



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y
TECNOLOGÍA AVANZADA

**Preparación de liposomas unilaminares y
encapsulación simultánea de DNA
mediante ondas de choque**

T E S I S

P R E S E N T A:

ALMA ATHENAS SÁNCHEZ TÉLLEZ

Que para obtener el título de

LICENCIADA EN TECNOLOGÍA



DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Luz María López Marín

CODIRECTOR DE TESIS:

Dr. Achim Max Loske Mehling

JURIQUILLA, QUERÉTARO, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Preparación de liposomas unilaminares y encapsulación simultánea de DNA mediante ondas de choque

**CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y
TECNOLOGÍA AVANZADA**
Alma Athenas Sánchez Téllez



DIRECTOR DE TESIS:
DRA. LUZ MARÍA LÓPEZ MARÍN
CODIRECTOR DE TESIS:
DR. ACHIM MAX LOSKE MEHLING

ÍNDICE DE CONTENIDOS

LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
ÍNDICE DE TABLAS.....	11
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	6
Antecedentes.....	6
Planteamiento del problema.....	6
OBJETIVOS.....	8
General.....	8
Particulares.....	8
HIPÓTESIS.....	8
MARCO TEÓRICO.....	9
1. Liposomas : Concepto y aplicaciones.....	9
1.1. BICAPA LIPÍDICA : ESTRUCTURA Y DINÁMICA.....	10
1.2. TIPOS.....	13
1.3. APLICACIÓN.....	15
1.4. MÉTODOS DE PREPARACIÓN Y ENCAPSULACIÓN.....	17
1.5. CARACTERIZACIÓN DE LIPOSOMAS.....	23
2. Ondas de choque.....	27
2.1. GENERACIÓN DE ONDAS DE CHOQUE.....	28
2.2. CAVITACIÓN ACÚSTICA.....	28
2.3. APLICACIONES.....	29
3. Transfección.....	30
3.1. USO DE ÁCIDOS NUCLEICOS COMO AGENTE TERAPÉUTICO.....	31

4.	Fluorescencia y sistemas reporteros de encapsulación de DNA.....	32
4.1.	FLUOROCROMOS EN VESÍCULAS.....	33
4.2.	PROTEÍNAS Y GENES REPORTEROS.....	33
5.	Plásmidos.....	34
	ESTRATEGIA.....	40
	METODOLÓGICA.....	40
	ESTRATEGIA METODOLÓGICA.....	41
1.	Obtención de plásmido.....	43
1.1.	PLÁSMIDO <i>PCX::GFP-GPI2</i>	43
2.	Preparación de liposomas multilaminares.....	46
3.	Obtención de liposomas unilaminares.....	47
3.1.	TRATAMIENTO CON ONDAS DE CHOQUE.....	47
4.	Caracterización de liposomas.....	49
4.1.	Liposomas sin cargo.....	49
4.1.1.	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM).....	49
4.1.2.	DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA (DLS).....	49
4.2.	Liposomas con pDNA como cargo.....	50
4.2.1.	RESISTENCIA DEL pDNA ANTE ONDAS DE CHOQUE.....	51
4.2.2.	Elaboración de liposomas con pDNA como cargo	52
4.2.3.	Dispersión de luz dinámica (DLS).....	52
4.2.4.	Microscopía confocal.....	53
4.2.5.	Estabilidad.....	53
	RESULTADOS.....	54
	RESULTADOS.....	55
1.	OBTENCIÓN DE LOTE DE PLÁSMIDO <i>PCX::GFP-GPI2</i>	55
2.	ANÁLISIS CUANTITATIVO DE PLÁSMIDO.....	55

3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN DE LIPOSOMAS SIN CARGO.....	56
4. DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA DE LIPOSOMAS SIN CARGO.....	60
5. POTENCIAL ZETA DE LIPOSOMAS SIN CARGO.....	63
6. RESISTENCIA DE PLÁSMIDO A ONDAS DE CHOQUE.....	63
7. DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA DE VESÍCULAS CON PDNA DE CARGO.....	65
8. MICROSCOPIA CONFOCAL.....	67
9. POTENCIAL ZETA DE LIPOSOMAS CON PDNA COMO CARGO.....	69
CONCLUSIONES.....	72
CONCLUSIONES.....	73
TRABAJO FUTURO.....	73
REFERENCIAS.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS

Cryo-EM	Microscopía electrónica de criofractura
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
DAPI	4',6 – Diamino-2 – Fenilindol
DOTAP	1, 2 – Dioleil- 3- Trimetilamonio-Propano
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EE	Eficiencia de encapsulación
EGFP	Proteína verde fluorescente aumentada
FDA	Administración de alimentos y medicamentos de los EUA
GFP	Proteína verde fluorescente
GUV	Vesículas unilaminares gigantes
hrs.	Horas
Hz	Hertz
kbp	Kilopares de bases
kV	Kilovolt(s)
LB	Medio de cultivo del inglés Lysogenic Broth
LB-AMP	Medio de cultivo LB con ampicilina
LUV	Vesículas unilaminares largas
mg	Miligramos(s)

ml	Mililitro(s)
MLV	Vesículas multilaminares grandes
MPa	Megapascal(es)
nm	Nanómetro(s)
pb	Pares de bases
PBS	Solución isotónica y amortiguadora de fosfatos
PC	L- α -fosfatidilcolina
rpm	Revoluciones por minuto
OCh	Ondas de choque
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TNA	Ácidos nucleicos terapéuticos
UV	Ultravioleta
V	Volts
μ g	Microgramo(s)
μ l	Microlitro(s)
μ m	Micrómetro(s)
μ mol	Micromol
μ M	Micromolar
$^{\circ}$ C	Grados centígrados
NP	Nanopartículas

ÍNDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1 Efecto de ondas de choque sobre vesículas multicapa
- FIGURA 2 Microscopía de liposomas multilaminares por Bangham en 1964
- FIGURA 3 Ejemplos de funcionalización de membranas lipídicas y liposomas
- FIGURA 4 Estructura química de la PC
- FIGURA 5 Estructura química de colesterol
- FIGURA 6 Estructura química de DOTAP
- FIGURA 7 Metodologías para la preparación de LUV
- FIGURA 8 Diagrama ilustrativo del funcionamiento del TEM
- FIGURA 9 Diagrama ilustrativo del DLS y su funcionamiento
- FIGURA 10 Diagrama ilustrativo de qué es el potencial zeta y cómo se mide
- FIGURA 11 Diagrama de la presión en un frente de choque típico
- FIGURA 12 Ejemplo de generador de ondas de choque de un generador de tipo piezoeléctrico
- FIGURA 13 Diagrama sobre la cavitación acústica
- FIGURA 14 Diagrama de Jablonski sobre el fenómeno de fluorescencia

FIGURA 15	Estructura química del DAPI
FIGURA 16	Diagrama ejemplificando la estructura de un plásmido
FIGURA 17	Diagrama de propagación del plásmido
FIGURA 18	Diagrama ilustrativo sobre electroforesis
FIGURA 19	Diagrama ilustrativo de microscopía confocal
FIGURA 20	Diagramas de flujo para diseño experimental
FIGURA 21	Esquema del plásmido pCX::GFP-GPI 2
FIGURA 22	Fotografía de bacterias transformantes en placa Petri con plásmido
FIGURA 23	Diagrama del generador de ondas piezoeléctrico
FIGURA 24	Esquema de gradiente de densidad para ultra-centrifugación
FIGURA 25	TEM de LUV neutros sin carga
FIGURA 26	TEM de LUV neutros sin carga, montados diferentemente
FIGURA 27	Diagramas de artefactos de TEM
FIGURA 28	DLS de LUV tratadas con P+ = 15.1 MPa analizadas a 4°C
FIGURA 29	DLS de LUV tratadas con P+ = 15.1 MPa analizadas a 25°C

FIGURA 30	DLS de LUV tratadas con P+ = 18.1 MPa analizadas a 4°C
FIGURA 31	DLS de LUV tratadas con P+ = 18.1 MPa analizadas a 25°C
FIGURA 32	Gráfica de potencial zeta de LUV neutros sin cargo
FIGURA 33	Electroforesis de pDNA tratado con OCh
FIGURA 34	Fotografía con bacterias transformadas con pDNA tratadas con OCh
FIGURA 35	DLS de LUV con pDNA antes de ultra-centrifugarse
FIGURA 36	DLS de LUV con pDNA después de ultra-centrifugarse
FIGURA 37	Microscopía confocal de liposomas neutros sin cargo
FIGURA 38	Barrido en Z de microscopía confocal de LUV neutros
FIGURA 39	Microscopía confocal de liposomas catiónicos sin cargo
FIGURA 40	Microscopía confocal de liposomas catiónicos tratados con OCh
FIGURA 41	Potencial zeta de liposomas catiónicos con pDNA
FIGURA 42	Potencial zeta de liposomas neutros con pDNA

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1.	Clasificación de liposomas por talla y laminaridad
TABLA 2.	Clasificación de liposomas por composición
TABLA 3.	Métodos de preparación de vesículas unilaminares
TABLA 4.	Lotes de liposomas usados y su cargo
TABLA 5.	Tratamientos con OCh
TABLA 6.	Estabilidad de coloides de acuerdo con su potencial zeta

RESUMEN

Los liposomas son vesículas lipídicas usadas a nivel industrial y en ciencia básica y en medicina como herramienta de encapsulación y transporte de diversos compuestos, indirectamente disminuyendo efectos nocivos de dichos compuestos o aumentando su eficiencia al mantener la integridad de lo internalizado.

Existen diversos métodos para la producción de liposomas. Pero entre ellos no se ha explorado el uso de las ondas de choque, las cuales son capaces de permeabilizar temporalmente las bicapas de lípidos por medio de microburbujas que colapsan en el medio donde se generan y propagan dichas ondas.

En este trabajo de tesis se desarrolló un método de preparación de liposomas unilaminares por ondas de choque y, de manera simultánea, el encapsulamiento de DNA plasmídico dentro de los liposomas.

Se produjeron distintos lotes de liposomas, con y sin cargos, con distintas composiciones de lípidos y con exposición a distintos tipos de tratamiento que variaban en intensidad y número de ondas de choque.

Por medio de análisis de imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) se caracterizó la morfología de los liposomas. Adicionalmente, se caracterizó el encapsulamiento del DNA plasmídico usando microscopía confocal. Se comprobó la estabilidad del material genético al ser expuesto ante ondas de choque mediante potencial zeta. El tamaño de las vesículas obtenidas después del tratamiento corresponde a lo esperado para vesículas unilaminares grandes, las vesículas formadas tienden a formar agregados; se demuestra la compatibilidad de las ondas de choque como método para la formación de vesículas unicapa para la encapsulación de material genético.

ABSTRACT

Liposomes are vesicles with lipid layers used at industrial level and basic research as tools for the entrapment and transport of a diverse variety of cargo, it allows decreasing of noxious effects or enhances its efficiency while maintaining the integrity of the encapsulated molecule.

There is a variety of methods for the production of liposomes. But the use of underwater shock waves, known to permeabilize cell membranes, has not been explored for this purpose.

In this project, DNA-encapsulating unilamellar vesicles were obtained by exposing multilamellar vesicles to shock waves.

Different liposome batches were prepared with or without DNA, with distinct lipid compositions, and using different intensities and numbers of shock waves.

Liposomes' morphology was characterized by transmission electron microscopy. The encapsulation of plasmid DNA was assessed by confocal microscopy. The stability of the genetic material was proven with Zeta potential.

The size of the obtained vesicles after the shock wave treatment corresponded to the expected size of large unilamellar vesicles, the acquired vesicles tend to form clusters.

The mentioned results demonstrate the compatibility of the shock waves as a method for unilamellar vesicle formation for genetic material encapsulation.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN LOS LABORATORIOS DE NANOBIO-ÓPTICA Y DE ONDAS DE CHOQUE DEL CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA DE LA UNAM, CON FINANCIAMIENTO DE LA DIRECCIÓN GENERAL DE ASUNTOS DEL PERSONAL ACADÉMICO (DGAPA) DE LA UNAM, A TRAVÉS DEL PROYECTO PAPIIT IT203518.

AGRADEZCO EL OTORGAMIENTO DE BECAS POR PARTE DE LA DGAPA-UNAM

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Licenciatura en Tecnología del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, campus UNAM Juriquilla.

Agradezco a mis maestros y tutores en este proyecto, la Dra. Luz María López Marín y el Dr. Achim M. Loske, a quienes debo su confianza y apoyo recibido durante varios años, la oportunidad de trabajar en dos laboratorios bajo su tutela, y la gran disposición al compartir su tiempo, y conocimientos, siempre con un trato amable procurando mi crecimiento académico y personal, además de una paciencia infinita no merecida.

A ambos muchas gracias por inculcarme ética y disciplina a partir del trabajo que realizan, permitiéndome crecer para ser una buena profesional, y por guiarme no sólo durante los últimos pasos de esta etapa, pero también por algunas de las mejores clases recibidas en toda la carrera.

Agradezco a los miembros del jurado por revisar y corregir este trabajo: el M.C. Francisco Fernández Escobar, Dr. Josué David Mota Morales, Dr. Fernando Peña Ortega, y a la Dra. María Teresa Peña Rangel.

Agradezco, una vez más, al M.C. Francisco Fernández Escobar por el apoyo teórico y práctico mostrado durante el tiempo que estuve trabajando en el proyecto y en el Laboratorio de Ondas de Choque, y su participación en mi formación a lo largo de la carrera.

Agradezco al Dr. Edgar Jiménez Cervantes Amieva, compañero y amigo, que me asesoró con la mejor de las disposiciones continuamente con todo tipo de dudas que tenía en el laboratorio y desarrollo del proyecto.

Agradezco a la Dra. Blanca Millán Chiu por su ejemplo y ayuda teórica y práctica en el proyecto y la carrera.

A la laboratorista Paula Bernardino Peláez por su excelente apoyo, disposición e interés.

A la responsable de la Unidad de Microscopía del Instituto de Neurobiología, la Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos y a la experta M.C. Lourdes Palma Tirado.

A la Unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología, en particular a la Dra. Anaid Antaramian y a la Dra. Adriana González.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional de Querétaro por la disposición de permitirme caracterizar en sus instalaciones.

A todos mis profesores de la Licenciatura en Tecnología por participar en mi formación de alguna u otra manera.

Al personal de Servicios Escolares de la Licenciatura en Tecnología.

Al país que financió el pago de mis estudios y actividades académicas.

Agradecimientos personales y una dedicatoria.

Las personas que me ayudaron en estos años de mi vida y en el tiempo de este proyecto son demasiadas, muchas seguramente ni siquiera fueron conscientes de esa ayuda o de mi aprecio hacia ellos (maestros, administrativos, técnicos de laboratorio, compañeros de años arriba o abajo, compañeros de laboratorios y claro amigos), y seguramente ni siquiera leerán esto, de modo que omitiré muchos nombres, pero mi cariño, gracias y recuerdos les pertenecen.

Las gracias van principalmente a mis padres, que posiblemente fueron quienes más preguntaron cuándo terminaría de escribir la tesis y titularme, *perdónenme por tardar demasiado*.

A mi mamá, *Isabel*, a quien tuve la fortuna de tener conmigo en todo este proceso, que más de una vez me vio llorar, que me ayudó en todo lo que pudo, y de todas las maneras a las que tuvo acceso, que soportó a regañadientes ver la luz de mi cuarto encendida durante madrugadas incontables veces, y que nunca ha dejado de cuidarme a su manera procurando mi salud mental y física; no era posible no considerarme afortunada en tenerla cada vez que veía las dificultades de mis amigos foráneos.

A mi papá, que, aunque no compartió los martirios de vivir en la misma casa que su hija universitaria durante estos años no salió librado del proceso, y me acompañó la mayoría de las mañanas a llegar a tiempo, y de las noches a llegar a casa, aunque esto significara menos horas de sueño para él, que cada ocasión que me veía demostraba interés y escuchaba todo lo que podía contarle de mis tareas, proyectos y experiencia, también a su manera cuidándome y brindándome la ayuda que podía cada vez que se la pedía.

A Edgar, que realmente se convirtió en el hermano mayor que nunca tuve, siempre eres amable y paciente con todos, pero siento que en estos años te luciste aguantándome, te agradezco

cada vez que escuchaste mis dudas del laboratorio y de la vida, dudo que sepas la cantidad de veces que te escribí mensajes llorando y lograbas calmarme sin saberlo.

A la Dra. Luz y al Dr. Achim, este agradecimiento no es como asesores de tesis, sino como maestros y personas, siempre amables, alegres y con una dedicación obvia con sus clases, no saben el cariño que les tuve desde un principio, antes de que se convirtieran en mis tutores.

A mí, porqué en algún lado tengo que darte las gracias, de demostrar que podías hacerlo a pesar de todas las veces que dije que no, por tu capacidad de soportar fracasos y corregirlos, por hacer cosas que me daban miedo, por seguir adelante cuando ya no quería, y por llevarme a lugares que pensé no merecía.

Finalmente dedico mi tesis a Consuelo, mi abuelita, con quien vivía al empezar mi universidad y que murió un día antes de mi primer parcial de variable compleja, no fui a tu funeral y aun así reprobé, merecías algo mejor. Ojalá pudieras leer esto y así poderte agradecer la motivación y apoyo que siempre fuiste, terminar esto habría valido más la pena si pudieras verlo.

“...the straight line; a respectable optical illusion which ruins many a man.”

Victor Hugo, Les Misérables

INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES

Los liposomas son herramientas empleadas en ciencia básica y aplicaciones biomédicas, usadas como vehículos de una extensa cantidad de medicamentos, siendo la primer y más común nanopartícula aprobada por la FDA como acarreador desde finales de los años ochenta (Allen & Cullis, 2013). Son un vector que en algunos casos aumenta la eficiencia en la liberación de fármacos y/o reduce la toxicidad de los mismos (Huwylar, 2008).

Existe una gran diversidad de metodologías para la preparación de liposomas y se busca con gran interés el mejorar dichos métodos (Dua & Rana, 2012), cada uno con ventajas y desventajas. Uno de los principales obstáculos es la complejidad y eficiencia limitada en el proceso de encapsulamiento del cargo y el daño que se puede producir en el mismo, particularmente con ácidos nucleicos.

Los liposomas que reportan mayor respuesta aplicados en tratamientos son las vesículas unilaminares grandes (100-500nm) (Shek, Yung & Stanacev, 1983). Actualmente en la industria farmacéutica se usan técnicas de sonicación, liofilización y rehidratación (Parthasarathy et al, 1994, Neopharm Inc, 2000) que rompe estructuras lipídicas grandes formando vesículas y micelas, logrando soluciones claras ópticamente como característica de los liposomas unilaminares (Saunders, Perrin & Gammack, 1962).

Las ondas de choque se han usado clínicamente desde principios de los años ochenta para la fragmentación no invasiva de cálculos urinarios y biliares, una técnica conocida como litotricia extracorpórea (Loske, 2007). Con este método también se ha logrado permeabilizar membranas celulares con fines de transfección. Recientemente se observó que, al exponer células eucariotas a ondas de choque, la membrana se modifica externamente con la aparición de poros y desprendimiento de vesículas (López-Marín et al, 2016), lo que sugiere su uso para la formación de liposomas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Particularmente en escenarios de terapia génica, donde los liposomas encuentran un área de aplicación de relevancia, la integridad de los ácidos nucleicos como cargo es fundamental en la metodología empleada para la fabricación de las vesículas. Sin embargo, los métodos tradicionales de fabricación de vesículas unilaminares se asocian con la desnaturalización de macromoléculas; un ejemplo de ello es el uso del ultrasonido. Hasta ahora, la encapsulación de biomoléculas en vesículas unilaminares ha sido lograda mediante el método de deshidratación-rehidratación, un proceso largo que involucra la formación de películas de Bangham, proceso que más adelante se describe con mayor

detalle; la extrusión de vesículas a través de membranas, deshidratación por liofilización durante varias horas para una rehidratación posterior (Cabral, Zollner, y Santana, 2004) o el uso de la electroporación de vesículas con la finalidad de permeabilizar momentáneamente la bicapa lipídica e integrar biomoléculas en el medio. En este trabajo se propone la aplicación de ondas de choque en agua, un proceso físico que ha sido usado para permeabilizar membranas de bacterias, hongos, y células de mamífero (Magaña-Ortiz et al, 2013, Rivera et al, 2014, López-Marín et al, 2018) . En todos los casos se ha identificado que el principal efecto de permeabilización de las membranas, al ser expuestas a ondas de choque es la cavitación acústica (Lauer et al, 1997, Zhou et al, 2012, Schlicher et al, 2006). El proceso de cómo se cree que este fenómeno puede llegar a producir vesículas unilaminares a partir de vesículas multilaminares está representado en la **Figura 1**. Se considera que la cavitación acústica es el efecto de mayor importancia, ya que, al minimizarla, ya sea con presiones hiperbáricas, o eliminando la interfaz líquido-aire, los efectos de permeabilización disminuyen.

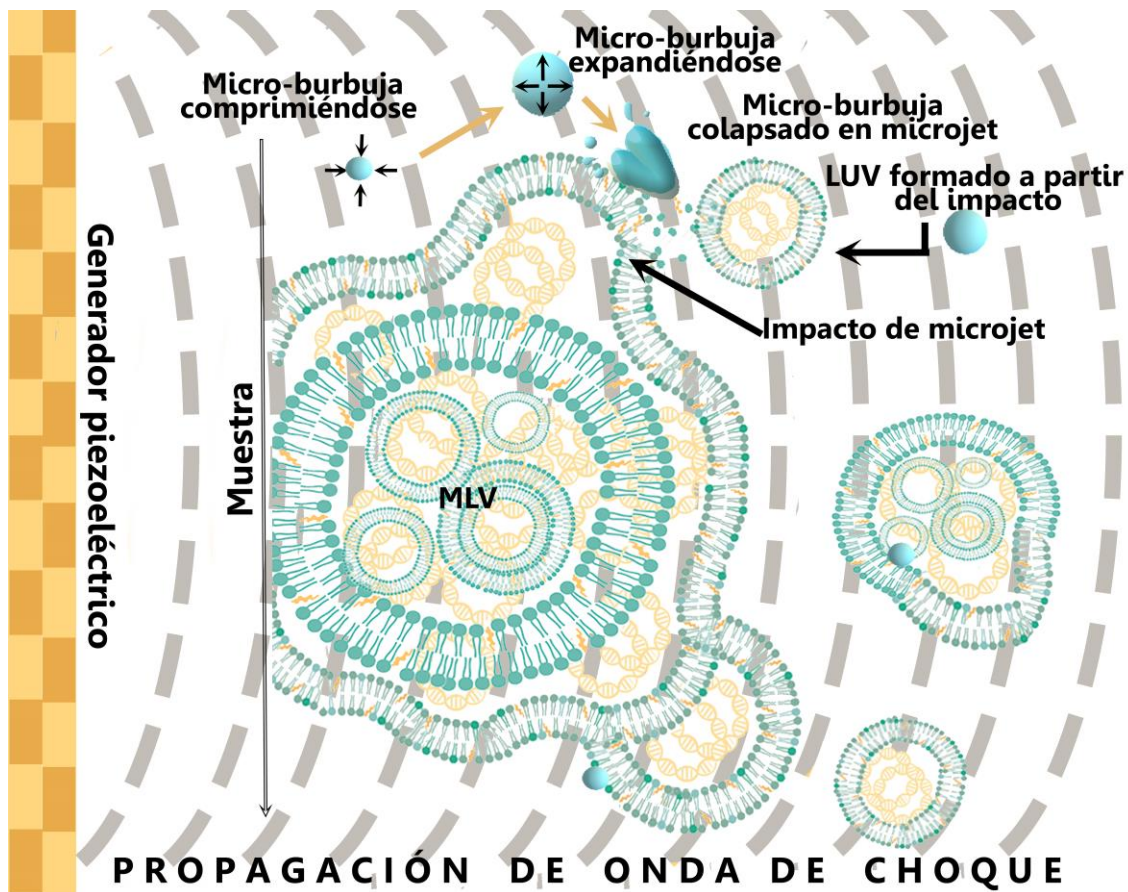


Figura 1. Esquema que muestra vesículas multilaminares suspendidas en solución, expuestas a ondas de choque producidas por un generador piezoeléctrico

OBJETIVOS

GENERAL

Explorar la viabilidad de las ondas de choque como un método para la preparación de liposomas unilaminares con encapsulamiento simultáneo de ácidos nucleicos.

PARTICULARES

- Evaluar los efectos de las ondas de choque de distinta energía y dosis sobre la estabilidad de liposomas multilaminares preparados a partir de lípidos de células eucariotas.
- Explorar la estabilidad ante ondas de choque del plásmido reportero *pCX::GFP-GPI2* purificado a partir de células de *Escherichia coli* transformantes.
- Evaluar la preparación mediante ondas de choque de liposomas unilaminares grandes con DNA plasmídico encapsulado.

HIPÓTESIS

Las ondas de choque romperán las membranas de fosfolípidos de una suspensión de vesículas multilaminares permitiendo la formación de liposomas unilaminares.

Aplicando ondas de choque es posible formar vesículas unilaminares sin comprometer la estabilidad de los ácidos nucleicos que se desean encapsular.

Las ondas de choque son un método viable para la formación de liposomas unilaminares con cargo de ácidos nucleicos.

MARCO TEÓRICO

1. LIPOSOMAS : CONCEPTO Y APLICACIONES

Los liposomas son vesículas esféricas que consisten en al menos una bicapa lipídica que rodea un compartimento acuoso. Su tamaño varía de 20 nm hasta 50 μm . Fueron observados (Figura 2) y estudiados por primera vez en 1964 (Bangham & Horne, 1964) después de ser descritos por serendipia al ultra-centrifugar soluciones de fosfatidilcolina (PC), también conocida como lecitina, de yema de huevo (Saunders, Perrin & Gammack, 1962). Son una herramienta básica en el estudio de la biofísica y bioquímica de membranas (Bangham, 1993) permitiendo hacer importantes avances en esa área y como modelo celular. A principios de los años 70 se comenzaron a usar para pruebas de encapsulamiento de enzimas e incluso para tratamientos *in vivo* con gran éxito (Colley & Ryman, 1976).

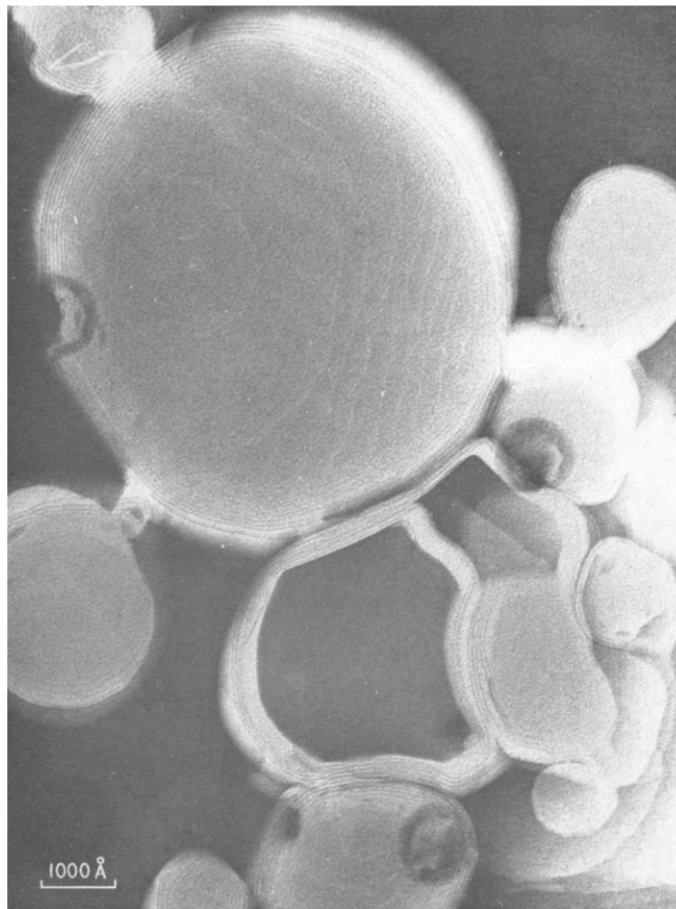


Figura 2 Una de las primeras microscopías electrónicas de transmisión de liposomas, preparada por tinción negativa, muestra proporciones molares iguales de lecitina de yema de huevo y colesterol tratados por ultrasonido (Bangham & Horne, 1964). Se observan estructuras multilaminares en escala de micras.

1.1. BICAPA LIPÍDICA : ESTRUCTURA Y DINÁMICA

Una bicapa lipídica es una barrera biológica, y dependiendo de su composición, su función además de separar, también regula procesos de intercambio de sustancias. La podemos encontrar como una de las estructuras principales en las membranas celulares, en algunos virus, alrededor del núcleo celular y otras estructuras subcelulares.

1.1.1. COMPOSICIÓN DE LA MEMBRANA LIPÍDICA

El componente principal en los liposomas es el fosfolípido, que está constituido por un glicerol esterificado por dos cadenas de ácidos grasos y a un fosfato que a su vez puede estar esterificado a un segundo alcohol dando así una diversidad de lípidos. Este segundo alcohol puede ser nitrogenado (colina), un polialcohol cíclico (inositol), otra molécula de glicerol, etc.

La membrana lipídica se forma con dos monocapas de lípidos anfifílicos cualquiera en el que las cadenas hidrocarbonatadas interactúan entre sí en forma horizontal y transversalmente creando un espacio hidrofóbico en el cual moléculas con la misma naturaleza pueden alojarse mientras que los extremos de las dos láminas son solvatados.

Los lípidos pueden unirse covalentemente con moléculas que compartan su polaridad, por ejemplo, glicolípidos, proteínas aciladas, y preniladas, y no covalentemente con lipoproteínas y otras estructuras. La estructura de membrana de los liposomas es compatible con compuestos hidrofílicos y lipofílicos, por lo que pueden ser decorados con proteínas transmembranales, anticuerpos, nanopartículas, polímeros y otras biomoléculas como se muestra en la [Figura 3](#), además pueden tener distintas cargas y tipos de superficie. Todo esto se traduce en características únicas que se pueden usar en el diseño para mejorar estrategias para liberación controlada, densidad de empaquetamiento, flexibilidad, resistencia osmótica, estabilidad *in vitro* e *in vivo*, permeabilidad, carga eléctrica, capacidad antigénica, aumentar su estabilidad, y biocompatibilidad, es decir su eficiencia como acarreadores.

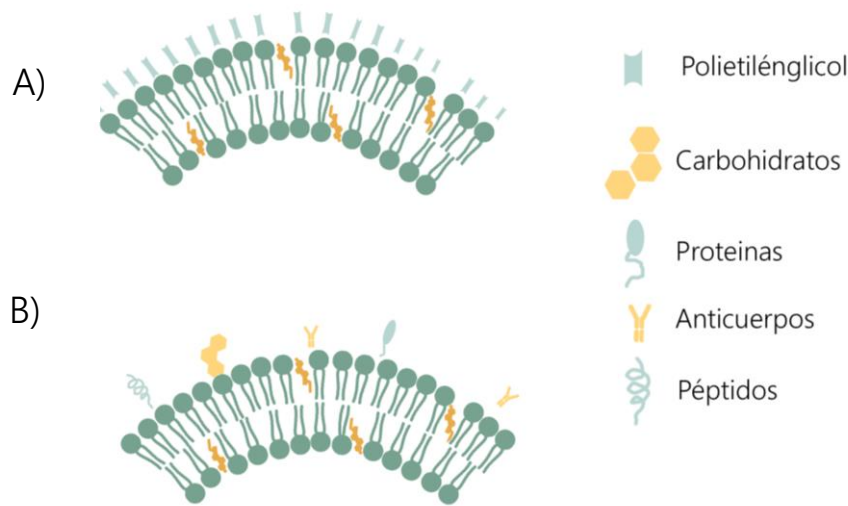


Figura 3. A) Representación de una configuración de membrana lipídica con decoración de distintas moléculas tanto orgánicas como inorgánicas. B) Para darle una mayor estabilidad es normal que se decore el exterior del liposoma con polímeros.

Las moléculas más usadas en la elaboración de liposomas son los fosfolípidos tipo L- α -fosfatidilcolina (PC) y el colesterol, su estructura se muestra en la Figura 4 y 5. Suelen combinarse para regular la fluidez de membrana provista por la PC con la rigidez que el colesterol y su estructura tetracíclica otorgan, además de incrementar la estabilidad, pues agrega repulsión estérica y efectos electroestáticos que evitan la agregación, también reduce la permeabilidad de la membrana a solutos (Mozafari, 2007).

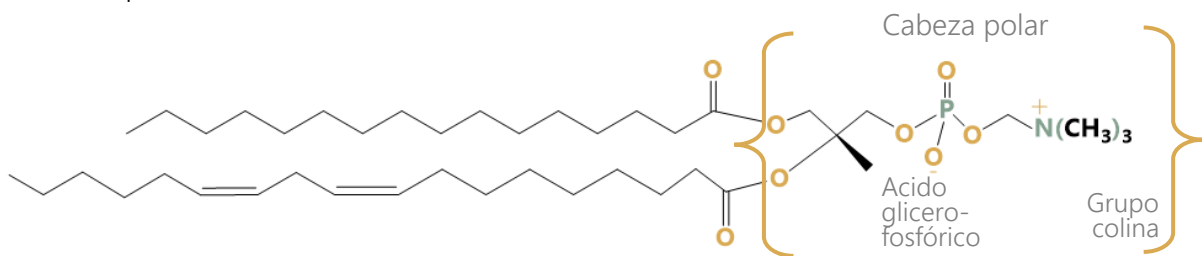


Figura 4. Estructura química de una PC con sustituyentes derivados comúnmente de ácidos palmítico, oleico o esteárico y linoleico o linoléico, compuesta por una parte polar, formada por un grupo colina y un ácido glicero-fosfórico, y una parte hidrofóbica, compuesta por, una cadena de ácido graso saturado y otra de un ácido graso insaturada ambas varían en talla.

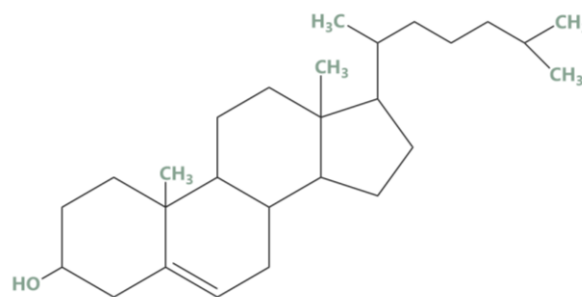


Figura 5. Estructura química del colesterol. Se localiza entre las cadenas de los ácidos grasos. En el acomodo de la membrana tiene una cabeza polar (grupo hidroxilo)

1.1.2. DINÁMICA DE LOS LIPOSOMAS

El auto-ensamblaje de los lípidos polares que estructuran la membrana ocurre dependiendo las condiciones bajo las que se lleve a cabo la preparación. La exposición de la mezcla de lípidos a una atmósfera convencional de aire promueve una oxidación no deseada, la hidratación debe hacerse por arriba de la temperatura de transición de fase de los lípidos, y los disolventes usados son determinantes para la estructura que adquirirán.

La variedad de lípidos que pueden usarse en la conformación de la membrana le conceden una carga y fluidez particular. En el caso de vesículas formadas con lípidos fluidos existe una mayor tendencia a fusionarse entre sí (Papahadjopoulos et al, 1974).

Se reporta que la interacción entre liposomas y células eucariotas puede darse vía fusión, endocitosis, adsorción estable o mediante el proceso de transferencia de lípidos. Los primeros involucran la recepción de un cargo, mientras que el proceso de transferencia consiste en un intercambio de lípidos de la capa externa del liposoma, pero no de su contenido. (Sandra, & Pagano, 1979).

Los procesos de interacción entre una célula y un liposoma donde se recibe un cargo podemos dividirlos en endocíticos y no-endocíticos. El modo de la interacción depende de las propiedades físicas y composición química de los liposomas y las células con las que están interactuando, siendo particularmente importante la carga superficial neta y la "fluidez" de la bicapa lipídica. Se reporta que el proceso no endocítico, como la fusión, ocurre predominantemente con vesículas cargadas negativamente formadas por fosfolípidos "fluidos" a una temperatura de 37°C (fosfatidilserina o PS / PC) (Martin, & Macdonald, 1974), mientras que el proceso de endocitosis ocurre en vesículas "neutras" fluidas (PC) (Rahman & Wright, 1975) y vesículas cargadas negativamente de fosfolípidos "sólidos" (fosfatidilserina / distearilfosfatidilcolina / dipalmitoilfosfatidilcolina) (Korn et. al, 1974).

Si una vesícula interactúa mediante endocitosis entonces será dirigido al aparato lisosomal donde el liposoma se romperá liberando el cargo. Sin embargo, cuando el límite de permeabilidad en la membrana lisosomal es superado por materiales con peso molecular mayor a 230 g/mol (Gordon & Cohn, 1973) existe la posibilidad de que este se difunda a otros sitios intracelulares. Si el mecanismo principal es fusión el contenido se liberará directamente al citoplasma con la posibilidad de modificar la membrana plasmática. La tendencia en esas interacciones con respecto a la fluidez de la membrana ocurre en vesículas unilaminares y

multilaminares con relevante similitud, lo que indica que la fluidez y carga son más relevantes que el tamaño en la forma en la que se incorporan a la célula (Poste & Papahadjopoulos, 1976). Siendo todo esto de suma importancia para el diseño del liposoma o bien del cargo.

1.2. TIPOS

Podemos clasificar a los liposomas de acuerdo con una nomenclatura que se basa en sus tallas y en la cantidad de láminas que tienen (Tabla 1). Esta particular forma de nombrarlos se acordó por la Academia de Ciencias de Nueva York en una reunión sobre el uso en biología y medicina de los liposomas (Papahadjopoulos, 1978).

TABLA 1 Clasificación de liposomas de acuerdo a la nomenclatura acordada en la reunión de la "New York Academy of Sciences" sobre liposomas del 14-17 de septiembre de 1977. En este proyecto en particular, nos interesamos principalmente por las vesículas unilaminares grandes o LUVs.

NOMBRE	DESCRIPCIÓN	APLICACIONES
Vesículas Multilaminares (MLV) (Gruner et al, 1985)	Vesículas con un diámetro que va desde unos cientos de nm hasta los 100 µm. Consisten en arreglos de una secuencia de bicapas lipídicas concéntricas que encierran un volumen acuoso.	A partir de estas vesículas es posible obtener los liposomas unilaminares pequeños y grandes. En menor proporción se usa para encapsular fármacos y biomoléculas con una baja eficiencia reportada.
Vesículas Unilaminares Pequeñas (SUVs) (Lin et al, 2011)	Vesículas de diámetro <100 nm. Entre más pequeñas, el tamaño de la bicapa adelgaza, la tensión de membrana aumenta, la densidad de área de las cabezas polares exteriores disminuye mientras la interior incrementa.	Usadas para el estudio de propiedades físicas de membranas donde el tamaño de la vesícula juega un papel importante. Se usan en menor medida para encapsulación de fármacos pequeños.
Vesículas Unilaminares Grandes (LUV) (Kim & Baianu, 1991)	Vesículas con tamaños entre los 100-500 nm, tienen una mayor eficiencia de encapsulación en comparación con las SUVs y son más homogéneas en su superficie comparadas con las MLV.	Son el principal tipo de liposoma usado para terapia génica, y encapsulación en la industria farmacológica, cosmética y alimenticia.

NOMBRE	DESCRIPCIÓN	APLICACIONES
Vesículas Unilaminares Gigantes (GUVs) (Wesołowska et al, 2009)	Vesículas cuyo tamaño va hasta los 50 μm , se generan en su mayoría al aplicar un campo eléctrico.	Modelo para el estudio de estructura, dinámica, y propiedades mecánicas membranales además de la interacción de moléculas no lipídicas con membranas liposomales y la respuesta membranal a distintos estímulos.

Los liposomas también se llegan a diferenciar de acuerdo con las modificaciones que se les han hecho para fines específicos (Tabla 2), ya sea para trabajo en laboratorio o en la industria; principalmente son de la talla y laminaridad de las LUV. Estas implementaciones les confieren propiedades para aumentar su eficiencia en distintas áreas. Es común que los liposomas puedan entrar en más de una categoría de composición.

TABLA 2 La composición de las vesículas también puede ser útil para clasificarlas, sin embargo, no es extraño que un liposoma pertenezca a más de una de las siguientes descripciones

NOMBRE	DESCRIPCIÓN
Liposomas convencionales	Son vesículas formadas a partir de fosfolípidos neutros, no están recubiertos, y son rehidratados en un medio acuoso sencillo. Tienen poco tiempo de vida en circulación <i>in vivo</i> .
Liposomas sensibles a pH (Slepushkin et al, 2004)	Son una variante de liposomas que al entrar por vía de endocitosis a la célula se desestabilizan por el pH medianamente ácido en los endosomas, liberando su cargo acuoso al citoplasma y desestabilizando la membrana del endosoma.
Liposomas catiónicos (Ahmad, Ali & Ahmad, 2012)	Un tipo de vesícula funcionalizada compuesta de lípidos catiónicos, y neutros que se mezclan con ácidos nucleicos cargados negativamente formando complejos.
Liposomas de larga circulación (Zalipsky et al, 1994)	Son liposomas con una cubierta de polímero, generalmente polietilenglicol (PEG), que da una estabilidad estérica que permite tiempos largos de circulación en torrente sanguíneo.

NOMBRE	DESCRIPCIÓN
Inmuno-Liposomas (Eloy et al, 2017)	Estas vesículas tienen ligandos en su superficie capaces de reconocer y unirse a células de interés. Pueden tener anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos y suelen contener maleimida.
Transferosomas (Cevc & Blume, 1992)	Consisten en un sistema de fosfolípido, colesterol y moléculas tensoactivas como colato de sodio, se deforman fácilmente siendo capaces de pasar a través de los poros para una liberación transdermal.
Arqueoliposomas (Mozafari et al, 2006)	Se definen como vesículas hechas con lípidos extraídas de arqueobacterias. Son más estables y resistentes a la oxidación e hidrólisis enzimática que los liposomas convencionales, incluso a altas temperaturas por lo que se sugieren para proteger antioxidantes en procesamiento de alimentos.

Sea cual sea el tipo de liposoma, lo deseable para aplicaciones comerciales es tener altas eficiencias de encapsulación, una distribución monodispersa de tallas, alta estabilidad térmica, y capacidades de liberación adecuadas a cada necesidad.

1.3. APLICACIÓN

Aparte de las ya mencionadas en la [Tabla 1](#), vale la pena mencionar, aunque sea de manera superficial, sus aplicaciones particularmente relacionadas a la encapsulación, ya sea como herramienta en la ciencia básica, o en la industria, con el fin de remarcar su importancia. Si bien la investigación en el desarrollo de nuevos productos que sean capaces de aprovechar el diseño único de los liposomas lleva varios años trabajando arduamente, los resultados se han visto limitados por problemas como toxicidad en algunas formulaciones de lípidos, baja eficiencia de encapsulación dependiendo de la talla de los cargos, vesículas inestables y altos costos para la producción en grandes escalas.

Las aplicaciones en la industria alimenticia para los liposomas se basan en encapsulado de saborizantes para su liberación controlada y colorantes, modifican la textura de los alimentos y mejoran la absorción y viabilidad de nutrientes. También pueden usarse para prevenir el envejecimiento y deterioro de los productos (Reineccius, 1995).

Los liposomas también se usan ampliamente en la rama cosmética, principalmente a través de geles, cremas, ungüentos, bloqueadores y otros tipos de soluciones que son capaces de liberar cargos al estrato córneo con fines anti oxidativos, de rehidratación, tratamiento de enfermedades y prevención de daños (Ashtiani et al, 2016).

Las aplicaciones farmacéuticas y médicas consisten en el encapsulamiento de agentes para rayos X o resonancia magnética, liberación de enzimas, hormonas, antígenos, factores sanguíneos y como adyuvante en varios medicamentos ya aprobados y en el comercio. Otro tipo de uso y en el que este proyecto se centra es el de encapsulación de ácidos nucleicos. Generalmente esto es para terapia génica (Sercombe et al, 2015).

1.3.1. LIPOSOMAS EN TERAPIA GÉNICA

La terapia génica se visualiza desde las últimas décadas como una alternativa al tratamiento con mayor desarrollo de enfermedades hereditarias y adquiridas. El principal objetivo de este tipo de terapia es la transferencia de material génico a tejido específico *in vivo*, sin embargo, esta terapia requiere la implementación de un acarreador, ya que por sí solo el material genético tiene baja aceptación celular. Los liposomas son el vector más explorado en la terapia génica después de los métodos virales (Edelstein et al, 2013), y poseen importantes ventajas sobre ellos, como que no son inmunogénicos, son fáciles de producir en comparación, no tienen limitante de acuerdo al tamaño del DNA que se quiere insertar, y no son oncogénicos (Ly et al, 2006) como el caso del retrovirus como vector (Bouard, Alazard-Dany & Cosset, 2009).

1.3.1.1. LÍPIDOS CATIÓNICOS

Los lípidos catiónicos comenzaron a desarrollarse a partir de finales de 1980 (Felgner et al, 1987). En la actualidad su síntesis puede adaptarse a aplicaciones específicas. Suelen estar compuestos de tres dominios, una cabeza polar, una mitad hidrofóbica que consiste en dos colas lipofílicas, o una porción esteroide y un grupo o un conector que una estos dos dominios, como lo muestra la [Figura 6](#).

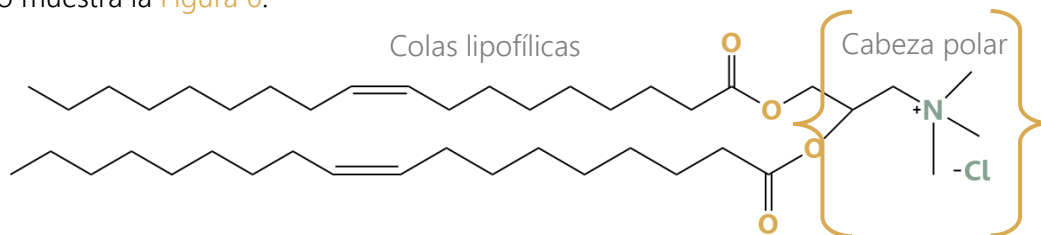


Figura 6. Estructura del lípido catiónico DOTAP, consiste en una cabeza monocatiónica de trimetilamonio y dos cadenas de carbono insaturadas

Generalmente, la síntesis de este tipo de lípidos se realiza para la producción de liposomas para la liberación de ácidos nucleicos, suelen mezclarse con lípidos neutros como apoyo y el material genético.

La carga parcial positiva facilita la unión con la superficie celular cargada negativamente, y la interacción con la membrana endosomal para la liberación citoplasmática de los ácidos nucleicos (Zhao & Huag, 2014). Entre las desventajas que presenta el uso de estos lípidos es una inestabilidad en fase acuosa por periodos de almacenamiento prolongado y un cierto nivel de toxicidad que al igual que su eficiencia de encapsulamiento depende de su concentración y proporción de otros lípidos en la composición final de la vesícula (Fehring et al, 2014). No sólo se usan para formar liposomas, también lipoplejos, que son estructuras no esféricas ni bien definidas.

1.4. MÉTODOS DE PREPARACIÓN Y ENCAPSULACIÓN

La preparación que Bangham estableció como base para los liposomas en general consiste en la mezcla de lípidos mediante disolventes orgánicos, evaporación de dichos disolventes y rehidratación con un medio acuoso mediante agitación manual. Esta metodología logra la formación de MLV.

Y si bien, para la fabricación de liposomas como modelos de membranas, generalmente las GUVs, es una aplicación con fines meramente limitados a investigación dentro de un laboratorio, las metodologías necesarias para la aplicación de encapsulación y liberación de todo tipo de compuestos que son usados a nivel industrial dependen no solamente de la composición o estructura del liposoma, sino también de la factibilidad técnica y económica del método. El método debería de tener el potencial para producir liposomas teniendo en cuenta una variedad de moléculas como posibles ingredientes y proteger de degradación tanto el cargo como las moléculas incorporadas en la superficie.

Como se muestra en la [Tabla 1](#), las MLV actualmente se usan en mayor medida como punto de partida para obtener liposomas de una sola lámina. Para la formación de este tipo de vesículas existe una diversidad de métodos que podemos dividir entre dispersión física y química. Son muchos los métodos que logran vesículas unilaminares que van de los 20 nm hasta varias micras, sin embargo, la mayoría no son métodos aptos para el encapsulamiento de cargos, ya sea por el estrés mecánico o químico que estos procedimientos implican. No solo eso, existen varios métodos para fabricación de liposomas a escalas de laboratorio, pero muy pocos para su producción a gran escala.

La **Tabla 3** muestra una breve descripción de dichos métodos con sus principales ventajas y desventajas.

TABLA 3 Descripción de los métodos más comúnmente usados para la producción de liposomas unilaminares

MÉTODOS DE DISPERSIÓN FÍSICA			
Método	Descripción	Ventajas	Desventajas
**Sonicación (Mendez & Banerjee, 2017)	MLV en solución acuosa expuestas a ultrasonido. El tiempo de exposición depende de la intensidad usada y el intervalo de tallas que se busca.	Simple y rápido.	Sobrecalentamiento en la suspensión de lípidos ocasionando degradación. Contaminación de partículas metálicas con la sonda. Degradación de ácidos nucleicos. Lotes multilaminares.
*Ciclos de congelación y descongelación (Traïkia et al, 2000)	MLV prefabricadas y rehidratadas congeladas con nitrógeno líquido, se calientan en baño maría a 60°C, y se repite varias veces.	Eficiente con bicapas poco rígidas.	Tardado. Se requiere de un crioprotector para no dañar el cargo. Baja eficiencia en liposomas con colesterol incorporado.
Método de Mozafari (Mortazavi et al, 2007)	Hidratación de lípidos en presencia de glicerol al 3% (vol) bajo agitación y calor (60-120°C dependiendo de la presencia de colesterol)	Libre de disolventes orgánicos.	Método nuevo que requiere verificar reproductibilidad y caracterización.

MÉTODOS DE DISPERSIÓN FÍSICA			
Método	Descripción	Ventajas	Desventajas
Extrusión (Lapinski et al, 2007)	Se pasa la solución de MLV a través de filtros de policarbonato del tamaño deseado varias veces.	Control de tamaño de partícula. Mayor eficiencia de encapsulación comparada con sonicación o remoción de detergente.	Se requiere cambiar los filtros constantemente. Maneja volúmenes pequeños. Es difícil alcanzar una temperatura y mantenerla.
Hidratación y rehidratación de vesículas preformadas vacías (Zadi & Gregoriadis, 2000)	En este método se usan vesículas preformadas sin carga de tallas pequeñas mezcladas con sacarosa y el soluto que se desea encapsular. La mezcla se deshidrata y rehidrata en repetidas ocasiones fusionando las SUVs en LUV con carga.	Alta eficiencia de encapsulamiento cuando la sacarosa se mantiene al mínimo. La sacarosa da estabilidad a las vesículas.	La estabilidad de las vesículas es inversamente proporcional a la eficiencia de encapsulación.
*Evaporación de fase reversa (Szoka & Papahadjopoulos, 1978)	La mezcla de lípidos se disuelve en un disolvente orgánico, se añade una fase acuosa y se sonica para producir micelas inversas, se evapora el disolvente y se obtiene un gel donde están los liposomas.	Niveles buenos de encapsulación. Simple.	No es apto para encapsulación de material sensible debido a los disolventes usados. Tardado. Problemas de esterilidad.

MÉTODOS DE DISPERSIÓN FÍSICA			
Método	Descripción	Ventajas	Desventajas
Inyección de etanol/éter (Batzri & Korn, 1973)	Los lípidos se disuelven en una mezcla de disolventes que después se inyectan en una fase acuosa. En caso de inyección de éter se tiene que calentar para evaporar disolvente.	Procedimiento simple. Alta eficiencia en cargos hidrofóbicos. Se desarrolló una versión fácilmente escalable (Hauschild, S. et al., 2005).	Residuo de disolventes orgánicos. Tardado. Problemas de esterilidad. Baja eficiencia en cargos hidrofílicos. Baja homogeneidad en vesículas.
Diálisis (Alpes et al, 1986)	Se usa detergente en concentración micelar crítica para solubilizar lípidos, al retirar el detergente mediante diálisis las micelas de lípidos en solución se estabilizan y se unen para formar LUV.	Dispersión de tamaños estrecha.	Es un proceso que puede llevar varios días. El volumen que maneja no supera los 10 ml. Exposición del cargo a detergente. No se puede retirar por completo el detergente.

**Son métodos que se describirán gráficamente más adelante.*

***Método utilizado como paso extra en muchos otros procesos.*

Como se puede observar, hay dos tendencias en la formación de LUV, los métodos de síntesis descendente (top-down), donde se parte ya sea de MLV, geles y capas de lípidos deshidratados y los métodos de síntesis ascendentes (bottom-up) (Trevisan et al, 2011, Deng, Yelleswarapu & Huck, 2016; Göpfrich, Platzman & Spatz, 2018), donde vesículas preformadas vacías de tallas correspondientes a SUVs se fusionan entre sí para aumentar su diámetro.

El método de síntesis no es el único factor relevante para la eficiencia del método de encapsulamiento, también recae en la modificación de temperaturas, presiones y la interacción que se tiene con el disolvente usado para rehidratar. Sin embargo, es importante que estos

cambios en el ambiente no sean lo suficientemente intensos o prolongados como para causar daños al material que se desea encapsular.

Es común que en la mayoría de los métodos se obtenga una población de tamaños dispersa, que muchas veces, por necesidad de la aplicación, se requiere homogeneizar. Un método común para separar liposomas de distintas tallas es la ultracentrifugación

No todos los métodos descritos anteriormente son óptimos para la encapsulación de biomoléculas. Varios de los métodos son tardados y con diversas desventajas. En la [Figura 7](#) se pueden observar algunas de las metodologías más usadas para la encapsulación por sus altos rendimientos reportados.

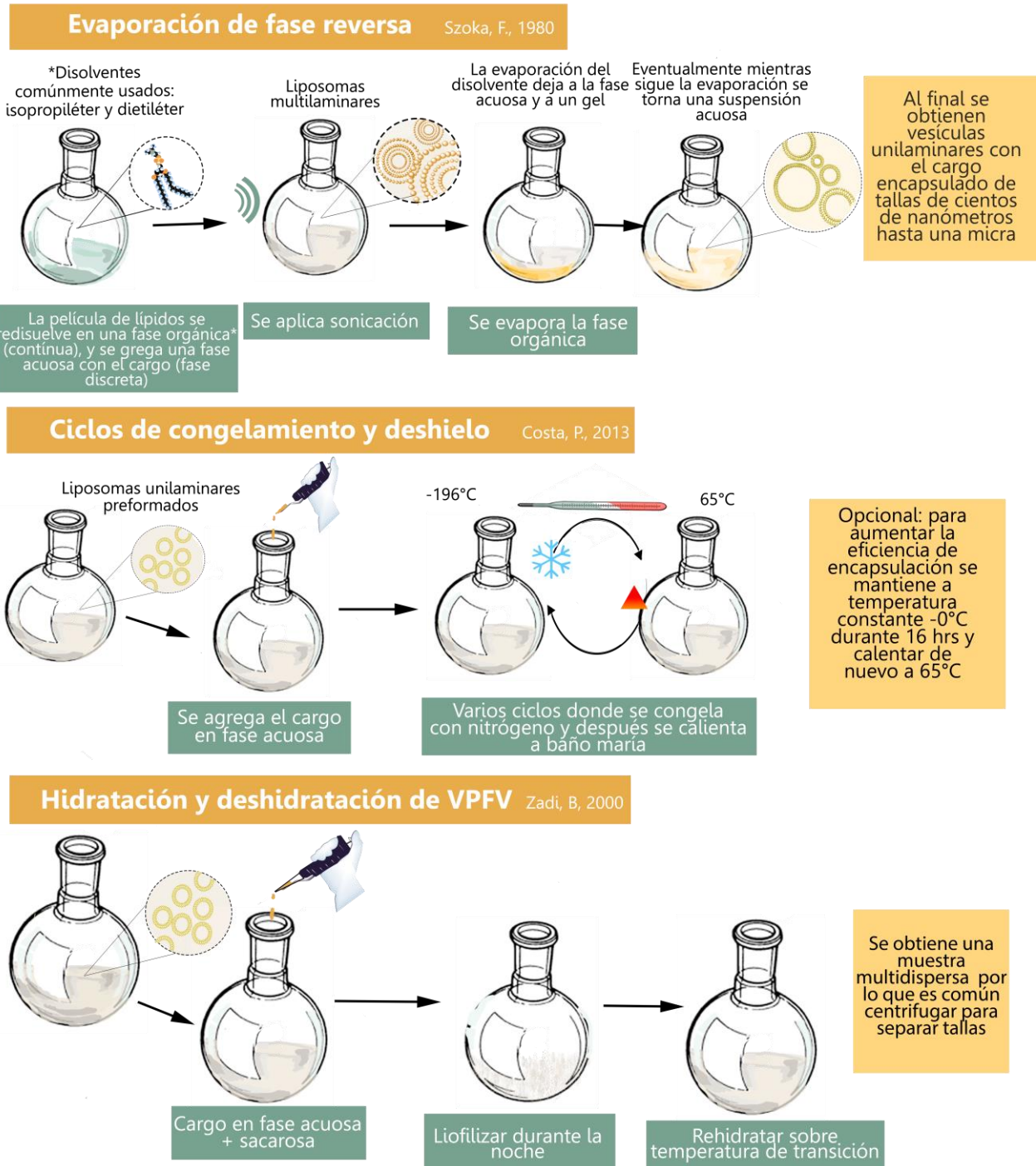


Figura 7. Se muestran algunas de las metodologías frecuentes para la elaboración de liposomas con cargo. En ellas se ejemplifica el tiempo empleado en su elaboración y el uso de disolventes inadecuados para biomoléculas A) El método de evaporación de fase reversa (Szoka & Papahadjopoulos, D. 1980, B) La técnica de ciclos repetitivos de congelación y descongelación (Costa, Xu, & Burgess, 2013, C) El método de hidratación y rehidratación de vesículas preformadas sin cargo (Zadi, & Gregoriadis, 2000)

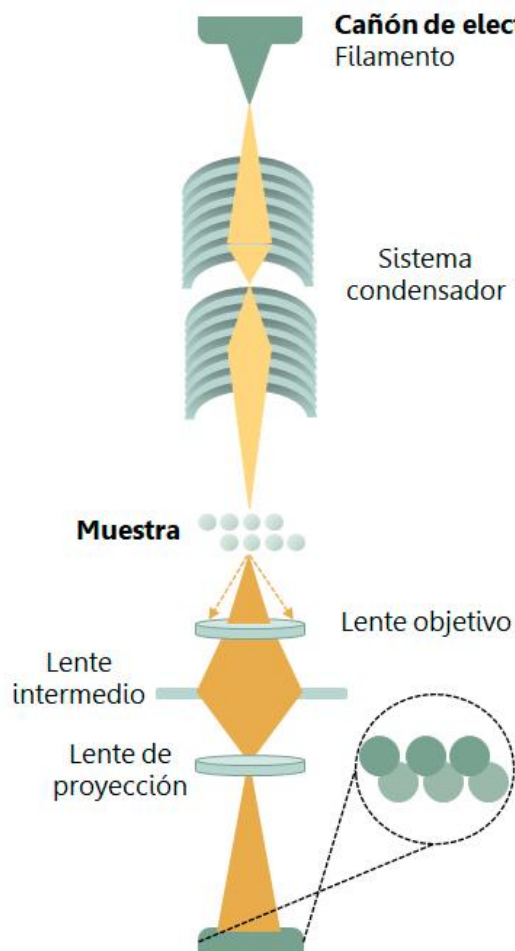
1.5. CARACTERIZACIÓN DE LIPOSOMAS

Para verificar el potencial de vesículas para una aplicación es necesario observar su morfología y laminaridad, su diámetro, estabilidad, carga superficial, fluidez de membrana y eficiencia de encapsulamiento.

A continuación, se presentan las técnicas de caracterización relevantes para este trabajo.

1.5.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM)

La microscopía electrónica de transmisión (TEM, *transmission electron microscopy*) consiste



en hacer incidir un haz de electrones acelerados por potenciales eléctricos de decenas hasta cientos de kV, los cuales son focalizados en alto vacío sobre una muestra o estructura de escala nanométrica para atravesarla y proyectar una imagen a blanco y negro contrastada por la densidad electrónica de la muestra. Es decir, las zonas que aparezcan con mayor luz representan áreas donde mayor cantidad de electrones pudieron pasar y se consideran poco electrodensas. Esta particularidad provee la forma, tamaño, estructura de la muestra y ciertas características de textura.

En la **Figura 8** se muestra una representación de los elementos de un microscopio electrónico de transmisión.

Figura 8. El cañón de electrones consiste de un filamento generalmente de tungsteno, los electrones emitidos atraviesan un sistema que los acelera y focaliza para atravesar la muestra, un sistema de lentes termina por corregir y aumentar la proyección

Se requiere que las muestras tengan una cierta transparencia electrónica para poder ser atravesadas y en algunos casos deben cortarse para observar estructuras, también tienen que resistir la cámara de vacío y en el caso de muestras de origen orgánico, como los liposomas, se suele hacer una tinción previa para dar contraste. Se usan tintes electrodenso como acetato de uranilo, de plomo, tetróxido de osmio, ácido fosfotúngstico y muchos más.

Para el caso de los liposomas, esta técnica proporciona la morfología, una noción de las tallas de la población de vesículas obtenidas, y la cantidad de láminas que tiene y la homogeneidad de la muestra.

1.5.2. DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA (DLS)

Es un método también llamado dispersión de luz cuasi-elástica usado para determinar el tamaño y la dispersión de tamaños de muestras en suspensión. Como se muestra en la [Figura 9](#), consiste en hacer incidir el haz de un láser en un medio acuoso donde existen partículas en interacción con moléculas de disolvente obteniendo un espectro de dispersión que se ve alterado por el constante movimiento browniano de cada elemento, además de la interferencia, ya sea constructiva o destructiva, de la suma de dispersiones de la muestra total. Por lo mismo posee fluctuaciones en la intensidad dependientes del tiempo y que se relacionan con el radio de difusión que tenga la muestra en el disolvente, que a su vez se relaciona con el radio hidrodinámico de la muestra, obteniendo así no solo el tamaño estimado de las partículas suspendidas sino también una intensidad con la que se presentan estos eventos (Stetefeld, Mckenna & Pate, 2016).

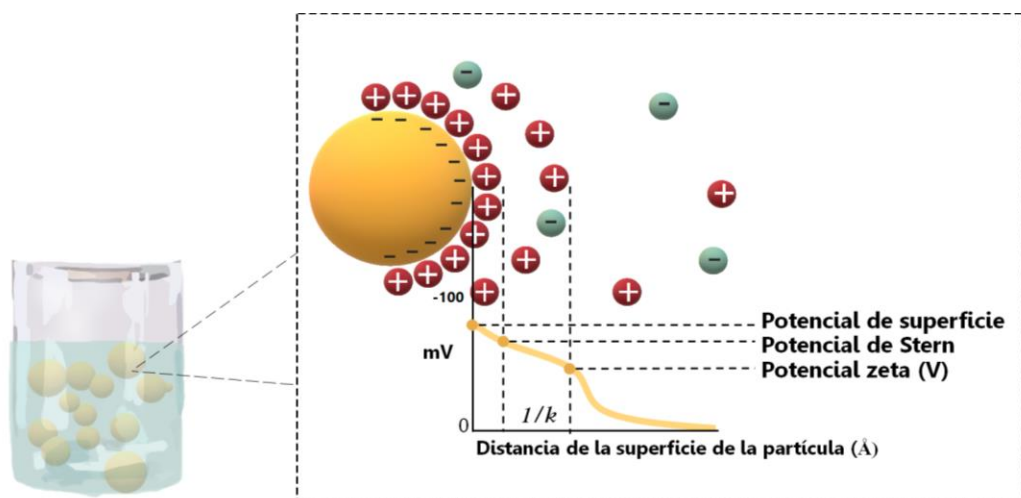


Figura 9. El movimiento de las partículas suspendidas puede ser más lento o rápido dependiendo el tamaño. Entre más grandes sean las partículas, menor será el movimiento Browniano, y no habrá tanta fluctuación de luz, al contrario de tamaños pequeños (gráficas de la primer caja a la derecha).

La luz dispersada de las partículas en suspensión es detectada a un ángulo θ , se analiza la fluctuación en la intensidad de dispersión de luz (qué tanto se mueve la partícula), con esto y otros factores como la temperatura del medio y la constante de Boltzman se obtiene la constante de difusión, y con la ecuación de Stokes-Einstein se puede obtener el diámetro hidrodinámico de las partículas.

El patrón de dispersión también dependerá del ángulo de medición y éste puede determinar selectivamente intervalos de tallas excluyendo otros posibles tamaños, por lo que en soluciones multidispersas se sugiere hacer medición a varios ángulos (Naiim et al, 2015).

1.5.3. POTENCIAL ZETA

Como se muestra en la **Figura 10** es un potencial electrocinético en muestras de coloides en función de la carga de superficie de una partícula en suspensión, y la interacción que ésta tiene con otras cargas en el medio, por ejemplo, las moléculas usadas para recubrir a los liposomas formando interfases y el medio de suspensión donde se encuentran. La información que este método de caracterización proporciona consiste en una carga parcial que puede relacionarse a la estabilidad en emulsiones. Entre mayor sea el valor absoluto del potencial zeta, la suspensión analizada resulta más estable, pues la magnitud de la carga produce una repulsión entre las partículas, evitando así la tendencia natural al agregarse, fusionarse y precipitar (Lu & Gao, 2010).

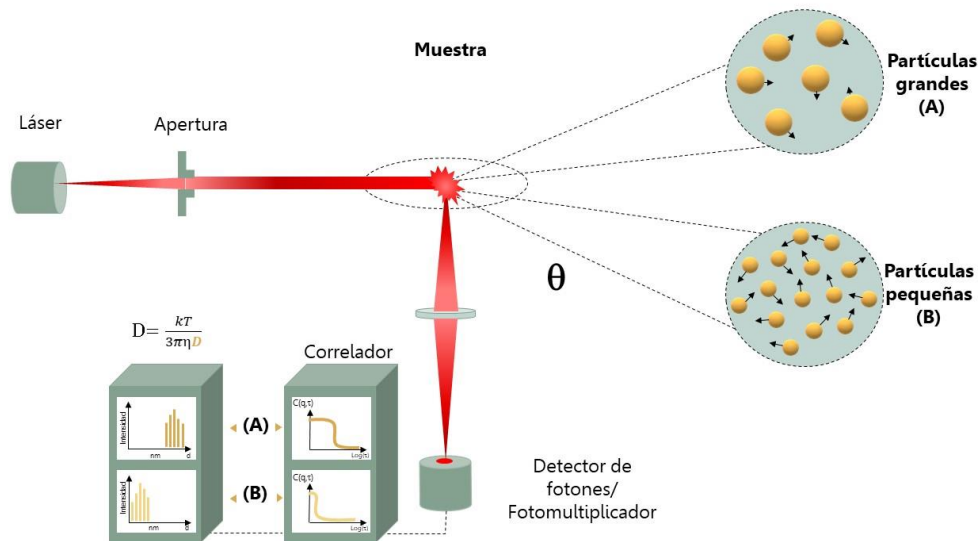


Figura 10. Las partículas en suspensión tienen una carga en su superficie, que determina las cargas que serán atraídas a esa interfaz y se mantendrán de manera estática, entre mayor sea la distancia con respecto al grupo de cargas experimentan menor atracción. La diferencia entre estos dos potenciales, el estático y el móvil es el potencial zeta.

Las principales características que afectan al potencial zeta de un liposoma, son la fluidez de su membrana su talla y su composición, mientras que en una dispersión en general, las impurezas, pH, fuerza iónica y temperatura.

En la **Tabla 4** se enlista la relación entre la estabilidad de una suspensión y el potencial zeta de la misma (Riddick, 1968), indicando que las muestras presentarían un nivel de aglomeración y precipitación ligera.

TABLA 4. *Potencial zeta de suspensiones relacionado con la estabilidad de las mismas. (Riddick, 1968)*

Características de estabilidad	Promedio de PZ (mV)
Máxima aglomeración y precipitación	+3 a 0
Excelente aglomeración y precipitación	-1 a -4
Aglomeración y precipitación razonable	-5 a -10
Umbral de aglomeración	-11 a -20
Escasa estabilidad (poca aglomeración)	-21 a -30
Moderada estabilidad (sin aglomerados)	-31 a -40
Buena estabilidad	-41 a -50
Muy buena estabilidad	-51 a -60
Excelente estabilidad	-61 a -80
Máxima estabilidad y flotabilidad	-81 a -125

2. ONDAS DE CHOQUE

Una onda de choque es un frente de energía que se propaga a una velocidad superior a la del sonido en algún medio (Loske, A.,2017). Para este proyecto las ondas de choque se generaron en agua. Cada onda de choque puede producir cambios drásticos en el medio, como aumento de temperatura, presión y entropía. La **Figura 11** describe el comportamiento de la presión, que alcanza abruptamente valores de 30 a 150 MPa, para decaer de una manera relativamente lenta y por debajo la presión de equilibrio del líquido. Esto va acompañado del fenómeno de cavitación acústica.

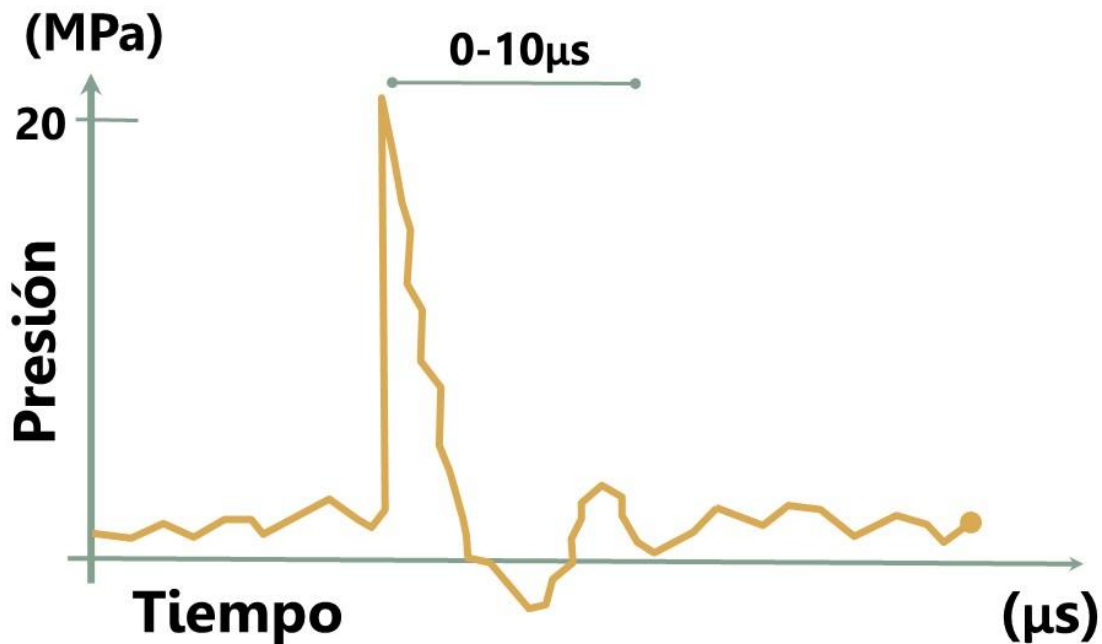


Figura 11. Diagrama de presión de un frente de choque típico en aplicaciones biomédicas, donde el origen del eje de las ordenadas corresponde a la presión de equilibrio del medio por el que se propaga la onda de choque. Se toma como tiempo = 0 el momento en que la presión aumenta súbitamente.

Actualmente se sabe que los cambios drásticos de presión causados por las ondas de choque, originan varios mecanismos que ya se han aprovechado en algunas aplicaciones biomédicas. Entre ellos están la compresión directa, el efecto Hopkinson y la cavitación acústica. Esta última ha sido de particular importancia en este trabajo, por lo que se describe más adelante con mayor detalle.

2.1. GENERACIÓN DE ONDAS DE CHOQUE

Para aplicaciones biomédicas las ondas de choque se suelen generar a partir de aparatos electrohidráulicos, piezoeléctricos y electromagnéticos. En este proyecto se empleó un generador del tipo piezoeléctrico, del cual se presenta un diagrama en la [Figura 12](#). Este tipo de generador consiste en un arreglo de cristales piezoeléctricos, montados sobre una sección de un cascarón esférico de aluminio, cubiertos por una membrana polimérica. Al recibir una descarga eléctrica de alto voltaje (2-10kV), cada cristal se expande súbitamente, produciendo una onda de presión que se propaga hacia el centro del arreglo (denominado “foco” o “punto focal”). La superposición de las contribuciones de todos los cristales, así como efectos no lineales, generan una onda de choque en la vecindad del punto focal. La suspensión a tratar dentro del vial generalmente se hace coincidir con dicho punto. Se suele tener un mando de control para ajustar la intensidad (traducida a presión positiva máxima P+), el número de pulsos por segundo y el número de ondas de choque generadas (Loske, 2017). En algunos modelos, como el que se usó para este trabajo, el equipo posee una doble capa de cristales piezoeléctricos. En este caso se excita primero la capa inferior y un tiempo después ($\sim 2 \mu\text{s}$) la capa superior, de manera que las contribuciones de cada capa se superpongan de manera constructiva. Con este diseño es posible reducir el tamaño del generador.

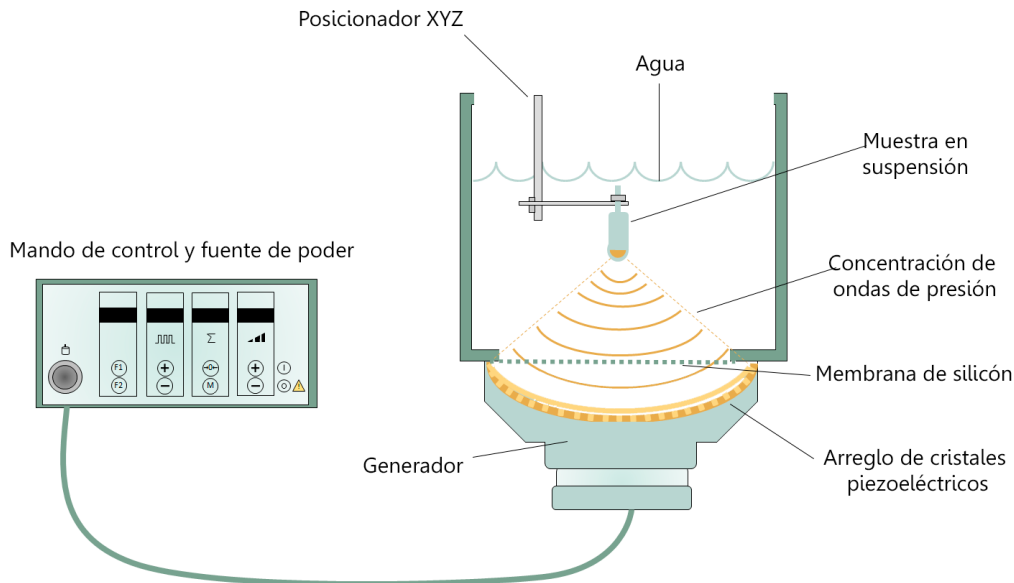


Figura 12. Diagrama simplificado de un generador de ondas de choque piezoeléctrico, montado en la base de una tina de acrílico, para la aplicación de ondas de choque a viales con suspensiones (Modificado de Rivera et al, 2012).

2.2. CAVITACIÓN ACÚSTICA

El término *cavitación acústica* se refiere al crecimiento y colapso de microburbujas contenidas en un líquido. Dichas burbujas pueden formarse a partir de otras microburbujas, núcleos (impurezas) de cavitación suspendidas o en la parte interior de la pared del vial. En la [Figura 13](#) se muestran las tres principales etapas del fenómeno: compresión forzada, expansión y colapso. El frente de choque incide sobre la burbuja en $t = 0$, disminuyendo su volumen cientos de veces. La presión interna de la burbuja y la drástica disminución de la presión externa genera un crecimiento significativo. Después de varios cientos de microsegundos la burbuja sufre un colapso violento. Por las condiciones externas a la burbuja, el colapso generalmente es asimétrico, formándose un toroide. El toroide es atravesado por un chorro microscópico de fluido de alta velocidad (hasta 400 m/s), denominado "microjet". Aunque estos microjets tienen corto alcance, son capaces de perforar incluso láminas delgadas de aluminio. El colapso de cada burbuja genera ondas de choque secundarias que a su vez pueden producir nuevos núcleos de cavitación. Cabe mencionar que las burbujas grandes o interfases agua-aire suelen actuar como superficies que reflejan el frente de choque. Las características físicas de las burbujas y del medio afectan directamente a la cavitación, al igual que la temperatura del medio y el tipo de gas que se encuentre al interior de las burbujas. (Brennen, 1995; Loske, 2017).

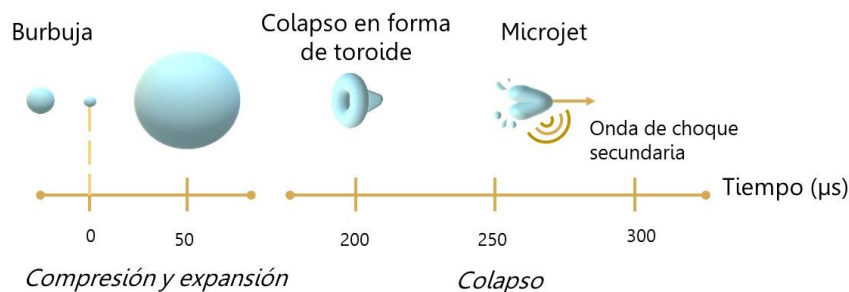


Figura 13. Diagrama de la dinámica de burbujas dentro del medio acuoso donde se propaga un frente de choque, siendo $t = 0$ el momento en el que la presión se eleva. (Modificado a partir de Fernández, Fernández y Loske, 2009).

Al generar ondas de choque con una frecuencia de repetición de 1 Hz, los sitios de nucleación generados por el paso de los microjets y las ondas secundarias aún pueden encontrarse presentes.

2.3. APLICACIONES

Como se mencionó con anterioridad, las ondas de choque se han aplicado clínicamente desde 1980 como método para la fragmentación no invasiva de cálculos urinarios. Posteriormente surgieron otras aplicaciones médicas en la ortopedia y traumatología (Chaussy, Brendel & Schmiedt, 1980, Russo et al, 1998). Aplicaciones más recientes se han dado a nivel celular,

produciendo efectos de radicales libres, excitabilidad celular, permeabilidad, y aglutinación (Fu et al, 1979; Dinno et al, 1989; Mihran, Barnes & Wachtel, 1990, Pohl et al, 1995).

Existen otras áreas donde la aplicación de ondas de choque a grandes volúmenes de líquidos y sólidos han mostrado resultados sobresalientes. Como ejemplo de lo anterior están las ondas de choque generadas por descargas eléctricas propagadas en agua para el ablandamiento de carnes (Bolumar, & Toepfl, 2016) y la inactivación de microorganismos patógenos en medios acuosos para procesos donde los métodos térmicos resultan contraproducentes (Sun et al, 2018, Álvarez et al, 2004).

2.3.1. APLICACIONES EN BIOTECNOLOGÍA

Los efectos de permeabilidad en diversos tipos de células se han explorado a través de la internalización de moléculas grandes como fluorocromos (dextrano fluorescente) en líneas de células de HeLa, hepatoma, fibroblastos y otros (Fechheimer et al, 1986; Miller et al 1998). La cavitación y los esfuerzos a los que se somete una célula no tienen el mismo efecto en todas las líneas celulares, probablemente debido a las características de rigidez y fluidez de cada membrana. Los efectos también varían de acuerdo a factores físicos y a la preparación de las muestras. Los factores físicos incluyen la presión de la onda, la densidad del flujo de energía, la frecuencia de generación de las ondas de choque y el número de ondas de choque, mientras que los factores de preparación, puede ser la densidad de la muestra a tratar, el medio en el que están suspendidas y la posible interfaz de aire dentro del vial de transferencia (López-Marín et al, 2016)

3. TRANSFECCIÓN

Al proceso de introducir material genético extraño al interior de células permeando la membrana para su expresión se le llama transfección. Sus objetivos son el estudiar la función de los genes, las proteínas y la regulación en cuanto a expresión e inhibición de las mismas.

Esta expresión puede darse de manera estable o transitoria; la diferencia consiste en que la expresión estable continúa aún después de la replicación de la célula hospedera, pues el material genético se ha integrado a su genoma, mientras que la expresión transitoria es por un tiempo limitado, pues el material genético se integra en una construcción independiente y autoreplicable, que puede perderse por factores del ambiente celular (Kim & Eberwine, 2010).

La transfección genética es la base de los potenciales tratamientos a enfermedades que requieran la corrección de genes dañados responsables de un desbalance metabólico, el tratamiento consistiría en la incorporación de la variante normal del gen o genes dañados.

3.1. USO DE ÁCIDOS NUCLEICOS COMO AGENTE TERAPÉUTICO

El uso de ácidos nucleicos como agentes terapéuticos (TNAs) consiste en el uso de nucleótidos, nucleósidos, oligonucleótidos y polinucleótidos para bloquear efectos patológicos. Se usan principalmente como anticancerígenos y antivirales y en protocolos de vacunación con DNA que han llegado a fases clínicas (Parker et al, 1991, Reardon & Spector, 1991).

En el caso de los nucleótidos y nucleósidos se modifica su estructura básica para la incorporación e interferencia en rutas metabólicas con el propósito de intervenir en la reparación o en la síntesis de DNA/RNA. También pueden producir citotoxicidad por varias vías produciendo apoptosis (Parker, Secrist & Waud, 2004).

Con los TNAs con oligonucleótidos se buscan distintas acciones, tales como bloquear la transcripción (oligodeoxyribonucleicos formadores de triplex), estimular el sistema inmune innato (oligonucleótidos con CpG), inhibir la transcripción del mRNA (oligonucleótidos antisentido y oligonucleótidos catalíticos como ribozimas y DNazimas, RNAs pequeños de interferencia), e inhibir funciones de proteínas por antagonismo (aptámeros de RNA) (Alvarez, 2008).

El ejemplo más claro del uso de polinucleótidos para terapia probablemente sean las vacunas de DNA usadas para la inducción de una respuesta inmune para enfermedades virales, bacterianas y parasíticas. Su aplicación se da principalmente mediante la transfección con plásmido (pDNA); este codifica para un antígeno bajo el control de un promotor fuerte. El pDNA se hace sin un origen de replicación eucariótico, es decir, no se puede replicar o integrar al DNA cromosomal del huésped, por lo tanto, sólo las células transfectadas serán capaces de expresar la información del pDNA y en este caso del antígeno, permitiendo el reconocimiento del sistema inmune. Entre sus ventajas está el potencial de incorporar múltiples epítomos inmunoestimulatorios y lograr la protección contra varias enfermedades por una sola vacuna. También pueden incorporar secuencias reguladoras usadas en las otras categorías de TNAs. Por último, en comparación con otras vacunas, las llamadas vacunas génicas son relativamente más seguras, estables y baratas (Schalk et al, 2006).

Aún cuando suelen mostrar un éxito inicial en pruebas clínicas (Macgregor et al, 2002; Le et al, 2000), la eficiencia no ha resultado del todo buena y actualmente se trabaja en el desarrollo de la segunda generación de este tipo de vacunas. Entre los aspectos en los que se trabaja se debe incluir un método para mejorar/sistematizar la transfección, o bien hacer más preciso el direccionamiento del DNA, donde el uso de adyuvantes, nanopartículas y vesículas pueden jugar una parte importante (Alvarez, 2008) .

4. FLUORESCENCIA Y SISTEMAS REPORTEROS DE ENCAPSULACIÓN DE DNA

La fluorescencia es un fenómeno espontáneo en ciertos materiales que consiste en emitir un fotón posterior al decaimiento de un estado inestable de excitación producido por la absorción de una longitud de onda generalmente en el rango de visible a ultravioleta, esto puede explicarse a través del diagrama de Jablonski, mostrado en la [figura 14](#). Temporalmente hablando puede dividirse en tres etapas, la primera es la excitación donde un fotón externo de cierta energía $h\nu_{EX}$ es absorbido por la materia fluorescente, creando así un estado electrónico excitado. La siguiente etapa es el tiempo que dura el estado excitado, (1-10 ns), tiempo en el que el fluoróforo atraviesa cambios conformacionales e interacciones con el ambiente molecular. La última etapa es la de emisión, donde un fotón $h\nu_{EM}$ es emitido y regresando el fluoróforo a su estado fundamental, dado que hay energía disipada en la segunda etapa, la energía de este fotón es menor y por lo tanto tiene una longitud de onda (λ) mayor que el fotón de excitación. Esta característica se puede aprovechar en procesos de tinción, análisis de estructuras, rastreo e indicadores de presencia de compuestos en muestras.

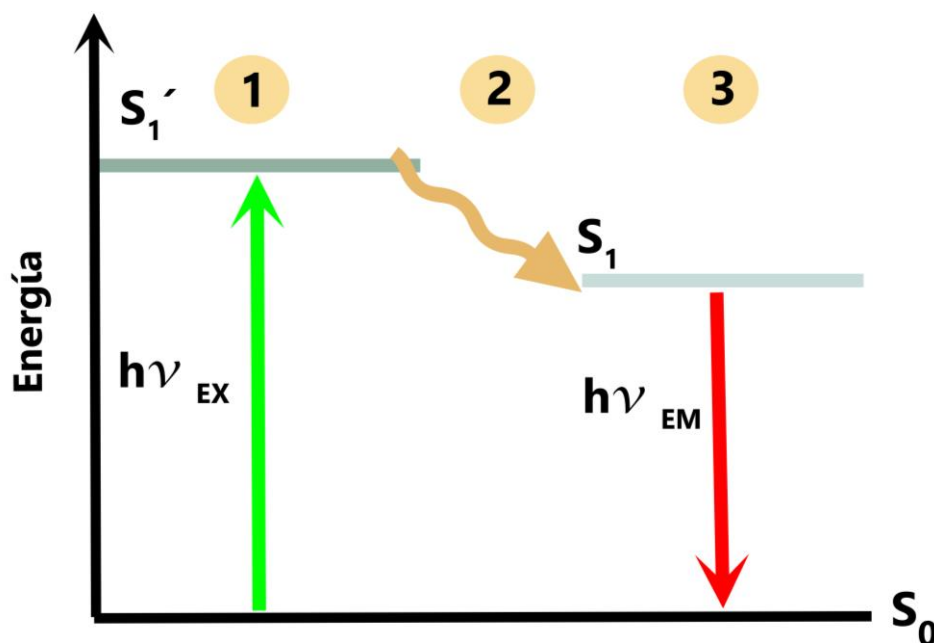


Figura 14 Diagrama Jablonski del fenómeno de fluorescencia. Ejemplifica la formación del estado excitado de singlete por absorción óptica y la emisión de fluorescencia subsecuente. Los números en la parte superior del diagrama señalan las tres etapas de la temporalidad del fenómeno previamente explicadas.

4.1. FLUOROCROMOS EN VESÍCULAS

Estas moléculas pueden tener un origen orgánico o sintético, y existir en diversidad de tamaños por lo que sus aplicaciones son diversas. En el área de biotecnología se suelen usar con mayor frecuencia para el marcaje de biomoléculas como lípidos, polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos. Otra aplicación que se le ha dado en proyectos similares al aquí presentado consiste en demostrar permeabilización de membrana observando internalización de un fluorocromo o la expresión de una proteína naturalmente fluorescente. Tomando en cuenta lo anterior, se describirá brevemente el fluorocromo usado en este proyecto.

4.1.1. DAPI

En la [figura 15](#) se muestra el 4',6-diamino-2-fenilindol-2HCl (DAPI), es un tipo de diamidina aromática, una molécula catiónica que al adherirse al DNA mejora notablemente su emisión, es decir entre mayor cantidad de DNA mayor será su emisión, produciendo una fluorescencia de tono azul brillante (λ_{exc} : 344 nm; λ_{em} : 449 nm) (Stockert & Blazquez-Castro, 2017). La posible manera en la que interactúa con el DNA es a través del surco menor de la doble hélice con una preferencia hacia el clúster de adenina-timina (Chazotte, 2011).

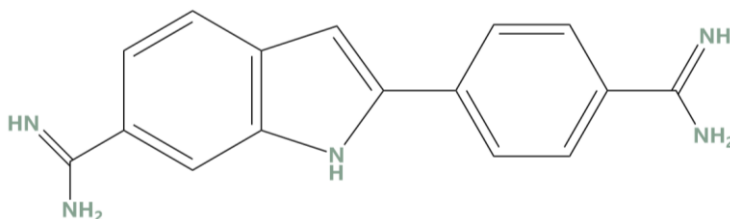


Figura 15. Estructura química del DAPI. Ha sido utilizado para estudiar la forma en la que la interacción del DNA con otras moléculas produce cambios conformacionales (Granzhan, Kotera & Teulade-Fichou, 2014)

4.2. PROTEÍNAS Y GENES REPORTEROS

De la misma manera en la que los fluorocromos permiten visualizar estructuras o comprobar encapsulación, los genes reporteros permiten la detección y medición de la expresión genética de una transfección transitoria, entre estos se incluye a los genes que codifican para proteínas fluorescentes y enzimas que ayudan a visualizar sustratos.

Entre los genes reporteros más comúnmente usados se encuentran los que codifican para la proteína verde fluorescente (GFP) y sus muchas variantes (Zimmer, 2009). La GFP se obtuvo a partir de la medusa *Aequorea victoria*, exhibe fluorescencia verde al ser excitada a 475 nm y desde mediados de la década de los 90 hasta el reconocimiento con el premio Nobel de química en el 2008 evolucionó en un monitor en terapia génica (Stripecke et al, 1999) para esclarecer procesos de transcripción, eficiencia de vectores, evaluar la actividad y especificidad de promotores (Cheng et al, 1996, Levy et al, 1996, Uchida et al, 1998).

5. PLÁSMIDOS

Los plásmidos (pDNA) son pequeñas moléculas circulares de DNA extracromosomales con la capacidad para replicarse independientemente (Cole, 2016). El pDNA bacteriano se ha estudiado y modificado para clonar, transferir, y manipular genes con el fin de funcionar como vectores. Su estructura básica, ejemplificada en la [Figura 16](#), consiste en un origen de replicación bacteriano (ORI) un gen marcador, un promotor que es una región reguladora que es capaz de dirigir la transcripción de otras regiones adyacentes, y al menos un sitio de reconocimiento único para enzimas de restricción (Nierman & Feldblyum, 2001).

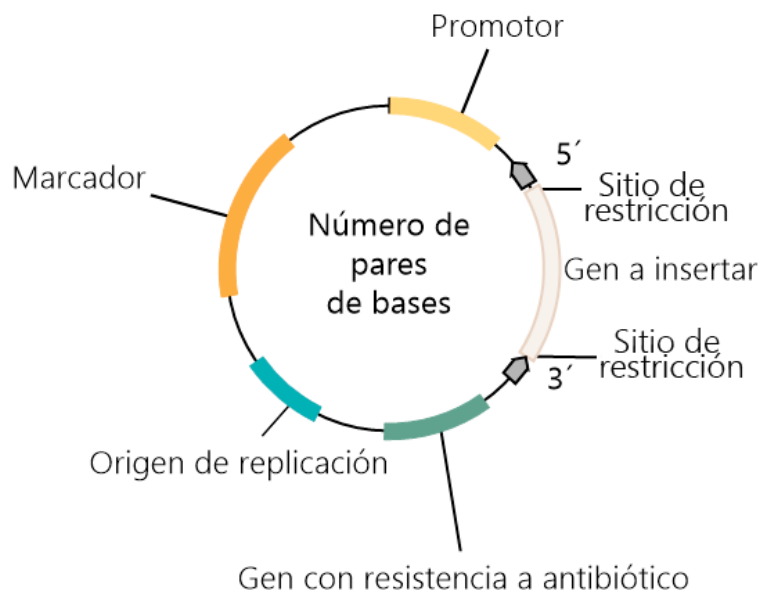


Figura 16. Ejemplo de construcción típica de un plásmido. Generalmente un gen con resistencia a antibiótico se usa como marcador para indicar fácilmente la transfección, sin embargo, pueden añadirse otros tipos de marcadores.

5.1. OBTENCIÓN

La obtención del pDNA se da mediante propagación y aislamiento. Generalmente se usan plásmidos adecuados para cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) no virulentas, pues se cultiva y multiplica con facilidad. Para aumentar la eficiencia de este proceso se usan células competentes de bacterias, este tipo de células tienen una susceptibilidad aumentada a la toma de DNA, lo cual se logra al añadir cloruro de calcio (Mandel & Higa, 1970).

5.2. PROPAGACIÓN

Las células competentes se exponen a un choque térmico mientras tiene el plásmido a propagar en el medio de suspensión. El choque térmico permea la membrana permitiendo la entrada al DNA. La suspensión se transfiere a un medio rico en nutrientes para la multiplicación de las bacterias, tras unas horas se transfiere a una placa de agar con antibiótico en el que solo las bacterias transformadas y que exhiban la resistencia sobreviven. Se selecciona una colonia de células transformantes de la placa y se transfiere a un cultivo de medio selectivo y rico en nutrientes para fomentar el crecimiento y se añade antibiótico. La [Figura 17](#) ejemplifica lo anterior.



Figura 17. Diagrama de flujo sobre la propagación de un plásmido en un cultivo de bacterias.

5.3. AISLAMIENTO

Para la extracción del pDNA es necesario producir la lisis de la pared bacteriana para la extracción del material genético. Esto se logra generalmente con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) y detergente dodecil sulfato de sodio (SDS). Con esto se solubiliza la

membrana celular y se rompen los enlaces de hidrógeno entre las bases de DNA, transformando el DNA genómico (gDNA) y el plásmido en sus formas monocatenarias por desnaturalización. A esto se le llama lisis alcalina (Birnboim, 1983). El material ribonucleico es eliminado mediante RNAsas.

El paso siguiente es la neutralización donde tras agregar acetato de potasio que disminuye la alcalinidad de la solución permitiendo que los enlaces de hidrógeno se reestablezcan renaturalizando el DNA. Este proceso resulta sencillo para DNA circular en el plásmido, pero demasiado complicado para el gDNA, siendo este un paso selectivo entre el DNA que se desea recuperar. El pDNA es soluble, mientras que un precipitado blanco y espeso de SDS, y DNA genómico no renaturalizado, y proteínas desnaturalizadas pueden separarse mediante columnas de extracción o centrifugaciones.

La solución con pDNA contiene RNAsas, sales, y otras biomoléculas que es importante retirar. Para ello se usan los métodos de extracción de fenol-cloroformo, precipitación con etanol, intercambio aniónico, columnas de sílice, entre otros. El método usado en este proyecto es el de intercambio aniónico. A grandes rasgos este consiste en colocar una resina en una columna, la matriz tiene grupos catiónicos y aniónicos. A la columna se le añaden buffers con una carga particular que interactuará de manera electroestática con los distintos elementos de la muestra que se quiere purificar.

5.3.1. CARACTERIZACIÓN DE DNA PREVIO A SU TRANSFECCIÓN Y ENCAPSULACIÓN

Es importante verificar la estabilidad y compatibilidad del material genético con los vectores a utilizar. En el caso de las vesículas verificar que el cargo que se desea transportar sea encapsulado y no sólo se encuentre en el exterior de la membrana, verificar fugas de cargo, que el tratamiento usado para la formación de vesículas no dañe el material genético, finalmente también es importante asegurarse de la calidad del lote purificado de DNA.

5.3.2. ESPECTROSCOPIA UV

La estructura del DNA se conforma por grupos funcionales aromáticos y por lo tanto es posible la cuantificación y análisis de pureza mediante absorción ultravioleta. Los ácidos nucleicos tienen una absorbancia máxima a 260 nm y la relación de esta absorbancia con la obtenida a 280 nm es utilizada para evaluar la pureza de una muestra de ácidos nucleicos. En el caso de DNA una relación 260/280 de ~ 1.8 es generalmente aceptado como puro. Como medida

secundaria para analizar la pureza del plásmido se usa la relación de 260/230, contaminantes presentes absorben a 230 nm. El valor esperado para este ratio es a partir de 2.0.

5.3.3. ELECTROFORESIS

Para estudiar la longitud, fragmentación o separación de ácidos nucleicos se usa la electroforesis. El DNA ya se tiene una carga negativa en su grupo fosfato, de este modo al aplicar un campo eléctrico a una matriz inerte de gel los ácidos nucleicos migrarán del polo negativo, al igual que su carga, al polo positivo. Como se muestra en la **Figura 18** se moldean unos pozos para colocar la muestra en el gel, en el caso de DNA generalmente es agarosa, y se puede modificar el empaquetamiento de la matriz para acelerar o retrasar el avance de las muestras.

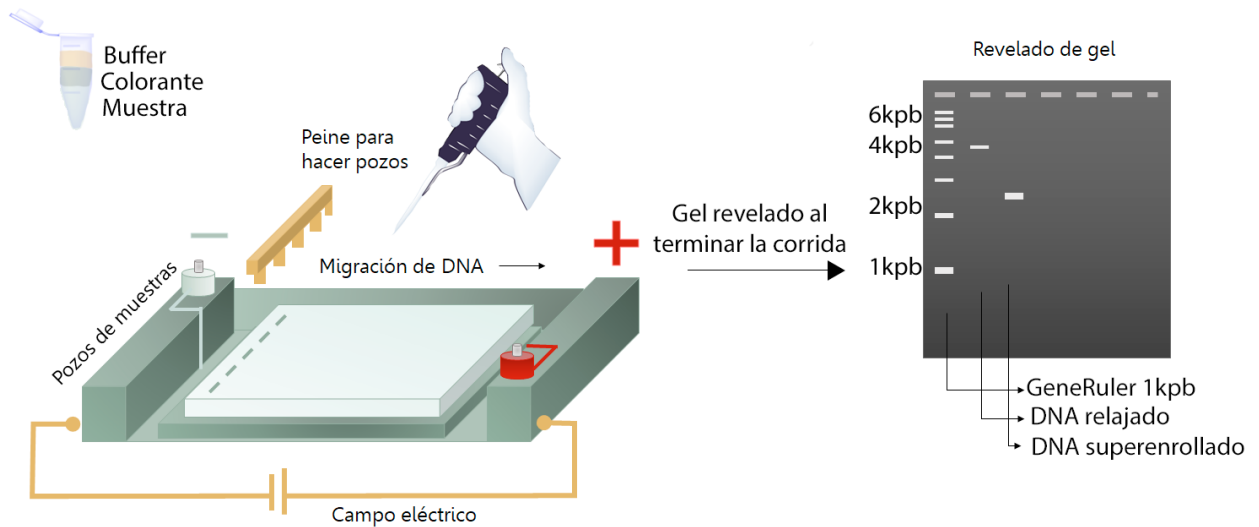


Figura 18. Las muestras para electroforesis suelen prepararse con un buffer de carga, que aumenta la densidad de la muestra evitando que salga de los pozos, y un colorante, que provee con la ubicación de las muestras en el gel mientras se aplica el voltaje y así obtener un buen revelado. Al final se suele incubar, protegido de la luz, con un colorante específico para ácidos nucleicos, que al ser excitado a una longitud de onda particular permite observar a través de un revelador el material genético, su tamaño, nivel de desdoblamiento, y calidad.

Al pasar aproximadamente una hora se observan fragmentos formando una especie de escalera con bandas que corresponden a distintas longitudes y orden de compactación. Generalmente en el primer pozo suele ponerse como muestra un estándar el cual contiene fragmentos con tallas conocidas, esto permite conocer el tamaño de las muestras bajo análisis.

5.3.4. MICROSCOPIA CONFOCAL

Para poder determinar la ubicación del cargo, eficiencia de encapsulación, perfil de liberación y fugas que pueda tener el liposoma se suelen usar moléculas bioactivas solubles en el medio donde se encuentra el cargo, por ejemplo, marcadores fluorescentes o radioactivos. Estos marcadores pueden unirse ya sea al cargo o a la membrana lipídica (Lohse, Boligner & Stamou, 2008).

En este tipo de microscopía es posible enfocarse a un plano específico en una muestra al mismo tiempo que se rechaza la luz que proviene de otras regiones fuera de foco, ya sea procedente de un plano superior o inferior. Al tener una colección de planos es posible reconstruir una estructura tridimensional. Esto se logra de manera analógica, manipulando la luz antes de su medición. Como muestra la [Figura 19](#), la idea básica del funcionamiento de este tipo de microscopía consiste en que un láser ilumina un filtro que enfoca a un sólo punto en la muestra tridimensional. Al introducir cargos a las vesículas las interacciones de estos pueden variar, dependiendo no sólo de las características de las vesículas sino también del cargo, particularmente su tamaño, carga y solubilidad. Como ya se había mencionado, el cargo puede interactuar anclándose a la superficie de la vesícula, puede quedar atrapado en la bicapa lipídica desestabilizando la estructura membranal o quedar encapsulado en el espacio acuoso del liposoma, siendo esto lo más deseable.

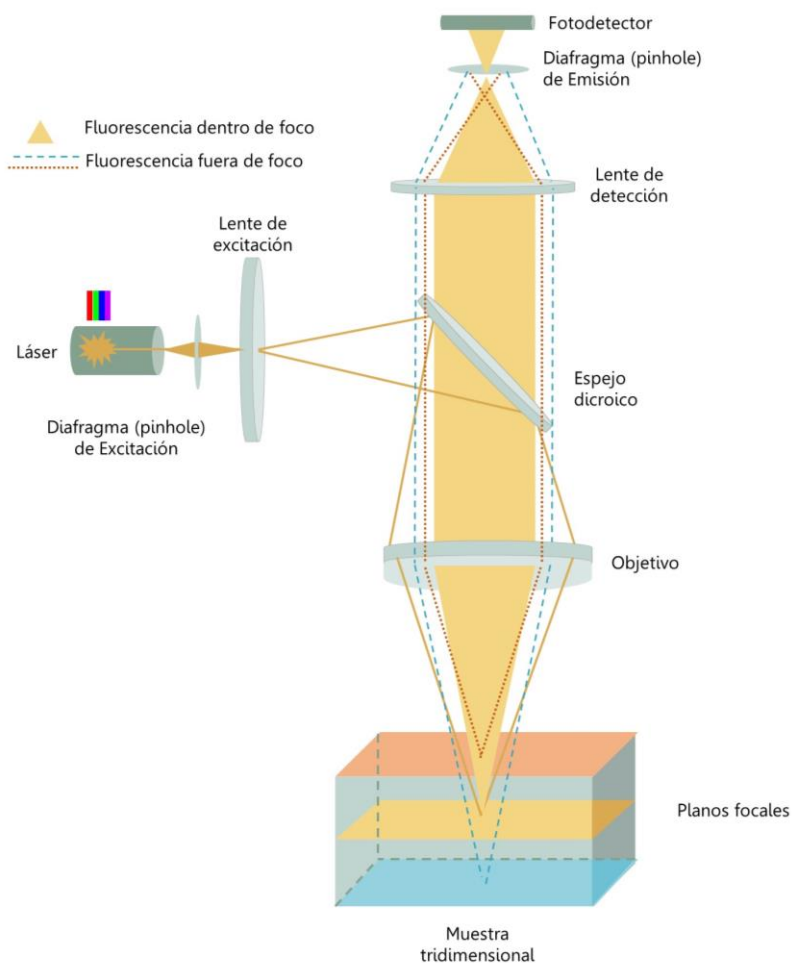


Figura 19. La fluorescencia emitida por el punto focal es enfocada por un segundo filtro (confocal). La fluorescencia emitida por cualquier otra zona del espécimen al no estar enfocada no contribuye a la imagen final. Se escanea el espécimen en el mismo plano del punto enfocado y así se reconstruye una imagen bidimensional.

ESTRATEGIA

METODOLÓGICA

El proyecto gira en torno a la producción y caracterización de vesículas unilaminares que encapsulan pDNA, mediante la aplicación de ondas de choque, lo cual varía de acuerdo con la intensidad (control de la presión y de la cavitación acústica) y el número de ondas aplicadas.

Distintos lotes de MLV que se distinguen de acuerdo al cargo contenido y a su composición fueron utilizados como materia prima.

La composición base consiste en PC con colesterol, este último proporciona estabilidad a la muestra.

El diseño experimental (Figura 20) consistió de cuatro etapas: la obtención de un lote de calidad de plásmido para su encapsulación, la preparación de vesículas multilaminares con y sin cargos, el tratamiento de ondas de choque a los distintos lotes y grupos para la obtención de vesículas unilaminares, y la caracterización de las vesículas obtenidas.

De manera complementaria se evaluó la estabilidad del pDNA desnudo exponiéndole a los mismos tratamientos de ondas de choque.

Cada etapa de la experimentación se llevó a cabo bajo las medidas necesarias de higiene y seguridad en el laboratorio.

Finalmente es importante mencionar que la mayoría de los distintos tipos de caracterización se hicieron casi de manera simultánea, como ejemplo, cuando se midió el potencial zeta de estas muestras no se tenía la interpretación del DLS, por lo que, con la limitación de la disposición de algunos equipos se decidió considerar a los tratamientos más intensos, es decir 1000 y 500 ondas de choque a una $P+ = 18.1\text{MPa}$, mientras que en otras sí fue posible hacer las caracterizaciones a todas las muestras.

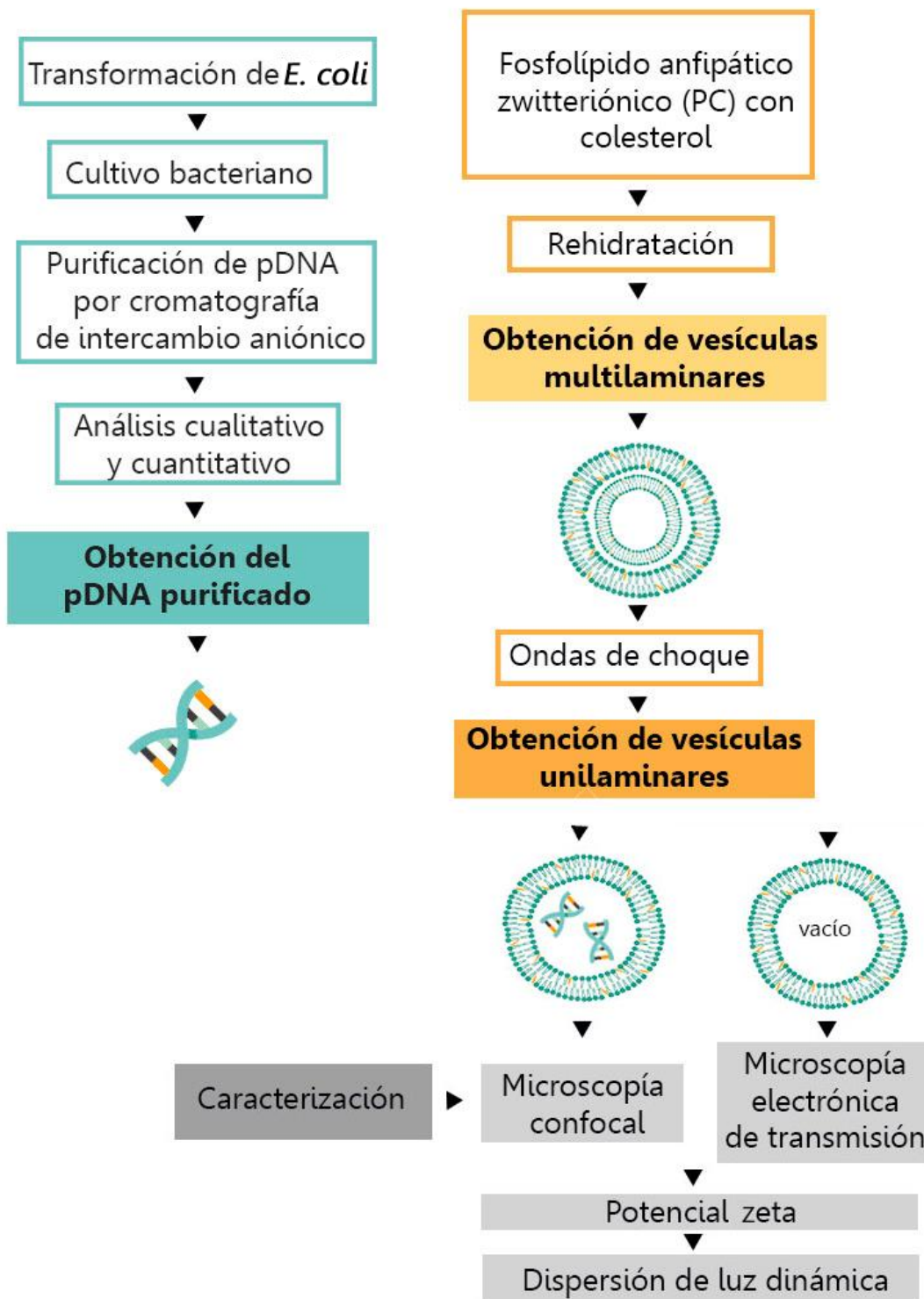
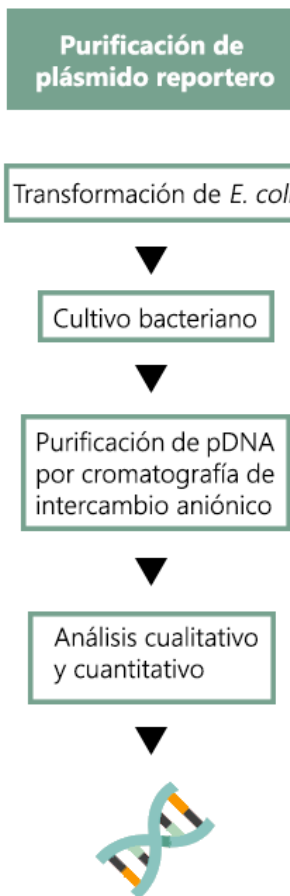


Figura 20. Diseño experimental; se muestra breve descripción de cada sección del proyecto.

1. Obtención de plásmido

El método de purificación se repitió varias veces para obtener suficiente material para trabajar en el proyecto. La cantidad necesaria para el análisis de electroforesis suele bastar con 10 ng, y para la espectroscopía UV, bastan desde 1µl. sin embargo había que considerar, la cantidad de muestras, sus repeticiones, y el hecho de que se diluirían.

1.1. PLÁSMIDO *pCX::GFP-GPI2*



El plásmido *pCX::GFP-GPI2* se encuentra descrito en la [Figura 21](#) y se propagó en *E. coli*. Consiste en una construcción de 6 kbp, contiene un gen reportero para producir la proteína verde fluorescente (Kondoh, 1999), un gen con resistencia al antibiótico ampicilina, una secuencia de señalización translocacional de membrana *N*-terminal de la proteína secretora acrosina de esperma, la secuencia C-terminal de anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI) de membrana plasmática, y el promotor de actina de pollo CAG (Rhee et al, 2006).

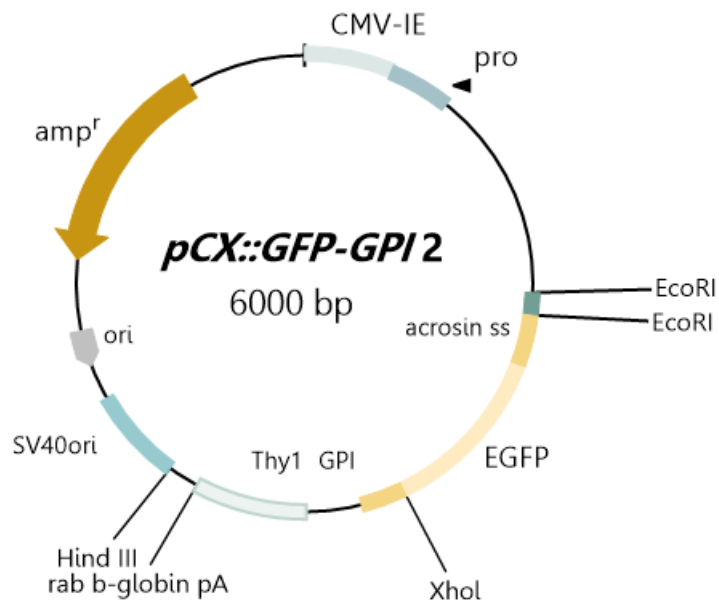


Figura 21 Representación esquemática de componentes del plásmido *pCX::GFP-GPI2*. Comenzado después del origen de replicación: *SV40 ori*, (origen de replicación del virus SV40), *Hind III* (sitio de restricción en donde reconoce y corta dicha enzima), *rab b-globin Pa* (Beta-globina de conejo con señal de poliadenilación para término de transcripción, *Thy1 GPI* (codifica para una glicoproteína de superficie de membrana con anclaje para GPI), *XhoI* (sitio de restricción de dicha enzima), *EGFP* (codifica para la proteína verde fluorescente mejorada), *acrosin ss* (señalización translocacional de acrosina), *pro* (promotor de beta-actina de pollo)

1.1.1. TRANSFORMACIÓN DE *E. COLI* CON PLÁSMIDO

La unidad de servicios de proteogenómica del Instituto de Neurobiología de la UNAM (INB) proporcionó dos viales de células ultracompetentes de *E. coli*, uno como control y otro para la obtención del plásmido. Se incubaron durante 10 min en hielo. Para el vial destinado a transformación se agregaron 100ng del plásmido *pCX::GFP-GPI2* de stock diluidos en 50 μ l y se agitó suavemente bajo condiciones de esterilidad.

El choque térmico se aplicó a ambos viales al incubarlos 90 segundos en baño maría con temperatura controlada y fija. Los contenidos se transfirieron a tubos Falcon con 1ml de medio LB, se incubaron bajo agitación durante 30 minutos a 37°C.

Alícuotas de 50 μ L de cada tubo Falcon se transfirieron a cajas Petri con agar LB-AMP (con 500 μ L de ampicilina de una solución de stock a 100 μ g/ml en 500ml de medio LB). El medio con bacterias fue dispersado con ayuda de perlas estériles de cristal mediante agitación manual. Las cajas se sellaron y se dejaron en incubación a 37°C por una noche.

1.1.2. INOCULACIÓN Y CULTIVO BACTERIANO

Se tomó una colonia de bacterias de la caja Petri y se resuspendió en 5ml de medio LB-AMP en un tubo Falcon de un volumen 4 veces mayor. El cultivo se dejó en agitación constante a 200 rpm a una temperatura de 37°C durante 5 hrs.

El cultivo se transfirió a un matraz de 2L con 500mL de medio LB-AMP y se dejó en incubación bajo condiciones similares, 200 rpm, 37°C y por un periodo de entre 12-16 hrs.

El cultivo, con una apariencia turbia, se transfirió para su centrifugación a 4°C durante 15 minutos a 6000 x *g* para la obtención de un pellet, el peso de este suele estar alrededor de 3 g/l de medio.

1.1.3. PURIFICACIÓN DE pDNA POR CROMATOGRFÍA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO

El protocolo (QIAGEN, 2005) se llevó a cabo con el material (columnas, reactivos y filtros) de QIAGEN Plasmid MaxiKit, Cat.No. 12263, Venlo Holanda.

El sedimento proveniente de 250 ml de cultivo se transfirió a un tubo Falcon de 30 mL y fue resuspendido en 10 mL con RNAsa I y LyseBlue. A continuación, se agregaron 10 ml de un buffer del kit que contiene detergente que produce lisis en las bacterias. La suspensión se homogeneizó suavemente hasta observarse un tono azul marino viscoso a toda la suspensión y que cúmulos cafés de células desaparecieran por completo.

La mezcla se dejó en incubación durante 5 min a temperatura ambiente (15-25°C).

Se agregaron 10mL del buffer del kit para neutralizar, obteniendo un precipitado blanco que contiene DNA genómico, proteínas, y restos celulares. Una solución incolora indica la precipitación total de dodecil sulfato de potasio (KDS) y SDS.

A continuación, el DNA genómico desnaturalizado se descarta usando los filtros *Cartridge* de QIA-GEN[®], de acuerdo a las instrucciones del proveedor. A la muestra obtenida se le hicieron varios lavados con buffers del kit para retirar la mayoría de los contaminantes en las preparaciones de pDNA.

En un tubo de fondo cónico y resistente a alcohol se recuperó el DNA plasmídico, posteriormente el plásmido se precipitó mezclándolo con 10.5 mL de isopropanol a temperatura ambiente. Inmediatamente se centrifugó a 5000 x *g* por 60 minutos a 4°C. Se decantó con cuidado el sobrenadante pues el pellet no estaba fuertemente fijo a las paredes del tubo y tenía una apariencia vidriosa.

El pellet se resuspendió con 5ml de etanol al 70% a temperatura ambiente y se centrifugó a 5000 x *g* por 60 minutos a 4°C, esto disuelve sales y sustituye al isopropanol por un disolvente más volátil permitiendo una resuspensión más sencilla del pellet de pDNA resultante.

Para finalizar se removió el sobrenadante y se dejó secar el pellet y se resuspendió con 500 µl de agua inyectable (PiSa Farmacéutica).

1.1.4. ANÁLISIS CUANTITATIVO

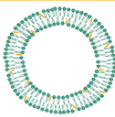
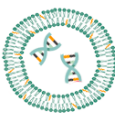
Para determinar la concentración y pureza del plásmido obtenido se usó espectroscopía UV mediante el Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) de la unidad de Proteogenómica del INB.

2. PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS MULTILAMINARES

Se usaron dos tipos de lotes, usando una mezcla del fosfolípido zwitteriónico PC (L- α -phosphatidylcholine, Sigma) con colesterol (Sigma) y otros con PC, colesterol y 1, 2 – Dioleil -3-Trimetilamonio-Propano (DOTAP). Estos lotes se describen en cuanto a su contenido y composición en la [Tabla 5](#). Los porcentajes descritos de lípido en cada mezcla se obtuvieron de experimentos previos en el laboratorio.

En un vial de vidrio se colocó la cantidad y mezcla correspondiente de lípido de acuerdo al volumen a preparar, se disolvieron en disolventes orgánicos para después ser secados bajo corriente de nitrógeno y obtener una película gelificada.

TABLA 5. Distintos lotes de liposomas usados, los elementos mencionados en composición se agregaron tras disolverlos en una mezcla de cloroformo y metanol 9:1 respectivamente, después de su evaporación, se agregaron los lípidos mencionados en el contenido en las proporciones indicadas (Caballero, 2013, Were et al, 2003).

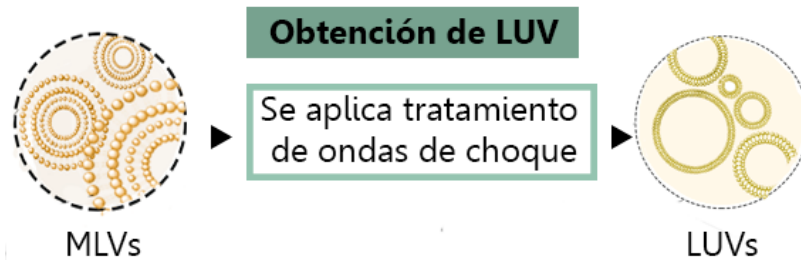
Lotes de liposomas de acuerdo a preparación y contenido			
		Composición	Contenido & concentración
Liposoma vacío		PC 70% Colesterol 30%	PBS 1x 1mg de lípido/ml
		PC 70% Colesterol 30%	50 μ g de plásmido <i>pCX::GFPGPI2</i> / ml
Liposoma con pDNA	PC 40% Colesterol 30% DOTAP 30%		

El lote sin carga se rehidrató con PBS 1X preparado recientemente a 1mg de lípido/ml. En el caso de vesículas con pDNA como carga se añadió un total de 50 μ g del plásmido *pCX::GFPGPI2* por cada mililitro de PBS 1X.

En ambos casos la rehidratación se hizo sobre la temperatura de transición (- 15°C para PC y 5°C para DOTAP) en la mezcla de los lípidos. Posterior a la integración de la fase acuosa el vial de vidrio se mantuvo en agitación hasta que la película de lípidos adherida al vial se resuspendió y la muestra obtuvo un tono opalescente y turbio, lo cual es característico de la formación de MLVs.

Su almacenamiento fue a 4°C en atmósfera inerte de nitrógeno.

3. OBTENCIÓN DE LIPOSOMAS UNILAMINARES



Para la ruptura de MLV a vesículas unilaminares se aplicaron distintos tratamientos de ondas de choque, variando el número de ondas aplicadas a cada muestra y la presión máxima positiva. Los parámetros de los tratamientos, que se especifican más adelante, se obtuvieron de experimentos previos con células en el Laboratorio de Ondas de Choque del CFATA.

3.1. TRATAMIENTO CON ONDAS DE CHOQUE

El generador de ondas de choque utilizado fue el modelo *Piesozone 100 Plus* (Richard Wolf, GmbH, Knittlingen, Alemania), mostrado en la [Figura 22](#). Este equipo es de uso comercial ortopédico, y fue acondicionado para la exposición de muestras biológicas pequeñas mediante el acoplamiento a un contenedor de agua y un posicionador XYZ, para la colocación precisa de las muestras inmersas en agua en la región focal.

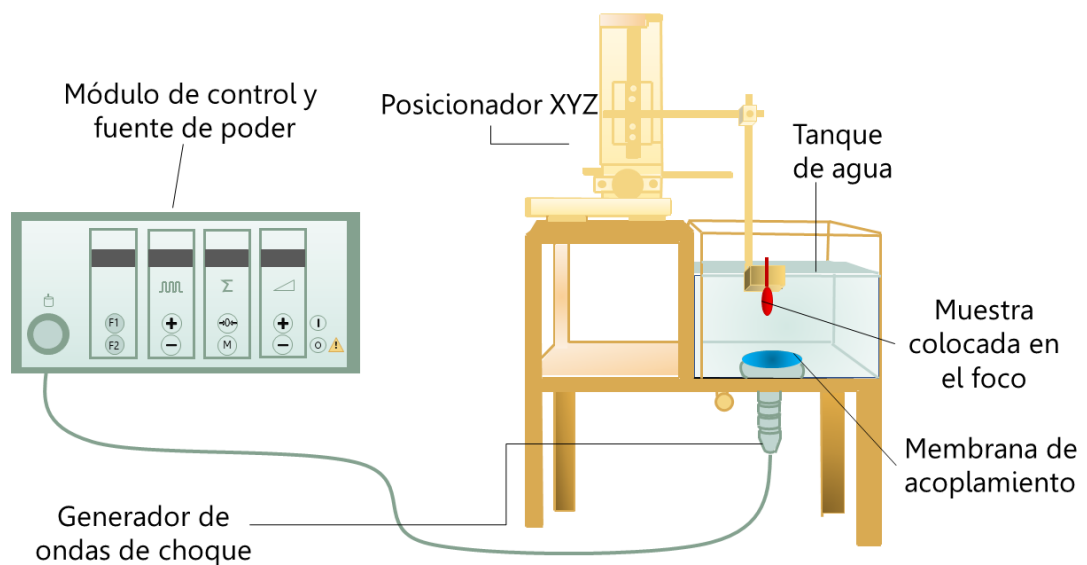


Figura 22 Diagrama del dispositivo experimental modificado a partir del Piesozon 100 Plus.

Se colocó 1 ml de MLV del lote correspondiente en pipetas de transferencia de polietileno suave y se sellaron herméticamente.

Para aplicar las ondas de choque a cada muestra, esta se ubicaba en la región focal del generador con el agua de su entorno a una temperatura constante de 37 °C.

Para determinar el mejor tratamiento para la formación de vesículas unilaminares se trataron los grupos presentados en la [Tabla 6](#), por triplicado, todos a una frecuencia de generación de ondas de choque de 1 Hz. En el caso de los liposomas con una composición con lípido catiónico los tratamientos aplicados sólo fueron con una presión $P+ = 18.1$ MPa.

Además de las muestras tratadas también se manejó como **control** una prueba para cada tipo de vesícula sin tratamiento a ondas de choque.

El número de ondas a aplicar y la presión se definieron en experimentos previos (*Camacho, 2012*).

TABLA 6 Tratamiento de ondas de choque aplicadas a MLV vacías.

PRESIÓN POSITIVA MÁXIMA, P+	NÚMERO DE ONDAS DE CHOQUE				
15.1 MPa	63	125	250	500	1000
18.1 MPa					

Las muestras se mantuvieron en hielo en los periodos cuando no se les aplicaban ondas de choque. Al terminar los tratamientos, las muestras fueron transferidas a tubos *Eppendorf* y almacenados en refrigeración a 4 °C y con atmósfera inerte.

Se puede suponer que, en promedio, todas las vesículas dentro de la pipeta de transferencia reciben la misma dosis de ondas de choque, porque cada frente de presión que pasa por la suspensión genera turbulencias.

El aire dentro de la pipeta de transferencia, aumenta la cavitación acústica pues las ondas de choque cambian de fase al reflejarse en la interfaz suspensión-aire, es decir, son reflejadas como un pulso de rarefacción. El frente reflejado es un pulso de presión negativa con respecto a la presión de equilibrio del medio, que fomenta el crecimiento y colapso de las burbujas en la suspensión.

4. CARACTERIZACIÓN DE LIPOSOMAS

En esta sección se describe la preparación y análisis de muestras en cada método de caracterización para determinación de morfología, tamaño, dispersión de tallas, estabilidad, y evaluación de encapsulación.

Se buscó evidencia de la formación de vesículas unilaminares, y las características más deseables con fines de encapsulamiento, es decir LUV (100-500 nm) y SUVs (<100 nm) como se mencionó en la [Tabla 1](#).

Caracterización de liposomas



Liposomas sin cargo



Liposomas neutros

TEM (Morfología, Talla)

DLS (Tallas y dispersión)

Potencial Zeta (Estabilidad)

4.1. LIPOSOMAS SIN CARGO

4.1.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM)

Se hicieron diluciones 1:10 de muestras seleccionadas a partir del análisis de DLS en agua destilada filtrada y se colocaron 5 μ l sobre rejillas de cobre, malla 200, y película de carbono. Un grupo de muestras fueron preparadas dejando la rejilla al vacío hasta que la gota dejara de ser visible en la superficie de la rejilla, otras, se colocaron en un ambiente libre de polvo y se secaron al aire libre, hasta que la gota se evaporara por completo.

Las muestras se tiñeron con acetato de uranilo al 2%, incubándolas en una parrilla durante 10 minutos dentro de placas de Mazzini, después se hicieron tres lavados en distintos vasos con agua destilada. El microscopio utilizado fue un JEM-

1010 (Jeol Co., Peabody) a 80kV.

4.1.2. DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA (DLS)

Los liposomas sin cargo se analizaron en un equipo de dispersión de luz B1.2005M (Brookhaven Instruments CO., HolBville, NY, USA) para la determinación de tamaños de partícula a ángulo fijo a 90°.

Cada muestra se diluyó 1:1000 en agua destilada previamente pasada a través de membranas con poros de 0.2 μ m de nitrocelulosa (MF-Millipore™, Membrane Filters) con el fin de evitar interferencias asociadas a impurezas.

Dado que las condiciones del medio, particularmente la temperatura, pueden modificar la dinámica de las vesículas lipídicas, se hicieron mediciones del tamaño de partícula a 25°C y a 4°C.

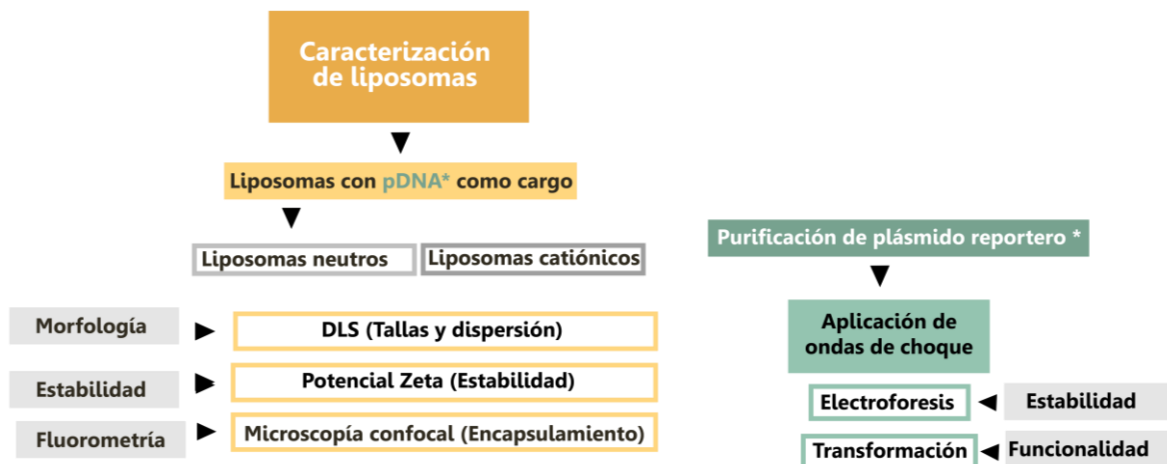
Con el fin de obtener mayor información, cada muestra fue medida 5 veces, resultando un total de 15 mediciones por cada tratamiento, ya que se hizo por triplicado. Los resultados fueron analizados mediante el algoritmo de mínimos cuadrados no negativos (NNLS).

4.1.3. Potencial zeta

Los liposomas sin carga se analizaron en el equipo Nanosizer Zs (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK) con láser de 632.8 nm en celdas de cuarzo, a ángulo fijo de 173 ° y 13°. Las muestras se diluyeron previamente a 1:100 en agua destilada.

La estabilidad de las muestras proporciona información sobre su tendencia a formar clusters, precipitar y también da una idea de la relación que tendrá en el medio o para la aplicación deseada.

4.2. LIPOSOMAS CON PDNA COMO CARGO



La caracterización en estos liposomas se centró en morfología, tamaño y carga electrostática de atracción/repulsión entre las vesículas.

Como primer punto, se analizó la estabilidad del plásmido a utilizar ante los tratamientos de ondas de choque que fueron capaces de inducir la formación de LUV.

Posteriormente, las caracterizaciones para este lote de liposomas se enfocaron en observar si existían diferencias en las características físicas (tamaño, distribución y estabilidad) de las vesículas sin carga y con pDNA, y en estas últimas corroborar la internalización del cargo.

Dado que la encapsulación de material genético no es solamente con el fin de observar la relación entre nuestra metodología de producción de LUV y biomoléculas, sino también la posibilidad de una aplicación futura para transfección, se justifica la producción de un lote con lípido catiónico (DOTAP) que, como se mencionó anteriormente, permite una interacción de las membranas celulares de carga negativa.

4.2.1. RESISTENCIA DEL PDNA ANTE ONDAS DE CHOQUE

Para determinar la viabilidad de las ondas de choque como una metodología para producir LUV capaces de mantener la integridad del cargo, se aplicaron los tratamientos correspondientes a 63, 125, 250, 500 y 1000 OCh, con $P+ = 18.1$ MPa a plásmido no encapsulado.

Cada muestra expuesta consistió en 1 ml contenido, con 6000 ng/ml de plásmido en agua destilada en los mismos viales de transferencia usados para la exposición de MLV a las ondas de choque.

Las muestras se mantuvieron en hielo en los periodos donde no se les aplicaba ondas de choque. Al terminar los tratamientos, las muestras fueron transferidas a tubos *Eppendorf* y almacenados a -20°C .

Se llevó a cabo el método de electroforesis por gel de agarosa en una cámara horizontal (Biorad) para evaluar posibles fragmentaciones del pDNA, el control usado consistía en muestras del mismo plásmido, con la misma dilución, y manteniendo en hielo al mismo tiempo que las demás muestras, con la diferencia que no se le aplicaron ondas de choque.

El plásmido se diluyó a manera de tener 100 ng por carril en 16 μl de agua inyectable (PiSa Farmaceutica), se mezcló con 4 μl de buffer de carga (Nucleic Acid Sample Loading Buffer, 5x, Biorad). Éste contiene glicerol para dar mayor densidad a la muestra y que permanezca en los pozos. También se cargó como referencia 16 μl de escalera de peso molecular para 1-15 kbp (EZ Load® 1kb Molecular Ruler, Biorad) mezclado con el mismo buffer de carga. Las mezclas se prepararon previamente sobre papel Parafilm®.

El gel se preparó al 0.8% pesando 400mg de agarosa (UltraPure™ Invitrogen) y diluyéndolo en 50 ml de TAE 1X caliente (preparado previamente a partir de TAE 50X de Biorad y agua destilada) se dejó gelificar por completo a temperatura ambiente y sobre una superficie lo más recta posible.

Se cubrió en su totalidad el gel con buffer de corrida TAE. La posición del gel fue de acuerdo a la sección 5.3.3 **Electroforesis** del Marco Teórico, es decir los pozos con la muestra del mismo lado que el cátodo para poder observar su migración hacia el ánodo. El voltaje aplicado fue

de 100 V por un total de 1 hora. Al terminar el gel se dejó incubando bajo agitación en 30 mL de TAE 1X y 3 μ l del colorante SYBR® Safe DNA 10,000X (Invitrogen), cubierto de papel aluminio para proteger de la luz durante 15 minutos.

El revelado del gel se hizo en un fotodocumentador GelDoc™ EZ Imager (Biorad) y se usó la charola de UV.

Se sabe que los métodos físicos son capaces de inducir mutaciones en el plásmido (Doida, Brayman, y Miller,1992). El método inequívoco para verificar si la metodología produjo mutaciones en el DNA tratado es la secuenciación.

En este trabajo, se realizó un análisis de transformación con el plásmido tratado, a fin de tener una indicación de funcionalidad, de manera previa a análisis de secuencia. En resumen, se hizo la transformación de *E. coli* usando el plásmido con los distintos tratamientos.

4.2.2. Elaboración de liposomas con pDNA como cargo

La composición lipídica de los liposomas neutros y catiónicos al igual que la concentración del plásmido corresponde al expresado en la **Tabla 5**, es decir, una mezcla de lípidos con PC y colesterol y otro lote con PC, colesterol y DOTAP. Al igual que los liposomas sin cargo, este lote se trató con ondas de choque después de su rehidratación. El estudio de los liposomas con pDNA internalizado se hace posterior a una ultra centrifugación, desechando el sobrenadante, las condiciones para esto fueron 45,000 rpm, por una hora a 4°C. De este modo se asegura que las características obtenidas no sean producto de plásmido no encapsulado.

4.2.3. Dispersión de luz dinámica(DLS)

Los liposomas preparados con pDNA se analizaron antes y después de ser ultracentrifugados con el fin de observar posibles modificaciones como fusión de vesículas o formación de cúmulos grandes en la población. Para ello, se utilizó un equipo Nanosizer Zs (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK)

La ultracentrifugación se realizó en un quipo Beckam Coulter, modelo Optima XL-100K. El pellet se resuspendió en PBS1x.

Las muestras se diluyeron 1:200 en agua destilada filtrada de la misma forma que para las vesículas sin cargo. Se midieron a temperatura de 25°C; el número de mediciones hechas a cada muestra fue determinado por los estándares del análisis del software de acuerdo a la calidad de la muestra.

4.2.4. Microscopía confocal

La presencia de pDNA encapsulado en el grupo de vesículas con pDNA como cargo se observó a través de microscopía confocal. La ultracentrifuga usada fue Beckam Coulter, modelo Avanti J-301, con un rotor JA 18.1, para tubos *Eppendorf*; las muestras fueron resuspendidas en PBS1x se incubaron 20 μ l de las vesículas con 40 μ L de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) al ser preparadas en el portaobjetos para su observación. El microscopio utilizado fue un Zeiss Axiovert 200 LSM 510 Meta-Multifonótico de la Unidad de Microscopía del INB. Se usó un láser multifotónico chameleon Argón multilínea (750 nm) y el software LSM 4.2

4.2.5. Estabilidad

Se midió el potencial zeta de las vesículas con un equipo Nanosizer ZS. Las vesículas con pDNA analizadas fueron ultracentrifugadas en un rotor angular para retirar el material no encapsulado. Cada muestra se analizó al menos tres veces.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. OBTENCIÓN DE LOTE DE PLÁSMIDO *pCX::GFP-GPI2*

La transformación de *E. coli* con el plásmido *pCX::GFP-GPI2* con resistencia a ampicilina fue exitosa, esto se demuestra en la [Figura 23](#), donde se observan varias colonias bacterianas en un medio con antibiótico. En el caso de que el plásmido no fuera asimilado por las bacterias sería improbable que varias colonias se formaran sobre esta placa. El control, o bacterias que experimentaron el mismo tratamiento, sin el plásmido, no generaron crecimiento de colonias en este medio (resultados no mostrados).



Figura 23 Fotografía de colonias de la bacteria *E. coli* transformada con el plásmido *pCX::GFP-GPI2* propagada en una placa LB con ampicilina.

2. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE PLÁSMIDO

A partir de la placa anterior se hizo el cultivo en medio líquido y purificó para obtener el materia genético suficiente, como se describió en la sección de metodología.

La relación de la intensidad de absorbancia a 260/280 de los lotes purificados siempre fue mayor a 1.8, mientras que el radio 260/230 fue mayor a 2.2. La cantidad del plásmido purificado se mantuvo por arriba de los 1000 ng/ μ l y por debajo de los 2000 ng/ μ l. Esto se muestra en la [Figura 24](#), y tal como fue mencionado en [Antecedentes](#), los resultados obtenidos corresponden al nivel de pureza esperado ($260/280 > 1.8$, $260/230 > 2$).

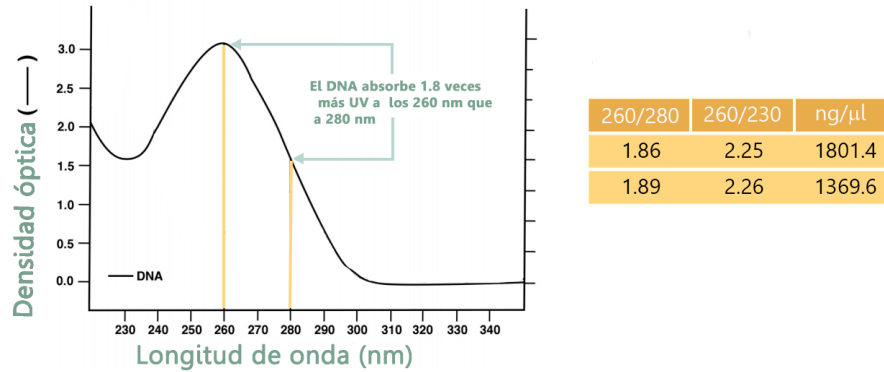


Figura 24 Gráfica de absorbancia típica de ácidos nucleicos a 260 nm, a un costado están los valores obtenidos tras la espectroscopía de las muestras.

3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN DE LIPOSOMAS SIN CARGO

Los experimentos para producir vesículas unilaminares a partir de ondas de choque incluyeron el uso de dos valores de presión aplicada, así como un número de ondas creciente.

Como experimento exploratorio, se observó a las vesículas con el tratamiento más agresivo, es decir, aquellas expuestas a 1000 ondas de choque (OCh) con $P = + 18.1$ MPa. En las micrografías mostradas en la [Figura 25](#) se observan dos tomas con sus respectivos acercamientos. En ambas imágenes aparecen aglomerados formados de vesículas y restos de lípido. Las vesículas lucen redondas, y sobrepuestas. En la micrografía superior se observa un cúmulo de vesículas homogéneas de alrededor de 50 nm. En la micrografía inferior se muestran grupos de partículas de lípido semi esféricas de alrededor de 10 nm, cuya talla es compatible con formaciones micelares. En la [Tabla 1](#) se menciona que los MLV tienen tallas a partir de los cientos de nanómetros, lo que indicaría que estas vesículas son monocapa.

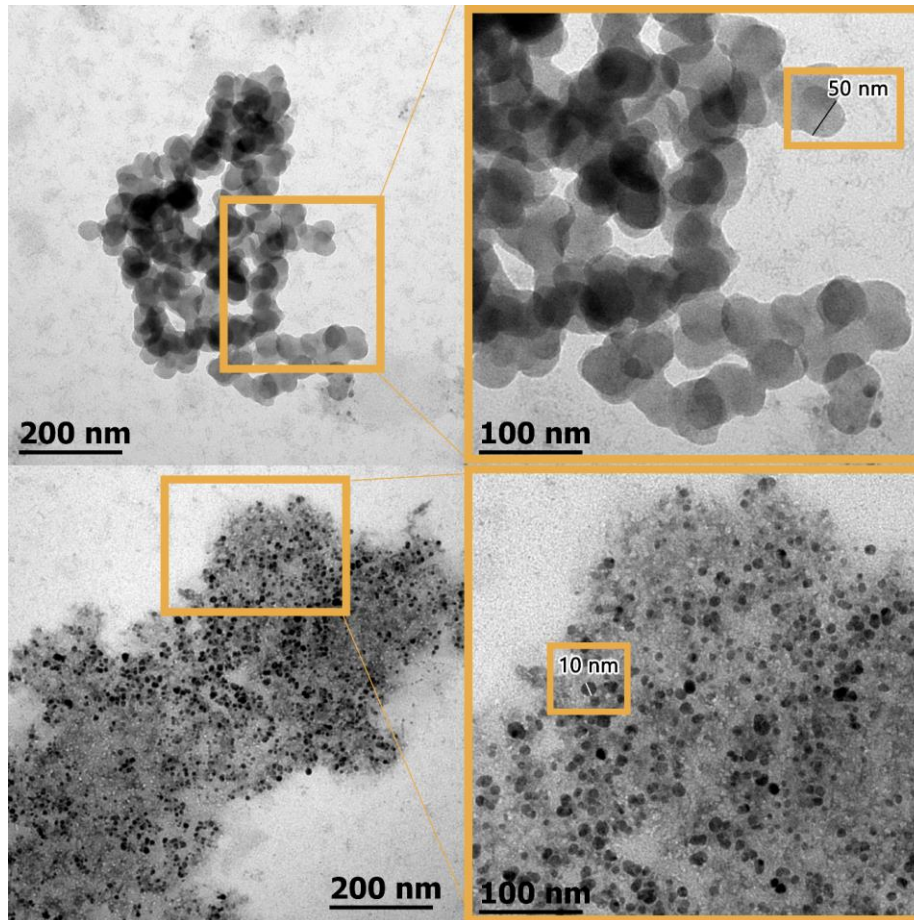


Figura 25 Micrografías de vesículas expuestas a ondas de choque, mezcla de lípidos PC-*chol* 7:3, las microscopías del lado derecho corresponden a una ampliación de la selección de la microscopía de lado izquierdo. En los cuadrantes superiores se aprecian vesículas de decenas de nanómetros, lo que es indicativo de una muestra monocapa. En el cuadrante inferior, las partículas lipídicas que se observan son alrededor de nm lo que sería característico de micelas, no de liposomas.

En la **Figura 26** se observa otra muestra de liposomas con la misma composición y tratamiento al anterior, pero con un montaje para la microscopía distinto, donde se secó sin vacío y la muestra se diluyó 1:10 en agua destilada, se distingue con claridad la membrana y evidencia que las vesículas obtenidas son monocapa. La muestra luce muy polidispersa a comparación de la **Figura 23**; el set de micrografías muestra vesículas que van de los 30 nm a los cientos de nanómetros, siendo en su mayoría liposomas de tallas menores a los 100 nm. En los cuadrantes **A** y **B** se observan cuerpos muy electrodensos que aparecen en la parte superior. Esto puede deberse a artefactos con respecto a la tinción negativa, sin embargo, se carece de una explicación a estos cúmulos.

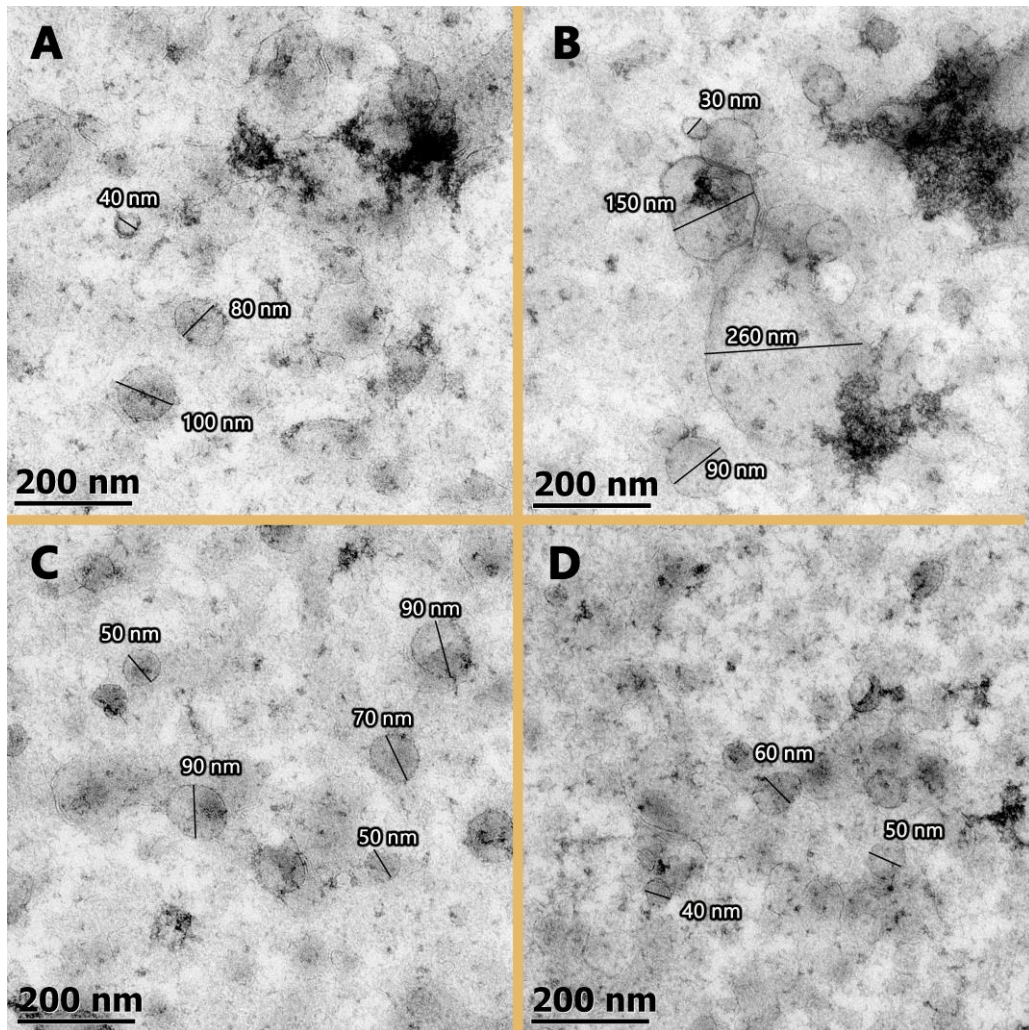


Figura 26 Set de micrografías electrónica de transmisión de vesículas tratadas con ondas de choque. Mezcla PC-*chol*.

La tinción negativa aplicada a las vesículas suele usarse para la observación de muestras biológicas en TEM. Es una técnica que estabiliza las muestras para resistir el alto vacío del microscopio, y si bien para muestras orgánicas, como la tinción de proteínas, este método resulta generalmente idóneo, pues se conserva la estructura nativa de estas (Silva, Guerra, y Magalhães, 1968), no suele ser igual para los lípidos, haciendo este tipo de muestras particularmente susceptibles a artefactos. Al no fijar los lípidos de acuerdo a su estructura nativa, las interacciones que estos pueden llegar a tener con la película de carbono de las rejillas resultan en modificaciones de los liposomas. Los lípidos se pueden “extender” y modificar sus estructuras, las vesículas grandes se pueden romper en el proceso de secado, formar fases onduladas de lípidos, micelas alargadas y otras configuraciones (Zhao y Craig, 2003). En la [Figura 27](#) se muestra un ejemplo de este tipo de interacción entre las vesículas y la película de carbono.

La fijación de los lípidos se logra a través del uso tetróxido de osmio, que genera uniones entre doble ligaduras de lípidos, sin embargo, este es un reactivo altamente tóxico por lo que no fue utilizado en las muestras.

Una forma de descartar los artefactos generados por la tinción negativa es la observación de las vesículas a través de microscopía electrónica de criofractura (cryo-EM), sin embargo, no se pudo acceder a este tipo equipo (Milne et al, 2012).

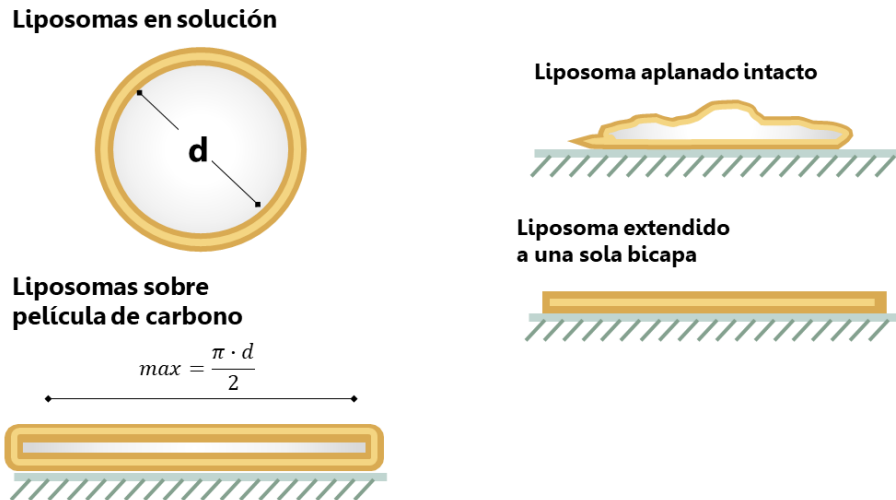


Figura 27 Esquema sobre las interacciones entre liposomas y la película de carbón de la rejilla. Del lado izquierdo se muestra el incremento de diámetro cuando una vesícula se aplana. Del lado derecho superior un liposoma aplastado intacto y en el lado inferior un artefacto donde el liposoma está extendido. Modificado de Baxa., 2017.

Indiferentemente a los artefactos que puede tener una muestra, los liposomas teñidos se “aplanan” en la superficie de la rejilla y su tamaño aumenta. Empíricamente se han encontrado que la diferencia máxima de tamaño de vesículas entre micrografías tipo TEM y las cryo-TEM tienen un factor de aproximadamente 1.5, o bien la mitad del perímetro del liposoma en suspensión (Baxa, U., 2017). Esto es un factor que debe tomarse en cuenta al analizar el tamaño de las micrografías.

Una complicación que se tiene para el análisis de micrografías de las vesículas previas al tratamiento de ondas de choque es que como ya se mencionó se carece del acceso a un equipo de cryo-TEM que sería lo ideal, y es que para una micrografía de transmisión de electrones se requieren espesores muy finos, posibles con liposomas unilaminares, sin embargo, incluso en las primeras muestras por las aglomeración se puede llegar a dificultar el análisis, pues la luz no se transmite y la suspensión se ve opaca. Es por esto que células y tejidos se observan después de ser cortadas en microtomo. Aparte de caracterización con cryo-TEM, hay otras técnicas sugeridas para el caso de MLVs como la microscopía de fluorescencia donde es posible usar un fluoróforo para la membrana y otro para el medio acuoso interno, y la microscopía óptica (Placzek y Kosela, 2016).

4. DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA DE LIPOSOMAS SIN CARGO

Las Figuras 28 y 29 corresponden a las vesículas con un tratamiento de intensidad media $P = + 15.1$ MPa, las temperaturas de registro correspondieron a 4°C , temperatura a la que los liposomas son almacenados y a 25°C , es decir, la temperatura asociada al manejo y al tratamiento de las vesículas y a la que se sometieron., mientras que las Figuras 30 y 31 corresponden a las vesículas con tratamiento de mayor intensidad, $P = + 18.1$ MPa.

Todas las muestras son de carácter multimodal y presentan tallas que van desde pocos nanómetros a varias micras. En todas ellas se encuentra la presencia de vesículas de múltiples tallas, en general, las tallas de unos ciertos de nanómetros se encuentran mayormente en todas las muestras.

Los resultados fueron normalizados con respecto al control igual a 1.

TRATAMIENTOS DE MEDIANA INTENSIDAD (15.1 MPa)

La Figura 26 corresponde a las muestras tratadas con ondas de choque de una presión $P+ = 15.1$ MPa analizada a 4°C .

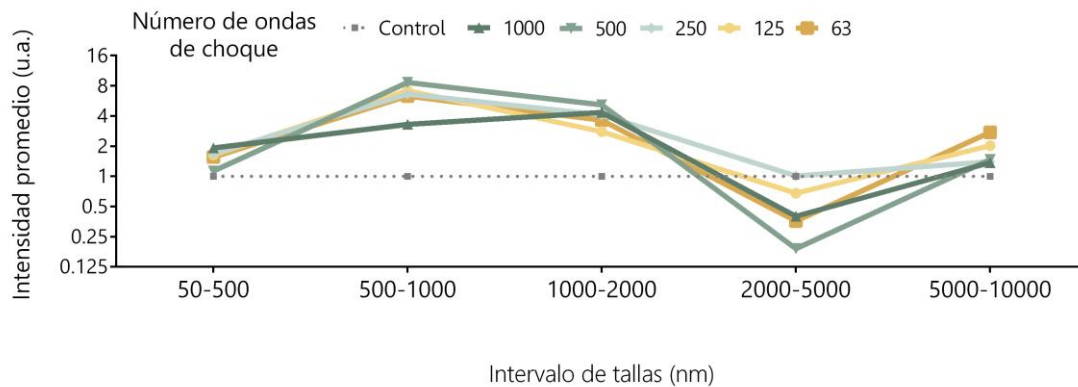


Figura 28 Liposomas expuestos a OCh con una $P+ = 15.1$ MPa, a una temperatura de 4°C . En el eje de las ordenadas esta la intensidad relativa promedio (u.a.) y en el eje de las abscisas están los intervalos de tallas de los liposomas en su diámetro hidrodinámico (nm). En la parte superior de la gráfica se representan que color corresponde a los distintos tratamientos de ondas de choque, ■ Control o 0 OCh, ▲ 1000 OCh, ▼ 500 OCh, ◆ 250 OCh, ● 125 OCh, ■ 63 OCh.

Se aprecia una tendencia en todos los tratamientos, y donde el intervalo de liposomas que corresponde a 500-1000 nm aumenta con respecto al control de manera notoria, las vesículas mayores a $2 \mu\text{m}$ pertenecen a los intervalos de menor abundancia, y conforme su tamaño aumenta su intensidad se asemeja más al control.

La Figura 29 muestra a las vesículas tratadas con ondas de choque de $P+ = 15.1$ MPa analizadas a 25°C .

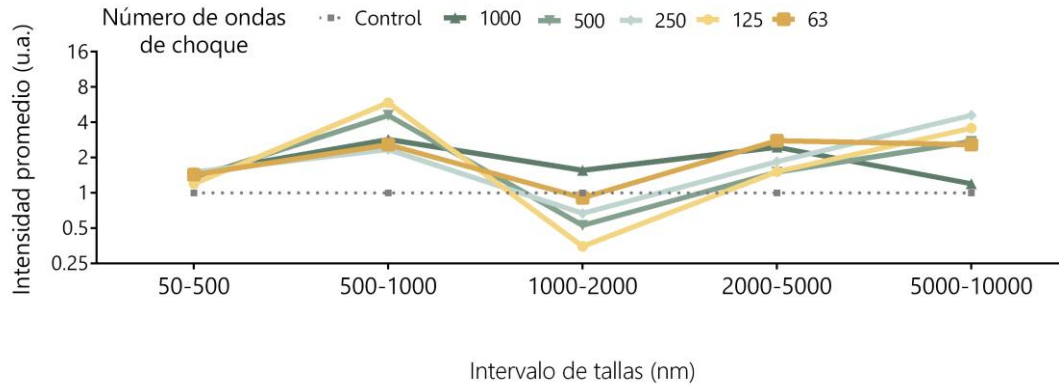


Figura 29 Histogramas de intensidad relativa del diámetro hidrodinámico y densidad en intervalos de tallas entre CONTROL y tratamientos de OCh a $P+ = 15.1$ MPa, $T = 25^\circ\text{C}$. En el eje de las ordenadas esta la intensidad relativa promedio (u.a.) y en el eje de las abscisas están los intervalos de tallas de los liposomas en su diámetro hidrodinámico (nm). En la parte superior de la gráfica se representan que color corresponde a los distintos tratamientos de ondas de choque, ■ Control o 0 OCh, ▲ 1000 OCh, ▼ 500 OCh, ◆ 250 OCh, ● 125 OCh, ■ 63 OCh.

Los dos análisis coinciden en que el intervalo de tallas de 500-1000 nm es el de mayor intensidad, este tamaño está en el intervalo menor de las dimensiones esperadas para LUV, confirmando que al aplicar ondas de choque se forman este tipo de vesículas. Sin embargo, se distingue una diferencia del patrón en el análisis de 4° a 25°C , el intervalo de menor intensidad se recorre de 2-5 μm a las vesículas de 1-2 μm conforme la temperatura aumenta, y conforme el tamaño de los liposomas aumenta su intensidad con respecto al control también.

TRATAMIENTOS DE ALTA INTENSIDAD (18.1 MPa)

En la [Figura 28](#) se muestran las vesículas tratadas con $P+ = 18.1$ MPa analizadas a 4°C . Este análisis posee una similitud con los resultados del análisis de $P+ = 15.1$ MPa a la misma temperatura, donde los intervalos con mayor intensidad coinciden en los 500-1000 nm, seguidos de 1-2 μm , y a partir de los 2000 nm la intensidad disminuye notoriamente, para después acercarse a lo registrado por el control.

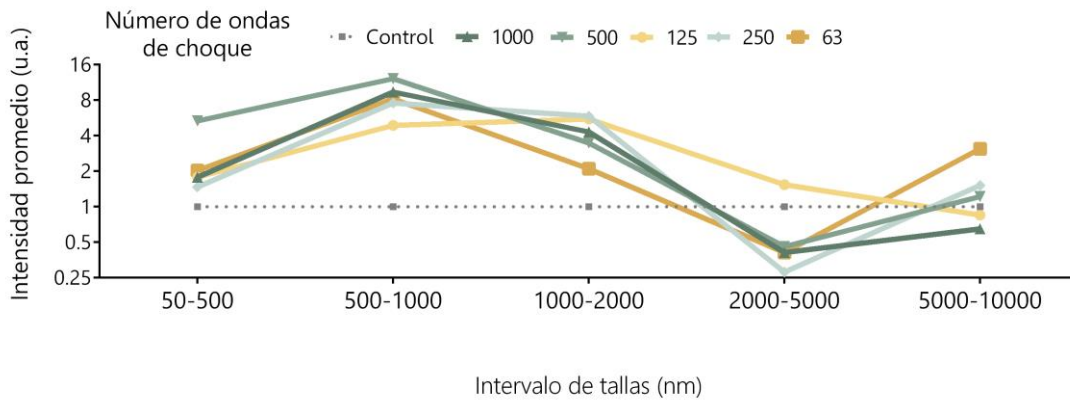


Figura 30 Histogramas de MLV expuestos a OCh con una $P+ = 18.1$ MPa, a 4°C . En el eje de las ordenadas esta la intensidad relativa promedio (u.a.) y en el eje de las abscisas están los intervalos de tallas de los liposomas en su diámetro hidrodinámico (nm). En la parte superior de la gráfica se representan que color corresponde a los distintos tratamientos de ondas de choque, ■ Control o 0 OCh, ▲ 1000 OCh, ▼ 500 OCh, ◆ 250 OCh, ● 125 OCh, ■ 63 OCh.

La **Figura 31** muestra las mediciones de las vesículas tratadas con $P+ = 18.1$ MPa y analizadas a 25°C . Al igual que la gráfica anterior mantiene una relación con los resultados mostrados por su contraparte de mediana intensidad, las poblaciones de 500-1000 nm se distinguen como de mayor intensidad en todos los tratamientos, mientras que el siguiente intervalo, 1-2 μm , tiene en común una baja intensidad sin importar el número de ondas aplicadas. Para el resto de los intervalos no parece haber una tendencia común entre los tratamientos.

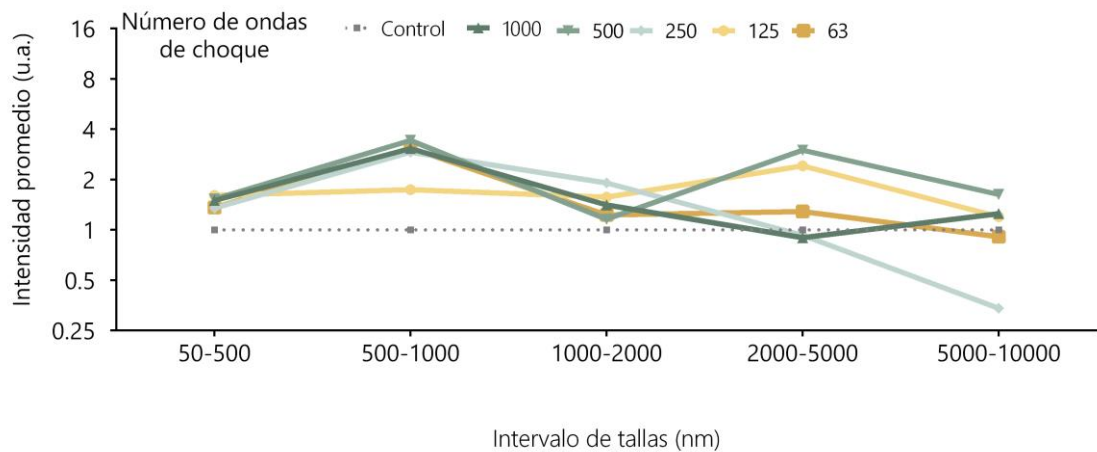


Figura 31 Histogramas de intensidad relativa del diámetro hidrodinámico y densidad en intervalos de tallas entre CONTROL y tratamientos de OCh a $P+ = 18.1$ MPa, $T = 25^{\circ}\text{C}$. En la parte superior de la gráfica se representan que color corresponde a los distintos tratamientos de ondas de choque, ■ Control o 0 OCh, ▲ 1000 OCh, ▼ 500 OCh, ◆ 250 OCh, ● 125 OCh, ■ 63 OCh.

Es claro que las ondas de choque fomentan la formación de vesículas unilaminares, hay tendencias presentes en todos los tratamientos y análisis a distinta temperatura que lo

muestran, sin embargo, parece no haber una diferencia clara entre mayor o menor aplicación de ondas de choque.

5. POTENCIAL ZETA DE LIPOSOMAS SIN CARGO

En la [Figura 32](#) se muestran los resultados representativos del potencial zeta en vesículas tratadas con la mayor intensidad correspondiente a $P = +18.1$ MPa, sin una diferencia significativa entre las vesículas multilaminares o control y las vesículas tratadas, los promedios corresponden a -12 mV y -13 mV respectivamente.

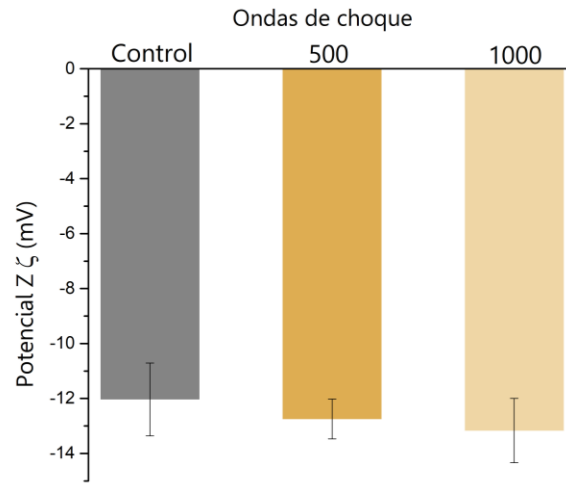


Figura 32. Potencial zeta de liposomas neutros, sin carga, tratados con ondas de choque y diluidos en agua destilada

6. RESISTENCIA DE PLÁSMIDO A ONDAS DE CHOQUE

Los resultados de la estabilidad del plásmido ante las ondas de choque se muestran en la [Figura 33](#). En ninguno de los casos se observa fragmentación o diferencia aparente entre las muestras tratadas y el control (pDNA sin ser expuesto a ondas de choque).

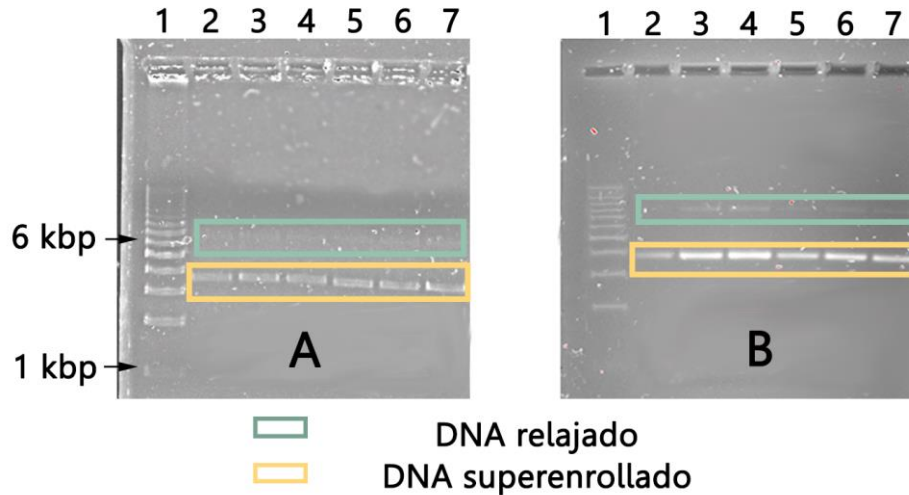


Figura 33. Análisis de la integridad de *pDNA* expuesto a ondas de choque. Gel de agarosa con tinción de SybrSafe® del plásmido *pCX::GFP-GPI2*. Los carriles corresponden **1** a escalera de 1-15 kbp, **2**: control con 0 ondas de choque, **3**: 63 OCh, **4**: 125 OCh, **5**: 250 OCh, **6**: 500 OCh, **7**: 1000 OCh, El gel **A**, corresponde a una $P+ = 18.1$ MPa, mientras que el gel **B**, a $P+ = 15.1$ MPa

Los gels presentan dos bandas, que corresponden a la forma relajada del plásmido (primera banda de arriba hacia abajo, a 6000 pb aproximadamente) y una forma súper enrollada (banda a aproximadamente 3000 pb).

El DNA plasmídico puede presentarse en diferentes conformaciones como lo son la forma lineal, súper enrollada, circular abierta y otras. Bajo condiciones *in vivo* el plásmido se encuentra en una configuración circular súper enrollada. Sin embargo, tras la manipulación de un proceso de purificación y tiempo de almacenamiento una parte seguirá en esa conformación súper enrollada, pero otra fracción se desnaturaliza y toma una forma más relajada. La conformación súper enrollada tiene menos estructura expuesta e interacciona menos la matriz de agarosa que el plásmido “desdoblado” por lo tanto llega más lejos en el gel. Esto justifica las dos bandas, a pesar de sólo haber un tipo de plásmido en las muestras.

Este análisis confirma que no hay fragmentación o desnaturalización del plásmido por el tratamiento de ondas de choque, al contrario de como suele ocurrir con la sonicación (Sarker et al, 2019), un método de dispersión física para la preparación de LUV (Tabla 3).

Aunque este análisis indica que las ondas de choque no producen la fragmentación del plásmido, todavía queda la posibilidad que el proceso pudiera generar cambios que alteran la estructura química de las bases y su función generando mutaciones.

En la **Figura 35** se muestra que la aplicación de ondas de choque en distintas dosis no produjo la pérdida de bioactividad del plásmido. Todas las placas mostraron colonias resistentes al antibiótico, indicando la funcionalidad del plásmido. Por lo tanto, estos resultados sugieren que el plásmido mantiene no solo su talla, sino también su funcionalidad, al menos en parte del lote tratado. Queda por confirmarse la ausencia de daños en la secuencia completa

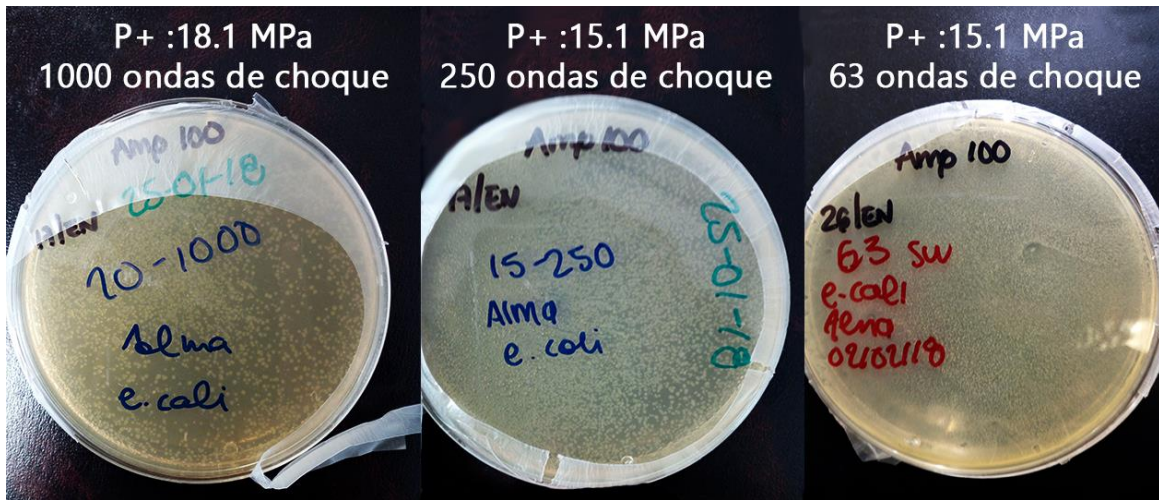


Figura 35 Fotografías con resultados típicos de colonias de *E. coli* transformantes, obtenidas con plásmidos tratados con ondas de choque

Cabe mencionar que los resultados mostrados en esta figura fueron equivalentes con todas las variantes entre intensidad de ondas de choque y número de ondas por muestra.

7. DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA DE VESÍCULAS CON pDNA DE CARGO

Los liposomas usados en esta caracterización corresponden a una mezcla de PC-colesterol 7:3.

Dado que el equipo previamente usado estuvo fuera de servicio un tiempo se nos presentó la oportunidad de usar un equipo mucho más moderno, propiedad del Cinvestav del estado.

La **Figura 36** muestra una comparación entre los liposomas neutros tratados con 125 OCh a $P+ = 15.1$ MPa, rehidratados con pDNA y MLV sin tratamiento y sin cargo. A diferencia de la multidispersidad continua a lo largo de toda la escala mostrada en el equipo Brookhaven, se observa que el tamaño máximo de partícula es de alrededor de $1 \mu\text{m}$, y que parece haber dos poblaciones principales, una alrededor de los 100 nm y otra por los 600 nm.

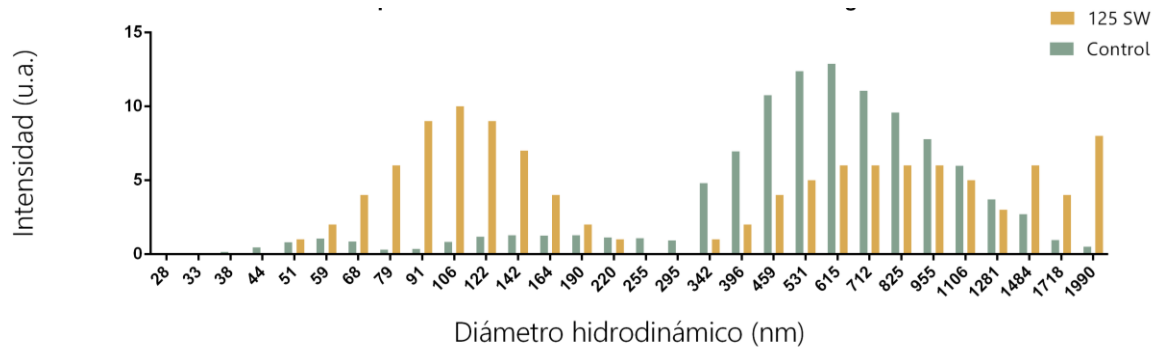


Figura 36 Vesículas neutras con pDNA analizadas antes de ser ultracentrifugadas

Es claro que el control tiene mayor cantidad de vesículas en un intervalo de 350-1500 nm, mientras el tratamiento con ondas de choque refleja un aumento en la población de vesículas alrededor de 100 nm y una disminución en la población cercana a 1 μm .

En la **Figura 37** se muestra el mismo lote de vesículas, pero después de haber sido ultra centrifugado.

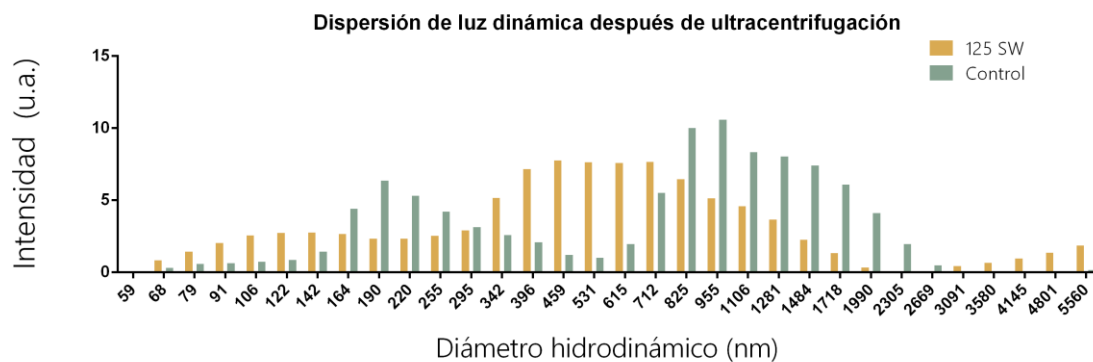


Figura 37 Vesículas neutras con pDNA después de ser ultracentrifugadas y resuspendidas

Como puede observarse, el proceso de ultracentrifugación utilizado parece haber generado la agregación de las vesículas previamente obtenidas por OCh. Posterior al tratamiento, las vesículas mostraban una subpoblación abundante cuya talla se había reducido desde 1 μm a 100 nm (**Figura 36**). En contraste, al ultra-centrifugar a fin de concentrar las vesículas, la moda de tallas obtenidas se situó en unos 500 nm (**Figura 37**). Esto puede implicar que las vesículas tienen una tendencia a fusionarse y disociarse con el proceso de centrifugación.

8. MICROSCOPIA CONFOCAL

El objetivo de este análisis fue observar la internalización del material genético. Las microscopías presentadas corresponden a los tratamientos más intensos, es decir 1000 OCh a $P+ = 18.1$ MPa.

La **Figura 38** muestra liposomas neutros rehidratados en un medio con pDNA sin exposición a ondas de choque. El tamaño aproximado del cluster es cercano a los $10 \mu\text{m}$ y se alcanzan a distinguir vesículas con amplia diversidad en tallas. Se observa fluorescencia correspondiente al pDNA marcado con DAPI en los planos focales medios indicando la internalización. Como es de esperarse, cuando se rehidrata una película lipídica en el proceso de elaboración de los MLV, lo que se encuentre disuelto en el medio quedará al interior de la vesícula. El no encontrar fluorescencia alrededor del liposoma indica la ausencia de material genético en el exterior de la bicapa. La fluorescencia conservada al interior confirma la retención suficiente del material genético en la mezcla de lípidos usados.



Figura 38. Microscopía confocal de liposomas neutros sin tratamiento de ondas de choque rehidratados con pDNA y teñidos con DAPI

La **Figura 39** corresponde a un barrido en Z de liposomas neutros tratados con 1000 OCh a una $P+ = 18.1$ MPa. A través de distintos planos focales se forma una imagen tridimensional. Las vesículas que forman los distintos clusters son de distintas tallas que, hasta donde permite la resolución de imágenes mediante el software, se alcanzan a distinguir dimensiones de 1 hasta $25 \mu\text{m}$, en el primer caso, demasiado grande para ser detectado por DLS. Al igual que

en la microscopía anterior se distingue la internalización del cargo y la ausencia de pDNA al exterior del cluster de liposomas.

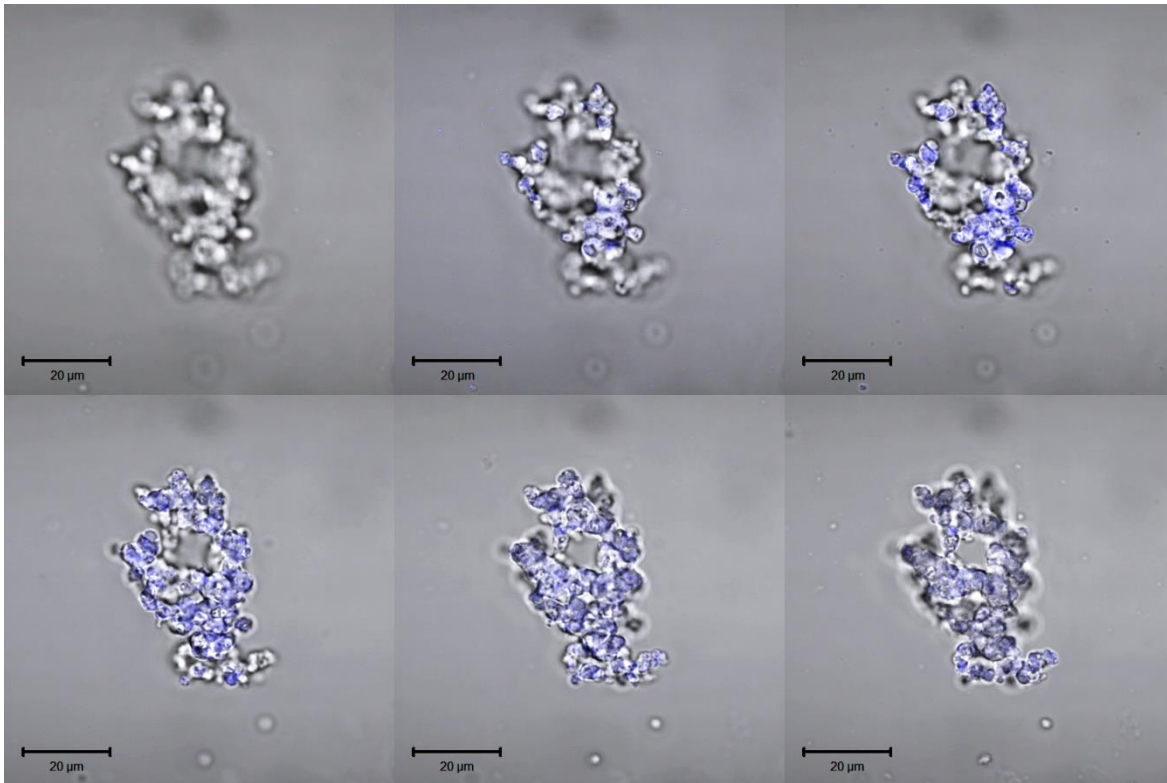


Figura 39 Barrido en Z de liposomas neutros obtenidos con un tratamiento de 1000 ondas de choque rehidratados con pDNA y teñidos con DAPI, la escala está a 20 µm.

La **Figura 40** muestra liposomas catiónicos rehidratados en un medio con pDNA sin exposición a ondas de choque, es decir liposomas multilaminares. El tamaño aproximado del agregado es cercano a los 15 µm y si bien no se distingue con claridad la talla de los liposomas que lo forman se logra identificar un tamaño homogéneo en general, al contrario de las vesículas neutras que se destacan por una diversidad de tallas sin importar si fueron o no expuestas a ondas de choque. La fluorescencia sólo se logra observar de manera parcial en la parte superior del cluster de las vesículas, sin embargo, no se hizo un stack en Z por lo que no se puede afirmar que la parte inferior no presenta encapsulamiento de pDNA.

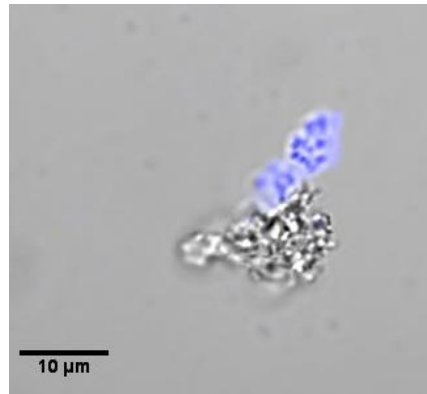


Figura 40. Liposomas catiónicos multilaminares rehidratados con pDNA y teñidos con DAPI, analizados en un plano focal único

En la **Figura 41** se muestra un cúmulo de vesículas catiónicas con tratamientos de 1000 OCh, $P^+ = 18.1\text{MPa}$ de tamaños más o menos uniformes entre sí, sin embargo, de manera tenue se distingue fluorescencia azul fuera del cúmulo o sobre las vesículas, en lugar de aparecer internalizado, particularmente en el perímetro del agregado. Esto podría deberse a un artefacto o bien a que el material genético se asocia a la superficie de las vesículas y debido a su carga negativa y a las interacciones iónicas entre el plásmido y los liposomas, no fue retirado a pesar de la ultracentrifugación .

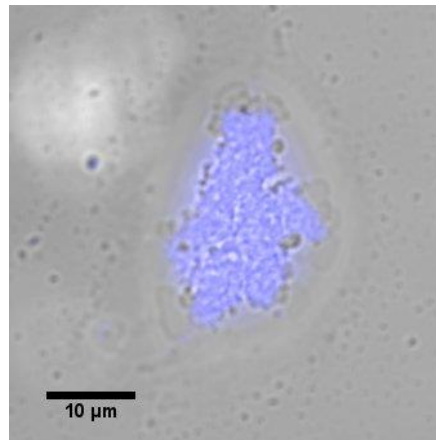


Figura 41. Liposomas catiónicos con 1000 ondas de choque a $P^+ = 18.1\text{MPa}$, rehidratados con pDNA, teñidos con DAPI

9. POTENCIAL ZETA DE LIPOSOMAS CON pDNA COMO CARGO

Los lotes analizados corresponden a liposomas catiónicos, mostrados en la **Figura 42**, (control y tratados con 63, 250 y 500 ondas de choque a $P^+ = 18.1\text{MPa}$), así como a liposomas

neutros, mostrados en la [Figura 43](#), (control y tratados con 63, 250, y 500 OCh a una $P+=18.1$ MPa).

En la primera gráfica se distingue que el potencial tiende a aumentar conforme el número de ondas de choque aumenta. El cambio más drástico es a partir del primer tratamiento.

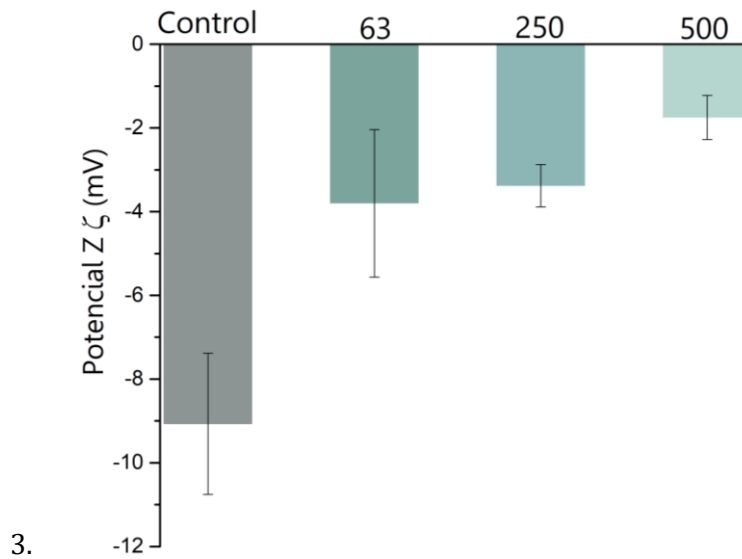
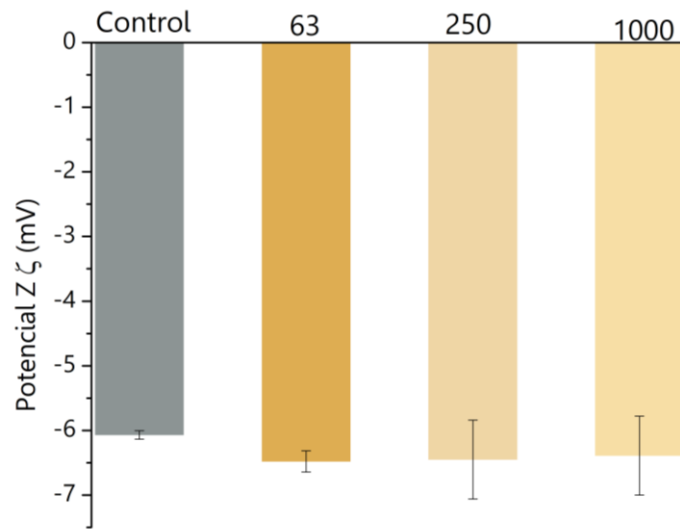


Figura 42 Potencial zeta de liposomas catiónicos con pDNA, tratados con ondas de choque.

Sin embargo, se sabe que cambios mínimos en temperatura, pH, viscosidad y conductividad del medio de la muestra pueden generar cambios drásticos en la medición del potencial zeta de una misma muestra (Clogston y Patri, 2016), siendo el pH la variable de mayor peso, y si bien esto es un factor que se omitió y debió considerarse, se ha reportado que liposomas catiónicos usando DOTAP muestran no ser afectados significativamente ante cambios en esta medición, debido a la amina cuaternaria que vuelve al lípido catiónico muy poco reactivo (Smith et al, 2017). El resultado obtenido con nuestras formulaciones podría indicar que la agregación de liposomas ocurre aún antes del tratamiento con ondas de choque y que la estabilidad de la muestra no se ve significativamente modificada.

A diferencia del lote catiónico, no se muestra una variación del potencial zeta con respecto al número de ondas de choque aplicadas en liposomas neutros ([Figura 42](#)). Se puede observar un potencial cercano a -6 mV para el control y de -6.5 mV para las vesículas tratadas, lo que concuerda con la [Figura 32](#), donde tampoco se observa una diferencia entre el potencial zeta de distintos tratamientos de liposomas neutros sin cargo.



4.

Figura 42 Potencial zeta de liposomas neutros con pDNA tratados con ondas de choque.

CONCLUSIONES

- Las ondas de choque son capaces de formar liposomas unilaminares a partir de una mezcla de liposomas multicapa, manteniendo encapsulado el material genético agregado en la fase de rehidratación.
- Los liposomas obtenidos mediante ondas de choque presentan multidispersidad de tallas que van de pocas decenas a cientos de nanómetros. Para determinar, de manera más precisa, las tendencias poblacionales de las vesículas con respecto a cada tratamiento, se tiene que recurrir a un análisis compatible con muestras tan multidispersas y con un amplio rango de tallas. En este trabajo se empleó la técnica de DLS de ángulo fijo, el cual permitió obtener un estimado preliminar, pero no es adecuado para un análisis detallado de tallas.
- Las ondas de choque no dañan el material genético modificando su enrollamiento o alterando su funcionalidad al ser expuesto a las mismas condiciones en las que se forman los liposomas unilaminares. Análisis de su funcionalidad indican la ausencia de daños moleculares.

TRABAJO FUTURO

- Dada la imposibilidad de caracterizar por TEM los liposomas previos a ondas de choque, se piensa añadir un análisis de opacidad óptica comparando muestras tratadas y sin tratar.
- Conocer la dispersión de tallas en las muestras a través de un método apropiado.
- Desarrollar un método de separación de las vesículas unilaminares formadas por ondas de choque.
- Verificar la viabilidad y efectividad de las vesículas tratadas como un vector de transfección celular.

REFERENCIAS

ANTECEDENTES

1. Allen, T. M., Cullis, P. R. (2013). Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(1), 36–48.
2. Huwyler, J. (2008). Tumor targeting using liposomal antineoplastic drugs. *International Journal of Nanomedicine*, 3(1), 21–29.
3. Dua J.S., Rana A. C., (2012). Liposome: Methods of preparation and applications. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research*, 3(2), 7.
4. Shek, P., Yung, B., & Stanacev, N. (1983). Comparison between multilamellar and unilamellar liposomes in enhancing antibody formation. *Immunology*, 49(1), 37-44.
5. Parthasarathy, R., Sacks, P. G., Harris, D., Brock, H., & Mehta, K. (1994). Interaction of liposome-associated all-trans-retinoic acid with squamous carcinoma cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 34(6), 527–534
6. Neopharm, Inc. (2000). *Method of administering Liposomal encapsulated taxane. No. 6146659*, United States.
7. Saunders, B. Y. L., Perrin, J., & Gammack, D. (1962). Ultrasonic irradiation of some phospholipid solutions. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 14(1), 567–572
8. Loske, A. M. (2007). *Shock wave physics for urologists*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
9. Lauer, U., Bu, E., Squire, Z., Messmer, K., Hofschneider, P. H., Gregor, M., & Delius, M. (1997). Shock wave permeabilization as a new gene transfer method. *Gene Therapy*, 7(4), 710–715.
10. López-Marín, L. M., Millán-Chiu, B. E., Castaño-González, K., Aceves, C., Fernández, F., Varela-Echavarría, A., & Loske, A. M. (2016). Shock Wave-Induced Damage and Poration in Eukaryotic Cell Membranes. *The Journal of Membrane Biology*, 250(1), 41-52.
11. Teissié, J. (2018). Induced shock waves in PEF (pulsed electric field) treatment. *Physics of Life Reviews*, 26-27, 39-42.
12. Cabral, E. C., Zollner, R. L., & Santana, M. H. (2004). Preparation and characterization of liposomes entrapping allergenic proteins. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 21(2), 137-146.
13. Magaña-Ortíz, D., Coconi-Linares, N., Ortiz-Vazquez, E., Fernández, F., Loske, A. M., & Gómez-Lim, M. A. (2013). A novel and highly efficient method for genetic transformation of fungi employing shock waves. *Fungal Genetics and Biology*, 56, 9-16.
14. Rivera, A. L., Magaña-Ortíz, D., Gómez-Lim, M., Fernández, F., & Loske, A. M. (2014). Physical methods for genetic transformation of fungi and yeast. *Physics of Life Reviews*, 11(2), 184-203.
15. López-Marín, L. M., Rivera, A. L., Fernández, F., & Loske, A. M. (2018). Shock wave-induced permeabilization of mammalian cells. *Physics of Life Reviews*, 26-27, 1-38.

16. Zhou, Y., Yang, K., Cui, J., Ye, J., & Deng, C. (2012). Controlled permeation of cell membrane by single bubble acoustic cavitation. *Journal of Controlled Release*, 157(1), 103-111.
17. Schlicher, R. K., Radhakrishna, H., Tolentino, T. P., Apkarian, R. P., Zarnitsyn, V., & Prausnitz, M. R. (2006). Mechanism of intracellular delivery by acoustic cavitation. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 32(6), 915-924.

LIPOSOMAS: CONCEPTOS Y APLICACIONES

1. Bangham, A. D., & Horne, R. (1964). Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *Journal of Molecular Biology*, 8(5).
2. Saunders, B. Y. L., Perrin, J., & Gammack, D. (1962). Ultrasonic irradiation of some phospholipid solutions. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 14(1), 567-572.
3. Bangham, A. D. (1993). Liposomes: The Babraham connection. En *Chemistry and Physics of Lipids* (Vol. 64, 1-3, pp. 275-285). Elsevier.
4. Colley, M. C., & Ryman, B. E. (1976). The liposome: From membrane model to therapeutic agent. *Trends in Biochemical Sciences*, 1(9), 203-205

COMPOSICIÓN DE MEMBRANA LIPÍDICA

1. Mozafari, M. R. (2007). *Nanomaterials and nanosystems for biomedical applications*. Dordrecht, The Netherlands: Springer

DINÁMICA DE LOS LIPOSOMAS

1. Papahadjopoulos, D., Mayhew, E., Poste, G., Smith, S., & Vail, W. J. (1974). Incorporation of lipid vesicles by mammalian cells provides a potential method for modifying cell behaviour. *Nature*, 252(5479), 163-166.
2. Sandra, A. & Pagano, R. E. (1979) Liposome-cell interactions. Studies of lipid transfer using isotopically asymmetric vesicles. *The Journal of Biological Chemistry*. 254(7), 2244-2249.
3. Martin, F., & Macdonald, R. (1974). Liposomes can mimic virus membranes. *Nature*, 252(5479), 161-163.
4. Rahman, Y. E. & Wright, B.J. (1975). Liposomes containing chelating agents. Cellular penetration and a possible mechanism of metal removal. *The Journal of Cell Biology*, 65(1), 112-122.
5. Korn, E. D., Bowers, B., Batzri, S., Simmons, S. R., & Victoria, E. J. (1974). Endocytosis and exocytosis: Role of microfilaments and involvement of phospholipids in membrane fusion. *Journal of Supramolecular Structure*, 2(5-6), 517-528.
6. Gordon, S., & Cohn, Z. A. (1973). The Macrophage. *International Review of Cytology*, 171-214.
7. Poste, G., & Papahadjopoulos, D. (1976). Lipid vesicles as carriers for introducing materials into cultured cells: Influence of vesicle lipid composition on mechanism(s) of

vesicle incorporation into cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(5), 1603-1607

TIPOS

1. Papahadjopoulos, D. (1978). Introductory Remarks. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 308 (1 Liposomes and their uses in biology and medicine), 1-1.
2. Lin, C., Li, C., Sheng, Y., Wu, D. T., & Tsao, H. (2011). Size-Dependent Properties of Small Unilamellar Vesicles Formed by Model Lipids. *Langmuir*, 28(1), 689-700.
3. Kim, H. Y., & Baianu, I. C. (1991). Novel liposome microencapsulation techniques for food applications. *Trends in Food Science & Technology*, 2, 55-61.
4. Wesolowska, O., Michalak, K., Maniewska, J., Hendrich, A. B., (2009). Giant unilamellar vesicles — a perfect tool to visualize phase separation and lipid rafts in model systems. *Acta Biochimica Polonica*, 56(1), 33-39
5. Gruner, S. M., Lenk, R. P., Janoff, A. S., & Ostro, N. J. (1985). Novel multilayered lipid vesicles: Comparison of physical characteristics of multilamellar liposomes and stable plurilamellar vesicles. *Biochemistry*, 24(12), 2833-2842.
6. Slepushkin, V., Simões, S., Lima, M. C., & Düzgüneş, N. (2004). Sterically Stabilized pH-Sensitive Liposomes. *Methods in Enzymology Liposomes*, Part D, 134-147.
7. Ahmad, M. U., Ali, S. M., & Ahmad, I. (2012). Applications of Nanotechnology In Pharmaceutical Development. *Lipids in Nanotechnology*, 171-190.
8. Zalipsky, S., Brandeis, E., Newman, M. S., & Woodle, M. C. (1994). Long circulating, cationic liposomes containing amino-PEG-phosphatidylethanolamine. *FEBS Letters*, 353(1), 71-74.
9. Eloy, J. O., Petrilli, R., Trevizan, L. N., & Chorilli, M. (2017). Immunoliposomes: A review on functionalization strategies and targets for drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 159, 454-467.
10. Cevc G, Blume G. (1992) Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *Biochem Biophys Acta*;1104:226–32
11. Mozafari, M. R., Flanagan, J., Matia-Merino, L., Awati, A., Omri, A., Suntres, Z. E., & Singh, H. (2006). Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(13), 2038-2045.

APLICACIONES

1. Reineccius, G. A. (1995). Liposomes for Controlled Release in the Food Industry. *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients ACS Symposium Series*, 113-131.
2. Ashtiani, H. R., Bishe, P., Lashgari, N., Nilforoushzadeh, M. A., & Zare, S. (2016). Liposomes in Cosmetics. *Journal of Skin and Stem Cell*, 3(3).
3. Sercombe, L., Veerati, T., Moheimani, F., Wu, S. Y., Sood, A. K., & Hua, S. (2015). Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. *Frontiers in Pharmacology*, 6, 286.

Liposomas en terapia génica

1. Edelstein, M., Wixon, J., & Ginn, S. L., Alexander I. E., Abedi M. R., (2013). Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 – An update. *The Journal of Gene Medicine*, 15(2), 65-77.
2. Lv, H., Zhang, S., Wang, B., Cui, S., & Yan, J. (2006). Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *Journal of Controlled Release*, 114(1), 100-109.
3. Bouard, D., Alazard-Dany, N., & Cosset, F. (2009). Viral vectors: From virology to transgene expression. *British Journal of Pharmacology*, 157(2), 153-165.

Lípidos catiónicos

1. Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M., Danielsen, M. (1987). Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(21), 7413-7417.
2. Zhao, Y., & Huang, L. (2014). Lipid Nanoparticles for Gene Delivery. En *Advances in Genetics: Nonviral Vectors for Gene Therapy Lipid- and Polymer-based Gene Transfer* (Vol. 88, pp. 13-36). Elsevier.
3. Fehring, V., Schaeper, U., Ahrens, K., Santel, A., Keil, O., Eisermann, M., Giese, K., & Kaufmann, J. (2014). Delivery of Therapeutic siRNA to the Lung Endothelium via Novel Lipoplex Formulation DACC. *Molecular Therapy*, 22(4), 811-820.

MÉTODOS DE PREPARACIÓN

1. Mendez, R., & Banerjee, S. (2017). Sonication-Based Basic Protocol for Liposome Synthesis. *Methods in Molecular Biology Lipidomics*, 255-260.
2. Traïkia, M., Warschawski, D. E., Recouvreur, M., Cartaud, J., & Devaux, P. F. (2000). Formation of unilamellar vesicles by repetitive freeze-thaw cycles: Characterization by electron microscopy and ³¹P-nuclear magnetic resonance. *European Biophysics Journal*, 29(3), 184-195.
3. Mortazavi, S. M., Mohammadabadi, M. R., Khosravi-Darani, K., & Mozafari, M. R. (2007). Preparation of liposomal gene therapy vectors by a scalable method without using volatile solvents or detergents. *Journal of Biotechnology*, 129(4), 604-613.
4. Lapinski, M. M., Castro-Forero, A., Greiner, A. J., Ofoli, R. Y., & Blanchard, G. J. (2007). Comparison of Liposomes Formed by Sonication and Extrusion: Rotational and Translational Diffusion of an Embedded Chromophore. *Langmuir*, 23(23), 11677-11683.
5. Zadi, B., & Gregoriadis, G. (2000). A Novel Method for High-Yield Entrapment of Solutes into Small Liposomes. *Journal of Liposome Research*, 10(1), 73-80.
6. Szoka, F., & Papahadjopoulos, D. (1978). Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(9), 4194-4198.
7. Batzri, S., & Korn, E. D. (1973). Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 298(4), 1015-1019.

8. Hauschild, S., Lipprandt, U., Rumplecker, A., Borchert, U., Rank, A., Schubert, R., & Förster, S. (2005). Direct Preparation and Loading of Lipid and Polymer Vesicles Using Inkjets. *Small*, 1(12), 1177-1180.
9. Alpes, H., Allmann, K., Plattner, H., Reichert, J., Rick, R., & Schulz, S. (1986). Formation of large unilamellar vesicles using alkyl maltoside detergents. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 862(2), 294-302.
10. Julia E. Trevisan, Leide P. Cavalcanti, Cristiano L. P. Oliveira, Lucimara G. de La Torre and Maria Helena A. Santana (2011). Technological Aspects of Scalable Processes for the Production of Functional Liposomes for Gene Therapy. *Non-Viral Gene Therapy*, 267–292.
11. Deng, N.-N., Yelleswarapu, M., & Huck, W. T. S. (2016). Monodisperse Uni- and Multicompartment Liposomes. *Journal of the American Chemical Society*, 138(24), 7584–7591.
12. Göpfrich, K., Platzman, I., & Spatz, J. P. (2018). Mastering Complexity: Towards Bottom-up Construction of Multifunctional Eukaryotic Synthetic Cells. *Trends in Biotechnology*, 36(9), 938–951.
13. Szoka, F., & Papahadjopoulos, D. (1980). Comparative Properties and Methods of Preparation of Lipid Vesicles (Liposomes). *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 9(1), 467-508.
14. Costa, A. P., Xu, X., & Burgess, D. J. (2013). Freeze-Anneal-Thaw Cycling of Unilamellar Liposomes: Effect on Encapsulation Efficiency. *Pharmaceutical Research*, 31(1), 97-103.
15. Zadi, B., & Gregoriadis, G. (2000). A Novel Method for High-Yield Entrapment of Solutes into Small Liposomes. *Journal of Liposome Research*, 10(1), 73-80.

CARACTERIZACIÓN

Dispersión de Luz dinámica

1. Stetefeld, J., Mckenna, S. A., & Patel, T. R. (2016). Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews*, 8(4), 409–427.
2. Naiim, M., Boualem, A., Ferre, C., Jabloun, M., Jalocha, A., & Ravier, P. (2015). Multiangle dynamic light scattering for the improvement of multimodal particle size distribution measurements. *Soft Matter*, 11(1), 28–32.

Potencial zeta

1. Lu, G. W., & Gao, P. (2010). Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery. In *Handbook of non-invasive drug delivery systems: Non-invasive and minimally-invasive drug delivery systems for pharmaceutical and personal care products* (1st ed., pp. 59-94). Amsterdam: Elsevier/William Andrew.
2. Riddick, T. M. (1968). Control of colloid stability through zeta potential: With a closing chapter on its relationship to cardiovascular disease. New York: ZETA-METER.

ONDAS DE CHOQUE

1. Achim M. Loske. Medical and Biomedical Applications of Shock Waves. Springer International Publishing, Cham, Suiza 2017.
2. Rivera, A. L., Gómez-Lim, M., Fernández, F., & Loske, A. M. (2012). Physical methods for genetic plant transformation. *Physics of Life Reviews*, 9(3), 308–345.

CAVITACIÓN ACÚSTICA

1. Brennen, C. E. (1995). Cavitation and bubble dynamics. New York: Oxford University Press.
2. Fernández, F., Fernández, G., & Loske, A. M. (2009). Treatment Time Reduction Using Tandem Shockwaves for Lithotripsy: An In Vivo Study. *Journal of Endourology*, 23(8), 1247-1253.

APLICACIONES

1. Chaussy, Ch., Brendel, W., & Schmiedt, E., (1980), Extracorporeally Induced Destruction Of Kidney Stones By Shock Waves. *The Lancet*, vol. 316, no. 8207, pp. 1265–1268.
2. Russo, S., Gigliotti, S., Durante, C., Canero, C., Andretta, R. & Corrado, B., (1998) Results with Extracorporeal Shock Wave Therapy in Bone and Soft Tissue Pathologies. *Extracorporeal Shock Waves in Orthopaedics*, pp. 149–155.
3. Fu, Y., Kaufman, G. E., Miller, M. W., Griffiths, T. D., & Lange, C. S. (1979). Modification by Cysteamine of Ultrasound Lethality to Chinese Hamster V-79 Cells. *Radiation Research*, 80(3), 575-580.
4. Dinno, M. A., Dyson, M., Young, S. R., Mortimer, A. J., Hart, J., & Crum, L. A. (1989). The significance of membrane changes in the safe and effective use of therapeutic and diagnostic ultrasound. *Physics in Medicine and Biology*, 34(11), 1543-1552.
5. Mihran, R. T., Barnes, F. S., & Wachtel, H. (1990). Temporally-specific modification of myelinated axon excitability in vitro following a single ultrasound pulse. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 16(3), 297-309.
6. Pohl, E. E., Rosenfeld, E. H., Pohl, P., & Millner, R. (1995). Effects of ultrasound on agglutination and aggregation of human erythrocytes in vitro. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 21(5), 711-719.
7. Bolumar, T., & Toepfl, S. (2016). Application of Shockwaves for Meat Tenderization. In Innovative food processing technologies: Extraction, separation, component modification and process intensification (pp. 232-259). Duxford, UK: Woodhead Publishing is an imprint of Elsevier.
8. Sun, B., Xin, Y., Zhu, X., Gao, Z., Yan, Z., & Ohshima, T. (2018). Effects of shock waves, ultraviolet light, and electric fields from pulsed discharges in water on inactivation of *Escherichia coli*. *Bioelectrochemistry*, 120, 112-119.
9. Alvarez, U. M., Loske, A. M., Castaño-Tostado, E., & Prieto, F. E. (2004). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* by

underwater shock waves. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5 (4), 459–463.

Aplicaciones en biotecnología

1. Fechheimer M., Denny C., Murphy R., & Taylor D. (1986). Measurement of cytoplasmic pH in *Dictyostelium discoideum* by using a new method for introducing macromolecules into living cells. *European Journal of Cell Biology*, Abril (40), (2), 242-247.
2. Miller, D. L., Williams, A. R., Morris, J. E., & Chrisler, W. B. (1998). Sonoporation of erythrocytes by lithotripter shockwaves in vitro. *Ultrasonics*, 36(9), 947-952.
3. López-Marín, L. M., Millán-Chiu, B. E., Castaño-González, K., Aceves, C., Fernández, F., Varela-Echavarría, A., & Loske, A. M. (2016). Shock Wave-Induced Damage and Poration in Eukaryotic Cell Membranes. *The Journal of Membrane Biology*, 250(1), 41-52.

TRANSFECCIÓN

1. Kim, T. K., & Eberwine, J. H. (2010). Mammalian cell transfection: The present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(8), 3173-3178.

USO DE ÁCIDOS NUCLEICOS COMO AGENTE TERAPÉUTICO

1. Parker, W.B.; Shaddix, S.C.; Chang, C.H.; White, E.L.; Rose, L.M.; Brockman, R.W.; Shortnacy, A.T.; Montgomery, J.A.; Secrist, J.A.; Bennett, L.L.J.(1991). Effects of 2-Chloro-9-(2-deoxy-2-fluoro- β -d-arabinofuranosyl) adenine on K562 Cellular Metabolism and the Inhibition of Human Ribonucleotide Reductase and DNA Polymerases by Its 5'-Triphosphate. *Cancer Research*, (51), 2386-2394.
2. Reardon, J. E., & Spector, T. (1991). Acyclovir: Mechanism of Antiviral Action and Potentiation by Ribonucleotide Reductase Inhibitors. *Advances in Pharmacology*, (22) 1–27.
3. Parker, W, B., Secrist, J. A., & Waud, W. R. (2004). Purine nucleoside antimetabolites in development for the treatment of cancer. *Current Opinion in Investigational Drugs*, 5(6), 592-596.
4. Alvarez, L. A. (2008). Nucleic Acids as Therapeutic Agents. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 8(15), 1379-1404.
5. Schalk, J. A., Mooi, F. R., Berbers, G. A., Aerts, L. A., Ovelgönne, H., & Kimman, T. G. (2006). Preclinical and Clinical Safety Studies on DNA Vaccines. *Human Vaccines*, 2(2), 45-53.
6. Macgregor, R. R., Ginsberg, R., Ugen, K. E., Baine, Y., Kang, C. U., Tu, X. M., Higgins, T. , Weiner, D. B., & Boyer, J. D. (2002). T-cell responses induced in normal volunteers immunized with a DNA-based vaccine containing HIV-1 env and rev. *AIDS*, 16(16), 2137-2143.

7. Le, T. P., Coonan, K. M., Hedstrom, R. C., Charoenvit, Y., Sedegah, M., Epstein, J. E., Kumar, S., Wang, R., Doolan, D. L., Maguire, J. D., Parker, S.E., Hobart, P., Norman, J., & Hoffman, S. L. (2000). Safety, tolerability and humoral immune responses after intramuscular administration of a malaria DNA vaccine to healthy adult volunteers. *Vaccine*, 18(18), 1893-1901.

FLUORESCENCIA Y SISTEMAS REPORTEROS DE ENCAPSULACIÓN DE DNA

DAPI

1. Stockert, J. C., & Blazquez-Castro, A. (2017). *Fluorescence Microscopy in Life Sciences*. Bentham Science Publishers
2. Chazotte, B. (2011). Labeling Nuclear DNA Using DAPI. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2011(1).
3. Granzhan, A., Kotera, N., & Teulade-Fichou, M. (2014). Finding needles in a haystack: Recognition of mismatched base pairs in DNA by small molecules. *Chemical Society Reviews*, 43(10), 3630-3665.

TRANSFECCIÓN Y GENES REPORTEROS

Proteínas y genes reporteros

1. Zimmer, M. (2009). GFP: From jellyfish to the Nobel prize and beyond. *Chemical Society Reviews*, 38(10), 2813-2968.
2. Stripecke, R., Villacres, M. D., Skelton, D. C., Satake, N., Halene, S., & Kohn, D. B. (1999). Immune response to green fluorescent protein: Implications for gene therapy. *Gene Therapy*, 6(7), 1305-1312.
3. Cheng, L., Fu, J., Tsukamoto, A., & Hawley, R. G. (1996). Use of green fluorescent protein variants to monitor gene transfer and expression in mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 14(5), 606-609.
4. Levy, J. P., Muldoon, R. R., Zolotukhin, S., & Link, C. J. (1996). Retroviral transfer and expression of a humanized, red-shifted green fluorescent protein gene into human tumor cells. *Nature Biotechnology*, 14(5), 610-614.
5. Uchida, N., Sutton, R. E., Frieria, A. M., He, D., Reitsma, M. J., Chang, W. C., Weissman, I. L. (1998). HIV, but not murine leukemia virus, vectors mediate high efficiency gene transfer into freshly isolated G0/G1 human hematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(20), 11939-11944.

PLÁSMIDOS

1. Cole, L. A. (2016). Evolutionary History of Planet Earth. *Biology of Life*, 37-43.
2. Nierman, W. C., & Feldblyum, T. V. (2001). Genomic Library. In *Encyclopedia of Genetics*.

Obtención

1. Mandel, M., & Higa, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal of Molecular Biology*, 53(1), 159-162.

Aislamiento

1. Birnboim, H. C. (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods in Enzymology*, 100, 243-255.

CARACTERIZACIÓN DE SISTEMAS DE ENCAPSULACIÓN DE DNA Y TRANSFECCIÓN

Microscopía confocal

1. Lohse, B., Bolinger, P.-Y., & Stamou, D. (2008). Encapsulation Efficiency Measured on Single Small Unilamellar Vesicles. *Journal of the American Chemical Society*, 130(44), 14372–14373.

METODOLOGÍA

Transformación de *E. coli*

1. Kondoh, G., Gao, X., Nakano, Y., Koike, H., Yamada, S., Okabe, M., & Takeda, J. (1999). Tissue-inherent fate of GPI revealed by GPI-anchored GFP transgenesis. *FEBS Letters*, 458(3), 299-303.
2. Rhee, J. M., Purity, M. K., Lackan, C. S., Long, J. Z., Kondoh, G., Takeda, J., & Hadjantonakis, A. (2006). In vivo imaging and differential localization of lipid-modified GFP-variant fusions in embryonic stem cells and mice. *Genesis*, 44(4), 202-218.
3. QIAGEN (2005). *Qiagen Plasmid Purification Handbook*. Hilden: QIAGEN GmbH.
4. Caballero González, R., (2013). Nanovectores híbridos para insertar material genético en células humanas (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro.
5. Camacho Banda, G., (2012) Revisión de parámetros y efectos biológicos implicados en la transfección mediada por ondas de choque (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro
6. Were, L. M., Bruce, B. D., Davidson, P. M., & Weiss, J. (2003). Size, Stability, and Entrapment Efficiency of Phospholipid Nanocapsules Containing Polypeptide Antimicrobials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 8073-8079.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Transformación de *E. coli*

1. Campos-Guillén, J., Fernández, F., Pastrana, X., & Loske, A. M. (2012). Relationship Between Plasmid Size and Shock Wave-Mediated Bacterial Transformation. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 38(6), 1078-1084.

2. Sarker, S. R., Ball, A. S., Bhargava, S. K., & Soni, S. K. (2019). Evaluation of plasmid DNA stability against ultrasonic shear stress and its in vitro delivery efficiency using ionic liquid [Bmim][PF6]. *RSC Advances*, 9(50), 29225–29231.
3. Teshima, K., Ohshima, T., Tanaka, S., & Nagai, T. (1995). Biomechanical effects of shock waves on *Escherichia coli* and λ phage DNA. *Shock Waves*, 4(6), 293-297.
4. Doida, Y., Brayman, A. A., & Miller, M. W. (1992). Modest enhancement of ultrasound-induced mutations in V79 cells in vitro. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 18(5), 465-469.

Morfología de liposomas tratados con ondas de choque sin cargo

1. Silva, M. T., Guerra, F. C., & Magalhães, M. M. (1968). The fixative action of uranyl acetate in electron microscopy. *Experientia*, 24(10), 1074-1074.
2. Zhao, F., & Craig, R. (2003). Capturing time-resolved changes in molecular structure by negative staining. *Journal of Structural Biology*, 141(1), 43-52.
3. Milne, J. L., Borgia, M. J., Bartesaghi, A., Tran, E. E., Earl, L. A., Schauder, D. M., . . . Subramaniam, S. (2012). Cryo-electron microscopy - a primer for the non-microscopist. *FEBS Journal*, 280(1), 28-45.
4. Baxa, U. (2017). Imaging of Liposomes by Transmission Electron Microscopy. *Methods in Molecular Biology Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*, 73-88
5. Płaczek, M., & Kosela, M. (2016). Microscopic methods in analysis of submicron phospholipid dispersions. *Acta Pharmaceutica*, 66(1), 1-22. doi:10.1515/acph-2016-0003

Potencial zeta de liposomas con pDNA como cargo

1. Clogston, J.D., Patri, A.K. (2016). Importance of physicochemical characterization prior immunological studies. *Handbook of Immunological properties of engineered nanomaterials. 1: Key Considerations for NANOPARTICLE Characterization Prior to Immunotoxicity Studies*, World Scientific Publishing Ltd, 25-52.
2. Smith, M. C., Crist, R. M., Clogston, J. D., & Mcneil, S. E. (2017). Zeta potential: A case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(24), 5779-5787