

## ENCAPSULACIÓN DE DERIVADOS DE SULFANIL – SULFONIL CHALCONAS EN SISTEMAS MICRO/NANOPARTICULADOS POLIMÉRICOS DE PDLA CON APLICACIÓN DE LIBERACIÓN CONTROLADA

Karina N González R<sup>1\*</sup>, Gema González<sup>2</sup>, Juan Rodríguez<sup>3</sup>, Marques Kruzakaya<sup>3</sup>, Vázquez Ana Sofía<sup>3</sup> y Marco A. Sabino G<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Universidad Central de Venezuela. Facultad de Farmacia. Unidad de Química Medicinal.

<sup>2</sup> Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Centro de Ingeniería de Materiales y Nanotecnología.

<sup>3</sup> Universidad Simón Bolívar. Laboratorio de Farmacología y Toxicología. Departamento de Biología Celular.

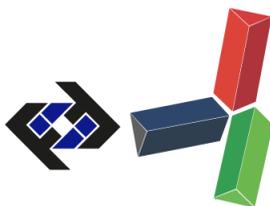
<sup>4</sup> Universidad Simón Bolívar. Dpto de Química. Sección de Química Orgánica. Grupo de Investigación B5IDA.

\* [karina.gonzalez@ucv.ve](mailto:karina.gonzalez@ucv.ve)

### RESUMEN

La encapsulación es una metodología versátil para controlar la liberación de los fármacos, debido a que un fármaco encapsulado presenta ventajas de dosificación con respecto a otras formas de administración y forma parte de la tecnología de formas farmacéuticas de liberación modificada de fármacos. Entre los sistemas de soporte empleados para la liberación controlada de fármacos destacan los compuestos poliméricos. En este proyecto se plantea la obtención y caracterización de sistemas micro y nanoparticulados poliméricos, biocompatibles, en base a una matriz de PDLA poli(ácido D Láctico) aplicados en la liberación controlada de dos derivados de sulfanil-chalconas que presentan actividad antimalárica, los compuestos (2E)-1-[4-(bencilsulfanil)fenil]-3-(4-clorofenil)prop-2-en-1-ona y (2E)-1-[4-(bencilsulfonil)fenil]-3-(4-fluorfenil)prop-2-en-1-ona. La preparación de las micro/nanopartículas se llevó a cabo siguiendo el método de microemulsificación. Para conocer la morfología de las partículas obtenidas se utilizó la técnica de microscopía electrónico de barrido. Para evaluar el porcentaje de encapsulación de los derivados de chalcona se realizó un análisis por espectroscopia UV, dando como resultado que el porcentaje de encapsulación fue de un 99%. A fin de evaluar la posible citotoxicidad de las micro-nanopartículas se realizó un estudio de la supervivencia celular *in vitro*, en células del tipo MCF-7 de cáncer de mama y NIH-3T3 de fibroblastos murinos, por medio del ensayo colorimétrico basado en la reducción metabólica del MTS, midiendo la producción de formazán a 550 nm. De igual manera, a fin de evaluar la hemocompatibilidad se realizó un ensayo para evaluar la capacidad de los compuestos en producir hemólisis en eritrocitos humanos, midiendo la hemoglobina liberada a 595 nm. En ambos casos se obtuvieron resultados favorables indicando que estos sistemas no son citotóxicos a las concentraciones ensayadas (100 ppm) y además son hemocompatibles (1-1000 ppm). Los resultados demuestran que este tipo de sistema presenta una alta potencialidad de uso para aplicaciones farmacológicas y biomédicas.

*Palabras Clave: encapsulación, PDLA, chalconas, citotoxicidad, hemocompatibilidad.*



## ABSTRACT

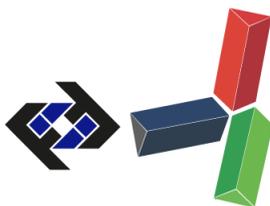
Encapsulation is a versatile methodology for controlling the release of drugs, because an encapsulated drug has dosage advantages over other forms of administration and it is part of the pharmaceutical technology of modified drug release forms. Among the support systems used for the controlled release of drugs, polymer compounds stand out. This project proposes the obtaining and characterization of micro and nanoparticulate polymeric, biocompatible systems, based on a matrix of PDLA poly (D-lactic acid) applied in the controlled release of two derivatives of sulfanyl-chalcones that present antimalarial activity, the compounds (2E) -1- [4-(benzylsulfanyl) phenyl] -3- (4-chlorophenyl) prop-2-en-1-one and (2E) -1- [4-(benzylsulfonyl) phenyl] -3- (4-fluorophenyl) prop-2-en-1-one. The preparation of the micro / nanoparticles was carried out following the microemulsification method. In order to know the morphology of the particles obtained, scanning electron microscopy technique was used. In order to evaluate the percentage of encapsulation of chalcone derivatives, an analysis by UV spectroscopy was carried out, resulting in a 99% encapsulation percentage. In order to evaluate the possible cytotoxicity of the micro-nanoparticles, a cell survival study was carried out in vitro, in cells of the MCF-7 type of breast cancer and NIH-3T3 of murine fibroblasts, by means of the colorimetric test based on the metabolic reduction of the MTS, measuring the formazan production at 550 nm. Similarly, in order to evaluate hemocompatibility, an assay was performed to evaluate the ability of the compounds to produce hemolysis in human erythrocytes, measuring the hemoglobin released at 595 nm. In both cases favorable results were obtained indicating that these systems are not cytotoxic at the tested concentrations (100 ppm) and they are also hemocompatible (1-1000 ppm). The results show that this type of system has a high potential for use for pharmacological and biomedical applications.

*Keywords: encapsulation, PDLA, chalcones, cytotoxicity, hemocompatibility.*

## INTRODUCCIÓN

La encapsulación es una metodología versátil para controlar la liberación de los fármacos, debido a que un fármaco encapsulado presenta ventajas de dosificación con respecto a otras formas de administración. Entre las ventajas más comunes se encuentran la disminución de los efectos secundarios, para mejorar la biodisponibilidad oral, para sostener el efecto de fármacos en un tejido seleccionado, para solubilizar fármacos para una administración intravascular y para mejorar la estabilidad de los agentes terapéuticos contra la degradación enzimática de las nucleasas y proteasas [1].

En esta perspectiva, fabricar sistemas micro y nanoparticulados capaces de ser vehículos dentro del sistema biológico de un fármaco y que sean biocompatibles y biodegradables se convierte en un reto. Los materiales poliméricos empleados en medicina incluyen polímeros sintéticos que imitan polímeros naturales con modificaciones químicas. Estas modificaciones se hacen para mejorar la biocompatibilidad, degradabilidad, o para introducir otras propiedades deseadas. La permeabilidad de los materiales poliméricos puede ser modificada y controlada [2].



Algunos aspectos generales de micro y nanopartículas han sido estudiados con anterioridad. Se han empleado los siguientes agentes como material de recubrimiento: poli-alquil cianoacrilato (PACA) [3] poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL) [4], ácido poliláctico (PLA) [5], polietilenglicol (PEG) [6], poli (hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBHV) [7][8], poli(metil metacrilato [9], poli(metacrilato,PMA) [10], entre otros, por su alta biocompatibilidad.

Los métodos de obtención de micro y nanopartículas comúnmente empleados, encontrados en la literatura son: evaporación del solvente y separación de fases o vía emulsión [11][12].

En el método vía emulsión, se tienen dos fases: en una el o los monómeros de las sustancias poliméricas son dispersados en un medio, donde un agente estabilizante es capaz de controlar la polimerización dentro de unas micelas, y se puede mantener un tamaño microscópico. En este proceso de emulsión, es un factor clave en el tamaño de partícula de los polímeros resultantes la velocidad de agitación y el medio donde se agita.

El siguiente trabajo es un estudio de la obtención de micro/nanopartículas de poliácido láctico (PDLA) para encapsular dos derivados de sulfanil-chalconas que poseen actividad antimalárica [13], por el método vía emulsión.

## METODOLOGÍA

### Reactivos.

Se emplearon los compuestos derivados de sulfanil-chalconas: (2E)-1-[4-(bencilsulfanil)fenil]-3-(4-clorofenil)prop-2-en-1-ona (PM= 364,89 g/mol) y (2E)-1-[4-(bencilsulfonil)fenil]-3-(4-fluorfenil)prop-2-en-1-ona (PM= 348,44 g/mol). Se usó el polímero Poliácido láctico (PDLA) ( $M_v \approx 91102$ g/mol) en su versión comercial en forma de *pellets*. Se dispuso de Polivinil Alcohol (PVA) ( $M_w \approx 2 \times 10^5$ g/mol) en su versión en polvo. Agua desionizada, cloroformo. Los materiales fueron suministrados por el Laboratorio de Química Orgánica, Grupo B5IDA de la USB y por el laboratorio de Química General de la Facultad de Farmacia UCV.

### Instrumentos

Beakers, pipetas, balones aforados, cilindros graduados, micropipetas, agitadores magnéticos, beaker con aletas, microespátula.

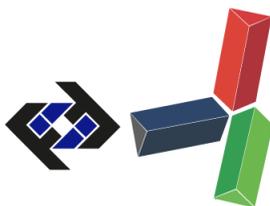
### Equipos.

Los instrumentos de laboratorio implementados fueron: Balanza Analítica, equipo de Ultrasonido VWR™, centrifugadora, ultradispersor eléctrico IKA™T10 Basic Ultra-Turrax™ a unas 15mil RPM, vórtex Fischer Genie 2, equipo de espectroscopia UV-160 A SHIMADZU, liofilizador.

### Metodología

La preparación de micro/nanopartículas de PDLA, se llevó a cabo siguiendo el método de microemulsificación [14]. Consiste en tomar una fase acuosa con un agente estabilizante previamente diluido, a la que se le agrega el polímero diluido en algún solvente orgánico apropiado, bajo agitación controlada.

### Preparación de las Micro y Nanopartículas de Poliácido Láctico PDLA.



Para cada uno de los derivados de sulfanil chalcona, (2E)-1-[4-(bencilsulfanil)fenil]-3-(4-clorofenil)prop-2-en-1-ona (compuesto 1, clorado) y (2E)-1-[4-(bencilsulfonil)fenil]-3-(4-fluorfenil)prop-2-en-1-ona (compuesto 2, fluorado) se siguió el mismo procedimiento de encapsulación.

Se preparó una solución de 100mL de Polivinil Alcohol (PVA) en agua al 0,025%  $m/v$  y a ella se le añadieron 5,0mL de una solución compuesta por el compuesto a encapsular y el polímero al 1%  $m/v$  de Poliácido Láctico en cloroformo, lentamente durante 20 minutos y utilizando una micropipeta. La agregación fue bajo agitación con el ultradispersor en conjunto con el equipo de ultrasonido, durante un tiempo total de 120 minutos. Este procedimiento se llevó a cabo en el reactor con aletas, ésta agitación continua permitiría obtener un sistema de liberación de fármacos en el orden micro/nanométrico.

Para cada compuesto, 1 y 2, respectivamente, se realizó la encapsulación en dos tandas, ya que la cantidad que se iba a encapsular era significativa, 26 mg para el compuesto 1 y 22 mg para el compuesto 2. En el caso del compuesto 1 se realizaron dos tandas para encapsular 13 mg del mismo y para el compuesto 2 dos tandas de 11 mg.

Una vez terminado el proceso, se dejó la solución bajo agitación hasta el día siguiente con el fin de evaporar el cloroformo. La solución fue centrifugada; y las partículas sedimentadas fueron lavadas con agua desionizada. Por último, la muestra fue liofilizada, y posteriormente preparada para la Microscopía Electrónica de Barrido.

### **Caracterización por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).**

Las micro/nanopartículas del compuesto 1 fueron observadas utilizando el microscopio electrónico de barrido modelo JEOL JSM 6460 a 15 kV, previamente, las muestras fueron colocadas en un porta muestras y recubiertas con oro usando un equipo Sputter-coater marca Balzers-SCD-030.

Las micro/nanopartículas del compuesto 2 fueron preparadas mediante el método de suspensión húmeda, empleando como solvente agua desionizada. Se colocó en ultrasonido y luego se colocaron dos gotas sobre un portamuestras de aluminio con base de carbón y posteriormente fue recubierta con carbono; para conocer su morfología se observó en un microscopio electrónico de barrido FEG Inspect 50, operando a 10kV.

### **Determinación de la eficiencia de encapsulación por Espectroscopía UV-Visible**

La eficiencia de encapsulación de los compuestos se determinó indirectamente a partir de la cuantificación de los derivados de sulfanil chalcona presentes en las aguas de lavado, obtenidas después de ejecutar el proceso de encapsulación en micro/nanopartículas. Esto parte del hecho de que, al conocer la cantidad total de compuesto que se planteó encapsular inicialmente y la cantidad presente en las aguas de lavado, se puede estimar por diferencia la cantidad de compuesto asociado a las partículas cargadas.

En este sentido, se realizó una extracción de los derivados del núcleo chalcona contenidas en las aguas de lavado, empleando como solvente orgánico cloroformo y una solución saturada de NaCl.

La fase orgánica fue secada con el rotavapor, y el compuesto obtenido fue llevado a un volumen

de 2 ml empleando DMSO a evaluar la absorción de radiación UV-Vis. Se realizaron las curvas de calibración correspondientes a los compuestos 1 y 2, graficando la absorbancia en función de la concentración de chalcona. Para las mediciones se usó una longitud de onda igual a 344 nm, valor determinado como  $\lambda_{\max}$  de absorción de los derivados de sulfanil chalcona y posteriormente se determinó la eficiencia de encapsulación, según la siguiente ecuación (Ec.1):

$$\text{Ec.1} \quad \% \text{Encapsulación: } \frac{\text{Cantidad de chalcona encapsulada}}{\text{Cantidad inicial de chalcona en el sistema}} \times 100\%$$

### Ensayo de viabilidad: Reducción del MTS

A fin de evaluar la posible citotoxicidad de las micro-nanopartículas se realizó un estudio de la supervivencia celular *in vitro*, en células del tipo MCF-7 de cáncer de mama y NIH-3T3 de fibroblastos murinos, por medio del ensayo colorimétrico basado en la reducción metabólica del MTS, midiendo la producción de formazán a 550 nm [15]. Este ensayo se basa en la capacidad de las células vivas, mediante la actividad de sus enzimas deshidrogenasas, de reducir a la sal de tetrazolio MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]] en formazán, que es un compuesto de coloración violeta soluble en el medio de cultivo, de forma que la cantidad de formazán producido es directamente proporcional al número de células vivas presentes en el cultivo estudiado.

Para realizarlo, se cultivaron las células tumorales de mama MCF-7 y no tumorales de fibroblastos NIH-3T3 a una densidad de  $5 \times 10^3$  células por pozo en placas de 96 pozos CELLSTAR® junto con 100  $\mu\text{L}$  de medio DMEM suplementado al 15% de SFB Gibco®, y se dejó en incubación por 24 horas para la adherencia de las células a la placa. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se agregaron 90  $\mu\text{L}$  del medio junto con 10  $\mu\text{L}$  de los sistemas micro/nanoestructurados de derivados de sulfanil chalcona a concentración 1000 ppm de forma tal que la concentración de cada compuesto en cada pozo fue de 100 ppm. Se incubaron a 37°C por 24, 48 y 72 horas, y al cumplirse dicho tiempo se agregaron 20  $\mu\text{L}$  del MTS CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay G358A Promega®, se esperaron 4 horas y se realizó la lectura de las placas a 490nm utilizando el lector de placas ELISA Autobio PHOMO®. Como control positivo, se utilizó Cisplatino a diferentes concentraciones (0,5-100  $\mu\text{M}$ ). Los ensayos se realizaron por triplicado.

### Ensayo de hemocompatibilidad

Para observar si los sistemas micro/nanoestructurados de derivados de sulfanil chalcona seleccionados poseen un efecto citotóxico sobre eritrocitos humanos, se realizó un ensayo de hemólisis según la metodología de Evans et al. [16], en el que se utilizó 5ml de sangre recién extraída de un donador, se colocaron en un tubo heparinizado y se centrifugaron a 500rpm por 5 minutos. Luego, se marcó el nivel de plasma en el tubo (capa superior de color amarillenta) y se aspiró dicha capa utilizando una micropipeta, con cuidado de no aspirar a la capa inferior de hematocritos. Se agregó una solución de NaCl de 150mM hasta la marca del nivel de plasma, se agitó el tubo por inversión, se centrifugó nuevamente a 500rpm por 5 minutos y se aspiró el sobrenadante. Esto se repitió un total de 3 veces y posteriormente se colocó tampón fosfato salino (PBS 1X) de pH 7.4 hasta la marca realizada, se agitó por inversión y se centrifugó.

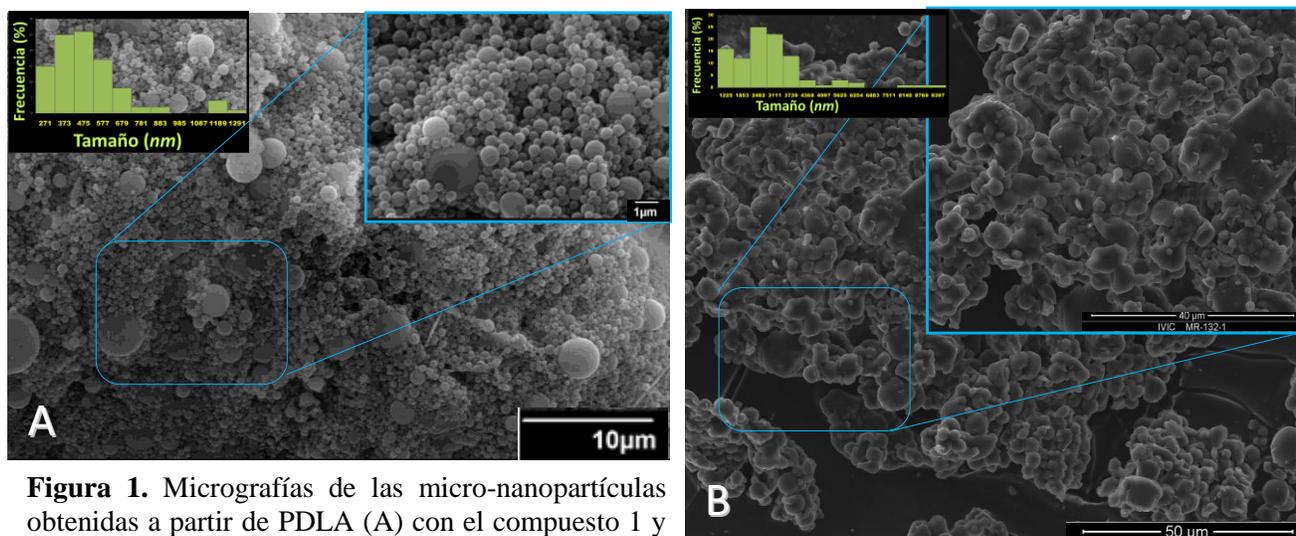
Luego de los lavados, se retiró el sobrenadante, se agregó PBS hasta la marca, se agitó por inversión, se tomó 1ml de dicha solución correspondiente a 100% de eritrocitos, y se añadió a 49ml de PBS en un tubo Falcon para formar una solución de 1:50 de eritrocitos (2%). Se agregaron 800 $\mu$ L de dicha solución a tubos eppendorf de 2ml, y a cada uno se le colocó 200 $\mu$ L de los sistemas micro/nanoestructurados de derivados de sulfanil chalcona en un rango de concentraciones entre 1 y 1000ppm, de forma tal que el volumen total en cada tubo sea de 1ml, y se incubaron por 1 hora a 37°C. Como control positivo, se empleó 200 $\mu$ L de una solución de Tritón X-100 al 20%, y como control negativo se colocó 200 $\mu$ L de PBS.

Por último, al terminar la incubación, cada tubo se centrifugó a 500g por 5 minutos, se colocaron 100 $\mu$ L de los sobrenadantes de cada tratamiento en una placa de ELISA y se realizará la lectura a  $\lambda = 595\text{nm}$  en un lector de placas de ELISA (Autobio PHOmo®) para determinar el porcentaje de eritrocitos lisados, tomando en cuenta que el 0% de lisis es el obtenido por el control negativo.

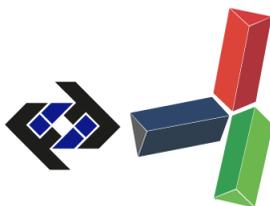
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).

En la Figura 1 se muestran las micrografías de las micro/nanopartículas obtenidas para los derivados de sulfanil chalconas, compuestos 1 y 2 respectivamente. En base a los resultados de microscopía se obtuvo el siguiente valor promedio de distribución de tamaños de partículas:  $X = 502 \pm 20$  nm para las micro/nanopartículas obtenidas a partir de PDLA (A) con el compuesto 1,  $X = 2940 \pm 150$  nm para las micro/nanopartículas obtenidas a partir de PDLA (A) con el compuesto 2. Para las para las micro/nanopartículas del compuesto 1 se observa una morfología simétrica de partículas esféricas, una mayor uniformidad y menor polidispersidad. En el caso de las micro/nanopartículas del compuesto 2 no se evidencia una morfología simétrica de partículas esféricas sino aglomerados de partículas. Posiblemente la interacción con el surfactante puede estar influyendo en una mayor polidispersidad (ver Figura 1).



**Figura 1.** Micrografías de las micro-nanopartículas obtenidas a partir de PDLA (A) con el compuesto 1 y PDLA (B) con el compuesto 2. Con su ampliación e histograma de tamaños.



### Determinación de la eficiencia de encapsulación por Espectroscopía UV-Visible

Para el compuesto 1, se encapsularon micro/nanopartículas de PDLA en una relación de 260 µg del derivado sulfanil chalcona clorado por cada mg del polímero (en cada tanda de 13 mg), en el caso del compuesto 2, se encapsularon micro/nanopartículas de PDLA en una relación de 220 µg del derivado sulfanil chalcona fluorado por cada mg del polímero (en cada tanda de 11 mg).

En la tabla 1 se muestra la eficiencia de encapsulación de los compuestos 1 y 2 en las micro/nanopartículas de PDLA

**Tabla 1.** Eficiencia de encapsulación de los compuestos 1 y 2 de las micro/nanopartículas de PDLA

MX-TANDA	Cantidad añadida del compuesto	Cantidad encapsulada	% de encapsulación
Compuesto 1 (Tanda 1)	13 mg	12,99 mg	99, 92%
Compuesto 1 (Tanda 2)	13 mg	12,99 mg	99, 92%
Compuesto 2 (Tanda 1)	11 mg	10,99 mg	99, 91%
Compuesto 2 (Tanda 2)	11 mg	10,99 mg	99, 91%

### Ensayo de viabilidad: Reducción del MTS

El ensayo de citotoxicidad por MTS demostró que a la concentración máxima ensayada de 100 ppm de las micro/nanopartículas de PDLA para los compuestos 1 y 2 no presentaron toxicidad celular apreciable ya que indujeron menos del 5% de muerte celular. Estos resultados muestran que los mencionados sistemas no son tóxicos en estas líneas celulares, sugiriendo un alto perfil de seguridad *in vitro* bajo el modelo estudiado.

### Ensayo de hemocompatibilidad

El ensayo de hemólisis en eritrocitos humanos demostró que en el rango de las concentraciones ensayadas, entre 1 y 1000 ppm, las micro/nanopartículas de PDLA de los compuestos 1 y 2 no presentaron lisis celular en el modelo ensayado. Estos resultados muestran que los mencionados sistemas son hemocompatibles.

## CONCLUSIONES

Se encapsularon los compuestos derivados de sulfanil-chalconas, compuesto 1 (2E)-1-[4-(bencilsulfanil)fenil]-3-(4-clorofenil)prop-2-en-1-ona y compuesto 2 (2E)-1-[4-(bencilsulfonil)fenil]-3-(4-fluorfenil)prop-2-en-1-ona en micro/nanopartículas de PDLA obteniéndose un 99% de encapsulación en ambos casos.

Las micro/nanopartículas de PDLA de los compuestos 1 y 2 no presentaron toxicidad celular apreciable en células del tipo MCF-7 de cáncer de mama y NIH-3T3 de fibroblastos murinos a la concentración máxima ensayada de 100 ppm.

Las micro/nanopartículas de PDLA de los compuestos 1 y 2 no presentaron toxicidad celular en eritrocitos humanos, en el rango de las concentraciones ensayadas (1-1000 ppm), indicando que son hemocompatibles.

Los resultados demuestran que este tipo de sistema presenta una alta potencialidad de uso para aplicaciones farmacológicas y biomédicas.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Miguel Rodríguez de la Facultad de Farmacia de la UCV, por la dotación de los derivados de sulfanil chalcona. Al Licenciado Gleen Rodríguez del Lab de Superficies del Lab E-USB y la Licenciada Lisbeth Lozada del Centro de Ing. de Materiales y Nanotecnología del IVIC, ambos por la preparación y observación de las muestras por microscopía electrónica de barrido.

## REFERENCIAS

- [1] Villafuerte L.(2009) Nanotecnología Farmacéutica. Razón y Palabra (México). 14(68):1-20.
- [2] Sáez V, Hernández E, Sanz L, Sanz L. (2002) *Revista Iberoamericana de Polímeros*; 3(3): 1-20.
- [3] Alhareth K, Vauthier C, Gueutin C, Ponchel G, Moussa F. (2012). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* (1);887-888:128-132.
- [4] Oliveira A, Pinho C, Fonte P, Sarmiento B, Dias A.(2017). *Int J Biol Macromol*; pii: S0141-8130(17)32051-2.
- [5] Thauvin C, Schwarz B, Delie F, Allémann E. (2017).. *Int J Pharm*;S0378-5173(17)31045-1.
- [6] Lee J, Bae K, Kim J, Nam Y, Park T. (2011) *Biomaterials*;32(33):8635-8644.
- [7] Chang H, Wang Z, Luo H, Xu M, Ren X, Zheng G, Wu B, Zhang X, Lu X, Chen F, Jing X, Wang L. (2014). *Braz J Med Biol Res*;47(7):533-9.
- [8] Puppi D, Morelli A, Chiellini F. (2017). *Bioengineering (Basel)*;4(2):49.
- [9] Bettencourt A, Almeida A. (2012). *J Microencapsul*;29(4):353-67.
- [10] Favretto M, Krieg A, Schubert S, Schubert U, Brock R. (2015). *J Control Release*;209:1-11.
- [11] Mora C, Fessi H, Elaissari A.(2010). *Int. J. Pharm*; 385: 113-142.
- [12] Crucho C, Barros M. (2017). *Materials Science and Engineering: C*; 80(1): 771-784.
- [13] Rodríguez Miguel. (2017). [Tesis de postgrado].Caracas: Universidad Central de Venezuela, Facultad de Farmacia.
- [14] Vanderhoff, J., El-Aaser, M. y Ugelstad, J. (1979). Estados Unidos, Patente N° 4, 177,177.
- [15] Cory A, Owen T, Barltrop J, Cory JG. (1991) *Cancer Commun*;3(7):207–212.
- [16] Evans B, Nelson CE, Yu S, Beavers K, Kim A, Li H, Nelson H, Giorgio T, Duvall C.(2013). *J Vis Exp.* 9;(73):e50166.