



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Unidad Monterrey

**Impacto del uso del complejo microburbuja ultrasonido
en la curva dosis respuesta de un fármaco.**

Tesis que presenta

Olivia Del Carmen Bautista Hernández

Para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias en
Ingeniería y Física Biomédicas**

Director de Tesis

Dr. Bruno A. Escalante Acosta

Apodaca, Nuevo León

agosto, 2023

Impacto del uso del complejo microburbuja-ultrasonido en la curva dosis respuesta de un fármaco.

©Olivia Del Carmen Bautista Hernández

Asesor: Dr. Bruno A. Escalante Acosta

Sinodal: Dr. Daniel P. Sánchez Herrera

Sinodal: Dr. Jesús Santana Solano

Tesis de maestría 2023

Centro de Estudios Avanzados Del IPN (CINVESTAV)

Nuevo León, México.

Contacto: olivia.bautista@cinvestav.com

Agradecimientos

Agradezco:

Al CINVESTAV Unidad Monterrey por brindarme la oportunidad de seguir creciendo académicamente.

A mi director de tesis, el Dr. Bruno A. Escalante Acosta por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por su orientación y sus enseñanzas durante este proyecto.

A M.C. Amelia Ríos, por su apoyo y enseñanzas durante este proyecto.

A CONAHCYT por la beca otorgada para lograr la obtención del grado de maestría.

A mis sinodales, el Dr. Daniel Sánchez y el Dr. Jesús Santana, por las valiosas aportaciones que hicieron a este proyecto.

A mi familia por darme siempre motivación y cariño. En especial a mi madre y mi padre, por otorgarme su amor incondicional y por apoyarme siempre.

A Erick y May, por siempre darme ánimos para seguir adelante, por su amistad y cariño.

A mis compañeros de laboratorio, Jesús y Ricardo, que durante esta etapa compartieron sus conocimientos conmigo y por su amistad, pero en especial a la Dra. Elisa Villa, por su guía, paciencia y tiempo.

Índice general

Resumen	1
1. Introducción	3
2. Antecedentes	7
3. Justificación	11
4. Hipótesis	12
5. Objetivos	13
6. Metodología	14
6.1. Fabricación de microburbujas(MBs)	14
6.1.1. Preparación de películas de lípidos	14
6.1.2. Hidratación de la película de fosfolípidos y formación de las microburbujas	15
6.1.3. Distribución de tamaños y concentración	16
6.2. Incorporación y cuantificación del fármaco a las microburbujas	17
6.3. Cultivo celular	17
6.3.1. Formación de la monocapa y curva de crecimiento	18
6.3.2. Viabilidad celular	18
6.4. Caracterización del efecto de la doxorubicina en administración libre.	19
6.5. Estimulación con US.	19
6.6. Estimulación con MBs+US.	21

<i>ÍNDICE GENERAL</i>	VII
6.7. Administración de doxorubicina en el complejo MBs-US.	22
7. Resultados	24
7.1. Microburbujas	24
7.2. Microburbujas+dox	25
7.3. Formación de la monocapa celular	27
7.4. Cuantificación de la eficiencia de muerte celular de doxorubicina en administración libre.	28
7.5. Caracterización del campo acústico	29
7.6. Microburbujas+ultrasonido	30
7.7. Efecto de la presión acústica sobre la viabilidad celular.	31
7.8. Efecto de la estimulación con MBs+US en la viabilidad celular.	33
7.9. Efecto de la administración de doxorubicina con el complejo MBs-US. . . .	35
8. Discusión	38
9. Conclusiones	41
10.Perspectivas	42
Referencias	43

Índice de figuras

1.1. Tipos de cavitación de una microburbujas dependiente del ultrasonido aplicado. Imagen modificada de [15].	4
1.2. Microburbujas en circulación, aplicación de US y ruptura del tejido endotelial. Imagen modificada de [23].	5
2.1. Comparación del efecto de la liberación controlada de antenapedia-caveolina(AP-Cav) mediante MBs-US y administración libre en los anillos aórticos de rata. Imagen tomada de [26].	8
2.2. Comparación de la inhibición de la expresión de eNOS para las células transfectadas con lipofectamina vs el complejo MBS-US. Se necesitó aproximadamente el doble de la concentración del siRNA para que el efecto mediado por la transfección con lipofectamina fuera comparable con los resultados dados por el sistema MBs-US. Imagen tomada de [27].	9
2.3. Crecimiento tumoral. La combinación de exposición a US y la inyección intratumoral de MBs + cisplatino retrasó el crecimiento tumoral en comparación con los demás grupos con los diferentes tratamientos el mismo día. Imagen tomada de [28].	10
6.1. Dispositivo microfluídico para la caracterización de microburbujas. Diseño con dimensiones de las cámaras microfluídicas.	16
6.2. Arreglo experimental del ultrasonido para cultivos celulares.	20

6.3. Dispositivo microfluídico para la estimulación de MBs con US. Diseño con dimensiones del conducto microfluídico.	21
6.4. Representación de la caja de Petri con el cultivo celular y MBS_{dox}	22
7.1. Distribución de tamaños de microburbujas. a) Imagen confocal representativa de una muestra de microburbujas a una dilución 1:10, se puede apreciar la geometría esférica de las MBs. b) Histograma de distribución de tamaños para una población de microburbujas provenientes de 3 muestras independientes. .	25
7.2. Incorporación de doxorubicina a las microburbujas, a) campo claro y b) campo oscuro, la fluorescencia roja representa la adición del fármaco a las MBs, se aprecia que las microburbujas mantienen la geometría esférica y no se aglomeran; en c) se muestra el histograma de tamaños de las MBS_{dox} , se aprecia un aumento en el tamaño de los diámetros respecto a las MBs sin dox. En d) se aprecia la curva de calibración de la absorbancia dada por diferentes concentraciones de dox ($0 \mu\text{M}$ - $70 \mu\text{M}$), el cuadro azul representa el valor interpolado de la concentración liberada por las MBS_{dox} . Los datos representan el promedio \pm el error estándar de la media (SEM) de 4 mediciones independientes.	26
7.3. Caracterización del crecimiento de la línea celular CACO 2. (a) Imágenes representativas de los núcleos celulares teñidos con Hoechst 33342 a las 24, 48, 72 y 96 h de crecimiento. (b) Cuantificación del crecimiento de las células CACO 2 en función del tiempo. Los datos representan el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes.	27
7.4. Respuesta celular de la administración libre de doxorubicina. Imágenes representativas de la monocapa celular post-tratamiento (los núcleos celulares teñidos con Hoechst 33342 (azul) y las células muertas con Homodímero de etidio (rojo)).	28

7.5. Curva dosis-respuesta de la dox en células CACO-2. Concentraciones crecientes de dox aumentan la muerte celular, en b) se muestra el ajuste no lineal (Eq. Hill) realizado con OriginPro; El cuadro azul representa el valor de la CE_{50} . Los datos representan el promedio \pm SEM, N=3.	29
7.6. Caracterización de la presión acústica generada por el ultrasonido y detectadas por el hidrófono. a) Presión acústica en función de la intensidad de las ondas de ultrasonido. b) Índice mecánico en función de la intensidad del ultrasonido, los colores corresponden a la escala de riesgo de daño mecánico. Todas las mediciones se realizaron con un ciclo de trabajo del 10 %, frecuencia de 1 MHz y 2 cm de distancia entre el transductor y el hidrófono. Los datos representan el promedio \pm SEM, N=3.	30
7.7. Microburbujas insonicadas. De arriba a abajo y de izquierda a derecha se muestran cuadros de imagen de alta velocidad del estallido de las MBs debido a la presión acústica (2 MHz, 10 % ciclo de trabajo, 1.5 W/cm ² , 30 s) en un dispositivo microfluídico.	31
7.8. Respuesta celular del efecto de la presión generada por las ondas acústicas. Imágenes representativas de la monocapa celular post-tratamiento (tinción de los núcleos celulares realizada con Hoechst 33342 (azul) y los núcleos de las células muertas con Homodímero de etidio (rojo).	32
7.9. Respuesta a la presión acústica sobre la viabilidad celular con 6 diferentes intensidades a partir de contabilizar las células vivas en la monocapa. El equipo de US se ajustó a 1 MHz de frecuencia y un ciclo de trabajo del 10 %. Los resultados representan el promedio \pm SEM, N=3.	33
7.10. Efecto de la exposición a US+MBs en células CACO-2. a) Imágenes representativas de la monocapa celular obtenida por microscopía de fluorescencia después del tratamiento. b) análisis de la viabilidad celular post-tratamiento. Los resultados representan el promedio \pm SEM, N=3.	34

7.11. Respuesta celular de la administración de doxorubicina en el complejo MBs-US. Imágenes representativas de la monocapa celular post-tratamiento (los núcleos celulares teñidos en rojo representan las células muertas, concentraciones crecientes del fármaco aumentan la muerte celular). 35

7.12. Curva dosis-respuesta de la estimulación de la dox en el complejo MBs-US en células CACO-2. Concentraciones crecientes de dox aumentan la muerte celular, b) ajuste no lineal (Eq. Hill) realizado con OriginPro, el cuadro azul representa la interpolación de la CE_{50} . Los datos representan el promedio \pm SEM, N=3. 36

7.13. Ajustes de las curva dosis-respuesta de la estimulación de la dox en el complejo MBs-US (línea verde) y de la respuesta de la administración de la dox de forma libre (curva roja) en células CACO-2. Concentraciones crecientes de dox aumentan la muerte celular, es más, se aprecia un claro corrimiento de la curva correspondiente a la administración del fármaco en el complejo MBs-US hacia la izquierda dado que la muerte celular es mayor con este método con menores concentraciones del fármaco. Los datos representan el promedio \pm SEM, N=3. 37

Resumen

Para que un fármaco genere el efecto deseado, inicialmente debe ser absorbido por el organismo para luego ser distribuido hasta llegar al órgano o tejido blanco. Sin embargo, además del efecto terapéutico deseado, todos los fármacos generan efectos tóxicos y la severidad de estos puede verse aumentada debido a la dosis administrada. Debido a esta problemática se han desarrollado diferentes sistemas de entrega de fármacos dirigidos y activados por estímulos externos, entre los que se encuentran la liberación de fármacos a partir de microburbujas (MBs) inducida por ultrasonido (US); se ha demostrado que con el uso de este complejo se puede disminuir la dosis administrada y con ello sus efectos adversos en sitios no deseados. Sin embargo, hasta la fecha no existen reportes que indiquen si el efecto puede modificar toda la relación dosis-respuesta de un fármaco.

Es por ello que en este trabajo realizamos un estudio a lo largo de la curva dosis respuesta de un fármaco modelo (doxorrubicina), con el objetivo de demostrar que el efecto del complejo MBS-US se presenta a lo largo de toda la curva dosis-respuesta.

Abstract

For a drug to generate the desired effect, it must initially be absorbed by the organism and then distributed to the target organ or tissue. However, in addition to the desired therapeutic effect, all drugs generate toxic effects and the severity of these can be increased due to the dose administered. Due to this problem, different targeted drug delivery systems activated by external stimuli have been developed , including the drug release from microbubbles (MBs) induced by ultrasound (US); It has been shown that the administered dose and its adverse effects at undesired sites can be decreased. However, to date there are not reports indicating whether this effect can modify the entire dose-response relationship of a drug.

For this reason, in this work we performed a study along the dose-response curve of a model drug (doxorubicin), with the aim of demonstrating that the effect of the MBs-US complex is present along the entire dose-response curve.

Capítulo 1

Introducción

Para que un fármaco genere su efecto en el organismo inicialmente debe ser absorbido por el organismo, es por ello que independientemente de la forma de administración, esta sustancia debe atravesar diferentes barreras para llegar al torrente sanguíneo a través del cual se distribuirá hasta llegar al órgano blanco donde debe generarse el efecto terapéutico; Este proceso se encuentra condicionado por las características fisicoquímicas del fármaco y del organismo, cualquier cambio puede modificar la magnitud del efecto farmacológico, así como el proceso de distribución. Además del efecto terapéutico, todos los fármacos generan efectos secundarios y la severidad de estos puede aumentarse debido a la dosis administrada [1-3].

Por esto se ha hecho necesario generar estrategias para la entrega de fármacos en los sitios de acción, con el fin de reducir las dosis administradas por medio de un transporte seguro y mejorando la especificidad.[4-6]. Entre los sistemas acarreadores de fármacos más prometedores se encuentra la liberación de fármacos a partir de microburbujas (MBs) e inducida por ultrasonido (US) [1, 4-9].

Las MBs son esferas de tamaño micrométrico compuestas de un núcleo gaseoso (les permite responder a ondas acústicas) que comprende la mayor parte del volumen de la microburbuja; Además, se encuentran estabilizadas por una coraza de lípidos, polímeros o proteínas

que actúan como una barrera entre el gas encapsulado y el medio acuoso, al mismo tiempo, funge como el componente que hace posible el acarreo de fármacos. La carga de estos se lleva a cabo por la incorporación del fármaco en la superficie de las MBs, por medio de interacciones electrostáticas o ligandos específicos, fármaco contenido en vehículos secundarios, p. e. liposomas, que luego se une a la microburbuja [10]. Además, se ha reportado que las cubiertas de fosfolípidos, particularmente si son conjugados con polietilenglicol (PEG), son menos propensas a desencadenar respuestas inmunes adversas in vivo [11, 12]. El rango de tamaños de microburbujas apropiado para uso clínico es $D \leq 10\mu m$, así se garantiza el uso de frecuencias de resonancia en un rango típicamente utilizado en ultrasonido de diagnóstico (1 a 15 MHz) [13, 14].

Cuando las MBs interactúan con un campo de US entran en un proceso de expansiones y contracciones periódicas, llamado cavitación. Se pueden observar dos tipos de este comportamiento: cavitación estable (CE) y cavitación inercial (CI) (Fig.1.1).

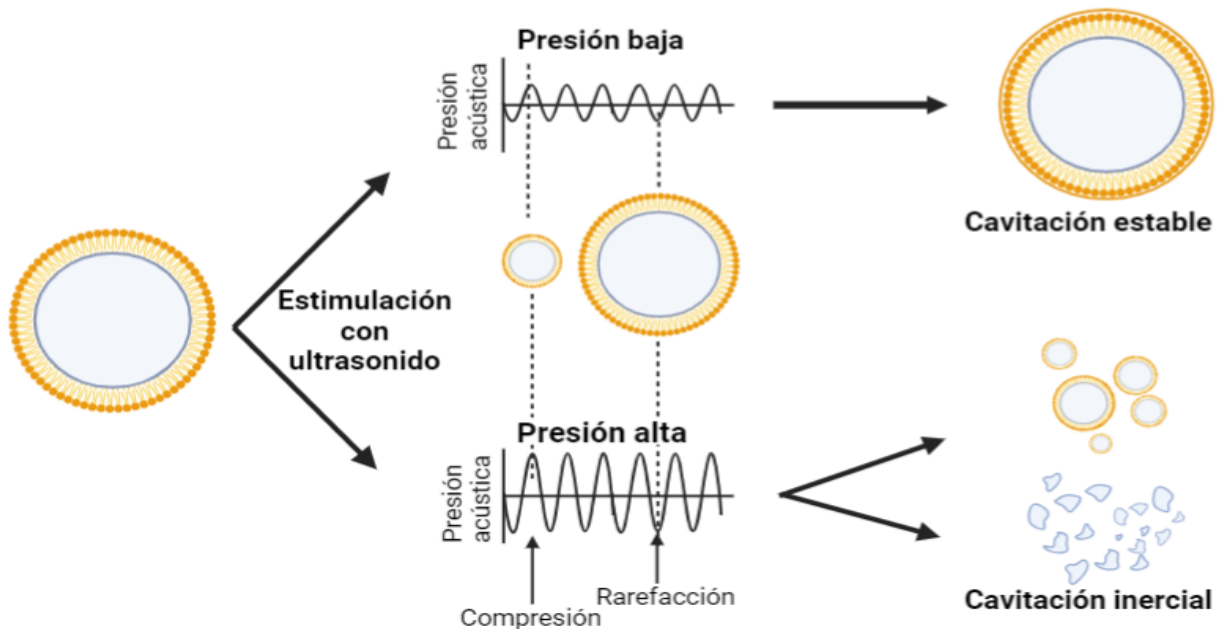


Figura 1.1: Tipos de cavitación de una microburbujas dependiente del ultrasonido aplicado. Imagen modificada de [15].

La CE se manifiesta cuando la estimulación con US de baja intensidad desencadena un movimiento periódico de las MBs, provocando la liberación de vesículas y la generación de microflujos. Además, mientras oscilan en las proximidades de la membrana celular se puede estimular la endocitosis. Por otro lado, la CI se da bajo sonicación de alta intensidad, que hace que las MBs presenten oscilación no lineal y genera fuerzas mecánicas violentas. Cuanto más caóticas y violentas se vuelven las oscilaciones, se inducen ondas de choque, microflujos, tensiones tangenciales y de cizallamiento, que pueden provocar la poración de la membrana celular o incluso la muerte celular. Ambos comportamientos conducen a efectos mecánicos y térmicos que resultan en el colapso de las MBs liberando la energía necesaria para inducir sonoporación (proceso que facilita el transporte de moléculas a través de la membrana celular) [8, 13, 16-21].

Aprovechando las ventajas de los núcleos de gas comprimible y la dispersión inducida por resonancia, las MBs se han usado para facilitar el paso de agentes terapéuticos a través de la barrera vascular y la membrana celular [8, 9, 22].

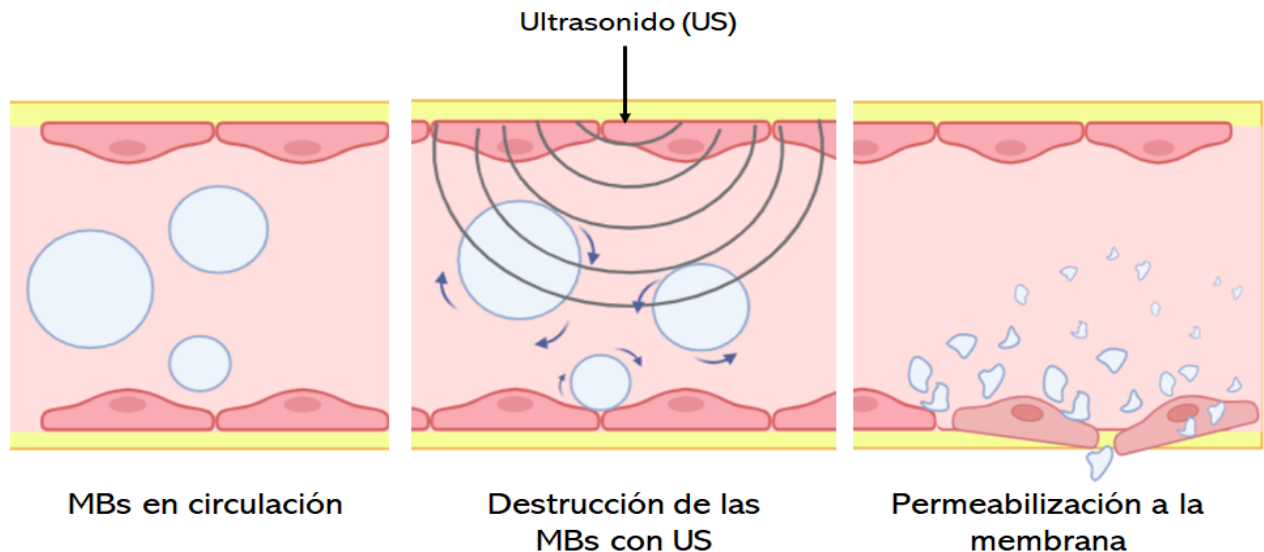


Figura 1.2: Microburbujas en circulación, aplicación de US y ruptura del tejido endotelial. Imagen modificada de [23].

Desde un punto de vista práctico, las MBs son administradas por vía intravenosa y pasan libremente a través de los vasos sanguíneos hasta que se exponen al US, luego de ello, comenzará un proceso de cavitación y, al mismo tiempo, la fuerza de radiación acústica empujará las MBs hacia la pared del vaso (Fig. 1.2) [6, 8, 13, 20].

Las condiciones de ultrasonido determinan el comportamiento de las MBs, que a su vez determinan el efecto celular por el tamaño de los poros generados. Diferentes tipos de células pueden responder de manera diferente a las mismas condiciones de ultrasonido tanto en términos de procesos de poración como de resellado. Cuando se forman poros pequeños se promueve la endocitosis de la membrana celular para sellar rápidamente el poro, mientras que, con poros muy grandes se promueve la muerte celular; se ha mostrado que la reparación de los poros ocurre en el orden de milisegundos a segundos por lo tanto, en algunos casos, la aparición de estos es transitoria [24, 25].

Capítulo 2

Antecedentes

Investigaciones recientes han evaluado modelos para facilitar la acción biológica de compuestos terapéuticos de forma eficiente mediante la destrucción de microburbujas por pulsos de ultrasonido.

Navarro y colaboradores desarrollaron un sistema MBs-US como acarreador del péptido antenapedia-caveolina-1 (Ap-Cav) para evaluar la permeabilidad intracelular a través de la inhibición del óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) en un modelo *ex vivo* de anillos aórticos de rata [26]. Los segmentos de aorta fueron incubados con las MBs-Cav y fueron expuestos a pulsos de US.

Con la intención de inducir la contracción vascular aplicaron un pretratamiento de fenilefrina a los anillos aórticos. Luego al observar la contracción máxima administraron acetilcolina la cual estimula la síntesis de óxido nítrico (ON), que tiene como efecto la relajación vascular. Ya que la Cav inhibe la actividad de la eNOS, la inhibición de la relajación implica una disminución en la síntesis de ON. Este sistema permitió aumentar la inhibición debido a la liberación controlada de la Cav y reducir la dosis utilizada con respecto a la liberación no controlada (Fig.2.1), dados estos resultados ellos concluyen que el sistema MBs-US aumenta la permeabilidad celular.

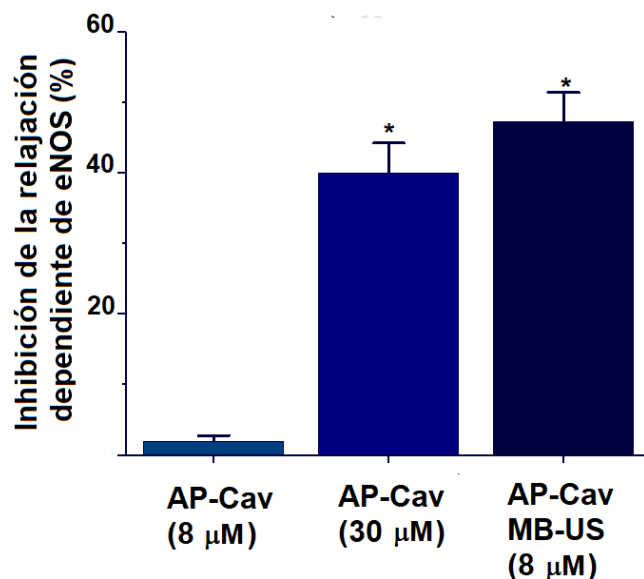


Figura 2.1: Comparación del efecto de la liberación controlada de antennapedia-caveolina(AP-Cav) mediante MBs-US y administración libre en los anillos aórticos de rata. Imagen tomada de [26].

También se ha hecho uso de este sistema para el silenciamiento de la expresión genética, Elisa Villa, evaluó el impacto en la producción de NO tras el silenciamiento de eNOS mediado por el tratamiento con microburbujas y transfectado con Lipofectamina [27].

Como parte de su trabajo ella comparó el efecto inhibitorio del siRNA eNOS (small interfering RNA, siRNA) en células transfectadas con lipofectamina y mediante MBs-US. La eficiencia de transfección de siRNA eNOS asistida por MBs y US fue mayor en comparación con Lipofectamina, dado que se requirió un menos de la cantidad de siRNA (Fig. 2.2). Ella concluyó que, a partir de sus resultados, el sistema de entrega mediante MBs-US podría ser un procedimiento específico, seguro y prometedor para la administración de siRNA eNOS.

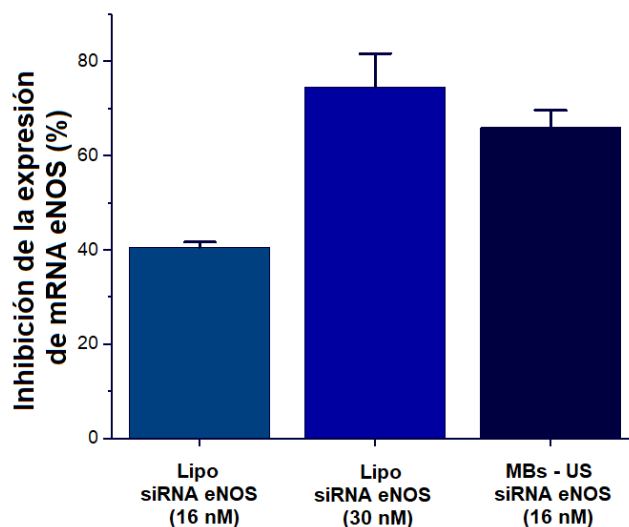


Figura 2.2: Comparación de la inhibición de la expresión de eNOS para las células transfectadas con lipofectamina vs el complejo MBS-US. Se necesitó aproximadamente el doble de la concentración del siRNA para que el efecto mediado por la transfección con lipofectamina fuera comparable con los resultados dados por el sistema MBs-US. Imagen tomada de [27].

Por otro lado, pero con el desarrollo de un estudio in vivo, Sasaki y colaboradores (2014) utilizaron Sonazoid (agente de contraste compuesto por una cubierta de fosfolípidos que encapsula gas perfluorobutano) en combinación con US y cisplatino para retrasar el crecimiento tumoral en ratones [28]. Para esto, inocularon células provenientes de una línea celular de adenocarcinoma tiroideo por vía subcutánea en la parte posterior izquierda de los ratones hasta que los tumores alcanzaron los 5 mm de diámetro (día 0).

Luego dividieron en diferentes grupos de tratamiento a los ratones: (1) sin tratamiento; (2) con inyección intratumoral de solución salina sin US; (3) inyección intratumoral de cisplatino sin US; (4) inyección intratumoral de MBs sin US; (5) inyección intratumoral de MBs con exposición a US; (6) inyección intratumoral de cisplatino con exposición a US; y (7) inyección intratumoral de cisplatino y MBs con exposición a US. Los tratamientos se repitieron cuatro veces en días alternos (los días 0, 2, 4 y 6) y el sitio de inyección se cambió cada vez.

Tras el monitoreo del tumor, se observó que la inyección intratumoral de MBs y cisplatino + US retrasó el crecimiento tumoral en comparación con el grupo sin tratamiento (Fig. 2.3); Sin embargo, los tumores continuaron creciendo pero el crecimiento tumoral en otros grupos no se retrasó en comparación con el grupo sin tratamiento. Por esto, ellos sugirieron que el complejo MBs-US mejora los efectos antitumorales y citotóxicos del cisplatino.

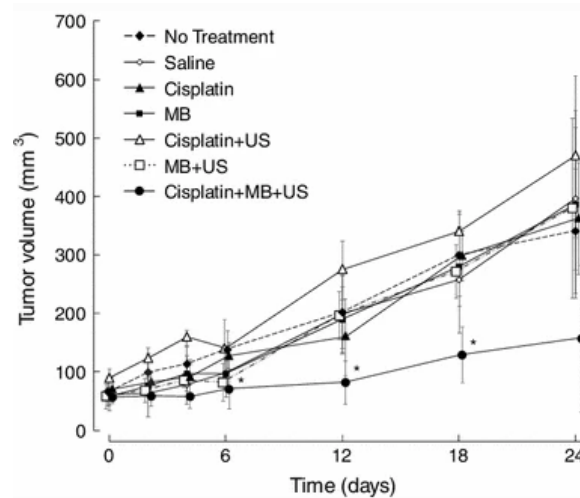


Figura 2.3: Crecimiento tumoral. La combinación de exposición a US y la inyección intratumoral de MBs + cisplatino retrasó el crecimiento tumoral en comparación con los demás grupos con los diferentes tratamientos el mismo día. Imagen tomada de [28].

Capítulo 3

Justificación

A partir de los trabajos realizados previamente en nuestro laboratorio se puede sugerir que al combinar la capacidad de las microburbujas de acarrear diversas moléculas y el potencial del ultrasonido para liberar las moléculas contenidas en ellas, a través de la destrucción de las MBs, conlleva a un aumento de la permeabilidad celular, sin embargo hacen falta más estudios para comprender los mecanismos involucrados en este proceso.

Con esta finalidad, el presente trabajo busca evaluar, a través de estudios *in vitro*, el efecto potenciador que tiene la liberación de un fármaco modelo a partir del sistema de microburbujas-ultrasonido sobre la curva dosis respuesta de un fármaco.

Capítulo 4

Hipótesis

El uso del sistema microburbujas-ultrasonido (MBS-US) como acarreador de agonistas biológicos puede modificar la relación dosis-respuesta de un fármaco.

Capítulo 5

Objetivos

Objetivo general

Demostrar que el efecto potenciador del complejo MBS-US se presenta a lo largo de toda la curva dosis respuesta de un fármaco.

Objetivos particulares

- Caracterizar las propiedades de las microburbujas.
- Determinar los efectos del fármaco en el complejo MBS-US y en administración libre.
- Comparar el efecto del complejo MBS-US en la curva dosis respuesta del fármaco.

Capítulo 6

Metodología

6.1. Fabricación de microburbujas(MBs)

Para la síntesis de microburbujas se inicia con una preparación previamente desarrollada en el laboratorio [29]. Esta consiste de una mezcla de tres fosfolípidos: 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (*DPPC*), 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(amino(polietilenglicol)-2000) (*DSPE-PEG2000*) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) y 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3- fosfoserina (*DPPS*) (Sigma-Aldrich Corp, St Louis, MO, USA), con una relación molar 95:5 y 0.6 mg/mL para este último.

6.1.1. Preparación de películas de lípidos

1. Se pesan DPPC, DSPE-PEG2000 y DPPS por separado en viales ámbar de 20 mL, para una relación molar 95:5 y 0.6 mg/mL:
 - DPPC: 13.3 mg
 - DSPE-PEG200: 2.7 mg
 - DPPS: 2.4 mg
2. Se disuelven el DPPC y DSPE-PEG200 con 1 mL de cloroformo cada uno, mientras que el DPPS se disuelve con 1 mL de una mezcla de cloroformo y metanol (50:50).

3. Una vez disueltos, se mezcla la solución de DPPC con la solución de DSPE-PEG2000, se agitan durante un minuto, haciendo uso de un sistema de agitación magnética. Pasado este tiempo se agrega la solución con DPPS y se repite el procedimiento.
4. La mezcla se distribuye en 8 viales ámbar y se evapora el solvente mediante corrientes de nitrógeno en agitación magnética constante a temperatura ambiente, obteniendo una película delgada de la mezcla.
5. Con el fin de eliminar totalmente los solventes utilizados, los viales ligeramente tapados se colocan en un desecador al vacío durante dos horas.
6. Por último, los viales que contienen las películas se cierra, sellan y se les inyecta una atmósfera de nitrógeno con el fin de evitar la oxidación y se almacenan a -20°C .

6.1.2. Hidratación de la película de fosfolípidos y formación de las microburbujas

Para hidratar la película de fosfolípidos se hace uso de un buffer de hidratación (solución salina fosfato (PBS):glicerol: propilenglicol (80:10:10 v/v)). El procedimiento se detalla a continuación:

1. Se agregan $500\ \mu\text{L}$ del buffer de hidratación a un vial con mezcla de lípidos.
2. Luego la mezcla se somete a agitación magnética constante a 400 rpm a una temperatura de 60°C , con el fin de formar liposomas multilaminares.
3. La suspensión de liposomas obtenida se coloca en un vial ámbar de 1.5 mL (PTFE/Silicone septum), con el fin de evitar la entrada y salida de gases, el vial se sella con Parafilm.
4. Se generó vacío al vial durante 2 min para extraer el aire y se sustituyó con gas perfluoropropano (C_3F_8), el cual fue inyectado durante 5 min a una presión de 5 psi.

5. Para obtener las microburbujas, la mezcla se somete a agitación mecánica por 46 s a 4500 osc/min en un amalgamador (Ultramat S, Effingham, Ill, USA).
6. Finalmente, las MBs se centrifugan dos veces a 300 g a 24 °C durante 20 min, con el fin de eliminar los lípidos que no contribuyeron a su formación y se resuspenden en 600 μL de buffer de hidratación.

6.1.3. Distribución de tamaños y concentración

Una vez obtenidas las microburbujas es necesario realizar su caracterización y cuantificación, para ello se obtienen imágenes de las MBs por microscopía confocal (Leica TCS SP5, Germany, objetivo de $63\times$ + zoom digital de $3\times$). Para realizar la caracterización de la distribución de tamaños y concentración de la suspensión inyectando las MBs diluidas en buffer de hidratación (1:10 v/v) en una cámara microfluídica de PDMS (geometría cuadrada, $1 \times 1 \times 0.02$ mm) Fig.6.1.

Se tomaron cuatro imágenes diferentes por cámara del dispositivo, se evaluaron tres preparaciones de MBs independientes. Las imágenes se analizaron con el software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) y el histograma de distribución de tamaños fue graficado con el software OriginPro (Northampton, Massachusetts, USA).

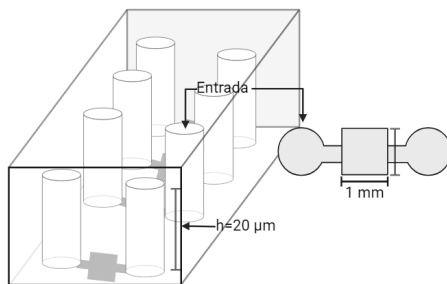


Figura 6.1: Dispositivo microfluídico para la caracterización de microburbujas. Diseño con dimensiones de las cámaras microfluídicas.

6.2. Incorporación y cuantificación del fármaco a las microburbujas

Después de caracterizar las microburbujas, se incorporó doxorubicina (dox) mediante la incubación de 5.21×10^6 MBs y $50 \mu\text{L}$ de dox en rotación constante durante 30 minutos, a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. Una vez que termina el tiempo de incubación se procede a a centrifugar dos veces a 300 g, durante 5 minutos con el fin de eliminar el fármaco que no se adhirió a las MBs y se resuspenden en $600 \mu\text{L}$ de buffer de hidratación.

Para cuantificar la concentración de dox en las MBs se realiza la destrucción de los $600 \mu\text{L}$ de MBs_{dox} por exposición al US (1 MHz, 50 % del ciclo de trabajo, $3 \text{ W}/\text{cm}^2$ 2 min), se centrifuga el tubo contenedor y se transfiere el subnadante a una placa de 96 pozos para medir la absorbancia de la muestra en un espectrofotómetro de placas (Elx800, Biotek). Se realizó una curva estándar de la absorbancia a 590 nm dada por diferentes concentraciones de dox y en ella se interpoló el valor dado por las MBs_{dox} , se evaluaron tres preparaciones de MBs independientes.

6.3. Cultivo celular

Con el fin de evaluar el impacto de los tratamientos de este proyecto se hizo uso de la línea celular CACO-2 (ATCC HTB-37TM) correspondiente a adenocarcinoma colorrectal humano. Las células se cultivaron con medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), complementado con 10 % de Suero Fetal Bovino (FBS) y 1 % de penicilina/estreptomicina (Gibco, NY, USA) en una atmósfera controlada y humidificada con 5 % de CO_2 a 37°C en cajas de Petri con un diámetro de 3.5 cm.

6.3.1. Formación de la monocapa y curva de crecimiento

Se realizó el monitoreo del crecimiento celular con el fin de conocer el porcentaje de confluencia celular (porcentaje del área superficial del recipiente de cultivo cubierto por una capa de células) y tener un mayor control sobre el número de células presentes respecto al tiempo, para ello se realizó el siguiente protocolo:

- Se sembró un inóculo de 80000 células CACO-2 en cajas de Petri de 3 cm de diámetro.
- Las cajas se incubaron durante 24, 48, 72 y 96 h con distinto número de pasajes y sembrando por duplicado.
- Pasado este tiempo los núcleos celulares se tiñeron con 0.1 % de Hoescht 33342 (Molecular Probes, NY, USA; 350 nm/461 nm Ex/Em) en medio DMEM.
- Luego las cajas se incubaron en la oscuridad a 37°C durante 30 min.
- Posteriormente, se tomaron 16 fotografías en posiciones aleatorias mediante microscopía de fluorescencia (Nikon Eclipse TE2000-U) con objetivo 10×.
- Finalmente, las imágenes obtenidas se analizaron con el software ImageJ.

6.3.2. Viabilidad celular

La viabilidad celular se midió para todos los grupos experimentales 24 h después del tratamiento a través de la obtención de imágenes por microscopía de fluorescencia de la misma forma que en la sección anterior.

Los cultivos en las cajas de Petri se incubaron durante 30 min en la oscuridad a 37°C con Hoestch y Homodimero-1 de etidio rojo fluorescente (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA, Ex/Em 495/635 nm). Este último es un indicador de muerte celular, se intercala entre los ácidos nucleicos y solo se difunde a través de las membranas celulares dañadas; con esta

tinción se logra diferenciar las células vivas de las muertas. La viabilidad celular y la muerte celular se evalúan con la siguientes relaciones:

$$\text{Células vivas (\%)} = \left(\frac{\text{células totales} - \text{células muertas}}{\text{células totales}} \right) \times 100 \quad (6.1)$$

$$\text{Células muertas (\%)} = 100 - \text{Células vivas} \quad (6.2)$$

6.4. Caracterización del efecto de la doxorrubicina en administración libre.

Para caracterizar la eficiencia de muerte celular del fármaco, las células se dividieron en dos grupos: un grupo control (sin dox) y un grupo experimental expuesto a concentraciones crecientes del fármaco (0.1 μM , 0.5 μM , 1.0 μM , 5.0 μM , 10.0 μM y 100.0 μM) prediluido en medio DMEM sin suero. Se mantuvieron las células con el tratamiento incubadas durante 24 horas. Pasado este tiempo se evaluó la muerte celular como se describe en la sección 6.3.2.

6.5. Estimulación con US.

Para establecer las condiciones de los pulsos de ultrasonido y cuantificar su efecto sobre la viabilidad celular se utilizó un arreglo experimental previamente establecido en el laboratorio [29]. Este consiste en el uso de un transductor plano con una superficie de 5 cm^2 , perteneciente a un equipo comercial de ultrasonido (Chattanooga Group, TN, USA, modelo 2776) acoplado en una apertura localizada en la zona inferior de una caja de plástico (17 \times 25 \times 15 cm), Fig. 6.2; El ciclo de trabajo (% del total), intensidad de potencia (W/cm^2), tiempo de exposición y frecuencia (1-3 MHz) se ajustan por el usuario.

Se agrega agua a 37°C, (el volumen suficiente para mantener una distancia de 2 cm entre el transductor y la monocapa celular y permitir la propagación de las ondas acústicas), 30 segundos de exposición, con un ciclo de trabajo del 10% y una frecuencia de 1 MHz; estas condiciones se mantienen durante todos los experimentos. Para estimular la monocapa de

células adheridas en la base de la caja de Petri se llena la caja con medio DMEM sin complementar y se sella con parafilm. La caja se coloca invertida a 1 cm de distancia de la base del transductor (la caja tiene 1 cm de altura, de esta forma se obtiene una distancia total de 2 cm entre la base del transductor y la monocapa).

Además, previo a la estimulación celular con el US se midieron los valores de la presión acústica negativa máxima (NMP) generada por el transductor, medidos en ausencia del cultivo celular, utilizando un hidrófono calibrado (HNR-0500, Onda, CA, USA).

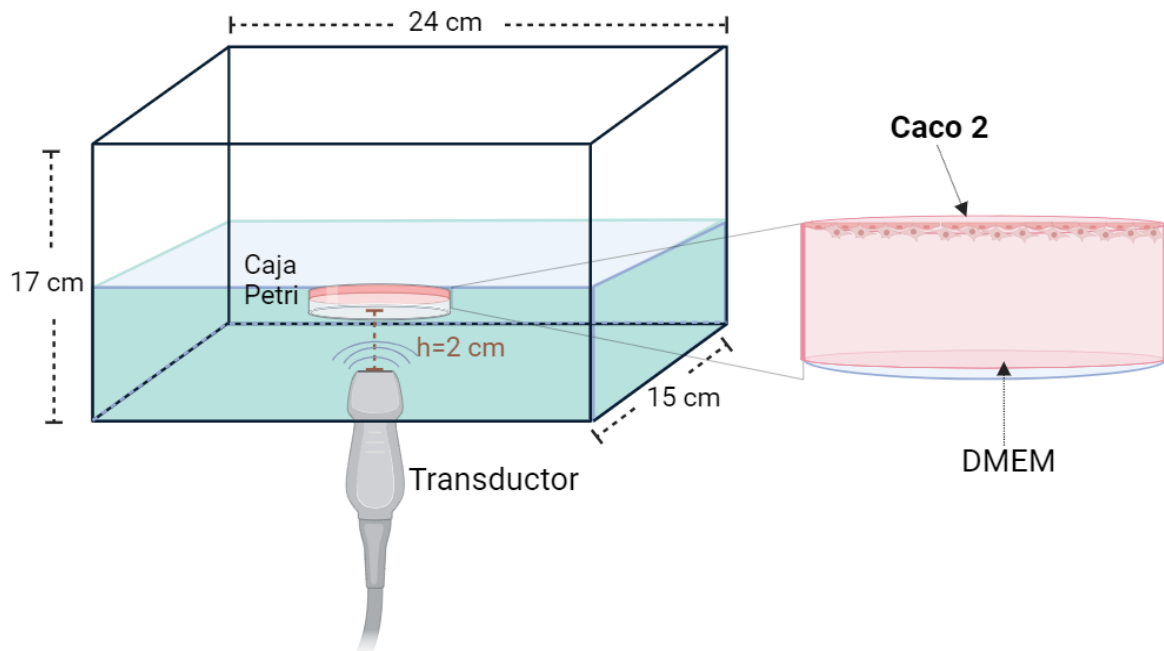


Figura 6.2: Arreglo experimental del ultrasonido para cultivos celulares.

Para caracterizar el efecto del US sobre la viabilidad celular, las células se dividieron en dos grupos: un grupo control (sin estimulación de US) y un grupo experimental al cual se le aplicaron estímulos crecientes de US (0.5 W/cm^2 a 3 W/cm^2 , cada 0.5 W/cm^2) a los que se les midió la viabilidad celular (sección 6.3.2). A partir de los resultados de estos experimentos fijamos el valor de la intensidad con la que estimulamos los cultivos celulares en los siguientes experimentos.

6.6. Estimulación con MBs+US.

Para evaluar el impacto del estímulo de las microburbujas y el ultrasonido en la viabilidad celular se estimuló a las células con diferentes concentraciones de MBs.

A partir de la concentración original (5.21×10^9 MBs/mL) se realizaron diluciones para obtener una relación burbuja-célula: 1:1 y 6:1, con base en una confluencia celular del 80% (alrededor de 1.28×10^6 células). Las células se dividieron en dos grupos: un grupo control (sin US ni MBs) y el grupo de células tratadas con US+MBs. Las microburbujas se agregaron a la caja de petri con medio DMEM sin suero, la viabilidad de la monocapa se midió con el procedimiento antes mencionado (sección 6.3.2).

De forma independiente se realizó la observación del efecto de cavitación de las MBs por el estímulo de US. Para ello se utilizó un dispositivo microfluídico de PDMS (Fig. 6.3) se obtuvieron imágenes que representan este proceso con el uso de una cámara rápida (Photron, FASTCAM SA3) acoplado a un microscopio biológico (Olympus BX51, objetivo $50\times$). Se aplicó ultrasonido (10% ciclo de trabajo, 1 MHz de frecuencia, 1.5 W/cm^2 , durante 30 seg) a una dilución de microburbujas 50:50 (v:v), dada la concentración obtenida en la sección 6.1, en buffer de hidratación.

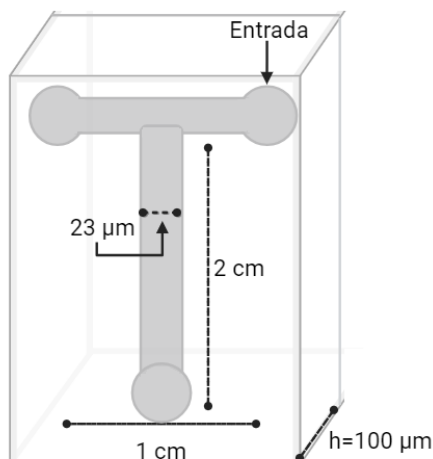


Figura 6.3: Dispositivo microfluídico para la estimulación de MBs con US. Diseño con dimensiones del conducto microfluídico.

6.7. Administración de doxorrubicina en el complejo MBs-US.

La administración del fármaco cargado en las MBs a las células se realizó a partir de suministrar diferentes concentraciones de las MBs_{dox} obtenidas a partir de la dilución de la concentración obtenida en la sección 6.2 en medio DMEM, las concentraciones usadas fueron:

- $0.05 \mu\text{M}$
- $0.1 \mu\text{M}$
- $0.5 \mu\text{M}$
- $1.7 \mu\text{M}$

Las microburbujas se agregaron a la caja de Petri con medio DEMEM (Fig. 6.4), la destrucción de las MBs se realizó con el arreglo y parámetros descrito previamente (la potencia del ultrasonido fue fijada en 1.5 W/cm^2); El tratamiento se mantuvo durante 24 horas, pasado ese tiempo se tiñeron los núcleos celulares y se obtuvieron imágenes con microscopia de fluorescencia. La tinción y el análisis de las imágenes se realizó con los métodos ya descritos (6.3.2).

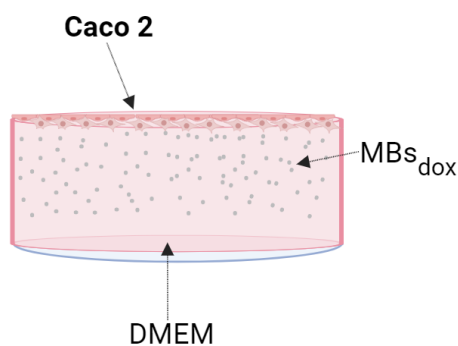


Figura 6.4: Representación de la caja de Petri con el cultivo celular y MBs_{dox} .

Para poder determinar la relación en la combinación de fármacos se calculó el índice de combinación: .

$$IC = \frac{[D]_1}{[D_x]_1} + \frac{[D]_2}{[D_x]_2}$$

donde $[D]_{1,2}$ son la concentración, en combinación, de cada fármaco para obtener $X\%$ de respuesta y $[D_x]_{1,2}$ son la concentración, en administración sola, de cada fármaco para obtener el mismo $X\%$ de respuesta [30].

Capítulo 7

Resultados

7.1. Microburbujas

Posterior a la síntesis de las microburbujas, se llevo a cabo la caracterización de las mismas. En la Fig.7.1(a) se muestra una imagen de las microburbujas obtenidas, donde se observa que poseen una morfología esférica y no presentan aglomeraciones. A partir del análisis de imágenes, fue posible obtener el histograma de distribución de tamaños (Fig.7.1(b)), asociando a las MBs un rango entre 0.2 - 5.0 μm de diámetro, una concentración de $5.21 \pm 0.5 \times 10^9$ MBs/mL con un diámetro promedio de 1.09 μm .

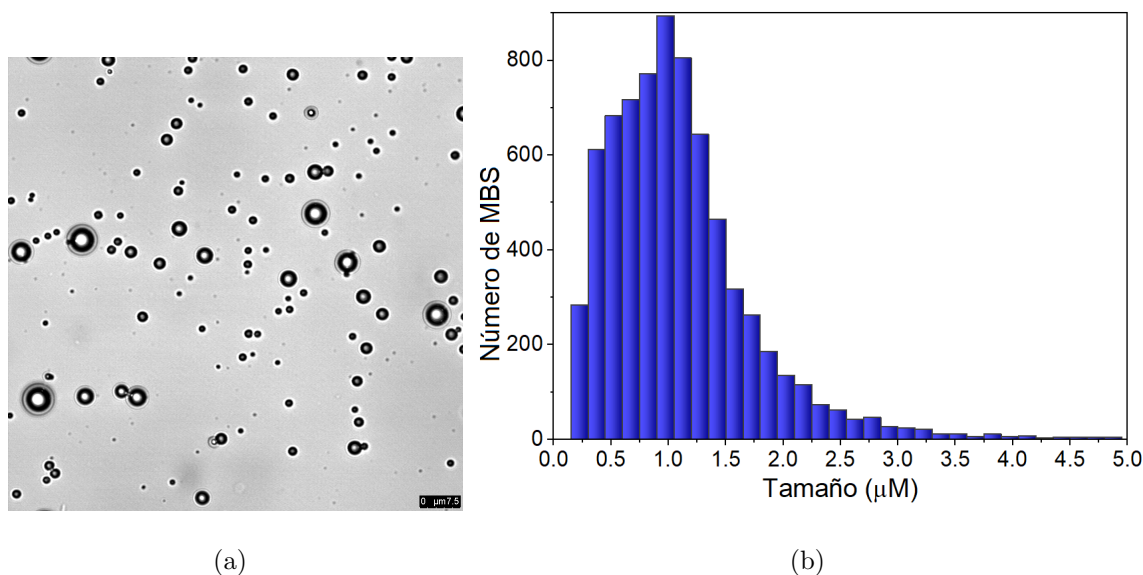
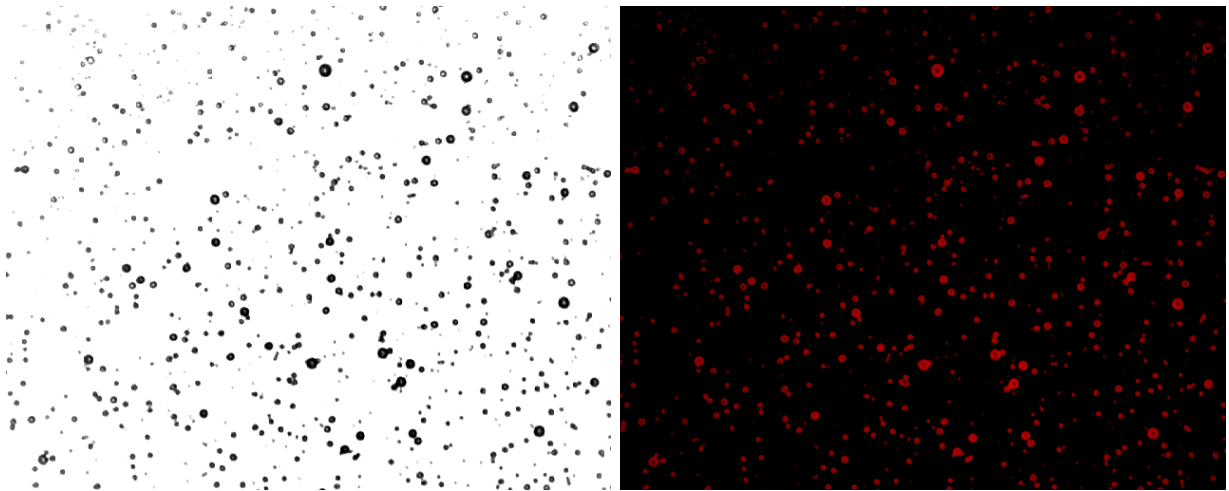


Figura 7.1: Distribución de tamaños de microburbujas. a) Imagen confocal representativa de una muestra de microburbujas a una dilución 1:10, se puede apreciar la geometría esférica de las MBs. b) Histograma de distribución de tamaños para una población de microburbujas provenientes de 3 muestras independientes.

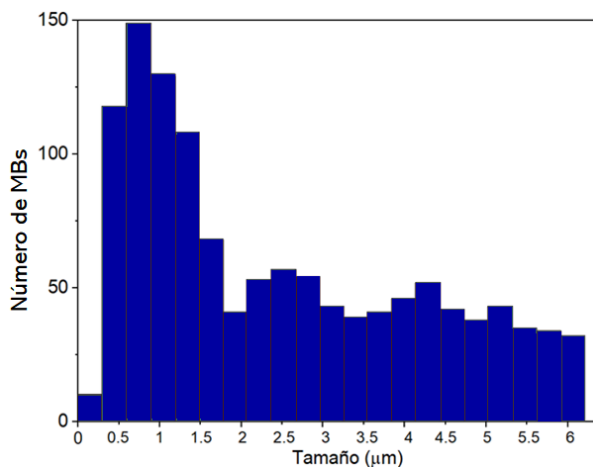
7.2. Microburbujas+dox

El siguiente paso fue la cuantificación y adición del fármaco a las microburbujas, dado que la dox tiene propiedades de auto-fluorescencia (481 nm/570 nm, Ex/Em) se comprobó su unión a las microburbujas mediante microscopía de fluorescencia (Nikon Eclipse TE2000-U), objetivo 20×), en la figura 7.2 a) y b) se puede apreciar el campo claro y el campo oscuro de una imagen representativa de las MBs_{dox} , se realizó la caracterización de los tamaños de estas MBs obteniendo un diámetro promedio de 2.4 μm (Fig.7.2 c)) y una concentración de 9.8×10^8 MBs/mL. La curva estándar de la absorbancia de la dox se realizó con la medición de 8 concentraciones diferentes del fármaco entre 0 μM y 70 μM, se realizaron cuatro mediciones independientes y los resultados se ajustaron a una línea recta ($R^2 = 0.996$), luego se midió la absorbancia de las MBs_{dox} destruidas y se interpoló en la curva antes realizada (Fig.7.2 d)). El valor de la concentración liberada por 2.084×10^9 MBs de dox es $64.76 \pm 8.061 \mu M$.

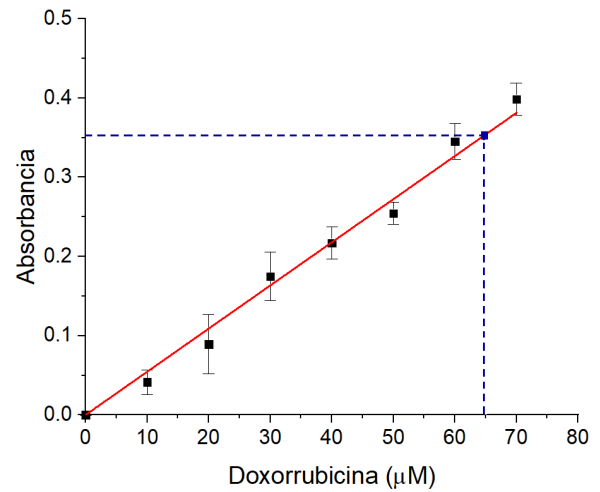


(a)

(b)



(c)



(d)

Figura 7.2: Incorporación de doxorubicina a las microburbujas, a) campo claro y b) campo oscuro, la fluorescencia roja representa la adición del fármaco a las MBs, se aprecia que las microburbujas mantienen la geometría esférica y no se aglomeran; en c) se muestra el histograma de tamaños de las MBs_{dox} , se aprecia un aumento en el tamaño de los diámetros respecto a las MBs sin dox. En d) se aprecia la curva de calibración de la absorbancia dada por diferentes concentraciones de dox ($0 \mu\text{M} - 70 \mu\text{M}$), el cuadro azul representa el valor interpolado de la concentración liberada por las MBs_{dox} . Los datos representan el promedio \pm el error estándar de la media (SEM) de 4 mediciones independientes.

7.3. Formación de la monocapa celular

Se monitoreo el crecimiento de la línea celular Caco 2 en el tiempo. Los resultados obtenidos, Fig. 7.3(a) muestra claramente como a través del tiempo la población celular aumenta, teniendo que aproximadamente a los 4 días, toda el área cubierta por células. Mediante el análisis de imágenes, se construyó la curva de crecimiento celular, donde se representa el número de células en función del tiempo para un inóculo de 80 mil células. Estos datos experimentales fueron comparados contra el rendimiento teórico reportado para un área de crecimiento de 10 cm^2 correspondiente a una caja de Petri de 3.55 cm de diámetro, donde la confluencia se alcanza a 1.6×10^6 células, lo cual según nuestros resultados obtenemos aproximadamente a los 4 días. Para cuantificar correctamente los núcleos celulares y evitar adquirir imágenes donde tengamos aglomeración, todos los experimentos se realizaron con un crecimiento celular de 3 días (aproximadamente 70 % de confluencia celular).

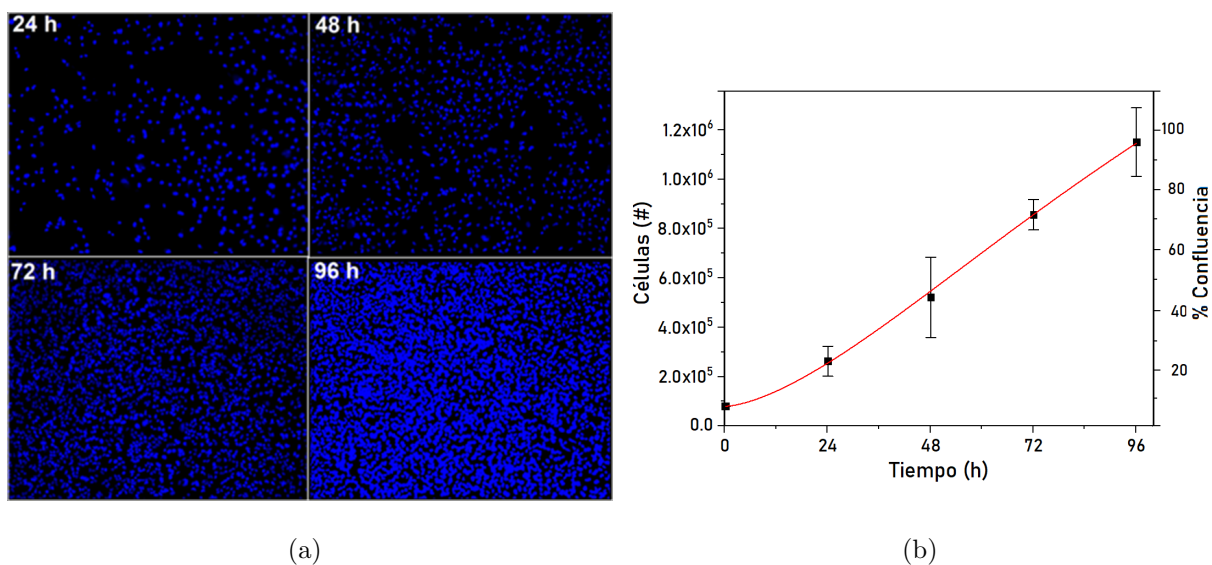


Figura 7.3: Caracterización del crecimiento de la línea celular CACO 2. (a) Imágenes representativas de los núcleos celulares teñidos con Hoechst 33342 a las 24, 48, 72 y 96 h de crecimiento. (b) Cuantificación del crecimiento de las células CACO 2 en función del tiempo. Los datos representan el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes.

7.4. Cuantificación de la eficiencia de muerte celular de doxorubicina en administración libre.

Una vez establecidas las condiciones de cultivo celular, lo siguiente fue realizar el análisis correspondiente a la eficiencia de muerte celular del fármaco en administración libre.

Los resultados obtenidos, Fig. 7.4 muestran claramente como conforme la concentración de dox aumenta, el porcentaje de células muertas (representadas por los núcleos en color rojo) manifiesta un comportamiento similar.

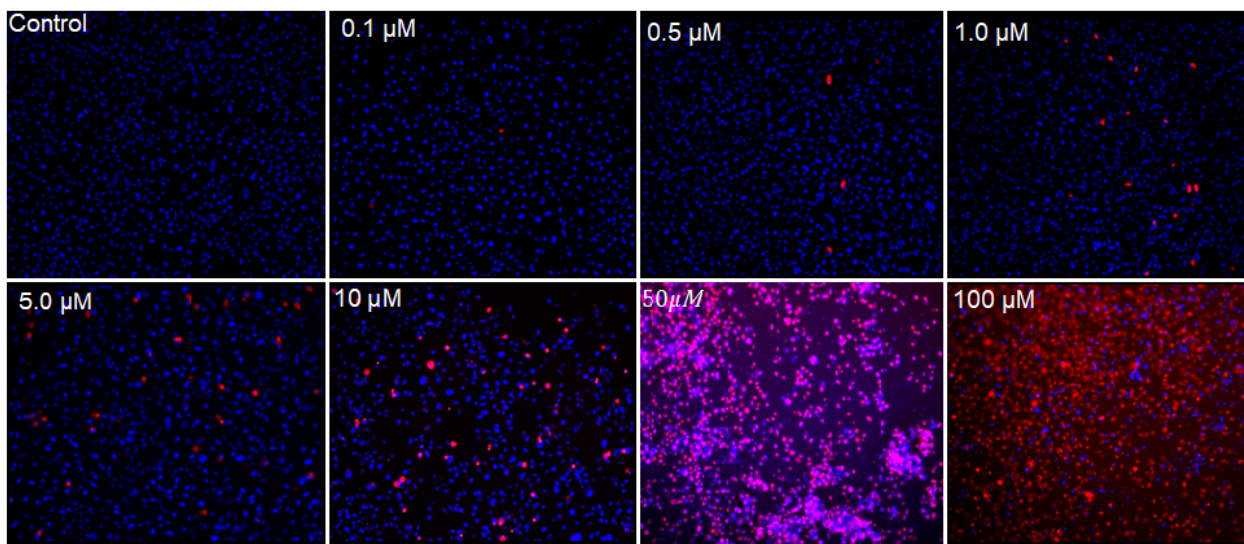


Figura 7.4: Respuesta celular de la administración libre de doxorubicina. Imágenes representativas de la monocapa celular post-tratamiento (los núcleos celulares teñidos con Hoechst 33342 (azul) y las células muertas con Homodímero de etidio (rojo)).

A partir del análisis de estas imágenes se obtuvo la gráfica de dosis-respuesta (Fig. 7.5 a)) con ella estimamos que para la concentración de 100 μM del fármaco, alrededor del 90 % de la población celular se encuentra muerta. Además, para obtener el valor de la concentración efectiva 50 CE_{50} se realizó el ajuste no lineal de la respuesta de las células CACO-2 a la dox usando el modelo cinético de la ecuación de Hill, este ajuste se realizó con el programa

OriginPro y se obtuvo el valor de $CE_{50} = 32.43 \pm 8.9 \mu\text{M}$ (Fig. 7.5 b)).

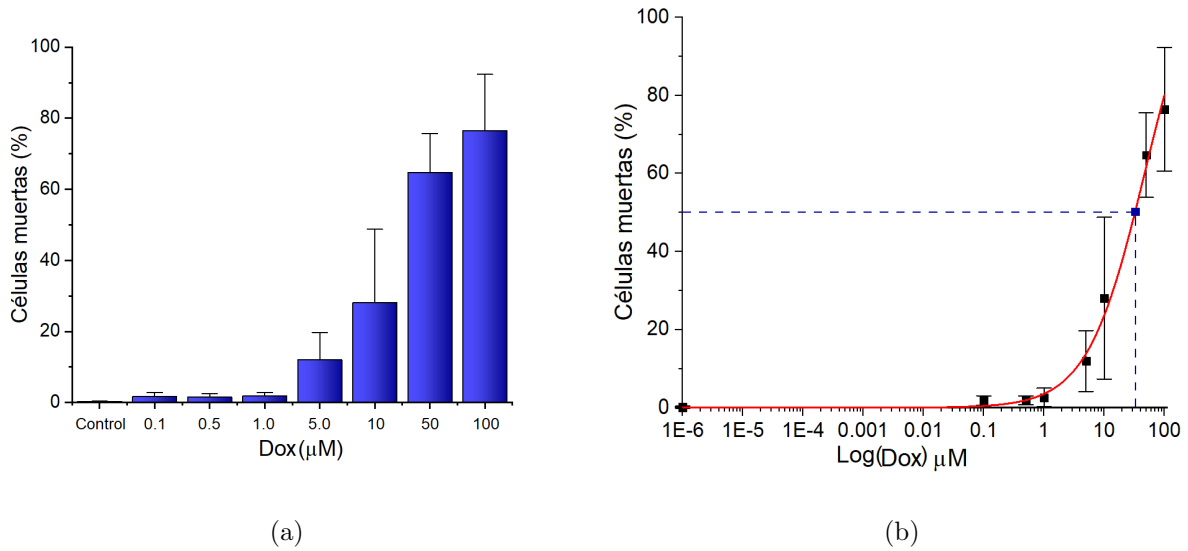


Figura 7.5: Curva dosis-respuesta de la dox en células CACO-2. Concentraciones crecientes de dox aumentan la muerte celular, en b) se muestra el ajuste no lineal (Eq. Hill) realizado con OriginPro; El cuadro azul representa el valor de la CE_{50} . Los datos representan el promedio \pm SEM, N=3.

7.5. Caracterización del campo acústico

Se realizó la caracterización de los pulsos de ultrasonido generados por el transductor dentro del dispositivo en ausencia de la caja de Petri. Con esta medición se obtuvo la presión acústica generada por las amplitudes máximas negativas de las ondas de ultrasonido. A partir de estos datos se estimó el índice mecánico al que se expondrían a los cultivos celulares.

Para obtener los valores de la presión acústica (Fig.7.6 a)) se midió con una distancia de 2 cm entre el transductor y el hidrófono la amplitud de la señal de presión pico negativa (PNP) dados por el US. Se aprecia que la presión acústica es directamente proporcional a la intensidad del US, el rango de presión acústica al cual se puede someter a las MBs, para los parámetros antes mencionados, están entre 0.11-0.31 MPa. También se cuantificó el valor del índice mecánico (IM), este valor se utiliza para describir la cavitación inercial y

predecir el riesgo de generar daño biológico debido a la energía mecánica [31]. En la Figura 7.6 b) se grafican los valores del IM correspondientes a los valores de las presiones acústicas obtenidos en la Figura 7.6 a); los cuales se encuentran dentro del rango de 0.1 a 0.3 que son índices aceptados dentro del rango permitido por la FDA (Food and Drug Administration: Administración de Medicamentos y Alimentos).

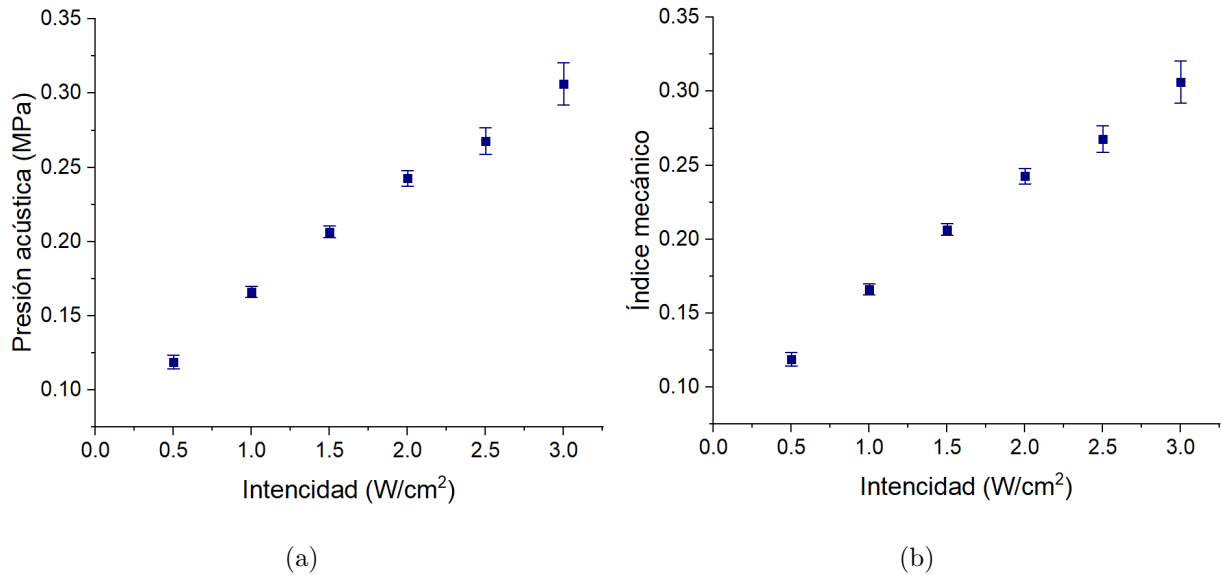


Figura 7.6: Caracterización de la presión acústica generada por el ultrasonido y detectadas por el hidrófono. a) Presión acústica en función de la intensidad de las ondas de ultrasonido. b) Índice mecánico en función de la intensidad del ultrasonido, los colores corresponden a la escala de riesgo de daño mecánico. Todas las mediciones se realizaron con un ciclo de trabajo del 10 %, frecuencia de 1 MHz y 2 cm de distancia entre el transductor y el hidrófono. Los datos representan el promedio \pm SEM, N=3.

7.6. Microburbujas+ultrasonido

Se realizó la exposición de las MBs a US (2 MHz, 10 % ciclo de trabajo, 1.5 W/cm², 30 s), la Figura 7.7 muestra imágenes secuenciales de una grabación de la explosión de MBs en una sección recta del dispositivo microfluídico (Fig. 6.3), la insonación se realizó desde la parte superior del canal.

En la figura 7.7 (1) se aprecia la concentración total de MBS, sin flujo, y sin US. A partir de la

figura 7.7 (2) se comienza a aplicar US, conforme pasa el tiempo las MBs que tienen ondas de resonancia natural igual a la resonancia aplicada explotan y las demás oscilan; Sin embargo, todas se ven empujadas por la presión acústica en dirección paralela con la dirección en la que se está aplicando.

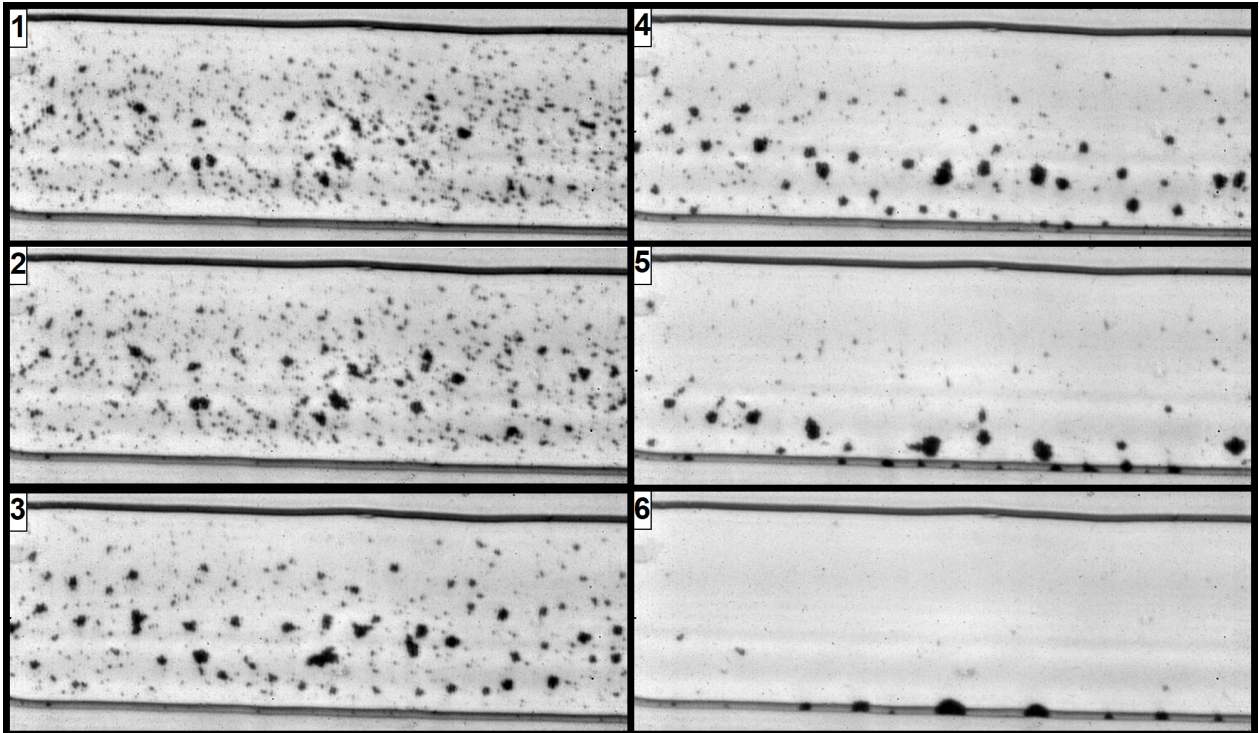


Figura 7.7: Microburbujas insonicadas. De arriba a abajo y de izquierda a derecha se muestran cuadros de imagen de alta velocidad del estallido de las MBs debido a la presión acústica (2 MHz, 10 % ciclo de trabajo, 1.5 W/cm², 30 s) en un dispositivo microfluídico.

7.7. Efecto de la presión acústica sobre la viabilidad celular.

Una vez caracterizada la eficiencia del fármaco se procedió a cuantificar el impacto de la estimulación con ultrasonido en la viabilidad celular. Basados en estudios previos realizados en el laboratorio, se ajustaron los siguientes parámetros para el uso del equipo de US:

- Frecuencia: 1 MHz

- Ciclo de trabajo: 10 %
- Tiempo de exposición: 30 s
- Distancia entre la base del transductor y la monocapa celular: 2 cm

Luego se aplicaron estímulos crecientes de US ($0.5 W/cm^2$ - $3 W/cm^2$) a los cultivos celulares y para medir el efecto de la presión generada por las ondas acústicas se aplicó el protocolo de viabilidad antes descrito. La tinción de los núcleos celulares permitió la estimación de la viabilidad celular a partir de las células muertas y vivas después de la exposición (Fig. 7.8).

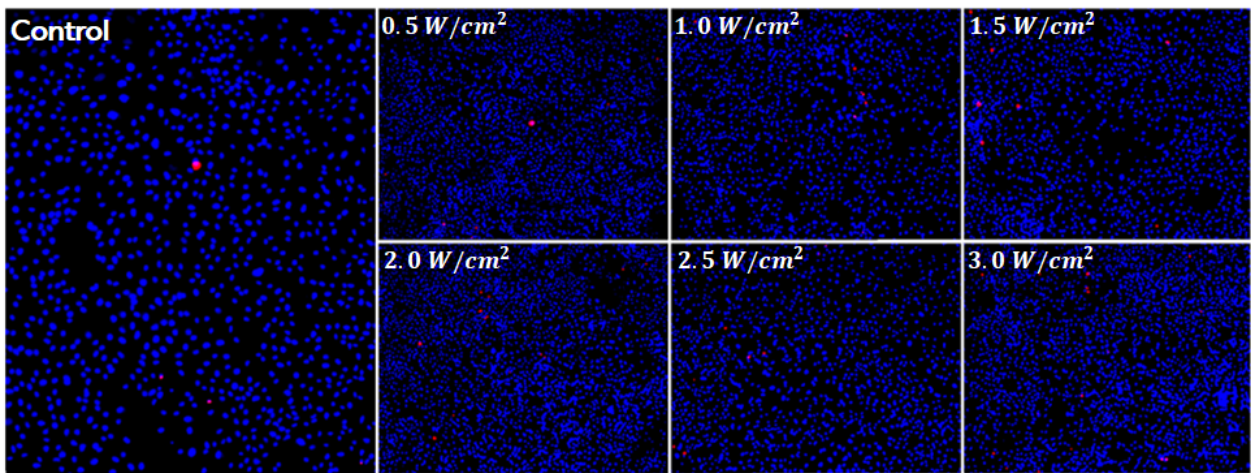


Figura 7.8: Respuesta celular del efecto de la presión generada por las ondas acústicas. Imágenes representativas de la monocapa celular post-tratamiento (tinción de los núcleos celulares realizada con Hoechst 33342 (azul) y los núcleos de las células muertas con Homodímero de etidio (rojo)).

La cuantificación de la respuesta en la viabilidad celular (Fig. 7.9) nos muestra que la presión generada por las ondas acústicas no causa un daño significativo sobre las células, ya que el valor de la viabilidad se mantiene arriba del 95 % incluso cuando se utilizó la intensidad máxima de $3 W/cm^2$. A partir de estos resultados fijamos el valor de la intensidad con la que estimulamos los cultivos celulares en los siguientes experimentos en $1.5 W/cm^2$

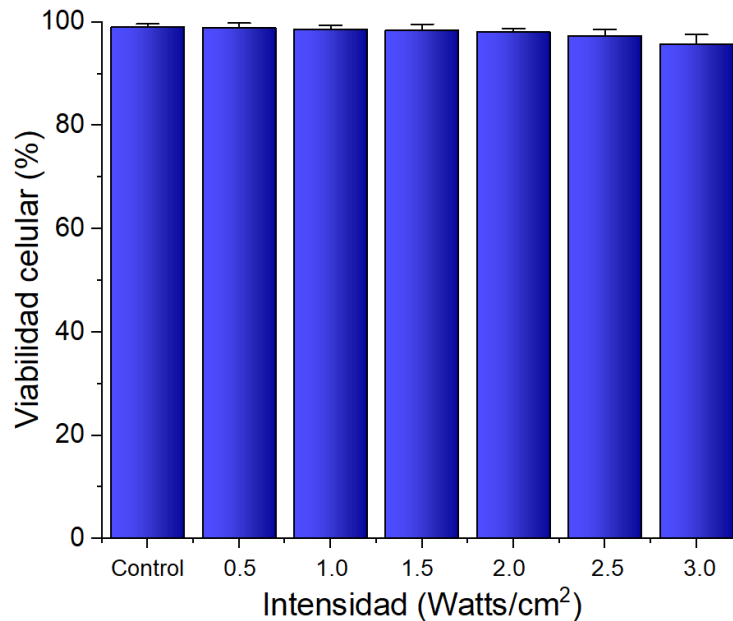
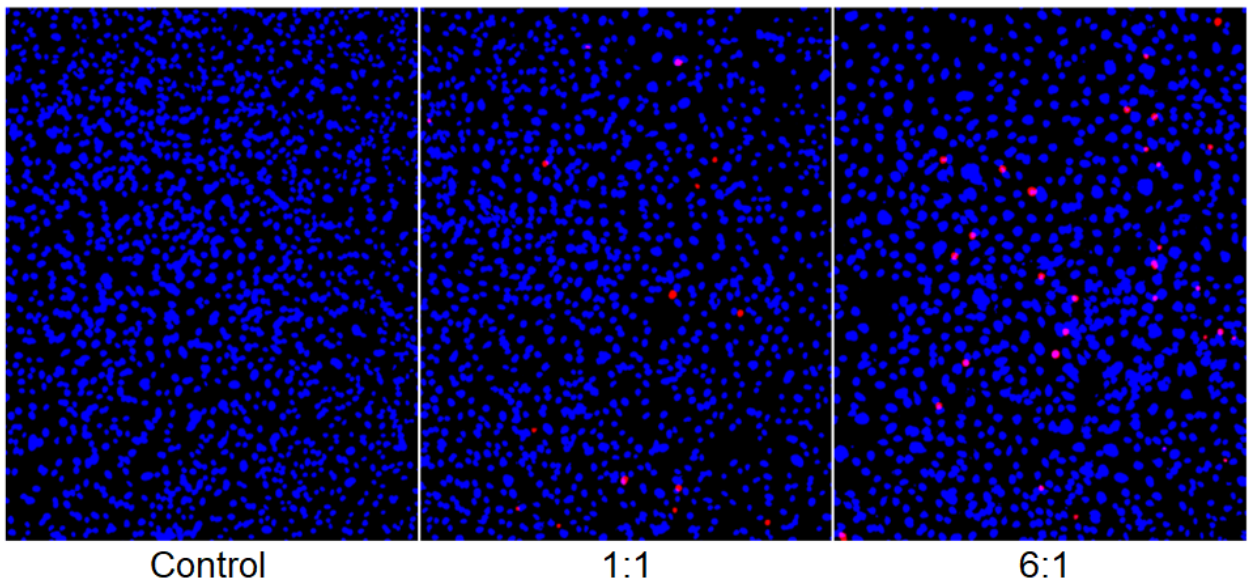


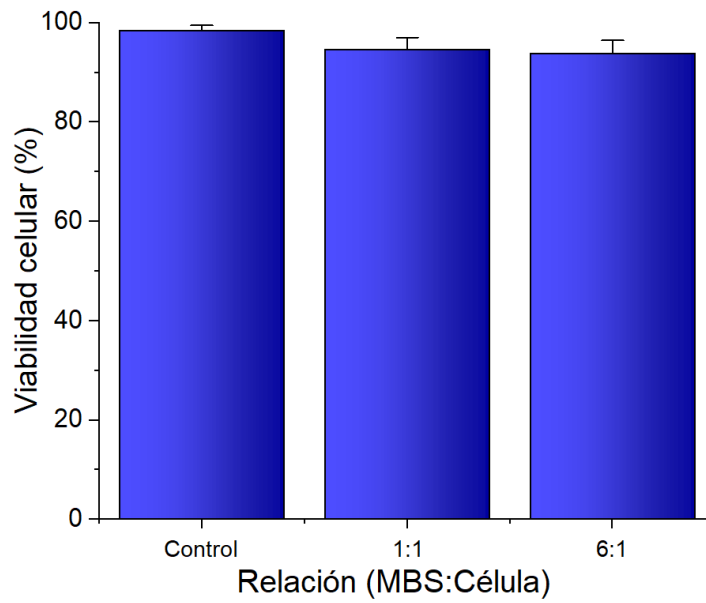
Figura 7.9: Respuesta a la presión acústica sobre la viabilidad celular con 6 diferentes intensidades a partir de contabilizar las células vivas en la monocapa. El equipo de US se ajustó a 1 MHz de frecuencia y un ciclo de trabajo del 10%. Los resultados representan el promedio \pm SEM, N=3.

7.8. Efecto de la estimulación con MBs+US en la viabilidad celular.

Después de haber cuantificado el efecto de la presión acústica sobre la viabilidad celular y haber establecidos los parámetros del ultrasonido se realizó la exposición de los cultivos celulares (por duplicado) a US+MBs para evaluar el impacto del estímulo sobre la viabilidad celular. La figura 7.10 a) muestra imágenes representativas de los cultivos obtenidas mediante microscopía de fluorescencia después del tratamiento con MBs+US con dos concentraciones diferentes, se puede apreciar que el estímulo no genera daño significativo sobre la monocapa. Al analizar estos resultados podemos apreciar que la viabilidad celular se reduce 5% y 7% 24 horas después del tratamiento con concentraciones correspondientes a las relaciones MBs-Célula 1: y 6:1, respectivamente (Fig. 7.10 b)).



(a)



(b)

Figura 7.10: Efecto de la exposición a US+MBs en células CACO-2. a) Imágenes representativas de la monocapa celular obtenida por microscopía de fluorescencia después del tratamiento. b) análisis de la viabilidad celular post-tratamiento. Los resultados representan el promedio \pm SEM, N=3.

7.9. Efecto de la administración de doxorrubicina con el complejo MBs-US.

Una vez que se midieron el efecto del complejo MBs-US, la respuesta celular a la presión acústica y la eficiencia de muerte celular de la doxorrubicina en administración libre, finalmente se evaluó el efecto de la administración de doxorrubicina con el complejo MBs-US.

Al tratar a las células CACO-2 con volúmenes crecientes de MBs_{dox} , lo que da como resultado la estimulación con concentraciones crecientes de dox en las MBs, y reventadas por US. Se aprecia una eficiencia de muerte celular creciente dependiente de la concentración administrada. En la Fig. 7.11, se muestran imágenes representativas 24 horas post-tratamiento obtenidas por microscopía de fluorescencia, claramente se aprecia como conforme la concentración de dox aumenta, el porcentaje de células muertas (representadas por los núcleos en color rojo) también lo hace mientras que en el grupo control hay ausencia de células muertas.

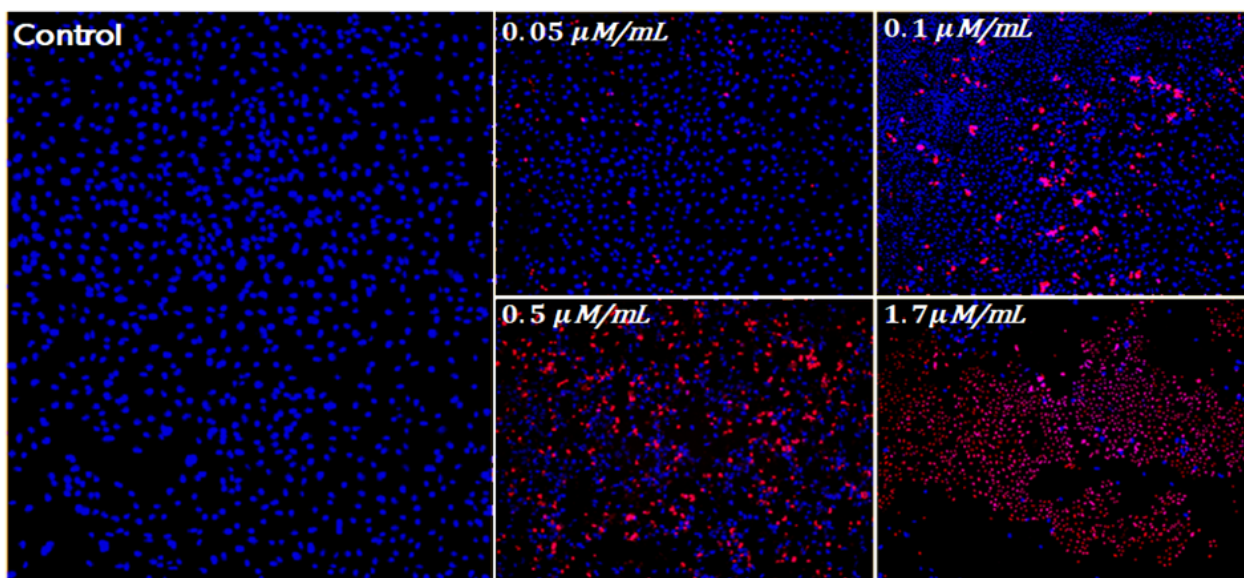


Figura 7.11: Respuesta celular de la administración de doxorrubicina en el complejo MBs-US. Imágenes representativas de la monocapa celular post-tratamiento (los núcleos celulares teñidos en rojo representan las células muertas, concentraciones crecientes del fármaco aumentan la muerte celular).

A partir del análisis de estas imágenes se obtuvo la gráfica de dosis-respuesta (Fig. 7.12,

a)) con ella se estimó, que para la concentración de $1.7 \mu\text{M}$ del fármaco, alrededor del 90 % de la población celular se encontraba muerta. Además, se realizó el ajuste no lineal de la respuesta de las células CACO-2 a las MBs_{dox} usando el modelo cinético de la ecuación de Hill para obtener el valor de la concentración efectiva 50 (CE_{50}), este ajuste se realizó con el programa OriginPro y se obtuvo el valor de $CE_{50} = 0.34 \pm 0.14 \mu\text{M}$ (Fig. 7.12 b)).

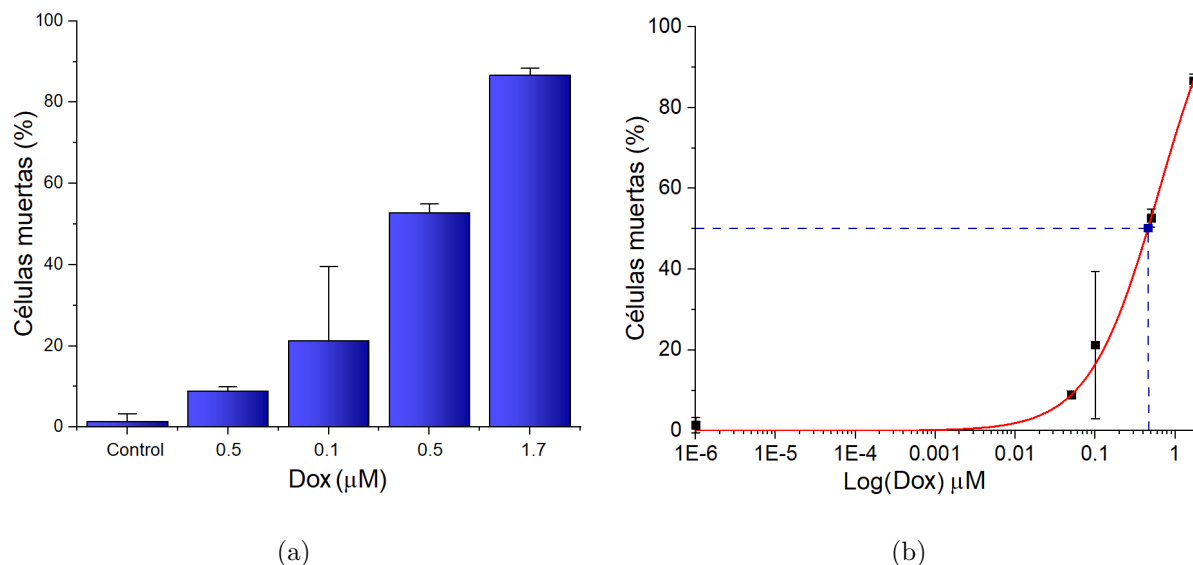


Figura 7.12: Curva dosis-respuesta de la estimulación de la dox en el complejo MBs-US en células CACO-2. Concentraciones crecientes de dox aumentan la muerte celular, b) ajuste no lineal (Eq. Hill) realizado con OriginPro, el cuadro azul representa la interpolación de la CE_{50} . Los datos representan el promedio \pm SEM, $N=3$.

En la figura 7.13 se observa la comparación de las curvas dosis-respuesta obtenidas mediante la administración de libre del fármaco (curva verde) vs la curva de la administración mediante el complejo MBs-US (curva roja). Se aprecia un claro desplazamiento hacia la izquierda de la curva correspondiente a la liberación controlada con el complejo MBs-US, lo cual muestra una clara potenciación del efecto del fármaco ya que fueron necesarias dosis menores para obtener una respuesta de parte de las células. Es más, al calcular las dosis efectivas 50, hay una diferencia significativa entre ellas.

	Adm. libre	$MBs_{dox}+US$
CE_{50} (μM)	32.43 ± 8.9	0.37 ± 0.14

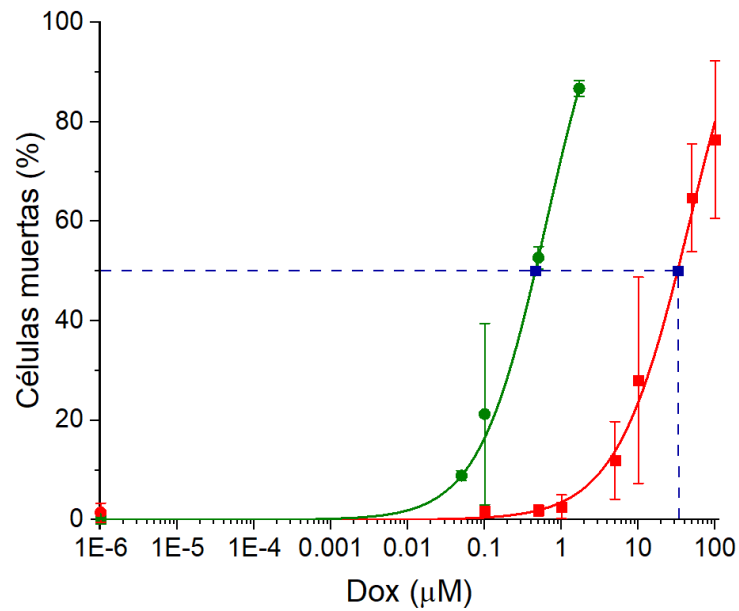


Figura 7.13: Ajustes de las curva dosis-respuesta de la estimulación de la dox en el complejo MBS-US (línea verde) y de la respuesta de la administración de la dox de forma libre (curva roja) en células CACO-2. Concentraciones crecientes de dox aumentan la muerte celular, es más, se aprecia un claro corrimiento de la curva correspondiente a la administración del fármaco en el complejo MBS-US hacia la izquierda dado que la muerte celular es mayor con este método con menores concentraciones del fármaco. Los datos representan el promedio \pm SEM, N=3.

Para poder determinar si la combinación del complejo MBS-US con el fármaco tienen como respuesta un efecto de sinergia o aditividad, se calculó el IC, a partir de nuestros resultados obtuvimos un $CI = 0.13$. Como $C < 1$ entonces hay sinergismo farmacológico.

Capítulo 8

Discusión

En este proyecto implementamos el uso del sistema microburbuja-ultrasonido como acarreador de fármacos, para ello partimos de una formulación previamente desarrollada en el laboratorio [26]. Cargamos las microburbujas lipídicas con un fármaco modelo (dox) y evaluamos la respuesta en células CACO-2 en diferentes escenarios. Dado que la dox es un antibiótico antraciclino con actividad antitumoral (altamente usado para tratar varios tipos de cáncer) y las CACO-2 son una línea de células de adenocarcinoma colorrectal humano, un aumento en la eficiencia de muerte celular nos indicaría una potenciación del efecto farmacológico.

Se ha demostrado que el sistema de administración de fármacos dirigidos MBs-US puede aumentar la acumulación del fármaco específicamente en los sitios específicos. [32-35]. La ventaja dada por el ultrasonido al ser una técnica no invasiva y no ionizante pero que permite un alto control temporal y una alta resolución espacial, junto con las características de la microburbuja hacen de este complejo una técnica muy prometedora.

La seguridad y eficiencia de los tratamientos basados en MBs se evalúa mediante el control de la cavitación. La dinámica de cavitación depende de la dinámica de oscilación, y esta a su vez depende del diámetro de las MBs, la presión acústica negativa máxima y la frecuen-

cia del US. En el proceso de caracterización del sistema MBs-US se observó que el tamaño promedio de las microburbujas cumple con el rango aceptado para poder ser utilizadas en aplicaciones biomédicas ($D < 10\mu M$) [36]. De igual forma, al caracterizar los pulsos de US encontramos que el IM cumple con los valores establecidos por la misma institución; es más, las características de US y la PNP registrada en nuestra caracterización nos muestran que estos valores son adecuados para generar sonoporación sin producir efectos negativos según datos reportados en la literatura [31, 37, 38]. Al utilizar un ciclo de trabajo del 10% y que el tiempo de exposición sea de 30 s, se asegura que la exposición a US sea suficiente para explotar las MBs y que las ondas de ultrasonido no provoquen daño sobre la viabilidad celular (Fig. 7.9).

Si bien, con los parámetros aplicados en este trabajo se observó una eficiencia de muerte celular mayor en la administración dirigida, se deben mejorar algunas características de las MBs, que para nuestro caso este valor fue del 17.07% y, por otro lado, la polidiversidad de tamaños. Esto con el fin de que se administre una concentración mayor del fármaco y que se asegure que todas las MBS en presencia del US caviten con un comportamiento similar, ya que, cuando hay múltiples microburbujas cerca unas de otras, la fuerza de radiación acústica secundaria puede hacer que se muevan unas hacia otras y formen agregados; cuando la presión acústica es lo suficientemente alta, las microburbujas pueden fusionarse y formar una gran burbuja (coalescencia) o generar un agregado de burbujas. Estos cambios de microburbujas dan como resultado cambios en su respuesta y efectos sobre las células, lo que afecta significativamente la administración mediada por ultrasonido.

Dado que nuestras MBS presentan una carga negativa y el fármaco usado (dox) tiene una carga positiva, se favorece la adición en la coraza por medio de interacciones electrostáticas. Además, observamos la presencia de la dox en el contorno de la MBs dada por su autofluorescencia de forma similar que Mohan, et al. [39], indicador de la presencia del fármaco en nuestras MBS. Las MBs no solo son buenos transportadores de fármacos, sino que también mejoran la permeabilidad de las células, tejidos y, en algunos casos, puede haber potenciación

farmacológica como la que se muestra en nuestros resultados y en la literatura [40, 41]. Esto podría sugerir que la potenciación observada se deba a que se mejora el transporte de la dox a su sitio de acción, en este caso el núcleo (se intercala en el ADN y altera las reparaciones mediadas por la topoisomerasa II [42]), sin embargo en la literatura hay evidencia de que este efecto ocurre con otros fármacos con diferente sitio de acción, ejemplo de ello es el proyecto de Navarro, quien utilizó un fármaco que actúa a nivel de la membrana celular [26].

Todo fármaco produce un efecto y, por lo tanto, una relación dosis-efecto. Para hablar de una potenciación farmacológica, debe darse la circunstancia en la cual la acción de un fármaco A aislado, en nuestro caso la administración de dox en forma libre, es superada por la interacción de A con un agente B cambiando la curva dosis-efecto, en este caso la administración en el complejo MBs-US. Estas relaciones se rigen por el principio físico-químico de la ley de acción de masas (La relación entre la cantidad de fármaco $[A]$ y la cantidad de complejo fármaco-receptor $[AR]$), entonces debe de haber una constante de asociación K_1 y una de disociación K_2 [43]. En términos de la curva dosis respuesta: un incremento del efecto es producido por un incremento en la concentración del fármaco [44]. En los resultados de este proyecto, se aprecia un evidente incremento en la respuesta al fármaco pero una disminución en la concentración administrada por el complejo MBs-US y, como ya se ha mencionado, este sistema eficientiza la entrega del fármaco debido a la sonoporación. Sin embargo, desde el punto de vista de la ley de acción de masas, ya que ni el receptor o la molécula del fármaco han cambiado, se podría estar generando algún cambio que tenga consecuencias en K_1 . Los principales factores que afectan la constante de disociación son la temperatura y la presión que pueden producirse por la presencia de un catalizador [45], en nuestro caso las presión acústica y la cavitación podrían estar alterando los mecanismos físico-químicos de la interacción fármaco-receptor, sin embargo hacen falta más estudios para poder determinar esta sugerencia.

Capítulo 9

Conclusiones

A partir del uso del complejo microburbuja-ultrasonido como acarreador de doxorrubicina, administradas en un modelo *in vitro* se logró modificar la relación dosis-respuesta en células CACO-2, logrando un efecto de potenciación sinérgica a lo largo de toda la curva dosis respuesta.

Capítulo 10

Perspectivas

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, aún hay un gran campo de investigación considerable en lo que concierne a la liberación controlada de fármacos a partir del uso del complejo microburbuja-ultrasonido.

En este sentido se propone involucrar estudios sobre la alteración del mecanismo intracelular realizado por la sonoporación, la relación con la potenciación del efecto del fármaco y cuantificar la concentración intracelular de este a partir de la liberación controlada contra la liberación libre.

Posteriormente, se propone realizar estudios *in vitro* que se acerquen más a la realidad biológica con la implementación de un co-cultivo con células endoteliales y evaluar la administración del fármaco en el complejo MBS-US en estas condiciones.

Referencias

- [1] Bertram Katzung. *Farmacología básica y clínica*. en. Manual Moderno, 2005.
- [2] Laurence L Brunton, John S Lazo y Keith L Parker. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 11.^a ed. McGraw-Hill Companies, 2005.
- [3] Salvador Acevedo Martínez y et al. *Farmacología general*. 1.^a ed. Universidad Autónoma de Aguascalientes, 2019.
- [4] S. I. Kaykanat y A. K. Uguz. «The role of acoustofluidics and microbubble dynamics for therapeutic applications and drug delivery». En: *Biomicrofluidics* 17.2 (abr. de 2023), pág. 021502. ISSN: 1932-1058. DOI: 10.1063/5.0130769. eprint: https://pubs.aip.org/aip/bmf/article-pdf/doi/10.1063/5.0130769/16822454/021502_1_5.0130769.pdf. URL: <https://doi.org/10.1063/5.0130769>.
- [5] Sophie Hernot y Alexander L. Klibanov. «Microbubbles in ultrasound-triggered drug and gene delivery». En: *Advanced Drug Delivery Reviews* 60.10 (2008). Ultrasound in Drug and Gene Delivery, págs. 1153-1166. ISSN: 0169-409X. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.03.005>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X08000811>.
- [6] Lauren J. Delaney et al. «Making waves: how ultrasound-targeted drug delivery is changing pharmaceutical approaches». En: *Mater. Adv.* 3 (7 2022), págs. 3023-3040. DOI: 10.1039/D1MA01197A. URL: <http://dx.doi.org/10.1039/D1MA01197A>.

- [7] Kohane D. Wang Y. «External triggering and triggered targeting strategies for drug delivery». En: *Nat Rev Mater* 2.17020 (mayo de 2017). DOI: <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2017.20>.
- [8] J. Deprez et al. «Opening doors with ultrasound and microbubbles: Beating biological barriers to promote drug delivery». En: *Advanced Drug Delivery Reviews* 172 (2021), págs. 9-36. ISSN: 0169-409X. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.02.015>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X21000612>.
- [9] Yanfei Wang. «External triggering and triggered targeting strategies for drug delivery». En: *Nature Reviews Materials* 2.9 (2017). ISSN: 2058-8437. DOI: <https://10.1038/natrevmats.2017.20>. URL: <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2017.20>.
- [10] Helen Mulvana et al. «Characterization of Contrast Agent Microbubbles for Ultrasound Imaging and Therapy Research». En: *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 64.1 (2017), págs. 232-251. DOI: 10.1109/TUFFC.2016.2613991.
- [11] Radwa H. Abou-Saleh et al. «Nanomechanics of Lipid Encapsulated Microbubbles with Functional Coatings». En: *Langmuir* 29.12 (2013). PMID: 23448164, págs. 4096-4103. DOI: 10.1021/la304093t. eprint: <https://doi.org/10.1021/la304093t>. URL: <https://doi.org/10.1021/la304093t>.
- [12] Javid A. et al. «Biocompatible APTES-PEG modified magnetite nanoparticles: effective carriers of antineoplastic agents to ovarian cancer.» En: *Appl Biochem Biotechnol* 173 (2014), págs. 36-54. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0740-6>.
- [13] Peter Frinking et al. «Three Decades of Ultrasound Contrast Agents: A Review of the Past, Present and Future Improvements». En: *Ultrasound in Medicine & Biology* 46.4 (2020), págs. 892-908. ISSN: 0301-5629. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2019.12.008>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030156291931628X>.

- [14] Paul S Sidhu, Maria E Sellars y Annamaria Deganello, eds. *Contrast-enhanced ultrasound in pediatric imaging*. en. Cham, Suiza: Springer Nature, 2021.
- [15] Hohyeon Lee et al. «Microbubbles used for contrast enhanced ultrasound and theragnosis: a review of principles to applications.» En: *Biomedical engineering letters* 7.2 (2017), págs. 59-69. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13534-017-0016-5>.
- [16] Yi-Ju Ho et al. «Oscillatory behavior of microbubbles impacts efficacy of cellular drug delivery». En: *Journal of Controlled Release* 333 (2021), págs. 316-327. ISSN: 0168-3659. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.03.044>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365921001553>.
- [17] Nico De Jong, Ayache Bouakaz y Peter Frinking. «Basic Acoustic Properties of Microbubbles». En: *Echocardiography* 19.3 (2002), págs. 229-240. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1540-8175.2002.00229.x>. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1046/j.1540-8175.2002.00229.x>. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1540-8175.2002.00229.x>.
- [18] Michael C. Cochran et al. «Doxorubicin and paclitaxel loaded microbubbles for ultrasound triggered drug delivery». En: *International Journal of Pharmaceutics* 414.1 (2011), págs. 161-170. ISSN: 0378-5173. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.05.030>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517311004443>.
- [19] Yanye Yang et al. «Mechanisms underlying sonoporation: Interaction between microbubbles and cells». En: *Ultrasonics Sonochemistry* 67 (2020), págs. 105096. ISSN: 1350-4177. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105096>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417719318413>.
- [20] Kumon Ronald E y Deng Cheri X Fan Zhenzhen. «Mechanisms of microbubble-facilitated sonoporation for drug and gene delivery». En: *Therapeutic Delivery* 5.4 (2014). PMID: 24856171, págs. 467-486. DOI: 10.4155/tde.14.10. eprint: <https://doi.org/10.4155/tde.14.10>. URL: <https://doi.org/10.4155/tde.14.10>.

- [21] Raffi Karshafian et al. «Microbubble mediated sonoporation of cells in suspension: Clonogenic viability and influence of molecular size on uptake». En: *Ultrasonics* 50.7 (2010), págs. 691-697. ISSN: 0041-624X. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ultras.2010.01.009>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041624X10000223>.
- [22] Yuyang Gu et al. «Harmonic responses and cavitation activity of encapsulated microbubbles coupled with magnetic nanoparticles». En: *Ultrasonics Sonochemistry* 29 (2016), págs. 309-316. ISSN: 1350-4177. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.10.006>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417715300493>.
- [23] Borden M. Ferrara K Pollard R. «Ultrasound microbubble contrast agents: fundamentals and application to gene and drug delivery». En: *Annual review of biomedical engineering* 9 (abr. de 2007), págs. 415-47. ISSN: 1932-1058. DOI: [10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095852](https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095852).
- [24] Raffi Karshafian et al. «Sonoporation by Ultrasound-Activated Microbubble Contrast Agents: Effect of Acoustic Exposure Parameters on Cell Membrane Permeability and Cell Viability». En: *Ultrasound in Medicine & Biology* 35.5 (2009), págs. 847-860. ISSN: 0301-5629. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2008.10.013>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301562908005036>.
- [25] S. I. Kaykanat y A. K. Uguz. «The role of acoustofluidics and microbubble dynamics for therapeutic applications and drug delivery». En: *Biomicrofluidics* 17.2 (abr. de 2023), pág. 021502. ISSN: 1932-1058. DOI: [10.1063/5.0130769](https://doi.org/10.1063/5.0130769). eprint: <https://pubs.aip.org/aip/bmf/article-pdf/doi/10.1063/5.0130769/16822454/021502\1\5.0130769.pdf>. URL: <https://doi.org/10.1063/5.0130769>.
- [26] J. Angel Navarro-Becerra et al. «Localized Delivery of Caveolin-1 Peptide Assisted by Ultrasound-Mediated Microbubble Destruction Potentiates the Inhibition of Nitric Oxide-Dependent Vasodilation Response». En: *Ultrasound in Medicine & Biology* 47.6 (2021), págs. 1559-1572. ISSN: 0301-5629. DOI: <https://doi.org/10.1016/j>.

ultrasmedbio.2021.02.003. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301562921000764>.

- [27] E Villa Martínez. «Evaluación de la eficiencia de silenciamiento génico de la sintasa de óxido nítrico endotelial utilizando un sistema de liberación microburbuja-siRNA controlado por ultrasonido». Tesis doct. CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL, Unidad Monterrey, 2022.
- [28] Sasaki N. et al. «Ultrasound image-guided therapy enhances antitumor effect of cisplatin». En: *Med Ultrasonics* 41 (2014), págs. 11-21. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10396-013-0475-y>.
- [29] J. Angel Navarro-Becerra et al. «Functional Activity and Endothelial-Lining Integrity of Ex Vivo Arteries Exposed to Ultrasound-Mediated Microbubble Destruction». En: *Ultrasound in Medicine & Biology* 46.9 (2020), págs. 2335-2348. ISSN: 0301-5629. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2020.05.004>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030156292030212X>.
- [30] Chou TC. «Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method». En: *Cancer Research* 70.2 (2010), págs. 440-6. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1947.
- [31] Kenneth B Bader y Christy K Holland. «Gauging the likelihood of stable cavitation from ultrasound contrast agents». En: *Physics in Medicine & Biology* 58.1 (dic. de 2012), pág. 127. DOI: 10.1088/0031-9155/58/1/127.
- [32] Linsey C. Phillips et al. «Targeted Gene Transfection from Microbubbles into Vascular Smooth Muscle Cells Using Focused, Ultrasound-Mediated Delivery». En: *Ultrasound in Medicine & Biology* 36.9 (2010), págs. 1470-1480. ISSN: 0301-5629. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2010.06.010>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301562910003017>.

- [33] Azza A. Al-Mahrouki et al. «Cellular characterization of ultrasound-stimulated microbubble radiation enhancement in a prostate cancer xenograft model». En: *Disease Models & Mechanisms* 7.3 (mar. de 2014), págs. 363-372. ISSN: 1754-8403. DOI: 10.1242/dmm.012922. eprint: <https://journals.biologists.com/dmm/article-pdf/7/3/363/1866489/363.pdf>. URL: <https://doi.org/10.1242/dmm.012922>.
- [34] Jean-Michel Escoffre et al. «Doxorubicin liposome-loaded microbubbles for contrast imaging and ultrasound-triggered drug delivery». En: *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control* 60.1 (ene. de 2013), págs. 78-87. DOI: 10.1109/TUFFC.2013.2539. URL: <https://www.hal.inserm.fr/inserm-02438665>.
- [35] Huilin Liu et al. «Synergic fabrication of pembrolizumab loaded doxorubicin incorporating microbubbles delivery for ultrasound contrast agents mediated anti-proliferation and apoptosis». En: *Drug Delivery* 28.1 (2021). PMID: 34259093, págs. 1466-1477. DOI: 10.1080/10717544.2021.1921080. eprint: <https://doi.org/10.1080/10717544.2021.1921080>. URL: <https://doi.org/10.1080/10717544.2021.1921080>.
- [36] Richard S. Meltzer. «Food and Drug Administration ultrasound device regulation: The output display standard, the “mechanical index,” and ultrasound safety». En: *Journal of the American Society of Echocardiography* 9.2 (1996), págs. 216-220. ISSN: 0894-7317. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0894-7317\(96\)90035-8](https://doi.org/10.1016/S0894-7317(96)90035-8). URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0894731796900358>.
- [37] Ahad Rahim et al. «Physical parameters affecting ultrasound/microbubble-mediated gene delivery efficiency in vitro». En: *Ultrasound in Medicine & Biology* 32.8 (2006), págs. 1269-1279. ISSN: 0301-5629. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2006.04.014>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301562906015808>.
- [38] Kathryn E. Hitchcock et al. «Ultrasound-enhanced delivery of targeted echogenic liposomes in a novel ex vivo mouse aorta model». En: *Journal of Controlled Release* 144.3 (2010), págs. 288-295. ISSN: 0168-3659. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.j>

jconrel.2010.02.030. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365910001860>.

- [39] Praveena Mohan y Natalya Rapoport. «Doxorubicin as a Molecular Nanotheranostic Agent: Effect of Doxorubicin Encapsulation in Micelles or Nanoemulsions on the Ultrasound-Mediated Intracellular Delivery and Nuclear Trafficking». En: *Molecular Pharmaceutics* 7.6 (2010). PMID: 20957997, págs. 1959-1973. DOI: 10.1021/mp100269f. eprint: <https://doi.org/10.1021/mp100269f>. URL: <https://doi.org/10.1021/mp100269f>.
- [40] Chengcheng Niu et al. «Doxorubicin loaded superparamagnetic PLGA-iron oxide multifunctional microbubbles for dual-mode US/MR imaging and therapy of metastasis in lymph nodes». En: *Biomaterials* 34.9 (2013), págs. 2307-2317. ISSN: 0142-9612. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.12.003>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961212013695>.
- [41] Inés Beekers et al. «Internalization of targeted microbubbles by endothelial cells and drug delivery by pores and tunnels». En: *Journal of Controlled Release* 347 (2022), págs. 460-475. ISSN: 0168-3659. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.05.008>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365922002620>.
- [42] Thorn C. F. et al. «Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects». En: *Pharmacogenetics and genomics* 21.7 (2010), págs. 440-446. DOI: <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32833ffb56>.
- [43] Terry Kenakin. «The mass action equation in pharmacology». En: *British Journal of Clinical Pharmacology* 81.1 (2016), págs. 41-51. DOI: <https://doi.org/10.1111/bcp.12810>. eprint: <https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/bcp.12810>. URL: <https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/bcp.12810>.

- [44] Jeffrey K. Aronson y Robin E. Ferner. «The law of mass action and the pharmacological concentration–effect curve: resolving the paradox of apparently non-dose-related adverse drug reactions». En: *British Journal of Clinical Pharmacology* 81.1 (2016), págs. 56-61. DOI: <https://doi.org/10.1111/bcp.12706>. eprint: <https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/bcp.12706>. URL: <https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/bcp.12706>.
- [45] Kenakin. T. «Pharmacologic Analysis of Drug Receptor Interaction». En: *Therapeutic Drug Monitoring* 10 (1988), págs. 365-366. URL: https://journals.lww.com/drug-monitoring/Fulltext/1988/03000/Pharmacologic_Analysis_of_Drug_Receptor.29.aspx.