



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Biología

Producción de vesículas extracelulares por ondas de choque y su potencial terapéutico

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Licenciado en Biología

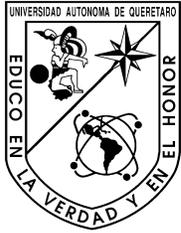
Presenta:

Gisela Martínez Andrade

Dirigido por:

Dra. Luz María López Marín

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Junio 2017



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Licenciatura en Biología

Producción de vesículas extracelulares por ondas de choque y su potencial terapéutico

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Licenciado en Biología

Presenta:

Gisela Martínez Andrade

Dirigido por:

Dra. Luz María López Marín

Dra. Luz María López Marín

Director

Firma

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca

Sinodal

Firma

Dr. Achim M. Loske Mehling

Sinodal

Firma

M. en C. Kruskaia Karenia Caltzontzin Fernández

Sinodal

Firma

Dr. Fausto Arellano Carbajal

Sinodal

Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Junio 2017

RESUMEN

Las vesículas extracelulares (VE) constituyen una herramienta prometedora en Nanomedicina debido a que son capaces de mantener sus biomoléculas activas y transportar información genética y proteómica a células receptoras. Su potencial terapéutico es amplio y ha tenido un gran auge en los últimos años. Si bien la producción de estas estructuras es regulada por mecanismos aún poco dilucidados, la obtención de VE a gran escala a partir de métodos físicos, ha generado un interés creciente. En este trabajo se presenta el uso de las ondas de choque para la producción de VE. Las ondas de choque se generan al concentrar una gran cantidad de energía en un espacio pequeño y se propagan en forma de frentes de alta presión. A nivel celular, dichas ondas son capaces de permeabilizar la membrana plasmática y de formar vesículas o protuberancias. El modelo utilizado en este estudio consistió en la producción de vesículas extracelulares a partir de linfocitos T obtenidos por cultivo primario de bazo de ratón. El rastreo y la caracterización ultraestructural de vesículas nanométricas se efectuó mediante Dispersión Dinámica de Luz, Microscopia Electrónica de Barrido y Microscopia Electrónica de Transmisión. Las VE inducidas por ondas de choque mostraron una morfología circular y talla homogénea de 20 a 30 nm acumuladas en agregados. Mediante marcaje con anticuerpos dirigidos contra receptores de superficie CD3, las VE producidas por ondas de choque mostraron capacidad para mantener el reconocimiento de epítomos de superficie celular, indicando así el potencial para la explotación de estas VE a través de interacciones ligando-receptor. Finalmente se llevó a cabo una prueba de encapsulamiento de plásmido en VE. Trabajos futuros deberán incluir la purificación de VE, a fin de eliminar contaminantes celulares, tales como fragmentos de DNA, y de obtener fracciones homogéneas de VE.

Palabras clave: anti-CD3, cavitación acústica, exosomas, ondas de choque, vesículas extracelulares

ABSTRACT

Extracellular vesicles (EVs) are a promising tool in nanomedicine because they are able to maintain their active biomolecules and transport genetic and proteomic information to recipient cells. Its therapeutic potential is broad and has been booming in recent years. Although the production of these structures is regulated by mechanisms that are still poorly elucidated, the study of methods for the production of EVs at large scale has generated an increasing interest. In this work, the use of shock waves to produce EVs is evaluated. Shock waves are generated when a large amount of energy is produced in a small space during a short period and are propagated as high pressure fronts. At cellular level, these waves are capable of permeabilizing the plasma membrane and create vesicles or blebs. The model used in this study consisted in the production of extracellular vesicles from T lymphocytes obtained by primary culture of mouse spleen. The tracing and ultrastructural characterization of nanometric vesicles was performed using Dynamic Light Scattering, Scanning Electron Microscopy and Transmission Electron Microscopy. The EVs induced by shockwaves showed a circular morphology and homogeneous size around 20 to 30 nm accumulated in aggregates. Through labeling with antibodies directed against CD3 surface receptors, the EVs produced by shock waves showed ability to maintain recognition of cell surface epitopes, thus indicating the potential for the exploitation of these EVs through ligand-receptor interactions. Finally, a plasmid encapsulation test was carried out in EVs. Future work should include EVs purification in order to eliminate cellular contaminants, such as DNA fragments, and to obtain homogeneous EV fractions.

Key words: anti-CD3, acoustic cavitation, exosomes, shock waves, extracellular vesicles

*A mi hermana **Lucía**,
que descansa en paz y siempre llevo presente
y a mi querido hijo **Ricardo**,
por ser mi gran fuerza y fuente de inspiración*

Magia es sólo ciencia que no entendemos aún.

Arthur C. Clarke

Los límites de lo posible sólo pueden definirse si se va más allá de lo imposible.

Arthur C. Clarke

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Con mucho cariño y sincero agradecimiento a mis padres María Juana Andrade Roldán y Francisco Javier Martínez Mejía por su inmenso apoyo incondicional en todos los sentidos posibles en esta trayectoria a lo largo de mi carrera universitaria. Por su tiempo, apoyo económico, paciencia y sabios consejos.

Especialmente agradezco a mi hermano Samuel Martínez Andrade por ser mi confidente, por ser una influencia creativa con pensamiento fuera de los marcos e ideas multidisciplinarias, que en bastantes ocasiones me indujo nuevas perspectivas con referencia a mis proyectos y estudio de tesis y a su vez por su apoyo con la redacción de tesis y opiniones llenas de franqueza.

Con mucho orgullo, agradezco a mi hermano Andrés Martínez Andrade por ser un ejemplo a seguir que trasciende y no se conforma con los parámetros impuestos. A mi cuñada Sarah Martínez, por su singular alegría y cariño. Por todo su apoyo les agradezco a pesar de la lejanía física que nos separa.

A mis familiares, abuelos y tíos por su interés constante durante este largo camino.

A todos mis profesores de la licenciatura en Biología, por su impulso, enseñanza, inspiración e inducción al mundo científico.

Y finalmente a todos mis amigos cuyo apoyo y palabras de aliento han sido indispensables, con mención especial de Beatriz Velázquez, Valeria Martínez, Isabel Moreno, Andrea Jaramillo, Israel Herreras, Libia Mardones, Pablo González, Franco Huerta y Osvaldo Salcedo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Querétaro, a la Facultad de Ciencias Naturales y principalmente a la licenciatura de Biología campus Juriquilla.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y el Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada por darme la oportunidad de efectuar mi trabajo de investigación de tesis a través del financiamiento que otorgó el proyecto PAPIIT IT200615.

A la Dra. Luz María López Marín por abrirme las puertas de su laboratorio, por ser una investigadora innovadora, activa y multifacética; por su motivación, orientación, apoyo y excelente dirección del proyecto de tesis.

Al Dr. Achim M. Loske Mehling por su apoyo, gran interés y disponibilidad del equipo del Laboratorio de Ondas de Choque del CFATA (UNAM).

A la Dra. Blanca Millán Chiu por compartir sus conocimientos, gran apoyo en diversas técnicas y por su disponibilidad de tiempo

A todos mis sinodales:

A la Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca, a la M. en C. Kruskaia Karenia Caltzontzin Fernández y al Dr. Fausto Arellano Carbajal, por todo su apoyo, inspiración y participación en mi formación académica.

A la I.B.Q. Lourdes Palma Tirado de la Unidad de Microscopia del INB (UNAM) por el apoyo con los procedimientos de preparación de muestras de microscopia electrónica de barrido y por la obtención de imágenes de microscopia electrónica de transmisión.

A la Dra. Anaid Antaramian y a la M. en C Adriana González Gallardo de la Unidad de Proteogenómica del INB (UNAM) por el préstamo del equipo y otorgarnos células competentes y medio LB de cultivo.

A la M. en Ing. Alicia del Real López del Laboratorio de Microscopia del CFATA (UNAM) por la obtención de imágenes de microscopia electrónica de barrido.

Al M. en C Francisco Fernández Escobar por su orientación en el área de física relacionada con el proyecto y a Paula Bernardino Peláez del Laboratorio de Ondas de Choque del CFATA (UNAM) por su excelente apoyo en el uso del equipo.

A la Dra. Susana Vargas Muñoz por su colaboración con los análisis de dispersión dinámica de luz (DLS).

A la Dra. Nydia Hernández Ríos por su apoyo para la obtención de imágenes de microscopia confocal.

A todos mis compañeros del laboratorio de Nanobio Óptica del CFATA (UNAM) con especial mención de Isadora Mejía, Dr. Edgar Jiménez, Alma Athenas Sánchez, Giovana Carrasco y Noelia Ferrusquía por asesorarme con técnicas y dudas respecto a mi trabajo de tesis.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	4
DEDICATORIA.....	5
AGRADECIMIENTOS PERSONALES.....	7
AGRADECIMIENTOS.....	8
ÍNDICE GENERAL.....	10
ÍNDICE DE FIGURAS.....	13
ÍNDICE DE TABLAS.....	15
LISTA DE ABREVIATURAS.....	16
1. INTRODUCCIÓN.....	20
2. REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	22
2.1 Características y clasificación de vesículas extracelulares.....	22
2.2 Funciones fisiológicas y patológicas.....	26
2.3 Aplicación terapéutica.....	29
2.4 Métodos de obtención.....	32
2.5 Métodos alternos de obtención.....	33
2.6 Métodos de caracterización.....	33
2.6.1 Dispersión dinámica de luz.....	34
2.6.2 Citometría de flujo.....	35
2.6.3 Microscopia electrónica de barrido.....	36
2.6.4 Microscopia electrónica de transmisión.....	39
2.6.5 Microscopia confocal.....	40
2.7 Métodos físicos para disrupción de membranas biológicas.....	42
2.7.1 Electroporación.....	42
2.7.2 Sonoporación.....	42
2.7.3 Ondas de choque.....	42

2.8	Líneas celulares y cultivo primario.....	45
2.8.1	Línea NIH-3T3.....	45
2.9	Producción y purificación de un plásmido.....	46
2.10	Marcaje con anticuerpos.....	50
3.	HIPÓTESIS.....	53
4.	OBJETIVOS.....	53
4.1	OBJETIVO GENERAL.....	53
4.2	OBJETIVOS PARTICULARES.....	53
5.	METODOLOGIA.....	54
5.1	Diseño experimental.....	54
5.2	Esquema experimental.....	55
5.3	Materiales y métodos.....	56
5.3.1	Obtención de vesículas extracelulares por ondas de choque.....	56
5.3.1.1	Cultivo celular y mantenimiento.....	56
5.3.1.2	Preparación de medio DMEM.....	56
5.3.1.3	Preparación de medio RPMI.....	57
5.3.1.4	Congelación y almacenamiento de células.....	57
5.3.1.5	Descongelación de células.....	58
5.3.1.6	Material biológico y cultivo primario.....	58
5.3.1.7	Caracterización celular por citometría de flujo.....	60
5.3.1.8	Aplicación de ondas de choque a cultivo enriquecido con linfocitos..	61
5.3.1.9	Microscopia electrónica de barrido (SEM).....	62
5.3.1.10	Purificación por ultracentrifugación.....	64
5.3.2	Caracterización de morfología y talla de VE.....	64
5.3.2.1	Análisis de dispersión dinámica de luz (DLS).....	64
5.3.2.2	Microscopia electrónica de transmisión (TEM).....	65
5.3.3	Análisis de bioactividad de VE.....	65
5.3.3.1	Marcaje de ve con anticuerpos para antígenos de superficie celular...	65

5.3.4 Prueba de encapsulamiento en VE	66
5.3.4.1 Encapsulamiento del plásmido <i>pCX::GFP-GPI2</i> en VE.....	66
5.3.4.2 Transformación de bacterias ultracompetentes.....	67
5.3.4.3 Inoculación y cultivo de bacterias transformadas.....	67
5.3.4.4 Purificación del plásmido <i>pCX::GFP-GPI2</i>	68
5.3.4.5 Cuantificación del plásmido.....	68
5.3.4.6 Electroforesis en gel de agarosa.....	69
5.3.4.7 Encapsulamiento del plásmido por ondas de choque.....	69
5.3.4.8 Análisis de plásmido y de encapsulamiento por VE.....	70
5.3.5 Análisis estadístico	70
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	71
6.1 Supervivencia celular y formación de ve en NIH-3T3.....	71
6.2 Linfocitos como modelo celular para producción de VE.....	73
6.3 Caracterización de cultivos primarios de esplenocitos murinos.....	75
6.3.1 Esplenocitos estimulados con el mitógeno concanavalina A.....	78
6.4 Observación de vesículas mediante microscopia electrónica de barrido.....	82
6.5 Tratamiento con ondas de choque a linfocitos.....	84
6.6 Resultados de caracterización de morfología y talla de VE	85
6.6.1 Caracterización de talla por dispersión dinámica de luz.....	85
6.6.2 Análisis morfológico de ve mediante microscopia electrónica de transmisión.....	87
6.7 Resultados de análisis de bioactividad	89
6.7.1 Marcas de superficie y bioactividad de VE.....	89
6.8 Análisis de encapsulamiento de plásmido	92
7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	98
8. REFERENCIAS	100

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del contenido típico de una VE.....	22
Figura 2. Esquema de clasificación: ectosomas, exosomas y cuerpos apoptóticos.....	23
Figura 3. VE presentes en diversos fluidos biológicos.....	24
Figura 4. Potencial terapéutico de las vesículas extracelulares.....	31
Figura 5. Método convencional de purificación de VE.....	32
Figura 6. Fluctuaciones características de partículas grandes y pequeñas.....	35
Figura 7. Representación esquemática del citómetro de flujo.....	36
Figura 8. Representación esquemática de las partes del SEM.....	37
Figura 9. Diagrama de fases presión-temperatura.....	39
Figura 10. Representación esquemática de las partes del TEM.....	40
Figura 11. Esquema representativo de un microscopio confocal.....	41
Figura 12. Mecanismo de cavitación acústica.....	43
Figura 13. Esquema de un generador piezoeléctrico de ondas de choque.....	44
Figura 14. Cultivo primario a partir de disgregación mecánica de tejido.....	45
Figura 15. Morfología de fibroblastos NIH-3T3.....	46
Figura 16. Estructura general de un plásmido.....	47
Figura 17. Transformación de bacterias competentes.....	48
Figura 18. Esquema general de un anticuerpo.....	51
Figura 19. Complejo TCR-CD3.....	52
Figura 20. Esquema experimental.....	55
Figura 21. Bazo de ratón sobre la malla de extrusión de tejidos.....	59
Figura 22. Generador de ondas de choque Piezoson 100 Plus.....	62
Figura 23. Bolsas de listón organza y sobres de papel filtro.....	64
Figura 24. Curva de supervivencia celular de la línea NIH-3T3 expuesta a ondas de choque.....	72
Figura 25. DLS de VE provenientes de NIH-3T3.....	72

Figura 26. Contenido típico de un exosoma de linfocito T.....	74
Figura 27. Caracterización de esplenocitos por citometría de flujo.....	75
Figura 28. Marcaje de linfocitos T en esplenocitos totales	76
Figura 29. Marcaje de linfocitos B en esplenocitos totales	77
Figura 30. Marcaje de granulocitos en esplenocitos totales.....	77
Figura 31. Caracterización de esplenocitos estimulados con conA por citometría de flujo.....	78
Figura 32. Marcaje de linfocitos T en esplenocitos estimulados con ConA.....	79
Figura 33. Marcaje de linfocitos B en esplenocitos estimulados con ConA.....	80
Figura 34. Marcaje de granulocitos en esplenocitos estimulados con ConA.....	80
Figura 35. SEM de linfocitos tratados con 250 ondas de choque.....	83
Figura 36. Curva de supervivencia celular de linfocitos ante tratamiento de ondas de choque.....	84
Figura 37. Análisis por DLS de VE de linfocitos.....	85
Figura 38. Correlación entre la formación de vesículas y la mortalidad celular ante tratamiento de ondas de choque.....	86
Figura 39. TEM de VE obtenidas con 250 ondas de choque.....	88
Figura 40. TEM de VE obtenidas con 500 ondas de choque.....	88
Figura 41. Microscopia confocal de linfocitos nativos y marcados con anti-CD3.....	89
Figura 42. Microscopia confocal de VE marcadas con anti-CD3.....	91
Figura 43. Cultivo de bacterias transformadas.....	92
Figura 44. Análisis del plásmido <i>pCX::GFP-GPI2</i> purificado.....	93
Figura 45. Gráfica de DLS de VE con plásmido.....	94
Figura 46. Imágenes de microscopia confocal de VE preparadas en ausencia de DNA plasmídico, y marcadas con DAPI.....	95
Figura 47. Imágenes de microscopia confocal de VE preparadas en presencia de DNA plasmídico, y marcadas con DAPI.....	96
Figura 48. Imágenes de microscopia confocal de VE marcadas con DAPI y anti-CD3 en ausencia de plásmido.....	97

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Bases de datos electrónicas de VE.....	24
Tabla 2. Tipos de vesículas extracelulares.....	25
Tabla 3. Funciones de VE	28
Tabla 4. Composición del medio RPMI suplementado.....	57
Tabla 5. Proceso de cultivo primario de bazo de ratón.....	60
Tabla 6. Anticuerpos para antígenos de superficie celular.....	61
Tabla 7. Procedimiento para encapsulamiento de <i>pCX:GFP-GPI2</i>	66
Tabla 8. Células extraídas de bazo de ratón CD1, de acuerdo con análisis por citometría de flujo y expresión de marcadores de superficie.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS

Alix	Proteína x de interacción ALG-2
APC	Célula presentadora de antígeno
APC	Aloficocianina
APO2	Apolipoproteína 2
ATPasa	Adenosintrifosfatasa
BSA	Albúmina sérica bovina
Ca	Calcio
Cat.	Catálogo
CD3	Cluster de diferenciación 3
CD4	Cluster de diferenciación 4
CD8	Cluster de diferenciación 8
CD9	Cluster de diferenciación 9
CD40	Cluster de diferenciación 40
CD63	Cluster de diferenciación 63
CD81	Cluster de diferenciación 81
CDR	Región determinante de complementariedad
cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de carbono
ConA	Concanavalina A
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DLS	Dispersión dinámica de luz
DMEM	Medio eagle modificado por <i>dulbecco</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
esRNA	Ácido ribonucleico exosomal
Fab	Fracción de unión a antígeno
FasL	Ligando Fas

FSC	Dispersor frontal del citómetro de flujo
g	Gramo (s)
GFP	Proteína verde fluorescente
GM3	Gangliósido ácido monosálico 3
GPI	Proteína glicosilfosfatidilinositol
GTPasa	Guanosina trifosfatasa o trifosfatasa de guanosina
HEK 293	Células inmortales derivadas de riñón embrionario humano
Hrs	Horas
Hsp70	Proteínas de shock térmico de 70 KDa
Hsp90	Proteínas de shock térmico de 90 KDa
Hz	Hertz
IgA	Inmunoglobulina A
IgD	Inmunoglobulina D
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
ITAM	<i>Motivo de activación</i> del inmuno-receptor Basado en <i>Tirosina</i>
Kcps	Kilo cuentas por segundo
keV	Electronvoltio
kDa	Kilo dalton
kpb	Kilo pares de bases
kV	Kilo voltio
LB	Caldo de lisogenia
LB-amp	Caldo de lisogenia con ampicilina
Ly-6G	Locus del complejo G6D del antígeno de linfocito 6
M	Molar
MFA	Microscopia de Fuerza Atómica
Mg	Miligramo (s)
MHC I	Complejo Mayor de Histocompatibilidad I
MHC II	Complejo Mayor de Histocompatibilidad II
min	Minuto (s)

miRNA	Micro ácido ribonucleico
ml	Mililitro (s)
MPa	Megapascal
NaCl	Cloruro de sodio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
ng	Nanógramo
NIH-3T3	Línea celular de fibroblastos de embriones de ratón
NK	Asesina natural
nm	Nanómetro
NTA	Análisis de seguimiento de nanopartículas
ORI	Origen de replicación
PE	Ficoeritrina
PerCP-Cy5.5	Peridina de clorofila conjugado con cianina 5.5
PBS	Buffer de fosfato salino
PFA	Paraformaldehído
pH	Potencial de hidrógeno
psi	Libra por pulgada cuadrada
RES	Sistema Retículo Endotelial
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	Ácido ribonucleico de interferencia
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
RNA _r	Ácido ribonucleico ribosomal
RNA _s	Ribonucleasa
RNA _t	Ácido ribonucleico de transferencia
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Medio Roswell Park Instituto Memorial
SDS	Dodecilsulfato sódico
SEM	Microscopia electrónica de barrido
SNC	Sistema nervioso central
SSC	Canal de dispersión lateral

TAE	Tampón de Tris, acetato y EDTA
TCR	Receptor de linfocitos T
TEM	Microscopia electrónica de transmisión
TF	Factor de tejido
Tsg-1	Gen susceptible a tumor 1
UV	Radiación ultravioleta
VE	Vesículas extracelulares
α	Alpha
γ	Gamma
δ	Delta
μ	Mu
μg	Microgramo
μl	Micrólitro
μm	Micrometro
ϵ	Épsilon
κ	Kappa
λ	Lambda
$x\text{ g}$	Fuerza
$^{\circ}\text{C}$	Grados centígrados

1. INTRODUCCIÓN

La Nanomedicina es un campo con un enfoque drásticamente distinto a la medicina convencional, que consiste en el uso de nanopartículas para el diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades (Chen *et al.*, 2016; Moghimi *et al.*, 2005).

Las nanopartículas o nanoacarreadores se describen como partículas de talla nanométrica capaces de transportar agentes terapéuticos o materiales biológicos a un sitio específico del cuerpo, ya sea a nivel celular, tejido u órgano; además de contar con propiedades físicas, biológicas y químicas específicas (Chen *et al.*, 2016).

Las vesículas extracelulares (VE) son nanopartículas liberadas naturalmente por células del cuerpo capaces de mantener sus biomoléculas activas y transportar información genética, lipídica y proteómica a células receptoras (Chen *et al.*, 2016; Moghimi *et al.*, 2005). Su origen es diverso y se han estudiado en muchos tipos celulares como células madre, células inmunes, células nerviosas e incluso células cancerígenas. En un principio se les consideraba *debris* celular o partículas de desecho sin ninguna función biológica. La primera vez que a estas estructuras se les dio importancia y que se llevó a cabo su descripción fue a partir de cuerpos multivesiculares de reticulocitos de oveja en 1983 (Pan y Johnstone, 1983). No obstante fue hasta 1996 que se les atribuyó potencial biomédico al utilizarlas como estimulantes de respuestas inmunológicas (Rasposo *et al.*, 1996).

Actualmente, las VE constituyen una herramienta prometedora en Nanomedicina debido a que representan uno de los principales mecanismos de comunicación de una célula eucarionte y, como consecuencia, son partícipes de procesos fisiopatológicos. Dichos mecanismos de comunicación intracelular involucran la activación de células vía ligandos de superficie, intercambio de receptores mediante fusión de membrana y transferencia horizontal de proteínas y RNA (Cocucci *et al.*, 2009; Kooijmans *et al.*, 2012).

El potencial terapéutico de las VE es amplio y ha tenido un gran auge en los últimos años. Las VE se pueden utilizar como biomarcadores de diagnóstico en patologías, así como para vacunación y vehículos de fármacos dirigidos (Kooijmans *et al.*, 2012; Raposo y Stoorvogel, 2013). La producción de estas estructuras es limitada, da lugar a vesículas con ligandos muy específicos, y es regulada por mecanismos aún mal dilucidados. Por ello, la

obtención de VE mediante métodos físicos ha generado un interés creciente, ya que podría dar lugar a una producción a gran escala y a la obtención de VE con ligandos derivados de las células de origen. Uno de los métodos físicos conocidos por inducir la ruptura de membranas plasmáticas y la formación de vesículas es la aplicación de ondas de choque.

Las ondas de choque son ondas mecánicas que se generan al concentrar una gran cantidad de energía en un espacio pequeño y en un periodo muy corto, propagándose en forma de frentes de alta presión. En Medicina, las ondas de choque generadas en un medio acuoso se comenzaron a utilizar para la fragmentación dirigida de cálculos urinarios de manera extracorpórea (Chaussy *et al.*, 1980). En la actualidad se siguen aplicando como tratamiento no invasivo y efectivo contra la urolitiasis (Loske, 2007, Rassweiler *et al.*, 2011) y en tratamientos ortopédicos (Loske, 2017).

En 1997 las ondas de choque se emplearon por primera vez a nivel celular y se comprobó su capacidad de permeabilizar transitoriamente la membrana plasmática, dando lugar a defectos en la superficie celular y como consecuencia a un nuevo método para introducir material genético en células eucariontes (Lauer *et al.*, 1997). En un estudio posterior, la exposición de células HEK 293 a ondas de choque dio lugar a la formación de blebs o protuberancias (López-Marín *et al.*, 2016). Estos hallazgos de ruptura membranal e inducción de blebs a partir de las ondas de choque, dieron pie a considerar y evaluar el potencial de este método físico para la generación de vesículas de células eucariontes. La producción de VE por este método físico representa una opción factible para aislar grandes cantidades de VE por su capacidad de disminuir el tamaño de células tratadas y de romper la membrana celular.

En esta tesis se evaluó el uso de las ondas de choque como un nuevo método físico para la producción de VE a gran escala. Dicha técnica no ha sido utilizada anteriormente con este fin. Las técnicas analíticas para caracterizar la formación de VE incluyeron el uso de la DLS, de la TEM y de microscopia confocal con marcaje de receptores de superficie celular. Finalmente se llevó a cabo una prueba de encapsulamiento de plásmido en VE de manera simultánea a su preparación por ondas de choque.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Características y clasificación de vesículas extracelulares

Las VE son partículas esféricas rodeadas por una bicapa de fosfolípidos provenientes de una célula, con un tamaño que oscila entre los 20 a 1000 nm y que contienen biomoléculas activas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Kim et al., 2013; Nassar et al., 2015). En la figura 1 se muestra el contenido típico de una VE. Existe una gran variedad de VE con diferente composición, densidad y función dependiendo del tipo celular del que se originen. (Raposo y Stoorvogel, 2013; van Niel et al., 2006).

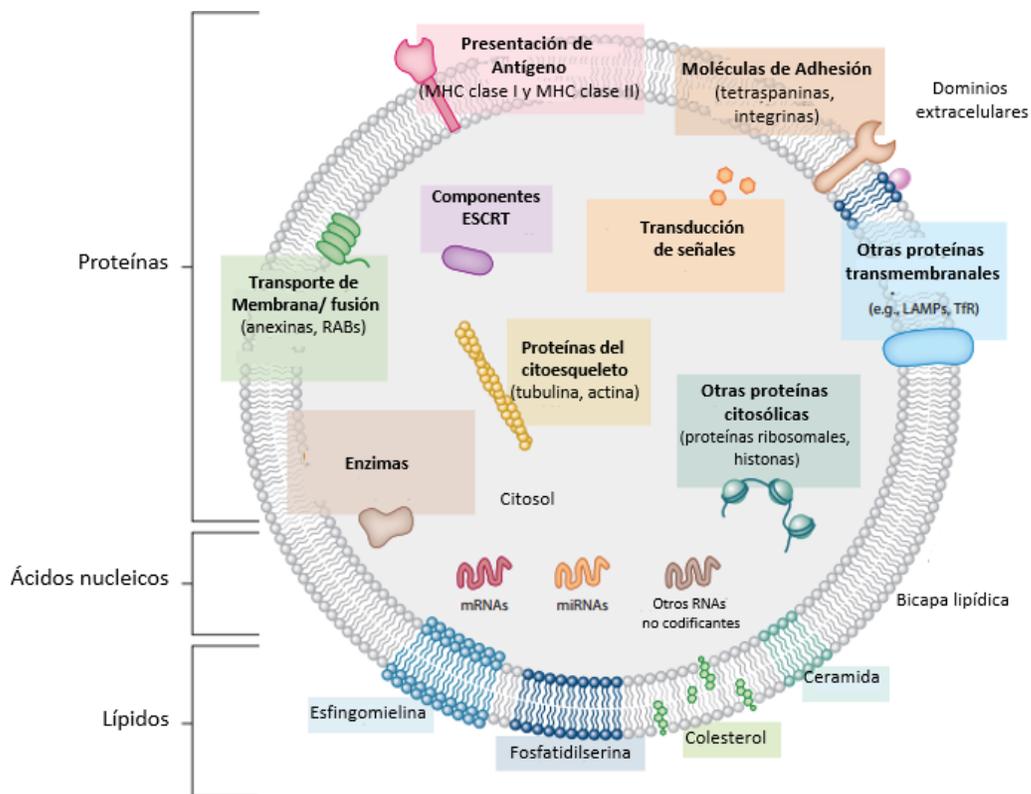


Fig. 1. Representación esquemática del contenido típico de una VE (adaptado de Colombo et al., 2014).

A pesar de que la nomenclatura de las VE es controversial, existen varias clasificaciones establecidas. Se les conoce como vesículas de membrana si se originan de arqueas o de bacterias Gram-positivas (Grimm et al., 1998, Lee et al., 2009) y vesículas de membrana externa si provienen de bacterias Gram-negativas (Lee et al., 2008). Existen algunas categorizaciones basadas en el tipo celular del que se generan o por su función biológica tal como los prostastosomas extraídos exclusivamente del semen, vexosomas que son vesículas relacionadas a vectores de adenovirus y los cardiosomas liberados por cardiomiocitos (Andaloussi et al., 2013). Sin embargo, la jerarquía más utilizada es la basada en su biogénesis que las agrupa en exosomas, ectosomas y cuerpos apoptóticos (Tabla 2 y Fig. 2) (Kalra et al., 2012). Su contenido depende directamente del tipo celular del que se originen. Además están presentes en todo tipo de fluidos biológicos (Fig. 3), se han encontrado en sangre, saliva, secreción nasal, semen, orina, líquido amniótico, leche materna, fluido uterino, bilis, líquido sinovial y líquido cefalorraquídeo (van Der Pol et al., 2012; Yuana et al., 2013).

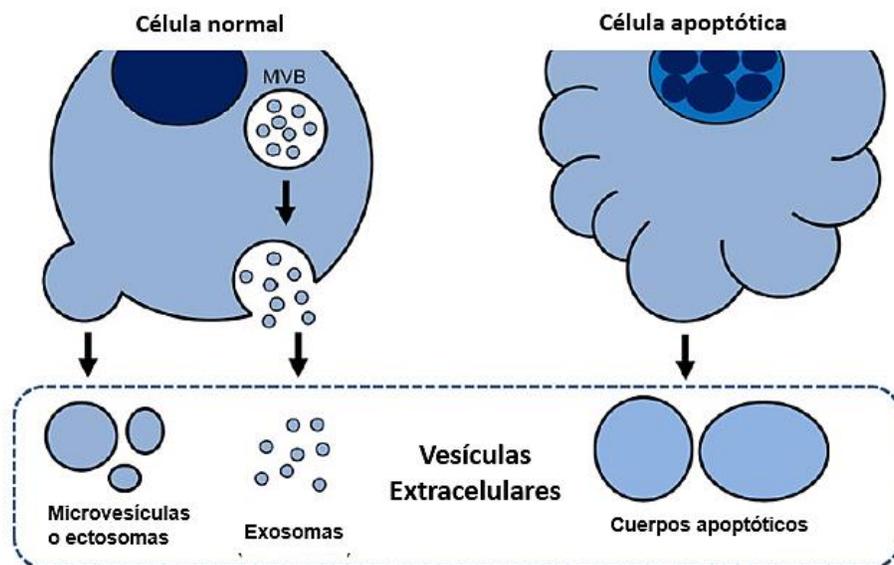


Fig. 2. Esquema de clasificación: ectosomas, exosomas y cuerpos apoptóticos (adaptado de Börger et al., 2016).

Actualmente se han establecido tres bases de datos de estudios de caracterización de VE en Internet que se enlistan en la tabla 1.

Tabla 1. Bases de datos electrónicas de VE		
Nombre	Características	Dirección URL
Exocarta	Cataloga proteínas, lípidos y RNA exclusivos de exosomas.	http://www.exocarta.org
Vesiclepedia	Abarca todo tipo de VE.	http://www.microvesicles.org
EVpedia	Cataloga información de VE.	http://evpedia.info

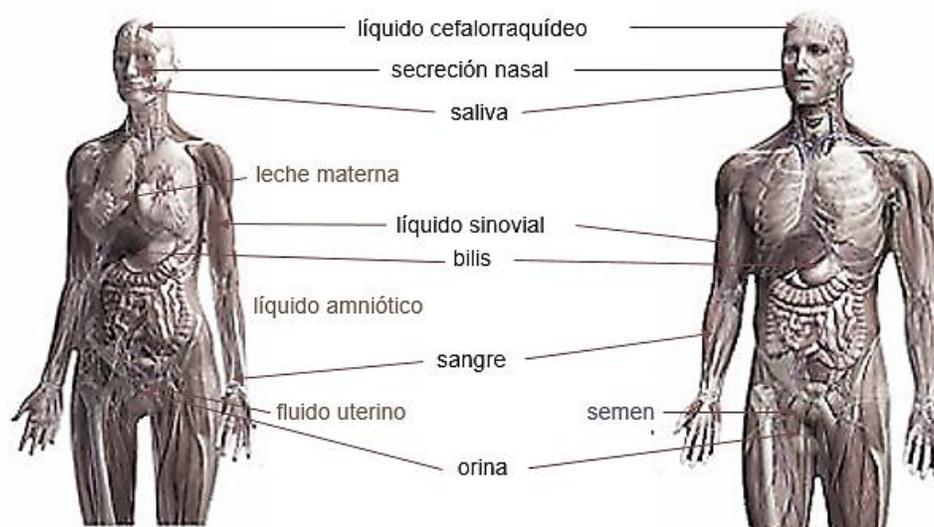


Fig. 3. VE presentes en diversos fluidos biológicos.

Los ectosomas, también conocidos como microvesículas, se originan directamente de la membrana plasmática, tienen un diámetro de 50 a 1000 nm, presentan grandes cantidades de fosfatidilserina en su superficie membranal, y como proteínas distintivas contienen

selectinas, integrinas, metaloproteinasas y CD40 (Cocucci et al., 2009; Mathivanan et al., 2010).

Los cuerpos apoptóticos son las VE más heterogéneas y de mayor tamaño (50 – 5000 nm), se producen como consecuencia del proceso de apoptosis o muerte celular y son las únicas que en su contenido presentan componentes celulares como histonas y DNA además de RNA como en otras VE (Kooijmans et al., 2012; Théry et al., 2001).

Tabla 2. Tipos de vesículas extracelulares

Nombre	Tamaño	Origen
Exosomas	30-100 nm	Origen endógeno de los cuerpos multivesiculares
Ectosomas o microvesículas	50-1000 nm	Origen directo de la membrana celular
Cuerpos apoptóticos	50-5000 nm	Apoptosis

Los exosomas son las VE más estudiadas. Su tamaño varía de los 30 a 100 nm. Se caracterizan por tener origen endocítico y ser liberados por la fusión de los cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática (Simpson et al., 2009; van Niel et al., 2006). Su morfología tiene forma de esfera en fluidos biológicos, aunque también se han reportado con forma de copa al ser observados por microscopia electrónica (Sahoo et al., 2011). Su contenido de proteínas, lípidos y RNAs varía según el tipo celular.

Son pocos los estudios acerca de la composición lipídica de los exosomas debido a que en un principio no se le atribuía gran importancia al perfil lipídico. Entre los lípidos más comunes se han reportado 4 tipos de prostaglandinas (E2, F2, J2, D2), ácido liso-bisfosfatídico y otros constituyentes de membrana: fosfatidilinositol, esfingomielina, colesterol, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y gangliósido GM3 (Mathivanan et al., 2010; Subra et al., 2007). En contraste, el contenido de proteínas en exosomas es

sumamente diverso y abundante, además de tener estrecha relación con su biogénesis. Debido a esto se han realizado una gran cantidad de estudios acerca del perfil proteico de exosomas (Mathivanan et al., 2010; Simpson et al., 2008; Simpson et al., 2009; Théry et al., 2001; Théry et al., 2009; van Niel et al., 2006; Wubbolts et al., 2003). La composición proteica típica de un exosoma presenta proteínas del citoesqueleto tales como actina, miosina y tubulina, moléculas transmembranales como canales ATPasa y moléculas presentadoras de antígeno MHC clase I y II. Además, también presentan proteínas de choque térmico como Hsp70 y Hsp90, proteínas de balsas lipídicas como Flotilina-1, proteínas relacionadas al transporte y fusión como Rab7, Rab2 y anexinas y proteínas endosomales como Alix, clatrina y Tsg1. En su contenido también cuentan con enzimas como piruvato cinasa y α -enolasa, moléculas involucradas en la transducción de señales como sintenina-1 y proteínas de adhesión como integrinas y tetrasparinas CD9, CD63 y CD81. Las tetrasparinas mencionadas sirven como biomarcadores exosomales, igual que Alix y Tsg1 (Mathivanan et al., 2012)

En todos los tipos de VE se han encontrado múltiples tipos de RNAs desde RNA mensajero (RNAm), microRNA (miRNA), RNA ribosomal (RNAr) y RNA de transferencia (RNAt) (Kim et al., 2013). El RNAm proveniente de exosomas se ha demostrado que es capaz de transferirse a células dirigidas y traducirse a proteínas (Ratajczak et al., 2006; Valadi et al., 2007). A este RNA transferido a una célula a partir de exosomas y que es funcional le llamaron esRNA (exosomal shuttle RNA) (Valadi et al., 2007). Los miRNA tienen la capacidad de regular la expresión génica mediante el silenciamiento post-transcripcional e impactar en vías de señalización río abajo (Chen et al., 2012). Su presencia en VE se ha demostrado en varios estudios (Mittelbrunn et al., 2011; Montecalvo et al., 2012; Turchinovich et al., 2011).

2.2 Funciones fisiológicas y patológicas

Las VE representan un mecanismo de comunicación intercelular con efectos pleiotrópicos por su capacidad de mantener la estabilidad de su membrana y así transportar ácidos nucleicos o proteínas tales como RNAs regulatorios, factores de transcripción, receptores de membrana, citoquinas, enzimas y antígenos de una célula a otra. Como consecuencia participan en procesos tanto fisiológicos como patológicos al modificar la composición y función de las células receptoras (Tabla 3) (Cicero A. L., et al., 2015; Yuana et al., 2013).

Inclusive se les ha acuñado el término señalosomas por ser complejos multifuncionales de vías de señalización partícipes en funciones biológicas esenciales (Andaloussi et al., 2013).

En el sistema nervioso central (SNC) las neuronas, oligodendrocitos, astrocitos y microglia son aptas de secretar VE. A diferencia de otros tipos celulares el intercambio de VE de una neurona a otra constituye un nuevo mecanismo de comunicación inter-neuronal aparte de la sinapsis (Chivet et al., 2014). Sin embargo, también están involucradas en procesos patogénicos a causa del intercambio de proteínas patogénicas como péptidos beta-amiloide, α -sinucleína y priones capaces de desencadenar enfermedades neurológicas (Gangoda et al., 2015; Vella et al., 2008).

En el sistema inmune, las VE son mediadores clave de respuestas fisiológicas normales, ya que inhiben o estimulan procesos como la angiogénesis, respuesta inflamatoria, proliferación y apoptosis (Gangoda et al., 2015, Yuana et al., 2013). Participan en todo el complejo de interacciones tanto en la respuesta inmune innata como en la respuesta inmune adaptativa. En el caso de las células NK, las VE secretadas por ellas tienen principalmente efectos citotóxicos y las VE secretadas por otras células que interactúan con las NK efectos estimuladores dependiendo del contenido de las mismas (Yáñez-Mo et al., 2015). Las VE secretadas por células presentadoras de antígeno (APC) como los linfocitos B, macrófagos y células dendríticas, mantienen su estructura membranar exhibiendo moléculas MHC clase I o clase II, así como proteínas coestimuladoras, que permiten conservar dicha función de presentar antígenos a células T CD8 y CD4 respectivamente y generar las respuestas específicas (Robbins y Morelli, 2014; Yáñez-Mo et al., 2015). Además, en general cualquier VE secretada por cualquier tipo celular puede contener antígenos que activen y modulen a las APC en caso de existir inflamación, disfuncionalidad o algún proceso infeccioso (Yáñez-Mo et al., 2015). Incluso las VE fabricadas por las células T son de las más versátiles con efectos moduladores diversos, tanto estimuladores como supresivos. Dichas VE de origen de linfocito T cuentan en su superficie con otras moléculas aparte de las MHC tales como TCR, ligando APO2 y FasL que pueden producir respuestas variadas como apoptosis de células T, bloqueo de activación de linfocitos T y control de estimulación de estas debido a presentación de antígeno (Yáñez-Mo et al., 2015).

Las células madres mesenquimales generan VE que también intervienen con el sistema inmune mediando de igual forma positiva o negativamente (Yáñez-Mo et al., 2015). Dichas VE de células madre tienen la capacidad de suprimir apoptosis e inducir proliferación celular, tener efectos inmunomodulatorios, provocar reepitelización y angiogénesis (Andaloussi et al., 2013; Börger et al., 2016).

La comunicación inmunológica entre feto y cuerpo de la madre durante el embarazo no sólo es mediada por factores solubles sino por VE. Ellas se encargan de crear un ambiente de interacciones con el feto y así afectar la respuesta inflamatoria local y sistémica, la angiogénesis local, la coagulación, controlar la actividad y diferenciación de células inmunes (Yáñez-Mo et al., 2015).

Uno de los efectos más importantes de las VE provenientes de células inmunes es el sustento de la homeostasis de tejidos, causado debido a que presentan lípidos de mediación involucrados en la resolución de la inflamación (Yáñez-Mo et al., 2015). En oposición a estos efectos que ayudan a la regulación de la respuesta inmune, el papel pro-inflamatorio de las VE en enfermedades autoinmunes parece ser ineludible. Los autoantígenos contenidos en las VE contribuyen en la persistencia del estado de inflamación patológico en varias enfermedades inflamatorias (Buzas et al., 2014). Un autoantígeno se puede definir como un antígeno o proteína endógena del cuerpo que no ha sido reconocido por el sistema inmune como propio. Las VE contribuyen en la homeostasis celular ya que son capaces de controlar el estrés extracelular e intracelular (van der Pol et al., 2012). Por ejemplo, para permitir la supervivencia celular se lleva a cabo un mecanismo de liberación de la caspasa 3 una molécula de estrés intracelular, vía VE del citosol (Abid Hussein et al., 2005).

Tabla 3. Funciones de VE

Patológicas	Fisiológicas
Cáncer	Coagulación
Autoinmunidad	Inmunomodulación
Neurodegeneración	Reparación de tejidos
Infecciones virales	Desarrollo embrionario
Priones	Homeostasis

La participación de las VE en los procesos de hemostasia y por ende en la coagulación lo logran gracias a que contienen factores pro-coagulantes y anti-coagulantes (Yáñez-Mo et al., 2015). Igualmente contribuyen en el desarrollo embrionario ya que apoyan al esparcimiento del gradiente de morfógenos, en la migración de grupos celulares y en la polaridad de tejidos (Yáñez-Mo et al., 2015). En específico se ha demostrado que microvesículas de linfocitos T fungieron como medio de transporte de proteínas Hedgehog (Hh) a otras células pluripotentes tomando parte directamente en la diferenciación de las mismas, lo que también da énfasis al papel que juegan las VE en el mantenimiento de la homeostasis (Martínez et al., 2006).

En el caso del cáncer, las VE provenientes de células tumorales juegan un papel clave debido a que pueden inducir mecanismos para detener o estimular la proliferación celular e incluso promover metástasis (Gangoda et al., 2015). Esto lo llevan a cabo principalmente por su contenido rico en miRNAs que afecta la regulación post-transcripcional y como consecuencia generan respuestas como proliferación celular desmedida. Además, algunos virus utilizan las VE como medio de transporte, les sirven como el camuflaje perfecto para su proceso infeccioso y sobrevivencia (van der Pol et al., 2012). En particular, existe la hipótesis de exosomas troyanos, que consiste en que algunos retrovirus utilizan la vía de biogénesis de exosomas para infectar a otras células, evadiendo al sistema inmune (Gould et al., 2003).

Dependiendo del tipo de biofluido en el que se encuentren las VE, se han propuesto numerosos mecanismos fisiológicos. En la leche materna, la labor de las VE con alto contenido de miRNAs es imprescindible y significativa para la interacción, maduración y desarrollo del sistema inmune del hijo (Zhou et al., 2012). En la saliva, las VE son muy activas porque cuentan con proteínas específicas y muchos tipos de RNAs, por ejemplo, se han asociado con la estimulación de coagulación debido a que contienen factor de tejido (TF) (Yáñez-Mo et al., 2015).

2.3 Aplicación terapéutica

El cargo bioactivo de las VE les confiere un enorme rango de aplicaciones biomédicas (Fig. 4). Entre ellos la entrega de fármacos dirigidos y vacunación es de los más llamativos, debido a que ejecutan transferencia horizontal de diversos tipos de RNAs. Dicha estrategia

terapéutica despliega varias ventajas, como su alto nivel de biocompatibilidad debido a la composición de su membrana plasmática que les facilita el no ser detectadas por el sistema inmune (Andaloussi et al., 2013). Además, son capaces de cruzar la barrera hematoencefálica sin la mayor dificultad, como se ha observado en un modelo de ratón para Alzheimer (Alvarez-Erviti et al., 2011).

La inmunoterapia consiste en la modulación de las vías de señalización del sistema inmunitario a través de las VE, debido a su capacidad inhibitoria y de activación explicada en el apartado anterior. Además de su capacidad de presentar antígenos al conservar la topología de las membranas de las células presentadoras de antígeno APC, del inglés *antigen presenting cells* e inducir la respuesta inmunitaria (Nassar et al., 2015)

Debido a que las VE están involucradas en el proceso de diseminación y progreso de ciertas patologías, se han propuesto varios mecanismos mediante los cuales se puede influir sobre ellas para detener o disminuir los efectos patológicos (Andaloussi et al., 2013). Uno de los mecanismos es impidiendo la biogénesis de las VE con estrategias específicas, como por ejemplo con un tratamiento del fármaco amilorida que se encarga de prescindir la formación de exosomas (Trajkovic et al., 2008). Otra alternativa es impidiendo desde el proceso de liberación de VE, lo cual se ha logrado en el caso de exosomas provenientes de células tumorales con RNAi (interferencia) que bloquean ciertas GTPasas clave (Bobrie et al., 2012). Otro mecanismo es a través de la intervención en la adquisición de las VE por la célula receptora, de manera que las señales patogénicas nunca llegan a su destinatario. Sin embargo los métodos que han propuesto para lograrlo tienen como limitante su baja especificidad. Por ejemplo, el uso de dianexina, que no sólo inhabilita la adhesión celular sino todas las diversas funciones esenciales en las que la fosfatidilserina membranal se encuentra involucrada (Andaloussi et al., 2013). A pesar de que estos mecanismos de bloqueo parecen ser opciones factibles, aún se encuentran en etapa de investigación, ya que el complejo de interacciones en las que las VE participan es sumamente diverso y multifuncional.

Las VE en fluidos biológicos representan agregados multimoleculares que sirven como biomarcadores de diagnóstico para enfermedades (Fais et al., 2016). En lugar de enfocarse en una sola molécula como biomarcador para una condición patológica, las VE pueden contener una combinación de varias moléculas aparte de cierta morfología y tamaño

característica que estadísticamente da más información de tener cierta enfermedad y reducen la posibilidad de diagnósticos erróneos. Por ejemplo, las VE provenientes de células cancerígenas pueden considerarse un reflejo del microambiente tumoral y por lo tanto es mucho más fácil detectar la malignidad del tumor e incluso el tipo celular (Taylor y Taylor, 2013). Las VE como biomarcadores constituyen un método eficiente, no invasivo, con mayor especificidad y sensibilidad en comparación con otros marcadores biológicos.

Otra aplicación en particular es su uso en medicina de regeneración y resarcimiento de tejidos. Las VE provenientes de células madre son las más adecuadas por su capacidad inmunomoduladora y angiogénica para tratar enfermedades relacionadas con heridas externas o internas crónicas como las úlceras comunes en diabetes (Rani y Ritter, 2015). Además, también se ha reportado que estas VE de células madre pueden incitar o interrumpir el crecimiento de tumores, debido a que la vía de señalización que se activa está directamente relacionada con la clase de tumor involucrado y su estado temporal de desarrollo (Katakowski et al 2013; Zhu et al 2012).

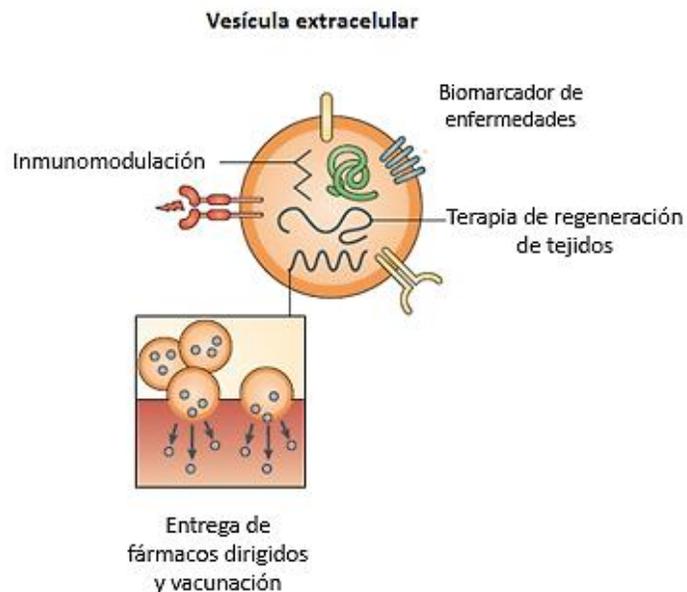


Fig. 4. Potencial terapéutico de las vesículas extracelulares (modificada de Andaloussi et al., 2013).

2.4 Métodos de obtención

El método más común para aislar VE es mediante una serie de centrifugaciones diferenciales que van de 300 x g a 20, 000 x g para eliminar agregados y *debris* celular de origen apoptótico, seguidas de una ultracentrifugación a 100,000 x g, del cual existen algunas variantes (Fig. 5) (Baietti et al. 2012; Raposo et al. 1996; Théry et al., 2006). El protocolo de almacenamiento de las VE para su posterior caracterización es en buffer fosfato salino (PBS) como medio y a una temperatura de 4°C.

La centrifugación por gradiente de sacarosa es un método con mayor eficacia en cuanto al grado de pureza final de VE a diferencia de centrifugaciones normales, debido a que la separación de las partículas ocurre por las distintas densidades de flotación (Théry et al., 2006).

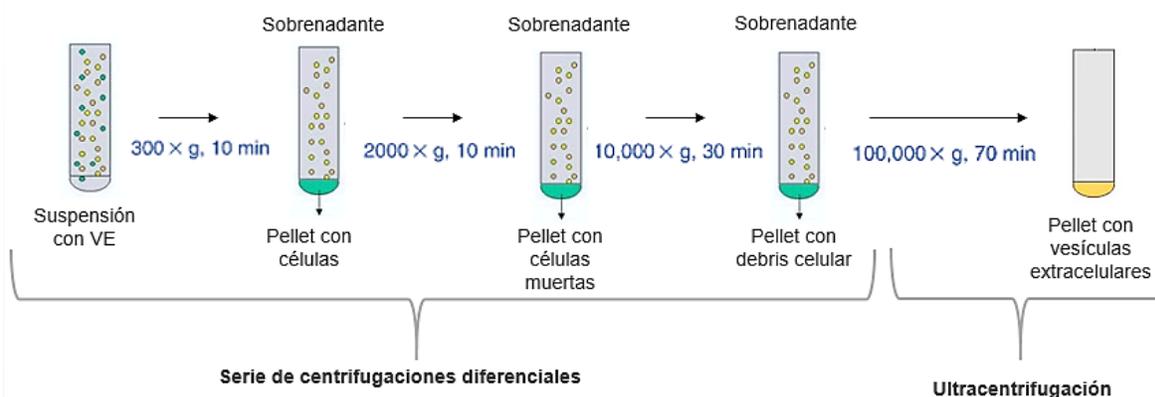


Fig. 5. Método convencional de purificación de VE. Los parámetros varían dependiendo el protocolo.

La técnica de captura por inmuno-afinidad representa un método de aislamiento de VE con alta especificidad (Tauro et al., 2012). Las microperlas magnéticas recubiertas con anticuerpos son capaces de separar subpoblaciones de vesículas en pequeñas cantidades con marcadores proteicos definidos y se han hecho diversos estudios al respecto (Clayton et al., 2001; Koga et al., 2005). Conjuntamente a los métodos de inmuno-afinidad con el

ExoTEST™ (HANSABIOMED, Tallinn, Estonia) se utilizan placas ELISA revestidas con anticuerpos contra antígenos exosomales, de manera que también pueden definir y dividir subpoblaciones de VE.

Los aparatos de microfluídica actúan de forma muy similar a los de captura por inmuno-afinidad, ya que su principio de acción es el mismo mediante la unión de las VE presentes en un biofluido a la superficie de un chip recubierto con anticuerpos seleccionados (They et al., 2006). Se caracterizan por su rapidez y facilidad de llevar a cabo inmediatamente algún otro proceso de caracterización.

2.5 Métodos alternos de obtención

Otros métodos de obtención de VE reportados recientemente son mediante el uso de electromagnetismo y tecnología de microfiltración. La técnica de pulsos de campos magnéticos de muy baja frecuencia (3 a 300 Hz) se basa en provocar la permeabilidad temporal de la membrana celular y de organelos, de forma que entra Ca^{2+} extracelular y se libera Ca^{2+} por los poros en organelos y es este exceso de Ca^{2+} el que estimula la vía de señalización para la liberación de VE (Stratton et al., 2013).

El otro método utilizado es mediante tecnología de microfiltración. Un ejemplo de este tipo es la extrusión serial utilizada para aislar exosomas de células a través de filtros de membrana policarbonatada con poros de 10, 5, 1 μ m, y posteriores centrifugaciones y ultracentrifugaciones (Jang et al., 2013; Lunavat et al., 2016). Cabe mencionar que igualmente se han diseñado kits especializados en la obtención de exosomas, como el ExoQuick™ (System Biosciences, Mountain View, CA, USA).

La elección del protocolo de aislamiento de VE adecuado depende principalmente de la aplicación posterior y del tipo celular o biofluido del cual se extraerán, cada uno cuenta con ventajas y desventajas que impactan directamente en el resultado final de pureza y cantidad de VE.

2.6 Métodos de caracterización

Existen una gran variedad de técnicas para caracterizar a las VE, los cuales describen parámetros tales como tamaño, morfología, densidad, concentración, carga, origen celular, contenido y funcionalidad o bioactividad. Sin embargo, aún existe dificultad en la

estandarización no sólo de los métodos de obtención y purificación sino de caracterización, debido principalmente a su tamaño nanométrico y heterogeneidad. Las técnicas por excelencia para estudiar su estructura, talla y morfología son citometría de flujo, dispersión dinámica de luz (DLS), análisis de seguimiento de partículas (NTA), microscopia electrónica de transmisión, microscopia electrónica de barrido y microscopia de fuerza atómica (MFA) (Momen-Heravi et al., 2012; van der Pol et al 2012). Las características de densidad se analizan asimismo por centrifugación con gradiente de sacarosa.

2.6.1 Dispersión Dinámica de Luz

El método de DLS ha sido comúnmente utilizado para establecer el diámetro hidrodinámico y la distribución del tamaño de nanopartículas y vesículas extracelulares en fluidos (Hallett et al 1991; Pencer & Hallett 2003; Pol et al., 2013). También es llamado Espectroscopia de Correlación de Fotones o Dispersión de Luz Cuasi Elástica. El movimiento Browniano fue descubierto en 1827 por Robert Brown y se refiere al desplazamiento aleatorio de las partículas en una suspensión, debido a los choques que tienen con el medio. El análisis de DLS consiste en que las muestras de partículas inmersas en solución son irradiadas por un láser monocromático, cuya luz es dispersada a través del tiempo debido al movimiento browniano y es a través de la medición de estas fluctuaciones de intensidad de luz dispersada que se obtiene la distribución de tamaño de las vesículas (Kaszuba et al., 2008). El movimiento browniano aumenta entre menor tamaño tenga la partícula o molécula y viceversa (Fig. 6), aparte de que se ve afectado a causa de la viscosidad y temperatura del medio (Malvern, 2012).

El coeficiente de difusión traslacional mide la velocidad del movimiento Browniano, utilizando la siguiente ecuación de Stokes-Einstein para obtener el tamaño de la partícula:

$$D_H = \frac{kT}{3 \pi \eta D}$$

D_H = Diámetro hidrodinámico

K = Constante de Boltzmann

T = Temperatura absoluta

η = viscosidad

D = Coeficiente de difusión traslacional

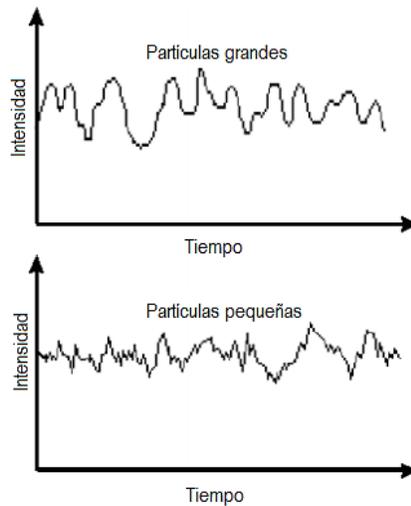


Fig. 6. Fluctuaciones características de partículas grandes y pequeñas (Malvern, 2012).

El diámetro hidrodinámico se define como un valor del diámetro de una esfera que tiene exactamente el mismo coeficiente de difusión traslacional (Malvern, 2012). Se produce una función de correlación a través del análisis del software de autocorrelación sobre las fluctuaciones de intensidad dispersadas que cambia en el tiempo (Frisken, 2001; Kaszuba et al., 2008;).

2.6.2 Citometría de Flujo

El citómetro de flujo se encarga de tomar propiedades como tamaño relativo, granularidad y fluorescencia de partículas, principalmente células a través de un sistema de detección con rayo láser (Biosciences, B. D. 2000). Se rige en conjunto con tres sistemas: de fluidos, electrónico y óptico. En el sistema de fluidos la muestra es inducida a una corriente de flujo individual llamado foco hidrodinámico donde interacciona con el láser examinador (Fig. 7). Existen dos detectores de la luz dispersada por las partículas, uno frontal cuya intensidad refleja el tamaño FSC del inglés *forward scatter channel* y otro lateral SSC del inglés *side scatter channel* que da información sobre la granularidad. De la misma forma si las partículas cuentan con fluorocromos, al pasar por el haz de cierto láser determinado emiten la fluorescencia que se filtra y dirige a los detectores indicados (FL1, FL2, FL3, FL4, etc).

Un fluorocromo es una molécula capaz de liberar parte de la energía absorbida en forma de fotones. La luz emitida por un fluorocromo es de menor energía que la originalmente absorbida y, por lo tanto, de mayor longitud de onda.

El sistema óptico abarca los láseres dispersantes que iluminan la muestra, los filtros ópticos y los detectores de luz. El sistema electrónico es el encargado de convertir las señales de luz en señales eléctricas para ser analizadas en el software. En algunos tipos de citómetros este sistema además cuenta con un mecanismo de clasificación de células que las divide en subtipos mediante carga electrostática. Cada partícula o célula representa un evento con sus parámetros específicos de luz y fluorescencia dispersada y con las correlaciones de los datos de dispersión lateral y frontal se pueden establecer poblaciones de tipos celulares (Biosciences, B. D. 2000).

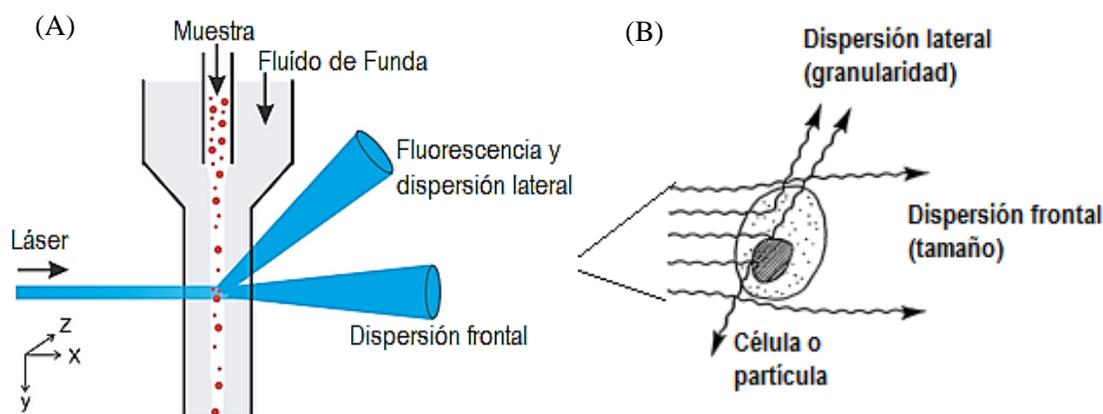


Fig. 7. Representación esquemática del citómetro de flujo. (A) Esquema del principio de medición por citometría de flujo, (B) Dispersión de la luz por una célula (Van der Pol et al., 2013).

2.6.3 Microscopio Electrónico de Barrido

El microscopio electrónico de barrido SEM del inglés *Scanning Electron Microscopy* se caracteriza por utilizar un haz de electrones de alta energía que al irradiar y chocar con

muestras sólidas provoca interacciones como la liberación de electrones secundarios y electrones retrodispersados que son detectados e interpretados a través de un tubo de rayos catódicos para formar una imagen tridimensional del objeto (Goldstein et al., 2012). Esto se logra debido a un mecanismo de escaneo o barrido del haz de electrones sobre toda la superficie de la muestra que opera en una cámara al vacío. Dicho barrido se lleva a cabo punto por punto localizado de la muestra en una trama rectangular. El rayo de electrones alcanza una aceleración de energía en el rango de 1- 40 keV. En particular los electrones secundarios son los que proporcionan la forma y topología de la muestra, en cambio los retrodispersados son direccionales y aumentan el contraste de la composición. Por lo tanto se pueden obtener imágenes de alta resolución con propiedades morfológicas de superficie, tamaño, composición, estructura y orientación cristalina de la muestra. Sus partes principales se muestran en la figura 8.

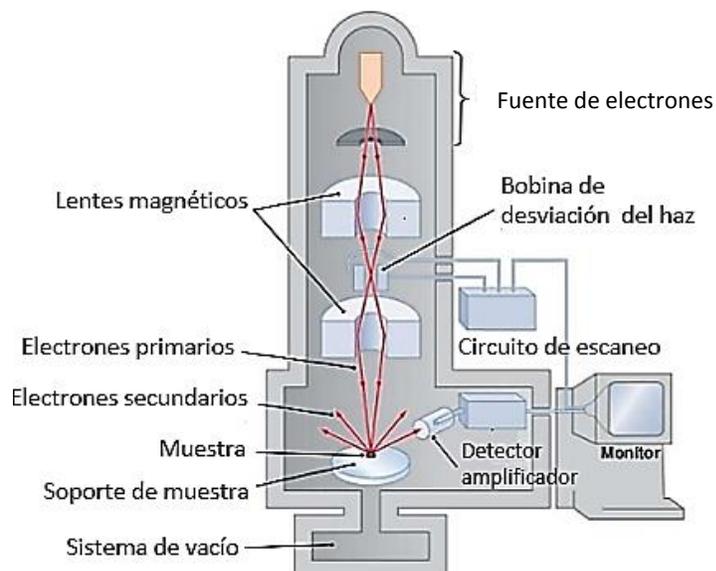


Fig. 8. Representación esquemática de las partes del SEM.

La preparación de muestras biológicas para SEM consta de tres pasos principales de los cuales no se puede prescindir. Existen variantes que añaden más pasos dependiendo del tipo de espécimen. El primero de ellos involucra estabilizar las moléculas orgánicas de la célula o tejido mediante un proceso de fijación. El fijador más común es el glutaraldehído en una concentración que va del 1.5 al 6% en un amortiguador tal como cacodilato de sodio.

El paso siguiente conlleva la deshidratación de la muestra que involucra exposiciones a concentraciones graduales de alcohol o acetona. No todas las muestras se secan por completo al aire libre sin sufrir modificaciones, por ello una de las técnicas más eficientes para lograrlo es por el método de punto crítico. Cuando se aumenta la presión y la temperatura de un fluido hasta alcanzar una temperatura y presión máximas o críticas se llega a un estado llamado punto crítico en el cual los límites de fases gaseoso y líquido dejan de existir y sus volúmenes molares son iguales como observamos en el diagrama de fases de la figura 9 (Gratton, 2003).

A diferencia de un fluido a temperatura y presión menor a la crítica que se conserva en dos fases de estado líquido y gaseoso con volúmenes molares diferentes. Un gas deja de condensarse con un aumento de presión al alcanzar o sobrepasar el punto crítico. Así un fluido al llegar a su punto crítico a determinada temperatura y presión logra una fase estable de líquido - gas de manera que una muestra expuesta a estas condiciones no sufre cambios microestructurales en su tensión superficial y se puede preservar para una imagen de alta resolución (Sahagún, 1997).

Por último, la muestra se recubre con una capa delgada (de unos 15-20 nm de espesor) de material conductor en toda su superficie. El oro, el platino y el cobre son ejemplos de materiales conductores de recubrimiento.

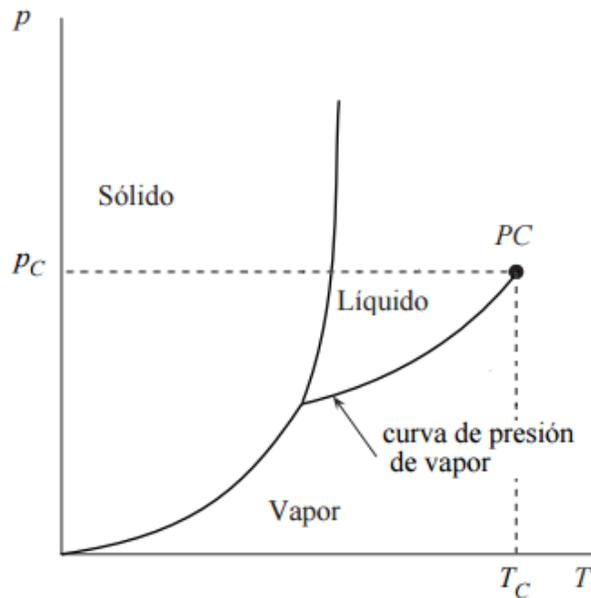


Fig. 9. Diagrama de fases de presión-temperatura. P: presión, T: temperatura, T_c : temperatura crítica, P_c : presión crítica, PC: punto crítico.

2.6.4 Microscopía Electrónica de Transmisión

Otra técnica de caracterización de nanovesículas de origen celular es por TEM del inglés *Transmission Electron Microscopy*. Igual que SEM, utiliza un haz de electrones de alta energía que irradian una muestra delgada para formar una imagen plana de alta resolución (Egerton, 2006). Entre sus partes destacan cuatro componentes principales: una columna óptica-electrónica, un sistema electrónico (lentes electromagnéticos, aditamentos y generador de alto voltaje de electrones), un sistema de vacío y el control del software (Fig. 10).

El haz de electrones con ayuda de los lentes condensadores se enfoca y condensa en la muestra que debe ser de un grosor de 500 nm o menos. Los lentes de proyección se encargan de recolectar los electrones dispersados y transmitirlos al fondo, usualmente a una

pantalla fluorescente en la que chocan y generan una imagen magnificada de la muestra. El sistema de alto vacío es imprescindible ya que en su ausencia los electrones se eliminarían por dispersión o absorción al estrellarse con las moléculas de aire.

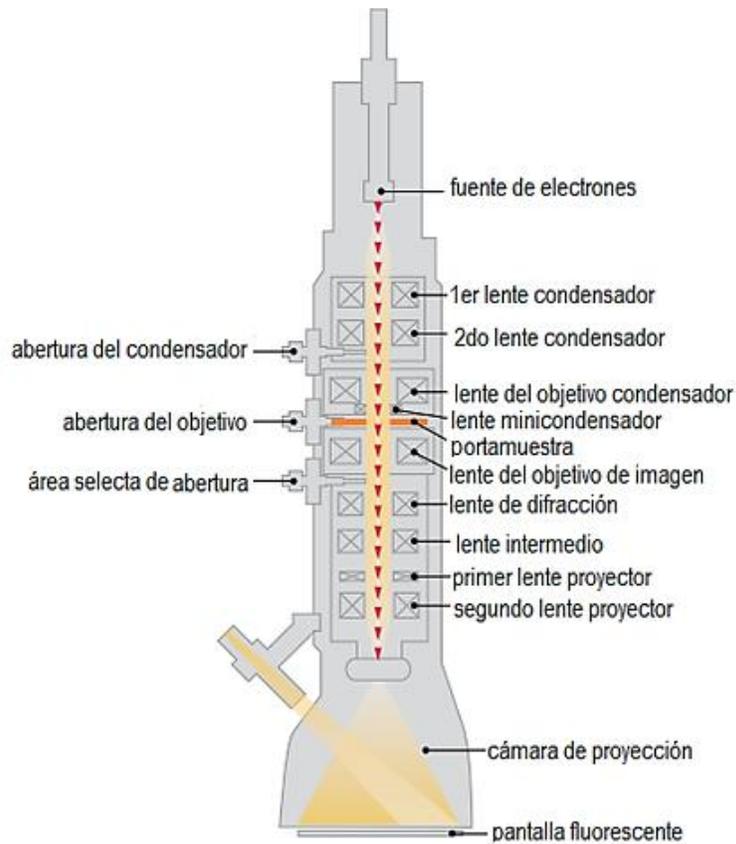


Fig. 10 Representación esquemática de las partes del TEM.

2.6.5 Microscopia Confocal

El principio de la microscopia confocal radica en un escaneo seccional de la muestra logrado debido a que el láser de excitación pasa por unos filtros espaciales llamados “pinhole”, ubicados justo delante del detector de luz y que sirven de bloqueo de señales fuera del área

de foco y permiten que la luz reflejada o fluorescente de interés pueda ser detectada como señal para formar la imagen en tres dimensiones (Claxton et al., 2006).

El sistema de excitación láser pasa primero por otra abertura de pinhole para ser reflejado por un espejo dicróico al lugar de escaneo de la muestra en un plano focal definido y la luz fluorescente secundaria es la que va hacia el otro pinhole discriminador para que únicamente la luz que pase sea detectada por el fotomultiplicador. El diámetro del filtro o pinhole afecta la cantidad de fluorescencia emitida que será detectada. El esquema general de un microscopio confocal se pueden apreciar en la figura 11.

La generación de la serie de secciones o rebanadas ópticas del espécimen debido a los diferentes planos focales al iluminar punto por punto permite contar con la propiedad de discriminación de profundidades. La técnica de microscopia confocal es una herramienta muy útil en áreas de investigación principalmente en Medicina y Biología. Su mecanismo permite trabajar con especímenes hasta de un grosor de 100 micras y detectar moléculas fluorescentes específicas. Existen diversos tipos de microscopios confocales, sin embargo el más común para especímenes fluorescentes es el del escaneo con láser.

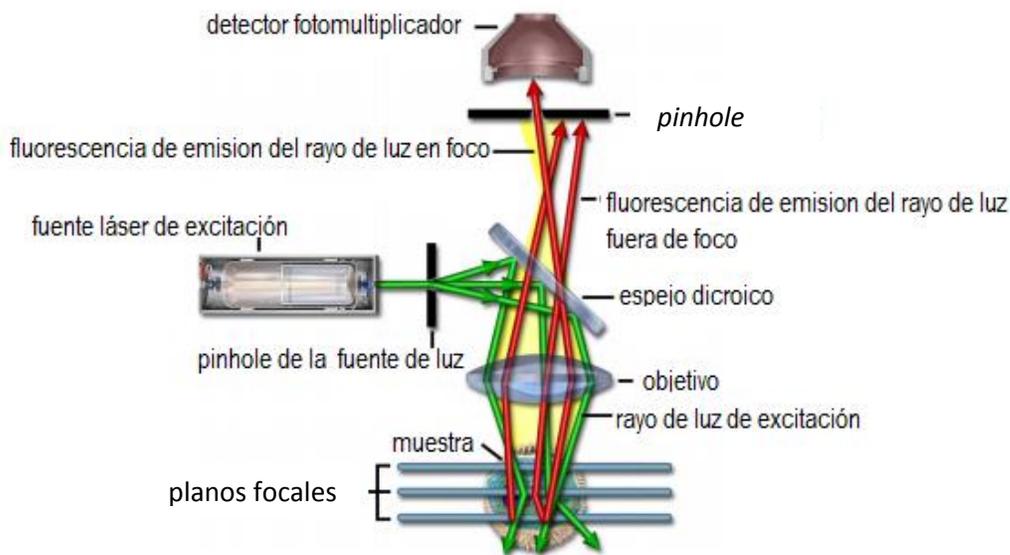


Fig. 11. Esquema representativo de un microscopio confocal (modificada de Claxton et al., 2006).

2.7 Métodos físicos para disrupción de membranas biológicas

Existen diversos métodos físicos que permiten la permeabilización transitoria de membranas celulares y se han utilizado para transfección de genes específicos en células. Entre ellos tenemos: la electroporación, la sonoporación y las ondas de choque. Las condiciones de cada método son distintas según el tipo celular utilizado. También existen otros métodos físicos directos como la biobalística que es la transfección mediante micropartículas de oro o tungsteno a gran velocidad cubiertas con DNA, o el método de microinyección con agujas diminutas que introducen el DNA desnudo a una sola célula (Mello y Fire, 1995; Sanford, 1988)

2.7.1 Electroporación

El método de electroporación para la transfección celular es de los más rápidos, simples y eficaces. Su mecanismo consiste en crear un campo eléctrico de alta intensidad que provoca la desestabilización temporal de la membrana y la consecuente introducción del material exógeno a través de los poros formados (Miyazaki et al., 2006). Esto se logra primeramente al colocar las células y el plásmido en un buffer conductor que permite generar un potencial eléctrico al aplicar los pulsos eléctricos. La formación de poros ocurre en un lapso muy corto de 10 nanosegundos aproximadamente. Sin embargo, su desventaja principal es que el alto voltaje de los pulsos eléctricos provoca alta mortalidad celular.

2.7.2 Sonoporación

La sonoporación radica en el uso de ondas de ultrasonido que en conjunto con microburbujas es capaz de provocar la permeabilización de la membrana (Newman & Bettinger 2007). Las ondas de ultrasonido se caracterizan por ser trenes de ondas armónicas (senoidales) con compresiones y rarefacciones alternadas, con una frecuencia específica (Loske, 2007). A pesar de ser un método sencillo y eficaz, como consecuencia presenta daño celular.

2.7.3 Ondas de choque

A diferencia de las ondas de ultrasonido, las ondas de choque poseen un gran espectro de frecuencias (Loske, 2017). Las ondas de choque se generan a partir de la liberación de energía, ya sea eléctrica, mecánica, química o nuclear en un espacio definido y se caracterizan por presentar un solo frente de alta presión con una duración sumamente corta, seguido de una disminución abrupta de presión (Loske, 2017). En medios líquidos, debido a los cambios de presión provocados por las ondas de choque, se genera cavitación acústica que consiste

en la compresión y expansión repentina de micro-burbujas, que culmina en un colapso que emite micro-chorros o “microjets” de alta velocidad (Fig. 12) (Ohl e Ikink, 2003). Como consecuencia de la presión positiva ejercida por una onda de choque, cada microburbuja se comprime, aumentando la presión en su interior. A esta compresión se le denomina colapso forzado. Después del paso de la onda de choque, la burbuja se expande y la presión dentro de ella disminuye, lo que finalmente resulta en un colapso sumamente violento, llamado colapso inercial. Debido a que la burbuja generalmente colapsa de manera asimétrica, se forma una especie de toroide que succiona fluido por un lado. Este chorro de fluido atraviesa la burbuja y choca contra la pared opuesta de la burbuja. El impacto es tan violento que genera ondas de choque secundarias. Finalmente, el microjet es expulsado de la burbuja con una velocidad que puede alcanzar los 700 m/s (Loske, 2017).

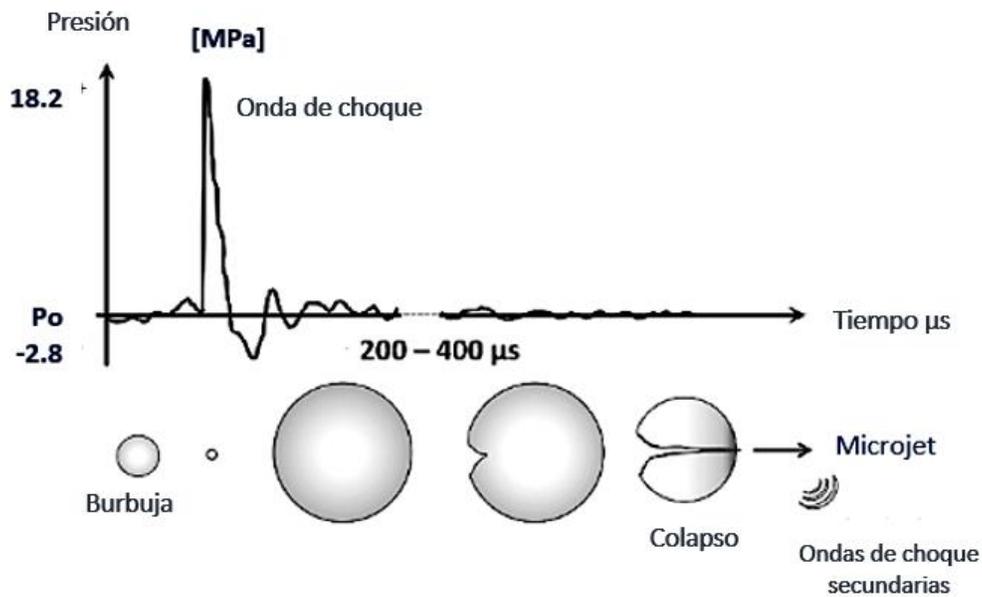


Fig.12. Mecanismo de cavitación acústica. Al paso de una onda de choque, cuyo perfil de presión se puede observar en la parte superior de la figura, una burbuja sufre una compresión repentina, seguida de una expansión, que resulta en un colapso violento debido a los cambios de presión en su exterior. En vista de que el colapso es asimétrico, se emite un microjet de fluido y ondas de choque secundarias de alta energía (Loske, 2007).

Existen varios estudios en los que se ha observado que el microchorro de alta energía inducido por el mecanismo de cavitación acústica, es capaz de provocar la ruptura de la membrana de células y formar poros en ella. A partir de este mecanismo surgieron una serie de trabajos de transfección génica con ondas de choque en diferentes tipos celulares (Bao et al., 1998; Kodama et al., 2002; Li et al. 2012; Michel et al., 2004; Millán-Chiu et al, 2014; Murata et al., 2007; Ruiz et al., 2006).

Los tres mecanismos para generar ondas de choque para aplicaciones biomédicas por excelencia son el piezoeléctrico, el electrohidráulico y el electromagnético (Loske, 2007). En los experimentos descritos en esta tesis únicamente se usó el sistema piezoeléctrico, motivo por el cual sólo se describirá este principio de generación de ondas de choque. Un generador piezoeléctrico cuenta con cientos o miles de pequeños cristales piezoeléctricos, montados sobre una superficie cóncava esférica de aluminio (Figura 13). Al ser excitados con una descarga eléctrica de 5 a 10 kV, se expanden súbitamente, produciendo ondas de compresión en un medio acuoso (Loske, 2017). La superposición de las ondas de compresión se convierte en una onda de choque en la vecindad del centro de arreglo, generalmente denominado “foco”. Debido a que la concentración de la energía no es puntual, se ha definido una “región focal”. Esta región tiene la forma de un puro (radio máximo: aproximadamente 3 mm, largo: 15 mm) y se caracteriza por ser la zona donde la presión positiva de la onda de choque tiene un valor de al menos el 50 % de la presión positiva máxima. El agua dentro del generador se fijó en 37 °C.

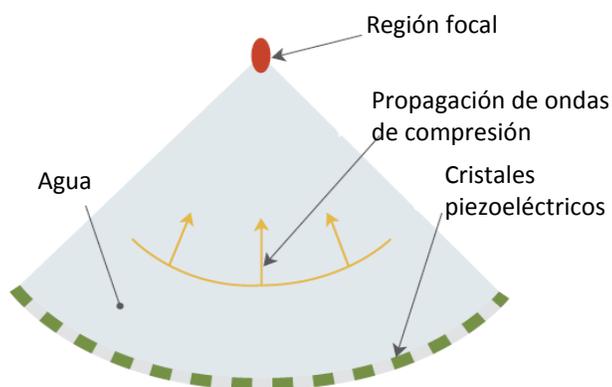


Fig. 13 Esquema de un generador piezoeléctrico de ondas de choque. Las ondas de compresión producidas por los cristales piezoeléctricos se superponen, para convertirse en una onda de choque cerca de la región focal (adaptado de Rivera et al. 2012).

2.8 Líneas celulares y cultivo primario

Los cultivos celulares son modelos de estudio de gran utilidad en la investigación científica, ya que nos permiten mantener células en condiciones *in vitro* con propiedades muy similares a las condiciones *in vivo*. El cultivo primario hace referencia a las células recién extraídas directamente de un órgano o tejido a partir de los cuales la disgregación celular se puede llevar a cabo con enzimas o mecánicamente (Fig. 14).

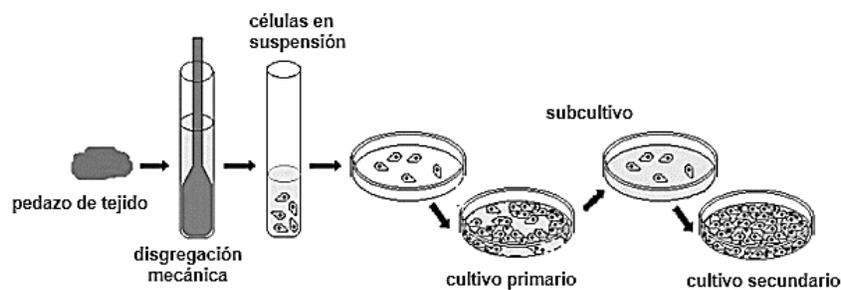


Fig. 14. Cultivo primario a partir de disgregación mecánica de tejido.

El cultivo primario pasa a ser cultivo secundario después de un subcultivo, es decir, un pase celular al alcanzar la confluencia suficiente. Las líneas celulares pueden ser finitas o continuas. Las líneas celulares finitas son células normales sujetas al proceso de senescencia que eventualmente dejarán de proliferar en algún momento. Las líneas celulares continuas se distinguen por ser “inmortalizadas”, es decir, que han perdido su regulación del ciclo celular, y por lo tanto pueden dividirse y proliferar indefinidamente.

2.8.1 Línea celular NIH-3T3

La línea inmortalizada NIH-3T3 se obtuvo de fibroblastos embrionarios de ratón albino cepa Swiss y fue establecida en 1962 por Howard Green y George Todaro. Actualmente se ha convertido en la línea celular estándar para fibroblastos (Fig. 15). Las siglas 3T3 significan 3 días de transferencia y la cantidad estable de cultivo 3×10^5 células, es decir hacen

referencia al protocolo de cultivo. Son células adherentes que crecen en monocapa y con habilidad de crecer a mayor velocidad con menor densidad celular. Es una línea celular con sensibilidad a la formación y propagación de virus como el virus del sarcoma y el virus de leucemia, aparte de servir como modelo de transfección celular (Copeland et al., 1979).

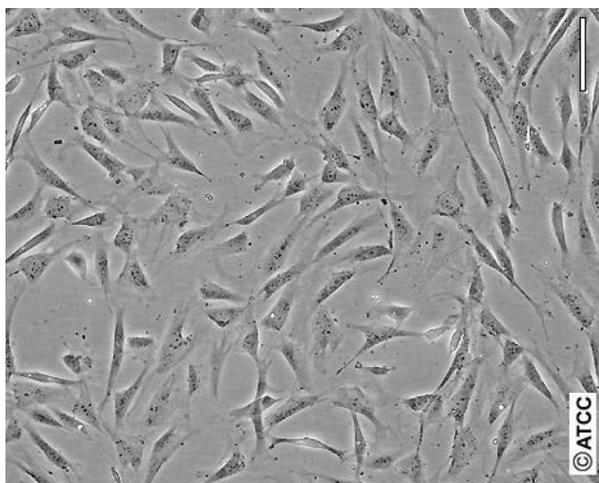


Fig. 15. Morfología de fibroblastos NIH-3T3 (ATCC® CRL-1658™).

2.9 Producción y purificación de un plásmido

Un plásmido se define como un elemento de DNA extracromosómico de origen bacteriano con forma circular. Se distingue por tener replicación autónoma, característica necesaria debido a que se encuentra físicamente separado del cromosoma (Clowes, 1972). Principalmente los plásmidos son de origen bacteriano, aunque pueden provenir también de arqueas, levaduras y plantas. El tamaño de un plásmido puede variar por miles de pares de bases y existen excepciones con DNA lineal en lugar de circular.

La estructura más básica de un plásmido consiste en un origen de replicación (ORI) y un gen relacionado a una condición de presión selectiva como la resistencia a un antibiótico, virulencia o degradación. En contraste, un plásmido utilizado como herramienta en Ingeniería Genética es utilizado como vector y cuenta con un gen de interés, una zona de

clonación múltiple, un marcador seleccionable y un sitio de clonación. El esquema general de un plásmido recombinante se puede observar en la figura 16. Los plásmidos son vectores de gran utilidad para estudios de manipulación genética. La construcción del plásmido recombinante se puede hacer mediante diversos métodos de clonación, sin embargo, el más común es a partir del uso de enzimas de restricción.

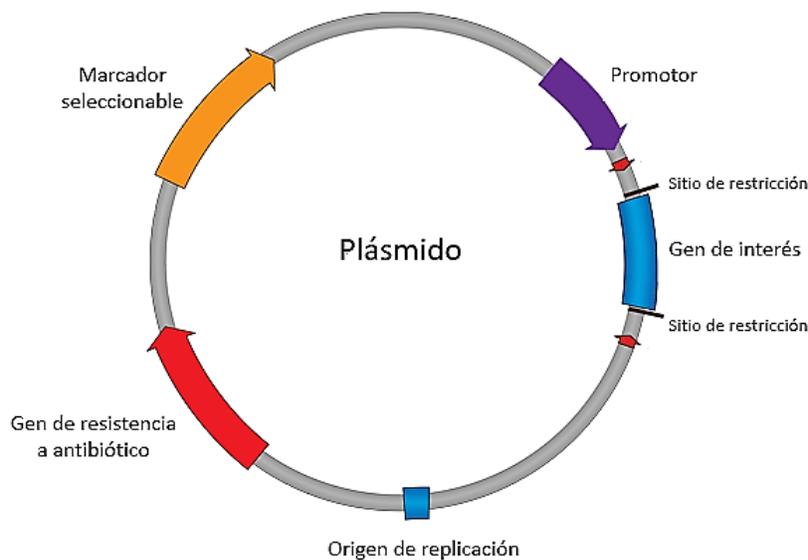


Fig. 16. Estructura general de un plásmido.

La transformación genética es un proceso en el cual se inserta DNA foráneo en una bacteria huésped para introducirlo directamente en sus cromosomas o de forma extracromosomal (Stewart y Carlson, 1986). La célula bacteriana a la que llaman célula competente, al reproducirse clona enormes cantidades de plásmido. El estado de competencia de una bacteria se logra cuando se consiguen las condiciones fisiológicas necesarias para permeabilizar su membrana y lograr incorporar el DNA recombinante. Existen múltiples tratamientos para inducir la transformación de bacterias que no son competentes de manera natural como *Escherichia coli*, tanto métodos químicos, como choque térmico o la electroporación. De forma general cualquier proceso de transformación se puede resumir en

tres pasos: la inducción de células competentes, la entrada e inserción del material genético exógeno y finalmente la expresión del genotipo resultante.

Para la técnica de choque térmico las bacterias se exponen a un tratamiento previo con iones de calcio que ayuda a la adsorción del DNA y las convierte temporalmente en células competentes. Enseguida las células competentes se someten a un cambio brusco de temperatura a 42 °C en una suspensión de DNA plasmídico, de forma que el choque térmico provoque la permeabilidad membranal e inserción del mismo. Una vez transformadas las bacterias, se siembran en un agar con un antibiótico específico para que únicamente formen colonias las bacterias con el plásmido exógeno que contiene el gen de resistencia a dicho antibiótico (Fig. 17). La incubación del cultivo bacteriano a 37 °C se deja reposando aproximadamente 24 hrs y posteriormente a partir de una sola colonia bacteriana transformada se deja crecer en medio selectivo para la obtención de un gran lote de DNA plasmídico.

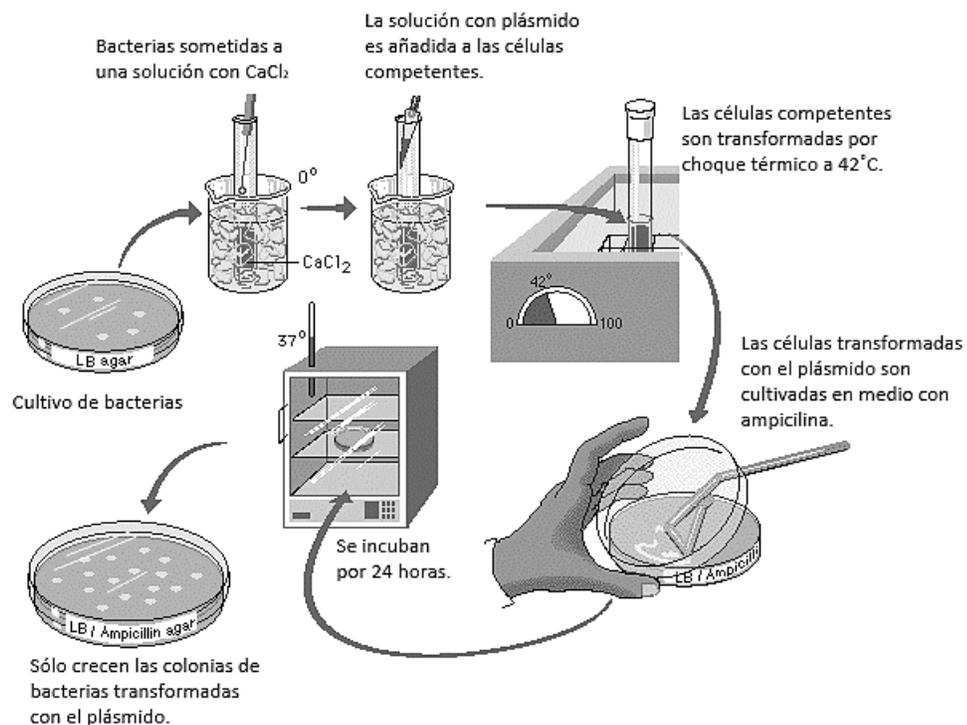


Fig. 17. Transformación de bacterias competentes.

Existen métodos tradicionales y kits comerciales para lograr la extracción y purificación de DNA plasmídico. La combinación de los protocolos es común y puede llegar a mejorar la eficiencia y pureza del DNA final. El primer paso es el lisado de la pared y membrana celular que se logra mediante un detergente como el dodecilsulfato sódico (SDS) en un medio salino (NaOH) para que se desnaturalice el DNA cromosomal y afecte en menor proporción al plásmido debido a su tamaño y estructura superenrollada. Esta técnica se basa en las diferentes resistencias al pH que tienen el DNA genómico y el del plásmido. Es conocida como lisis alcalina y fue propuesta por Birboim y Doly en 1979. Para conservar el DNA plasmídico se neutraliza el medio con una solución amortiguadora, por ejemplo, con acetato potásico que lo mantiene soluble a diferencia del DNA genómico, que se precipita junto con las proteínas para ser fácilmente centrifugado o filtrado. El uso de RNAsas evita la contaminación con RNA y en algunos casos también se utilizan proteasas para deshacerse de las proteínas. Una vez extraído el DNA de interés, la purificación de este se puede hacer por diferentes métodos como ultrafiltración, por columna de intercambio iónico o columna de adsorción. La cromatografía de intercambio iónico logra la separación del DNA debido a la interacción de carga positiva (+) de la resina con la negativa (-) del plásmido y se divide en dos fases: estacionaria y móvil. En la fase estacionaria es donde las moléculas cargadas se unen a los intercambiadores iónicos para separarlas de cualquier otra molécula presente mediante uno o varios lavados y la fase móvil es en la cual se separa de la resina a través de una solución aniónica eluyente. La precipitación del DNA de origen plasmídico se hace en conjunto de isopropanol y etanol al 70 % con sus respectivas centrifugaciones.

Por último, es importante analizar cuantitativa y cualitativamente la integridad del plásmido purificado. El rendimiento se verifica por espectrofotometría a razón de la ley de Beer-Lambert, la cual consiste en que a determinada longitud de onda una molécula o sustancia absorbe cierta cantidad de luz y se relaciona directamente con la concentración de la misma. El DNA absorbe la luz ultravioleta a 260 nm a diferencia de las proteínas que lo hacen a 280 nm. Por lo tanto, un análisis de absorción UV del DNA sirve para estimar su concentración sólo si se encuentra con un alto grado de pureza que se puede determinar a razón de 260 nm/280 nm (DNA/proteínas) con un valor mayor o igual a 1.8 (Schmid, 2001).

La electroforesis de DNA plasmídico se hace comúnmente en geles de poliacrilamida o agarosa. A consecuencia de la aplicación de un campo eléctrico en el gel, las moléculas de DNA que tienen carga negativa debido a su grupo fosfato, migran dirección al ánodo (+) dependiendo su tamaño y es posible distinguir sus bandas colocándoles algún colorante (Rapley, 1998). Para teñir normalmente se utiliza un agente intercalador de DNA, tal como el bromuro de etidio o el Sybr Safe®. El tamaño de la molécula, la estructura o conformación del DNA, ya sea super-enrollado, circular o lineal, la concentración de agarosa, la composición del buffer y el voltaje aplicado son los principales parámetros que influyen en la velocidad de migración (Rapley, 1998).

2.10 Marcaje con anticuerpos

La técnica bioquímica de inmunofluorescencia se fundamenta en la detección de proteínas endógenas y exógenas a partir de la fluorescencia emitida gracias a un fluoróforo conjugado a un anticuerpo que es el que interacciona directa o indirectamente con el antígeno de interés (Giepmans et al. 2006). Un antígeno se puede definir como cualquier molécula, regularmente proteínas o polisacáridos, capaz de generar una respuesta inmune. Por su parte, un anticuerpo es una proteína que pertenece a la familia de las inmunoglobulinas (Ig), y que es producida únicamente por los linfocitos B en respuesta a un agente externo, o antígeno (Elgert, 2009).

La estructura característica de un anticuerpo es en forma de Y con dos regiones de unión a antígeno, la región bisagra y 2 cadenas ligeras de 23 kD y 2 cadenas pesadas de 50kD (Fig. 18). La región variable de las cadenas ligeras se llama VL y la parte constante CL y se dividen en kappa (κ) o lambda (λ), a diferencia de las cadenas pesadas que se agrupan en alpha (α), gamma (γ), mu (μ), delta (δ) y epsilon (ϵ). La zona variable llamada Fab (del inglés *fraction antigen binding*), incluso cuenta con secciones hipervariables llamadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que son las que llevan a cabo las interacciones con el antígeno. Dependiendo de su estructura y tipo de cadenas pesadas, existen 5 clases de anticuerpos: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Los anticuerpos también contienen carbohidratos ubicados en distintos sitios según la clase.

El marcaje con anticuerpos puede ser de manera directa, es decir, que se utiliza un anticuerpo primario que reconoce al antígeno de interés y que ya presenta un fluoróforo unido covalentemente, o puede hacerse de forma indirecta, con el fluoróforo unido a un anticuerpo secundario que reconoce al anticuerpo primario, el que a su vez ya está interactuando con el antígeno específico.

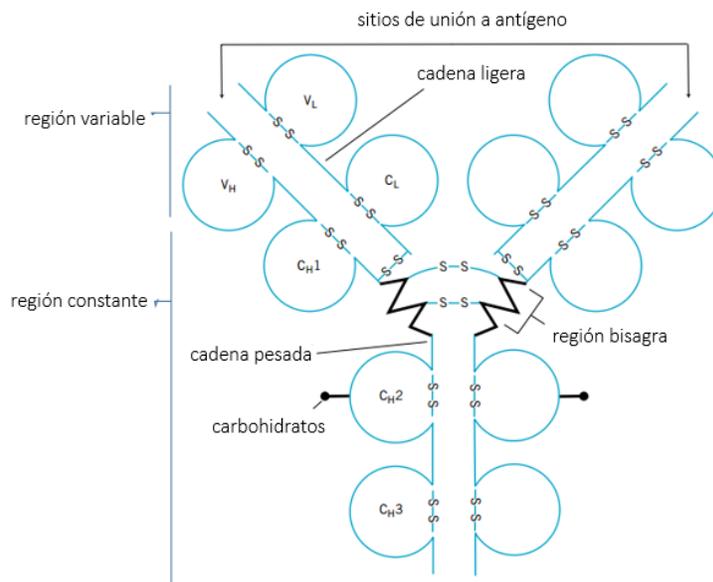


Fig. 18. Esquema general de un anticuerpo (IgG). Las regiones de la cadena pesada son VH, CH1, CH2 y CH3. Las regiones de la cadena ligera son VL y CL (modificado de Elgert, 2009).

En este estudio se utilizó un anticuerpo primario isotipo convencional IgG conjugado con ficoeritrina como fluorocromo para marcar linfocitos T y VE provenientes de linfocitos T. El receptor de linfocitos T (TCR) tiene una estructura similar a la región Fab de un anticuerpo, una zona constante y un complejo de proteínas llamado CD3 que comprende tres dímeros de cuya presencia depende su función (Fig. 19). Los 2 heterodímeros se designan como $\gamma\epsilon$ (gamma épsilon) y $\delta\epsilon$ (delta épsilon) y un homodímero $\zeta\zeta$ (zeta), que tiene una variante $\zeta\eta$ (zeta,eta) (Owen, et al. 2013). Todos los dímeros en sus colas citoplasmáticas contienen secuencias llamadas ITAM (del inglés *Immunoreceptor tyrosine activation motif*),

que se fosforilan para unir proteínas adaptadoras. El anticuerpo anti-CD3 se une directamente a la cadena épsilon (ϵ) de 25 kD del complejo CD3 que funge como transductor de señal. El mecanismo de marcaje es muy simple: cuando el anticuerpo se une correctamente al antígeno se incrementa la emisión de luz, como respuesta a la excitación por luz de cierta longitud de onda, y se traduce a una señal. Cuando el anticuerpo primario no se une, por ausencia del antígeno, no se produce fluorescencia y por ende ninguna señal.

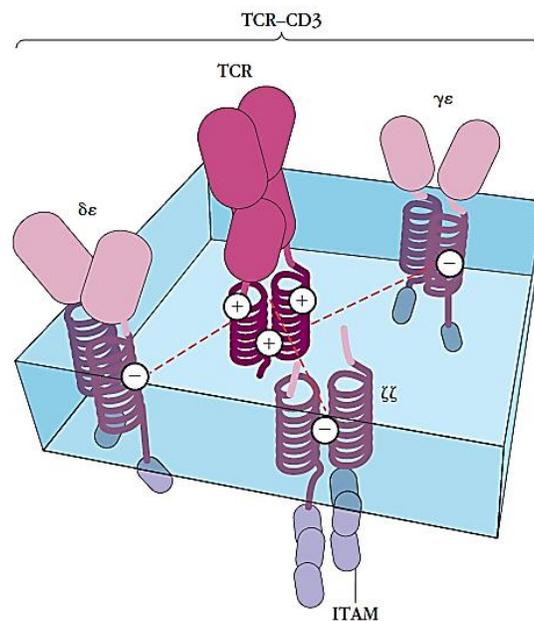


Fig. 19. Complejo TCR-CD3. El receptor transmembranal TCR de carga positiva con sus 3 dímeros ($\gamma\epsilon$, $\delta\epsilon$ y $\zeta\zeta$) de carga negativa. Y las secuencias ITAM ancladas a sus colas citoplasmáticas (Owen, et al. 2013).

3. HIPÓTESIS

Las ondas de choque rompen la membrana plasmática en células eucariontes y producen vesículas extracelulares con biomoléculas que mantienen su estructura funcional.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Producir vesículas extracelulares con biomoléculas funcionales a partir de linfocitos murinos mediante tratamiento con ondas de choque.

4.2 Objetivos particulares

- Montar métodos de producción de VE por tratamiento con ondas de choque.
- Caracterizar las VE obtenidas con base en sus características morfológicas y de tamaño.
- Analizar la capacidad de las VE de mantener funcionales sus receptores de membrana para estimar su potencial terapéutico.
- Analizar la capacidad de las VE para encapsular plásmido mediante ondas de choque para estimar su potencial terapéutico.

5. METODOLOGÍA

5.1 Diseño experimental

El protocolo para la generación de vesículas extracelulares por ondas de choque se sondeó utilizando diversos parámetros físicos de energía y números de ondas de choque con la línea NIH-3T3, como estudio exploratorio. A partir de los resultados obtenidos de mortalidad celular, y de formación de protrusiones celulares, se eligieron los tratamientos de ondas de choque adecuados para linfocitos T murinos obtenidos por cultivo primario. Se utilizó un generador de ondas de choque piezoeléctrico comercialmente disponible (Piezoson 100 Plus), el cual ha sido adaptado para el enfoque de las ondas acústicas en viales celulares de experimentación. Las poblaciones celulares totales extraídas del bazo y las poblaciones de linfocitos T activados con un mitógeno por tres días se caracterizaron por citometría de flujo. La purificación de VE se llevó a cabo por ultracentrifugación.

La caracterización morfológica y de talla de las VE se llevó a cabo por análisis de Dispersión Dinámica de Luz, Microscopia Electrónica de Barrido y Microscopia Electrónica de Transmisión.

Su bioactividad, es decir la capacidad de las VE producidas por ondas de choque de mantener biomoléculas activas, se analizó mediante microscopia confocal, a través de un marcaje de receptores de superficie de las VE purificadas con anticuerpos anti-CD3, para verificar la funcionalidad de receptores membranales expuestos en las VE formadas. Finalmente, se realizaron estudios preliminares para explorar el posible encapsulamiento de un plásmido en VE formadas por ondas de choque. El diseño experimental se esquematiza en la figura 20.

5.2 Esquema experimental

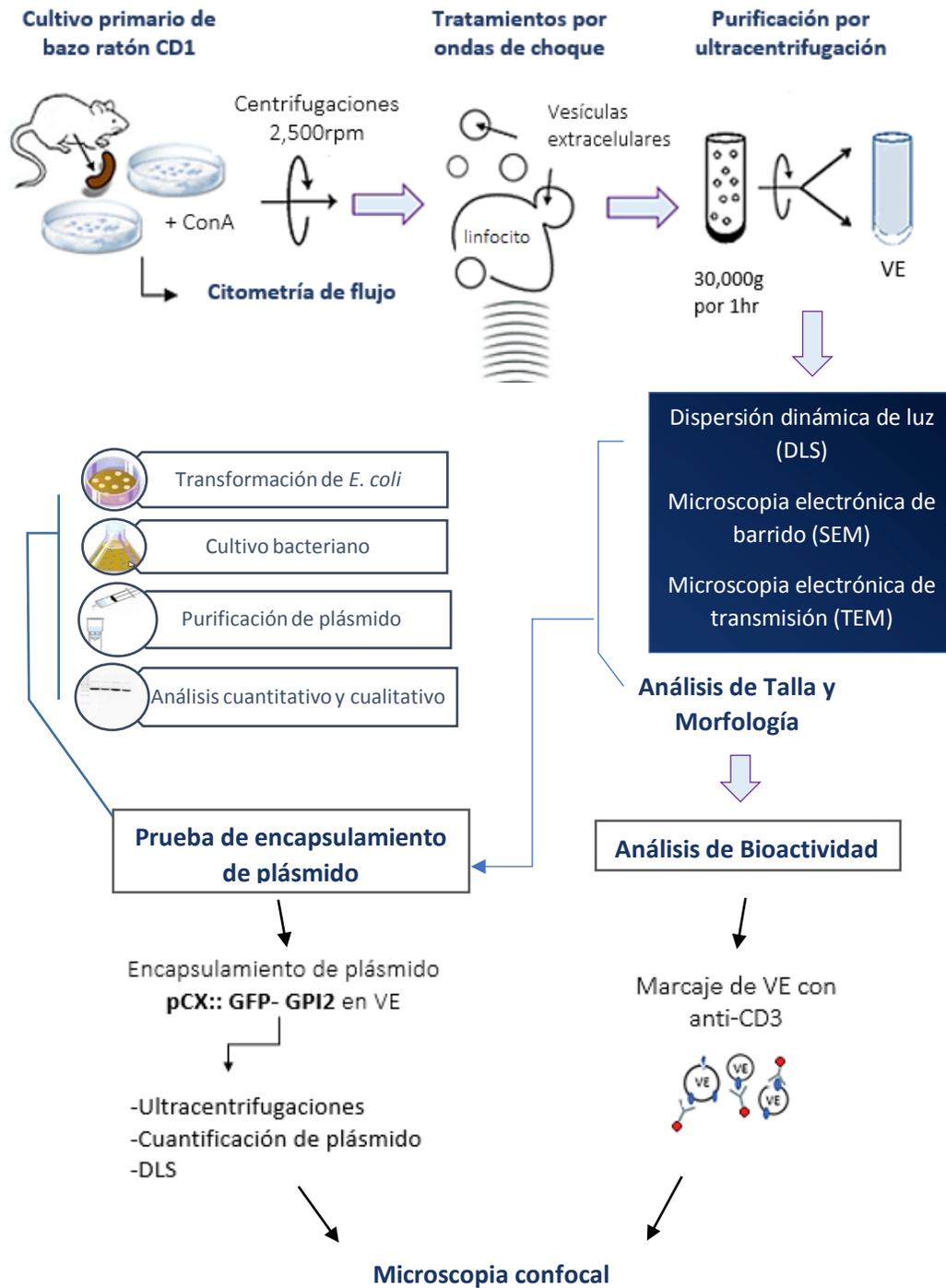


Fig. 20. Esquema experimental. Las células NIH-3T3 se utilizaron en un estudio preliminar. Los linfocitos T murinos se utilizaron como modelo para la caracterización, análisis de bioactividad y prueba de encapsulamiento de plásmido.

5.3 Materiales y Métodos

5.3.1 Obtención de VE por tratamientos de ondas de choque

5.3.1.1 Cultivo celular y mantenimiento

Para los primeros experimentos se utilizó la línea celular estándar de fibroblastos NIH-3T3. Para mantener las condiciones de esterilidad se trabajó en una campana de bioseguridad clase II y se utilizaron cajas Petri estériles especiales para cultivo celular de 10 cm de diámetro (Nunclon™Δ Delta Surface). Los cultivos se mantuvieron a 37 °C con 5 % de CO₂ en una incubadora Thermo Forma y para su revisión constante se utilizó un microscopio óptico invertido Olympus CKX41. El material, incluyendo los frascos, puntas y buffer fosfato salino (PBS) se esterilizó por autoclave durante 25 min a 121 °C y 121 psi.

Los pases celulares se llevaron a cabo para mantener y expandir las células 2 o 3 veces por semana, al presentar cada cultivo una confluencia del 80 %. El medio de cultivo se aspiró con pipeta Pasteur conectada a una línea de vacío, se lavó con PBS 1×, se agregaron 2 ml de TrypLE® (Gibco) por caja e incubaron a 37 °C por 5 min. Una vez despegadas las células se les añadieron 8 ml de medio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) con 10 % de suero fetal bovino (SFB), a fin de inhibir el efecto proteolítico de la tripsina, y se transfirió la mezcla a un tubo Falcon de 50 ml. Las células se centrifugaron a 2,500 rpm durante 5 min y el precipitado se resuspendió en medio completo.

El conteo celular se efectuó con 10 μl de suspensión celular en una cámara de Neubauer (Hausser Scientific, USA) con la siguiente fórmula: # células/ml = (promedio del conteo de células / cuadrante) × (cuadrante / 0.1 μl) × (10³ μl/ml) × (el factor de dilución de la suspensión). Según el experimento en curso, se ajustó la cantidad necesaria de células en un volumen determinado.

5.3.1.2 Preparación de medio DMEM

La línea celular NIH-3T3 se cultivó en medio DMEM suplementado con SFB al 10 %, 100 U/ ml de penicilina y 100 μg/ml de estreptomicina. Para preparar 100 ml de medio completo se utilizaron 89 ml de medio DMEM, 10 ml de SFB y 1 ml de estreptomicina. Todos los reactivos se medían a la misma temperatura.

5.3.1.3 Preparación de medio RPMI

Para 1 litro de medio RPMI 1640 Gibco liofilizado con L-glutamina, 25mM de buffer de HEPES (Núm. Cat. 23400-013, Gibco, lugar, país), se disuelven 2 g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) y un sobre del medio en 950 ml de agua MilliQ, con ayuda de un agitador magnético. El medio completo se aforó a 1 litro, ajustando previamente el pH a 0.2 - 0.3 unidades por abajo del valor deseado (7.4) con gotas de NaOH 1 M. La solución resultante se esterilizó por filtración a través de una membrana. La prueba de esterilidad se llevó a cabo incubando 3 ml de medio en tubo Falcon de 15 ml a 37 °C durante tres días consecutivos. Para suplementar 500 ml de medio RPMI se utilizaron las soluciones estériles indicadas en la tabla 4:

Solución	Cantidad
Piruvato de sodio 100 mM (Gibco)	5 ml
Aminoácidos no esenciales 100X (Gibco 1140-650)	5 ml
β -mercaptoetanol 1000X (Gibco 21985)	500 μ l
Penicilina/estreptomicina 100X	5 ml
50 ml de suero fetal bovino (FBS Gibco)	50 ml
Medio RPMI 1640	434.5 ml

5.3.1.4 Congelación y almacenamiento de células

La línea NIH-3T3 se conservó congelada en un medio crioprotector, compuesto de DMEM con 20% de dimetilsulfóxido (DMSO) y 20% de SFB, en nitrógeno líquido o a -70 °C. Para ello, se preparó medio de congelación 2X, mezclando 8ml de DMEM completo, 5.3 ml de SFB y 3.3 ml de DMSO previamente esterilizado por filtración. Las células fueron despegadas de la superficie de cultivo mediante tripsinización con 2 ml de TrypLE®, y la proteólisis fue bloqueada con 2 volúmenes de DMEM completo. Después de centrifugar a 2,500 rpm por 5 min, la suspensión fue ajustada a una densidad de 2×10^6 células/ml, se agregó un volumen del medio de congelación 2X, agitando suavemente, y se congeló de inmediato a -80 °C en viales de congelación estériles.

5.3.1.5 Descongelación de células

El proceso de descongelación de células a partir de un vial se realizó diluyendo la suspensión celular del vial (1 ml) en 9 ml de DMEM suplementado, previamente calentado a 37 °C. El medio de congelación con DMSO (el cual es sumamente tóxico) se eliminó ya sea por aspiración, una vez que las células se hubieron adherido a la superficie de cultivo, o por centrifugación, resuspendiendo en DMEM suplementado antes de su siembra en cajas de cultivo.

5.3.1.6 Material biológico y cultivo primario

Para el cultivo primario de linfocitos T se utilizaron ratones machos de la cepa CD1, de 6 semanas de edad, proporcionados por el bioterio del Instituto de Neurobiología, UNAM. En cada experimento se sacrificó un espécimen en una cámara de dióxido de carbono, siguiendo los procedimientos de ética para el manejo de animales del propio bioterio, de la norma oficial (NOM-062-ZOO-1999). Posteriormente el espécimen se colocó en un vaso de precipitado con etanol al 70 %, para esterilizarlo antes de introducirlo en el cuarto de cultivo celular. Los pasos del procedimiento de cultivo primario se esquematizan en la tabla 5. De manera previa al experimento, el material necesario se esterilizó en autoclave o se horneó por 3 hrs a 180 °C.

El procedimiento de extracción de bazo de cada ejemplar se realizó en condiciones de esterilidad, usando cubrebocas y guantes. Antes de comenzar se colocaron 10 ml de medio RPMI sin suplementar a 37 °C en una caja Petri y de ellos se tomaron 5 ml con una jeringa con aguja calibre 21. Con el uso de pinzas y tijeras de disección estériles, se realizaron cortes circulares de la piel y del recubrimiento de los órganos de un tamaño ligeramente mayor al bazo, cuidando de no dejar rastro de pelo, y se extrajo el bazo, tomándolo con pinzas y cortando con tijeras en cada extremo. Posteriormente, en cada extremo del bazo se le inyectó 1ml de medio RPMI sin suplementar, para llevar a cabo el proceso de perfusión. Inmediatamente, se machacó el bazo en una malla de extrusión de tejidos (Tissue Grinder, Sigma-Aldrich, Inc.), usando un pistilo de vidrio, y depositando el producto sobre una caja de Petri con 5 ml de medio RPMI sin suplementar (Fig. 21). Con 2 ml de medio se enjuagó el dispositivo, utilizando una jeringa y el homogenado se reservó en la caja de Petri. Los desechos biológicos se etiquetaron correctamente y fueron dispuestos de acuerdo con los protocolos institucionales.

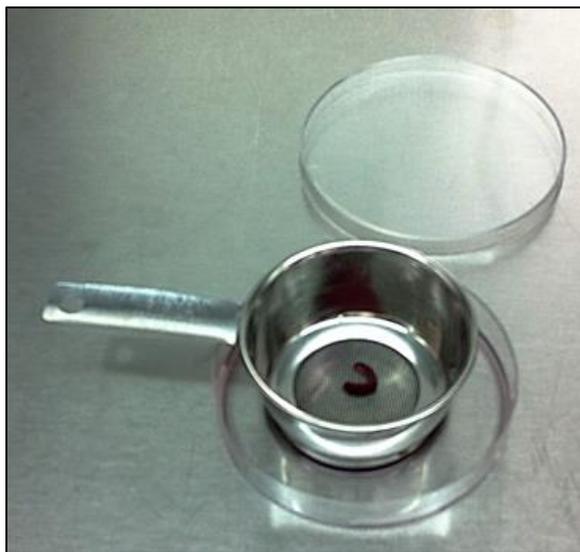


Fig. 21. Bazo de ratón sobre la malla de extrusión de tejidos.

En la campana de cultivo celular se extrajo el medio junto con el machacado de la caja de Petri y se situó en un tubo Falcon por 5 minutos. Los pedazos de mayor tamaño se sedimentaron y el sobrenadante se pasó a un tubo Falcon estéril, se centrifugó a 2,500 rpm durante 6 minutos y al sedimento se le agregaron 2 ml de buffer de lisis al 1× por 5 min. En el caso de que el pellet luciera aún con coloración rojiza, se añadieron 2 ml más de buffer de lisis 1× por otros 5 min. Se efectuaron 2 lavados con 10 ml de PBS 1× y se centrifugó bajo las mismas condiciones. Al sedimento final se le añadieron 10 ml de RPMI suplementado y se hizo un conteo celular en la cámara de Neubauer, utilizando azul de tripano para estimar la viabilidad. Dependiendo del experimento en curso se cultivaron las cajas necesarias con una densidad aproximada de $6 \text{ a } 7 \times 10^6$ células/ml, en un volumen de 10 ml. A las dos horas de incubación, se agregó 30 μl de concavalina A (ConA) por caja (concentración final de 3 $\mu\text{g/ml}$) para inducir la activación y proliferación policlonal de linfocitos T. Los cultivos se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5 % de CO₂ por tres días.

Tabla 5. Proceso de cultivo primario de bazo de ratón		
Pasos	Descripción	Lugar
Esterilización de espécimen	En etanol al 70 % por unos minutos.	Mesa de laboratorio
Extracción de bazo	Cortes circulares de la piel y cubierta de órganos con tijeras y pinzas estériles.	Campana de flujo laminar
Perfusión del órgano	En cada extremo del bazo inyectar 1ml de RPMI sin suplementar.	Campana de flujo laminar
Machacado	En la malla de extrusión de tejidos con un pistilo estéril.	Campana de flujo laminar
Sedimentación	Esperar 5 minutos a que los pedazos machacados grandes se precipiten.	Campana de flujo laminar
Centrifugación 2,500 rpm por 5 min		
Lisis	Se añaden 2 ml de Buffer de lisis 1X por 5 min.	Campana de flujo laminar
2 centrifugaciones 2,500 rpm por 5 min + PBS 1X		
Cultivo	Resuspender en RPMI completo, conteo celular y sembrar.	Campana de flujo laminar

5.3.1.7 Caracterización celular por citometría de flujo

Las poblaciones de esplenocitos inmediatamente extraídos del bazo de ratón y las poblaciones enriquecidas en linfocitos T mediante estimulación con el mitógeno ConA se caracterizaron por citometría de flujo en un equipo Accuri C6 Plus (Becton Dickinson, USA). Para ello, las células fueron resuspendidas a una densidad celular de 2,500 000 por ml y marcadas con los anticuerpos acoplados a fluorocromos enlistados en la tabla 6. Las muestras fueron centrifugadas a 2,500 rpm durante 6 min y a cada una se le agregaron 200 μ l de tampón

de tinción PBS 1X +BSA 0.5 %. El proceso de marcaje con anticuerpos consistió en agregar 1 µl de anticuerpo a cada muestra a temperatura ambiente, e incubar protegidos de la luz durante 30 min (el anticuerpo queda a una concentración final de 1 µg/ml). Se realizaron dos lavados con el tampón de tinción PBS 1X +BSA 0.5 %, eliminando cada vez la solución de lavado, previamente separada por centrifugación a 2,500 rpm durante 5 min. Una vez marcada, cada muestra se fijó con un volumen de solución de PFA al 4 % por 15 min, y se realizaron tres lavados con PBS 1X, centrifugando a 8500 rpm por 6 min para eliminar los lavados. El volumen final fue ajustado a 200 µl con PBS 1X. Las muestras fueron almacenadas al abrigo de la luz a 4 °C hasta su análisis.

Tabla 6. Anticuerpos para antígenos de superficie

Anticuerpo	Antígeno	Tipo celular	Fluorocromo	Canal de fluorescencia
Anticuerpo anti- CD19 murino fabricado en rata clona ID3	CD19	Linfocitos B	APC	FL4
Anticuerpo anti- CD3e murino	CD3	Linfocitos T	PE	FL2
Anticuerpo anti-Ly-6G murino	Ly-6G	Granulocitos	PerCP-Cy5.5	FL3

5.3.1.8 Aplicación de ondas de choque a cultivo enriquecido con linfocitos

Antes del tratamiento, los linfocitos fueron depletados de VE presentes en el SFB mediante 2 lavados con RPMI sin suplementar, eliminando cada vez el lavado por centrifugación a 2500 rpm por 6 min. La suspensión se ajustó a una densidad de 2, 000,000 de células/ml, y se colocaron muestras de 1 ml en pipetas de transferencia de plástico (Sedi-PET TM Sterile), sellándolas con ayuda de un encendedor y pinzas estériles antes del tratamiento. Se utilizó un generador de ondas de choque piezoeléctrico Piezason 100 Plus (Richard Wolf GmbH)

(Fig. 22). Cada experimento se aplicó por duplicado a intensidad 20 equivalente a una presión de 18.1 MPa. Se hicieron con 0, 60, 120, 250, 500 y 1000 ondas de choque.

La supervivencia celular se determinó mediante conteos celulares de cada muestra por el método de tinción por exclusión con azul de tripano al 0.08 %, el cual únicamente se incorpora en células con ruptura o daño en la membrana. Finalmente, las células se centrifugaron a 4,500 rpm durante 5 min y se almacenaron a 4 °C.

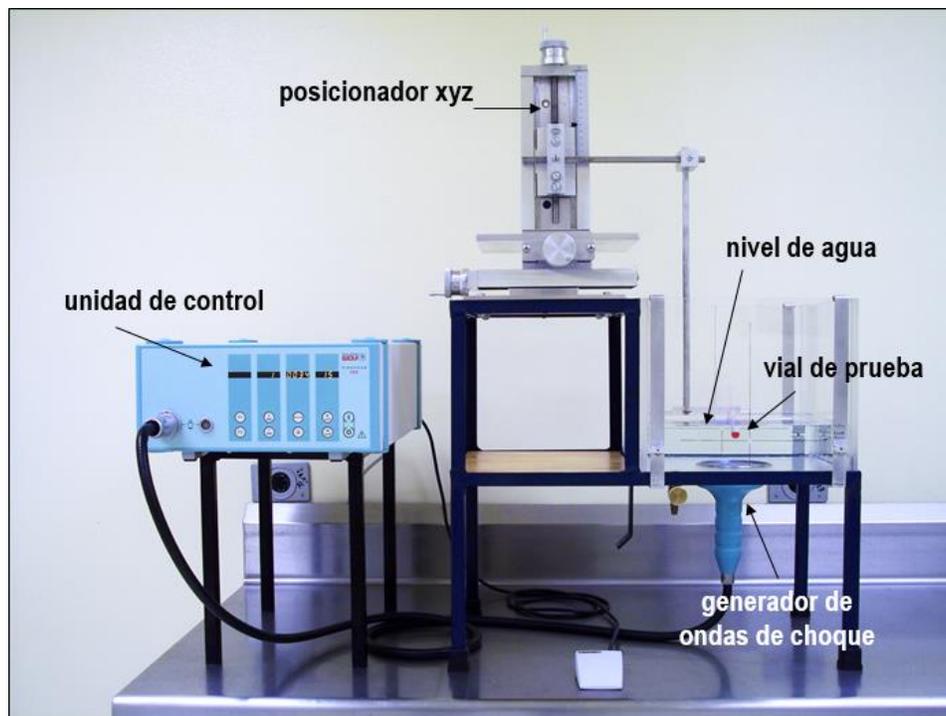


Fig. 22. Generador de ondas de choque Piezason 100 Plus

5.3.1.9 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Como parte de la caracterización y con el fin de visualizar la formación de vesículas o protuberancias en los linfocitos tratados con ondas de choque se llevó a cabo un análisis de SEM. Se prepararon muestras de las suspensiones de linfocitos sometidas a 0, 250 y 500

ondas de choque y se visualizaron en el equipo JSM-60-60LV (JEOL). La preparación de las 4 muestras, se llevó a cabo en 6 pasos: fijación primaria, fijación secundaria, deshidratación, secado de punto crítico y recubrimiento conductor. Todas las centrifugaciones se hicieron en el equipo SORVALL ST8 Thermo Scientific.

La fijación primaria consistió en añadir 1 ml de glutaraldehído al 3 % a cada vial celular, inmediatamente (15 segundos) después de aplicar ondas de choque. A las 2 hrs, las muestras se centrifugaron a 8,000 rpm por 6 min seguido de un lavado de 24 hrs con 1 ml de buffer de cacodilatos al 0.2 M a 4 °C.

Consecutivamente para la fijación secundaria se centrifugó a 8,000 rpm durante 6 min y se agregó al sedimento 1 ml de tetraóxido de osmio al 2% por 2 hrs. El tetraóxido de osmio sirve como fijador de lípidos, requiere extremo cuidado, uso de guantes y de campana por su alta toxicidad. En seguida se hicieron 3 lavados de 1 ml de buffer de cacodilatos a 8000 rpm por 6 min y se almacenaron a 4 °C. Con ayuda de un cautín y pinzas se sellaron bolsas pequeñas de listón de organza por muestra y también se doblaron los filtros de microscopia de 0.22 μm , 47 mm de diámetro (Thermo SCIENTIFIC) en forma de pequeños sobres humedeciéndolos con agua filtrada. Los sobres de filtro y bolsas de listón se pueden observar en la figura 23.

El proceso de deshidratación consistió en un tren de diluciones crecientes de etanol al 10%, 30%, 50%, 70%, 96% y etanol absoluto de 15 min cada uno, por duplicado. Entre cada dilución se centrifugó a 8,000 rpm por 6 min, excepto en las centrifugaciones del 96% y absoluto que fueron a 8,5000 rpm cada una. Cada muestra se colocó en los sobres de los filtros de 0.22 μm , cuidando mantenerlas húmedas con etanol y se colocaron y marcaron con lápiz en la bolsa de organza para llevar a cabo el tratamiento de desecación total en un equipo secador de punto crítico (CPD2, Pelco International Redding). El equipo se revisó antes de utilizar, tanto las válvulas de ventilación, drenado y llenado, así como la manguera de drenaje y el tanque de CO₂. Una vez iniciado el equipo, se calentaron las válvulas de 10 a 15 min. Se abrió la válvula del CO₂ y se llenó la cámara con el tubo conector y a su vez se revisó que la presión llegará a 600 psi. El procedimiento residió en realizar un reemplazo del etanol presente en las muestras de VE a CO₂ líquido en varios ciclos de llenado y drenado hasta que el solvente de deshidratación inicial fuera eliminado por completo. Entonces se procedió a

calentar la cámara con el CO₂ líquido para su evaporación total a temperatura de 42 °C y presión de 1300 psi. Una vez alcanzadas dichas condiciones de punto crítico, el CO₂ gaseoso es liberado lentamente teniendo la precaución de que la presión no baje a más de 100 psi por min, hasta llegar a cero y que la temperatura se mantenga arriba de 32 °C.

Inmediatamente después del secado por punto crítico se les aplicó un recubrimiento de oro a todas las muestras con un recubridor por pulverización catódica (EMS 550 Electron Microscopy Sciences). La capa de oro es de las más utilizadas debido a su alto potencial como emisor de electrones secundarios. Las muestras quedaron listas y fueron conservadas a temperatura ambiente hasta su observación.



Fig. 23. Bolsas de listón organza y sobres de papel filtro.

5.3.1.10 Purificación por ultracentrifugación

Las suspensiones de VE obtenidas por ondas de choque se ultracentrifugaron en un rango de 25,000 g a 42,100 g por 60 min a 4 °C, (Rotor JA18.1 Beckman Coulter™ Avanti R J-30T).

5.3.2 Caracterización de morfología y talla de VE

5.3.2.1 Análisis de dispersión dinámica de luz (DLS)

El tamaño nanométrico de las VE se determinó mediante la técnica DLS del *inglés Dynamic Light Scattering*, utilizando el instrumento B1200SM (Brookhaven instrumentos Co).

Holtsville, NY). Las mediciones de cada muestra se obtienen a partir de las variaciones de la intensidad de dispersión generadas por las vesículas en función del tiempo de su movimiento Browniano. De las muestras de VE ultracentrifigadas se tomaron 400 μ l y se colocaron junto con 2 ml de agua filtrada en tubos de vidrio previamente lavados con agua destilada e isopropanol. Primero se verificó con agua filtrada la función de correlación para indicar la ausencia de partículas extrañas. El análisis se efectuó por triplicado de cada muestra y se tomaron en cuenta los datos de kcps (kilo cuentas por minuto) para correlacionar con los promedios de diámetro hidrodinámico obtenidos.

5.3.2.2 Microscopia electrónica de transmisión (TEM)

La talla y la morfología de las VE también se visualizaron en un microscopio electrónico de transmisión JEM-1010 (Jeol Co., Peabody). Para la preparación de las muestras se hicieron dos diluciones, de 1/30 y 1/300 de la solución celular con VE tratada con 250 y 500 ondas de choque. En cada rejilla de cobre de malla 200, se colocaron 6 μ l de cada muestra. Cada rejilla cuenta con un recubrimiento con Formvar/carbón (Cat. 01800-F de Ted Pella, Inc.) y se dejaron secar en un desecador al vacío.

La prueba de contraste con acetato de uranilo se llevó a cabo para cada muestra. En cada cavidad de una placa de Mazzini se añadieron de 4 a 5 gotas de acetato de uranilo al 2 %, y con ayuda de unas pinzas se colocaron las rejillas de cobre con cada muestra. Después se taparon con un cubreobjetos y dejaron reposar por 15 min en una parrilla eléctrica a 80 °C. Una vez pasado el lapso de 15 min, se dejaron enfriar unos minutos y prosiguió con 4 lavados en agua desionizada (sumergiendo las rejillas en agua dentro de vasos de precipitados por unos 30 segundos en cada vaso). Las muestras se dejaron secar antes de su observación.

5.3.3 Análisis de bioactividad de VE

5.3.3.1 Marcaje de VE con anticuerpos para antígenos de superficie celular

Una vez sometidas a 0, 250 y 500 ondas de choque, las suspensiones de VE con una densidad inicial de 2, 000,000 células por ml, se ultracentrifugaron a 30,000 g por 60 min a 4 °C. Cada sedimento se resuspendió con 200 μ l de tampón de tinción PBS1 \times con 0.5 % de BSA y se le añadió 1 μ l del anticuerpo anti-CD3e acoplado a ficoeritrina (PE). Las muestras marcadas se dejaron reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente al abrigo de la luz y se hicieron 2 lavados con 200 μ l de tampón de tinción, ultracentrifugando en las mismas condiciones.

En porta objetos perfectamente lavados con ácido acético, se colocaron 20 µl de cada muestra, se les colocaron sus cubre objetos respectivos para observar al microscopio confocal Zeiss Axiovert 200 LSM 510 Meta-Multifónico. Cada muestra se selló con barniz transparente y guardó al abrigo de la luz hasta su análisis.

5.3.4 Prueba de encapsulamiento en VE

5.3.4.1 Encapsulamiento del plásmido *pCX: GFP- GPI2*

Para la prueba de encapsulamiento de plásmido en VE mediante ondas de choque, se trabajó en condiciones de esterilidad utilizando guantes en todo el procedimiento de purificación del plásmido y de transformación de bacterias. Los pasos del procedimiento se enlistan en la tabla 7.

Tabla 7. Procedimiento para encapsulamiento de <i>pCX:GFP-GPI2</i>	
Pasos	Descripción
Transformación de bacterias	Inserción del plásmido de interés en bacterias ultra competentes
Inoculación y cultivo de bacterias	Propagación del plásmido
Purificación del plásmido	Separación del plásmido puro
Cuantificación por espectroscopia UV	Análisis de concentración y pureza del plásmido
Electroforesis de agarosa	Análisis de integridad del plásmido
Ensayos de encapsulamiento	Inserción del plásmido en las VE por ondas de choque
Ultracentrifugaciones	Purificación de las VE
Microscopia Confocal	Visualización del plásmido encapsulado

5.3.4.2 Transformación de bacterias ultra-competentes

La transformación de bacterias ultra-competentes de *Escherichia coli* XL-Blue se llevó a cabo mediante la técnica de choque térmico. Se utilizó el plásmido *pCX::GFP-GPI2* que codifica para las proteínas GFP+GPI. Las células ultra-competentes *E. coli*, el medio LB (1.0% NaCl, 1.0% bacto triptona, 0.5% extracto de levadura) y las placas de LB con ampicilina (100 mg/L) fueron proporcionadas por la Unidad de Proteogenómica del INB de la UNAM.

En un inicio se tomaron 2 viales con 200 µl de suspensión de bacterias ultra-competentes, uno para control y el otro para la transformación. Para descongelarlos se sumergieron los 2 viales en hielo durante un lapso no mayor a 20 min. En condiciones de esterilidad se le añadió al vial para transformación de 1 a 2 µl de plásmido y se dejaron ambos viales reposar por 15 min a 4 °C. Inmediatamente se sometieron a un choque térmico de 2 a 3 min máximo a 42 °C en baño maría. Los dos viales se transfirieron a un tubo Eppendorf respectivamente con 1 ml de medio LB sin antibiótico y se dejaron en agitación constante durante 30 min a 37 °C. Por último, se sembraron 50 µl de cada muestra en una caja Petri con medio LB-amp (agar). El sembrado se hizo con perlas de vidrio de dispersión estériles, con movimientos circulares de manera que abarcaran toda el área de la placa. Cada caja se selló perfectamente con Parafilm y se incubó por 12 horas a 37 °C, con la caja con el agar hacia arriba para evitar que el agua de condensación dañe las colonias de bacterias.

5.3.4.3 Inoculación y cultivo de bacterias transformadas

Las dos cajas Petri se revisaron, la caja control sin crecimiento de bacterias y la del plásmido *pCX::GFP-GPI2* con presencia de colonias bacterianas transformadas. Enseguida, se añadió ampicilina, a una concentración de 100 µg/ml en el medio de cultivo LB. En un tubo Falcon se colocaron 3 ml de medio LB con ampicilina, y se tomaron unos cuantos µl para resuspender sobre una de las colonias de bacterias transformadas de la caja Petri, y sembrar dentro del tubo Falcon. En seguida se sometieron a una incubación con agitación de 3 a 6 hrs. El resto del medio LB con ampicilina se vertió al matraz de 1 litro previamente esterilizado y se inoculó con 500 µl de medio LB con bacterias transformadas (dilución de 1:1000), y se dejaron incubando durante 12 a 16 hrs. El volumen de medio LB inoculado se transfirió a 4 frascos de plástico con 125 ml cada uno y se centrifugó a 4000 rpm durante 10

min a 4 °C (HERMLE z383k). El sobrenadante se descartó y los frascos con los pellets se almacenaron en un recipiente de plástico en el congelador a 4 °C.

5.3.4.4 Purificación del plásmido *pCX:GFP-GPI2*

La purificación del plásmido se efectuó mediante el método de columna de intercambio iónico con el kit comercial Maxi Kit de QIA-GEN® (Cat. 12263 Venlo, Holanda).

Los pellets de bacterias transformadas centrifugados previamente, se resuspendieron con 10 ml de Buffer P1 RNasa A, hasta formar una mezcla homogénea y se colocaron en un tubo Falcon. El Buffer P1 se encarga de eliminar RNAs. Para el mecanismo de lisis de la pared celular se les añadieron 10 ml de Buffer P2 Lysis buffer que contiene detergentes, por 5 min a temperatura ambiente y se mezcló por inversión del tubo hasta que se tornó de color azul. En seguida se preparó el QIAfilter Cartridge y se le colocó en la punta un Caps for QIAfilter Cartridge. Para reneutralizar el DNA plasmídico, se añadieron 10 ml del Buffer P3 y se resuspendió por inversión hasta desaparecer el color azul y se incubó durante 10 min. Inmediatamente se colocó la suspensión en el QIAFilter Cartridge y en la columna QIAGEN-tip500 se agregaron 10 ml del Buffer QBT para vaciar por gravedad. Pasados 10 min y una vez filtrado el Buffer QBT se colocó el QIAFilter Cartridge sobre la columna y se utilizó como jeringa para agregar la suspensión plasmídica. Una vez filtrado se realizaron dos lavados de 30 ml del Buffer QC.

Posteriormente, la elución del DNA se realizó con 15 ml de Buffer QF a 65 °C para despegar completamente al DNA de la columna. Por último, se añadieron 10.5 ml de isopropanol para precipitar al DNA y centrifugó a 5,000 g por 60 min a 4 °C. Al precipitado se le colocaron 5 ml de etanol al 70% y se centrifugó bajo las mismas condiciones. El pellet se dejó secar de 5 a 10 min y resuspendió en 500 µl de agua de PiSa farmacéutica.

5.3.4.5 Cuantificación del plásmido

El DNA plasmídico recién purificado se cuantificó por espectroscopía UV utilizando un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). Las muestras de plásmido se agitaron en el vortex unos segundos y se utilizaron de 1 a 2 µl de cada una para el análisis. El agua de PiSa farmacéutica sirvió como blanco y se utilizó entre cada análisis de cuantificación.

5.3.4.6 Electroforesis en gel de agarosa

Para analizar el plásmido *pCX::GFP-GPI2* de manera cualitativa y poder observar la calidad de las formas topoisoméricas del DNA, tanto superenrollado como relajado, se realizó una electroforesis en gel de agarosa. Para ello se utilizó una cámara Biorad horizontal que contiene refrigerante y previamente se envolvió en aluminio y se refrigeró por unos 20 min. En un matraz de 125 ml se preparó un gel de agarosa al 0.8% con 0.32 g de agarosa (UltraPure™ Invitrogen), a un volumen total de 40 ml de agua destilada con 800 µl de TAE 50 × (Buffer Biorad). El gel se disolvió calentándolo aproximadamente por sesiones de 30 segundos en el microondas hasta quedar totalmente transparente.

Las muestras de plásmido se prepararon a una concentración de 100 ng de DNA totales por carril con agua de PiSa farmacéutica para un volumen de 16 µl. El gel ya atemperado se colocó en su base con el peine que forma los carriles y se esperó a que solidificara aproximadamente 1 hora. El gel solidificado se colocó en la cámara de electroforesis, verificando que los pozos queden del lado del cátodo (-) y se cubrió con 250 ml de buffer TAE1 × de corrida. En un trozo de papel Parafilm® se mezclaron los 16 µl de muestra con 4 µl de Buffer de carga (Nucleic Acid Sample Loading Buffer 5 ×, Biorad) y se cargaron los 20 µl en cada carril. En el primer carril se cargaron 5 µl de la escalera de pesos moleculares de 1 a 15 kbp (Ladder EZ Load™ Molecular Ruler 1 kb, Biorad). La fuente de poder se ajustó a 100 V durante 1 hora y se corrieron las muestras DNA con carga negativa hacia el ánodo (+).

El gel se sumergió en el buffer de revelado con 30 ml de agua destilada con 500 µl de TAE50 × y 3 µl de SYBR®Safe DNA 10,000 × (Invitrogen) y se colocó en el agitador orbital por 15 min. Por último, el gel se visualizó en el fotodocumentador Gel Doc™ EZ Imager (Biorad).

5.3.4.7 Encapsulamiento del plásmido por ondas de choque

Para el encapsulamiento de plásmido se prepararon tres viales de 1 ml con una densidad de 2,500 000 linfocitos por ml. Antes de someter los viales a ondas de choque se centrifugaron a 4,000 rpm por 10 min, se descartó el sobrenadante y a los precipitados se les agregó 1ml de una solución con plásmido a 400 ng/µl. Al control se le añadió 1ml de medio sin

suplementar. Los viales se sometieron a 500 ondas de choque con 18.1 MPa, se centrifugaron a 4,000 rpm por 5 min y los sobrenadantes se guardaron a 4 °C.

5.3.4.8 Análisis de plásmido y de encapsulamiento de plásmido por VE

Previa centrifugación a 30,000 g por 60 min, a 4 °C, se analizaron muestras de VE con plásmido tratadas por ondas de choque y muestras de VE en ausencia de plásmido como control. Los sobrenadantes de ambas ultracentrifugaciones se cuantificaron por Nanodrop, así mismo las muestras de VE con plásmido encapsulado. Para verificar la integridad del plásmido después de la aplicación de las ondas de choque se realizó un gel de agarosa del sobrenadante de la primera centrifugación. Ambas muestras de VE con plásmido y VE control se tiñeron con el marcador azul fluorescente DAPI 4',6-diamino-2-fenilindol (Sigma-Aldrich), para observar por microscopia confocal si el plásmido realmente había sido encapsulado al momento de formar las vesículas. Las VE se montaron en portaobjetos, colocando 20 µl de solución de VE con DAPI. Una vez colocadas sobre el cubreobjetos, las muestras se cubrieron con un cubreobjetos, se sellaron con barniz transparente y se mantuvieron al abrigo de la luz. También se realizó simultáneamente una tinción con anticuerpo anti-CD3e PE.

5.3.5 Análisis estadístico

Todos los datos fueron analizados con el programa Origin versión 9. Los datos de citometría de flujo fueron analizados con el programa FlowJo™ versión 10.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo con datos recientes, la aplicación de ondas de choque a suspensiones de células eucariontes permitió su permeabilización, generando también la formación de VE de manera concomitante (Castaño, 2015; López-Marín et al, 2016). De acuerdo con estos trabajos, las células sometidas al paso de las ondas de choque conservan su viabilidad y metabolismo celular. Por ejemplo, análisis por citometría de flujo muestran que algunas células han sufrido una disminución en su talla promedio, pero son aún capaces de expresar un transgén (López-Marín et al, 2016). Con estos antecedentes, en este trabajo se presenta un estudio para explorar el uso de las ondas de choque como un método para la formación de vesículas extracelulares a partir de células eucariontes. Se utilizaron células inmortales NIH-3T3 para un estudio preliminar del fenómeno, y se analizó la formación de VE a partir de linfocitos T murinos.

6.1 Supervivencia celular y formación de VE en NIH-3T3

Los fibroblastos de la línea NIH-3T3 se eligieron para el estudio exploratorio debido a la facilidad de su manejo y rápida proliferación. Las células fueron despegadas de las superficies de cultivo por tratamiento con tripsina, depletadas de vesículas provenientes de suero fetal bovino del medio de cultivo, y puestas en suspensión dentro de pipetas de transferencia selladas. Enseguida, las muestras fueron sometidas a ondas de choque y analizadas para determinar la supervivencia celular, así como la producción de VE. En la figura 24 se observa la curva de supervivencia celular. Como puede observarse, a medida que se incrementa la cantidad de ondas de choque, aumenta la mortalidad celular. Los viales se trataron con 63, 125 y 250 ondas de choque a intensidades 15 y 20, correspondientes a presiones positivas de 15.1 y 18.1 MPa, respectivamente. Como era esperado, la aplicación de ondas de choque con presión positiva indujo una mayor mortalidad de las células.

Las muestras tratadas con 250 ondas de choque de 18.1 MPa fueron analizadas por dispersión dinámica de luz, considerando que la mortalidad celular en dicha condición aumentó drásticamente, lo cual estaría íntimamente ligado a la generación de mayor cantidad de VE.

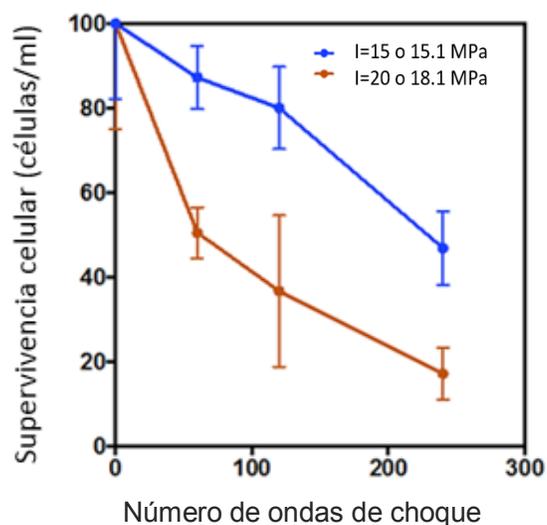


Fig. 24. Curva de supervivencia celular de la línea NIH-3T3 expuesta a ondas de choque.

En el análisis de DLS de las dos muestras se observaron poblaciones de vesículas de tallas que van de los 400 a 600 nm de diámetro hidrodinámico y una pequeña población de vesículas de aproximadamente de 100 nm (Fig. 25). No se observó presencia de partículas mayores a una micra.

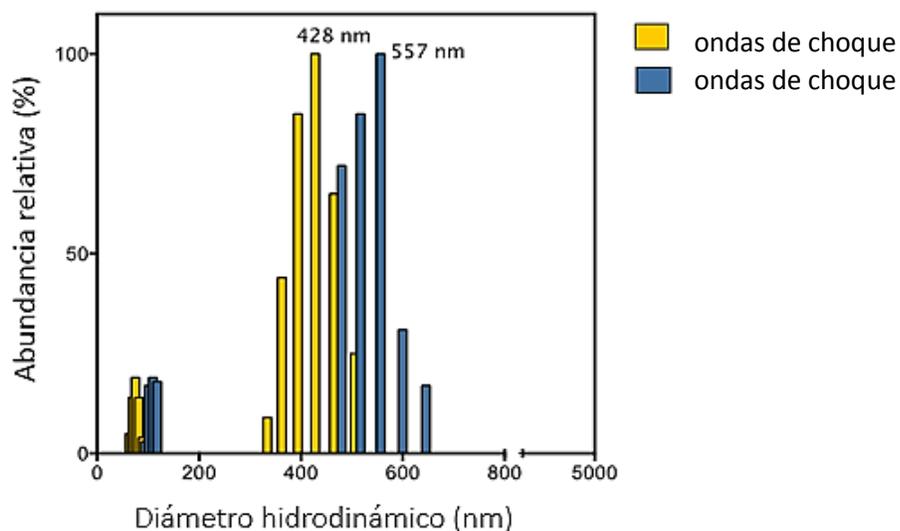


Fig. 25. DLS de VE provenientes de NIH-3T3. Los colores indican el número de réplicas.

6.2 Linfocitos como modelo celular para producción de VE

Una de las desventajas del uso de la línea NIH-3T3 como modelo para la obtención de VE es su carácter adherente, ya que requieren de un proceso de tripsinización para despegarlas del medio de cultivo. El efecto de la tripsina en células adherentes no sólo despega a las células del medio, sino que también provoca efectos adversos como la desregulación de proteínas de membrana, respuestas de estrés, disminución de la expresión de proteínas involucradas en el metabolismo y crecimiento y sobreexpresión de proteínas apoptóticas (Huang et al., 2010). Esto significa que el uso de la tripsina conlleva la posibilidad de la generación de vesículas apoptóticas previo al tratamiento por ondas de choque e incluso alteraciones y pérdida de funcionalidad de sus proteínas tanto internas como membranales, lo cual podría afectar directamente en su capacidad de regulación como posibles nanoacarreadores. Aunado a esto, resultaría de mayor interés utilizar un modelo celular con mayor potencial terapéutico que la línea de fibroblastos. Los linfocitos T, al ser células no adherentes son un modelo más adecuado para la formación de vesículas de uso biomédico, que evita las desventajas del proceso de tripsinización y reduce la potencial inducción de vesículas resultantes de procesos de apoptosis.

Existen estudios en los que se proponen diversas opciones terapéuticas del uso de VE provenientes de células del sistema inmune (Nassar et al., 2015; Théry et al., 2009). En particular las VE provenientes de linfocitos T son capaces de retener la conformación de su membrana de origen con proteínas funcionales como su receptor TCR y otros ligandos específicos (Fig. 26) (Gutiérrez-Vázquez et al., 2013).

El sistema de fagocitos mononucleares es una de las principales barreras a las que se enfrenta cualquier nanocarreador inmediatamente al entrar en el cuerpo, sin embargo las VE originadas a partir de linfocitos T, al mantener su fisiología membranal, tendrían como ventaja el ser reconocidas como partículas propias y camuflajearse para evadir el proceso de opsonización y subsecuente fagocitosis (Blanco et al., 2015). La opsonización de las nanopartículas con contenido terapéutico ocurre a partir del marcaje con proteínas plasmáticas que permiten identificarlas por células fagocíticas, principalmente macrófagos. La capacidad de camuflaje de VE de células T aumenta su dinámica de flujo en el sistema retículo endotelial (RES) para alcanzar sus destinos y poder liberar el cargo necesario.

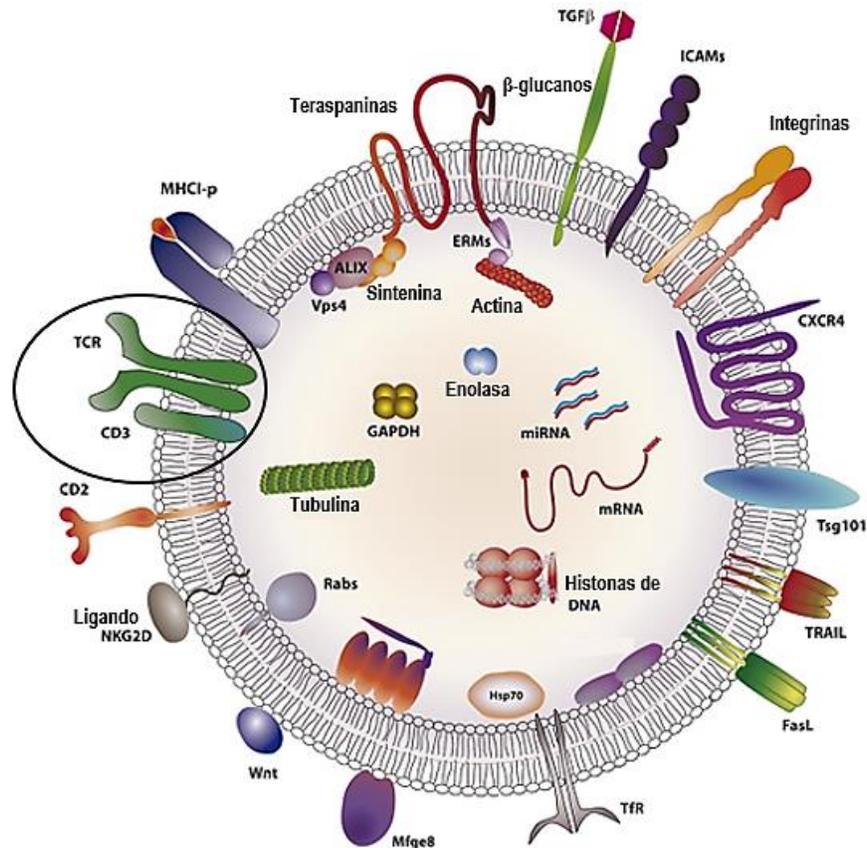


Fig. 26. Contenido típico de un exosoma de linfocito T. Las VE de linfocitos T mantienen sus biomoléculas funcionales. En la imagen se ilustran sus receptores, así como moléculas que podrían quedar encapsuladas (Gutiérrez Vázquez et al., 2013).

Cabe resaltar que se han estudiado efectos inmunomoduladores de las VE provenientes de linfocitos T, como su capacidad de inhabilitar la citotoxicidad de células NK o provocar apoptosis en linfocitos T (Gutiérrez- Vázquez et al., 2013). Además, la presencia de su receptor TCR les permite ser partícipes del proceso de reconocimiento de antígenos al interactuar con APC (Gutiérrez- Vázquez et al., 2013).

6.3 Caracterización de cultivos primarios de esplenocitos murinos

Una vez extraídas las células de bazo de ratón se caracterizaron las poblaciones celulares por citometría de flujo, utilizando marcadores de superficie de granulocitos (Ly6G), de linfocitos T (CD3) y de linfocitos B (CD19). Asimismo, se caracterizaron las células obtenidas de esplenocitos cultivados por tres días con el mitógeno ConA. Como se explicó en el inciso 2.6-B, la luz del láser que incide sobre las células se dispersa de forma frontal (FSC), lo cual da información sobre el tamaño de partícula. Por su parte, la dispersión lateral (SSC) proporciona información sobre la complejidad interna o que tan granulosa es la superficie de la célula. En citometría de flujo, se pueden delimitar zonas para definir poblaciones con ciertas características y se pueden discriminar partículas pequeñas, correspondientes a *debris* celulares.

En la figura 27 (a) se muestra una gráfica típica de análisis de esplenocitos recién extraídos del bazo de la cepa CD1. Cada punto representa un evento, es decir una célula. Para su obtención se desplegaron 30,000 eventos en una gráfica de puntos de tamaño contra granularidad relativas (FSC VS SSC). Además en la figura 27 (b) se delimitó la zona P1 con un 97.4% de eventos, que representa el 100% para definir las poblaciones celulares con marcadores de superficie.

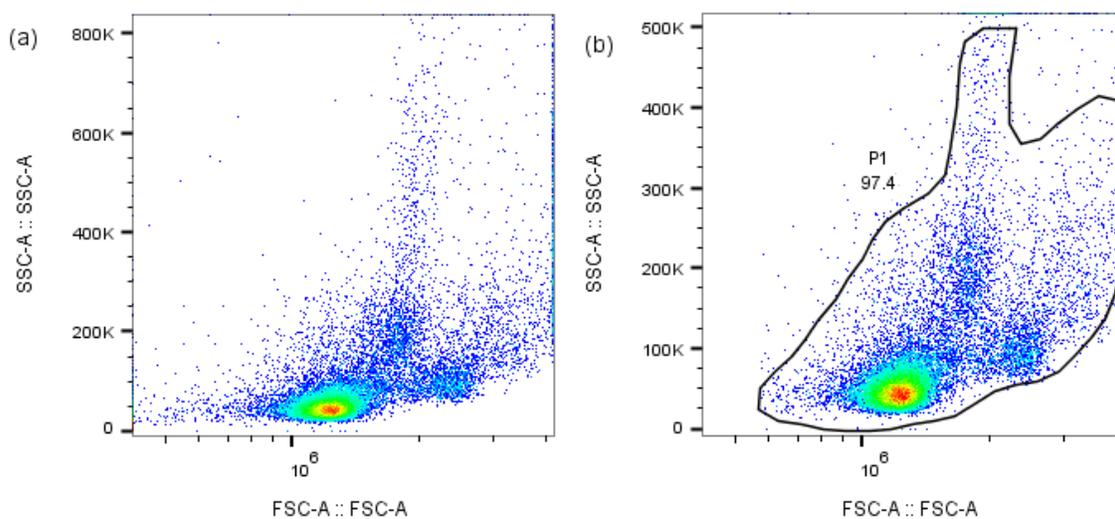


Fig. 27. (a) Caracterización de esplenocitos por citometría de flujo. La gama de colores expresa la densidad celular, la mayor concentración se localiza en el área con colores rojo, amarillo, verde y azul claro. (b) Gráfica de la zona P1, se delimitó con un 97.4% de los eventos totales.

Para cada marcador se analizó la intensidad de fluorescencia primero con un histograma para separar con un valor de corte los picos de fluorescencia positiva de la fluorescencia basal. En la figura 28 (a) se muestra una gráfica de dispersión del marcaje con anti-CD3 de los esplenocitos totales, FSC contra SSC. Se distinguen dos poblaciones de linfocitos T con diferente tamaño respecto al eje de las “x”, sin embargo, la zona de color rojo con mayor densidad celular es la que corresponde a los linfocitos T de menor tamaño sin activar (fig. 28a). El histograma de intensidad de fluorescencia del marcador anti-CD3 PE se observa en la fig. 28 (b), el valor de corte separa las células con fluorescencia basal (51.9% del total) de las células con fluorescencia positiva que corresponden a 47.7%.

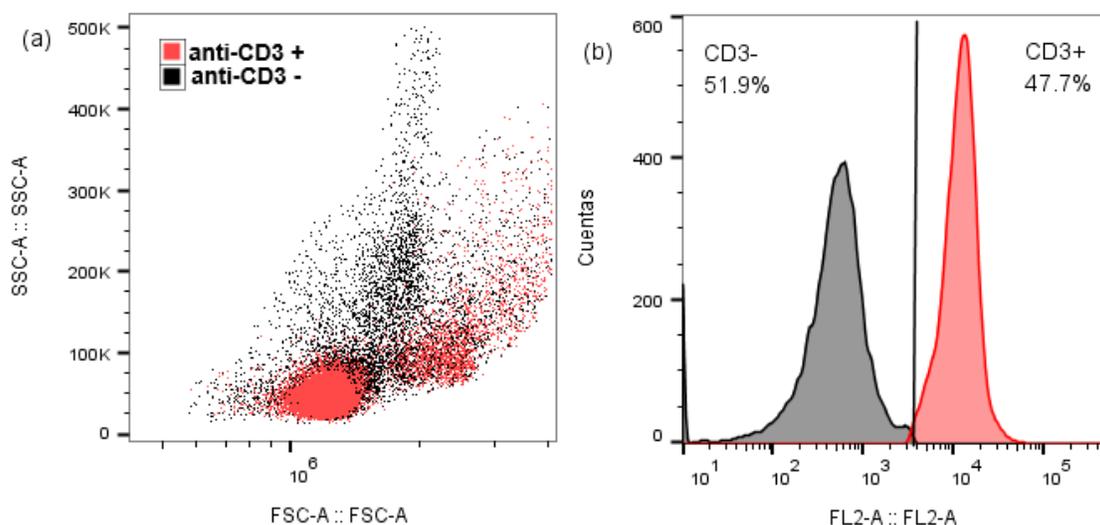


Fig. 28. Marcaje de linfocitos T en esplenocitos totales. (a) Gráfica de dispersión de esplenocitos marcados con anti-CD3. (b) Histograma de fluorescencia anti-CD3.

En la figura 29 (a) se muestra una gráfica de dispersión del marcaje para linfocitos B de esplenocitos totales y en la fig. 29 (b) el histograma de fluorescencia positiva para anti-CD19 de 42.4 %, separada de la basal de un 57.6 %. Los linfocitos B se ubican en la misma area que los linfocitos T con dos poblaciones respecto al tamaño expresado por el eje de las “x” (FSC). En la figura 30 (a) se observa una gráfica de dispersión del marcaje para

granulocitos de los esplenocitos totales y en la fig. 30 (b) el histograma de fluorescencia para el marcador anti-Ly6G. El porcentaje de fluorescencia basal es de 95.6% en contraste con el porcentaje de fluorescencia positiva que es de 4.46%. La distribución de la población de los granulocitos coincide con sus características de complejidad y granulocidad respecto al eje de las “y” (SSC) y es una subpoblación drásticamente de menor tamaño que los linfocitos T y B.

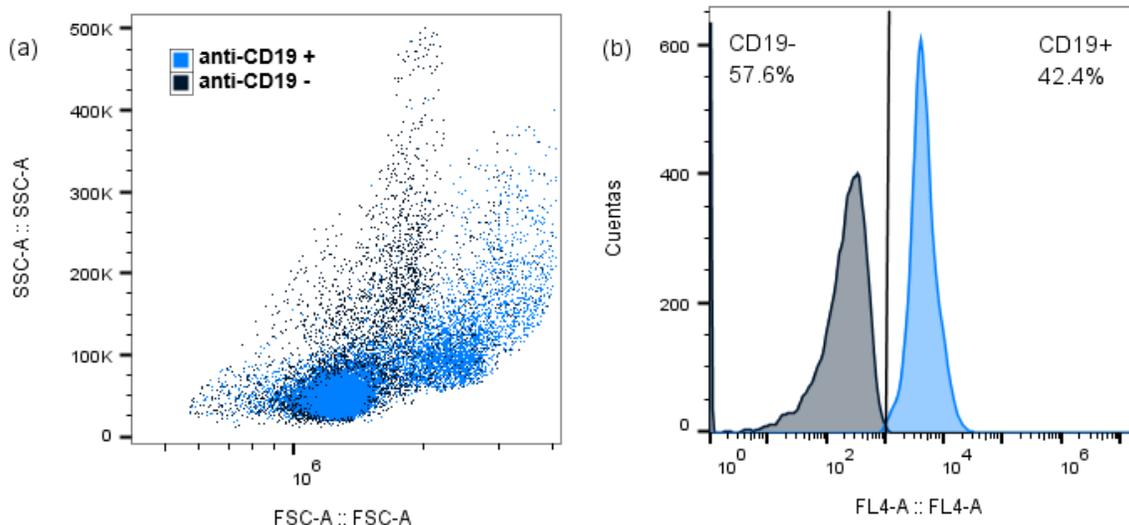


Fig. 29. Marcaje de linfocitos B en esplenocitos totales. (a) Gráfica de dispersión de esplenocitos marcados con anti-CD19. (b) Histograma de fluorescencia anti-CD19.

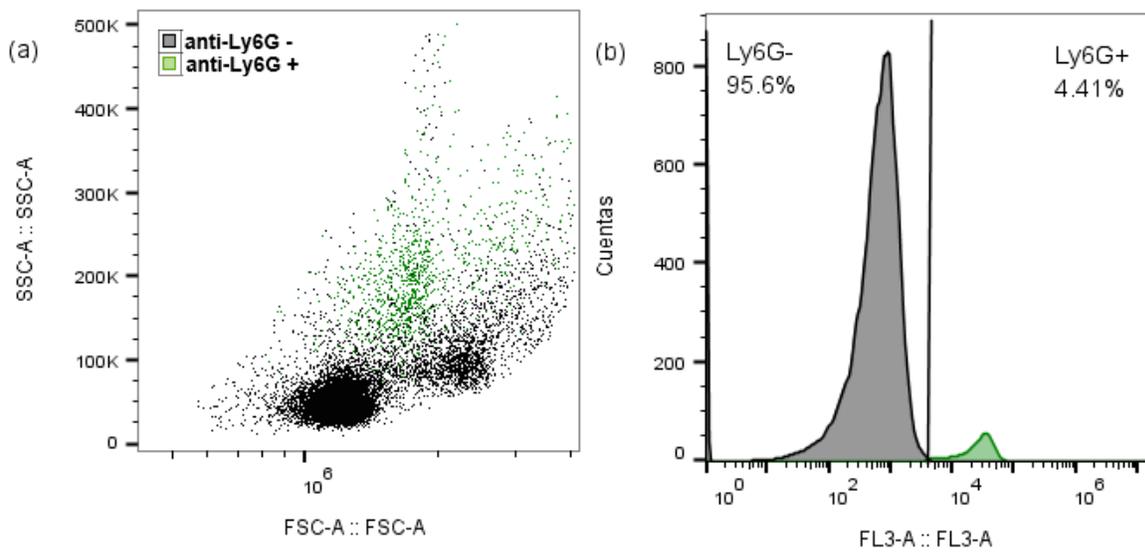


Fig. 30. Marcaje de granulocitos en esplenocitos totales. (a) Gráfica de dispersión de esplenocitos marcados con anti-Ly6G. (b) Histograma de fluorescencia anti-Ly6G.

6.3.1 Esplenocitos estimulados con el mitógeno Concanavalina A

En la figura 31 (a) se muestra una gráfica de puntos de las células estimuladas por tres días en presencia de ConA en la que se desplegaron 30,000 eventos y en la fig. 31 (b) se muestra la zona delimitada como P2 con un 97% de los eventos que se realizó para descartar *debris* celular, y que representa el 100% para delimitar los análisis de marcadores de superficie, las poblaciones de linfocitos T, B y granulocitos.

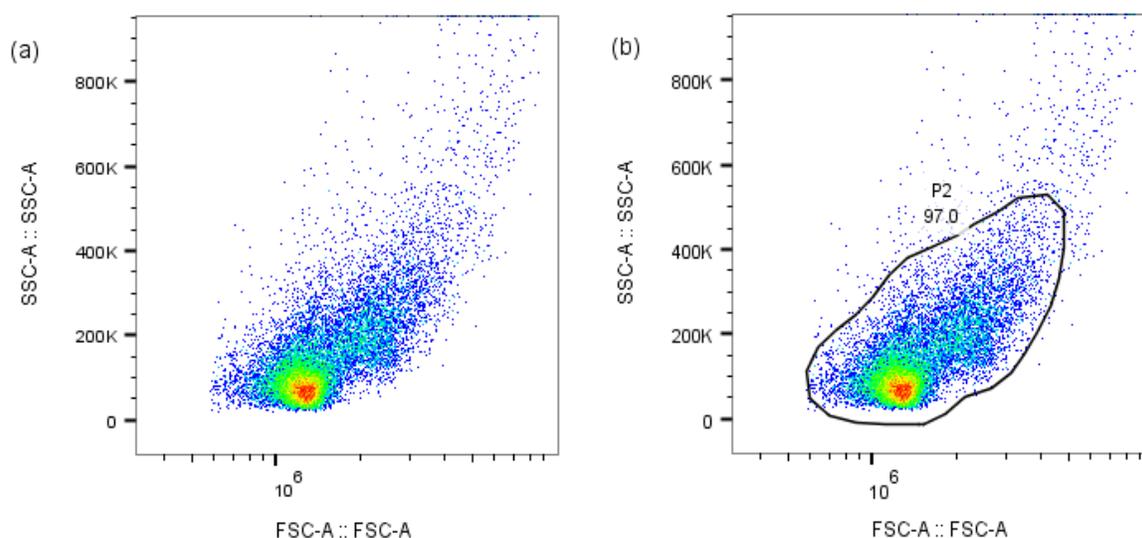


Fig. 31. (a) Caracterización de esplenocitos estimulados con ConA por citometría de flujo. La gama de colores expresa la densidad celular cuya mayor concentración se localiza en el área con colores rojo, amarillo, verde y azul claro. (b) Gráfica que muestra la zona P2 con 97% de los eventos totales.

En la figura 32 (a) se muestra una gráfica de puntos de dispersión del marcaje con anti-CD3 de los esplenocitos estimulados con ConA. El histograma de intensidad de fluorescencia para el marcador anti-CD3 PE se observa en la fig. 32 (b), el valor de corte las células con fluorescencia basal (50.9 % del total) de las células con fluorescencia positiva, que representan el 49.1 %. A diferencia de la gráfica de la fig. 28a del marcaje anti-CD3 para esplenocitos totales, se observa mayor densidad celular de células marcadas de mayor tamaño

y complejidad. El aumento de talla de linfocitos T era esperado por el efecto de activación provocado por la concanavalina A, que es una lectina capaz de inducir la activación de células T incrementando su proliferación (Dutton, 1972).

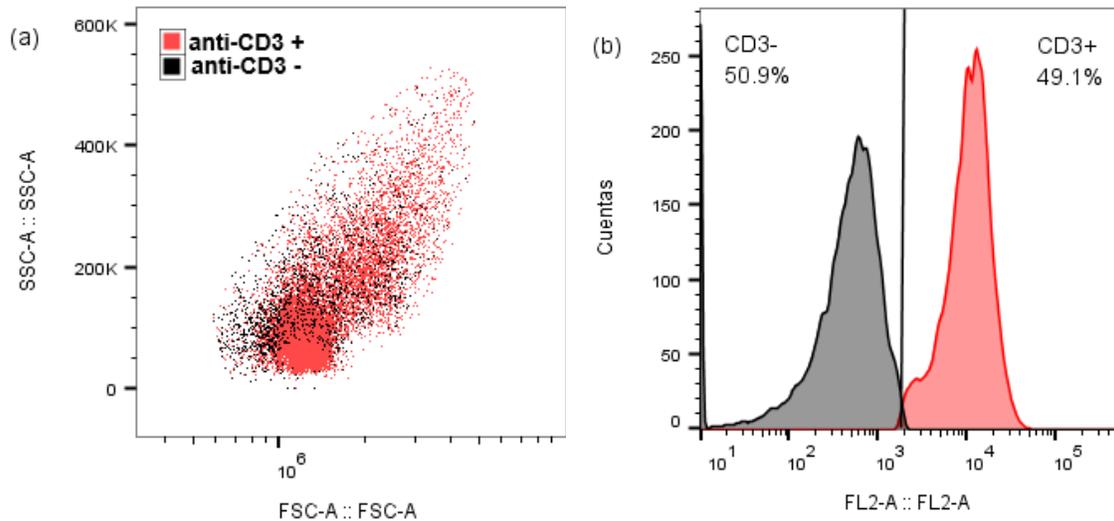


Fig. 32. Marcaje de linfocitos T en esplenocitos estimulados con ConA. (a) Gráfica de dispersión de esplenocitos +ConA marcados con anti-CD3. (b) Histograma de intensidad de fluorescencia anti-CD3.

En la figura 33 (a) se muestra una gráfica de dispersión del marcaje para linfocitos B de esplenocitos estimulados con ConA y en la fig. 33 (b) el histograma de intensidad de fluorescencia con el valor de corte de las células con fluorescencia basal (65.6 % del total) de las células con fluorescencia positiva para anti-CD19, que representan el 34.4 %.

En la figura 34 (a) se observa una gráfica de dispersión del marcaje para granulocitos de los esplenocitos + ConA y en la fig. 34 (b) el histograma de fluorescencia para el marcador anti-Ly6G. Ya no se observó la presencia de la subpoblación de granulocitos debido a que la población celular total se enriqueció en linfocitos T.

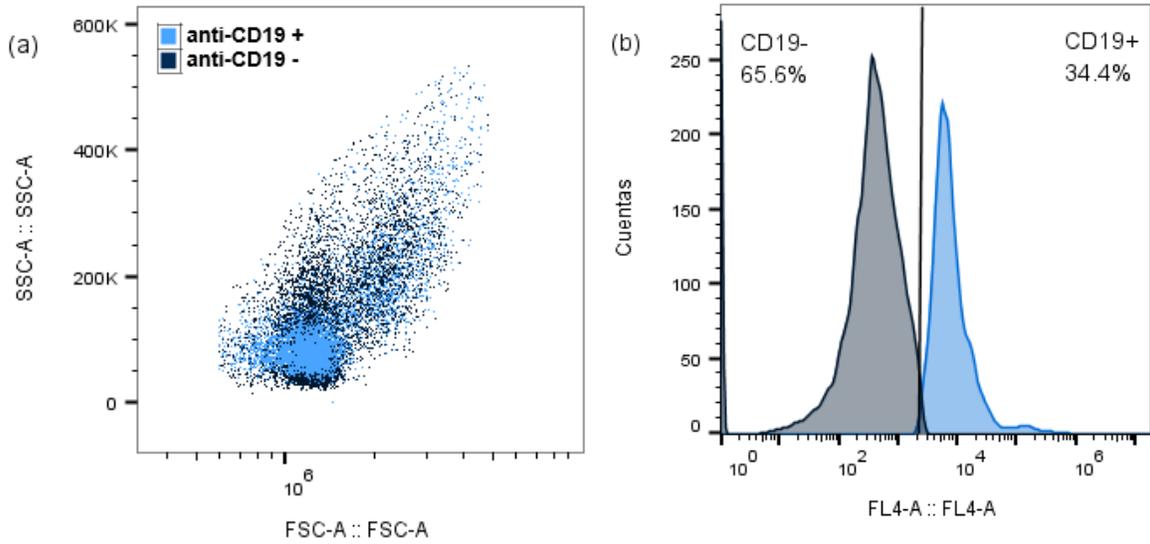


Fig. 33. Marcaje de linfocitos B en esplenocitos estimulados con ConA. (a) Gráfica de dispersión de esplenocitos marcados con anti-CD19. (b) Histograma de intensidad de fluorescencia anti-CD19.

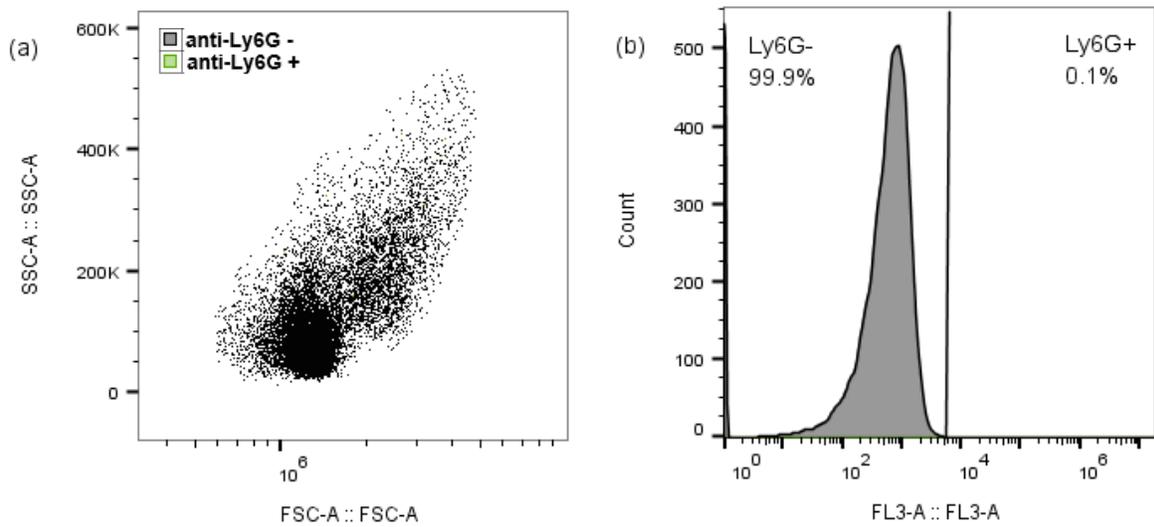


Fig. 34. Marcaje de granulocitos en esplenocitos estimulados con ConA. (a) Gráfica de dispersión de esplenocitos+ConA marcados con anti-Ly6G. (b) Histograma de fluorescencia anti-Ly6G.

En la tabla 8 se muestra la relación de densidad celular en porcentajes de las diferentes subpoblaciones celulares como resultado de los análisis de expresión de marcadores de superficie, tanto de células recién extraídas del bazo de ratón, como las estimuladas con el mitógeno. La concanavalina A únicamente presenta efecto mitogénico en Linfocitos T, sin embargo, en un estudio se observó que los linfocitos B expuestos a ConA en cultivo durante 24 hrs y en presencia de ciertos factores humorales liberados por células T, se pueden volver competentes y activarse (Andersson et al., 1972), lo cual podría explicar la prevalencia no sólo de linfocitos T sino de una población considerable de linfocitos B después de agregarles el mitógeno. Las poblaciones de células expuestas a ConA resultaron efectivamente enriquecidas principalmente en linfocitos T, además de linfocitos B, con un 83.5% de ambas poblaciones. El 16.4 % restante podría corresponder a otros tipos celulares como células dendríticas y macrófagos.

Tabla 8. Células extraídas de bazo de ratón CD1, de acuerdo con análisis por citometría de flujo y expresión de marcadores de superficie.

Subpoblación celular	Marcador de superficie	Marcador fluorescente	Porcentaje Esplenocitos totales	Porcentaje Esplenocitos + ConA
Linfocitos T	CD3	PE	47.7 %	49.1 %
Linfocitos B	CD19	APC	42.4 %	34.4 %
Granulocitos	Ly6G	PerCP-Cy5.5	4.4 %	0.1 %
Otros	-	-	5.5 %	16.4 %

6.4 Observación de vesículas mediante microscopia electrónica de barrido

Con el objetivo de captar el instante de la formación de protuberancias o vesículas directamente de la membrana celular, se efectuó la fijación de las células 15 segundos después del tratamiento con ondas de choque, y se visualizó por medio de SEM. Fue de suma importancia llevar a cabo el proceso de secado por punto crítico con extrema precaución, debido a que cualquier cambio de temperatura o presión en el momento indebido puede maltratar a las células fijadas y colapsarlas.

Como control se observaron linfocitos sin tratamiento de ondas de choque, los cuales se observaron sin daño ni alteraciones, con toda su membrana intacta (Fig. 35 a y b). En las muestras con los linfocitos tratados con 250 ondas de choque se obtuvieron imágenes de la formación de poros u hoyos membranales (Fig. 35. d y e) como los observados en estudios anteriores (López-Marín et al., 2017). A su vez se obtuvieron imágenes en las que se captó el instante preciso de la formación de protuberancias o blebs recién emergiendo de las células (Fig. 35. c y f). Las imágenes de SEM ilustran claramente los efectos de permeabilización y generación de vesículas de diversos tamaños provocados por las ondas de choque.

En vista de que, como se explicó con anterioridad, los microjets inducidos por las ondas de choque pueden dañar la membrana celular, una hipótesis es que las vesículas se forman por la acción de estos microjets. Este fenómeno podría provocar la separación de pequeñas porciones de membrana, que al cerrarse conforman las nuevas vesículas de múltiples tamaños. El contenido de estas vesículas recién generadas probablemente sea el de las biomoléculas presentes en la zona aledaña. Además de la cavitación acústica como posible responsable de la formación de VE pueden influir otros fenómenos físicos como las ondas de choque secundarias anteriormente mencionadas, así como la compresión y la tensión.

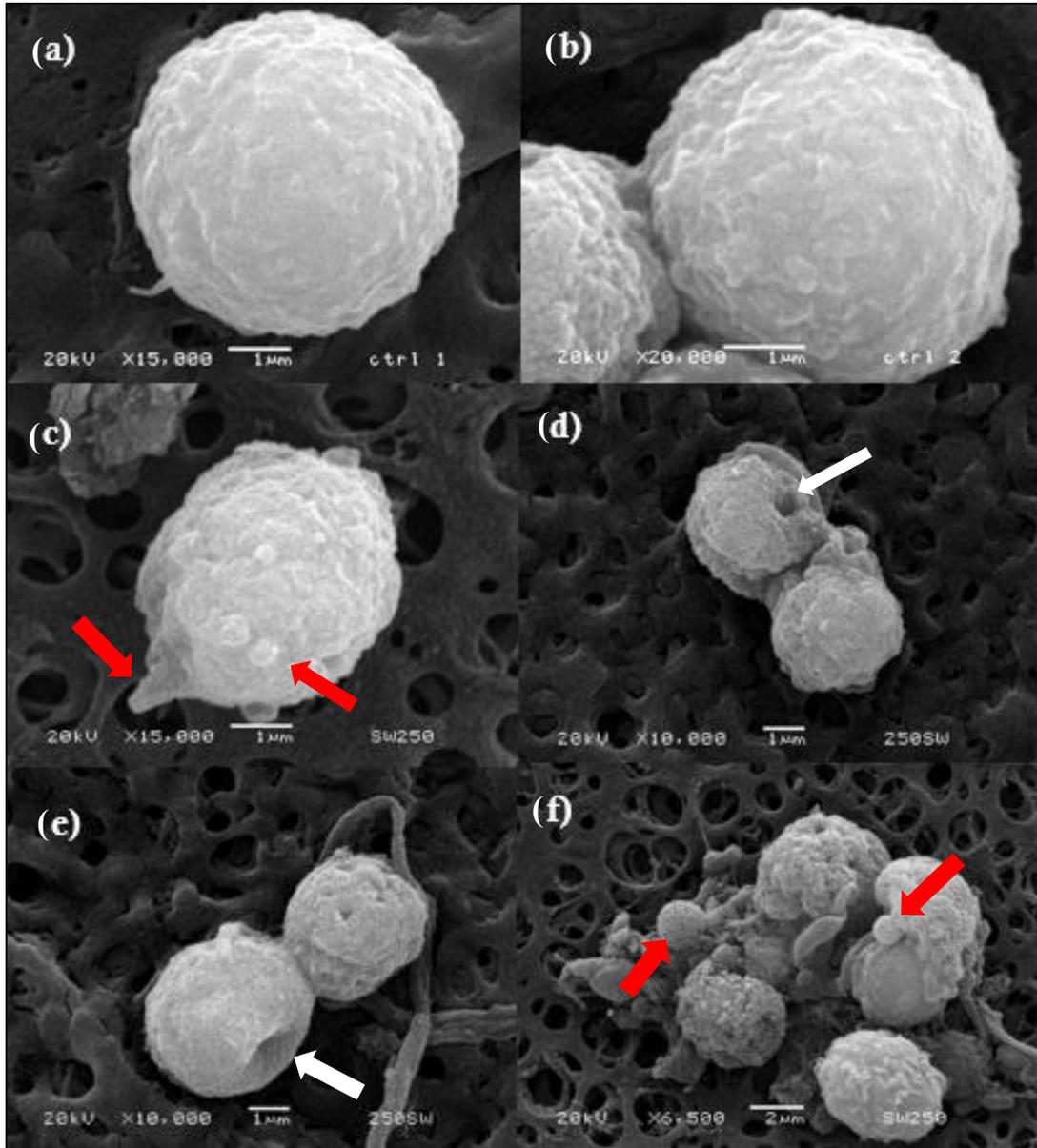


Fig. 35. SEM de linfocitos tratados con 250 ondas de choque. En el control (a) y (b) se observaron las células con su membrana intacta. En las figuras (c) y (f) se observaron la formación de protuberancias o vesículas recién emergiendo de la membrana (flechas rojas) y en las figuras (d) y (e) la inducción de poros en la membrana celular (flechas blancas).

6.5 Tratamiento con ondas de choque a linfocitos murinos

Los viales de suspensión celular enriquecidos con linfocitos T, se sometieron a 0, 63, 125, 250, 500 y 1000 ondas de choque con presión positiva de 18.1 MPa. Los conteos celulares se hicieron inmediatamente después de cada tratamiento para el monitoreo adecuado de la curva de supervivencia celular, con el fin de sondear las condiciones más adecuadas para la generación de VE.

Igual que para los resultados anteriores de la línea NIH-3T3, la supervivencia celular resultó estrechamente relacionada al número de ondas de choque. Conforme se aumentó el número de ondas de choque incrementó la mortalidad celular (Fig. 36). Entre menor cantidad de células vivas, se espera mayor formación de vesículas.

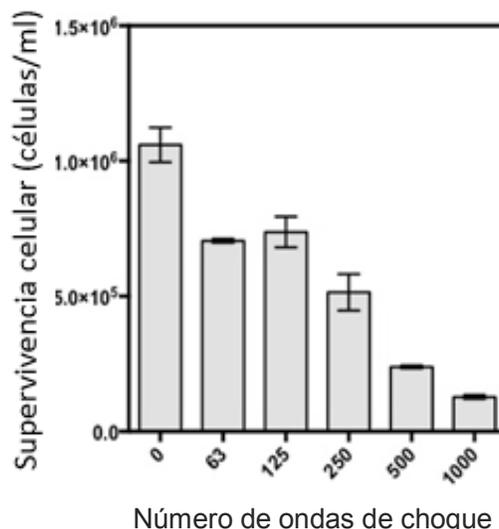


Fig. 36. Curva de supervivencia celular de linfocitos ante tratamiento con ondas de choque.

6.6 Resultados de caracterización de morfología y talla de VE

6.6.1 Caracterización de talla de las VE por Dispersión Dinámica de Luz

Las suspensiones celulares expuestas a 0, 63, 125, 250, 500 y 1000 ondas de choque se analizaron por DLS. En las muestras expuestas a 0, 63 y 125 ondas de choque, no se observó presencia significativa de vesículas. Los análisis de DLS para 250, 500 y 1000 ondas de choque mostraron poblaciones polidispersas de VE con tallas nanométricas sumamente diversas, sin relación aparente entre tamaños específicos de las vesículas con la cantidad de ondas de choque (Fig. 37).

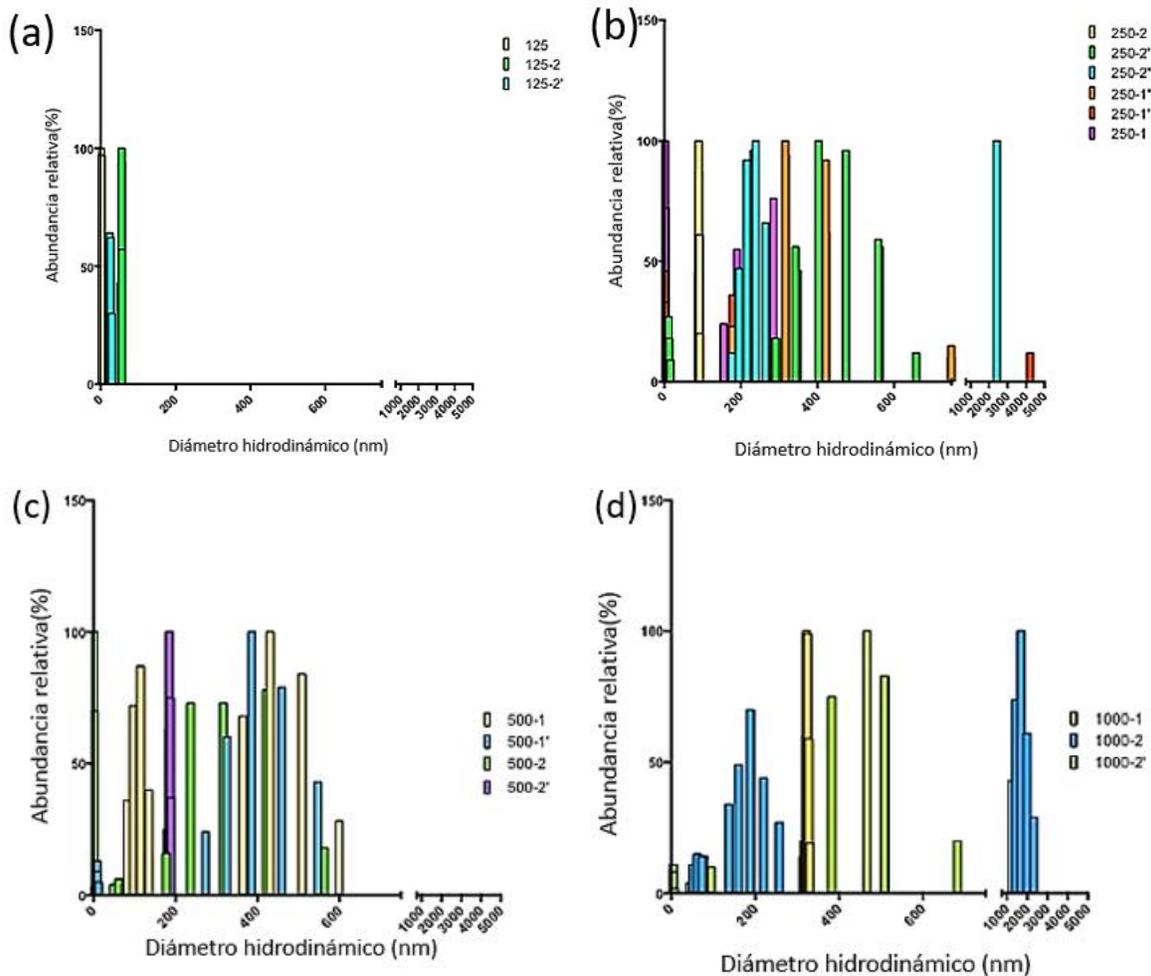


Fig. 37. Análisis por DLS de VE de linfocitos. (a) 125 ondas de choque, (b) 250 ondas de choque, (c) 500 ondas de choque y (d) 1000 ondas de choque. En cada inciso se muestra la dispersión de distintas réplicas, cada una en un color distinto.

Además, se obtuvo una correlación positiva entre la formación de vesículas dependiente de la cantidad de ondas de choque y el promedio de número de cuentas por segundo contabilizadas por el equipo de DLS (Fig. 38).

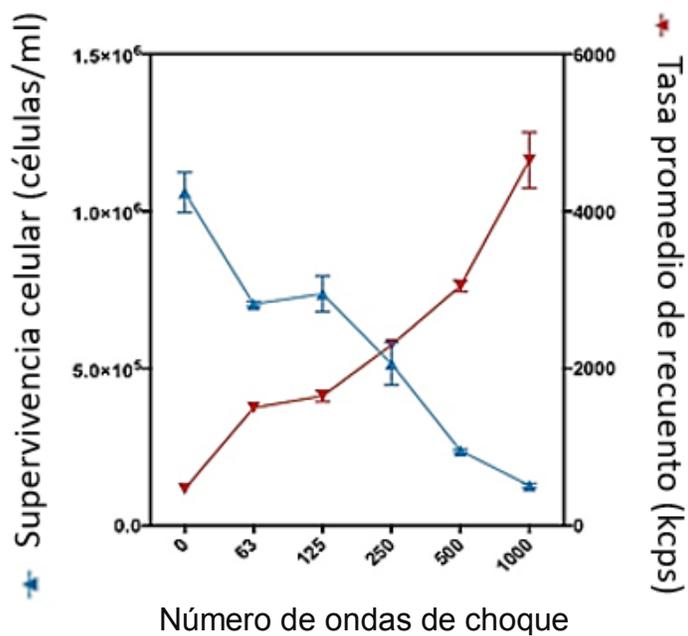


Fig. 38. Correlación entre la formación de vesículas (detectadas por DLS) y la mortalidad celular ante tratamiento de ondas de choque.

6.6.2 Análisis morfológico de VE mediante microscopia electrónica de transmisión

La caracterización de VE de las suspensiones celulares sometidas a 250 y 500 ondas de choque fue realizada por TEM. Inesperadamente, los resultados obtenidos por TEM no concordaron con los análisis de DLS ni con los de SEM. En las muestras de TEM se observaron claramente VE con morfología ovalada a circular, con talla homogénea de aproximadamente 20 a 30 nm, acumuladas en grandes conglomerados de material biológico de varios tamaños (Fig. 39 y 40). Algunas de las vesículas se observan con un color más oscuro o más claro, lo cual puede deberse a su distinta densidad de contenido. Los conglomerados de VE con otros materiales desconocidos estimaron tamaños de 100 a 1000 nm aproximadamente, inconsistentes con los resultados por DLS. Es decir, la rica diversidad de diámetros hidrodinámicos obtenidos por DLS, es en gran parte consecuencia de la presencia de conglomerados enormes con VE diminutas. En las imágenes de SEM se observó que sí se producen vesículas de tallas nanométricas de mayor tamaño, entonces podría ser que el método posterior de purificación por ultracentrifugación sea el responsable de descartar las vesículas de mayores tamaños a los observados por TEM.

En la literatura se ha documentado que el método de purificación de VE por ultracentrifugación o incluso por centrifugación de alta velocidad presenta como limitación la formación de agregados con VE (Erdbrügger et al., 2014; Linares et al., 2015; Momen-Heravi et al., 2013; Théry et al., 2006). En particular, las imágenes de crio-microscopia electrónica logradas por Linares y colaboradores (2015) son muy similares a las obtenidas en este trabajo. Sin embargo son pocos los estudios que utilizando este método de purificación de VE, han registrado la obtención de dichos conglomerados, lo cual se puede deber a que los agregados no son detectados por las limitaciones implicadas dependiendo el tipo de análisis de caracterización posterior. Por ejemplo, por el método de DLS no se puede saber si los diámetros hidrodinámicos obtenidos pertenecen a partículas individuales o a agrupaciones. El contenido de los conglomerados en los que las vesículas se encuentran inmersas probablemente sea una mezcla de agregados proteicos, fragmentos nucleosomales, ácidos nucleicos y lípidos.

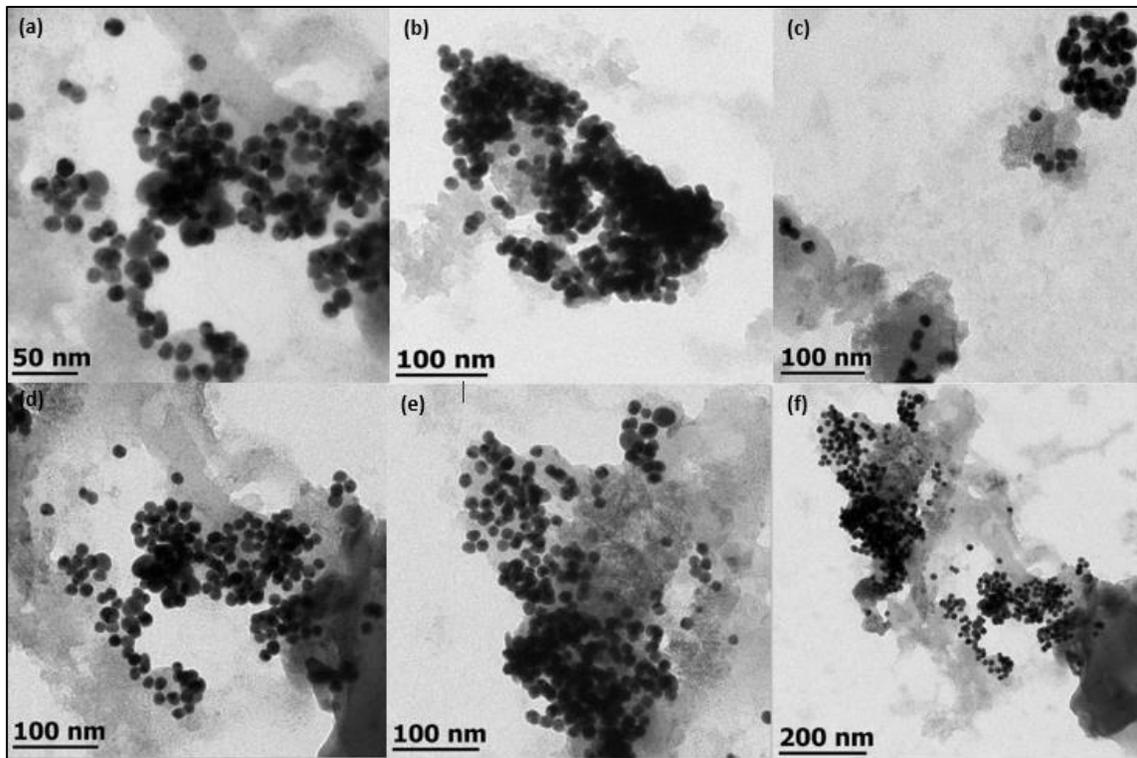


Fig. 39. TEM de VE obtenidas con 250 ondas de choque.

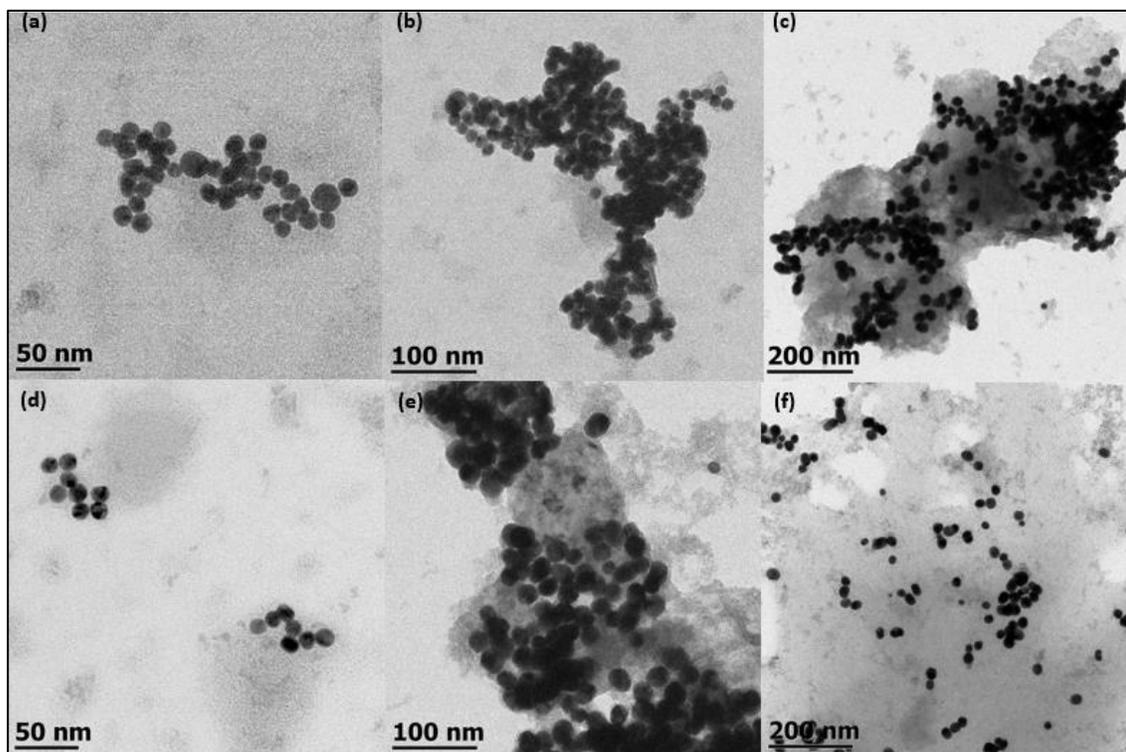


Fig. 40. TEM de VE obtenidas con 500 ondas de choque.

6.7 Resultados del análisis de bioactividad de VE

6.7.1 Marcas de superficie y bioactividad de VE

Tras la caracterización morfológica y de talla de las VE, se llevó a cabo el marcaje con anti-CD3e acoplado a PE para reconocimiento de proteínas funcionales de membrana, es decir del receptor de linfocitos T (TCR). El antiCD3 es capaz de unirse a la cadena ϵ del CD3, que es parte del complejo TCR-CD3 de linfocitos T y expresar la fluorescencia roja al estar acoplado a PE. Con base en este mecanismo de reconocimiento de proteínas de superficie para células T, se esperaba obtener la misma marca típica de fluorescencia de reconocimiento en las VE de células T generadas mediante ondas de choque.

Como resultado, se obtuvieron las imágenes de microscopia confocal con DIC (contraste diferencial de interferencia) superpuestas a fluorescencia roja. En el control negativo se observaron células T nativas y en el control positivo se observó la marca de superficie representativa para linfocitos T (Fig.41).

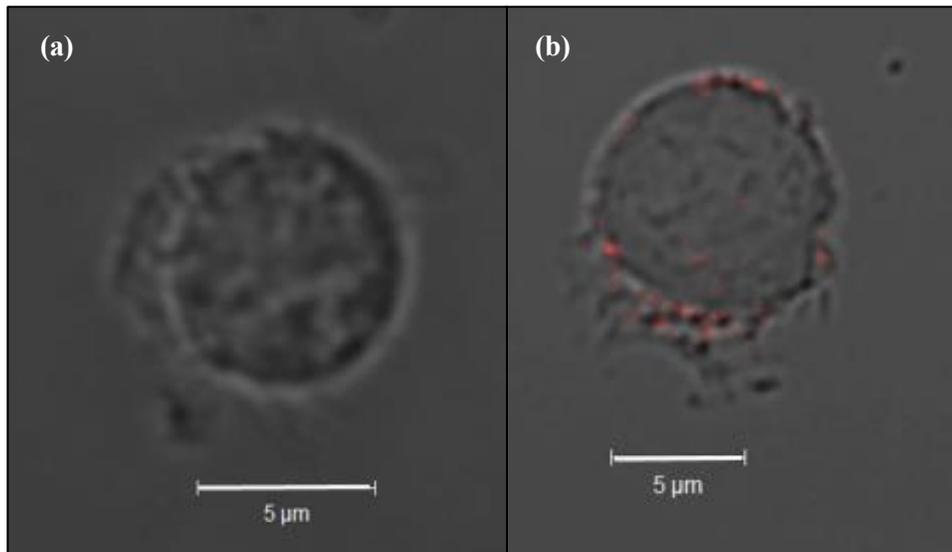


Fig. 41. Microscopia confocal de linfocitos nativos (a) y marcados con anti-CD3 PE (b). Se muestran imágenes DIC superpuestas a fluorescencia roja.

Las imágenes (a-f) en la figura 42 muestran que muchas de las VE inducidas mediante ondas de choque emiten fluorescencia debido a la expresión del complejo TCR-CD3. Esto significa que las vesículas generadas por este método físico son capaces de mantener sus receptores de membrana activos, ya que mantienen la conformación necesaria para ser reconocidos por anticuerpos. Como esperado, se observó la ausencia de marca fluorescente roja para algunas VE, lo cual indica la presencia de vesículas de origen endocítico o provenientes de otros tipos celulares, como los linfocitos B.

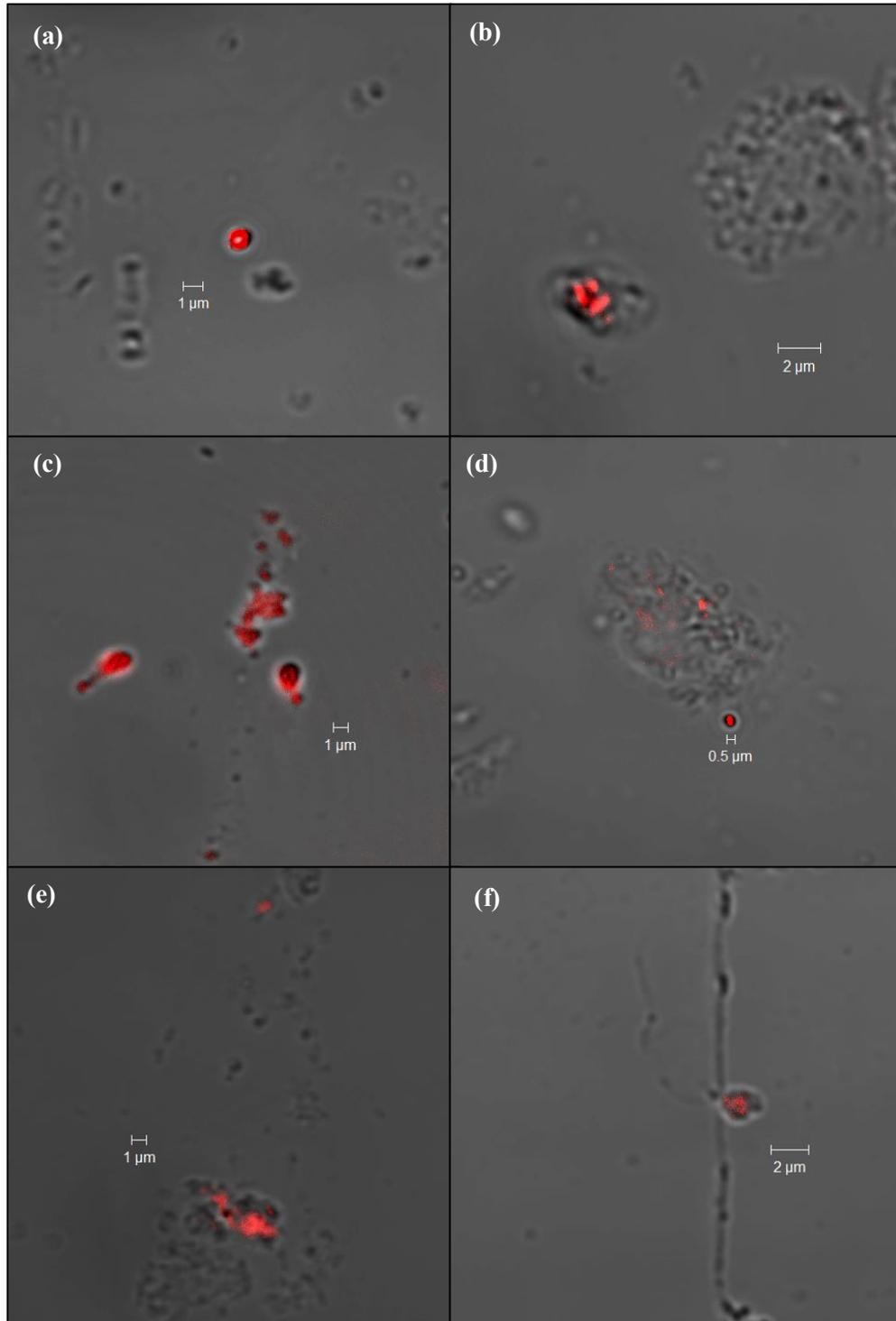


Fig. 42. Microscopia confocal de VE marcadas con anti-CD3 (a-d). Las VE fueron inducidas por ondas de choque. Se muestran imágenes DIC superpuestas a fluorescencia roja.

6.8 Análisis de encapsulamiento de plásmido

La prueba de encapsulamiento del *pCX::GFP-GPI2* se llevó a cabo en VE de linfocitos, de manera simultánea al tratamiento con 500 ondas de choque a una presión máxima de 18.2 MPa. El plásmido *pCX::GFP-GPI2* codifica para la proteína EGFP (del inglés *enhanced green fluorescent protein*), que es una variante de la proteína normal GFP, y que contiene un motivo de anclaje a la membrana en su secuencia C-terminal el cual se une al glicofosfolípido GPI (del inglés *glycosyl phosphatidyl inositol*) (Rhee et al., 2006). El objetivo de dicho análisis fue el de explorar si el uso de las ondas de choque permite, generar las VE, e introducir de manera simultánea un plásmido de interés dentro de ellas, lo cual tendría aplicaciones de interés nanocarreador terapéutico. De acuerdo con datos de nuestro grupo de trabajo, las ondas de choque permiten mantener la estructura topoisomérica del plásmido *pCX::GFP-GPI2* (Millán Chiu et al, 2014), por lo que es factible contemplar el encapsulamiento de DNA durante la formación de VE por ondas de choque.

Para la producción del plásmido se utilizaron células *E. coli*. La transformación se realizó por choque térmico en células ultracompetentes, y el plásmido fue purificado a partir de un cultivo en fase exponencial obtenido en medio LB con ampicilina (Fig. 43).

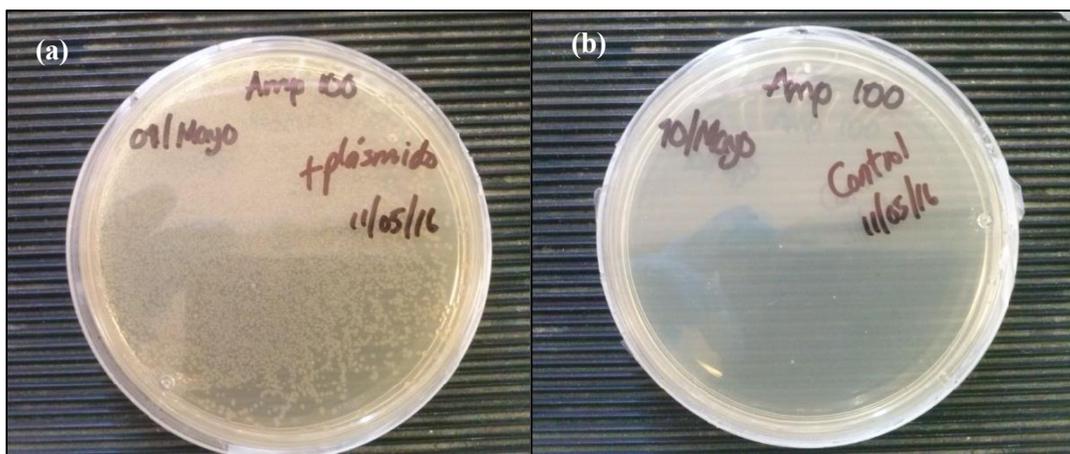


Fig. 43. Cultivo de bacterias transformadas. (a) Caja Petri con colonias de bacterias *E. coli* transformadas con el plásmido *pCX::GFP-GPI2* (resistentes a ampicilina). (b) Control, sin crecimiento bacteriano debido a la ausencia de plásmido.

El plásmido fue purificado por intercambio aniónico, utilizando el kit MaxiPrep (Qiagen, Inc. Valencia, CA), y se cuantificó por espectroscopía UV. En la figura 44 podemos observar el espectro de absorbancia arrojado al momento de la cuantificación del plásmido en uno de los lotes obtenidos. Como puede observarse, el producto muestra un máximo de absorción a 260 nm. Mediante análisis de electroforesis en gel de agarosa, el plásmido purificado mostró sus dos formas topoisoméricas en dos bandas, la más delgada corresponde al DNA relajado y la más ancha al DNA superenrollado (Fig. 44b).

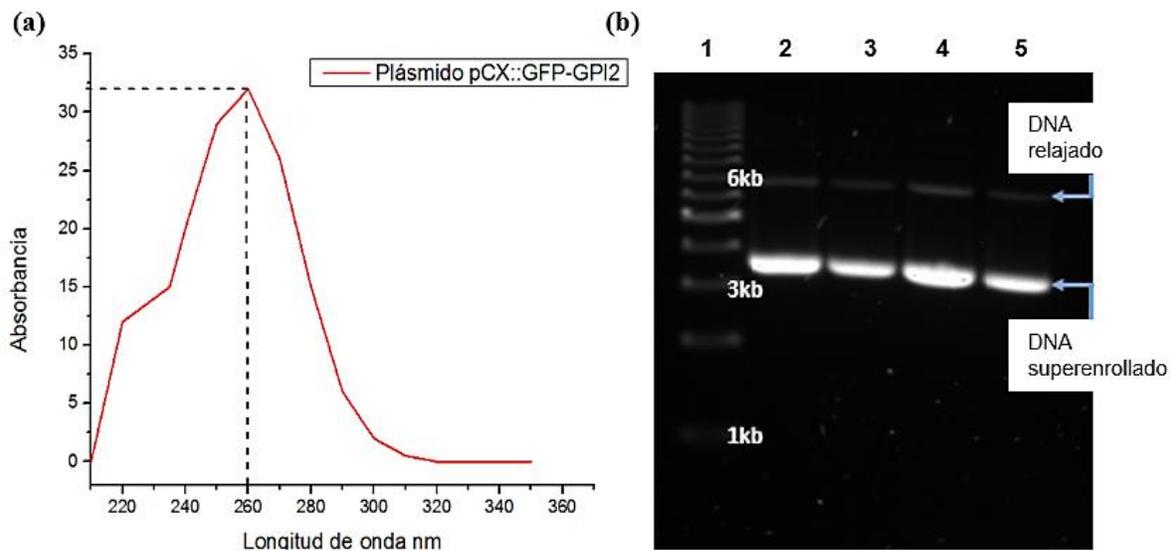


Fig. 44. Análisis del plásmido *pCX::GFP-GPI2* purificado. (a) Espectro de absorción, con su punto máximo a 260 nm. (b) Análisis por electroforesis en gel de agarosa, revelado con el marcador fluorescente SybrSafe. Carril 1, Estándares de nucleótidos de distintas tallas; carriles 2 a 4, lotes de plásmido purificado.

Con este análisis preliminar se buscó analizar si las VE formadas podían encapsular plásmido presente en el medio. La estrategia empleada para ello fue la eliminación del DNA no encapsulado mediante ultracentrifugaciones, y el marcaje de DNA encapsulado con el fluorocromo 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), el cual es un intercalador de ADN. Los

análisis por DLS de las VE obtenidas en presencia de plásmido se muestran en la Fig. 45, en donde puede confirmarse la generación de vesículas con el mismo perfil de tallas anteriormente mostrado.

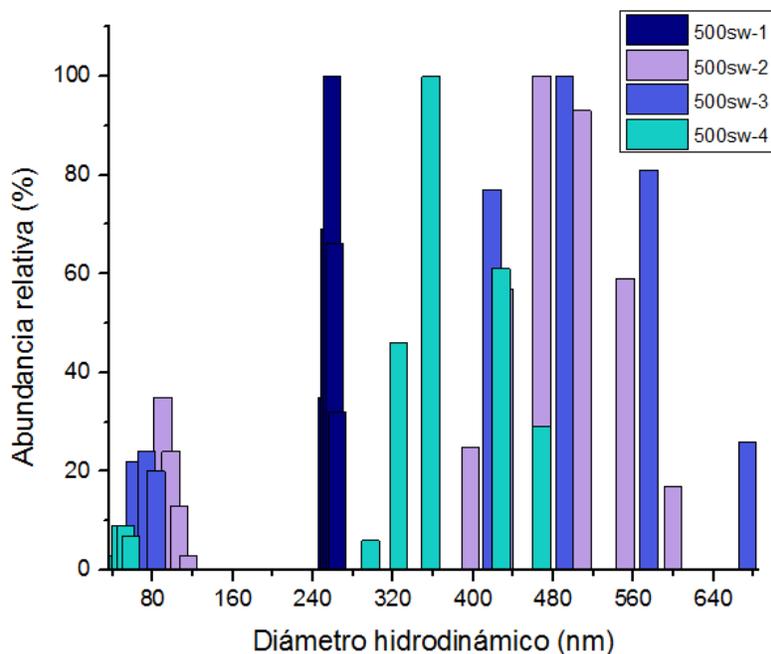


Fig. 45. Gráfica de DLS de VE con plásmido.

El DAPI tiene la capacidad de unirse fuertemente al DNA en las zonas ricas en adenina y timina, por lo tanto se espera que las VE que encapsularon el plásmido desplieguen la marca azul fluorescente. En la Fig. 46, 47 y 48 se muestran las imágenes obtenidas por microscopia confocal de las VE marcadas con DAPI. La resolución de la microscopia óptica no permite la observación de vesículas individuales. Sin embargo, es posible observar si los agregados de VE presentan marca fluorescente. Los resultados de los análisis mostraron que la fluorescencia azul fue visible en VE preparadas en presencia de plásmido (Fig. 47 a - d), pero también en aquellas preparadas sin plásmido (experimento control), y que el DAPI marca material en el interior de vesículas, en su exterior, y en material extravesicular (Fig.

46 a y b). De igual forma, en las muestras marcadas con anti-CD3 y DAPI simultáneamente sin presencia del plásmido *pCX:GFP-GPI2*, se obtuvo fluorescencia para los dos marcadores (Fig. 48-1 y 2). Estos resultados muestran que mucho del contenido de muestras con VE corresponde a ácidos nucleicos, y que la complejidad de las muestras obtenidas no permite el rastreo de plásmido a encapsular mediante esta técnica de marcaje. Por otro lado, se puede afirmar que uno de los componentes principales de los agregados es DNA, y que es altamente probable que los restos nucleicos generados por ondas de choque sean responsables de la agregación de vesículas aquí observada.

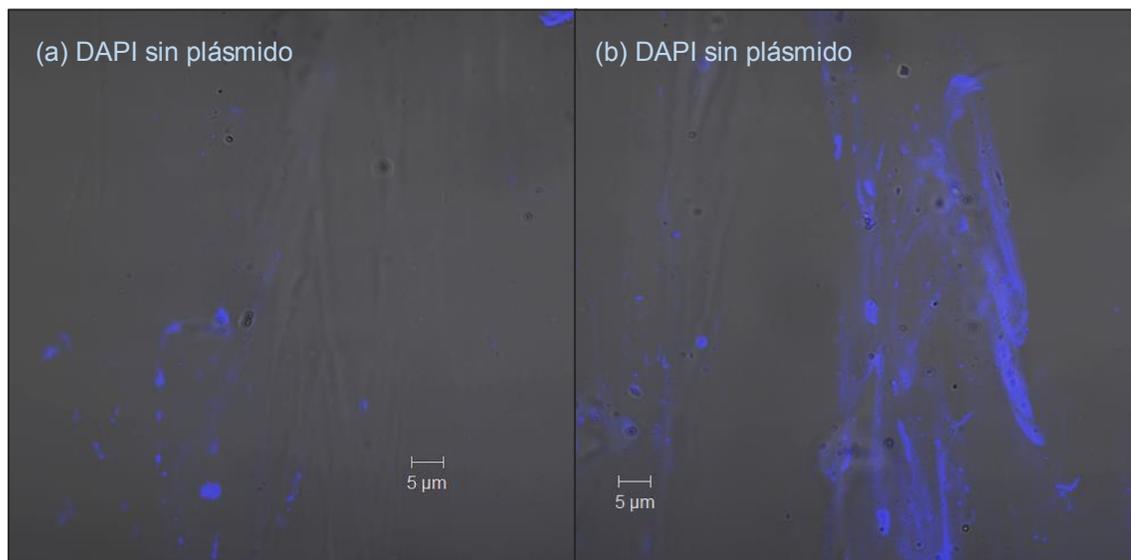


Fig. 46. Imágenes de microscopía confocal de VE preparadas en ausencia de DNA plasmídico, y marcadas con DAPI (a-b).

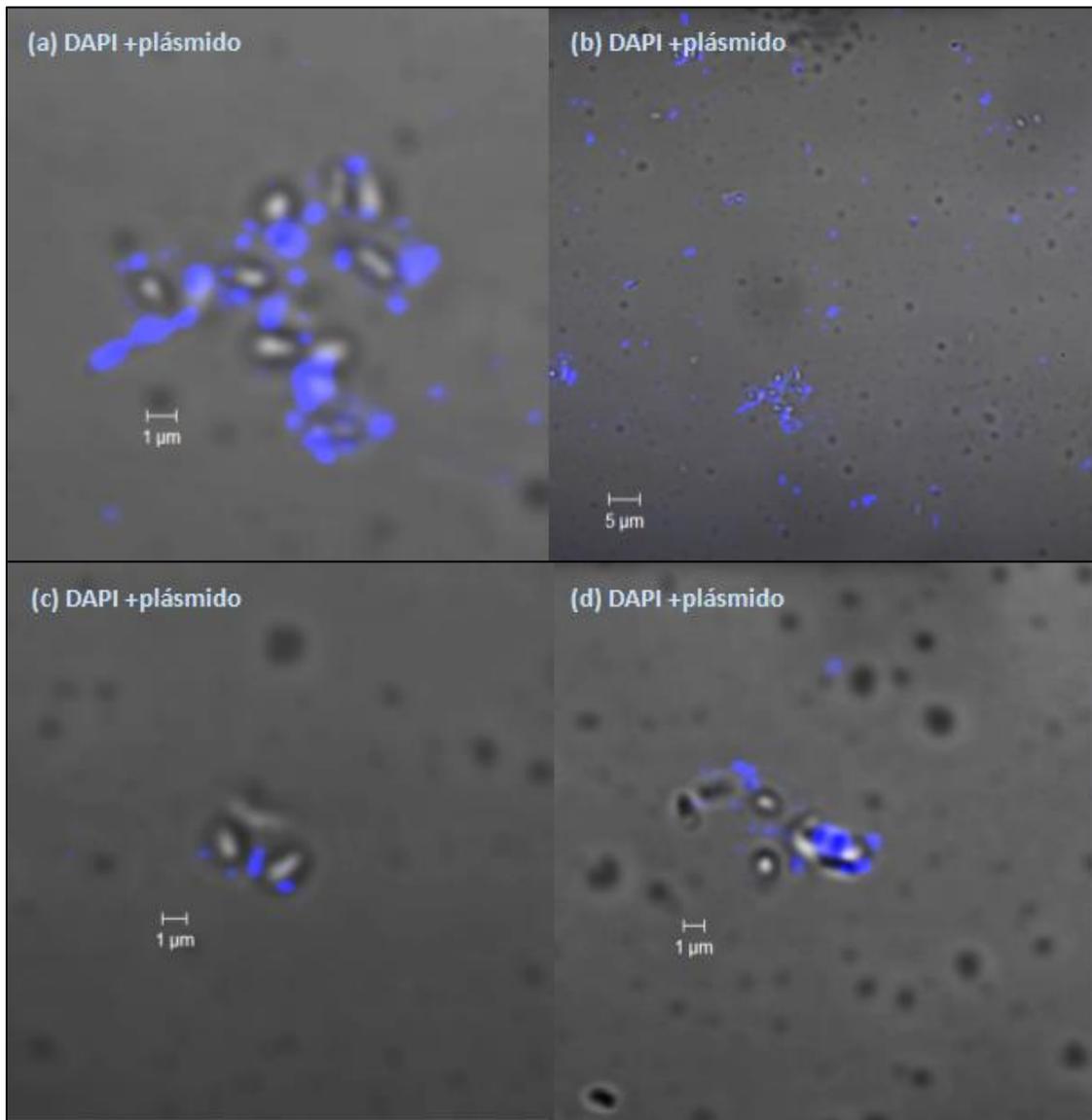


Fig. 47. Imágenes de microscopía confocal de VE preparadas en presencia de DNA plasmídico, y marcadas con DAPI (a-d).

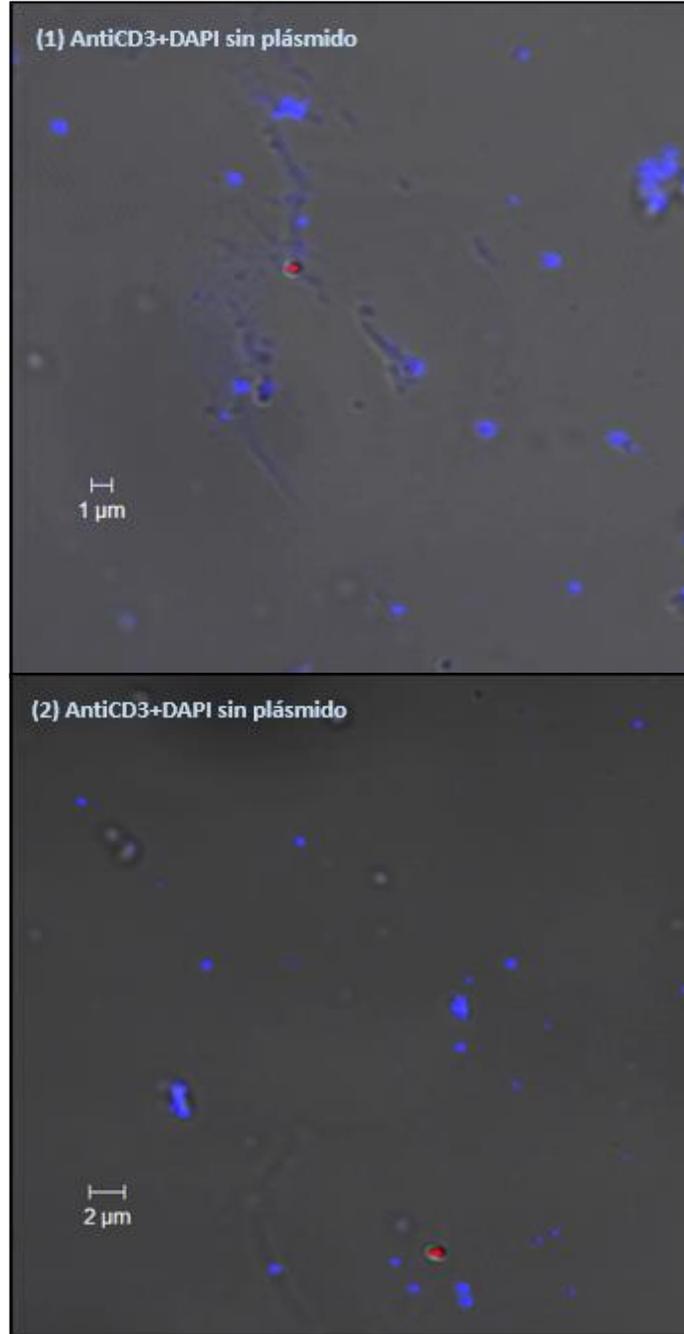


Fig. 48. Imágenes de microscopia confocal de VE marcadas con DAPI y anti-CD3e PE en ausencia de plásmido (1-2).

7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Las ondas de choque fueron utilizadas con éxito para la producción de vesículas extracelulares a partir de células eucariotas. La producción de vesículas fue dependiente del número de ondas de choque aplicadas. Además, se comprobó que células de distintas estirpes son susceptibles de ser utilizadas como material de origen para la producción de VE.

El marcaje con anti-CD3 PE demostró que el método de ondas de choque permite que las vesículas producidas retengan la funcionalidad de sus receptores de membrana, al llevar a cabo un reconocimiento de ligando-receptor. Esto sugiere fuertemente que las vesículas provenientes de linfocitos T son capaces de mantener la bioactividad de sus proteínas de membrana.

En contraste, la complejidad del material obtenido por tratamiento de células con ondas de choque es alta, e incluye la presencia de ácidos nucleicos provenientes de la ruptura celular o nuclear. Dicha complejidad impide la realización de pruebas de encapsulamiento en muestras no purificadas, y obliga a una purificación previa de vesículas de distintos tipos a través de gradientes de densidad.

La formación de VE bioactivas mediante ondas de choque se logra en un periodo de corta duración. Esto representa una gran ventaja, desde el punto de vista técnico, debido a que dichas vesículas no se ven afectadas por la temperatura que podría inhibir el metabolismo celular. Por ello, resulta factible considerar el método de ondas de choque para la producción de VE con potencial terapéutico.

Como perspectiva futura, la técnica de centrifugación por gradiente de sacarosa se probará como método de purificación más adecuado para evitar la formación de los conglomerados de VE observados claramente por TEM. A su vez, esto permitirá analizar las causas directas de la acumulación de las vesículas en agrupaciones y saber si son consecuencia del tratamiento por ondas de choque o de las ultracentrifugaciones subsiguientes. El método de centrifugación por gradiente de sacarosa permite la separación de las vesículas con base en las diferentes densidades de flotación, y se han obtenido resultados efectivos en otro estudio (Momen-Heravi et al., 2013)

Otra consideración en investigaciones futuras, es el uso de un solo tipo celular para la producción de VE, en este caso de linfocitos T. La generación de vesículas de un solo origen celular representa una ventaja para obtener resultados más homogéneos en los análisis de bioactividad y caracterización. Existen múltiples métodos para purificar células T, como por citometría de flujo con “Cell Sorting”, inmunomagnetismo o con el uso de una columna lana de vidrio, o bien también se puede utilizar una línea celular como Jurkat de linfocitos T humanos. Además, es necesario ampliar las pruebas de caracterización de VE, ya que no se hizo ningún análisis de contenido, los cuales son de suma importancia para su uso en nanomedicina.

8. REFERENCIAS

1. Abid Hussein, M. N., Nieuwland, R., Hau, C. M., Evers, L. M., Meesters, E. W., y Sturk, A. 2005. Cell- derived microparticles contain caspase 3 in vitro and in vivo. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3(5), 888-896.
2. Andaloussi, S. E., Mäger, I., Breakefield, X. O., y Wood, M. J. 2013. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nature reviews Drug discovery*, 12(5), 347-357.
3. Andersson, J., Möller, G., y Sjöberg, O. 1972. B lymphocytes can be stimulated by concanavalin A in the presence of humoral factors released by T cells. *European journal of immunology*, 2(1), 99-101
4. Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Lakhai, S., y Wood, M. J. 2011. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature biotechnology*, 29(4), 341-345.
5. Bao, S., Thrall, B. D., Gies, R. A., y Miller, D. L. 1998. In vivo transfection of melanoma cells by lithotripter shock waves. *Cancer research*, 58(2), 219-221.
6. Baietti, M. F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., Ivarsson, Y., Depoortere, F., Coomans, C., Vermeiren, E., Zimmermann, P., y David, G. 2012. Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nature cell biology*, 14(7), 677-685.
7. Bimboim, H. C., y Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research*, 7(6), 1513-1523.
8. Biosciences, B. D. 2000. *Introduction to Flow Cytometry: A learning guide. Manual Part, 1.*
9. Blanco, E., Shen, H., y Ferrari, M. 2015. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature biotechnology*, 33(9), 941-951.
10. Bobrie, A., Krumeich, S., Rey, F., Recchi, C., Moita, L. F., Seabra, M. C., Ostrowski, M., y Théry, C. 2012. Rab27a supports exosome-dependent and-independent mechanisms that modify the tumor microenvironment and can promote tumor progression. *Cancer research*, 72(19), 4920-4930.
11. Börger, V., Bremer, M., Görgens, A., y Giebel, B. 2016. Mesenchymal stem/stromal cell- derived extracellular vesicles as a new approach in stem cell therapy. *ISBT Science Series*, 11(S1), 228-234.

12. Buzas, E. I., György, B., Nagy, G., Falus, A., y Gay, S. 2014. Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. *Nature Reviews Rheumatology*, 10(6), 356-364.
13. Castaño, K. 2015. Efectos y Mecanismos en la Aplicación de Ondas de Choque en Células Humanas. Tesis de Licenciatura en Tecnología, UNAM, Querétaro.
14. Chaussy, C. H., Brendel, W., y Schmiedt, E. 1980. Extracorporeally induced destruction of kidney stones by shock waves. *The Lancet*, 316(8207), 1265-1268.
15. Chen, X., Liang, H., Zhang, J., Zen, K., y Zhang, C. Y. 2012. Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Trends in cell biology*, 22(3), 125-13.
16. Chen, G., Roy, I., Yang, C., y Prasad, P. N. 2016. Nanochemistry and Nanomedicine for Nanoparticle-based Diagnostics and Therapy. *Chemical reviews*, 116(5), 2826-2885.
17. Chivet, M., Javalet, C., Laulagnier, K., Blot, B., Hemming, F. J., y Sadoul, R. 2014. Exosomes secreted by cortical neurons upon glutamatergic synapse activation specifically interact with neurons. *Journal of extracellular vesicles*, 3.
18. Cicero, A. L., Stahl, P. D., y Raposo, G. 2015. Extracellular vesicles shuffling intercellular messages: for good or for bad. *Current opinion in cell biology*, 35, 69-77.
19. Claxton, N. S., Fellers, T. J., y Davidson, M. W. 2006. Laser scanning confocal microscopy. Department of Optical Microscopy and Digital Imaging, Florida State University, Tallahassee.
20. Clayton, A., Court, J., Navabi, H., Adams, M., Mason, M. D., Hobot, J. A., Newman, G., y Jasani, B. 2001. Analysis of antigen presenting cell derived exosomes, based on immuno-magnetic isolation and flow cytometry. *Journal of immunological methods*, 247(1), 163-174.
21. Clowes, R. C. 1972. Molecular structure of bacterial plasmids. *Bacteriological Reviews*, 36(3), 361.
22. Cocucci, E., Racchetti, G., y Meldolesi, J. 2009. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends in cell biology*, 19(2), 43-51.
23. Colombo, M., Raposo, G., y Théry, C. 2014. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual review of cell and developmental biology*, 30, 255-289.
24. Copeland, N. G., Zelenetz, A. D., y Cooper, G. M. 1979. Transformation of NIH/3T3 mouse cells by DNA of Rous sarcoma virus. *Cell*, 17(4), 993-1002.

25. Dutton, R. W. 1972. Inhibitory and stimulatory effects of concanavalin A on the response of mouse spleen cell suspensions to antigen I. Characterization of the inhibitory cell activity. *The Journal of experimental medicine*, 136(6), 1445-1460.
26. Erdbrügger, U., Rudy, C. K., E Etter, M., Dryden, K. A., Yeager, M., Klibanov, A. L., y Lannigan, J. 2014. Imaging flow cytometry elucidates limitations of microparticle analysis by conventional flow cytometry. *Cytometry Part A*, 85(9), 756-770.
27. Egerton, R. F. 2006. *Physical principles of electron microscopy: an introduction to TEM, SEM, and AEM*. Springer Science & Business Media.
28. Elgert, K. D. 2009. *Immunology: understanding the immune system*. John Wiley & Sons.
29. Fais, S., O'Driscoll, L., Borrás, F. E., et al. 2016. Evidence-based clinical use of nanoscale extracellular vesicles in nanomedicine. *ACS nano*, 10(4), 3886-3899.
30. Frisken, B. J. 2001. Revisiting the method of cumulants for the analysis of dynamic light-scattering data. *Applied Optics*, 40(24), 4087-4091.
31. Gangoda, L., Boukouris, S., Liem, M., Kalra, H., y Mathivanan, S. 2015. Extracellular vesicles including exosomes are mediators of signal transduction: are they protective or pathogenic? *Proteomics*, 15(2-3), 260-271.
32. Giepmans, B. N., Adams, S. R., Ellisman, M. H., y Tsien, R. Y. 2006. The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science*, 312(5771), 217-224.
33. Gratton, J. 2003. *Termodinámica: Introducción a la Mecánica Estadística*. Departamento de Física, Buenos Aires.
34. Grimm, R., Singh, H., Rachel, R., Typke, D., Zillig, W., y Baumeister, W. 1998. Electron tomography of ice-embedded prokaryotic cells. *Biophysical journal*, 74(2), 1031-1042.
35. Goldstein, J., Newbury, D. E., Echlin, P., Joy, D. C., Romig Jr, A. D., Lyman, C. E., y Lifshin, E. 2012. *Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis: a text for biologists, materials scientists, and geologists*. Springer Science & Business Media.
36. Gould, S. J., Booth, A. M., y Hildreth, J. E. 2003. The Trojan exosome hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(19), 10592-10597.
37. Gutiérrez- Vázquez, C., Villarroya- Beltri, C., Mittelbrunn, M., y Sánchez- Madrid, F. 2013. Transfer of extracellular vesicles during immune cell- cell interactions. *Immunological reviews*, 251(1), 125-142.

38. Hallett, F. R., Watton, J., y Krygsman, P. 1991. Vesicle sizing: number distributions by dynamic light scattering. *Biophysical journal*, 59(2), 357.
39. Huang, H. L., Hsing, H. W., Lai, T. C., Chen, Y. W., Lee, T. R., Chan, H. T., Lyu, P., Wu, C., Lu, Y., Lin, S., Lin, C., Lai, C., Chang, H., Chou, H. y Chan, H. 2010. Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells. *Journal of biomedical science*, 17(1), 1.
40. Jang, S. C., Kim, O. Y., Yoon, C. M., Choi, D. S., Roh, T. Y., Park, J., Nilsson, J., Lötvall, J., Kim, Y. y Gho, Y. S. 2013. Bioinspired exosome-mimetic nanovesicles for targeted delivery of chemotherapeutics to malignant tumors. *ACS nano*, 7(9), 7698-7710.
41. Kalra, H., Simpson, R. J., Ji, H., et al. 2012. Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation.
42. Katakowski, M., Buller, B., Zheng, X., Lu, Y., Rogers, T., Osobamiro, O., Shu W., Jiang, F. y Chopp, M. 2013. Exosomes from marrow stromal cells expressing miR-146b inhibit glioma growth. *Cancer letters*, 335(1), 201-204.
43. Kaszuba, M., McKnight, D., Connah, M. T., McNeil-Watson, F. K., y Nobbmann, U. 2008. Measuring sub nanometre sizes using dynamic light scattering. *Journal of Nanoparticle Research*, 10(5), 823-829.
44. Kim, D. K., Kang, B., Kim, O. Y., et al. 2013. EVpedia: an integrated database of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles. *Journal of extracellular vesicles*, 2.
45. Kodama, T., Doukas, A. G., y Hamblin, M. R. 2002. Shock wave-mediated molecular delivery into cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1542(1), 186-194.
46. Koga, K., Matsumoto, K., Akiyoshi, T., Kubo, M., Yamanaka, N., Tasaki, A., Nakashima, H., Nakamura, M., Kuroki, S., Tanaka, M., y Katano, M. 2005. Purification, characterization and biological significance of tumor-derived exosomes. *Anticancer research*, 25(6A), 3703-3707.
47. Kooijmans, S. A., Vader, P., van Dommelen, S. M., van Solinge, W. W., y Schiffelers, R. M. 2012. Exosome mimetics: a novel class of drug delivery systems. *International journal of nanomedicine*, 7, 1525.
48. Lauer, U., Bürgelt, E., Squire, Z., Messmer, K., Hofschneider, P. H., Gregor, M., y Delius, M. 1997. Shock wave permeabilization as a new gene transfer method. *Gene Therapy*, 4(7), 710-715.

49. Lee, E. Y., Choi, D. S., Kim, K. P., y Gho, Y. S. 2008. Proteomics in gram- negative bacterial outer membrane vesicles. *Mass spectrometry reviews*, 27(6), 535-555.
50. Lee, E. Y., Choi, D. Y., Kim, D. K., Kim, J. W., Park, J. O., Kim, S., Kim, S. H., Desiderio, D. M., Kim Y. K., Kim, K. P., y Gho, Y. S. 2009. Gram- positive bacteria produce membrane vesicles: Proteomics- based characterization of *Staphylococcus aureus*- derived membrane vesicles. *Proteomics*, 9(24), 5425-5436.
51. Linares, R., Tan, S., Gounou, C., Arraud, N., y Brisson, A. R. 2015. High-speed centrifugation induces aggregation of extracellular vesicles. *Journal of extracellular vesicles*, 4.
52. López-Marín, L. M., Millán-Chiu, B. E., Castaño-González, K., Aceves, C., Fernández, F., Varela-Echavarría, A., y Loske, A. M. 2016. Shock Wave-Induced Damage and Poration in Eukaryotic Cell Membranes. *The Journal of membrane biology*, 1-12.
53. Loske A. M. 2007. Shock wave physics for urologists. Querétaro, Mexico: Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, UNAM; ISBN 978-970-32-4377-8.
54. Loske A. M. 2017. Medical and Biomedical Applications of Shock Waves. Springer Verlag. ISBN 978-3-319-47568-4.
55. Lunavat, T. R., Jang, S. C., Nilsson, L., Park, H. T., Repiska, G., Lässer, C., Nilsson, J., Gho, Y. S., y Lötval, J. 2016. RNAi delivery by exosome-mimetic nanovesicles– Implications for targeting c-Myc in cancer. *Biomaterials*, 102, 231-238.
56. Malvern Instruments 2012. Dynamic light scattering: an introduction in 30 minutes. Technical Note Malvern.
57. Martínez, M. C., Larbret, F., Zobairi, F., Coulombe, J., Debili, N., Vainchenker, W., Ruat, M., y Freyssinet, J. M. 2006. Transfer of differentiation signal by membrane microvesicles harboring hedgehog morphogens. *Blood*, 108(9), 3012-3020.
58. Mathivanan, S., Fahner, C. J., Reid, G. E., y Simpson, R. J. 2012. ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids. *Nucleic acids research*, 40(D1), D1241-D1244.
59. Mathivanan, S., Hong, J., y Simpson, R. J. 2010. Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of proteomics*, 73(10), 1907-1920.
60. Mello, C., y Fire, A. 1995. DNA transformation. *Methods in cell biology*, 48, 451-482.

61. Michel, M. S., Erben, P., Trojan, L., Schaaf, A., Kiknavelidze, K., Knoll, T., y Alken, P. 2004. Acoustic energy: a new transfection method for cancer of the prostate, cancer of the bladder and benign kidney cells. *Anticancer research*, 24(4), 2303-2308.
62. Millán-Chiu, B., Camacho, G., Varela-Echavarría, A., Tamariz, E., Fernández, F., López-Marín, L. M., y Loske, A. M. 2014. Shock Waves and DNA-Cationic Lipid Assemblies: A Synergistic Approach to Express Exogenous Genes in Human Cells. *Ultrasound in medicine & biology*, 40(7), 1599-1608.
63. Mittelbrunn, M., Gutiérrez-Vázquez, C., Villarroya-Beltri, C., González, S., Sánchez-Cabo, F., González, M. Á., Bernard, A., y Sánchez-Madrid, F. 2011. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nature communications*, 2, 282.
64. Miyazaki, M., Obata, Y., Abe, K., Furusu, A., Koji, T., Tabata, Y., y Kohno, S. 2006. Gene transfer using nonviral delivery systems. *Peritoneal Dialysis International*, 26(6), 633-640.
65. Moghimi, S. M., Hunter, A. C., y Murray, J. C. 2005. Nanomedicine: current status and future prospects. *The FASEB Journal*, 19(3), 311-330.
66. Momen-Heravi, F., Balaj, L., Alian, S., Mantel, P. Y., Halleck, A. E., Trachtenberg, A. J., Soria, C. E., Ochin, S., Bonebreak C. M., Saracoglu, E., Skog, J., y Kuo, W. P. 2013. Current methods for the isolation of extracellular vesicles. *Biological chemistry*, 394(10), 1253-1262.
67. Montecalvo, A., Larregina, A. T., Shufesky, W. J., et al. 2012. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood*, 119(3), 756-766.
68. Murata, R., Nakagawa, K., Ohtori, S., Ochiai, N., Arai, M., Saisu, T., Sasho, T., Takahashi, T., y Moriya, H. 2007. The effects of radial shock waves on gene transfer in rabbit chondrocytes in vitro. *Osteoarthritis and Cartilage*, 15(11), 1275-1282.
69. Nassar, W., El-Ansary, M., Aziz, M. A., y El-Hakim, E. 2015. Extracellular vesicles: fundamentals and clinical relevance. *The Egyptian Journal of Internal Medicine*, 27(1), 1.
70. Newman, C. M. H., y Bettinger, T. 2007. Gene therapy progress and prospects: ultrasound for gene transfer. *Gene therapy*, 14(6), 465-475.
71. Ohl, C. D., e Ikin, R. 2003. Shock-wave-induced jetting of micron-size bubbles. *Physical review letters*, 90(21), 214502.
72. Owen, J. A., Punt, J., y Stranford, S. A. 2013. *Kuby immunology*. New York: WH Freeman.

73. Pan, B. T., y Johnstone, R. M. 1983. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*, 33(3), 967-978.
74. Pencer, J., y Hallett, F. R. 2003. Effects of vesicle size and shape on static and dynamic light scattering measurements. *Langmuir*, 19(18), 7488-7497.
75. Pol, E., Coumans, F., Varga, Z., Krumrey, M., y Nieuwland, R. 2013. Innovation in detection of microparticles and exosomes. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 11(s1), 36-45.
76. Rapley, R. 1998. *Molecular Biomethods Hand book*. Springer Science & Business Media.
77. Rani, S., y Ritter, T. 2015. *The Exosome- A Naturally Secreted Nanoparticle and its Application to Wound Healing*. *Advanced Materials*.
78. Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C. V., Melief, C. J., y Geuze, H. J. 1996. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *The Journal of experimental medicine*, 183(3), 1161-1172.
79. Raposo, G., y Stoorvogel, W. 2013. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of cell biology*, 200(4), 373-383.
80. Rassweiler, J. J., Knoll, T., Köhrmann, K. U., McAteer, J. A., Lingeman, J. E., Cleveland, R. O., Bailey, M. R., y Chaussy, C. (2011). Shock wave technology and application: an update. *European urology*, 59(5), 784-796.
81. Ratajczak, J., Wysoczynski, M., Hayek, F., Janowska-Wieczorek, A., y Ratajczak, M. Z. 2006. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia*, 20(9), 1487-1495.
82. Rhee, J. M., Purity, M. K., Lackan, C. S., Long, J. Z., Kondoh, G., Takeda, J., y Hadjantonakis, A. K. 2006. In vivo imaging and differential localization of lipid-modified GFP- variant fusions in embryonic stem cells and mice. *Genesis*, 44(4), 202-218.
83. Rivera, A. L., Gómez-Lim, M., Fernández, F., y Loske, A. M. 2012. Physical methods for genetic plant transformation. *Physics of life reviews*, 9(3), 308-345.
84. Robbins, P. D., y Morelli, A. E. 2014. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nature Reviews Immunology*, 14(3), 195-208.
85. Ruiz, E. A., Echavarría, A. V., de la Escalera, G. M., y Loske, A. M. 2006. Transfección de células por medio de ondas de choque. *Revista mexicana de física*, 52(4), 352.

86. Schmid, F. X. 2001. Biological Macromolecules: UV- visible Spectrophotometry. eLS.
87. Sahagún, J. L. O. 1997. Métodos de microscopia electrónica de barrido en biología. Universidad de Cantabria.
88. Sahoo, S., Klychko, E., Thorne, T., Misener, S., Schultz, K. M., Millay, M., Ito, A., Liu, T., Kamide, C., Agarwal H., Perlman, H., Qin, G., Kishore, R., y Losordo, D. W. 2011. Exosomes from human CD34+ stem cells mediate their proangiogenic paracrine activity. *Circulation research*, 109(7), 724-728.
89. Sanford, J. C. 1988. The biolistic process. *Trends in Biotechnology*, 6(12), 299-302.
90. Simpson, R. J., Jensen, S. S., y Lim, J. W. 2008. Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. *Proteomics*, 8(19), 4083-4099.
91. Simpson, R. J., Lim, J. W., Moritz, R. L., y Mathivanan, S. 2009. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential. *Expert review of proteomics*, 6(3), 267-283.
92. Stratton, D., Lange, S., y Inal, J. M. 2013. Pulsed extremely low-frequency magnetic fields stimulate microvesicle release from human monocytic leukaemia cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 430(2), 470-475.
93. Stewart, G. J., y Carlson, C. A. 1986. The biology of natural transformation. *Annual Reviews in Microbiology*, 40(1), 211-231. ISO 690
94. Subra, C., Laulagnier, K., Perret, B., y Record, M. 2007. Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie*, 89(2), 205-212.
95. Tauro, B. J., Greening, D. W., Mathias, R. A., Ji, H., Mathivanan, S., Scott, A. M., y Simpson, R. J. 2012. Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes. *Methods*, 56(2), 293-304.
96. Taylor, D. D., y Gercel-Taylor, C. 2013. The origin, function, and diagnostic potential of RNA within extracellular vesicles present in human biological fluids.
97. Théry, C., Boussac, M., Véron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J., y Amigorena, S. 2001. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *The Journal of Immunology*, 166(12), 7309-7318
98. Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., y Clayton, A. 2006. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current Protocols in Cell Biology*, 3-22.

99. Théry, C., Ostrowski, M., y Segura, E. 2009. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 9(8), 581-593.
100. Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brugger, B., y Simons, M. 2008. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*, 319(5867), 1244-1247.
101. Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A., y Burwinkel, B. 2011. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic acids research*, gkr254.
102. Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., y Lötvall, J. O. 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology*, 9(6), 654-659.
103. Van der Pol, E., Böing, A. N., Harrison, P., Sturk, A., y Nieuwland, R. 2012. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacological reviews*, 64(3), 676-705.
104. Van Niel, G., Porto-Carreiro, I., Simoes, S., y Raposo, G. 2006. Exosomes: a common pathway for a specialized function. *Journal of biochemistry*, 140(1), 13-21.
105. Vella, L. J., Sharples, R. A., Nisbet, R. M., Cappai, R., y Hill, A. F. 2008. The role of exosomes in the processing of proteins associated with neurodegenerative diseases. *European Biophysics Journal*, 37(3), 323-332.
106. Wubbolts, R., Leckie, R. S., Veenhuizen, P. T., Schwarzmann, G., Möbius, W., Hoernschemeyer, J., Slot, J. W., Geuze, H. J., y Stoorvogel, W. 2003. Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes Potential implications for their function and multivesicular body formation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(13), 10963-10972.
107. Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R. M., Andreu, Z., et al. 2015. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of extracellular vesicles*, 4.
108. Yuana, Y., Sturk, A., y Nieuwland, R. 2013. Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions. *Blood reviews*, 27(1), 31-39.
109. Zhou, Q., Li, M., Wang, X., Li, Q., Wang, T., Zhu, Q., Zhu, X., Wang, X., Gao, W., y Li, X. 2012. Immune-related microRNAs are abundant in breast milk exosomes. *Int J Biol Sci*, 8(1), 118-123.