

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“REVISIÓN DE PARÁMETROS Y
EFECTOS BIOLÓGICOS IMPLICADOS EN LA
TRANSFECCIÓN MEDIADA POR ONDAS DE CHOQUE”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

GISELLE SUZANE CAMACHO BANDA

DIRIGIDA POR

Dra. LUZ MARÍA LÓPEZ MARÍN

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2012



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**"REVISIÓN DE PARÁMETROS Y
EFECTOS BIOLÓGICOS IMPLICADOS EN LA
TRANSFECCIÓN MEDIADA POR ONDAS DE CHOQUE"**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

GISELLE SUZANE CAMACHO BANDA

DIRIGIDA POR

Dra. LUZ MARÍA LÓPEZ MARÍN

SINODALES

Dra. LUZ MARÍA LÓPEZ MARÍN

DIRECTOR

Dr. ACHIM MAX LOSKE MEHLING

SINODAL


Dra. SOFÍA MARÍA ARVIZU MEDRANO

SINODAL

Dr. SERGIO DE JESÚS ROMERO GÓMEZ

SINODAL









ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	
DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTOS	
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Ondas de choque	1
1.1.1. Física de las ondas de choque	1
1.1.2. Generación de ondas de choque	2
1.1.3. La cavitación: posible responsable de la permeabilidad celular	3
1.1.4. Antecedentes históricos	4
1.1.5. <i>Piezoson</i> , generador piezoeléctrico	5
1.1.6. Diversas aplicaciones de las ondas de choque	5
1.2 Transfección	6
1.2.1. Métodos de transfección	7
1.2.1.1. Transfección viral	8
1.2.1.2. Transfección mediada por nanovectores	8
1.2.1.3. Liposomas catiónicos	9
1.2.1.4. Transfección por electroporación	9
1.2.1.5. Transfección por ultrasonido	10
1.2.1.6. Transfección por ondas de choque	10
1.3 Parámetros y herramientas involucrados en ensayos de transfección	10
1.3.1 Viabilidad celular	11
1.3.2 Permeabilidad celular	11
1.3.3 Vectores moleculares	13
1.4 Citometría de flujo asistida por fluorescencia (FACS, del inglés Fluorescence Assisted Cell Sorting)	13

2. HIPÓTESIS	15
3. OBJETIVOS	16
3.1 General	16
3.2 Específicos	16
4. METODOLOGÍA	17
4.1 Material, reactivos y equipo de laboratorio	17
4.1.1. Materiales	17
4.1.2. Línea celular HEK293	18
4.1.3. Reactivos	18
4.1.4. Equipo	19
4.1.5. Generador de ondas de choque: Piezason 100 plus	19
4.2 Métodos	20
4.2.1 Cultivo celular	20
4.2.1.1. Descongelamiento	20
4.2.1.2. Propagación y mantenimiento	20
4.2.1.3. Almacenamiento de células	22
4.2.2 Selección de plásmido pCX::GFP-GPI2	22
4.2.2.1. Propagación del plásmido pCX::GFP-GPI2	24
4.2.2.2. Purificación de plásmido utilizando el Maxi kit-QIAGEN®	25
4.2.2.3. Caracterización molecular del plásmido pCX::GFP-GPI2	27
4.2.3 Preparación de los viales experimentales para tratamientos de ondas de choque	28
4.2.3.1. Viabilidad celular post-tratamientos	28
4.2.3.2. Pruebas de internalización de azul de tripano	28
4.2.3.3. Selección de fluorocromos	29
4.2.3.3.1. Calceína	29
4.2.3.3.2. Dextrano fluoresceinado	30
4.2.3.4. Internalización de fluorocromos	30
4.2.3.5. Estabilidad del plásmido	32
4.2.3.6. Transfección de células con plásmido desnudo o en complejo con lípidos catiónicos	32

4.2.3.7. Transfección de células HEK293 con plásmido pCX::GFP-GPI2 utilizando el método comercial FuGene®6	34
4.3 Diseño experimental	35
5. RESULTADOS	36
5.1. Búsqueda de condiciones para tratamientos de ondas de choque	36
5.1.1 Efecto del voltaje y del número de ondas de choque aplicadas sobre la mortalidad celular	36
5.1.2 Efecto del número de ondas de choque en la internalización de azul de tripano	37
5.2. Ensayos de permeabilidad celular con el fluorocromo ácido calceína	37
5.2.1. Observaciones al microscopio de fluorescencia	37
5.2.2. Análisis de la internalización de calceína	39
5.2.3. Análisis de la calceína internalizada por citometría de flujo	43
5.3. Internalización de FD-10 Dextrano	45
5.3.1. Observaciones al microscopio de fluorescencia	45
5.3.2. Análisis de FD-10 dextrano internalizado por citometría de flujo	47
5.3.3. Microscopia confocal	49
5.4. Efectos de ondas de choque sobre el ADN plasmídico	49
5.4.1. Caracterización del plásmido	49
5.4.2. Estabilidad del plásmido a tratamientos de ondas de choque	51
5.5. Eficiencia de transfección del plásmido desnudo o en complejo con lípidos catiónicos	59
5.5.1. Análisis de fluorescencia por citometría de flujo	59
5.5.2. Microscopia confocal de células transfectadas	63
6. DISCUSIÓN	64
6.1. Búsqueda de condiciones para tratamientos de ondas de choque	64
6.1.1. Efecto del voltaje y del número de ondas de choque aplicadas sobre la mortalidad celular	64
6.1.2. Efecto del número de ondas de choque en la internalización de azul de tripano	65

6.2. Ensayos de permeabilidad celular con el fluorocromo ácido calceína	66
6.2.1. Observaciones al microscopio de fluorescencia	66
6.2.2. Análisis de la internalización de calceína	66
6.2.3. Análisis de la calceína internalizada por citometría de flujo	67
6.3. Internalización de FD-10 Dextrano	68
6.3.1. Observaciones al microscopio de fluorescencia	68
6.3.2. Análisis de FD-10 dextrano internalizado por citometría de flujo	68
6.3.3. Microscopia confocal	69
6.4. Efectos de ondas de choque sobre el ADN plasmídico	69
6.4.1. Caracterización del plásmido	69
6.4.2. Estabilidad del plásmido a tratamientos de ondas de choque	69
6.5. Eficiencia de transfección del plásmido desnudo o en complejo con lípidos catiónicos	71
6.5.1. Análisis de fluorescencia por citometría de flujo	71
6.5.2. Microscopia confocal de células transfectadas	71
7. CONCLUSIONES	73
8. REFERENCIAS	74

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Mezclas para digestión del plásmido	27
2	Carga de digestiones del plásmido pCX::GFP-GPI2	27
3	Carga de muestras post-tratamientos (controles/SW)	32
4	Composición de muestras de plásmido para ensayos de transfección	33
5	Cálculo de eficacia de permeabilidad celular contra el número de ondas de choque aplicadas	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Onda de choque típica generada por un litotritor extracorpóreo	2
2	Cavitación mediante ondas de choque	3
3	Base esférica cóncava de aluminio	7
4	Ejemplos de fosfolípidos de membrana que presentan una carga neta negativa	12
5	Esquema típico de un citómetro de flujo	14
6	Fotografía que muestra el generador de ondas de choque Piezason 100 plus con sus diferentes componentes	21
7	Cálculo de la densidad celular	23
8	Mapa que muestra los componentes del plásmido pCX::GFP-GPI2	24
9	Fotografía de <i>E. coli XL-BLUE</i> transformantes	25
10	Estructura de la calceína.	29
11	Estructura del FITC/Dextrano	30
12	Densidad celular post-tratamiento al utilizar ondas de choque en diferentes cantidades e intensidad	36
13	Internalización de azul de tripano en células tratadas con ondas de choque	37
14	Análisis de calceína internalizada en células tratadas con ondas de choque	38
15	Permeabilidad celular contra el número de ondas de choque aplicadas	40

16	Sobrevivencia celular con los tratamientos de ondas de choque seleccionados	40
17	Internalización de calceína en tratamientos con ondas de choque	41
18	Internalización de calceína en células control	42
19	Parámetros de luz dispersada hacia el frente (FSC, del inglés forward scatter) y de la luz dispersada hacia los lados (SSC, del inglés side scattering) de células HEK293 en suspensión	43
20	Histogramas comparativos de internalización de calceína, analizada por citometría de flujo	44
21	Fluorescencia internalizada en células control y células tratadas con números crecientes de ondas de choque (en intensidad media de fluorescencia, IMF)	45
22	Fluorocromo FD-10 dextrano internalizado	46
23	Histogramas comparativos de internalización de FD-10 dextrano por citometría de flujo en el BD FACSCalibur	47
24	Intensidades medias de fluorescencia de células control y células tratadas con números crecientes de ondas de choque en presencia de dextrano fluoresceinado de 10 kDa	48
25	Imágenes confocales de células tratadas en presencia de FD10	49
26	Gel de agarosa al 1% del plásmido pCX::GFP-GPI2 tratado con enzimas	50
27	Gel de agarosa al 1% del plásmido pCX::GFP-GPI2 incubado a 37°C con medio de cultivo DMEM suplementado con suero fetal bovino	52
28	Gel de agarosa al 1% del plásmido pCX::GFP-GPI2 sometido a tratamientos de ondas de choque en presencia de medio de cultivo con suero fetal bovino	53

29	Gel de agarosa al 1% del plásmido pCX::GFP-GPI2 y de componentes del medio de cultivo	54
30	Gel de agarosa al 1% del plásmido pCX::GFP-GPI2 incubado en agua de PiSA a 37°C, sin ondas de choque (SW)	55
31	Gel de agarosa al 1% del plásmido pCX::GFP-GPI2 en agua de PiSA , sometido a tratamientos de ondas de choque (SW)	56
32	Gel de agarosa al 1% del plásmido pCX::GFP-GPI2 incubado a 37°C en medio DMEM sin SFB ni antibiótico	57
33	Gel de agarosa al 1% del plásmido pCX::GFP-GPI2 sometido a tratamientos de ondas de choque (SW) en medio DMEM no suplementado	58
34	Análisis por citometría de flujo de la fluorescencia verde VS tamaño de partícula en muestras de células tratadas con plásmido desnudo y diferentes dosis de ondas de choque	60
35	Análisis por citometría de flujo de la fluorescencia verde VS tamaño de partícula en muestras de células tratadas con plásmido cationizado y diferentes dosis de ondas de choque	61
36	Análisis comparativo de las intensidades medias de fluorescencia presentadas en células tratadas con plásmido desnudo o cationizado y diferentes dosis de ondas de choque	62
37	Análisis de la fluorescencia en células transfectadas con el método comercial FuGene®6	62
38	Células transfectadas con el plásmido pCX::GFP-GPI2 analizadas por microscopía confocal	63

RESUMEN

El término transfección se refiere a la introducción de ADN exógeno en células eucariotas. Su uso tiene gran potencial para tratar ciertas enfermedades heredadas y adquiridas. Actualmente, la falta de métodos eficaces y seguros para insertar material nucleico al interior de las células constituye una limitante. Las ondas de choque son frentes de alta presión que pueden concentrarse en áreas definidas de un tejido. Su principal uso es la litotricia extracorpórea, pero se ha reportado su capacidad de mediar la entrada de ADN al interior celular. En este trabajo se identificaron parámetros para la generación de ondas de choque que fueran capaces de permeabilizar células, evaluando posteriormente la utilidad del método para la transfección de células HEK293. La permeabilización fue monitoreada mediante la internalización de fluorocromos (calceína y FITC-Dextrano). Se utilizó el plásmido pCX::GFP-GPI2, con un gen reportero que codifica para la proteína verde fluorescente, *egfp*. La eficacia del método de transfección fue evaluada utilizando el plásmido desnudo o en complejo con lípidos catiónicos. Los datos fueron analizados por microscopía de epifluorescencia, microscopía confocal y citometría de flujo asistida por fluorescencia. Se seleccionaron condiciones capaces de permeabilizar, conservando una alta viabilidad celular, minimizando la degradación de plásmido y evitando repulsión eléctrica entre éste y la superficie celular. Los mejores parámetros evaluados correspondieron al uso de 60 ondas de choque (12.25 Mpa) y uso del plásmido en complejo con lípidos catiónicos. Los datos obtenidos apoyan el uso de ondas de choque para transfección celular, siendo una novedosa alternativa para terapia génica no invasivo.

Por tanto, al Rey de los siglos, incorruptible, invisible, al único Dios, sea honor y gloria por los siglos de los siglos. Amén. 1 Timoteo 1:17.

Dedico con amor esta tesis a mi mami Gaby y mi hermanito David, quienes comprendiendo mis ideales, me han alentado y apoyado a seguir mi camino de incursionar en este asunto maravilloso de la ciencia.

AGRADECIMIENTOS

Muchas gracias a mi tutora la Dra. Luz María López por todo su apoyo y dedicación como tutora, por compartir su conocimiento y ser mi guía durante el desarrollo de este proyecto y sobretodo su confianza.

Le agradezco al Dr. Achim Max Loske por su apoyo y revisiones del trabajo final.

Le agradezco a la Dra. Blanca Millán por ayudarme a la conclusión de este proyecto, su apoyo moral y amistad.

Gracias al M. en C. Francisco Fernández Escobar y a la Q. Concepción Arredondo por su apoyo y guía para el uso de los equipos.

Agradezco a la Ing. Elsa Nydia Hernández de la Unidad de Microscopia del Instituto de Neurobiología, Campus Juriquilla y al QFB Carlos Castellanos de la Unidad de Citofluorometría, en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, ambos de la Universidad Nacional Autónoma de México. Agradezco también a la Dra. Anaid Antaramian y a la M. en C. Adriana González Gallardo de la unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología, Campus Juriquilla.

A los miembros de los seminarios de nanobio-ondas.

Este proyecto fue realizado con apoyo de la DGAPA (UNAM) a través de los proyectos PAPIIT IT200512-3 e IN108410 para financiamiento y otorgamiento de becas. Toda la investigación contenida en esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Ondas de Choque y el Laboratorio de Nanobióptica, ambos ubicados en el Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada de la Universidad Autónoma de México Campus Juriquilla.

1. ANTECEDENTES

1.1 Ondas de choque

Una onda de choque se define como una onda mecánica en la que la presión se eleva del nivel ambiente o de equilibrio a una presión máxima en pocos nanosegundos (10^{-9} seg). En la actualidad, para uso terapéutico, se emplean amplitudes de presión con un rango entre 10 y 100 Megapascuales (MPa). Un megapascal equivale aproximadamente a 10 bar, lo que equivale diez veces la presión atmosférica. Es posible calcular la amplitud de la presión de un frente de choque, conociendo el medio en que viaja y su energía. Lo anterior depende de la dimensión espacial entre el punto en el que la presión atmosférica prevalece y aquel en el que se logra la máxima amplitud de la onda (Leal y col., 2002).

Los litotritores, equipos que generan ondas de choque para litotricia extracorpórea, generalmente producen pulsos de microsegundos con un pico de presión positiva (P^+) en un intervalo de 30 a 150 MPa, con una duración de entre 0.5 y 3 μ s, seguido por un pulso de tensión con una amplitud (P^-) de -20 MPa y una duración de entre 2 a 20 μ s. En la Figura 1, el tiempo de ascensión t_r se define como el tiempo necesario para que la presión se incremente de un 10% a un 90% del pico positivo de presión P^+ . La duración del pulso de presión, t^+ , se define como el ancho del pulso a la mitad de la amplitud máxima de la presión positiva, P^+ (FWHM = full width half maximum), y t es el tiempo entre P^+ y P^- . Se acostumbra llamarle “onda de choque” a todo el perfil de presión, aunque el término debería restringirse sólo a la transición inicial (Canseco y col., 2011).

1.1.1. Física de las ondas de choque

Las ondas de choque consisten en un pulso de compresión seguido de un pulso de rarefacción. Los líquidos generalmente poseen gases disueltos y burbujas con diámetros menores a una décima de milímetro. Al paso de una onda de choque, estas diminutas burbujas se comprimen súbitamente por la acción del pulso positivo (compresión) de la onda de choque. Un instante después, la presión disminuye drásticamente, aumentándoles su volumen cientos de veces. Este crecimiento dura aproximadamente 50 μ seg. Posteriormente, el volumen de las burbujas no varía mucho durante 200 a 450 μ seg, para finalmente sufrir un colapso violento. Durante

el colapso, cada burbuja puede emitir ondas de choque secundarias muy intensas, así como pequeños chorros de líquido a velocidades de hasta 400 m/seg (Figura 2) (Armenta y col., 2006).

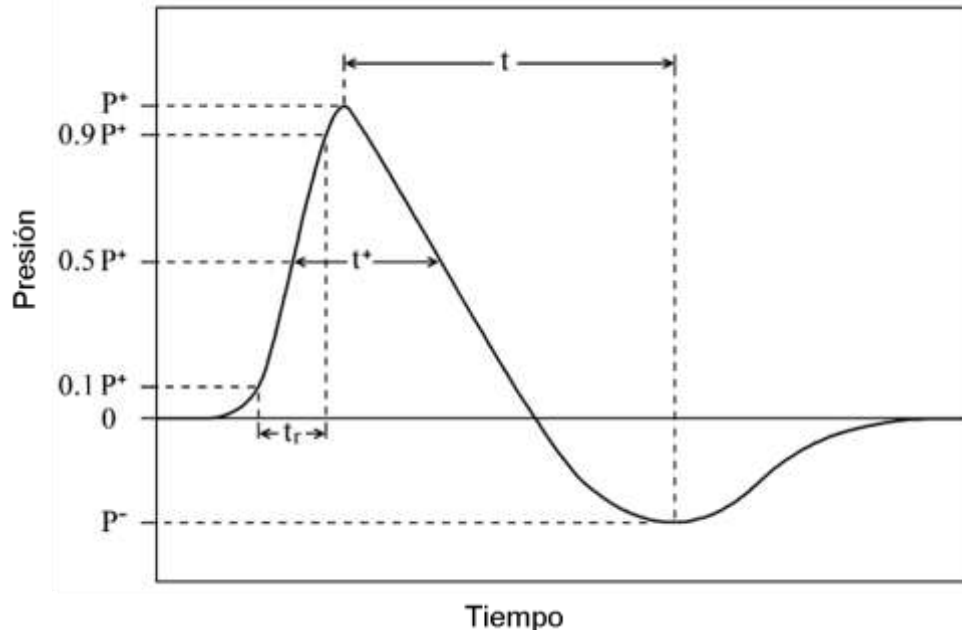


Figura 1. Onda de choque típica generada por un litotritor extracorpóreo. Se indica el tiempo de ascenso t_r , la duración del pulso t^+ , y el tiempo t entre la presión positiva máxima, P^+ y el valor mínimo de presión, P^- (Canseco y col., 2011).

1.1.2. Generación de ondas de choque

Debido a que las propiedades acústicas del agua y de los tejidos son similares, en medicina las ondas de choque se generan en agua. Con ello se evitan reflexiones indeseadas en la piel del paciente. Además, en agua es posible generar ondas de choque con una presión mucho mayor que en el aire, usando la misma energía inicial. Esto se debe a que es mucho más difícil comprimir agua que aire. Los métodos para generar ondas de choque en agua son: por detonaciones con microexplosivos, concentrando la energía de un rayo láser en una región muy pequeña (láser), generando un movimiento brusco de una membrana o bobina (electromagnético), con la excitación de cristales piezoeléctricos (piezoeléctrico) y por la ruptura eléctrica entre dos electrodos (electrohidráulico). Cabe señalar que cada uno de estos métodos tiene efectos secundarios y limitaciones propias (Armenta y col., 2006).

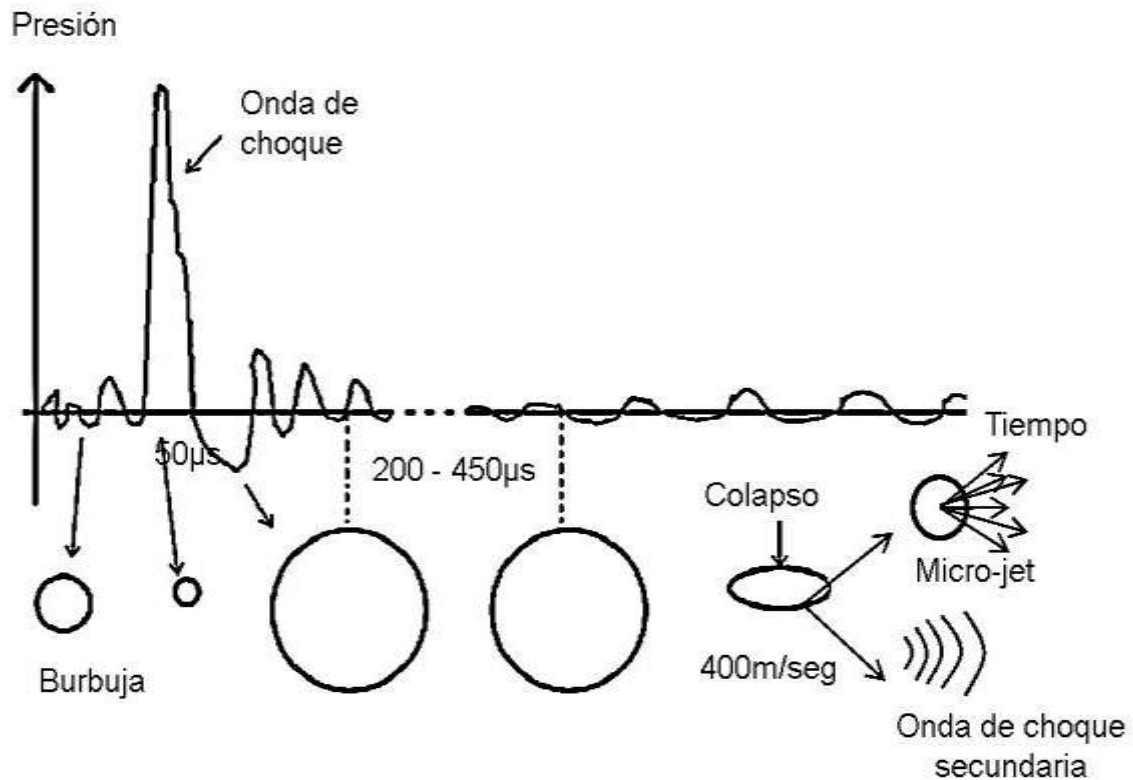


Figura 2. Cavitación mediante ondas de choque. La figura muestra el fenómeno de cavitación, pasando del equilibrio a la compresión de burbujas en el medio, seguida por la dilatación de estas y terminando en el colapso de las burbujas generando micro-jets y ondas de choque.

1.1.3. La cavitación: posible responsable de la permeabilidad celular

Se sabe que las ondas de choque son capaces de permeabilizar la membrana celular en tejidos. A este respecto se cree que la cavitación (formación y colapso de burbujas en un fluido) creada por el paso de una onda de choque es el principal fenómeno que aumenta la permeabilidad de la membrana, ya que produce microjets que serían capaces de generar permeabilidad transitoria en la membrana celular (Ohi y Wolfrum, 2003; Bekeredjian y col., 2007). Este efecto de las ondas de choque ha sido evaluado como un método para permitir la entrada de material genético (transfección) en células tratadas (Kodama y col., 2000; Tschoep y col., 2001; Michel y col., 2004; Trojan y col., 2004; Doukas y Kolliasb, 2004; Armenta y col., 2006; Murata y col., 2007; Ogura y col., 2007; Prakash y col., 2011; Loske y col., 2011; Rivera y col., 2012). Las ondas de choque han representado un método no invasivo para fines terapéuticos. Han mostrado utilidad para tratamientos

ortopédicos, incluyendo pacientes pediátricos, por lo que su aplicación para transfección celular es una estrategia muy llamativa.

Profundizar en el estudio de los efectos que las ondas de choque tienen en las células y el material genético puede ayudar a consolidar este método de transfección y aumentar su eficiencia. Importantemente, la cavitación acústica inducida por ultrasonido es comúnmente utilizada para fragmentar material genético, por lo que la estabilidad del ADN ante tratamientos por ondas de choque debe ser evaluada (Kochanski y col., 2001). Además, la repulsión de cargas electrostáticas entre el material nucleico ácido y la superficie de las células disminuye la eficiencia de los tratamientos (Kuhn y col., 2000).

1.1.4. Antecedentes históricos

Los efectos de las ondas de choque en agua en tejido humano fueron documentados por primera vez durante la Segunda Guerra Mundial cuando se observó que el tejido pulmonar era destruido debido a las explosiones de bombas en el agua aunque no se presentaba ningún daño físico externo (Wang, 2003). Sin embargo, las investigaciones para fines terapéuticos sobre la interacción entre las ondas de choque y los tejidos biológicos en animales comenzaron en Alemania entre los años 1968 y 1971. Una de las principales aplicaciones de las ondas de choque en medicina es la ruptura de cálculos urinarios sin cirugía, denominada litotricia extracorpórea. En 1980, Christian Chaussy (Chaussy y Schmiedt, 1984) fue el primero en practicar una litotricia extracorpórea a un paciente humano en Múnich, Alemania, utilizando el prototipo de un litotritor clínico fabricado por la empresa Dornier, denominado Human Model 1 (HM1). A este primer tratamiento le siguieron diversas investigaciones de la aplicabilidad terapéutica de las ondas de choque que fueron producto de la colaboración de la empresa Dornier y el Departamento de Urología de la Universidad de Múnich. Más de treinta años después, la litotricia extracorpórea sigue siendo la primera opción para el tratamiento de la mayoría de pacientes litiásicos (Reina y col., 2002).

En la actualidad existen diferentes maneras de generar ondas de choque para litotricia extracorpórea, todas ellas bajo un mismo principio: comprimir repentinamente el medio de propagación, para generar una onda de compresión y

concentrarla hacia el interior del cuerpo mediante espejos o reflectores. Los aparatos que realizan esta tarea son llamados generadores de ondas de choque (Kolzer y García, 2001).

1.1.5. Piezoson, generador piezoeléctrico

Alrededor del año 1980, Jacques y Pierre Curie descubrieron una inusual característica en ciertos cristales minerales. Cuando estos cristales eran sometidos a una fuerza mecánica, se polarizaban, es decir que la tensión y la compresión de un cristal generaba una diferencia de potencial. Este fenómeno físico actualmente se denomina piezoelectricidad. La evolución tecnológica de los materiales cerámicos suplantó a los materiales piezoeléctricos naturales y dio origen a la siguiente generación de materiales piezoeléctricos usados en aplicaciones para la acústica, óptica, medicina y comunicación inalámbrica. Los elementos piezoeléctricos son fabricados de cristales de niobato de litio, cuarzo sintético, cerámicas de bario o de circonato de plomo y otros materiales que pueden exhibir propiedades piezoeléctricas significativamente superiores a los elementos policristalinos. La relativa insensibilidad a la temperatura, la conversión de energía mecánica a eléctrica eficiente y rápida, y viceversa, entre otros atributos, hacen que a estos materiales se les pueda dar un uso muy diverso (Jaffe y col., 1971).

Al expandirse súbitamente, un cristal de este tipo puede comprimir fuerte y rápidamente el medio que lo circunda (por ejemplo agua) y generar una onda de compresión, que al ser concentrada puede degenerar en una onda de choque. En la práctica (ver Figura 3) se forman arreglos de cientos de pequeños cristales piezoeléctricos sobre la superficie cóncava de un cascarón esférico, de manera que las contribuciones de cada uno de estos elementos se suman. Por la geometría que tiene el arreglo de cristales, las contribuciones se concentran hacia el centro o foco de dicho cascarón (Loske y Prieto, 1999).

1.1.6. Diversas aplicaciones de las ondas de choque

El éxito de la aplicación de las ondas de choque en litotricia extracorpórea motivó la investigación de otras aplicaciones de este tipo de ondas en medicina. Una ventaja radica en que estas ondas son generadas fuera del cuerpo, pueden hacerse pasar a través de él sin causar daños significativos a la mayoría de los tejidos y

concentrarse en una región pequeña dentro del organismo. Además de la litotricia, otra aplicación de uso creciente de las ondas de choque en medicina ha sido para fines ortopédicos. Numerosos estudios han mostrado que las ondas de choque promueven efectos regenerativos, según el nivel de energía utilizado. A un nivel de energía bajo, las ondas de choque se utilizan como agente reductor del dolor. A un nivel de energía intermedio, comparado con la litotricia extracorpórea, el método puede ser enfocado a casos de cicatrización lenta en fracturas óseas y desintegración de calcificaciones (Galkowski y col., 2009; Ioppolo y col., 2012; Zhao y col., 2012). Por otro lado, también se ha visto su aplicación en tumores malignos, encontrándose que inhiben hasta cierto grado su crecimiento (Gambihler y col., 1994; Shi y col., 2003; Trojan y col., 2004; Kavindra y col., 2012; Naumann y col., 2012). Además se han utilizado para promover la angiogénesis en enfermedades cardiovasculares o la trombólisis (Miao y col., 2012; Wong y col., 2012). Actualmente se han desarrollado dispositivos con la capacidad de generar microjets, con el fin de ser utilizados para vacunación sin uso de agujas (Prakash y col., 2011).

Recientemente se reportaron resultados de estudios experimentales sobre los efectos que producen las ondas de choque sobre ciertos microorganismos. Una posible aplicación podría ser la conservación de alimentos (Wang, 2003; Loske y col., 2010).

La interacción de las ondas de choque con la materia abre un campo muy interesante, en el cual aún hay mucho por hacer (Loske y Prieto, 1999).

1.2 Transfección

El término “transfección” se refiere a la introducción de ADN exógeno en células eucariotas. Su uso tiene gran potencial para el tratamiento de algunas enfermedades heredadas y adquiridas. El paso crítico para la introducción de material nucleico en una célula es la permeabilización de la membrana que la rodea. Es por esto que han sido desarrollados muchos métodos con el fin de producir una permeabilización transitoria en las células sin ocasionar efectos citotóxicos (Kodama y col., 2000; Madigan y col., 2003, Doukas y Kolliasb, 2004; Ogura y col., 2007).

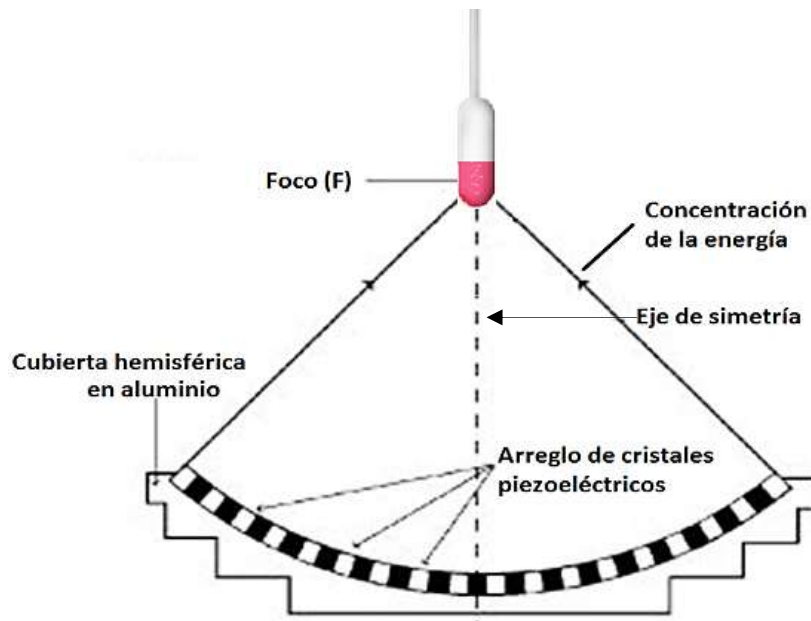


Figura 3. Base esférica cóncava de aluminio. Las ondas de choque son frentes de presión que pueden ser generadas a través de cristales piezoeléctricos, y concentradas en un punto focal (F) en un medio acuoso. Este punto puede ser un vial con células experimentales dentro de él o un órgano, el cual recibe la energía generada de manera extracorpórea (Loske y col., 2001).

1.2.1. Métodos de transfección

Actualmente existen diversos métodos de transfección. Estos incluyen (1) métodos químicos: detergentes tales como la digitonina que altera la estructura lipídica de la membrana, toxinas bacterianas como la estreptolisina O, co-precipitación con fosfato de calcio, liposomas artificiales; (2) métodos físicos: campos eléctricos pulsados (electroporación), ultrasonido, biobalística, microinyección y ondas de choque, entre otros (Kodama y col., 2000). Cada uno de estos métodos presenta ventajas e inconvenientes. Una de las principales limitantes de los métodos de transfección es su difícil aplicabilidad *in vivo*. Las ondas de choque podrían representar un método físico no invasivo de transfección aplicable *in vivo*. (Armenta y col., 2006).

Los primeros pasos de evaluación de un método de transfección son normalmente realizados mediante experimentación *in vitro*. Estos ensayos pueden enfocarse a optimizar condiciones en una línea celular dada o en un tejido.

A continuación se enumeran los métodos más comunes de transfección para aplicaciones *in vivo*.

1.2.1.1. Transfección viral

Los vectores virales son sistemas biológicos genéticamente modificados derivados de virus con la capacidad de transferir su material genético a células hospedadoras. Muchos tipos de virus, incluyendo los retrovirales, adenovirus, virus del herpes simple (VHS) y virus adeno-asociados (AAV) han sido modificados para eliminar su toxicidad y mantener su alta capacidad de transferencia genética. Los vectores virales son capaces de lograr una alta eficiencia en la entrega de genes y su expresión mediante su maquinaria de penetración y mecanismos intracelulares (Morille y col., 2008). Sin embargo, las limitaciones asociadas a los vectores virales son la dificultad y alto costo de producción, difícil administración debido a que inducen la respuesta inmune humoral y celular, inserciones mutagénicas al azar por integración del ADN foráneo en el genoma celular y un bajo tamaño de transgenes. A pesar de esto en la actualidad este es el único método utilizado para terapia génica (Wolfgang y Ulrike, 2000; Maher, 2002; Kesari y col., 2012; Huang y Kamihira, 2012; Kildebeck y col., 2012). Es debido a las limitantes de este método que ha sido alentada la búsqueda de otros sistemas alternativos como los nanovectores (Mohammed y Xiang, 2009) o los métodos físicos.

1.2.1.2. Transfección mediada por nanovectores

Los nanovectores se conforman de lípidos, péptidos, o polímeros. Consisten en una cadena principal catiónica capaz de formar complejos estables con el material genético por interacciones electrostáticas con el ADN cargado negativamente, siendo además modificados por la incorporación de grupos funcionales, y a menudo combinados con biomateriales para mejorar su citocompatibilidad (Mellott y col., 2012). Actualmente existe una gran variedad de nanopartículas tales como los lípidos catiónicos, polímeros catiónicos, nanopartículas de oro, magnéticas y de sílice, los quantum dots u puntos cuánticos (nanomateriales semiconductores), los fulerenos (moléculas estructurales de carbono, insolubles), los CTN (nanotubos de carbono, o fulerenos cilíndricos) y sistemas supramoleculares (por ejemplo sacáridos funcionalizados y oligómeros de tetraguanidina) (Katragadda y col.,

2010), partículas pseudovirales, virus sintéticos generados con estructuras multiproteicas que mimetizan la organización y conformación de los auténticos virus nativos, pero carecen del genoma viral. Actualmente estas estructuras supramoleculares han sido utilizadas como vacunas (Pichon y col., 2010), entre otros. Las ventajas asociadas a este tipo de vectores incluyen: su simplicidad, fácil producción a gran escala, falta de respuesta inmune específica, la posibilidad de modificaciones seleccionadas y la capacidad de llevar grandes insertos (Li y Huang, 2000).

Aunque los beneficios terapéuticos de los vectores no virales han sido ampliamente demostrados en modelos animales, su baja eficiencia de transfección (Mohammed y Xiang, 2009) y riesgos de toxicidad (Hongtao y col., 2006) sigue siendo un obstáculo para aplicaciones clínicas.

1.2.1.3. Liposomas catiónicos

La transfección mediada por liposomas utiliza vesículas de membranas artificiales, que contienen grupos funcionales catiónicos para mediar interacciones apropiadas de adherencia y fusión a la membrana celular cargada negativamente. Los liposomas protegen el ADN, al empacarlo para internalización celular y protegerlo de la degradación (Sambrook y Russell, 2001; Wang y col., 2012). Es un método altamente eficiente para la transfección de células animales, levaduras y protoplastos (Allison, 2007). Su principal inconveniente son las dosis tóxicas necesarias para aplicaciones sistémicas, lo cual conlleva un alto costo (Morille y col., 2008).

1.2.1.4. Transfección por electroporación

La electroporación es la aplicación de breves pulsos eléctricos de alto voltaje, produciendo poros nanométricos en la membrana plasmática y la introducción de ADN al citoplasma a través de los poros. Es una técnica útil en una gran variedad de tipos celulares y tejidos, pero resulta agresiva e invasiva (Sambrook y Russell, 2001). Es un método eficiente para la transfección de levaduras, así como para células animales y vegetales (Allison, 2007), sin embargo, es necesario el diseño de electrodos apropiados para fijar las condiciones de los pulsos eléctricos (voltaje, duración del impulso, número de pulsos) según la aplicación (Nakamura, 2009).

1.2.1.5. Transfección por ultrasonido

El ultrasonido consiste en una onda mecánica que conlleva energía y puede inducir fenómenos tales como calentamiento, transmisión y cavitación cuando es propagado a través de células o tejidos (Liang y col., 2010). Los efectos de cavitación inducida incrementan la permeabilidad temporal de la membrana celular por la producción de agujeros temporales en la bicapa fosfolipídica, fenómeno denominado sonoporación, que permite la introducción de moléculas de ADN dentro de la célula. Es un método mecánico poco menos invasivo que la electroporación, ya que se trata de ondas acústicas que pueden propagarse a través del tejido blando y alcanzar órganos internos (Zhang y col., 2012). Normalmente se requiere de ultrasonido de alta energía para producir cavitación, que causa un incremento en la temperatura y daños mecánicos a la muestra. La presencia de micro-burbujas puede reducir significativamente los niveles de energía requeridos para la producción de cavitación acústica (Nakamura, 2009).

1.2.1.6. Transfección por ondas de choque

Entre los diversos métodos de transfección que existen, el ultrasonido y las ondas de choque extracorpóreas han sido considerados como buenos métodos físicos para mejorar la introducción de genes de interés. Hasta ahora, las ondas de choque han sido objeto de estudios con resultados muy variables. En particular, la eficiencia para la transferencia de genes ha sido baja, al ser comparada con el ultrasonido. Ambas técnicas sufren de una baja eficiencia de transfección al ser comparadas con métodos virales. Sin embargo, el importante potencial de estos métodos físicos de transfección alienta a la optimización de las condiciones para lograr mayor eficiencia y superar los efectos adversos (Murata y col., 2007).

1.3 Parámetros y herramientas involucrados en ensayos de transfección

Existen diversos obstáculos a sobrepasar para efectuar una transfección exitosa: se debe tomar en cuenta desde el tipo celular, su estructura, manipulación y cuidados elementales, así como el cuidado de los materiales, equipo y recursos necesarios para llevarla a cabo. Esto se describe de manera resumida en las siguientes líneas.

1.3.1 Viabilidad celular

La viabilidad celular es la determinación de las células vivas y muertas. Puesto que todo lo viviente se compone de células, el recuento de la viabilidad celular tiene un enorme número de aplicaciones. Las pruebas de viabilidad celular por lo general involucran un análisis de población de células en una muestra y tinción de las células o la aplicación de productos químicos para diferenciar las células vivas de entre las muertas. Hay numerosas pruebas y métodos para medir la viabilidad celular. Así, una muestra es teñida con diversos colorantes, o tratada con productos químicos, para ser sometida a un examen microscópico para evaluar la viabilidad celular (Parker, 2010). Estas mediciones se pueden utilizar para evaluar la efectividad de algunos tratamientos para células (Wallace, 2011).

1.3.2 Permeabilidad celular

La permeabilidad es definida como el paso de sustancias o moléculas a través de una membrana. La membrana celular es selectiva y funciona como barrera de protección. La célula tiene la capacidad de controlar las diversas propiedades de su membrana, incluyendo aquellas relacionadas con su permeabilidad. Este control es ejercido de las siguientes maneras: 1) por la variación de la naturaleza lipídica de los componentes de la membrana; 2) por la variación de las proteínas del glicocálix o azúcares asociados a lípidos en la parte externa de la célula, o las proteínas internas asociadas a las membranas; 3) causando que largas áreas de la membrana fluyan de un lugar a otro, o el doblez, hendidura o por la realización de movimientos de moléculas enlazados a una u otra superficie de la membrana o embebidas en ella; 4) por el movimiento integral selectivo de las proteínas de membrana, permitiendo que estas proteínas transporten sustancias, partículas, moléculas, u otros materiales unidas a ella; 5) por la variación de las propiedades de una proteína de membrana integral o por un grupo de asociación cercana a ellas, todo eso con el fin de prevenir el transporte a través de la membrana de sustancias tales como iones o proteínas de un carácter específico (Parker, 2010). La membrana de células eucariotas tiene una composición variable, dependiendo de su tipo y de las condiciones ambientales (Nelson, 2005). Sin embargo, todas las membranas contienen fosfolípidos zwitteriónicos, en los que la carga negativa de

residuos fosfato se contrarresta de la carga positiva de grupos polares y cierto porcentaje de fosfolípidos con carga negativa. En la Figura 4 se esquematizan fosfolípidos zwitteriónicos y aniónicos comúnmente presentes en membranas celulares. Debido a ello, las membranas celulares tienen una carga neta negativa y presentan repulsión eléctrica con macromoléculas aniónicas, tales como el ADN.

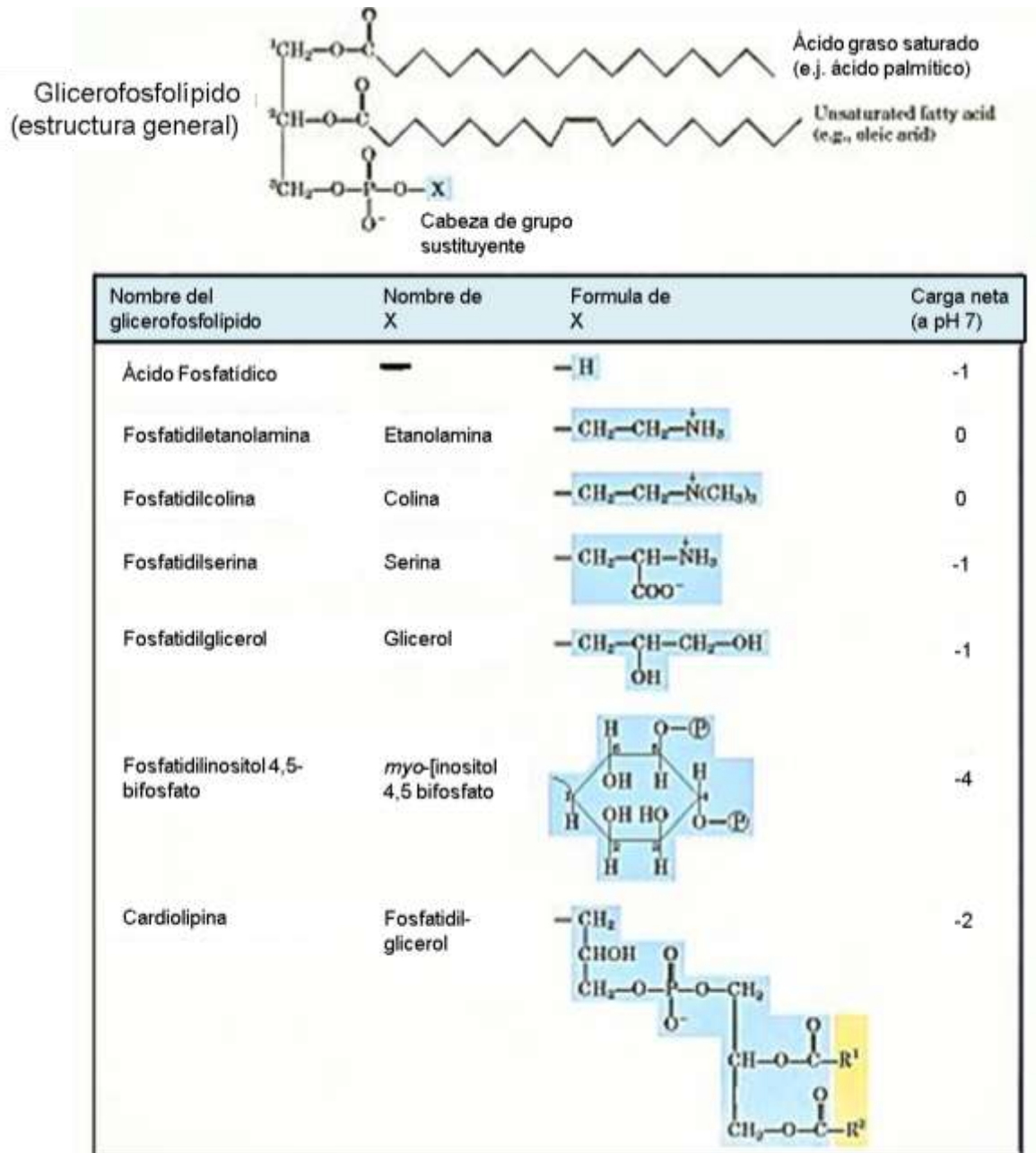


Figura 4. Ejemplos de fosfolípidos de membrana que presentan una carga neta negativa (Nelson, 2005).

1.3.3 Vectores moleculares

Un vector molecular es cualquier molécula de ácidos nucleicos que sea capaz de replicarse de manera autónoma en una célula hospedera. Contiene un origen de replicación (secuencia específica que indica el inicio de replicación) y es capaz de aceptar ADN foráneo. Un vector tiene su propio origen de replicación, uno o varios sitios únicos de reconocimiento para endonucleasas que pueden ser utilizados para la inserción de ADN foráneo, y marcadores de selección, es decir genes que codifican para resistencia a antibióticos y también secuencias señal para la expresión del ADN insertado. Los vectores más comunes son los plásmidos, moléculas cerradas, circulares, de replicación autónoma en determinadas células. Los plásmidos de uso común se replican en bacterias, tienen ADN de doble cadena, extracromosómico, con un tamaño molecular de entre 1 a más de 200 kb y con un número de copias de uno a cientos por célula bacteriana (Kahl, 2001).

1.4 Citometría de flujo asistida por fluorescencia (FACS, del inglés Fluorescence Assisted Cell Sorting)

Con la finalidad de comprobar las modificaciones que se realizan a nivel celular nos valimos de la técnica de citometría de flujo para la revisión, cualitativa y cuantitativa de los cambios que hemos inducido.

Un citómetro de flujo es un instrumento que ilumina células (u otras partículas), mientras fluyen individualmente a través de un filamento y pasan frente a una fuente de luz. Así, la partícula es detectada por las señales que resultan de su iluminación. Al iluminar con la fuente de luz láser, ésta es dispersada hacia el frente de manera proporcional a la talla de la partícula, lo cual es detectado por un detector colocado al frente del haz. Por su parte, un detector de luz perpendicular es utilizado para capturar la luz dispersada hacia los lados, que es proporcional a la granularidad de la partícula. Con la ayuda de espejos dicróicos, también colocados de manera perpendicular al haz de luz láser, la luz emitida por la partícula es medida con detectores provistos de filtros para radiaciones de distintos colores (Figura 5). Se conoce como “evento” a cualquier objeto que ha sido detectado por el instrumento, correcta o incorrectamente, como una partícula. Parte de la luz que las partículas emiten no es luz dispersada sino fluorescente. Las partículas

presentan auto-fluorescencia y esta es detectada por el citómetro. Además, al pasar a través del haz de luz, la luz dispersada o fluorescencia emitida (si la partícula se encuentra marcada con fluorocromo) proporciona información acerca de las propiedades de la partícula. La técnica de citometría de flujo tiene restricciones de tamaño de partícula de 1 μm a 30 μm aproximadamente (Hawley y Hawley, 2004).

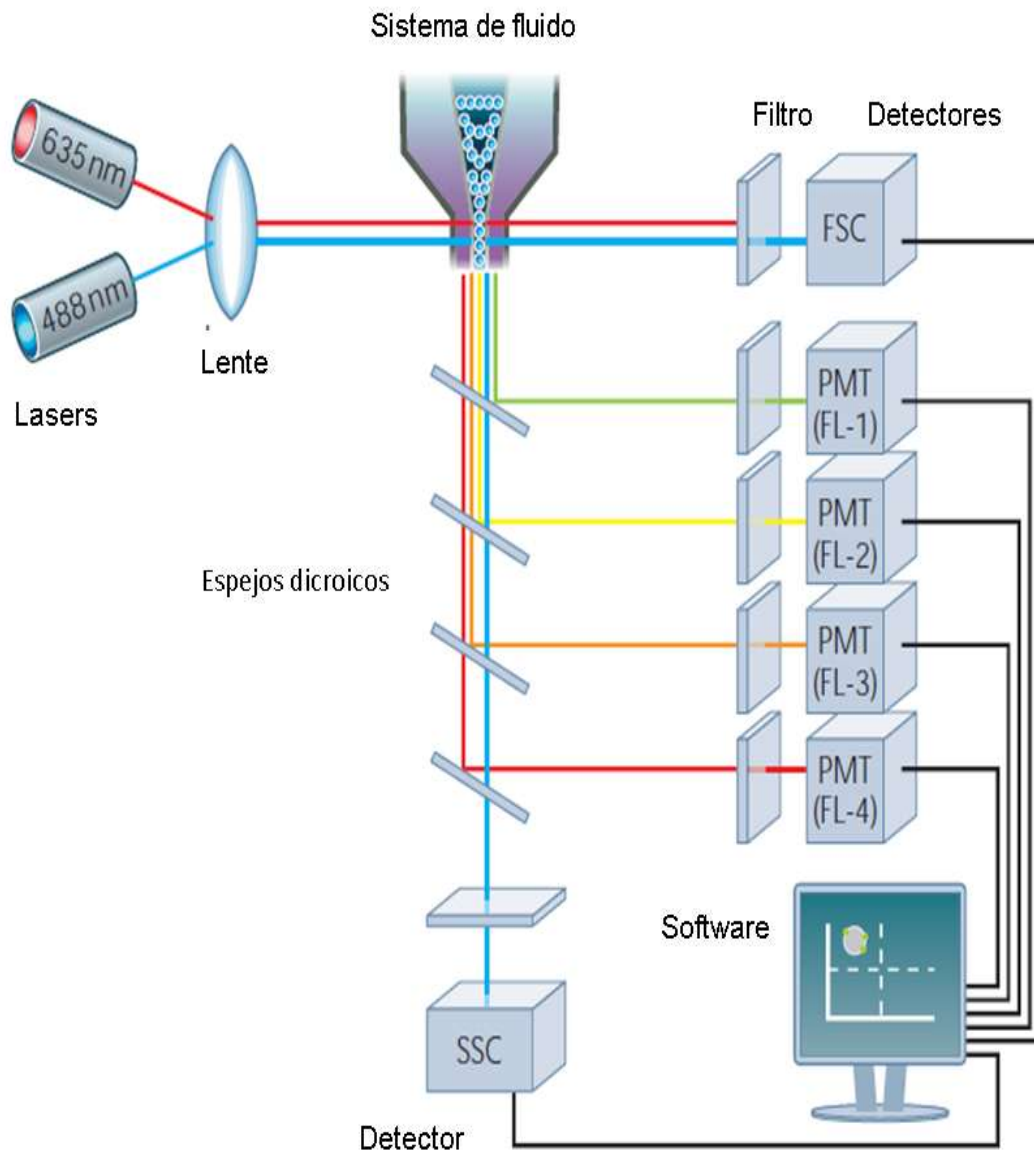


Figura 5. Esquema típico de un citómetro de flujo. El uso de longitudes de onda específicas, filtros y espejos dicróicos para dividir la señal de luz de las células por diferentes fotodetectores de acuerdo con su color (Rahman, 2006).

2. HIPÓTESIS

Es factible transfectar de manera eficiente células eucariotas por cavitación acústica mediante la aplicación de ondas de choque.

3. OBJETIVOS

4.1 General

Determinar los efectos biológicos según las condiciones físicas por aplicación de ondas de choque para lograr una transfección celular eficiente.

4.2 Específicos

- Establecer las condiciones biológicas y físicas para transfectar células HEK293 con ondas de choque en función de la viabilidad, permeabilidad de las células, integridad del plásmido y la eficiencia de transfección.
- Probar si el empleo de lípidos catiónicos que cambien la carga del material genético resulta en una mayor eficiencia de transfección de células.

4. METODOLOGÍA

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Nanobio-óptica y en el Laboratorio de Ondas de Choque del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, de la Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Querétaro.

4.1 Material, reactivos y equipo de laboratorio

El equipo, el material y los reactivos que se utilizaron para los experimentos fueron los siguientes:

4.1.1. Materiales

Asa bacteriológica

Cajas de Petri estériles para cultivo bacteriológico

Cajas de Petri estériles para cultivo de células: Cell Culture Dish, CORNING® 100 mm X 20 mm

Cámara de Neubauer, Hausser Scientific

Encendedor

Etiquetas

Enzimas: EcoR1 (Buffer: H, Promega); HindIII y XhoI (Buffer: React 2, Invitrogen)

Filtros de nailon de 0.22 µm MILLEX® GP FilterUnit

FluoroDish™ Cell Culture Dish – 35 mm World Precision Instruments, Inc.

Gasas estériles

Hielera para transporte de viales

Jeringas de 10 y 20 ml: DM medicrat 20x32 mm; Sensi medical® 21GX32mm

Matraz 1000 ml

Matraz Kitasato 2000 ml

Micropipetas mecánicas: 2-20, 5-50, 10-100, 20-200, y 100-1000 µl, BOECO Germany

Parafilm

Pinzas de metal, CRAFT TOOLS

Pipetas de transferencia, SEDI-PET™ STERILE

Pipetas desechables de 5, 10 y 25 ml, NUNC™ Brand Products

Pipetas Pasteur de 145 mm estériles BRAND

Pizeta

Puntas de 10, 100 y 1000 μ l

QIAGEN Plasmid Maxi Kit (25)

Tijeras

Tubos Eppendorf, FALCON

Tubos tipo Falcón de Centrifugación 15 y 50 ml: FALCON

Vaso de precipitados de 250 ml

4.1.2. Línea celular HEK293

En este trabajo se utilizó la línea de células inmortalizadas HEK293, que es una línea celular que proviene del riñón de embrión humano y ha sido transformada con genes del Adenovirus Tipo 5 (Adv5). La línea celular fue cultivada por Van der Eb, a inicios de 1970 en Holanda y posteriormente transformada por Graham. Estas células reciben el nombre de “Human Embryonic Kidney Cells” (células embrionarias de riñón humano) y el número 293 por ser el experimento número 293 de Graham (Hay y col., 1994).

Los cultivos se realizaron en medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), utilizándose penicilina y estreptomina como antibióticos y suplementando con suero fetal bovino.

4.1.3. Reactivos

Agarosa, UltraPure™ Invitrogen

Agua estéril libre de RNAsas, Agua inyectable de Pisa, COLIBA

Antibióticos, Ampicilina; Penicilina-Estreptomina GIBCO-BRL

Buffer de carga, BlueJuice™ Invitrogen

DimetilSulfóxido, DMSO Baker

Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM 1X GIBCO

Etanol Baker

Fluorocromos: Calceína y FD-10 DextranoFluoresceinisothiocyanate-dextran, SIGMA

FuGene®6 Transfection Reagent Roche

Isopropanol, Baker

Marcadores de pesos moleculares, Ladder DNA 100 bp Trackit™ Invitrogen

Medio Luria Bertani

Paraformaldehído, SIGMA
PBS y H₂O estéril (pH neutro)
Gelatina de piel de cerdo tipo A
Suero Fetal Bovino, FBS GIBCO
Colorante de ácidos nucleicos, SYBR® Invitrogen
Tripsina-EDTA, SIGMA
Azul de tripano (0.4%), SIGMA

4.1.4. Equipo

Autoclave, HIRAYAMA
Baño de agua, LINDBERG/BLUE WB 1110^a
Bomba de vacío, PUMP KNF LAB
Cámara de Electroforesis, HE 33, AmershamBiosciences
Campana de flujo laminar
Centrifuga, HERMLE Z 383 K
Citómetro de flujo, BD FACSCalibur
Fuente de Poder, Power PAC 1000 BIO-RAD
Generador de ondas de choque piezoeléctrico, Richard WOLF PiezoSon 100 I/IP20
Incubadora para bacterias *E. coli*, BIO-RAD Mini Incubator
Incubadora para células animales HEK 293, Thermo Forma
Lámpara UV, entela UVGL-55
Hornos de microondas
Microscopio Confocal ZEISS, LSM 510 META
Microscopio Nikon Eclipse E-600 Contraste de Fase Contraste de Fase y Fluorescencia
Gel Doc™ EZ Imager, BIORAD
Espectrofotómetro NanoDrop 1000 Thermo Scientific
Pipeteador electromecánico, GILSON®
Potenciómetro, HANNA Instruments

4.1.5. Generador de ondas de choque: Piezoson 100 plus

Los experimentos se realizaron en un generador de ondas de choque piezoeléctrico Piezoson 100 plus, fabricado por la empresa Richard Wolf GmbH en Knittlingen,

Alemania. Este equipo, que generalmente se usa para tratamientos ortopédicos, fue adaptado para pruebas experimentales (Figura 6). El sistema posee un diseño ergonómico y dimensiones relativamente pequeñas, con una vida útil de por lo menos 5 millones de ondas de choque. Cuenta con 20 niveles de intensidad para el rango de nivel bajo de energía, lo cual en ortopedia permite tratamientos sin necesidad de sedantes o anestesia. Cada grupo experimental se analizó por duplicado, utilizándose los niveles de intensidad de 10 (4,193 volts) y 20 (6,143 volts), que generan pulsos con una presión positiva de 12.25 MPa y 24.5 MPa, respectivamente, manteniéndose una frecuencia de 1 Hz y la temperatura del agua a 37°C durante cada experimento. Cada vial experimental era mantenido a 4°C antes y después de cada tratamiento.

4.2 Métodos

4.2.1 Cultivo Celular

Se utilizaron células eucariotas de la línea HEK293, las cuales se mantuvieron en congelación en alícuotas de 1 ml con una densidad de 1×10^6 células/ml.

4.2.1.1 Descongelamiento

Se sacaron las células del nitrógeno líquido y se dejaron descongelar en hielo en la campana de flujo laminar, bajo un ambiente estéril. Después se tomó 1 ml de medio DMEM completo (89% DMEM, 10% SFB y 1% antibiótico) y se vertió gota a gota en el vial de congelación, se succionó la mezcla de células y medio DMEM y se vertió en un tubo tipo Falcon que contenía 8 ml de medio DMEM completo y fresco previamente calentado a 37°C; se resuspendió y se centrifugó por 5 minutos a 1000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en medio DMEM completo. La suspensión celular se colocó en una caja de cultivo celular estéril de 10 cm de diámetro con 8 ml de medio DMEM completo. Al cabo de 2 horas las células deben comenzar a adherirse al fondo de la caja.

4.2.1.2 Propagación y mantenimiento

El cultivo de células HEK293 se realizó con medio DMEM completo, en cajas de Petri estériles de 10 cm. Su propagación y mantenimiento se realizó cada 2 a 4 días al alcanzar una confluencia de entre 70-80%, realizando la resiembra correspondiente. Todo se llevó a cabo dentro de una campana de flujo laminar.

Para realizar el pase de células, el medio de cultivo y restos celulares no adheridos fueron aspirados con ayuda de una pipeta Pasteur estéril conectada a una bomba de vacío a través de una manguera.



Figura 6. Fotografía que muestra el generador de ondas de choque Piezoson 100 plus con sus diferentes componentes.

Se lavaron con 7 ml de PBS 1X estéril (sin Ca^{2+} o Mg^{2+}) a fin de eliminar residuos proteicos del medio completo. Enseguida, se colocaron 2 ml de Tripsina-EDTA, y se incubó a 37°C , 5% de CO_2 y 97% de humedad relativa. Las células se revisaron después de 5 minutos, al microscopio invertido, para ver el progreso de la tripsinización. Una vez despegadas todas las células, se homogenizaron con medio DMEM completo, se resuspendieron en 4 ml de este medio para bloquear la degradación por la Tripsina-EDTA. La suspensión se colocó en un tubo tipo Falcon, y se centrifugó a 1500 rpm por 5 minutos. Se aspiró el medio por completo con una pipeta Pasteur cuidando de no tocar el pellet celular. Finalmente, se resuspendió suavemente el pellet en medio DMEM completo, ajustando el número de células a

la densidad deseada. El número de células fue estimado colocando 11 μ L de la suspensión en una cámara de Neubauer (Figura 7). El número de células, densidad celular, se estimo de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Número de } \frac{\text{células}}{\text{ml}} = \left(\text{Número de células} \frac{\text{contadas}}{\text{cuadrantes contados}} \right) * 10\ 000$$

4.2.1.3 Almacenamiento de células

Las células pueden guardarse por largos periodos (aproximadamente 6 meses) a -70°C o definitivamente en una fase de vapor de nitrógeno líquido a -130°C sin que se altere su fenotipo o disminuya significativamente su viabilidad. Siendo necesario comenzar con cultivos frescos cada seis meses.

4.2.2 Selección de plásmido pCX::GFP-GPI2

Para monitorear la transfección de células se utilizó como gen reportero el *gfp* (*egfp*, Enhanced Green Fluorescent Protein), que codifica para la proteína verde fluorescente, la cual genera luminiscencia por parte del organismo transformante al absorber luz azul (alrededor de 395 nm y 475 nm), emitiendo luz verde fluorescente (alrededor de los 509 nm) (Allison, 2007). En particular, se utilizó un plásmido en donde el gen *gfp* se ha fusionado con el gen *gpi* que codifica para anclaje de proteínas de membrana plasmática del tipo glicosilfosfatidilinositol, constituido de diacilglicerol y fosfatidilinositol (Ferguson, 1999). Generalmente, las proteínas de anclaje del tipo GPI son sintetizadas como precursores conteniendo dos secuencias señal: la secuencia de amino terminal (MVEMLP TVAVLV LAVSVVA) para la translocación de membrana dentro del retículo endoplásmico (RE) y la señal polipéptido carboxilo terminal (KDNTTLQEFAT-LAN) de anclaje a GPI. Ambas secuencias son unidas después de la translocación en el RE y posteriormente el carboxilo terminal de la proteína es covalentemente unido al GPI que ha sido pre-intetizado en el RE (Rhee y col., 2006). El mapa del plásmido utilizado se muestra en la Figura 8. Para construirlo, el gen *gfp* fue fusionado con la señal de translocación de la enzima acrosina en la señal *N*-terminal. El fragmento de ADN de fusión tipo acrosina-*egfp* fue después ligado a la secuencia señal 5'-terminal de *gpi* de anclaje de ratón Thy-1 (Kondoh y col., 1999).

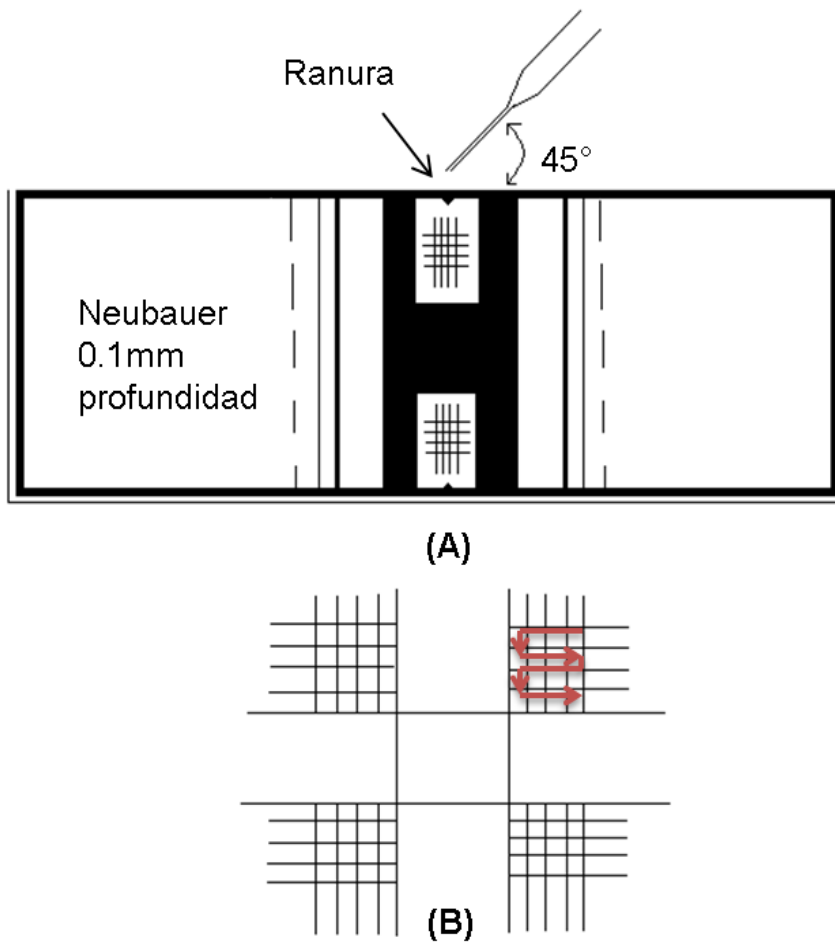


Figura 7. Cálculo de la densidad celular. A) Cámara de Neubauer, la gota (11 μ L) de suspensión celular se coloca en la ranura de la cámara. B) La flecha indica la frecuencia del conteo; se cuentan las células que se localizan dentro de los cuatro cuadrantes 4 X 4 cuadros. La suma total de las células en los cuatro cuadrantes se divide entre 4 (o el número de cuadrantes contados) y este valor se multiplica por 10 000 (factor de dilución) para obtener la densidad de la población (células/ml).

La fusión resultante fue ligada río abajo al promotor de transcripción CAAG, y se estableció así el elemento regulador del potenciador de citomegalovirus (CMV) y el promotor de beta-actina de pollo, regulando la replicación del plásmido para ayudar a su expresión íntegra. La construcción además cuenta con su respectivo origen de replicación (*ori*) y el gen de selección de resistencia a ampicilina (*amp*) (Rhee y col., 2006).

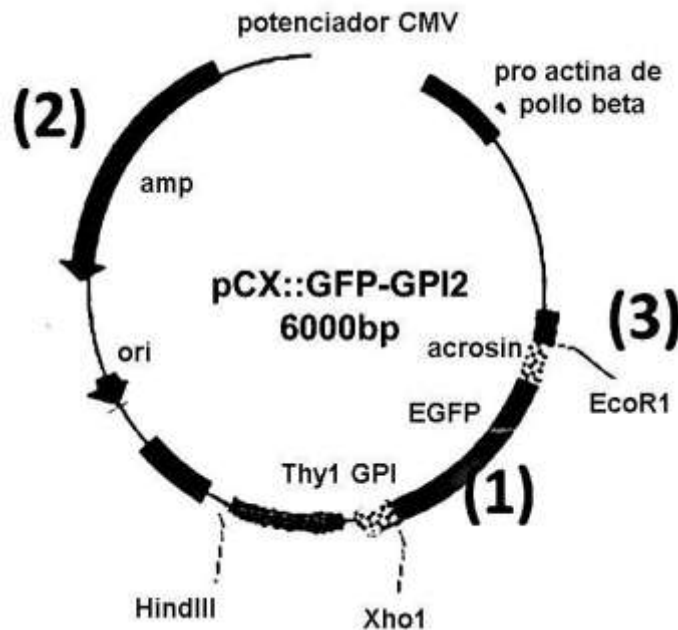


Figura 8. Mapa que muestra los componentes del plásmido pCX::GFP-GPI2. (1) Los genes *egfp* y *gpi* codifican para una proteína de fusión GFP con puente GPI (para localización en membrana). (2) Secuencia de resistencia a ampicilina. (3) Sitios de restricción EcoR1, Xho1 y HindIII (Rhee y col., 2006).

4.2.2.1 Propagación del plásmido pCX::GFP-GPI2

Para realizar la propagación de plásmido se utilizaron células ultra-competentes *E. coli XL-BLUE*, las cuales se descongelaron en baño de hielo (completamente sumergidas a fin de evitar la pérdida de su carácter competente). Una vez descongeladas, se agregaron 2 μ l del plásmido pCX::GFP-GPI2, y la mezcla se incubó por 15 minutos a 4°C en hielo.

Pasados los 15 minutos se aplicó un choque térmico a 42°C durante 2 a 3 minutos. Enseguida, las células eran transferidas a un tubo Eppendorf con 1 ml de medio LB (Luria Bertani) –sin antibiótico– y se colocaron en incubación bajo agitación a 37°C durante 30 minutos. Finalmente, una alícuota de 50 μ L de la suspensión bacteriana se sembró en una caja de Petri con medio LB-Ampicilina (agar); dispersando con ayuda de perlas de vidrio o de un asa bacteriológica –estériles–. Las células, así como células control (tratadas sin plásmido) se incubaron a 37°C durante una noche.

La selección de las bacterias que incorporaron el plásmido estuvo dada por el crecimiento de las mismas, ya que únicamente las bacterias transformadas poseen el gen con resistencia a ampicilina del plásmido, lo cual las capacita para su proliferación en el medio LB-Ampicilina (agar); adicionalmente, la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) se monitorea en las colonias con ayuda de una lámpara manual de luz UV (Lámpara UV, entela UVGL-55) (Figura 9). Al día siguiente se tomó una de las colonias con ayuda de un asa bacteriológica – esterilizada al rojo de la flama- y se transfirió a un tubo tipo Falcon de 50 ml de capacidad, el cual contenía 15 ml de medio LB-Ampicilina. El tubo se incubó a 37°C con agitación durante 5 horas. De esta suspensión madre se tomaron 500 µL para sembrarlo en 500 ml de medio LB-Ampicilina contenidos en un matraz de 1 L de capacidad, el cual se incubó durante la noche a 37°C con agitación.

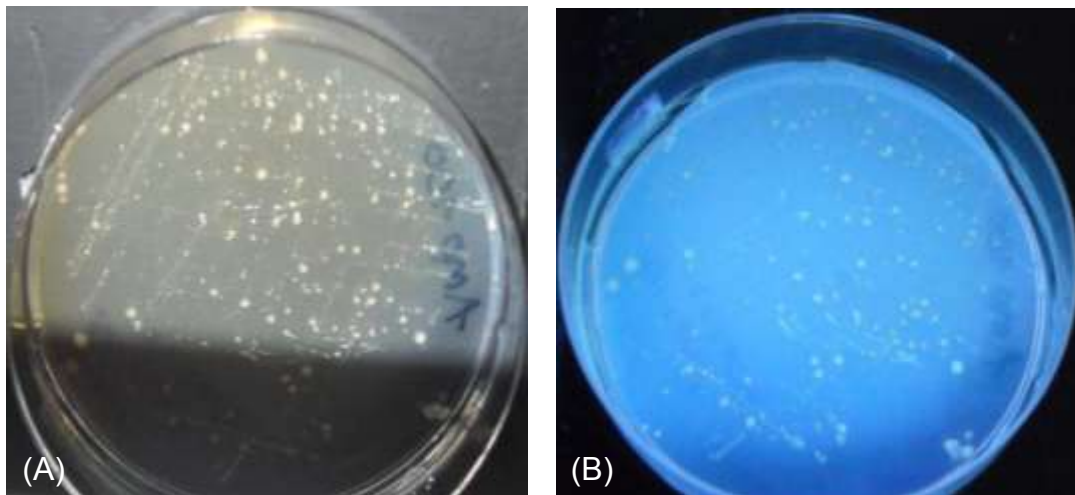


Figura 9. Fotografía de *E. coli XL-BLUE* transformantes. (A) Crecimiento de colonias con resistencia a ampicilina. (B) Irradiación de colonias con luz UV evidenciando la expresión de proteína verde fluorescente, GFP.

4.2.2.2 Purificación de plásmido utilizando el Maxi kit-QIAGEN®

Las bacterias transformantes se recuperaron en un sedimento obtenido del crecimiento en 500 ml de medio LB-Ampicilina. El sedimento se obtuvo mediante una centrifugación a 3500 x g por 15 minutos a 4°C en una centrífuga HERMLE Z 383 K con rotor de ángulo fijo. Este sedimento se homogenizó en 10 ml de solución con RNAsa, o Buffer P1 (2-8°C, con indicador azul para lisis celular).

Posteriormente, se añadieron 10 ml de Buffer P2, el cual contiene detergente (SDS) para realizar la lisis de las bacterias; al agregarse el Buffer P2, el indicador tornó el medio azul, indicando una lisis eficiente tras realizar la mezcla por inversión repetida del tubo. Después de un tiempo máximo de 5 minutos, el medio se neutralizó con 10 ml de Buffer P3 (4°C), mezclando nuevamente por inversión hasta apreciar que se perdió la coloración azul y se observaron los restos de membranas. De manera paralela, se preparaba un filtro QIAfilter Maxi, atornillando una tapa en la boquilla de salida y colocándolo en un tubo tipo Falcon de 50 ml. El contenido del tubo Falcon se transfirió al filtro QIAfilter Maxi y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Mientras tanto, se preparó una columna QIAGEN-tip500 de intercambio iónico, equilibrándola con 10 ml de Buffer QBT, permitiendo que eluyera por gravedad –completamente-. Una vez terminado el periodo de reposo de la muestra en el filtro QIAfilter, se removió la tapa de salida del filtro y se procedió a insertar el émbolo en el filtro, depositando el contenido dentro de una columna QIAGEN-tip500 (de intercambio iónico). La columna se lavó con 60 ml de Buffer QC. Posteriormente el ADN se eluyó en un tubo tipo Falcon libre de pirógenos, haciendo pasar por la columna 15 ml de Buffer QC (previamente calentado a 65°C). El eluato, con plásmido, se trató para precipitar ADN, agregándole 10.5 ml de isopropanol destilado (a temperatura ambiente), mezclándolo por inversión del tubo, se centrifugó a 4°C con 5,000 x g por 60 minutos dentro de una centrifuga refrigerada (HERMLE Z 383 K). Al terminar la centrifugación, el sobrenadante era decantado con cuidado de no perder el pellet. El material fue finalmente lavado con 5 ml de etanol al 70% y centrifugado nuevamente (HERMLE Z 383 K) a 4°C con 5,000 x g por 60 minutos. De nuevo el sobrenadante se decantó con cuidado y el pellet se secó al aire por 5-10 minutos, resuspendiendo en un volumen de unos 200-400 µl de agua de Pisa, trasvasándolo a un tubo Eppendorf. Finalmente, la pureza y concentración del plásmido se estimaron mediante espectrofotometría UV, utilizando un equipo Nano Drop 1000 (ThermoScientific).

4.2.2.3 Caracterización molecular del plásmido pCX::GFP-GPI2

El plásmido se trato con enzimas de restricción a partir de una solución de 10 ng. Los tratamientos se realizaron utilizando las mezclas necesarias según el orden que se muestra en el Cuadro 1 (Lewis M, 2001); se utilizaron tres enzimas con sus medios amortiguadores específicos: EcoR1 (Buffer: H, Promega); HindIII y XhoI (Buffer: React 2, Invitrogen). Las reacciones se realizaron utilizando dos concentraciones diferentes de plásmido, 20 y 40 ng. La idoneidad de medio amortiguador equivalente para las enzimas HindIII y XhoI permitió la realización de una doble digestión de la misma muestra (*), la cual se llevó a cabo colocando 1 μ l de cada enzima.

Cuadro 1. Mezclas para digestión del plásmido

Reactivos (μ l)	Proporciones recomendadas	Ensayo con 20 ng	Ensayo con 40 ng	*Doble digestión 40 ng
Buffer 10 X	1	2	2	2
H2O Pisa	6.5	15	13	14
ADN plasmídico	2	2	4	2
Enzima	0.5	1	1	2

Terminando de realizar las mezclas correspondientes, se realizo una incubación de una hora a 37°C en baño seco. Después de las diversas digestiones, se procedió a analizar las muestras (Cuadro 2) en un gel de agarosa al 1%, aplicándole una corriente de 100 Volts durante 60 min. El gel se preparo con 36 ml de agua destilada, 4 ml de TBE 10X y 0.40 g de agarosa, disolviendo el polímero por calentamiento durante 35 segundos en horno de microondas. Finalmente, al finalizar la corrida, el gel se incubo durante 15 minutos con SYBR®Safe (30 ml de TBE 1X y 3 μ l de SYBR®Safe), y se analizo en un fotodocumentador Gel Doc™ EZ Imager BIORAD.

Cuadro 2. Carga de digestiones del plásmido pCX::GFP-GPI2

Carril	Nombre	Agua de Pisa (μ l)	Buffer de corrida (μ l)	Digestión (μ l)
1	Ladder	15	3	2
2	Digestión	0	3	20

4.2.3 Preparación de los viales experimentales para tratamientos de ondas de choque

4.2.3.1. Viabilidad celular post-tratamientos

Los cultivos se prepararon uno o dos días antes del experimento para que presentaran un 80% de confluencia el día del ensayo. Las células se despegaron por tripsinización, y se resuspendieron en medio DMEM completo, a una concentración de 2×10^6 células/ml. Para los tratamientos con ondas de choque, se tomo 1 ml de suspensión celular (conteniendo 2×10^6 células) y se colocó en un tubo Eppendorf, para después trasvasarlo dentro de una pipeta Pasteur estéril, de plástico, la cual sirvió como vial experimental. Con ayuda de unas tijeras se cortó la punta de la pipeta, dejando un pequeño tramo (aproximadamente 5 cm) para ser sellado con ayuda de una flama y pinzas estériles. Una vez sellados los viales, las células se colocaron a 4°C, en baño de hielo.

El número de células viables después de los tratamientos se determinó por conteo de células como se describe en la Figura 7.

4.2.3.2. Pruebas de internalización de azul de tripano

Se sembraron cultivos para el día del experimento a un 80% de confluencia y se prepararon los viales experimentales necesarios para cada tratamiento, manteniendo una densidad celular de 2×10^6 células/ml en cada vial experimental.

Una vez terminados los tratamientos de ondas de choque se trasvasó la suspensión celular a un tubo Eppendorf, se resuspendió con cuidado a las células para después realizar diluciones 1:1 con azul de tripano (100 µl de suspensión celular - 100 µl de azul de tripano, y se realizaron los conteos correspondientes según se describe en la Figura 7.

El azul de tripano es un colorante utilizado para diferenciar células vivas de células muertas, las células vivas o tejidos con la membrana celular intacta no son coloreados, debido a la impermeabilidad de la membrana. Así, en las células en perfecto estado, el azul de tripano no es internalizado, mientras que en las células afectadas o alteradas se observa un color azul (Gambihler y col., 1990).

4.2.3.3. Selección de fluorocromos

Un fluorocromo es una sustancia química que emite luz fluorescente tras la absorción de luz de mayor energía (excitación). Durante la permeabilización momentánea de membranas celulares, si un fluorocromo es internalizado, la emisión de luz a partir de la molécula sirve como una señal cualitativa o cuantitativa de permeabilización. Existen fluorocromos de distintos tipos estructurales, que de manera natural o por acoplamiento con anticuerpos, pueden reaccionar de manera específica con un componente celular particular, lo cual permite su identificación (Kahl, 2001).

4.2.3.3.1. Calceína

La calceína es un compuesto fluorescente que puede ser utilizado como una molécula modelo para internalizar material hidrosoluble de carga negativa al interior de una célula. Su peso molecular es de 622 g/mol y es utilizada a una concentración de 1-10 μ M. Tiene sus máximos de excitación y emisión de 495 y 515 nm, respectivamente (Liu y col., 2009). Su carácter fluorescente ha resultado útil para la medición de la permeabilidad celular después de tratamientos físicos, como las ondas de choque (Gambihler y col., 1994; Kodama y col., 2000). En la Figura 10 se muestra la estructura química de la calceína mostrando su propiedad de molécula ácida, de carga negativa. Su uso para explorar condiciones de permeabilización a moléculas ácidas, como el ADN, se ha reportado también para el estudio de otros métodos de permeabilización (Liu y col., 2009).

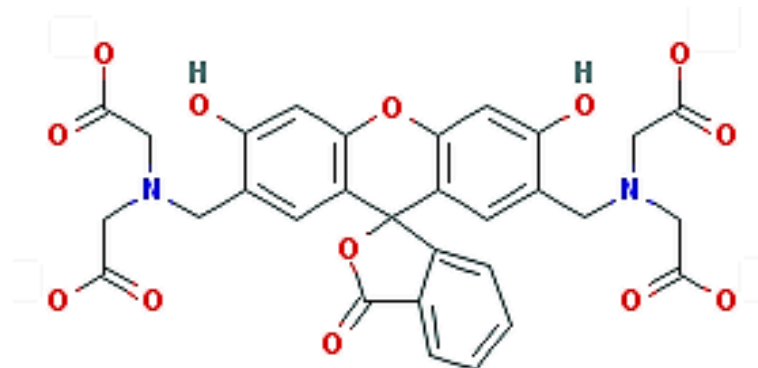


Figura 10. Estructura de la calceína. Molécula de carga negativa con un peso molecular de 622 g/mol (Liu y col., 2009).

4.2.3.3.2. Dextrano fluoresceinado

Este fluorocromo es un polímero de anhidroglucosa que se encuentra compuesto aproximadamente en un 95% de uniones del tipo alfa-D (166). Las uniones restantes (163) producen ramificaciones. Los dextranos de tamaño entre 2,000 a 10,000 presentan las propiedades de una espiral expandible. El uso de los dextranos ha sido reportado como útil para estudiar porosidad y permeabilidad (Kodama y col., 2000; Phillips y col., 2008; Balda, 2012). Presenta una excitación máxima a 490 nm y su máximo de emisión es a los 520 nm. La Figura 11 muestra la estructura del FD (Oliver y col., 1984).

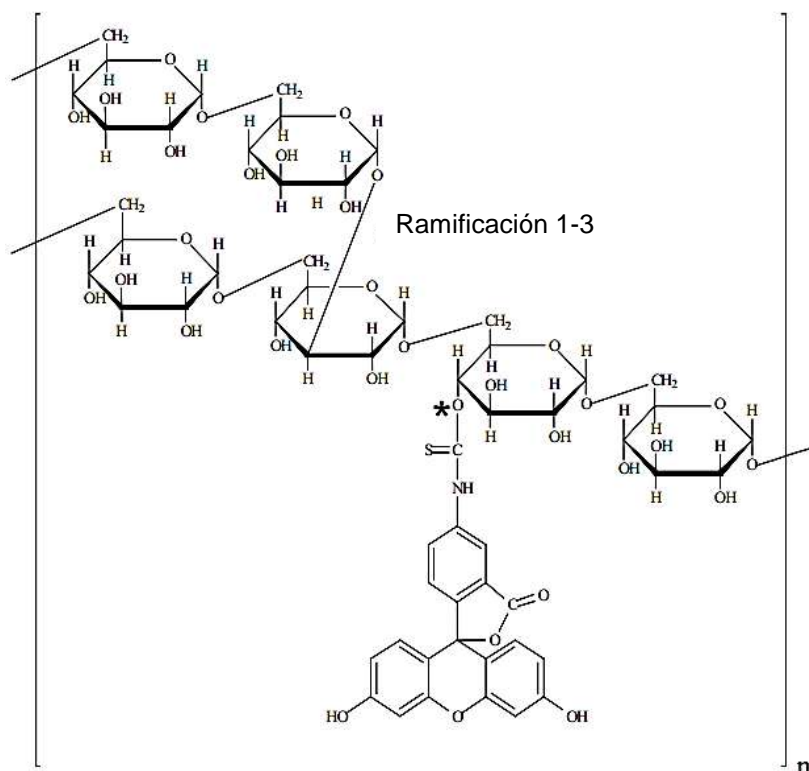


Figura 11. Estructura del FITC/Dextrano. Con un peso molecular de 10,000 g/mol. * Se asume que el sitio de unión del FITC es al azar con cualquier grupo hidroxilo libre (Oliver y col., 1984).

4.2.3.4. Internalización de fluorocromos

Se prepararon las células uno o dos días antes para obtener una confluencia del 80% y una densidad final en los viales de 2×10^6 células/ml; el fluorocromo (calceína o FD-10 Dextrano) se utilizó en una concentración de 200 μM (Kodama y col., 2000). Para ello, se preparó una solución madre de fluorocromo 2000 μM en

PBS 10X, la cual se diluyo 1:5 en medio DMEM completo. Posteriormente, esta solución (400 μ M) se diluyo 1:1 con la suspensión celular de 2 millones de células por ml. Los viales experimentales contenían una densidad celular de 1 millón de células/ml y una concentración de fluorocromo 200 μ M.

Al finalizar los tratamientos con ondas de choque, las células en suspensión se fijaron con paraformaldehído (PFA) a una concentración de 4%. Para ello, la suspensión de células se transfirió del vial experimental a un tubo tipo Falcon de 50 ml, se añadieron 5 ml de PBS 1X, después se resuspendió con suavidad y, se centrifugo a 1500 rpm. Después se retiro el sobrenadante, se realizaron dos lavados más con PBS a fin de eliminar el fluorocromo no internalizado. Las células lavadas se resuspendieron en 2 ml de PBS 1X y se trataron con 2 ml de PFA al 4%, resuspendiendo suavemente, e incubando a temperatura ambiente por 15 minutos. Al terminar la incubación, las células eran centrifugadas, el sobrenadante se descarto, y el sedimento se resuspendió, en 500 μ l de PBS 1X. Las muestras se mantuvieron a 4°C dentro de tubos Eppendorf, al abrigo de la luz.

La permeabilidad de las células a los fluorocromos se analizo con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E-600 con contraste de fase y fluorescencia y con un microscopio Confocal Zeiss LSM 510 META. Para estimar el número de células permeabilizadas se utilizó la cámara de Neubauer y se realizó un conteo del número de células totales (con luz blanca), así como del número de células fluorescentes. Con las observaciones y conteos realizados con el microscopio de fluorescencia se estimo la eficiencia de permeabilidad, considerándose esta como el número de células permeabilizadas entre el número de células totales, multiplicado por cien (Armenta y col., 2006).

La citometría de flujo es una técnica que permitió distinguir a las células por su tamaño, su granularidad y la eventual presencia de sustancias fluorescentes. Esta técnica nos ayudó a determinar valores de corte precisos para distinguir a las poblaciones con auto-fluorescencia de poblaciones con fluorescencia adquirida, en este caso por internalización de un fluorocromo.

Para este trabajo se utilizó el citómetro FACSCalibur (BD Bioscences, San Jose, CA, EUA) del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, el cual cuenta

con dos fuentes de luz láser, una de Ar (488nm) y un diodo solid state red (635nm). La primera de estas fuentes se utilizó para irradiar en el rango del espectro azul y obtener una emisión de fluorescencia verde por parte de las células que adquirieron los fluorocromos descritos en este reporte. Al menos 1×10^5 células viables por muestra fueron monitoreadas bajo criterios de tamaño, granularidad y fluorescencia emitida, y analizadas en el programa CellQuest (BD Biosciences).

4.2.3.5. Estabilidad del plásmido

Se revisó la estabilidad del plásmido pCX::GFP-GPI2 durante los tratamientos de ondas de choque. Para ello se realizó una dilución del plásmido, para tener una concentración de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Los medios de dilución utilizados fueron agua de Pisa, medio DMEM completo, o Medio DMEM sin SFB ni antibiótico. Un ml de cada dilución de plásmido se colocó dentro de los viales experimentales, de manera similar que para los tratamientos con células. Las muestras fueron mantenidas a 4°C, en baño de hielo, antes y después de los tratamientos correspondientes. Después de los tratamientos, las muestras se trasvasaron a tubos Eppendorf y analizaron en gel de agarosa al 1%, según el Cuadro 3.

Cuadro 3. Carga de muestras post-tratamientos (controles/SW)

Carril	Nombre	Agua de Pisa (μl)	Buffer de corrida (μl)	Muestra con plásmido (μl)
1	Marcador de PM	15	3	2
2	Tratamiento	0	3	17

4.2.3.6. Transfección de células con plásmido desnudo o en complejo con lípidos catiónicos

Se utilizó el reactivo FuGene®6, el cual es un reactivo catiónico para transfección, comercialmente disponible. Se sembraron células HEK293 con uno o dos días de anticipación, para tener cultivos con un 80% de confluencia. El complejo plásmido/FuGene®6 se preparó con anticipación, de acuerdo con instrucciones del proveedor. Brevemente, el plásmido se incubó con el reactivo durante 30 a 45 minutos, a fin de que ambos componentes formaran complejos. Diferentes mezclas

se prepararon como se indica en el Cuadro 4. Se realizo la dilución correspondiente para tener el plásmido en una concentración de 10 µg de ADN por µl.

Cuadro 4. Composición de muestras de plásmido para ensayos de transfección

Mezcla	Código	DMEM sin suero (µl)	FuGene®6 (µl)	Dilución plásmido (µg)
Proporciones recomendadas	3:2	97	3	2
TxFGP (tratamiento- FuGene®6-plásmido)	1	655.76	120	24.24
TxP (tratamiento plásmido desnudo)	2	775.76	0	24.24

Para preparar cada mezcla (Cuadro 4) se colocó en un tubo Eppendorf el medio DMEM sin suero, se agregó el reactivo FuGene®6 directamente en el medio (sin tocar las paredes del tubo) y se agitó suavemente. Se incubó por 5 minutos antes de agregar el plásmido. Una vez agregado, la mezcla final se incubó durante 45 minutos antes de ponerse en contacto con las células. Para los tratamientos sin FuGene®6 se realizó el mismo procedimiento, salvo que no se agregó el reactivo, únicamente realizando la mezcla de medio DMEM con plásmido desnudo.

Las suspensiones celulares para experimentos de transfección se prepararon de manera similar a los experimentos de permeabilización, salvo que a una concentración de 2×10^6 células en 900 µl. En estos experimentos, el plásmido se agregó gota a gota sobre la suspensión celular antes de trasvasar las muestras a los viales experimentales (pipetas Pasteur). Para ello, después de ser agregado el plásmido, las muestras se agitaron suavemente, siendo trasvasadas al vial experimental, selladas y mantenidas a 4°C en hielo antes y después del tratamiento.

Al terminar los tratamientos se llevó a cabo la siembra de las células en condiciones de esterilidad. Se comenzó resuspendiendo las células en tubos tipo Falcon de 50 ml. Se realizó una primera centrifugación a 1500 rpm por 5 minutos y se descartó el medio. Se realizó un lavado con 4 ml de PBS 1X estéril, resuspendiendo y centrifugando nuevamente para descartar el sobrenadante.

Posteriormente se resuspendió cada muestra en 1 ml de medio DMEM completo y se realizó el conteo de células en una cámara de Neubauer (Figura 7). Finalmente, 30 000 células se sembraron en caja FluoroDish con gelatina (preparadas una noche antes de su uso: se colocaron 3 ml de gelatina al 0.1% sobre el fondo de la caja, se incubó durante una noche a 37°C, 5% CO₂ y se lavó 3 veces con PBS1X, dejando en medio de lavado hasta antes de sembrar células). Por otro lado, 500 000 células se sembraron en cajas de cultivo celular de 10 cm de diámetro. Todas las células sembradas eran incubadas durante 24 horas a 37°C, 5% CO₂.

Una vez transcurrido el periodo de incubación se procedió a fijar las células con PFA al 4%. Las células sembradas en cajas de 10 cm se tripsinizaron y lavaron con 5 ml de PBS 1X, para fijarlas en suspensión al resuspenderlas en 2 ml de PBS 1X y agregar 2 ml de PFA al 4%. Después de 15 min de fijación a temperatura ambiente, se centrifugó la suspensión de células, se descartó el sobrenadante, y se resuspendió el pellet en 500 µl de PBS 1X. Las muestras se conservaron al abrigo de la luz, a 4°C dentro de tubos Eppendorf. Las células sembradas en cajas FluoroDish se fijaron sobre la superficie, realizando primero tres lavados con PBS 1X, sin dejar secar las células, colocando el lavado inmediatamente después de aspirar el medio o el PBS. Después de los lavados con PBS, se agregaron 500 µl de PFA a 4°C y se incubaron a temperatura ambiente por 15 a 20 minutos. Terminando la incubación se realizaron tres lavados con PBS 1X, incubando durante 5 minutos después de cada lavado. Finalmente, las muestras se mantuvieron a 4°C y protegidas de la luz. Las células fijadas en suspensión se analizaron mediante citometría de flujo, y las células adheridas en cajas Fluorodish se analizaron por microscopía confocal.

4.2.3.7. Transfección de células HEK293 con plásmido pCX::GFP-GPI2 utilizando el método comercial FuGene®6

Para fines comparativos de la eficiencia de transfección de células HEK293 tratadas con ondas de choque se utilizó el kit comercial FuGENE® como estándar de oro. Para este método se tripsinizaron las células con un 80% de confluencia, se sembraron en una densidad de 1×10^6 células/ml en caja de 10 cm de diámetro, o 30 000 células en caja FluoroDish, se incubaron por 24 horas a 37°C y 5% CO₂.

Al día siguiente se descarto el medio y se realizo un lavado con PBS 1X; se agregaron 5 ml de DMEM sin suero a las cajas de 10 cm o 1 ml de DMEM sin suero a cajas tipo FluoroDish. Enseguida, se agrego la mezcla de plásmido-FuGENE® (3:2, 97 µl de DMEM sin suero, 3 µl FuGENE® y 2 µg de ADN plasmídico), se homogenizo e incubo por 3-4 horas a 37°C. Terminado el tiempo de incubación se agregaron 5 ml de medio DMEM suplementado con una concentración de 20% de SFB para las cajas de 10 cm o 1 ml de medio DMEM con 20% de SFB para las cajas tipo FluoroDish, dejándolas incubar durante toda la noche. Al tercer día, las células se prepararon para ser analizadas por citometría de flujo o por microscopia confocal, como en los protocolos arriba descritos.

4.3 Diseño experimental

Cada experimento se realizó por cuadruplicado y se prepararon los grupos experimentales el día del experimento.

Las variables independientes fueron: a) intensidad del frente de presión, b) dosis de ondas de choque, c) fluorocromos (Calceína/FD-10 Dextrano) y d) material genético con o sin lípidos catiónicos. Los grupos testigo de cada suspensión en vial sufrieron los mismos manejos que los experimentales, con la excepción de las ondas de choque.

5. RESULTADOS

5.1 Búsqueda de condiciones para tratamientos de ondas de choque

5.1.1 Efecto de la energía del generador de ondas de choque y del número de ondas de choque aplicadas sobre la mortalidad celular

Se evaluaron intensidades de 10 (4193 volts) y 20 (6143 volts), que corresponden a una amplitud del pulso positivo de 12.25 y 24.5 MPa, respectivamente. La Figura 12 muestra las cuentas viables post-tratamiento de células HEK293, se observa una mortalidad celular en aumento según la cantidad la cantidad de ondas de choque.

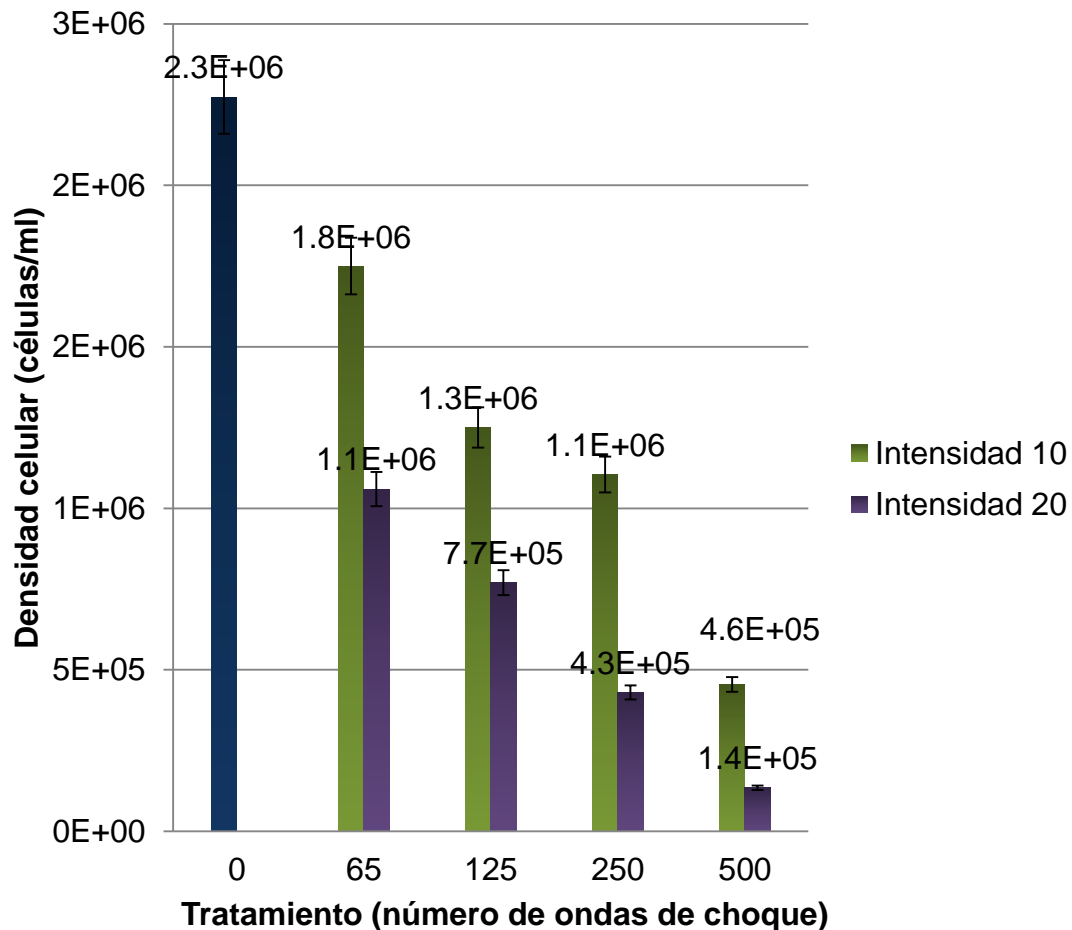


Figura 12. Densidad celular post-tratamiento al utilizar ondas de choque en diferentes cantidades e intensidad. Se utilizaron intensidades de 10 y de 20, que en el generador Piezason corresponden a una amplitud del pulso positivo de 12.25 y 24.5 MPa, respectivamente. La frecuencia utilizada fue de 1 Hz (una onda de choque por segundo). Las barras indican el error estándar.

5.1.2 Efecto del número de ondas de choque en la internalización de azul de tripano

La Figura 13 muestra una disminución en la permeabilidad al azul de tripano al colocar el colorante en contacto con las células después de los tratamientos. Se observó una permeabilidad muy baja de estas suspensiones, con un máximo de introducción del colorante de 7.5×10^4 para el tratamiento más agresivo.

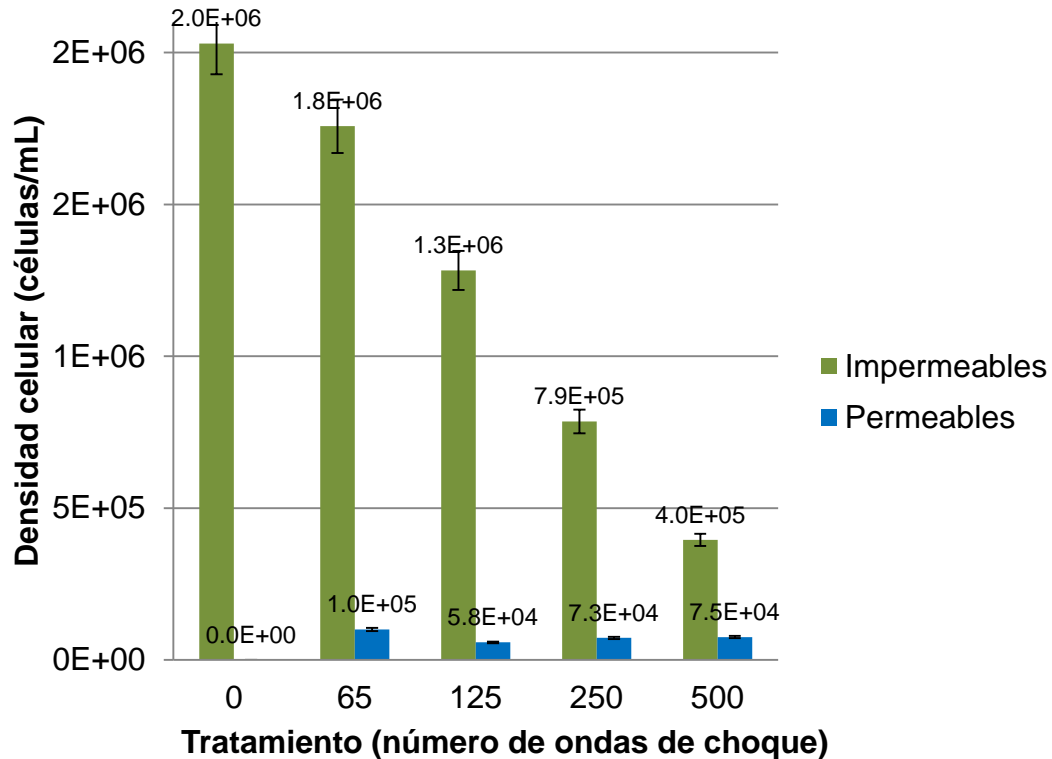


Figura 13. Internalización de azul de tripano en células tratadas con ondas de choque. Intensidad de 10 equivalente a 12.25 MPa y 1 Hz.

5.2 Ensayos de permeabilidad celular con el fluorocromo ácido calceína

5.2.1 Observaciones al microscopio de fluorescencia

En la Figura 14 se muestran imágenes típicas de células en suspensión, tratadas con ondas de choque en presencia de calceína. Se observa un aumento en la permeabilidad y mortalidad relacionada a las cantidades de ondas de choque utilizadas.

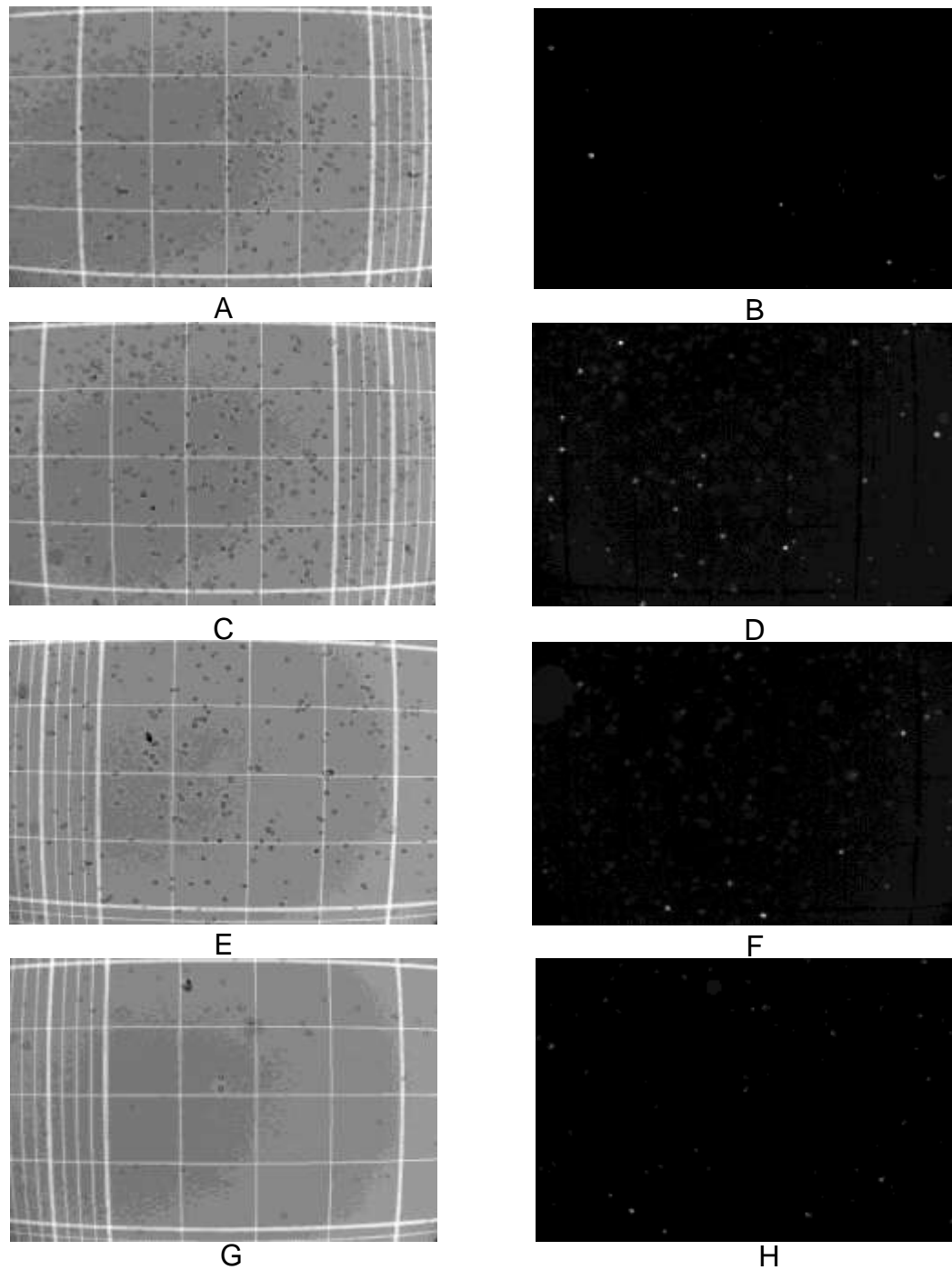


Figura 14. Análisis de calceína internalizada en células tratadas con ondas de choque. Las imágenes del lado izquierdo corresponden a microscopía de campo claro y del lado derecho microscopía de fluorescencia. Los tratamientos fueron realizados con una intensidad de 10. Células control (A y B), Células tratadas con 125 (C y D), 250 (E y F) y 500 ondas de choque (G y H).

5.2.2 Análisis de la internalización de calceína

La Figura 15 muestra la eficacia de permeabilidad contra el número de ondas aplicadas al realizarse los conteos correspondientes. Se observó un incremento en la presencia del fluorocromo, sin embargo los controles también presentaron señal fluorescente.

En el Cuadro 5 se muestra el cálculo de la eficacia de permeabilidad. Se observó un aumento en la mortalidad de las poblaciones en relación con el aumento de la cantidad de ondas de choque.

Se establecieron las cantidades de 60, 120 y 180 ondas de choque y sus respectivos controles, para obtener células permeabilizadas, con una pérdida mínima de células viables. La Figura 16 muestra los porcentajes de células remanentes después de los tratamientos de ondas de choque, los cuales fueron obtenidos utilizando la ecuación:

$$\% \text{ células viables} = [(\# \text{ de células post-tratamiento}) / (\# \text{ de células control})] \times 100.$$

Se observó que el número y la intensidad de células fluorescentes aumentaron con el número de ondas aplicadas (Figura 17). También se evidenció la introducción pasiva de la calceína en células control, Figura 18.

Cuadro 5. Cálculo de eficacia de permeabilidad celular contra el número de ondas de choque aplicadas.

Tratamiento (número de ondas de choque)	N° células permeables	N° células totales	Eficacia de permeabilidad
0	2	547	36.56%
125	306	474	59.50%
250	219	244	89.13%
500	31	35	81.82%

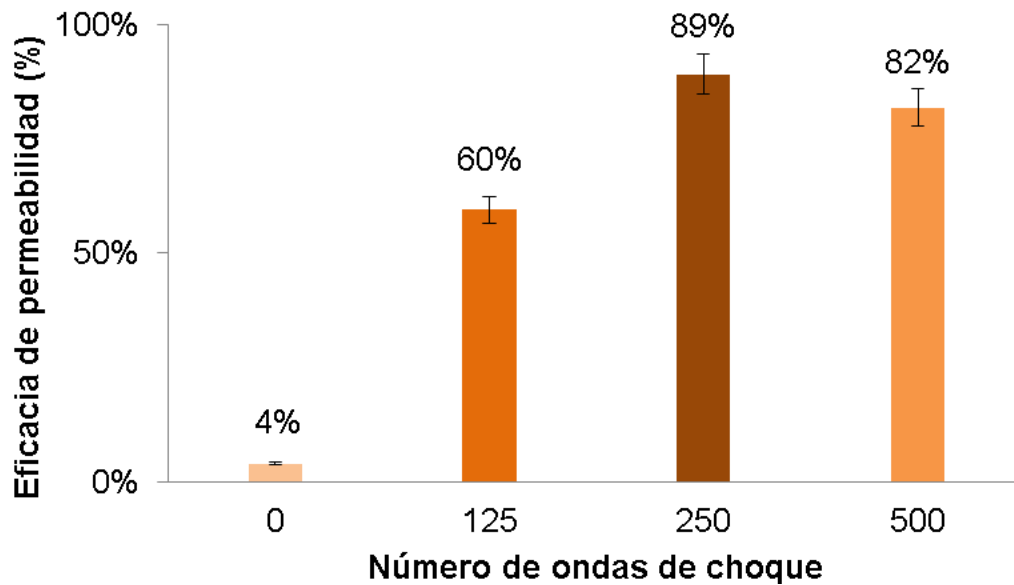


Figura 15. Permeabilidad celular contra el número de ondas de choque aplicadas.

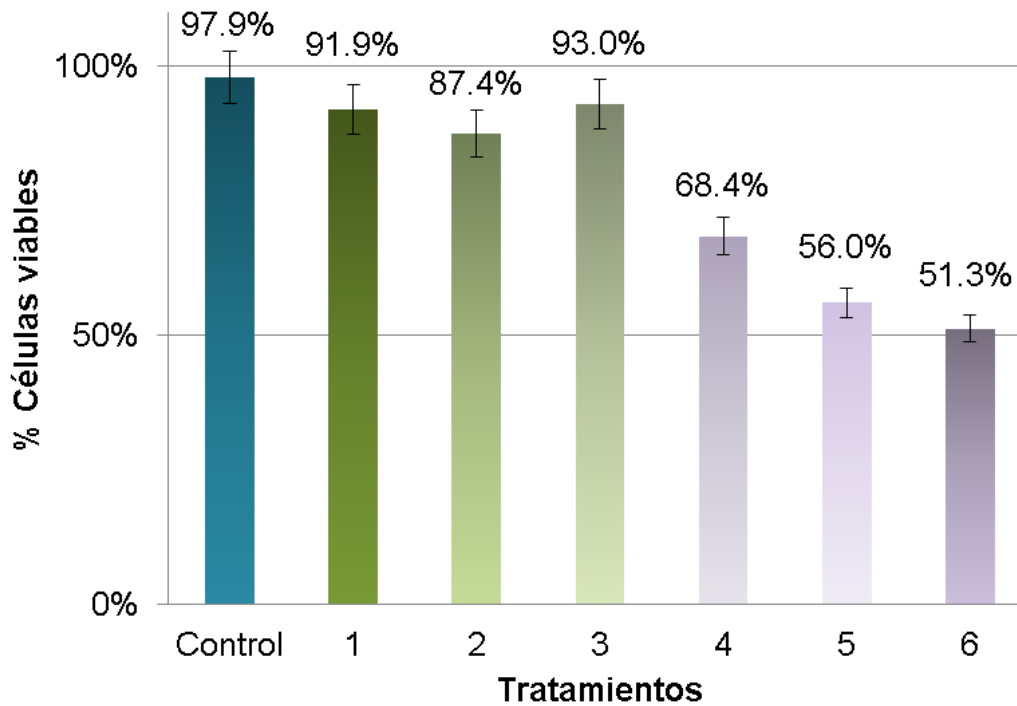


Figura 16. Supervivencia celular con los tratamientos de ondas de choque seleccionados. Células incubadas a 37°C sin ondas de choque durante 60 (1), 120 (2) y 180 (3) segundos, y a 37°C tratadas con 60 (4), 120 (5) y 180 (6) ondas de choque. Intensidad de 10 equivalente a 12.25 MPa y frecuencia de 1 Hz.

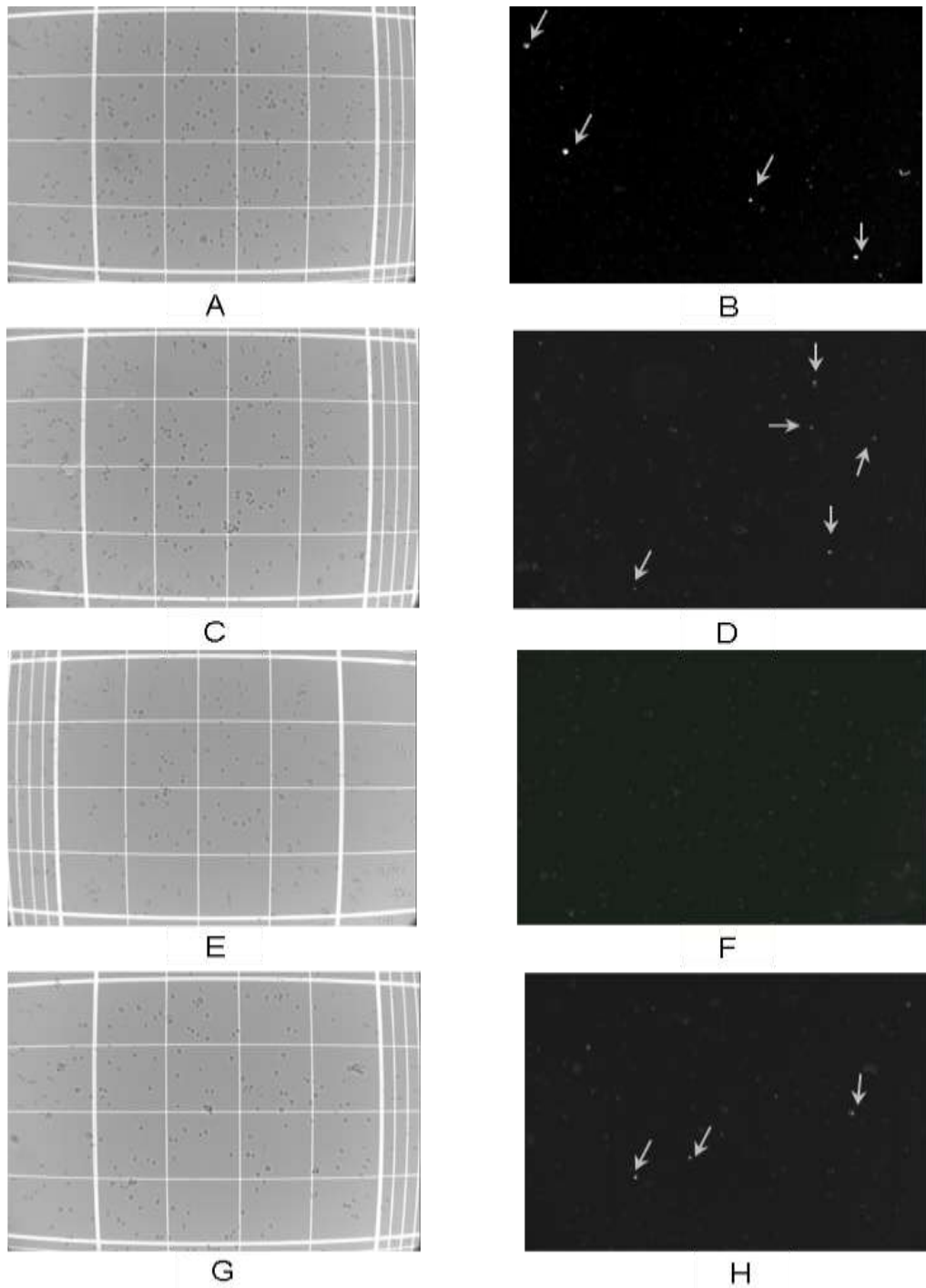


Figura 17. Internalización de calceína en tratamientos con ondas de choque. Las imágenes del lado izquierdo corresponden a microscopía de campo claro y del lado derecho a microscopía de fluorescencia. Los tratamientos fueron realizados con una intensidad de 10. Células control a 4 °C sin ondas de choque (A y B), Células tratadas con 125 (C y D), 250 (E y F) y 500 ondas de choque (G y H). Las flechas indican células con mayor grado de fluorescencia.

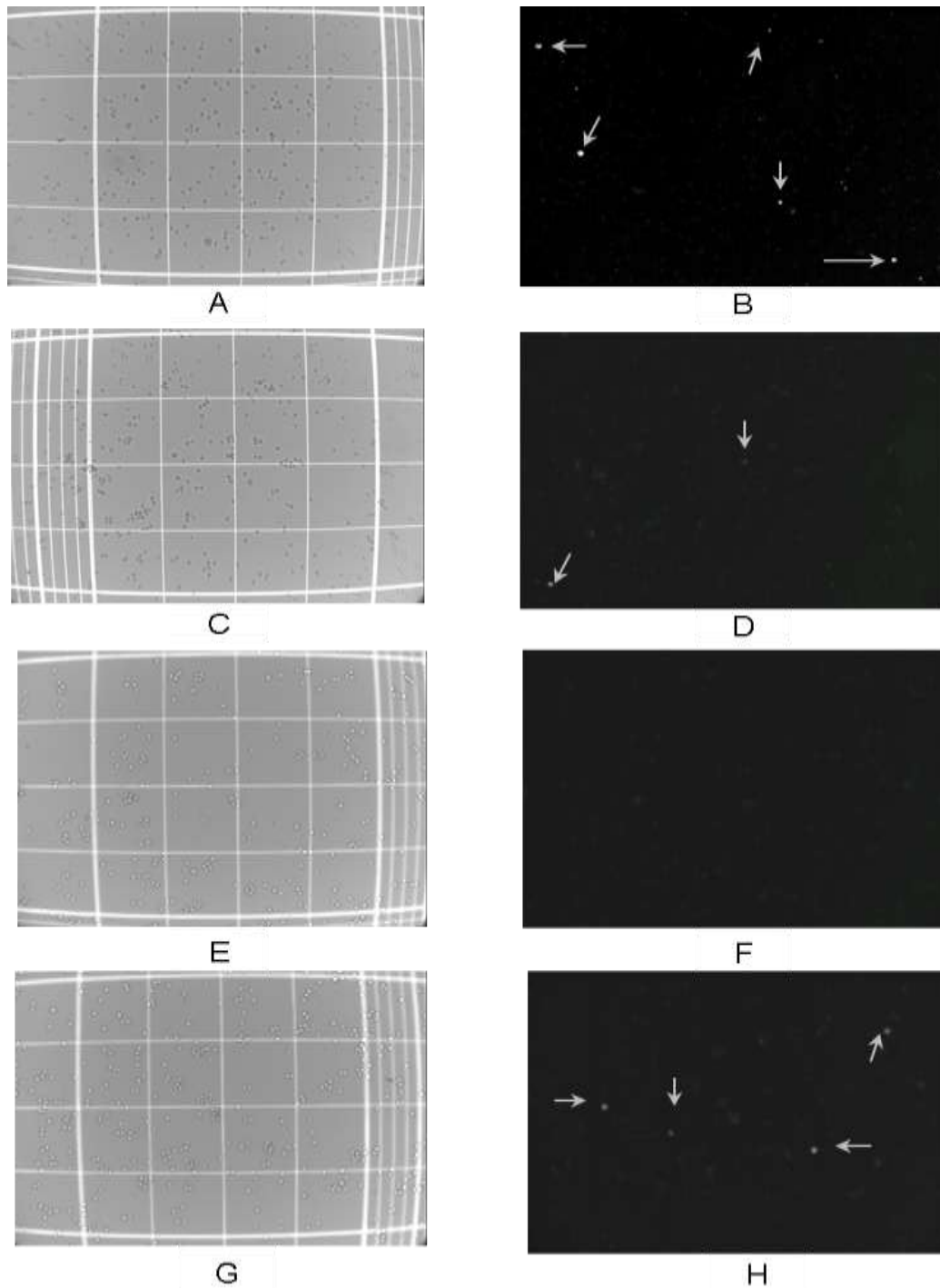


Figura 18. Internalización de calceína en células control. Las imágenes del lado izquierdo corresponden a microscopía de campo claro y del lado derecho a microscopía de fluorescencia. Células fueron expuestas a calceína e incubadas a 4°C (A y B), o a 37 °C durante 60 seg (C y D), 120 seg (E y F) o 180 segundos (G y H). Las flechas indican células con mayor grado de fluorescencia.

5.2.3 Análisis de la calceína internalizada por citometría de flujo

Las células fueron analizadas en un citómetro de flujo (BD FACSCalibur). En la Figura 19 se muestra como se delimitaron los parámetros ópticos para visualizar células de tamaño y complejidad correspondientes a la población de células HEK293.

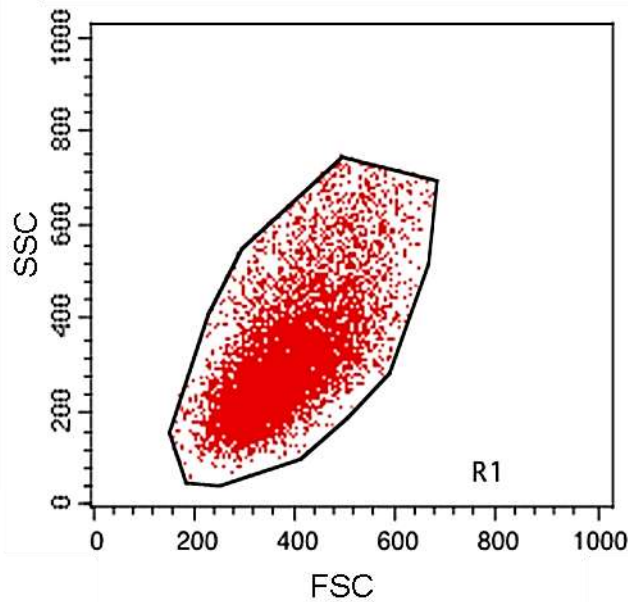


Figura 19. Parámetros de luz dispersada hacia el frente (FSC, del inglés forward scatter) y de la luz dispersada hacia los lados (SSC, del inglés side scattering) de células HEK293 en suspensión. Se observa que la población tienen una heterogeneidad esperada en cuanto a talla (\propto FSC) y a granularidad (\propto SSC). Para eliminar señales fluorescentes en restos celulares, los análisis fueron delimitados a la población dentro del polígono R1.

El análisis de luz verde emitida por la población R1 se muestra en la Figura 20, en donde se obtuvieron histogramas del número de células frente a la intensidad de fluorescencia. Con el análisis de las células control se estableció un valor de corte que delimita la fluorescencia basal o auto-fluorescencia de las células HEK293 analizadas. A esta subpoblación con fluorescencia basal se le define como M1 (Figura 20A). Posteriormente, las células que emiten luz verde por arriba del valor de corte definido corresponden a la subpoblación M2, y son consideradas como células con fluorescencia adquirida. Como pueden observarse en la Figura 20, tanto células tratadas con ondas de choque (histogramas rosas), como células control (histogramas verdes) presentaron señales de fluorescencia positivas. La

fluorescencia de las células se desplazó a señales de intensidad superior al valor de corte en porcentajes superiores a un 95%. En la Figura 21 se muestra un análisis comparativo de las intensidades medias de fluorescencia en las mismas muestras.

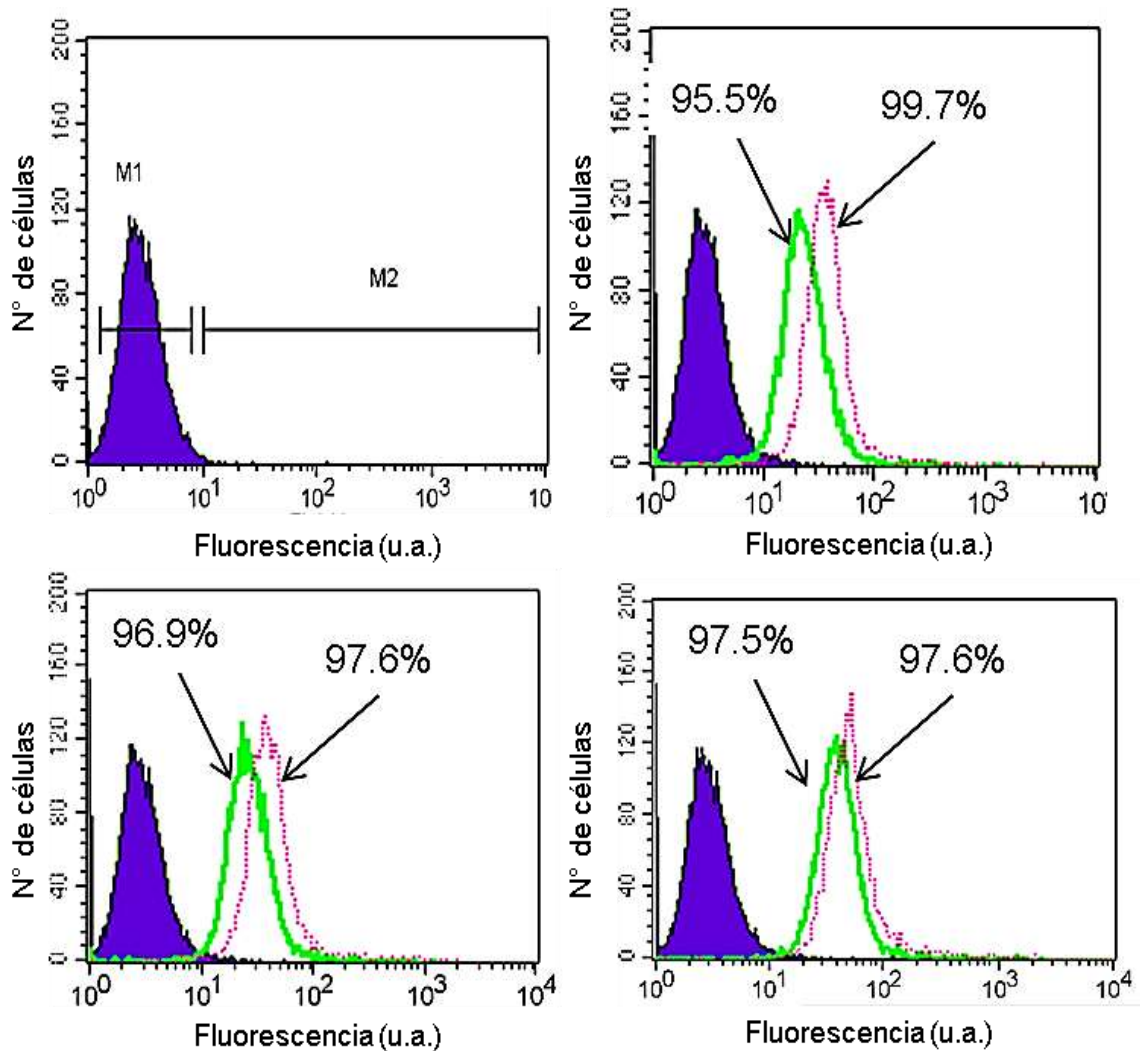


Figura 20. Histogramas comparativos de internalización de calceína, analizada por citometría de flujo. (A) Establecimiento del valor de corte para señal de autofluorescencia que presentan las células HEK293; M1, subpoblación con autofluorescencia; M2, intervalo de fluorescencia adquirida correspondiente al fluorocromo. (B) Tratamiento por 60 segundos a 37 °C; (C) Tratamiento por 120 segundos a 37°C; (D) Tratamientos por 180 segundos a 37 °C. En cada gráfico se muestra la población de células control, sin fluorocromo (sombreado azul), las células incubadas con calceína (línea verde) y las células tratadas con ondas de choque (línea rosa). Los porcentajes indican la proporción de cada población celular con fluorescencia dentro del intervalo M2.

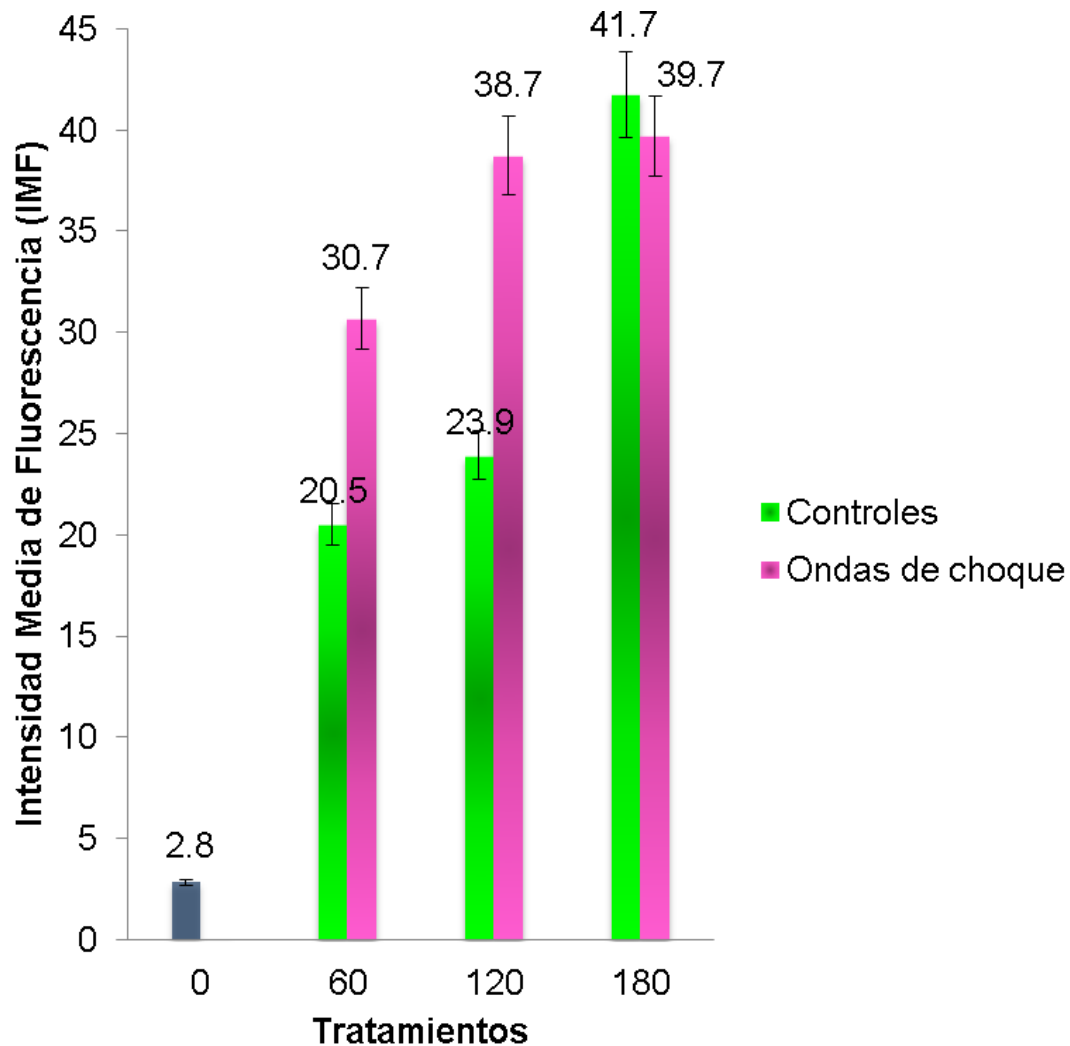


Figura 21. Fluorescencia internalizada en células control y células tratadas con números crecientes de ondas de choque (en intensidad media de fluorescencia, IMF).

5.3 Internalización de FD-10 Dextrano

5.3.1 Observaciones al microscopio de fluorescencia

En la Figura 22 se observan resultados similares a los experimentos con calceína, las células tratadas con ondas de choque mostraron un aumento en la fluorescencia que se relacionó con las cantidades de ondas de choque utilizadas. También, al igual que en el caso con calceína, se observa señal de fluorescencia para el control sin ondas de choque.

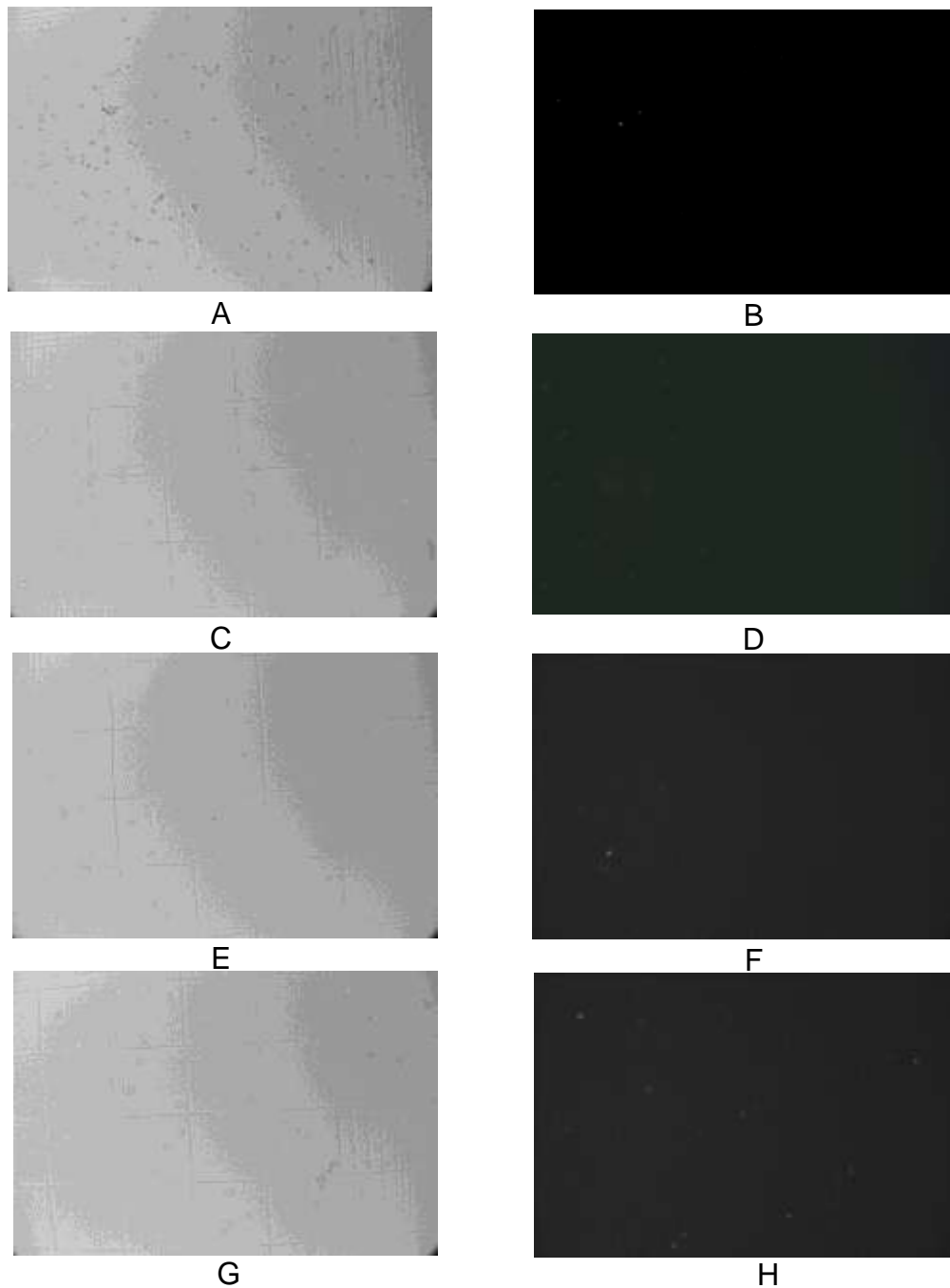


Figura 22. Fluorocromo FD-10 dextrano internalizado. Las imágenes del lado izquierdo corresponden a campo claro y del lado derecho a fluorescencia. Las gráficas corresponden a tratamientos de intensidad 10 sin ondas de choque (A y B), 60 ondas de choque (C y D), 120 ondas de choque (E y F) y 180 ondas de choque (G y H).

5.3.2 Análisis de FD-10 dextrano internalizado por citometría de flujo

Se realizaron mediciones por citometría de flujo (BD FACSCalibur). Adquirimos histogramas para representar el número de células frente a la intensidad de fluorescencia, lo cual permite apreciar la eficacia de permeabilidad de los tratamientos (Figura 23); para la medición utilizamos los parámetros celulares anteriormente fijados (Figura 19).

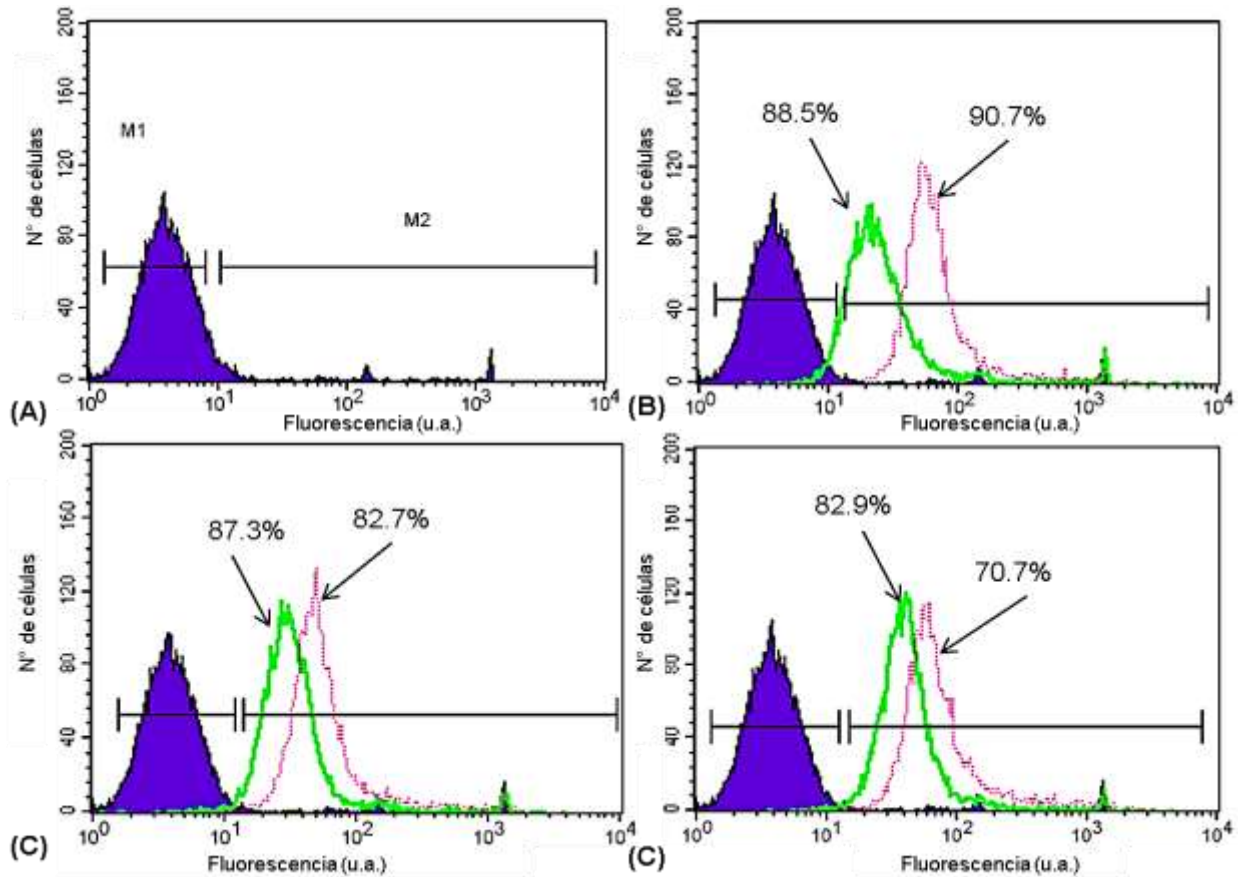


Figura 23. Histogramas comparativos de internalización de FD-10 dextrano por citometría de flujo en el BD FACSCalibur. (A) M1, medición de auto-fluorescencia que presentan las células HEK293, fijándose M2, fluorescencia no natural Sombreado, fluorescencia basal, sin fluorocromo; línea continua, control con fluorocromo a 60 segundos de exposición a 37°C; línea punteada, tratamiento de 60 SW. (C) Tratamiento 2, muestras analizadas: Sombreado, fluorescencia basal, sin fluorocromo; línea continua, control con fluorocromo a 120 segundos de exposición a 37°C; línea punteada, tratamiento de 120 SW. (D) Tratamiento 3, muestras analizadas: Sombreado azul, población de células control, con fluorescencia basal; línea continua, control con fluorocromo a 180 segundos de exposición a 37°C; línea punteada, tratamiento de 180 SW. Los porcentajes indican la proporción de cada población celular con fluorescencia dentro del intervalo M2.

En la Figura 23, observamos un claro desplazamiento de la fluorescencia presentada por parte de los tratamientos con ondas de choque frente a los resultados obtenidos en los controles, al igual se evidencia la intensidad de la fluorescencia presentada en las células tratadas en la Figura 24.

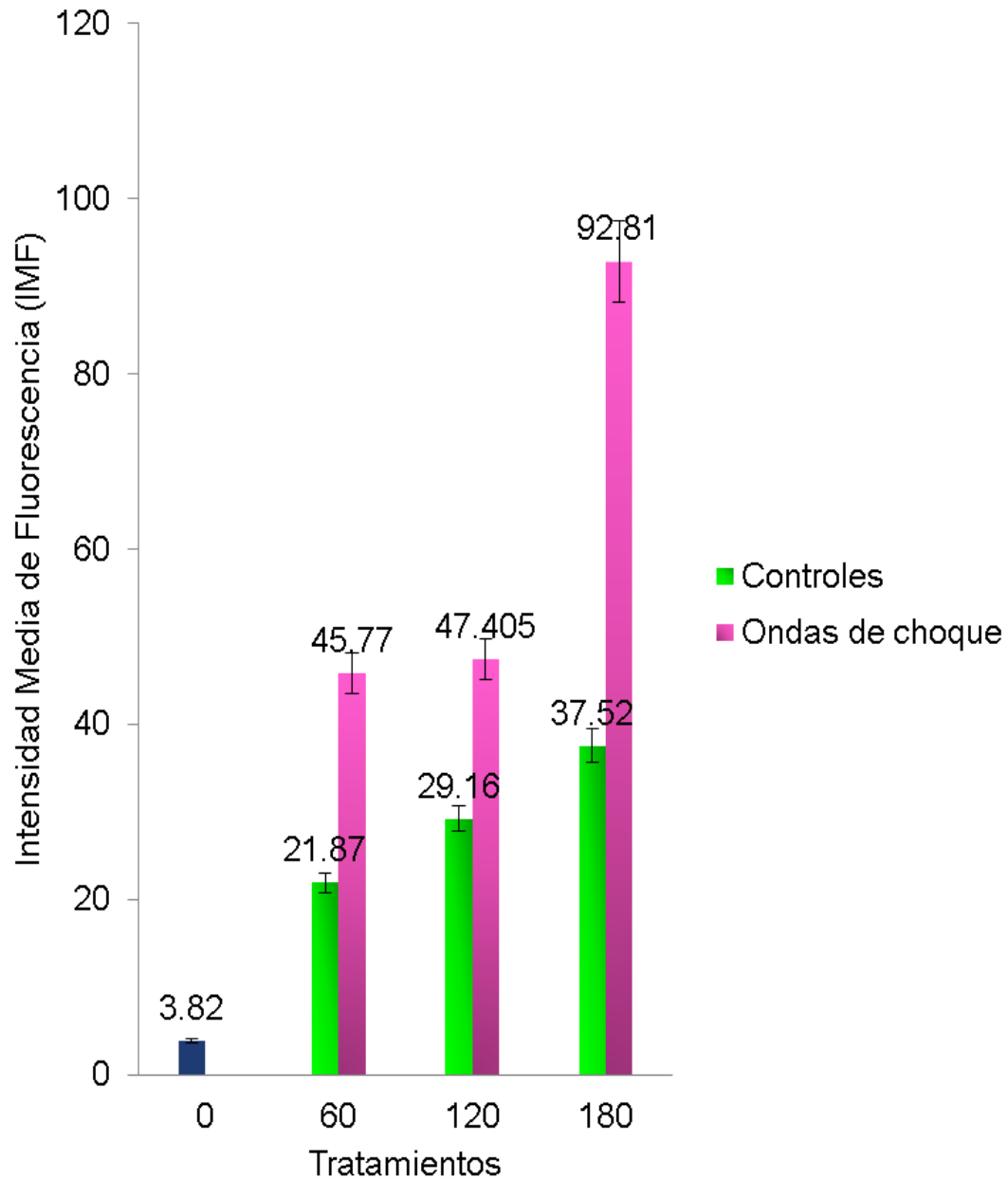


Figura 24. Intensidades medias de fluorescencia de células control y células tratadas con números crecientes de ondas de choque en presencia de dextrano fluoresceinado de 10 kDa.

5.3.3 Microscopia confocal

Se realizó un análisis por microscopía confocal localizando la fluorescencia en células no tratadas con ondas de choque, la cual se presenta principalmente en la membrana de las células y no dentro de ellas (Figura 25). En contraste, las células con tratamiento de ondas de choque presentan mayor fluorescencia ya que el fluorocromo se encuentra no solo en la membrana sino internalizado.

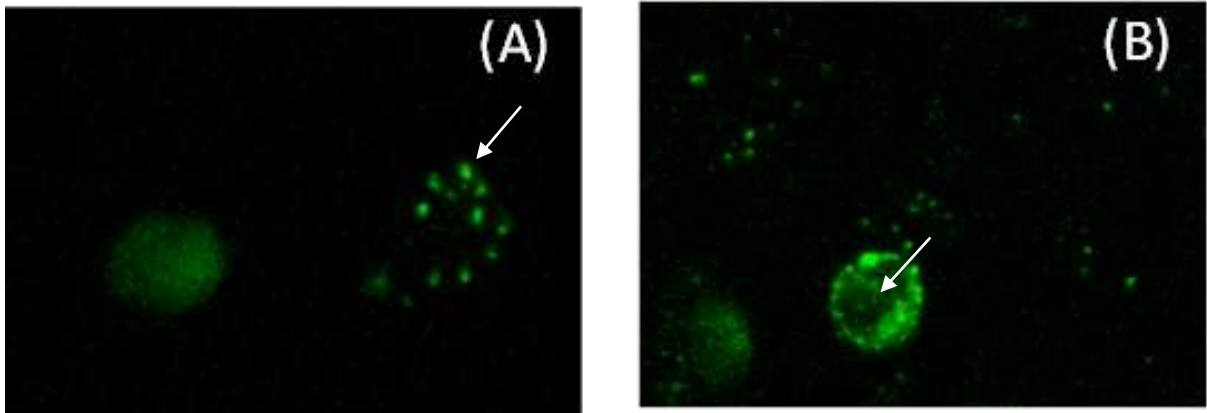


Figura 25. Imágenes confocales de células tratadas en presencia de FD10. (A) Células incubadas con FD10 durante 60 segundos. (B) Células tratadas con 60 ondas de choque en presencia del fluorocromo. Las imágenes muestran la localización del fluorocromo sobre la superficie de células, enfocadas en distintos planos. Solamente con ondas de choque, el fluorocromo puede ser observado en el interior de las células (flecha).

5.4 Efectos de ondas de choque sobre el ADN plasmídico

5.4.1 Caracterización del plásmido

Se llevó a cabo la linearización del plásmido con el uso de enzimas de restricción EcoR1, Xho1 y Hind III, marcadas en el mapa genético del plásmido pCX::GFP-GPI2 como sitios de restricción específicos. En la Figura 26, mostramos los fragmentos de restricción obtenidos. Este análisis muestra los patrones de cortes esperados, de acuerdo con la estructura lineal del plásmido (ver sección Metodología, Figura 8).

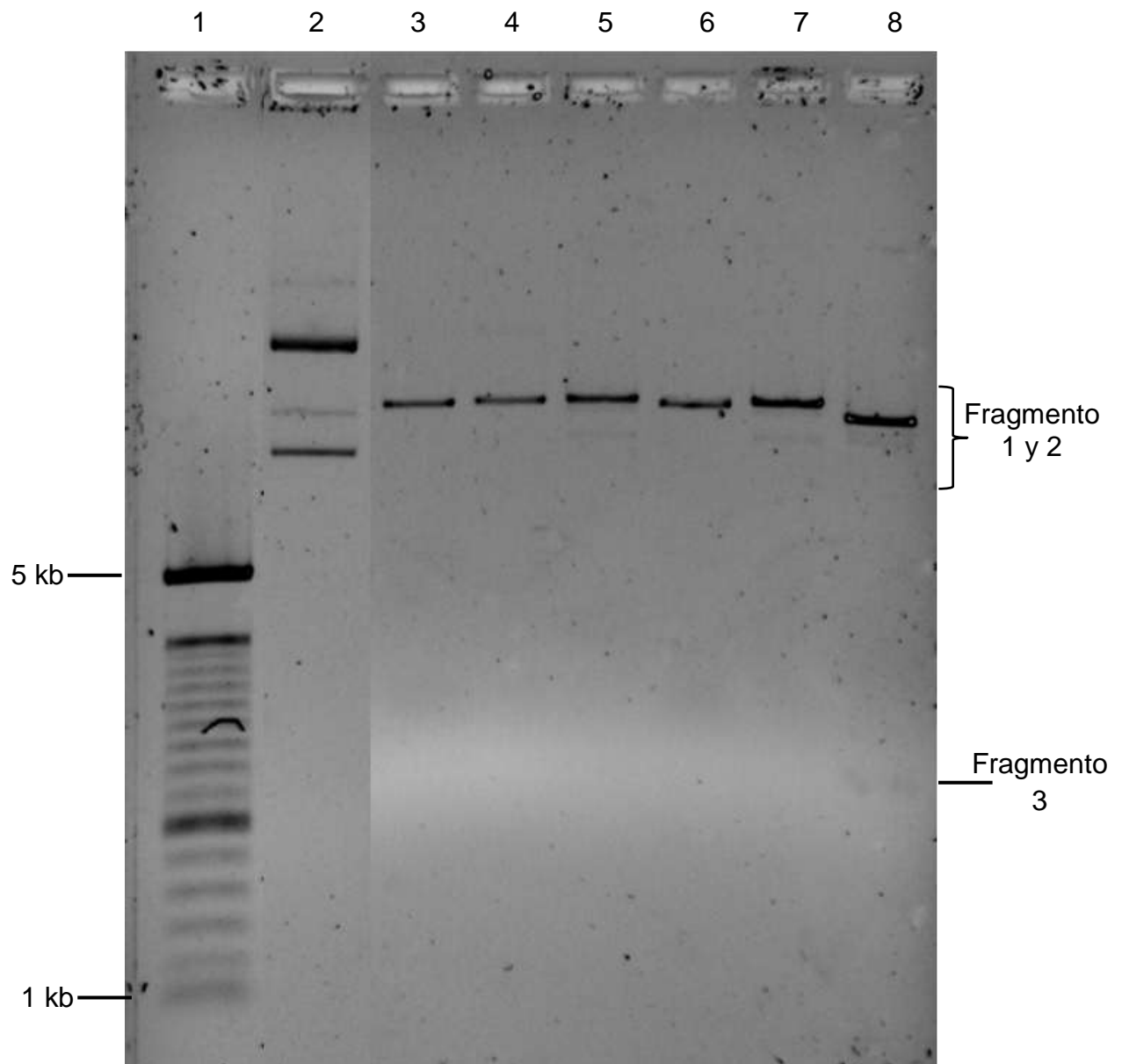


Figura 26. Gel de agarosa al 1% del plásmido pCX::GFP-GPI2 tratado con enzimas. Se utilizaron las tres enzimas reportadas como útiles para realizar cortes en el plásmido evidenciando 2 y e fragmentos, respectivamente. Muestras analizadas: 1) Marcador de peso molecular, 2) Plásmido completo, 3) Plásmido tratado con EcoR1 (20ng), 4) Plásmido tratado con Xho1 (20ng), 5) Plásmido tratado con Hind III (20ng), 6) Plásmido tratado con EcoR1 (40ng), 7) Plásmido tratado con Hind III (40ng), 8) Plásmido tratado con Xho1 y HindIII (40ng).

5.4.2 Estabilidad del plásmido a tratamientos de ondas de choque

Analizamos la influencia de los componentes del medio de cultivo celular DMEM, suplementado o no con suero fetal bovino, y sometimos las células a cantidades crecientes de ondas de choque (65-2000 ondas). Al analizar las muestras después de los tratamientos encontramos que la incubación de plásmido en presencia de suero fetal bovino genera una importante degradación del ADN, lo cual puede observarse por la presencia de un barrido (Figura 27). La degradación aumenta de manera proporcional al tiempo de incubación.

Cuando el plásmido fue sometido a tratamientos con ondas de choque en presencia de medio DMEM con suero fetal bovino, el fenómeno de degradación resultó exacerbadado, como puede observarse en la Figura 28.

En la Figura 27 y 28 se muestra que durante el desarrollo de las pruebas de degradación del ADN plasmídico aparece una banda gruesa de una talla aparente de 5 kb que no corresponde a las cantidades y peso molecular del plásmido depositado sobre el gel. Al analizar los componentes en el medio de cultivo celular, se detectó que este artefacto corresponde a un componente del suero fetal bovino (Figura 29).

Se descarto cualquier inferencia del medio sobre la degradación del plásmido al realizar un análisis del material nucleico expuesto al medio DMEM no suplementado, comparándolo con incubaciones en agua inyectable estéril, sometido a 37°C o a tratamientos con ondas de choque a esta misma temperatura (ver Figura 30 y 31).

En las Figuras 32 y 33 se observa claramente poca degradación del ADN plasmídico tanto en muestras control como en aquellas sometidas a tratamientos con ondas de choque. El material nucleico mostró ser estable bajo las condiciones utilizadas para permeabilizar células (de 60 a 180 ondas de choque a 37°C).

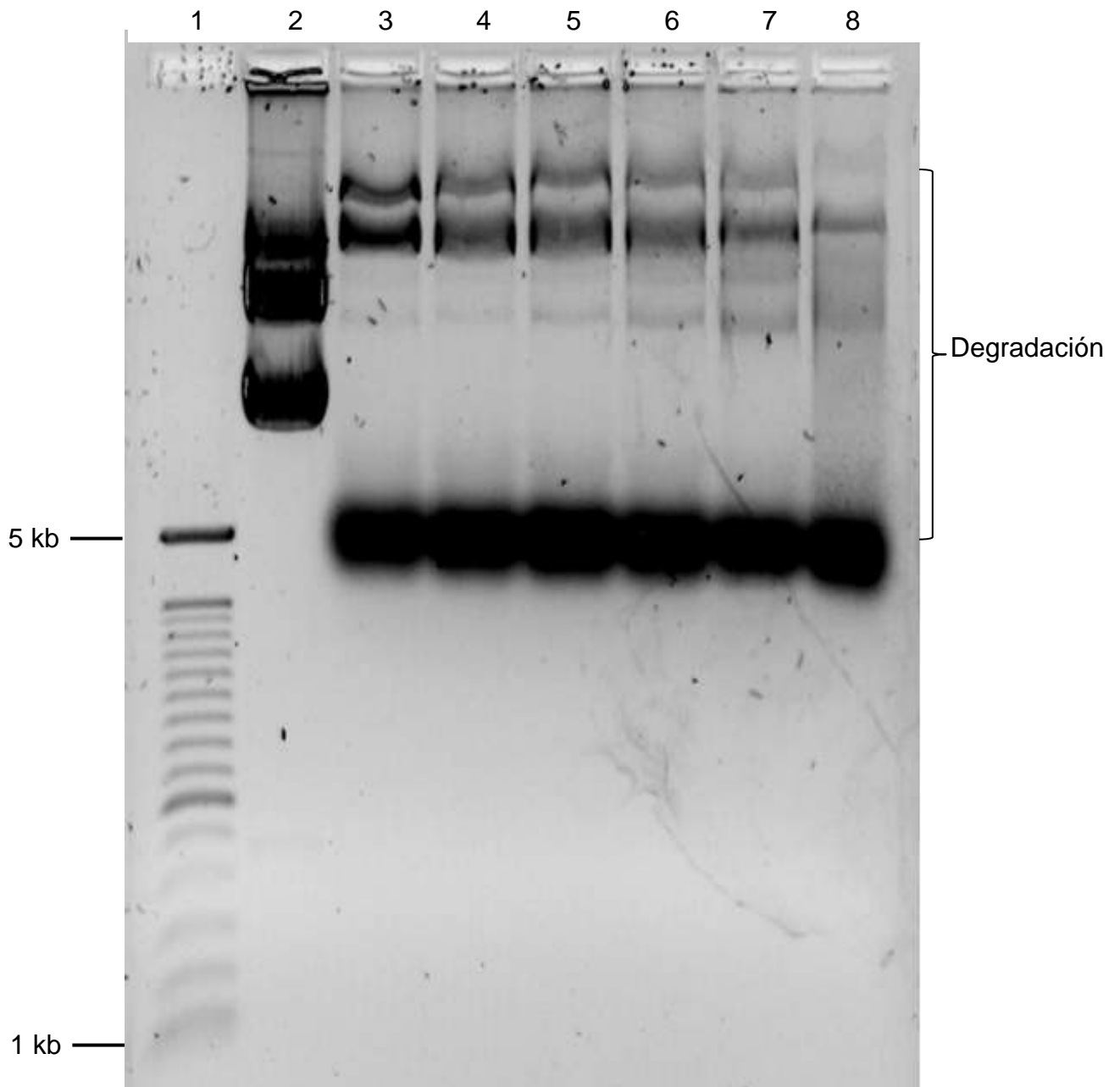


Figura 27. Gel de agarosa al 1% del plásmido pCX::GFP-GPI2 incubado a 37°C con medio de cultivo DMEM suplementado con suero fetal bovino. Los tiempos de incubación a 37°C corresponden a tiempos equivalentes de tratamientos de ondas de choque utilizados. 1) Marcadores de pesos moleculares, 2) Plásmido control no expuesto al medio, 3) Plásmido incubado durante 1 minuto, 4) Plásmido incubado 2 minutos, 5) Plásmido incubado 4 minutos, 6) Plásmido incubado 8 minutos, 7) Plásmido incubado 16 minutos, 8) Plásmido incubado 33 minutos.

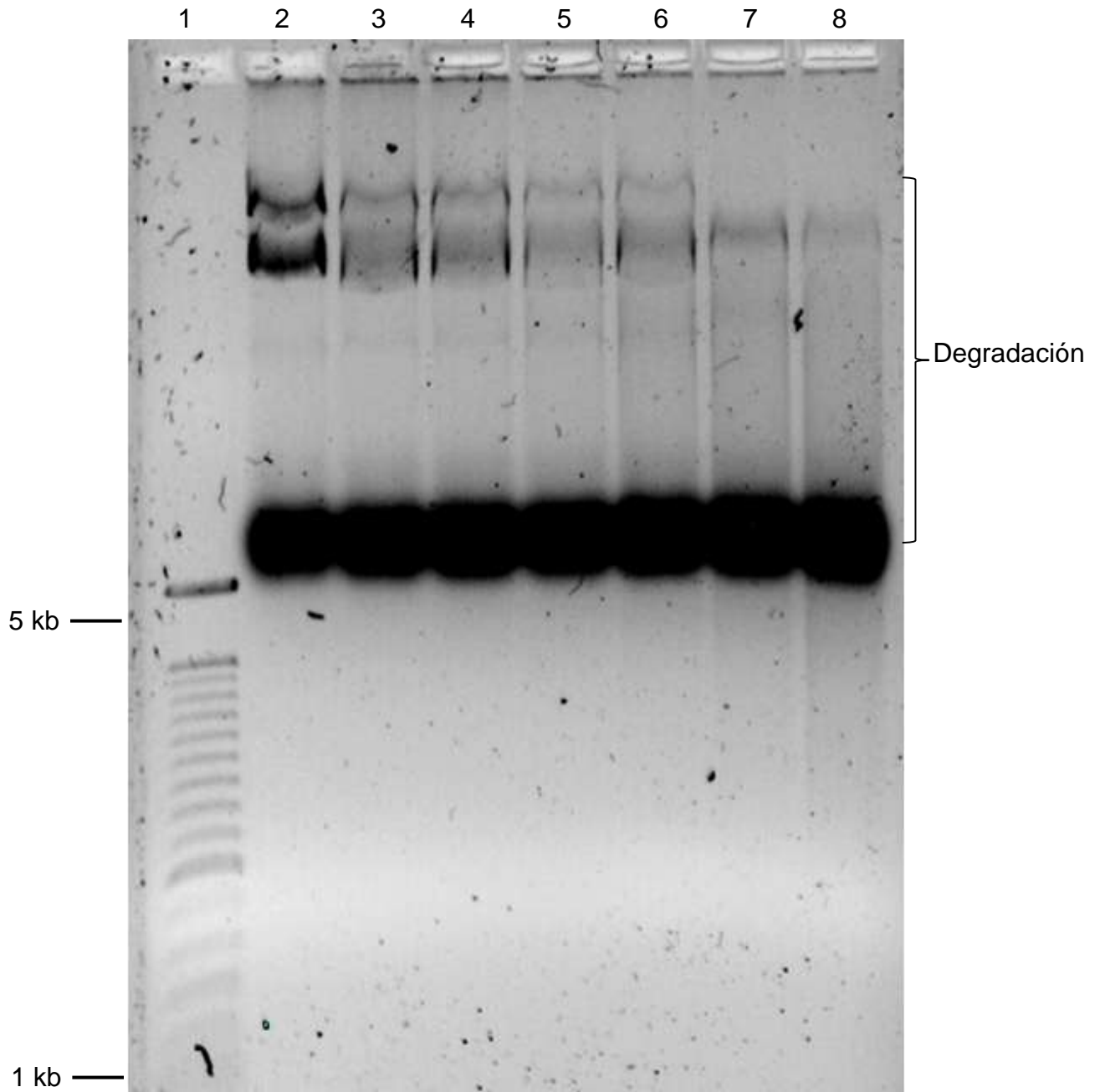


Figura 28. Gel de agarosa al 1% del plásmido pCX::GFP-GPI2 sometido a tratamientos de ondas de choque en presencia de medio de cultivo con suero fetal bovino. 1) Marcador de pesos moleculares, 2) Plásmido control, 3) Plásmido tratado con 65 ondas de choque (SW), 4) Plásmido tratado con 125 SW, 5) Plásmido tratado con 250 SW, 6) Plásmido tratado con 500 SW, 7) Plásmido tratado con 1000 SW, 8) Plásmido tratado con 2000 SW.

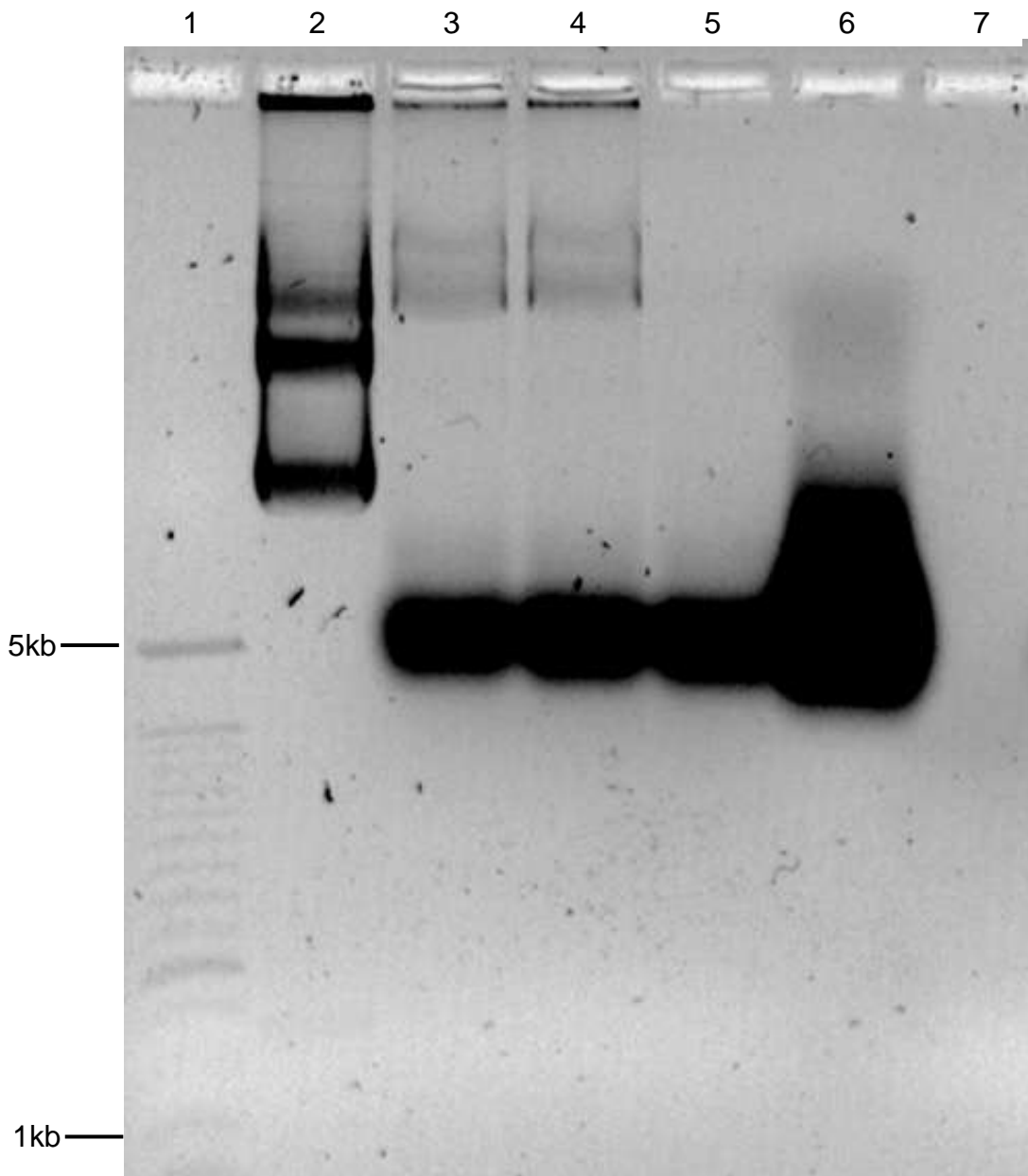


Figura 29. Gel de agarosa al 1% del plásmido pCX::GFP-GPI2 y de componentes del medio de cultivo. 1) Marcador de pesos moleculares, 2) Plásmido control sin tratamiento, diluido en agua de PiSA, 3) Plásmido + medio DMEM suplementado con suero fetal bovino, mantenido a 4°C, 4) Plásmido incubado a 37°C por 60s con medio DMEM suplementado con suero fetal bovino, 5) Medio DMEM suplementado con suero, 6) Suero fetal bovino, 7) Medio DMEM no suplementado.

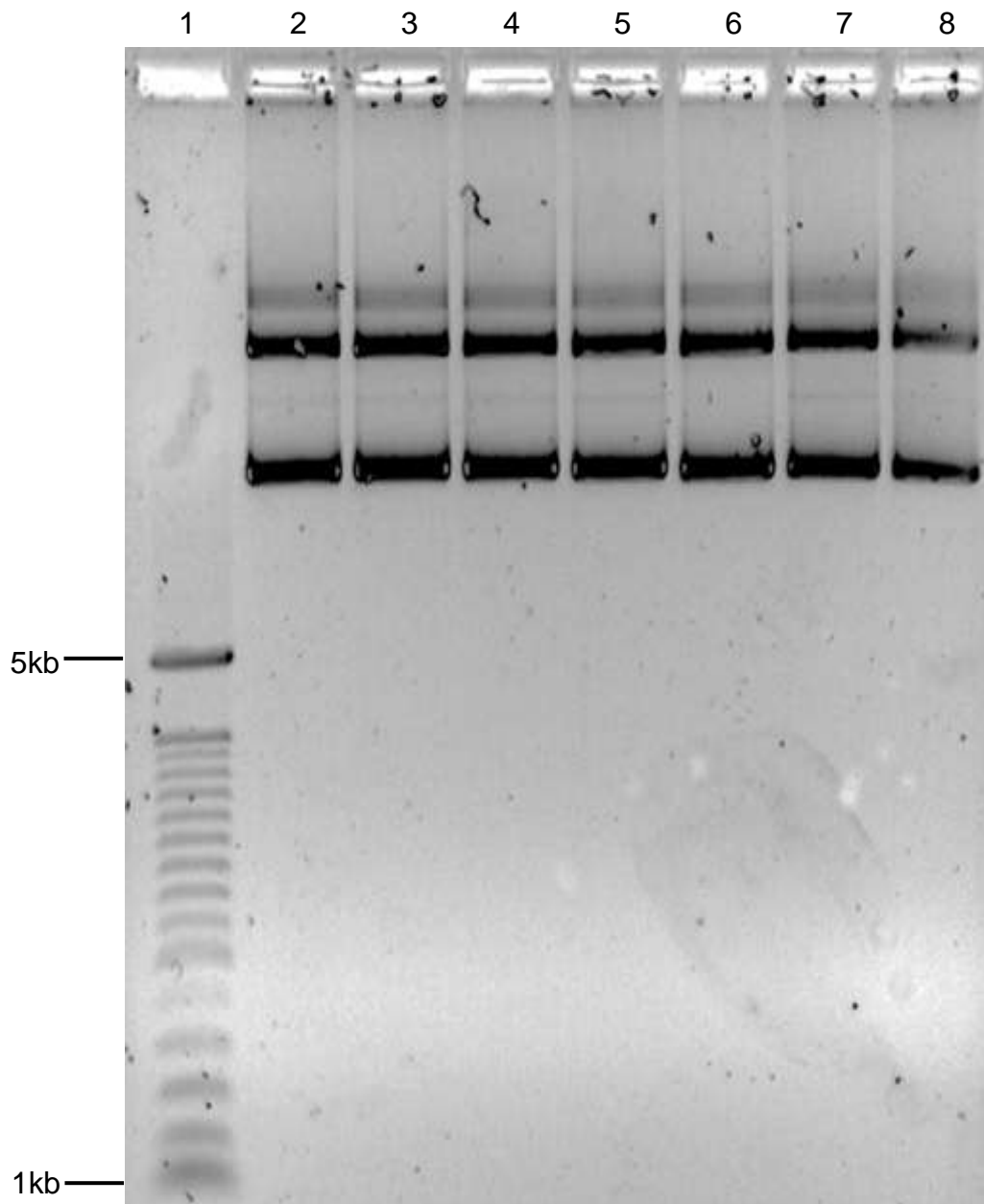


Figura 30. Gel de agarosa al 1% del plásmido pCX::GFP-GPI2 incubado en agua de PiSA a 37°C, sin ondas de choque (SW). 1) Marcador de pesos moleculares, 2) Plásmido control sin SW, 3) Plásmido incubado 1 minuto, 4) Plásmido incubado 2 minutos, 5) Plásmido incubado 4 minutos, 6) Plásmido incubado 8 minutos, 7) Plásmido incubado 16 minutos, 8) Plásmido incubado 33 minutos.

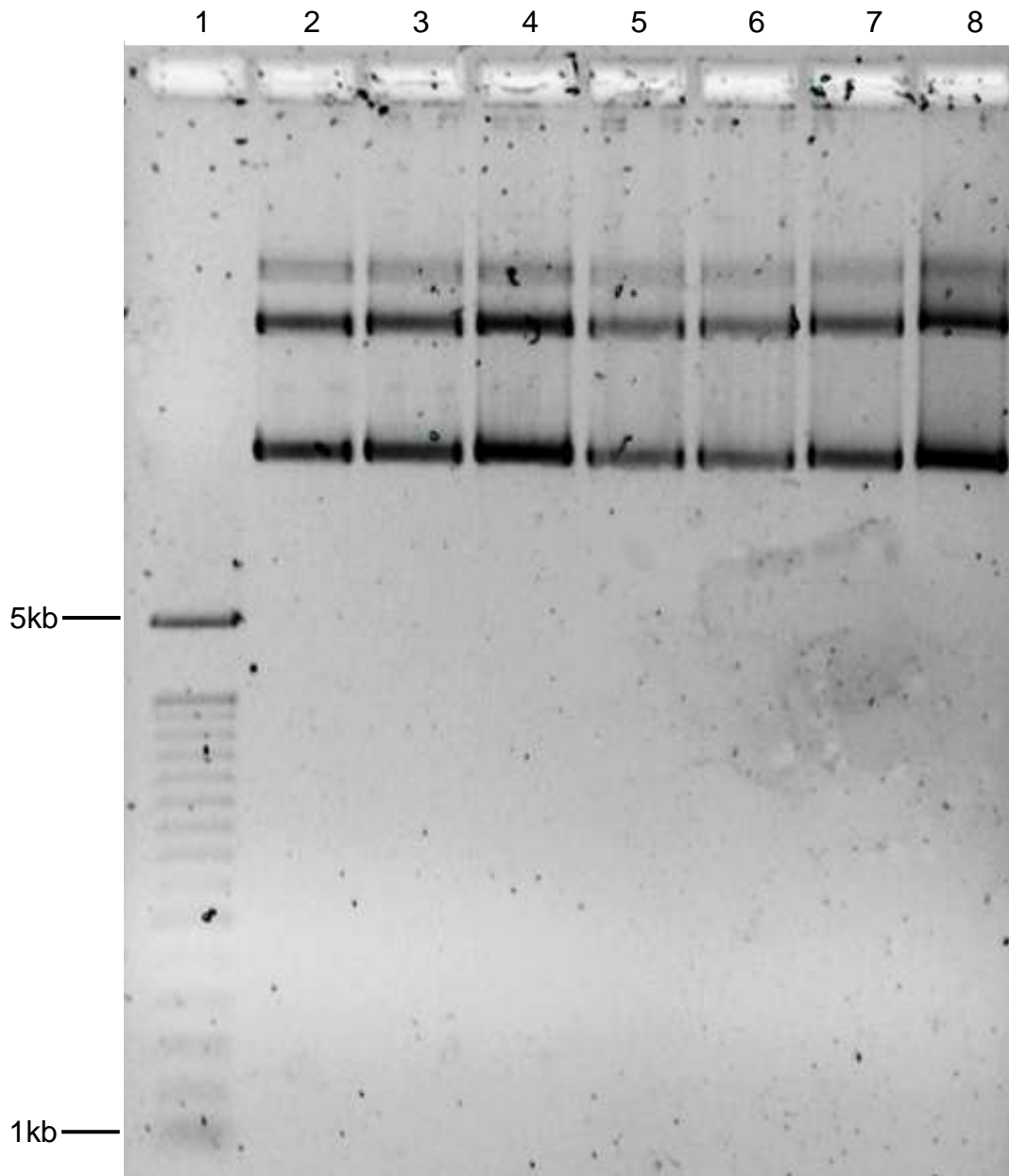


Figura 31. Gel de agarosa al 1% del plásmido pCX::GFP-GPI2 en agua de PiSA , sometido a tratamientos de ondas de choque (SW). 1) Marcador de pesos moleculares, 2) Plásmido control negativo sin SW, 3) Plásmido tratado con 65 ondas de choque (SW), 4) Plásmido tratado con 125SW, 5) Plásmido tratado con 250SW, 6) Plásmido tratado con 500SW, 7) Plásmido tratado con 1000SW, 8) Plásmido tratado con 2000SW.

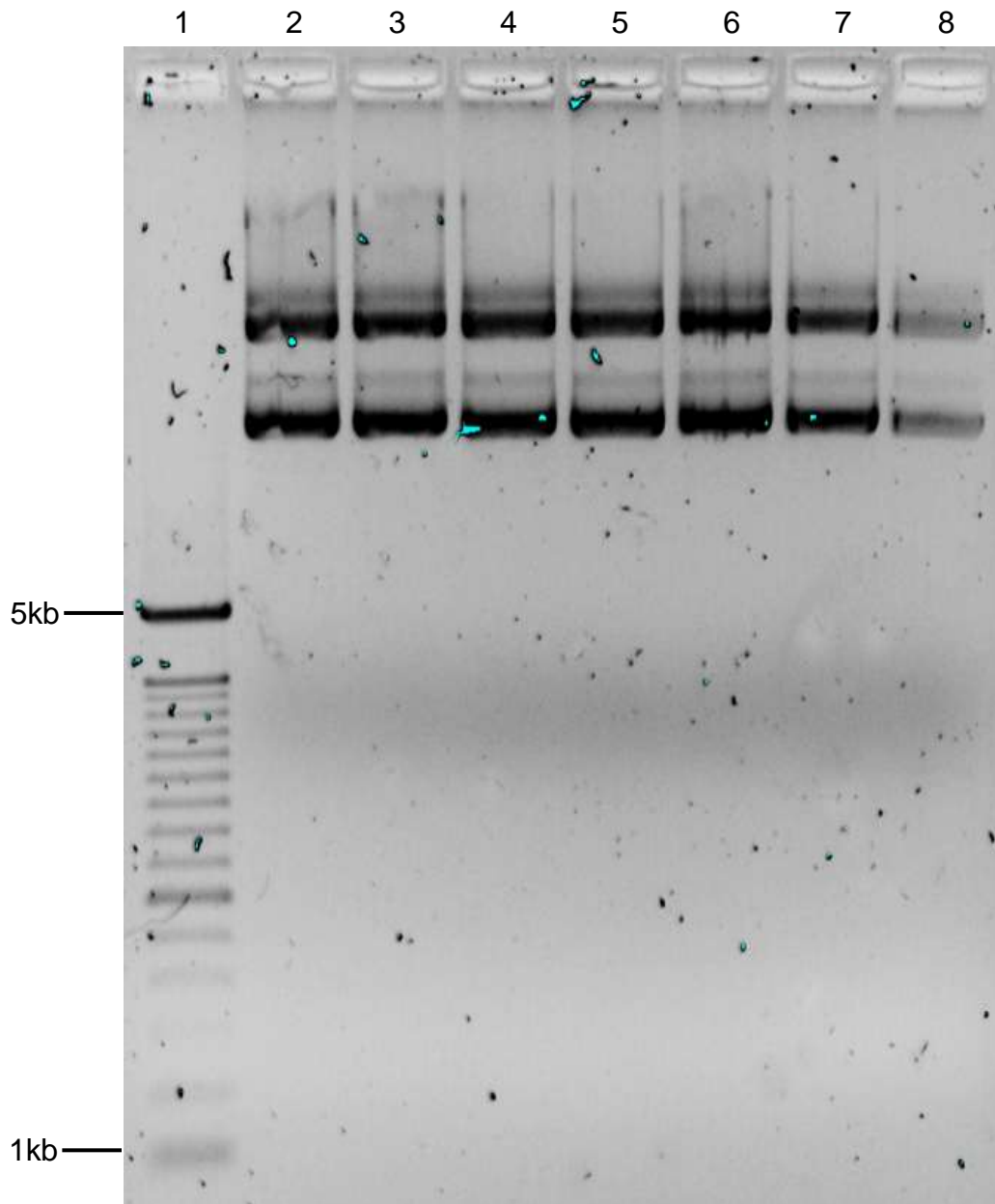


Figura 32. Gel de agarosa al 1% del plásmido pCX::GFP-GPI2 incubado a 37°C en medio DMEM sin SFB ni antibiótico. 1) Marcador de pesos moleculares, 2) Plásmido control, 3) Plásmido incubado 1 minuto, 4) Plásmido incubado 2 minutos, 5) Plásmido incubado 4 minutos, 6) Plásmido incubado 8 minutos, 7) Plásmido incubado 16 minutos, 8) Plásmido incubado 33 minutos.

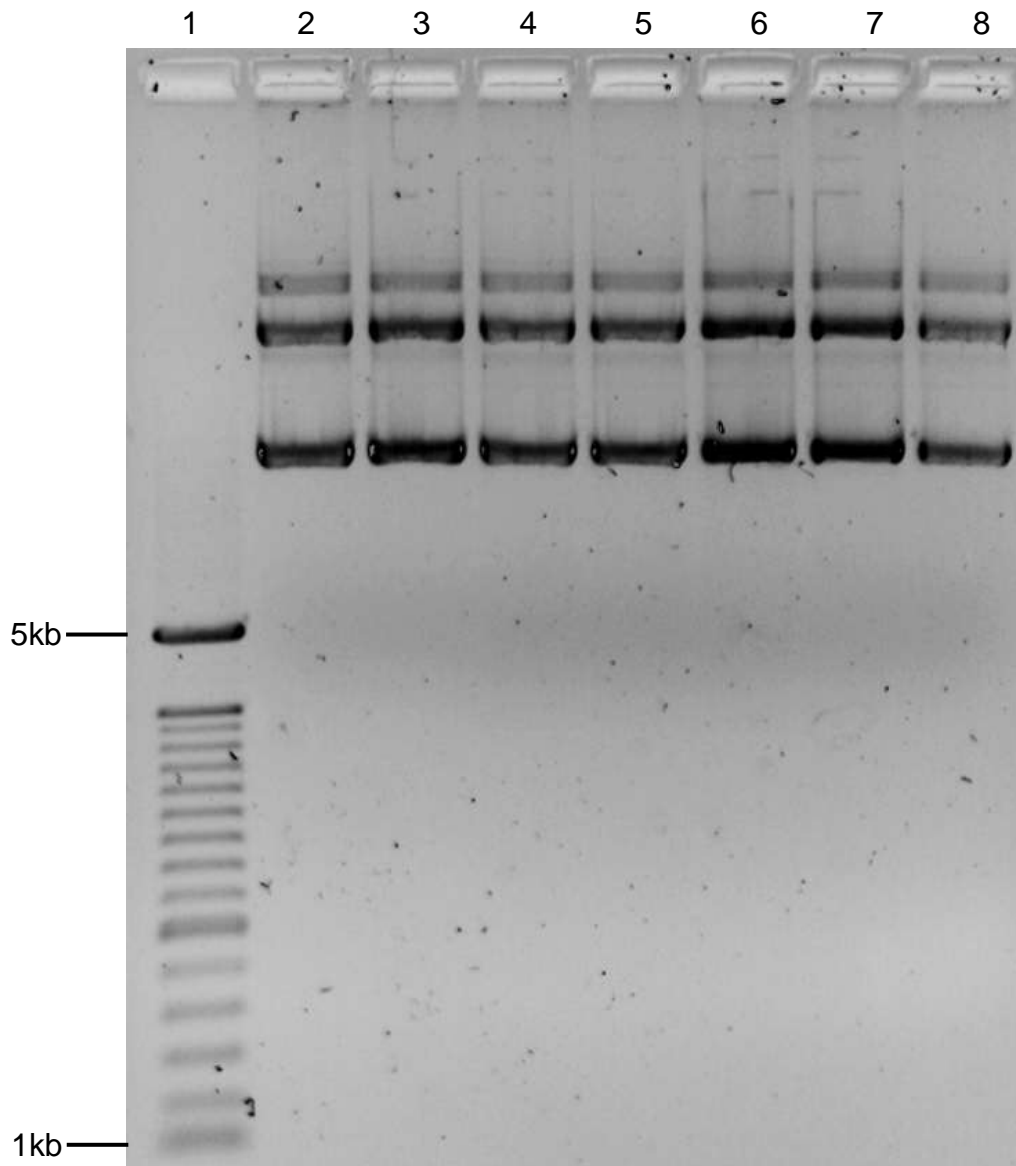


Figura 33. Gel de agarosa al 1% del plásmido pCX::GFP-GPI2 sometido a tratamientos de ondas de choque (SW) en medio DMEM no suplementado. 1) Marcadores de pesos moleculares, 2) Plásmido control negativo sin SW, 3) Plásmido tratado con 65SW, 4) Plásmido tratado con 125SW, 5) Plásmido tratado con 250SW, 6) Plásmido tratado con 500SW, 7) Plásmido tratado con 1000SW, 8) Plásmido tratado con 2000SW.

5.5 Eficiencia de transfección del plásmido desnudo o en complejo con lípidos catiónicos

5.5.1. Análisis de fluorescencia por citometría de flujo

Se realizaron tratamientos control con plásmido desnudo (DNA⁻), así como tratamientos con el plásmido incubado con el reactivo FuGene®6 (DNA⁺). Se analizaron las diferentes muestras por citometría de flujo, utilizando los parámetros antes fijados (ver Figura 19), en este caso para monitorear la expresión de proteína GFP después de 24 horas de incubación posteriores al tratamiento.

En la Figura 34 se muestra el análisis en los dotplots de células tratadas con plásmido desnudo, se observa que la expresión de GFP varió en células incubadas a 37°C sin tratamiento, a una dispersión aumentada de la fluorescencia por parte de células sometidas a 60, 120 y 180 ondas de choque, respectivamente.

En la Figura 35 se muestra el mismo análisis para células tratadas con el plásmido cationizado mediante incubación con el reactivo comercial FuGene®6. Bajo estas condiciones, las ondas de choque resultaron en incremento de la señal de fluorescencia, con un 75 % de eficiencia incrementada (Figura 36).

A la par se realizó la transfección de células HEK293 utilizando las indicaciones marcadas en el protocolo comercial del kit FuGene®6. El análisis por citometría de flujo (Figura 37) mostró que este método generó un porcentaje de transfección mayor que las ondas de choque (12%).

Puede observarse en la Figura 37 que, aunque un 19.4% de células presentan fluorescencia adquirida por expresión de GFP, la intensidad es inferior que en células transfectadas por ondas de choque (ver Figura 35).

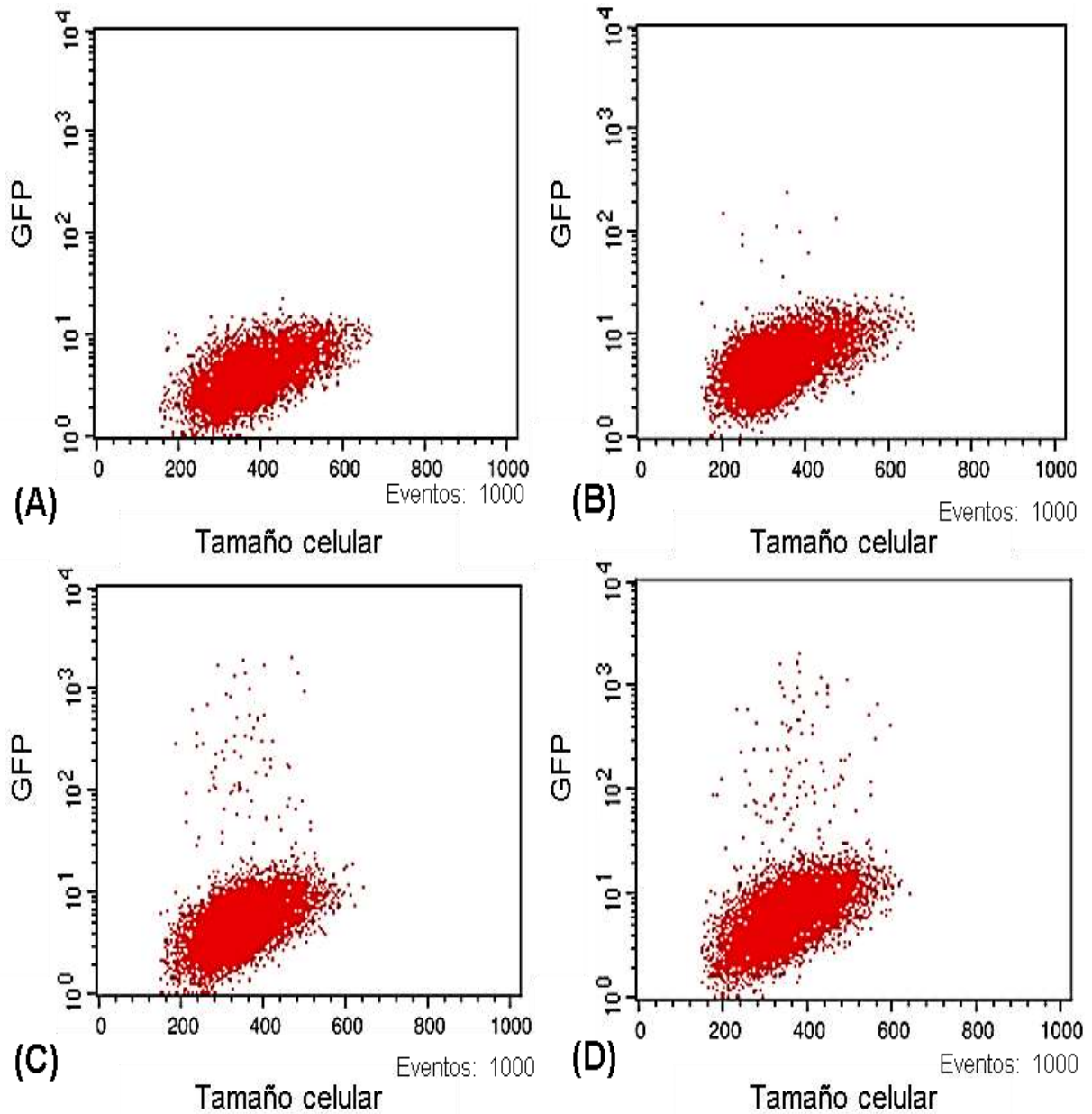


Figura 34. Análisis por citometría de flujo de la fluorescencia verde VS tamaño de partícula en muestras de células tratadas con plásmido desnudo y diferentes cantidades de ondas de choque. Cada punto representa un evento. (A) ADN⁻ sin tratamiento. (B) ADN⁻ + tratamiento con 60 ondas de choque. (C) ADN⁻ + tratamiento con 120 ondas de choque. (D) ADN⁻ + tratamiento con 180 ondas de choque.

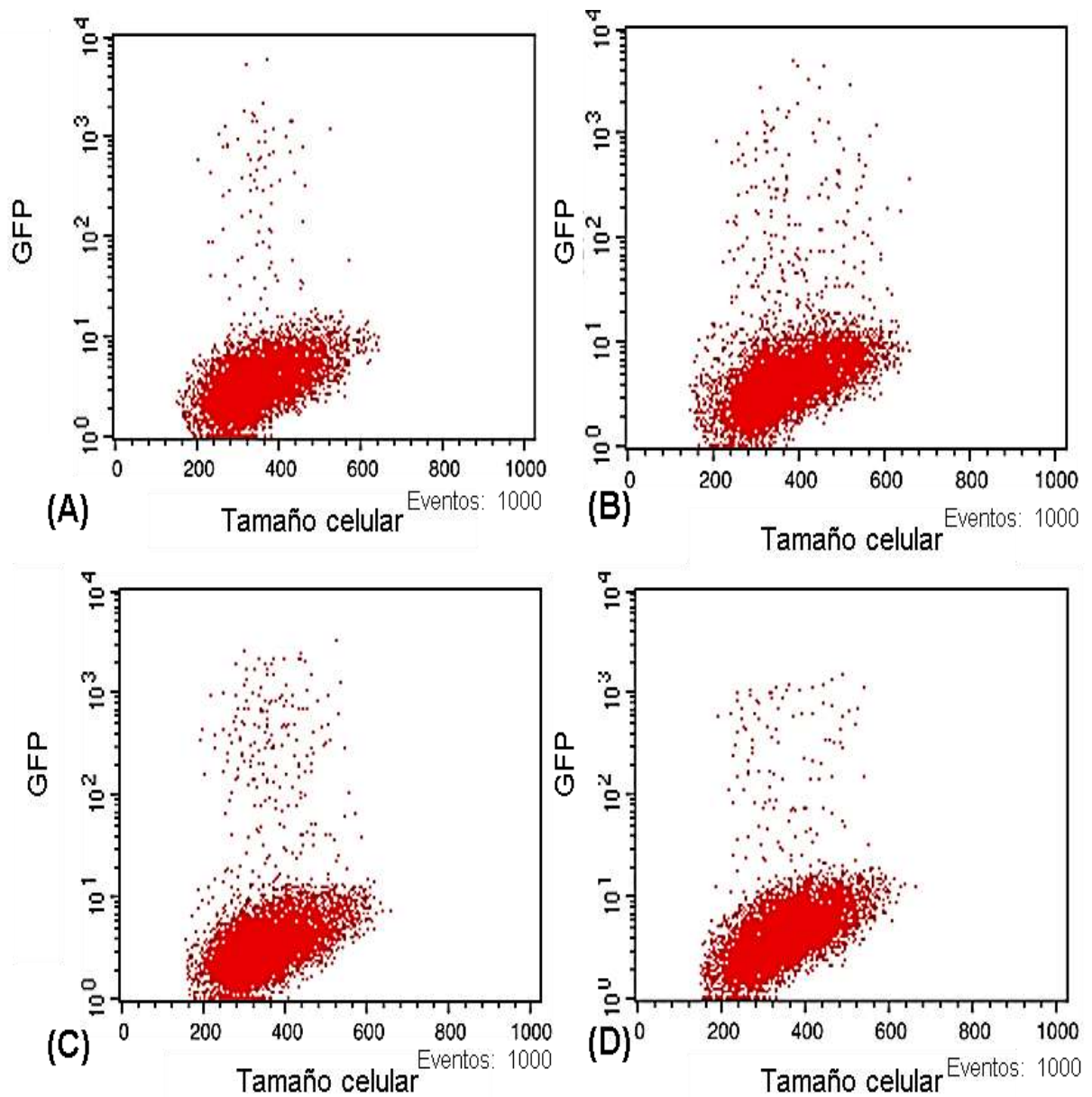


Figura 35. Análisis por citometría de flujo de la fluorescencia verde VS tamaño de partícula en muestras de células tratadas con plásmido cationizado y diferentes cantidades de ondas de choque. Cada punto representa un evento. (A) ADN⁺ sin tratamiento. (B) ADN⁺ + tratamiento con 60 ondas de choque. (C) igual: TxP con 120SW. (D) TxP con 180SW.

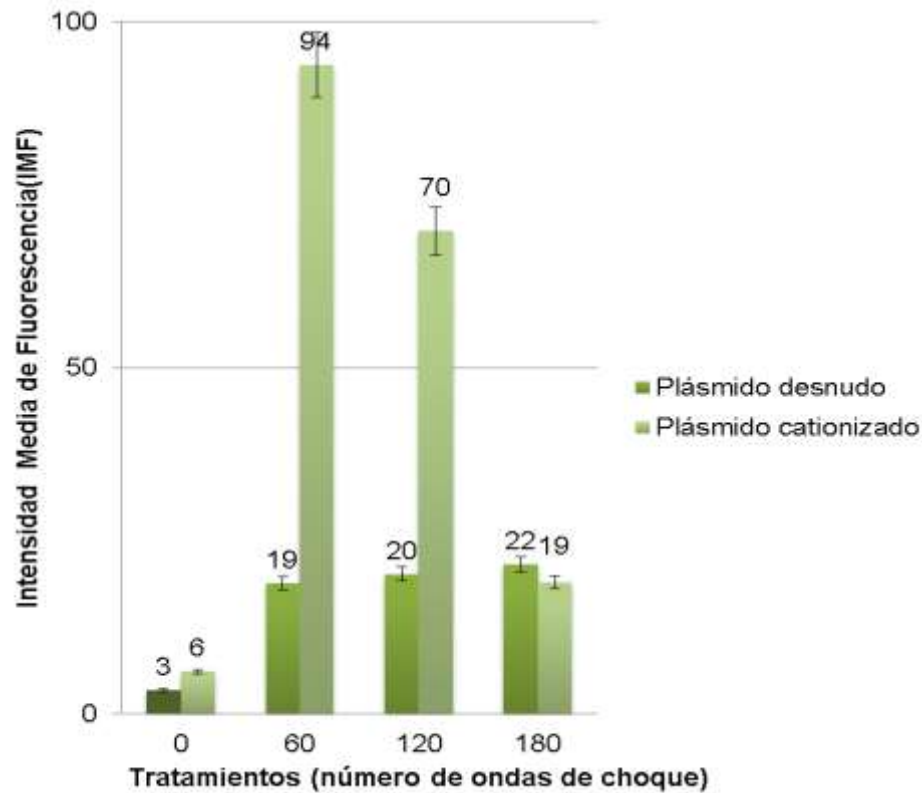


Figura 36. Análisis comparativo de las intensidades medias de fluorescencia presentadas en células tratadas con plásmido desnudo o cationizado y diferentes cantidades de ondas de choque.

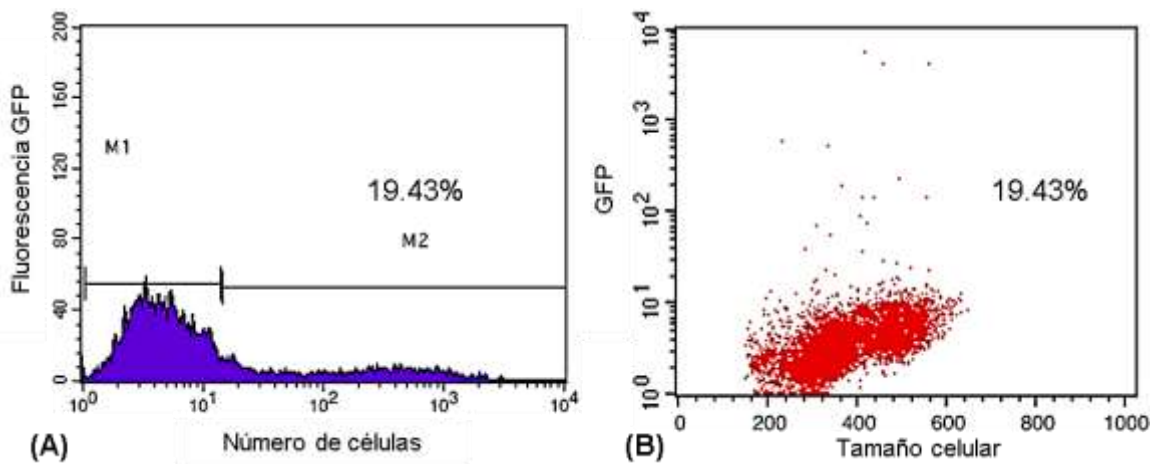


Figura 37. Análisis de la fluorescencia en células transfectadas con el método comercial FuGene®6. Se midió la expresión de proteína verde fluorescente (GFP) y la densidad poblacional fluorescente. (A) Histograma para delimitar células autofluorescentes (M1), y células con fluorescencia adquirida (M2). (B) Distribución de la intensidad de fluorescencia, graficada en relación con el tamaño celular.

5.5.2. Microscopia confocal de células transfectadas

Se observaron las células tratadas con 60 ondas de choque, tanto para los tratamientos con plásmido desnudo como para tratamientos con plásmido cationizado. Como puede observarse en la Figura 38, el nivel de expresión de la proteína verde fluorescente resulta superior cuando las células han sido tratadas con plásmido cationizado y ondas de choque.

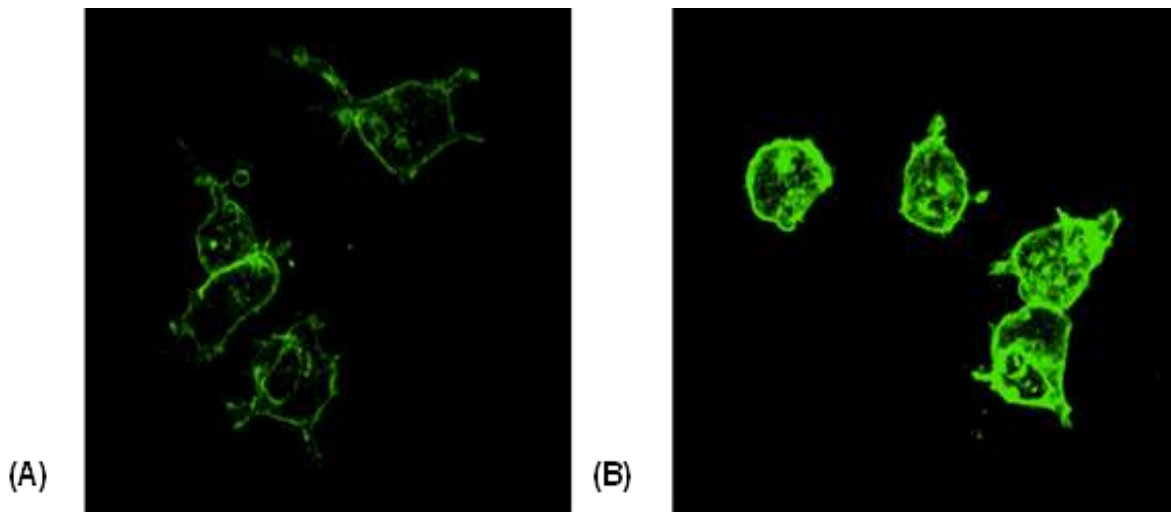


Figura 38. Células transfectadas con el plásmido pCX::GFP-GPI2 analizadas por microscopía confocal. (A) Transfección mediante 60 ondas de choque utilizando plásmido desnudo. (B) Transfección mediante 60 ondas de choque utilizando plásmido cationizado.

6. DISCUSIÓN

6.1 Búsqueda de condiciones para transfectar células eucariotas con ondas de choque

Con anterioridad se han reportado parámetros (número, energía, perfil de presión) útiles de ondas de choque para explorar efectos de ruptura, viabilidad y permeabilidad celular (Endl y col., 1996; Gambihler y col., 1990; Martini y col., 2003), sin embargo estos deben ser establecidos según el propósito del estudio. Nuestro objetivo es lograr una transfección eficiente *in vitro* de una línea celular eucariota, optimizando las condiciones básicas de parámetros experimentales físicos y biológicos en los tratamientos.

6.1.1 Efecto de la energía y del número de ondas de choque aplicadas sobre la mortalidad celular

En todas las poblaciones de células HEK293 sometidas a ondas de choque, el número de ondas y la amplitud de los pulsos de presión fueron directamente proporcionales a la reducción en los conteos. Las ondas de choque producen mortalidad celular, generándose una reducción en el conteo celular, así como la presencia de restos celulares en la suspensión (dato no mostrado). En estudios anteriores se ha observado que la viabilidad celular es diferente, tanto para células en suspensión como para células adheridas a una superficie, siendo menos dañadas al encontrarse en suspensión. Por otro lado, las células son afectadas en su morfología por el impacto de las ondas de choque y por los efectos secundarios que estas generan (Endl y col., 1996).

Al analizar los datos se observa que la mortalidad es inversamente proporcional a la cantidad de ondas de choque utilizada. Asimismo, como era de esperarse, aplicar ondas de choque con un pulso positivo cuya amplitud es de 24.5 MPa (nivel de intensidad 20) resultó en una mayor mortalidad celular que al aplicar pulsos positivos con una amplitud de 12.25 MPa (nivel de intensidad 10). Usando la amplitud baja del pulso de presión se redujo la pérdida de la población tratada. Debido a la cantidad de trabajo, recursos y tiempo que involucra un tercer o cuarto nivel de intensidad solo se probaron los niveles medio y superior del aparato.

6.1.2 Efecto del número de ondas de choque en la internalización de azul de tripano

La viabilidad de las células no pudo ser analizada por exclusión de azul de tripano, que es el método comúnmente utilizado para conteo de células viables, con membranas intactas (Martini y col., 2003). En las células tratadas con ondas de choque, observamos una ligera introducción del colorante en las células que acababan de recibir ondas de choque, siendo variable el grado de colorante internalizado por las células, aunque más importante en las células tratadas con mayor cantidad de ondas. Asimismo los experimentos arrojaron varios resultados interesantes:

- (a) El monitoreo de células viables mediante un colorante como el azul de tripano no es recomendado en experimentos relacionados con métodos que inducen permeabilidad celular, como la aplicación de ondas de choque.
- (b) Con los parámetros utilizados en los ensayos reportados en esta tesis, fue posible inducir permeabilidad celular.
- (c) La permeabilidad celular generada por ondas de choque tiene un carácter transitorio, con una duración del orden de minutos, tiempo en el cual se realizaban conteos de densidad celular post-tratamiento.
- (d) Aparentemente, la mortalidad observada es causada por la destrucción total de algunas células, generando restos celulares junto con células viables (que transitoriamente pueden estar permeabilizadas).

De acuerdo con los resultados obtenidos, un colorante como el azul de tripano podría ser un reactivo útil para analizar la permeabilización de células por ondas de choque, utilizándolo en el medio de las células tratadas al momento del tratamiento. Sin embargo, es importante mencionar que algunos colorantes resultan tóxicos para las células, lo cual podría generar resultados variables según el tiempo de exposición al colorante, que sería distinto para las diferentes condiciones de ondas de choque a utilizar.

Por otro lado, al igual que en resultados reportados por Martini y colaboradores (2003), la siembra de una cantidad definida de células remanentes después de los tratamientos generaba una disminución en la adherencia y proliferación en los

diversos tratamientos, independientemente del número de células permeables al azul de tripano.

6.2 Ensayos de permeabilidad celular con el fluorocromo ácido calceína

La calceína al ser un compuesto fluorescente, de carga negativa, es considerada como una molécula modelo para internalizar material hidrosoluble de carga negativa al interior de una célula, como es el caso de moléculas ácidas como el ADN (Kodama y col., 2000).

6.2.1 Observaciones al microscopio de fluorescencia

Basándonos en lo reportado en la literatura, las células se mantuvieron a 4°C, para evitar la internalización espontánea de calceína, y colocadas a 37°C únicamente durante el tiempo de tratamiento (Kodama y col., 2000).

Se observó un aumento en la permeabilidad celular en relación con el aumento en el número de ondas de choque aplicadas, así como también un incremento en la mortalidad de las células para tratamientos más prolongados, mostrando que la permeabilidad y la mortalidad incrementan a la par al aumentar el número de ondas de choque aplicadas.

6.2.2 Análisis de la internalización de calceína

Uno de los objetivos de nuestro estudio fue el proponer tratamientos que resulten poco agresivos. Dado que con 250 ondas de choque se observó una mortalidad celular de aproximadamente 50%, se optó por reducir el número de ondas. Se evaluaron diversos números de ondas, en incrementos logarítmicos, de tal manera que se mantuvieran condiciones de baja mortalidad, pero capaces de inducir permeabilidad. Con 60, 120 y 180 ondas de choque se obtuvieron células permeabilizadas, con una pérdida aceptable de células viables.

Con el fin de obtener resultados representativos, se uniformaron las condiciones entre las células tratadas y sus controles, los cuales correspondieron a células mantenidas en viales con calceína a 37 °C, sin tratamiento, durante un lapso equivalente al tiempo de tratamientos con ondas de choque.

Al realizar los conteos de permeabilidad en la cámara de Neubauer una de las dificultades que se presentó fue el distinguir de manera objetiva entre las células con distintos grados de fluorescencia bajo excitación con luz azul, sin embargo, las

condiciones del microscopio fueron ajustadas para reducir las señales de autofluorescencia en las células.

De manera inesperada, los periodos cortos de incubación con calceína de células mantenidas a 37 °C fueron suficientes para permitir la introducción pasiva de calceína. Como se evidenció en las imágenes obtenidas por microscopía de epifluorescencia, la incubación de células control (en presencia de calceína, pero sin tratamiento con ondas de choque) también produjo un aumento en la cantidad de células fluorescentes de manera proporcional al tiempo de incubación a 37 °C. De estos resultados concluimos que:

- (a) La microscopía de fluorescencia no permite discriminar fácilmente entre células con distinto grado de fluorocromo internalizado.
- (b) La calceína es internalizada en periodos equivalentes a los encontrados para permeabilizar células por ondas de choque, lo que limita su uso como una molécula modelo a internalizar. Sin embargo, es difícil establecer si el aumento de fluorescencia aquí observado en las células tratadas con ondas de choque puede ser tomado como prueba de permeabilización.

Debido a estas observaciones se decidió monitorear las células con fluorocromo internalizado mediante un método cuantitativo que permitiera el análisis de una población importante, así como el establecimiento de un valor de corte bien definido para descartar células con señales de autofluorescencia. El método seleccionado fue la citometría de flujo asistida por fluorescencia (FACS, del inglés Fluorescence Assisted Cell Sorting).

6.2.3 Análisis de la calceína internalizada por citometría de flujo

Al comparar las células control y las células tratadas con números crecientes de ondas de choque, observamos que:

- (a) A 37 °C, la calceína en los controles para monitorear permeabilización mediante duraciones similares a tratamientos de ondas de choque, se internalizó en las células HEK293 de manera espontánea.
- (b) Aunque la internalización espontánea de calceína impide obtener datos categóricos de permeabilización, es posible observar que cuando se aplican ondas de choque, el fluorocromo es internalizado en un grado superior que

en las células control. Esta observación es más clara en células tratadas durante 60 segundos, en donde la fluorescencia debida a calceína adquirida de manera espontánea es más baja que en las incubaciones más largas.

- (c) El análisis comparativo de la intensidad media de fluorescencia en células control y sometidas a ondas de choque permite sugerir que las células HEK293 son permeabilizadas con tratamientos de 60 ondas de choque.

6.3 Internalización de FD-10 Dextrano

Debido a los resultados obtenidos con el uso de calceína, se decidió utilizar un fluorocromo macromolecular para evaluar la permeabilización mediada por ondas de choque: el dextrano de 10 kDa con unión covalente a isotiocianato de fluoresceína (FITC-Dextrano de 10 kDa o FD-10).

6.3.1 Observaciones al microscopio de fluorescencia

Recurrimos al uso del fluorocromo FD-10, un fluorocromo comercialmente reportado para investigaciones de permeabilidad celular, de mayor peso molecular, con propiedades tipo espiral expandible y más estable a las condiciones experimentales requeridas.

Por su talla, el dextrano de 10 kDa no es capaz de entrar de manera espontánea al interior de las células. Sin embargo, nuestros datos mostraron que al ser incubadas con dextrano durante periodos equivalentes a los de los tratamientos de ondas de choque, las células HEK293 adquirirían una marca fluorescente que no fue eliminada mediante lavados.

6.3.2 Análisis de FD-10 dextrano internalizado por citometría de flujo

Los resultados que obtuvimos fueron similares a los observados en el experimento de calceína, es decir que el experimento control, presentó fluorescencia incrementada con respecto a células nativas. Se observó que la intensidad media de fluorescencia es similar para los tratamientos de 60 y 120 ondas de choque y sus respectivos controles, sin embargo, la intensidad media de fluorescencia fue mayor para el tratamiento con 180 ondas de choque con respecto a la señal de su respectivo control, mostrando una diferencia de 55.29 unidades.

6.3.3 Microscopía confocal

Creemos que el FD-10 Dextrano realiza una interacción con la superficie de las células sin tratamientos de ondas de choque. Como esta molécula es grande descartamos el que esté siendo internalizada de manera pasiva como la calceína, pero al ser un polímero de anhidroglucosa con propiedades de un espiral expandible (Oliver y col., 1984), consideramos la posibilidad de que se formen interacciones con lectinas de superficie (Macarulla, 2007), las cuales son proteínas de origen no-inmune que comparten la propiedad de enlazarse de forma inespecífica y reversible a los carbohidratos (Castillo y Abdullaev, 2005), ya sean libres o que formen parte de estructuras más complejas, siendo que estas proteínas de superficie son omnipresentes y se encuentran en animales, plantas y microorganismos (Cruz y col., 2005).

6.4 Efectos de las ondas de choque sobre el ADN plasmídico

Se ha reportado que los métodos físicos como el ultrasonido pueden generar degradación de material genético (Elsner y Lindblad, 1989), por lo que se exploró el daño que este puede sufrir al ser tratado con ondas de choque.

6.4.1. Caracterización del plásmido

Se obtuvieron digestiones del plásmido pCX::GFP-GPI2 y al observar la digitalización de los geles se observó claramente el plásmido intacto, de una talla de 6 kbp, el plásmido linearizado por el uso de enzimas que cortan un sitio de restricción y el plásmido cortado en dos sitios reconocidos por las enzimas Xho1 y HindIII, generándose así una banda lineal más pequeña que el resto y un fragmento pequeño (Rhee y col., 2006).

6.4.2. Estabilidad del plásmido a tratamientos de ondas de choque

Los plásmidos son altamente susceptibles a la presencia de endonucleasas en medios biológicos (Barry y col., 1999), aunque estos efectos han sido analizados en periodos largos (del orden de horas). Por otro lado, los efectos de la cavitación acústica sobre la integridad del ADN han sido ampliamente documentados cuando dicho fenómeno es producido por sonicación (Elsner y Lindblad, 1989). En el caso de ondas de choque, existen datos que indican que las ondas de choque pueden inducir pérdida de plásmidos cuando se utilizan condiciones altamente energéticas

(Campos y col, 2011), pero no siempre que se utilizan ondas de choque permeabilizantes (Prakash y col., 2011). A la luz de estos datos, decidimos analizar los efectos sobre el plásmido reportero pCX::GFP-GPI2 en las condiciones de nuestro estudio.

Al revisar la integridad del plásmido por el patrón de corrida que presentó después de ser sometido a diversos tratamientos de ondas de choque y en diversas condiciones, con medio suplementado, sin suplementar y en agua inyectable, pudimos observar que:

- (a) Al realizar el análisis del medio DMEM y la corrida del plásmido en medio DMEM completo, se evidencia la degradación presentada por el plásmido en medio suplementado, estando esta degradación presente aún en los controles sin tratamientos de ondas de choque.
- (b) El suero fetal bovino (SFB), conocido por contener endonucleasas, induce una rápida degradación del plásmido, por lo que se justifica el uso de medio DMEM sin suplementar para los experimentos de transfección.
- (c) Al analizar el uso de medio DMEM sin suplementar y del uso de agua inyectable se observó que el medio DMEM sin SFB no produce degradación del plásmido en el intervalo de condiciones que fueron seleccionadas para permeabilizar células (de 60 a 180 ondas de choque). Sin embargo, el tratamiento con 2000 ondas de choque produjo una disminución en la intensidad de las señales del plásmido, sin que se observara el barrido característico por la degradación con suero o por sonicación (Elsner y Lindblad, 1989).

En resumen, estos resultados mostraron que el material genético es degradado por endonucleasas presentes en suero, por tratamientos prolongados de ondas de choque (> 1000 ondas de choque, a una intensidad de pulso positivo de 12.25 MPa), pero que es estable a los tratamientos con ondas de choque permeabilizantes exentos de suero fetal bovino. La presencia de endonucleasas en muchos tejidos biológicos comprometería la estabilidad de muchos plásmidos para fines de terapia génica, por lo que una estrategia para proteger el material nucleico sería indispensable para fines de terapia génica.

6.5 Eficiencia de transfección del plásmido desnudo o en complejo con lípidos catiónicos

Con la finalidad de evitar la repulsión eléctrica entre el material genético y la superficie celular se utilizó el reactivo FuGene®6, el cual consiste en una suspensión de lípidos catiónicos. Este reactivo es comúnmente utilizado para transfecciones *in vitro*, en las que el plásmido es previamente mezclado con los lípidos e incubado por varias horas para promover su entrada pasiva en las células. Aunque esta estrategia sería inviable para uso *in vivo*, debido al carácter tóxico del reactivo, su uso nos permitió explorar si un cambio en la carga eléctrica del material genético aumentaba la eficiencia de transfección por medio de ondas de choque.

6.5.1. Análisis de fluorescencia por citometría de flujo

Al analizar el efecto de los tratamientos de ondas de choque sobre la transfección con plásmido sin recubrimiento se observó que el simple efecto permeabilizante de las ondas de choque fue suficiente para promover la entrada de plásmido desnudo al interior de las células HEK293, siendo que al incrementar la dosis de ondas de choque aumenta el número de células que expresan la proteína.

Los resultados de los tratamientos con plásmido cationizado mostraron que, como era de esperarse, el cambio de carga eléctrica en el plásmido promovió su entrada espontánea al interior de la célula. Sin embargo, resultó evidente que la aplicación de ondas de choque aumentó significativamente la eficiencia de transfección.

Además, al ser comparada la intensidad media de los tratamientos con plásmido sin recubrir y recubierto, se evidenció un aumento en la fluorescencia por parte de los tratamientos con plásmido recubierto, mostrando así un aumento en la expresión de la proteína.

6.5.2. Microscopía confocal de células transfectadas

Fue claro un aumento superior en el nivel de expresión de la proteína verde fluorescente cuando las células fueron tratadas con plásmido cationizado y ondas de choque.

Al realizar la comparación con la transfección comercial de manera interesante, aunque este método generó un porcentaje de transfección mayor que las ondas de choque (12%), la entrada de plásmido resultó en una menor expresión de GFP que

al utilizar ondas de choque. Estos resultados evidencian que los tratamientos con ondas de choque representan un método sumamente eficaz para incrementar la cantidad de material nucleico a internalizar dentro de una célula.

7. CONCLUSIONES

Se puede concluir que:

- Las ondas de choque promueven la permeabilidad transitoria de la membrana de células HEK293.
- Un aumento en la cantidad de ondas de choque aplicadas y/o en la amplitud de la presión del pulso positivo del frente de choque, causa un aumento en la mortalidad.
- El material genético es degradado por tratamientos prolongados de ondas de choque, sin embargo, es estable a los tratamientos con ondas de choque permeabilizantes (60, 120 y 180 ondas de choque) exentos de suero fetal bovino.
- La transfección observada es una consecuencia de efectos físicos como la amplitud del frente de presión, la cavitación y la cantidad de ondas de choque aplicadas, así como de efectos biológicos como la permeabilidad, la viabilidad, y el material genético con o sin lípidos catiónicos.
- La introducción del material genético sin recubrir puede ser promovida por tratamientos de ondas de choque, sin embargo, el uso de recubrimiento catiónico ayuda a incrementar la eficiencia del método, además de resultar en una mayor expresión de proteína. Se recomienda continuar en la búsqueda de parámetros aún más útiles.

8. REFERENCIAS

Allison LA. Fundamental molecular biology. Malden: Blackwell Publishing, **2007**;234, 236.

Álvarez U, Ramírez A, Fernández F, Méndez A, Loske AM. The influence of single-pulse and tandem shock waves on bacteria. Shock Waves. **2008**;17:441-447.

Armenta, E., Varela, A., Martínez, G., Loske, A. M. Transfección de células por medio de ondas de choque. Revista Mexicana de Física. **2006**;52:352-358.

Balda MS, Matter K. Size-selective assessment of tight junction paracellular permeability using fluorescently labelled dextrans. BMG Labtech [serie en internet] 2012 (consultado 2012 noviembre 20); 10(6): [aprox. 4 pp]. Disponible en: <http://www.bmglabtech.com/application-notes/fluorescence-intensity/tight-junctions-146.cfm>

Barry ME, Pinto-González D, Orson FM, McKenzie GJ, Petry GR, Barry MA. Role of endogenous endonucleases and tissue site in transfection and CpG-mediated immune activation after naked DNA injection. Hum Gene Ther. **1999**;10:2461-80.

Bekeredjian, R., Bohris, C., Hansen, A., Katus, H. A., Kuecherer, H. F. Impact of Microbubbles on shock wave-mediated DNA uptake in cells *in vitro*. Elsevier. **2007**;33:743-750.

Burgess R, Deutscher M. Methods in enzymology. 2da. edición. San Diego: Editorial Elsevier, **2009**;292.

Canseco G, Icaza M, Fernández F, Loske A. Modified shock waves for extracorporeal shock wave lithotripsy: a simulation based on the Gilmore formulation. Ultrasonics **2011**;51:803-810.

Castillo A, Abdullaev F. Plant lectins and their effects on cancer. Scielo. **2005**;57:55-64.

Chaussy C, Schmiedt E. Extracorporeal shock wave lithotripsy (ESWL) for kidney stones. An alternative to surgery? UROLOGIC RADIOLOGY 1984;6:80-87.

Cruz P, Pérez E, Martínez L, Ortiz B, Martínez G. Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. REB **2005**;24:21-27.

Delteil C, Teissie J, Rols MP. Effect of serum on in vitro electrically mediated gene delivery and expression in mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **2000**; 1467:362-368.

Doukas, A.G., McAuliffe, D.J., Flotte, T.J. Biological effects of laser-induced shock waves: structural and functional cell damage in vitro. *Ultrasound Med. Biol.* **1993**;19:137-146.

Doukas, A.G., Kolliasb, N. Transdermal drug delivery with a pressure wave. *Drug Delivery Reviews.* **2004**;56:559-579.

Elsner HI, Lindblad EB. Ultrasonic degradation of DNA. *DNA.* **1989**;8:697-701.

Endl E, Steinbach P, Schärfe J, Fickweiler S, Wörle K, Hofstädter F. Cell-type-specific response to shock waves of suspended or pelleted cells as analysed by flow cytometry or electrical cell volume determination. *Ultrasound Med Biol.* **1996**;22:515-525.

Ferguson MAJ. The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *J. Cell Sci.* **1999**;112:2799-2809.

Galkowski V, Petrisor B, Drew B, Dick D. Bone stimulation for fracture healing: What's all the fuss? *IJO* **2009**;43:117-120.

Gambihler S, Delius M, Brendel W. Biological effects of shock waves: cell disruption, viability, and proliferation of L1210 cells exposed to shock waves in vitro. *Ultrasound Med Biol.* **1990**;16:587-94.

Gambihler, S., Delius, M., Ellwart, J. W. Permeabilization of the plasma membrane of L1210 mouse leukemia cells using lithotripter shock waves. *MEMBRANE BIOLOGY.* **1994**;141:267-275.

Hawley TS, Hawley RG. Flow cytometry protocols. 2da. edición. New Jersey: Human Press, **2004**;vol.263:1-31.

Hay R, Caputo J, Chen TR, Mawy M, McClintock P, Reid Y. ATCC Cell lines and hybridomas. 8va. edición. Rockville: Editorial Maryland, **1994**;149.

Hongtao L, Zhang S, Wang B, Cui S, Yan S. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *Journal of Controlled Release.* **2006**;114:100-109.

Huang S, Kamihira M. Development of hybrid viral vectors for gene therapy. *Biotechnol Adv.* **2012**;12:182-186.

Ioppolo F, Tattoli M, Di Sante L, Attanasi C, Venditto T, Servidio M, Cacchio A, Santilli V. Extracorporeal shock-wave therapy for supraspinatus calcifying tendinitis: a randomized clinical trial comparing two different energy levels. *Phys Ther.* **2012**;92:1376-1385.

Jaffe, B., Cook, J., Jaffe, L. Piezoelectric ceramics. NEW YORK: ACADEMIC PRESS. **1971**;317:50-55.

Jagadeesh, G., Divya, G., Rakesh, S. G., Sankar, U., Gopala, M., Eswarappa, S. M., Chakravorty, D. Needleless Vaccine Delivery Using Micro-Shock Waves. *CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY.* **2011**;18:539-545.

Kahl G. The Dictionary of Gene Technology. 2da. ed., Federal Republic, Germany: Editorial WILEY-VCH, **2001**;136, 564, 600, 896-897.

Katragadda CS, Choudhury PK, Murthy P.N. Nanoparticles as Non-Viral Gene Delivery Vectors. *Indian J.Pharm. Educ. Res.* **2010**;44:109-120.

Kavindra K, Sanjay K, Jayprakash N, Mohd H, Siddiqui H, Jitendra B. Biophysical evaluation of radiofrequency electromagnetic field effects on male reproductive pattern. *Cell Biochem Biophys.* **2012**;12:414-419.

Kesari S. Treating brain cancer with viral vector. *ScienceDaily* [serie en internet] 2012 (consultado 2012 noviembre 5); 102(6): [aprox. 2 pp]. Disponible en: <http://www.sciencedaily.com/releases/2012/03/120301142941.htm>

Kildebeck E, Checketts J, Porteus M. Gene therapy for primary immunodeficiencies. *Curr Opin Pediatr.* **2012**;24:731-738.

Kochanski, A. M., Mejnartowicz, J. P., Latos-Bielenska, A., Etienne, J., Filipczynski, L. DNA damage induced by lithotripter generated shock waves: Short report. *International Urology and Nephrology.* **2001**;32:419-422.

Kodama, T., Hamblin, M. R., Doukas, A. G. Cytoplasmic Molecular Delivery with Shock Waves: Importance of Impulse. *Biophysical Journal.* **2000**;79:1821-1832.

Kolzer JF, García R, **2001.** II Congreso Latinoamericano de Ingeniería Biomédica. La Habana, Cuba. 23-25, 5: 2-3.

Kondoh, G., Gao, X. H., Nakano, Y., Koike, H., Yamada, S., Okabe, M., Takeda, J. Tissue-inherent fate of GPI revealed by GPI-anchored GFP transgenesis. *FEBS*. **1999**;458:299-303.

Kuhn, P. S., Barbosa, M. C., Levin, Y. Effects of hydrophobicity in DNA surfactant complexation. *Elsevier*. **2000**;283:113-118.

Leal, C., López, J. C., Reyes, O. E. Ondas de choque en Ortopedia y Traumatología. *Revista Colombiana de Ortopedia y Traumatología*. **2002**;16:42-52.

Lewis M. Restriction enzyme digestion of DNA: basic method. [monografía en internet]. Liverpool: Methodbook.net, 2001 [consultado 2011 marzo 11]. Disponible en: <http://www.methodbook.net/dna/restrdig.html>.

Li S, Huang L. Nonviral gene therapy: promises and challenges. *Gene Therapy*. **2000**;7:31-34.

Liang HD, Tang J, Halliwell M. Sonoporation, drug delivery, and gene therapy: *Journal of Engineering in Medicine*. **2010**;224:343-344.

Liu J, Naughton AS, Brinkera CJ. Silica nanoparticle supported lipid bilayers for gene delivery. *NIH Public Access*. **2009**;34:5100-5102.

Liu, J., Naughton, A. S., Jiang, X., Brinker, C. J. Porous Nanoparticle Supported Lipid Bilayers (Protocells) as Delivery Vehicles. *NIH Public Access*. **2009**;131:1354-1355.

Loske, AM, Prieto, F. E. Fundamentos técnicos de litotripsia extracorporal. México, D. F.: Ciencia y Cultura Latinoamericana, **1999**;27-34, 42-43, 134-139.

Loske, AM, Ben, D. G., Igra, O., Elperin, T. *Handbook of Shock Waves*. San Diego, New York: Academic Press, **2001**;211-256.

Loske, A. M., Guillen, J., Fernández, F., Tostado, E. Enhanced shock wave-assisted transformation of *Escherichia coli*. *ELSEVIER*; **2010**;37:502-510.

Loske AM, Campos-Guillen J, Fernández F, Castaño-Tostado E. Enhanced shock wave-assisted transformation of *Escherichia coli*. *Ultrasound Med Biol*. **2011**;37:502-510.

Macarulla JM. *Bioquímica*. 6ta. edición. Barcelona: Editorial Reverté, **2007**;320.

Madigan MT, Martinko J. M., Parker J. Ingeniería Genética y Biotecnología. Brock, Biología de los Microorganismos.10ma. ed., España: PEARSON Prentice Hall, **2003**;990.

Maher B. Gene Therapy Trials Hit Obstacle. The scientist **2002**;16:41-42.

Martini L, Giavaresi G, Fini M, Torricelli P, de Pretto M, Schaden W, Giardino R. Effect of extracorporeal shock wave therapy on osteoblastlike cells. Clin Orthop Relat Res. **2003**;413:269-80.

Mellott AJ, Forrest ML, Detamore MS. Physical Non-Viral Gene Delivery Methods for Tissue Engineering. Ann Biomed Eng. **2012**;107:439-448.

Miao XL, Wang ZG, Yang WD, Zhao Y, Chen ZJ, Yu FH, Yue SY, Zhang JN, Yu Q. Application of high-field intraoperative magnetic resonance imaging in stereotactic aspiration and drainage of hypertensive hematomas. Zhonghua Yi Xue Za Zhi. **2012**;92:2491-2494.

Michel MS, Erben P, Trojan L, Schaaf A, Kiknavelidze K, Knoll T, Alken P. Acoustic energy: a new transfection method for cancer of the prostate, cancer of the bladder and benign kidney cells. ANTICANCER RESEARCH **2004**;24:2303-2308.

Mohammed SA, Xiang G. Nonviral Gene Delivery: Principle, Limitations, and Recent Progress. AAPS Journal **2009**;11:671-681.

Morille M, Passirani C, Vonarbourg A, Clavreul A, Benoit JP. Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. Biomaterials **2008**;29:3477-3496.

Murata R, Nakagawa K, Ohtori S, Ochiai N, Arai N, Saisu T, Sasho T, Takahashi K, Moriya H, The effects of radial shock waves on gene transfer in rabbit chondrocytes in vitro. OARSI **2007**;15:1275-1282.

Nakamura H. Electroporation and sonoporation in developmental biology. New York: Springer, **2009**;317-326.

Naumann F, Greb A, Borchmann P, Bohlius J, Engert A, Schnell R. First-line tandem high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation versus single high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation in multiple myeloma, a systematic review of controlled studies. Cochrane Database Syst Rev. **2012**;1002:1046-1058.

Nelson DL, Cox M. Principios de bioquímica, Lehninger. 4ta edición. Barcelona: Editorial Omega, **2005**;440.

Ogura, M., Abernethy, A. D., Blissett, R. D., Ruggiero, K., Som, S. J., Goodson, M., Kent, R., Doukas, A. G., Soukos, N. S. Photomechanical wave-assisted molecular delivery in oral biofilms. *World J Microbiol Biotechnology*. **2007**;23:1637-1646.

Ohl CD, Wolfrum B. Detachment and sonoporation of adherent HeLa-cells by shock wave-induced cavitation. *BBA* **2003**;1624:131-138.

Oliver JM, Berlin RD, Davis BH. Use of horseradish peroxidase and fluorescent dextrans to study fluid pinocytosis in leukocytes. *Methods Enzymol*. **1984**;108:336-47.

Parker, S. Cell permeability [monografía en internet]. España: McGraw-Hill Science & Technology Dictionary, 2003 [consultado 2011 junio 11]. Disponible en: <http://www.answers.com/topic/cell-permeability>

Phillips BE, Cancel L, Tarbell JM, Antonetti DA. Occludin independently regulates permeability under hydrostatic pressure and cell division in retinal pigment epithelial cells. *ARVO*. **2008**;49:2568-257.

Pichon C, Billiet L, Midoux P. Chemical vectors for gene delivery: uptake and intracellular trafficking. *Curr Opin Biotechnol*. **2010**;21:640-645.

Pitt, W. G. Ultrasound in drug and gene delivery. *ELSEVIER, ScienceDirect*. **2008**;60:1095-1096.

Prakash DG, Anish RV, Jagadeesh G, Chakravorty D. Bacterial transformation using micro-shock waves. *Anal Biochem* **2011**;419:292-301.

Rahman M. Introduction to flow cytometry. Oxford: Serotec, **2006**;7.

Reina, M. C., Sánchez, J., Martínez, R., Blasco, P., García, M. Litotricia extracorpórea por ondas de choque, un tratamiento establecido. *ACTAS UROLÓGICAS ESPAÑOLAS*. **2002**;26:636-649.

Rhee JM, Purity MK, Lackan CS, Long JZ, Kondoh G, Takeda J, Hadjantonakis AK. In Vivo Imaging and Differential Localization of Lipid-Modified GFP-Variant Fusions in Embryonic Stem Cells and Mice. *NIH Public Access*. **2006**;44:202-218.

Rivera AL, Gómez M, Fernández F, Loske AM. Physical methods for genetic transformation in plants. *Phys Life Rev*. **2012**;9:352.

Roy, I., Mitra, S., Maitra, A., Mozumdar, S., Photophysics of Cy3-Encapsulated Calcium Phosphate Nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*. **2002**;250:25-33.

Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3a. edición. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, **2001**;3:16.2-16.3.

Schooneveld, M. M., Vucic, E., Koole, R., Zhou, Y., Stocks, J., Cormode, D. P., Tang, C. Y., Gordon, R. E, Nicolay, K., Meijerink, A., Fayad, Z. A., Mulder, J. M. Improved Biocompatibility and Pharmacokinetics of Silica Nanoparticles by Means of a Lipid Coating: A Multimodality Investigation. *NANO LETTERS*. **2008**;8:2517-2525.

Shi, L., Tang, G. P., Gao, S. J., Ma, Y. X., Liu, B. H., Li, Y., Zeng, J. M., Ng, Y. K., Leong, K. W., Wang, S. Radiation-inducible caspase-8 *gene therapy* for malignant brain tumors. *Gene Therapy*. **2003**;103:1179-1188.

Spector DL, Goldman RD. *Basic methods in microscopy*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, **2006**;28-33;43-81.

Trojan, L., Michel, M.S., Erben, P., Schaaf, A., Kiknavelidze, K., Knoll, T., Alken, P. Acoustic energy: a new transfection method for cancer of the prostate, cancer of the bladder and benign kidney cells. *Anticancer Research*. **2004**;24:2303-2308.

Tschoep K, Hartmann G, Jox R, Thompson S, Eigler A, Krug A, Erhardt S, Adams G, Endres S, Delius M. Shock waves: a novel method for cytoplasmic delivery of antisense oligonucleotides. *J Mol Med* **2001**;79:306-313.

Wallace, O. Cell permeability [monografía en internet]. USA, 2012 [consultado 2011 junio 11]. Disponible en: <http://www.wisegeek.com/what-is-cell-viability.htm>

Wang B, Zhou J, Cui S, Yang B, Zhao Y, Zhao B, Duan Y, Zhang S. Cationic liposomes as carriers for gene delivery: Physico-chemical characterization and mechanism of cell transfection. *African Journal of Biotechnology*. **2012**;11:2763-2773.

Wang C.J. An Overview of Shock Wave Therapy in Musculoskeletal Disorders. *Chang Gung Med J*. **2003**;26:220-232.

Wolfgang W, Ulrike S. *Gene therapy of cancer, methods and protocols*. Berlin: Springer, **2000**;vol.35:287.

Wong KM, Yeh ML, Chuang SC, Wang LY, Lin ZY, Chen SC, Tsai JF, Wang SN, Kuo KK, Dai CY, Yu ML, Lee KT, Chuang WL. Survival comparison between surgical resection and percutaneous radiofrequency ablation for patients in Barcelona Clinic Liver Cancer early stage hepatocellular carcinoma. *Indian J Gastroenterol.* **2012**;10:1007-1026.

Zhang Y, Tachibana R, Okamoto A, Azuma T, Sasaki A, Yoshinaka K, Osada K, Kataoka K, Takagi S, Matsumoto Y. Ultrasound-mediated gene transfection in vitro: enhanced efficiency by complexation of plasmid DNA. *Jpn. J. Appl. Phys.* **2012**;51:07GF29-1.

Zhao Y, Zhang SD, Wang D, Liu YH, Sun T, Jiang CQ, Tan JW, Qu WQ, Xin DJ. Comparison of stability of sacroiliac screws in the treatment of bilateral sacral fractures in a finite element model. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi.* **2012**;50:719-723.