



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**CARACTERIZACIÓN DE EFECTOS DE ONDAS DE CHOQUE USANDO
NANOPARTÍCULAS FLUORESCENTES EN EMBRIONES SINCISIALES DE
*DROSOPHILA MELANOGASTER***

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
DANIEL TAPIA MERINO**

**TUTOR PRINCIPAL:
DR. GONZALO MARTÍNEZ DE LA ESCALERA LORENZO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
UNAM CAMPUS JURQUILLA**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DR. JUAN RAFAEL RIESGO ESCOVAR
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
UNAM CAMPUS JURQUILLA**

**DR. ACHIM MAX LOSKE MEHLING
CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA
UNAM CAMPUS JURQUILLA**

JURQUILLA, QUERÉTARO, ENERO 2024



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.

A mis padres

Agradecimientos

Este trabajo ha sido posible en gran medida gracias a todas las personas que me han apoyado a través de mis años como estudiante. Quiero agradecer a mis padres quienes siempre estuvieron para apoyarme en cada una de mis decisiones. A mis compañeros en el Laboratorio de Genética de Transducción de Señales (INB, UNAM), quienes nunca dudaron que lograría mis objetivos.

Agradezco al Dr. Pedro Salas Castillo del Laboratorio de Catálisis (CFATA, UNAM), al igual que al Dr. Gonzalo Ramírez García del Laboratorio Nacional de Caracterización de Materiales (CFATA, UNAM), quienes me ayudaron con la síntesis y la caracterización de la emisión de las nanopartículas fluorescentes utilizadas en este trabajo. También a la Dra. Luz María López Marín del Laboratorio de Nanobióptica (CFATA, UNAM), quien facilitó el espectrofotómetro para obtener las gráficas de UV-Visible de las nanopartículas fluorescentes.

Se agradece ampliamente a la empresa Richard Wolf GmbH (Knittlingen, Baden-Wurtemberg, Alemania), por proporcionar el generador portátil de ondas de choque *Piezoson 100 plus*, el cual se ha acoplado en el sistema de aplicación de ondas de choque utilizado en esta tesis.

A Thom de Hoog, estudiante de doctorado del grupo de Biología Celular en la Universidad de Zúrich, Suiza, por suministrar el plásmido original para las pruebas de expresión de GFP.

Un agradecimiento especial para Paula Bernardino Peláez y el M. en C. Francisco Fernández Escobar, quienes hicieron posible todos los experimentos llevados a cabo en el Laboratorio de Ondas de Choque (CFATA, UNAM). Así mismo, agradezco el apoyo técnico brindado por la Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos y la Ing. Ma. Lourdes Palma Tirado, pertenecientes a la Unidad de Microscopía (INB, UNAM). También quiero mencionar la invaluable asistencia técnica del Dr. Juan Manuel Murillo Maldonado en la parte experimental con moscas, realizada en el Laboratorio de Genética de Transducción de Señales.

Estoy sumamente agradecido con el Dr. Gonzalo Martínez De La Escalera Lorenzo y el Dr. Achim Max Loske Mehling, quienes activamente impulsaron mi desarrollo académico e hicieron todo lo que estuvo a su alcance para que esta tesis sea posible.

Este trabajo se ha desarrollado gracias a la beca nacional CONACYT No. 798017, junto con los apoyos PAPIIT-UNAM IN207719 y UR-307 a J.R.R.E.

No puedo concluir esta sección sin agradecer al Dr. Juan Rafael Riesgo Escovar, quien dirigió esta tesis en el Laboratorio de Genética de Transducción de Señales. Él siempre confió en mí para obtener el grado de Maestro en Ciencias (Neurobiología), pese a que mi tema de investigación abarca áreas del conocimiento un poco distintas a lo acostumbrado en este posgrado.

Índice

Introducción	6
Antecedentes.....	7
Ondas de choque del tipo usado para aplicaciones biomédicas	7
Generador de ondas de choque piezoeléctrico	10
Nanociencia y nanopartículas	11
Embrión temprano de <i>Drosophila melanogaster</i>	12
Primeros tratamientos de embriones con ondas de choque.....	13
Justificación	15
Hipótesis.....	15
Objetivos	15
Estrategia experimental	16
Cría de moscas	16
Síntesis de nanopartículas fluorescentes	17
Caracterización de nanopartículas fluorescentes	17
Microinyección de larvas de mosca.....	18
Inserción de nanopartículas en embriones de mosca usando ondas de choque.....	18
Fijación de tejido de mosca para cortes histológicos.....	20
Digestión de larvas de mosca en KOH.....	20
Preparación de plásmido con GFP.....	21
Resultados.....	22
Espectroscopía UV-Visible	22
Microscopía electrónica de transmisión de nanopartículas de carbono.....	25
Espectroscopía de fluorescencia.....	26
Microinyección de larvas con nanopartículas de carbono	27
Tratamiento con ondas de choque en un medio con nanopartículas de carbono....	28
Digestión de larvas de mosca en KOH.....	29
Observación de larvas en microscopio estereoscópico	30
Observación de cortes histológicos con láser de 405 nm.....	31
Observación de cortes histológicos en microscopía confocal.....	32
Prueba de inserción de DNA.....	32
Tratamiento con ondas de choque en un medio con nanopartículas de oro	33

Micrografías de pruebas con nanopartículas de oro.....	35
Discusión.....	38
Conclusiones.....	41
Bibliografía.....	42

Introducción

Durante un poco más de 100 años la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) se ha empleado para realizar estudios relacionados con genética, desarrollo y varias enfermedades, pues aproximadamente 65% de los genes que causan enfermedades en humanos tienen homólogos en la mosca de la fruta (Ugur *et al.*, 2016). *D. melanogaster* presenta un ciclo de vida desde el embrión hasta adulto de aproximadamente 10 días a una temperatura de 25°C, lo que facilita el estudio de su desarrollo en una o varias generaciones (Schumann & Triphan, 2020).

Ejemplos de la importancia de este modelo se pueden ver en su empleo para estudiar enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer (Chakraborty *et al.*, 2011). Además ha permitido dilucidar el funcionamiento de genes involucrados en vías de señalización en el desarrollo, como la de Notch (Hartenstein & Posakony, 1990), la de Hippo (Gokhale & Pflieger, 2019), o la de señalización de la insulina (Garofalo, 2012).

Durante su ciclo de vida, la mosca de la fruta pasa por las etapas de embrión, larva, pupa y adulto. El embrión tiene una longitud promedio de 0.51 mm (Markow *et al.*, 2009). Las larvas miden aproximadamente 1 mm de longitud en el primer estadio, 2.8 mm en el segundo y 4-5 mm en el tercero (Alpatov, 1929). La longitud de la pupa es de 3 mm en promedio. En los adultos, debido al dimorfismo sexual, una hembra madura mide en promedio 2.62 mm de longitud y un macho maduro 2.51 mm (Caldwell *et al.*, 2005).

Por otra parte, las ondas de choque son una perturbación transitoria en la presión que se propaga en el espacio tridimensional. Esta perturbación causa un rápido aumento de la presión ambiental en el frente de la onda. Las ondas de choque utilizadas para aplicaciones biomédicas suelen generarse en un medio acuoso y se utilizan geles para facilitar su acoplamiento al paciente (Ogden *et al.*, 2001). Además, este tipo de ondas ha sido especialmente eficiente para transformar genéticamente hongos filamentosos, al producir una permeabilización transiente en su membrana (Magaña-Ortíz *et al.*, 2013).

En *D. melanogaster*, debido a que en etapas tempranas de desarrollo el embrión es un sincisio (una célula multinucleada) rodeado por tres capas, la aplicación de ondas de choque podría representar un método sencillo para insertar material exógeno. Tradicionalmente la microinyección es la única técnica fiable que permite insertar, de forma controlada, químicos y material genético en el cuerpo de la mosca (Zabihhesari *et al.*, 2020). Sin embargo, debido a la naturaleza del método y el grado de experiencia que se requiere, al inyectar material genético en el embrión de *Drosophila* se obtiene un porcentaje entre 0.5 y 5% de moscas transformadas (Rubin & Spradling, 1983).

La propuesta de la presente tesis es que la exposición de embriones tempranos de *D. melanogaster* en ondas de choque tendrá como uno de sus efectos la permeabilización temporal de las capas externas de los embriones, permitiendo la entrada de elementos exógenos.

Antecedentes

Ondas de choque del tipo usado para aplicaciones biomédicas

Una onda de choque del tipo usado en aplicaciones biomédicas, consiste en un pulso de presión positiva de hasta 150 MPa, con un tiempo de ascenso de aproximadamente 5 a 500 ns. Posteriormente, la presión disminuye hasta llegar al valor de equilibrio en aproximadamente 2 a 5 μ s. Finalmente le sigue una etapa de rarefacción de algunos microsegundos (figura 1). Este tipo de ondas se han utilizado con fines terapéuticos en casos como tendinitis calcificante del hombro, epicondilitis, fascitis plantar y litiasis renal renales (Thiel, 2001).

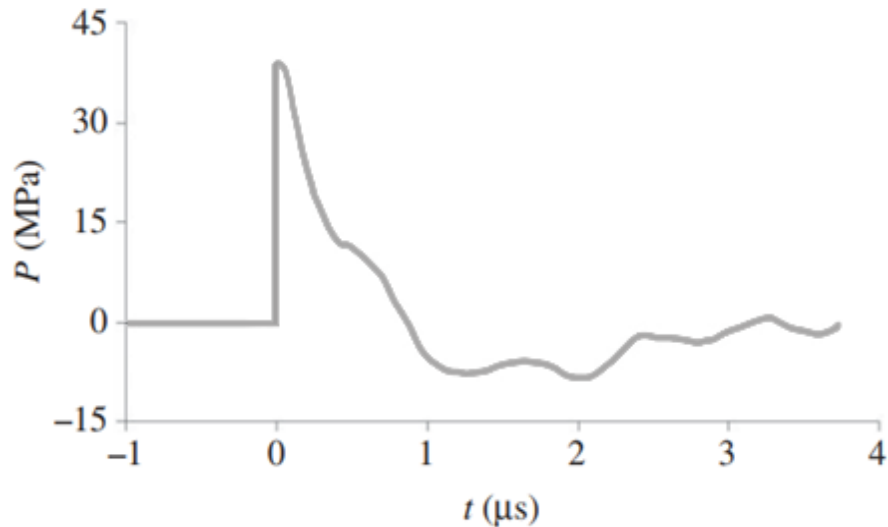


Figura 1. Gráfica de presión (P) vs. tiempo (t) de un perfil típico de onda de choque utilizada en aplicaciones biológicas (imagen modificada de Ohl *et al.*, 2015).

Otro tipo de ondas mecánicas que se utiliza en aplicaciones biomédicas, como la regeneración de algunos tejidos, es el ultrasonido (de Lucas *et al.*, 2020). Sin embargo, mientras que en el ultrasonido las ondas tienen una frecuencia fija, la frecuencia de una onda de choque varía en un rango de 15 kHz a 100 MHz (Loske, 2017). La presión de las ondas de ultrasonido generalmente es mucho más baja en comparación con la de las ondas de choque. Además, en el ultrasonido la forma de la onda es típicamente sinusoidal, lo que contrasta con el perfil de una onda de choque (figura 1).

La cavitación es la expansión repentina de una burbuja dentro de un líquido o sólido sujeto a una tensión negativa, sin que se requiera un cambio en la temperatura del medio (Barney *et al.*, 2020). En aplicaciones biotecnológicas, la cavitación acústica ocurre porque en un medio líquido hay núcleos de cavitación, que son puntos en los que se propicia el crecimiento de burbujas. Cuando el pulso de presión positiva de una onda de choque incide en una burbuja inmersa en el medio, ocurre un colapso forzado. La burbuja se comprime rápidamente y la presión en su interior aumenta. La diferencia de presiones y la rarefacción generada por el pulso negativo de la onda, la hacen crecer rápidamente. Finalmente, la presión en su interior disminuye, provocando un colapso inercial muy violento (Loske, 2007). La respuesta de las burbujas al paso de la onda de choque depende de

características del medio como la viscosidad, la temperatura y la presencia de gases disueltos. Al modificar estos parámetros, se pueden controlar los efectos de la cavitación acústica (Rooze *et al.*, 2013).

Generalmente, las burbujas colapsan de manera asimétrica, ya que la presión alrededor de ellas no es homogénea. Esto es más evidente cuando hay alguna interfase cercana, sobre todo, si el cambio en impedancia acústica es grande. En esos casos la presión en el espacio entre la burbuja que colapsa y la interfase (superficie) es baja, ya que el fluido entra a dicho espacio con una velocidad menor. Debido a ello, la burbuja colapsa asimétricamente y se dirige hacia la superficie, produciendo un microchorro de fluido de alta velocidad, conocido como microjet, el cual sale del interior de la burbuja y golpea la superficie mencionada (Loske, 2007). Cuando esta superficie es una membrana biológica el impacto de los microjets puede causar una permeabilización transitoria de la membrana, permitiendo la entrada del líquido de los alrededores (Li *et al.*, 2017). Se ha reportado que el diámetro del microjet es de aproximadamente una décima parte del diámetro de la burbuja que lo formó (Zhang *et al.*, 2022).

Cuando la pared de la burbuja que está colapsando y el microjet colisionan, se forman ondas de choque secundarias, que pueden impactar la superficie u otras burbujas en los alrededores, acelerando su colapso (Loske, 2007). De este modo los microjets pueden causar daño adicional. Además, la cavitación acústica puede producir sonoluminiscencia, efectos sono-químicos y acción erosiva que causa desgaste al material en la zona de incidencia (Neppiras, 1980).

Debido al fenómeno de cavitación acústica descrito, se ha logrado la transformación bacteriana con plásmidos usando ondas de choque (Jagadeesh, 2004). También se ha reportado que es posible transformar hongos filamentosos con una excelente eficiencia, medida en número de transformantes por célula (Magaña-Ortiz *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2017). Otro aspecto analizado es la permeabilidad que producen en líneas celulares humanas, abriendo la posibilidad de transformarlas genéticamente o usarlas para administración dirigida de fármacos (López-Marín *et al.*, 2017). Cuando se desea insertar DNA en algún organismo como un hongo filamentosos, el DNA se encuentra en la solución utilizada para el

experimento, por lo que queda expuesto al frente de ondas de choque, de manera que se requiere de una gran cantidad inicial de DNA, considerando que parte del material genético se va a degradar, sin embargo, ajustando los parámetros adecuados es posible lograr una alta eficiencia de transformación (Magaña-Ortíz *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2017).

Generador de ondas de choque piezoeléctrico

La mayoría de los generadores de ondas de choque para aplicaciones biomédicas son piezoeléctricos, electrohidráulicos o electromagnéticos (Schneider *et al.*, 1991). En este trabajo se usó un generador piezoeléctrico. Los sistemas piezoeléctricos utilizan un pulso de alto voltaje a través de una serie de elementos piezoeléctricos montados sobre un cascarón esférico de aluminio, causando su rápida expansión y contracción, lo que da como resultado un pulso de presión, que degenera en una onda de choque en la vecindad del punto focal. Los voltajes usualmente utilizados van de 5 a 10 kV (Rivera *et al.*, 2012).

En los experimentos de la presente investigación, la fuente para generar las ondas de choque consta de dos capas, cada una compuesta por cientos de elementos cerámicos piezoeléctricos (figura 2). Cuando se les aplica un alto voltaje, cada componente piezoeléctrico experimenta una expansión súbita de unas pocas micras, lo que da lugar a un diminuto pulso de presión. Una de estas capas de elementos piezoeléctricos se encuentra en el lado cóncavo, mientras que el otro está en el lado convexo de una superficie de soporte que tiene forma de cascarón esférico (semiesfera). La capa posterior de elementos piezoeléctricos recibe la excitación en primera instancia, seguida después de un breve lapso por la capa frontal, la cual es más cercana al punto focal. Esto resulta en que los pulsos de presión generados por ambas capas se superpongan. Gracias a esta superposición y a efectos no lineales, la amplitud de la onda de presión se incrementa a medida que se desplaza hacia el centro del arreglo, dando lugar a la formación de una onda de choque (Loske, 2017). Esta onda de choque se origina cerca del punto

geométrico central, el cual se conoce como el foco del generador de ondas de choque.

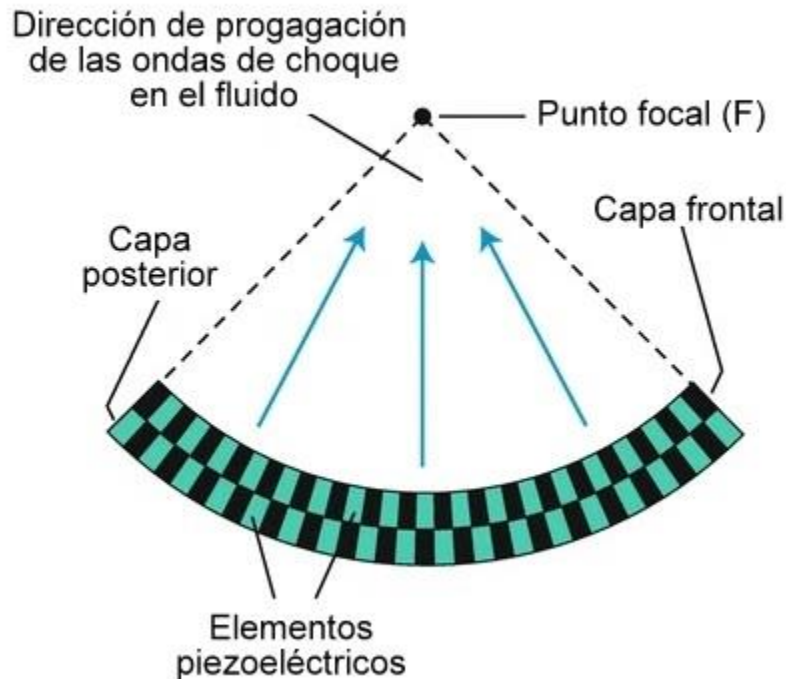


Figura 2. Esquema básico de un generador de ondas de choque piezoeléctrico de doble capa (imagen modificada de Loske, 2017).

Para colocar la muestra se hicieron bolsitas de polietileno selladas con calor para cada muestra sometida a ondas de choque, esto con el fin de contener los embriones de mosca y las soluciones empleadas (nanopartículas o DNA). En experimentos de transfección en hongos (Magaña-Ortíz *et al.*, 2013), este tipo de bolsitas permitió la adecuada transmisión de las ondas de choque.

Nanociencia y nanopartículas

La nanociencia es el estudio de objetos de dimensiones que van desde unos nanómetros hasta aproximadamente 100 nm (Whitesides, 2005). Consiste en la aplicación de los conocimientos de la nanociencia en áreas como química, física, ingeniería, electrónica y medicina (Bayda *et al.*, 2020). Por definición, un nanomaterial tiene alguna de sus dimensiones en el rango de 1 a 100 nm. Una

nanopartícula tiene todas sus dimensiones dentro de dicho rango (Boverhof *et al.*, 2015).

Uno de los métodos más sencillos empleados en la síntesis de nanomateriales es la vía solvotermal, en la que se calienta un solvente y un soluto en un medio cerrado a una temperatura fija, permitiendo controlar el tamaño del nanomaterial y producirlo en mayor cantidad en comparación con otros métodos (Yáñez-Vilar *et al.*, 2009). La síntesis hidrotérmica, un método solvotermal donde el soluto es agua, ha probado ser efectiva para la síntesis de nanopartículas de carbono a partir de carbohidratos. Estas nanopartículas tienen propiedades fotoluminiscentes y una estabilidad mayor a 1 año, y prometen tener aplicaciones como marcadores fluorescentes, bio-sensores, o como parte de un sistema de entrega de fármacos (He *et al.*, 2011). La fluorescencia se puede originar, ya sea por transiciones electrónicas de dominios π conjugados, o por defectos que modifican la energía en su superficie (Molaei, 2019).

Embrión temprano de *Drosophila melanogaster*

El embrión en su fase temprana es un sincisio; es decir, una célula multinucleada. Una vez fertilizado, el cigoto presentará 13 ciclos de divisiones nucleares antes de celularizarse. Sólo las primeras 7 divisiones nucleares son sincrónicas, después algunos núcleos migrarán a la periferia y otros permanecen en el centro para ser vitelofagos, y otro grupo de núcleos migra a la parte posterior para formar las células polares (la línea germinal). Todo esto dentro de las dos primeras horas de desarrollo embrionario (Campos-Ortega & Hartenstein, 1997). El sincisio es un buen candidato para la inserción de material exógeno; no obstante, debe considerarse que se encuentra rodeado por el corion, además de las membranas plasmática y vitelina (Margaritis *et al.*, 1980). La membrana vitelina es una estructura lo suficientemente rígida para mantener la forma del embrión, incluso si se remueve el corion, el cual es la capa más exterior (Bate & Arias, 1993). La longitud promedio que alcanza el embrión es de 0.51 mm (Markow *et al.*, 2009).

Primeros tratamientos de embriones con ondas de choque

En experimentos anteriores en los que se expusieron embriones de moscas de la fruta a ondas de choque (frecuencia 1 Hz, presión del pulso positivo 18 MPa), se encontró que, con la energía usada, no hay una diferencia significativa en la supervivencia, al aplicar 50, 100 o 200 ondas de choque (figura 3). La mayor supervivencia se obtuvo al aplicar 50 ondas de choque (Velázquez *et al.*, 2018). La mortalidad de los embriones se debe tanto al efecto de las ondas de choque como a la manipulación al colocar, transportar y recuperar los embriones de una bolsa de polietileno. Estos experimentos se realizaron en un *Piezoson 100 plus* (Richard Wolf GmbH, Knittlingen, Baden-Wurtemberg, Alemania).

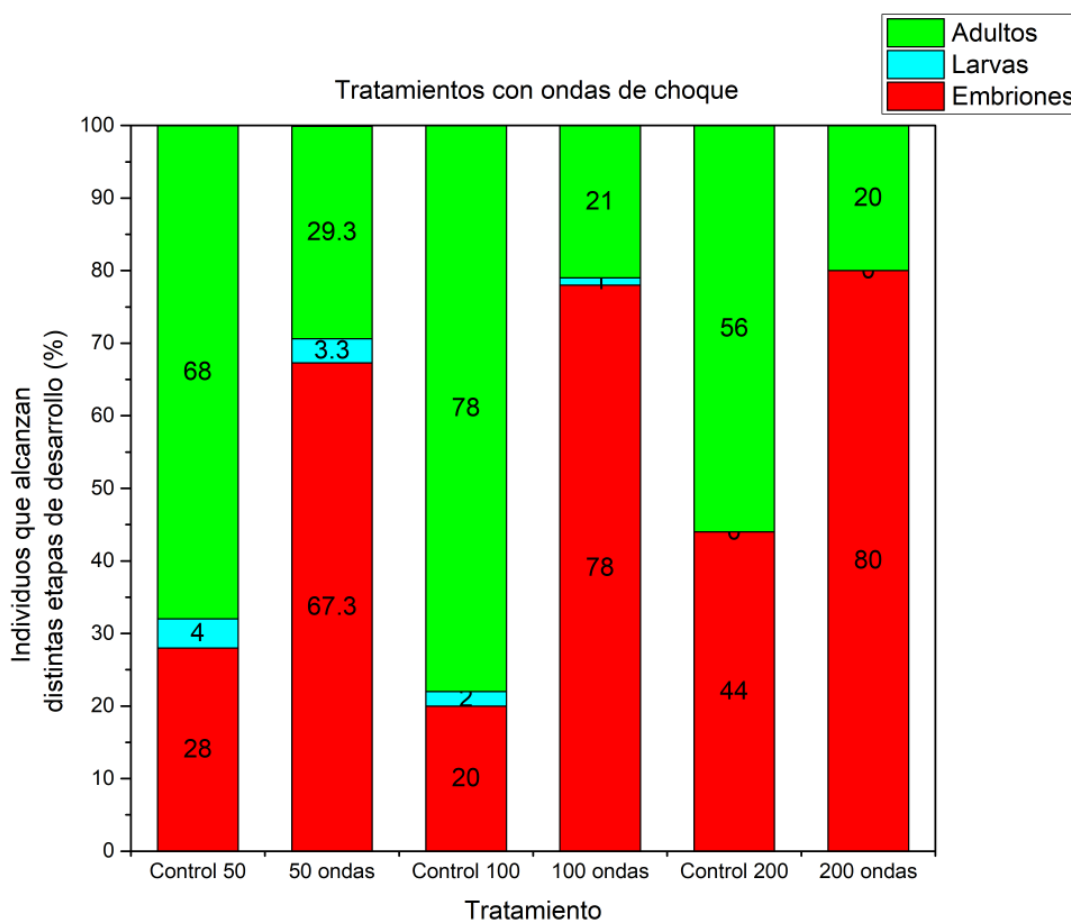


Figura 3. Registro de supervivencia de moscas de la fruta tratadas con 50, 100 y 200 ondas de choque. En cada experimento las ondas de choque ($p^+ = 18$ MPa) se aplicaron con una frecuencia de 1 Hz a bolsas con 50 embriones. Se muestra el porcentaje de moscas que viven hasta cada etapa de desarrollo: embrión (rojo), larva (azul) o adulto (verde). Se presentan los controles y el promedio de 3 repeticiones por cada condición (modificado de Velázquez *et al.*, 2018).

Aplicando el tratamiento con 50 ondas de choque con soluciones de nanopartículas fluorescentes, la mayor supervivencia de adultos se encontró con nanopartículas de 4 nm de diámetro (figura 4). En cortes histológicos realizados a estas moscas se encontraron cúmulos fluorescentes que sugieren la inserción de nanopartículas. La población de moscas adultas que fueron tratadas como embriones resultó ser fértil. En las etapas larvarias se observó necrosis en algunos tejidos, pero en los adultos no se observaron fenotipos anormales (Tapia, 2019).

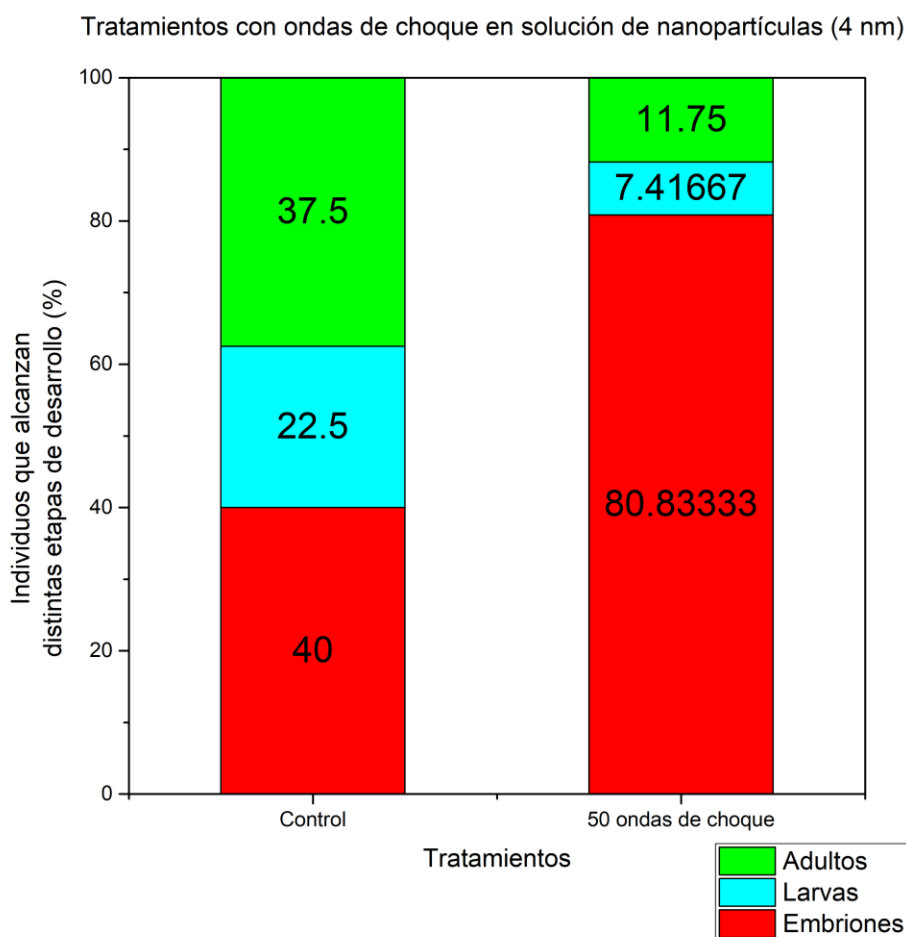


Figura 4. Gráficas del registro de vida de moscas en solución con nanopartículas (4 nm) fluorescentes, expuestas a 50 ondas de choque ($p^+ = 18$ MPa, $f = 1$ Hz) con el equipo Piezoson 100 plus. Se muestra el porcentaje de moscas que viven hasta cada etapa de desarrollo: embrión (rojo), larva (azul) o adulto (verde). Se presentan datos del control y el promedio de 3 repeticiones del tratamiento con ondas de choque.

Justificación

Drosophila melanogaster es un modelo ampliamente utilizado en estudios de genética, desarrollo y enfermedades. Debido a que en etapas tempranas de desarrollo el embrión es un sincisio, la aplicación de ondas de choque puede facilitar la inserción de material exógeno, creando una nueva opción para investigaciones biológicas, por lo que es importante comprobar la inserción de material usando nanopartículas.

Hipótesis

La aplicación de ondas de choque produce efectos en el embrión temprano de *Drosophila melanogaster*, como la permeabilización de sus capas exteriores, permitiendo la entrada de nanopartículas.

Objetivos

Objetivo general: Estudiar los efectos producidos en embriones de mosca de la fruta al someterse a ondas de choque en un medio con nanopartículas, para evaluar el posible empleo de una nueva técnica de inserción de material exógeno.

Objetivos específicos:

- Sintetizar nanopartículas fluorescentes para pruebas de inserción ajustando parámetros de concentración y tiempo de calentamiento.
- Realizar espectros de absorción UV-Visible de las muestras de nanopartículas sintetizadas.
- Obtener espectros de emisión de las nanopartículas seleccionadas a distintas fuentes de excitación.
- Realizar microscopía electrónica de transmisión en la muestra con mayor emisión en el espectro visible.

- Microinyectar larvas con el equipo *Nanoliter 2000* para conocer si la fluorescencia de las nanopartículas es observable dentro del cuerpo de las larvas con microscopía óptica.
- Llevar a cabo pruebas con embriones sometidos a ondas de choque en solución de las nanopartículas seleccionadas.
- Registrar supervivencia de las moscas en distintos estadios al tratamiento con ondas de choque.
- Hacer cortes histológicos de larvas de mosca tratadas para buscar nanopartículas insertadas en el cuerpo de las larvas.
- Digerir con KOH larvas tratadas con ondas de choque y centrifugar para buscar evidencia de la presencia de nanopartículas.
- Observar cortes histológicos con láser de 405 nm.
- Observar los cortes histológicos en microscopía confocal con láser de 405 nm.
- Realizar observaciones de moscas sometidas a ondas de choque en medio acuoso con un plásmido que expresa GFP.
- Registrar supervivencia de las moscas al tratamiento con ondas de choque en un medio con nanopartículas de oro.
- Explorar inserción de nanopartículas de oro en moscas mediante microscopía electrónica de transmisión.

Estrategia experimental

Cría de moscas

Las moscas se mantuvieron en un bioterio a 25°C; para su cultivo y desarrollo se colocaron en tubos con alimento. Para recolectar embriones, las moscas fueron puestas en vasos taponados con una caja Petri en donde las hembras ovipositaron los huevos. La caja tiene un medio base de agarosa. Para realizar las pruebas con ondas de choque, los embriones se transfirieron a una bolsa 2 horas después de que hayan sido puestos por las moscas, en donde cada embrión pasa por las

últimas divisiones nucleares en su etapa como sincisio. Todas las moscas utilizadas son de tipo silvestre.

Se realizó un registro de supervivencia de las moscas por estadio previo a las pruebas de inserción de nanopartículas, para documentar, de existir, una posible toxicidad de las partículas.

Síntesis de nanopartículas fluorescentes

Se colocó la cantidad especificada (0.5-3 g) de sacarosa de grado reactivo por muestra en 15 ml de agua destilada, y se disolvió en su totalidad. Después el líquido se vertió en una autoclave y se dejó entre 190 y 210°C en un horno por el tiempo seleccionado (1-3 h). La muestra se recolectó para su posterior caracterización por espectroscopía UV-Visible y microscopía electrónica de transmisión. Las muestras de nanopartículas obtenidas se denominan puntos cuánticos de carbono (CQD por sus siglas en inglés).

Caracterización de nanopartículas fluorescentes

La absorbancia en espectroscopía UV-Visible se midió colocando 2 ml de solución en celdas de cuarzo, en un espectrofotómetro *GENESYS 10S* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Cada solución se midió en el rango de 200 a 600 nm.

La microscopía electrónica de transmisión se realizó agregando una gota de una disolución 1:10 de la muestra en una gradilla con membrana, la cual fue colocada en un microscopio electrónico *JEM-1010* (JEOL, Akishima, Tokio, Japón), en el cual se aplicó una tensión de 80 kV. El tamaño de las nanopartículas en las micrografías se midió empleando el *software ImageJ*.

La espectroscopía de emisión de fluorescencia se realizó colocando 2 ml en una celda de cuarzo y se incidió un led de diferente longitud de onda (365 nm, 390 nm y 370 nm). El detector de un espectrofluorímetro portátil UV-VIS-NIR (StellarNet, Tampa, Florida, Estados Unidos) registra la intensidad de las longitudes de onda emitidas y crea la gráfica correspondiente en un computador.

Como control respecto a la permanencia de la fluorescencia, se sometió la solución con nanopartículas fluorescentes al tratamiento con ondas de choque, donde se comprobó que su propiedad de fluorescencia resiste el tratamiento y es viable utilizarlas en todos los experimentos de este trabajo.

Microinyección de larvas de mosca

Una solución con nanopartículas se microinyectó directamente en las larvas, durante su tercer estadio, con un equipo *Nanoliter 2000* (World Precision Instruments, Sarasota, Florida, Estados Unidos), ajustando el volumen de inyección en 69.9 nl, lo que corresponde a su máxima capacidad. Previamente se prepararon capilares estirados. Uno de los extremos del capilar se estiró con un *puller pul-100* (World Precision Instruments, Sarasota, Florida, Estados Unidos), para formar una punta que sirvió para penetrar el cuerpo de la larva. Estos capilares se llenaron con la solución de nanopartículas, de carbono u oro. Las larvas se recolectaron en una placa. En el caso de las nanopartículas de carbono, las larvas se observaron con un equipo de iluminación de fluorescencia (Nightsea, Lexington, Kentucky, Estados Unidos) acoplado a un microscopio estereoscópico *SMZ-2T* (Nikon, Kōnan, Tokio, Japon).

Inserción de nanopartículas en embriones de mosca usando ondas de choque

Para producir las ondas de choque se utilizó un generador piezoeléctrico modelo *Piezoson 100 plus*, montado en el fondo de una tina de acrílico transparente (278 mm x 278 mm x 235 mm). El agua se mantuvo a 23°C. Cada muestra se sujetó horizontalmente dentro de la tina con un posicionador xyz y se centró en el punto focal del generador de ondas de choque (figura 5). La muestra consistió en una bolsa de polietileno de 15 mm x 25 mm, con 90 μ l de *buffer* TE y 10 μ l de una solución de nanopartículas (o de DNA con GFP), donde se incluyeron 50 embriones. Cada prueba se realizó con 50 ondas de choque a una frecuencia de 1 Hz, con 3 repeticiones y un control. La amplitud máxima del pulso de presión positivo (p^+) de

las ondas de choque fue de aproximadamente 18 MPa. Esta presión se obtuvo al ajustar el nivel de intensidad del equipo a su máximo valor. Para las primeras observaciones de inserción de nanopartículas se utilizó un equipo de iluminación de fluorescencia marca *Nightsea* en un estereomicroscopio *SMZ-2T*.

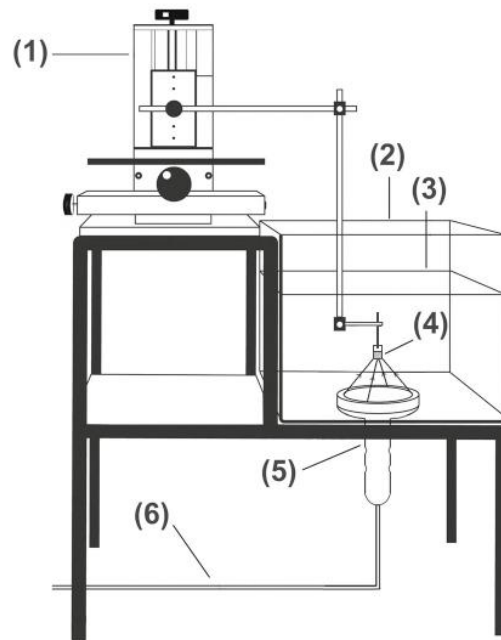


Figura 5. Esquema simplificado del generador de ondas de choque *Piezason 100 plus*. Los elementos básicos son (1) posicionador, (2) tina, (3) nivel de agua, (4) muestra (bolsa), (5) fuente de ondas de choque, (6) conexión a la unidad de control (imagen modificada de Lukes et al., 2016).

Al realizar todos los ensayos, en el *Piezason 100 plus* se acopló un generador piezoeléctrico de doble capa *FB10G4* (Richard Wolf GmbH, Knittlingen, Baden-Wurtemberg, Alemania). La información proporcionada por el fabricante se enlista a continuación (Loske, 2017; Ginter & Krauss, 2007).

- Ángulo de apertura: 94 grados.
- Rango de presión: 11 – 126 MPa.
- Flujo de densidad de energía del pulso positivo (EFD⁺ por sus siglas en inglés): 0.03 – 1.05 mJ/mm².
- Energía 5 MPa (total): 1 – 48 mJ.

Fijación de tejido de mosca para cortes histológicos

Una vez obtenidas las moscas sobrevivientes al tratamiento con ondas de choque, se fijaron por 30 minutos en hielo en una solución previamente preparada con 125 μl de tetróxido de osmio (OsO_4) al 2%, 10 μl de glutaraldehído al 50%, 62.5 μl de *buffer* de cacodilato y 52.5 μl de H_2O . A continuación se colocaron en OsO_4 al 2% en hielo por 2 horas, se deshidrataron en soluciones graduales de acetona (30%, 50%, 70%, 90%, 96%, 100%) y se dejaron por una noche en una solución de Spurr/acetona 1:1. Después se cambiaron a Spurr por al menos cuatro horas a temperatura ambiente, y luego se colocaron individualmente en moldes con Spurr. Para solidificarse, se dejaron en estos moldes con Spurr 100% dentro de un horno a 70°C por 3 días. Los cortes semifinos se realizaron en un microtomo *RM2265* (Leica, Wetzlar, Hesse, Alemania), cada uno con un grosor de 1 μm , utilizando una navaja de vidrio. Posteriormente se colocaron en un porta objetos y se fijaron a 60°C en una parrilla durante pocos minutos. Finalmente, los cortes se observaron en el sistema de superresolución del equipo *Elyra PS.1* (Zeiss, Oberkochen, Baden-Württemberg, Alemania) y en un microscopio confocal *LSM 880* (Zeiss, Oberkochen, Baden-Württemberg, Alemania). Para microscopía electrónica de transmisión, se realizaron cortes ultrafinos (alrededor de 90 nm de grosor) con el mismo procedimiento para cortes semifinos, pero empleando un ultramicrotomo *RMC MTx* (Boeckeler Instruments, Tucson, Arizona, Estados Unidos). Una vez que se obtuvieron los cortes, se recolectaron en una rejilla de cobre previo a su observación en el microscopio electrónico de transmisión *JEM-1010*. Se omitió el paso de contrastar los cortes, buscando evitar cualquier señal que interfiriera con nanopartículas de oro en la muestra, en caso de haberlas.

Digestión de larvas de mosca en KOH

Se prepararon 25 ml de una solución de KOH al 10%. Como control, se probaron las nanopartículas fluorescentes de carbono (CQD 4) solas. Se sometieron las nanopartículas solas al tratamiento, para ver si resistían al mismo. Para esto se

agregaron en un tubo de microcentrífuga 500 μ l de KOH al 10% y 200 μ l de solución de nanopartículas. El tubo se calentó por 10 minutos a 100°C en baño María. Posteriormente se centrifugó a 14 000 rpm por 15 minutos. Al final se identificó si hay fluorescencia incidiendo una lámpara UV.

Para digerir las larvas tratadas con ondas de choque en dilución de nanopartículas, se recolectaron como embriones en una placa con alimento después del tratamiento con ondas de choque. Una vez que se desarrollaron hasta larvas, se llevaron a un recipiente con H₂O destilada para lavarlas, después se seccionaron por la mitad, separando la parte anterior y posterior, con ayuda de una navaja sobre un portaobjetos, y con las pinzas las secciones se depositaron en un tubo de microcentrífuga con 500 μ l de KOH 10%. El tubo se sometió a 100°C en baño María por 10 minutos. Se realizaron 2 centrifugaciones en una centrífuga 5415C (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), primero a 2000 rpm por 2 minutos, para dejar en el fondo los restos gruesos de los tejidos de larva, y se recuperó el sobrenadante en un nuevo tubo, el cual es centrifugado a 14 000 rpm por 15 minutos. Al final se probó si había fluorescencia al incidir una lámpara UV en el botón obtenido.

Preparación de plásmido con GFP

En las pruebas de inserción de DNA, se utilizó un plásmido que contiene un gen de GFP con un promotor de ubicuitina, para la expresión de GFP y un terminador de tubulina (figura 6). Con el fin de obtener una cantidad de plásmido suficiente para pruebas con ondas de choque, primero se transformaron células bacterianas competentes con el plásmido, después se hicieron crecer las células en medio LB. Partiendo de un volumen de 250 ml de medio con células se utilizó un kit de maxiprep (Qiagen, Venlo, Limburgo, Países Bajos) para purificar y concentrar el DNA. Con esto se obtuvieron 100 μ l de DNA con una concentración de 151.4 μ g/ml y un coeficiente de calidad A60/A80 de 1.89, de acuerdo con un espectrofotómetro *NanoDrop Lite Plus* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos).



Figura 6. Conformación básica del gen para probar inserción de DNA en ondas de choque.

Resultados

Espectroscopía UV-Visible

Las distintas síntesis de nanopartículas se analizaron en espectroscopía UV-Visible (figura 7), nombradas de acuerdo con la tabla 1. La mayoría muestra dos bandas de absorbancia en el espectro ultravioleta. Después de la síntesis, algunas muestras se veían muy concentradas o con poca emisión en el visible. Tomando esto en cuenta se seleccionó la muestra CQD 4 para seguir con las pruebas en moscas. Esta muestra no se encontró saturada y emitió la mayor fluorescencia observable al excitarse con una lámpara de luz ultravioleta. Se exploró si un cambio en el pH al añadir ácido cítrico tenía un efecto positivo en la fluorescencia, pero la fluorescencia de estas muestras no fue sobresaliente bajo luz ultravioleta. Sin embargo, al utilizar glucosa en lugar de sacarosa (CQD 16) sí hubo una fluorescencia notable, pero no mejor que la muestra CQD 4.

Espectroscopía UV-Visible de muestras CQD

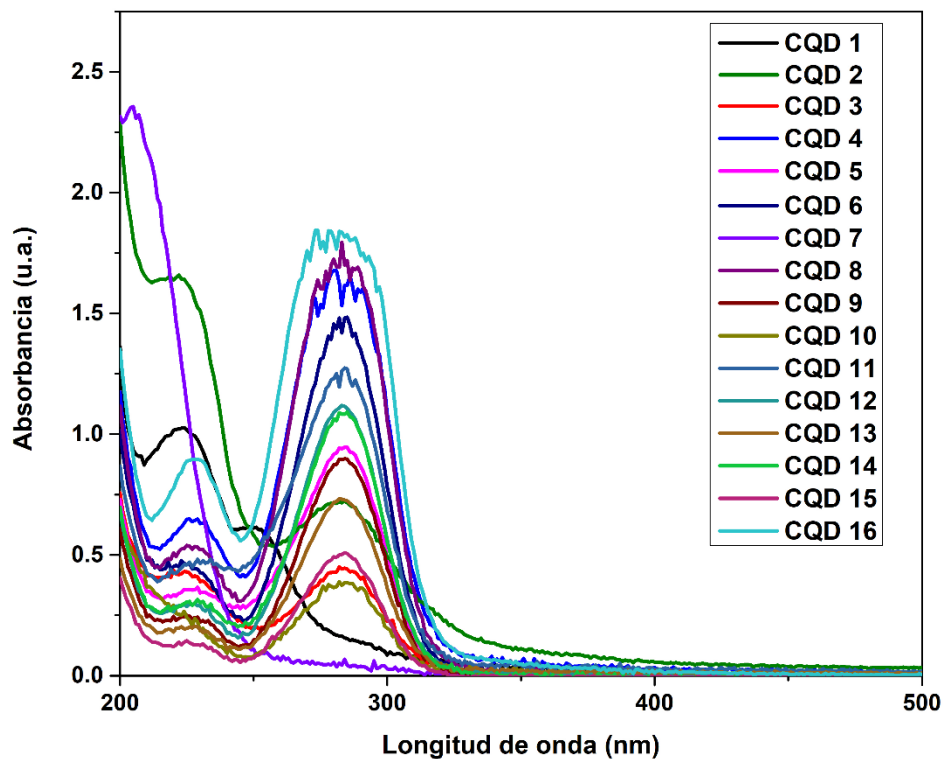


Figura 7. Espectroscopía UV-Visible realizada a las distintas síntesis de puntos cuánticos de carbono (CQD por sus siglas en inglés). La mayoría presenta dos bandas de absorción en el espectro ultravioleta.

Muestras de puntos cuánticos de carbono (CQD)				
Número CQD	Sacarosa (g)	Ácido cítrico (g)	Temperatura (°C)	Tiempo (h)
1	0.5	0	190	1
2	0.5	0	180	1.5
3	0.5	0	190	1.5
4	0.5	0	200	1.5
5	0.5	0	210	1.5
6	0.25	0.25	200	1.5
7	0	0.5	200	1.5
8	0.375	0.125	200	1.5
9	0.45	0.05	200	1.5
10	0.05	0.45	200	1.5
11	2	0	200	2
12	1	0	200	2
13	0.5	0	200	2
14	0.5	0	190	2
15	0.5	0	190	3
16	0.5 (glucosa en lugar de sacarosa)	0	200	1.5

Tabla 1. Condiciones de síntesis para las distintas muestras de puntos cuánticos de carbono (CQD). En todas las muestras se utilizó un volumen de 15 ml de H₂O.

El espectro de UV-Visible de la muestra CQD 4 (0.5 g de sacarosa, 1.5 h a 200°C) presenta dos bandas de absorción (figura 8), la menor en 228 nm y la mayor en 282 nm. Ambas bandas corresponden a transiciones electrónicas ya reportadas en nanopartículas fluorescentes de carbono (Pan *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2009).

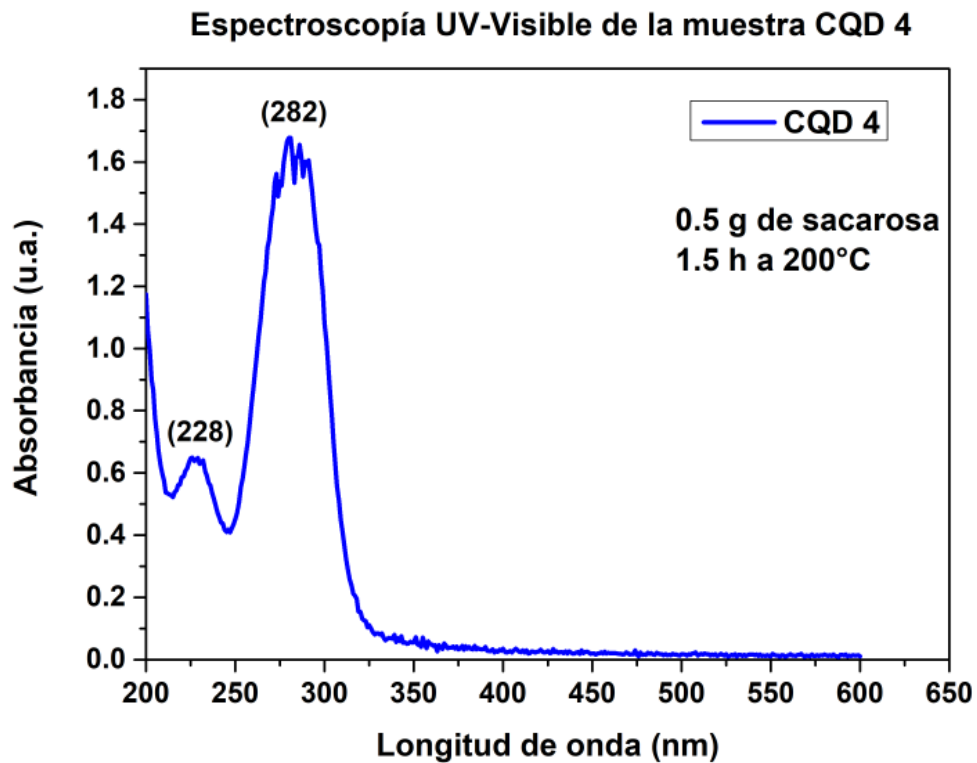


Figura 8. Espectroscopía UV-Visible realizada a la muestra sintetizada CQD 4. Presenta dos bandas de absorción ubicadas en 228 y 282 nm.

Microscopía electrónica de transmisión de nanopartículas de carbono

La muestra CQD 4 fue visualizada con microscopía electrónica de transmisión (figura 9). Se observaron regiones con nanopartículas de carbono de un promedio de 2.06 nm de diámetro, en un rango de 0.75 a 3.58 nm, con una desviación estándar de 0.652 nm.

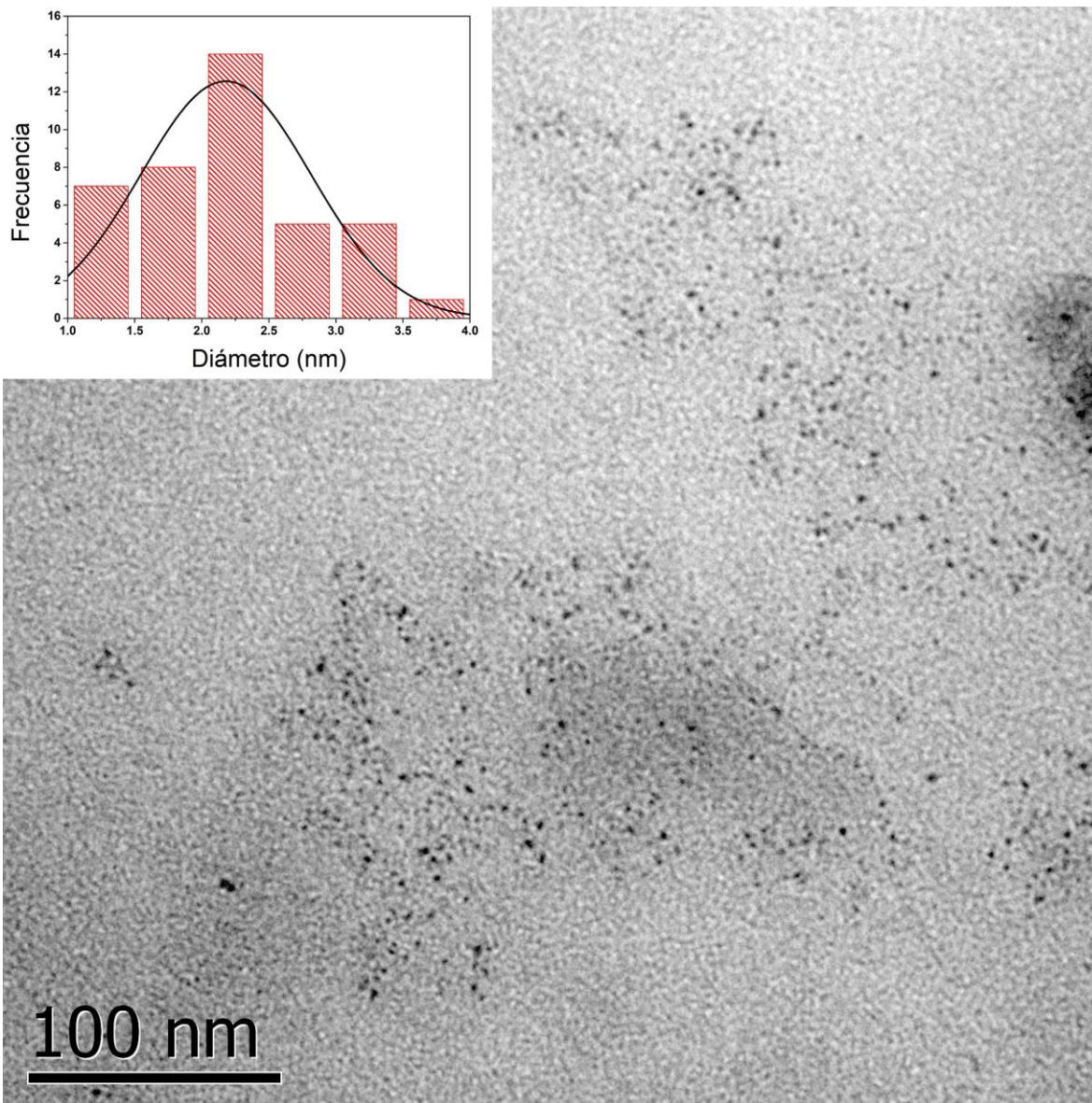


Figura 9. Región de la muestra CQD 4, observada en un microscopio electrónico de transmisión marca JEOL, modelo JEM-1010. El tamaño de las nanopartículas es de 2.06 nm y se encuentran segregadas. En la esquina superior izquierda se muestra la distribución de tamaño de las nanopartículas presentes en esta zona.

Espectroscopía de fluorescencia

La emisión de la muestra CQD 4 fue medida al incidir leds de distinta longitud de onda (295 nm, 345 nm, 365 nm, 390 nm, 470 nm y 502 nm). Los mejores espectros de emisión se obtuvieron con los leds de 345 nm, 365 nm y 390 nm, que tienen picos de emisión en 500 nm, 502 nm y 510 nm, respectivamente. Al incidir el led de

470 nm, las nanopartículas muestran una banda de emisión en 545 nm, pero es mucho menor que la emisión de la misma fuente. No se registró emisión al excitar con leds de 295 nm y 502 nm (figura 10).

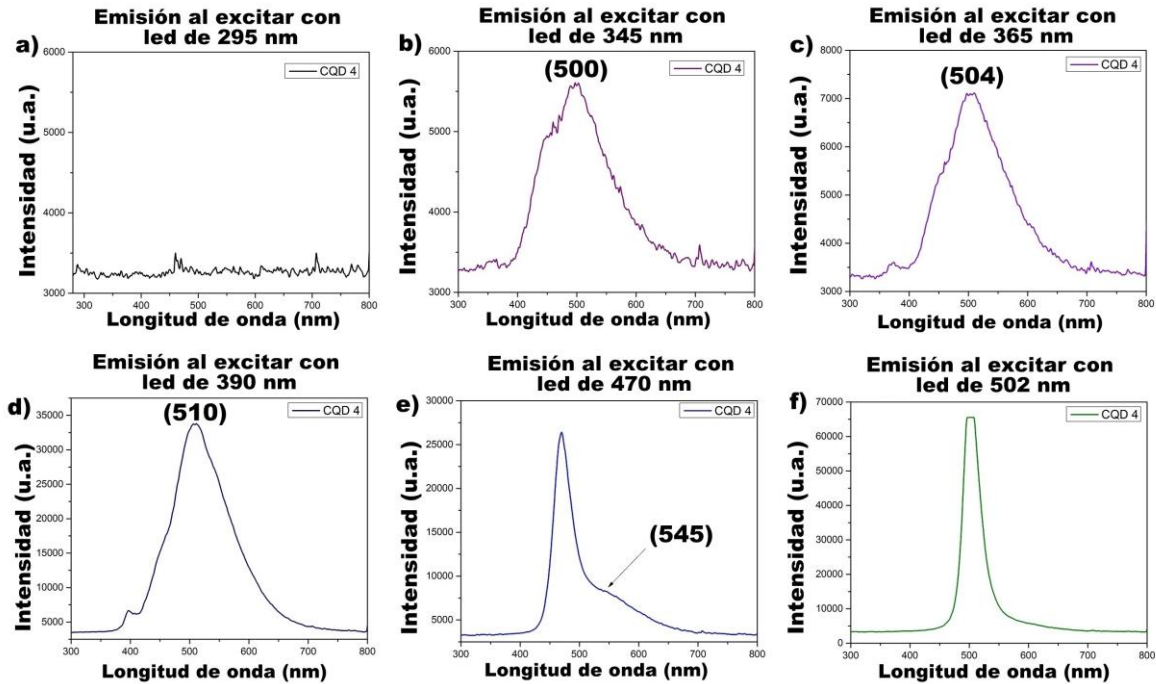


Figura 10. Espectros de emisión de la muestra CQD 4 obtenidos al incidir leds de a) 295 nm, b) 345 nm, c) 365 nm, d) 390 nm, e) 470 nm y f) 502 nm. Los leds de 345 nm, 365 nm y 390 nm tienen picos de emisión en 500 nm, 504 nm y 510 nm, respectivamente. Con los leds de 295 nm y 502 nm no se observa emisión proveniente de las nanopartículas.

Microinyección de larvas con nanopartículas de carbono

Después de ser microinyectadas con la solución de nanopartículas de carbono (CQD 4), las larvas fueron observadas en fluorescencia, con un kit de iluminación *Nightsea*, acoplado a un microscopio estereoscópico *SMZ-2T*. Se encontraron cúmulos fluorescentes de nanopartículas en zonas que no corresponden a la fluorescencia endógena (figura 11).



Figura 11. Larva microinyectada con nanopartículas de carbono (CQD 4), utilizando el equipo Nanoliter 2000. Se señala con un círculo un cúmulo fluorescente debido a la inyección de nanopartículas.

Tratamiento con ondas de choque en un medio con nanopartículas de carbono

Aplicando 50 ondas de choque a 1 Hz a embriones de mosca de la fruta en una solución de nanopartículas de carbono (CQD 4), se encontró una disminución en la supervivencia de los adultos respecto al control (figura 12). No obstante, los adultos supervivientes no mostraron defectos fenotípicos y pudieron dejar descendencia. Las larvas tratadas presentaron zonas de necrosis en ciertos tejidos, principalmente a lo largo del intestino, pero en el microscopio estereoscópico no se observó diferencia significativa entre la fluorescencia de las larvas tratadas y el control. Es importante considerar que la mortalidad de los embriones se debe tanto al efecto de las ondas de choque como a la manipulación al colocar, transportar y recuperar los embriones de la bolsa de polietileno.

Tratamientos con ondas de choque en solución de nanopartículas de carbono

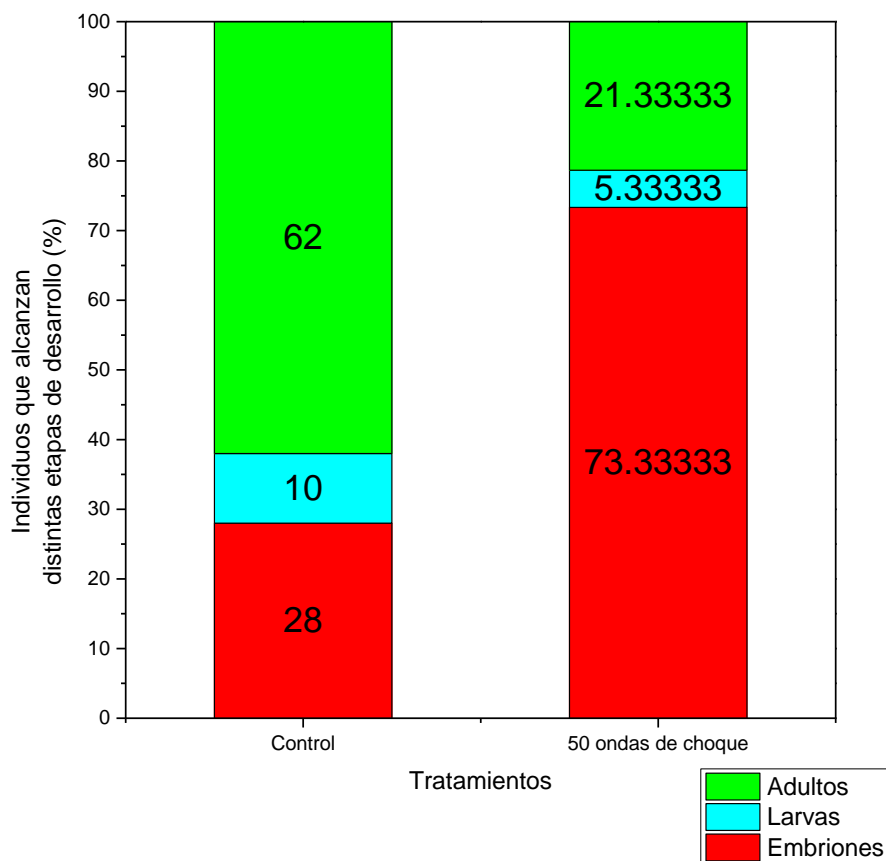


Figura 12. Gráficas del registro de vida de moscas en solución con nanopartículas de carbono (CQD 4), expuestas a 50 ondas de choque ($p^+ = 18$ MPa, $f = 1$ Hz) con el equipo Piezoson 100 plus. Se muestra el porcentaje de las moscas que vivieron hasta cada etapa de desarrollo: embrión (rojo), larva (azul) o adulto (verde).

Digestión de larvas de mosca en KOH

El proceso de digestión primero se realizó con nanopartículas (CQD 4), y se encontró que las nanopartículas aún exhiben fluorescencia después del proceso, pero la apariencia de la solución se torna más oscura. Además, la centrifugación logra crear un gradiente en la muestra. Al realizar el proceso con las larvas que fueron tratadas con ondas de choque, la solución tuvo fluorescencia de baja intensidad después de centrifugar e incidir una lámpara UV (figura 13). Sin embargo, no se logró distinguir la presencia de nanopartículas en espectroscopía

UV-Visible, posiblemente porque los residuos de larva que quedan son suficientes para saturar la muestra, aún después de centrifugar 2 veces para separar por masa.

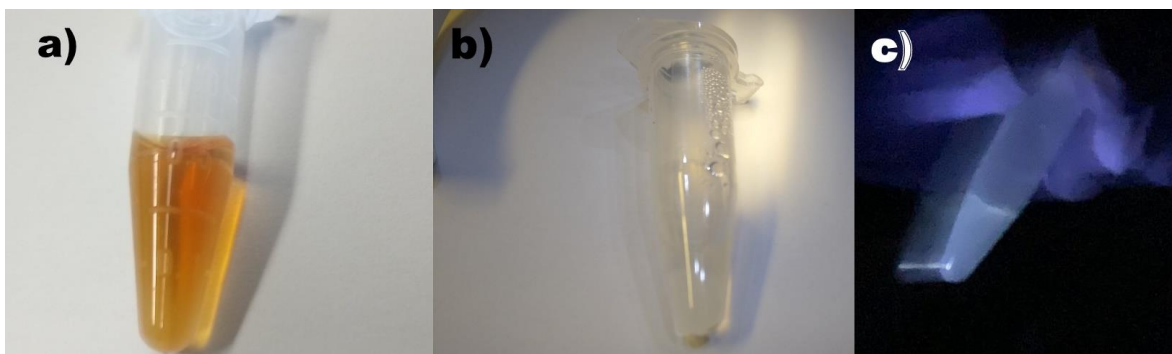


Figura 13. Muestras después del proceso de digestión con KOH y centrifugación. Se muestran los tubos con a) sólo nanopartículas, b) larvas tratadas con ondas de choque y c) larvas tratadas con ondas de choque bajo luz UV.

Observación de larvas en microscopio estereoscópico

Al observar larvas control y tratadas con ondas de choque, no se identificó la presencia de algún cúmulo de nanopartículas. Las larvas tratadas se ven ligeramente más fluorescentes, lo cual se podría deber a que las nanopartículas estén distribuidas sin formar cúmulos (figura 14). Estos resultados representaron una primera exploración, que motivó a utilizar las microscopías presentadas posteriormente.

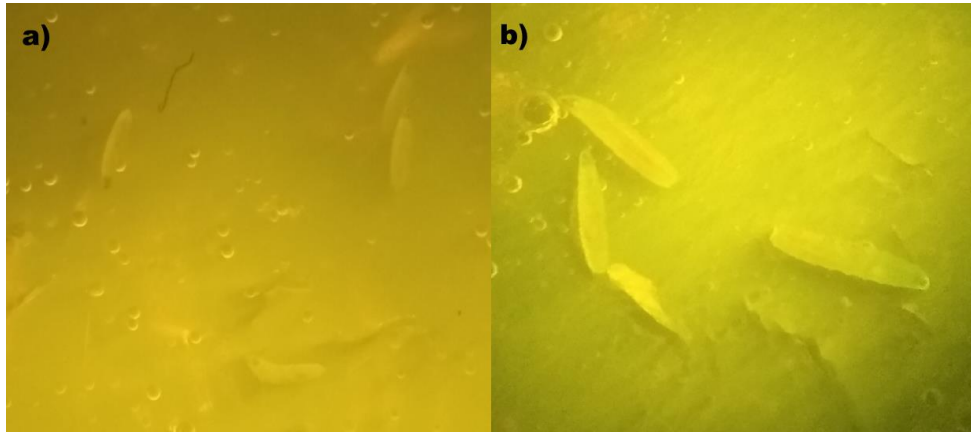


Figura 14. Larvas observadas en fluorescencia, después del tratamiento con ondas de choque en solución de nanopartículas de 100 nm. a) Larvas control. b) Larvas tratadas con ondas de choque.

Observación de cortes histológicos con láser de 405 nm

Como primer paso en microscopía de superresolución, se ajustó la potencia del láser y el tiempo de exposición, de acuerdo con las mejores condiciones para la visualización de las nanopartículas (CQD 4) por sí solas. Al ver cortes histológicos de larvas tratadas con ondas de choque, se logran apreciar algunas regiones donde las larvas tratadas parecen ser más fluorescentes (figura 15). No obstante, estos resultados están sujetos a que hay fluorescencia endógena en los tejidos de las larvas. La imagen no puede aislar la información de un solo plano, y el equipo no cuenta con un modo en el software para identificar firmas espectrales.

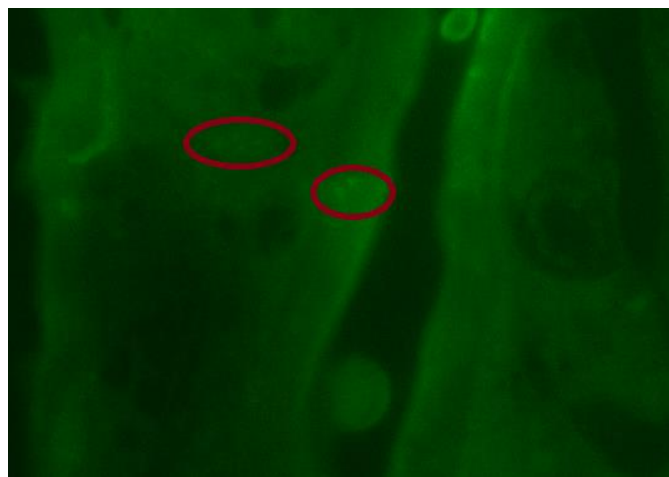


Figura 15. Observación en microscopía de superresolución de corte histológico de larva tratada con ondas de choque en solución de nanopartículas (CQD 4).

Observación de cortes histológicos en microscopía confocal

Empleando un láser de 405 nm y observando en microscopía confocal, ha sido posible identificar el espectro de emisión de las nanopartículas fluorescentes (CQD 4). Por otra parte, al observar un tejido de larva tratado con ondas de choque en microscopía confocal y separar las fuentes de emisión con el modo lambda stack, se encontraron dos firmas espectrales, una de ellas similar a la firma espectral de las nanopartículas (figura 16).



Figura 16. Observación de espectros de emisión en microscopía confocal. Espectro de emisión de muestra CQD 4 (izquierda). Separación del espectro con el modo lambda stack de un corte histológico de larva tratada con ondas de choque en solución de nanopartículas de la muestra CQD 4 (izquierda).

Prueba de inserción de DNA

Las moscas que fueron tratadas con ondas de choque en solución de plásmido que expresa GFP (15.1 $\mu\text{g/ml}$), se observaron durante su desarrollo. Sólo se encontraron diferencias respecto al control durante el tercer estadio larvario, lo cual se podría atribuir a la expresión transiente de GFP (figura 17). La diferencia es mayor en tejidos como los intestinos.

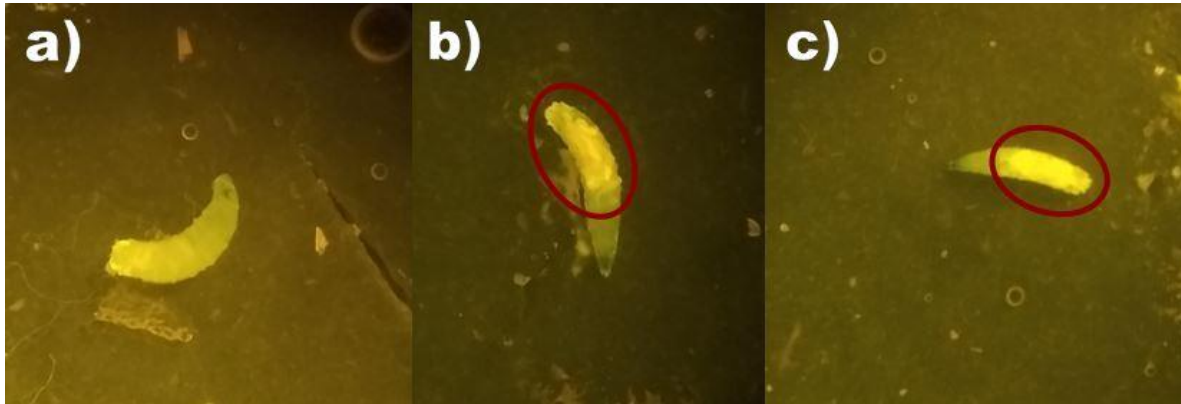


Figura 17. Observación en fluorescencia de larvas tratadas con ondas de choque en solución de plásmido que expresa GFP (15.1 $\mu\text{g/ml}$). a) Larva control de tercer estadio. b) y c) Larvas durante el tercer estadio, las cuales fueron tratadas, como embriones, con ondas de choque. Las regiones con mayor fluorescencia se indican por un óvalo rojo.

Tratamiento con ondas de choque en un medio con nanopartículas de oro

Para complementar los experimentos realizados con nanopartículas fluorescentes, se incluyeron pruebas con nanopartículas de oro. Al aplicar tratamientos de 50 ondas de choque a 1 Hz en embriones de mosca de la fruta en una solución de nanopartículas de oro de 6 nm (AURION Immuno Gold Reagents & Accessories, Wageningen, Países Bajos), la supervivencia de los adultos fue aceptable y suficiente para dejar descendencia (figura 18). Los resultados, especialmente en el registro de adultos tratados, fueron muy similares al mismo tratamiento, pero con nanopartículas fluorescentes de carbono (figura 12), lo que indica que ambos tipos de nanopartículas no representan un riesgo toxicológico para la supervivencia de las moscas.

Tratamientos con ondas de choque en solución de nanopartículas de oro (6 nm)

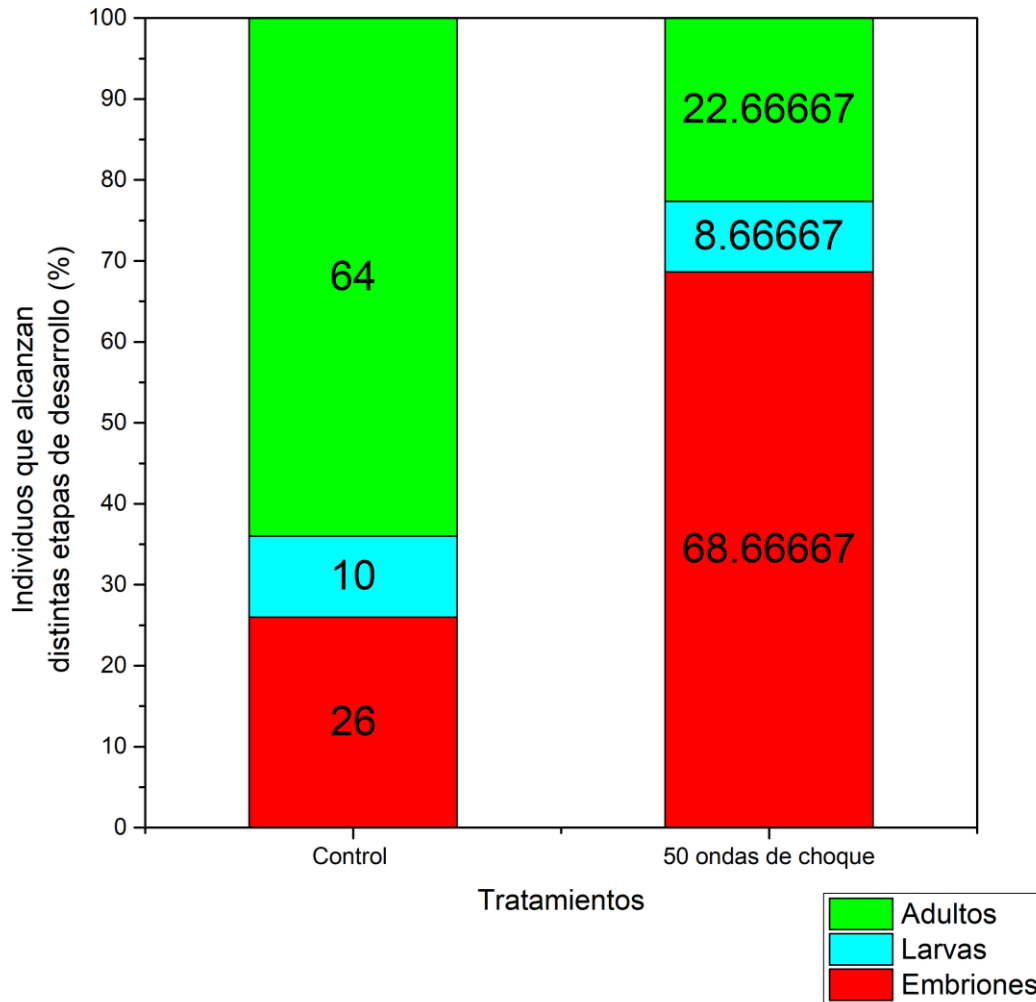


Figura 18. Gráficas del registro de vida de moscas en solución con nanopartículas de oro (6 nm), expuestas a 50 ondas de choque ($p^+ = 18$ MPa, $f = 1$ Hz) con el equipo Piezozon 100 plus. Se muestra el porcentaje de las moscas que viven hasta cada etapa de desarrollo: embrión (rojo), larva (azul) o adulto (verde). Se presentan datos del control y el promedio de 3 repeticiones del tratamiento con ondas de choque.

Micrografías de pruebas con nanopartículas de oro

En las imágenes de microscopía electrónica se pueden apreciar cúmulos electron-densos que se pueden atribuir a la presencia de nanopartículas de oro. Se encuentran tanto en larvas microinyectadas como en las tratadas con ondas de choque (figura 19).

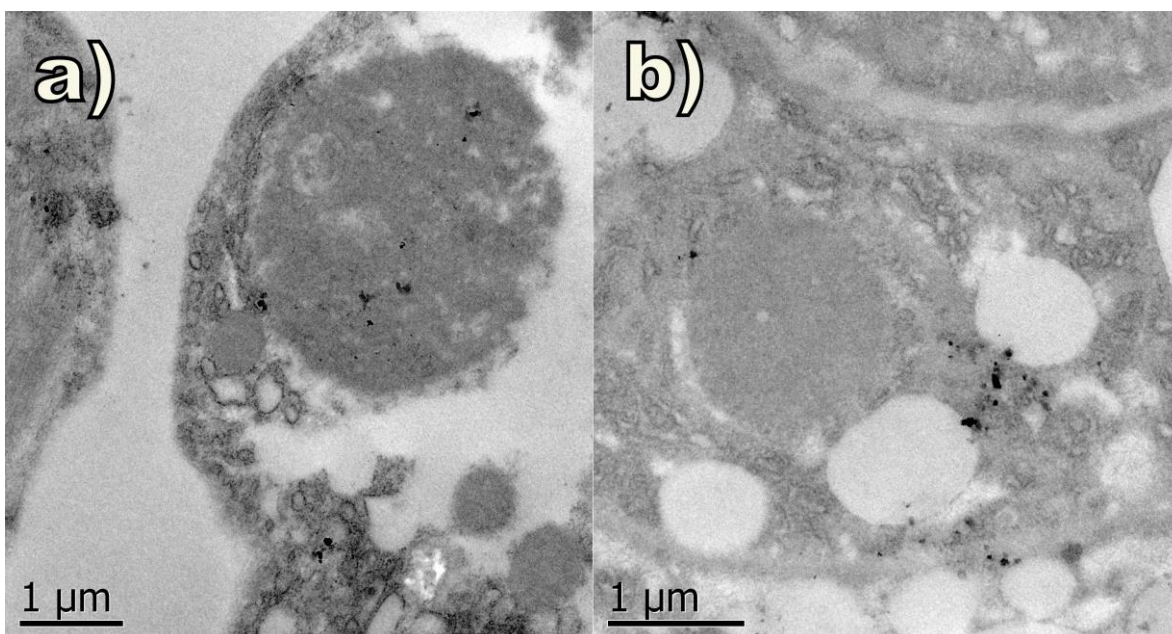


Figura 19. Micrografías de cortes histológicos de a) larva microinyectada con nanopartículas de oro usando un Nanoliter 2000, b) larva tratada con ondas de choque en solución de nanopartículas de oro, observadas en un microscopio electrónico JEM-1010.

Con el objetivo de tener una referencia de cómo se ven los cortes histológicos de larva sin insertar las nanopartículas ni aplicar un contraste en el tejido, se hicieron cortes de larvas con el mismo procedimiento, pero sin aplicar ondas de choque (figura 20). Aunque los tejidos no dejan pasar parte de los electrones, no son tan electron-densos como los cúmulos observados (figura 19).

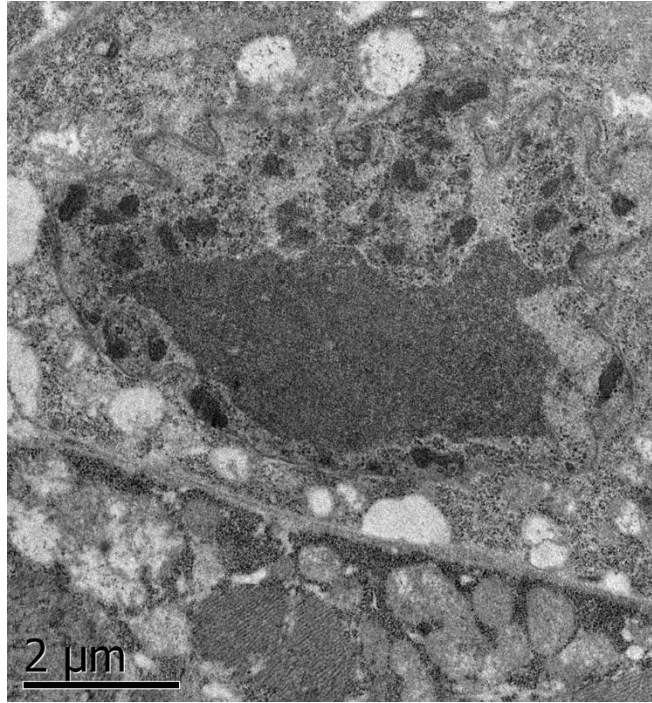


Figura 20. Corte de larva control sometida al procedimiento, pero sin aplicar ondas de choque, observado en un microscopio electrónico JEM-1010.

Con la finalidad de cuantificar los cúmulos de nanopartículas, se consideraron sólo los que se encuentran dentro de una sección de tejido, para evitar considerar zonas electron-densas ocasionadas por el tejido. En cada sección se obtuvo un cociente al sumar el área de cada cúmulo y dividirla entre el área total de la sección de tejido observada. Cada área se obtuvo mediante el *software ImageJ*. Al comparar los cocientes de las secciones de larva microinyectadas y los de larvas tratadas con ondas de choque ($n= 18$ y $n= 13$, respectivamente), no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ($U= 109$, $p= 0.05$). Al repetir el experimento con secciones de otra larva microinyectada y otra tratada con ondas de choque ($n= 8$ y $n= 10$, respectivamente), tampoco se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ($U= 52$, $p= 0.05$). Se debe de considerar que nuestra observación está limitada a sólo un grupo de cortes de la larva, además de que la distribución de las nanopartículas puede ser resultado de su transporte por la hemolinfa, o en el caso de las moscas tratadas por ondas de choque, también influyen los estados de desarrollo desde el sincisio.

Sin embargo, es de recalcar que se obtuvieron resultados que muestran que las nanopartículas de oro se pueden introducir a los embriones mediante ondas de choque, y observarlas después en el estadio larvario. Esto complementa y es consistente con los resultados obtenidos con nanopartículas fluorescentes.

Discusión

Después de realizar diversas síntesis de puntos cuánticos de carbono (CQD), en base a su emisión en visible y dispersión en la solución, se determinó continuar con la muestra CQD 4 (0.5 g de sacarosa, 1.5 h a 200°C), la cual absorbe específicamente en 228 y 282 nm. Los puntos cuánticos son de un diámetro promedio de 2.06 nm, como se determinó con la microscopía electrónica de transmisión. De acuerdo con las pruebas de emisión, es mejor excitar las nanopartículas en un rango entre 345 a 390 nm, produciendo mayor emisión con el led de 390 nm. La microinyección en larvas evidencia que las nanopartículas son visibles al acumularse en el cuerpo de la larva.

En cuanto a los tratamientos con ondas de choque, en el control la supervivencia de adultos es similar a los experimentos control sin nanopartículas ni ondas de choque (controles figura 3 y figura 12), y la supervivencia de adultos con moscas tratadas en solución de nanopartículas es mayor con la muestra CQD 4 que con las nanopartículas de 4 nm utilizadas previamente (figura 4 y figura 12). Ambos resultados indican que los puntos cuánticos de la muestra CQD 4 no son tóxicos para las moscas. Los adultos que sobreviven con los puntos cuánticos de 2.06 nm de diámetro tienen un fenotipo normal y pueden dejar descendencia. Al hacer las pruebas con ondas de choque, pero utilizando nanopartículas de oro, la supervivencia de adultos en las moscas es similar a la obtenida con la muestra CQD 4 (figura 18 y figura 12). Las nanopartículas de oro se utilizan ampliamente por su biocompatibilidad. Esto indica que ambos tipos de nanopartículas no representan un riesgo para el desarrollo de las moscas.

Con el uso del microscopio estereoscópico se observó una diferencia pequeña entre larvas tratadas con ondas de choque y su respectivo control, sin que se presente algún cúmulo sobresaliente a este nivel de observación. Las pruebas de digestión en KOH sugieren la presencia de fluorescencia en larvas tratadas, pero aún se requiere revisar si es posible distinguir la probable señal de las nanopartículas del resto de residuos de larva. En cuanto a los cortes histológicos de larvas tratadas con ondas de choque en solución de nanopartículas, la microscopía

de superresolución evidencia regiones donde las larvas tratadas son más fluorescentes, pero con este equipo no se puede separar rigurosamente la fluorescencia endógena de las larvas frente alguna de otro origen. Utilizando un microscopio confocal con láser de 405 nm es posible detectar el espectro de emisión de las nanopartículas, el cual es similar a uno de los espectros que logra separar el modo lambda stack en el tejido de larva tratado con ondas de choque.

En la prueba de inserción de DNA en moscas tratadas con ondas de choque, se han encontrado diferencias en la fluorescencia de las moscas tratadas respecto al control, esto durante el tercer estadio larvario. Además, se encontró evidencia de cúmulos de nanopartículas de oro presentes en tejidos de larva. Esto podría indicar que las ondas de choque sí están permeabilizando las capas exteriores del embrión temprano de *Drosophila*, pero aún quedará por considerarse varias cuestiones sobre cómo ocurre la interacción entre los embriones y las ondas de choque. Pese a que las condiciones de la tina en el arreglo de ondas de choque se mantienen lo más controladas posible (figura 5), puede ocurrir una variación en el medio dentro de las bolsas de polietileno al transportarse entre laboratorios y al sellarlas, lo que cambiaría la presión interna, y terminaría influyendo en la generación de burbujas y, con ello, microjets. Con muy pocos microjets se atenuaría el efecto de permeabilización de la membrana, mientras que en exceso se causaría bastante daño a los tejidos, también ocasionado por la formación de ondas de choque secundarias. Se debe de tomar en cuenta que, a diferencia de otros organismos, como los hongos, el embrión temprano tiene 3 capas exteriores: el corion, la membrana vitelina y la membrana plasmática, donde adentro se encuentran núcleos distribuidos en un volumen relativamente grande de citoplasma. Por esto es viable considerar la posibilidad de que se esté generando cavitación y microjets entre las capas del embrión o dentro del mismo. Por una parte, el citoplasma del embrión es más viscoso que el agua, lo que en principio disminuye la cavitación, pero también se ha observado que la energía de las ondas de choque es suficiente para destruir varios embriones, por lo que es factible que en algún embrión el paso de la onda de choque sea suficientemente intenso para producir cavitación en su interior y con ello microjets. Aunque se han observado tejidos con necrosis en larvas que fueron

tratadas como embriones con ondas de choque, no se ha observado alguna alteración fenotípica en adultos, lo que indica que no ha habido daños severos ni mutaciones por la posible influencia de las ondas de choque dentro del embrión temprano de la mosca.

La cavitación en las regiones acuosas de los organismos no es extraña en la naturaleza; se ha identificado que las plantas producen cavitación en su xilema, esto como respuesta ante un estímulo de estrés, como ocurre en una sequía o al ser cortadas. Gracias a esto pueden emitir sonidos que informen de su condición, e incluso pueden provocar la liberación de agua acumulada en el tallo bajo condiciones adversas (Khait *et al.*, 2023; Cochard *et al.*, 2013).

Conclusiones

Este trabajo, basado en primeros principios, explora un mejor método de introducir elementos exógenos a embriones sincisiales tempranos de la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, al exponer los embriones a ondas de choque. Permite un primer acercamiento con una metodología distinta a la tradicional, con varias ventajas como son; bajo costo, rapidez y facilidad de uso. La manera tradicional es la inyección directa en embriones, y aunque es perfectamente viable, requiere mucha habilidad y tiene una eficiencia baja al transformar moscas genéticamente. Los diferentes experimentos delineados y efectuados en este trabajo son consistentes con que la aplicación de ondas de choque es un método prometedor para lograr lo anterior: se pueden introducir nanopartículas de diferente naturaleza a los embriones por medio de ondas de choque. Esto es suficientemente exitoso como para pensar en desarrollar una aplicación futura para transformación y/o introducción de elementos al interior del embrión sincisial. Restaría explorar si al introducir DNA, éste es capaz de insertarse en el genoma, y lograr la transformación del material genético de los embriones.

Bibliografía

Alpatov, W. W. (1929). *Growth and variation of the larvae of Drosophila melanogaster*. Journal of Experimental Zoology, 52(3), 407-437.

Barney, C. W., Dougan, C. E., McLeod, K. R., Kazemi-Moridani, A., Zheng, Y., Ye, Z. & Crosby, A. J. (2020). *Cavitation in soft matter*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 117(17), 9157-9165.

Bate, M., & Arias, A. M. (1993). *The development of Drosophila melanogaster*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Vol. 1, 48-49.

Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M., & Rizzolio, F. (2020). *The history of nanoscience and nanotechnology: from chemical–physical applications to nanomedicine*. Molecules, 25(1), 112.

Boverhof, D. R., Bramante, C. M., Butala, J. H., Clancy, S. F., Lafranconi, M., West, J., & Gordon, S. C. (2015). *Comparative assessment of nanomaterial definitions and safety evaluation considerations*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 73(1), 137-150.

Caldwell, P. E., Walkiewicz, M., & Stern, M. (2005). *Ras activity in the Drosophila prothoracic gland regulates body size and developmental rate via ecdysone release*. Current Biology, 15(20), 1785-1795.

Campos-Ortega, J.A. & Hartenstein, V. (1997). *The embryonic development of Drosophila melanogaster*. Springer Science & Business Media. 1-19.

Chakraborty, R., Vepuri, V., Mhatre, S. D., Paddock, B. E., Miller, S., Michelson, S. J. & Marenda, D. R. (2011). *Characterization of a Drosophila Alzheimer's disease model: pharmacological rescue of cognitive defects*. PloS One, 6(6), e20799.

Cochard, H., Badel, E., Herbette, S., Delzon, S., Choat, B., & Jansen, S. (2013). *Methods for measuring plant vulnerability to cavitation: a critical review*. Journal of Experimental Botany, 64(15), 4779-4791.

de Lucas, B., Pérez, L. M., Bernal, A., & Gálvez, B. G. (2020). *Ultrasound therapy: experiences and perspectives for regenerative medicine*. Genes, 11(9), 1086.

Garofalo, R. S. (2012). *Genetic analysis of insulin signaling in Drosophila*. Trends in Endocrinology & Metabolism, 13(4), 156-162.

Ginter, S., & Krauss, W. (2007). *Wolf-innovative piezoelectric shock wave systems: Piezolith 3000 and Piezason 100 plus*. Therapeutic Energy Application in Urology: Standards and Recent Developments, 175.

Gokhale, R., & Pflieger, C. M. (2019). *The power of drosophila genetics: the discovery of the Hippo pathway*. *The Hippo Pathway*, 3-26.

Hartenstein, V., & Posakony, J. W. (1990). *A dual function of the Notch gene in Drosophila sensillum development*. *Developmental Biology*, 142(1), 13-30.

He, X., Li, H., Liu, Y., Huang, H., Kang, Z., & Lee, S. T. (2011). *Water soluble carbon nanoparticles: hydrothermal synthesis and excellent photoluminescence properties*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 87(2), 326-332.

Jagadeesh, G., Nataraja, K. N., & Udayakumar, M. (2004). *Shock waves can enhance bacterial transformation with plasmid DNA*. *Current Science*, 87(6), 734-735.

Khait, I., Lewin-Epstein, O., Sharon, R., Saban, K., Goldstein, R., Anikster, Y., ... & Hadany, L. (2023). *Sounds emitted by plants under stress are airborne and informative*. *Cell*, 186(7), 1328-1336.

Li, D., Tang, Y., Lin, J., & Cai, W. (2017). *Methods for genetic transformation of filamentous fungi*. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 1-13.

López-Marín, L. M., Millán-Chiu, B. E., Castano-González, K., Aceves, C., Fernández, F., Varela-Echavarría, A., & Loske, A. M. (2017). *Shock wave-induced damage and poration in eukaryotic cell membranes*. *The Journal of Membrane Biology*, 250(1), 41-52.

Loske, A.M. (2007). *Shock Wave Physics for Urologists*. ResearchGate. 81-84.

Loske, A.M. (2017). *Medical and biomedical applications of shock waves*. Springer International Publishing. Cham, Switzerland. 7-135.

Lukes, P., Fernández, F., Gutiérrez-Aceves, J., Fernández, E., Alvarez, U. M., Sunka, P., & Loske, A. M. (2016). *Tandem shock waves in medicine and biology: a review of potential applications and successes*. *Shock Waves*, 26(1), 1-23.

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(1), 9-16.

Margaritis, L. H., Kafatos, F. C., & Petri, W. H. (1980). *The eggshell of Drosophila melanogaster. I. Fine structure of the layers and regions of the wild-type eggshell*. *Journal of Cell Science*, 43(1), 1-35.

Markow, T.A., Beall, S. & Matzkin, L.M. (2009). *Egg size, embryonic development time and ovoviviparity in Drosophila species*. Journal of Evolutionary Biology, 22(2), 430-434.

Molaei, M. J. (2019). *Carbon quantum dots and their biomedical and therapeutic applications: a review*. RSC Advances, 9(12), 6460-6481.

Neppiras, E. A. (1980). *Acoustic cavitation*. Physics Reports, 61(3), 159-251.

Ogden, J. A., Tóth-Kischkat, A., & Schultheiss, R. (2001). *Principles of shock wave therapy*. Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007), 387, 8-17.

Ohl, S. W., Klaseboer, E., & Khoo, B. C. (2015). *Bubbles with shock waves and ultrasound: a review*. Interface Focus, 5(5), 20150019.

Pan, D., Zhang, J., Li, Z., Wu, C., Yan, X., & Wu, M. (2010). *Observation of pH-, solvent-, spin-, and excitation-dependent blue photoluminescence from carbon nanoparticles*. Chemical Communications, 46(21), 3681-3683.

Rivera, A.L., Gomez-Lim, M., Fernandez, F. & Loske, A.M., 2012. *Physical methods for genetic plant transformation*. Physics of Life Reviews, 9(3), 308-345.

Rooze, J., Rebrov, E. V., Schouten, J. C., & Keurentjes, J. T. (2013). *Dissolved gas and ultrasonic cavitation—a review*. Ultrasonics Sonochemistry, 20(1), 1-11.

Rubin, G. M., & Spradling, A. C. (1983). *Vectors for P element-mediated gene transfer in Drosophila*. Nucleic Acids Research, 11(18), 6341-6351.

Schneider, H. T., Fromm, M., Ott, R., Janowitz, P., Swobodnik, W., Neuhaus, H., & Ell, C. (1991). *In vitro fragmentation of gallstones: comparison of electrohydraulic, electromagnetic and piezoelectric shockwave lithotripters*. Hepatology, 14(2), 301-305.

Schumann, I., & Triphan, T. (2020). *The pedtracker: An automatic staging approach for drosophila melanogaster larvae*. Frontiers in Behavioral Neuroscience, 14, 612313.

Tapia, D. (2019). *Estudio de la interacción de ondas de choque con embriones de Drosophila melanogaster empleando nanopartículas como marcadores*. Tesis Licenciatura en Tecnología, UNAM. 5-40.

Thiel, M. (2001). *Application of shock waves in medicine*. Clinical Orthopaedics and Related Research, 387, 18-21.

Ugur, B., Chen, K., & Bellen, H. J. (2016). *Drosophila tools and assays for the study of human diseases*. Disease Models & Mechanisms, 9(3), 235-244.

Velázquez, G. , Loske, A. M., Riesgo Escovar, J. R., & Ramírez, M. R. (2018). *Efectos de ondas de choque en embriones de Drosophila melanogaster*. Memoria de Estadía UPP. 9-45.

Whitesides, G. M. (2005). *Nanoscience, nanotechnology, and chemistry*. *Small*, 1(2), 172-179.

Yáñez-Vilar, S., Sánchez-Andújar, M., Gómez-Aguirre, C., Mira, J., Señarís-Rodríguez, M. A., & Castro-García, S. (2009). *A simple solvothermal synthesis of MFe₂O₄ (M= Mn, Co and Ni) nanoparticles*. *Journal of Solid State Chemistry*, 182(10), 2685-2690.

Zabihhesari, A., Hilliker, A. J., & Rezai, P. (2020). *Localized microinjection of intact Drosophila melanogaster larva to investigate the effect of serotonin on heart rate*. *Lab on a Chip*, 20(2), 343-355.

Zhang, L., Ji, L., Zhang, H., Li, X., Wang, J., & Zheng, J. (2022). *Dynamics characteristics of a laser-induced non-spherical bubble collapsing micro-jet and its enhancement on hard tissue ablation*. *Optics and Lasers in Engineering*, 151, 106893.

Zhu, H., Wang, X., Li, Y., Wang, Z., Yang, F., & Yang, X. (2009). *Microwave synthesis of fluorescent carbon nanoparticles with electrochemiluminescence properties*. *Chemical Communications*, (34), 5118-5120.