del tono vascular indu- cidos por la liberación desencadenada por pulsos de ultrasonido de microburbujas-liposomas cargadas con fenilefrina y acetilcolina.....	41
5. Grupo Experimental 3: Cuantificación de la dosis de fenilefrina/ acetilcolina en el sistema microburbuja- liposoma.....	41
4. Experimentos in vivo.....	42
1. Medición de velocidad de flujo en la aorta descendente.....	43
2. Instrumentación y procesado de la señal.....	43
5. Experimentos in vivo de las microburbuja-liposoma.....	44

1.	Parámetros del ultrasonido para la exposición.....	44
6.	Protocolo experimental de liberación controlada de fenilefrina encapsulada en el sistema microburbuja-liposoma.....	45
7.	Liberación controlada mediante pulsos de ultrasonido en un modelo de trombosis.....	46
1.	Medición de la velocidad de flujo sanguíneo en la femoral.....	46
8.	Desarrollo y caracterización del modelo de trombosis en la femoral mediante la aplicación de cloruro férrico.....	46
1.	Parámetros de ultrasonido en el modelo de trombosis.....	47
2.	Protocolo experimental de liberación controlada en el modelo de trombosis.....	47
9.	Análisis estadístico de los resultados.....	48
7.	Resultados.....	45
1.	Caracterización del sistema microburbuja-liposoma.....	45
2.	Efecto de la liberación ex vivo de fenilefrina encapsulada en el sistema microburbuja-liposoma en la respuesta contráctil.....	49
1.	Estabilidad del encapsulamiento de fenilefrina en el sistema.....	49
2.	Cambios inducidos en la contracción vascular por la liberación controlada de fenilefrina encapsulada en el sistema microburbuja-liposoma.....	49
3.	Efecto de la liberación ex vivo de acetilcolina encapsulada en el sistema microburbuja-liposoma.....	51
1.	Estabilidad del encapsulamiento de acetilcolina en el sistema.....	51
2.	Cambios inducidos en la relajación vascular por la liberación controlada de acetilcolina encapsulada en el sistema microburbuja-liposoma.....	52
4.	Cuantificación de la dosis de fenilefrina y acetilcolina liberada por el sistema microburbuja-liposoma.....	54
5.	Liberación controlada de fenilefrina encapsulada en el sistema microburbuja-liposoma en un modelo in vivo.....	55
1.	Condición basal de la velocidad de flujo sanguíneo en la aorta descendente...	55
2.	Efecto de la administración de fenilefrina en la velocidad de flujo sanguíneo aórtico.....	65
3.	Efecto de la liberación controlada de fenilefrina encapsulada en el sistema microburbuja-liposoma en la velocidad de flujo sanguíneo aórtico.....	66
4.	Comparación de la liberación controlada de fenilefrina en el sistema microburbuja-liposoma vs no encapsulada.....	68
6.	Respuesta de liberación controlada en un modelo de trombosis femoral. ...	70
1.	Medición de la velocidad de flujo sanguíneo en la femoral.....	70

1.	Caracterización histológica del trombo mediante tinción hematoxilina-eosina.....	73
2.	Cuantificación del tamaño del trombo en la arteria femoral.....	74
3.	Estimación de los parámetros del ultrasonido en el modelo de trombosis.....	76
8.	Discusión.....	78
9.	Conclusión .....	79
10.	Perspectivas .....	87
11.	Bibliografía .....	88

## Índice de figuras

Figura 2.1: Atenuación de onda y sus fenomenos físicos.....	24
Figura 2.2: Efecto doppler.....	25
Figura 2.3: Representación de las fases de compresion y expansion de la microburbuja en presencia de un campo acústico.....	27
Figura 6.1: Sistema de órgano aislado.....	35
Figura 6.2: Trazo representativo de espectrograma de frecuencias.....	40
Figura 6.3: Representación de la adquisición de la señal de la velocidad de flujo en la femoral en el modelo de trombosis.....	49
Figura 7.1: Imágenes confocales de microburbujas funcionalizadas con avidina.....	47
Figura 7.2: Imágenes confocales del sistema microburbuja-liposoma.....	47
Figura 7.3: Distribución de tamaños del sistema microburbuja-liposoma.....	48
Figura 7.4: Estabilidad del encapsulamiento de fenilefrina en el sistema microburbuja-liposoma y su efecto en la respuesta contráctil ex vivo.....	50
Figura 7.5: Contracción vascular inducida por la liberación controlada de fenilefrina encapsulada en el sistema microburbuja-liposoma.....	51
Figura 7.6: Estabilidad del encapsulamiento de acetilcolina en el sistema microburbuja-liposoma y su efecto en la respuesta de relajación ex vivo.....	53
Figura 7.7: Relajación vascular inducida por la liberación controlada de acetilcolina encapsulada en el sistema microburbuja-liposoma en anillos precontractados por fenilefrina (1 $\mu$ M).....	53
Figura 7.8: Dosis respuesta de los agonistas vasculares en el sistema microburbuja-liposoma cargados.....	54
Figura 7.9: Comparación de curvas dosis-respuesta del sistema microburbuja-liposoma cargados vs la adición directa de fenilefrina/ acetilcolina.....	55
Figura 7.10: Trazos representativos de la adquisición de las señales del equipo Doppler.....	56
Figura 7.11: Velocidad de flujo sanguíneo aórtico en condiciones basales.....	56
Figura 7.12: Cambios en la velocidad de flujo sanguíneo aórtico inducidos por la administración de 20 $\mu$ g/Kg de fenilefrina libre.....	66
Figura 7.13: Cambios en la velocidad de flujo sanguíneo aórtico inducidos por la exposición de la región aórtica al ultrasonido.....	67
Figura 7.14: Cambios en la velocidad de flujo sanguíneo aórtico inducidos por la administración del sistema microburbuja-liposoma sin fenilefrina encapsulada y a su posterior exposición al ultrasonido.....	68
Figura 7.15: Cambios en la velocidad de flujo sanguíneo aórtico inducidos por la liberación controlada de fenilefrina encapsulada en el sistema microburbuja-liposoma.....	69
Figura 7.16: Gráfica comparativa de las velocidades de flujo el instante inmediato (30 seg tras la aplicación del estímulo.....	70
Figura 7.17: Trazos representativos de la adquisición de las señales del equipo Doppler en la femoral.....	71
Figura 7.18: Variaciones en la velocidad de flujo sanguíneo en condiciones sham y trombo a 20 % v/w.....	72
Figura 7.19: Variaciones en la velocidad de flujo sanguíneo en condiciones sham y trombo a 50 % v/w.....	73
Figura 7.20: Cortes histológicos de la arteria femoral con tinción de Hematoxilina& Eosina.....	74
Figura 7.21: Detección del area de los cortes histologicos de la arteria femoral con tinción Hematoxilina & Eosina.....	75
Figura 7.22: Daño causado por el alto tiempo de exposición al ultrasonido.....	75
Figura 7.23: Variaciones en la velocidad de flujo sanguíneo en la arteria femoral con trombosis antes y después de la aplicación de los pulsos de ultrasonido.....	76
Figura 7.24: Trazos representativos de la adquisición de las señales del equipo Doppler en la trombosis y posterior al tratamiento de microburbujas + ultrasonido.....	77

# 1. Introducción

En las últimas décadas se ha ido mejorando la farmacocinética y eficacia de los fármacos, así como la reducción de la toxicidad de dichas sustancias, esto se ha ido logrando con el desarrollado de sistemas de liberación los cuales están basados en compuestos tales como nanomateriales [1], polímeros [2] o fosfolípidos [3], logrando que la liberación del fármaco encapsulado sea promovido por la ruptura del vehículo/ acarreador esto se debe a que el fármaco se encuentra inactivo al estar encapsulado en el acarreador y al ser liberado de este pasa a estar activo y ejercer su función en el organismo, lo que significa que el medicamento debe estar fuera de su rango terapéutico, con esa inactividad es posible reducir las acciones dañinas y los efectos secundarios no deseados en el organismo, aunado a esto, la liberación controlada de dichos sistemas ha sido posible mediante un estímulo local o externo. Por liberación local tenemos: difusión pasiva, orientación mediada por ligando [4], enzimas como la fosfolipasa C [5] y cambios de pH [6] y para estímulo externo la activación ha sido posible por luz [7] calor [8] y ultrasonido [9].

Con estas nuevas formas de liberar fármacos se han logrado nuevos objetivos terapéuticos, mejorando la farmacocinética de las drogas, la biodistribución, la especificidad de las drogas en las células o tejidos, la cinética de la exposición a las drogas, por ende se ve incrementado la tolerabilidad y la generación de nuevos sitios blancos para los nuevos sistemas de liberación [10,11] como el corazón [12], cerebro [13,14] barrera encefalografica [15] entre otros sitios que debido a la complejidad anatómica y fisiológica es complicado llevar fármacos a dichos órganos blanco de manera focalizada y regulada. Uno de los acarreadores más empleados en la actualidad son los liposomas, los cuales han sufrido numerosas modificaciones tales como: la alteración de la carga agregando nanopartículas [16], así como su superficie a través de la incorporación de un carbohidrato (polietilenglicol [PEG]) y de colesterol dando como resultado mayor estabilidad y un incremento en la vida media en el torrente sanguíneo [17]. Se demostrado que son portadores eficientes para medicamentos hidrófilos y/ o hidrófobicos, protegiendo el fármaco de la eliminación y desactivación, permitiendo que los medicamentos lleguen al sitio objetivo [18]. Algunos ejemplos de los liposomas como vehículos son: liberación de moléculas en las células endoteliales [19], liposomas cargados de óxido nítrico que producen una mejor respuesta antiinflamatoria en las células endoteliales en comparación con el uso de los mismos medicamentos sin usar liposomas como vehículos de transporte [20]. Sin embargo,

debido a ciertas características de los liposomas tales como: la distribución pasiva que conduce a interacciones celulares no específicas y, por lo tanto, genera la aparición de efectos adversos no deseados. Por lo que se debe reducir dicha eliminación inespecífica de los liposomas para aumentar la captación intracelular local y reducir los efectos secundarios sistémicos [21]. Por lo tanto, para garantizar el éxito de los liposomas como un sistema de administración de fármacos dirigidos al endotelio, es necesario aumentar la captación intracelular local y reducir los efectos secundarios sistémicos mediante la adición de un mecanismo de liberación controlada [22].

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 mejorar la visualización en los 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, que son microesferas (1-10  $\mu\text{m}$ ) de núcleo gaseoso estabilizadas por una monocapa de lípidos, polímeros o proteínas [23]. Con el paso de los años algunos autores notaron que la microburbuja puede usarse como un sistema de administración de fármacos con una liberación controlada debido al núcleo gaseoso, que en presencia de ondas de ultrasonido presentan un fenómeno de oscilaciones conocido como cavitación [24].

En general la cavitación puede ser de 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, micro-jets y generación de radicales libres [25,26]. Esta destrucción de la microburbuja ayuda a mejorar el contraste de las imágenes obtenidas por ultrasonido y para cuando se usa como sistema de liberación controlada, libera el fármaco de las microburbujas [27]. El ultrasonido se divide en dos categorías principales: ultrasonido de baja frecuencia (LFUS), su rango va de 20 a 100 kHz, y ultrasonido de alta frecuencia (HFUS), cuyo rango oscila entre 1 y 10 MHz siendo este último (HFUS) el empleado para generar la destrucción de las microburbujas, mientras que el LFUS se emplea para

que las microburbujas funcionen como medio de contraste [28]. Hoy en día, las microburbujas están compuestas con un alto gas hidrófobo y estabilizadas por una cubierta de fosfolípidos, esto evita la difusión de gases y prolonga el tiempo de circulación en la sangre.

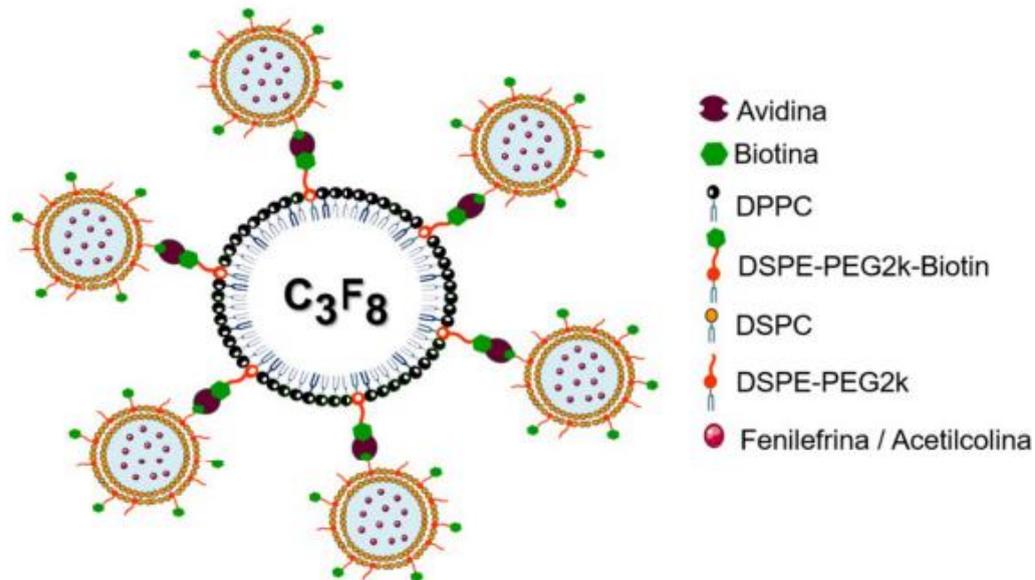
Cuando las microburbujas son destruidas mediante ultrasonido y se encuentran cerca de una célula, se producen efectos biológicos tal y como los micro-jets, ondas de shock que generan poros transitorios en la membrana celular y dan como resultado un fenómeno conocido como sonoporación [29] logrando permitir la entrada de fármacos a la célula de manera controlada en tejidos específicos [30].

Para las enfermedades cardiovasculares, el endotelio vascular representa un objetivo terapéutico importante en patologías como: inflamación, trombosis, hipertensión, etc., que representan un buen ejemplo donde el endotelio puede ser el objetivo celular inicial para resolver la patología. Por lo tanto, para aumentar la eficacia terapéutica es importante controlar el objetivo endotelial específico y reducir la dosis administrada. En estudios recientes se informó una configuración experimental fisiológica que permitió el mantenimiento de los vasos y la evaluación selectiva de la función de los vasos sanguíneos, antes y después de la exposición al ultrasonido. Los resultados sugirieron que ni la respuesta del tono vascular ni el daño tisular se pueden asociar a la exposición de microburbujas al ultrasonido [31,32].

Otros trabajos, aseguran que, para mantener la respuesta del tono vascular, la función de las células endoteliales y la integridad de los tejidos es necesario controlar los parámetros de ultrasonido y microburbujas a los que están expuestos los vasos sanguíneos [30]. Aunque, estos estudios han apoyado la caracterización de la interacción de las microburbujas y el ultrasonido en los vasos sanguíneos, han planteado la cuestión de si la destrucción de las microburbujas cargadas con fármacos puede administrarse al tejido vascular y provocar un efecto biológico predecible tanto ex vivo como in vivo. Sin embargo, el uso de microburbujas llenas de gas como vehículo farmacológico se limita a fármacos hidrofóbicos que limitan su uso en las células endoteliales. Por lo que en la última década, tratando de focalizar y controlar la liberación de fármacos se desarrolló un sistema de suministro de fármacos más avanzado, desarrollando y caracterizando un nuevo portador basado en la unión de los liposomas a las microburbujas a través de enlaces químicos (sulfúricos o biotina-avidina) [33,34], el más simple es a través del

enlace biotina-avidina [35], este enlace tiene una afinidad muy alta (106 veces más fuerte que la del ligando-receptor) [36] permitiendo una unión rápida y eficiente de los liposomas a microburbujas, esto se puede lograr porque ambos portadores tienen una parte biotinilada que hace posible dicho enlace.

Este nuevo sistema de transporte de fármacos potencia los aspectos positivos de cada uno de los portadores (liposomas y microburbujas) y disminuye los problemas que presenta cada uno de ellos. El sistema de microburbuja-liposoma nos brinda las siguientes ventajas: 1.- mayor capacidad del fármaco hidrofóbico, ya que el fármaco puede encapsularse tanto en liposomas como en microburbujas 2.- captura de fármacos hidrofílicos, esto es posible porque el fármaco hidrofílico puede encapsularse en el núcleo de los liposomas, 3.- liberación controlada y focalizada ya que a través del fenómeno de cavitación que es inducido por el núcleo gaseoso que presenta una impedancia acústica en la microburbuja hace que las microburbujas sean altamente ecogénicas permitiendo ser manipuladas por una fuerza de radiación acústica [37-42], destruyendo las microburbujas y favoreciendo así la liberación del fármaco encapsulado en el vehículo por HFUS [43-45]. Por lo tanto, el uso de microburbujas junto con liposomas cargados de fármacos puede representar una buena estrategia para mejorar el suministro de fármacos tanto hidrofóbicos como hidrofílicos al endotelio vascular. Esta hipótesis está respaldada por varios estudios que informan que el sistema microburbuja-liposoma lideran la liberación, aumentan la difusión, aumentan y potencian el efecto de diferentes fármacos hidrofóbicos contra el cáncer en las células del sitio objetivo [41,45,46].



**Figura 1.1: Sistema microburbuja-liposoma.** Ambos acarreadores están compuestos por fosfolípidos, las micro burbujas contienen un núcleo gaseoso (perflouropropano) mientras que los liposomas contienen un núcleo acuoso y ambos acarreadores están unidos mediante un enlace de biotina-avidina-biotina. El agonista vascular (fenilefrina/ acetilcolina) está encapsulado en el interior de los liposomas.

Como es el caso de Geers et al [41] que evalúan los efectos biológicos del sistema de micro- burbujas y liposomas expuestos al ultrasonido, y reportaron que al exponer el sistema de microburbujas-liposomas (con el fármaco encapsulado en los liposomas) a pulsos de ultrasonido, el efecto del fármaco aumentó, aumentando la mortalidad celular [47], de la misma manera ha logrado demostrar una mejora en el transporte de fármacos en la barrera encefalográfica, que para ciertos casos (tumores) que se requiere que el fármaco llegue al cerebro en una alta concentración de manera focalizada [48-50].

Sin embargo, varios estudios muestran que también hay efectos secundarios dañinos al usar el sistema de microburbuja-liposomas por ejemplo: daño celular, muerte en cultivos celulares y hemorragias internas [51,52] con toda esta información sabemos que los principales factores que generan estos daños son: las altas concentraciones de las microburbujas, los efectos secundarios causados por la exposición del ultrasonido vinculado a la cavitación y el uso inapropiado de los parámetros del ultrasonido [53]. Cabe mencionar

que el uso del sistema microburbuja-liposoma para administrar moléculas terapéuticas hidrofílicas de forma controlada al endotelio aún no está probado.

Con toda esta información, la activación remota puede permitir la liberación del fármaco con dosis repetidas, reproducibles y bajo demanda, reduciendo potencialmente la toxicidad sistémica y aumentando la eficacia. Cuando sea deseable, estos métodos también pueden proporcionar una liberación de fármacos altamente localizada. Es probable que esta convergencia desempeñe un papel importante en la tendencia actual a desarrollar sistemas que puedan proporcionar más de una modalidad terapéutica.

Por otro lado, hay muchas moléculas hidrofílicas utilizadas en el tratamiento de diferentes condiciones patológicas en las que se desea la liberación específica y controlada tal es el caso de enfermedades cardíacas, trombosis e hipertensión representando un buen ejemplo donde el endotelio puede ser el objetivo celular inicial para resolver la patología reduciendo la dosis administrada y mejorando la eficiencia del fármaco [54]. Para reducir la alta concentración del fármaco en el cuerpo y una mejor biodistribución. Como se mencionó anteriormente el uso de las microburbujas no permite la encapsulación de sustancias hidrofílicas por lo que se requiere implementar el sistema microburbuja-liposoma para evaluar si es posible controlar la liberación de fármacos hidrofílicos con un efecto biológico predecible del mismo modo que se ha demostrado para las sustancias hidrofóbicas.

Por último, las microburbujas cargadas con fármacos solo se han demostrado *in vitro* y existen pocos estudios *in vivo* [55,56], para la mayoría de los estudios *in vivo* sobre el suministro dirigido por ultrasonido, las microburbujas fueron co-inyectadas con la sustancia 'activa' (por ejemplo, fluorescentes) colorantes, nanopartículas o fármacos quimioterapéuticos hidrofóbicos [57,59], por lo que no se ha demostrado un efecto biológico inmediato tras la liberación del fármaco activo, así como también los pocos estudios *in vivo* de microburbujas se centran en encapsular quimioterapéuticos y fármacos modelo hidrofílicos [60-62] y no fármacos capaces de producir un efecto biológico en el tejido. En el presente estudio, planteamos la hipótesis de que el sistema microburbuja-liposoma se pueden usar como un vehículo agonista del endotelio vascular hidrofílico para provocar una vasoconstricción o respuesta de vasodilatación predecible. Para probar esta hipótesis, proponemos demostrar que la vasoconstricción o la vasodilatación pueden modularse en el anillo aórtico mediante el uso de microburbuja-liposoma como un sis-

tema de liberación controlada mediado por pulsos de ultrasonido. Para lograr nuestro objetivo, diseñamos liposomas cargados con agonistas vasculares (fenilefrina y/o acetilcolina) acoplados a microburbujas e inducimos su liberación por pulsos de ultrasonido para evaluar en tiempo real los efectos del tono vascular en una cámara de órganos de anillos aórticos aislados y finalmente decidimos observar si el efecto vasoconstrictor se podía generar y visualizar de manera inmediata tras la liberación del agonista encapsulado en un modelo in vivo.

## 2. Marco Teórico

### 1. *Principios físicos del ultrasonido.*

Para una mejor comprensión del concepto de ultrasonido debemos definir primero el sonido: es una variación de presión o vibración que se desplaza en el ambiente, esta variación de presión usualmente genera una onda mecánica, y que estas vibraciones generan efectos físicos y químicos [63].

Generalmente en el ultrasonido la vibración sonora es generada por un transductor piezoeléctrico Langevin el cual consiste de dos elementos cerámicos que cambian su tamaño de manera precisa y reproducible en respuesta a un campo eléctrico. Por lo tanto, si se aplica un campo eléctrico alterno, los elementos cerámicos se mueven hacia arriba y hacia abajo de manera altamente reproducible [64].

Cuando la energía acústica interactúa con la materia, las moléculas del mismo se alteran levemente y la energía se transmite de una molécula a otra adyacente. La energía acústica se mueve a través del tejido mediante ondas longitudinales y las moléculas del medio de transmisión oscilan en la misma dirección que la onda y de acuerdo con la densidad del tejido y del transductor que se use, las ondas se devolverán, dispersarán o seguirán su recorrido hacia el "infinito" el cual está determinada por la impedancia acústica  $Z$ , definida como el producto de la densidad del medio por la velocidad del sonido en el mismo medio. La distancia de una compresión (distancia entre picos de la onda sinusoidal) constituye la longitud de onda ( $\lambda$ ) y se obtiene de dividir la velocidad de propagación entre la frecuencia. El número de veces que se comprime una molécula es la frecuencia ( $f$ ) y se expresa en ciclos por segundo o hertzios. Estas ondas sonoras corresponden básicamente a la rarefacción y compresión periódica del medio en el cual se desplazan. Por lo que la imagen que se forma en la pantalla está compuesta de muchos puntos blancos de distinta intensidad. Las longitudes de onda más cortas dan como

resultado imágenes de mayor resolución pero menos penetración. Por lo tanto, en las imágenes médicas se utilizan sondas de mayor frecuencia para estructuras superficiales, (por ejemplo, visualización de vasos periféricos) y sondas de menor frecuencia para obtener imágenes de estructuras más profundas (por ejemplo, el abdomen y órganos pélvicos) [65,66].

Un transductor típicamente produce una onda de sonido sinusoidal en el medio en que recorre. Si luego se refleja sobre sí mismo, puede formarse un patrón de onda estacionaria. En este caso, el sonido ya no parece viajar a través del medio, pero en cambio parece detenerse, con cada punto ahora tiene una amplitud constante, o presión acústica. En el nodo, la amplitud de la onda sonora es cero, pero las fuerzas acústicas son mayores, porque el cambio en la presión se está produciendo más rápidamente. Por el contrario, en el antinodo la amplitud es mayor, pero la presión acústica es cero [64].

Se conoce como "ultrasonido de potencia" a las frecuencias entre 20 y 40 kHz ya que estas frecuencias están justo por encima de la frecuencia de audición humana (20Hz a 20kHz) dichas ondas de sonido generadas son relativamente potentes y pueden generar campos de cizallamiento significativos dentro del fluido circundante. Por otra parte, la frecuencia más alta (>1 MHz) son altamente empleadas en la obtención de imágenes. [67]. La potencia acústica está relacionada con la potencia suministrada por el campo eléctrico el cual determina la amplitud de la vibración ( $A$ ). Esta vibración generalmente es de 25 mm o menos (pico a pico) en la superficie del transductor. Por lo que el transductor distribuye esta vibración sobre un área relativamente amplia, por lo que la intensidad energética del campo acústico ( $I$ , W/cm<sup>2</sup>) es baja. La intensidad cae aún más debido a la distancia que recorre la onda en el medio a propagarse, debido a la absorción de las ondas sonoras por el fluido dependiendo de la densidad y viscosidad del fluido [68].

La clave para comprender los instrumentos de imagen de contraste recae en la interacción única entre un agente de contraste (micro burbujas) y el proceso de visualización que generan. A diferencia del tejido, las microburbujas dispersan el ultrasonido de diferentes maneras según la amplitud del sonido a los que están siendo expuestos. El resultado son 3 regímenes amplios de comportamiento de dispersión, que depende de la presión máxima del sonido incidente producido por el transductor. A baja presiones incidentes (correspondientes a la baja potencia de transmisión del transductor), las burbujas producen una mejora lineal de la retrodispersión, resultando en un aumento del eco de la sangre.

Conforme se incrementa la presión generada por el transductor, la presión incidente sobre una burbuja va más allá de 50 a 100 kPa, todavía muy por debajo del nivel utilizado en la mayoría de las exploraciones sin contraste, en esta etapa se empieza a manifestar fenómenos de retrodispersión del agente de contraste que muestran características no lineales, como la emisión de armónicos y es esto, lo que forma la base de la visualización en los modos de imagen mediados por agentes de contrastes. Finalmente, la presión máxima incidente se acerca a 500 kPa (o 1 MPa), cerca del nivel normal emitido por un sistema de imágenes de ultrasonido, la mayoría de los agentes se rompen, liberando su contenido gaseoso en el entorno inmediatamente, esto desencadena un retraso, el cual es el método más sensible para detectar la perfusión. Cabe señalar que, en la práctica, debido a los diferentes tamaños presente en una población de las microburbujas, las fronteras entre estos comportamientos no son claras [69].

La amplitud de onda se expresa típicamente en términos de presión,  $p$ , aunque se puede representar de manera equivalente en términos de desplazamiento de partículas, velocidad o aceleración. La ecuación que describe una onda plana idealizada que se propaga linealmente en el espacio,  $x$ , y el tiempo,  $t$ , puede escribirse así como:

$$EC2.1 : P(x, t) = PA * e^{-\alpha x} \sin(2\pi(ft - x/\lambda))$$

donde  $PA$  es la amplitud de la presión de onda,  $e^{-\alpha x}$ , describe la atenuación de la onda a medida que se propaga debido a la viscosidad de absorción y dispersión. Estos efectos se caracterizan por el coeficiente de atenuación.

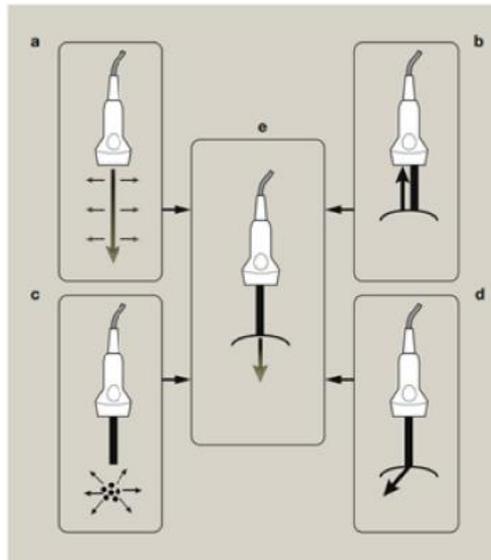
Por otra parte sabemos, que la cantidad de energía reflejada en una interfaz entre tejidos depende de la diferencia en la impedancia acústica de esos tejidos. La impedancia acústica ( $Z$ ) de un tejido es el producto de la densidad y la velocidad a la que el sonido viaja a través de ella. El aire tiene una densidad mucho menor que el agua o los tejidos blandos, que a su vez tienen una densidad mucho menor que la ósea. Cuanto mayor sea la diferencia en impedancia acústica entre dos materiales en una interfaz, cuanto más brillante será la imagen resultante [70-72].

A medida que una onda sonora pasa a través del material, pierde gradualmente su energía esto es conocido como atenuación, las causas son reflexión, refracción, dispersión y absorción. Las primeras dos ocurren en las interfaces entre los tejidos.

- La reflexión, es responsable de la producción de los ecos requeridos. La refracción de las ondas sonoras es similar a la reflexión óptica, el cual consta de que parte de la energía de la onda es enviada de vuelta al medio del que proviene. En una reflexión verdadera, el ángulo de reflexión  $\theta_r$  debe ser igual al ángulo de incidencia  $\theta_i$ . La fuerza de la reflexión de una interfaz es variable y depende de la diferencia de impedancias entre dos medios afines y el ángulo incidente en el límite. Si las impedancias de los medios son iguales, no hay reflexión (sin eco) [73].
- La refracción causa una transmisión de onda desviada con respecto a la dirección original debido a que dicha onda pasa a través de una interfaz entre tejidos. Cuando el ultrasonido encuentra límites entre diferentes medios, parte del ultrasonido se refleja y la otra parte se transmite. Las direcciones reflejadas y transmitidas están dadas por el ángulo de reflexión  $\theta_r$  y el ángulo de transmisión  $\theta_t$ , respectivamente [73].

La dispersión describe la difusión de la onda en todas las direcciones que ocurre cuando una onda se encuentra con una estructura mucho más pequeño que su longitud de onda. La mayor parte de la atenuación, sin embargo, se produce debido a la absorción, causada por que la energía de la onda sonora se convierte en fricción entre partículas del tejido oscilantes y se pierde en forma de calor [74].

Para compensar esta pérdida de energía (atenuación de la onda del ultrasonido), el equipo de ultrasonido utiliza un proceso llamado ganancia de tiempo compensación (TGC). La ganancia es la relación entre la potencia eléctrica de salida y entrada; que esta directamente relacionada con la modificación de la intensidad del brillo en la imagen. La ganancia generalmente se mide en decibelios (dB). El aumento de la ganancia amplifica no solo las señales de retorno, sino también el ruido de fondo dentro del sistema de la misma manera. TGC es una amplificación dependiente del tiempo [70]. Al igual que las vibraciones en otras estructuras, estas oscilaciones radiales tienen una frecuencia natural de oscilación en la que absorberán y dispersarán el ultrasonido con una eficiencia alta. Si las microburbujas resuenan a presiones acústicas suficientemente altas, las oscilatorias de las compresiones y expansiones de las microburbujas no son iguales [75].



**Figura 2.1: Atenuación de onda y sus fenómenos físicos.** a) Absorción; b) reflexión; c) dispersión; y d) refracción todos contribuyen a la atenuación general de la onda de ultrasonido observada en el apartado e) (3).

por lo que tal movimiento no lineal emitido por la microburbuja y detectado por el transductor contiene armónicos (definiendo armónicos como señales cuya frecuencia es un múltiplo entero de la frecuencia fundamental).

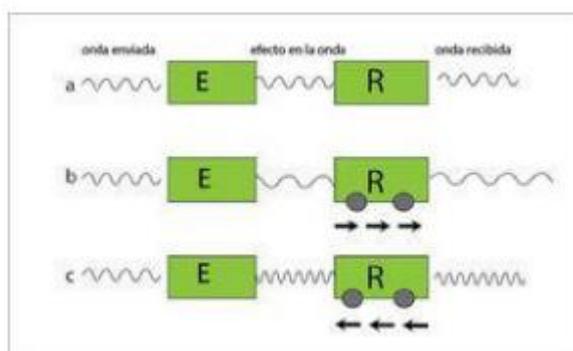
A medida que una burbuja es comprimida por la onda de presión del ultrasonido, se vuelve más rígida y, por lo tanto, resiste una mayor reducción en su radio. Por el contrario, en la fase de rarefacción del pulso de ultrasonido, la burbuja se vuelve menos rígida y, por lo tanto, se agranda mucho más. Los picos en el espectro de eco se ven al doble de la frecuencia transmitida, así como en subarmónicos y ultraarmónicos. Este es el método más simple para distinguir las burbujas del tejido: excitarlas para producir armónicos y detectarlos en lugar del eco fundamental del tejido. Cabe mencionar que los factores claves en la respuesta de los armónicos de un agente son: la presión incidente del campo de ultrasonido, la frecuencia y la distribución de tamaño de las burbujas, así como también de las propiedades mecánicas de la cápsula de la microburbuja (una cápsula rígida, por ejemplo, amortiguará las oscilaciones y atenuará su respuesta no lineal [76]).

Aunque los ecos armónicos a menudo se asocian con las microburbujas, los ecos generados por el tejido que también pueden contener armónicos de la frecuencia central transmitida inicial, como resultado de la propagación no lineal de la onda de presión de ultrasonido transmitida. La velocidad del sonido es mayor para los componentes de mayor presión de una onda de ultrasonido que viaja dentro del tejido y, por lo tanto, el pulso se distorsiona durante la propagación. Los ecos tisulares de la onda de presión distorsionada también contienen frecuencias armónicas [77].

Las imágenes armónicas están ampliamente disponibles en la mayoría de los ecógrafos modernos, tanto para la detección de tejidos como de agentes de contraste. En modo armónico, el sistema está configurado para recibir ecos preferentemente al doble de la frecuencia transmitida. En los primeros sistemas, esto se lograba por medio de un filtro de paso de banda de radiofrecuencia que simplemente eliminaba todos los ecos, excepto aquellos cuya frecuencia era cercana a la del segundo armónico. Sin embargo, una aplicación de la imagen armónica de contraste que ha demostrado ser prometedora es Doppler [76].

## 2. Ultrasonido Doppler.

Definimos el efecto doppler cuando un emisor produce una onda de una determinada frecuencia (luz o sonido), y esta viaja por el aire libremente a una determinada velocidad, alcanzando al observador que se encuentra en movimiento alterando la frecuencia con la cual es percibida por receptor. Cabe mencionar que el movimiento no es solo específico del receptor, sino que también puede presentar movimiento el emisor [78]. Existen dos tipos de equipos dopplers, el doppler continuo CW: en el cual el transductor emite y recibe la señal al mismo tiempo, adquiriendo todos los flujos y movimientos a lo largo del haz, sin determinar la posición o profundidad del vaso. La ventaja es que no tiene límite de velocidad para su medición, es decir, permite evaluar velocidades muy altas, como ocurre en las cavidades cardiacas y el doppler pulsado (PW) el cual envía pulsos de ondas de ultrasonido que interactúan con el vaso, esperando que la



**Figura 2.2: Efecto doppler.** (a) El emisor (E) envía una frecuencia que es recibida (R) sin cambios ya que no hay movimiento. No hay efecto doppler. (b) y (c). - muestran el efecto doppler: En b, el receptor (R) se aleja del emisor, recibiendo una menor frecuencia y en c, el receptor se acerca al emisor, recibiendo una mayor frecuencia.

información regrese antes de enviar el próximo pulso. Esto permite la discriminación espacial, evaluando de forma precisa el vaso a estudiar [79].

En la práctica clínica, el doppler se utiliza para evaluar el flujo sanguíneo por medio de la medición del movimiento de los glóbulos rojos. Éstos actúan como pequeños reflectores que devuelven el sonido a modo de un eco. El efecto doppler se manifiesta dos veces. Primero tenemos un emisor estacionario (transductor), que emite una determinada frecuencia de sonido, la que es recibida por un receptor en movimiento (glóbulo rojo), manifestándose un primer efecto doppler. Luego este glóbulo rojo en movimiento devuelve otra frecuencia al receptor estacionario (transductor), evidenciándose el segundo efecto doppler. La diferencia de frecuencias entre ellas (frequency shift) cae dentro de las frecuencias audibles por el ser humano (entre 20 y 20000 hz), por lo que podemos escucharlas durante el estudio [80]

El principio Doppler se establece de forma matemática de la siguiente manera [81]:

$$f_d = 2 f_0 \frac{v \cos \theta}{c}$$

donde  $f_d$  es la frecuencia doppler,  $f_0$  es la frecuencia incidente,  $v$  es la velocidad del flujo,  $c$  es la velocidad de sonido en el tejido, y  $\theta$  es el ángulo entre el haz de ultrasonido y la dirección del flujo. Esta expresión implica que la frecuencia de un eco de ultrasonido de un reflector o dispersor en movimiento difiere de la frecuencia de la onda de sonido incidente.

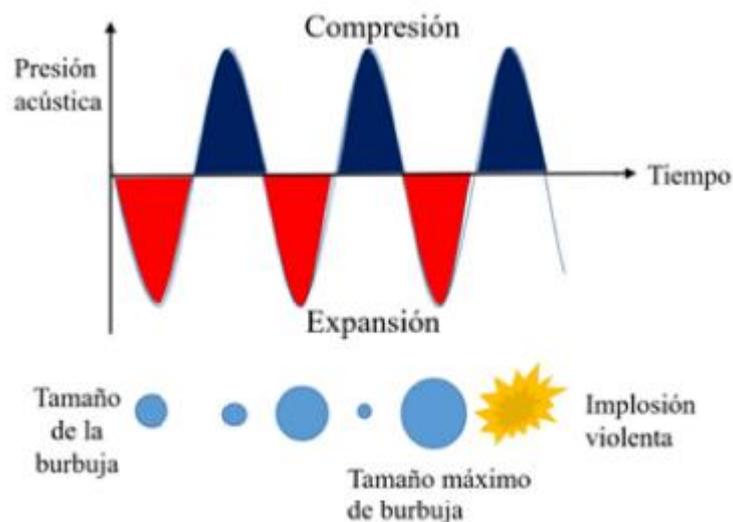
### 3. *Microburbujas y su interacción con el tejido.*

Debido a que la presión, la amplitud y geometría del ultrasonido cambia según el tejido, generando una atenuación, cuanto mayor sea la atenuación, menor será la presión máxima en el tejido. Un equipo de ultrasonido no puede saber en qué tejido se está utilizando, por lo que surgió la necesidad de un nuevo concepto conocido como índice mecánico (IM), el cual no es más que la exposición aproximada de la presión del ultrasonido en el foco del haz en un promedio de tejido. El índice mecánico se define como el pico de presión negativa, dividida por el cuadrado raíz de la frecuencia de ultrasonido. Esta cantidad está relacionada con la cantidad de trabajo mecánico que se puede realizar en una burbuja durante un solo medio ciclo negativo de sonido y está pensado para dar una indicación de la propensión del sonido a causar cavitación en el medio, este índice generalmente se encuentra en algún lugar entre 0.1 y 2.0 [76].

Como bien se sabe la onda del ultrasonido tiene ciclos de expansión y de compresión, el ciclo de expansión ocurre en la amplitud negativa de la onda sonora, mientras el ciclo de compresión surge en la amplitud positiva. La amplitud negativa de la onda sonora debe ser lo suficientemente grande para inducir una intensa presión negativa y con ello provocar variaciones de presión en el líquido. La microburbuja se contrae en el ciclo de compresión de la onda sonora hasta llegar a un tamaño crítico que origine su implosión, Este método conduce al fenómeno de cavitación, el cual se describirá a mayor detalle a continuación [82].

Las ondas acústicas ultrasónicas, como todos los sonidos, se propagan a través de una serie de olas de compresión y expansión que viajan a través de un medio. Los ciclos de compresión juntan las moléculas del medio mientras que los ciclos de expansión las separan. En un medio líquido, el ciclo de expansión de los ultrasonidos puede generar suficiente presión negativa como para romper las fuerzas de cohesión de las moléculas del líquido, separándolas localmente [83].

En cuanto a las microburbujas en presencia de este cambio acústico tenderán a moverse a ya sea el nodo o el antinodo del campo bajo la influencia de lo que se conoce como fuerzas de Bjerknes tendiendo a presentar un crecimiento durante cada expansión que es ligeramente más grande que el encogimiento durante la compresión.



**Figura 2.3: Representación de las fases de compresión y expansión de la microburbuja en presencia de un campo acústico.** La figura describe el comportamiento entre la presión acústica y el tamaño de la microburbuja, al estar expuesta de presión negativa la microburbuja se contrae caso contrario ocurre al exponerse a un campo de presión positiva.

Si la microburbuja está en sintonía con este campo acústico, este fenómeno es conocido como cavitación estable [64]. Así, a lo largo de muchos ciclos acústicos, la cavidad va creciendo hasta lograr finalmente una medida crítica con la cual puede absorber eficientemente energía de la irradiación ultrasónica [84]. Si las burbujas están presentes en un campo de onda estacionaria, este movimiento de burbujas en sí mismo también aumenta la turbulencia localizada y, por lo tanto, nuevamente las tasas de transferencia de masa y calor. Éste se conoce como microstreaming de cavitación.

Como bien es conocido, la cavidad puede crecer rápidamente durante un ciclo acústico adquiriendo una medida inestable con la que ya no puede absorber energía eficientemente. Sin esta energía la cavidad no se puede mantener y el líquido que la rodea entra violentamente a la cavidad, ocasionando su implosión esto se le conoce como cavitación inestable [83,84].

Esta implosión de la cavidad crea un entorno inusual para reacciones químicas. La rápida compresión de los gases y vapores dentro de la burbuja genera temperaturas y presiones enormes, de hasta 5000 °C y 1000 atm, respectivamente. Dado que las burbujas son muy pequeñas en comparación con el volumen del líquido que hay alrededor, el calor generado se "disipa" muy rápidamente, con lo cual las condiciones ambientales se mantienen esencialmente inalteradas además que dichas condiciones extremas se limitan al centro de la burbuja, sin embargo, la burbuja se habrá expandido de nuevo antes de producirse cualquier transferencia de calor significativa [21,22]. Esta combinación de altas temperaturas, altas presiones y rápido enfriamiento genera unas condiciones difícilmente alcanzables con otras técnicas [85]. Así mismo el colapso también genera ondas de choque que pueden inducir efectos mecánicos de manera no simétrica alcanzo velocidades de hasta 400 km/h [86]

Debido al impacto se liberan pequeñas partículas sólidas o líquidas. En sistemas líquido-líquido se forman emulsiones, generalmente mucho más estables que las formadas convencionalmente. Los sólidos experimentan fragmentaciones y erosiones, que hacen aumentar las áreas activadas. La cavitación también acelera el transporte de masa y disminuye la repasivación por los productos de reacción. El resultado global es un contacto mucho más fácil entre reactivos inmiscibles o poco solubles. Como consecuencia de las condiciones altamente energéticas generadas muchas reacciones químicas pueden ser activadas por sonicación [87,88]. En algunos casos, la cavitación puede inducir una reactividad química específica (switching sonoquímico), pudiendo cambiar la naturaleza de los productos de reacción. En general, la sonicación de disoluciones mejora los procesos de radicales libres, mientras que casi no afecta a los procesos polares [88]. Las reacciones sonoquímicas se han desarrollado fundamentalmente para reacciones en fase heterogénea. Cuando las burbujas de cavitación se forman encima o cerca de una superficie sólida el colapso de la burbuja no es simétrico. La superficie sólida impide el movimiento del líquido desde su lado de forma que la mayor parte del flujo de líquido dentro de la burbuja será desde el otro lado de la burbuja.

Como resultado, se forma un chorro líquido dirigido hacia la superficie sólida con una velocidad de unos 400 km x h Estos chorros y las ondas de choque asociadas pueden producir una erosión importante en las superficies y exponer nuevas superficies muy calientes [88,89]. Otro efecto de la sonicación es la transferencia de masa. En sistemas heterogéneos, los productos de reacción se van acumulando en la superficie de contacto, lo cual impide la interacción de nuevas moléculas de reactivo con esta superficie. Las fuerzas de corte mecánico causadas por los rayos cavitacionales producen un flujo turbulento y transporte de material desde y hacia las superficies de las partículas sólidas o de las gotas, de forma que se va maximizando la exposición de unos reactivos con los otros. Por otro lado, la combinación de chorros líquidos de alta velocidad, altas presiones y temperaturas, y muy elevadas velocidades de calentamiento y de enfriamiento que tienen lugar durante la implosión de las burbujas cavitacionales hacen de la cavitación ultrasónica un medio único para transferir energía a las reacciones químicas [90,91]. El tamaño de las microburbujas está ligado a muchos elementos tanto en la formulación de ellas como en el método empleado para crearlas, en general el tamaño de la burbuja se puede aproximar por la expresión simple dada en EC3.3:

$$EC2,3 : f * R = 3$$

donde  $f$  es la frecuencia en megahercios, y  $R$  es el radio de burbuja en micrómetros [91]. La capacidad de las microburbujas para interactuar con el ultrasonido de manera tan efectiva se debe en gran parte a su compresibilidad. Esto se puede entender mejor considerando el equilibrio de presión en la superficie de una burbuja de gas esférica suspendida en un volumen infinito de líquido y que podrá expresarse como [92]:

$$EC2,4: P_e = P_L + (2a)/R$$

donde  $P_e$  es la presión del gas dentro de la burbuja,  $P_L$  es la presión en el líquido en la pared de la burbuja,  $a$  es la tensión interfacial y  $R$  es el radio de burbuja.

Cualquier cambio en la presión del líquido, por ejemplo, debido a la aplicación de un campo sonoro externo, dará lugar a un cambio en la presión del gas dentro de la burbuja, si, asumimos que el gas dentro de la burbuja se comporta idealmente,  $p_G$  se puede escribir como [92]:

$$EC2,5: P_e[(4/3) * 4r * R^3] = nBT$$

donde  $B$  es la constante universal del gas,  $n$  es el número de moles del gas contenido dentro de la burbuja y  $T$  es la temperatura absoluta.

Cualquier variación en  $Pe$  requerirá una variación correspondiente en  $n$ ,  $T$  y/o  $R$ , es decir, la masa, temperatura o volumen de la burbuja. Cabe mencionar que las escalas de tiempo asociadas con la transferencia de masa y calor son muy lentas en comparación con la longitud del pulso de ultrasonido ( $V_{-1-2} \mu s$ ), por el contrario, el volumen de la burbuja, puede cambiar fácilmente debido a la alta compresibilidad del gas en su interior.

Un enfoque más preciso está basado en el radio de resonancia lineal que tiene en cuenta la relación calorífica específica del interior del gas de la burbuja ( $\gamma$ ), la presión del líquido ambiente ( $P_{00}$ ) y la densidad del líquido ( $\rho_L$ ) [93]. Sin embargo, incluso esta ecuación tiende a sobreestimar el tamaño de burbuja, debido a los efectos no lineales que presentan [94].

$$EC3,6 : R \times 10^{-6} = \sqrt{((3\gamma)P_{\infty})/(\rho_L f^2)}$$

Una vez que la burbuja comienza a oscilar, el líquido junto a la pared de la burbuja también se pondrá en movimiento y así influirá en la dinámica de burbuja. Consecuentemente, para describir completamente la respuesta de una microburbuja la excitación por ultrasonido es necesario considerar la inercia del líquido circundante.

Se han desarrollado varios modelos para describir matemáticamente el movimiento de la pared de burbujas. La primera ecuación reportada en la literatura, que describe una cavidad esférica vacía en un volumen infinito de líquido fue desarrollada por Besant [95].

$$EC3,7 : \rho_L [R\ddot{R} + 3/2\dot{R}^2] = P_L - P_{\infty}$$

donde  $R$  es el radio instantáneo de la cavidad y  $\dot{R}$  y  $\ddot{R}$  son la velocidad y la aceleración de la pared de la cavidad respectivamente.  $\rho_L$  es la densidad del fluido circundante,  $P_L$  es la presión en el líquido en la superficie de la cavidad y  $P_{00}$  es la presión en el líquido a gran escala distancia de la burbuja.

Por lo que el caso más simple: el de la microburbuja libre impulsada por un campo sonoro de baja amplitud en un fluido infinito. Las ecuaciones fundamentales de la dinámica de las burbujas fueron desarrolladas por Rayleigh y Plesset [96], sin tomar en cuenta los efectos de compresibilidad del líquido y asumiendo que la presión del gas en la burbuja es uniforme y obedece a la ley politrópica, que viene dada por:

$$EC3,8 : p(R\ddot{R} + 3/2\dot{R}^2) = P_0(t) - P_0 - P_i(t) - [(4\gamma R)/R] - [(2\sigma)/R]$$

donde  $R$  es el radio de burbuja en equilibrio,  $\dot{R}$  y  $\ddot{R}$  representan la primera y segunda derivada temporal del radio de burbuja  $R$ ,  $P_0$  es la presión hidrostática,  $P_i(t)$  es la presión de ultrasonido incidente en el líquido a una distancia infinita,  $P_g(t)$  es la presión de gas uniforme dentro de la burbuja,  $\rho$  es la densidad,  $\sigma$  es la tensión superficial y  $\eta$  la viscosidad. Estas suposiciones son aceptables para microburbujas en condiciones típicas de exposición de diagnóstico. Sin embargo, a altas intensidad de ultrasonido esta ecuación tuviera que ser modificada [97].

Utilizando una suposición de oscilación de pequeña amplitud, la ecuación de Rayleigh-Plesset se ha aplicado ampliamente para estudiar muchos aspectos de la dinámica de burbujas, como la frecuencia natural de burbujas, las características de dispersión acústica y los efectos de amortiguación térmica [98,99].

Así mismo, se han estudiado los efectos de la viscosidad y elasticidad de la cápsula de las burbujas. Roy et al. primero trataron la cápsula de las burbujas como un simple líquido viscoso y encontraron un buen acuerdo entre las predicciones del modelo y las mediciones experimentales in vitro del umbral de cavitación [100]. Se han desarrollado modelos de propiedades de capsulas utilizando principios mecánicos clásicos. Church derivó una ecuación similar a la de Rayleigh-Plesset que describe la dinámica de las burbujas de gas encapsuladas, asumiendo que el material de recubrimiento es una capa de un sólido incompresible, viscoso-elástico [101].

### **3. Justificación**

Los 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 hidrofóbicas y aumentar su efecto terapéutico.

Por otro lado, existe un gran número de moléculas hidrofílicas que se pudieran utilizar para enfermedades cardiovasculares dirigidos a endotelio ya que el endotelio vascular puede representar un objetivo terapéutico importante en patologías como: inflamación, trombosis e hipertensión, pudiendo ser el objetivo celular inicial para resolver dichas patologías. Mediante el uso de un sistema microburbuja-liposoma se pretende aumentar la eficacia terapéutica, localizar y liberar el fármaco de manera controlado reduciendo la dosis administrada, así como demostrar que es posible una liberación controlada mediante un estímulo externo capaz de generar una respuesta biológica predecible.

Con todo lo anterior se pretende resolver la problemática de focalizar y liberar de manera controlada una molécula hidrofílica con actividad vascular a través de la unión de liposomas y microburbujas y expuesta a la liberación controlada mediante la exposición de pulsos de ultrasonido permitiendo liberar el fármaco encapsulado y observar una respuesta biológica de vasoconstricción/vasodilatación inmediatamente en un modelo ex vivo e in vivo

## **4. HIPOTESIS**

La incorporación de fármacos hidrofílicos en un sistema microburbuja-liposoma podría proteger dichos fármacos (fenilefrina / acetilcolina) de las interacciones del entorno celular en el organismo y generar una respuesta biológica vascular instantánea inducida por la liberación controlada y focalizada de un agonista de carácter hidrofílico mediante la aplicación de un estímulo externo (ultrasonido) produciendo una respuesta vascular inmediata tras la liberación del fármaco encapsulado.

## 5. OBJETIVOS

### I. Objetivo General

Desarrollar, caracterizar y demostrar que un acarreador combinado por microburbuja y liposomas permita liberar un agonista vascular de carácter hidrofílico de manera controlada al exponer simultáneamente el tejido y el sistema microburbuja-liposoma a pulsos de ultrasonido generando una respuesta biológica inmediata tras la liberación del agonista en un modelo *ex vivo*; así como también caracterizar y demostrar la viabilidad del sistema en un modelo *in vivo*.

### 1. Objetivos Particulares

- Desarrollar un acarreador microburbuja-liposoma que pueda ser usado en un sistema de órgano aislado.
  - Caracterizar la distribución de tamaños, diámetro medio y concentración del sistema microburbuja-liposoma.
- Demostrar que se puede inducir un efecto biológico inmediato tras la liberación controlada mediada por pulsos de ultrasonido del agonista vascular presente en el sistema microburbuja-liposoma en un modelo *ex vivo*.
- Demostrar que se puede inducir un efecto biológico inmediato tras la liberación controlada mediada por pulsos de ultrasonido del agonista vascular presente en el sistema microburbuja-liposoma en un modelo *in vivo*.
  - Caracterizar el efecto biológico de un agonista vascular en la aorta descendente.
- Caracterizar el efecto hemodinámico generado por la liberación del agonista presente en el sistema microburbuja-liposoma en un modelo *in vivo*.

## 6. 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.

### I. Reactivos

1,2-Dipalmitoyl-sn-glicero-3-phosphocholine (DPPC), 1,2 Distearoyl-sn-glicero-3-phosphocholine (DSPC), Avidin-FITC de clara de huevo (Avidin), (R)-(-) El clorhidrato de fenilefrina (phe), el cloruro de acetilcolina (ach), el glicerol, el propilenglicol y el cloroformo se adquirieron de Sigma-Aldrich Corp. (St Louis, MO, EE.UU). 1,2 Diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N [biotinil (polietilenglicol )-2000] (DSPE- PEG 2000-Biotina), 1, 2- Diestearoil-sn-glicero-3- fosfoetanolamina- N-[ amino (polietilenglicol )-2000] (DSPE-PEG2000) y colesterol se adquirieron de Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, EE.UU). Gas perfluoropropano (*C3F8*) adquirido de Coastal Specialty Gas (Beaumont, TX, EE.UU). La pureza de todos los reactivos fue superior al 98 %.

### 2. Preparacion del sistema microburbuja-liposoma

#### 1. Preparación de liposomas biotinilados unilaminares cargados con fenilefrina o Acetilcolina

Los liposomas biotinilados multilaminares cargados con fenilefrina o acetilcolina se prepararon usando el método de hidratación de película delgada [47]. Una mezcla de fosfolípidos con o sin colesterol [DSPC: DSPE-PEG2000: DSPE-PEG2000-Biotin: Chol (85: 5: 5: 5) o DSPC: DSPE-PEG2000: DSPE-PEG2000-Biotin: (90: 5: 5)] se disolvieron en cloroformo. El disolvente se evaporó bajo una corriente constante de nitrógeno y se eliminaron los residuos del solvente empleando una cámara de vacío durante 3 horas. La película lipídica resultante se hidrató con solución HEPES (20 nM, pH 7,4) y 0,1 M de fenilefrina o acetilcolina a 65 °C durante 20 minutos para obtener una concentración final de 2 mg / ml. Luego, para obtener liposomas biotinilados unilamelares cargados con fenilefrina o acetilcolina, se extruyeron los liposomas multilamelares a través de una membrana de policarbonato (tamaño de poro de 0.2  $\mu\text{m}$ ) usando el equipo de mini

extruder (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) siguiendo el procedimiento establecido por el fabricante. Finalmente, para eliminar el exceso de fenilefrina o acetilcolina sin encapsular, los liposomas unilamelares se lavaron cinco veces por centrifugación durante 1 hora a 14,000 rpm a 4 °C. Después de cada lavado, el sedimento se resuspendió en 100 µl de solución PBS [ (PBS, 7,4): glicerol: propilenglicol (80:10:10 v / v)].

## 2. Preparación de microburbujas recubiertas de avidina

Se prepararon microburbujas biotiniladas usando el método de hidratación de película delgada [31]. La mezcla de fosfolípidos [DPPC: DSPE-PEG2000-biotina (95: 5)] se hidrató en solución HEPES a 60 °C durante 20 minutos para obtener una concentración final de lípidos de 5 mg/ml. Luego, se transfirieron 0,5 ml de esta solución a un vial de vidrio de color ámbar de 1,5 ml, que se selló con PTFE / silicona (Sigma-Aldrich) para posteriormente someter el vial al vacío y sustituirlo por *C3F8* (perflouropropano). Las microburbujas biotiniladas se prepararon mediante agitación mecánica con un dispositivo de agitación de alta velocidad Ultramat S (SDI, Effingham, 11, EE. UU.) a 4500 oscilaciones/s durante 46 s. El resultado de las microburbujas biotiniladas fueron diluidas en 0,5 ml de HEPES y fueron centrifugados, dos veces, durante 5 minutos a 470 x g. El "cake" (aglomeración de microburbujas en forma de espuma que se forma al realizar los centrifugados) se resuspendió en 1 ml de HEPES. Para la formación de las microburbujas-avidina se prepararon incubando 80 µL (6,64x10<sup>8</sup> MBs) de microburbujas biotiniladas a temperatura ambiente con 2 µL de FITC-avidina (2 mg/ml) en rotación lenta. Después de 10 minutos de incubación, las microburbujas-avidina se lavaron dos veces por centrifugación durante 4 minutos a 400g y se resuspendieron en 100 µl de HEPES.

### 3. Conjugación de liposomas biotinilados unilaminares con microburbujas-avidina

Los liposomas biotinilados unilaminares cargados con fenilefrina o acetilcolina (2 mg / ml) se incubaron con 80  $\mu$ l (664x10<sup>8</sup> MBs) de microburbujas-avidina a temperatura ambiente y rotación lenta. Después de 20 minutos de incubación, el sistema de microburbuja-liposoma se lavó dos veces por centrifugación durante 4 minutos a 300 x g y se resuspendió en 100  $\mu$ l de HEPES.

### 4. Caracterización del sistema microburbuja-liposoma

Se introdujo una muestra de microburbujas-avidina y del sistema microburbuja-liposoma en una cámara de microfluídica de polidimetilsiloxano (1 x 1 x 0,002 mm), se midió la distribución del tamaño y la concentración a partir de 60 imágenes confocales (n = 3, TCS SP5, Leica, Mannheim, Alemania). Las imágenes se analizaron utilizando el software Image J (NIH, EE. UU.). La unión de liposomas biotinilados unilaminares cargados con fenilefrina o acetilcolina se evaluó con Vybrant Dil (V-22885, Molecular Probes, Eugene, Oregon, EE. UU.). Un marcador de membrana lipofílica fluorescente rojo. Los liposomas unilaminares se incubaron con Vybrant Dil durante 30 minutos a 37 °C, se lavaron dos veces durante 1 hora a 14000 rpm y se resuspendieron en 100  $\mu$ l de HEPES. Luego, los liposomas con Vybrant Dil se conjugaron con microburbujas-avidina usando el mismo procedimiento descrito anteriormente. Se utilizaron longitudes de onda de excitación y emisión de 512/522 nm para FITC-avidina y 549/565 nm para Vybrant Dil. Finalmente, el índice de polidispersidad fue calculado con la ecuación 1.

$$EC6.1 = PDI(\mu/Dm) * 100)$$

Donde PDI=índice de polidispersidad, desviación estándar y Dm= diámetro medio. Se lavó dos veces por centrifugación durante 4 minutos a 300 x g y se resuspendió en 100  $\mu$ l de HEPES.

## 5. Parámetros de exposición a ultrasonido.

Se utilizó un dispositivo ultrasónico móvil comercial que consta de un transductor plano con una area activa de 5cm<sup>2</sup> y dispositivos electrónicos relacionados para controlar los parámetros de ultrasonido. (Intellect Mobile Ultrasound 2776, Chattanooga Group, Hixson, TN, EE. UU.). El transductor de dicho equipo fue montado en el fondo de un tanque de acrílico lleno de agua. La cámara de órgano estaba centrada, posicionada y alineada a 2.5 cm por encima de la superficie del transductor dicha cámara contenía 6ml de solución Krebs-Henseleit y siendo constantemente aireada con 95 % de O<sub>2</sub> y 5 % de CO<sub>2</sub> (pH 7.4) se agregó la solución de microburbuja-liposoma y/o anillos aórticos. Los anillos aórticos se montaron cuidadosamente en dos ganchos de alambre de acero inoxidable en una cámara de órgano (Fig. 5.1). Las fuerzas de contracción y relajación de los anillos aórticos se detectaron utilizando un transductor de fuerza (MLT0201 / RAD, ADInstruments, Colorado Springs, CO, EE. UU.) acoplado a un sistema de adquisición de datos (PowerLab / 4SP, ADInstruments).

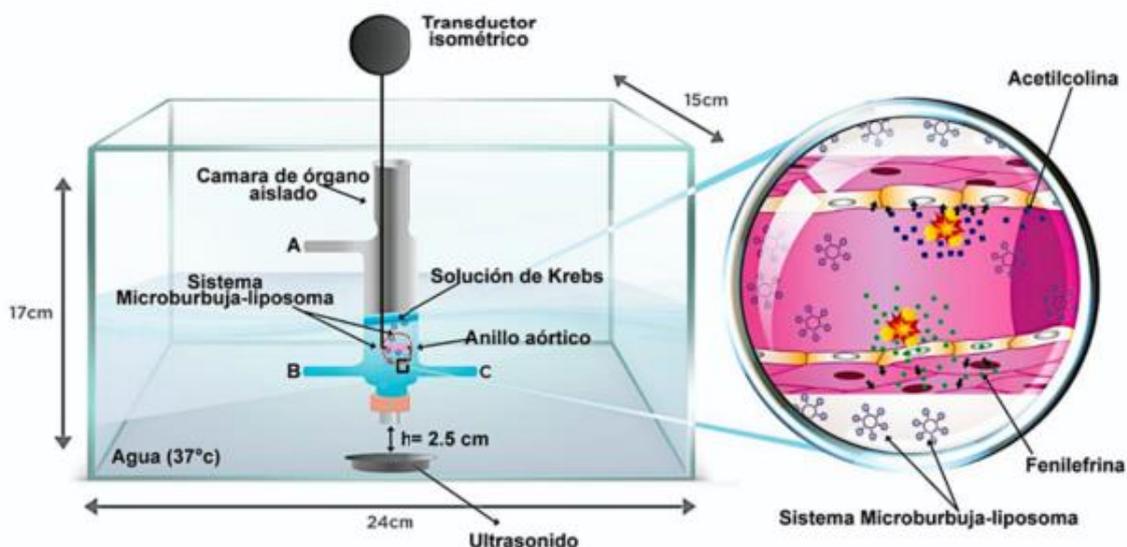
Se usó agua como medio de acoplamiento entre el transductor y la cámara del órgano sumergido (Fig. 5.1). Brevemente, se aplicaron ondas de ultrasonido sinusoidales de 3 MHz con una presión acústica de 0.5 MPa, un índice mecánico de 0.5, un ciclo de trabajo del 50 % y una frecuencia de repetición de pulso de 100 Hz. La duración del pulso fue de 5 ms, con exposiciones temporizadas de 30 s. La presión acústica negativa máxima generada en el centro del transductor se midió por separado utilizando un hidrófono calibrado (HNR-0500, Onda Corp., Sunnyvale, CA, EE. UU.) En ausencia de la placa de cultivo. La señal de ultrasonido se monitorizó utilizando un osciloscopio digital sincronizado (USB-5132, National Instruments, Austin, TX, EE. UU.). Todos los experimentos se llevaron a cabo a 37 °C.

### 3. Experimentos ex vivo

#### 1. Preparación de anillos aórticos de rata

Todos los procedimientos se ajustaron a la "Guía para el Cuidado y Uso de Animales del Laboratorio (1996)" de los Institutos Nacionales de Salud y fueron aprobados por el Comité de Revisión de Ética Institucional para la Experimentación Animal de Cinvestav-IPN (aprobación no. 0170-15). Se emplearon ratas macho de la sepa Wistar

(250–300 g de peso corporal) las cuales fueron alimentadas con una dieta equilibrada y teninedo agua y comida a voluntad.



**Figura 6.1: Sistema de órgano aislado.** La figura muestra una caja de acrílico con un baño de agua circulante que mantiene la temperatura a 37 grados, en la parte inferior de la caja permite la posición del transductor de ultrasonido la cual está centrado, posicionado y alineado a 2,5 cm por encima de la superficie del transductor a una cámara de órgano aislada, consta también de una cámara interna lleno con solución fisiológica Krebs a 37 °C. Dentro de la cámara de órgano aislado se coloca el anillo aórtico con una tensión inicial y conectado a un transductor de fuerza isométrica. Los liposomas, las microburbujas o los agonistas vasculares utilizados se agregan directamente a la cámara del órgano aislada.

Las ratas se anestesiaron profundamente con isoflurano (2% - 3%, EZ Anesthesia, WPI, Sarasota, FL, EE. UU.) Y luego se les inyectó heparina (100 UI). La aorta torácica se retiró cuidadosamente y se colocó directamente en una solución Krebs-Henseleit (en mM: NaCl 117.8; KCl 6.0; CaCl<sub>2</sub> 1.6; MgSO<sub>4</sub> 1.2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2; NaHCO<sub>3</sub> 24.2; glu- cosa 11). Se diseccionó la aorta y se eliminó el tejido conectivo circundante para luego cortar en segmentos de 3 mm de largo.

## 2. Análisis de funcionalidad de anillos aórticos

Primeramente, los anillos aórticos se montaron en la cámara del órgano como se describe anteriormente. Los anillos aórticos se equilibraron durante 90 minutos con lavados realizados cada 10 minutos ajustando el tono basal a 2 g.

Para probar la funcionalidad de los anillos aórticos, se añadió fenilefrina libre cada 30 minutos para alcanzar una concentración de  $1\mu\text{M}$  en el baño para inducir una precontracción del 80 %. En la meseta de la contracción máxima, la relajación fue inducida por acetilcolina libre ( $1\mu\text{M}$ ). Las respuestas a acetilcolina se expresaron como un cambio porcentual con respecto a la contracción máxima, calculado mediante la ecuación 2:

$$EC_{6,2} = (R/RT) * 100$$

Donde, R= relajación (g) y RT= contracción máxima (g)

Se descartaron los anillos que no desarrollaron más de 0,7 g de contracción. Por último, los anillos aórticos se lavaron tres veces cada 10 minutos para recuperar el tono basal y realizar la liberación controlada de agonistas vasculares encapsulados en el sistema microburbuja-liposoma inducido por la liberación de pulsos ultrasónicos.

## 3. Grupo Experimental 1: Comparación del efecto vascular en el sistema Microburbuja-liposoma sin colesterol y con colesterol

Para comparar la estabilidad de los liposomas, se usaron 20 ratas con 4 anillos para cada rata y se dividieron en cuatro subgrupos experimentales:

- Subgrupo a: fenilefrina libre  $1 \times 10^{-6}\text{M}$  ( grupo control).
- Subgrupo b: 2 mg / ml (concentración de liposomas, resuspendidos en 100  $\mu\text{l}$ ) liposomas cargados de fenilefrina sin colesterol.
- Subgrupo c: 2 mg/ml de liposomas cargados de fenilefrina con colesterol.
- Subgrupo d:  $2,38 \times 10^8$  MBs con 2 mg/ml de liposomas (todo resuspendido en 100  $\mu\text{l}$ ) de liposomas-microburbujas cargadas de fenilefrina.

Los cambios en la tensión vascular se registraron durante los siguientes 10 minutos. Se diseñó un grupo experimental similar para analizar liposomas cargados con acetilcolina, pero los anillos se contrajeron previamente con fenilefrina  $1 \times 10^{-6}\text{M}$  antes de la adición de acetilcolina libre  $10 \times 10^{-6}\text{M}$ , liposomas o sistema microburbuja-liposoma.

**4. Grupo Experimental 2: Efectos del tono vascular inducidos por la liberación desencadenada por pulsos de ultrasonido de microburbujas-liposomas cargadas con fenilefrina y acetilcolina**

Para evaluar el efecto del ultrasonido y el efecto de liberación de fenilefrina o acetilcolina mediante la exposición del sistema microburbuja-liposoma a pulsos de ultrasonido en los anillos aórticos en tiempo real, se usaron 20 ratas con 4 anillos por cada rata y se dividieron en cuatro subgrupos experimentales para posteriormente aplicar el estímulo externo de ultrasonido, se estimularon de la siguiente manera:

- Subgrupo a: los anillos se estimularon con pulsos de ultrasonido ( grupo control).
- Subgrupo b: los anillos se incubaron con microburbuja-liposoma vacíos seguidos de la estimulación con pulsos de ultrasonido.
- Subgrupo c: los anillos se incubaron con microburbuja-liposoma cargados con fenilefrina
- Subgrupo d: los anillos se incubaron con microburbuja-liposoma cargados con fenilefrina seguido de la estimulación con ultrasonido.

Se diseñó un grupo experimental similar para analizar liposomas cargados con acetilcolina, pero los anillos se contrajeron previamente con fenilefrina  $1 \times 10^{-6} \text{M}$  antes de la adición del sistema microburbuja-liposoma y del estímulo con ultrasonido.

**5. Grupo Experimental 3: Cuantificación de la dosis de fenilefrina/acetilcolina en el sistema microburbuja-liposoma**

Con el fin de evaluar el efecto dependiente de la dosis de fenilefrina o acetilcolina generado mediante la liberación controlada del estímulo externo de pulsos de ultrasonido, utilizamos 4 ratas con 4 anillos por cada rata. Se obtuvieron curvas iniciales de concentración-respuesta para fenilefrina ( $1 \times 10^{-9} \text{M}$  a  $1 \times 10^{-5} \text{M}$ ) o acetilcolina ( $1 \times 10^{-9} \text{M}$  a  $1 \times 10^{-5} \text{M}$ ) en anillos aórticos previamente contraídos. Se generaron curvas de dosis- respuestas acumulativas para fenilefrina o acetilcolina cargadas en el sistema microburbuja-liposoma. Primero se agregó un volumen diferente (solo un volumen para un experimento, es decir un volumen para un trazo y se hace todos esos trazos individualmente con exposición a ultrasonido (5, 10, 20, 30, 40  $\mu\text{l}$ ) del sistema microburbuja-liposoma a los anillos aórticos montados en la cámara del órgano después se aplica los pulsos de ultrasonido, usando el procedimiento, parámetros y arreglo experimental (tanque de agua) descritos en la configuración del ultrasonido.

Cada condición se agregó individualmente y se repitió con 5 animales diferentes. Las respuestas vasculares en ambas curvas se expresaron como 100 % de respuesta que describen la respuesta a la dosis de la curva de fenilefrina o acetilcolina. El porcentaje de respuesta para cada dosis de microburbuja-liposoma se usó para estimar la concentración de fenilefrina o acetilcolina presente en el baño de órganos después de la liberación de la destrucción de las microburbujas. Se usó el programa de computadora Prism para este cálculo. (GraphPad Prism versión 6.00 para Windows, software GraphPad, San Diego, California, EE. UU.)

Luego, se generó una respuesta de dosis acumulativa, esta curva de dosis-respuesta acumulativa se generó con diferentes volúmenes (5, 10, 20, 30, 40  $\mu$ l) del sistema microburbuja-liposoma contenidos en un tubo eppendorf para posteriormente producir la liberación del fármaco encapsulado mediante la exposición a pulsos de ultrasonido usando el procedimiento, parámetros y arreglo experimental descritos anteriormente. Después de eso, los anillos aórticos montados en la cámara del órgano fueron estimulados por la adición de cada volumen sonificado.

Finalmente, los valores obtenidos para las respuestas de contracción y relajación después de la liberación desencadenada por los pulsos de ultrasonido Phe o Ach cargados en el sistema microburbuja-liposomas (100  $\mu$ l,  $2,38 \times 10^8$  MBs) se interpolaron utilizando la cinética de Michaelis-Menten (Eq 3) la concentración (D) de fenilefrina / acetilcolina fue estimada comparando la curva de dosis-respuesta acumulativa para fenilefrina o acetilcolina libre vs la entregado desde el sistema microburbuja-liposoma.

$$EC6.3: [D] = [K_m][R]/[R_r - R]$$

Donde [D] es la concentración estimada,  $K_m$  es la concentración que causa el 50 % del efecto máximo ( $ED_{50}$ ),  $R_r$  es la respuesta biológica máxima posible y R es la respuesta biológica correspondiente a la dosis [D].

#### 4. Experimentos in vivo.

Se usaron ratas Wistar macho (250-300 g de peso corporal) fueron alimentadas con una dieta equilibrada y de libre acceso. Las ratas se anestesiaron profundamente con isoflurano y heparina para evitar la formación de coágulos sanguíneos cabe resaltar que para los experimentos in vivo del modelo de trombosis se omitió la aplicación de heparina.

## 1. Medición de velocidad de flujo en la aorta descendente.

Una vez que el animal es anestesiado como se describió anteriormente, se procedió a rasurar el cuello y el área torácica, se coloca la rata anestesiada en posición supina con las patas pegadas a los electrodos en una placa de ECG de temperatura controlada con una temperatura de  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . una vez posicionada la rata se insertó una aguja (25G) en la vena de la cola para la administración de las diversas sustancias a evaluar.

Para medir la señal de velocidad de flujo aórtico ascendente, la sonda de 10MHz se colocó en el segundo espacio intercostal a la derecha del esternón y en ángulo para registrar la velocidad, la profundidad del rango de la sonda se ajustó entre 6 y 9 mm para obtener la velocidad máxima. La visualización del espectrograma de velocidad (flujo de velocidad máxima) se optimizó ajustando los niveles de ganancia, contraste y ruido antes del cálculo de la frecuencia máxima.

## 2. Instrumentación y procesado de la señal.

Para medir la velocidad del flujo aórtico, utilizamos una sonda Doppler pulsada de 10 MHz (1 mm de diámetro) acoplada a un equipo modular ultrasónico Doppler pulsado con una frecuencia de repetición de pulso de 65.4 kHz. Se utilizó un analizador de espectro Doppler en tiempo real (DSPW, Indus Instruments, Houston, TX) para adquirir las señales de audio a una frecuencia de muestreo de 125 kHz a su vez por medio de una tableta portátil se adquiere las señales del ECG y son muestrearon a 4kHz.

Para su posterior análisis se adquirieron y almacenan dos segundos de datos en bruto. Dicho análisis se realiza mediante una transformada rápida de Fourier de 256 puntos (segmento de datos de 2 ms que resultó en una resolución de frecuencia de 500 Hz) cada 0.1 ms (resolución temporal) de las señales de audio Doppler sin procesar y se muestra en la pantalla como un espectrograma de frecuencias, junto con las señales de ECG tal y como observamos en la figura 5.2. La velocidad ( $v$ ) es calculada por medio de la frecuencia de cambio Doppler (Ecuación 4):

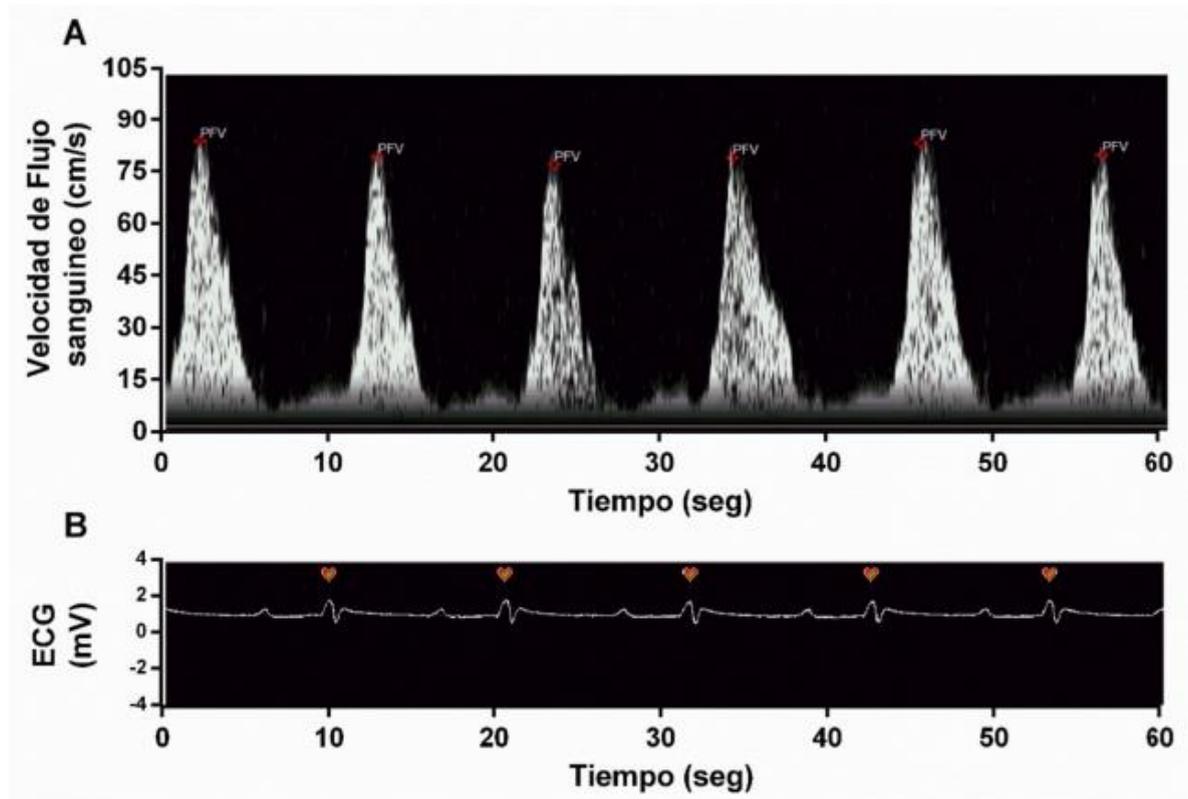
$$\text{EC6.4. } V = c * ([L]f / [2f_0] * \text{Cose})$$

Donde  $c$  es la velocidad del sonido en la sangre (1540 m/s),  $f$  es la frecuencia de la sonda de ultrasonido (10 MHz) y  $\theta$  es el ángulo que forma entre el haz de sonido y el vector de velocidad.

5. Experimentos in vivo de las microburbuja-liposoma.

1. Parámetros del ultrasonido para la exposición.

Utilizamos un ultrasonido móvil (Intellect Mobile Ultrasound 2776, Chattanooga Group, Hixson, TN, EE. UU.). con una sonda de 5cm<sup>2</sup> con un haz colimado, los parámetros empleados en la onda ultrasónica sinusoidal son de 3 MHz, ciclo de trabajo del



**Figura 6.2: Trazo representativo de espectrograma de frecuencias.** El panel A muestra un trazo representativo de la señal adquirida de la velocidad del flujo sanguíneo en la aorta descendente durante 60 seg, el valor máximo de dicha señal esta representada por la velocidad de flujo máxima (PFV por sus siglas en ingles). El panel B muestra un trazo representativo de la señal ECG adquirida durante 60 seg, para el procesamiento de datos es necesario identificar el complejo QRS lo cual se indica mediante una marca de corazón

10%, repetición de frecuencia de pulso de 100 Hz con intervalo de duración de pulso de 9 ms y exposición de tiempo de 30 segundos y una intensidad de 2.5 W / cm<sup>2</sup>

## 6. Protocolo experimental de liberación controlada de fenilefrina encapsulada en el sistema microburbuja-liposoma

Para determinar si hay variaciones en la velocidad de flujo aórtico generado por la fenilefrina encapsulada en el sistema microburbuja-liposoma, se propusieron visualizar las variaciones de los cambios de la velocidad de flujo en cuatro tratamientos:

- A: Ultrasonido.
- B: Fármaco libre.
- C: Microburbujas.
- D: Microburbuja-liposoma cargados con fenilefrina.

Primeramente, las ratas fueron anestesiadas y colocadas en la placa de ECG, se procedió a medir el flujo aórtico como se describe a continuación: las velocidades de flujo pico (PFV) se obtuvieron a partir del espectrograma de la frecuencia de velocidad aórtica, primero se midió el flujo aórtico basal (condición basal de la velocidad de flujo en la femoral de la rata), posteriormente se administró a través de la vena femoral una de las siguientes condiciones:

- 1.- 20 $\mu$ g / kg de fenilefrina a través de la vena femoral.
- 2.- 7,32x10<sup>9</sup> Microburbujas.
- 3.- Microburbuja-liposoma con [2 mg] de liposomas o [4 mg] en de 7,32x10<sup>9</sup> MBs.

Simultáneamente se colocó gel conductor de ultrasonido sobre el área torácica para posteriormente colocar el transductor de ultrasonido con los parámetros establecidos para propiciar la liberación del fármaco encapsulado en el sistema microburbuja-liposoma después de 30 segundos de exposición, el flujo aórtico se midió nuevamente, luego esperamos 2 minutos para medir el flujo nuevamente y finalmente, después de esperar nuevamente 2 minutos (4 minutos en total), se tomará la última medición del flujo sanguíneo. Este procedimiento se repitió para cada una de las 4 condiciones mencionadas anteriormente (ultrasonido, fármaco libre, microburbujas, microburbuja-liposoma + fenilefrina).

7. Liberación controlada mediante pulsos de ultrasonido en un modelo de trombosis

1. Medición de la velocidad de flujo sanguíneo en la femoral.

Primeramente, el animal fue anestesiado tal cual y como se ha descrito en las secciones anteriores, se colocó la rata anestesiada en posición supina con las patas pegadas a los electrodos en una placa de ECG de temperatura controlada con una temperatura de  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se procedió a rasurar la extremidad inferior izquierda de la rata desde la tibial anterior hasta el glúteo superficial, una vez posicionada la rata se insertó una aguja (25G) en la vena de la cola para la administración de las diversas sustancias a evaluar. Para medir la señal de velocidad de flujo en la femoral izquierda, la sonda de 20MHz se colocó en la femoral por debajo de la arteria epigástrica y en ángulo para registrar la velocidad, la profundidad del rango de la sonda se ajustó entre 3 y 4 mm para obtener la velocidad máxima. La visualización del espectrograma de velocidad (flujo de velocidad máxima) se optimizó ajustando los niveles de ganancia, contraste y ruido antes del cálculo de la frecuencia máxima.

8. *Desarrollo y caracterización del modelo de trombosis en la femoral mediante la aplicación de cloruro férrico.*

Una vez anestesiado el animal se procedió a realizar el trombo en la femoral como se describe a continuación. La arteria femoral fue disecada a la altura de la arteria epigástrica superficial hasta el origen de la femoral profunda, la arteria femoral común se separó de la vena y del nervio. Después de esto, se colocó a la arteria femoral común entre dos papeles filtros saturado con cloruro férrico al 20 % o 50 %, la trombosis se evaluó mediante el monitoreo de flujo, que se acercó a 0 después de la oclusión y fue registrado como el tiempo para que cese completamente el flujo sanguíneo dicho tiempo es conocido como tiempo hasta la oclusión (TTO por sus siglas en inglés).

Tras la cirugía se deja al animal 1 hr en aislamiento para su recuperación y posteriormente se coloca con el resto de los animales intervenidos. En cuanto a la caracterización del modelo de trombosis se caracterizó de forma histológica mediante la tinción de hematoxilina & eosina la formación del trombo en la femoral, para que posteriormente mediante procesamiento de imágenes ImageJ se analizó el porcentaje de oclusión que ocupa el trombo en relación al área total de la luz de la arteria.

## 1. Parámetros de ultrasonido en el modelo de trombosis.

Utilizamos un ultrasonido móvil (Intellect Mobile Ultrasound 2776, Chattanooga Group, Hixson, TN, EE. UU.) con una sonda de 5cm<sup>2</sup> con un haz colimado, los parámetros empleados en la onda ultrasónica sinusoidal son de 3 MHz, ciclo de trabajo del 10%, repetición de frecuencia de pulso de 100 Hz con intervalo de duración de pulso de 9 ms y exposición de tiempo de 30s, 1 min o 2 min y una intensidad de 2.5 W / cm<sup>2</sup>

## 2. Protocolo experimental de liberación controlada en el modelo de trombosis.

Para determinar si hay variaciones en la velocidad de flujo tras la liberación controlada de las microburbujas en el modelo de trombosis se propusieron visualizar las variaciones de los cambios de la velocidad de flujo en cinco condiciones diferentes:

- 1.- Basal (sin trombo).
- II.- Ultrasonido.
- III.- Sham.
- IV.- Trombo.
- V.- Microburbujas.

Para la primera condición (basal), la rata fue anestesiado y colocado en la placa de ECG, se procedió a medir el flujo en la femoral mediante las velocidades de flujo pico (PFV) dichos valores se obtuvieron a partir del espectrograma de la frecuencia de velocidad en la femoral se monitoreó la velocidad de flujo en la femoral cada 24 hrs durante 7 días.

Para la condición de solo ultrasonido, una vez que la rata fue anestesiada se tomó la medición de condiciones basales para posteriormente colocar el transductor en la femoral izquierda aplicando los pulsos de ultrasonido con los parámetros establecidos, inmediatamente después se registró la velocidad de flujo. La velocidad de flujo fue monitoreada cada 24hrs durante 7 días antes de la aplicación del ultrasonido y después del estímulo.

Para las demás condiciones primeramente se tomaron las condiciones basales del flujo en la femoral para posteriormente proceder a realizar una de las cirugías:

- 1.- Sham: (exposición de la arteria femoral y cierre de la incisión) una vez concluida la cirugía se tomó la medición de la velocidad de flujo.
- 2.- Trombo: se procedió a realizar la generación del trombo tal y como se describió previamente, una vez que se confirma mediante TTO la generación

del trombo se toma la velocidad de flujo sanguíneo por debajo de donde se realizó el trombo.

Veinte cuatro horas después de la intervención quirúrgica (sham o trombo) se vuelve a tomar las mediciones de velocidad de flujo en la femoral una vez tomado dicha medición se coloca el transductor de ultrasonido con los parámetros establecidos, el flujo en la femoral es monitoreado durante 5 minutos. Este procedimiento se repitió durante

7 días seguidos después de la intervención quirúrgica y para cada una de las diversas condiciones experimentales.

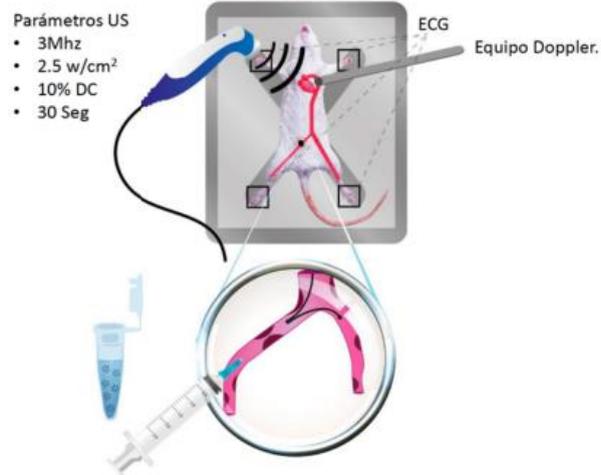
Por último, para observar el efecto generado por las microburbujas se procedió a reali-

zar el trombo en la femoral 24 hrs posterior a la intervención quirúrgica se administró

200  $\mu$ l de microburbujas a través de la vena en la cola de la rata, al mismo tiempo el ultrasonido fue colocado en la femoral con el trombo presente con los parámetros mencionado anteriormente, finalmente se tomó la medición de la velocidad tras el estímulo de ultrasonido tal cual se muestra en la figura 63.

## 9. Análisis estadístico de los resultados

Todos los datos son expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). El análisis unidireccional de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey se utilizaron para datos de comparación múltiple, se evaluaron utilizando el software GraphPad (San Diego, CA, EE.UU.) Y el software MATLAB (Natick, Massachusetts: The MathWorks Inc.) \* Valores P  $\sim$  0.05 fueron considerados estadísticamente significativo.



**Figura 6.3: Representación de la adquisición de la señal de la velocidad de flujo en la femoral en el modelo de trombosis.** Primeramente, se expone la arteria femoral común para posteriormente cubrirla con dos papeles previamente sumergidos a *FeCl3* a cierta concentración (20 % o 50 % v/w), a la par el equipo Doppler es colocado para la adquisición de la señal de la velocidad de flujo. El ultrasonido es colocado en la zona afectada mientras que la administración del fármaco es mediante la vena en la cola.

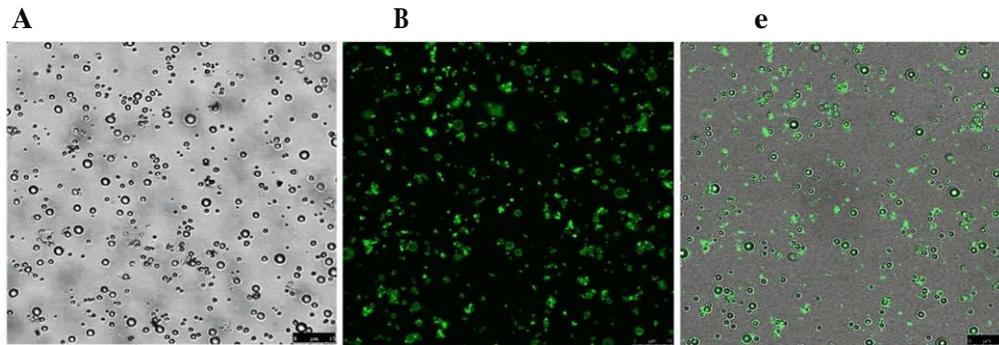
## 7. Resultados

### 1. Caracterización del sistema microburbuja-liposoma.

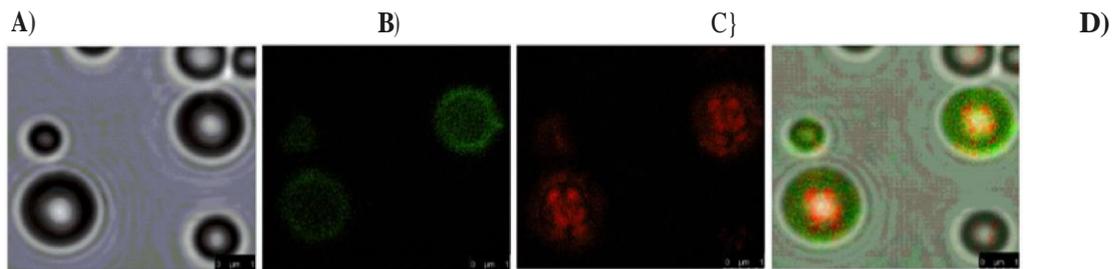
Dado que la conjugación de liposomas a microburbujas ocurre por medio de un enlace biotina-avidina, primeramente, la generación de microburbujas funcionalizadas con avidina fue comprobada mediante imágenes confocales de fluorescencia (Figura 7.1). La figura 7.1A, muestra la imagen en campo claro de microburbujas con una composición de DPPC: DSPE-PEG2000-Biotina (95: 5) a una concentración de 5 mg/ml, en donde se puede observar claramente una forma esférica uniforme y casi sin presencia de aglomeraciones. La identificación de avidina unida al fosfolípido biotilado presente en la monocapa de fosfolípidos fue identificada por la fluorescencia verde emitida por FITC-avidina (figura 7.1B) y su colocalización en la membrana de fosfolípidos fue comprobada mediante la composición de la imagen en campo claro y la imagen de fluorescencia (figura 7.1C).

Una vez comprobada la obtención de microburbujas funcionalizadas con avidina, la unión de liposomas (DSPC: DSPE-PEG2000: DSPE-PEG2000-Biotina: Chol (85.5:5:5) con fenilefrina ó acetilcolina encapsulada, )2 mg/ml) microburbujas fue corroborado mediante imágenes de fluorescencia de microscopia confocal (Figura 7.2). La membrana de fosfolípidos de los liposomas fue teñida con Vybran Dil (fluorescencia roja, Figura 7.2C) y la colocalización de la fluorescencia roja con la fluorescencia verde emitida por las microburbujas funcionalizadas con avidina (fluorescencia amarilla, Figura 7.2D) demostró la unión de los liposomas a las microburbujas, formando de esta manera el sistema microburbuja-liposoma.

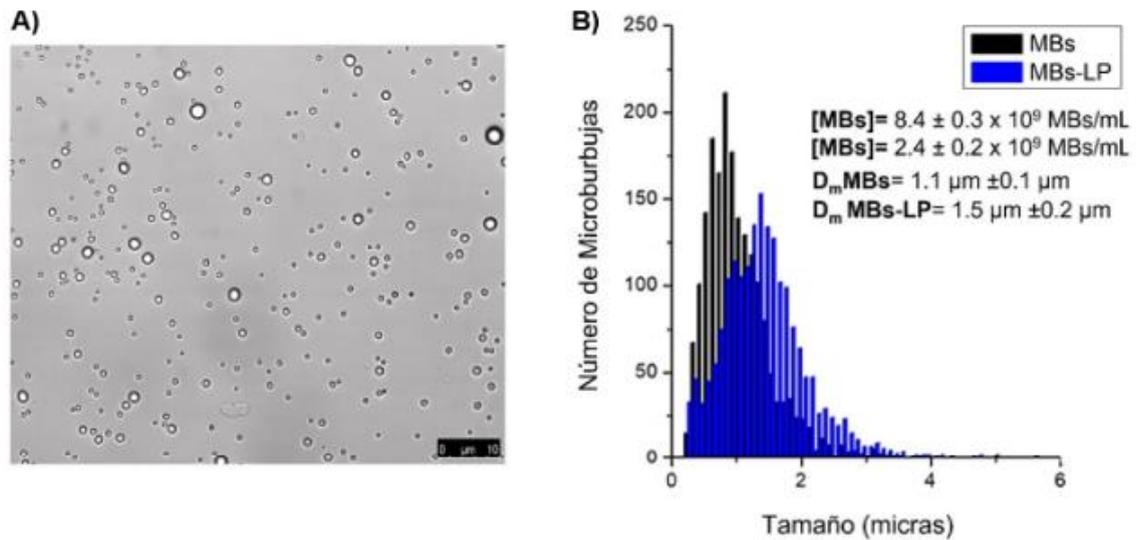
Una vez obtenido el sistema microburbuja-liposoma, se caracterizó su distribución de tamaños mediante análisis de imágenes (Figura 7.3). Las imágenes confocales, mos-



**Figura 7.1: Imágenes confocales de microburbujas funcionalizadas con avidina.** A) Microburbujas en campo claro, B) fluorescencia producida por la unión de FITC-avidina a DSPE-PEG2000-biotina presente en la monocapa de fosfolípidos y C) imagen compuesta de A y B que muestra la colocalización de FITC-avidina en la monocapa de fosfolípidos de las microburbujas. La barra representa una escala de  $10\ \mu\text{m}$ .



**Figura 7.2: Imágenes confocales del sistema microburbuja-liposoma.** A) Imagen en campo claro, B) microburbujas funcionalizadas con FITC-avidina, C) liposomas biotinilados con fenilefrina o acetilcolina encapsulada teñidos con Vybrant Dil y C) imagen compuesta de A y B que muestra la unión de liposomas a microburbujas (fluorescencia amarilla). La barra representa una escala de  $1\ \mu\text{m}$ .



**Figura 7.3: Distribución de tamaños del sistema microburbuja-liposoma.** A) Imagen confocal representativa del sistema microburbuja-liposoma. La barra representa una escala  $10\ \mu\text{m}$ . B) Histogramas de distribución de tamaño que comparan las poblaciones de microburbujas funcionalizadas con avidina y el sistema microburbuja-liposoma.

traron que la unión de los liposomas a las microburbujas no alteró su forma esférica y mantuvo a las microburbujas sin interacciones entre ellas, es decir no se presentaron aglomeraciones (Figura 7.3A). Los histogramas de distribución de tamaños (Figura 7.3B) mostraron diferencias significativas entre microburbujas funcionalizadas con avidina y el sistema microburbuja-liposoma. Se obtuvo un rango de tamaños para ambas poblaciones que osciló entre  $0.2$  y  $6\ \mu\text{m}$ , siendo mayor la distribución para el sistema microburbuja-liposoma. El diámetro medio para las microburbujas funcionalizadas con avidina fue de  $1.1 \pm 0.1\ \mu\text{m}$ , un índice de polidispersidad del 52.6 % y una concentración de  $8.4 \pm 0.36 \times 10^9$  MBs/ml, mientras que para el sistema microburbuja-liposoma los valores obtenidos fueron de  $1.5 \pm 0.1\ \mu\text{m}$ , 85 % y  $2.4 \pm 0.28 \times 10^9$  MBs/ml respectivamente.

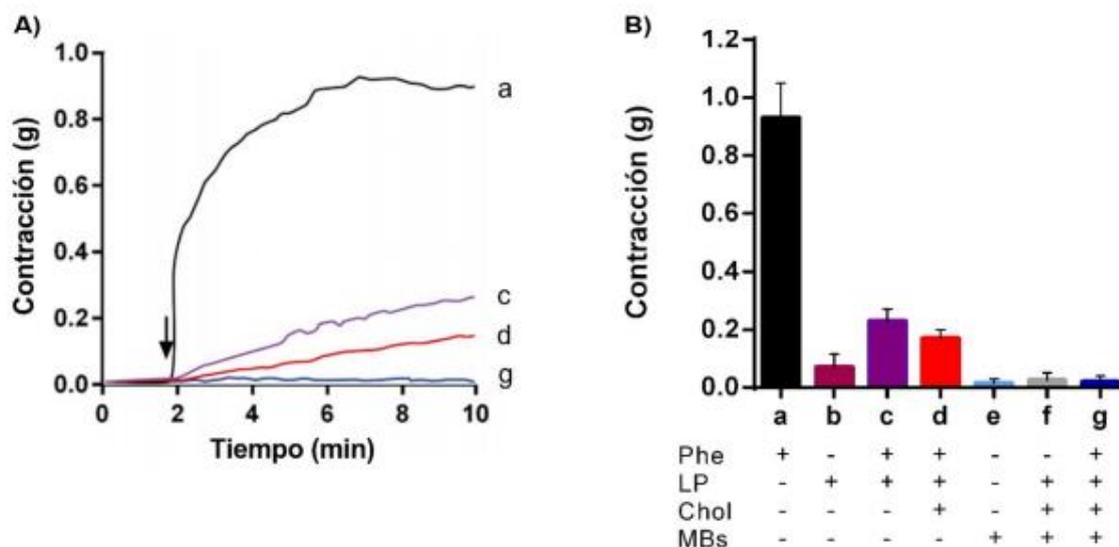
**2.** Efecto de la liberación ex vivo de fenilefrina encapsulada en el sistema microburbuja-liposoma en la respuesta contráctil.

**1.** Estabilidad del encapsulamiento de fenilefrina en el sistema.

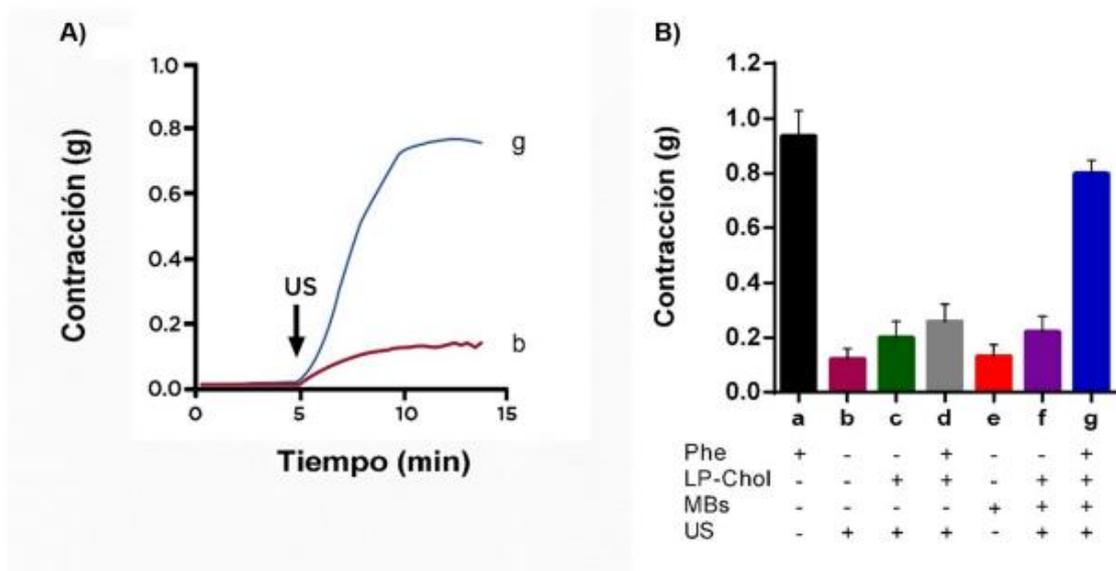
Para caracterizar la estabilidad del encapsulamiento de fenilefrina en el sistema microburbuja-liposoma, se evaluó el efecto de la presencia y ausencia de colesterol en la membrana de los liposomas. Para esto, se evaluó la respuesta de contracción vascular en anillos aórticos (Figura 7.4). La adición de fenilefrina libre ( $1 \mu M$ ) indujo una respuesta contráctil máxima que después de 10 minutos alcanzó un valor de  $0.9 \pm 0.1$  g (a). La adición de liposomas sin colesterol y sin fenilefrina encapsulada generó una respuesta contráctil sostenida de  $0.07 \pm 0.05$  g (b), mientras que la adición de liposomas sin colesterol y con fenilefrina encapsulada generó una respuesta contráctil lenta y lineal que alcanzó un valor máximo de  $0.23 \pm 0.04$  g (e). Por otro lado, la adición de liposomas con colesterol y fenilefrina encapsulada indujo una contracción de  $0.17 \pm 0.03$  g (d) que fue menor en comparación con la respuesta generada cuando esta encapsulada en liposomas sin colesterol. Importantemente, cuando los liposomas con colesterol y con fenilefrina encapsulada fueron unidos a microburbujas para formar el sistema microburbuja-liposoma y este fue puesto en contacto con los anillos aórticos se observó una respuesta contráctil constante y nula con un valor de  $0.02 \pm 0.01$  g (g), que fue similar a la respuesta contráctil generada por la adición de únicamente microburbujas (e) y el sistema microburbuja-liposoma sin fenilefrina encapsulada (f).

**2.** Cambios inducidos en la contracción vascular por la liberación controlada de fenilefrina encapsulada en el sistema microburbuja-liposoma.

Para probar el efecto de la liberación controlada de fenilefrina encapsulada en el sistema microburbuja-liposoma a través de la aplicación de pulsos de ultrasonido, anillos aórticos fueron incubados en diferentes condiciones experimentales (Figura 7.5). Como se muestra en la figura 7.5B, la adición de fenilefrina libre ( $1 \mu M$ ) indujo una contrae-



**Figura 7.4: Estabilidad del encapsulamiento de fenilefrina en el sistema microburbuja-liposoma y su efecto en la respuesta contráctil ex vivo.** A) Trazos típicos que muestran la comparación de la contracción inducida por fenilefrina libre ( $1 \mu M$ ), (a), liposomas (b) liposomas con fenilefrina encapsulada (e), liposomas con colesterol y fenilefrina encapsulada (d) microburbujas (e), sistema microburbuja-liposomas vacío (f) y liposomas con colesterol y fenilefrina encapsulada unidos a microburbujas (g). B) Cuantificación de la contracción inducida por liposomas y el sistema microburbuja-liposoma con y sin Phe encapsulada. Los datos representan el promedio  $\pm$  el error estándar de 4 experimentos independientes.



**Figura 7.5: Contracción vascular inducida por la liberación controlada de fenilefrina encapsulada en el sistema microburbuja-liposoma.** A) Trazos representativos que muestran la comparación de la contracción inducida por la exposición al ultrasonido (b) y fenilefrina encapsulada en el sistema microburbuja-liposoma y liberada de manera controlada por ultrasonido (g). B) Cuantificación de la relajación inducida por la liberación controlada de fenilefrina por pulsos de ultrasonido. Los datos representan el promedio  $\pm$  el error estándar de 4 experimentos independientes.

ción de  $0.9 \pm 0.1$  g (a), la exposición de los anillos aórticos a los pulsos de ultrasonido (30 s) indujo una contracción pequeña de  $0.12 \pm 0.04$  g (b), mientras que la exposición de liposomas sin fenilefrina encapsulada (c), liposomas con fenilefrina encapsulada (d), micro burbujas (e) y liposomas sin fenilefrina conjugados a micro burbujas (f) al ultrasonido generaron contracciones de  $0.20 \pm 0.06$  g,  $0.26 \pm 0.07$  g,  $0.13 \pm 0.04$  y  $0.22 \pm 0.05$  g respectivamente. Sin embargo, de manera importante la adición del sistema microburbuja-liposoma con fenilefrina encapsulada en presencia de los anillos aórticos tras la exposición al ultrasonido, indució una liberación controlada (g) que generó una contracción de  $0.79 \pm 0.05$  g, similar a la respuesta generada por fenilefrina libre.

### 3. Efecto de la liberación ex vivo de acetilcolina encapsulada en el sistema microburbuja-liposoma.

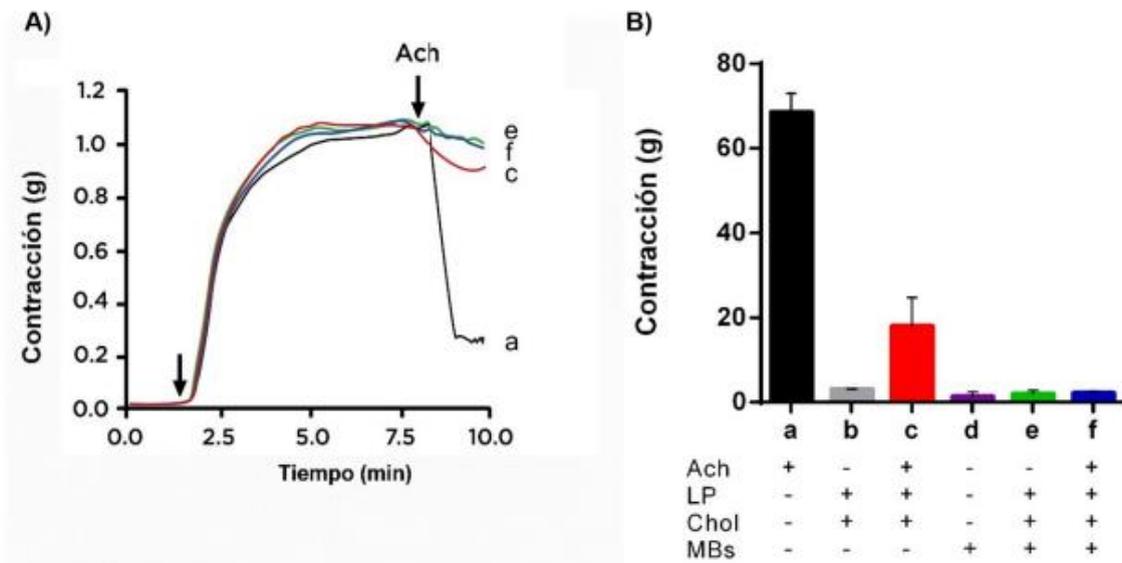
#### 1. Estabilidad del encapsulamiento de acetilcolina en el sistema.

Una vez que se determinó que la presencia de colesterol en la membrana de los liposomas ofrece una mejor estabilidad en el encapsulamiento, para caracterizar el efec-

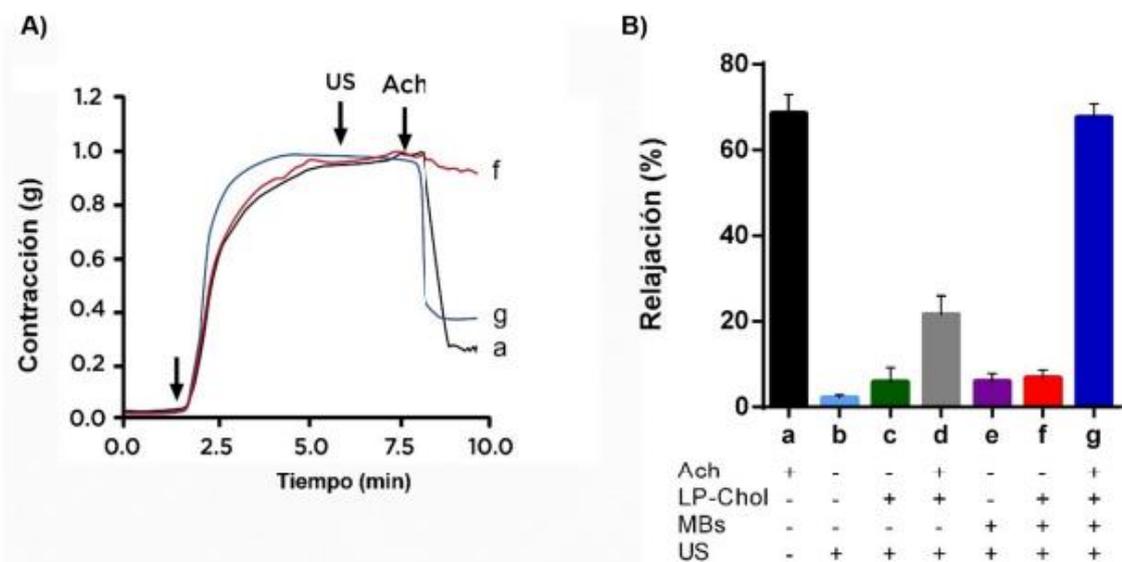
to inducido de acetilcolina encapsulada en la respuesta de relajación se utilizaron este tipo de liposomas (Figura 7.6). Como se muestra en la figura 7.6, la adición de acetilcolina libre ( $1\mu\text{M}$ ) a anillos precontractados con fenilefrina ( $1\mu\text{M}$ ) indujo una respuesta de relajación rápida del  $68.6 \pm 4.3 \%$  (a), mientras que la adición de liposomas con colesterol sin acetilcolina (b), liposomas con colesterol y acetilcolina encapsulada (c), indujeron relajaciones de  $3.1 \pm 0.08 \%$  y  $18.6 \pm 6.6 \%$  respectivamente. Por otra parte la respuesta inducida únicamente por microburbujas (d)  $1.4 \pm 1.1 \%$ , el sistema microburbuja-liposoma sin acetilcolina encapsulada (e)  $1.9 \pm 0.9 \%$  y sistema microburbuja-liposoma con acetilcolina encapsulada (f)  $2.2 \pm 0.5 \%$  fue prácticamente nula.

## 2. Cambios inducidos en la relajación vascular por la liberación controlada de acetilcolina encapsulada en el sistema microburbuja-liposoma.

Para probar el efecto de la liberación controlada de acetilcolina encapsulada en el sistema microburbuja-liposoma a través de la aplicación de pulsos de ultrasonido, anillos aórticos fueron precontractados con  $1\mu\text{M}$  de fenilefrina y después de alcanzar la contracción máxima, los anillos aórticos fueron incubados en diferentes condiciones experimentales (Figura 7.7). Como se muestra en la figura 7.7, la adición de acetilcolina libre ( $1\mu\text{M}$ ) (a) indujo una relajación del  $68.6 \pm 4.4 \%$ , la exposición de los anillos aórticos a los pulsos de ultrasonido (30 s) indujo una relajación pequeña del  $2.1 \pm 0.7 \%$  (b), mientras que la exposición de liposomas sin acetilcolina encapsulada (c), liposomas con acetilcolina encapsulada (d), micro burbujas (e) y el sistema microbur-



**Figura 7.6: Estabilidad del encapsulamiento de acetilcolina en el sistema microburbuja-liposoma y su efecto en la respuesta de relajación ex vivo.** A) Trazos típicos que muestran la comparación de la relajación inducida por acetilcolina libre ( $10\mu\text{M}$ ) (a), liposomas con colesterol sin acetilcolina (b), liposomas con colesterol y acetilcolina encapsulada (c), microburbujas (d), liposomas con colesterol sin acetilcolina encapsulado unidos a microburbujas (e) y liposomas con colesterol y acetilcolina encapsulada unidos a microburbujas (f). B) Cuantificación de la relajación inducida por liposomas y el sistema microburbuja-liposoma con y sin acetilcolina encapsulada. Los datos representan el promedio  $\pm$  el error estándar de 4 experimentos independientes



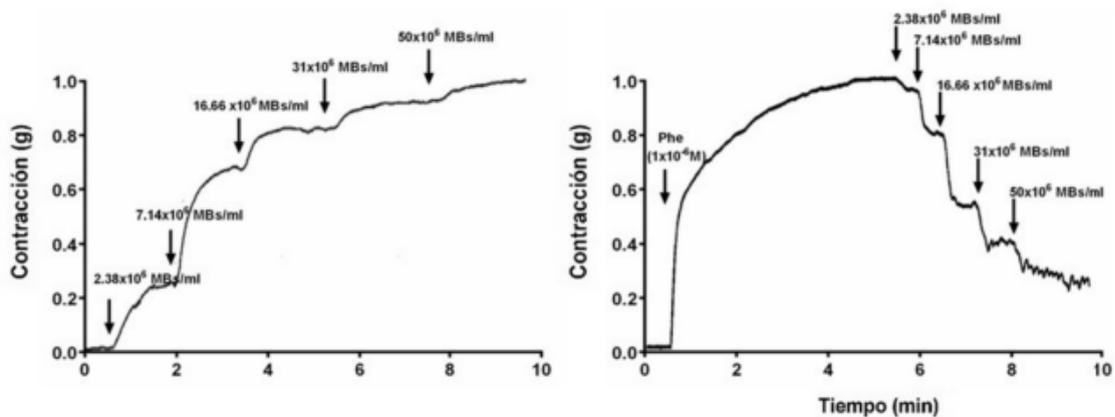
**Figura 7.7: Relajación vascular inducida por la liberación controlada de acetilcolina encapsulada en el sistema microburbuja-liposoma en anillos precontractados por fenilefrina ( $1\mu\text{M}$ ).** A) Trazos representativos que muestran la comparación de la relajación inducida por acetilcolina libre ( $10\mu\text{M}$ , a), liposomas con colesterol sin acetilcolina encapsulado unidos a microburbujas (f) y por la liberación controlada de acetilcolina

encapsulada en el sistema microburbuja-liposoma (g). B) Cuantificación de la relajación inducida por la liberación controlada de acetilcolina por pulsos de ultrasonido. Los datos representan el promedio  $\pm$  el error estándar de 4 experimentos independientes.

buja-liposoma sin acetilcolina encapsulada (f) al ultrasonido generaron respuesta de relajación de  $5.9 \pm 3.3$  %,  $21.59 \pm 4.3$  %,  $5.9 \pm 1.9$  % y  $6.7 \pm 1.8$  % respectivamente. Sin embargo, al igual que para fenilefrina, de manera importante la adición del sistema microburbuja-liposoma con acetilcolina encapsulada en presencia de los anillos aórticos y su posterior exposición al ultrasonido (g) generó una relajación del  $67.6 \pm 3.2$  % que fue similar al porcentaje de relajación de la respuesta producida por acetilcolina libre.

#### 4. Cuantificación de la dosis de fenilefrina y acetilcolina liberada por el sistema microburbuja-liposoma.

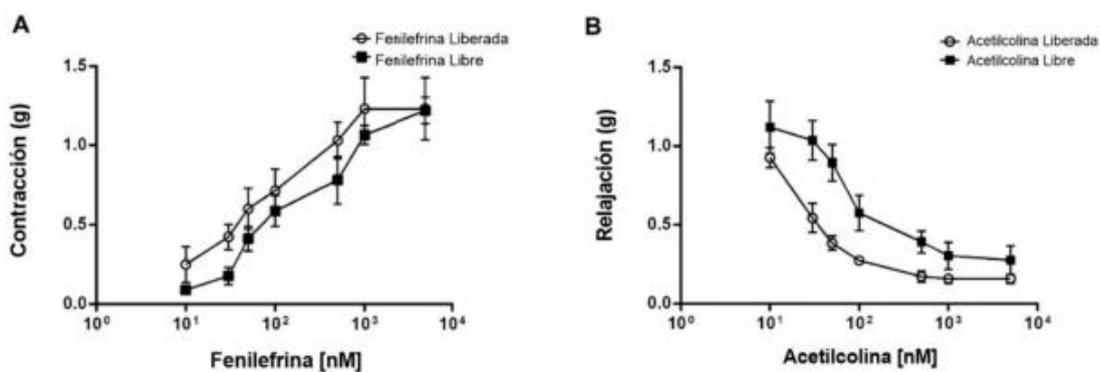
Para determinar la dosis liberada de fenilefrina y acetilcolina encapsulada en el sistema microburbuja-liposoma, anillos aórticos fueron incubados con concentraciones crecientes del sistema, después fueron expuestos simultáneamente al ultrasonido en



**Figura 7.8: Dosis respuesta de los agonistas vasculares en el sistema microburbuja-liposoma cargados.** Trazos representativos de un número creciente del sistema microburbuja-liposoma cargados con fenilefrina (izquierda) o microburbuja-liposoma cargados con acetilcolina (derecha). Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 5 experimentos diferentes.

cada concentración y las respuestas de contracción/relajación fueron cuantificadas. Finalmente, estas respuestas fueron comparadas con los cambios inducidos por la adición de fenilefrina y acetilcolina libre (Figura 7.8). Así, la concentración de fenilefrina para cada volumen del sistema microburbuja-liposoma con fenilefrina encapsulada fue de

0.20, 0.42, 0.56, 0.75 y  $2.50 \times 10^{-7}$  M, mientras que para acetilcolina encapsulada fue de 0.12, 0.37, 0.79, 1.30 y  $8.50 \times 10^{-6}$  M, ambos valores corresponden a una cantidad de 2.38, 7.14, 16.66, 31 y  $50 \times 10^6$  microburbujas-liposomas/ml añadidos a la cámara de órgano aislado. Por lo tanto, el cálculo  $ED_{50}$  de fenilefrina agregado directamente al baño fue de  $3,523 \times 10^{-8} \pm 0.054$  M, mientras que el  $ED_{50}$  para la fenilefrina liberada en el baño de órganos por los pulsos de ultrasonido fue  $3,163 \times 10^{-8} \pm 0.009$  M. El cálculo de acetilcolina  $ED_{50}$  agregado directamente al baño fue  $2,847 \times 10^{-7} \pm 0.0328$  M, mientras que la  $ED_{50}$  para acetilcolina liberada en el baño de órganos por los pulsos de ultrasonido fue  $6,011 \times 10^{-7} \pm 0.1326$  M.



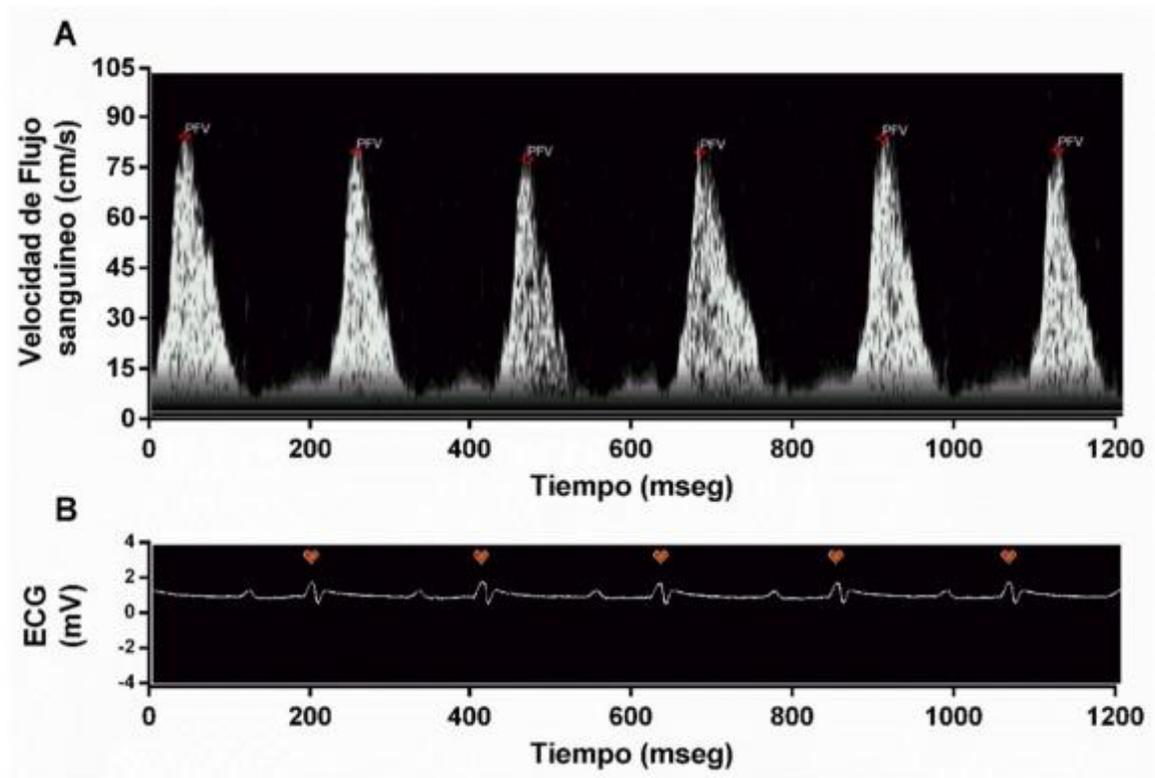
**Figura 7.9: Comparación de curvas dosis-respuesta del sistema microburbuja-liposoma cargados vs la adición directa de fenilefrina/ acetilcolina.** Los cambios vasculares expresados en gramos producido por la aplicación directa de fenilefrina (panel A) o acetilcolina (panel B) (en gris) se compararon el efecto del sistema microburbuja-liposoma cargados (en negro). Cada curva representa la media de  $\pm$  SEM de 5 animales con 4 anillos para cada preparación.

5. Liberación controlada de fenilefrina encapsulada en el sistema microburbuja-liposoma en un modelo in vivo.

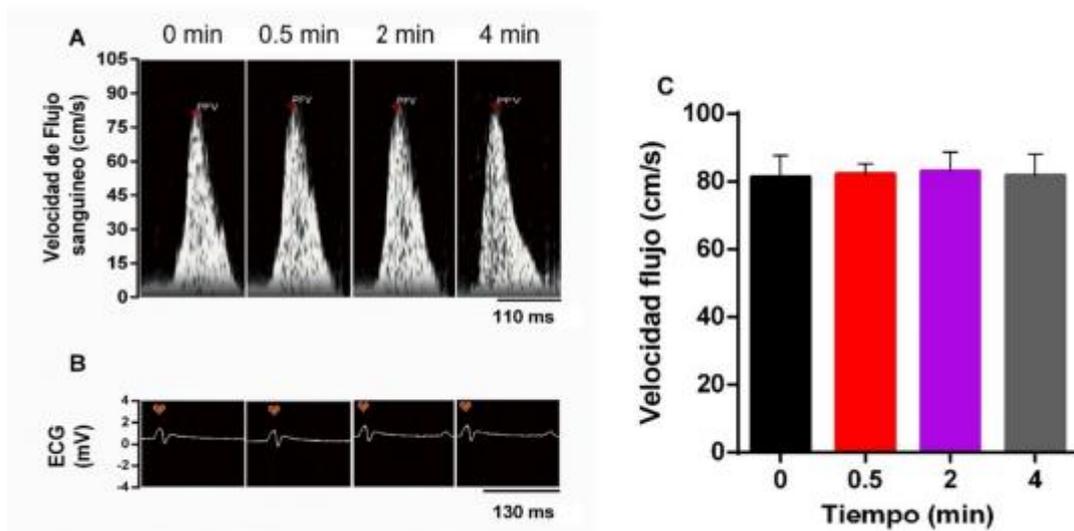
1. Condición basal de la velocidad de flujo sanguíneo en la aorta descendente.

En la figura 7.10 se muestra un trazo representativo de la señal adquirida por el equipo Doppler con en una ventana de tiempo de 1200 mseg. El panel A se observó el perfil de velocidad de flujo sanguíneo de la aorta descendente (espectrograma de color blanco), se toma el valor máximo de cada trazo para promediar la velocidad de flujo sanguíneo; el cual esta representado por el marcador de PFV (por sus siglas en ingles), por otra parte en panel B observamos un ECG durante el mismo intervalo de tiempo que el de la velocidad de flujo, esto con el fin de poder identificar el complejo QRS, cabe

mencionar que para todas las imágenes se aplicó los mismos parámetros de ganancia, intensidad de ruido y contraste así como la misma concentración de microburbujas o microburbujas-liposomas ( $1^{\circ}V \quad 7,32 \times 10^8$  Microburbujas). Una vez establecido los parámetros para la adquisición de la visualización óptima del perfil de velocidad realizamos las mediciones del flujo sanguíneo en condiciones basales en los diversos instantes de tiempo: inmediatamente (después de 30 segundos de exposición al pulso de ultrasoni-



**Figura 7.10: Trazos representativos de la adquisición de las señales del equipo Doppler.** El panel A muestra la velocidad del flujo sanguíneo en el transcurso del tiempo en la aorta descendente, cada trazo (líneas color blanco) ejemplifica un promedio de la velocidad de los eritrocitos, por lo que para el análisis se toma el pico de valor máximo (PFV por sus siglas en inglés). El panel B muestra un ECG tomado de las extremidades del animal con duración de 1.2 s y se identifica el complejo QRS para posteriores análisis. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 5 experimentos diferentes.



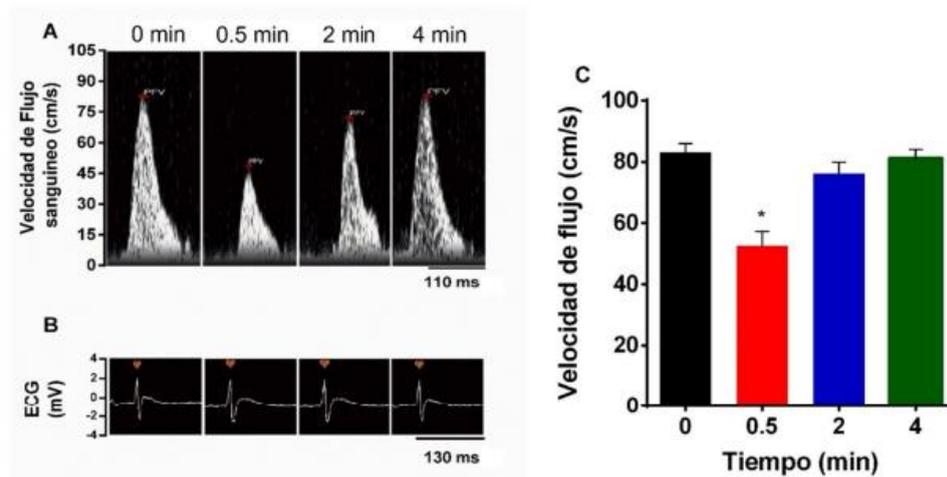
**Figura 7.11: Velocidad de flujo sanguíneo aórtico en condiciones basales.** A) Espectrograma de la velocidad del flujo sanguíneo en diferentes instantes de tiempo 0, 0.5, 2 y 4 min. Donde PFV representa el pico de velocidad máxima y el área de color blanca de cada pulso representa el promedio de la velocidad de los eritrocitos. B) Electrocardiograma (ECG) tomado en los mismos instantes de tiempo con una duración de 1.2s, donde cada marca de corazón identifica el complejo QRS. C) Cuantificación de velocidad de flujo sanguíneo en la aorta descendente. Los datos representan el promedio  $\pm$  el error estándar de 5 experimentos independientes.

do), 2 minutos después del estímulo y 4 minutos después del estímulo dichas mediciones muestran que no hubo diferencias significativas (es importante mencionar que en esta condición no hubo estímulo de ultrasonido ya que nos interesa saber si existe variaciones notables durante todo el tiempo del tratamiento) tal y como se muestra en la figura 7.11A. Los valores de velocidad de flujo sanguíneo aórtico obtenidos a los 0, 0.5, 2 y 4 min no mostraron diferencias significativas y fueron de  $81.2 \pm 6.5$ ,  $82.0 \pm 3.2$ ,  $83.0 \pm 5.6$ ,  $81.7 \pm 6.4$  cm/s, respectivamente.

## 2. Efecto de la administración de fenilefrina en la velocidad de flujo sanguíneo aórtico.

Los cambios en la velocidad de flujo sanguíneo aórtico inducido por fenilefrina libre, fueron evaluados tras la administración de  $20 \mu\text{g/Kg}$  en 5 animales diferentes

(Figura 7.12). Espectrogramas Doppler (Figura 7.12A) y ECG (Figura 7.12B) fueron adquiridos previos a la administración de Phe 0, 0.5, 2 y 4 min después. Los resultados mostrarán que 0.5 min después de la administración hubo una reducción significativa en la velocidad de flujo sanguíneo, el cual fue asociado con una disminución en el pico de velocidad máxima, que después de 2 y 4 min se observa como regresó a condiciones basales. Los valores de velocidad del flujo sanguíneo para 0, 0.5, 2 y 4 min fueron de  $83.2 \pm 23$ ,  $52.5 \pm 48$ ,  $76.1 \pm 3.7$ ,  $81.0 \pm 3.0$  cm/s respectivamente (Figura 7.12C).

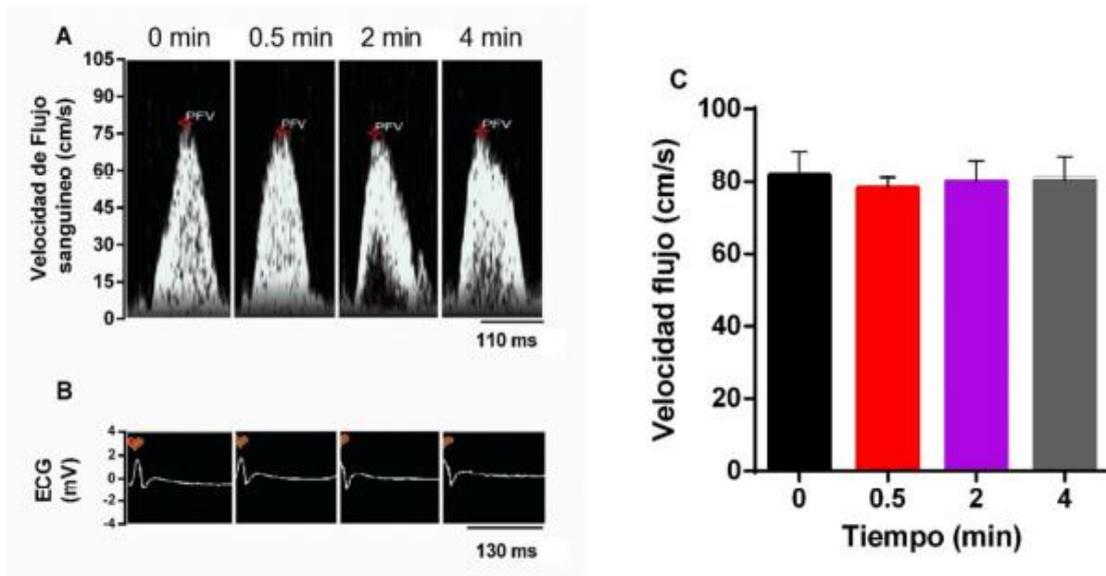


**Figura 7.12: Cambios en la velocidad de flujo sanguíneo aórtico inducidos por la administración de 20 µg/Kg de fenilefrina libre.** A- B), Espectrograma de la velocidad del flujo sanguíneo y ECG adquiridos previos a la administración de fenilefrina 0 min, y 0.5, 2 y 4 min después de la administración. C) Cuantificación de los cambios en la velocidad de flujo sanguíneo. Los datos representan  $\pm$  el error estándar de 5 experimentos diferentes.

### 3. Efecto de la liberación controlada de fenilefrina encapsulada en el sistema microburbuja-liposoma en la velocidad de flujo sanguíneo aórtico.

Una vez demostrado que la administración de fenilefrina libre es capaz de inducir cambios en la velocidad de flujo sanguíneo, se evaluó el efecto de la exposición al ultrasonido en la velocidad de flujo sanguíneo (Figura 7.13). Espectrogramas Doppler (Figura 7.13A) y ECG (Figura 7.13B) fueron adquiridos previos a la exposición de ultrasonido (0 min), posteriormente, la región aórtica fue expuesta al ultrasonido durante (30s) y mediciones de flujo fueron adquiridas a los 0.5, 2 y 4 min después de la exposición. Los valores de velocidad de flujo sanguíneo aórtico obtenidos previos a la exposición

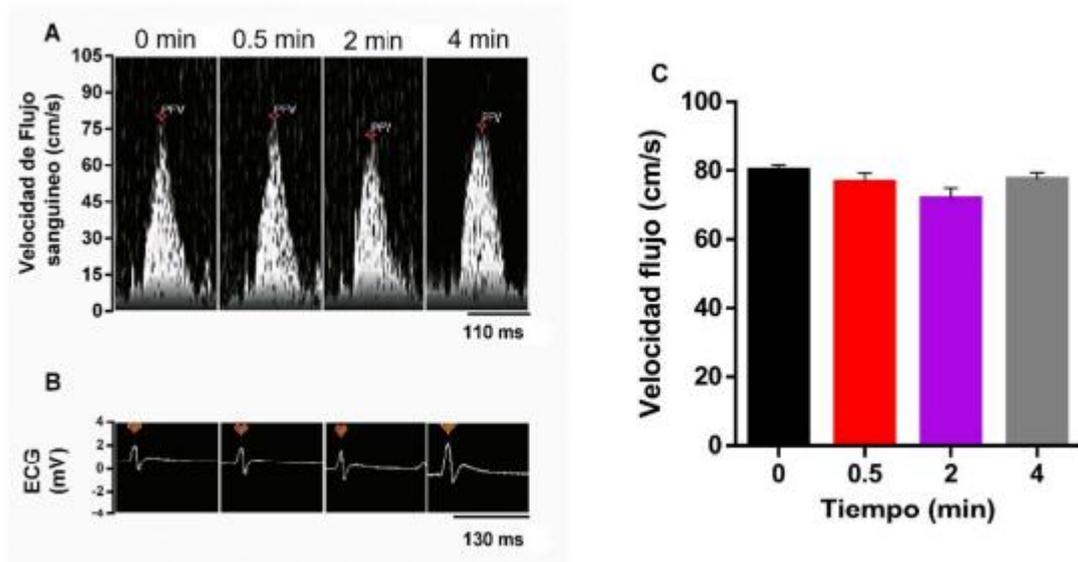
y después de la exposición al ultrasonido no mostraron diferencias significativas, para 0, 0.5, 2 y 4 min, la velocidad de flujo fue de  $81.7 \pm 6.5$ ,  $78.1.0 \pm 3.2$ ,  $80.0 \pm 5.6$ ,



**Figura 7.13: Cambios en la velocidad de flujo sanguíneo aórtico inducidos por la exposición de la región aórtica al ultrasonido.** A - B) Espectrograma de la velocidad del flujo sanguíneo y ECG adquiridos previos a exposición al ultrasonido (0 min,) y 0.5, 2 y 4 min después de la exposición. C) Cuantificación de los cambios en la velocidad de flujo sanguíneo. Los datos representan el promedio  $\pm$  el error estándar de 5 experimentos independientes.

$80.4 \pm 6.4$  cm/s, respectivamente. Luego de analizar el comportamiento de la velocidad de flujo al exponer la región aórtica al ultrasonido, se evaluó el efecto en la velocidad de flujo aórtico generado por la exposición del sistema microburbuja-liposoma sin fenilefrina encapsulada al ultrasonido (Figura 7.14). Para esto  $2.4 \times 10^8$  MBs con 4 mg de liposomas conjugados, fueron administrados por la arteria femoral y posteriormente se expuso la región aórtica a pulsos de ultrasonido para inducir la disrupción del sistema microburbuja-liposoma. Espectrogramas Doppler (Figura 7.14A) y ECG (Figura 7.14B) fueron adquiridos a los 0 min y 0.5, 2, 4 min después de la exposición. No hubo diferencias significativas en las velocidades de flujo, las cuáles fueron de  $80.1 \pm 1.5$ ,  $76.7 \pm 2.6$ ,  $71.8 \pm 3.1$  y  $77.4 \pm 2.0$  cm/s para 0, 0.5, 2 y 4 min. Finalmente, una vez demostrado que el ultrasonido y la combinación de ultrasonido con el sistema microburbuja-liposoma no inducen variaciones en la velocidad de flujo sanguíneo aórtico, se procedió a evaluar el efecto de la liberación controlada de fenilefrina encapsulada en

el sistema microburbuja-liposoma con las mismas condiciones descritas para el sistema microburbuja-liposoma sin encapsulamiento. Importantemente, los resultados mostrarán que 0.5 min después de la liberación controlada de fenilefrina inducida



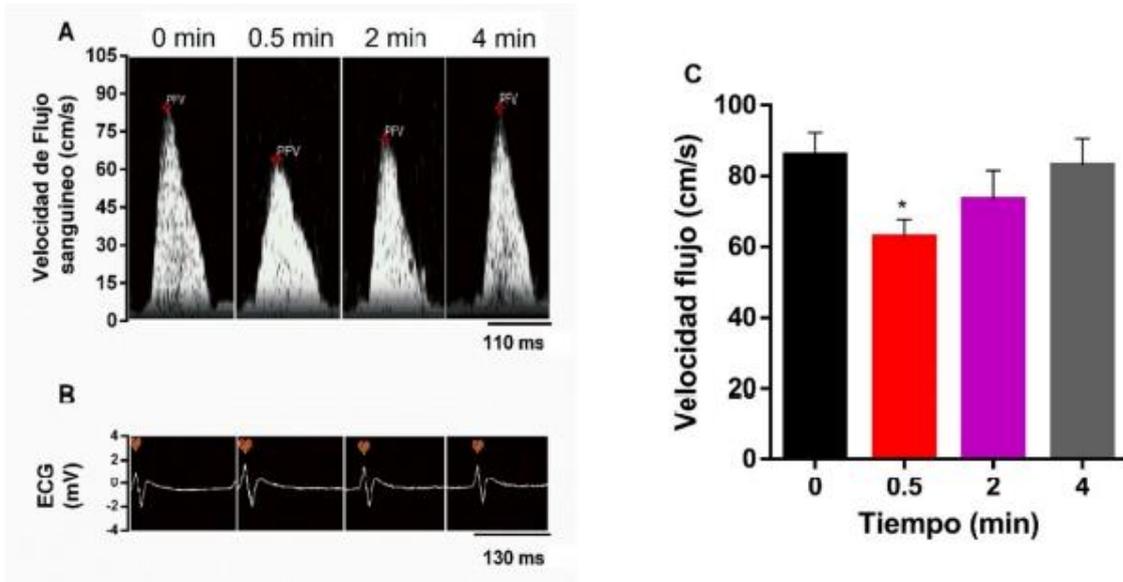
**Figura 7.14:** Cambios en la velocidad de flujo sanguíneo aórtico inducidos por la administración del sistema microburbuja-liposoma sin fenilefrina encapsulada y a su posterior exposición al ultrasonido. A - B) Espectrograma de la velocidad del flujo sanguíneo y ECG adquiridos previos a exposición al ultrasonido (0 min) y 0.5, 2 y 4 min después de la exposición. C) Cuantificación de los cambios en la velocidad de flujo sanguíneo. Los datos representan el promedio  $\pm$  el error estándar de 5 experimentos independientes.

por la exposición al ultrasonido indujo una reducción del 26.89 % en la velocidad de flujo sanguíneo, que después de 2 min fue recuperándose lentamente hasta llegar a condiciones basales (Figura 7.15A). El valor de velocidad de flujo sanguíneo previos a la administración del sistema microburbuja-liposoma fue de  $85.9 \pm 6.3$  cm/s y para 0.5, 2 y 4 min después de la liberación controlada fue de  $62.8 \pm 4.9$ ,  $73.4 \pm 8.1$  y  $83.1 \pm 7.6$  cm/s respectivamente (Figura 7.15C).

#### 4. Comparación de la liberación controlada de fenilefrina en el sistema microburbuja-liposoma vs no encapsulada.

Una vez que se demostró que la liberación controlada de fenilefrina induce una reducción del flujo sanguíneo a los 0.5 min después de la liberación, para resaltar la

importancia de la utilización del sistema microburbuja-liposoma como sistema de liberación controlada se agruparon todas las condiciones probadas en este instante de tiempo (Figura 7.16). Los resultados mostraron que las velocidades de flujo sanguíneo no se ven alteradas ni por la aplicación del ultrasonido ( $78.1 \pm 3.2$  cm/s, [c]), la combinación de ultrasonido + sistema microburbuja-liposoma sin fenilefrina ( $76.7 \pm 26$  cm/s)



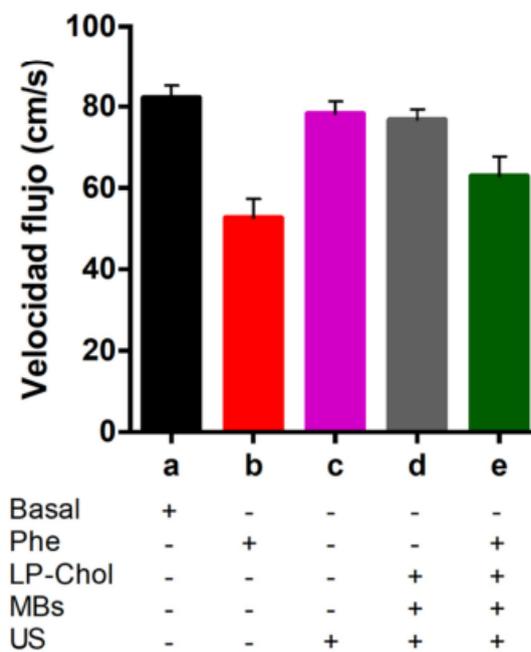
**Figura 7.15: Cambios en la velocidad de flujo sanguíneo aórtico inducidos por la liberación controlada de fenilefrina encapsulada en el sistema microburbuja-liposoma.** A - B) Espectrograma de la velocidad del flujo sanguíneo y ECG adquiridos previos a exposición al ultrasonido (0 min) y 0.5, 2 y 4 min después de la exposición. C) Cuantificación de los cambios en la velocidad de flujo sanguíneo. Los datos representan el promedio  $\pm$  el error estándar de 5 experimentos independientes.

cm/s, [d]) comparadas con el flujo en condiciones basales ( $82.0 \pm 38$  cm/s, [a]). Sin embargo, la liberación controlada de una dosis de  $6.011 \times 10^{-7} \pm 0.1326$  M de fenilefrina encapsulada en el sistema microburbuja-liposoma ( $62.8 \pm 4.9$  cm/s, [e]) indujo una reducción comparable a la producida por la administración de  $20 \mu\text{g/Kg}$  ( $52.5 \pm 4.8$  cm/s, [b]).

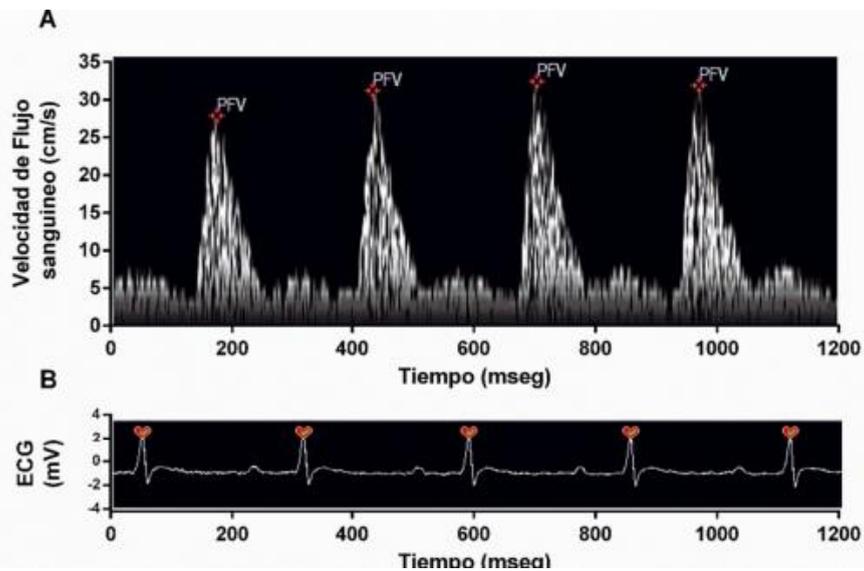
6. Respuesta de liberación controlada en un modelo de trombosis femoral.

1. Medición de la velocidad de flujo sanguíneo en la femoral.

Para la caracterización de la velocidad de flujo sanguíneo en la arteria femoral, en condiciones basales, se posicionó una sonda de ultrasonido doppler dicha arteria por debajo de la arteria epigástrica. En la figura 7.17 observamos un trazo representativo de las mediciones de la velocidad de flujo en la femoral y observamos que no existe diferencias en el transcurso de 7 días, de igual manera no se apreciaron cambios significativos a la hora de aplicar únicamente el ultrasonido en la femoral.



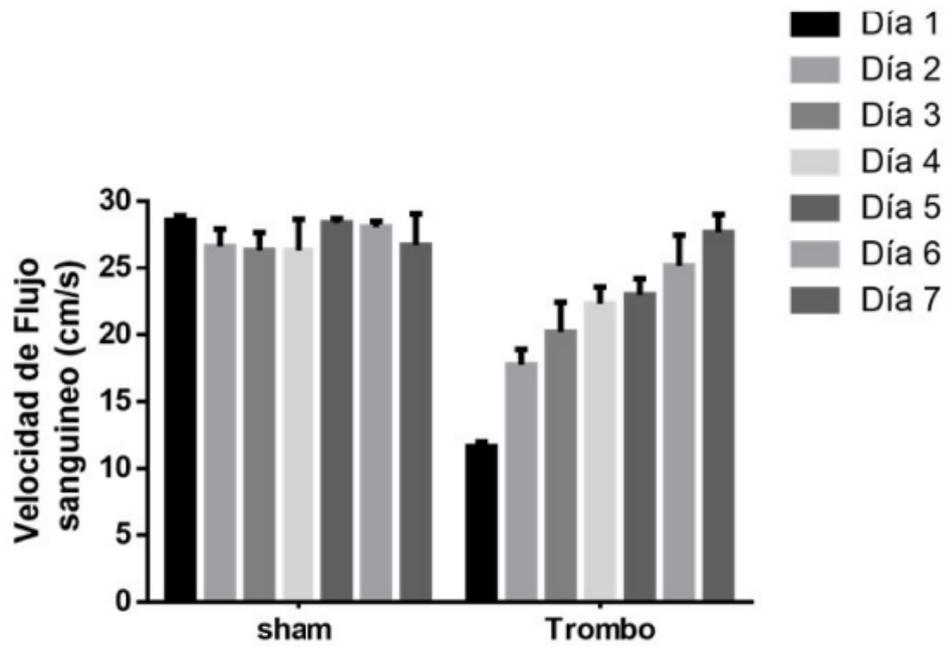
**Figura 7.16: Gráfica comparativa de las velocidades de flujo el instante inmediato (30 seg) tras la aplicación del estímulo.** La condición basal (a) con una velocidad de  $82.0 \pm 3.1$  cm/s,  $52.5 \pm 4.8$  cm/s para fenilefrina libre (b),  $78.1 \pm 3.2$  cm/s para ultrasonido (c),  $76.7 \pm 2.6$  cm/s para microburbujas-liposomas sin fenilefrina (d),  $62.8 \pm 4.9$  para fenilefrina encapsulada en el sistema microburbuja-liposoma (e). Los datos representan el promedio  $\pm$  el error estándar de 5 experimentos independientes.



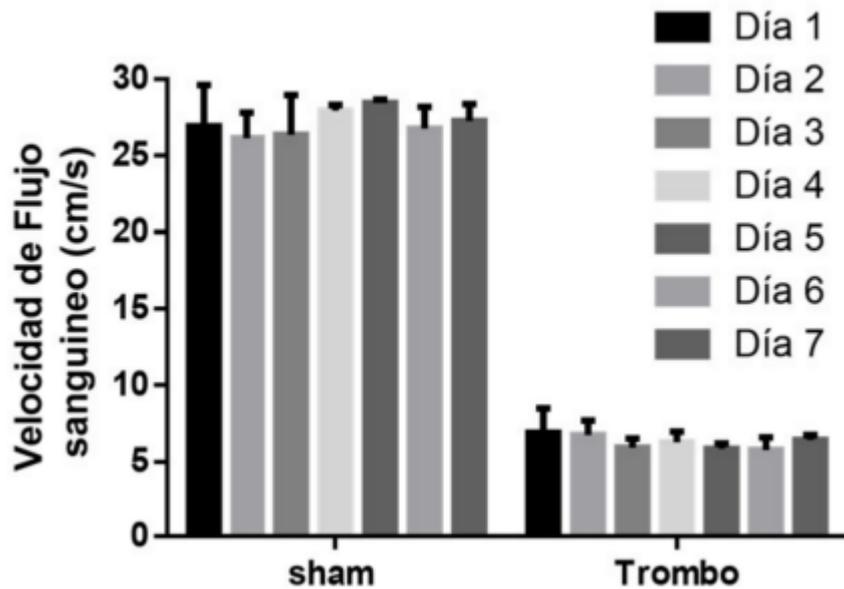
**Figura 7.17: Trazos representativos de la adquisición de las señales del equipo Doppler en la femoral.** El panel A muestra la velocidad del flujo sanguíneo en el transcurso del tiempo en la femoral común, cada trazo (líneas color blanco) ejemplifica un promedio de la velocidad de los eritrocitos, por lo que para el análisis se toma el pico de valor máximo (PFV por sus siglas en inglés) para representar el valor máximo en cada pulso sanguíneo. El panel B muestra un ECG tomado de las extremidades del animal con duración de 1.2 s identificando el complejo QRS.

Una vez que se caracterizó la velocidad de flujo en condiciones basales se corroboró que no existiera cambios en la velocidad en la condición sham con la finalidad de confirmar que la intervención quirúrgica no afectaba a la velocidad de flujo, observando que no hubo variaciones significativas en el transcurso de 7 días (figura 7.18). Posteriormente se continuó con la caracterización de la concentración adecuada para generar un trombo en la femoral con  $FeCl_3$ , se probaron dos condiciones diferentes 20 % y 50 % v/w primeramente observamos que el TTO fue de  $18 \text{ min} \pm 1.1 \text{ min}$  así mismo observamos que en la concentración de 20 % existía una reducción de la velocidad de flujo sin embargo el flujo se iba recuperando poco a poco tras el paso de los días llegando a condiciones basales al 7 día, tal y como se muestra en la figura 7.18. Por lo que se incrementó a 50 % v/w la concentración, y se observó que la velocidad de flujo igualmente se ve reducida a la hora de generar el trombo en la femoral. Existen dos principales diferencias la primera es que la TTO fue reducida a  $10 \text{ min} \pm 0.9 \text{ min}$  y la segunda es que al aplicar

una concentración más elevada la velocidad permanece constante al menos durante



**Figura 7.18:** Variaciones en la velocidad de flujo sanguíneo en condiciones sham y trombo a 20 % v/w. El primer grupo es la condición sham durante 7 días cada barra representa el promedio de la velocidad en un día. El segundo grupo es el grupo experimental con el trombo presente. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos diferentes.



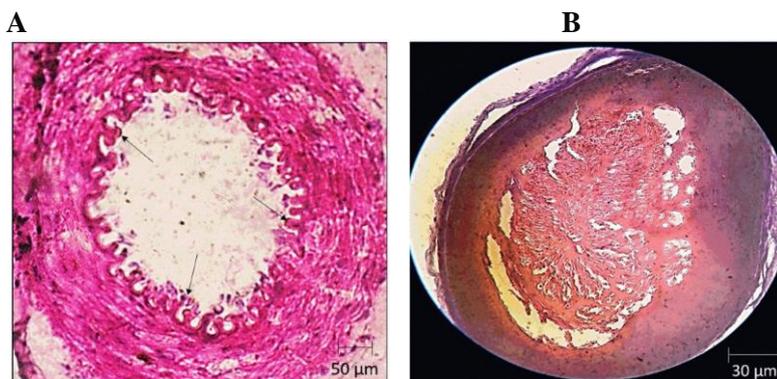
**Figura 7.19: Variaciones en la velocidad de flujo sanguíneo en condiciones sham y trombo a 50 % v/w.** El primer grupo es la condición sham durante 7 días cada barra e presenta el promedio de la velocidad en un día. El segundo grupo es el grupo experimental con el trombo presente. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 5 experimentos diferentes.

días tras la generación de la trombosis tal y como observamos en la figura 6.19, de igual manera la condición sham no presenta variaciones significativas durante 7 días.

### 1. Caracterización histológica del trombo mediante tinción hematoxilina-eosina.

Para corroborar la presencia del trombo se realizaron cortes histológicos para confirmar por otro método la aparición del trombo en la arteria. Dicho corte fue realizado en criostato y teñido con la técnica de hematoxilina-eosina para identificar de manera clara el endotelio y la luz del vaso (figura 7.20). La cual nos muestra en el panel A un corte transversal de la arteria femoral en condiciones basales (sham), podemos observar claramente el tejido endotelial dentro de la luz del vaso, siendo éste señaladas por las flechas. En el panel B observamos un trombo en la arteria femoral, claramente se observa que se pierde la irregularidad del endotelio, afectando de manera clara a la estructura y forma de la arteria, de igual manera se aprecia que la luz del vaso está en su mayor parte obstruida por diversos componentes tales eritrocitos, glóbulos blancos

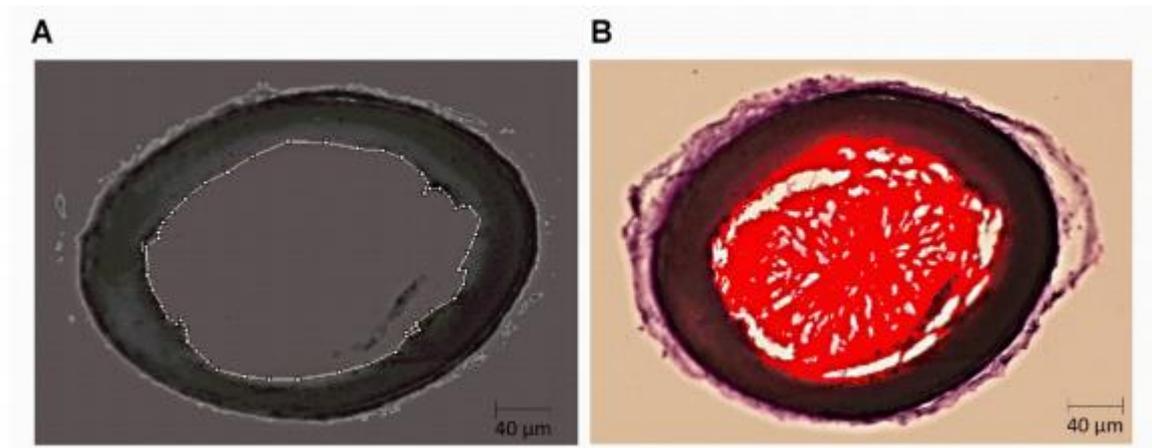
y plaquetas (no visibles en esa escala de zoom) los cuales son elementos esenciales para la formación del trombo.



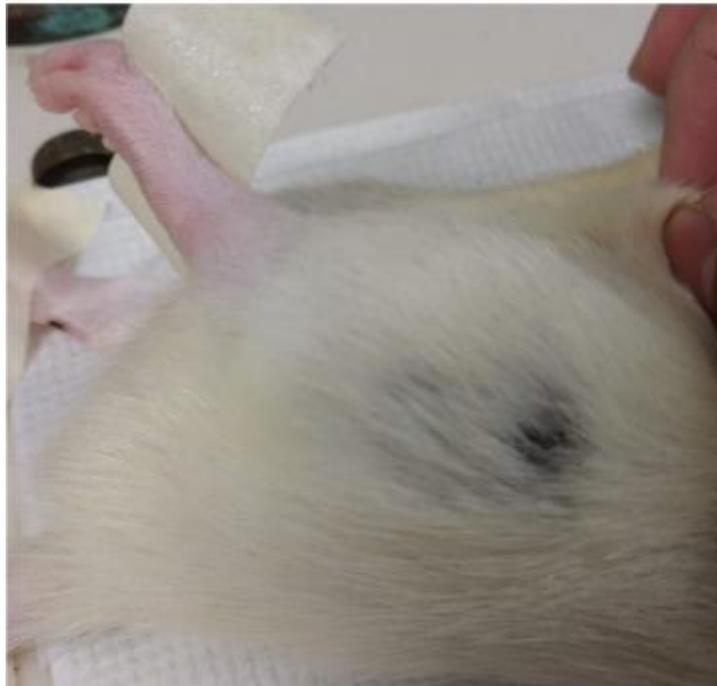
**Figura 7.20: Cortes histológicos de la arteria femoral con tinción de Hematoxilina & Eosina.** El panel A nos muestra un corte histológico transversal de la femoral en la cual se puede ver la luz del vaso, así mismo se muestra el tejido endotelial (flechas negras). El panel B igualmente es un corte histológico de la femoral 24 hrs después de la generación del trombo, se observa una oclusión casi completa de la luz del vaso. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 5 experimentos diferentes.

## 2. Cuantificación del tamaño del trombo en la arteria femoral.

Posteriormente definimos el porcentaje de oclusión en la luz del vaso, mediante análisis de imágenes mediante el programa de ImageJ, primeramente se detectó el contorno de la luz del vaso tal y como se muestra en la figura 7.21 panel A, una vez que se identificó el contorno del vaso se estimó el área dentro de dicho contorno, posteriormente se localizó el trombo dentro del vaso a través de un procesamiento de imágenes en formato RGB, detectando el trombo y calculando su área (panel B), para que posteriormente normalizar con respecto al área total de la luz de vaso y expresando en porcentaje el área de oclusión generada por la trombosis. El área de oclusión generada por el trombo fue de  $72.41\% \pm 3.14\%$  Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 5 experimentos diferentes.



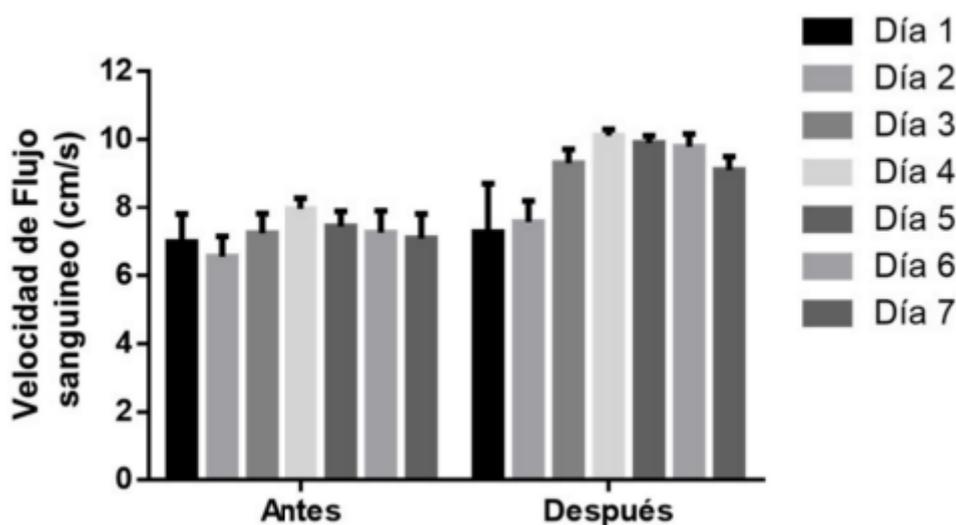
**Figura 7.21: detección del area de los cortes histológicos de la arteria femoral con tinción Hematoxilina & Eosina.** El panel A nos muestra un corte histológico transversal de la femoral en el cual se estima el area de la luz del vaso. El panel B nos muestra la detección del trombo en el interior del vaso ( color rojo). El área de oclusión generado por el trombo fue de  $72.41\% \pm 3.14\%$  . Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 5 experimentos diferentes.



**Figura 7.22: Daño causado por el alto tiempo de exposición al ultrasonido.** No se observaron diferencias entre el daño a 1 min y 2 min de exposición. El animal fue sacrificado dada las condiciones de daño en la extremidad, se repitió 3 veces por cada tiempo establecido.

### 3. Estimación de los parámetros del ultrasonido en el modelo de trombosis.

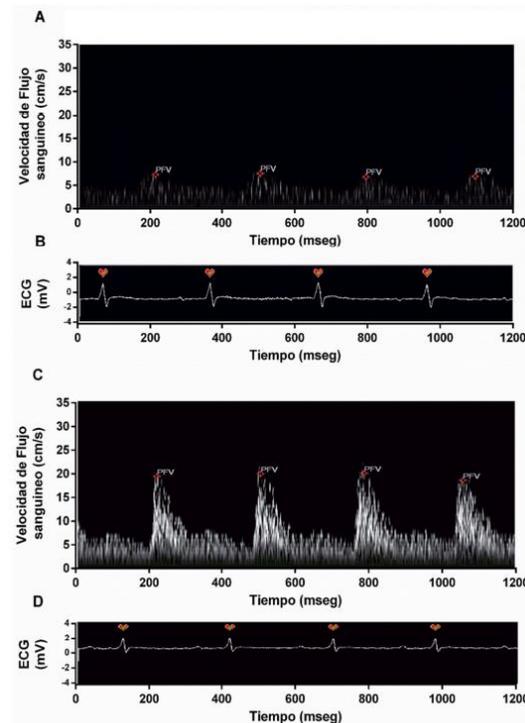
Debido a que los pulsos de ultrasonido producen ligeros cambios en la velocidad de flujo sanguíneo en la patología de trombosis, decidimos evaluar si el uso de ultrasonido combinado con microburbujas podría producir algún cambio significativo en la velocidad de flujo, es decir si es capaz de poder restaurar el flujo sanguíneo. Por lo que se realizó el trombo y 24 hrs después se tomó una primera medición (basal) posteriormente se administró 200  $\mu$ l de microburbujas administrados mediante la vena en la cola y



**Figura 7.23: Variaciones en la velocidad de flujo sanguíneo en la arteria femoral con trombosis antes y después de la aplicación de los pulsos de ultrasonido.** El primer grupo es la condición antes de la aplicación del estímulo de ultrasonido cada barra representa el promedio de la velocidad en un día. El segundo grupo es el grupo experimental tras la aplicación de ultrasonido observando que existe ligeros cambios en el incremento de la velocidad a partir del cuarto día. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 5 experimentos diferentes.

simultáneamente se aplicó los pulsos de ultrasonido en la región en la cual se generó el modelo de trombosis, inmediatamente después se capturó la señal de velocidad de flujo sanguíneo. Tal y como podemos observar en la figura 7.24, 24 horas después de la generación del trombo el flujo es mínimo, sin embargo al aplicar las microburbujas conjuntamente con los pulsos de ultrasonidos se observó que existe una recuperación del flujo sanguíneo (figura 7.24C), siendo este valor de 21 cm/s, normalizando con respecto

al flujo basal (cm/ s) obtenemos una recuperación de la velocidad de flujo del 78.83 %. Logrando una liberación controlada de las microburbujas con un efecto ligero en la recuperación del flujo sanguíneo.



**Figura 7.24: Trazos representativos de la adquisición de las señales del equipo Doppler en la trombosis y posterior al tratamiento de microburbujas + ultrasonido.** A) muestra la velocidad del flujo sanguíneo en el transcurso del tiempo en la femoral común con trombosis, cada trazo ejemplific a un promedio de la velocidad de los eritrocitos representado por PFV en cada pulso sanguíneo. C) muestra la velocidad del flujo sanguíneo en el transcurso del tiempo en la femoral común con trombosis tras haber aplicado el tratamiento combinado de microburbujas + ultrasonido, observando que existe un incremento en el PFV en cada pulso sanguíneo recuperando de manera parcial el flujo sanguíneo en la femoral. B) y D) muestra un ECG tomado de las extremidades del animal con duración de 1.2 s identificando el complejo QRS.

## 8. Discusión

EL uso del ultrasonido y la destrucción de microburbujas dirigidas por ultrasonido (UTMD) han sido utilizadas por varios investigadores para la administración de genes y fármacos al sistema cardiovascular [47-52]. Actualmente existen microburbujas aprobadas por la Food Drug Administration (FDA), dichas microburbujas contienen gases fluorados, y su recubrimiento puede ser de lípidos, proteínas o polímero los cuales ayudan a controlar el tamaño de la microburbuja, así como a mantener su estabilidad, este auge del uso de microburbujas hicieron que fueran llevadas a ser usadas en la liberación de fármacos cardiovasculares, recordemos que dicha liberación se debe a varios fenómenos físicos y térmicos descritos ya previamente en la literatura: cavitación, fuerza de radiación [54,55] y temperatura. [57,58].

Partiendo de todo esto diversos autores han propuesto la combinación híbrida de un sistema de liberación conformado mediante liposomas enlazados en la superficie de la microburbuja asistidos con ultrasonido. Brindando diversas ventajas con respecto a otros sistemas de administración de fármacos, incluyendo: 1) La preparación de las microburbujas está bien establecida y están aprobados como agentes de contraste para el diagnóstico emitido por ultrasonido. 2) Las microburbujas cargadas con drogas pueden ser atacadas y destruidas localmente por el ultrasonido aplicados sobre la superficie de la piel en el sitio de interés, causando la liberación localizada de los fármacos cargados [59,60] y 3) Las microburbujas en combinación con el ultrasonido pueden aumentar la permeabilidad de muchas barreras fisiológicas como la barrera hematoencefálica, el endotelio capilar o la membrana celular [61].

En el presente estudio, el sistema microburbuja-liposoma cargado con un agonista vascular fue empleado para evaluar el efecto de UMMD en anillos aórticos en un modelo ex vivo para posteriormente aplicarlo en un modelo in vivo. El efecto vascular fue

evaluado en tiempo real durante la liberación del agonista encapsulado. Demostrando que dos fármacos vasculares hidrófilos (fenilefrina y acetilcolina), cargados en liposomas y conjugados a microburbujas fueron liberados con éxito mediante pulsos de ultrasonido y que dicha contracción vascular fue promovida por dichos fármacos. Nuestro sistema microburbuja-liposoma ha demostrado que es capaz de generar una respuesta ante un pulso acústico así como también de una liberación del fármaco ante dichos estímulos obteniendo resultados comparables con los de la literatura, tal es el caso de Kheirloomoom et al. que logró conjugar liposomas a las microburbujas y demostró que los liposomas unidos a microburbujas oscilaban como agentes de contraste en respuesta a un pulso acústico [44]. Por otra parte Klibanov et al. informaron que la exposición ante pulsos de ultrasonido de sistema microburbuja-liposoma resultó en la destrucción completa de las microburbujas y desencadenó la liberación de una fracción significativa de la trombina atrapada para acelerar la coagulación de la sangre *in vitro* [52]. Así mismo se logró demostrar la entrega exitosa del fármaco anticancerígeno doxorubicina (DOX) por la exposición de ultrasonido en un modelo de cultivo celular de melanoma [41], cabe mencionar que en nuestro 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 [102].

Al igual que Geers [28], Kheirloomoom [44], 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. Otro aspecto importante de nuestro sistema microburbuja-liposoma fue el uso de polietilenglicol (PEG) dichos lípidos que se incorporan a la cáscara lipídica que rodea a la microburbuja y en especial a los liposomas. El propósito del PEG es evitar la unión de las microburbujas a proteínas inespecíficas y otros materiales que de otro modo acortarían la vida media de los acarreadores [103].

Por otra parte la incorporación del colesterol como componente de la membrana de los liposomas rigidiza dicha membrana brindando mayor estabilidad, sin embargo brinda también mayor rigidez por lo que es relevante determinar la concentración adecuada

para poder liberar adecuadamente el contenido de los liposomas. En nuestros experimentos fuimos capaces de observar una liberación controlada del fármaco encapsulado en los liposomas unidos a las microburbujas concluyendo que el colesterol es parte importante en la prevención y en la fuga del agonista encapsulado en los liposomas y que está respaldada por la demostración de fugas reducidas de carboxfluoresceína en solución de bufer mediante la adición de 40 % de colesterol a los liposomas EPC [104]. De igual manera, diversos autores mencionados con anterioridad han trabajado en la encapsulación de diversos fármacos logrando encapsular moléculas hidrofóbicas en su sistema microburbuja-liposoma y liberarla ante un estímulo de ultrasonido, dichos estudios han sido sobre cultivos y en vitro pero sin la aplicación directa del ultrasonido, previamente en nuestro laboratorio se logro observar la liberación de una molécula ante la exposición de pulsos de ultrasonido logrando demostrar que el tiempo de exposición del ultrasonido desempeña un papel importante en el daño del tejido vascular. Concluyendo que los tiempos de exposición inferiores a 2 minutos no estaban asociados con la disfunción endotelial, sin embargo a tiempos mayores el daño era visible. También demostramos que la concentración de microburbujas se asoció con una relajación deteriorada, y encontramos daños vasculares importantes pero sólo a concentraciones de microburbujas mayores al 1 %, los resultados muestran que a condiciones no adecuadas existe daños vasculares generados por UMMD y que se traduce en una respuesta de relajación alterada sin efecto en la contracción [30]. Así mismo existe en la literatura reportes de apariciones de hemolisis, fugas microvasculares, rupturas capilares, hemorragias [105-107] lesiones en cardiomiocitos [108,109], infiltraciones inflamatorias de células y contracciones ventriculares prematuras [110].

Tomando todo esto en cuenta, se hicieron las modificaciones pertinentes para adaptar y optimizar las condiciones experimentales y nuestros resultados confirman que el daño endotelial esta ligado con los parametros tanto de la concentración de microburbujas como los parametros empleados del ultrasonido; así mismo demuestra que es posible encapsular una molécula hidrofílica en el sistema microburbuja-liposoma y liberarla de manera controlada mediante pulsos de ultrasonido en un sistema ex vivo expuesto directamente a los pulsos de ultrasonido. Concluyendo que el alcance de los bioefectos no deseados puede acentuarse mediante una combinación de varios factores, como la alta concentración de agente de contraste, el método administración del farmaco, el transductor del sistema de ultrasonido y los ajustes (baja frecuencia de ultrasonido y alta presión), baja atenuación por los tejidos situados entre el enfoque de la insonación

y el transductor, cabe resaltar que en nuestros experimentos no se observaron daños visibles en el tejido ni en funcionalidad, permitiendo evaluar directamente una función biológica y con ello acercarnos más a lo que ocurriría en un escenario in vivo.

Bien es sabido que cuando la microburbuja es destruida por el ultrasonido en el tejido objetivo, la energía liberada en forma de alto flujo de cizallamiento y microflujos, causará la ruptura de la membrana de los liposomas asociados a microburbujas y posteriormente liberará el fármaco encapsulado [111,112].

Cabe destacar que para la liberación y contracción de nuestra arteria en nuestro sistema existen diversas explicaciones el primero de ellos se debe a un fenómeno denominado "sonoporización". Debido a que existen diversos microflujos que causan estrés cizallador en la membrana celular y crean agujeros transitorios no letales en la membrana plasmática, a través de los cuales un fármaco o gen es capaz de difundir [113,114]. Se sabe que las células endoteliales soportan un alto estrés cizallador, esto a sido demostrado en experimentos in vitro dando como resultado que las células pueden mantener tensiones de hasta 1 MI (por sus siglas en ingles) con adición de microburbujas [115]. En nuestras condiciones experimentales utilizadas (MI de 0.2), siendo este muy por debajo del limite mencionado con anterioridad, por lo que podemos suponer que existe un estrés suficiente para desencadenar una respuesta celular en la membrana celular sin llegar a alterar dicha funcionalidad.

En segundo lugar, la generación de especies de oxígeno reactivo intracelular, después de la aplicación de ultrasonido, podría contribuir a la permeabilización de la membrana celular [116,117] sin afectar la viabilidad celular. Por ultimo, tenemos el aumento local y transitorio de la temperatura debido a la absorción y disipación de la energía de ultrasonido que también puede influir en la fluidez de la bicapa fosfolípida y, por lo tanto, en la permeabilidad celular [118]. Otros escenarios son la participación de mecanismos de transporte activos, como la endocitosis y la fagocitosis en la absorción de microburbujas, y la fusión de microburbujas a base de lípidos con la membrana celular.

EL uso del ultrasonido Doppler se utiliza en prácticamente todas las especialidades médicas logrando determinar la presencia o ausencia de flujo sanguíneo así como su dirección y velocidad. La visualización o espectrograma espectral muestra el patrón de velocidad y como varia con respecto al tiempo. Estas formas de onda espectrales tienen características de "firma específicas" del objeto estudiado. La velocidad de onda de pulso arterial (PWV) es una de las aplicaciones para mediciones periféricas de la velocidad arterial y es tomado como un índice de rigidez arterial [119]. Los recipientes más rígidos propagan la presión y las ondas de velocidad más rápido que los recipientes

con una compliancia menor. En el espectrograma se observa las líneas verticales con un ligero desfase con la onda R del ECG, y se puede ver que la velocidad aumenta en proporción a la distancia del corazón, normalmente se usa el pico espectral o la forma de onda de velocidad máxima porque es el parámetro más robusto en la señal Doppler [120]. Por lo tanto, la velocidad máxima medida representa el componente más alto de velocidad dentro del volumen de la muestra en la dirección del haz de sonido. Otro aspecto importante a tomar en cuenta es el uso de la frecuencia en el transductor, debido a que la frecuencia ultrasónica relativamente alta (20 MHz) exhibe una alta dispersión de los glóbulos rojos, lo que resulta en una excelente señal acústica a la relación ruidosa (20-50 dB) incluso cuando se utiliza con cristales ultrasónicos pequeños.

El sistema Doppler pulsado ha demostrado ser extremadamente útil para la estimación del flujo sanguíneo a través de los vasos más pequeños de animales [121]. A tal punto de incluso poder medir la velocidad de flujo producido por diferentes patologías entre ellas la estenosis y trombosis logrando incluso estimar la caída de presión mediante la ecuación simplificada de Bernoulli.

La trombosis vascular es responsable de la mayoría de los casos de accidente cerebrovascular isquémico e infarto de miocardio, se considera la mayor causa de muerte, por lo que es necesario la restauración rápida del flujo sanguíneo, existen en el mercado diversos medicamentos entre ellos, antiagregantes plaquetarios, anticoagulantes y trombolíticos, los cuales se emplean para prevenir y tratar trastornos vasculares, sin embargo todos poseen efectos adversos importantes como: riesgo de sangrado, incidencia de resistencia, e interacciones no deseadas con el fármaco administrado [122].

El uso de este sistema de microburbuja-liposoma es en primer lugar, las microburbujas pueden ser dirigidas al trombo y funcionar como agentes de diagnóstico para detectar y localizar el coágulo. En segundo lugar, al unir las microburbujas con los liposomas puede facilitar aun mas la disolución directamente del coágulo. Tal y como describimos previamente los bioefectos generados por en la combinación de microburbujas y ultrasonido, la cavitación crea microjets de alta velocidad de magnitud suficiente para promover la lisis del coágulo afectando los cambios inducidos en la malla de fibrina y en la aceleración en el transporte y la penetración de fármacos en el coágulo, logrando una disolución más rápida del coágulo sin la liberación de grandes cantidades de fragmentos de coágulos. Aportando reducir la cantidad de fármaco empleado así como también en la reducción de riesgo de hemorragia, al tiempo que acelera la disolución del coágulo y limita el daño isquémico a los tejidos.

La trombosis inducida por *FeCl3* depende tanto de plaquetas como de proteínas de coagulación, recientemente se demostraron que al aplicar *FeCl3* aplicado de manera tópicamente, atravesó el endotelio por una vía endocítica- exocítica en el lumen arterial para causar disfunción endotelial y trombosis oclusiva [123]

Es bien sabido que la interrupción de la capa endotelial y la exposición de la matriz extracelular subendotelial (ECM) inician la hemostasia, así como la trombosis intravas-

cular, que implica una serie de eventos complejos que incluyen adherencia, activación, agregación, liberación de gránulos y activación en cascada de coagulación, lo que conduce a la formación de trombos ricos en fibrina. De igual manera el Factor tisular y Factor VIIa se unen a la membrana plaquetaria activada, permitiendo la activación de factores de coagulación que resultan en la generación de trombina y en la conversión de fibrinógeno soluble a fibrina insoluble, que se localiza en el sitio de lesiones y está protegido por los inhibidores circulantes [124,125].

La concentración que fue tomada para nuestra condición experimental fue la de 50 %, w/v, puesto que ya está reportado que a concentración de *FeCl3* (5 %) no se ocluye por completo la arteria durante 30 min, mientras que a altas concentraciones (80 %, w/v) parece ser muy potente en causar lesiones vasculares y detener el flujo sanguíneo en menos de 10 minutos [126]. Por otra parte otros autores usan el 50 % w/v *FeCl3* para inducir trombosis, la cual es inducida rápidamente y resulta difícil de inhibir con heparina dando oportunidad al estudio de una trombosis avanzada, y que a su vez es consistente con lo reportado en la trombosis oclusiva de la carótida de rata, reportando que la oclusión ocurrió en un TTO de 11 min, que concuerda con nuestro tiempo reportado al emplear dicha concentración [127]. Cabe mencionar que la lesión endotelial por aplicación *FeCl3* en la adventicia es uniforme de animal a animal porque depende de la concentración, tamaño del segmento arterial lesionado y duración de la lesión, que se puede controlar con precisión [126].

En nuestro modelo de trombosis observamos que en alrededor de 11 min se formó un trombo con casi una oclusión total caracterizado por numerosas plaquetas, fibrina y glóbulos rojos y los mismos resultados fueron reportados por diversos autores (Philp et al, Haust et al y French et al) que han descrito características ultraestructurales de trombos en arterias pequeñas incluso se han centrado en la descripción de elementos celulares de sangre como plaquetas, glóbulos rojos y blancos en trombos [128-132]. Todos estos informes han descrito básicamente los mismos cambios morfológicos que hemos observado en este modelo *FeCl3*.

En cuanto a la recuperación del flujo que se tiene al combinar las microburbujas con el uso del ultrasonido se ha observado resultados similares en donde Tachibana ha demostrado in vitro que las microburbujas de albúmina llenas de aire (Albunex, Molecular Biosystems, Inc.) junto con el ultrasonido aceleran los efectos de disolución de coágulos [133].

De igual manera que Nishioka et al, logro una reperfusión en un modelo de arteria iliofemoral de conejo empleando un transductor de ultrasonido de 20 kHz, logrando recuperar el flujo de 13 de 17 (76 %) arterias tras la aplicación combinada de ultrasonido transcutáneo y un bolo de microburbujas (Sonus Pharmaceuticals, Inc) [134]. Sin embargo, ellos expresan que existe daño térmico inducido por la exposición por ultrasonido a la piel y a los tejidos blandos subcutaneos, siendo comparables con nuestros resultados experimental, sin embargo al modificar los parametros de ultrasonido, se logro evitar dicho problema en la lesion del tejido, asi mismo Nishioka et al aplicaron las microburbujas por una inyección intra-arterial más invasiva que en nuestro caso que fue inyectado mediante la vena de la cola siendo esta menos invasiva.

Por último la recuperación del flujo observado mediante el uso de microburbujas conjunto con el ultrasonido se logro con indices mecanicos bajos (0.2MI), por lo que parece que no solo con indices altos se puede lograr dicha reperfusión ya que esto a sido demostrado recientemente, que transductores de ultrasonido de diagnóstico tiene la capacidad de recanalizar trombos intravasculares profundamente ubicados si se emplea un índice mecánico alto (MI) cabe mencionar que solo aplican cuando se visualizan las microburbujas en el trombo, con el uso de un esquema de secuencia de pulso sensible a microburbujas de bajo MI como guía, puesto que de lo contrario se observaran daños adversos al aplicar altos indices mecanicos [135]

## **9. Conclusión**

La utilización del sistema de liberación microburbuja-liposoma en combinación con la aplicación de pulsos de ultrasonido induce la liberación controlada y focalizada de un agonista vascular, permitiendo de esta manera, generar cambios locales e inmediatos en el tono vascular y en la variación de la velocidad del flujo sanguíneo aórtico y femoral.

## 10. 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 el arreglo experimental para la aplicación de ultrasonido presente en la patología de trombosis así como su caracterización.
- Demostrar y caracterizar el sistema microburbuja liposoma encapsulando una molécula con efecto anti-trombotico.

## 11. Bibliografía

- [1] Lavan, D. A., McGuire, T., & Langer, R. (2003). Small-scale systems for in vivo drug delivery. *Nature biotechnology*, 21(10), 1184.
- [2] Pridgen, E. M., Langer, R., & Farokhzad, O. C. (2007). Biodegradable, polymeric nanoparticle delivery systems for cancer therapy.
- [3] 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), 8325-8339.
- [4] Unger, E., Porter, T., Lindner, J., & Grayburn, P. (2014). Cardiovascular drug delivery with ultrasound and microbubbles. *Advanced drug delivery reviews*, 72, 110-126.
- [5] Hesketh, T. R., Payne, S. N., & Humphrey, J. H. (1972). Complement and phospholipase C lysis of lipid membranes. *Immunology*, 23(5), 705.
- [6] Simoes, S., Moreira, J. N., Fonseca, C., Düzgünes, 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.
- [7] Yavlovich, A., Singh, A., Blumenthal, R., & Puri, A. (2011). A novel class of phototriggerable 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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.

- [11] Kazunori, K., Masayuki, Y., Temo, O., & Yasuhisa, S. (1993). Block copolymer micelles as vehicles for drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 24(1-3), 119-132.
- [12] Shohet, R. V., Chen, S., Zhou, Y. T., Wang, Z., Meidell, R. S., Unger, R. H., & Grayburn, P. A. (2000). Echocardiographic destruction of albumin microbubbles directs gene delivery to the myocardium. *Circulation*, 101(22), 2554-2556.
- [13] Ting, C. Y., Fan, C. H., Liu, H. L., Huang, C. Y., Hsieh, H. Y., Yen, T. C., ... & Yeh, C. K. (2012). Concurrent blood-brain barrier opening and local drug delivery using drug-carrying microbubbles and focused ultrasound for brain glioma treatment. *Biomaterials*, 33(2), 704-712.
- [14] Treat, L. H., McDannold, N., Zhang, Y., Vykhodtseva, N., & Hynynen, K. (2012). Improved anti-tumor effect of liposomal doxorubicin after targeted blood-brain barrier disruption by MRI-guided focused ultrasound in rat glioma. *Ultrasound in medicine & biology*, 38(10), 1716-1725.
- [15] Tosí, G., Duskey, J. T., & Kreuter, J. (2020). Nanoparticles as carriers for drug delivery of macromolecules across the blood-brain barrier. *Expert opinion on drug delivery*, 17(1), 23-32.
- [16] Torchilin, V. P. (2005). Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature reviews Drug discovery*, 4(2), 145-160.
- [17] 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.
- [18] Xie, J., Ganguli-Indra, G., Indra, A. K., & Gombart, A. F. (2017). 13 Sustained Delivery of Cathelicidin Antimicrobial Peptide-inducing Compounds to Minimize Infection and Enhance Wound Healing Antimicrobial Peptides: Discovery, Design and Novel Therapeutic Strategies, 219.
- [19] Sawant, R. R., & Torchilin, V. P. (2012). Challenges in development of targeted liposomal therapeutics. *The AAPS journal*, 14(2), 303-315.
- [20] Kee, P. H., Kim, H., Huang, S., Laing, S. T., Moody, M. R., Vela, D., ... & McPherson, D. D. (2014). Nitric oxide pretreatment enhances atheroma component highlighting

- in vivo with intercellular adhesion molecule-1-targeted echogenic liposomes. *Ultrasound in medicine & biology*, 40(6), 1167-1176.
- [21] 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.
- [22] Semple, S. C., Chonn, A., & Cullis, P. R. (1998). Interactions of liposomes and lipid-based carrier systems with blood proteins: Relation to clearance behaviour in vivo. *Advanced drug delivery reviews*, 32(1-2), 3-17.
- [23] 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.
- [24] Fokong, S., Theek, B., Wu, Z., Koczera, P., Appold, L., Jorge, S., ... & Lammers, T. (2012). Image-guided, targeted and triggered drug delivery to tumors using polymer-based microbubbles. *Journal of controlled release*, 163(1), 75-81.
- [25] Newman, C. M. H., & Bettinger, T. (2007). Gene therapy progress and prospects: ultrasound for gene transfer. *Gene therapy*, 14(6), 465.
- [26] Schroeder, A., Kost, J., & Barenholz, Y. (2009). Ultrasound, liposomes, and drug delivery: principles for using ultrasound to control the release of drugs from liposomes. *Chemistry and physics of lipids*, 162(1-2), 1-16.
- [27] Tlaxca, J. L., Anderson, C. R., Klivanov, 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.
- [28] 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.
- [29] Tokarczyk, A., Rivens, I., van Bavel, E., Symonds-Taylor, R., & ter Haar, G. (2013). An experimental system for the study of ultrasound exposure of isolated blood vessels. *Physics in Medicine & Biology*, 58(7), 2281.
- [30] Navarro-Becerra, J. A., Caballero-Robledo, G. A., Franco-Urquijo, C. A., Ríos, A., & Escalante, B. (2020). Functional Activity and Endothelial-Lining Integrity

of Ex Vivo Arteries Exposed to Ultrasound-Mediated Microbubble Destruction. *Ultrasound in medicine & biology*.

- [31] Cool, S. K., Geers, B., Roels, S., Stremersch, S., Vanderperren, K., Saunders, J. H., ... & Sanders, N. N. (2013). Coupling of drug containing liposomes to microbubbles improves ultrasound triggered drug delivery in mice. *Journal of Controlled Release*, 172(3), 885-893.
- [32] J.P. Christiansen, J.R. Lindner, Molecular and cellular imaging with targeted contrast ultrasound, *Proc. IEEE* 93 (4) (2005) 809-818. [10] M.J. Shortencarier, P.A. Dayton, S.H. Bloch, P.A. Schumann, T.O.
- [33] Lin, C. Y., Lin, Y. C., Huang, C. Y., Wu, S. R., Chen, C. M., & Liu, H. L. (2020). Ultrasound-responsive neurotrophic factor-loaded microbubble-liposome complex: Preclinical investigation for Parkinson's disease treatment. *Journal of Controlled Release*, 321, 519-528.
- [34] Bae, Y. J., Yoon, Y. I., Yoon, T. J., & Lee, H. J. (2016). Ultrasound-guided delivery of siRNA and a chemotherapeutic drug by using microbubble complexes: In vitro and in vivo evaluations in a prostate cancer model. *Korean Journal of Radiology*, 17(4), 497-508.
- [35] Gao, J., Nesbitt, H., Logan, K., Burnett, K., White, B., Jack, I. G., ... & Callan, J. F. (2020). An ultrasound responsive microbubble-liposome conjugate for targeted irinotecan-oxaliplatin treatment of pancreatic cancer. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 157, 233-240.
- [36] Diamandis, E. P., & Christopoulos, T. K. (1991). The biotin-(strept) avidin system: principles and applications in biotechnology. *Clinical chemistry*, 37(5), 625-636. [37] Wood, S. C., Antony, S., Brown, R. P., Chen, J., Gordon, E. A., Hitchins, V.M., ... & Harris, G. R. (2012). Effects of ultrasound and ultrasound contrast agent on vascular tissue. *Cardiovascular ultrasound*, 10(1), 1-10.
- [38] Hallow, D.M., Mahajan, A. D., & Prausnitz, M. R. (2007). Ultrasonically targeted delivery into endothelial and smooth muscle cells in ex vivo arteries. *Journal of controlled release*, 118(3), 285-293.
- [39] Van Rooij, T., Skachkov, I., Beekers, I., Lattwein, K. R., Voorneveld, J. D., Kokhuis, T. J., ... & Kooiman, K. (2016). Viability of endothelial cells after ultrasound-

- mediated sonoporation: Influence of targeting, oscillation, and displacement of microbubbles. *Journal of Controlled Release*, 238, 197-211.
- [40] Shigeta, K., Itoh, K., Ookawara, S., Taniguchi, N., & Omoto, K. (2004). Endothelial cell injury and platelet aggregation induced by contrast ultrasonography in the rat hepatic sinusoid. *Journal of ultrasound in medicine*, 23(1), 29-36.
- [41] Lentacker, I., Geers, B., Demeester, J., De Smedt, S. C., & Sanders, N. N. (2010). Design and evaluation of doxorubicin-containing microbubbles for ultrasound-triggered doxorubicin delivery: cytotoxicity and mechanisms involved. *Molecular therapy*, 18(1), 101-108.
- [42] Lentacker, I., De Smedt, S. C., Demeester, J., Van Marck, V., Bracke, M., & Sanders, N. N. (2007). Lipoplex-Loaded Microbubbles for Gene Delivery: A Trojan Horse Controlled by Ultrasound. *Advanced Functional Materials*, 17(12), 1910-1916.
- [43] Ibsen, S., Schutt, C. E., & Esener, S. (2013). Microbubble-mediated ultrasound therapy: a review of its potential in cancer treatment. *Drug design, development and therapy*, 7, 375.
- [44] 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.
- [45] Yan, F., Li, L., Deng, Z., Jin, Q., Chen, J., Yang, W., ... & Zheng, H. (2013). Paclitaxel-liposome-microbubble complexes as ultrasound-triggered therapeutic drug delivery carriers. *Journal of controlled release*, 166(3), 246-255.
- [46] Vandenbroucke, R. E., Lentacker, I., Demeester, J., De Smedt, S. C., & Sanders, N. N. (2008). Ultrasound assisted siRNA delivery using PEG-siPlex loaded microbubbles. *Journal of controlled release*, 126(3), 265-273.
- [47] Eloy, J. O., de Souza, M.C., Petrilli, R., Barcellos, J. P. A., Lee, R. J., & Marchetti, J. M. (2014). Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: strategies

- to enhance encapsulation and delivery. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 123, 345-363.
- [48] E.C. Unger, T.P. McCreery, R.H. Sweitzer, Ultrasound enhances gene expression of liposomal transfection, *Invest. Radiol.* 32 (1997) 723-727.
- [49] Unger, E. C., Fritz, T. A., Matsunaga, T., Ramaswami, V., Yellowhair, D., & Wu, G. (1996). U.S. Patent No. 5,542,935. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- [50] Shohet, R. V., Chen, S., Zhou, Y. T., Wang, Z., Meidell, R. S., Unger, R. H., & Grayburn, P. A. (2000). Echocardiographic destruction of albumin microbubbles directs gene delivery to the myocardium. *Circulation*, 101(22), 2554-2556.
- [51] Fujii, H., Li, S. H., Wu, J., Miyagi, Y., Yau, T. M., Rakowski, H., ... & Li, R. K. (2011). Repeated and targeted transfer of angiogenic plasmids into the infarcted rat heart via ultrasound targeted microbubble destruction enhances cardiac repair. *European heart journal*, 32(16), 2075-2084
- [52] Suzuki, J. I., Ogawa, M., Takayama, K., Taniyama, Y., Morishita, R., Hirata, Y., ... & Isobe, M. (2010). Ultrasound-microbubble-mediated intercellular adhesion molecule-1 small interfering ribonucleic acid transfection attenuates neointimal formation after arterial injury in mice. *Journal of the American College of Cardiology*, 55(9), 904-913.
- [53] Ohl, C. D., Arora, M., Ikink, R., De Jong, N., Versluis, M., Delius, M., & Lohse, D. (2006). Sonoporation from jetting cavitation bubbles. *Biophysical journal*, 91(11), 4285-4295.
- [54] Lum, A. F., Borden, M. A., Dayton, P. A., Kruse, D. E., Simon, S. I., & Ferrara, K. W. (2006). Ultrasound radiation force enables targeted deposition of model drug carriers loaded on microbubbles. *Journal of Controlled Release*, 111(1-2), 128-134.
- [55] Dayton, P., Klibanov, A., Brandenburger, G., & Ferrara, K. (1999). Acoustic radiation force in vivo: a mechanism to assist targeting of microbubbles. *Ultrasound in medicine & biology*, 25(8), 1195-1201.
- [56] Dayton, P. A., Morgan, K. E., Klibanov, A. L., Brandenburger, G., Nightingale, K. R., & Ferrara, K. W. (1997). A preliminary evaluation of the effects of primary

- and secondary radiation forces on acoustic contrast agents. *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*, 44(6), 1264-1277.
- [57] Stride, E., & Saffari, N. (2004). The potential for thermal damage posed by microbubble ultrasound contrast agents. *Ultrasonics*, 42(1-9), 907-913.
- [58] Umemura, S. I., Kawabata, K. I., & Sasaki, K. (2005). In vivo acceleration of ultrasonic tissue heating by microbubble agent. *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*, 52(10), 1690-1698.
- [59] Mukherjee, D., Wong, J., Griffin, B., Ellis, S. G., Porter, T., Sen, S., & Thomas, J. D. (2000). Ten-fold augmentation of endothelial uptake of vascular endothelial growth factor with ultrasound after systemic administration. *Journal of the American College of Cardiology*, 35(6), 1678-1686.
- [60] Taniyama, Y., Tachibana, K., Hiraoka, K., Namba, T., Yamasaki, K., Hashiya, N., ... & Morishita, R. (2002). Local delivery of plasmid DNA into rat carotid artery using ultrasound. *Circulation*, 105(10), 1233-1239.
- [61] Li, P., Armstrong, W. F., & Miller, D. L. (2004). Impact of myocardial contrast echocardiography on vascular permeability: comparison of three different contrast agents. *Ultrasound in medicine & biology*, 30(1), 83-91.
- [62] Klibanov, A. L., Shevchenko, T. I., Raju, B. I., Seip, R., & Chin, C. T. (2010). Ultrasound-triggered release of materials entrapped in microbubble-liposome constructs: a tool for targeted drug delivery. *Journal of controlled release*, 148(1), 13-17.
- [63] Gibbs, V., Cole, D., & Sassano, A. (2011). *Ultrasound physics and technology: how, why and when*. Elsevier Health Sciences.
- [64] Kentish, S. E. (2017). Engineering principles of ultrasound technology. In *Ultrasound: Advances for Food Processing and Preservation* (pp. 1-13). Academic Press.
- [65] Soni, N. J., Arntfield, R., Kory, P. (2019). *Point of care ultrasound e-book*. Chapter 2: Ultrasound Physics. Elsevier Health Sciences, 9-19.
- [66] Laugier, P., & Haïat, G. (2011). Introduction to the physics of ultrasound. *Bore quantitative ultrasound*, 29-45.
- [67] Monín, G. (1998). Recent methods for predicting quality of whole meat. *Meat Science*, 49, 8231-8243.

- [68] Peshkovsky, A. S., Peshkovsky, S. L., & Bystryak, S. (2013). Scalable high-power ultrasonic technology for the production of translucent nanoemulsions. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 69, 77-82.
- [69] Chin, C. T., & Burns, P. N. (2000). Predicting the acoustic response of a microbubble population for contrast imaging in medical ultrasound. *Ultrasound in medicine & biology*, 26(8), 1293-1300
- [70] Powles, A. E., Martín, D. J., Wells, I. T., & Goodwin, C. R. (2018). Physics of ultrasound. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 19(4), 202-205.
- [71] Rose JS, Bair AE. Fundamentals of ultrasound. In: Cosby KS, Kendall JL, editors. *Practical guide to Emergency Ultrasound*. PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2006. pp. 27-41.
- [72] Schuler A. Image artifacts and pitfalls. In: Mathis G, editor. *Chest sonography*. 2nd ed. New York: Springer; 2008. pp. 175-82.
- [73] Laugier, P., & Harat, G. (2011). Introduction to the physics of ultrasound. *Borre quantitative ultrasound*, 29-45.).
- [74] Absorption and dispersion of ultrasound in biological tissue. *Ultrasound in medicine & biology*, 1(4), 369-376.
- [75] Neppiras EA, Nyborg WL, Miller PL. Nonlinear behavior and stability of trapped micron-sized cylindrical gas bubbles in an ultrasound field. *Ultrasonics*. 1983;21:109Y1 15.
- [76] Burns, P. N., & Wilson, S. R. (2006). Microbubble contrast for radiological imaging: I. Principles. *Ultrasound quarterly*, 22(1), 5-13.
- [77] Schoelgens, C. (1998). Native Tissue harmonic imaging. *Der Radiologe*, 38(5), 420-423.
- [78] Burns, P. N. (1987). The physical principles of Doppler and spectral analysis. *Journal of clinical ultrasound*, 15(9), 567-590.
- [79] REEDER, G. S., CURRIE, P. J., HAGLER, D. J., TAJIK, A. J., & SEWARD, J. B. (1986, September). Use of Doppler techniques (continuous-wave, pulsed-wave, and color flow imaging) in the noninvasive hemodynamic assessment of congenital heart disease. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 61, No. 9, pp. 725-744). Elsevier.

- [80] Carovac, A., Smajlovic, F., & Junuzovic, D. (2011). Application of ultrasound in medicine. *Acta Informatica Medica*, 19(3), 168.
- [81] Taylor, K. J., & Holland, S. (1990). Doppler US. Part I. Basic principles, instrumentation, and pitfalls. *Radiology*, 174(2), 297-307.
- [82] Schroeder, A., Kost, J., & Barenholz, Y. (2009). Ultrasound, liposomes, and drug delivery: principles for using ultrasound to control the release of drugs from liposomes. *Chemistry and physics of lipids*, 162(1-2), 1-16.
- [83] Collis, J., Manasseh, R., Liovic, P., Tho, P., Ooi, A., Petkovic-Duran, K., & Zhu, Y. (2010). Cavitation microstreaming and stress fields created by microbubbles. *Ultrasonics*, 50(2), 273-279.
- [84] Wischhusen, J., Padilla, F. (2018). Ultrasound-targeted microbubble destruction (UTMD) for localized drug delivery into tumor tissue. *IRBM*.
- [85] Gong, C., & Hart, D. P. (1998). Ultrasound induced cavitation and sonochemical yields. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 104(5), 2675-2682.
- [86] Brujan E A, Keen G S, Vogel A and Blake J R 2002 The final stage of the collapse of a cavitation bubble close to a rigid boundary *Phys. Fluids* 14 85-92.
- [87] Acoustic radiation force in vivo: a mechanism to assist targeting of microbubbles", P. Dayton et al., 1999, *World Federation for Ultrasound in Medicine & Biology*.
- [88] Shchukin, D. G., & Mohwald, H. (2006). Sonochemical nanosynthesis at the engineered interface of a cavitation microbubble. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 8(30), 3496-3506.
- [89] Fernandez Rivas, D., Prosperetti, A., Zijlstra, A. G., Lohse, D., & Gardeniers, H. J. (2010). Efficient sonochemistry through microbubbles generated with micromachined surfaces. *Angewandte Chemie International Edition*, 49(50), 9699-9701.
- [90] Fan, Z., Kumon, R. E., & Deng, C. X. (2014). Mechanisms of microbubble-facilitated sonoporation for drug and gene delivery. *Therapeutic delivery*, 5(4), 467-486.
- [91] Leighton, T. G. (1994). *The Acoustic Bubble*. Academic. Press, London, 234-243.

- [92] Azmin, M, Harfield, C, Ahmad, Z, Edirisinghe, M, & Stride, E. (2012). How do microbubbles and ultrasound interact? Basic physical, dynamic and engineering principles. *Current pharmaceutical design*, 18(15), 2118-2134.
- [93] Young, F. R. (1989). *Cavitation* McGraw-Hill. Maidenhead, UK, 151.
- [94] Yasui K, Tuziuti T, Lee J, Kozuka T, Towata A, Iida Y. The range of ambient radius for an active bubble in sonoluminescence and sonochemical reactions. *J Chem Phys*. 2008;128(18):184705.
- [95] Besant, William Henry. *A treatise on hydrostatics and hydrodynamics*. Deighton, Bell, 1859.
- [96] Rayleigh L. VIII. On the pressure developed in a liquid during the collapse of a spherical cavity. *Lond Edinb Dublin Philos Mag J Sci*. 1917;34(200):94-8.
- [97] Nelson, T. R., & Pretorius, D. H. (1998). Three-dimensional ultrasound imaging. *Ultrasound in medicine & biology*, 24(9), 1243-1270.
- [98] Devin C 1959 Survey of thermal, radiation, and viscous damping of pulsating air bubbles in water. *J. Acoust. Soc. Am.* 31 1654-67.
- [99] Fanelli M, Prosperetti A and Reali M 1981 Radial oscillations of gas-vapor bubbles in liquids: 2. Numerical examples. *Acustica* 49 98-109.
- [100] Roy R A, Church C C and Calabrese A 1990 *Frontiers of Nonlinear Acoustics: Proc. 12th ISNA* ed M F Hamilton and D A Blackstock pp 746-481.
- [101] Church C C 1995 The effects of an elastic solid-surface layer on the radial pulsations of gas-bubbles. *J. Acoust. Soc. Am.* 97 1510-21.
- [102] Ferrara, K., Pollard, R., & Borden, M. (2007). Ultrasound microbubble contrast agents: fundamentals and application to gene and drug delivery. *Annu. Rev. Bio-med. Eng.*, 9, 415-447.
- [103] 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.
- [104] Silvander, M., Johnsson, M., & Edwards, K. (1998). Effects of PEG-lipids on permeability of phosphatidylcholine/ cholesterol liposomes in buffer and in human serum. *Chemistry and physics of lipids*, 97(1), 15-26.

- [105] Miller, D. L., & Quddus, J. (2000). Diagnostic ultrasound activation of contrast agent gas bodies induces capillary rupture in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(18), 10179-10184.
- [106] Ay, T., Havaux, X., Van Camp, G., Campanelli, B., Gisellu, G., Pasquet, A., ... & Vanoverschelde, J. L. J. (2001). Destruction of contrast microbubbles by ultrasound: effects on myocardial function, coronary perfusion pressure, and microvascular integrity. *Circulation*, 104(4), 461-466.
- [107] Wible Jr, J. H., Calen, K. P., Wojdyla, J. K., Hughes, M. S., Klibanov, A. L., & Brandenburger, G. H. (2002). Microbubbles induce renal hemorrhage when exposed to diagnostic ultrasound in anesthetized rats. *Ultrasound in medicine & biology*, 28(11-12), 1535-1546.
- [108] Miller, D. L., Li, P., Dou, C., Gordon, D., Edwards, C. A., & Armstrong, W. F. (2005). Influence of contrast agent dose and ultrasound exposure on cardiomyocyte injury induced by myocardial contrast echocardiography in rats. *Radiology*, 237(1), 137-143.
- [109] Miller, D. L., Dou, C., & Armstrong, W. F. (2005). The influence of agent delivery mode on cardiomyocyte injury induced by myocardial contrast echocardiography in rats. *Ultrasound in medicine & biology*, 31(9), 1257-1263.
- [110] van der Wouw, P. A., Brauns, A. C., Bailey, S. E., Powers, J. E., & Wilde, A. A. (2000). Premature ventricular contractions during triggered imaging with ultrasound contrast. *Journal of the American Society of Echocardiography*, 13(4), 288-294.
- [111] Lewis, C. W., McConaughy, J., Rinkevich, D., Klibanov, A. L., & Lindner, J. R. (2004, October). Development of a novel microbubble agent for ultrasound-mediated targeted drug delivery. In *Circulation* (Vol. 110, No. 17, pp. 511-511). TWO COMMERCE SQ, 2001 MARKET ST, PHILADELPHIA, PA 19103 USA: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS.
- [112] Klibanov, A. L., Rinkevich, D., McConaughy, J. E., Lewis, C., Lindner, J. R., & Kaul, S. (2004). Ultrasound-triggered release of microbubble-associated material: site-targeted drug release and deposition. In *32nd Annual Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials*. Honolulu: Controlled Release Society (Vol.735).

- [113] Ward, M., Wu, J., & Chiu, J. F. (1999). Ultrasound-induced cell lysis and sonoporation enhanced by contrast agents. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 105(5), 2951-2957.
- [114] Wu, J., Ross, J. P., & Chiu, J. F. (2002). Reparable sonoporation generated by microstreaming. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 111(3), 1460-1464.
- [115] Van Wamel, A., Bouakaz, A., Versluis, M., & de Jong, N. (2004). Micromanipulation of endothelial cells: ultrasound-microbubble-cell interaction. *Ultrasound in medicine & biology*, 30(9), 1255-1258.
- [116] Juffermans, L. J. M., Dijkmans, P. A., Musters, R. J. P., Visser, C. A., & Kamp, O. (2006). Transient permeabilization of cell membranes by ultrasound-exposed microbubbles is related to formation of hydrogen peroxide. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 291(4), H1595-H1601.
- [117] Miller, D. L., & Gies, R. A. (1998). The interaction of ultrasonic heating and cavitation in vascular bioeffects on mouse intestine. *Ultrasound in medicine & biology*, 24(1), 123-128.
- [118] Karshafian, R., Bevan, P. D., Williams, R., Samac, S., & Burns, P. N. (2009). Sonoporation by ultrasound-activated microbubble contrast agents: effect of acoustic exposure parameters on cell membrane permeability and cell viability. *Ultrasound in medicine & biology*, 35(5), 847-860.
- [119] Williams, R., Needles, A., Cherin, E., Zhou, Y. Q., Henkelman, R.M., Adamson, S. L., & Foster, F. S. (2007). Noninvasive ultrasonic measurement of regional and local pulse-wave velocity in mice. *Ultrasound in medicine & biology*, 33(9), 1368-1375.
- [120] Evans, D. H., & McDicken, W. N. (1989). *Doppler ultrasound: physics instrumentation and clinical applications*. John Wiley & Sons Incorporated.
- [121] Hartley, C. J., Hanley, H. G., Lewis, R. M., & Cole, J. S. (1978). Synchronized pulsed Doppler blood flow and ultrasonic dimension measurement in conscious dogs. *Ultrasound in medicine & biology*, 4(2), 99-110.
- [122] Mandal, A. K., Das, S., Basu, M. K., Chakrabarti, R. N., & Das, N. (2007). Hepatoprotective activity of liposomal flavonoid against arsenite-induced liver fibrosis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 320(3), 994-1001.

- [123] Tseng, M. T., Dozier, A., Haribabu, B., & Graham, U. M. (2006). Transendothelial migration of ferric ion in *FeCl3* injured murine common carotid artery. *Thrombosis research*, 118(2), 275-280.
- [124] Palabrica, T., Lobb, R., Furie, B. C., Aronovitz, M., Benjamín, C., Hsu, Y. M., ... & Furie, B. (1992). Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature*, 359(6398), 848-851.
- [125] Bertina, R. M. (1997). Laboratory diagnosis of resistance to activated protein C (APC-resistance). *Thrombosis and haemostasis*, 78(07), 478-482.
- [126] Surin, W. R., Prakash, P., Barthwal, M. K., & Dikshit, M. (2010). Optimization of ferric chloride induced thrombosis model in rats: effect of anti-platelet and anti-coagulant drugs. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 61(3), 287-291.
- [127] Kurz, K. D., Main, B. W., & Sandusky, G. E. (1990). Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride. *Thrombosis research*, 60(4), 269-280.
- [128] Philp, R. B., Francey, I., & Warren, B. A. (1978). Comparison of antithrombotic activity of heparin, ASA, sulfinpyrazone and VK 744 in a rat model of arterial thrombosis. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, 7(5), 282-293.
- [129] Haust, M. D., Wyllie, J. C., & More, R. H. (1965). Electron microscopy of fibrin in human atherosclerotic lesions: immunohistochemical and morphologic identification. *Experimental and molecular pathology*, 4(2), 205-216.
- [130] French, J. E., Macfarlane, R. G., & Sanders, A. G. (1964). The structure of haemostatic plugs and experimental thrombi in small arteries. *British journal of experimental pathology*, 45(5), 467.
- [131] Jorgensen, L. H. T. J., Rowsell, H. C., Hovig, T., & Mustard, J. F. (1967). Resolution and organization of platelet-rich mural thrombi in carotid arteries of swine. *The American journal of pathology*, 51(5), 681.
- [132] JOrgensen, L., HC, R., & JF, M. (1972). Deposition of formed elements of blood on the intima and signs of intimal injury in the aorta of rabbit, pig, and man.
- [133] Tachibana, K., & Tachibana, S. (1995). Albumin microbubble echo-contrast material as an enhancer for ultrasound accelerated thrombolysis. *Circulation*, 92(5), 1148-1150.
- [134] Nishioka, T., Luo, H., Fishbein, M. C., Cercek, B., Forrester, J. S., Kim, C. J.,

- ... & Siegel, R. J. (1997). Dissolution of thrombotic arterial occlusion by high intensity, low frequency ultrasound and dodecafluoropentane emulsion: an in vitro and in vivo study. *Journal of the American College of Cardiology*, 30(2), 561-568.
- [135] Xie, F., Everbach, C., Matsunaga, T., Lof, J., He, A., Bennett, R. M., & Porter, T. R. (2007). Detection of intravascular cavitation activity during treatment of deep vessel thromboses with diagnostic ultrasound and intravenous microbubbles.