

03040

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA



TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS HeLa POR ONDAS DE CHOQUE

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**

PRESENTA:

BIÓLOGO EDUARDO ARMENTA RUIZ

DIRECTORES DE TESIS:

Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo y Dr. Achim Max Loske Mehling

JURIQUILLA, QRO. FEBRERO 2005.

m344105



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Agradecimientos:

Deseo expresar mis más profundos agradecimientos a las siguientes personas e instituciones:

A Claudia Hernández Galicia, por su incondicional apoyo, cariño y comprensión durante el desarrollo experimental de esta tesis.

A mis padres, Efrén y Ana, por enseñarme los principios para continuar esforzándome en la vida.

A mis hermanos, Liliana, Armando y Dulce, por ser mis compañeros y amigos.

Al Dr. Fernando E. Prieto, por haber sido más que un tutor para mi. - Gracias maestro-

A los Doctores: Achim M. Loske, Gonzalo Martínez, Alfredo Varela, Edith Garay, Eduardo Castaño y Víctor M. Castaño, por sus valiosos comentarios y revisión de esta tesis.

A la UNAM, por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios.

A todo el personal docente y administrativo del Instituto de Neurobiología, por sus enseñanzas y atenciones.

Al apoyo incondicional que me brindo el Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada.

A Leonor Casanova de la Unidad de Enseñanza del Instituto de Neurobiología, por su comprensión, atención y amabilidad.

A Pilar Galarza de la Unidad de Biblioteca del Instituto de Neurobiología, por su respaldo y confianza.

A mi compañera, Esperanza Meléndez, estudiante de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Neurobiología, por haberme capacitado en cultivo celular.

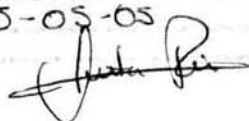
Agradezco al Proyecto PAPIIT DGAPA IN 101202.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico y físico el contenido de mi Tesis de Maestría.

NOMBRE: Eduardo Armenta Rizo

FECHA: 5-05-05

FIRMA:



CONTENIDO

	Página
Resumen en español	5
Resumen en inglés	6
I. INTRODUCCIÓN	
1. Las ondas de choque	
A) Reseña histórica	7
B) Características de las ondas de choque	8
C) Concepto y generalidades de una onda de choque débil	9
D) Métodos de generación de ondas de choque	10
E) Interacción de las ondas de choque con la materia	13
F) La cavitación	14
G) El Laboratorio de Ondas de Choque y el generador de ondas de choque: MEXILIT II*	16
2. Transfección	
A) Concepto y características	18
B) Factores que afectan la transfección	19
C) Métodos de transfección	20
Transfección mediada por liposomas	21
Transfección por co-precipitación de fosfato de calcio	21
Transfección mediada por DEAE-dextrano	22
Transfección por electroporación	22
Transfección mediada por fusión de protoplastos	23
Transfección por microinyección	23
Transfección <i>in vivo</i>	23
D) Replicación del ADN exógeno en una célula cultivada: transfección permanente VS transfección transitoria	24
E) Utilización de las células transfectadas	25
3. Células HeLa	
II. ANTECEDENTES	
A) Características	26
B) Efecto citotóxico de las ondas de choque débiles	27
C) La cavitación: posible responsable de la permeabilidad celular	28
D) Transfección por ondas de choque <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	29
III. JUSTIFICACIÓN	30
IV. HIPÓTESIS	32
V. OBJETIVOS	32
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	33
Metodología	34
1. Lugar de estudio	34
2. Protocolo experimental	34
A) Grupos experimentales	35
3. Material biológico	36
A) Cultivo celular	36
Descongelamiento	
Mantenimiento y propagación	
Congelamiento	
B) Producción de un plásmido de ADN para Transfección	37
Transformación	
Selección y purificación	
Método QUIAGEN " purificación del plásmido"	

C) Acondicionamiento de las células antes de cada Tratamiento	40
Condiciones específicas por grupo	41
Grupo experimental 1: Cinética de 24 kV	42
Grupo experimental 2: Cinética de 20 kV	42
Grupo experimental 3: Efecto de la cantidad del plásmido	42
D) Viabilidad celular	43
E) Microscopía de fluorescencia	43
4. Generador de ondas de choque electrohidráulico	43
5. Transfección por liposomas	44
6. Análisis estadístico	45
7. Material	46
VII. RESULTADOS	
Síntesis	47
Eficiencia de transfección	
Efecto del número de ondas de choque	49
Efecto del voltaje	53
Efecto de la cantidad del plásmido	55
Daño celular	
Efecto del número de ondas de choque	57
Efecto del voltaje	62
Efecto de la cantidad del plásmido	64
Proliferación celular	
Efecto del número de ondas de choque	66
Efecto del voltaje	71
Efecto de la cantidad del plásmido	73
VIII. DISCUSIÓN	75
IX. CONCLUSIÓN	80
X. LITERATURA CITADA	81
XI. ÍNDICE DE FIGURAS	85
XI. ÍNDICE DE TABLAS	86

RESUMEN

En medicina y biología experimental son muchas las razones por las cuales se necesita introducir material genético al interior de una célula. Uno de los usos actuales es la terapia génica, con la cual se incorpora un gen o oligonucleotido (artificial o natural) en la célula, para tratar enfermedades heredadas o adquiridas, tales como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y desórdenes metabólicos.

Muchos son los métodos que se han ideado para producir un aumento transitorio de permeabilidad en la célula, sin toxicidad concomitante. Entre estos métodos se encuentra el uso de detergentes para alterar la estructura física de la membrana, así como el uso de toxinas bacterianas, el uso de campos eléctricos pulsados (electroporación) o el uso del ultrasonido.

Un método novedoso podría ser la aplicación de ondas de choque. Una onda de choque es un pulso de presión positiva de hasta 2 kbar y duración de aproximadamente 1 μ seg, seguida de una fase negativa de menor amplitud. Las ondas de choque se utilizan clínicamente en medicina desde 1980 para la destrucción de cálculos renales y su uso se ha ampliado hasta hoy. Existen diferentes maneras para generar ondas de choque. La más utilizada clínicamente es a través de una descarga eléctrica en agua (método electrohidráulico). La transfección (incorporación de material exógeno a una célula eucariota) por ondas de choque ha sido estudiada por un reducido número de autores en algunos tipos de células eucariotas.

El presente trabajo describe un método con el cual se transfectan células HeLa por ondas de choque. El generador de ondas de choque utilizado fue de tipo electrohidráulico; el número de ondas de choque utilizadas fue de 100, 250, 400, 450, 700 y 1500; el voltaje con el cual se generaron las ondas de choque fue de 20 y 24 kV y la cantidad de plásmido con la cual se transfectó fue de 12 o 30 μ g por mililitro. Se utilizaron células de la línea HeLa a una concentración de 10^7 células por mililitro, en medio OPTIMEM. El vector con el cual se transfectó fue pCA β mGFP y el gen reportero fue la proteína verde fluorescente (GFP).

Los resultados de este trabajo muestran la posibilidad de transfección por ondas de choque mediante el generador electrohidráulico MEXILIT II⁺ y abren la posibilidad de generar etapas posteriores de investigación. La máxima eficiencia de transfección que se alcanzó al aplicar 250 ondas de choque a 20 kV y 12 μ g de plásmido (fue de 0.183 %). El valor promedio de este bloque experimental fue de 0.063 %.

Las condiciones en las cuales también se presentó mayor eficiencia de transfección fue al aplicar 100 ondas de choque a 24 kV.

RESUMEN EN INGLÉS

Effective treatments for inherited and acquired diseases including cancer and degenerative disorders are pointing towards gene therapy, which in turn depends on methods to introduce foreign genetic material to adult cells in situ.

However, most of the methods developed to transiently increase cell permeability, and thus allow the incorporation of transgenes to the genome, are not selective to target a particular population of cells.

Shock waves may be used as a cell - permeabilization (*sonoporation*) method to load external molecules (DNA) into cells, opening the possibility of focal gene transfer. These pressure peaks consist of a compressive phase with an amplitude of up to 2 kbar and a duration of about one microsecond, followed by a 3 microsecond tensile tail with smaller amplitude. Shock waves have been widely used as one of the most effective methods to remove urinary stones since 1980. Different techniques have been developed to generate shock waves for clinical application. The most popular method (electrohydraulic shock wave generation) uses an underwater spark discharge to generate a spherically expanding shock wave that is focused by an ellipsoidal reflector. The intensity of the reflected wave is maximized in the vicinity of the far focus of the reflector, where the kidney stone is located.

The present work describes the use of a method based on shock waves to transfect cultured HeLa cells with a reporter gene (green fluorescent protein).

The results show the feasibility of eucariotic cell transfection by electrohydraulic-generated shock waves. The conditions that allowed the maximal efficiency of transfection (0.183%) were 100 to 250 shock waves, generated at 20 to 24 KV. These results open the possibility of selectively target particular populations of cells to be transfected in situ.

I. INTRODUCCIÓN

En esta sección se hará una breve reseña histórica sobre la aplicación de las ondas de choque a la medicina y se describirán los conceptos de onda de choque y transfección, así como sus principales características.

1.- LAS ONDAS DE CHOQUE

Desde el primer tratamiento de desintegración de cálculos renales sin cirugía (litotripsia extracorporal) que se realizó en 1980, las investigaciones se concentraron en realizar mejoras a los equipos ya existentes y a la búsqueda de nuevas aplicaciones de las ondas de choque a la medicina.⁴⁴ Actualmente las ondas de choque se utilizan como técnica no invasiva para la desintegración de cualquier tipo de cálculo dentro del cuerpo, así como en ortopedia. La destrucción de trombos y la aplicación a tumores malignos se encuentra en fase experimental⁴⁸ (ver efecto citotóxico de las ondas de choque).

Recientemente se han llevado a cabo estudios experimentales para investigar el efecto que producen las ondas de choque débiles sobre ciertos microorganismos patógenos y no patógenos. La finalidad es establecer una cinética de muerte que demuestre estadísticamente el efecto de las ondas de choque, con la idea de desarrollar un método novedoso de conservación de alimentos.^{28,45,49}

En un futuro, es muy probable que se desarrollen nuevas aplicaciones de las ondas de choque débiles en medicina, biología, química y física.⁴⁸ La interacción de las ondas de choque con la materia abre un campo sumamente interesante, en el cual aún hay mucho por hacer.

A) Reseña histórica

El origen de las aplicaciones médicas de las ondas de choques fue la desintegración de cálculos renales sin cirugía.^{13,14,48} La litotripsia extracorporal por ondas de choque (LEOCH), se desarrolló principalmente en Alemania, Estados Unidos, Japón, Inglaterra, Francia, Italia y China y se ha aplicado durante los últimos veinte años prácticamente en todo el mundo. La LEOCH es una técnica no invasiva para el tratamiento de cálculos renales, biliares y salivales. Al hablar de litotripsia extracorporal se sobrentiende que es por ondas de choque, ya que hasta la fecha no existe otro principio físico, no invasivo, clínicamente aplicable.^{9,13,43}

Los inicios de la LEOCH datan de 1950, año en el que Yutkin propuso en Rusia la idea de desintegrar cálculos atrapados en el uretero con un dispositivo denominado YPAT-1 que generaba ondas de choque electrohidráulicas. En 1959, V. Goldberg fue el primero en usar el método electrohidráulico para desintegrar cálculos renales en forma invasiva (ver sección de métodos).^{13,42,48}

En 1970, el físico E. Häusler, investigador de la Universidad de Saarland en Saarbrücken, Alemania, fue uno de los primeros en proponer la desintegración de cálculos renales en forma *no* invasiva con ondas de choque. Häusler y Ziegler, un urólogo de la misma institución, comenzaron a publicar los primeros estudios relacionadas con el rompimiento de cálculos renales sin cirugía en 1971.⁴² A principios de 1980, en la clínica urológica de Munich, Alemania, en colaboración con la compañía Dornier Medizintechnik GmbH, se desarrolló el primer generador clínico de ondas de choque electrohidráulico y en 1982 se inauguró el primer centro de litotripsia en esta misma ciudad.⁴⁸

B) Características de las ondas de choque

Existen dos grupos de ondas en la naturaleza: las ondas mecánicas y las electromagnéticas. Las ondas de choque pertenecen al primer grupo. Ejemplo de ondas electromagnéticas son la luz visible, la luz ultravioleta y las microondas.²⁵ Este tipo de ondas no se tratarán en esta tesis.

Para entender lo que es una onda de choque, es importante comprender las características más importantes de las ondas mecánicas, como por ejemplo, las ondas sonoras.^{19,25} Una onda de choque es una discontinuidad de presión que se propaga por un medio a una velocidad cercana o mayor a la velocidad del sonido en ese medio.^{28,48}

Entre las características generales más importantes de cualquier onda, pueden mencionarse: *la amplitud, la longitud de onda, la frecuencia y la velocidad de propagación.*²⁵ No todas son independientes.

Una onda es una vibración, también denominada *onda del medio transmisor*, cuyos puntos más "altos" sobre una gráfica de presión contra distancia se llaman *crestas de la onda* y los puntos más bajos *valles de la onda*. El ciclo entre cresta - valle - cresta, es denominado oscilación. La *frecuencia*, se define como el número de oscilaciones completas ó ciclos por segundo.^{7,19}

La distancia entre dos crestas o dos valles consecutivos se llama *longitud de onda*. Las unidades de la longitud de una onda son de *distancia (metros, centímetros, etc.)*.

Se llama *amplitud de la onda* a la altura máxima de una *cresta* o a la profundidad máxima de un *valle*, medidas desde *el nivel de equilibrio* (Figura 1). De acuerdo al tipo de fenómeno en estudio, la amplitud puede ser el voltaje medido en volts, un desplazamiento medido en metros o centímetros, la presión medida, por ejemplo, en atmósferas (atm) ó alguna otra variable.⁷ Por definición, el período de una onda es la duración de una oscilación o ciclo completo. La velocidad de una onda mecánica está en función de diversos factores, tales como: la temperatura, la presión, la densidad del medio por la que se propaga y el método de generación, entre otros.^{7,25}

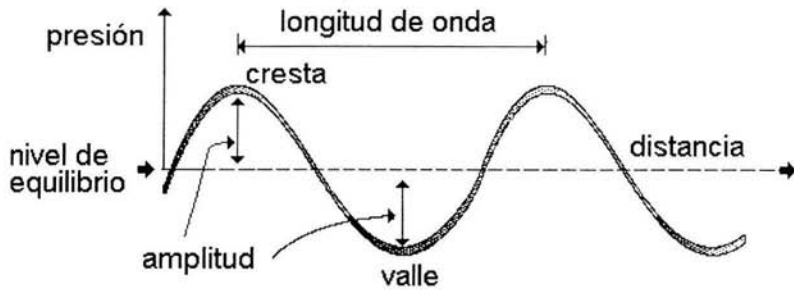


Figura 1. Principales características que posee un movimiento ondulatorio.

C) Concepto y generalidades de una onda de choque débil

Como ya se mencionó, una onda de choque es una región muy densa en energía acústica, que requiere de un medio gaseoso, líquido o sólido para poder originarse y propagarse.^{28,46,48} Una onda de choque *débil*, es una discontinuidad ó pulso de presión de hasta a aproximadamente 2 kbar. Este tipo de onda consiste en una compresión o presión positiva, seguida de una descompresión o rarefacción denominada también presión "negativa".^{9,43} Al igual que todas las ondas, una onda de choque transporta energía. De acuerdo al medio en el que se genera y a la cantidad de energía, una onda de choque puede llegar a oírse a diferentes intensidades; además de poder sentirse en mayor o menor grado su paso a través del cuerpo.²⁸

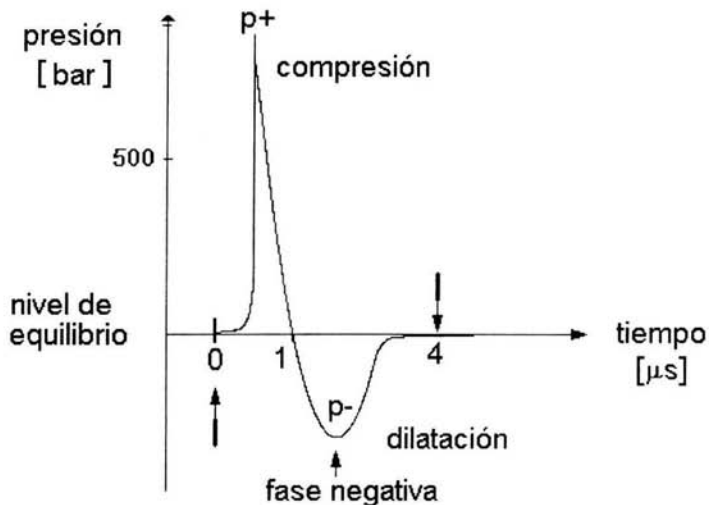


Figura 2. Variaciones de presión que se dan al paso de una onda de choque, en función del tiempo.

En una onda de choque, los cambios de presión se dan en tiempos extremadamente cortos. Al incidir una onda de choque, la presión aumenta en unos cuantos nanosegundos a su valor máximo (cientos de bars). Posteriormente regresa a su valor de equilibrio en aproximadamente 1 μ seg.^{9, 50} La fase negativa dura entre 2 y 4 μ seg (Figura 2).

Debido a que únicamente se trata de un pulso ó pico de presión y no de una oscilación, frecuentemente se usa el término *frente* de choque en vez de *onda* de choque. Por este mismo motivo no se puede hablar de una frecuencia única de una onda de choque. Se dice que la onda de choque tiene un gran número de frecuencias asociadas.^{42,43} La explicación física de estos conceptos esta fuera del alcance de esta tesis. El lector interesado puede consultar las referencias citadas al final de este texto.^{7,25,48, 60}

En el caso de la LEOCH, el término amplitud de la onda se refiere a la presión máxima ó mínima del pico positivo ó negativo, medida desde el nivel de equilibrio. Dichas amplitudes (presiones entre el nivel de equilibrio y la cresta o el valle) en general no son iguales.^{9,48}

D) Métodos de generación de ondas de choque

Existen diferentes maneras para generar ondas de choque para litotripsia extracorporal, todas ellas bajo un mismo principio: comprimir repentinamente el medio de propagación, generar una onda de compresión y concentrarla mediante espejos o reflectores hacia el interior del cuerpo.^{13,51} Los aparatos clínicos con los que se generan las ondas de choque, son denominados *litotriptores*.

Dado que las propiedades acústicas del agua y de los tejidos son similares, en medicina las ondas de choque se generan en agua. Con ello se evitan reflexiones indeseadas en la piel del paciente. Además, en agua es posible generar ondas de choque con una presión mucho mayor que en el aire, usando la misma energía inicial. Esto se debe a que es mucho más difícil comprimir agua que aire.

Los métodos para generar ondas de choque débiles en agua son: por detonaciones con microexplosivos (*microexplosivo*), concentrando la energía de un rayo láser en una región muy pequeña (*láser*), generando un movimiento brusco de una membrana o bobina (*electromagnético*), con la excitación de cristales piezoeléctricos (*piezoeléctrico*)^{9,52} y por la ruptura eléctrica entre dos electrodos (*electrohídrico*).⁴³ Cabe señalar que cada uno de estos métodos, tiene efectos secundarios y limitaciones propias. Para pulverizar un cálculo renal es necesario aplicar cientos de ondas de choque.^{13,15,48}

A continuación se dará una breve descripción del método electrohídrico:

En los generadores electrohídricos, las ondas de choque son producto de la aplicación de alto voltaje (miles de volts) a un par de terminales llamadas

electrodos, que forman parte de una bujía intercambiable sumergidas en agua. El paso de alto voltaje entre los dos electrodos crea un canal de vapor altamente ionizado (plasma), a una presión y temperatura elevada (miles de °C). Las partículas que pueden encontrarse en el plasma son: átomos de oxígeno, de hidrógeno, de ozono y átomos de los materiales que forman a los electrodos, entre otras.^{47, 48}

La separación entre electrodos es de 1 a 2 milímetros y su diámetro es de aproximadamente 2 milímetros (Figura 3). El canal de plasma que se forma entre los electrodos se expande súbitamente como un pistón que comprime el agua. La velocidad de expansión es sumamente grande, generando de esta forma una onda de choque casi esférica (*frente de choque*), que se propaga a través del medio con una velocidad mayor que la del sonido en el agua.^{9,42,48}

En el caso de un tratamiento de LEOCH, la compresión de agua mencionada (*frente de choque*), se dirige y concentra mediante reflectores con forma de elipsoide de revolución truncado,⁴² hacia el lugar donde se localiza la concreción que se desea fracturar. Los reflectores con los que se concentra la onda de choque generalmente son de latón ó de acero inoxidable. Para concentrar una onda de choque con un reflector elíptico, el frente de onda de choque se produce en el primer foco (F_1) del elipsoide. De acuerdo a las leyes de reflexión, la onda de compresión se refleja hacia el segundo foco (F_2), lugar en el cual se dá la máxima concentración de energía. Dependiendo de la energía, la onda de choque puede formarse antes ó después de la reflexión.^{43,46}

Para aplicaciones experimentales muy específicas, como por ejemplo, el estudio de la posibilidad de usar ondas de choque como método de conservación de alimentos, se pueden usar reflectores parabólicos en lugar de elípticos (Figura 4). Con este tipo de reflectores se produce un frente de choque *plano*. En un futuro es posible que también se usen reflectores parabólicos ó reflectores compuestos⁴⁶ para el estudio de la transferencia génica en diferentes tipos de células. En esta tesis, únicamente se usaron reflectores elípticos.

Entre las principales ventajas que poseen los litotriptores electrohidráulicos se tienen: el bajo costo del generador, su diseño relativamente sencillo y el hecho de que producen una onda de choque con un tiempo de ascenso muy corto.^{42,43} Las desventajas son: el inevitable desgaste de los electrodos y la variación de presión entre una y otra onda de choque.

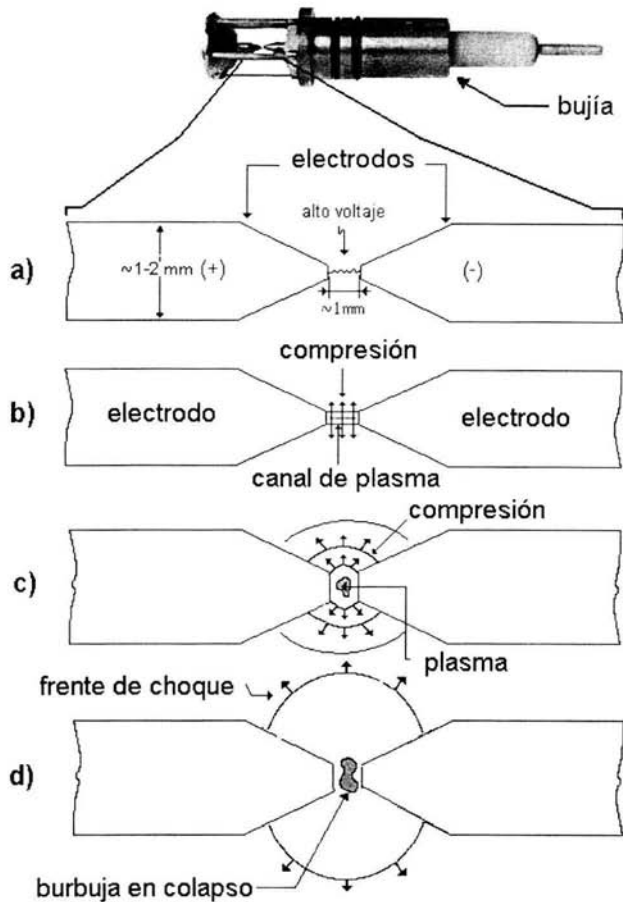


Figura 3. Generación de una onda de choque mediante una descarga eléctrica.

- La diferencia de potencial entre dos electrodos produce una descarga eléctrica.
- Súbitamente se crea un canal de plasma que comprime al medio circundante (agua).
- Debido a que la burbuja de plasma pierde velocidad, se separa de la onda de compresión (frente de choque).
- El frente de choque es prácticamente esférico y se propaga por el agua, mientras que la burbuja de plasma se colapsa.

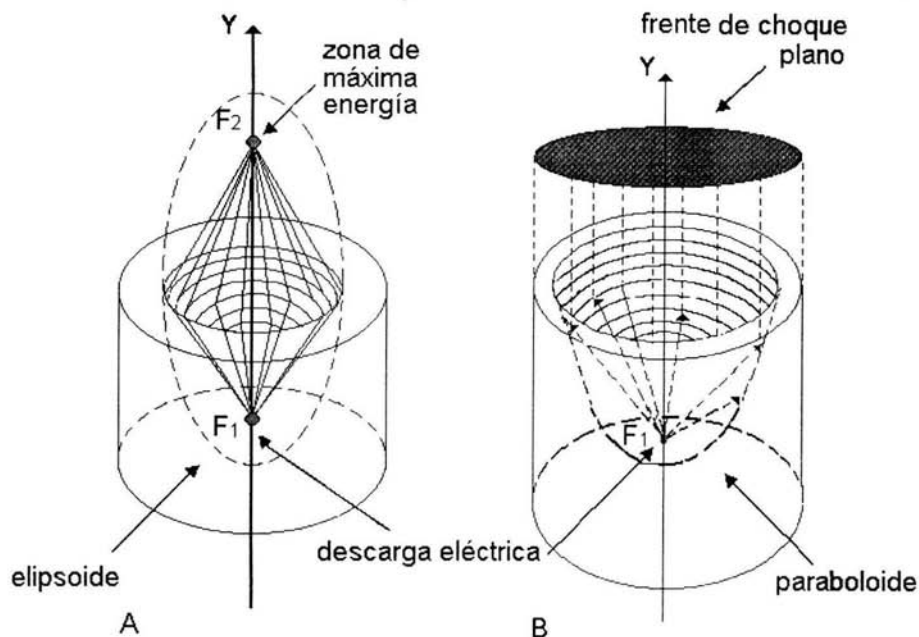


Figura 4. Reflectores A. elíptico y B. parabólico, usados para la concentración de una onda de choque.

E) Interacción de las ondas de choque con la materia

Al pasar por la materia, las ondas de choque pueden producir cambios en la conductividad, polarización eléctrica, propiedades termodinámicas y propiedades ópticas. Adicionalmente pueden formar burbujas en el medio (cavitación real y pseudocavitación) y producir fracturas. Se ha demostrado que la cavitación es uno de los efectos principales que intervienen en la pulverización de los cálculos renales durante un tratamiento de LEOCH. Se piensa que la cavitación es el efecto principal que aumenta la permeabilidad celular en células eucariotas (Figura 5).^{2,3,4,8,10,20,39,55}

Los efectos destructivos de las ondas de choque puede clasificarse en:

a) efectos directos:

- Compresión (presión positiva) y descompresión (presión por debajo de la presión de equilibrio), al paso de la onda de choque por el medio.^{9,48}
- Efecto Hopkinson: en litotripsia se refiere al desprendimiento de fragmentos del cálculo en la cara posterior al sitio de entrada de la onda de choque. Se origina debido a la reflexión y transmisión de la onda de choque de un medio más denso (concreción), a uno menos denso (orina o tejido).^{9,48} En el caso de la aplicación de

ondas de choque a células eucariotas en suspensión, este efecto es mucho más débil debido al tamaño y a las propiedades intrínsecas y extrínsecas de la célula.

b) efectos secundarios:

- Cavitación: es la formación y el colapso violento de burbujas al paso de la onda de choque. Existen dos tipos de cavitación, la pseudocavitación y la cavitación real. Los efectos principales de la cavitación son la formación de ondas de choque secundarias y la expulsión de pequeños chisquetes de líquido de alta energía (microjets).^{28,48,52} Debido a que se piensa que la cavitación es la responsable de la permeabilidad celular, ésta se abordará con mayor detalle más adelante.

c) efectos asociados:

- Destello de luz: éste es exclusivo de los sistemas de generación electrohidráulico y de microexplosivos. Se produce al momento de generar la descarga eléctrica, entre uno y otro electrodo o al hacer detonar el microexplosivo.^{28,48}

F.- La cavitación

Por definición, cavitación es la formación de una nueva superficie o cavidad dentro de un líquido.⁹ Para generar cavitación es necesario reducir la presión dentro del líquido; es decir, poner en tensión al líquido. Si la tensión es lo suficientemente grande se vence la resistencia a la tracción, creándose con ello cavidades en los espacios donde el líquido se rompe. La formación de nuevas burbujas y su colapso dentro de los líquidos se denomina cavitación real y el proceso de crecimiento de burbujas ya existentes y su colapso se conoce como pseudocavitación.^{8,9} La cavitación, es un proceso asociado al paso de la onda de choque que tiene una duración de 400 a 600 μs .

Al exponer las burbujas a una reducción de presión súbita, éstas se expanden y en algunos casos implotan colapsando violentamente. Entre mayor sea la descompresión, mayor será el número de burbujas que podrán tener crecimiento explosivo y colapso violento.⁹ El tiempo de crecimiento de las burbujas es de 100 a 200 μs y la energía liberada en su colapso puede generar presiones de hasta 10,000 bar.¹⁸

El radio de las burbujas contenidas en agua (potable, no tratada) es de aproximadamente 3 μm . Estas burbujas, así como las micropartículas contenidas en el agua, pueden ser núcleos de cavitación.¹⁰ La velocidad de crecimiento y colapso de las burbujas depende del tamaño de los núcleos de cavitación, además de la rarefacción aplicada. En tejido, las burbujas generadas por cavitación no pueden crecer libremente, por lo cual su colapso no es tan violento.¹³

La vida de estas burbujas puede dividirse en tres etapas: a) una fase de *crecimiento explosivo*, en la cual se crea y/o se expande la burbuja en un tiempo

menor a $50 \mu\text{s}$, b) una fase durante la cual la burbuja permanece estable por $180 \mu\text{s}$ aproximadamente y c) una fase de *colapso*, la cual ocurre aproximadamente en los siguientes $100 - 300 \mu\text{s}$ después de la etapa estable (Figura 5). El tiempo que dura la presión positiva al paso de una onda de choque, es de aproximadamente de $2 \times 10^{-2} \mu\text{s}$. Después del colapso, las burbujas quedan de un tamaño aproximadamente 10 veces menor que el inicial.⁴⁰

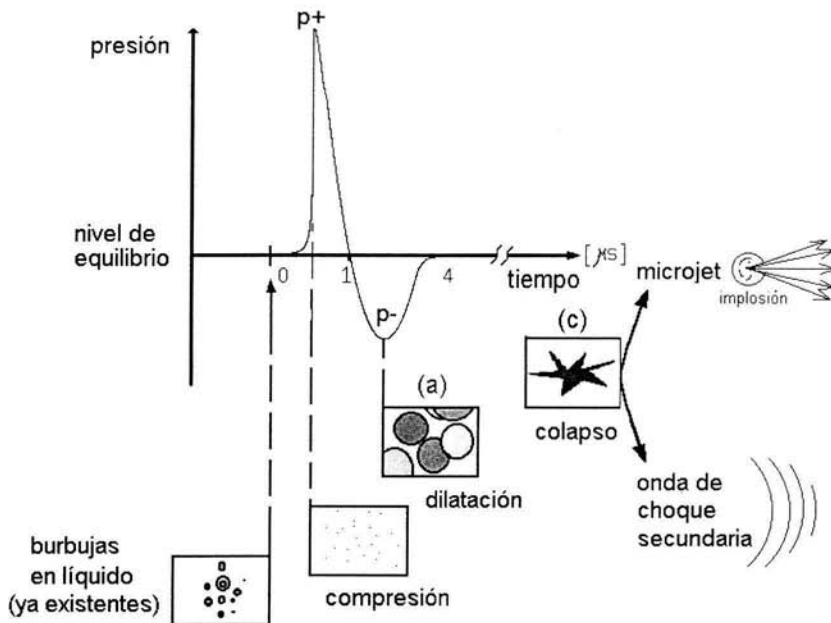


Figura 5. Dibujo que muestra las diferentes etapas de la cavitación generada por una onda de choque.

Existen dos efectos posibles cuando se produce cavitación: 1) el colapso de la burbuja y consecuentemente la generación de una onda de choque secundaria y 2) la expulsión de un chorro de líquido (microjet) de alta velocidad (aproximadamente 400 m/seg.), formado por la involución de la cavidad. En algunos casos el microjet provoca que la burbuja se deforme hasta convertirse en un toroide, el cual se colapsa y genera una onda de choque secundaria, de manera que la producción de un microjet frecuentemente está acompañada de la generación de una onda de choque secundaria. Las ondas de choque secundarias formadas por cualquiera de los procesos mencionados anteriormente son independientes de la onda primaria que generó la cavitación.^{9,40,48} Cuando una burbuja colapsa violentamente produce daños considerables a las superficies que se encuentran cerca.⁹

Dada la importancia que tiene la fase negativa de una onda de choque para formar cavitación, actualmente los estudios en el campo de la LEOCH están dirigidos a la fabricación de dispositivos que contribuyan al control del colapso de las burbujas. Ejemplo de ello son los equipos que generan dos ondas de choque en intervalos de tiempo muy cortos, reflectores compuestos que concentran la energía generada en dos regiones diferentes a tiempos diferentes, reflectores hechos de materiales suaves (espuma de poliuretano) que generan presiones negativas y dispositivos piezoeléctricos que mandan dos o más ondas de choque separadas por un intervalo de tiempo muy corto (del orden de microsegundos). La primera onda genera cavitación y la segunda refuerza el colapso de las burbujas.^{8,9} Estudios recientes *in vitro* muestran que existe mayor daño a modelos de cálculos renales cuando se controla la cavitación.^{21,33} Asimismo la geometría y el tipo de superficie del sólido (cálculo renal) influyen en el poder erosivo de la cavitación.^{23,24}

G) El Laboratorio de Ondas de Choque y el generador de ondas de choque MEXILIT II*

En 1988 se fundó en el Instituto de Física de la UNAM, el Laboratorio de Choques Débiles, ahora denominado Laboratorio de Ondas de Choque del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada de la UNAM (LOCH). Una de las motivaciones principales para la creación de este laboratorio fueron las aplicaciones médicas de las ondas de choque a la desintegración de cálculos renales y/o biliares sin cirugía. Actualmente el laboratorio cuenta con cinco generadores de ondas de choque. Las líneas de investigación que se desarrollan se enfocan a la búsqueda de nuevas aplicaciones de las ondas de choque en medicina, química, física y biología.⁴⁸ De los cinco generadores de ondas de choque con los que cuenta, dos son de tipo clínico y tres de tipo experimental.

El generador de ondas de choque experimental electrohidráulico (MEXILIT II*) está formado por una tina de pruebas de 120 x 80 x 60 cm, construida de fibra de vidrio. En el borde superior de la tina, se tienen dos grúas móviles de precisión que se usan para sujetar y mover objetos. Una de ellas posee tres motores de paso controlados por computadora. Debajo de la tina está parte de un circuito que carga entre uno y 12 capacitores intercambiables de 10 nF a un voltaje máximo de 30 kV, así como un interruptor de chispa. En la figura 6, se muestra un esquema donde se señalan los componentes principales del MEXILIT II*.^{1,48,51}

Como ya se mencionó, en el MEXILIT II* las ondas de choque se generan por rompimiento eléctrico del agua. Las descargas eléctricas se dan entre dos electrodos de tungsteno puntiagudos, separados entre 1 y 2 mm, que forman parte de una bujía intercambiable, instalada en el fondo de la tina (Figura 6). Cuando se requiere concentrar la energía en una región pequeña, se utiliza un reflector con forma de elipsoide de revolución, que se instala de manera que uno de sus focos geométricos (F1), generalmente el más cercano a la base del reflector, coincida con el lugar donde se realiza la descarga eléctrica. El frente de choque generado en F1 es reflejado en las paredes del reflector y concentrado en el segundo foco

(F2) del mismo, lugar donde debe colocarse el objeto a tratar. El LOCH cuenta con varios reflectores diferentes de acero inoxidable (elípticos, paraboloides y compuestos), que pueden ser intercambiados y usados según la aplicación específica.^{43,47,48}

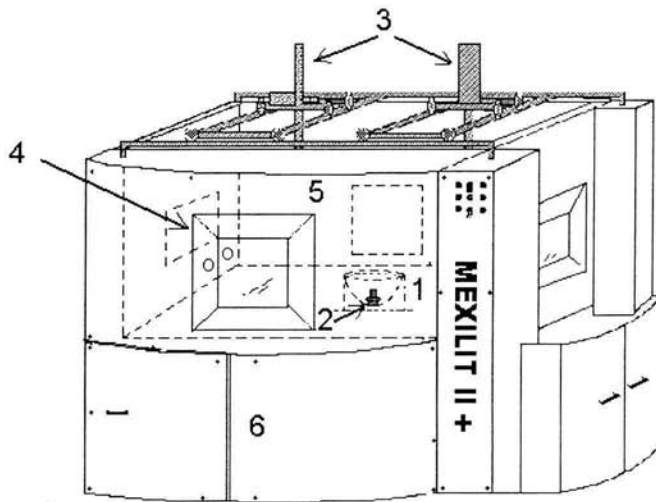


Figura 6. Dibujo del generador de ondas de choque MEXILIT II⁺, en el cual se muestra: (1) el reflector, (2) la bujía, (3) las grúas de precisión, (4) las ventanas, (5) la tina y (6) el contenedor del circuito de descarga.

2.- TRANSFECCIÓN

A) Concepto y características

El término transfección se refiere a la introducción de ADN exógeno a una célula eucariota *in vitro* o *in vivo*, independientemente de su integración al genoma. Como término fue usado por primera vez en 1964 y deriva de las palabras transformación e infección. Los primeros protocolos para transfección se basaron en la mezcla de cromosomas metafásicos en suspensiones celulares.¹¹ El primer registro de transfección es del año de 1962, en donde los investigadores Szybalska y Szybalski describieron la transferencia génica mediante un coprecipitado con fosfato de calcio y ADN. (Citado por Hernández, 1995²⁹).

Existen diversos métodos para transfección, cada uno de ellos con características específicas que permiten seleccionar en mayor ó menor grado el tipo de célula que se desea transfectar (en suspensión, fijas o línea celular).^{11,26} La eficiencia de transfección depende del tipo de célula y del método utilizado. Posteriormente se describirán otros aspectos considerados también de gran importancia que influyen en la eficiencia de transfección y que son de gran importancia para esta tesis.

Según la aplicación por la cual se transfecta, puede dividirse la transfección en dos tipos. El primero, en donde se busca que el material genético exógeno (*ADN*) se incorpore al genoma celular (*transfección permanente*) y el segundo en donde se requiere que el material genético exógeno se exprese durante un tiempo determinado, por lo cual no se incorpora al genoma (*transfección temporal*).

Aunque existen métodos que aseguran en mayor o menor grado el tipo de transfección (permanente o temporal), no existe un método para transfección permanente en donde se controlen el o los sitios de inserción del material genético incorporado.¹¹ Al parecer el o los lugares donde se integra el ADN exógeno no tienen ninguna relación con la secuencia de nucleótidos del mismo.^{34,41}

Existen diferentes formas moleculares de ADN para transfectar (vectores), tales como los BACs, PACs, YACs, cósmidos y plásmidos, siendo estos últimos los de mayor preferencia en investigación para la transfección de células de mamíferos.^{11,27,58} El concepto de plásmido, así como sus características se describen en la siguiente sección.

Los proyectos en donde se utiliza transfección forman parte de un novedoso campo de investigación que se enfoca en modificar el repertorio genético y manipular artificialmente el metabolismo celular entre otras cosas.^{3,29,30,37,54} Clínicamente, los estudios reportados se dirigen a la prevención y/o tratamiento de enfermedades de origen hereditario o adquiridas. Los nuevos protocolos para transfección buscan elevar la eficiencia en diferentes tipos de células, donde los métodos convencionales son deficientes o nulos.^{53,58,65,66}

Existen diferentes formas para demostrar que una población de células ha sido transfectada. Una de ellas es la cotransfección con marcadores fluorescentes los cuales permiten observar, estimar o cuantificar la eficiencia de transfección. Otra forma de demostrar que las células han sido transfectadas, es mediante una hibridación *in situ*.⁵⁸

Los métodos más usados para transfectar son: co-precipitación con fosfato de calcio; DEAE - Dextran; electroporación,³⁰ liposomas artificiales;^{36,61,65} sistemas de permeabilidad membranal α -toxina y streptolisina; poli-cationes⁶⁴ y eritrocitos fantasmas⁵⁷ y detergentes⁶³ entre otros.¹¹ Cabe señalar que existen modificaciones específicas de cada uno de estos métodos según el tipo de célula y el objetivo por el cual se transfecta.

B) Factores que afectan la transfección

Los factores que afectan la eficiencia de transfección pueden ser de origen físico, químico o biológico, tales como: la temperatura, el pH, la concentración celular, el transporte por el cual se introduce el material genético (vector), la estructura química y física del material a transfectar, así como las características del método por el cual se transfecta.^{11,58}

Un vector es un sistema de transporte que facilita la transferencia de un ADN exógeno a una célula blanco. Los vectores ayudan a transportar genes, junto con las secuencias de nucleótidos que codifican para su expresión o permanencia dentro de una célula blanco.⁴¹ Los vectores pueden clasificarse en virales y no virales. Los virales tienen como ventaja la capacidad de infectar y facilitar la expresión de genes exógenos y como desventaja la respuesta inflamatoria y antiviral del sistema inmunitario. Los vectores no virales son menos efectivos como transporte génico, pero ofrecen como principal ventaja la seguridad. Actualmente las investigaciones se enfocan a desarrollar nuevos sistemas no virales con las siguientes características: mayor biodegradabilidad, mínima toxicidad, escasa o nula inmunogenicidad, producción a gran escala y uso sencillo.^{16,61,68} Los vectores no virales más usados son los complejos ADN - liposomas, mientras que los virales son los retrovirus, adenovirus y herpesvirus, entre otros.^{11,58}

Las principales características que deben de considerarse en la selección de un vector son: a) que proteja al ADN exógeno de posibles degradaciones enzimáticas durante su transporte hasta su destino final, b) que permita la expresión del gen con eficiencia, c) que no genere respuestas secundarias, d) que pueda ser destinado con la mayor especificidad y e) el equipamiento con el que cuenta.^{11,41,58} La selección del vector ideal varía en función de la aplicación concreta, además de la composición y tamaño del material genético a transfectar.¹¹

Debido a que en el trabajo de investigación de esta tesis se utilizaron plásmidos y liposomas, no se tratarán en detalle aspectos relacionados con los vectores virales.

Un plásmido es una pequeña molécula circular de ADN bicatenario que se replica de forma independiente en bacterias. Para su clonación, se introducen el plásmido mediante transformación (sección de métodos: material biológico). Entre las grandes ventajas que ofrece el utilizar plásmidos para transfección esta su capacidad de conferir resistencia a antibióticos a la célula transfectada. Un plásmido contiene las secuencias necesarias de nucleótidos para su propagación y selección en un hospedero bacteriano, o bien, en una célula eucariota transfectada. Cualquier ADN puede ligarse a un plásmido y clonarse en un cultivo bacteriano, para su posterior transformación ó transfección.^{41,58} La resistencia a antibióticos presente en algunos plásmidos se debe a que estos contienen genes de resistencia. Los genes de resistencia comúnmente utilizados son el de ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol y kanamicina entre otros. El número de plásmidos presentes por célula bacteriana oscila entre 20 y 50 copias. Algunos plásmidos, después de bloquear la síntesis de proteínas, se replican hasta 1000 veces por célula.⁴¹

En general, un plásmido está compuesto de un gen de resistencia, un gen de interés y una región denominada promotora, así como de otros segmentos que regulan la transcripción. La región promotora es el sitio al cual se enlaza la molécula de RNA polimerasa antes de iniciar la transcripción. Asimismo, el promotor contiene la información que determina cual de las dos cadenas de ADN será transcrita.⁴¹ Funciona como un interruptor bajo el control de genes reguladores que lo activan o inactivan. El número de nucleótidos que constituyen un promotor oscila entre 20 y 200 pares de bases (pb).⁵⁸

C) Métodos de transfección

Los métodos para transfección pueden dividirse en dos: en los que se usan sistemas no biológicos (*métodos físicos*), por ejemplo: electroporación^{11,30,58} y microinyección^{11,58} y en donde se utilizan sistemas sintéticos (*métodos químicos*). Los métodos químicos se basan en la formación de complejos tales que las células son capaces de adquirir o incorporar directamente mediante la ruta endocítica⁶³ (tal es el caso de los métodos de fosfato cálcico o de DEAE-dextrano) o a las membranas (métodos de liposomas).^{36,68} La diferencia entre uno y otro tipo de técnica es su metodología más no sus resultados. Los métodos físicos sólo son funcionales *in vitro*, ya que es necesaria la exposición de las células a situaciones extremas.¹¹ Un método físico, es la transfección por llenado mediante raspado, el cual consiste en lesionar mecánicamente las células en cultivo en presencia de ADN.⁵⁸ Hoy en día, la información disponible permite seleccionar el método de acuerdo al tipo de célula a transfectar.^{11,41,58}

Una de las características principales que determinan el método para transfectar es la polaridad celular. La polaridad intrínseca celular, permite a las células adherirse a las superficies o bien mantenerse en suspensión. La técnica más sencilla para transfectar células en suspensión, aunque la de mayores limitaciones por utilizarse virus, es la infección con retrovirus, también conocida como

transfección mediada por vectores retrovirales. La primera transfección exitosa con células adherentes se realizó mediante el método de co-precipitación con fosfato de calcio.¹¹

A continuación se dará una breve descripción de los diversos métodos de transfección; sin embargo, se tratará con mayor detalle el método de transfección por liposomas, debido a que en el presente trabajo se utiliza el método de liposomas como control de expresión del plásmido utilizado.

Transfección mediada por liposomas

Los liposomas son vesículas esféricas artificiales constituidas por dos o más capas de lípidos. El transporte de genes mediado por liposomas consiste en la encapsulación del ADN en una bicapa lipídica, por ejemplo de L- α -fosfatidil-L-serina, aislada normalmente de cerebro bovino. La bicapa fosfolipídica del liposoma es similar a la de las membranas plasmáticas de las células.⁴¹

De acuerdo a su carga final neta, existen dos clases de liposomas: aniónicos y catiónicos. Los liposomas aniónicos fueron desarrollados para encapsular el ADN en liposomas, mientras que los catiónicos fueron desarrollados como complejos ADN - liposomas. La carga positiva de los liposomas contribuye a la interacción con el ADN y con la superficie celular de las células blanco.^{16,68} Cuando se añaden liposomas cargados con ADN a una suspensión de células para transfectar, estos se fusionan con los lípidos de la membrana plasmática. En el citosol, la mayor parte del ADN es secuestrado y degradado en los endosomas. De acuerdo al propósito por el cual se transfecta pueden ocurrir dos cosas: que una pequeña porción del ADN alcance al núcleo, permaneciendo en forma de un epicromosoma para su posterior expresión; o bien que se exprese directamente en el citosol.⁴¹

Los liposomas son uno de los vectores no vírales que han demostrado ser eficaz y seguro para su uso en transfección *in vivo*.⁶¹ Yang y Huang⁶⁸ reportan que los complejos catiónicos liposomas ADN son más eficientes en la transfección *in vivo*, principalmente en pulmón, hígado y corazón.

Utilizar liposomas para transfección tiene como ventajas la escasa o nula respuesta inmunitaria cuando se administran *in vivo*, la alta eficiencia de transfección *in vitro* y lo comercial y sencillo de la técnica.⁶⁸ La cantidad de liposomas (Lipofectamina^{MR}) que debe agregarse para transfectar, depende del tipo de célula. La cantidad de liposomas recomendada para 2×10^5 células HeLa es de 10 μ l.¹¹ En la sección de métodos se describe el método.

Transfección por co-precipitación de fosfato de calcio

La transfección por co-precipitación de fosfato de calcio fue el primer método utilizado para transfectar células de mamíferos. Se ha utilizado para transfectar

células en suspensión; sin embargo, se ha comprobado que no funciona para ciertas líneas celulares y que no es eficiente en otras.²⁷

La co-precipitación de fosfato de calcio se basa en obtener un precipitado entre el cloruro de calcio y el ADN en una solución salina de fosfatos. De esta manera, co-precipitan formando agregados que son endocitados y/o fagocitados por las células. El agregado con calcio protege al ADN de la degradación en su trayecto hacia el núcleo. La velocidad a la cual se forma el precipitado es crítica, siendo el precipitado más fino el de mayor eficiencia para transfección. Esta técnica puede verse afectada por factores tales como pequeños cambios en el pH.⁵⁸

La transfección por co-precipitación se inicia al someter las células en cultivo a distintos amortiguadores. El amortiguador básico utilizado es Hepes salino (HBS). Una forma para aumentar la eficiencia de transfección es mediante la aplicación de un choque con glicerol o DMSO cuando se retira el medio de las células después de la incubación. Una ventaja de esta técnica es que puede ser aplicada a diferentes tipos celulares en placa de cultivo o en suspensión. Las desventajas son lo poco reproducible, la escasa o nula eficiencia de transfección en ciertas líneas celulares y el tiempo que lleva el proceso.¹¹

Transfección mediada por DEAE - dextrano

La transfección mediada por DEAE-dextrano es mucho más simple y más reproducible que la transfección por co-precipitación de fosfato de calcio. Esta técnica se basa en que el DEAE - dextrano es un polímero de cadena larga, el cual se une a las moléculas de ADN formando complejos que posteriormente se mezclan e incuban con las células a transfectar. Estos complejos se introducen en las células mediante choques osmóticos con DMSO o glicerol. El método original ha sido modificado repetidamente.¹¹

Un método similar al DEAE es la transfección mediada por Polybrene, el cual también es un polímero que se adhiere al ADN formando complejos. Utilizar Polybrene en vez de DEAE parece ser más eficaz, tanto para células adherentes como para células en suspensión.¹¹

Una de las desventajas de utilizar el método DEAE - dextrano es la alta toxicidad del DEAE - dextrano, por lo cual deben de realizarse diversos ensayos para cada tipo de célula a transfectar, además de ajustar el tiempo de duración y la intensidad del choque osmótico. El uso de DEAE - dextrano se limita a las transfecciones del tipo temporal. Una ventaja de esta técnica es que puede ser utilizada para transfectar células en suspensión y en placa.

Transfección por electroporación

La transfección por electroporación, se basa en contener células en un medio rico en plásmidos, de tal forma que cuando se produzca la permeabilidad transitoria algunos de estos plásmidos puedan incorporarse a la célula.^{11,30,64} Es un método

que consiste en aplicar alto voltaje a células durante un período de tiempo corto (μs). En este tiempo las células despolarizan sus membranas y forman pequeños orificios por los cuales penetra el ADN exógeno. Terminada la despolarización, más de un 90% de las células son dañadas irreparablemente y mueren. Del 5 al 10% de las células se recuperan habiendo incorporado el ADN.⁶⁶ Las desventajas de este método son: la gran cantidad de células y de ADN necesario; lisis celular y fallas en el ajuste del equipo entre uno y otro experimento (frecuencia y voltaje).¹¹

Este método es una técnica sencilla que puede aplicarse a un gran número de tipos células y del 100% de células que sobreviven todas se transfectan.^{11,58}

Transfección mediada por fusión de protoplastos

La transfección mediada por la fusión de protoplastos se basa en fusionar bacterias modificadas y células blanco.⁵⁸ Los protoplastos son bacterias que conservan una membrana plasmática bacteriana, debido a que son tratadas inicialmente con lisozimas. Después de fusionarse con las células blanco, todo su contenido es liberado al interior de la célula.^{11,58}

Microinyección

Como ya se mencionó, este método de transfección se encuentra entre los llamados métodos físicos. La microinyección es un método para transfección que permite la introducción mecánica de ADN al interior de la célula mediante una micropipeta que se controla con la ayuda de un micromanipulador bajo un microscopio.¹¹

La principal limitación de la microinyección es su sensibilidad, además de que requiere especialización del personal que la realiza y de un equipo delicado, sofisticado y costoso. Este método es tedioso y se manipulan pocas docenas o escasos cientos de células en un tiempo de trabajo largo; sin embargo, resulta ser una técnica eficaz, ya que uno de cada cinco células consigue incorporar el ADN exógeno de forma permanente. Una ventaja de esta técnica es que puede ser utilizada en un gran número de líneas celulares.⁵⁸

Transfección *in vivo*

La transfección *in vivo* es una línea de investigación que se basa en la valoración de la respuesta inmunológica al introducir al organismo material genético exógeno.^{2,39,53,59,62,66} Al igual que los métodos de transfección *in vitro*, los métodos de transfección *in vivo* se clasifican en virales y en no virales. Los métodos no virales se dividen en específicos y en inespecíficos. Algunos ejemplos de los métodos específicos son: la inyección de complejos ADN-liposomas en órganos y de ADN desnudo. En el caso de los métodos inespecíficos algunos ejemplos son: los que son mediados por receptores, los complejos ADN - proteína y los inmunoliposomas/liposomas destinados. Los métodos virales comprenden la

utilización de adenovirus, retrovirus, virus adeno-asociados y herpesvirus. La inyección de ADN es parecida a una infección viral.⁵³

Aunque el ADN puede ser administrado al organismo de forma directa a través de vacunas, las investigaciones se enfocan en diseñar y utilizar diferentes vectores que faciliten el proceso de transferencia y permitan su localización intracelular; es decir, con destinos específicos, determinados a un órgano o tejido específico.^{36,66}

Actualmente, uno de los métodos más eficientes y más usado para transfectar *in vivo* es la inyección directa de ADN en músculo esquelético.⁵³ Las investigaciones reportadas están dirigidas a la obtención de los parámetros físicos y biológicos de la captación celular. En combinación con factores o técnicas de transfección *in vitro*, tales como electroporación y liposomas.⁶⁸ Se ha visto que las vacunas de ADN son una herramienta eficaz en especies pequeñas; sin embargo, su eficiencia disminuye en primates.¹⁶ La electroporación como reforzador para la captación celular en combinación con la inyección muscular es efectiva, dado que incrementa la respuesta celular subsecuentemente, debido a que las células transfectadas proliferan.²⁹

D) Replicación del ADN exógeno en una célula cultivada: transfección permanente vs transfección transitoria.

Atravesar la membrana plasmática de la célula, es el primer objetivo a vencer cuando se realiza transfección. De esta manera se permite al ADN exógeno interactuar con la maquinaria responsable de la transcripción y replicación de la célula receptora. Posteriormente a esta fase, el ADN en la célula receptora puede integrarse de forma estable en el genoma, o bien permanecer transitoriamente dentro de la célula.^{41,58} Cabe señalar que una transfección permanente ocurre aproximadamente en una de cada 10^6 células donde se haya introducido ADN.³⁵ El organismo que adquiere información genética nueva por adición de ADN exógeno se denomina transgénico.⁴¹

Una vez transfectado el ADN e incorporado al genoma celular, este debe ser capaz de replicarse en el nuevo hospedero. La integración del ADN exógeno al genoma celular se lleva a través de la ligación mediante la enzima ligasa, de la propia célula blanco. Cuando la célula sintetiza su nuevo ADN, en la división celular, también se replica el ADN exógeno.^{41,58} En contraposición con lo anterior, se denomina transfección transitoria o temporal al caso en el cual el ADN transfectado no se integra al genoma ni se replica al replicarse la célula, de tal suerte que se va perdiendo con el proceso de los ciclos celulares. En este caso, el ADN es transcrito en RNA mensajero y traducido a proteína sin integrarse al genoma.⁴¹

Alternativamente, existen plásmidos especiales, diseñados con el propósito de que se repliquen independientemente del genoma celular en una célula eucariota. Estos plásmidos se replican al menos con la misma frecuencia que la célula transfectada, no desaparecen con el paso del tiempo.

Como ya se mencionó, no existe ningún método de transfección que asegure saber si el ADN transferido se incorpora o no, a una región activa del ADN receptor. Para identificar las células en las que el ADN se integra con éxito, se puede recurrir a diferentes métodos, tales como generar plásmidos que contengan genes marcadores, además del ADN de interés (cotransfección).^{11,41,58} Este tipo de genes marcadores, se clasifican en dos tipos: los de resistencia a drogas y los auxotrópicos. Otro caso particular, consiste en llevar a cabo la transfección de un tipo de célula con el ADN genómico de otra; en este caso, la célula con ADN exógeno integrado tendrá que mostrar otro fenotipo que podría identificarse.

E) Utilización de las células transfectadas

Las células transfectadas *in vitro* o *in vivo* se utilizan en función de las disciplinas involucradas con las que se llevó a cabo la transfección, tales como: biología molecular, genética, virología, bioquímica, biofísica, entre otras.

La introducción *in vitro* o *in vivo* de un gen en células germinales o somáticas, permite modificar el repertorio genético y manipular artificialmente las células. El propósito principal de dichas investigaciones es el tratamiento de un tipo de patologías, heredadas y adquiridas.^{2,38,58}

Existen innumerables motivos por los cuales se realiza transfección en cultivo celular, por ejemplo, para hacer que se exprese una proteína que normalmente no se expresa en la célula blanco (efecto de la proteína sobre el fenotipo de las células). Pueden mencionarse también las investigaciones que se realizan con oncogenes con el fin de determinar el efecto de distintas mutaciones en relación con la capacidad del gen para producir una transformación oncogénica o maligna. Otro ejemplo son los estudios donde se necesita la expresión de una proteína a concentraciones mucho más altas que las normalmente expresadas en las células; es decir, la sobre-expresión de un gen específico.⁵⁸ Asimismo, para la purificación de una proteína en especial. Al utilizar la transfección, la proteína puede purificarse más rápidamente que si se parte del tejido original.²⁹

3. CÉLULAS HELA

A) Características

Las células HeLa son células tumorígenas que provienen de un carcinoma epiteloidal cervical humano. Fue la primera línea celular aneuploide epitelial derivada de tejidos humanos que se mantuvo continuamente en cultivo.^{29,31,39} La línea celular HeLa crece en monocapa en un soporte artificial, es extensivamente heteroploide y tiene un rango de cromosomas que va de 38 a 106 con una moda de 71. Desde su origen, ha sido una de las líneas celulares más estudiadas. Estudios previos han demostrado que el estado tumorigénico está asociado específicamente a la pérdida de una copia de los cromosomas 11 y 14. Se ha observado que los cromosomas 1 y 5 son extracopiados, otros cromosomas que pueden ser extracopiados son: 7, 9, 12, 16 y 17.²⁹

Estas células contienen ADN integrado del virus del papiloma humano (HPV) tipo 18 en forma no productiva (5 a 200 copias por célula). De este tipo de virus se transcriben activamente los oncogenes E6 y E7. Sus productos están involucrados en la introducción y mantenimiento del estado inmortalizado de las células que contienen la secuencia del HPV. Dichos genes se expresan selectivamente en tumores celulares y líneas celulares derivadas de tumores humanos y se conservan intactos durante la integración del ADN viral al genoma celular, siendo evidente la integración en una o más regiones de los cromosomas del huésped, a menudo con una disposición en tandem. Una característica significativa de estas células es que cuando se fusionan con fibroblastos normales, las células híbridas resultantes ya no presentan el fenotipo maligno.²⁹ Las células HeLa han sido utilizadas ampliamente en investigación desde su aislamiento e inmortalización. Actualmente se tiene una amplia base de datos que fundamentan su eficiencia como células blanco.^{23,29,39,41}

II. ANTECEDENTES

Como ya se mencionó, las ondas de choque se utilizan como tratamiento no invasivo para la destrucción de cualquier tipo de concreción dentro del cuerpo (*litotripsia extracorporal*).^{13,48} Por la eficiencia y las ventajas de esta técnica, la búsqueda de nuevas aplicaciones a la medicina se ha incrementado paulatinamente.⁴⁴ Hoy en día, las investigaciones se enfocan a evaluar^{46,52} y reducir el daño que producen las ondas de choque a su paso por células y tejidos, así como al control de sus efectos secundarios y asociados.

Las ondas de choque también se están utilizando clínicamente en ortopedia y experimentalmente para la destrucción de trombos dentro del cuerpo y para el posible control de tumores malignos.^{6,37,44,67}

El uso de las ondas de choque en ortopedia tuvo su auge en 1986. Actualmente se usan para el tratamiento de pseudoartrosis y cicatrización retardada. También se aplican ondas de choque a tejidos blandos cercanos al sistema óseo, a endopatías y a tendopatías entre otras. En estos casos, se usan dos niveles de energía: a) bajo, para reducir el dolor y b) altos, para casos de fracturas con cicatrización retardada y para la desintegración de calcificaciones.⁴⁸

La destrucción de trombos dentro del cuerpo se encuentra en investigación desde 1992. Los resultados obtenidos muestran una notable disminución en peso y tamaño de los trombos, probablemente debido a que la impedancia acústica del trombo y la de los vasos sanguíneos no es igual. Los resultados proponen que el efecto de cavitación es responsable de esta reducción.^{22,23,39}

A mediados de los ochentas, se comenzaron a realizar estudios *in vitro* e *in vivo* enfocados a la destrucción de tumores malignos por ondas de choque débiles. Este tipo de estudios relacionados con el *efecto citotóxico de las ondas de choque (ECOCH)*, ha sido comparado, como método alternativo, con técnicas como el ultrasonido.^{12,31,35}

Basado en el *ECOCH*, en 1994 Lauer y colaboradores^{38,39} demostraron que las ondas de choque aplicadas a células en suspensión generan un aumento en la permeabilidad celular. La probabilidad de incorporar material genético por esta técnica, abre un nuevo campo en la aplicación de las ondas de choque en medicina (*transfección por ondas de choque*).^{14,44,69}

La *transfección de células por ondas de choque (TCOCH)* con miras hacia una posible terapia génica y tratamiento de ciertos tipos de cáncer,^{2,54} es la línea de investigación más reciente de las ondas de choque en medicina. Es de gran interés en la manipulación génica. Sus aplicaciones integran diversas disciplinas tales como física, biología y electrónica, entre otras.

Debido a que los resultados de los experimentos relacionados con el efecto citotóxico de las ondas de choque son el punto de partida para el estudio de la transfección por ondas de choque, a continuación se dará una breve reseña de los avances en dicho campo.

A) Efecto citotóxico de las ondas de choque débiles

En 1986 se comenzó con el estudio de la aplicación de las ondas de choque débiles a células tumorales *in vitro* e *in vivo*. En este tipo de estudios^{4,14,59,67} frecuentemente se refieren a las ondas de choque como *ondas de choque de alta energía*, aunque en realidad se trata del mismo tipo de onda. Las investigaciones reportadas generalmente utilizan células cancerígenas o tumorales para valorar el daño que producen las ondas de choque a su paso.^{2,39,54}

Según resultados de Russo y colaboradores,⁶² al exponer *in vitro* células de carcinomas prostáticos de rata R3327AT-3 y melanomas humanos SK-Mel-28 a ondas de choque, se detecta una reducción en la viabilidad y proliferación celular. Esto se observa al inyectar células tratadas con ondas de choque a organismos sanos, obteniendo un retraso en el crecimiento de los tumores con respecto a los controles. En otra serie de experimentos, se aplicaron ondas de choque *in vivo* a tumores previamente desarrollados. Debido a que los resultados fueron similares a los anteriores, se comprobó que las ondas de choque tienen un efecto citotóxico sobre este tipo células *in vitro* e *in vivo*.^{2,21,37}

El efecto citotóxico que produce el paso de las ondas de choque en tumores, también fue estudiado *in vitro* e *in vivo* por Randazzo y colaboradores⁵⁹. Los experimentos mostraron que las ondas de choque pueden reducir la velocidad de crecimiento de tumores *in vitro* e *in vivo* y que existen evidencias indirectas de que el daño celular se produce a nivel de la *membrana celular*. En estudios posteriores, a este efecto se le denominó sonoporación ó permeabilidad celular inducida por ondas de choque.

Siguiendo con la misma línea de investigación, Berens y colaboradores,⁴ demostraron que el efecto que poseen las ondas de choque en células de carcinoma de ovario BG-1 y carcinoma del endometrio HEC-1-A de humano, es de inhibición dependiente, es decir, a mayor número de ondas de choque, mayor es la inhibición. Las ondas de choque fueron generadas electrohidráulicamente por un litotriptor HM3 (Dornier Medizintechnik, GmbH, Germering, Alemania) a 18 kV. Es importante señalar que este trabajo demuestra asimismo que el efecto de cavitación es el responsable de la inhibición celular y no la luz emitida en la generación de la onda de choque.¹⁷

Brümmer y colaboradores,^{5,6} utilizando un generador de ondas de choque experimental Dornier XL7⁴⁸ a un voltaje de 18 kV, demostraron que al exponer células de leucemia L1210 a diferentes cantidades de ondas de choque y bajo dos condiciones (en suspensión e inmóviles), el efecto que se produce es muy diferente. Los resultados señalan mayor daño en células en suspensión que

inmovilizadas en gelatina. Esto demuestra que la cavitación juega un papel primordial en este proceso. Otro estudio que corrobora lo anterior es el reportado por Laudone y colaboradores.³⁷

En 1993, Coleman y colaboradores¹⁰ estudiaron la cavitación y su relación con la muerte celular. Los resultados muestran que a mayor número de ondas de choque, se reduce la proliferación y existe mayor lisis. Las células utilizadas fueron de la línea L1210, el número de ondas de choque máximo fue de 1000 y el voltaje utilizado en un litotriptor electrohidráulico fue de 25 kV.

Williams y colaboradores,⁶⁷ utilizando eritrocitos en dos condiciones (en suspensión y en pastilla) y un litotriptor electrohidráulico, demostraron que la lisis celular está en función de la presión hidrostática, mas no de la condición del generador; es decir, el voltaje y el número de ondas de choque. Los resultados muestran lisis del 97% a presiones mayores a 118.42 bars. El número de ondas de choque máximo fue de 800.

De los trabajos anteriormente descritos puede deducirse que el daño que sufren las células aparentemente no se debe a la interacción directa con las ondas de choque (compresión y descompresión); sino más bien, al efecto secundario de *cavitación*. Los resultados expuestos por Gambihler et al., 1990;²³ Gambihler y Delius, 1992^{21,22} y Gambihler et al., 1994²⁴, se refieren al estudio de la permeabilidad que posee la membrana plasmática en células de la línea L1210 de ratón, al aplicar ondas de choque. Los resultados proponen que la cavitación es la responsable de generar pequeños huecos en la membrana, aumentando con ello su permeabilidad. Los autores hacen hincapié en el potencial que poseen las ondas de choque como herramienta en el tratamiento *in vivo* y en la combinación de éstas con medicamentos para terapia. Los estudios reportados por Delius y colaboradores 1998;¹⁵ Lauer y colaboradores 1994,1997,^{38,39} y Brümmer y colaboradores 1992,⁶ confirman lo anterior.

B) La cavitación: posible responsable de la permeabilidad celular

Como ya se mencionó, aparentemente el principal fenómeno que aumenta temporalmente la permeabilidad celular es la cavitación.^{3,39,56} Los estudios referentes a la cavitación tienen como objetivo principal incrementar la formación de burbujas y su colapso, así como dirigir los efectos secundarios y asociados hacia una zona específica. Un ejemplo de ello, son los resultados expuestos por Loske y colaboradores^{46,47,50} quienes diseñaron mejoras a los equipos de litotripsia extracorporeal existentes, dirigiendo dos ondas de choque separadas por decenas de microsegundos. Otro estudio similar es el reportado por Zhong y colaboradores.⁶⁹ Por otro lado, Cauwelaert⁹ y Loske et al.,⁵² diseñaron un dispositivo electrónico que controla el colapso de la cavitación en un generador piezoeléctrico. Este sistema genera dos ondas de choque en vez de una. El tiempo entre cada onda de choque es de aproximadamente 200 a 300 μ s.

A continuación se describen otros estudios que se han elaborado con el fin de determinar el efecto de la cavitación en diferentes tipos de células eucariotas y procariotas.

En células eucariotas

Según Gambihler y colaboradores,^{21,22,23} y Lauer y colaboradores, 1997,³⁹ las ondas de choque incrementan temporalmente la permeabilidad de la membrana celular, motivo por el cual las células eucariotas tratadas con ondas de choque pueden ser transfectadas con plásmidos y drogas. El aumento de la permeabilidad de la membrana es de corta duración y cada poro inducido tiene un diámetro de por lo menos de 50 nm.

En células procariotas

Según Hernández²⁸ y Loske et al.,^{45,49} al aplicar ondas de choque a células procariotas (*E. coli*) en suspensión se produce mayor muerte celular cuando éstas se encuentran dentro de viales parcialmente llenos (75 %) y menor daño dentro de viales llenos al 100%. Las ondas de choque fueron generadas mediante el dispositivo electrohidráulico ya descrito (MEXILIT II+). Estos resultados probablemente se deben a la interfase suspensión - aire, la cual produce reflexiones de las ondas de choque incrementando la cavitación. El daño celular no aumenta al incrementar la concentración de células tratadas, lo cual indica que las colisiones intracelulares no son significativamente dañinas durante la aplicación de las ondas de choque.⁴⁸

C) Transfección por ondas de choque *in vitro* e *in vivo*

La aplicación de ondas de choque como posible método de transfección de células eucariotas, nace a raíz de la aplicación de las ondas de choque débiles en tumores malignos.^{2,35,39} Debido a que es un campo de investigación nuevo, las investigaciones reportadas son escasas.

La permeabilidad temporal de la membrana plasmática al paso de una onda de choque, es el fundamento de la transfección por ondas de choque. El aumento temporal de la permeabilidad se debe a los huecos generados en la célula por los pequeños "jets" anteriormente mencionados, producto del colapso de las burbujas formadas en el medio extracelular.^{3,15,20}

Partiendo de lo anterior, la incorporación de ADN desnudo a una célula eucariota por ondas de choque fue propuesta y descrita como técnica por Lauer y colaboradores.³⁹ Estos autores expusieron células eucariotas de la línea HeLa a diferentes números de ondas de choque (125, 250 y 500), a un voltaje de 25 kV y a una frecuencia de descarga de una onda por segundo. El dispositivo usado fue un litotriptor experimental Dornier XL1. Las células fueron contenidas en viales de polipropileno a una concentración de 10^7 células por mililitro. Cada vial contuvo un volumen de 2.5 ml, mezclado con 30 µg de plásmido pRSVβ-gal (β-galactosidasa)

o pSV-MH β -gal (MH β s). Los resultados muestran una reducción en la viabilidad del 80, 65 y 50% a 125, 250 y 500 ondas de choque respectivamente. Asimismo se muestra que la eficiencia de transfección es directamente proporcional a la cantidad de plásmido en la suspensión. Concretamente, los resultados señalan que la eficiencia es constante al utilizar una concentración de células desde 10^5 hasta 3×10^7 . El porcentaje de transfección fue de 0.5%. Otro resultado expuesto en este estudio es que el plásmido utilizado no presentó daño alguno al paso de hasta 1000 ondas de choque, además de que se señala a la cavitación como la responsable de generar pequeños poros en la membrana celular.

Otro estudio que propone a las ondas de choque como técnica para transfectar diversos plásmidos *in vitro*, es el reportado por Bao y colaboradores.^{2,3} Las células utilizadas fueron de ovario de Hamster y el gen reportero Luciferasa. Una de las aportaciones más trascendentes de este estudio es el uso de un mecanismo de rotación que genera mayor cantidad de gases dentro del vial y con ello mayor cavitación en la suspensión expuesta a las ondas de choque.

La transfección de células por ondas de choque *in vivo*, ha sido reportada por Bao y colaboradores, 1998² y por Miller y colaboradores.⁵⁴ Los estudios reportan la formación artificial de tumores con células (ATCC CRL-6323, B.16-F1 melanoma) en *murinos*. Para estimar la eficiencia de transfección se utilizó como gen reportero la luciferasa y la proteína verde fluorescente. El procedimiento se basa en mezclar el gen reportero con aire (equivalente al 10% del tumor) e inyectarlo vía intratumoral. El volumen del tumor fue medido digitalmente con un capilar. La cantidad de plásmido utilizado fue de 2 mg/ml. El generador de ondas de choque utilizado es similar a un Dornier HM-3. El tumor fue expuesto a diferentes dosis de ondas de choque e intensidades. La expresión de la luciferasa fue medida con un luminómetro un día después del tratamiento. El número de ondas de choque al que se expuso el tumor fue de 800. Los resultados muestran un aumento en la expresión de la luciferasa, en función del número de descargas y del aire inyectado. Los autores reportan un decremento del tumor equivalente al 4.2% después del tratamiento.

III. JUSTIFICACIÓN

Existen dos justificaciones para realizar este proyecto:

a) la posibilidad que ofrecen las ondas de choque como herramienta para transfección *in vitro* e *in vivo* de forma no invasiva y/o tratamiento para terapia génica.

b) la necesidad de generar métodos más eficientes para transfección *in vitro* e *in vivo*, en células donde los métodos actuales son deficientes.

IV. HIPÓTESIS

Es posible transfectar células HeLa *in vitro* por ondas de choque con el generador electrohidráulico MEXILIT II*.

V. OBJETIVOS

General

Utilizar ondas de choque como herramienta para transfectar células HeLa.

Específicos

Lograr transfectar células HeLa por ondas de choque con el generador electrohidráulico MEXILIT II⁺, estimando tanto la eficiencia de transfección como la viabilidad celular.

Determinar la influencia del voltaje y del número de ondas de choque sobre la viabilidad y eficiencia de transfección en células HeLa.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

En esta sección se presenta el método empleado para transfectar células eucariotas HeLa por ondas de choque con el gen reportero *GFP* (proteína verde fluorescente). Se describe de manera general el fundamento de cada técnica y se identifican los pasos desarrollados en el laboratorio, señalando los materiales específicos y las condiciones bajo las cuales se realizó cada prueba.

Este proyecto fue posible gracias a que en el Laboratorio de Ondas de Choque del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada de la UNAM se cuenta con varios generadores de ondas de choque, con los cuales se pueden establecer las bases y las condiciones para transfectar células eucariotas *in vitro*.

La metodología que se siguió en este trabajo fue la siguiente:

- 1.- Búsqueda bibliográfica acerca de los efectos que producen las ondas de choque a su paso por células eucariotas.
- 2.- Establecer las condiciones biológicas y físicas para transfectar células HeLa por ondas de choque con el generador electrohidráulico *MEXILIT II*^{*}.
- 3.- Determinar el efecto que tiene el número de ondas de choque, la cantidad de plásmido y el voltaje sobre la eficiencia de transfección, el daño celular y la proliferación celular después de los tratamientos.
- 4.- Evaluar los resultados generados, formulando hipótesis de los posibles fenómenos involucrados.

Metodología

1. Lugar de estudio

El presente trabajo se realizó en los laboratorios de Biología Molecular y Neuroendocrinología del Instituto de Neurobiología y en el Laboratorio de Ondas de Choque del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, ambos ubicados en el *campus* de la UNAM situado en Juriquilla, Querétaro.

2. Protocolo experimental

Se utilizaron 3 poblaciones de células HeLa que se sometieron a varios tratamientos experimentales. Los grupos testigo de cada población sufrieron los mismos manejos que los experimentales, con excepción de la aplicación de las ondas de choque y la cantidad de plásmido.

El medio expuesto a las ondas de choque (*medio de transfección*), consistió de una mezcla de células HeLa en suspensión, 10^7 células por mililitro

aproximadamente, en medio OPTIMEM (GIBCO-BRL, N° Cat. 51985-034) y 12 o 30 μg de plásmido, respectivamente.

El medio de transfección fue contenido en pipetas (*viales*) de transferencia de polietileno de 4.0 ml (Tyco/Healthcare, KENDALL, 127P507STR). La cantidad de suspensión dentro de cada vial fue de 1 ml.

Cada grupo experimental estuvo compuesto de 4 réplicas independientes con su respectivo control. El número de ondas de choque aplicadas fue de 100, 250, 400, 450, 700 o 1500 y el voltaje utilizado fue de 20 o 24 kV. La frecuencia con la cual se aplicaron las ondas fue de 0.5 Hz (1 descarga cada 2 seg.).

Las variables independientes fueron: a) el número de ondas de choque, b) el voltaje y c) la cantidad de plásmido. Los experimentos se realizaron a una temperatura media de 37° C. En la figura 7 se muestra el tipo de reflector utilizado para concentrar las ondas de choque durante los experimentos.

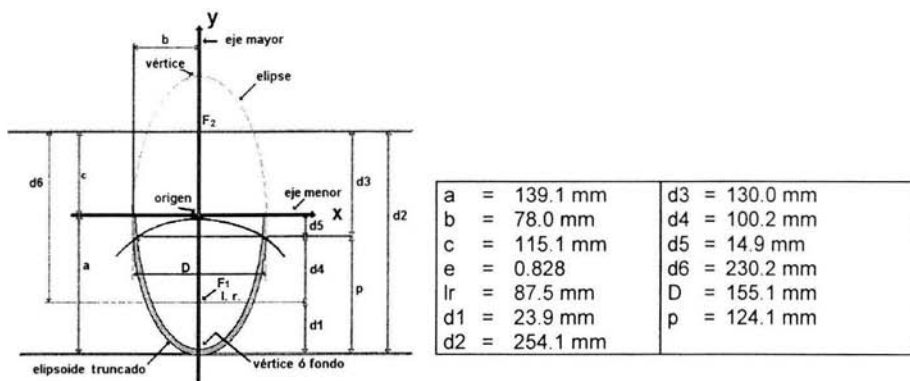


Figura 7. Dibujo que muestra la geometría y las medidas del reflector E4, usado en el MEXILIT II*. Es de acero inoxidable y tiene la misma geometría que un reflector Dornier HM3 o HM4 no modificado.³¹

A) Grupos experimentales

- I.- Los variables utilizadas en el primer grupo experimental fueron: 100, 250, 450, 700 y 1500 ondas de choque, 12 μg de plásmido, un voltaje de 24 kV y una frecuencia de descarga de 0.5 Hz.
- II.- El segundo grupo experimental estuvo compuesto de las siguientes variables: 100, 250, 400 y 700 ondas de choque, 12 μg de plásmido, un voltaje de 20 kV y una frecuencia de descarga de 0.5 Hz.
- III.- El tercer grupo experimental, se sujetó a las condiciones con las cuales se obtuvo mayor eficiencia de transfección en el grupo experimental uno y dos,

con la diferencia de que en vez de utilizar únicamente 12 μg de plásmido, se utilizaron 30 μg de plásmido. Por lo anterior, las variables fueron: 100 y 250 ondas de choque a 24 y 20 kV respectivamente, 12 o 30 μg de plásmido y una frecuencia de descarga de 0.5 Hz.

3. Material biológico

A) Cultivo celular

Se utilizaron células eucariotas de la línea HeLa, mantenidas en congelación en nitrógeno líquido.

Descongelamiento: Para su descongelación, se extrajeron del nitrógeno líquido y se dejaron de 3 a 5 minutos a temperatura ambiente en sitio estéril. Posteriormente se vaciaron sobre un plato de cultivo de 10 cm junto con 10 ml de medio DMEM-10% SFB y se colocaron dentro de una incubadora a 37° C y 5% de bióxido de carbono. El medio DMEM-10% SFB se preparó de la siguiente manera:

90% de *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (GIBCO-BRL, N° Cat. 11995-065)
10 % de suero fetal bovino (GIBCO-BRL, N° Cat. 16000-044)
1 % de antibióticos (GIBCO-BRL, N° Cat. 15140-148), 10,000 u/ml de penicilina y 10,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomina.

Mantenimiento y propagación: El cultivo de células HeLa se realizó con medio DMEM-10% SFB, en platos para cultivo de 10 cm. Para su propagación se dividieron 1:2 cada tercer día bajo el siguiente protocolo:

Con el fin de remover los desechos orgánicos, se aspiró el medio mediante vacío y se agregaron 2 ml de PBS (1X, pH 7.0), por caja petri, volviéndose a aspirar nuevamente. El siguiente paso involucró el despegar las células de los platos de cultivo. Para ello, se agregaron por caja petri 600 μl de una suspensión de tripsina (GIBCO-BRL, N° Cat. 153055-014), la cual se preparó en 100 ml de solución salina balanceada de Hanks (GIBCO-BRL, N° Cat. 4170-120) y se dividió en alícuotas de 4 ml para congelarla hasta su uso. Para su descongelación, se colocó en "baño maría" a 37°C durante 5 minutos. Una vez que se agregó la tripsina, se incubaron los platos de cultivo durante 4 minutos, tiempo durante el cual se colocaron en un tubo falcón de 50 ml (FALCON N° Cat. 352070), 20 ml de DMEM-10% SFB. A continuación, se transfirieron las células despegadas a los tubos falcón, homogeneizándose por inversión de 4 a 6 veces. Las células se sembraron 1:2 e incubaron durante 48 horas. Posteriormente se repite el proceso.

Congelamiento: De igual manera que en el protocolo anterior, para almacenar las células en nitrógeno líquido (por caja petri subconfluente), las células fueron despegadas y colocadas en tubos falcón de 15 ml (FALCON N° Cat. 352070) junto con 10 ml de DMEM-10% SFB y se centrifugaron a 1000 revoluciones por minuto durante 3 minutos con una centrifuga marca HERMLE (N° Cat.

27900V02,220,87,V02) de rotor de ángulo fijo. Durante la centrifugación, se preparó el *medio de congelación*, que consistió de 200 μ l de suero fetal bovino (GIBCO-BRL, N° Cat. 16000-044), 600 μ l de DMEM (GIBCO-BRL, N° Cat. 11995-065) y 80 μ l de Dimetilsulfuróxido (J.T.Baker:9224-01). La pastilla resultante se mezcló junto con el medio de congelación y se colocó en crio-tubos (NUNC - 65234). Posteriormente, los crio-tubos se colocaron a menos 4° C durante 2 horas, a menos 70° C en un REVCO durante 3 horas y en nitrógeno líquido para su permanencia. Cabe señalar que debido a que el DMSO es tóxico, éste se agregó al final de la suspensión.

B) Producción de un plásmido de ADN para transfección

Para calcular la eficiencia de transfección por ondas de choque en células HeLa, se utilizó como gen reportero la proteína verde fluorescente (*GFP*) y como vector, el plásmido pCA β mGFP. La selección del gen reportero se debe a que la GFP cuenta actualmente con una extensa base de datos que fundamentan su eficiencia como marcador para evaluar, identificar y caracterizar diversos métodos de transferencia génica. Asimismo, la selección del plásmido obedece a que se ha comprobado su eficiencia, debido a que es el utilizado en el laboratorio donde se llevó a cabo la manipulación celular. En la figura 8, se presentan los componentes del plásmido pCA β mGFP. Cabe señalar que la cantidad de plásmido requerida durante los experimentos fue de aproximadamente 1.5 ml (1 μ g /ml).

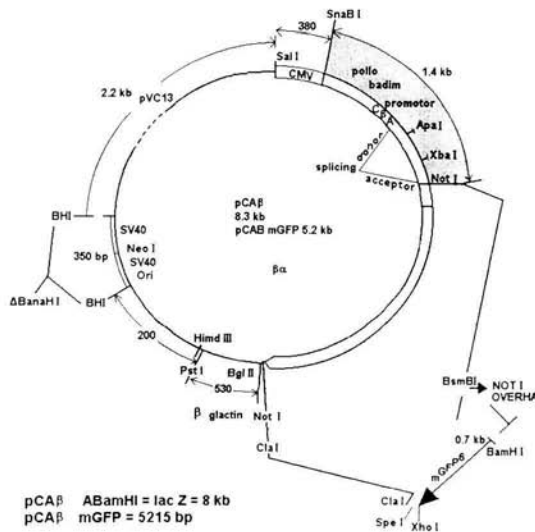


Figura 8. Dibujo que muestra los componentes del plásmido pCA β mGFP.

El método que se utilizó para producir el plásmido requerido se describe a continuación:

Transformación: Como ya se explicó, el término transformación se refiere a la introducción de ADN exógeno a una célula bacteriana. El método utilizado para transformar en este trabajo, se basó en aumentar la permeabilidad de la pared celular mediante un choque térmico.

Las bacterias que se utilizaron para clonar el plásmido pertenecen a la cepa de *E Coli* ATCC 5006 y estuvieron almacenadas a menos 70° C en tubos eppendorf de 1.5 ml (FALCON N° Cat. R3HT15N) cada uno con 100 µl.

El protocolo utilizado para la transformación fue el siguiente:

Con el fin de reducir posibles cambios biológicos de las células competentes, éstas se sacaron del REVCO e inmediatamente se colocaron sobre hielo picado. Una vez descongeladas, se mezclaron con 5 µl del plásmido pCAβmGFP y se colocaron en hielo durante 30 minutos, en "baño maría" a 37° C por 3 minutos y sumergidas en hielo durante 3 minutos.

El siguiente paso se realizó en condiciones estériles y consistió en mezclar las células competentes con 500 µl de medio Luria (LB) e incubarlas durante 30 minutos a 37° C. Posteriormente, las células competentes se centrifugaron a 1200 revoluciones por minuto durante un minuto en una centrifuga marca HERMLE con un rotor de ángulo fijo y se resuspendió la pastilla en 50 µl de sobrenadante. A continuación, se agregó la suspensión de células competentes junto con 8 perlas de vidrio en un plato de cultivo con medio Luria y ampicilina solidificada. Las perlas se agregaron con el fin de expandir por todo el plato las células competentes. Una vez homogénea la suspensión en la caja petri, se extrajeron las perlas. El control negativo se realizó de igual forma con 550 µl de medio LB. Posteriormente, el plato de cultivo experimental y el control se incubaron a 37° C y 5% de CO₂ durante 24 hrs. Cabe señalar, que el medio LB se mantiene a -4° C hasta el tiempo de uso.

Selección y crecimiento: Una vez terminada la transformación, la selección de las bacterias que incorporaron el plásmido estuvo dada por el crecimiento de las mismas. Esto se debe a que las bacterias transformadas ahora poseen un gen de resistencia a ampicilina, lo cual les permite proliferar en los platos de cultivo. Después de seleccionar las bacterias, se procedió a crecerlas en un litro de medio de cultivo de la siguiente manera:

Bajo condiciones estériles, en un tubo falcon de 15 ml se mezclaron 3 ml de medio LB con 3 µl de ampicilina y se inocularon con un barrido de bacterias transformadas. Posteriormente el tubo falcon se colocó en agitación vigorosa durante 2 horas a 37° C. Concluido el tiempo, en un matraz Elen meyer de un litro se colocaron 250 ml de medio LB junto con 250 µl de ampicilina y se vaciaron los

3 ml incubados. El matraz Elen meyer se colocó en agitación vigorosa durante toda la noche a 37° C (aproximadamente 16 hrs). El siguiente paso fue la extracción y purificación del plásmido mediante el método de purificación comercial de QUIAGEN®. Cabe señalar que la ampicilina se descongeló en hielo picado y el medio LB se colocó a temperatura ambiente una hora antes de usarse.

Método QUIAGEN® "purificación del plásmido". De manera resumida, los amortiguadores del método de QUIAGEN® (N° Cat. 1226-3) rompen la pared y membrana celular de las bacterias transformadas y remueven los diferentes organelos y/o contaminantes, de tal manera que se concentra y purifica el plásmido de interés para su obtención. El método QUIAGEN® inicia con la disolución de RNAsa (RNAsa A) en el amortiguador P1 (a una concentración final de 100 µg/ml) y con la verificación de que no existan precipitados de SDS en el amortiguador P2, así como en enfriar el amortiguador P3 a 4° C.

El protocolo para purificar el plásmido fue el siguiente:

Con el fin de coleccionar las bacterias transformadas, el medio de cultivo en crecimiento se centrifugó a 6000 revoluciones por minuto durante 5 minutos a una temperatura de 4° C, en una centrífuga marca Du Pont " Sorvall[®] ", modelo RC5B con un rotor de ángulo fijo. Una vez centrifugadas, se vació el sobrenadante, de tal manera que la pastilla se mantuviera intacta y se agregaron 10 ml del amortiguador P1 frío, resuspendiendo sin dejar grumos. A continuación se añadieron 10 ml del amortiguador P2 y se mezcló por inversión de 4 a 6 veces, inoculando a temperatura ambiente durante 5 minutos. Durante este tiempo, se atornilló la boquilla del cartucho Quiafilter y se colocó de tal forma que se mantuviera derecho.

Para precipitar la suspensión, se añadieron 10 ml del amortiguador P3 frío y se mezcló inmediatamente por inversión de 4 a 6 veces; posteriormente, la suspensión se colocó en un cartucho Quiafilter y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, tiempo durante el cual se agregaron 10 ml del amortiguador QBT a un cartucho Quiagentip y se permitió vaciar éste por gravedad. A continuación, se removió la boquilla del cartucho Quiafilter y se insertó suavemente el émbolo. La solución resultante se colectó y filtró en un cartucho Quiagentip. Posteriormente se agregaron 60 ml del amortiguador Qc, permitiendo también que el flujo pasara por gravedad. A continuación, se agregaron 15 ml del amortiguador QF y se colectó la solución resultante en un tubo falcon de 50 ml (FALCON N° Cat. 352070). Para precipitar el plásmido se agregó 10.5 ml de isopropanol a temperatura ambiente y se centrifugó a 8000 revoluciones por minuto con una centrífuga HERMLE modelo Z323K durante 45 minutos. Posteriormente, se decantó el sobrenadante y se colocó la pastilla en un tubo eppendorf de 1.5 ml (FALCON N° Cat. R3HT15N).

Con el fin de lavar la pastilla de plásmido, ésta se resuspendió en 1.5 ml de etanol al 70% y se centrifugó a 14000 revoluciones por minuto durante 15 minutos en la

misma centrífuga. A continuación, se decantó el sobrenadante y se agregó 1 ml de isopropanol, volviéndose a centrifugar a las mismas condiciones. Con el fin de lavar nuevamente la pastilla, ésta se resuspendió en un mililitro de etanol al 100% y se centrifugó a las mismas condiciones con la misma centrífuga. La pastilla final se dejó secar al aire libre durante 10 minutos y se resuspendió en 200 μ l de agua estéril libre de RNAsas (agua estéril de Pisa, COLIBA). Posteriormente se cuantificó la cantidad de plásmido mediante un espectrofotómetro a 260, 280 y 240 nm.

C) Acondicionamiento de las células antes de cada tratamiento

Cada vial tratado con ondas de choque contuvo un mililitro de medio de transfección, el cual consistió de una mezcla de células HeLa en suspensión, 10^7 células por mililitro aproximadamente, en medio OPTIMEM (GIBCO-BRL, N° Cat. 51985-034) y 12 o 30 μ g de plásmido respectivamente. El medio OPTIMEM se colocó una hora antes de su uso a 37° C y 5 % de CO₂, ésto con el fin de equilibrar las condiciones de temperatura y CO₂ con el de las células a tratar.

Las pipetas utilizadas (viales), fueron de polietileno de 4 ml (Tyco/Healthcare, KENDALL, 127P507STR). Cada grupo experimental estuvo compuesto por 4 réplicas independientes, mas su respectivo control. El número de ondas de choque aplicadas por vial varió según el grupo experimental y la frecuencia de descarga fue de 0.5 Hz (1 descarga cada 2 seg.).

Debido a que la cantidad de medio de transfección fue de 1 ml por vial con 10^7 células, se utilizó entre 3 o 4 platos de cultivo subconfluentes por réplica experimental. El tiempo total de manipulación por réplica fue de 80 a 100 minutos (desde la extracción de la incubadora, la aplicación de las ondas de choque y la colocación nuevamente en cultivo).

La metodología utilizada para el acondicionamiento celular, la aplicación de ondas de choque y su colocación nuevamente en cultivo fue la siguiente:

De igual manera que para cultivo celular, las células utilizadas por réplica experimental se bajaron de los platos de cultivo y se colocaron en un tubo falcon de 50 ml con 40 ml de DMEM-10% SFB, se mezclaron por inversión de 4 a 6 veces y se contaron con ayuda de un hemocitómetro (Figura 9). Posteriormente se centrifugaron a 1300 revoluciones por minuto durante 5 minutos en una centrífuga marca Eppendorf, modelo 5417C, de columpio. Transcurrido el tiempo de centrifugación, se aspiró el sobrenadante por vacío, de tal forma que se mantuviera intacta la pastilla. Una vez calculado el número total de células, la pastilla se diluyó en medio OPTIMEM previamente equilibrado a 5% de CO₂ y a 37° C, de tal forma de que existiera una concentración final de 10^7 células por mililitro.

A continuación, se colocó 1 ml de esta suspensión por vial experimental y control, en un tubo eppendorf de 1.5 ml. El vial experimental se mezcló con 12 o 30 μg de plásmido pCA β mGFP y se agitó por inversión de 4 a 6 veces, dejándose incubar por 1 minuto. Posteriormente, mediante una jeringa de aguja pequeña (Terumo® 5cc/ml, 21Gx32 mm, 0197), se trasladó la suspensión de los tubos eppendorf al vial control y experimental previamente etiquetados. Los viales utilizados fueron de polietileno de 4.0 ml (tyco/Healthcare, KENDALL, 127P507STR). Posteriormente se sellaron con calor.

El traslado del vial experimental y su respectivo control (células tratadas de igual forma sólo que sin plásmido) al Laboratorio de Ondas de Choque para la aplicación de ondas de choque, se realizó mediante un recipiente con agua a 37° C. Una vez aplicadas las ondas de choque, bajo condiciones estériles, en el laboratorio de cultivo celular se cortó la parte posterior del vial (pivote) con tijeras y se repartió su contenido en tres platos de cultivo de 10 cm (300 μl por plato), junto con 9 ml de medio DMEM-10% SFB por plato y se incubó a 37° C y 5% de CO₂. Cabe señalar que los viales control, se colocaron dentro de la tina del MEXILIT II⁺, fuera de la acción de las ondas de choque.

De los tres platos con células tratadas (por vial experimental), el primer plato se analizó mediante microscopía de fluorescencia a las 24 hrs, el segundo a las 48 hrs y el tercero a las 72 hrs después del tratamiento.

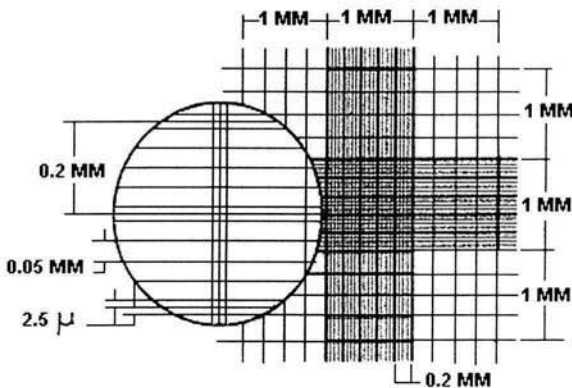


Figura 9. Dibujo que muestra las dimensiones de la cuadrícula de un hemocitómetro para el conteo de células. Para realizar un conteo de células, se cuentan las células que se localizan dentro de los cuatro cuadrantes de 4X4 cuadrados y promedian los resultados. El número total de células por mililitro se obtiene al multiplicar el valor resultante por 10^4 .

Las condiciones de cada grupo experimental fueron:

Grupo experimental 1: Cinética a 24 kV

Las variables independientes utilizadas en este grupo fueron:

Voltaje: 24 kV

Cantidad de plásmido (pCA β mGFP): 12 μ g.

Número de ondas de choque: 100, 250, 450, 700 y 1500.

Número de células tratadas por mililitro: 1×10^7 .

Frecuencia de descarga: 0.5 Hz.

Temperatura del agua a la cual se aplicaron las ondas de choque: 37°C.

Línea celular: HeLa.

Intervalo del número de células expuestas: entre 0.82×10^7 y 1.28×10^7 .

Medio de transfección: medio OPTIMEM, 1×10^7 células HeLa y 12 μ g de plásmido.

Grupo experimental 2: Cinética a 20 kV

Las variables independientes utilizadas en este grupo fueron:

Voltaje: 20 kV

Cantidad de plásmido (pCA β mGFP): 12 μ g .

Número de ondas de choque: 100, 250, 400 y 700.

Número de células tratadas por mililitro: 1×10^7 .

Frecuencia de descarga: 0.5 Hz.

Temperatura del agua a la cual se aplicaron las ondas de choque: 37°C.

Línea celular: HeLa.

Intervalo del número de células expuestas: entre 0.93×10^7 y 1.4×10^7 .

Medio de transfección: medio OPTIMEM, 1×10^7 células HeLa y 12 μ g de plásmido.

Grupo experimental 3: Efecto de la cantidad de plásmido

Las variables independientes utilizadas en este grupo fueron:

Voltaje: 20 y 24 kV

Cantidad de plásmido (pCA β mGFP): 12 y 30 μ g .

Número de ondas de choque: 100 y 250 ondas.

Número de células tratadas por mililitro: 1×10^7 .

Frecuencia de descarga: 0.5 Hz.

Temperatura del agua a la cual se aplicaron las ondas de choque: 37°C.

Línea celular: HeLa.

Intervalo del número de células expuestas: entre 1.3×10^7 y 1.6×10^7 .

Medio de transfección: medio OPTIMEM, 1×10^7 células HeLa, 12 o 30 μ g de plásmido.

D) Viabilidad celular

El número de células viables después de los tratamientos, se determinó mediante azul de tripano. El azul de tripano es una molécula coloreada de gran peso molecular que sólo es capaz de introducirse en células que tienen alteraciones en la membrana plasmática. Una célula en perfecto estado se observa incolora, mientras una célula muerta o alterada se observa de color azul.

El protocolo seguido para determinar la viabilidad celular consistió en mezclar en un tubo eppendorf de 1.5 ml (FALCON N° Cat. R3HT15N), 315 µl de PBS (1X, pH 7) y 25 µl de azul de tripano, junto con 10 µl de suspensión con células tratadas. Se agitó por inversión y se dejó incubar durante 3 minutos.

La viabilidad celular de las células tratadas se determinó al dividir el número de células vivas entre el número de células muertas, multiplicado este valor por 100. En la figura 9 se muestra la manera de como se realizó el conteo celular.

E) Eficiencia de transfección por: microscopia de fluorescencia

Considérese como eficiencia de transfección al número de células transfectadas entre el número de células totales, por cien (por observación). Para cuantificar el número de células transfectadas, se utilizó un hemocitómetro y un microscopio de fluorescencia marca OLYMPUS, modelo X150. Para ello, se contó el número de células totales con luz blanca e inmediatamente después se cambió a fluorescencia para contar el número de células fluorescentes.

La manera de contar el número de células se describe en la figura 9.

4. Generador de ondas de choque electrohidráulico

Los experimentos se realizaron con el generador de ondas de choque electrohidráulico MEXILIT II*.

Cada grupo experimental se realizó por cuadruplicado bajo los siguientes parámetros:

- Reflector: E4 (ver figura 7).
- Voltaje: 20 kV o 24 kV.
- Frecuencia: 0.5 Hz.
- Capacitancia: 80 nF.
- Conductividad del agua: 670 – 710 microsiemens / cm.
- Temperatura del agua: 37.0° C.
- Calentamiento de bujía: 100 descargas a 18 kV.

La colocación de los viales durante los experimentos se muestra en la figura 10.

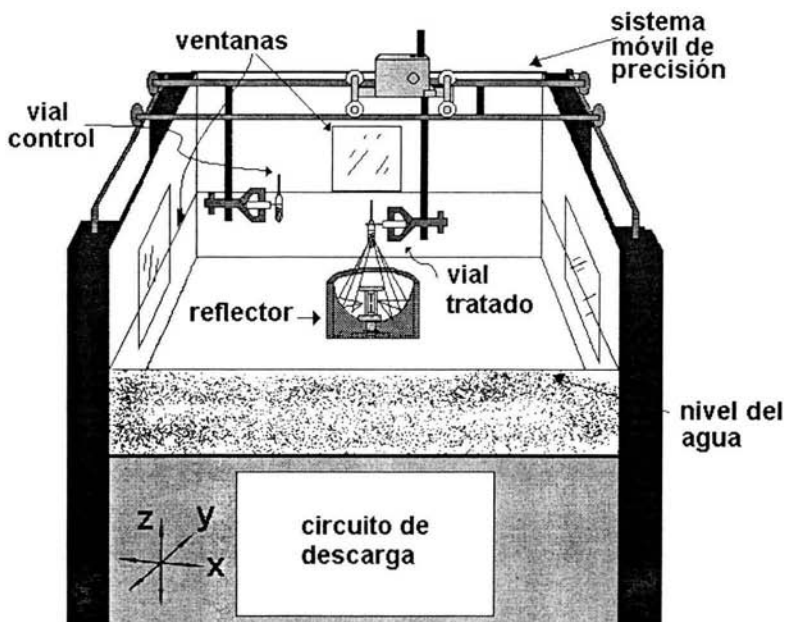


Figura 10. Dibujo que muestra el sistema de posicionamiento de los viales tratados con ondas de choque en el MEXILI II* y sus respectivos controles.

5. Transfección por liposomas

La transfección por liposomas se realizó con el objetivo de tener un control sobre la eficiencia del plásmido en las células utilizadas. El método utilizado fue el comercial, proporcionado por el proveedor de Lipofectamina™ (Reagent Lifetechologies n° catalogo: 18324-012), el cual de manera resumida consistió en:

Un día antes de la transfección, se sembraron 2×10^5 células por pozo en cajas de cultivo de 6 pozos (NUNC N° Cat. 152795) e incubaron a 37°C y 5% de CO_2 durante doce horas. Al día siguiente, se prepararon las siguientes soluciones para cada pozo en viales eppendorf de 1.5 ml (FALCON N° Cat. R3HT15N):

solución A.- 2 μg de DNA + 100 μl de OPTIMEM (GIBCO-BRL n° cat:51985-034)

solución B.- 5, 10 ó 20 μl de lipofectamina + 100 μl de OPTIMEM (GIBCO-BRL n° cat:51985-034)

Se mezclaron las dos soluciones en un solo eppendorf e incubaron durante 40 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron a cada vial 800 μl de medio OPTIMEM (GIBCO-BRL n° cat:51985-034) y se lavaron las células sembradas en los pozos con 2 ml de OPTIMEM.

A continuación se agregó la solución de los tubos eppendorf en los pozos y se incubó durante 20 hrs a 37° C y 5% de CO₂. Al término del tiempo, se cambió el OPTIMEM por 1 ml de DMEM - FBS 10%, volviendo a incubar a 37° C y 5% de CO₂ durante 48 hrs. Posteriormente, se evaluaron los extractos celulares por microscopía de fluorescencia. El método realizado para el conteo se describe en la figura 9.

6. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó por grupo experimental y en los datos en su conjunto. El tipo de variables consideradas y sus características se muestran a continuación:

Tipo de variable	Nombre	Descripción
Independientes	Voltaje	Es el voltaje con el cual se genera la onda de choque.
	Número de ondas de choque	Número de ondas de choque que se aplican por vial tratado.
	Cantidad de plásmido	Cantidad de plásmido con el cual se incuba para transfectar.
Intecurrentes	Número de células tratadas	Número de células por vial tratado.
	Cantidad de medio de disolución	Cantidad de medio en el cual se disuelven 10 ⁷ células HeLa.
	Temperatura	Temperatura del agua a la cual se aplican las ondas de choque.
	Cavitación	Formación y colapso de burbujas al paso de la onda de choque.
	Luz	Luz (visible y UV) emitida por la descarga eléctrica al formar la onda de choque.
	Contenedor del medio de disolución (vial)	Pipeta de polietileno de 4 ml, la cual contiene las células tratadas.
Emergentes	Tiempo	Tiempo que transcurre desde el acondicionamiento celular, la aplicación de las ondas de choque y el cultivo celular.
Dependientes	Células muertas por manipulación	Células no viables en el vial control.
	Células destruidas	Células no contabilizadas en el vial experimental, con respecto al vial control.
	Células no viables	Células no viables en el vial experimental.
	Células viables	Células viables en el vial experimental.
	Proliferación a las 24 hrs	Número de células viables a las 24 hrs post-tratamiento.
	Proliferación a las 48 hrs	Número de células viables a las 48 hrs post-tratamiento.
	Proliferación a las 72 hrs	Número de células viables a las 72 hrs post-tratamiento.
	Eficiencia de transfección a las 24 hrs	Número de células transfectadas entre el número de células totales por cien a las 24 hrs.
	Eficiencia de transfección a las 48 hrs	Número de células transfectadas entre el número de células totales por cien a las 48 hrs.
Eficiencia de transfección a las 72 hrs	Número de células transfectadas entre el número de células totales por cien a las 72 hrs.	

El análisis estadístico que se realizó consistió del siguiente protocolo:

I. Estadística descriptiva:

Descripción gráfica y numérica		
A) Medidas de tendencia central	<ul style="list-style-type: none">• Media• Moda• Mediana• Cuartiles	} Histograma y polígonos de frecuencia
B) Medidas de dispersión	<ul style="list-style-type: none">• Varianza• Desviación estándar• Rango• Coeficiente de variación	
C) Prueba de normalidad	<ul style="list-style-type: none">• Shapiro – Wilk	

II. Estadística inferencial:

a) Similitud entre subgrupos y grupos experimentales

prueba de hipótesis	<ul style="list-style-type: none">• ANOVAS (1, 2 y 3 vías)• Pruebas F• Prueba T
---------------------	--

b) Dependencia entre variables:

- Gráficas de dispersión y ajuste de rectas de regresión entre variables
- Coeficiente de correlación
- Coeficiente de determinación
- Pruebas de hipótesis

c) Predicción de resultados

- Coeficiente de regresión
- Pruebas de hipótesis

d) Inferencias del proceso

- Análisis por grupo
- Valoración de resultados

7. Material

El material utilizado durante los experimentos fue:

cajas petri estériles
gasas
alcohol al 75%
micropipetas mecánicas de 10, 100 y 1000 μ l
pipetas pasteur de 145 mm (14672-029)

pipetas desechables de 10 ml (FALCON N° Cat. 358551)
puntas de 10, 100 y 1000 μ l (T10-B, T100-B, T1000-B)
PBS ó H₂O estéril (pH neutro)
tripsina (GIBCO-BRL, N° Cat. 153055-014)
solución salina Balanceada de Hanks (GIBCO-BRL, N° Cat. 4170-120)
agua estéril libre de RNAsas (Agua estéril de Pisa, COLIBA)
tubos falcon de 15 y 50 ml (FALCON N° Cat. 352070)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (GIBCO-BRL, N° Cat. 11995-065)
suero fetal bovino (GIBCO-BRL, N° Cat. 16000-044)
antibióticos (GIBCO-BRL, N° Cat. 15140-148) penicilina y estreptomina.
medio OPTIMEM (GIBCO-BRL, N° Cat. 51985-034)
encendedor
etiquetas
viales de polietileno de 4.0 ml (tyco/Healthcare, KENDALL, 127P507STR)
jeringas de 10 ml (Terumo® 5cc/ml, 21Gx32 mm, 0197)
hemocitómetros
canasta para transportar viales
bolsa de polipropileno (opaca)
plastos de cultivo de 6 pozos (NUNC N° Cat. 152795)
Lipofectamina™ (Reagent Life-technologies n° catalogo: 18324-012)
Generador de ondas de choque electrohidráulico (MEXILIT II⁺)

VII. RESULTADOS (Síntesis)

Con las condiciones experimentales utilizadas⁽¹⁾, encontramos que el uso de ondas de choque permite la transfección de células HeLa (eficiencia de transfección⁽²⁾) en un rango desde 0 hasta 0.183 %. Además, los resultados indican que aplicar ondas de choque a células HeLa, afecta la viabilidad celular, en función del voltaje (kV), del número de ondas de choque y de la cantidad de plásmido con la que se incuban. A mayor voltaje y a mayor número de ondas de choque, se produce mayor daño celular al paso de la onda de choque.

El resultado más relevante de este estudio es que con las condiciones utilizadas, los parámetros más eficientes para transfectar el plásmido pCA β mGFP en células HeLa, consisten en la aplicación de 100 ondas de choque a 24 kV, o bien, 100, 250 o 400 ondas de choque a 20 kV.

Este trabajo muestra que, independientemente del voltaje usado en los tratamientos, aumentar el número de ondas de choque influye directamente en la integridad de las células tratadas (número de células destruidas y número de células no viables), en la viabilidad celular después de los tratamientos, en la proliferación celular y en la eficiencia de transfección medida a las 24, 48 y 72 hrs después del tratamiento, excepto cuando se aplican 100 o 250 ondas de choque a 20 kV. En este caso, el número de células no viables fue estadísticamente el mismo. Asimismo este estudio demuestra que independientemente del número de ondas de choque aplicadas y del voltaje utilizado en los tratamientos, aumentar la cantidad de plásmido siempre reduce el daño celular e incrementa el número de células viables después de los tratamientos. Sin embargo, no ocurrió un incremento de eficiencia de transfección estadísticamente significativo en ningún tiempo medido, 24, 48 o 72 hrs después del tratamiento.

Referente a la eficiencia de transfección medida a las 24, 48 y 72 hrs después del tratamiento, los resultados indican que ésta depende del número de ondas de choque y del voltaje utilizado en los tratamientos, más no del efecto secundario que confiere el plásmido (mayor número de células viables). Este estudio muestra que la eficiencia de transfección medida a las 24, 48 y 72 hrs, estadísticamente es la misma.

En lo que respecta al número de células tratadas, los resultados de este estudio muestran que no está relacionada con la eficiencia de transfección medida a las 24, 48 o 72 hrs.

Respecto a la transfección por liposomas, existe mayor eficiencia de transfección al utilizar 2 μ g de ADN y 10 μ l de lipofetamina.

¹ Las condiciones usadas por experimento se describen en la sección de métodos.

² Considérese como eficiencia de transfección al número de células transfectadas entre el número de células totales por cien (por observación).

EFICIENCIA DE TRANSFECCIÓN

Efecto del número de ondas de choque

El efecto que tiene el número de ondas de choque sobre el porcentaje de células transfectadas a las 24, 48 y 72 hrs depende del voltaje utilizado y de la cantidad de plásmido con la que se transfecta.

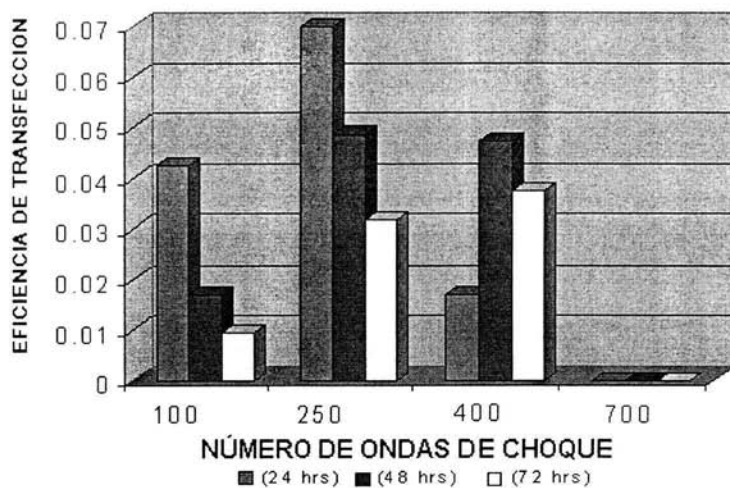
Los resultados demuestran que las ondas de choque generadas con un voltaje de 20 kV, pueden transfectar células HeLa al aplicar 100, 250 o 400 ondas. La distribución de los datos indica que con 100 y 250 ondas de choque el porcentaje de células transfectadas (eficiencia de transfección), disminuye conforme al tiempo de observación (Figura 11A y Tabla 1), y que la eficiencia de transfección medida a las 48 y 72 hrs es muy similar al aplicar 250 o 400 ondas de choque. En lo concerniente a la relación estadística entre el número de ondas de choque y la eficiencia de transfección, los resultados indican que a mayor número de ondas de choque, menor es la eficiencia de transfección medida a las 24, 48 y 72 hrs (Tabla 2). Respecto a la semejanza entre aplicar 100, 250 o 400 ondas de choque, los resultados señalan que, independientemente de su número, los resultados no son distintos en los tiempos medidos.

Referente a los resultados en donde se utiliza un voltaje de 24 kV, únicamente se observa transfección al aplicar 100 ondas de choque. La mayor eficiencia se presenta a las 24 hrs y la menor a las 72 hrs después del tratamiento (Figura 11B y Tabla 1). En la tabla 2, se presentan los valores referentes al coeficiente de correlación y a la probabilidad de F, los cuales indican que la eficiencia de transfección medida a las 24 hrs depende del número de ondas de choque. Cabe señalar que si se comparan los valores obtenidos al aplicar 100 ondas a 20 kV con los de 24 kV, la eficiencia de transfección es mayor al utilizar el voltaje de 24 kV en todos los tiempos medidos.

Al analizar los datos en su conjunto (20 y 24 kV), los resultados indican que conforme aumenta el tiempo de observación, aumenta la dependencia entre el número de ondas de choque y la eficiencia de transfección, además de que, independientemente del número de ondas de choque aplicadas, estadísticamente la eficiencia de transfección es la misma a las 24, 48 y 72 hrs (Tabla 3). Cabe señalar que los estadísticos indican una correlación inversamente proporcional que no puede atribuirse al azar a un nivel de significancia de 0.05 únicamente entre el número de ondas de choque y la eficiencia de transfección a las 48 y 72 hrs.

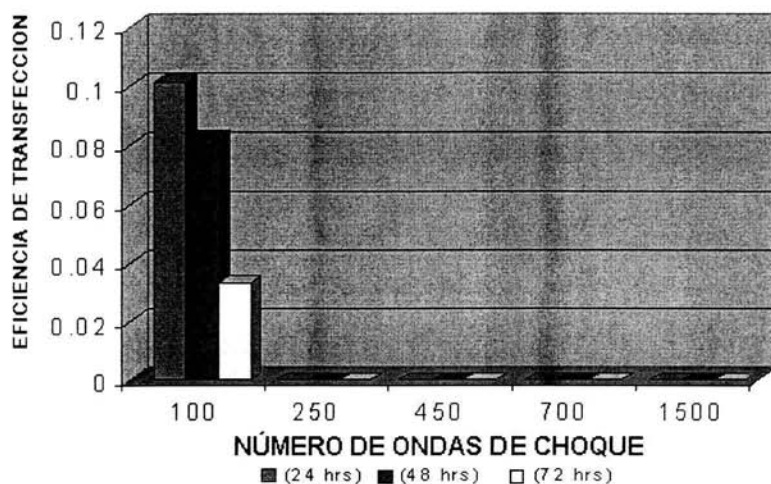
Respecto al análisis de los datos al utilizar como variable independiente el número de células tratadas, los estadísticos no indican resultados diferentes a los anteriores. La probabilidad de F es: 0.138, 0.139 y 0.137 para la eficiencia de transfección medida a las 24, 48 y 72 hrs respectivamente.

EFFECTO DE TRANSFECCIÓN A 20 kV



A

EFFECTO DE TRANSFECCIÓN A 24 kV



B

Figura 11. Gráficas que muestran la eficiencia de transfección a las 24, 48 y 72 hrs, después de aplicar: A) 100, 250, 400 y 700 ondas de choque a 20 kV y B) 100, 250, 450, 700 y 1500 de ondas de choque a 24 kV. Los valores mostrados en estas gráficas son el promedio de cuatro réplicas independientes por grupo experimental.

	Eficiencia de transfección 20 kV			Eficiencia de transfección 24 kV		
	Tiempo (hrs)			Tiempo (hrs)		
	24	48	72	24	48	72
100 ondas de choque / 12 µg de plásmido						
Media	0.0423	0.0169	0.0095	0.0332	0.0606	0.0638
Varianza	0.0014	0.0002	0.0001	0.0000	0.0016	0.0005
Desviación estándar	0.0375	0.0143	0.0077	0.0051	0.0395	0.0221
Coefficiente de variación	0.8854	0.8490	0.8125	0.1525	0.6523	0.3471
Máximo	0.0955	0.0368	0.0197	0.0397	0.1096	0.0952
Mínimo	0.0084	0.0050	0.0032	0.0279	0.0192	0.0476
100 ondas de choque / 30 µg de plásmido						
Media	-----	-----	-----	0.0477	0.0363	0.0270
Varianza	-----	-----	-----	0.0011	0.0002	0.0001
Desviación estándar	-----	-----	-----	0.0326	0.0144	0.0121
Coefficiente de variación	-----	-----	-----	0.6828	0.3972	0.4482
Máximo	-----	-----	-----	0.0948	0.0539	0.0425
Mínimo	-----	-----	-----	0.0256	0.0243	0.0141
250 ondas de choque / 12 µg de plásmido						
Media	0.0634	0.0410	0.0226	0.0000	0.0000	0.0000
Varianza	0.0054	0.0002	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000
Desviación estándar	0.0733	0.0154	0.0110	0.0000	0.0000	0.0000
Coefficiente de variación	1.1559	0.3755	0.4870	0.0000	0.0000	0.0000
Máximo	0.1831	0.0810	0.0704	0.0000	0.0000	0.0000
Mínimo	0.0100	0.0173	0.0065	0.0000	0.0000	0.0000
250 ondas de choque / 30 µg de plásmido						
Media	0.0657	0.0596	0.0315	-----	-----	-----
Varianza	0.0055	0.0028	0.0003	-----	-----	-----
Desviación estándar	0.0741	0.0532	0.0160	-----	-----	-----
Coefficiente de variación	1.1279	0.8930	0.5074	-----	-----	-----
Máximo	0.1766	0.1359	0.0496	-----	-----	-----
Mínimo	0.0242	0.0216	0.0178	-----	-----	-----
400 ondas de choque / 12 µg de plásmido						
Media	0.0169	0.0469	0.0374	-----	-----	-----
Varianza	0.0001	0.0003	0.0001	-----	-----	-----
Desviación estándar	0.0081	0.0170	0.0099	-----	-----	-----
Coefficiente de variación	0.4798	0.3628	0.2659	-----	-----	-----
Máximo	0.0278	0.0620	0.0476	-----	-----	-----
Mínimo	0.0087	0.0238	0.0238	-----	-----	-----
450 ondas de choque / 12 µg de plásmido						
Media	-----	-----	-----	0.0000	0.0000	0.0000
Varianza	-----	-----	-----	0.0000	0.0000	0.0000
Desviación estándar	-----	-----	-----	0.0000	0.0000	0.0000
Coefficiente de variación	-----	-----	-----	0.0000	0.0000	0.0000
Máximo	-----	-----	-----	0.0000	0.0000	0.0000
Mínimo	-----	-----	-----	0.0000	0.0000	0.0000

Tabla 1. (continua)

Tabla 1. (continuación)

700 ondas de choque / 12 μ g de plásmido	Eficiencia de transfección 20 kV			Eficiencia de transfección 24 kV		
	Tiempo (hrs)			Tiempo (hrs)		
	24	48	72	24	48	72
Media	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Varianza	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Desviación estándar	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Coefficiente de variación	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Máximo	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Mínimo	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
1500/CP1						
Media	-----	-----	-----	0.0000	0.0000	0.0000
Varianza	-----	-----	-----	0.0000	0.0000	0.0000
Desviación estándar	-----	-----	-----	0.0000	0.0000	0.0000
Coefficiente de variación	-----	-----	-----	0.0000	0.0000	0.0000
Máximo	-----	-----	-----	0.0000	0.0000	0.0000
Mínimo	-----	-----	-----	0.0000	0.0000	0.0000

Tabla 1. Estadística descriptiva de la eficiencia de transfección medida a las 24, 48 y 72 hrs, después de aplicar 100, 250, 400, 700 y 1500 ondas de choque a 20 y 24 kV. Los resultados que se muestran en esta tabla son el promedio de cuatro réplicas independientes.

Variable independiente	Voltaje	Tiempo (hrs)	Coefficiente de correlación	>Prob F
# ondas de choque	20 kV	24	-0.3644	0.1775
		48	-0.1309	0.5431
		72	-0.0678	0.7910
# ondas de choque	24 kV	24	-0.5071	0.0778
		48	-0.5071	0.0669
		72	-0.5071	0.0582

Tabla 2. Valores de correlación y de probabilidad de F entre ondas de choque aplicadas a 20 kV y 24 kV y la eficiencia de transfección medida a las 24, 48 y 72 hrs sobre células HeLa. En el coeficiente de correlación, el signo negativo implica que la relación entre la variable independiente y la variable dependiente es inversamente proporcional. En el caso de los valores del coeficiente de correlación, en cuanto más se acerque el valor a uno, mayor es la correlación entre las variables. En el caso del estadístico F, entre más se acerque a cero, mayor es la probabilidad entre la variable independiente y la variable dependiente. El nivel de significancia utilizado en todas las pruebas fue de 0.05.

Variable independiente	Voltaje (kV)	Tiempo (hrs)	Coefficiente de correlación	>Prob F
# ondas de choque	20 y 24	24	-0.3007	0.0705
		48	-0.3410	0.0388
		72	-0.3684	0.0249

Tabla 3. Valores de correlación y de probabilidad de F entre el número de ondas de choque y la eficiencia de transfección medida a las 24, 48 y 72 hrs sobre células HeLa. El nivel de significancia utilizado en todas las pruebas fue de 0.05.

Efecto del voltaje

El efecto que tiene el voltaje sobre el número de células transfectadas a las 24, 48 y 72 hrs depende del número de ondas de choque aplicadas y de la cantidad de plásmido con la que se incubó.

Como se observa en las figuras 11A y 11B, cuando se utiliza un voltaje de 24 kV para generar ondas de choque, se reduce el número de ondas con las que se pueden transfectar. La eficiencia de transfección es mayor al aplicar 100 ondas de choque a 24 kV para todos los tiempos medidos.

Al analizar los datos después de aplicar 100 ondas de choque a 24 kV y 250 ondas de choque a 20 kV (condiciones en las cuales se obtuvo mayor eficiencia de transfección), los estadísticos indican que existe mayor eficiencia de transfección a las 72 hrs cuando se utiliza 24 kV, además de que la eficiencia de transfección medida a las 24 y 48 hrs no depende del voltaje (Tabla 4).

Respecto al análisis de los datos en su conjunto (20 y 24 kV), a diferencia de los resultados anteriores, estos indican que los valores de voltaje no se relacionan con los valores de eficiencia de transfección en ningún tiempo medido (correlación), además de que existe una muy leve tendencia a incrementarse la eficiencia de transfección a las 72 hrs conforme aumenta el voltaje (Tabla 5). Cabe señalar que, al utilizar el número de células tratadas como variable independiente, los resultados no son diferentes a los descritos (Tabla 6).

Referente a la semejanza estadística entre aplicar 20 o 24 kV y diferente número de ondas de choque, los resultados demuestran que estadísticamente la eficiencia de transfección es la misma a las 24, 48 y 72 hrs cuando se generan las ondas de choque con un voltaje de 20 o 24 kV. Sin embargo, si se compara la eficiencia de transfección cuando se aplican 100 ondas de choque a 20 kV, con la eficiencia de transfección al aplicar de 100 ondas de choque a 24 kV, se muestran diferencias significativas.

Variable independiente	Tiempo (hrs)	Coefficiente de correlación	>Prob F
Voltaje	24	-0.2145	0.4250
	48	0.0284	0.9168
	72	0.4961	0.0506

Tabla 4. Valores de correlación y de probabilidad de F entre el voltaje y la eficiencia de transfección medida a las 24, 48 y 72 hrs sobre células HeLa, al utilizar 100 y 250 ondas de choque a 20 y 24 kV. Los resultados se obtuvieron al analizar cuatro réplicas independientes por grupo experimental. El nivel de significancia utilizado en todas las pruebas fue de 0.05.

Variable independiente	Tiempo (hrs)	Coefficiente de correlación	>Prob F
Voltaje	24	-0.1168	0.4910
	48	0.0008	0.9959
	72	0.1649	0.3293

Tabla 5. Valores de correlación y de probabilidad de F entre el voltaje y la eficiencia de transfección medida a las 24, 48 y 72 hrs sobre células HeLa, al utilizar todos los datos generados a 20 y 24 kV. Los resultados se obtuvieron al analizar cuatro réplicas independientes por grupo experimental. El nivel de significancia utilizado en todas las pruebas fue de 0.05.

Variable independiente	Tiempo (hrs)	>Prob F
Voltaje	24	0.7795
	48	0.6773
	72	0.7004

Tabla 6. Valores de probabilidad de F entre el voltaje y la eficiencia de transfección medida a las 24, 48 y 72 hrs al utilizar como variable independiente el número de células tratadas. Los resultados se obtuvieron al analizar cuatro réplicas independientes por grupo experimental. El nivel de significancia utilizado en todas las pruebas fue de 0.05.

Efecto de la cantidad de plásmido ($pCA\beta mGFP$)

El efecto que tiene la cantidad de plásmido (12 o 30 μg), sobre la eficiencia de transfección depende del número de ondas de choque y del voltaje utilizado para generar las ondas de choque (Figura 12).

Al comparar la eficiencia de transfección obtenida después de aplicar 100 ondas de choque a 24 kV con la eficiencia de transfección obtenida después de aplicar 250 ondas de choque a 20 kV, cada uno con 12 o 30 μg de plásmido, los resultados indican que a mayor cantidad de plásmido, mayor es la eficiencia de transfección a las 24 hrs. La eficiencia de transfección a las 48 y 72 hrs depende del voltaje utilizado, así como del número de ondas de choque. Asimismo y, aunque no se aprecia correlación significativa entre la cantidad de plásmido y la eficiencia de transfección a ningún tiempo medido (Tabla 7), al considerar el número de células como variable independiente, la eficiencia de transfección a las 24, 48 y 72 hrs depende fuertemente de la cantidad del plásmido (Tabla 8).

Al comparar la eficiencia de transfección que se obtiene al utilizar 12 o 30 μg de plásmido, los resultados indican que estadísticamente la eficiencia de transfección es la misma a las 24 y 48 hrs; sin embargo, esto no es claro en el porcentaje de células transfectadas a las 72 hrs (Tabla 9).

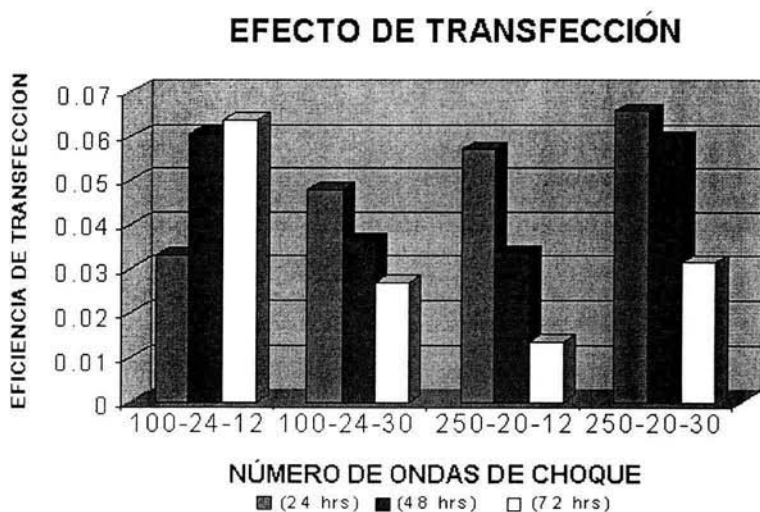


Figura 12. Gráfica y tabla que muestran la eficiencia de transfección al aplicar 100 o 250 ondas de choque con 12 o 30 μg de plásmido. Los resultados de esta gráfica son el producto del promedio de cuatro réplicas independientes.

En lo que respecta al análisis de todos los datos en su conjunto (20 y 24 kV), los resultados demuestran que a un nivel de significancia de 0.05, no existe

correlación entre la cantidad de plásmido y la eficiencia de transfección que no pueda atribuirse al azar.

Al analizar los datos utilizando al número de células tratadas como variable independiente, los resultados indican que existe significancia entre la cantidad de plásmido y la eficiencia de transfección a las 72 hrs, es decir, a mayor cantidad de plásmido, mayor es el número de células transfectadas (Tabla 10).

Variable independiente	Tiempo (hrs)	Coefficiente de correlación	>Prob F
Cantidad de plásmido	24	0.1016	0.4250
	48	0.0385	0.9168
	72	-0.2383	0.0506

Tabla 7. Valores de correlación y de probabilidad de F entre la cantidad de plásmido y la eficiencia de transfección medida a las 24, 48 y 72 hrs, al utilizar 100 o 250 ondas de choque a un voltaje de 20 y 24 kV, con 12 o 30 μg de plásmido. Los resultados se obtuvieron al analizar cuatro réplicas independientes. El nivel de significancia utilizado en todas las pruebas fue de 0.05.

Variable independiente	Tiempo (hrs)	>Prob F
Cantidad de plásmido	24	0.0517
	48	0.0578
	72	0.0241

Tabla 8. Valores de probabilidad de F entre la cantidad de plásmido y la eficiencia de transfección medida a las 24, 48 y 72 hrs, utilizando 100 o 250 ondas de choque a un voltaje de 20 y 24 kV, con 12 o 30 μg de plásmido. Los resultados se obtuvieron al analizar cuatro réplicas independientes. El nivel de significancia utilizado en todas las pruebas fue de 0.05.

Variable independiente	Tiempo (hrs)	Coefficiente de correlación	>Prob F
Cantidad de plásmido	24	0.1405	0.4068
	48	0.1066	0.5927
	72	0.2998	0.8604

Tabla 9. Valores de correlación y de probabilidad de F entre la cantidad de plásmido y la eficiencia de transfección medida a las 24, 48 y 72 hrs, al utilizar todos los datos generados a 20 y 24 kV con 12 o 30 μg de plásmido. Los resultados se obtuvieron al analizar cuatro réplicas independientes. El nivel de significancia utilizado en todas las pruebas fue de 0.05.

Variable independiente	Tiempo (hrs)	>Prob F
Cantidad de plásmido	24	0.2842
	48	0.3623
	72	0.0960

Tabla 10. Valores de probabilidad de F entre la cantidad de plásmido y la eficiencia de transfección medida a las 24, 48 y 72 hrs al utilizar como variable independiente el número de células tratadas. Los resultados se obtuvieron al analizar todos los datos generados y el nivel de significancia utilizado en todas las pruebas fue de 0.05.

DAÑO CELULAR

Efecto del número de ondas de choque

El efecto que produce el número de ondas de choque sobre la integridad de la célula HeLa depende del voltaje y de la cantidad de plásmido con la que se incubaba. Después de aplicar ondas de choque se observa desintegración celular, células no viables y células viables.

En comparación a cuando se aplican ondas de choque generadas a 20 kV, al aplicar 100, 250, 450, 700 o 1500 ondas de choque generadas a 24 kV, el porcentaje de células destruidas es directamente proporcional al número de ondas de choque aplicadas e inversamente proporcional al porcentaje de células no viables y viables, excepto por un aumento de células viables cuando se aplican 250 ondas (Figura 13 y Tabla 11). En la tabla 12 se muestran los estadísticos que indican (al igual que en la figura 13), que conforme se incrementa el número de ondas de choque, aumenta el porcentaje de células destruidas y disminuye el porcentaje de células no viables, y el porcentaje de células viables. Cabe señalar que al considerar el número de células tratadas como variable independiente, los resultados también señalan la misma relación, excepto para el número de células viables (Tabla 13). Referente a la semejanza estadística al aplicar 100, 250, 450, 700 o 1500 ondas de choque, con una F calculada de 6.67 y una F de tablas de 3.23; se acepta la hipótesis de que únicamente hay diferencias significativas en el número de células viables después de los tratamientos; es decir, se produce el mismo porcentaje de células destruidas y de células no viables cuando se aplican ondas de choque a 24 kV, independientemente del número de ondas choque.

Con respecto a las ondas de choque generadas a 20 kV (Figura 14), al aplicar 100, 250, 400 o 700 ondas de choque, se genera una distribución de los datos que indican que el porcentaje de células destruidas no se relaciona directamente con el número de ondas de choque. La distribución de los datos muestra que existe un mayor daño cuando se aplican 400 o 700 ondas de choque y menos daño cuando se aplican 250 ondas de choque. Referente a la relación estadística entre el número de ondas de choque y el daño celular, no existe correlación alguna, sin embargo, existe una muy leve relación inversamente proporcional entre el porcentaje de células viables y no viables respectivamente y el número de ondas de choque (Tabla 14). Cabe señalar que los mismos resultados se observan al considerar el número de células tratadas como variable independiente (Tabla 15)

Analizando los resultados en su conjunto (20 y 24 kV), en la tabla 16 se presentan los valores que demuestran que conforme aumenta el número de ondas de choque, se incrementa el porcentaje de células destruidas y disminuye el porcentaje de células viables. Cabe señalar que esto también se observa cuando se utiliza el número de células tratadas como variable independiente (Tabla 17). La prueba F indica que al aplicar 100 o 250 ondas de choque se produce igual porcentaje de células no viables. Cuando se aplican 250 o 400 ondas de choque, se produce igual porcentaje de células destruidas y células viables.

100 ondas de choque / 12 µg de plásmido	Daño celular 20 kV			Daño celular 24 kV		
	Porcentaje (%)			Porcentaje (%)		
	Destruídas	No viables	Viables	Destruídas	No viables	Viables
Media	47.7284	13.4806	38.7911	37.0017	14.0065	48.9918
Varianza	288.3448	66.9609	143.1989	417.2198	57.4591	339.8761
Desviación estándar	16.9807	8.1830	11.9666	20.4260	7.5802	18.4357
Coefficiente de variación	0.3558	0.6070	0.3085	0.5520	0.5412	0.3763
Máximo	60.9347	22.7848	56.7164	67.5958	25.3012	63.7339
Mínimo	25.3731	6.1795	32.0178	25.7028	9.4077	22.9965
100 ondas de choque / 30 µg de plásmido						
Media	-----	-----	-----	21.2074	11.8119	66.9807
Varianza	-----	-----	-----	638.6922	16.0779	514.1417
Desviación estándar	-----	-----	-----	25.2724	4.0097	22.6747
Coefficiente de variación	-----	-----	-----	1.1917	0.3395	0.3385
Máximo	-----	-----	-----	58.8119	16.9118	83.2827
Mínimo	-----	-----	-----	5.8824	7.7228	33.4653
250 ondas de choque / 12 µg de plásmido						
Media	34.8088	14.9987	50.1925	71.4236	13.0565	17.5198
Varianza	224.6399	95.2758	409.5671	1.8789	8.3989	6.2256
Desviación estándar	14.9880	9.7609	20.2378	1.3707	2.8981	2.4951
Coefficiente de variación	0.4306	0.6508	0.4032	0.0192	0.2220	0.1424
Máximo	69.0326	34.3750	77.6062	72.9303	16.2299	20.3598
Mínimo	5.7915	5.1282	25.1739	70.2503	10.5499	15.6798
250 ondas de choque / 30 µg de plásmido						
Media	34.9462	18.9060	46.1478	-----	-----	-----
Varianza	127.7002	42.0223	84.0745	-----	-----	-----
Desviación estándar	11.3005	6.4825	9.1692	-----	-----	-----
Coefficiente de variación	0.3234	0.3429	0.1987	-----	-----	-----
Máximo	51.4599	28.3019	54.9180	-----	-----	-----
Mínimo	27.0492	14.0511	34.4891	-----	-----	-----
400 ondas de choque / 12 µg de plásmido						
Media	50.7287	9.5677	39.7036	-----	-----	-----
Varianza	214.0444	115.029	46.7297	-----	-----	-----
Desviación estándar	14.6303	10.7252	6.8359	-----	-----	-----
Coefficiente de variación	0.2884	1.1210	0.1722	-----	-----	-----
Máximo	66.4835	25.6506	44.7368	-----	-----	-----
Mínimo	31.2268	3.8462	29.6703	-----	-----	-----
450 ondas de choque / 12 µg de plásmido						
Media	-----	-----	-----	89.2012	3.0866	7.2658
Varianza	-----	-----	-----	2.2737	2.2737	6.2337
Desviación estándar	-----	-----	-----	1.5079	1.5079	2.4967
Coefficiente de variación	-----	-----	-----	0.0169	0.4885	0.3150
Máximo	-----	-----	-----	90.9668	4.7333	10.2399
Mínimo	-----	-----	-----	88.0068	1.7733	5.2799

Tabla 1. (continua)

Tabla 1. (continuación)

700 ondas de choque / 12 µg de plásmido	Daño celular 20 kV			Daño celular 24 kV		
	Porcentaje (%)			Porcentaje (%)		
	Destruídas	No viables	Viables	Destruídas	No viables	Viables
Media	50.1611	24.7088	25.9601	97.2467	1.1367	3.7533
Varianza	0.5118	0.0282	0.3922	5.2900	0.5280	15.1900
Desviación estándar	0.7154	0.1680	0.6262	2.3000	0.7267	3.8974
Coefficiente de variación	0.0143	0.0068	0.0241	0.0237	0.6393	1.0384
Máximo	50.6669	24.8276	26.4029	99.5467	1.6100	8.0533
Mínimo	49.6552	24.5900	25.5172	94.9467	0.3000	0.4533
1500/CP1						
Media	-----	-----	-----	97.5309	1.5679	1.2346
Varianza	-----	-----	-----	3.6864	2.0997	3.6864
Desviación estándar	-----	-----	-----	1.9200	1.4490	1.9200
Coefficiente de variación	-----	-----	-----	0.0197	0.9242	1.5552
Máximo	-----	-----	-----	99.4509	3.1546	3.1546
Mínimo	-----	-----	-----	95.6109	0.3146	0.6854

Tabla 11. Estadística descriptiva del daño celular medida a las 24, 48 y 72 hrs, después de aplicar 100, 250, 400, 700 y 1500 ondas de choque a 20 y 24 kV. Los resultados que se muestran en esta tabla son el promedio de cuatro réplicas independientes.

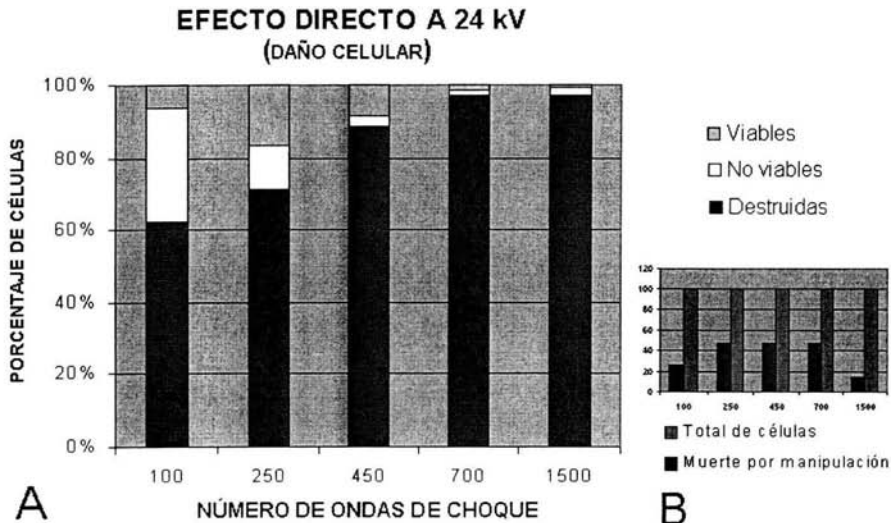


Figura 13. A) Gráfica que muestra el porcentaje de células destruidas, no viables y viables después de aplicar 100, 250, 450, 700 y 1500 ondas de choque a 24 kV y B) Gráfica que muestra el porcentaje de células muertas por manipulación después de aplicar 100, 250, 450, 700 y 1500 ondas de choque a 24 kV. Los valores mostrados en estas gráficas son el promedio de cuatro réplicas independientes por grupo experimental.

Variable independiente	Daño celular (% células)	Coefficiente correlación	Coefficiente de regresión	>Prob F
# ondas choque	Destruídas	0.7994	$y=69.600795+0.023093245(x)$	0.0055
	no viables	-0.6663	$y=19.174639-0.01598013(x)$	0.0354
	Viables	-0.6523	$y=11.224566-0.00711311(x)$	0.0409

Tabla 12. Valores de correlación y de probabilidad de F entre el número de ondas de choque y el porcentaje de células destruidas, células no viables y células viables, después de aplicar 100, 250, 450, 700 y 1500 ondas de choque a 24kV a células HeLa. El nivel de significancia utilizado en todas las pruebas fue de 0.05. Los resultados son producto del promedio de cuatro réplicas independientes.

Variable independiente	Daño celular (# células)	>Prob F
# ondas de choque	Destruídas	0.0042
	no viables	0.0133
	Viables	0.2236

Tabla 13. Efecto de las ondas de choque generadas a 24 kV sobre células HeLa, al utilizar como variable independiente el número de células tratadas. Probabilidad de F entre el número de ondas de choque y daño celular. El nivel de significancia utilizado en todas las pruebas fue de 0.05. Los resultados obtenidos en esta tabla son el promedio de cuatro réplicas independientes por grupo experimental.

EFFECTO DIRECTO A 20 kV (DAÑO CELULAR)

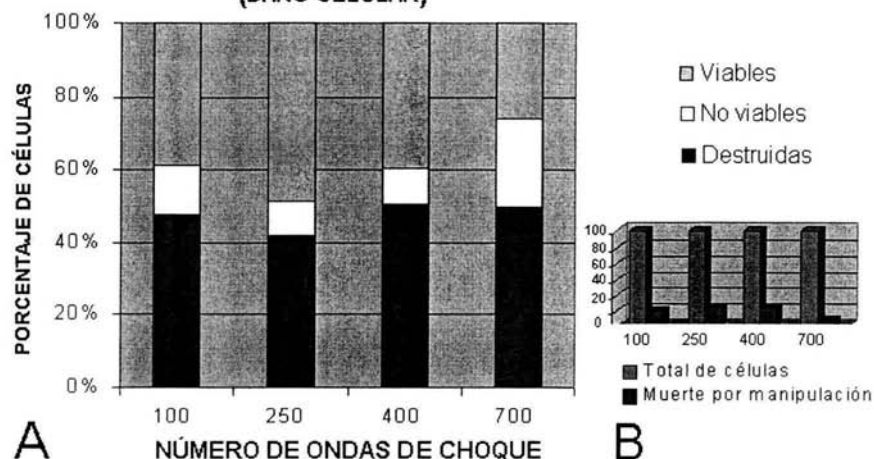


Figura 14. A) Gráfica que muestra el porcentaje de células destruidas, no viables y viables después de aplicar 100, 250, 400 y 700 ondas de choque a 20 kV y B) Gráfica que muestra el porcentaje de células muertas por manipulación después de aplicar 100, 250, 400 y 700 ondas de choque a 20 kV. Los valores mostrados en estas gráficas son el promedio de cuatro réplicas independientes por grupo experimental.

Variable independiente	Daño celular (% células)	Coefficiente correlación	>Prob F
# ondas choque	destruidas	0.1468	0.5873
	no viables	0.3577	0.1737
	viables	-0.3484	0.1860

Tabla 14. Valores de correlación y de probabilidad de F entre el número de ondas de choque y el porcentaje de células destruidas, células no viables y células viables, después de aplicar 100, 250, 400 y 700 ondas de choque a 20kV, sobre células HeLa. El nivel de significancia utilizado en todas las pruebas fue de 0.05. Los resultados son producto del promedio de cuatro réplicas independientes.

Variable independiente	Daño celular (# células)	>Prob F
# ondas de choque	Destruídas	0.7263
	no viables	0.1877
	Viables	0.1908

Tabla 15. Efecto de las ondas de choque sobre células HeLa, cuando se utiliza como variable independiente el número de células tratadas. Probabilidad de F entre el número de ondas de choque a 20 kV y el daño celular. El nivel de significancia utilizado en todas las pruebas fue de 0.05. Los resultados obtenidos en esta tabla son el promedio de cuatro réplicas independientes por grupo experimental.

Variable independiente	Daño celular (% células)	Coefficiente correlación	Coefficiente de regresión	>Prob F
# ondas choque	destruidas	0.5318	$Y=29.4243741+0.0485489(x)$	0.0007
	no viables	-0.2170	No es significativo	0.1969
	viables	-0.5023	$Y=54.657652+-0.04108081(x)$	0.0015

Tabla 16. Valores de correlación y de probabilidad de F entre aplicar 100, 250, 400, 450, 700 y 1500 ondas de choque a 20 y 24 kV y el porcentaje de células destruidas, células no viables y células viables, sobre células HeLa. El nivel de significancia utilizado en todas las pruebas fue de 0.05. Los resultados son producto del promedio de cuatro réplicas independientes.

Variable independiente	Daño celular (# células)	>Prob F
# ondas de choque	destruidas	0.0020
	no viables	0.1729
	viables	0.0056

Tabla 17. Efecto de las ondas de choque sobre células HeLa cuando se utiliza como variable independiente el número de células tratadas. Probabilidad de F entre el número de ondas de choque y el daño celular. El nivel de significancia utilizado en todas las pruebas fue de 0.05. Los resultados obtenidos en esta tabla son el promedio de cuatro réplicas independientes por grupo experimental.

Efecto del voltaje

Como se puede observar en la figura 13 y 14, el efecto del voltaje sobre la integridad de las células HeLa depende del número de ondas de choque y de la cantidad de plásmido con la se incuba para transfectar (Figura 15). A mayor voltaje y a mayor número de ondas de choque, mayor es el número de células destruidas y mayor es el número de células no viables después de los tratamientos.

Al aplicar 100 ondas de choque a 24 kV y 250 ondas de choque a 20 kV, la distribución de los datos indican que se produce menos daño celular al utilizar un voltaje de 20 kV, sin embargo, el número de células muertas por manipulación es mayor (Figura 15). Respecto a la relación estadística entre el voltaje y el daño celular, los resultados indican que el voltaje esta directamente relacionado con el porcentaje de células no viables, más no con el porcentaje de células destruidas y células viables. A mayor voltaje, menor porcentaje de células no viables (Tabla 18).

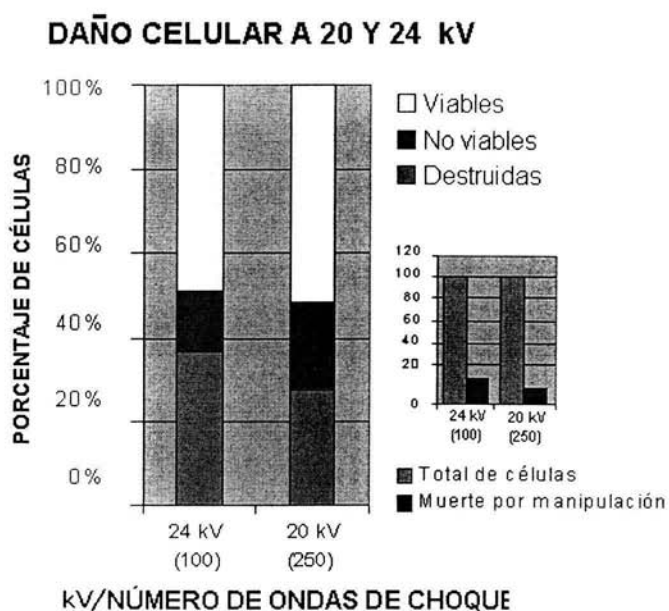


Figura 15. Gráfica que muestra el porcentaje de células destruidas, no viables y viables después de aplicar 100 ondas de choque a 24 kV y 250 ondas de choque a 20 kV, ambos con 12 µg de plásmido. Los valores mostrados en esta gráfica son producto de cuatro réplicas independientes.

Referente al análisis de los datos en su conjunto (20 y 24 kV), los resultados indican que no existe ninguna correlación estadística entre el voltaje y el daño celular (Tabla 19), sin embargo, la probabilidad de F muestra una muy pequeña

relación - directamente proporcional - entre el voltaje y el porcentaje de células destruidas, además de una relación inversamente proporcional entre el voltaje y el porcentaje de células no viables. Cabe señalar, que al utilizar el número de células tratadas como variable independiente, los resultados son similares a los anteriormente descritos (Tabla 20). Con respecto a la semejanza estadística entre aplicar 100, 250, 400 o 700 ondas de choque de choque a 20 o 24 kV, los resultados indican que no existen diferencias significativas al aplicar 100, 250, 400 o 700 ondas de choque a 20 kV o 24 kV, más sí cuando, se compara el efecto entre 20 o 24 kV a cualquier número de ondas de choque.

Variable independiente	Daño celular (% células)	Coefficiente correlación	>Prob F
Voltaje	Destruídas	-0.0654	0.8868
	No viables	-0.4674	0.0830
	Viables	0.2525	0.4166

Tabla 18. Coeficiente de correlación y de probabilidad de F entre el número de ondas de choque y el porcentaje de células destruidas, porcentaje de células no viables y porcentaje de células viables al utilizar 100 y 250 ondas de choque a un voltaje de 24 y 20 kV respectivamente, sobre células HeLa. El nivel de significancia utilizado en todas las pruebas fue de 0.05. Los resultados son producto del promedio de cuatro réplicas independientes.

Variable independiente	Daño celular (% células)	Coefficiente correlación	>Prob F
Voltaje	Destruídas	0.2015	0.2316
	No viables	-0.1840	0.2754
	Viables	-0.1518	0.3695

Tabla 19. Efecto directo al utilizar 100, 250, 400, 450, 700 y 1500 ondas de choque a un voltaje de 20 y 24 kV, sobre células HeLa. Coeficiente de correlación y probabilidad de F, entre el número de ondas de choque y el porcentaje de células destruidas, porcentaje de células no viables y porcentaje de células viables. El nivel de significancia utilizado en todas las pruebas fue de 0.05. Los resultados son producto del promedio de cuatro réplicas independientes.

Variable independiente	Daño celular (# células)	>Prob F
Voltaje	Destruídas	0.4643
	No viables	0.4048
	Viables	0.6724

Tabla 20. Efecto directo al utilizar 100, 250, 400, 450, 700 y 1500 ondas de choque a un voltaje de 20 y 24 kV, sobre células HeLa. Análisis utilizando el número de ondas de choque como variable independiente. Coeficiente de correlación y probabilidad de F, entre el número de ondas de choque y el porcentaje de células destruidas, porcentaje de células no viables y porcentaje de células viables. El nivel de significancia utilizado en todas las pruebas fue de 0.05. Los resultados son producto del promedio de cuatro réplicas independientes.

Efecto de la cantidad de plásmido (*pCA β mGFP*)

El efecto que tiene la cantidad de plásmido sobre la integridad celular, depende del voltaje utilizado y del número de ondas de choque que se aplican a las células HeLa.

Como se observa en la figura 16, los datos indican que al incrementar la cantidad de plásmido de 12 a 30 μ g en los viales tratados con 100 ondas de choque a 24 kV, aumenta el porcentaje de células viables y disminuye el porcentaje de células destruidas. Además de que las muestras tratadas con 250 ondas de choques a 20 kV, aumentan su porcentaje de células destruidas y de células viables. El porcentaje de células no viables se reduce independientemente del número de ondas de choque y del voltaje empleado en los tratamientos. En la tabla 21 se presentan los valores que corroboran que cuando se incrementa la cantidad de plásmido, se reduce el porcentaje de células no viables, independientemente de utilizar 20 o 24 kV de voltaje. Cabe señalar que, al utilizar el número de células como variable independiente no se observa relación alguna entre el voltaje y el daño celular en los viales tratados con 100 y 250 ondas de choque a 24 y 20 kV respectivamente.

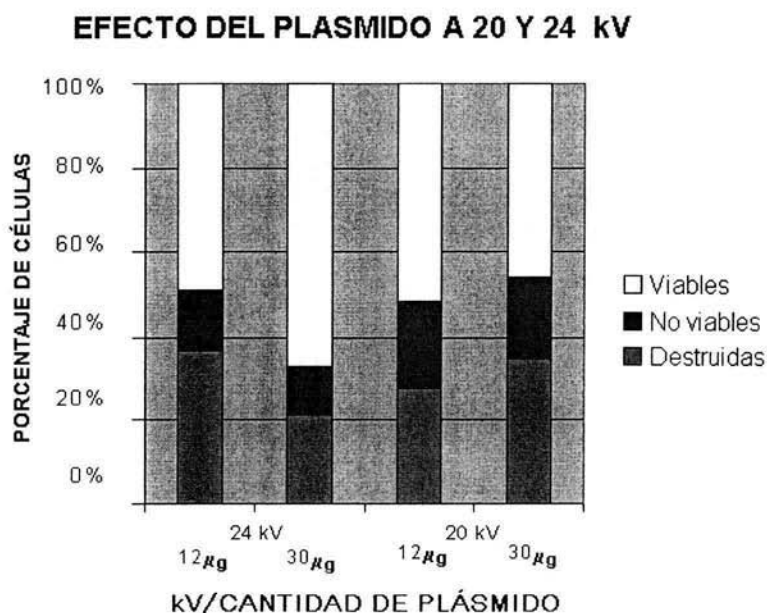


Figura 16. Gráfica que muestra el porcentaje de células destruidas, no viables y viables, después de aplicar 100 y 250 ondas de choque a 24 y 20 kV con 12 o 30 μ g de plásmido respectivamente. Los valores presentados en esta gráfica son producto de cuatro réplicas independientes.

Al analizar todos los datos en su conjunto (20 y 24 kV), los resultados indican que independientemente de utilizar el número de células como variable independiente, al aumentar la cantidad de plásmido, se reduce el porcentaje de células destruidas y se aumenta el porcentaje de células viables. La probabilidad de F corrobora la misma relación (Tabla 22). Referente a la similitud estadística entre utilizar 12 o 30 μg de plásmido, los resultados indican que no hay diferencias significativas; es decir, el daño celular que se produce al utilizar 12 o 30 μg es el mismo.

Variable independiente	Daño celular (% células)	Coefficiente correlación	>Prob F
Cantidad de plásmido	destruidas	-0.0527	0.8096
	no viables	-0.2337	0.0679
	viables	0.1458	0.3453

Tabla 21. Efecto directo al utilizar 100 y 250 ondas de choque a un voltaje de 24 y 20 kV respectivamente, sobre células HeLa. Coeficiente de correlación y probabilidad de F, entre la cantidad de plásmido y el porcentaje de células destruidas, porcentaje de células no viables y porcentaje de células viables. El nivel de significancia utilizado en todas las pruebas fue de 0.05. Los resultados son producto del promedio de cuatro réplicas independientes.

Variable independiente	Daño celular (% células)	Coefficiente correlación	Coefficiente de regresión	>Prob F
Cantidad de Plásmido	destruidas	-0.3669	$Y=62.0629539-1.1355680(x)$	0.0255
	no viables	-0.0981	No es significativo	0.5631
	viables	0.4482	$Y=22.4244229-1.2426812(x)$	0.0054

Tabla 22. Valores de correlación y de probabilidad de F después de aplicar 100, 250, 400, 450, 700 y 1500 ondas de choque a 20 y 24 kV y el porcentaje de células destruidas, células no viables y células viables, sobre células HeLa. El nivel de significancia utilizado en todas las pruebas fue de 0.05. Los resultados son producto del promedio de cuatro réplicas independientes.

PROLIFERACIÓN CELULAR

Efecto del número de ondas de choque

El efecto que tienen las ondas de choque sobre la proliferación celular de células HeLa, depende de su número, del voltaje y de la cantidad de plásmido con la se incuban (Figura 17, 18). A mayor número de ondas de choque y a mayor voltaje, menor es el número de células viables y más lenta es su proliferación.

Los resultados que a continuación se describen están en relación al número de células viables después de los tratamientos.

Cuando se aplican 250, 450, 700 o 1500 ondas de choque a un voltaje de 24 kV, el porcentaje de células siempre se reduce severamente durante las primeras 24 y 48 hrs. Sin embargo, cuando se aplican 100 ondas de choque, su proliferación aumenta 1:3.92 en 24 hrs y 1:8.6 durante 48 hrs. A las 72 hrs, la proliferación celular aumenta levemente en las muestras tratadas con 250, 450, 700 y 1500 ondas de choque, sin embargo, no llegan a la mitad del número de células iniciales (Figura 17, 18 y Tabla 23). Referente a la relación estadística, los resultados indican una pequeña tendencia a que conforme aumenta el número de ondas de choque, el porcentaje de células a las 24, 48 y 72 hrs disminuye (Tabla 24). Estos mismos resultados se observan al utilizar al número de células como variable independiente (Tabla 25).

Al aplicar 100, 250, 400 o 700 ondas de choque a 20 kV, los resultados indican que la proliferación después de los tratamientos es lenta, pero mucho más homogénea que cuando se aplican ondas a 24 kV. Nuevamente aplicar 100 ondas de choque es la condición que muestra una proliferación mayor (Figura 18 y Tabla 23). Referente a la relación estadística, en la tabla 26 se presentan los valores que demuestran que conforme aumenta el número de ondas de choque, disminuye el porcentaje de células a las 24, 48 y 72 hrs. Cabe señalar que se observan los mismos resultados al utilizar el número de células como variable independiente.

Al analizar los datos en su conjunto, los resultados muestran que disminuye el porcentaje de células conforme al tiempo de observación al incrementar el número de ondas de choque (Tabla 27).

	Proliferación 20 kV			Proliferación 24 kV		
	Tiempo (hrs)			Tiempo (hrs)		
	24	48	72	24	48	72
100 ondas de choque / 12 µg de plásmido						
Media	75.4104	139.6996	237.7052	20.8198	12.4510	9.4569
Varianza	1037.370	5403.245	7118.432	110.9243	2.4409	29.5252
Desviación estándar	32.2082	73.5068	130.8374	10.5321	1.5624	5.4337
Coefficiente de variación	0.4271	0.5262	0.5504	0.5059	0.1255	0.5746
Máximo	100.0484	200.9281	367.7744	33.6364	14.6117	17.5214
Mínimo	28.6253	43.4906	78.5714	7.8788	10.9500	5.6566
100 ondas de choque / 30 µg de plásmido						
Media	-----	-----	-----	22.7731	36.5898	58.0205
Varianza	-----	-----	-----	6.4834	61.8882	151.6214
Desviación estándar	-----	-----	-----	2.5463	7.8669	12.3135
Coefficiente de variación	-----	-----	-----	0.1118	0.2150	0.2122
Máximo	-----	-----	-----	26.4497	47.2189	70.9489
Mínimo	-----	-----	-----	20.7687	29.2857	43.5714
250 ondas de choque / 12 µg de plásmido						
Media	30.8263	33.7878	44.6333	51.0686	13.8824	38.2353
Varianza	24.1028	46.3606	13.8534	11.2389	18.9189	14.7456
Desviación estándar	4.9095	6.8089	3.7220	3.3525	4.3496	3.8400
Coefficiente de variación	0.1593	0.2015	0.0834	0.0656	0.3133	0.1004
Máximo	68.0052	59.3696	100.5435	54.5753	18.0557	42.0753
Mínimo	11.4000	11.4925	12.5000	47.8953	9.3757	34.3953
250 ondas de choque / 30 µg de plásmido						
Media	23.2039	29.4275	52.3191	-----	-----	-----
Varianza	161.8181	543.3663	4663.289	-----	-----	-----
Desviación estándar	12.7208	23.3102	68.2883	-----	-----	-----
Coefficiente de variación	0.5482	0.7921	1.3052	-----	-----	-----
Máximo	41.6751	61.0568	154.5988	-----	-----	-----
Mínimo	14.1045	7.3016	14.4099	-----	-----	-----
400 ondas de choque / 12 µg de plásmido						
Media	14.1544	4.8457	4.0200	-----	-----	-----
Varianza	3.7397	0.5910	0.1458	-----	-----	-----
Desviación estándar	1.9338	0.7688	0.3818	-----	-----	-----
Coefficiente de variación	0.1366	0.1586	0.0950	-----	-----	-----
Máximo	15.5294	5.6471	4.4444	-----	-----	-----
Mínimo	11.3793	3.8413	3.5294	-----	-----	-----
450 ondas de choque / 12 µg de plásmido						
Media	-----	-----	-----	60.7647	26.1373	33.8039
Varianza	-----	-----	-----	12.8604	6.2337	12.8604
Desviación estándar	-----	-----	-----	3.5861	2.4967	3.5861
Coefficiente de variación	-----	-----	-----	0.0590	0.0955	0.1061
Máximo	-----	-----	-----	63.7447	28.4506	36.7839
Mínimo	-----	-----	-----	56.7847	23.4906	29.8239

Tabla 1. (continua)

Tabla 1. (continuación)

700 ondas de choque / 12 µg de plásmido	Proliferación 20 kV			Proliferación 24 kV		
	Tiempo (hrs)			Tiempo (hrs)		
	24	48	72	24	48	72
Media	4.7302	1.8578	1.2116	78.2745	29.7451	39.0392
Varianza	0.1465	0.1115	0.0011	7.9233	7.9233	2.0233
Desviación estándar	0.3828	0.3340	0.0339	2.8148	2.8148	1.4224
Coefficiente de variación	0.0809	0.1798	0.0280	0.0360	0.0946	0.0364
Máximo	5.0008	2.0939	1.2355	81.2412	32.7118	40.0059
Mínimo	4.4595	1.6216	1.1876	75.6412	27.1118	37.4059
1500/CP1						
Media	-----	-----	-----	59.1569	62.6078	147.0588
Varianza	-----	-----	-----	5.9397	2.0997	3.6864
Desviación estándar	-----	-----	-----	2.4372	1.4490	1.9200
Coefficiente de variación	-----	-----	-----	0.0412	0.0231	0.0131
Máximo	-----	-----	-----	61.7435	63.8612	148.9788
Mínimo	-----	-----	-----	56.9035	61.0212	145.1388

Tabla 23. Estadística descriptiva de la proliferación celular a las 24, 48 y 72 hrs después de aplicar 100, 250, 400, 450, 700 y 1500 ondas de choque a 20 y 24 kV. Los resultados que se presentan en esta gráfica, son producto del promedio de cuatro réplicas independientes.

PROLIFERACION CELULAR A 24 kV

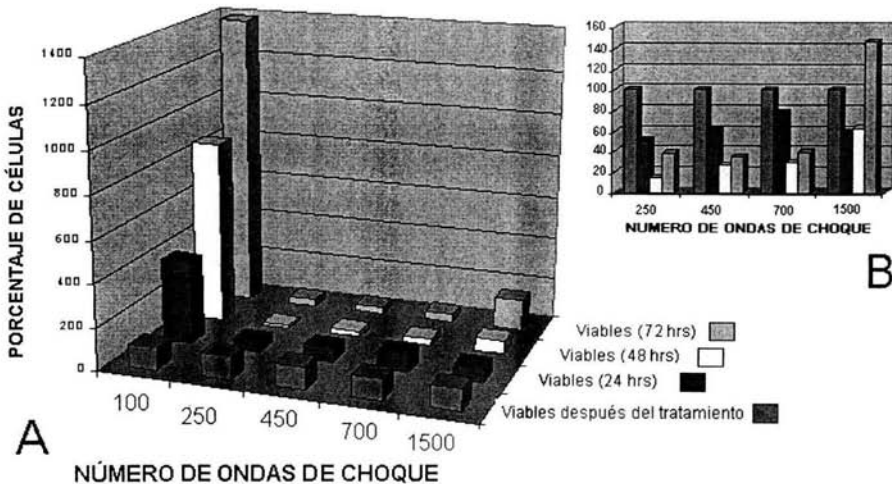


Figura 17. A) Gráfica que muestra el porcentaje de células a las 24, 48 y 72 hrs después de aplicar 100, 250, 450, 700 y 1500 ondas de choque a un voltaje de 24 kV y B) Gráfica que muestra el porcentaje de células a las 24, 48 y 72 hrs después de aplicar 250, 450, 700 y 1500 ondas de choque a un voltaje de 24 kV. Los resultados que se presentan en esta gráfica, son producto del promedio de cuatro réplicas independientes.

PROLIFERACION CELULAR A 20 kV

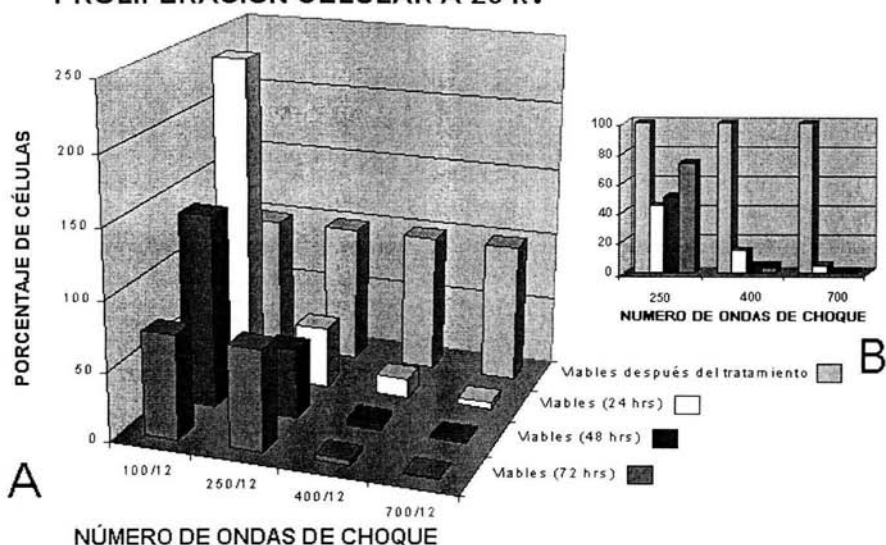


Figura 18. A) Gráfica que muestra el porcentaje de células a las 24, 48 y 72 hrs después de aplicar 100, 250, 400 y 700 ondas de choque a 20 kV y B) Gráfica que muestra el porcentaje de células a las 24, 48 y 72 hrs después de aplicar 250, 400 y 700 ondas de choque a 20 kV. Los resultados que se presentan en esta gráfica, son producto del promedio de cuatro réplicas independientes.

Variable independiente	Tiempo (hrs)	Coefficiente correlación	>Prob F
# ondas choque	24	-0.4981	0.1428
	48	-0.4651	0.1755
	72	-0.4401	0.2030

Tabla 24. Coeficiente de correlación y probabilidad de F, entre el número de ondas de choque y el porcentaje de células a las 24, 48 y 72 hrs (proliferación). El número de ondas de choque utilizadas fue de 100, 250, 450, 700 y 1500 a un voltaje de 24 kV. El nivel de significancia utilizado en todas las pruebas fue de 0.05. Los resultados son producto del promedio de cuatro réplicas independientes.

Variable independiente	Tiempo (hrs)	>Prob F
# ondas de choque	24	0.0207
	48	0.0493
	72	0.0448

Tabla 25. Probabilidad de F, entre el número de ondas de choque y el porcentaje de células a las 24, 48 y 72 hrs (proliferación) al utilizar el número de células como variable independiente. El número de ondas de choque utilizadas fue de 100, 250, 450, 700 y 1500 a un voltaje de 24 kV. El nivel de significancia utilizado en todas las pruebas fue de 0.05. Los resultados son producto del promedio de cuatro réplicas independientes.

Variable independiente	Tiempo (hrs)	Coefficiente correlación	Coefficiente de regresión	>Prob F
# ondas choque	24	-0.7069	$Y = -132.644131 + 0.3732499(x)$	0.0022
	48	-0.6761	$Y = -273.20704 + 0.71880398(x)$	0.0040
	72	-0.6539	$Y = 462.580923 + 1.20456701(x)$	0.0060

Tabla 26. Coeficiente de correlación, coeficiente de determinación y probabilidad de F, entre el número de ondas de choque y el porcentaje de células a las 24, 48 y 72 hrs (proliferación). El número de ondas de choque utilizadas fue de 100, 250, 400 y 700 a un voltaje de 20 kV. El nivel de significancia utilizado en todas las pruebas fue de 0.05. Los resultados son producto del promedio de cuatro réplicas independientes.

Variable independiente	Tiempo (hrs)	>Prob F
# ondas de choque	24	0.0013
	48	0.0075
	72	0.0226

Tabla 27. Probabilidad de F, entre el número de ondas de choque y el porcentaje de células a las 24, 48 y 72 hrs (proliferación). El número de ondas de choque utilizadas fue de 100, 250, 400, 450, 700 y 1500 a un voltaje de 20 y 24 kV. El nivel de significancia utilizado en todas las pruebas fue de 0.05. El nivel de significancia utilizado en todas las pruebas fue de 0.05. Los resultados son producto del promedio de cuatro réplicas independientes.

Efecto del voltaje

El efecto que tiene el voltaje sobre la proliferación celular de células HeLa, depende del número de ondas de choque (Figura 17 y 18) y de la cantidad de plásmido con la se incubaba (Figura 19). Cuando se emplea un voltaje de 24 kV y se incrementa el número de ondas de choque, se reduce el número de células viables, sin embargo, su proliferación es mayor con respecto a cuando se aplican ondas de choque a 20 kV.

Como se observa en la figura 10, cuando se aplican 100 ondas de choque a 24 kV y 250 ondas a 20 kV, la proliferación se ve más afectada a mayor voltaje (aunque en ambos casos, se reduce el número de células conforme se incrementa el tiempo de observación), independientemente del número de ondas de choque (100 o 250). Referente a la relación estadística entre el voltaje y la proliferación celular, los estadísticos demuestran que al aplicar ondas de choque a un voltaje de 24 kV, el número de células a las 24 hrs disminuye levemente. El voltaje no muestra relación estadística con el porcentaje de células a las 48 y 72 hrs (Tabla 28). Cabe señalar que al utilizar el número de células tratadas como variable independiente, los resultados muestran que no existe relación ninguna, entre el voltaje y el porcentaje de células a las 24, 48 y 72 hrs (Tabla 29). Respecto a la similitud entre grupos, la prueba F indica que no existen diferencias significativas en el porcentaje de células a las 24, 48 o 72 hrs cuando se utiliza un voltaje de 20 o 24 kV.

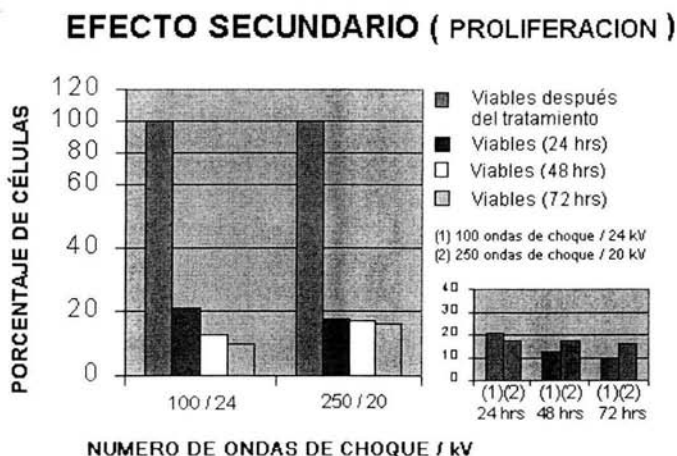


Figura 19. Gráfica que muestra el porcentaje de células a las 24, 48 y 72 hrs después de aplicar un voltaje de 24 kV (100 ondas) y un voltaje de 20 kV (250 ondas) con 12 µg de plásmido cada uno. Los valores de esta gráfica son producto de cuatro réplicas independientes.

Variable independiente	Proliferación (hrs)	Coefficiente correlación	>Prob F
Voltaje	24	0.2430	0.1473
	48	0.1693	0.3162
	72	0.1699	0.3146

Tabla 28. Coeficiente de correlación y de probabilidad de F, entre el voltaje y el porcentaje de células a las 24, 48 y 72 hrs. El nivel de significancia utilizado en todas las pruebas fue de 0.05. Los resultados son producto del promedio de cuatro réplicas independientes.

Variable independiente	Proliferación (hrs)	>Prob F
Voltaje	24	0.5590
	48	0.8320
	72	0.7848

Tabla 29. Efecto del voltaje sobre el porcentaje de células a las 24, 48 y 72 hrs al utilizar el número de células como variable independiente. Probabilidad de F, entre el voltaje y el porcentaje de células a las 24, 48 y 72 hrs. El nivel de significancia utilizado en todas las pruebas fue de 0.05. Los resultados son producto del promedio de cuatro réplicas independientes.

Efecto de la cantidad plásmido (pCAβmGFP)

El efecto que tiene la cantidad de plásmido sobre la proliferación celular depende del voltaje y del número de ondas de choque con la cual se transfecta.

En la figura 20, se presentan los resultados que demuestran que al aumentar la cantidad de plásmido de 12 a 30 μg en las muestras tratadas con 100 o 250 ondas de choque a 24 o 20 kV respectivamente, aumenta el porcentaje de células a las 24, 48 y 72 hrs después de los tratamientos.

Los resultados demuestran que al aplicar 100 ondas de choque a 24 kV con 30 μg de plásmido, en vez de 12 μg de plásmido, se incrementa levemente el porcentaje de células en 24 hrs, aumenta hasta 300 % el porcentaje de células en 48 hrs y hasta un 600 % el porcentaje de células en 72 hrs.

Referente a cuando se aplican 250 ondas de choque a 20 kV y 30 μg de plásmido, en vez de 12 μg, los resultados indican que se incrementa el porcentaje de células a las 24 hrs (de un 17 % a un 23 %), hasta un 200 % en 48 hrs y hasta un 350 % en 72 hrs.

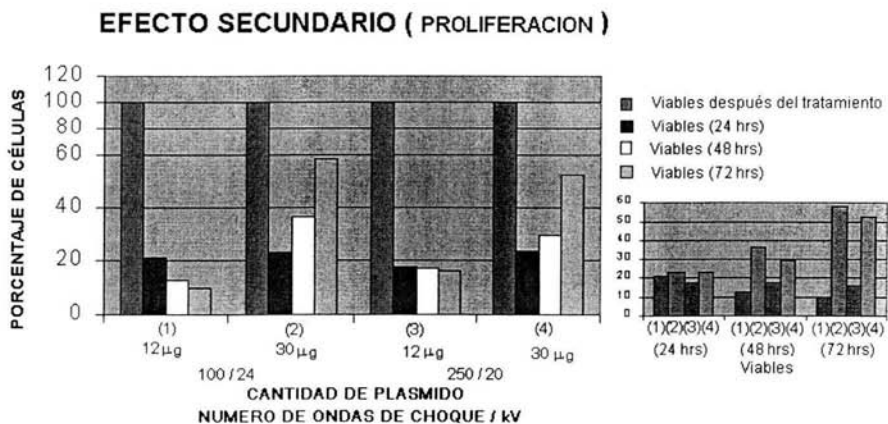


Figura 20. Gráfica que muestra el efecto de la cantidad de plásmido al utilizar 100 y 250 ondas de choque a 24 y 20 kV con 12 μg y 30 μg de plásmido respectivamente. Los valores que se muestran en esta gráfica son producto de cuatro réplicas independientes.

En lo que respecta a la relación estadística entre la cantidad de plásmido y el porcentaje de células a las 24, 48 y 72 hrs (proliferación celular), el análisis indica que al usar 30 μg de plásmido, se incrementa el porcentaje de células a las 48 y 72 hrs (Tabla 30). Cuando se utiliza el número de células como variable independiente, el análisis indica que el porcentaje de células a las 24 hrs también depende de la cantidad de plásmido (Tabla 31).

Al analizar los datos en su conjunto, los resultados indican que independientemente de utilizar el número de células como variable independiente, no existe ninguna relación estadística entre la cantidad de plásmido y el porcentaje de células a las 24, 48 o 72 hrs (Tabla 32). Referente a la similitud estadística cuando se utilizan 12 o 30 μg de plásmido, los estadísticos indican que no hay diferencias significativas; es decir, no se incrementa significativamente el porcentaje de células a ningún tiempo observado.

Variable independiente	Proliferación (hrs)	Coefficiente correlación	Coefficiente de regresión	>Prob F
Cantidad de plásmido	24	0.1016	No es significativo	0.1475
	48	0.5213	$Y=42.0804656+-0.5994134(x)$	0.0190
	72	0.5387	$Y=77.6093024+-1.4124364(x)$	0.0122

Tabla 30. Efecto de la cantidad de plásmido a las 24, 48 y 72 hrs, cuando se utilizan 100 y 250 ondas de choque a un voltaje de 24 y 20 kV respectivamente. El nivel de significancia utilizado en todas las pruebas fue de 0.05. Los resultados son producto del promedio de cuatro réplicas independientes.

Variable independiente	Proliferación (hrs)	>Prob F
Cantidad de plásmido	24	0.0092
	48	0.0084
	72	0.0046

Tabla 31. Probabilidad de F, entre la cantidad de plásmido y el porcentaje de células a las 24, 48 y 72 hrs, al utilizar el número de células como variable independiente. El nivel de significancia utilizado en todas las pruebas fue de 0.05. Los resultados son producto del promedio de cuatro réplicas independientes.

Variable independiente	Proliferación (hrs)	>Prob F
Cantidad de plásmido	24	0.2864
	48	0.4799
	72	0.5210

Tabla 32. Probabilidad de F, entre la cantidad de plásmido y el porcentaje de células a las 24, 48 y 72 hrs, al utilizar toda la información generada a 20 y 24 kV. El nivel de significancia utilizado en todas las pruebas fue de 0.05. Los resultados son producto del promedio de cuatro réplicas independientes.

VIII. DISCUSIÓN

Las ondas de choque se han empleado para fragmentar prácticamente todo tipo de concreción dentro del cuerpo (cálculos renales, biliares, pancreáticos y salivales), además de su uso en ortopedia.¹³ Una gran ventaja de las ondas de choque es que pueden generarse fuera del cuerpo y dirigirse específicamente hacia el interior del mismo, de tal modo que casi todo órgano o tejido de interés puede tratarse.³⁹ Otra característica que hace atractivo el uso de ondas de choque, es que la región de máxima energía reflejada puede ampliarse o reducirse según los requerimientos.^{31,38} Estas características abren la posibilidad de realizar transfección *in vitro* e *in vivo*.

Potencialmente la transfección por ondas de choque *in vitro* tiene grandes ventajas sobre otras técnicas de transfección.³⁸ Esto se debe a que las ondas de choque se pueden generar mediante diferentes métodos, así como que es una técnica que puede aplicarse fácilmente a cualquier tipo de células en suspensión y en placa, además de que las ondas de choque se pueden concentrar y dirigir hacia cualquier región (fuera o dentro del cuerpo en el caso de un tratamiento *in vivo*).³¹

Los artículos más alentadores,^{29,35} reportan una eficiencia no mayor al 0.5 % al transfectar diferentes tipos de células eucariotas *in vitro*. Esta eficiencia de transfección es extremadamente baja en comparación con otras técnicas, tales como la de microinyección, en donde el 95% de las células inyectadas se transfectan; la electroporación, en donde prácticamente el 100% de las células que sobreviven al tratamiento se transfectan y la de liposomas en la cual la eficiencia de transfección oscila entre 10% y 50% (según el tipo de célula)¹¹. Elaborar estudios como el presente está justificado por diversas razones, tales como las propiedades intrínsecas de las ondas de choque, que difieren de otros métodos comerciales para transfección; el poder generar las ondas de choque fuera del cuerpo; el poder dirigir las ondas de choque específicamente y delimitar su campo de acción. Por lo anterior, las ondas de choque podrían formar parte de una técnica para el tratamiento de diferentes enfermedades heredadas o adquiridas.

Existen otras técnicas en las cuales también se utilizan variaciones de presión. Tal es el caso del ultrasonido.^{35,56} Una ventaja que tienen las ondas de choque para transfección *in vitro*, es que no generan calor en el volumen focal (área en donde se concentra más del 50% de la energía reflejada). Los sistemas de ultrasonido han sido ampliamente estudiados para transfección *in vitro*; sin embargo, generan un aumento significativo de la temperatura, siendo este un factor que contribuye al estrés durante el tratamiento.^{17,35,56} Debido a lo anterior, la viabilidad celular es mayor cuando se aplican ondas de choque para transfección *in vitro* y potencialmente son menos dañinas al aplicarse para transfección *in vivo*. Debe tomarse en cuenta que las ondas de choque al utilizarse *in vivo*, pueden causar hemorragias⁶², reducción del flujo sanguíneo³² y necrosis,¹² en el volumen focal. En general, se produce mayor daño en órganos donde existen cavidades con gases, tales como el pulmón, el corazón o algunas partes de intestino.

Suponiendo que la transfección *in vivo* – como lo indican los estudios *in vitro* - pueda darse a presiones menores a las usadas en *litotripsia extracorporal*, no causaría daño a los tejidos.

En el presente trabajo se usaron 100, 250, 450, 400, 700 y 1500 ondas de choque, un voltaje de 20 o 24 kV y una frecuencia de disparo de una onda cada 2 segundos, ya que para estas condiciones se obtuvo un gradiente de eficiencia de transfección.

EFICIENCIA DE TRANSFECCIÓN

Como se observa en la figura 1 a y 1 b, la eficiencia de transfección depende del voltaje con el cual se generan las ondas de choque y del número de ondas que se aplican por tratamiento. Los factores que pueden estar relacionados con la eficiencia de transfección (variables que no fueron analizadas por no ser el objetivo de este trabajo, y que serían adecuadas para analizarse en una segunda etapa de investigación), son factores físicos y biológicos, tales como: ciertas características del generador de ondas de choque (Mexilit II*), por ejemplo, el impacto que genera la luz visible y UV en las células tratadas, el efecto de la cavitación, la frecuencia de generación de las ondas, así como las características del vector y del gen reportero a transfectar, el daño estructural e interno que se produce a la célula al paso de la onda de choque, además del estrés, la preparación de las células para su tratamiento y el método para la valoración de los resultados.

Al aplicar ondas de choque a un voltaje de 20 kV, la eficiencia de transfección disminuye conforme aumenta el número de ondas de choque. A 24 kV desaparece al utilizar más de 100 ondas. Este efecto puede deberse a que la magnitud de la presión – factor moderado por el voltaje - es la variable que regula el tamaño del poro por el cual se hace permeable la membrana plasmática de las células tratadas y a que el número de ondas de choque produce la cantidad de poros. Si se unen estas dos características, para incrementar la eficiencia de transfección *in vitro*, los nuevos experimentos a desarrollarse deben contemplar un gran número de ondas de choque (entre 400 y 1000 ondas) y voltajes bajos. Esto no coincide con lo descrito por Lauer y colaboradores (1997);³⁹ y Bao y colaboradores (1997);³ los cuales describen como factores óptimos, voltajes elevados (25 kV) y un bajo número de ondas de choque (250); sin embargo, esto puede deberse al tipo de generador de ondas de choque que se utilizó, además del gen reportero y del método que se utilizó para medir la eficiencia de transfección. Lo anterior podría explicar por qué al comparar los resultados obtenidos al aplicar 100 ondas a 20 kV con los de aplicar 100 ondas de choque a 24 kV, la eficiencia de transfección es mayor al utilizar el voltaje de 24 kV en todos los tiempos medidos. Otra manera con la cual podría ser posible incrementar la eficiencia de transfección es aumentando la cavitación en el medio en donde se encuentran las células a transfectar. La cavitación se considera el mecanismo básico que media la transferencia en la aplicación de las ondas de choque.^{2,35,31,}

39

Existen diferentes maneras para incrementar la cavitación y con ello los *microjets* expulsados al colapsarse las burbujas. Una de las más sencillas es crear una interfase aire-líquido en donde la onda de choque se refleje e incremente los efectos de las siguientes ondas. Otra posible manera es generar parejas de ondas de choque con intervalos entre ellas de microsegundos. Este tipo de sistemas han sido diseñados para generadores de ondas de choque piezoeléctricos,⁹ obteniéndose resultados alentadores para aplicaciones médicas en las que un aumento de cavitación también es importante. Hasta el momento no existen trabajos que reporten los efectos de transfección al variar la cavitación, por lo cual sería interesante, considerar esto para una fase de investigación posterior. Por último, otra manera con la cual podría incrementarse la eficiencia de transfección es mediante la aplicación combinada de ondas de choque y el uso de liposomas. La encapsulación del material genético al transfectar por lípidos podría aumentar la difusión transmembranal al tratar las células con ondas de choque.⁶⁵

Los resultados muestran que al usar 30 μg de plásmido en vez de 12 μg , la eficiencia de transfección aumenta a las 24 hrs cuando se aplican 100 ondas de choque a 24 kV. Este resultado puede deberse a que las células tratadas se dañan estructural e internamente, generando con ello problemas en la reconstrucción del citoesqueleto celular y organelos, lo cual repercute directamente en su proliferación. Además, al utilizar un voltaje de 24 kV, el tamaño del poro generado es tan grande que la célula se fragmenta. Es necesario realizar estudios que demuestren si existen alteraciones en el ciclo celular después de aplicar ondas de choque. Un proceso que puede estar alterado es la vía Rho/Rac, la cual esta involucrada en la organización del citoesqueleto y en los problemas que impiden llevar a cabo una citocinesis apropiada. Otro proceso que puede jugar un papel importante es la muerte mitótica, la cual es un proceso lento que depende de la actividad mitótica en la cual la célula muere después de dos o tres ciclos. Para detectar si existe muerte mitótica se pueden realizar estudios por citofluorometría.

Un resultado que apoya la hipótesis de que a mayor voltaje, más grande es el poro que se genera en la membrana plasmática es que al aplicar 250 ondas de choque a 20 kV, la eficiencia de transfección aumenta a las 24, 48 y 72 hrs, en comparación a cuando se utiliza un voltaje de 24 kV. En este caso, el efecto que tiene el plásmido sobre la eficiencia de transfección es el de incrementar el número de células viables.

Las diferencias con respecto a resultados publicados por otros autores pueden deberse al diferente tipo de generador de ondas de choque usado, a la metodología que se siguió, la cual en este caso se elaboró según las condiciones de trabajo y equipamiento, y a la forma de cuantificar los resultados (eficiencia de transfección). Otra de las posibles razones por las cuales se obtienen distintas eficiencias de transfección en estudios publicados por otros autores se debe a las características intrínsecas del vector utilizado. Respecto a publicaciones que reportan resultados obtenidos con ondas de choque electrohidráulicas, la

diferencia puede deberse a los parámetros físicos (frecuencia y voltaje) del equipo. Lauer y colaboradores, usaron un litotriptor construido para investigación (XL1),³⁹ con algunas características diferentes a las del MEXILIT II.

Una diferencia del XL1 es que puede cargar los capacitores tan rápido que es posible generar una onda de choque cada segundo a niveles de voltaje mayores que los empleados en el MEXILIT II*. Una razón más por la que se han obtenido resultados diferentes a los reportados por otros autores, podría deberse a que en el presente trabajo se sometió a las células tratadas y controles a estrés adicional por el traslado de un laboratorio (en donde se realizó la preparación celular) a otro (en donde se aplicaron las ondas de choque). El tiempo de traslado fue de aproximadamente 20 min.

DAÑO CELULAR

En este trabajo se estudió el efecto que tienen las ondas de choque sobre una población de células HeLa para diferente dosis de ondas, desde las condiciones menos severas (100 y 250 ondas), hasta las condiciones en donde se encontró más de un 97% de células muertas (700 y 1500 ondas). Los resultados muestran que conforme se incrementa el número de ondas de choque, el número de células disminuye (Figura 13 y 14), independientemente del voltaje. Este efecto puede deberse a diferentes factores físicos y biológicos tales como: la luz visible y UV, la cavitación, la frecuencia de descarga, el volumen focal, el número de células tratadas, el medio de disolución y la cantidad de plásmido, entre otras variables.

Los resultados muestran que al aplicar ondas de choque a 24 kV (figura 13), el tratamiento es altamente destructivo y el daño celular es directamente proporcional al número de ondas que se aplican. Posiblemente este resultado se debe al hecho de que a mayor voltaje, mayor es el tamaño de las cavidades que se producen en la membrana plasmática (efecto directo de cavitación), razón por la cual el porcentaje de células destruidas se incrementa hasta un 95% al emplear más de 450 ondas de choque. Cuando una célula es multi-perforada (posee demasiados poros), es muy probable que se altere el citoesqueleto y parte de los organelos intracelulares, de tal manera que no puede restaurarse y por consiguiente la célula muere.

Otro posible factor que puede ocasionar daño celular, es la luz visible y la luz UV. Debido a la descarga eléctrica que se produce en la generación de la onda de choque dentro del reflector, las células fueron expuestas a diferentes longitudes de onda (luz visible y luz UV), que pudieron alterar externa e internamente su integridad. Es posible que se hayan originado mutaciones que modificaran el ciclo celular y con ello, la replicación celular. Una manera con la cual se evita la exposición a la luz, es cubriendo los viales con una bolsa de plástico opaco. En 1999, Hernández, señala que la luz emitida por el generador electrohidráulico MEXILIT II* es el factor responsable de la muerte en *E. coli*.²⁸

Cuando se aplican ondas de choque a 20 kV, los resultados muestran que independientemente del número de ondas de choque, el daño celular es similar. Estos resultados posiblemente se deban a que los efectos producidos por la cavitación se han minimizados (tamaño del poro), razón por la cual se restaura automáticamente la célula. Es posible que por esta razón aumente significativamente el porcentaje de células viables en comparación a cuando se aplican ondas de choque generadas a 24 kV. Si se considera que el efecto de cavitación es poco significativo cuando se aplican ondas de choque a 20 kV, convendría analizar, en etapas posteriores, el efecto de la luz, la frecuencia de disparo y el tamaño del volumen focal. La frecuencia de disparo (tiempo entre una onda de choque y otra) y el volumen focal, son dos variables que pueden modificar los resultados. La frecuencia de disparo puede regular el efecto de cavitación. Al variar el retardo (200 o 500 μ s) entre parejas de ondas de choque mediante dispositivos electrónicos⁹ se aumenta la energía del colapso de las burbujas y consecuentemente la generación de microchorros. El volumen focal puede alterarse modificando la geometría de los reflectores y, en el caso del generador piezoeléctrico, modificando la forma del transductor.

Finalmente, cabe señalar que los resultados muestran que en general e independientemente de utilizar 20 o 24 kV, al utilizar 30 μ g en vez de 12 μ g, el plásmido actúa como amortiguador (el porcentaje de células viables aumenta y el porcentaje de células destruidas disminuye). Sin embargo, en la figura 16, puede observarse que al aplicar 250 ondas de choque a 20 kV, en vez de disminuir el porcentaje de células destruidas y de aumentar el porcentaje de células viables, ocurre lo contrario. Es posible que estos resultados se deban al tamaño y a las características del plásmido, el número de ondas de choque y el voltaje utilizado. Hasta el momento no existen trabajos que reporten el papel que confiere el plásmido al ser tratado con ondas de choque. Por lo anterior, se sugiere realizar una serie de experimentos donde se varíe la concentración del plásmido, el número de ondas de choque y el voltaje utilizado.

IX. CONCLUSIÓN

Las conclusiones del presente trabajo son:

- 1.- Se mostró que se pueden transfectar células HeLa por ondas de choque con el generador electrohidráulico MEXILIT II⁺, utilizando como vector pCA β mGFP y como gen reportero la proteína verde fluorescente (GFP). La eficiencia de transfección en células HeLa alcanzó una eficiencia máxima de 0.183 %.
- 2.- La metodología desarrollada es potencialmente aplicable a cualquier tipo de células eucariotas.
- 3.- El efecto que tiene el número de ondas de choque sobre la eficiencia de transfección, integridad celular y la proliferación celular depende del voltaje utilizado y de la cantidad de plásmido con la que se incubaba.
- 4.- Al aplicar 700 o más ondas de choque a un voltaje de 20 kV, la eficiencia de transfección se desploma al igual que al aplicar 250 o más ondas de choque a 24 kV.
- 5.- Las condiciones con las cuales se presentó mayor eficiencia de transfección fue al aplicar 100 y 250 ondas de choque a 24 kV y 20 kV, respectivamente.

LITERATURA CITADA

1. Armenta R. E, Méndez A., Loske AM y Prieto FE. *Manual de operación del generador de ondas de choque MEXILIT II**. Reporte interno, Laboratorio de Choques Débiles, Instituto de Física, UNAM. 1998.
2. Bao S, Thrall BD, Gies RA, Miller DL, *In vivo* transfection of melanoma cells by lithotripter shock waves. *Cancer Res* 1998 Jan 15(58):219-21.
3. Bao S, Thrall BD, Miller DL. *Transfection of a reporter plasmid into cultured cells by sonoporation in vitro*. *Ultrasound Med Biol*. 1997, 23(6):953-9.
4. Berens, M.E., C.E. Welander, A.S. Griffin, D.L. McCullough. *Effect of acoustic shock waves on clonogenic growth and drug sensitivity of human tumor cells in vitro*. *The Journal of Urology*. 1989, 142: 1090-1094.
5. Brümmer, F, Brenner J, Bräuner T, Hülser DF. *Effect of shock waves on suspended and immobilized L1210 cells*. *Ultrasound in Medicine and Biology*. 1989, 15(3):229-237.
6. Brümmer, F, Suhr D, Hülser DF. *Sensitivity of normal and malignant cells to shock waves*. *The Journal of Stone Disease*. 1992, 4 (3) : 243-247.
7. Buche F. *Fundamentos de Física*. Mc Graw Hill. 1988. pp. 377-423.
8. Carstensen EL, Gracewski S, Dalecki D. The search for cavitation in vivo. *Ultrasound Med Biol*. 2000 Nov;26(9):1377-85.
9. Cauwelaert Amuchástegui Javier V. *Cavitación controlada por dos ondas de choque y su aplicación a Litotripsia Extracorpora*". Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. 2001.
10. Coleman A J, Whitlock M, Leighton T and Saunders J E. *The spatial distribution of cavitation induced acoustic emission, sonoluminescence and cell lysis in the field of a shock wave lithotripter*. *Phys. Med. Biol*. 1993, 38:1545-1560.
11. Current protocols..
12. Debus J, Peschke P, Hahn EW, et al. Treatment of the Dunning prostate tumor R3327-AT1 with pulsed high energy ultrasound shock waves (PHEUS): Growth delay and histomorphologic changes. *J Urol*. 146:1143–1146. 1991.
13. Delius M. *Lithotripsy*. *Ultrasound Med Biol*. 2000, May;26 Suppl 1:S55-8.
14. Delius A., and G. Adams. Shock waves permeabilization with ribosome inactivating proteins: a new approach to tumor therapy. *Cancer Res*. 59:5227-5232. 1999.
15. Delius M, Ueberle F and Eisenmenger W. *Extracorporeal shock waves act by shock wave-gas bubble interaction*. *Ultrasound in Med.&Biol*. 1998, 24(7):1055-1059.
16. Fasbender A, Marshall J, Moninger TO, Grunst T, Cheng S and Welsh MJ. *Effect of co-lipids in enhancing cationic lipid-mediated gene transfer in vitro and in vivo*. *Gene Therapy*, 1997. 4:716-725.
17. Filipczynski L, Piechocki M. Estimation of the temperature increase in the focus of a lithotripter for the case of high rate administration. *Ultrasound Med Biol*. 16:146 –156. 1990.
18. Flynn HG, Church C.C A mechanism for the generation of cavitation maxima by pulsed ultrasound. *J. Acoust Soc Am*. 76:505-512. 1984.

19. Freyman PR, Leighton BR, Sands M. *Física: mecánica radiación y calor*. Vol. 1. Addison - Wesley Iberoamericana. 51-1 a 51-10. 1987.
20. Gambihler S, Delius M. *Transient increase in membrane permeability of L1210 cells upon exposure to lithotripter shock waves in vitro*. *Naturwissenschaften* 1992, Jul 79:7 328-9.
21. Gambihler S, Delius M. *In vitro interaction of lithotripter shock waves and cytotoxic drugs*. *Br J Cancer*. 1992 Jul;66(1):69-73.
22. Gambihler S, Delius M. *Influence of dissolved and free gases on iodine release and cell killing by shock waves in vitro*. *Ultrasound Med Biol*. 1992,18(6-7):617-23.
23. Gambihler S, Delius M, Brendel W. *Biological effects of shock waves: cell disruption, viability, and proliferation of L1210 cells exposed to shock waves in vitro*. *Ultrasound Med Biol*. 1990, 16:6 587-94.
24. Gambihler S, Delius M, Ellwart JW. *Permeabilization of the plasma membrane of L1210 mouse leukemia cells using lithotripter shock waves*. *J Membr Biol* 1994 Sep 141:3 267-75.
25. Giancoli DC. *Física General*. Vol. 1. Prentice-Hall Hispanoamérica, S.A. 315-345. 1988.
26. Hapala, I. *Breaking the barrier: methods for reversible permeabilization of cellular membranes*. *Crit. Rev. Biotechnol*. 1997.
27. Heiser WC. *Gene Transfer into Mammalian Cells by Particle Bombardment*. *Analytical Biochemistry*. 185-196. 1994.
28. Hernández G.C. *Aplicación de ondas de choque a Escherichia coli como alternativa a la conservación de alimentos*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM. pp 69. 1999.
29. Hernández G.S. *Efectos de la transfección del gen ras en células HeLa*. Tesis de licenciatura. Facultad de Biología, UNAM. 1995.
30. Ho, S. Y., and G.S. Mittal. *Electroporation of cell membranes: a review*. *Crit. Rev. Biotechnol*. 16:349-362. 1996.
31. Huber P., J. Jenne, J. Debus, M.F. Wannemacher and P. Pfisterer. *A comparison of shock wave and sinusoidal-focused ultrasound-induced localized transfection of HeLa cell*. *Ultrasound in Med. Biol*. 25: 1451-1457. 1999.
32. Huber P, Peschke P, Brix G, et al. *Synergistic interaction of ultrasonic shock waves and hyperthermia in the Dunning prostate tumor R3327-AT1*. *Int J Cancer*. 82:84 -91. 1999.
33. Huber P, Debus J, Jōchle K, et al. *Control of cavitation activity by different shock wave pulsing regimes*. *Phys Med Biol*. 44:1427-1437. 1999.
34. Jiménez S. A. *Genética Molecular Bacteriana*. (incompleta).
35. Kim HJ, Greenleaf JF, Kinnick RR, Bronk JT. *Ultrasound mediated transfection of mammalian cell*. *Hum Gene Ther*. 7:1339-1346. 1996.
36. Koch S. P. Pohl, U. Cobet and N.G. Rainov. *Ultrasound enhancement of liposome-mediated cell transfection is caused by cavitation effects*. *Ultrasound in Med. Biol*. 26:897-903. 2000.
37. Laudone VP, Morgan TR, Huryk RF, Heston WRW, Fair WR. *Cytotoxicity of high energy shock waves: methodologic considerations*. *The Journal of Urology*, 1989, 141: 965-968

38. Lauer, U., Squire, Z., Bürgelt, E., Hofschneider, P.H., Gregor, M., Gambihler, S., Delius, M. *Towards a new gene transfer system: shock wave - mediated DNA transfer. J. Cellular Biochem. Suppl.* 1994, 18A: 226.
39. Lauer U, Bürgelt E, Squire Z, Messmer K, Hofschneider PH, Gregor M and Delius M. Shock wave permeabilization as a new gene transfer method. *Gene Therapy.* 1997 Jul;4 (7):710-715.
40. Leighton TG. *The Acoustic Bubble.* Academic Press, Inc., 1997
41. Lewin B, *Genes VII.* Marbán SL. 2001
42. Loske AM. *Generación de ondas de choque en agua por rompimiento eléctrico.* UNAM. Tesis de maestría. 1990. pp. 100.
43. Loske AM. *Interacción de ondas de choque débiles en agua con la materia: diseño de electrodos y reflectores novedosos para litotriptores electrohidráulicos.* Instituto de Física. UNAM. Tesis doctorado. 1994.
44. Loske AM. *Applications of Shock Waves in Medicine,* capítulo 12, Handbook of Shock Waves, Volumen 2, Academic Press, G. Ben-Dor, T. Elperin, O. Igra y A. Lifshitz, ISBN 0-12-086432-2, 2001.
45. Loske AM, Hernández C., Armenta E. y Prieto F.E. *Shock wave potential as a food preservation method,* TIP Revista Especializada en Ciencias Químico - Biológicas 3 (1): 23 - 30, 2000,
46. Loske AM. and Prieto FE., *First in vitro experiments using a new reflector to concentrate shock waves for ESWL,* "Proceedings of the 16th International Congress on Acoustics and the 135th Meeting of the Acoustical Society of America", editado por Patricia K. Kuhl y Lawrence A. Crum, Seattle, Universidad de Washington, Seattle, WA, E.U.A., pág. 2805 - 2806, junio 1998.
47. Loske AM. y Prieto FE. *Bifocal reflector for electrohydraulic lithotripters,* The Journal of Endourology, vol. 13, núm. 2, 1999, págs. 65 - 75.
48. Loske AM. y Prieto FE. *Fundamentos Técnicos de Litotripsia Extracorporal,* JGH Editores, Ciencia y Cultura Latinoamérica, S.A. de C.V., 1999, 168pp.
49. Loske AM., Fernando E. Prieto, Ma. de Lourdes Zavala, Angel D. Santana y Eduardo Armenta. *Repeated application of shock waves as a possible method for food preservation,* Shock Waves, 9 (1999) 1, 49-55.
50. Loske AM. y Prieto FE. *Concentración de ondas de choque más eficiente para litotripsia extracorporal,* Memorias del Primer Congreso Latinoamericano de Ingeniería Biomédica, 11 al 14 de noviembre, 1998, Emilio Sacristán R., Verónica Medina B. y Oscar Yañez S. (editores), publicadas por la Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica, pág. 758 - 760
51. Loske AM., Prieto FE. y Méndez A. *Generador de ondas de choque experimental.* Memorias del Primer Congreso Latinoamericano de Ingeniería Biomédica, 11 al 14 de noviembre, 1998, Emilio Sacristán R., Verónica Medina B. y Oscar Yañez S. (editores), publicadas por la Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica, pág. 54 - 57.
52. Loske AM., Prieto FE., Cauwelaert J. V. y Fernández F. *Alternative pressure waveforms for ESWL,* Memorias de International Congress on Acoustics, Roma, Italia, 3 de septiembre, 2001.
53. McMahon JM, Ke Wells, JE Bamfo, MA Cartwright and DJ Well. *Inflammatory responses following direct injection of plasmid DNA into skeletal muscle.* Gene Therapy, 1998. 5:1283-1290.

54. Miller DL, Bao S, Gies RA, Thrall BD. *Ultrasonic enhancement of gene transfection in murine melanoma tumors*. *Ultrasound Med Biol*. 1999 Nov;25(9):1425-30.
55. Miller DL, Bao S and J.E. Morris. *Sonoporation of cultured cells in the rotating tube exposure system*. *Ultrasound Med. Biol.* 25:143-149. 1999.
56. Miller DL, Creim JA, Gies RA. *Heating vs. cavitation in the induction of mouse hindlimb paralysis by ultrasound*. *Ultrasound Med Biol*. 1999 Sep;25(7):1145-50.
57. Miller DL, A. R. Williams, J. E. Morris and W.B. Chrisler. *Sonoporation of erythrocytes by lithotripter shock waves in vitro*. *Ultrasonics*. 36:947-952. 1998.
58. Morgan S.J. y Darling D.C. "Cultivo de células animales". Editorial Acribia, S.A. 155pp. 1993
59. Randazzo, R.F., Ch. Chaussy, G.J. Fuchs, S.M. Bhuta, H. Lovrekovich, J.B. Kernion. *The in vitro and in vivo effects of extracorporeal shock waves on malignant cells*. *Urol. Res.* 16:419-426, 1988.
60. Resnick R, Halliday D., Krane K. *Física*. Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V. México, 1992.
61. Ross PC and Hui SW. *Lipoplex size is a major determinant of in vitro lipofection efficiency*. *Gene Therapy*. 1999. 6:651-659.
62. Russo, P., R.A. Stephenson, C. Mies, R. Huryk, W.D.W Heston, M.R. Melamed, W.R. Fair. *High energy shock waves suppress tumor growth in vitro and in vivo*" *The Journal of Urology*. 135: 626-628, 1986.
63. Schafer T., U. O. Karli, E.K. Gratwohl, F. E. Schweizer and M. M. Burger *Digitonin-permeabilized cells are exocytosis competent*. *J. Neurochem.* 49:1697-1707. 1987.
64. Spiller, D. G., R. V. Giles, L. Grzybowski, D. M. Tidd, And R.E. Clark. *Improving the intracellular delivery and molecular efficacy of antisense oligonucleotides in chronic myeloid leukemia cells: a comparison of streptolysin-O permeabilization, electroporation, and lipophilic conjugation*. *Blood* 91:4738-4746. 1998
65. Unger EC, McCreery TP, Sweitzer RH. *Ultrasound enhances gene expression of liposomal transfección*. *Invest Radiol.* 32:723- 727. 1997.
66. Widera G, Austin M, Rabussay D, Goldbeck C, Barnett SW, Chen M, Leung L, Otten GR, Thudium K, Selby MJ, Ulmer JB. *Increased DNA vaccine delivery and immunogenicity by electroporation in vivo*. *J Immunol.* 2000 May 1;164(9):4635-40.
67. Williams JC Jr, Woodward JF, Stonehill MA, Evan AP, McAteer JA. *Cell damage by lithotripter shock waves at high pressure to preclude cavitation*. *Ultrasound Med Biol*. 1999 Nov;25(9):1445-9.
68. Yang J-P and Huang L. *Time - dependent maturation of cationic liposome-DNA complex for aserum resistance*. *Gene Therapy*, 1998 5:380-387.
69. Zhong P, Lin H, Xi X, Zhu S y Bhogte S E. *Shock wave-inertial microbubble interaction: Methodology, physical characterization, and bioeffect study*. *J. Acoust. March* 105(3):1997-2009. 1999.

Índice de figuras

N° figura	Título	Pág.
1	Principales características que posee un movimiento ondulatorio.	9
2	Variaciones de presión que se dan al paso de una onda de choque, en función del tiempo.	9
3	Generación de una onda de choque mediante una descarga eléctrica.	12
4	Reflectores A. elíptico y B. parabólico, usados para la concentración de una onda de choque.	13
5	Dibujo que muestra las diferentes etapas de la cavitación generada por una onda de choque.	15
6	Dibujo del generador de ondas de choque MEXILIT II ⁺ , en el cual se muestra: (1) el reflector, (2) la bujía, (3) las grúas de precisión, (4) las ventanas, (5) la tina y (6) el contenedor del circuito de descarga.	17
7	Dibujo que muestra la geometría y las medidas del reflector E4, usado en el MEXILIT II ⁺ .	35
8	Dibujo que muestra los componentes del plásmido pCAβmGFP.	37
9	Dibujo que muestra las dimensiones de la cuadrícula de un hemocitómetro para el conteo de células.	41
10	Dibujo que muestra el sistema de posicionamiento de los viales tratados con ondas de choque en el MEXILI II ⁺ y sus respectivos controles.	44
11	Gráficas que muestran la eficiencia de transfección a las 24, 48 y 72 hrs, después de aplicar: A) 100, 250, 400 y 700 ondas de choque a 20 kV y B) 100, 250, 450, 700 y 1500 de ondas de choque a 24 kV.	50
12	Gráfica y tabla que muestran la eficiencia de transfección al aplicar 100 o 250 ondas de choque con 12 o 30 μg de plásmido.	55
13	A) Gráfica que muestra el porcentaje de células destruidas, no viables y viables después de aplicar 100, 250, 450, 700 y 1500 ondas de choque a 24 kV y B) Gráfica que muestra el porcentaje de células muertas por manipulación después de aplicar 100, 250, 450, 700 y 1500 ondas de choque a 24 kV.	59
14	A) Gráfica que muestra el porcentaje de células destruidas, no viables y viables después de aplicar 100, 250, 400 y 700 ondas de choque a 20 kV y B) Gráfica que muestra el porcentaje de células muertas por manipulación después de aplicar 100, 250, 400 y 700 ondas de choque a 20 kV.	60
15	Gráfica que muestra el porcentaje de células destruidas, no viables y viables después de aplicar 100 ondas de choque a 24 kV y 250 ondas de choque a 20 kV, ambos con 12 μg de plásmido.	62
16	Gráfica que muestra el porcentaje de células destruidas, no viables y viables, después de aplicar 100 y 250 ondas de choque a 24 y 20 kV con 12 o 30 μg de plásmido respectivamente.	64
17	A) Gráfica que muestra el porcentaje de células a las 24, 48 y 72 hrs después de aplicar 100, 250, 450, 700 y 1500 ondas de choque a un voltaje de 24 kV y B) Gráfica que muestra el porcentaje de células a las 24, 48 y 72 hrs después de aplicar 250, 450, 700 y 1500 ondas de choque a un voltaje de 24 kV.	68
18	A) Gráfica que muestra el porcentaje de células a las 24, 48 y 72 hrs después de aplicar 100, 250, 400 y 700 ondas de choque a 20 kV y B) Gráfica que muestra el porcentaje de células a las 24, 48 y 72 hrs después de aplicar 250, 400 y 700 ondas de choque a 20 kV.	69
19	Gráfica que muestra el porcentaje de células a las 24, 48 y 72 hrs después de aplicar un voltaje de 24 kV (100 ondas) y un voltaje de 20 kV (250 ondas) con 12 μg de plásmido cada uno.	71
20	Gráfica que muestra el efecto de la cantidad de plásmido al utilizar 100 y 250 ondas de choque a 24 y 20 kV con 12 y 30 μg de plásmido respectivamente.	73

Índice de tablas

Nº tabla	Título	Pág.
1	Estadística descriptiva de la eficiencia de transfección medida a las 24, 48 y 72 hrs, después de aplicar 100, 250, 400, 700 y 1500 ondas de choque a 20 y 24 kV. Los resultados que se muestran en esta tabla son el promedio de cuatro réplicas independientes.	52
2	Valores de correlación y de probabilidad de F entre ondas de choque aplicadas a 20 kV y 24 kV y la eficiencia de transfección medida a las 24, 48 y 72 hrs sobre células HeLa.	52
3	Valores de correlación y de probabilidad de F entre el número de ondas de choque y la eficiencia de transfección medida a las 24, 48 y 72 hrs sobre células HeLa.	52
4	Valores de correlación y de probabilidad de F entre el voltaje y la eficiencia de transfección medida a las 24, 48 y 72 hrs sobre células HeLa, al utilizar 100 y 250 ondas de choque a 20 y 24 kV.	53
5	Valores de correlación y de probabilidad de F entre el voltaje y la eficiencia de transfección medida a las 24, 48 y 72 hrs sobre células HeLa, al utilizar todos los datos generados a 20 y 24 kV.	54
6	Valores de probabilidad de F entre el voltaje y la eficiencia de transfección medida a las 24, 48 y 72 hrs al utilizar como variable independiente el número de células tratadas.	54
7	Valores de correlación y de probabilidad de F entre la cantidad de plásmido y la eficiencia de transfección medida a las 24, 48 y 72 hrs, al utilizar 100 o 250 ondas de choque a un voltaje de 20 y 24 kV, con 12 o 30 µg de plásmido.	56
8	Valores de probabilidad de F entre la cantidad de plásmido y la eficiencia de transfección medida a las 24, 48 y 72 hrs, utilizando 100 o 250 ondas de choque a un voltaje de 20 y 24 kV, con 12 o 30 µg de plásmido.	56
9	Valores de correlación y de probabilidad de F entre la cantidad de plásmido y la eficiencia de transfección medida a las 24, 48 y 72 hrs, al utilizar todos los datos generados a 20 y 24 kV con 12 o 30 µg de plásmido.	56
10	Valores de probabilidad de F entre la cantidad de plásmido y la eficiencia de transfección medida a las 24, 48 y 72 hrs al utilizar como variable independiente el número de células tratadas.	56
11	Estadística descriptiva del daño celular medida a las 24, 48 y 72 hrs, después de aplicar 100, 250, 400, 700 y 1500 ondas de choque a 20 y 24 kV.	59
12	Valores de correlación y de probabilidad de F entre el número de ondas de choque y el porcentaje de células destruidas, células no viables y células viables, después de aplicar 100, 250, 450, 700 y 1500 ondas de choque a 24kV a células HeLa.	60
13	Efecto de las ondas de choque generadas a 24 kV sobre células HeLa, al utilizar como variable independiente el número de células tratadas. Probabilidad de F entre el número de ondas de choque y daño celular.	60
14	Valores de correlación y de probabilidad de F entre el número de ondas de choque y el porcentaje de células destruidas, células no viables y células viables, después de aplicar 100, 250, 400 y 700 ondas de choque a 20kV, sobre células HeLa.	61
15	Efecto de las ondas de choque sobre células HeLa, cuando se utiliza como variable independiente el número de células tratadas. Probabilidad de F entre el número de ondas de choque a 20 kV y el daño celular.	61
16	Valores de correlación y de probabilidad de F entre aplicar 100, 250, 400, 450, 700 y 1500 ondas de choque a 20 y 24 kV y el porcentaje de células destruidas, células no viables y células viables, sobre células HeLa.	61
17	Efecto de las ondas de choque sobre células HeLa cuando se utiliza como variable independiente el número de células tratadas. Probabilidad de F entre el número de ondas de choque y el daño celular.	61

18	Coefficiente de correlación y de probabilidad de F entre el número de ondas de choque y el porcentaje de células destruidas, porcentaje de células no viables y porcentaje de células viables al utilizar 100 y 250 ondas de choque a un voltaje de 24 y 20 kV respectivamente, sobre células HeLa.	63
19	Efecto directo al utilizar 100, 250, 400, 450, 700 y 1500 ondas de choque a un voltaje de 20 y 24 kV, sobre células HeLa. Coeficiente de correlación y probabilidad de F, entre el número de ondas de choque y el porcentaje de células destruidas, porcentaje de células no viables y porcentaje de células viables.	63
20	Efecto directo al utilizar 100, 250, 400, 450, 700 y 1500 ondas de choque a un voltaje de 20 y 24 kV, sobre células HeLa. Análisis utilizando el número de ondas de choque como variable independiente. Coeficiente de correlación y probabilidad de F, entre el número de ondas de choque y el porcentaje de células destruidas, porcentaje de células no viables y porcentaje de células viables.	63
21	Efecto directo al utilizar 100 y 250 ondas de choque a un voltaje de 24 y 20 kV respectivamente, sobre células HeLa. Coeficiente de correlación y probabilidad de F, entre la cantidad de plásmido y el porcentaje de células destruidas, porcentaje de células no viables y porcentaje de células viables.	65
22	Valores de correlación y de probabilidad de F después de aplicar 100, 250, 400, 450, 700 y 1500 ondas de choque a 20 y 24 kV y el porcentaje de células destruidas, células no viables y células viables, sobre células HeLa.	65
23	Estadística descriptiva de la proliferación celular a las 24, 48 y 72 hrs después de aplicar 100, 250, 400, 450, 700 y 1500 ondas de choque a 20 y 24 kV.	68
24	Coefficiente de correlación y probabilidad de F, entre el número de ondas de choque y el porcentaje de células a las 24, 48 y 72 hrs (proliferación). El número de ondas de choque utilizadas fue de 100, 250, 450, 700 y 1500 a un voltaje de 24 kV.	69
25	Probabilidad de F, entre el número de ondas de choque y el porcentaje de células a las 24, 48 y 72 hrs (proliferación) al utilizar el número de células como variable independiente. El número de ondas de choque utilizadas fue de 100, 250, 450, 700 y 1500 a un voltaje de 24 kV.	69
26	Coefficiente de correlación, coeficiente de determinación y probabilidad de F, entre el número de ondas de choque y el porcentaje de células a las 24, 48 y 72 hrs (proliferación). El número de ondas de choque utilizadas fue de 100, 250, 400 y 700 a un voltaje de 20 kV.	70
27	Probabilidad de F, entre el número de ondas de choque y el porcentaje de células a las 24, 48 y 72 hrs (proliferación). El número de ondas de choque utilizadas fue de 100, 250, 400, 450, 700 y 1500 a un voltaje de 20 y 24 kV.	70
28	Coefficiente de correlación y de probabilidad de F, entre el voltaje y el porcentaje de células a las 24, 48 y 72 hrs.	72
29	Efecto del voltaje sobre el porcentaje de células a las 24, 48 y 72 hrs al utilizar el número de células como variable independiente. Probabilidad de F, entre el voltaje y el porcentaje de células a las 24, 48 y 72 hrs.	72
30	Efecto de la cantidad de plásmido a las 24, 48 y 72 hrs, cuando se utilizan 100 y 250 ondas de choque a un voltaje de 24 y 20 kV respectivamente.	74
31	Probabilidad de F, entre la cantidad de plásmido y el porcentaje de células a las 24, 48 y 72 hrs, al utilizar el número de células como variable independiente.	74
32	Probabilidad de F, entre la cantidad de plásmido y el porcentaje de células a las 24, 48 y 72 hrs, al utilizar toda la información generada a 20 y 24 kV.	74