



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y  
TECNOLOGÍA AVANZADA**

**EFFECTOS Y MECANISMOS DE LA  
APLICACIÓN DE ONDAS DE CHOQUE EN  
CÉLULAS HUMANAS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADA EN TECNOLOGÍA**

**P R E S E N T A**

**KAREN CASTAÑO GONZÁLEZ**

**DIRECTORES DE TESIS:**

**DRA. LUZ MARÍA LÓPEZ MARÍN**

**DR. ACHIM MAX LOSKE MEHLING**

**JURIQUILLA, QUERÉTARO, 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

## CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA LICENCIATURA EN TECNOLOGÍA

### Votos Aprobatorios

COMITÉ ACADÉMICO  
Licenciatura en Tecnología  
PRESENTE

En cumplimiento del Artículo 26 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis con título “**Efectos y mecanismos de la aplicación de ondas de choque en células humanas**”, que realizó la pasante **Karen Castaño González**, con número de cuenta: **306174553**, bajo la opción de titulación por Tesis y Examen profesional en la carrera de Licenciatura en Tecnología.

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**Atentamente**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Campus UNAM-Juriquilla, Qro. 30 de abril de 2015.

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dr. Juan Bibiano Morales Malacara	
<b>SECRETARIO</b>	Dra. Adriana Jheny Rodríguez Méndez	
<b>VOCAL</b>	Dr. Achim Max Loske Mehling	
<b>1er. SUPLENTE</b>	Dr. Enrique Arturo Cantoral Uriza	
<b>2º SUPLENTE</b>	Dra. Luz María López Marín	

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Licenciatura en Tecnología en el Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada de la Universidad Nacional Autónoma de México, *campus* Juriquilla.

Al apoyo del proyecto IT200512 (PAPIIT-DGAPA, UNAM).

A mis tutores: Dra. Luz María López Marín y Dr. Achim Max Loske Mehling por sus conocimientos, orientación y motivación que han sido fundamentales para mi formación.

A mis sinodales:

Dr. Juan Bibiano Morales Malacara

Dra. Adriana Jheny Rodríguez Méndez

Dr. Enrique Arturo Cantoral Uriza

Al Q.F.B. Carlos Castellanos Barba de la Unidad de Citometría del IIB (UNAM) en los análisis por citometría de flujo.

A la I.B.Q. Ma. De Lourdes Palma Tirado y la Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos de la Unidad de Microscopía del INB (UNAM) en la preparación de muestras y obtención de imágenes en microscopía confocal.

A la Dra. Anaid Antaramian y a la M. en C. Adriana González Gallardo de la Unidad de Proteogenómica del INB (UNAM) por permitirnos trabajar con los equipos y facilitarnos células competentes y medio de cultivo para bacterias.

A la M. en Ing. Alicia del Real López del Laboratorio de Microscopía del CFATA (UNAM) en la obtención de imágenes en microscopía electrónica.

Al M. en C. Francisco Fernández Escobar y a Paula Bernardino Peláez del Laboratorio de Ondas de Choque del CFATA (UNAM) en la realización de los experimentos.

Al Dr. Ulises M. Álvarez del Proyecto Pedagógico Sophie (UNAM) por su aporte al trabajo y a mi formación como tecnóloga.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A la Dra. Blanca Millán Chiu por brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia aunadas a la confianza y afecto primordiales para concretar este trabajo.

A mis compañeros nanobiópteros y miembros del LOCH; en especial a Edgar Jiménez por su apoyo y amistad.

A Ricardo.

A mi familia.

*A mis padres*

*“Wonder is the seed of knowledge”*

- Francis Bacon

# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>II</b>
<b>AGRADECIMIENTOS PERSONALES</b>	<b>III</b>
<b>ÍNDICE</b>	<b>VI</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>VIII</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>X</b>
<b>1 MARCO TEÓRICO</b>	<b>1</b>
1.1 TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS EUKARIONTES	1
1.2 ONDAS DE CHOQUE	5
1.3 ONDAS DE CHOQUE TÁNDEM	10
1.4 GENERADOR MULTIFUNCIONAL DE ONDAS DE CHOQUE	12
1.5 LÍNEAS CELULARES	14
1.5.1 Línea celular HEK293	14
1.5.2 Línea celular MCF-7	15
1.6 PLÁSMIDO PCX::GFP-GPI2	16
1.7 CITOMETRÍA DE FLUJO ASISTIDA POR FLUORESCENCIA	18
1.8 MICROSCOPÍA CONFOCAL	20
1.9 MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	21
<b>2 ANTECEDENTES</b>	<b>22</b>
<b>3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>24</b>
<b>4 HIPÓTESIS</b>	<b>25</b>
<b>5 OBJETIVOS</b>	<b>25</b>
5.1 GENERAL	25
5.2 PARTICULARES	25
<b>6 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>26</b>
6.1 CULTIVO CELULAR	26
6.1.1 Mantenimiento y propagación	26
6.1.2 Almacenamiento de células	26
6.1.3 Descongelamiento de células	27
6.2 PROPAGACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO PCX::GFP-GPI2	28
6.2.1 Propagación del plásmido pCX::GFP-GPI2	28



6.2.2 Purificación de plásmido usando Plasmid Maxi-kit QIAGEN®	28
6.2.3 Prueba de identidad y de calidad del plásmido purificado	29
6.2.3.1 Susceptibilidad a enzimas de restricción	29
6.2.3.2 Electroforesis en gel de agarosa	30
6.3 USO DEL GENERADOR DE ONDAS DE CHOQUE PIEZOLITH 2501	31
6.4 CONDICIONES PARA LA APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS DE ONDAS DE CHOQUE	32
6.4.1 Estabilidad del plásmido	32
6.4.2 Aplicación de ondas de choque	32
6.4.3 Supervivencia de las células ante tratamientos de ondas de choque	33
6.4.4 Permeabilización de células	34
6.4.5 Preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido	35
<b>7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>37</b>
7.1 CÉLULAS HEK293	37
7.1.1 Viabilidad celular	37
7.1.2 Permeabilización	38
7.1.3 Transfección	41
7.2 CÉLULAS MCF-7	46
7.2.1 Viabilidad celular	46
7.2.2 Permeabilización	47
7.2.3 Transfección	51
7.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	55
<b>8 CONCLUSIONES</b>	<b>59</b>
<b>9 REFERENCIAS</b>	<b>60</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1-1. TERAPIA GÉNICA.	1
FIGURA 1-2. MÉTODOS VIRAL Y QUÍMICO DE INTRODUCCIÓN DE ADN EN CÉLULAS EUCARIOTA.	3
FIGURA 1-3. MÉTODOS FÍSICOS DE TRANSFECCIÓN.	4
FIGURA 1-4. PERFIL DE PRESIÓN DE UNA ONDA DE CHOQUE EN AGUA.	6
FIGURA 1-5. VARIACIÓN DE PRESIÓN AL PASO DE UNA ONDA DE ULTRASONIDO.	6
FIGURA 1-6. FOTOGRAFÍA DE LA SOMBRA DE UNA ONDA DE CHOQUE ORIGINADA POR UN PROYECTIL ESFÉRICO A ALTA VELOCIDAD EN LA SUPERFICIE SUPERIOR DE UN MUSLO DE GATO.	6
FIGURA 1-7. GENERADORES DE ONDAS DE CHOQUE.	8
FIGURA 1-8. ESQUEMA DEL PERFIL DE PRESIÓN DE UNA ONDA DE CHOQUE Y DEL CAMBIO QUE SUFRE UNA BURBUJA INMERSA EN AGUA, AL PASO DE DICHA ONDA.	9
FIGURA 1-9. PERFIL DE UNA ONDA DE CHOQUE.	11
FIGURA 1-10. ESQUEMA QUE MUESTRA UNA SEGUNDA ONDA DE CHOQUE ENVIADA DURANTE EL COLAPSO DE LA BURBUJA, PROVOCANDO UN COLAPSO REFORZADO.	11
FIGURA 1-11. ESQUEMA DEL GENERADOR DE ONDAS DE CHOQUE ADAPTADO PARA SU USO EN LABORATORIO.	13
FIGURA 1-12. CULTIVO DE CÉLULAS HEK 293.	14
FIGURA 1-13. CULTIVO DE CÉLULAS MCF-7.	15
FIGURA 1-14. MODELO DEL PLÁSMIDO pCX::GFP-GPI2.	17
FIGURA 1-15. ESQUEMA GENERAL DEL ARREGLO DE UN CITÓMETRO DE FLUJO TÍPICO.	19
FIGURA 1-16. GRÁFICAS REPRESENTATIVAS GENERADAS POR UN CITÓMETRO DE FLUJO.	19
FIGURA 1-17. PROYECCIÓN DE UNA IMAGEN EN TERCERA DIMENSIÓN OBTENIDA CON UN MICROSCOPIO CONFOCAL.	20
FIGURA 1-18. CONFIGURACIÓN ÓPTICA DE UN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO.	21
FIGURA 6-1. ESQUEMA DEL GENERADOR DE ONDAS DE CHOQUE <i>PIEZOLITH 2501</i> .	31
FIGURA 6-2. ESTRUCTURA DEL FITC-DEXTRANO (FD).	34
FIGURA 7-1. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE PERMEABILIZACIÓN DE CÉLULAS HEK293. GRÁFICAS DE TAMAÑO CELULAR VS GRANULARIDAD (COMPLEJIDAD) DE 10,000 EVENTOS.	38
FIGURA 7-2. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE PERMEABILIZACIÓN DE CÉLULAS HEK293. GRÁFICAS DE TAMAÑO CELULAR VS FLUORESCENCIA DE 10,000 EVENTOS.	39
FIGURA 7-3. MICROGRAFÍAS CONFOCALES EN CAMPO OSCURO DE CÉLULAS HEK293.	41
FIGURA 7-4. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS HEK293. GRÁFICAS DE TAMAÑO CELULAR VS FLUORESCENCIA DE 10,000 EVENTOS.	42
FIGURA 7-5. MICROGRAFÍAS CONFOCALES EN CAMPO OSCURO DE CÉLULAS HEK293 EN SUSPENSIÓN.	44
FIGURA 7-6. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE PERMEABILIZACIÓN DE CÉLULAS MCF-7. GRÁFICAS DE TAMAÑO CELULAR VS GRANULARIDAD (COMPLEJIDAD) DE 10,000 EVENTOS.	47

FIGURA 7-7. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE PERMEABILIZACIÓN DE CÉLULAS MCF-7. GRÁFICAS DE TAMAÑO CELULAR VS FLUORESCENCIA DE 10,000 EVENTOS.	48
FIGURA 7-8. MICROGRAFÍAS CONFOCALES EN CAMPO OSCURO DE CÉLULAS MCF-7 EN SUSPENSIÓN PERMEABILIZADAS.	50
FIGURA 7-9. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS MCF-7. GRÁFICAS DE TAMAÑO CELULAR VS FLUORESCENCIA DE 10,000 EVENTOS.	52
FIGURA 7-10. MICROGRAFÍAS CONFOCALES EN CAMPO OSCURO DE CÉLULAS MCF-7 EN SUSPENSIÓN TRANSFECTADAS.	54
FIGURA 7-11. FOTOGRAFÍAS TOMADAS EN EL MICROSCOPIO DE LUZ.	55
FIGURA 7-12. MICROGRAFÍAS DE MEB DE CÉLULAS HEK293.	57
FIGURA 7-13. MICROGRAFÍAS DE MEB DE CÉLULAS MCF-7.	58

## RESUMEN

La terapia génica es una estrategia terapéutica que se basa en modificar el patrimonio genético de determinadas células somáticas mediante la administración de secuencias de ácidos nucleicos (transfección celular). El objetivo es tratar enfermedades tanto de origen hereditario como adquirido. El ADN puede ser introducido en el paciente mediante métodos físicos que provoquen la formación de poros en la membrana celular. Uno de estos métodos son las ondas de choque, las cuales son frentes de alta presión que pueden concentrarse en regiones definidas de un tejido, o aplicarse a células en suspensión. Sin embargo, aunque se sabe que las ondas de choque inducen permeabilidad transitoria y transfección de células humanas, la generación de poros en la membrana celular no ha sido documentada.

Se sabe que el principal fenómeno involucrado en la permeabilización de células por ondas de choque es la cavitación acústica, que consiste en la expansión, oscilación y colapso de burbujas de gas microscópicas en un medio acuoso, incluyendo tejidos. Este fenómeno es acompañado por la generación de ondas de choque secundarias y la formación de *microjets* de fluido a muy altas velocidades, a los cuales se les atribuye el efecto permeabilizante. Las denominadas ondas de choque tándem, consisten en dos frentes de choque generados con una separación temporal de 50 a 950 microsegundos de manera que aumenta la energía del colapso de las microburbujas y, consecuentemente, la emisión de *microjets*.

El propósito del presente trabajo fue analizar la permeabilización y la ultraestructura de dos líneas celulares humanas ante distintos tratamientos con ondas de choque, documentando a

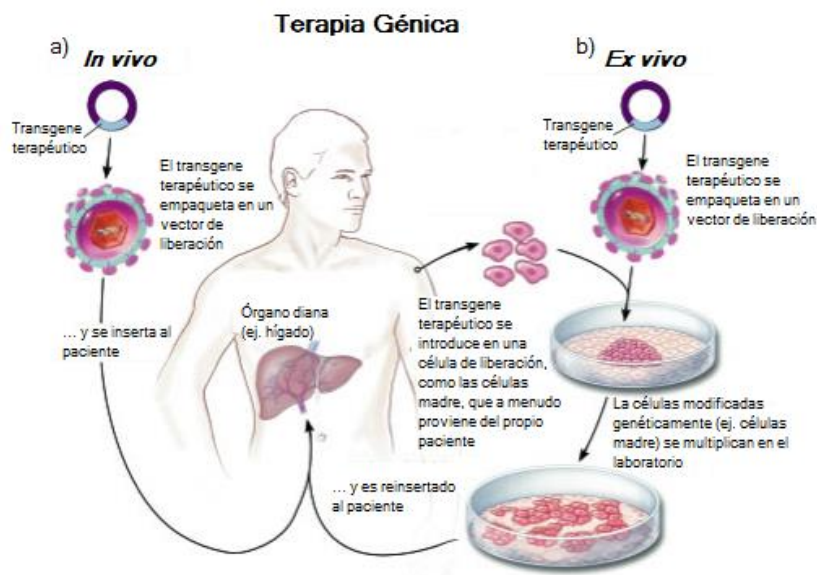
la vez la supervivencia celular. Se utilizaron células HEK 293 y células MCF-7; y un generador de ondas de choque de tipo piezoeléctrico, adaptado para el tratamiento con ondas de choque convencionales y ondas de choque tándem de viales con suspensiones celulares a una temperatura de 37 °C. La permeabilización y transfección celulares fueron monitoreadas con ayuda de marcadores y proteínas de expresión fluorescentes, a través de microscopía confocal de fluorescencia, citometría de flujo asistida por fluorescencia y microscopía electrónica de barrido.

# 1 MARCO TEÓRICO

## 1.1 Transfección de células eucariotas

Se denomina transfección celular al proceso de introducción de ADN (ácido desoxirribonucleico) foráneo en células con la finalidad de que sea incorporado por éstas. En la actualidad, la dotación genética de una célula puede ser modificada mediante la introducción de un gen normal en un organismo diana que sustituya al gen defectuoso en su función; es lo que se denomina terapia génica [1]. La terapia génica consiste en utilizar ADN codificante como un fármaco, es decir, la transfección de un gen terapéutico a células diana [2]. En función de la estrategia aplicada, la terapia génica puede clasificarse en:

1. Terapia génica *in vivo* (Figura 1-1a): agrupa las técnicas en las que el material genético se introduce directamente en las células del organismo, sin que se produzca su extracción ni manipulación *in vitro*.
2. Terapia génica *ex vivo* (Figura 1-1b): comprende todos aquellos protocolos en los que las células a tratar son extraídas del paciente, aisladas, crecidas en cultivo y sometidas al proceso de transferencia *in vitro*. Una vez que han sido efectivamente transducidas, se expanden en cultivo y se introducen de nuevo en el paciente.



**Figura 1-1.** Terapia génica a) In vivo b) Ex vivo [3].

Otra variante de la terapia génica es el silenciamiento génico, que consiste en la introducción de ácidos nucleicos no codificantes que inducen específicamente la degradación de un ARN mensajero (ARNm) meta en un sistema celular. De esta manera se “silencia” el gen afectado.

La información que se tiene sobre genomas y procesos celulares hasta ahora, podría permitir que este tipo de terapia tratara enfermedades causadas por mutaciones genéticas, pero también enfermedades complejas, tales como el cáncer, enfermedades cardíacas e incluso algunas enfermedades infecciosas como el SIDA [4].

El ADN no se inserta espontáneamente en las células. Para administrar el gene exógeno o transgene a las células se recurre a distintos métodos, que pueden clasificarse en dos categorías:

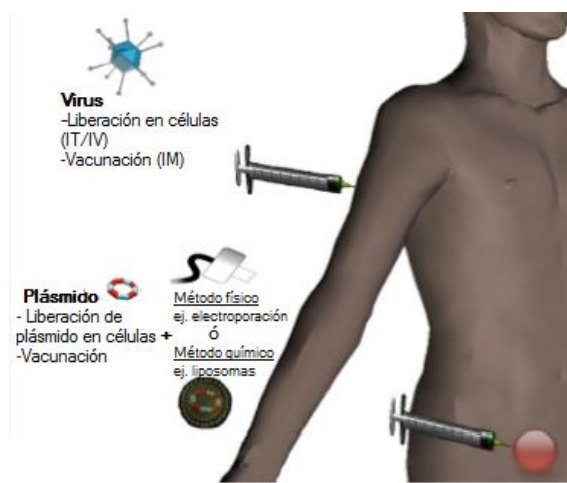
- Los *vectores virales*; en este caso, el casete de expresión terapéutica se integra en el genoma de un virus recombinante.
- Los *métodos no virales*, que incluyen los *vectores químicos* del ADN y las *técnicas físicas* de administración del ADN. En estos métodos, un plásmido producido por una bacteria porta el casete de expresión terapéutico.

Pese al número creciente de ensayos clínicos, se sabe que el factor limitante del desarrollo de la terapia génica *in vivo* es la falta de vectores de liberación de ADN para que las técnicas de administración sean lo suficientemente seguras y ejecutables [2]. Además, para que los genes insertados sean expresados, los ácidos nucleicos se deben estabilizar de modo que puedan pasar sin degradarse por los cambios de pH, las proteasas y nucleasas y la opsonización (marcaje de un patógeno para su ingestión y destrucción por un fagocito) presentes en el ambiente extracelular [5]. Después de esto, los ácidos nucleicos deben asociarse con la membrana celular y cruzar la membrana plasmática ya sea por penetración, interacción electrostática, adsorción o por unión de un receptor mediado por ligando.

Hasta ahora, el método más eficaz para introducir ADN en células eucariotas es el uso de virus (Figura 1-2). Sin embargo, aunque los virus son manipulados para eliminar genes de virulencia ya descritos, la falta de control sobre el genoma completo ha ocasionado efectos secundarios en el humano que han llegado a causar la muerte del paciente [4]. La mayor

preocupación con respecto a la seguridad de los vectores virales es su toxicidad, su inmunogenicidad y la oncogénesis derivada de la mutagénesis de inserción. Además, los vectores virales contienen secuencias de tamaño restringido, su ingeniería es laboriosa y costosa, y su efectividad podría verse limitada en distintos tipos de células.

Aunque los métodos no virales no presentan los mismos problemas asociados, sus eficacias son menores. Sin embargo, altas dosis de vectores químicos pueden ser tóxicas especialmente en células sensibles y se ha demostrado que las células primarias, las células progenitoras y las células madre muestran una mayor resistencia a ser transfectadas. Dentro de los vectores químicos se encuentran los lípidos catiónicos, polímeros catiónicos y péptidos que penetran la célula y que pueden ser dirigidos a células específicas de manera local o sistémica (Figura 1-2).

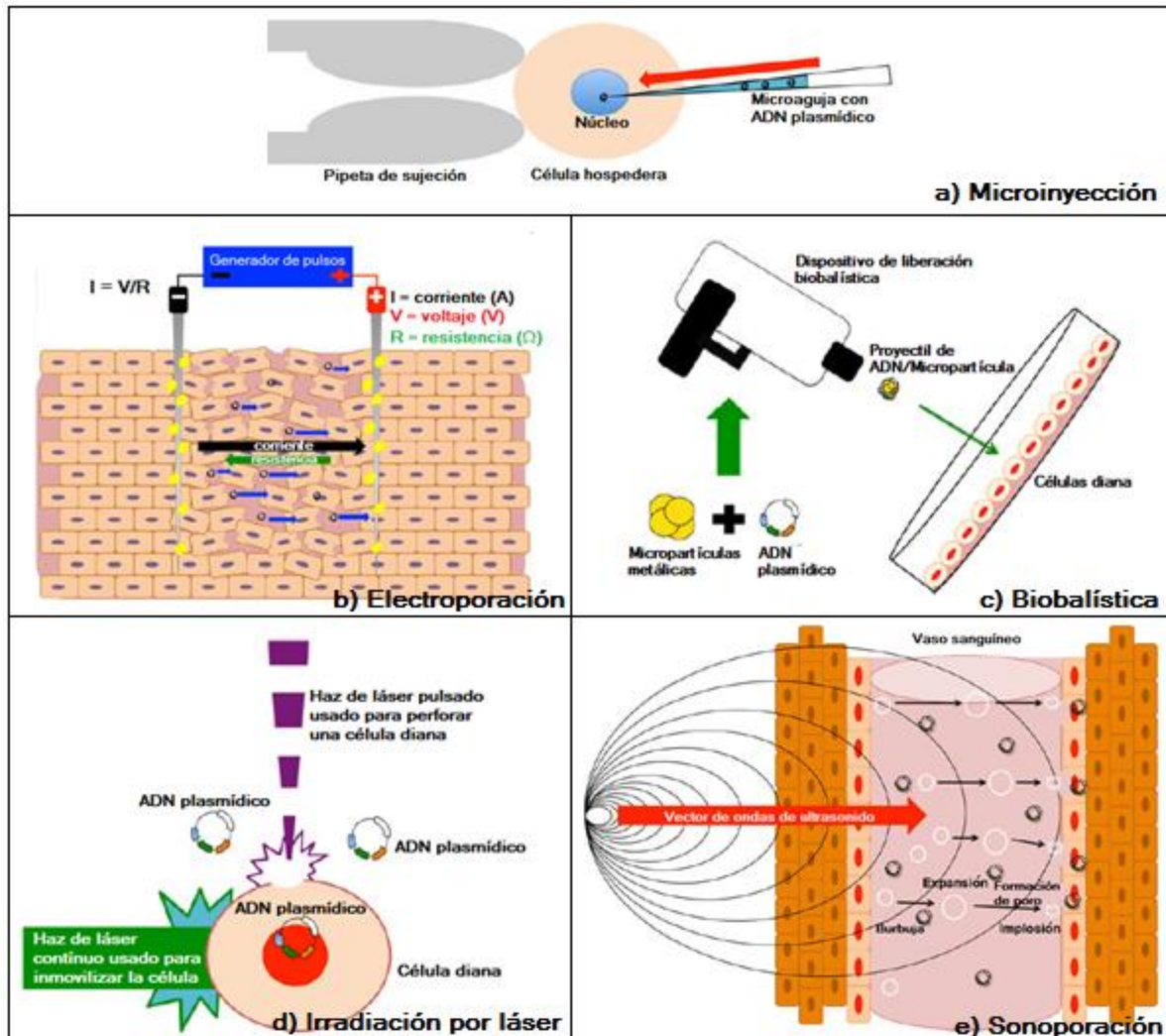


**Figura 1-2.** Métodos viral y químico de introducción de ADN en células eucariotas. [6]

Los métodos físicos (Figura 1-3) han demostrado ser efectivos en la transfección de células eucariontes tanto *in vitro* como *ex vivo* e *in vivo*. Esto puede deberse en parte a que estos métodos tienden a forzar a los ácidos nucleicos al citoplasma o al núcleo. Sin embargo, enfrentan limitaciones distintas a las de los métodos químicos. Dependiendo del método utilizado, la célula puede presentar algún trauma e iniciar mecanismos de apoptosis por lo que existe una tendencia a mostrar viabilidades celulares bajas y se tiene el riesgo de que la invasión física pueda causar senescencia celular (respuesta al estrés y daño ocurrido en una célula) lo que podría influenciar negativamente el fenotipo de la célula. Estas técnicas se



basan en la capacidad de generar poros momentáneos en la membrana celular cuando las células son sometidas a grandes cantidades de energía de manera localizada. Entre estas técnicas se encuentran la electroporación, la sonoporación, la biobalística, el ultrasonido, la irradiación con láser y las ondas de choque, entre otras [7].



**Figura 1-3.** Métodos físicos de transfección. a) Microinyección: se utilizan microagujas para liberar ADN en el núcleo celular. b) Electroporación: se aplica una corriente a través de las células o tejidos para hacer a las membranas celulares permeables a ADN exógeno. c) Biobalística: el ADN plasmídico se mezcla con partículas de oro o tungsteno de un rango de tamaño nano a micro métrico. d) Irradiación por láser: se hace una perforación de alta precisión en una célula en cultivo o tejido con un haz de luz láser. e) Sonoporación: se utilizan frecuencias ultrasónicas para inducir la cavitación de microburbujas que crean poros en células en cultivos celulares o en tejidos [7].

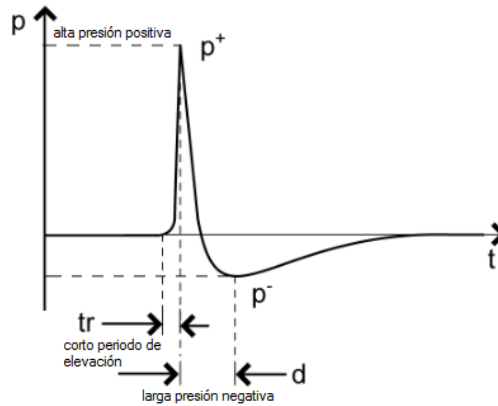
## *1.2 Ondas de choque*

Las ondas de choque son el resultado de la liberación repentina de energía mecánica, eléctrica, química o nuclear en un espacio limitado y se definen como una discontinuidad en la que existe un cambio repentino de presión, densidad, temperatura, entropía y velocidad de la partícula. Se consideran ondas mecánicas debido a que son perturbaciones que se propagan por la materia. Las variaciones del medio producen el desplazamiento de las moléculas que lo forman. De manera simplificada, puede pensarse que cada molécula transmite la vibración a las que se encuentren en su vecindad, provocando un movimiento en cadena, similar a lo que sucede con el sonido. En ese caso la propagación del movimiento de las moléculas del medio produce en el oído humano una sensación descrita como sonido. En la atmósfera, las ondas de choque pueden producirse cuando se detona material explosivo, cuando estalla un relámpago o cuando los aviones rompen la barrera del sonido. Pueden transmitir energía desde el lugar de su generación hasta áreas distantes.

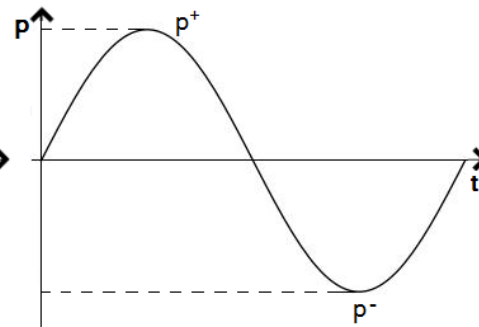
Las ondas de choque comparten características con el ultrasonido, sin embargo, difieren de este por tener amplitudes de presión más elevadas. Una onda de choque es una onda de alta energía que consiste en un solo pico de compresión con un tiempo de ascenso sumamente corto (nanosegundos) y una declinación gradual (microsegundos), pasando por una fase de rarefacción o tensión. El ultrasonido se caracteriza por compresiones y rarefacciones alternadas, esto es, una onda sinusoidal o un tren de pulsos modulado con una frecuencia definida. En las Figura 1-4 Figura 1-5 se muestran las diferencias entre una onda de choque y una onda ultrasónica. Mientras el ultrasonido tiene una frecuencia característica, las ondas de choque se componen de un espectro de frecuencias muy amplio [8].

Durante la Segunda Guerra Mundial se observaron cuerpos de naufragos con daño interno en los pulmones debido a explosiones de bombas marinas, sin que se observaran lesiones externas. Esta fue la primera vez que se observó la influencia de las ondas de choque, creadas por la explosión de bombas subacuáticas, en un tejido. En 1946, se publicaron los primeros estudios de la propagación de ondas de choque a través de distintos cuerpos, el método consistió en tomar fotografías en distintos momentos de la sombra de una onda generada en un laboratorio (Figura 1-6) [9]. Alrededor de 1950, se comenzaron las

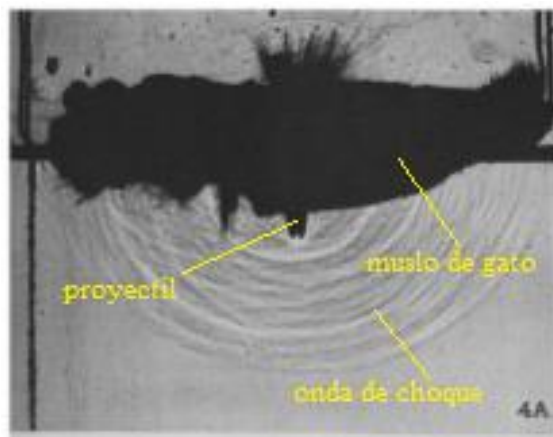
investigaciones sistemáticas para el uso de las ondas de choque en medicina, quedando descritas hacia finales de esa década sus propiedades físicas.



**Figura 1-4.** Perfil de presión de una onda de choque en agua.



**Figura 1-5.** Variación de presión al paso de una onda de ultrasonido.



**Figura 1-6.** Fotografía schlieren de una onda de choque originada por un proyectil esférico a alta velocidad en la superficie superior de un muslo de gato suspendido en agua. La punta del proyectil se observa debajo del muslo. La onda original se dispersa tras el impacto en el tejido y pasa como ondas en el agua debajo de éste. [9].

La primera aplicación de las ondas de choque usando como medio de propagación el agua, para el beneficio de la medicina, fue el desarrollo de la litotricia extracorpórea (pulverización de cálculos dentro de las vías urinarias, el riñón o la vesícula biliar) por

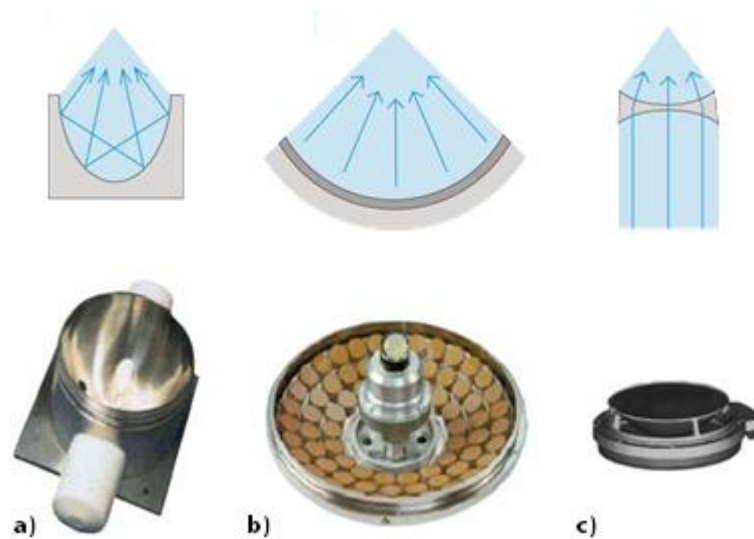
ondas de choque. Hacia 1970, el físico Ebehard Häusler propuso una idea para la remoción no invasiva de cálculos renales usando ondas de choque en agua generadas por una descarga eléctrica de alto voltaje (10 a 30 kV) en el punto focal de un semi-elipsoide de revolución. Las ondas de choque se reflejarían de la pared del elipsoide fuera del cuerpo y después, serían enfocadas hacia el cálculo a tratar. Durante experimentos *in vivo* se demostró que los cálculos renales se desintegraban por la exposición a las ondas de choque, sin embargo había temor por el posible daño a los tejidos.

Actualmente existen tres tipos de generadores de ondas de choque que se usan en el campo médico: electrohidráulico, electromagnético y piezoeléctrico. El circuito eléctrico de todos los generadores es similar: un capacitor o banco de capacitores de alto voltaje se carga y descarga rápidamente aportando energía a un transductor electro-acústico. El primero es el generador electrohidráulico (Figura 1-7a), que utiliza dos electrodos como fuente puntual y la descarga se lleva a cabo en medio acuoso. Los electrodos se encuentran en el primer punto focal de un reflector metálico semi-elipsoidal. Al descargar los capacitores, se genera una descarga eléctrica entre los electrodos. La expansión del plasma que se produce entre los electrodos forma una onda de choque. Las ondas de choque esféricas se reflejan en el reflector mencionado, siendo enfocadas en el segundo punto focal, dentro del cuerpo del paciente.

El segundo generador forma ondas de choque por efecto piezoeléctrico (Figura 1-7 b). Se montan cientos o miles de cristales piezoeléctricos conectados en paralelo, en la parte interna de una superficie esférica. Al descargar la energía almacenada en los capacitores a través de dichos cristales, cada uno de ellos genera una compresión que se propaga a través del agua superponiéndose hasta degenerar en una onda de choque en la vecindad del centro (foco) del arreglo esférico.

El tercer principio de generación de ondas de choque para aplicaciones biomédicas usa una bobina electromagnética y una membrana metálica (Figura 1-7 c). Al liberar una corriente a través de la bobina, se genera un campo magnético fuertemente variable que induce alta corriente en la membrana opuesta. Las fuerzas electromagnéticas aceleran la membrana metálica creando un pulso de compresión. Para enfocar la onda se utiliza un lente acústico.

Los tiempos de ascenso de la presión están en el rango de algunos nanosegundos hasta decenas de nanosegundos [10].

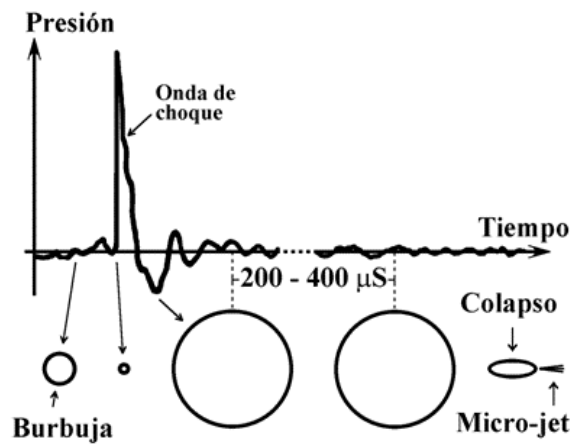


**Figura 1-7.** Generadores de ondas de choque: a) electrohidráulico, b) piezoeléctrico, c) electromagnético [11].

Los generadores de ondas de choque producen cavitación acústica, un mecanismo conocido por su capacidad de producir daño tisular basado en alteraciones a nivel celular y sub-celular [12]. La cavitación acústica puede definirse como cualquier actividad que involucre a una o varias burbujas en un fluido que han sido estimuladas por un campo acústico. A esta actividad se le puede ver como una gran concentración de energía acústica que resulta en elevadas tensiones localizadas, temperaturas y/o velocidad del fluido. La cavitación depende del contenido de gases disueltos, la viscosidad, la tensión superficial, la temperatura del fluido y la presión aplicada. La mayoría de los fenómenos de la cavitación pueden dividirse en dos categorías: (1) crecimientos pequeños de las burbujas en donde el cambio en el radio de una burbuja en un ciclo acústico es significativamente menor al del radio original; (2) crecimientos grandes en los que la burbuja crece en un ciclo tanto como o más que su radio original [13].

Al paso de una onda de choque a través de un medio acuoso como el agua, el crecimiento de una burbuja depende no sólo del pico de la presión, sino también de su duración. Entre mayor sea la amplitud del pulso de presión, mayor será la compresión sufrida por la

burbuja y consecuentemente, su crecimiento y colapso. El colapso asimétrico de la burbuja resultará en la emisión de un micro-chorro de agua (*microjet*) a una velocidad muy alta (aproximadamente 400 m/s), en la dirección del pulso incidente [13]. Como se muestra en la Figura 1-8, cada micro-burbuja dentro del fluido se comprime por el pulso de presión. Un instante después, la burbuja comienza una expansión inercial, aumentando su volumen enormemente en tan sólo 50  $\mu\text{s}$  a 100  $\mu\text{s}$  y colapsa violentamente después de aproximadamente 250  $\mu\text{s}$  a 500  $\mu\text{s}$  [14].



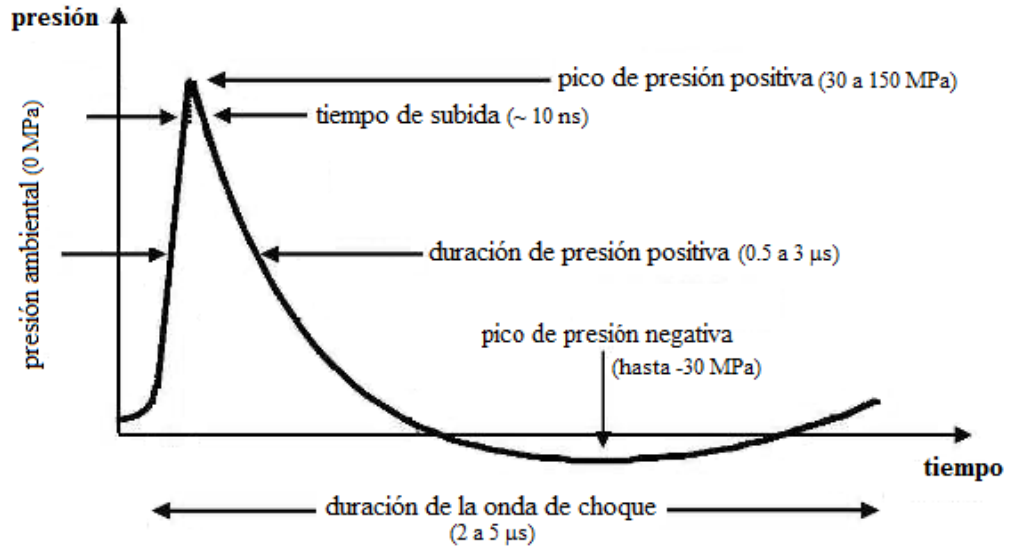
**Figura 1-8.** Esquema del perfil de presión de una onda de choque y del cambio de tamaño que sufre una burbuja inmersa en agua, al paso de dicha onda. [8]

### *1.3 Ondas de choque tándem*

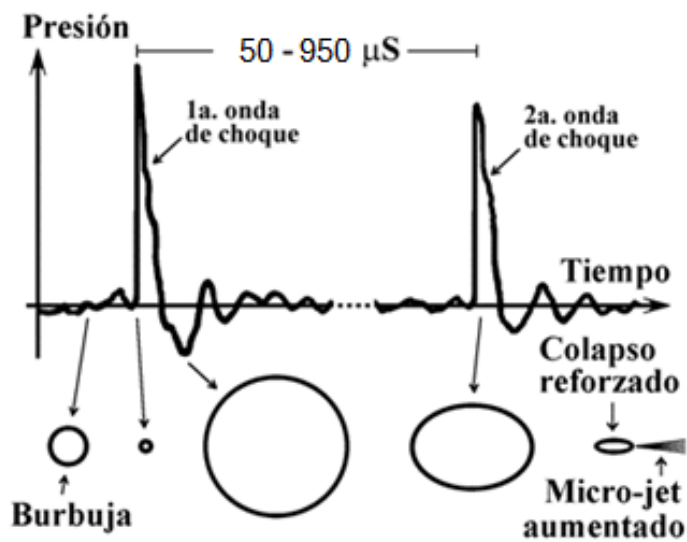
Con el objetivo de intensificar el colapso de las burbujas debido al paso de una onda de choque en la vecindad de cálculos renales, se han probado tres nuevos tipos de generadores de ondas de choque, entre ellos, los de liberación “tándem”. A diferencia de las ondas de choque estándar (mono-pulso), las ondas de choque tándem reciben su nombre debido a que dos pulsos emitidos uno tras otro en un lapso de microsegundos ( $\mu\text{s}$ ) lo que conlleva a un fenómeno de cavitación aumentada [8].

Los generadores de ondas de choque anteriormente descritos, producen variaciones de presión con un pico entre 30 y 150 MPa con un tiempo de ascenso de aproximadamente 10 nanosegundos (ns) y una duración de 0.5 a 3  $\mu\text{s}$  (Figura 1-9). Posteriormente se produce una descompresión, o presión “negativa”, con un pico de tensión de hasta -30 MPa y una duración de 2 a 20  $\mu\text{s}$ . Las ondas de choque tienen un espectro de frecuencia que va de los 20 kilo-Hertz (kHz) hasta algunos mega-Hertz (MHz). La mayoría de la energía se encuentra entre los 100 kHz y 1 MHz, con un pico alrededor de los 300 kHz. La energía total de pulso está en el rango de 10 a 100 mili-Joules (mJ) y la densidad de la energía se encuentra entre los 0.2 y 2.0  $\frac{\text{mJ}}{\text{mm}^2}$ . Como se explicó, durante el paso de una onda de choque, todas las microburbujas que se encuentran en el fluido, se comprimen debido al pico positivo. Después de 50-100  $\mu\text{s}$ , el volumen de estas burbujas aumenta hasta cien veces su tamaño original, para finalmente colapsar violentamente en un tiempo de aproximadamente 250 a 500  $\mu\text{s}$ .

La aplicación de las ondas de choque tándem está basada en el hecho de que el colapso de las burbujas se puede intensificar si una segunda onda de choque aparece un instante antes de iniciarse el colapso (Figura 1-10). El tiempo de retardo entre la primera y segunda onda debe ajustarse de acuerdo al tiempo de colapso de las burbujas formadas por la primera onda de choque. Este tiempo de colapso depende de varios factores, entre ellos del perfil de presión de la primera onda. Se ha demostrado que la segunda onda puede ser de una presión menor a la primera y aun así se obtiene un aumento en la energía de colapso de las burbujas [8].



**Figura 1-9.** Perfil de una onda de choque. [15]



**Figura 1-10.** Esquema que muestra una segunda onda de choque emitida durante el colapso de la burbuja, provocando un colapso reforzado [8].



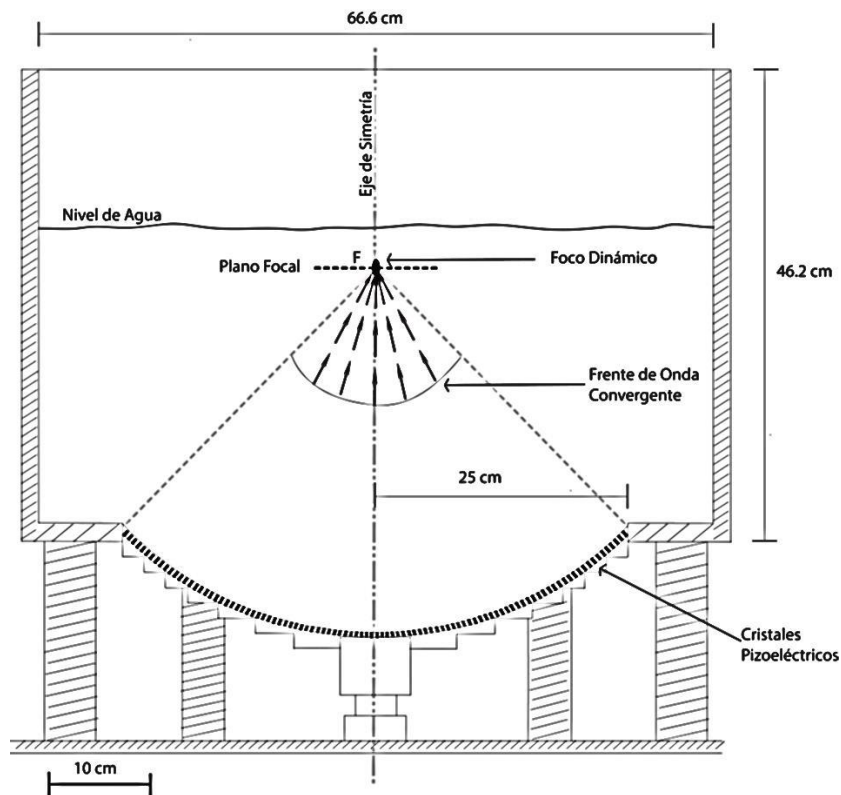
### *1.4 Generador multifuncional de ondas de choque*

El generador de ondas de choque *Piezolith 2501* (Richard Wolf GmbH) consiste en una superficie metálica esférica dispuesta con 3,000 cristales piezoeléctricos como se muestra en la Figura 1-11. Como se mencionó anteriormente, los generadores piezoeléctricos producen ondas de choque por una abrupta descarga de alto voltaje (5 - 10 kV) aplicada a través del conjunto de cristales piezoeléctricos (de titanato de bario, por ejemplo). Estos pulsos eléctricos cambian la dimensión de los cristales lo que produce una onda de presión con diferentes niveles de intensidad y una rarefacción al regresar los cristales a su forma inicial. Para transferir la energía acústica se utiliza agua. Para aplicaciones biomédicas el agua es un medio ideal debido a que su impedancia acústica es similar a la del tejido humano y porque la atenuación lineal de las ondas de choque es muy baja ( $0.01 \text{ dB cm}^{-1}$  por MHz). Los cristales piezoeléctricos están aislados del agua por una membrana de polímero flexible.

Debido a la forma esférica del arreglo de cristales piezoeléctricos (radio aproximado de 69 cm), las ondas convergen hacia su centro, sitio en el que se debe colocar la muestra a tratar. Este arreglo hemisférico de cristales produce un foco dinámico (o zona de -6 dB) en forma de un cilindro de 17 x 3 mm. El foco dinámico se define como el volumen en el que, en cualquier punto, la presión tiene más del 50% de la amplitud máxima del pulso de positivo. Para fines de experimentación, el generador se encuentra sobre una mesa y posee un tanque cúbico para depositar el agua hecho de polimetilmetacrilato. Para la colocación correcta de la muestra, se cuenta con un sistema posicionador de tres dimensiones (X, Y, Z) en la parte superior del tanque.

El circuito del *Piezolith 2501* consiste principalmente en un sistema de carga del condensador y una unidad que controla su descarga. El transformador carga dos capacitores a través de una resistencia y dos puentes rectificadores. Los capacitores mantienen este voltaje hasta el instante en el cual se activa el interruptor de chispa. Al suceder esto, se descarga la energía almacenada en uno de los capacitores, excitando el arreglo de cristales piezoeléctricos, mismos que producen la primera onda de choque. La segunda onda de choque se producirá al descargarse el capacitor restante [16]. Para producir ondas de

choque tándem, este circuito tuvo que ser duplicado conectando en paralelo ambas salidas de alto voltaje al arreglo de cristales piezoeléctricos. Además, se diseñó un generador de pulsos que dispara a ambos sistemas con un retardo ajustable entre 50 y 950  $\mu\text{s}$  en pasos de 10  $\mu\text{s}$ , logrando generar dos ondas de choque con el retardo deseado. La generación de dos ondas de choque en tiempos tan cortos es posible debido a que el tiempo que toman los cristales piezoeléctricos para regresar a su forma inicial es menor a un microsegundo. Para controlar la frecuencia de generación de las ondas de choque, se utiliza ya sea un interruptor de chispa (*spark gap*) o un interruptor de estado sólido, controlado por un generador de pulsos [17]. El sistema se puede operar en modo manual (un solo pulso o una pareja de pulsos) o automático (mono-pulso o tándem) con una frecuencia ajustable de emisión de ondas mono-pulso o tándem entre 0.1 y 1.0 Hz y cuenta con un contador de cuatro dígitos que registra el número de ondas generadas [18].



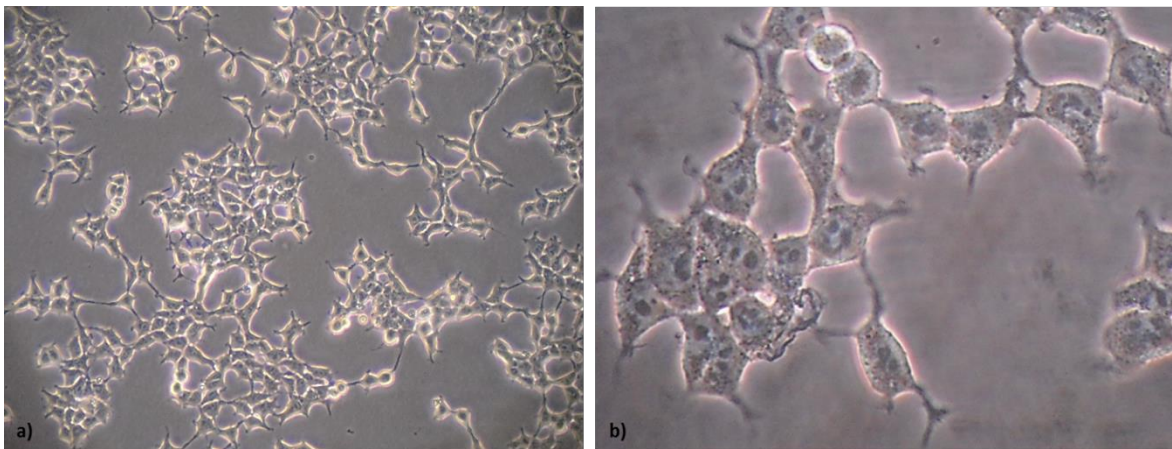
**Figura 1-11.** Esquema del generador de ondas de choque adaptado para su uso en el laboratorio.

## 1.5 Líneas celulares

Para el estudio de las ondas de choque como un método físico de transfección, en el presente trabajo se utilizaron cultivos de células humanas.

### 1.5.1 Línea celular HEK293

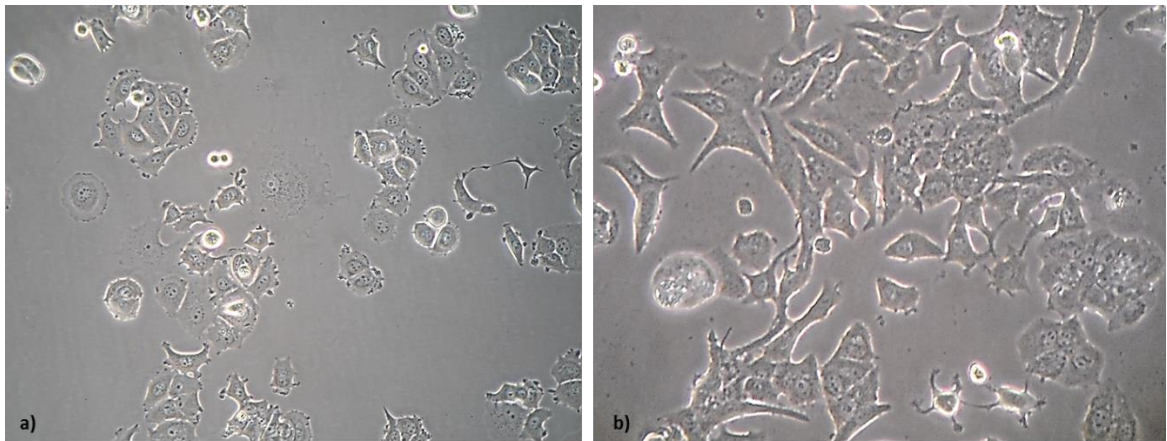
La línea celular de riñón de embrión humano HEK 293, por sus siglas en inglés (human embryonic kidney), se generó hace más de 30 años después de una transformación de células de riñón embrionario primarias por exposición de fragmentos cortados de adenovirus humano tipo 5 (Ad5). En un principio, las células HEK se obtuvieron como producto del aborto de un feto sano que fueron cultivadas por van der Eb y transformadas por Graham [19] con fragmentos de Ad5 que abarcan la región temprana 1 (E1). Las células originales HEK 293 clonadas (Figura 1-12) contenían varios nucleótidos de Ad5, incluyendo las secuencias transformadas de la región E1 integradas al cromosoma 19 de la célula hospedera como producto del experimento número 293 de Frank Graham [20].



**Figura 1-12.** Cultivo de células HEK 293. a) Objetivo 10X. b) Objetivo 40X.

### 1.5.2 Línea celular MCF-7

En 1970 se aislaron células tumorales de mama obtenidas por efusión pleural de una mujer caucásica de 69 años con carcinoma mamario metastásico, generando así las células MCF-7 (Figura 1-13). Sus siglas son el acrónimo en inglés de la Fundación de Cáncer de Michigan (Michigan Cancer Foundation), que es el instituto en la ciudad de Detroit en donde Herbert Soule y sus colaboradores [21] establecieron la línea celular.



**Figura 1-13.** Cultivo de células MCF-7. a) Objetivo 10X. b) Objetivo 40X.

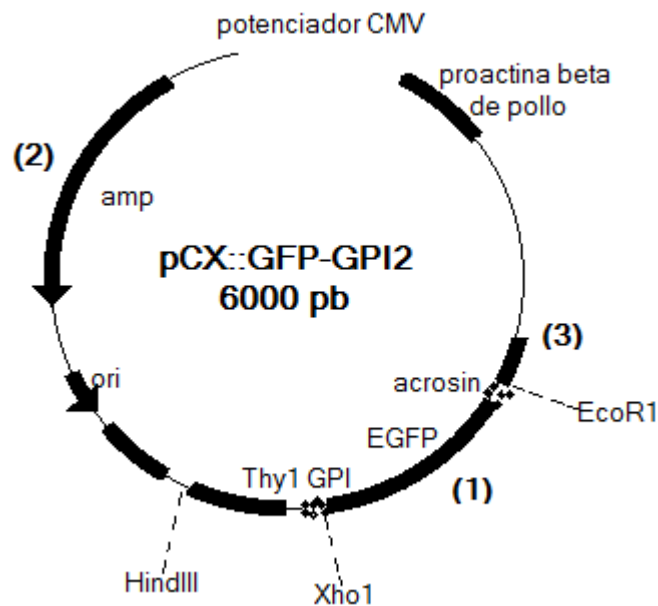
### 1.6 Plásmido *pCX::GFP-GPI2*

Para realizar una transfección se utilizan frecuentemente construcciones de ácidos nucleicos, denominadas vectores. Un vector molecular es capaz de replicarse de manera autónoma en una célula hospedera. Además, contiene un origen de replicación, es capaz de aceptar ADN foráneo, posee 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, es decir, moléculas cerradas, circulares, de replicación autónoma, que se encuentran en determinadas organismos como las bacterias y algunos eucariotas como las levaduras. Los plásmidos de uso común se replican en bacterias (lo cual facilita su producción para fines tecnológicos y clínicos), tienen ADN de doble cadena extra-cromosómico, con un tamaño molecular de entre 1 a más de 200 kb y con un número de copias de uno a cientos por célula [22].

Para monitorear la transfección de células se utilizó el plásmido *pCX::GFP-GPI2*, compuesto por el gen *egfp*, que codifica la proteína verde fluorescente (*gfp*, por sus siglas en inglés *green fluorescent protein*) con el gen *gpi*, que permite el anclaje de la proteína con el glicolípido de membrana glicosilfosfatidilinositol (*gpi*, del inglés *glycosylphosphatidylinositol*).

Debido a la facilidad para detectarla, la *gfp*, extraída de la medusa *Aequorea victoria*, es ampliamente utilizada como reportero en estudios sobre expresión de genes y localización de proteínas. La fluorescencia de esta proteína emite luz verde ( $\lambda_{\max} = 510$  nm) al ser excitada con luz ultravioleta (UV) o luz azul ( $\lambda_{\max} = 395$  nm, pico menor en 470 nm) y no requiere ningún sustrato o cofactor para ser detectada. Para mejorar la versión silvestre de la *gfp*, se hizo una combinación de una mutación de *gfp* de fluorescencia 35 veces mayor con una secuencia génica rediseñada de *gfp* que contiene codones encontrados en proteínas humanas de alta expresión, llamada *egfp* (*enhanced green fluorescent protein*, proteína verde fluorescente mejorada). Estos cambios permiten que tanto células mamíferas como vegetales traduzcan eficientemente el ADN mensajero de la *egfp*, lo que incrementa su expresión [23].

Los grupos glicosilfosfatidilinositol funcionan para fijar una amplia variedad de proteínas a la superficie exterior de la membrana plasmática eucarionte, proporcionando una alternativa a los dominios polipeptídicos transmembrana. Para generar proteínas de fusión que pudieran señalar la parte interna de la membrana plasmática, se marcaron proteínas fluorescentes *egfp* con secuencias de *gpi* que dirigen la unión de diferentes fracciones de lípidos en la membrana. Para la construcción del plásmido *pCX::GFP-GPI* se agregó además el gen de selección de resistencia a ampicilina (*amp*), su respectivo origen de replicación (*ori*) y los sitios de restricción HindIII, XhoI y EcoRI [24]. Estos sitios de restricción son importantes pues permiten a la bacteria *Escherichia coli*, en donde se crece el plásmido, protegerse de ADN exógeno para evitar la “promiscuidad” en los intercambios genéticos. Podemos observar el modelo de este plásmido en la Figura 1-14.



**Figura 1-14.** Modelo del plásmido *pCX::GFP-GPI2*. (1) Los genes *egfp* y *gpi* codifican para una proteína de fusión para localización en membrana. (2) Secuencia de resistencia a ampicilina. (3) Sitios de restricción EcoRI, XhoI y HindIII.

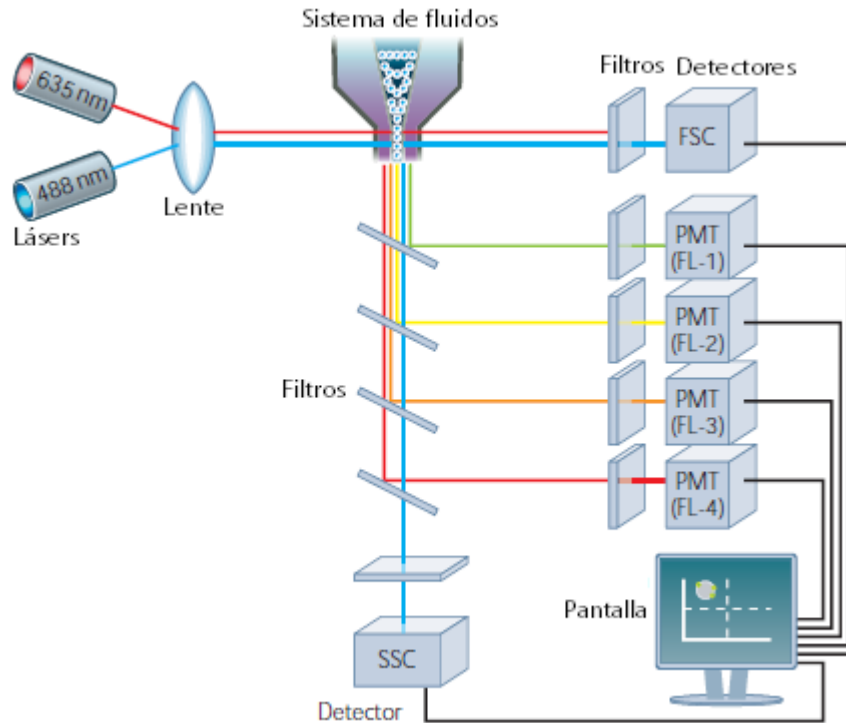
### *1.7 Citometría de flujo asistida por fluorescencia*

La citometría de flujo constituye una técnica que permite un análisis multi-paramétrico de un gran número de células en suspensión a medida que éstas pasan alineadas una a una delante de un haz de luz, habitualmente un láser. Al ser multi-paramétrico permite conocer de forma simultánea rápida y objetiva diferentes características de una célula o población celular. Por otra parte, la citometría de flujo permite la obtención no sólo de una información cualitativa sino también cuantitativa sobre los diferentes parámetros estudiados.

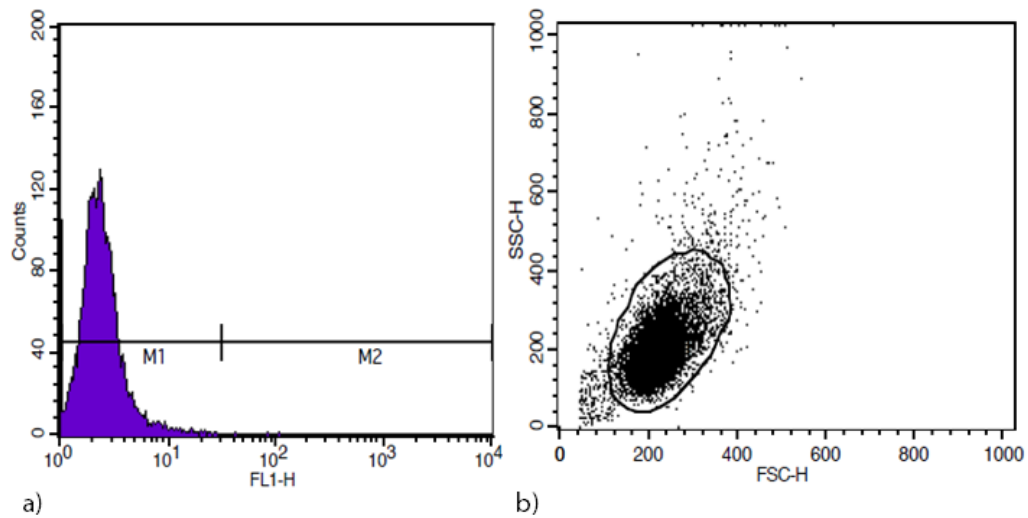
Con el fin de poder discriminar entre los fotones, el citómetro posee una serie de detectores de luz denominados fotodiodos o tubos fotomultiplicadores (PMT, del inglés *Photomultiplier Tubes*) que seleccionan diferentes parámetros en base al ángulo de detección de la luz y a su longitud de onda. Así, los citómetros de flujo están dotados con hasta 10 láseres y 18 detectores diferentes: detectores para la luz dispersada, frontalmente (FSC del inglés *forward scatter channel*), lateralmente (SSC del inglés *side scatter channel*) y para luz emitida por fluorocromos (FL1, FL2, FL3, FL4, etc.) (Figura 1-15).

La intensidad en FSC equivale aproximadamente al tamaño de la célula y puede utilizarse para diferenciar entre células vivas y restos celulares, mientras que el canal de dispersión lateral SSC brinda información sobre la granularidad de una célula. Tanto el canal FSC como el SSC son únicos para cada célula y la combinación de ambos puede utilizarse, por ejemplo, para diferenciar diferentes tipos celulares en una muestra heterogénea [25].

Al excitarse por el haz láser, los colorantes emiten una longitud de onda específica de luz que se detecta con otra serie de filtros y PMT. Luego, un sistema de computación convierte la señal de luz emitida en un histograma fluorescente, que despliega intensidad creciente de un color de fluorescencia en el eje de las abscisas (x) contra el recuento celular en el eje de las coordenadas (y) (Figura 1-16a). La luz desviada fuera de las células nativas por lo general se convierte a un diagrama de dispersión donde cada punto representa una sola célula de tamaño y densidad determinados (Figura 1-16b). Los parámetros colocados en el eje x o el eje y del diagrama de dispersión varían con cada fabricante y simplemente son exposiciones diferentes de los mismos datos celulares.



**Figura 1-15.** Esquema general del arreglo de un citómetro de flujo típico [26].



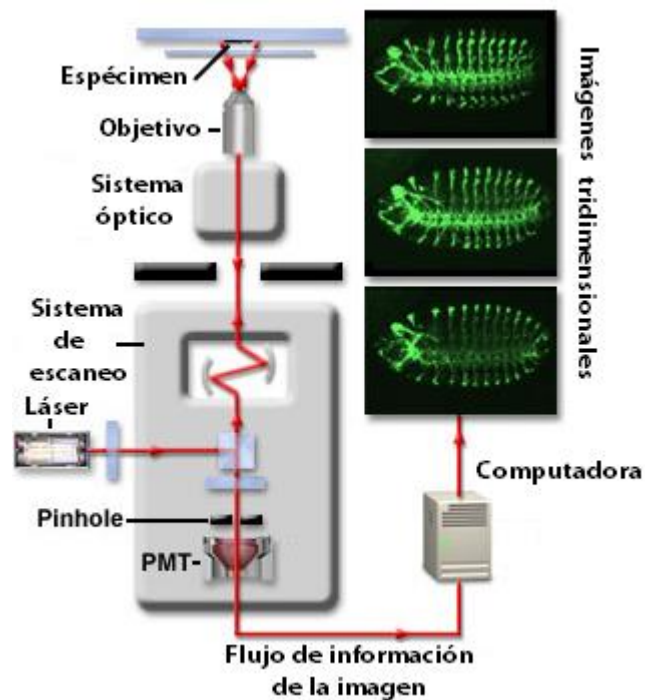
**Figura 1-16.** Gráficas representativas generadas por un citómetro de flujo. a) Histograma de fluorescencia vs conteo de un grupo de células b) Diagrama de dispersión del mismo grupo celular.



### 1.8 Microscopía confocal

La microscopía confocal es una técnica de imagen utilizada para incrementar el contraste en fotografías tomadas a través de sistemas de amplificación como son los microscopios o para reconstruir imágenes en tercera dimensión mediante el uso de un dispositivo que permite eliminar la luz que se encuentra fuera de plano focal o el brillo en objetos que son más gruesos que el campo focal.

En la actualidad, existen dos métodos diferentes para la microscopía confocal: escaneo por uno o por múltiples haces de luz, siendo más popular es el de escaneo por un haz de luz láser. Éste último utiliza PMTs sensibles y una computadora para controlar los espejos de exploración y facilitar la recolección y visualización de imágenes (Figura 1-17). La iluminación y detección están confinadas a un único punto de difracción limitada en el espécimen el cual es enfocado por un lente objetivo y posteriormente escaneado. Se pueden capturar hasta tres fluorocromos simultáneamente, y es más sencillo manipular las imágenes con la ayuda de un software especializado.

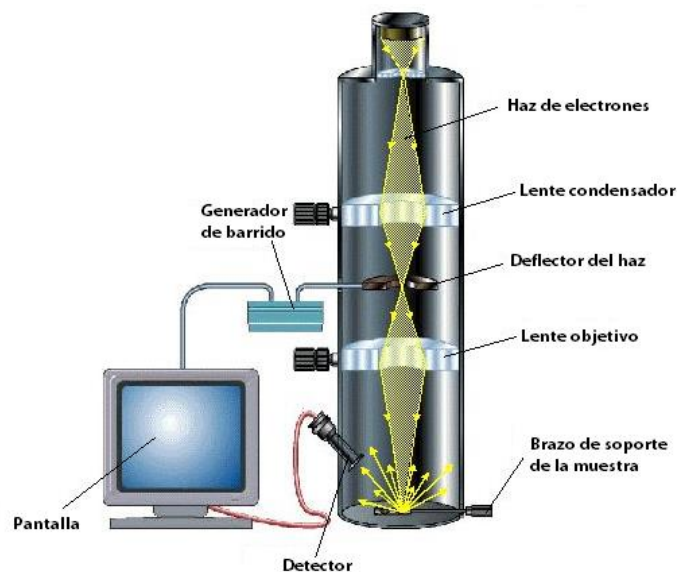


**Figura 1-17.** Proyección de una imagen en tercera dimensión obtenida con un microscopio confocal [27].

### 1.9 Microscopía Electrónica de Barrido

El microscopio electrónico de barrido (MEB), a diferencia de un microscopio óptico utiliza electrones en lugar de luz para formar una imagen y lentes electromagnéticas. Esto permite que se enfoque a la vez una gran parte de la muestra con alta resolución y amplificación; y con apariencia tridimensional permitiendo el estudio y análisis de las características microestructurales de objetos sólidos.

Los electrones emitidos por la interacción del haz incidente y la muestra son colectados por los correspondientes detectores para producir una señal eléctrica, la cual se utiliza para modular la intensidad de un haz de electrones que incide en la pantalla de un tubo de rayos catódicos (TRC), de manera que mediante un barrido sincronizado del haz incidente en la superficie de una muestra y del haz incidente en la pantalla del TRC, se produce en esta una imagen de la muestra (Figura 1-18). Para generar una imagen en la pantalla del TRC es necesario que el haz de electrones en la columna del microscopio barra la superficie de estudio en sincronía con el barrido del haz en el TRC, de manera que la información proveniente de cualquier punto de la muestra se reproduzca en la misma posición relativa en la pantalla. De esta manera se construye la superficie de una muestra punto por punto. [28].



**Figura 1-18.** Configuración óptica de un microscopio electrónico de barrido [29].

## 2 ANTECEDENTES

En general, la terapia con ondas de choque es segura y efectiva pero debe cuidarse la dosis aplicada, ya que de lo contrario puede causar daños en los tejidos [30]. Bajo ciertas circunstancias, las ondas de choque pueden producir permeabilidad transitoria en las membranas celulares, permitiendo que moléculas de gran tamaño (normalmente excluidas por la membrana celular) se inserten en la célula.

A nivel celular, cuando un *microjet* pasa cerca de, o atraviesa una membrana celular perturba su integridad, lo que podría producir una permeabilidad transitoria o un daño biológico (muerte celular) [31]. Se ha demostrado que cierta proporción de células expuestas a tratamientos con ondas de choque es destruida y reducida a restos celulares (dependiendo del número de descargas y de la energía utilizada); sin embargo, la mayoría de las células sobrevivientes han mostrado una proliferación cercana a la normal [32]. Según algunos estudios, ciertas líneas celulares como, por ejemplo la L1210 de ratón [33] y la PC-3 de humano [34]; así como los esferoides tumorales multicelulares de células HeLa y EMT6/Ro [35], aunque difieren su sensibilidad a las ondas de choque, se comportan del mismo modo durante las diferentes fases del ciclo celular.

En 1992, se reportó que la permeabilidad de la membrana de las células L1210 (células leucémicas) puede ser aumentada con la exposición a ondas de choque, dando así la posibilidad de que las sustancias fuera de la célula pudiesen ser insertadas en su interior [36]. En 1997, un grupo de investigadores publicó un artículo en el que se describe la internalización de un plásmido desnudo en células eucariotas de distintas especies y tejidos, así como algunos parámetros para determinar la eficiencia del tratamiento con ondas de choque [37]. A partir de entonces, se estudia la transfección en varias líneas celulares usando diferentes vectores. Los beneficios de este tipo de tratamiento han dado paso a su exploración a nivel *in vivo* con resultados favorables. En 1998, se determinó la transfección transitoria de genes reporteros en células de melanoma tanto *in vitro* como *in vivo*

mostrando una mayor expresión a mayor número de ondas de choque en el tratamiento y se recomendó utilizar una alta concentración de plásmido [38].

Por otro lado, se ha demostrado que el uso de las ondas de choque tándem mejora la calidad y la velocidad de la trituración de cálculos renales artificiales sin aumentar el daño tisular [14]. Ajustando adecuadamente ciertos parámetros como amplitud de las ondas y el retardo (*delay*) entre la primera y la segunda onda de choque, se ha demostrado que pueden aumentar la inactivación [39] y la eficiencia de transformación [40] de bacterias y hongos filamentosos [41], así como una mejora de liberación de macromoléculas [42].

La línea celular HEK293 se ha usado para demostrar la eficacia de varios reactivos de transfección como lípidos catiónicos Lipofectamine<sup>®</sup> (Invitrogen), la formulación no liposomal FuGene<sup>®</sup> (Promega), el dendrímero activado SuperFect<sup>®</sup> (QIAGEN), así como de diferentes técnicas como penetración física por electroporación y biolística [20, 43, 44].

A diferencia de éstas, las células MCF-7 se consideran de difícil transfección. Sin embargo, se ha reportado inserción de los genes reporteros gWIZ-luciferasa y gWIZ-GFP, plásmido de proteína verde fluorescente, mediante biolística [45] así como con el plásmido con lípidos catiónicos METAFECTENE<sup>®</sup> (Biontex) [46] y con el reactivo libre de liposomas XtremeGENE 9 DNA<sup>®</sup> [47], pero no hay antecedentes sobre transfección mediante un método aplicable *in vivo*, tal como la aplicación de ondas de choque.

### **3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En un estudio reciente de nuestro grupo se reportó la permeabilidad transitoria y la transfección de células HEK 293. En estos experimentos se logró obtener una alta expresión de genes exógenos utilizando un plásmido cationizado y se observó que la mortalidad es inversamente proporcional a la cantidad de ondas de choque utilizada [48, 49].

Sin embargo, poco se sabe sobre los efectos y mecanismos involucrados en la permeabilización celular debido a las ondas de choque y su relación con la viabilidad celular post-tratamiento. Debido a lo anterior, resulta de interés describir el efecto de las ondas de choque generadas con el equipo *Piezolith 2501* (Richard Wolf GmbH) descrito anteriormente. Teniendo como modelo de transfección a las líneas celulares HEK293 y MCF-7 es importante realizar un análisis comparativo sobre la mortalidad, permeabilidad, eficiencia de transfección y la evidencia de dichos efectos a nivel ultraestructural.

## **4 HIPÓTESIS**

Mediante microscopía electrónica de barrido es posible documentar la formación de poros en células tratadas por ondas de choque.

## **5 OBJETIVOS**

### *5.1 General*

Analizar la ultraestructura de células HEK293 tratadas por ondas de choque

### *5.2 Particulares*

Establecer la supervivencia de células HEK 293 y MCF-7 expuestas a ondas de choque mono-pulso y tándem.

Determinar condiciones de ondas de choque capaces de permeabilizar las células, permitiendo el paso de una macromolécula fluorescente.

Efectuar estudios ultra-estructurales de células permeabilizadas transitoriamente por ondas de choque.

Realizar ensayos de transfección de dos líneas de células eucariontes HEK 293 y MCF-7 mediante ondas de choque capaces de producir permeabilización de membrana.

Analizar si existe una relación entre la formación de poros documentados a nivel ultra-estructural y la transfección de dos líneas de células humanas.

## **6 MATERIALES Y MÉTODOS**

### *6.1 Cultivo celular*

#### *6.1.1 Mantenimiento y propagación*

Ambas líneas celulares se cultivaron en medio DMEM adicionado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y Penicilina-Estreptomicina al 1% (DMEM completo) en cajas de cultivo estériles a una temperatura de 37 °C en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> dentro de la incubadora. Los frascos y puntas que se usaron para preparar el medio de cultivo y PBS fueron esterilizados previamente en autoclave durante 20 minutos a 121 °C y 21 psi. Se hicieron pases de mantenimiento y propagación 2-3 veces por semana cuando la confluencia se encontraba entre el 80% y el 90%.

En condiciones de esterilidad, el medio de cultivo viejo, fue aspirado, con ayuda de una pipeta Pasteur estéril conectada a línea de vacío. Para eliminar residuos proteicos, se realizó un lavado con 5 mL de PBS 1X y se aspiró. Posteriormente se agregaron 2 mL de tripsina-EDTA incubando por 5 minutos a 37 °C para desprender las células. Una vez transcurrido el tiempo, se monitoreó al microscopio el desprendimiento celular y, en caso de ser necesario, se incubaban más tiempo en periodos de 5 minutos. A fin de inhibir la proteólisis, se agregó medio adicionado de SFB en un volumen equivalente al doble del volumen de tripsina utilizado, transfiriendo la suspensión celular a un tubo cónico para centrifuga de 50 mL. Las células fueron recuperadas por centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos desechando el sobrenadante y re-suspendiendo en medio completo. Posteriormente fueron realizados los conteos celulares en una cámara de Neubauer para estimar la densidad celular y se sembraron 1 millón de células en 10 mL de DMEM completo para crecimiento por 48 h ó 400,000 células en el mismo volumen para crecimiento por 72 h.

#### *6.1.2 Almacenamiento de células*

Con el propósito de tener cultivos frescos continuamente, fue necesario preservar alícuotas de las líneas celulares en congelación. Las células pueden guardarse por un periodo de 6 meses a -80 °C o durante periodos mayores en fase de vapor de nitrógeno líquido a -130 °C

sin causar daño a su fenotipo ni disminución en su viabilidad. Para su crio-preservación se preparó medio de congelación 2X que consistió en DMEM completo con 20% de SFB y 20% de dimetilsulfóxido (DMSO), un agente químico que actúa como crio-protector. Se siguió el procedimiento descrito en 6.1.1, ajustando la suspensión a 1 millón de células por mililitro en medio de congelación. Para ello, se preparó una suspensión celular en DMEM completo, a una densidad celular de 2 millones/mL, y se hizo una dilución 1:1 (vol/vol) con medio de congelación 2X, mezclando muy suavemente únicamente una vez. La suspensión celular fue repartida en viales de congelación (1 mL por vial) e inmediatamente congelada a -80 °C.

### *6.1.3 Descongelamiento de células*

Para asegurar la calidad del lote de células congelado uno de los viales fue descongelado, procurando que las células estuviesen el menor tiempo posible en contacto con el DMSO para evitar lisis osmótica. Al llegar a temperatura ambiente, y una vez que el hielo desaparecía, se transfirieron a una caja de cultivo estéril con 10 mL de medio DMEM completo y se incubaron por lo menos 3 horas permitiendo que las células se adhirieran al plato; una vez adheridas las células se realizó cambio de medio sin DMSO.



## 6.2 Propagación y purificación del plásmido *pCX::GFP-GPI2*

### 6.2.1 Propagación del plásmido *pCX::GFP-GPI2*

Para realizar la propagación de plásmido se utilizaron células ultra-competentes *E. coli XL-BLUE* congeladas a -80 °C. Se descongeló un vial con 200 µL de suspensión celular en baño de hielo (sumergiéndolo completamente, a fin de evitar la pérdida del carácter competente de las células). Enseguida, se agregaron 0.1 µg del plásmido *pCX::GFP-GPI2* en condiciones estériles, y la mezcla se incubó por 15 minutos a 4 °C. Pasados los 15 minutos se aplicó un choque térmico a 42 °C durante 2 a 3 minutos. Enseguida, las células fueron transferidas a un tubo Eppendorf con 1 mL de medio LB sin antibiótico y se colocaron en incubación a 37 °C bajo agitación durante 30 minutos. Finalmente, se sembró una alícuota de 50 µL de la suspensión bacteriana en una caja Petri con medio LB-Ampicilina (agar), dispersando con ayuda de perlas de vidrio. Se hizo el mismo procedimiento, pero sin agregar plásmido para tener un cultivo control, y ambos cultivos se incubaron a 37 °C durante una noche (12 h). La selección de las bacterias que incorporan el plásmido se dio por el crecimiento de las mismas, pues 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.

### 6.2.2 Purificación de plásmido usando *Plasmid Maxi-kit QIAGEN*<sup>®</sup>

Después de 24 h del proceso de propagación del plásmido, se tomó una de las colonias con expresión de EGFP con ayuda de un asa bacteriológica estéril y se transfirió a un tubo cónico de 50 mL con 5 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 y se sembraron en 500 mL de medio LB-Ampicilina dentro un matraz de 1 L, el cual se incubó durante 12 h a 37 °C con agitación.

Las bacterias transformantes fueron recuperadas por centrifugación a 3500 x g por 15 minutos a 4 °C del cultivo en matraz, éstas fueron re-suspendidas en 10 mL de solución con RNAsa, tampón de EDTA-Tris-Glc (P1), y se trasvasaron a un tubo cónico de 50 mL. Posteriormente, se añadieron 10 mL de solución P2 (NaOH y detergente SDS) para realizar la lisis de las bacterias mezclando por inversión hasta visualizar una suspensión azul

homogénea, lo cual es facilitado en este kit por un indicador de pH incluido en el tampón P1. Después de 5 minutos, el medio se neutralizó con 10 mL de buffer de acetato de potasio (P3), mezclando nuevamente por inversión hasta perder el tono azul. Se preparó un filtro QIAfilter Maxi, ajustando una tapa en la boquilla de salida y colocándolo en un tubo cónico limpio. El contenido del primer tubo se transfirió a un filtro QIAfilter Maxi y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Durante el tiempo de incubación, se procedía a preparar la columna QIAGEN-tip500 de intercambio iónico, equilibrándola por elución con 10 mL de solución amortiguadora QBT.

Una vez terminado el periodo de reposo de la muestra en el filtro QIAfilter, se removió la tapa de salida del filtro y se insertó el émbolo en el filtro, depositando el contenido dentro de la columna QIAGEN-tip500. Se hizo pasar 60 mL de tampón QC para lavado. Posteriormente, se agregaron 15 mL de tampón QF de elución, recuperando la elución en un tubo cónico estéril. El plásmido eluido fue precipitado con 10.5 mL de isopropanol y centrifugando a 4 °C y 5 000 x g por 60 minutos. Se realizó un lavado con 5 mL de etanol al 70% (4 °C), y una nueva centrifugación; posteriormente el pellet se transfirió a un tubo Eppendorf y fue re-suspendido en un volumen de 200 - 400 µL de agua de Pisa. La pureza y concentración del plásmido se estimó mediante espectrofotometría UV (NanoDrop 1000, ThermoScientific) y por último, el plásmido se almacenó en congelación a -20 °C.

### *6.2.3 Prueba de identidad y de calidad del plásmido purificado*

#### *6.2.3.1 Susceptibilidad a enzimas de restricción*

Las enzimas de restricción o endonucleasas reconocen secuencias específicas en el ADN de doble hebra (de 4 a 8 nucleótidos) y cortan ambas hebras de la molécula. Las bacterias utilizan estas enzimas como sistema de defensa frente a los bacteriófagos: el ADN propio de la bacteria no se corta, debido a que las secuencias que reconocerían las endonucleasas están metiladas y, por tanto, protegidas del corte. Una de las aplicaciones de estas enzimas es hacer el mapa de restricción de un plásmido mediante la fragmentación de ADN genómico.

Para ello, se llevaron a cabo digestiones que consisten en la preparación de soluciones de 20 ng/µL del plásmido *pCX::GFP-GPI2* tratados por separado con 1 µL de tres enzimas de

restricción: EcoR1, HindIII y XhoI; 2  $\mu$ L del buffer correspondiente a cada endonucleasa y 15  $\mu$ L de agua de Pisa. Posterior a la preparación de las muestras, se realizaron incubaciones de una hora a 37 °C en baño seco.

#### *6.2.3.2 Electroforesis en gel de agarosa*

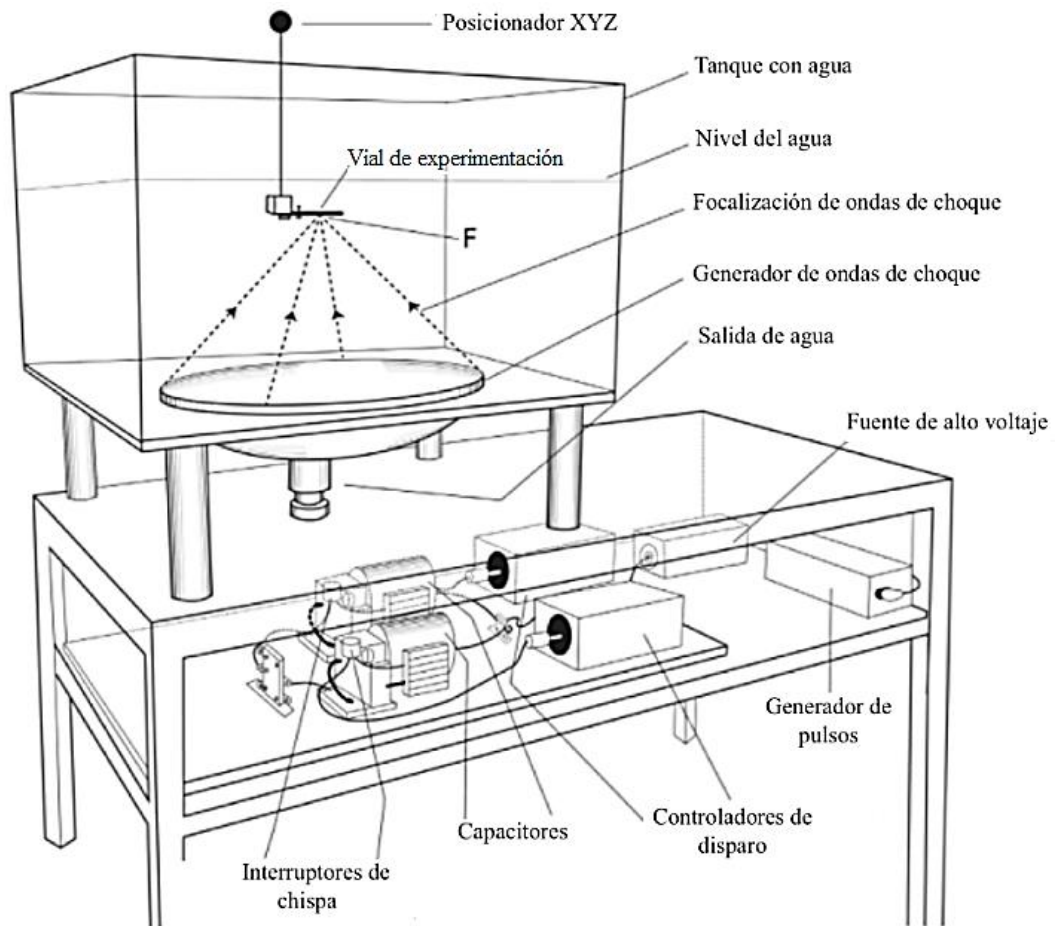
El análisis de las formas topoisoméricas o de los fragmentos de ADN generados por la digestión con enzimas de restricción se realizó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa.

Un plásmido no tratado con enzimas de restricción es una molécula circular de ADN y, debido a esta característica, puede presentarse en dos conformaciones, principalmente: una forma súper-enrollada y, por lo menos, una forma relajada. Aunque las dos tienen la misma masa molecular, migran de forma diferente debido a su forma o disposición espacial. La movilidad relativa de las dos formas depende principalmente del porcentaje de agarosa en el gel, aunque también influyen la corriente aplicada, la fuerza iónica del tampón y el grado de enrollamiento de la forma súper-enrollada. Bajo las mismas condiciones la forma súper-enrollada, más compacta, migra más deprisa que la forma relajada.

En este caso se preparó un gel de agarosa al 1% usando 36 mL de agua destilada, 4 mL de TAE 10X y 0.4 g de agarosa que se calentó durante 35 segundos en horno de microondas para su disolución. Posteriormente, se cargó una muestra por pozo así como el marcador de pesos moleculares y se aplicó una corriente de 100 volts durante 60 minutos. Al finalizar la corrida, el gel se tiñó durante 15 minutos en una solución de 30 mL de TAE 1X y 3  $\mu$ L de SYBR<sup>®</sup>Safe, y fue analizado en foto-documentador (Gel Doc<sup>™</sup> EZ Imager, BIORAD).

### 6.3 Uso del generador de ondas de choque Piezolith 2501

El tanque del generador de ondas de choque multifuncional (Figura 6-1) se llenó con agua hasta 4 cm arriba del nivel focal (F). Posteriormente, se verificó que los interruptores principales se encontraran apagados y el control de alto voltaje en cero. Después, se conectó el equipo a la toma de corriente, y se encendió el interruptor principal y el generador de pulsos. Una vez verificado el funcionamiento de los controles del generador, se colocó el primer vial en el foco usando el posicionador XYZ.



**Figura 6-1.** Esquema del generador de ondas de choque multifuncional *Piezolith 2501* [50].

## *6.4 Condiciones para la aplicación de tratamientos de ondas de choque*

### *6.4.1 Estabilidad del plásmido*

Un paso importante fue estudiar el comportamiento del plásmido *pCX::GF-GPI2 per se* expuesto a la acción de las ondas de choque, por lo que fue necesario hacer experimentos previos a su adición a muestras con células. El medio ideal para suspender células evitando la degradación del plásmido es el medio DMEM libre de suero fetal bovino (SFB), únicamente suplementado con antibióticos [49].

### *6.4.2 Aplicación de ondas de choque*

Los parámetros utilizados para los tratamientos con ondas de choque en células HEK293 se eligieron de acuerdo con trabajos previos en el laboratorio, en donde se encontró un intervalo de viabilidad del 50% al 80% para tratamientos de 60, 120 y 180 ondas de choque generadas con un voltaje de 3 kV, siendo 120 ondas de choque la dosis con mayor sobrevivencia [48]. Debido a este antecedente, se decidió trabajar con 60 ondas de choque tándem, es decir, 60 pares de ondas, y se probaron tres distintos intervalos de tiempo entre la primera y la segunda onda de choque: 300, 600 y 900 microsegundos.

Para la línea celular MCF-7 se obtuvo una curva de sobrevivencia tomando como referencia los parámetros usados para las células HEK293 y a partir de esos resultados se llevaron a cabo los experimentos para observar transfección y permeabilización.

Para la evaluación de transfección y permeabilización se consideraron dos controles comparativos de células sin exposición a las ondas de choque; el control positivo en el que al medio en el que se encontraban las células se le agregó el plásmido *pCX::GF-GPI2* o el fluorocromo FD-10, según el caso, y el control negativo en el que las células no recibieron ondas de choque.

Para la preparación de los viales de experimentación se crecieron cultivos celulares de HEK 293 por 48 h y de MCF-7 por 120 h. Se siguieron los pasos de 6.1.1 hasta la recuperación de células, las cuales se re-suspendieron en medio DMEM sin suero, ajustando la

concentración a 2 millones de células por mililitro. Cada muestra fue colocada primeramente en un tubo Eppendorf estéril y después fue trasvasada a pipetas de transferencia de polipropileno estériles (Elkay Products Inc, Shrewsbury, EUA, modelo 127-p507-STR). Las puntas de las pipetas se cortaron aproximadamente a 5 cm del vial y se sellaron con calor en condiciones estériles. Por último, los viales se colocaron, uno por uno, en el foco del generador multifuncional *Piezolith 2501* y se sometieron a tratamientos con ondas de choque.

#### *6.4.3 Supervivencia de las células ante tratamientos de ondas de choque*

Al finalizar los tratamientos con ondas de choque, se abrieron los viales de experimentación en condiciones de esterilidad, con ayuda de unas tijeras estériles, y se contaron las células en suspensión en una cámara Neubauer para tener un estimado de la viabilidad celular utilizando el indicador azul de tripano (Trypan Blue solution 0.4%, Sigma-Aldrich).

Para el caso de la permeabilización, las células se fijaron posteriormente a los tratamientos. El agente fijador usado fue paraformaldehído (PFA) al 4% en amortiguador de fosfatos PBS 1X.

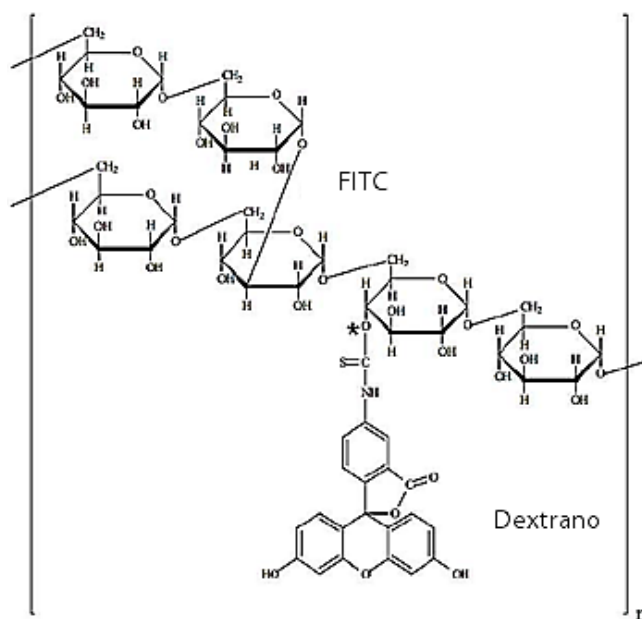
Para fijar las células en suspensión, las células fueron lavadas y el sobrenadante fue descartado por centrifugación y posteriormente se agregaron, en volúmenes iguales, amortiguador, PBS 1X y PFA al 4% re-suspendiendo bien la muestra e incubando por 15 minutos. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 8000 rpm por 5 minutos, descartando el sobrenadante, para eliminar restos del fijador. En total, se realizaron tres lavados con PBS 1X, dejando reposar 5 minutos con cada lavado; una vez concluidos las muestras se almacenaron a 4 °C protegidas de la luz para su posterior análisis.

En el caso de transfección, después del conteo, las células fueron sembradas nuevamente, se crecieron por 24 h (HEK 293) y 48 h (MCF-7), a fin de permitir la expresión de la información genética exógena insertada en el plásmido. Una vez transcurrido ese tiempo, se realizó la fijación con paraformaldehído como se describió para las células tratadas con FD-10.

#### 6.4.4 Permeabilización de células

Para la evaluación indirecta tanto de la inserción del plásmido como del FD-10, se utilizaron equipos que permiten obtener valores de fluorescencia, como son el citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences), el cual usa el software de análisis CellQuest Pro<sup>®</sup> (BD Biosciences). Por otro lado, también se usó un microscopio confocal Nikon Eclipse E-600 con módulo PCM 2000 con software de captura Simple PCI (Compix) para microscopía a través del cual se realizaron secuencias en plano X, Y, Z, en tiempo real, reconstrucciones, proyecciones y análisis de imágenes.

Para comprobar que la permeabilización celular estuviese mediada por las ondas de choque y no por simple absorción, se utilizó como marcador el fluorocromo FD-10 (del inglés Fluorescein Isothiocyanate-Dextran, Sigma<sup>®</sup>), cuyo peso molecular (10 kD) impide su inserción por sí mismo en la célula. El marcador fue utilizado a una concentración de 200  $\mu\text{M}$  bajo las mismas condiciones de tratamiento que en los experimentos de supervivencia celular. El dextrano es un polímero de anhidroglucosa derivado de la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* (cepa B512) el cual, al conjugarse con el FITC (Isotiocianato con fluoresceína) forma una macromolécula fluorescente con excitación máxima de 490 nm y emisión máxima en 520 nm (Figura 6-2).



**Figura 6-2.** Estructura del FITC-Dextrano (FD).

#### *6.4.5 Preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido*

Los pasos básicos a seguir para fijar células son: (1) Las células fueron fijadas en una solución amortiguadora de glutaraldehído al 3%, durante 60 minutos; (2) Las muestras fueron centrifugadas 8000 rpm por 5 minutos; (3) Se realizó un lavado de 24 horas con buffer de cacodilatos 0.2M; (4) Las células fueron centrifugadas nuevamente y se agregó tetróxido de osmio al 2% por dos horas; (5) Se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con buffer de cacodilatos y se almacenaron a 4 °C en buffer de cacodilatos. Antes de llevarlas a observación en el microscopio de barrido, las muestras fueron deshidratadas en un tren de deshidratación con concentraciones crecientes de etanol por duplicado (10 %, 30%, 50%, 70%, 96%, etanol absoluto), dejando 15 minutos en cada contenedor.

Posteriormente las muestras fueron sometidas a un tratamiento de secado por punto crítico (CPD2, Pelco International Redding) que consistió en un recambio de solventes dentro del equipo, el etanol fue reemplazado por CO<sub>2</sub> líquido, en varios ciclos, una vez realizado el recambio, la muestra fue secada por presión y temperatura críticas para evaporación total del CO<sub>2</sub>. Las muestras una vez secas, se retiraron del aparato de secado e inmediatamente fueron recubiertas con oro utilizando el recubridor por pulverización catódica (EMS 550 (Electron Microscopy Sciences). Finalmente las muestras fueron analizadas con ayuda del microscopio de barrido MEB JSM-6060LV (JEOL) utilizando electrones secundarios con 20 kV de voltaje de aceleración, y bajo vacío.

En resumen, el procedimiento se describe en la Tabla 6-1.



**Tabla 6-1.** Esquema de preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido.

<b>Actividad</b>	<b>Reactivo</b>	<b>Tiempo involucrado</b>
Fijación primaria	Glutaraldehído al 3% en amortiguador de cacodilatos	1 h
Lavado	Amortiguador de cacodilatos (3 cambios a 4° C, uno toda la noche)	1 – 12 h
Fijación secundaria	Tetróxido de osmio al 1%	1 – 2 h
Deshidratación	Etanol al 10%	1 h
	30%	1 h
	50%	1 h
	70%	12 h
	96% (2 cambios)	1 h c/u
	Etanol absoluto (2 cambios)	1 h c/u
Secado de punto crítico	CO <sub>2</sub> líquido / CO <sub>2</sub> gas	2 h
Recubrimiento conductor	Oro	5 min

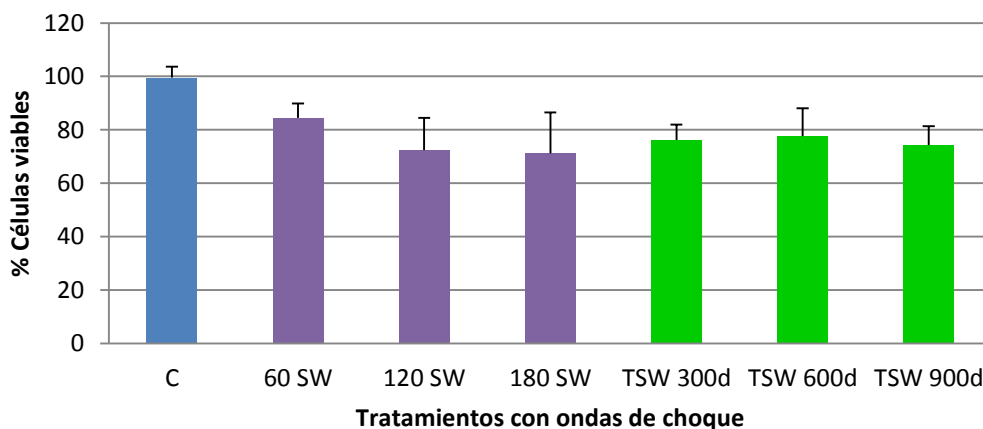
## 7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Células HEK293

#### 7.1.1 Viabilidad celular

Al llevar a cabo experimentos de transfección por un método físico, como las ondas de choque, es importante monitorear la supervivencia para cada tipo de célula y cada generador, ya que los resultados pueden diferir con otros equipos y líneas celulares.

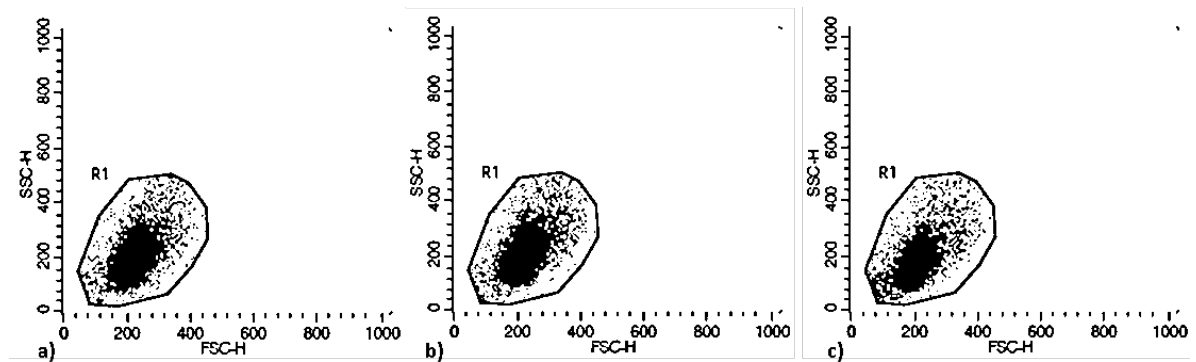
En la Gráfica 7-1 se presenta el porcentaje de células vivas tras ser sometidas a tratamientos con distinto número de ondas de choque mono-pulso (SW) y 60 ondas de choque tándem (TSW), en donde se variaron los tiempos de retardo (d) entre las duplas de ondas. De manera comparativa se muestra el porcentaje de las células control las cuales no fueron expuestas a ondas de choque. En el caso de los tratamientos mono-pulso, la curva sobre la supervivencia celular obtenida coincide con la información reportada con anterioridad [48]. También se observa una curva decreciente al aumentar el número de SW mientras que para las 60 TSW no se perciben cambios significativos al variar los retardos.



**Gráfica 7-1.** Viabilidad de células HEK293 expuestas a ondas de choque en el generador *Piezolith 2501*. En azul: células control. En morado: tratamientos mono-pulso (60, 120 y 180 SW). En verde: tratamientos tándem (60 TSW) con tres retardos (d): 300, 600 y 900  $\mu$ s.

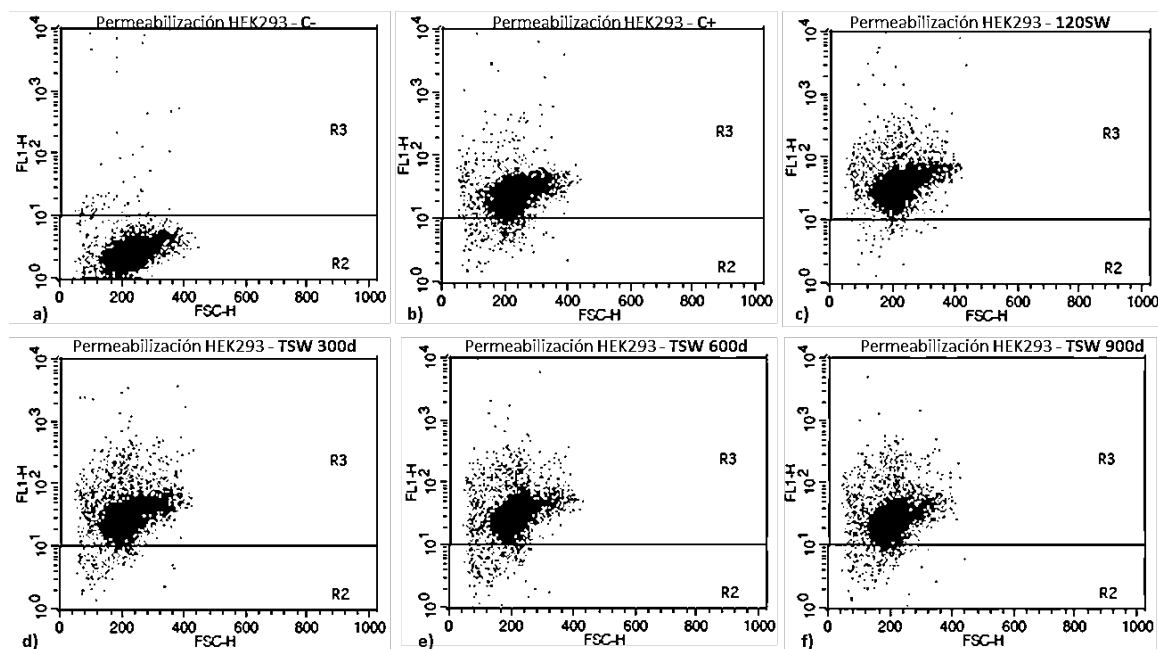
### 7.1.2 Permeabilización

Una vez obtenidos los datos de viabilidad celular y con el fin de evaluar la efectividad de los tratamientos en la permeabilización, se agregó FD-10 a la suspensión celular de manera previa a la aplicación de ondas de choque. Usando la citometría de flujo, se pudo determinar el tamaño relativo de las células usando los parámetros FSC y SSC. En la Figura 7-1, se presentan diagramas representativos de los grupos control y células expuestas a ondas de choque, en donde cada punto corresponde a uno de 10,000 eventos (células) analizados. En la región R1 de la Figura 7-1a, correspondiente a células sin tratamiento, se encuentra una población de tamaño y complejidad uniforme. Dentro de esta región se muestra una ligera variación en la distribución en ambos ejes a lo largo de los tratamientos, Figura 7-1b y c, por lo que se puede pensar que las células sufren cambios en su ultraestructura.



**Figura 7-1.** Análisis por citometría de flujo de permeabilización de células HEK293. Gráficas de tamaño celular vs granularidad (complejidad) de 10,000 eventos para: a) células control b) 120 SW y c) 60 TSW 600  $\mu$ s d.

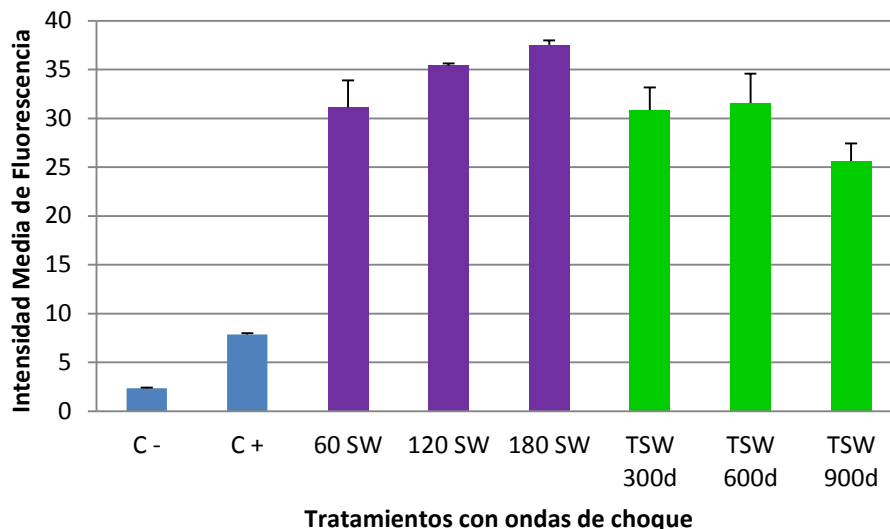
En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** Figura 7-2 los diagramas muestran la medición de la dispersión de luz hacia el frente (eje de las abscisas) y de la fluorescencia verde (eje de las ordenadas). Los valores obtenidos con células control (Figura 7-2a) permiten delimitar el valor de corte para determinar la región correspondiente a la auto-fluorescencia de las células (región R2) y aquella con fluorescencia proveniente del fluorocromo FD-10 capturado durante la experimentación (región R3).



**Figura 7-2.** Análisis por citometría de flujo de permeabilización de células HEK293. Gráficas de tamaño celular vs fluorescencia de 10,000 eventos para: a) C- b) C+ con tratamientos: c) 120 SW y 60 TSW con d) 300 e) 600 f) 900  $\mu$ s de retardo.

Como era esperado, las células expuestas al FD-10 pero sin exposición a ondas de choque (Figura 7-2b) muestran desplazamiento hacia la región con fluorescencia adquirida R1, ya que el FD-10 se adhiere a la superficie de las células [48]. Sin embargo, las muestras que recibieron tratamientos con ondas de choque presentan un desplazamiento claramente superior en el eje de fluorescencia (FL1-H) (Figura 7-2c-f), indicando que el tratamiento por ondas de choque promueve una mayor captura del fluorocromo macromolecular que en las células no tratadas.

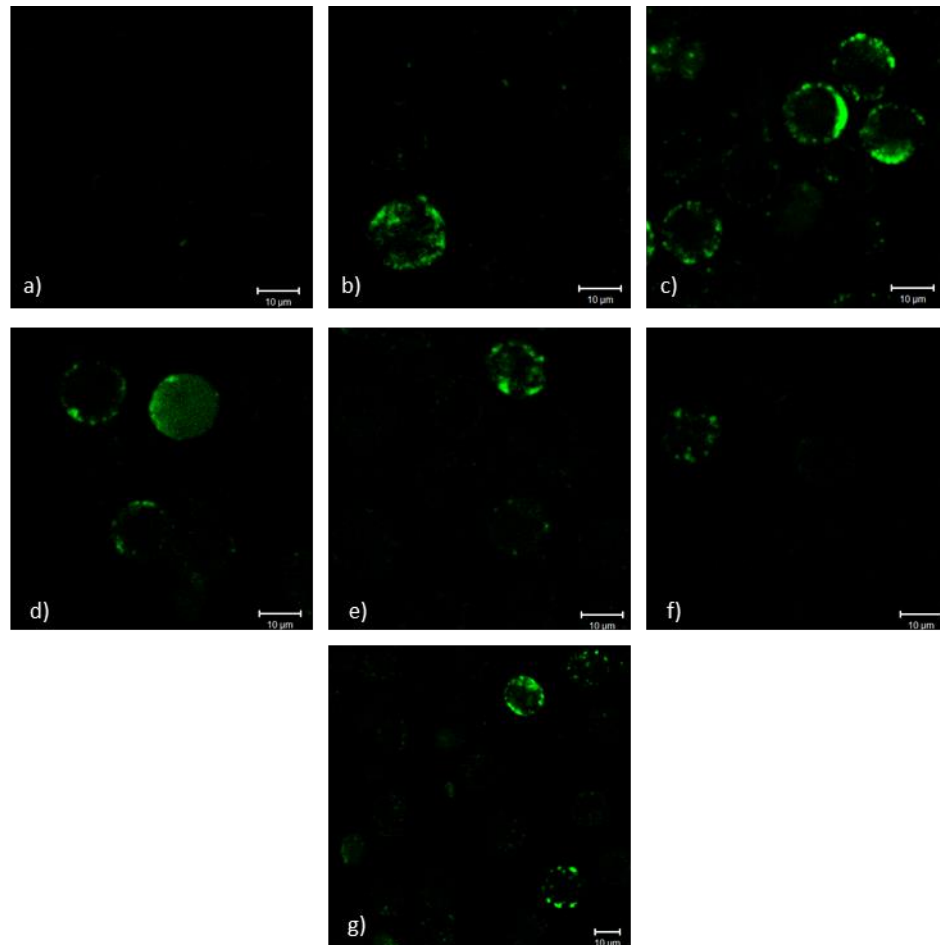
A partir de los datos generados por el citómetro de flujo se obtuvo la intensidad media de fluorescencia (IMF) de todos los eventos en cada tratamiento. En la Gráfica 7-2 se muestra la IMF para los distintos experimentos, en donde se observa un aumento proporcional de la IMF y el número de ondas de choque mono-pulso. En los tratamientos con ondas de choque tándem la IMF aumentó con respecto a las células no sometidas a ondas de choque, pero presenta un aumento con un mayor intervalo de tiempo entre la primera y segunda onda de choque.



**Gráfica 7-2.** Gráfica comparativa de las IMF en distintos tratamientos de permeabilización. En azul, células control C- y C+. En morado, tratamientos 60, 120 y 180 SW. En verde, tratamientos tándem 60 TSW con retardos de 300, 600 y 900  $\mu$ s.

Si bien los datos de fluorescencia arrojados por la citometría de flujo indican que el fluorocromo es mayormente capturado cuando las células son expuestas a ondas de choque, la adherencia del fluorocromo a la superficie de las células impide obtener conclusiones claras sobre su internalización. Para explorar dicho fenómeno, recurrimos a análisis de microscopía confocal obteniendo información de la emisión en cortes transversales de las células.

En la Figura 7-3 se muestra la fluorescencia en la sección media de células HEK293 en suspensión. A pesar de que se encuentran en distintos planos, se procuró obtener imágenes en las que se apreciara la sección media de las células. Para el control positivo (Figura 7-3a), se observa una ligera adhesión del fluoróforo a la membrana celular, mientras que las muestras referentes a tratamientos con ondas de choque (Figura 7-3b-g) tienen fluorescencia en el citoplasma u organelos, cuando se muestra un corte en el plano interior.



**Figura 7-3.** Micrografías confocales en campo oscuro de células HEK293. a) C+. Con tratamientos: b) 60 c) 120 y d) 180 SW y 60 TSW con retardos: e) 300 f) 600 y g) 900  $\mu$ s.

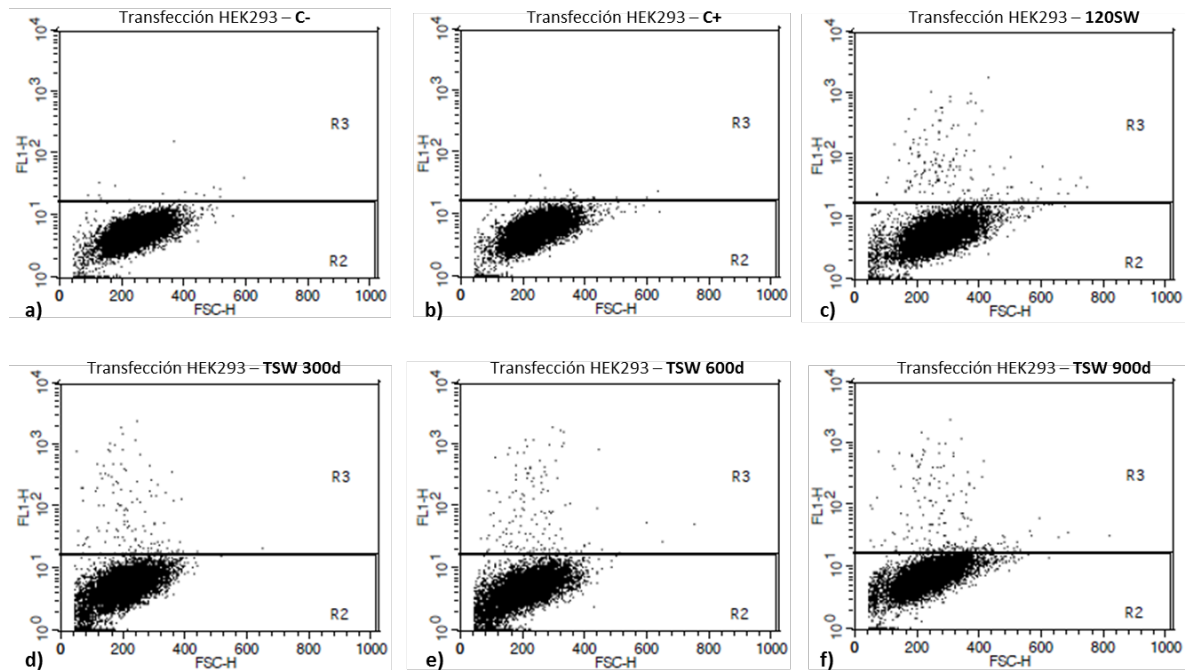
### 7.1.3 Transfección

Tras la confirmación de la capacidad de las ondas de choque para permeabilizar células HEK293, se utilizaron las mismas condiciones experimentales para tratamientos de transfección para la expresión de la proteína verde fluorescente. En la Figura 7-4 se muestra la expresión de fluorescencia verde en células control y con distintos tratamientos de ondas de choque. En la Figura 7-4a observamos nuevamente la fluorescencia basal de la población celular, delimitada en la región R2. Como se muestra en la en la Figura 7-4b, el tratamiento de células en contacto con el plásmido sin ondas de choque (C+), no muestra cambios de fluorescencia respecto al control negativo (C-). En el caso de las muestras con plásmido y sometidas a diferente número de ondas, se observa la presencia de muchos

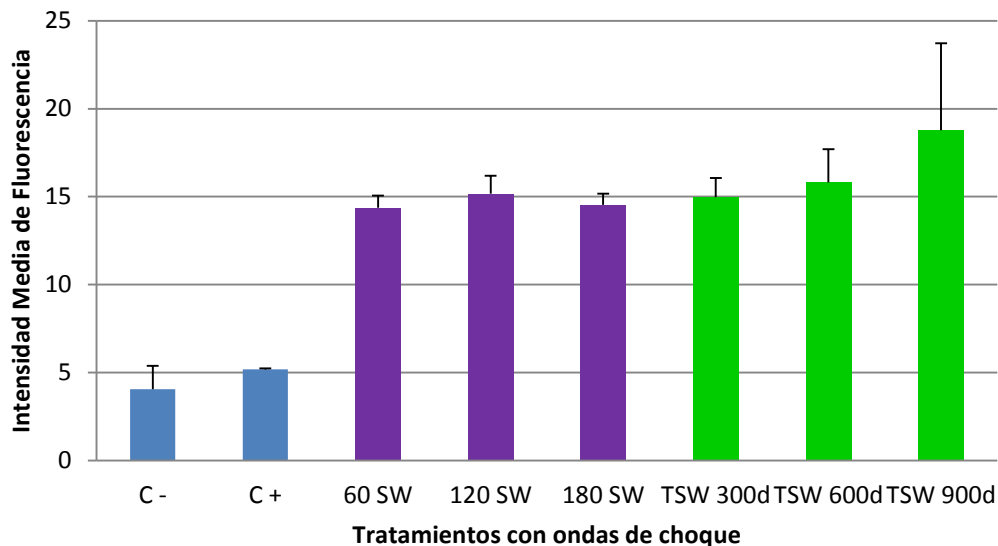
eventos que incrementan el nivel de fluorescencia. Este aumento es atribuido a la expresión de la proteína GFP, en diferentes órdenes de magnitud, lo que indica que la transfección de esas células fue exitosa.

Para analizar si existe una diferencia significativa entre los distintos tratamientos con ondas de choque mono-pulso y los tratamientos con ondas tándem, se analizaron el porcentaje de eventos en la región R3 y el índice de IMF en dicha región.

El promedio de las IMF obtenidas por citometría de flujo de los distintos tratamientos de transfección se muestra en la Gráfica 7-3. Aunque se puede confirmar que existe transfección, indicada indirectamente por los valores de la IMF, estos no varían mucho entre las distintas exposiciones a ondas de choque.



**Figura 7-4.** Análisis por citometría de flujo de transfección de células HEK293. Gráficas de tamaño celular vs fluorescencia de 10,000 eventos para: a) C-, b) C+, tratamientos con ondas de choque: c) 60 SW y 60 TSW con d) 300, e) 600 y f) 900 μs de retardo.

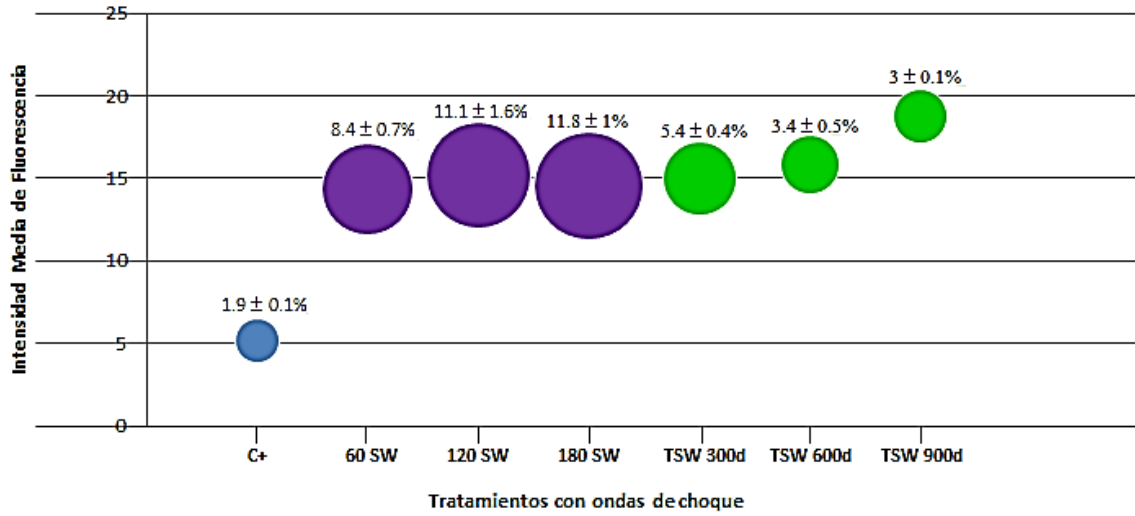


**Gráfica 7-3.** Gráfica comparativa de las intensidades medias de fluorescencia en distintos tratamientos. En azul, células control C- y C+. En morado, tratamientos 60, 120 y 180 SW. En verde, tratamientos tándem 60 TSW con retardos de 300, 600 y 900  $\mu$ s.

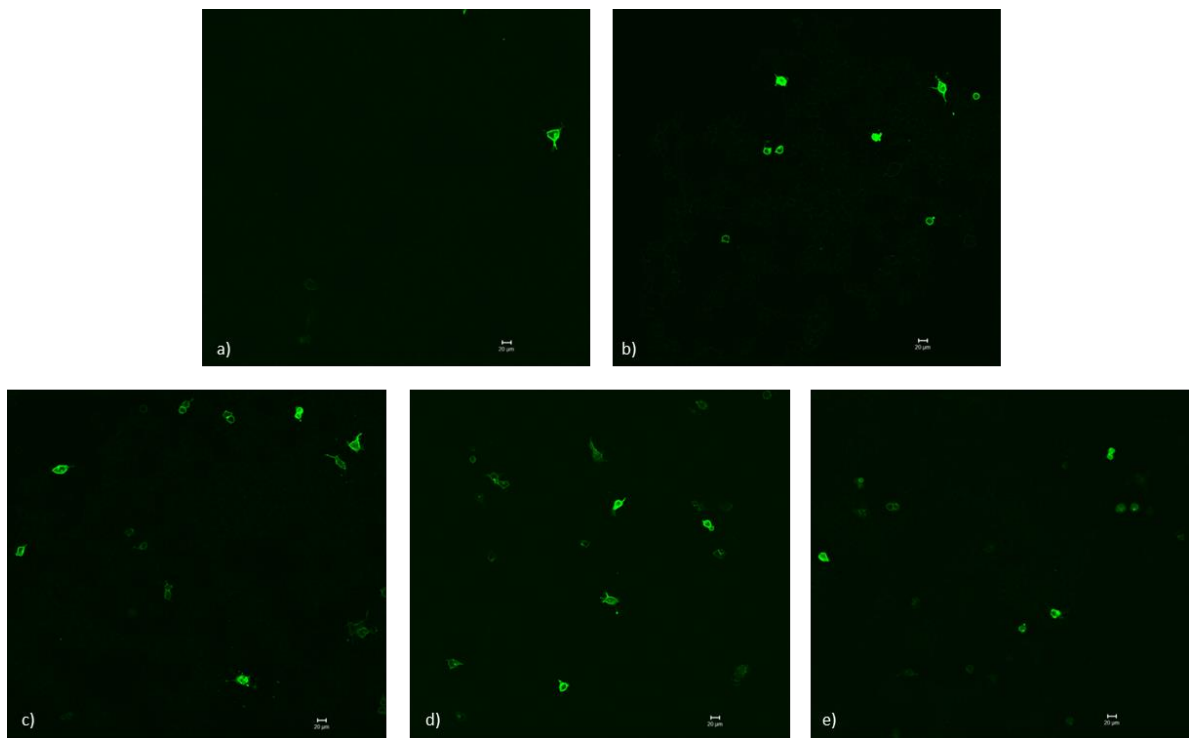
En la Gráfica 7-4 se puede observar una comparación entre el porcentaje de células transfectadas, correspondiente al tamaño del círculo de cada tratamiento e indicado en cada uno; y la intensidad media fluorescencia en el eje Y. De esta forma, es fácil observar que la mayor cantidad de células transfectadas está alrededor del 12% para los tratamientos de 120 y 180 SW y decrece para el caso de los tratamientos tándem. A pesar de que la IMF muestra un mayor valor en estos últimos, la población que expresa la proteína *gfp* tras 24 h de incubación, es menor que para los tratamientos en mono-pulso.

Finalmente, la expresión de la proteína GFP en las células transfectadas por ondas de choque fue analizada mediante microscopía de epifluorescencia. Como puede observarse en la Figura 7-5, las células control, que sólo estuvieron en contacto con el plásmido sin recibir pulsos de ondas de choque, muestran fluorescencia de manera esporádica. En contraste, las células tratadas con ondas de choque en contacto con el plásmido muestran múltiples casos de expresión de fluorescencia.





**Gráfica 7-4.** Gráfica comparativa de los porcentajes de células transfectadas y la IMF. En azul, células control positivo. En morado, tratamientos 60, 120 y 180 SW. En verde, tratamientos tándem 60 TSW con retardos de 300, 600 y 900  $\mu$ s.



**Figura 7-5.** Micrografías de epifluorescencia en campo oscuro de células HEK293 en suspensión. a) C+. Con tratamientos: b) 120 SW y 60 TSW con retardos: c) 300 d) 600 y e) 900  $\mu$ s.

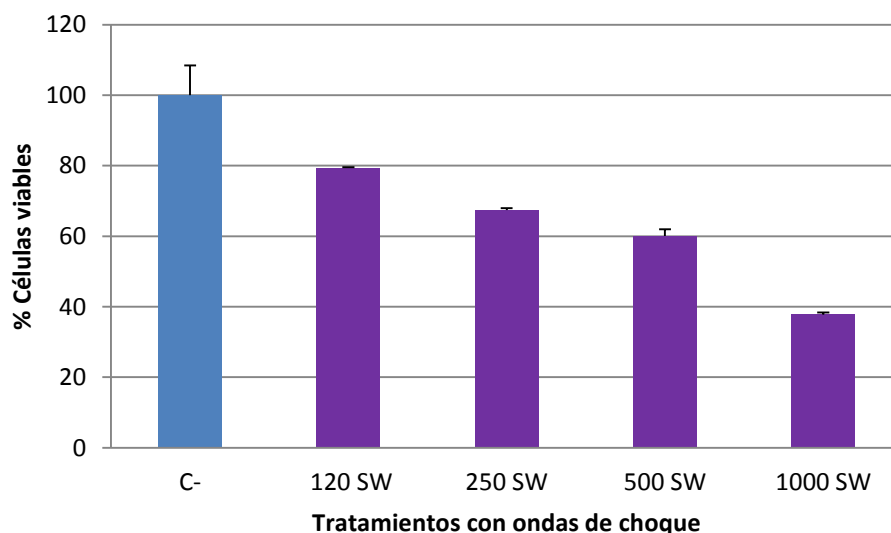
Las ondas de choque han resultado ser un método eficaz para transfección ya que, comparado con estudios por ultrasonido, en este tipo de tratamientos no se requieren condiciones especiales como la adición de micro-burbujas para incrementar la cavitación acústica. Por ejemplo, Yoon *et al* [51] reportan una expresión nula del plásmido p $\beta$ -VEGF en ausencia de micro-burbujas (Sonovue<sup>®</sup>, radio 1-10  $\mu$ m) en el momento del tratamiento y, sin embargo, observaron una mayor expresión del plásmido al aumentar la concentración de micro-burbujas sin que se presentara una diferencia significativa al cambiar la intensidad del ultrasonido y con una viabilidad mayor al 80% incluso a la presión más alta ( $4 \frac{W}{cm^2}$ ). Ante los resultados obtenidos con un excelente porcentaje de transfección celular mediada por ondas de choque en donde se incorpora un plásmido desnudo se puede decir que este método físico es una alternativa viable para llevar a cabo experimentos *in vivo*.

## 7.2 Células MCF-7

### 7.2.1 Viabilidad celular

Para el caso de las células MCF-7, también se realizó una curva de supervivencia. Curiosamente, al evaluar los mismos parámetros utilizados para las células HEK293, la pérdida de viabilidad fue casi nula para tratamientos aplicados con 3 kV. Por consiguiente, se procedió a incrementar tanto la intensidad de voltaje como la cantidad de ondas de choque (SW). Es relevante considerar el distinto grado de sensibilidad que presenta cada estirpe o línea celular al llevar a cabo los tratamientos con ondas de choque, pues como en este caso, hay una gran diferencia en la susceptibilidad entre las células de carcinoma mamario y las HEK293.

En la Gráfica 7-5 se ilustra la viabilidad celular con tratamientos a 4 kV con 120, 250, 500 y 1000 SW, sobre células MCF-7, apreciándose una curva en la que el porcentaje de células viables contadas decrece al aumentar el número de ondas de choque. Como control comparativo se tienen células también en suspensión que no han sido expuestas a ningún tratamiento.

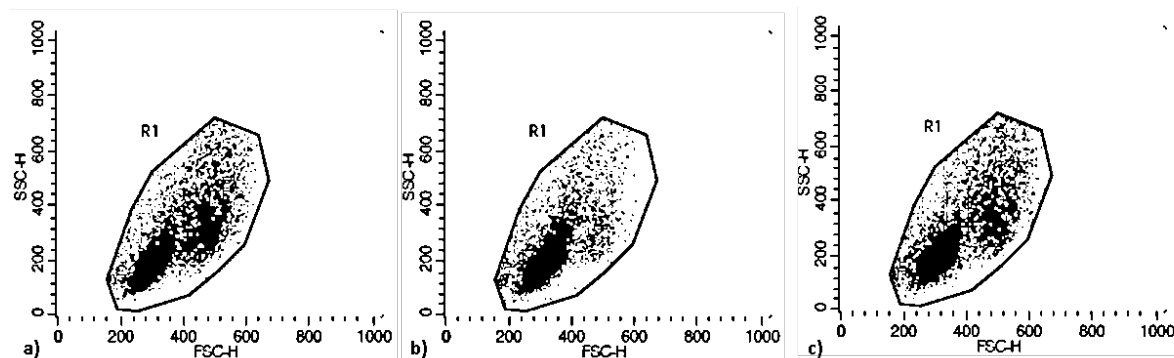


**Gráfica 7-5.** Viabilidad de células MCF-7 posterior a tratamientos SW de intensidad 4 kV. En azul: células control. En morado: tratamientos 120, 250, 500 y 1000 SW.

### 7.2.2 Permeabilización

Después de obtener la información sobre viabilidad celular, se procedió a evaluar la efectividad de los tratamientos para permeabilizar las células MCF-7 usando como marcador el fluorocromo FD-10.

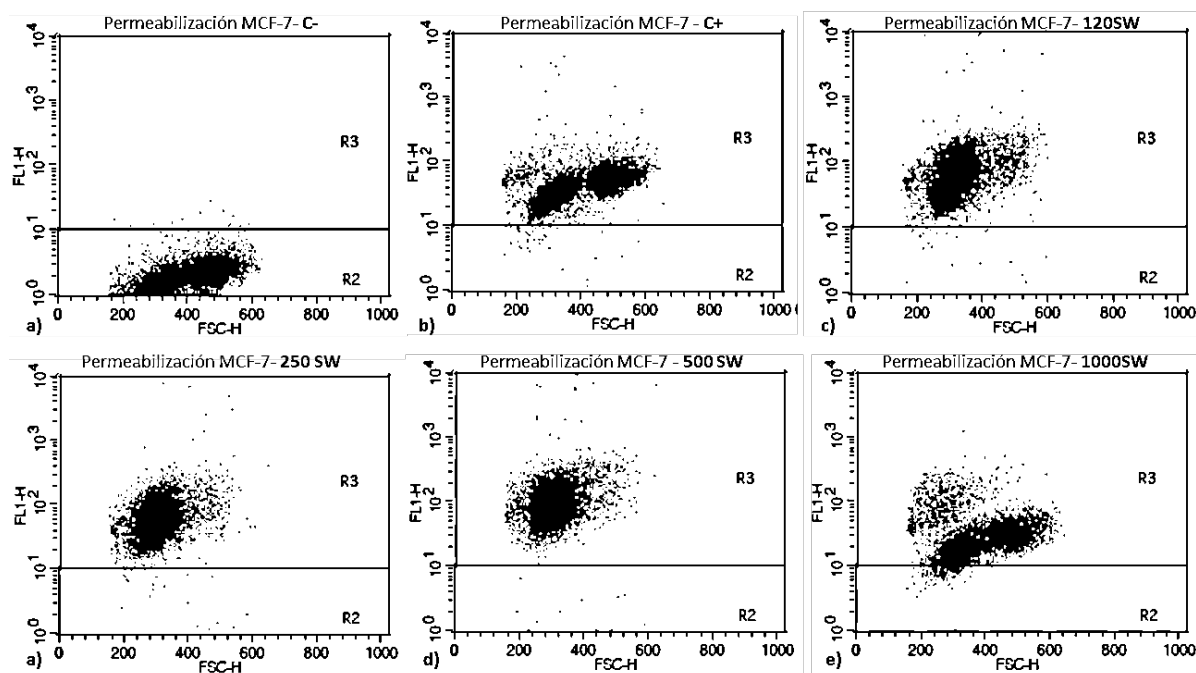
Al analizar las muestras por citometría de flujo se determinó el tamaño relativo de las células. En la Figura 7-6, se presentan diagramas de la medición de la dispersión de luz hacia el frente (eje de las abscisas) y de la granularidad (eje de las ordenadas) donde cada punto equivale a un evento (célula) tanto de los grupos control como de las células expuestas a ondas de choque. Para el caso de las células control (Figura 7-6a), en la región R1 se observan dos poblaciones que varían ligeramente en tamaño y complejidad; esta separación de poblaciones se ve afectada tras la exposición a ondas de choque como se observa en las Figura 7-6b y c lo cual es interesante analizar a nivel ultraestructural.



**Figura 7-6.** Análisis por citometría de flujo de permeabilización de células MCF-7. Gráficas de tamaño celular vs granularidad (complejidad) de 10,000 eventos para: a) células control b) 2500 SW y c) 1000 SW.

También, se obtuvieron las gráficas de tamaño celular (FSC-H) contra fluorescencia verde (FL1-H) que se muestran en la Figura 7-7. Se observa el valor de corte delimitado a partir de los valores obtenidos con células de control negativo (región R2). El control positivo (C+) está definido por células que no han sido expuestas a ondas de choque pero que sí entraron en contacto con el fluorocromo. En esta muestra, se percibe un desplazamiento de la población celular hacia la región con fluorescencia adquirida R1 (Figura 7-7b) presumiblemente por la adhesión del FD-10 a la superficie celular.

Por otro lado, las muestras que fueron expuestas a ondas de choque presentan un mayor desplazamiento en el eje de las ordenadas (Figura 7-7c-f) lo que indica que la captura del fluorocromo se promovió debido a los tratamientos. Además, destaca el cambio de tamaño que muestran las células, pues mientras que en los controles se observan dos poblaciones, en los análisis post-tratamientos sólo se ve una población, exceptuando en el ensayo con 1000 SW en el que se vuelven a apreciar ambas. Se puede pensar que las células sufren alteraciones físicas tras su exposición a las ondas de choque.

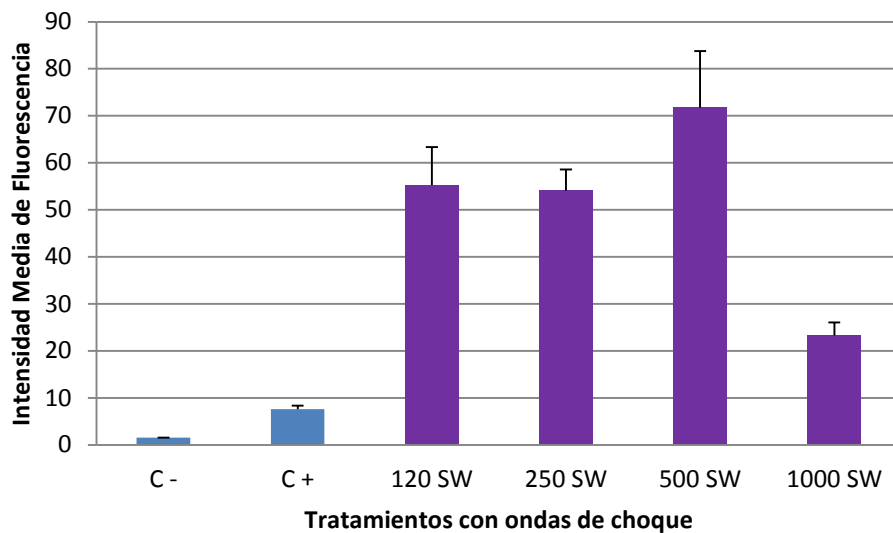


**Figura 7-7.** Análisis por citometría de flujo de permeabilización de células MCF-7. Gráficas de tamaño celular vs fluorescencia de 10,000 eventos para: a) C-, b) C+ y tratamientos c) 120 d) 250 e) 500 y f) 1000 SW.

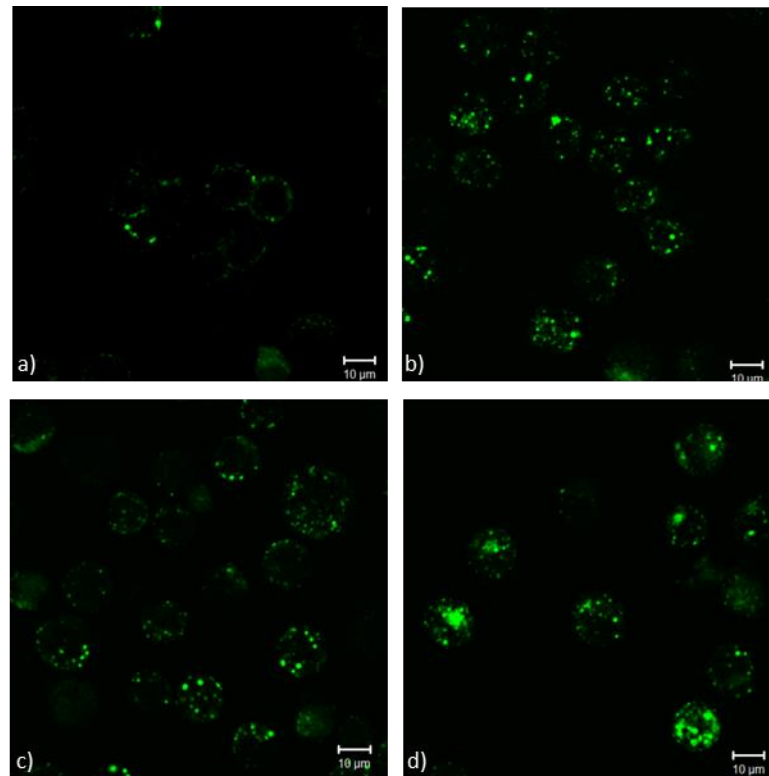
En la Gráfica 7-6 se muestra la intensidad media de fluorescencia (IMF), de todos los eventos en cada tratamiento, obtenida a partir de los datos generados por el citómetro de flujo. Se observa que, entre los tratamientos con 120, 250 y 500 SW la intensidad media de fluorescencia es mayor a la de los controles por lo que, aunque no existe una tendencia clara que indique mayor eficiencia, hay un indicio de que el fluorocromo se encuentra mayormente adherido a la superficie celular tras los tratamientos con ondas de choque. Al hacer una comparación con las gráficas de viabilidad podría considerarse que los tratamientos de 120 y 250 SW son ideales para la continuación de experimentos. Hacia las

1000 SW el nivel de la IMF es incluso más bajo que el de los controles, esto puede deberse a la baja supervivencia de células durante la exposición a ondas de choque.

A través de un análisis por microscopía confocal se obtuvo la Figura 7-8, en donde se observa el fluorocromo FD-10 en la sección media de las células después de haber sido sometidas a ondas de choque. En el caso de las células de control positivo se aprecia adhesión a la membrana celular. Es importante destacar que la intensidad media de fluorescencia (IMF), aunque al principio parece aumentar de acuerdo al creciente número de ondas de choque aplicadas, llega a un punto de saturación a las 500 ondas de choque y después decrece.



**Gráfica 7-6.** Gráfica comparativa de las intensidades medias de fluorescencia en distintos tratamientos. En azul, células control sin contacto con FD-10S (C-) y en contacto con FD-10S (C+). En morado, tratamientos mono-pulso 120, 250, 500 y 1000 SW.



**Figura 7-8.** Micrografías confocales en campo oscuro de células MCF-7 en suspensión permeabilizadas. a) C+, con tratamientos: b) 125 c) 250 y d) 500 SW.

La permeabilización de esta línea celular debido a la sonoporación se ha reportado usando ultrasonido en presencia de micro-burbujas encapsuladas, en donde se menciona un efecto de reparación celular tras la generación de pequeños poros en la membrana [52]. También se menciona la importancia de la presencia de burbujas para que la permeabilización transitoria fuese posible, así como la selección de la amplitud de presión acústica adecuada para que exista inserción del fluido extracelular sin ser demasiada como para impedir la recuperación de las células. Además se observa, como en nuestros resultados, que la IMF inicialmente crece conforme aumenta la presión hasta llegar a un máximo (0.25 MP) tras la cual disminuye. A diferencia del ultrasonido, al utilizar ondas de choque no es necesario adicionar micro-burbujas, pues un solo impulso aporta energía suficiente como para provocar cavitación en las burbujas del medio en que se encuentran las células, esto hace que la experimentación *in vitro* sea más eficiente y menos complicado para llevar a pruebas *in vivo*.

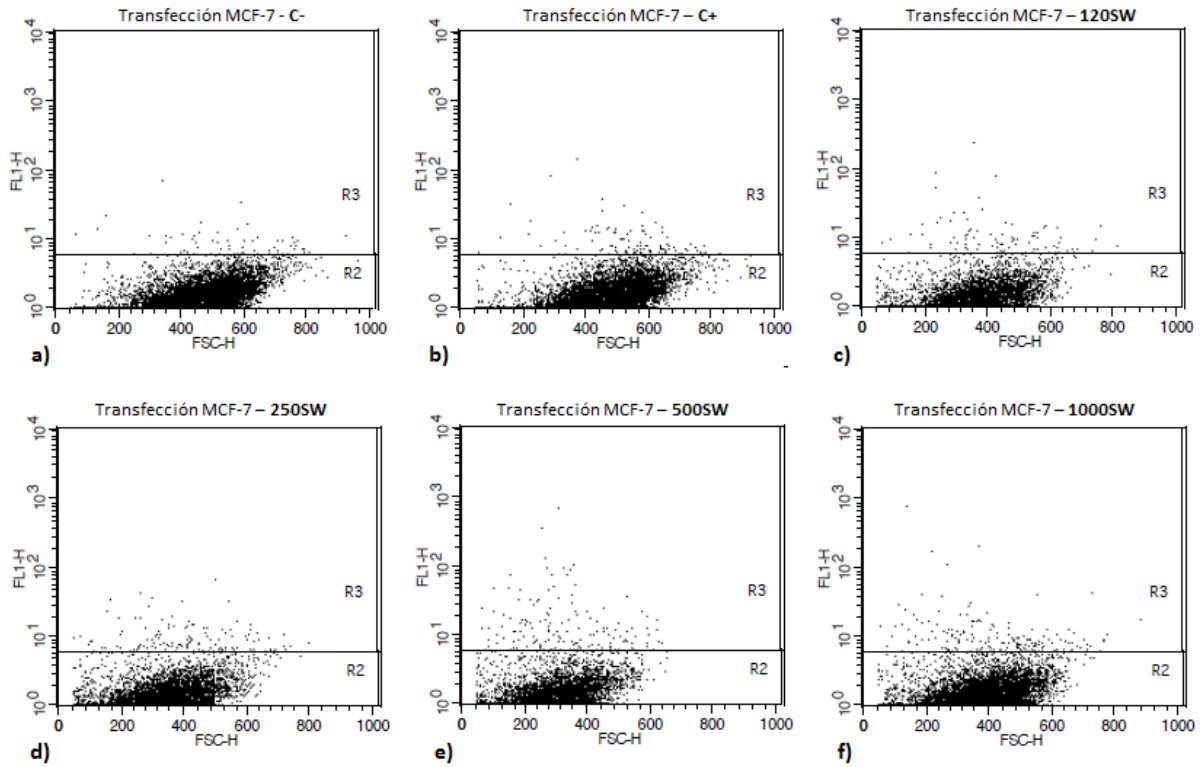
### 7.2.3 Transfección

Una vez que se comprobó la permeabilización de la línea celular MCF-7 propiciada por la exposición a ondas de choque, se tomaron los mismos parámetros para evaluar la expresión de la proteína GFP en los tratamientos de transfección. En la Figura 7-9 se muestran los datos obtenidos por citometría de flujo, se observa la contribución de la fluorescencia verde debida a la inserción del plásmido *pCX::GFP-GPI2* en el interior celular. Primero, se establece la región R2 dada por la fluorescencia basal en las células del C-, luego se observa el desplazamiento de las demás muestras hacia la región R1. Se puede notar que para los distintos tratamientos con ondas de choque el desplazamiento es mayor que en los controles pero no llega a ser tan notorio como en el caso de la permeabilización.

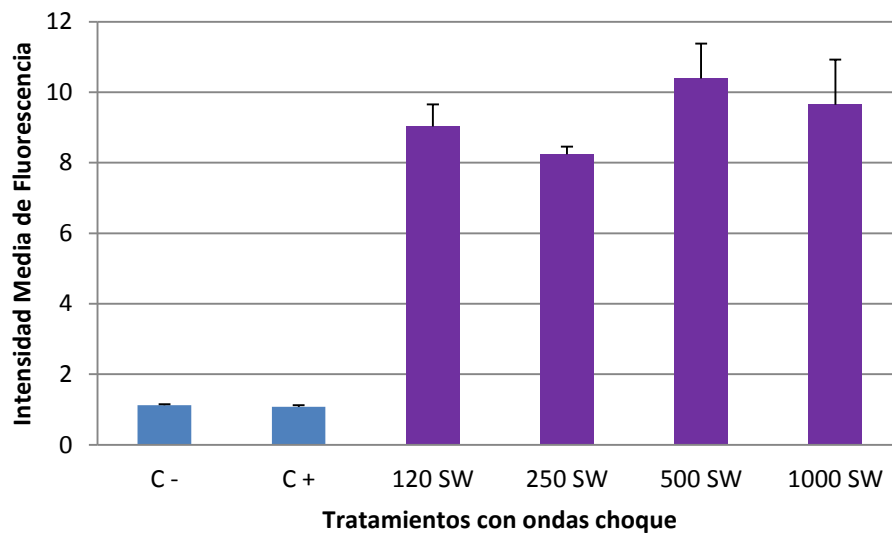
El promedio de las intensidades medias de fluorescencia derivado del análisis en el citómetro de flujo de la transfección de células MCF-7 se muestra en la Gráfica 7-7. Al observar este resultado es importante destacar que la transfección, medida indirectamente por la intensidad media de fluorescencia, es mayor en los parámetros en que la viabilidad decrece, por ejemplo, en la aplicación de 1000 SW obtenemos una IMF alrededor de 9 pero una supervivencia del 40% mientras que a las 120 SW la supervivencia es del 80% con una IMF similar.

En la Gráfica 7-8 se muestran datos comparativos entre los porcentajes de células que expresan el plásmido después de 48 h de haber sido sometidas a ondas de choque (indicados en cada círculo) y la intensidad media de fluorescencia. Se observa una curva en la que existe una mayor cantidad de células transfectadas proporcional al aumento de número de ondas de choque aplicadas llegando a un máximo de alrededor del 2% en el tratamiento con 1000 SW. Dentro de estos resultados, es muy importante considerar el porcentaje alcanzado de células MCF-7 transfectadas, pues éstas tienden a presentar una baja incorporación de material exógeno al interior celular. Sin embargo, es necesario considerar estos datos en conjunto con los obtenidos para la viabilidad celular; para obtener un efecto de transfección eficiente sin hacer daño excesivo a las células.

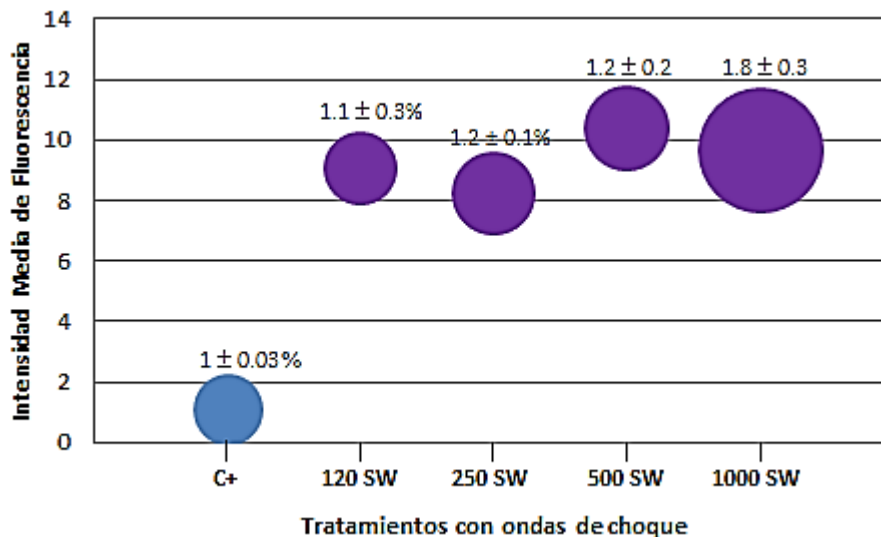




**Figura 7-9.** Análisis por citometría de flujo de transfección de células MCF-7. Gráficas de tamaño celular vs fluorescencia de 10,000 eventos para: a) C-, b) C+ y tratamientos: c) 120, d) 250, e) 500 y f) 1000 SW.



**Gráfica 7-7.** Gráfica comparativa de las intensidades medias de fluorescencia en distintos tratamientos. En azul, células control C- y C+. En morado, tratamientos mono-pulso 120, 250, 500 y 1000 SW.

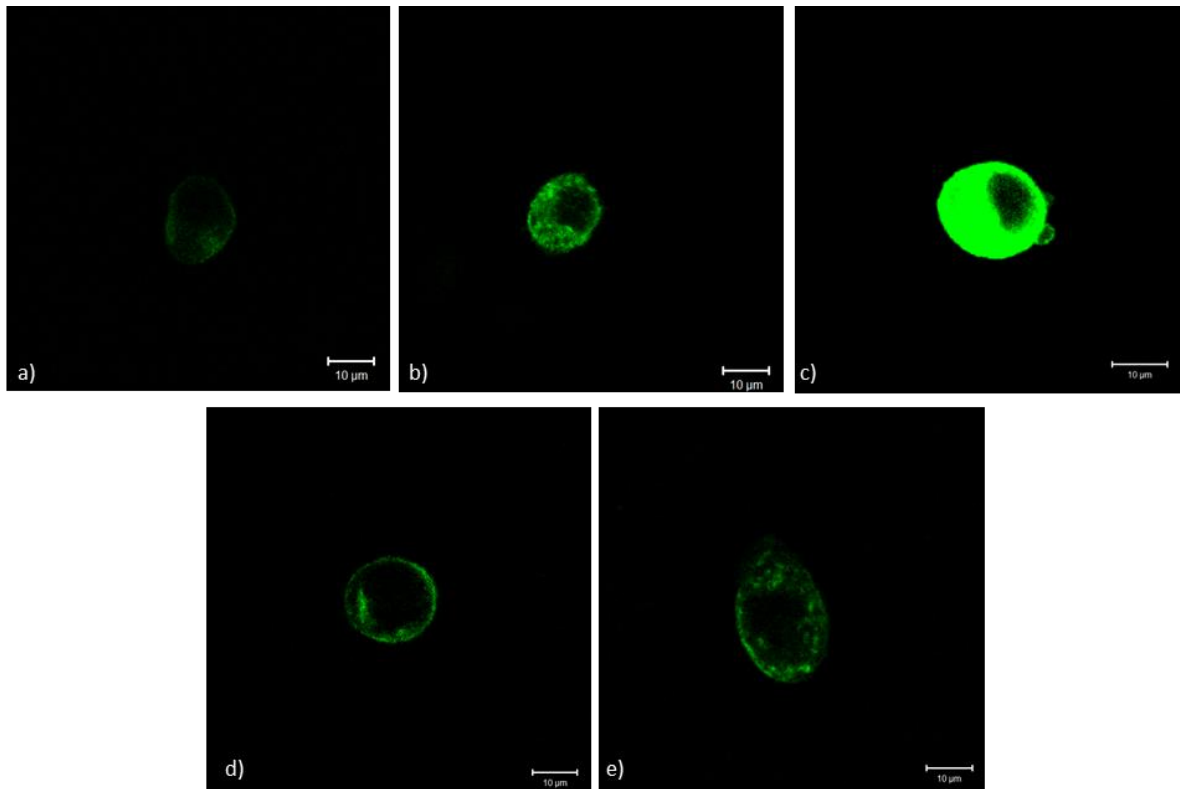


**Gráfica 7-8.** Gráfica comparativa de los porcentajes de células transfectadas. En azul, células control C- y C+. En morado, tratamientos 60, 120 y 180 SW. ±

Por medio de microscopía confocal se observó la expresión de la proteína verde fluorescente codificada en el plásmido *pCX::GFP-GPI2* internalizado en la célula (Figura 7-10). Las imágenes obtenidas del microscopio indican que todas las muestras tratadas parecen manifestar la asimilación del plásmido.

A diferencia de otros métodos físicos, las ondas de choque han demostrado condiciones transferibles a experimentos *in vivo* pues es un método no invasivo y presenta porcentajes óptimos tanto de células transfectadas como de internalización de plásmido desnudo. Para otros métodos, se ha reportado la transfección de células MCF-7 por medio de ultrasonido usando el plásmido pEGFP recubierto con complejos PEI:ADN (polietilenimina + ADN) suplementando el medio extracelular con el agente contrastante SonoVue<sup>®</sup> (microburbujas con radio (~1.5 – 2 μm) en donde se muestra la eficiencia de transfección y viabilidad celular como funciones del pico de presión acústica negativo. La eficiencia de transfección incrementa gradualmente al aumentar la presión hasta llegar a un pico máximo mientras que la viabilidad celular decrece al incrementar la presión [53]. Aunque el ultrasonido es bien conocido por su uso terapéutico, sus ondas de baja presión impiden causar cavitación

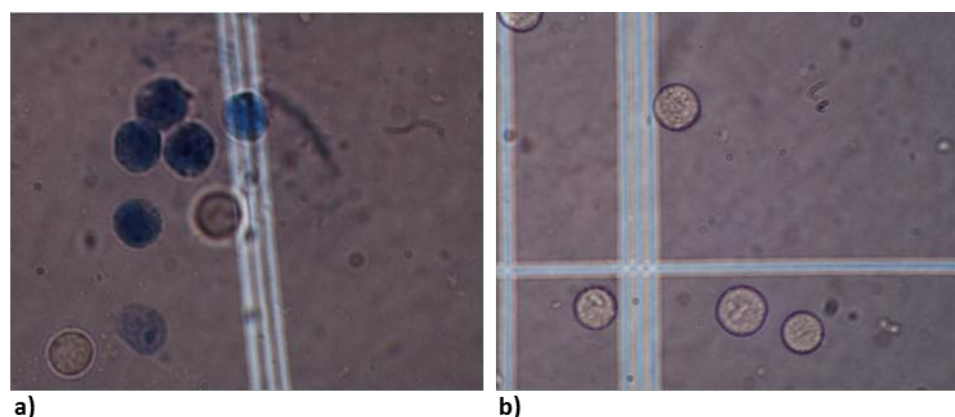
del modo en que lo hacen las ondas de choque por lo que es necesario añadir microburbujas sintéticas lo que puede complicar su uso al querer hacer tratamientos *in vitro*.



**Figura 7-10.** Micrografías de epifluorescencia en campo oscuro de células MCF-7 en suspensión transfectadas. a) C+, con tratamientos: b) 125, c) 250, d) 500 y e) 1000 SW.

### 7.3 Microscopía electrónica de barrido

Durante los conteos con cámara Neubauer en un microscopio de luz, se percibió daño celular, debido a los tratamientos con ondas de choque, indicado por el colorante azul de tripano que se agregó a las muestras para su observación (Figura 7-11). Al considerar de suma relevancia este fenómeno, en conjunto con los resultados de citometría de flujo en los que se observan cambios de tamaño y complejidad en las poblaciones celulares tras los tratamientos, se decidió analizar y comparar la ultraestructura de las células tratadas y las células control utilizando el microscopio electrónico de barrido (MEB).



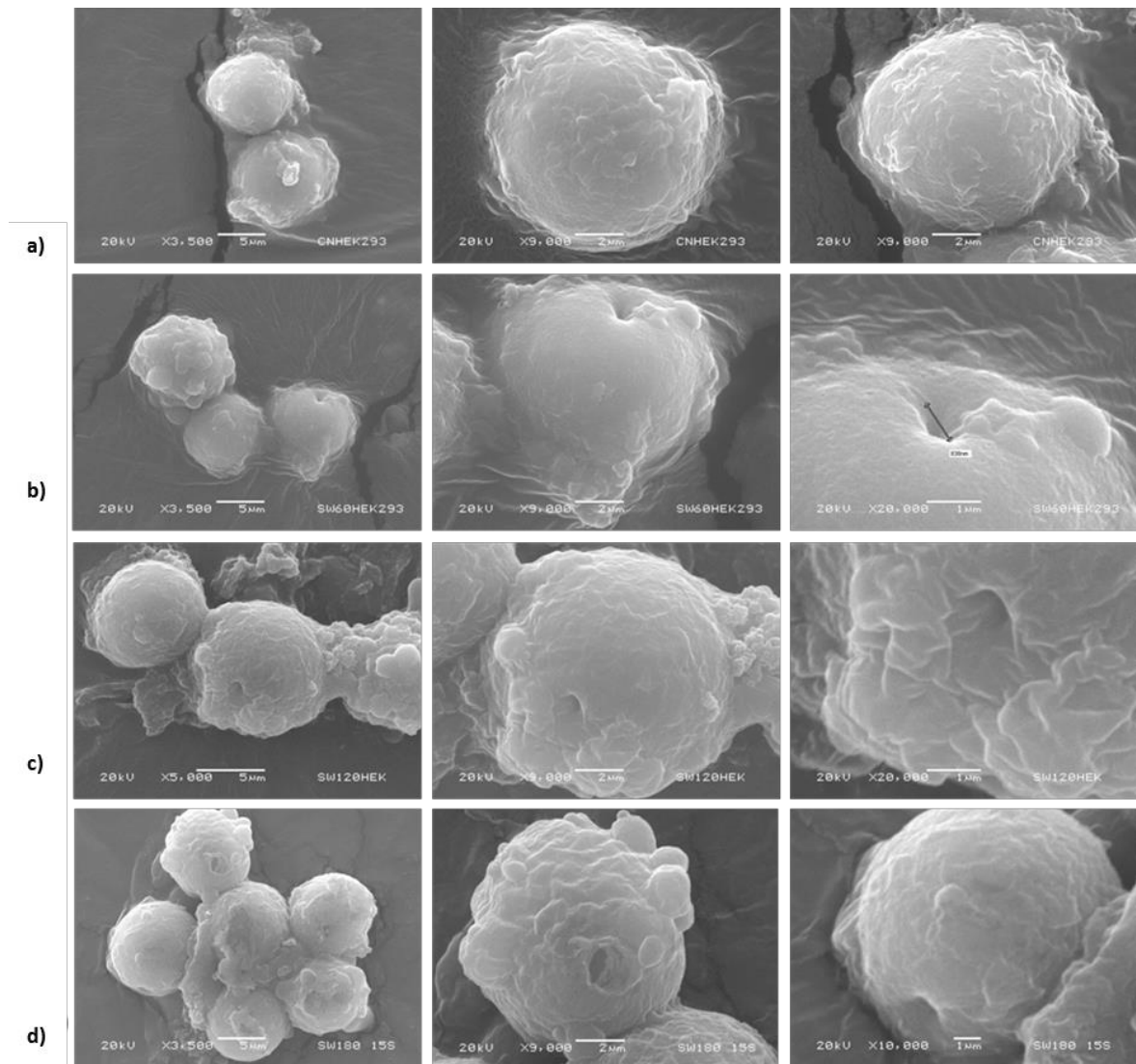
**Figura 7-11.** Fotografías tomadas en el microscopio de luz de: a) células muertas y b) células vivas.

En las imágenes obtenidas con el MEB, se pudo constatar un mecanismo importante generado por la cavitación acústica debido a las ondas de choque. Por un lado, las células control se ven intactas con forma esférica y su superficie sin alteraciones en las vellosidades (Figura 7-12a y Figura 7-13a) lo que indica que son células intactas que han estado en suspensión el mismo tiempo que las tratadas.

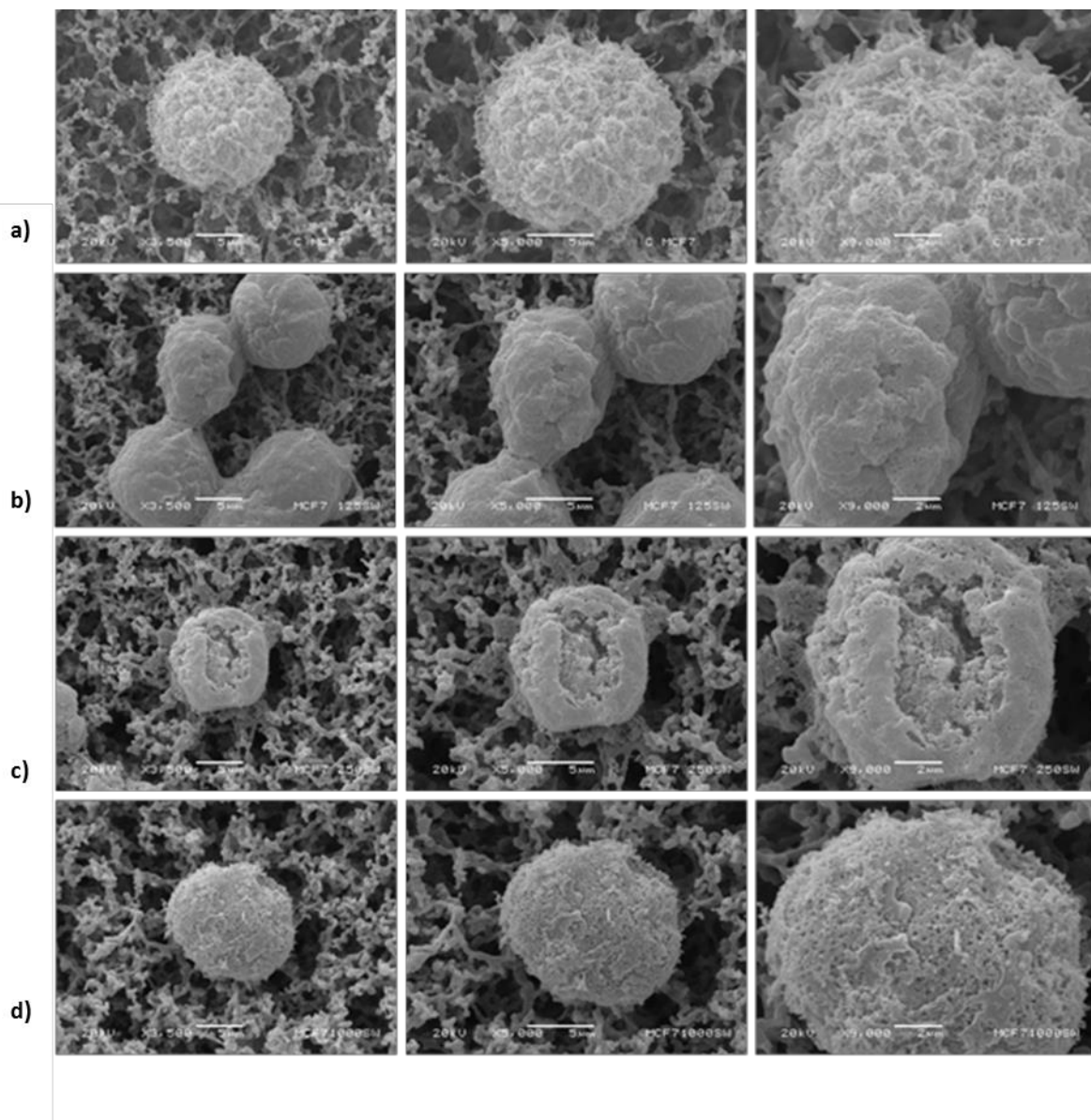
Sin embargo, para el caso de las células que han sido sometidas a ondas de choque la apreciación no es igual. En las Figura 7-12 y Figura 7-13 b-d se observa que las células han sufrido algunos cambios, por ejemplo, la superficie se percibe más rugosa y las vellosidades desaparecen y es de mucha importancia señalar la presencia de poros de entre 0.5 y 1  $\mu\text{m}$  en las membranas celulares lo cual confirma la hipótesis sobre el cambio de tamaño observado en citometría de flujo.

Al parecer no hay una relación entre la cantidad de ondas de choque aplicadas y el tamaño de poro, no obstante, se distinguen regiones más granulosas que evidencian el daño celular que aumenta proporcionalmente al número de ondas de choque. Es importante mencionar que estas aperturas celulares son transitorias, la fijación de las muestras que se presentan en las micrografías se hace durante los primeros diez segundos después de haber sido sometidas a ondas de choque. Al realizar la fijación después de un tiempo mayor, los poros no fueron visibles y conservaron su capacidad proliferativa por lo que se puede pensar que las células mantienen su ciclo vital. Teniendo en cuenta estos resultados, es posible relacionar la permeabilización o transfección debido a la generación de los pequeños poros por donde los fluorocromos podrían tener acceso al interior de la célula que más tarde procesará la información y al ser reconocida por la maquinaria celular se expresará.

Por medio de otro método físico de transfección, el ultrasonido, se han estudiado los poros generados *in vitro* por cavitación acústica en donde se reportan tamaños de poro de 1 nm hasta 4.31  $\mu\text{m}$  que incrementan al aumentar la presión y el tiempo de tratamiento [54, 55, 52, 53]. Se cree que la transfección mediada por ultrasonido también está relacionada con la sonoporación al generar poros transitorios en la membrana celular. Los análisis por microscopía electrónica de barrido permiten monitorear las condiciones de permeabilización de una célula al estudiar los poros generados en las células de manera eficiente sin necesidad de utilizar sistemas reporteros como los marcadores fluorescentes.



**Figura 7-12.** Micrografías de MEB de células HEK293. El fondo corresponde a la cinta de carbón, las células lucen colapsadas por falta de secado de punto crítico. Por líneas: a) Control. Con tratamientos mono-pulso: b) 60 c) 120 y d) 180 SW.



**Figura 7-13.** Micrografías de MEB de células MCF-7. El fondo corresponde a los polisacáridos del papel filtro en el que se hizo el secado de punto crítico y posteriormente el montaje. Por líneas: a) Control y tratamientos: b) 125, c) 250 y d) 1000 SW.

## 8 CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que las ondas de choque provocan poros transitorios de hasta 1  $\mu\text{m}$  de diámetro que promueven la permeabilidad de la membrana celular en las líneas HEK293 y MCF-7. Este efecto es una consecuencia de la aplicación de las ondas de choque en donde la cavitación, la amplitud del frente de presión, la cantidad de ondas de choque aplicadas y la viabilidad ante los tratamientos determinan la internalización de macromoléculas en las células.

En ambas líneas celulares el aumento en la cantidad de ondas de choque aplicadas es proporcional a la mortalidad, sin embargo, la susceptibilidad a tratamientos con ondas de choque varía enormemente entre distintas estirpes celulares. Para el caso de las MCF-7 fue necesario aumentar tanto el voltaje de generación de las ondas de choque, de 3 kV, con que las células HEK293 permean, a 4 kV, como la cantidad de pulsos administrados. Por otro lado, nuestros resultados muestran que si bien las condiciones de las ondas tándem aplicadas para permeabilizar requieren ser optimizadas, el aumento de cavitación acústica inducido por esta técnica no causa detrimento en la viabilidad celular.

En la búsqueda por la optimización de los tratamientos para cada línea celular, se generaron resultados favorables con altos porcentajes de transfección. Dada la eficiencia obtenida al utilizar un plásmido desnudo en combinación con la exposición a ondas de choque, se podría proponer la transferencia de estas condiciones a sistemas *in vivo*.

El hallazgo de los poros generados durante la aplicación de ondas de choque nos permite confirmar que la cavitación acústica es un mecanismo por el cual se presenta el efecto de permeabilización de la membrana celular. Por otro lado, nos lleva a pensar que la transitoriedad de los poros está dada por el mecanismo biológico de la célula que se recupera del daño físico y puede seguir su ciclo vital en cultivo celular, conservando y expresando la información codificada en el plásmido *pCX::GFP-GPI2* aún después de 24 h (HEK293) ó 72 h (MCF-7). Esta información es reveladora y muy importante para la continuidad en la investigación de este método como una alternativa para transfección.



## 9 REFERENCIAS

- [1] C. L. Ronchera-Oms y J. M. González-Valis, «Terapia Génica,» *Farmacia Hospitalaria*, pp. 919-927, 2004.
- [2] D. Scherman, «École nationale supérieure de chimie de Paris,» 09 Febrero 2014. [En línea]. <http://lcbmc.free.fr/vecto/principes.pdf>.
- [3] National Institute of Health, «Gene Therapy. National Institute of Health,» 20 Julio 2013. [En línea]. <http://www.stemcells.nih.gov>.
- [4] B. A. Pierce, «Análisis genético molecular y biotecnología,» de *Genética: Un enfoque conceptual*, Tercera ed., Madrid, Editorial Médica Panamericana, S.A., 2009, pp. 539-540.
- [5] A. F. Adler y K. W. Leong, «Emerging links between surface nanotechnology and endocytosis: impact on non-viral gene delivery,» *Nano Today*, vol. 5, n° 6, pp. 553-569, 2010.
- [6] Cork Cancer Research Centre, «Cork Cancer Research Centre,» Biosciences Institute, UCC, Cork | Mercy University Hospital, [En línea]. <http://www.ccrc.ie/index.php?page=gene-therapy#.VROa3fyG-So>. [Último acceso: Julio 2013].
- [7] A. J. Mellott, L. M. Forrest y M. S. Detamore, «Physical non-viral gene delivery methods for tissue engineering,» *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 41, n° 3, pp. 446-468, 2013.
- [8] A. M. Loske, *Shock Wave Physics for Urologists*, Querétaro: Universidad Nacional Autónoma de México, 2007.
- [9] N. E. Harvey y H. J. McMillen, «An experimental study of shock waves resulting from

- the impact of high velocity missiles on animal tissues,» *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 85, n° 3, pp. 321-328, 1947.
- [10] S. Shrivastava y Kailash, «Shock wave treatment in medicine,» *Journal of Biosciences*, vol. 30, n° 2, pp. 269-275, Marzo 2005.
- [11] FOCUS-IT, LLC., «FOCUS-IT,» 20 Julio 2013. [En línea]. <http://www.eswt.net>.
- [12] V. Laudone, T. Morgan, R. Huryk, W. Heston y W. Fair, «Cytotoxicity of high energy shock waves: methodological considerations,» *Journal of Urology*, n° 141, pp. 965-968, 1989.
- [13] R. Apfel, «Acoustic cavitation: A possible consequence of biomedical uses of ultrasound,» *The British Journal of Cancer. Supplement*, vol. 5, pp. 140-146, 1982.
- [14] F. Fernández, G. Fernández y A. M. Loske, «Treatment time reduction using tandem shockwaves for lithotripsy: an in vivo study,» *Journal of Endourology*, vol. 23, n° 8, pp. 1247-1253, 2009.
- [15] International Society for Medical Shockwave Treatment, «ISMST,» [En línea]. <http://www.ismst.com>. [Último acceso: 03 Marzo 2015].
- [16] F. Fernández, A. M. Loske, H. Zendejas-Martínez, E. Castaño-Tostado y M. Paredes-Serrano, «Desarrollo de un litotriptor extracorporeal más eficiente,» *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*, vol. XXVI, n° 1, pp. 7-15, 2005.
- [17] A. M. Loske, F. E. Prieto, F. Fernández y J. van Cauwelaert, «Tandem shock wave cavitation enhancement for extracorporeal lithotripsy,» *Physics in Medicine and Biology*, vol. 47, n° 22, p. 3945, 2002.
- [18] F. Fernández, A. M. Loske, J. van Cauwelaert y F. E. Prieto, «Electronic device to improve the efficiency of extracorporeal lithotripters,» *Journal of Applied Research Technology*, vol. 2, n° 2, pp. 170-178, 2004.

- [19] F. Graham, J. Smiley, W. Russell y R. Nairn, «Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5,» *Journal of General Virology*, vol. 36, nº 1, pp. 59-72, 1977.
- [20] X. Li, M. Uchida, O. H. Alpar y P. Mertens, «Biolistic transfection of human embryonic kidney (HEK)293 cells,» de *Biolistic DNA Delivery. Methods and Protocols*, vol. 940, S. Sudowe y A. B. Reske-Kunz, Edits., Humana Press, 2013, pp. 119-132.
- [21] H. Soule, J. Vázquez, A. Long, S. Albert y M. Brennan, «A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma,» *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 51, nº 5, pp. 1409-1416, 1973.
- [22] G. Kahl, *The Dictionary of Gene Technology*, Segunda ed., Germany: VCH Verlagsgesellschaft Mbh., 1995, pp. 896-897.
- [23] T.-T. Yang, L. Cheng y S. R. Kain, «Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein,» *Nucleic Acids Research*, vol. 24, nº 22, pp. 4592-4593, 1996.
- [24] J. M. Rhee, M. K. Pirity, C. S. Lackan, J. Z. Long, G. Kondoh, J. Takeda y K. Hadjantonakis, «In Vivo imaging and differential localization of lipid-modified GFP-variant fusions in embryonic stem cells and mice,» *Genesis*, vol. 44, nº 4, pp. 202-218, 2006.
- [25] M. d. M. Abad, J. Ciudad, J. J. Cruz, J. García, A. Gómez-Alonso, A. López, M. D. Tabernero, A. Orfao y J. I. Paz-Bouza, «Cuantificación de ADN en tumores sólidos,» de *Técnicas de fluorescencia en microscopía y citometría*, vol. 3, Universidad de Oviedo, 1995, pp. 229-238.
- [26] M. Rahman, «AbD Serotec,» 2013. [En línea]. <http://www.abdserotec.com/introduction-to-flow-cytometry.html>.

- [27] Nikon Microscopy, «Nikon MicroscopyU,» Noviembre 2013. [En línea]. <http://www.microscopyu.com/articles/confocal/pawley39steps.html>.
- [28] H. Hernández-Albañil y É. Espejo-Mora, «Microscopía Electrónica de Barrido,» de *Mecánica de fractura y análisis de falla*, vol. 8, Bogotá, Universidad Nacional de Colombia, 2002, pp. 238-240.
- [29] Blog de Física, «Blog de Física y Química 3° ESO,» Marzo 2014. [En línea]. [http://inmascgl.blogspot.mx/2012\\_02\\_01\\_archive.html](http://inmascgl.blogspot.mx/2012_02_01_archive.html).
- [30] M. Delius, «Medical Applications and bioeffects of extracorporeal shock waves,» *Shock Waves*, vol. 4, n° 2, pp. 55-72, 1994.
- [31] S. Gambihler, M. Delius y J. Ellwart, «Permeabilization of the plasma membrane of L1210 mouse leukemia cells using lithotripter shock waves,» *The Journal of Membrane Biology*, vol. 141, n° 3, pp. 267-275, 1994.
- [32] S. Gambihler, M. Delius y W. Brendel, «Biological effects of shock waves: cell disruption, viability and proliferation of L1210 cells exposed to shock waves in vitro,» *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 16, n° 6, pp. 587-594, 1990.
- [33] F. Brümmer, J. Brenner, T. Bräuner y D. F. Hülser, «Effect of shock waves on suspended and immobilized L1210 cells,» *Ultrasound in medicine & Biology*, vol. 15, n° 3, pp. 229-239, 1989.
- [34] I. Kaver, W. Koontz Jr, J. Wilson, J. Guic y M. Smith, «Effects of lithotripter-generated high energy shock waves of mammalian cells in vitro,» *The Journal of Urology*, vol. 147, n° 1, pp. 215-219, 1992.
- [35] T. Bräuner, F. Brümmer y H. F. Dieter, «Hystopathology of shock wave treated tumor cell suspensions and multicell tumor spheroids,» *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 15, n° 5, pp. 451-460, 1989.
- [36] S. Gambihler, M. Delius y J. Ellwart, «Transient increase in membrane permeability of

- L1210 cells upon exposure to lithotripter shock waves in vitro,» *Naturwissenschaften*, vol. 79, n° 7, pp. 328-329, 1992.
- [37] U. Lauer, S. Z. Bürgelt, K. Messmer, P. Hofschneider, M. Gregor y M. Delius, «Shock wave permeabilization as a new gene transfer method,» *Gene Therapy*, vol. 4, n° 7, pp. 710-715, 1997.
- [38] S. Bao, B. D. Thrall, R. A. Gies y D. L. Miller, «In vivo transfection of melanoma cells by lithotripter shock waves,» *Cancer Research*, vol. 58, n° 2, pp. 219-221, 1998.
- [39] U. M. Álvarez, A. Ramírez, F. Fernández, A. Méndez y A. M. Loske, «The influence of single-pulse and tandem shock waves on bacteria,» *Shock Waves*, vol. 17, n° 6, pp. 441-447, 2008.
- [40] A. M. Loske, J. Campos-Guillen, F. Fernández y E. Castaño-Tostado, «Enhanced shock wave-assisted transformation of *Escherichia coli*,» *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 37, n° 3, pp. 502-510, 2011.
- [41] A. M. Loske, F. Fernández, D. Magaña-Ortiz, N. Coconi-Linares, E. Ortiz-Vázquez y M. A. Gómez-Lim, «Tandem shock waves to enhance genetic transformation of *Aspergillus niger*,» *Ultrasonics*, vol. 54, n° 6, pp. 1656-1662, 2014.
- [42] P. Zhong, H. Lin, X. Xi, S. Zhu y E. S. Bhogte, «Shock wave-inertial microbubble interaction: Methodology, physical characterization, and bioeffect study,» *The Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 105, n° 3, 1999.
- [43] P. Thomas y T. G. Smart, «HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins,» *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, vol. 51, n° 3, pp. 187-200, 2005.
- [44] L. M. Albritton, «Efficient transfection of fibroblast and epithelial cells with SuperFect transfection reagent,» *QIAGEN News*, n° 2, pp. 4-7, 1997.
- [45] M. Uchida, X. Li, P. Mertens y O. Alpar, «Transfection by particle bombardment:

- Delivery of plasmid DNA into mammalian cells using gene gun,» *Biochim et Biophys Acta*, vol. 1790, n° 8, pp. 754-764, 2009.
- [46] H. Koch, «Biontex,» Agosto 2013. [En línea]. [http://www.biontex.com/con\\_4\\_6\\_4/cms/upload/pdf/MCF7.pdf](http://www.biontex.com/con_4_6_4/cms/upload/pdf/MCF7.pdf).
- [47] Roche, «Roche Diagnostics GmbH,» Agosto 2013. [En línea]. Available: [x-treme-roche.com](http://x-treme-roche.com).
- [48] G. S. Camacho, *Efectos biológicos implicados en la transfección mediada por ondas de choque*, Querétaro, Querétaro: Universidad Autónoma de Querétaro, 2013.
- [49] B. Millán-Chiu, G. S. Camacho, A. Varela-Echavarría, E. Tamariz, F. Fernández, L. M. López-Marín y A. M. Loske, «Shock waves and DNA-cationic lipid assemblies: A synergistic approach to express exogenous gene in human cells,» *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 40, n° 7, pp. 1599-1608, 2014.
- [50] A. M. Loske, F. Fernández, D. Magaña-Ortíz, N. Coconi-Linares, E. Ortiz-Vázquez y M. A. Gómez-Lim, «Tandem shock waves to enhance genetic transformation of *Aspergillus niger*,» *Ultrasonics*, vol. 54, n° 6, pp. 1656-1662, 2014.
- [51] C. S. Yoon, H. S. Jung, T. K. Kim, M. J. Kwon, M. K. Kim, M. Lee, K. S. Koh, B. D. Rhee y J. H. Park, «Comparison of the efficiency and toxicity of sonoporation with branched polyethylenimine-mediated gene tranfection in various cultured cell lines,» *Journal of Drug Targeting*, vol. 16, n° 10, pp. 773-779, 2008.
- [52] F. Yang, N. Gu, D. Chen, X. Xi, D. Zhang, Y. Li y J. Wu, «Experimental study on cell self-sealing during sonoporation,» *Journal of Controlled Release*, vol. 131, n° 3, pp. 205-210, 2008.
- [53] Y. Qiu, C. Zhang, J. Tu y D. Zhang, «Microbubble-induced sonoporation involved in ultrasound-mediated DNA transfection in vitro at low acoustic pressures,» *Journal of Biomechanics*, vol. 45, n° 8, pp. 1339-1345, 2012.

- [54] Y. Taniyama, K. Tachibana, K. Hiraoka, T. Namba, K. Yamasaki, N. Hasiya, M. Aoki, T. Ogihara, K. Yasufumi y R. Morishita, «Local delivery of plasmid DNA into rat carotid artery using ultrasound,» *Circulation*, vol. 105, pp. 1233-1239, 2002.
- [55] M. C. Deshpande y M. R. Prausnitz, «Synergistic effect of ultrasound and PEI on DNA transfection in vitro,» *Journal of Controlled Release*, vol. 118, nº 1, pp. 126-135, 2007.
- [56] ATCC, «ATCC: The Global Bioresource Center,» Julio 2013. [En línea]. Available: [http://www.atcc.org/en/Products/Cells\\_and\\_Microorganisms/Cell\\_Lines.aspx](http://www.atcc.org/en/Products/Cells_and_Microorganisms/Cell_Lines.aspx).
- [57] G. Haupt, «Use of extracorporeal shock waves in the treatment of pseudarthrosis, tendopathy and other orthopedic diseases,» *The Journal of Urology*, vol. 158, nº 1, pp. 4-11, 1997.
- [58] K. Masanori, I. Naomasa, S. Takashi, K. Mariko, I. Yasuo, W. Ryuji y S. & S. O. Hironobu, «Mechanism of anti-tumor effect of combination of bleomycin and shock waves,» *Japanese Journal of Cancer Research*, vol. 91, nº 10, pp. 1065-1072, 2000.
- [59] M. Kambe, M. Ioritani, K. Kambe, M. Kuwahara, D. Arita, T. Funato, H. Shimodaira, M. Gamo, S. Orikasa y R. Kanamaru, «Enhancement of chemotherapeutic effects with focused shock waves: extracorporeal shock wave chemotherapy (ESWC),» *In vivo*, vol. 10, nº 3, pp. 369-375, 1996.
- [60] QIAGEN, «Optimization of plasmid DNA transfection,» de *The QIAGEN Transfection Resource Book*, QIAGEN Inc., 2002, pp. 18-19.