



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**CENTRO DE FÍSICA APLICADA  
Y TECNOLOGÍA AVANZADA**

**ELABORACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DE CÁLCULOS RENALES  
ARTIFICIALES INFECTADOS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**LICENCIADO EN TECNOLOGÍA**

**PRESENTA:**

**ARMANDO LUNA SUÁREZ**

**ASESOR: ACHIM MAX LOSKE MEHLING**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada

Asunto: VOTOS APROBATORIOS

DR. RAMIRO PÉREZ CAMPOS  
DIRECTOR DEL CFATA, UNAM  
PRESENTE

ATN: Dr. Jose Luis Aragón Vera  
Coordinador de la Licenciatura en  
Tecnología

En cumplimiento del Artículo 26 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis con título "Elaboración y estandarización de cálculos renales artificiales infectados", que presenta el pasante Luna Suárez Armando, con número de cuenta: 408061410 para seguir con la opción de titulación por tesis y examen profesional en la carrera de Licenciatura en Tecnología.

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

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Juriquilla, Qro. a 11 del mes de nov del año 2011.

	NOMBRE	FIRMA DE ENTERADO
PRESIDENTE	Dr. Juan Bibiano Morales Malacara	
SECRETARIO	Dr. Achim Max Loske Mehling	
VOCAL	Dra. Luz María López Marín	
1er. SUPLENTE	Dr. Pedro Salas Castillo	
2º SUPLENTE	Dra. Concepción Arenas Arrocena	



# RESUMEN

Este trabajo se realizó con el fin de elaborar un procedimiento estándar para la síntesis de cálculos renales artificiales infectados. Cuando un paciente con urolitiasis es tratado con litotricia extracorpórea por ondas de choque es posible que sus cálculos estén infectados con bacterias del tipo gram negativo. Al lisarse estos microorganismos se libera gran cantidad de endotoxinas, también llamadas lipopolisacáridos, provocando la activación desmedida de la respuesta inmune y en un porcentaje relativamente alto, la muerte del paciente por choque séptico. Se trabajó con *Escherichia coli* por ser la bacteria de mayor incidencia en los cálculos renales y con las variedades XL Blue y ATCC 25922, ambas por no ser patógenas y requerir un manejo de bioseguridad nivel 1. Los resultados mostraron que al adaptar la bacteria cultivada a un medio rico en sulfato de calcio, el modelo tiene un tiempo de vida útil mayor que si se utiliza una cepa ordinaria. Se midió también la contribución independiente de cada variable estudiada y se obtuvo un procedimiento estandar para la elaboración de modelos infectados. Los cálculos elaborados bajo este procedimiento servirán como modelo en el estudio *in vitro* de la posible inactivación de bacterias y la difusión de endotoxinas en el organismo cuando éstos sean sometidos a pulverización por ondas de choque. Adicionalmente, se demostró la factibilidad de caracterizar el modelo implementado en cuanto a carga bacteriana, empleando microscopía electrónica de barrido (MEB) y endotoxinas liberadas, mediante análisis de sus componentes grasos determinado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

Palabras clave: litotricia extracorpórea, endotoxinas, lipopolisacáridos, urolitiasis, cálculo renal artificial, *Escherichia coli*.

*A mis padres.*

# AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Achim M. Loske por su confianza, su tiempo y sus valiosos consejos.

A la Dra. Luz María López por la orientación oportuna y por su generosidad y sencillez al compartir sus conocimientos. Al M. en C. Ulises M. Álvarez, por su tiempo y por compartir su experiencia.

A la Dra. Ma. Concepción Arenas, al Dr. Juan B. Morales y al Dr. Pedro Salas por integrar, junto con la Dra. Luz María López y el Dr. Achim Loske, el jurado evaluador y por sus aportaciones para mejorar este trabajo.

Al Dr. Víctor M. Catastaño y a todo el equipo de trabajo del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada de la UNAM que hicieron posible la fundación de la Licenciatura en Tecnología.

A la QFI María Concepción Arredondo, por su ayuda en el laboratorio. A la M. en C, Alicia del Real por su apoyo en el análisis de los modelos en el microscopio electrónico de barrido.

A Yissel, por su apoyo incondicional, sus consejos y por darme una idea diferente y complementaria de las situaciones. A mis compañeros y amigos de la carrera: Andrés, Ángel, Gerardo, Kaleb, Héctor, Leonel, Erik, Omar, Rodrigo, Jorge, Daniel, Carlos y Juan Carlos, pues he aprendido mucho de cada uno de ellos.

A todos los profesores del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada de la UNAM, pues el asistir a sus clases me abrió el camino hacia una vida profesional con un enfoque fuerte hacia la investigación. Al personal administrativo que me facilitó el avance en la obtención de este logro, en especial a Daniela Reyes y al MVZ Román Pacheco.

# ÍNDICE GENERAL

<b>Resumen</b>	<b>II</b>
<b>Dedicatoria</b>	<b>III</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>IV</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>VII</b>
<b>2. Antecedentes</b>	<b>2</b>
2.1. Sobre las ondas de choque . . . . .	2
2.2. Litotricia extracorpórea y otros procedimientos . . . . .	3
2.3. Uso de <i>Escherichia coli</i> . . . . .	4
<b>3. Objetivos</b>	<b>6</b>
<b>4. Metodología</b>	<b>7</b>
4.1. Preparación del cultivo . . . . .	7
4.2. Preparación de los moldes . . . . .	9
4.3. Preparación de los modelos infectados . . . . .	10
4.4. Preparación de la cepa adaptada . . . . .	10
4.5. Preparación del modelo para la micrografía en microscópio electrónico de barrido	11
4.6. Identificación del lipopolisacárido . . . . .	13
4.7. Evaluación de los modelos infectados . . . . .	14
4.7.1. Preparación del material . . . . .	15
4.7.2. Procedimiento . . . . .	15

---

<b>5. Resultados</b>	<b>17</b>
5.1. Evaluación de la cepa XL Blue . . . . .	17
5.1.1. Prueba 1 . . . . .	17
5.1.2. Prueba 2 . . . . .	19
5.1.3. Prueba 3 . . . . .	20
5.1.4. Prueba 4 . . . . .	21
5.2. Evaluación de la cepa ATCC 25922 . . . . .	22
5.2.1. Prueba 5 . . . . .	22
5.2.2. Prueba 6 . . . . .	23
5.3. Micrografías del modelo . . . . .	24
5.4. Análisis del LPS en el GC-MS . . . . .	27
<b>6. Discusión de resultados</b>	<b>29</b>
<b>7. Conclusiones</b>	<b>31</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>32</b>

# CAPÍTULO

## 1

# INTRODUCCIÓN

La urolitiasis es una enfermedad que consiste en la formación y acumulación de cristales de calcio, ácido úrico, estruvita e inclusive, en casos muy raros, de cistina (cuando el paciente excreta gran cantidad de aminoácidos por la orina). Estos litos se forman en los riñones y pueden ser expulsados por la orina de forma natural si son menores a 1 mm [1]. Cuando son de mayor tamaño se alojan en el riñón y pueden ser portadores de bacterias.

Si no se atiende a tiempo este padecimiento puede derivar en complicaciones como insuficiencia renal severa. Ello por el daño físico que sufre el riñón por la presencia de los litos y por el contenido bacteriano de los mismos. Estas bacterias pueden provocar inflamación y disminución de las funciones renales hasta en un 90% [2]. Las estadísticas señalan que la bacteria *Escherichia coli* es la causante del 90% de las infecciones en vías urinarias [3].

Existen diversos factores que influyen en la susceptibilidad a este padecimiento, entre otros, la edad (entre 15 y 45 años), el género (los hombres son 2 o 3 veces más propensos que las mujeres), la dieta (personas con alto consumo protéico y baja ingesta de agua), antecedentes familiares y presencia de infecciones en vías urinarias [3].

En pacientes con urolitiasis es frecuente que los cálculos renales estén contaminados por bacterias, especialmente del tipo gram-negativo. Estas bacterias se caracterizan por tener lipopolisacáridos (LPSs) en su membrana externa. Los LPSs, también llamados endotoxinas, poseen el antígeno O, que actúa como receptor para los bacteriófagos, desencadenando la respuesta inmune en el organismo [20].

La litotricia extracorpórea es un procedimiento ambulatorio y no invasivo en el que, a través de ondas de choque emitidas por un litritor se pulverizan los cálculos renales del paciente para que pueda expulsarlos fácilmente y sin dolor por la orina [5]. Durante este tratamiento es posible que las bacterias sufran lisis. La lisis de las bacterias que se encuentran dentro del cálculo puede provocar la entrada repentina de una gran cantidad de LPSs al torrente sanguíneo. De ser así, el paciente puede sufrir un choque anafiláctico y, si no es atendido de inmediato, puede morir [4]. Lamentablemente existe muy poca información sobre la interacción de las ondas de choque con los microorganismos que proliferan dentro de un cálculo urinario.

Estudiando la interacción de las ondas de choque con las bacterias contenidas en los litos, puede ser posible diseñar métodos alternativos que permitan evitar o reducir la incidencia de la anafilaxis posterior a la litotricia extracorpórea. Para lograr este objetivo, es indispensable contar con un modelo de cálculo renal infectado que sea reproducible y representativo del caso clínico.



Figura 1.1: Fotografía de cálculos renales.

## CAPÍTULO

### 2

## ANTECEDENTES

### 2.1

#### **Sobre las ondas de choque**

Una onda de choque se produce con un aumento súbito de energía mecánica, eléctrica, química o nuclear en un espacio limitado, produciendo un cambio repentino en la presión, densidad, temperatura, entropía y velocidad de partícula. Las ondas de choque se propagan de manera similar a las acústicas, sin embargo poseen alta energía y consisten en un sólo pulso de alta presión, con tiempo de ascenso de algunos nanosegundos, seguido de una reducción de presión con duración de unos cuantos microsegundos. En aplicaciones médicas se usa este tipo de onda debido a la baja atenuación en la propagación a través del cuerpo humano. Durante un tratamiento de litotricia extracorpórea por ondas de choque (LEOCH) se generan cientos de ondas de choque. A pesar de ello no se ha reportado un daño en los tejidos por aumento de la temperatura [5]. Los daños al tejido se deben a efectos de cavitación acústica y a los esfuerzos generados por las variaciones de presión tan intensas.

Cuando una onda de choque pasa a través de un medio, hay una pérdida de energía causando una reducción en la amplitud de la presión. La amplitud de la presión decrece exponencialmente mientras más grande es el recorrido a través del tejido. La penetración en el tejido depende de la frecuencia de la onda [5].

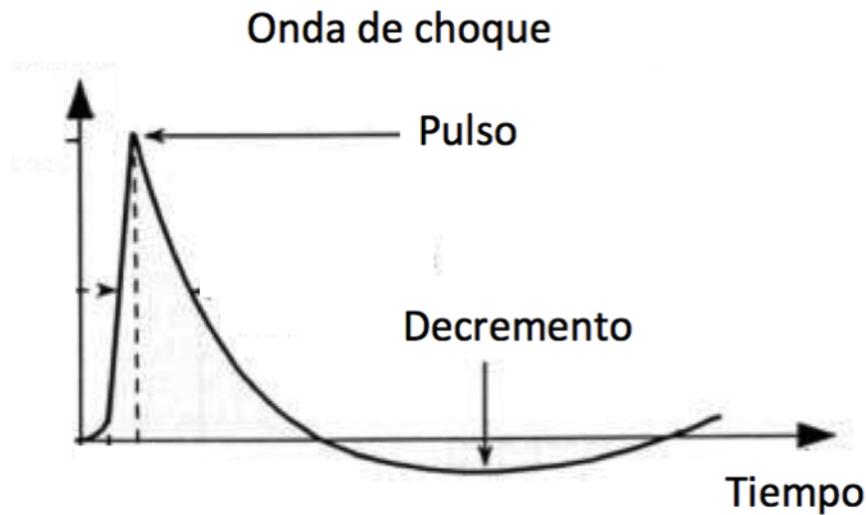


Figura 2.1: Variación de presión de un frente de choque en agua, del tipo usado para las aplicaciones médicas

Los litotritores clínicos tienen un espectro de frecuencia que va desde los 20 kHz hasta pocos MHz. La mayor parte de la energía está entre 100 kHz y 1 MHz, con un pico cercano a los 300 kHz. La energía total del pulso está en el rango de 10 a 100 mJ [6] y las densidades de energía varían entre 0.2 y 2.0 mJ/mm<sup>2</sup>. La densidad de energía se define como la cantidad de energía acústica transmitida a través de 1 mm<sup>2</sup> por pulso [5]. Cuando una onda de choque que viaja a través del tejido blando se encuentra con un objeto de impedancia acústica diferente (cálculo urinario), se generan esfuerzos muy grandes que pueden llegar a fracturar dicho objeto. Los principales efectos responsables de la fractura de cálculos urinarios durante LEOCH son la compresión, la cavitación acústica y el efecto Hopkinson [15].

## 2.2

### Litotricia extracorpórea y otros procedimientos

La LEOCH es una opción en el tratamiento cuando los cálculos renales tienen un tamaño de entre 2 y 10 mm. Si el lito es menor a 2 mm eventualmente puede ser reducido químicamente con medicamentos, como el citrato de potasio [7]. Una alternativa es la ureterorenoscopia, es decir, el uso de un endoscopio para pulverizar el cálculo. Con el ureteroscopio se visualiza el interior con una cámara de video en miniatura. Además cuenta con sistemas para pulverizar cálculos urinarios (láser, electrohidráulico, neumático y ultrasónico) [10].

---

La LEOCH es un tratamiento ambulatorio en el que el especialista dirige las ondas de choque del litotritor hacia el lito para reducirlo a fragmentos pequeños que pueda expulsar el paciente por la orina. Previamente se le suministran antibióticos al paciente para eliminar la dispersión de bacterias en el torrente sanguíneo y en la orina. Frecuentemente la mayor carga microbiana se encuentra en el interior del cálculo, en donde no tiene efecto el medicamento suministrado. Por ello, entre el 1 y el 2% de los pacientes que son tratados con LEOCH experimentan un choque séptico durante o después del tratamiento [20].

## 2.3

### Uso de *Escherichia coli*

Como se mencionó en la introducción, esta bacteria es la de mayor incidencia en las vías urinarias [3], por lo que la selección de *Escherichia coli* para el procedimiento de fabricación de cálculos renales artificiales infectados es representativo del caso clínico. Es una bacteria de tipo gram-negativo. Estas bacterias provocan choque séptico al ser lisadas porque su membrana está constituida por lipopolisacáridos que son reconocidos por el sistema inmune para activar su respuesta. El problema es la gran cantidad de este lipopolisacárido en el organismo en tan poco tiempo [4].

Las bacterias gram-negativas se denominan de esa forma porque no se tiñen de azul oscuro o violeta con la tinción de Gram. Esto es resultado de la estructura misma de la membrana. Las bacterias gram-negativas poseen doble capa lipídica y por lo mismo la tinción de Gram no alcanza a penetrar en ellas, dejándolas de un color rosa [11].

La conformación de los lipopolisacáridos que contienen las bacterias como la *Escherichia coli* se muestra en la figura 2.2. Para su estudio se puede dividir la estructura de un lipopolisacárido, también llamado endotoxina, en tres partes: lípido A, región R o núcleo y el antígeno O. El lípido A está conformado por dos unidades de N-acetilglucosamina unidos por un enlace beta. La región R está formada por una serie de monosacáridos. Región de interés es la del antígeno O, pues es la parte que reconoce los bacteriófagos y la que desencadena la respuesta inmune y queda estructuralmente sin alteraciones a la muerte o lisis de la bacteria que lo contiene.

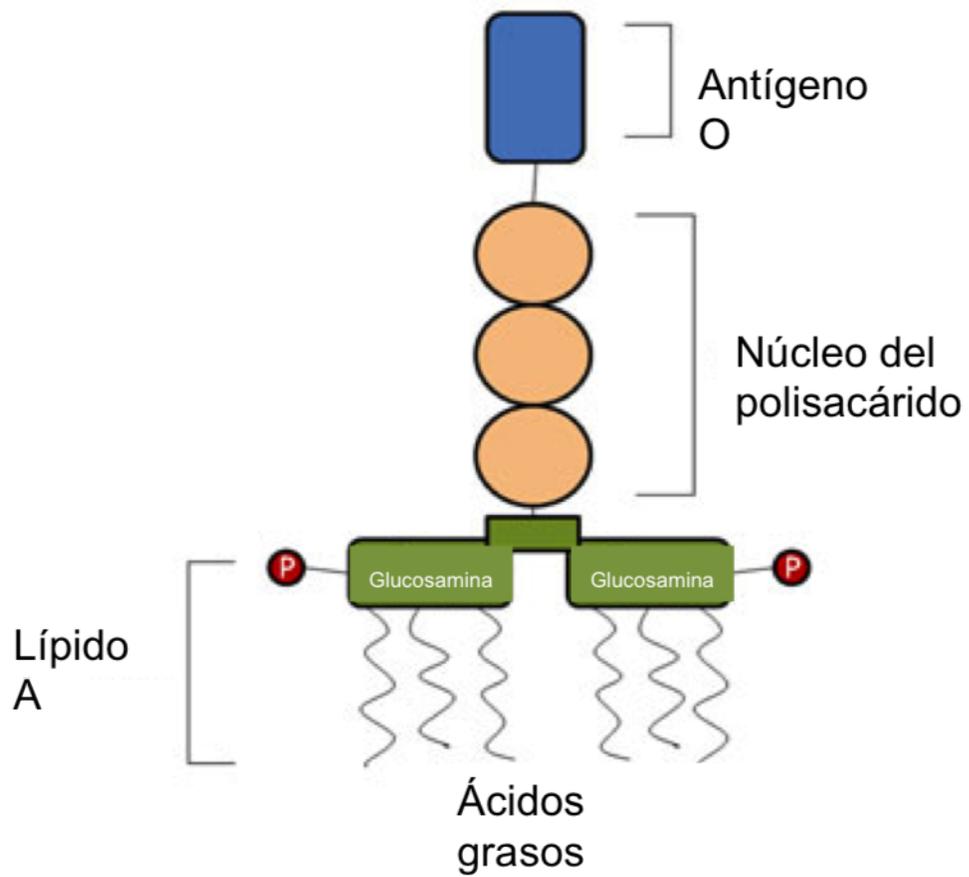


Figura 2.2: Diagrama de la conformación de un lipopolisacárido

## CAPÍTULO

### 3

## OBJETIVOS

Desarrollar y describir una técnica para elaborar cálculos renales artificiales infectados estandarizados para ser usados en investigación básica relacionada con litotricia extracorpórea e invasiva.

Elaborar cálculos artificiales de calcio infectados con *Escherichia coli*.

Evaluar los cálculos artificiales desde el punto de vista microbiológico.

## CAPÍTULO

### 4

# METODOLOGÍA

En este capítulo se detalla el procedimiento para el tratamiento del cultivo, la obtención de la cepa adaptada, la elaboración de los moldes, la síntesis de los cálculos renales artificiales infectados y el procedimiento para identificar los LPSs endotóxicos. Se evaluaron dos cepas de *Escherichia coli*, la variedad XL Blue y la ATCC 25922, ambas no patógenas y por tanto manejables en laboratorios con nivel de bioseguridad 1.

Ambas cepas se analizaron realizando experimentos con distintas variables con el fin de conocer su comportamiento ante condiciones diferentes de conservación hasta su uso. De los resultados presentados se pudo hacer una selección de la bacteria a utilizar, el tratamiento que se le debe dar y las condiciones en que debe estar, de tal forma que se puedan obtener resultados con menos variabilidad en los experimentos que se llevarán a cabo con estos cálculos renales artificiales infectados.

## 4.1

### Preparación del cultivo

Los cultivos de *Escherichia coli* ATCC 25922 se mantuvieron en refrigeración a 4°C en tubos de agar inclinados. Primero se preparó el medio. Se pesaron 1.5 gramos de polvo para caldo de soya tripticaseina y se incorporaron a 50 ml de agua destilada, revolviendo la mezcla con un

agitador magnético sobre una plancha térmica, usando un matraz erlenmeyer de 250 ml.

Una vez disuelto el contenido, se retiró el agitador magnético, se cubrió el matraz con un tapón de gasa y algodón, se colocó un pedazo de papel aluminio y se selló con *masking tape*. Posteriormente se le adhirió al matraz un pedazo pequeño de cinta testigo. Este procedimiento se hizo por triplicado, para contar con el sustrato necesario para el procedimiento.

Se colocaron los tres recipientes con 50 ml de caldo de soya tripticaseina sellados en el autoclave a 121°C por 15 minutos para esterilizar el contenido. Transcurrido el tiempo, se sacaron los 3 matraces, se dejaron enfriar y se guardaron dos.

Sobre una mesa desinfectada, con un mechero bunsen y una asa para inocular esterilizada con el fuego del mechero, se tomó la muestra del tubo de agar inclinado y se inoculó el caldo de cultivo. En este punto es conveniente señalar que el tubo inclinado con el cultivo se debe sacar de refrigeración, dejándolo al menos 15 minutos a temperatura ambiente. Asimismo, el matraz con caldo de cultivo no se debe usar inmediatamente después de sacarlo del autoclave. El objetivo de estas dos medidas es evitar en lo posible un choque térmico para la bacteria.

El matraz inoculado se colocó en una incubadora a 37°C por 24 horas. Transcurrido este tiempo se observó crecimiento bacteriano por la turbidez del contenido, lo cual se puede apreciar en la figura 4.1. En ambiente estéril, se tomó nuevamente una asada del contenido del matraz y se inoculó otro de los que se tenían en reserva. El nuevo matraz inoculado se dejó en incubación, también a 37°C, pero por 18 horas. El matraz del cual se tomó la asada se dejó en refrigeración para que su contenido fuera inactivado en autoclave.



Figura 4.1: Comparación entre solución infectada (izquierda) y solución sin infectar (derecha).

Transcurridas las 18 horas de incubación, con una pipeta estéril, se tomó el contenido del

matraz y se vertió en 4 tubos para centrífuga (10 ml en cada tubo). Se introdujeron los tubos en la centrífuga *Vanguard V6000* del fabricante *Hamilton Bell* a 10,000 rpm por 10 minutos. Después de esto las bacterias se encontraban sedimentadas, pudiendo retirarse el sobrenadante con facilidad y sustituyéndolo por 10 ml de solución salina isotónica al 0.85 %. Se homogeneizó la mezcla con un agitador tipo vortex por 30 segundos y se obtuvo la cepa para la infección de los cálculos renales artificiales.

## 4.2

### Preparación de los moldes

Para obtener cálculos de tamaño y morfología estándar, se usó una manguera de plástico transparente de 10 mm de diámetro y se hicieron cortes rectos en secciones perpendiculares de 10 mm de largo. Los moldes cortados se dejaron remojar con una ligera agitación por 3 minutos en un recipiente con agua y jabón líquido neutro, se enjuagaron y se dejaron secar. Una vez secos, se dejaron inmersos en una solución de etanol al 35 % durante 30 minutos, con el fin de esterilizarlos. Transcurrido ese tiempo, se dejaron secar en un ambiente estéril (campana de flujo laminar, sobre mesa desinfectada con etanol y cloro y con mechero bunsen encendido).

Los moldes se manipularon usando guantes estériles. En uno de los lados de los cilindros se colocó una sección cuadrada de 15 mm por lado de *parafilm*, estirando bien la película, sin que se rompiera, para que se adhiriera a las paredes del molde. Con los moldes ya preparados se procedió a la siguiente parte del proceso.

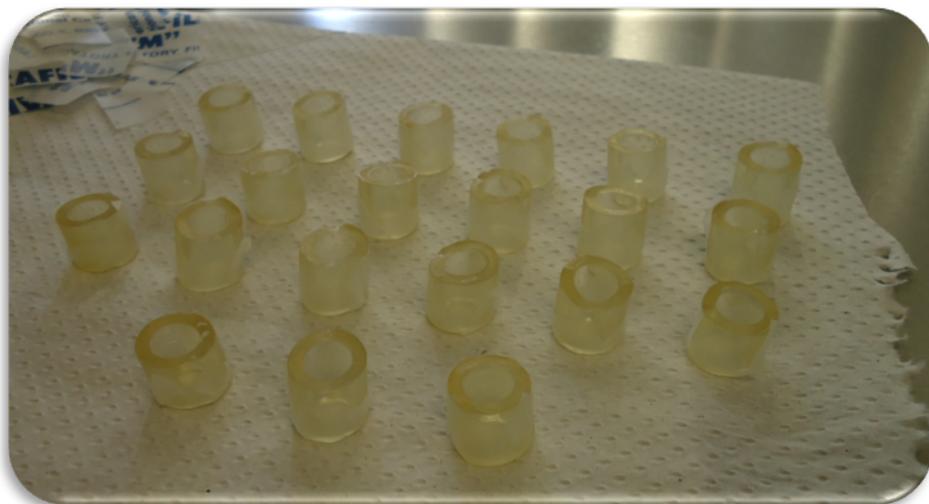


Figura 4.2: Moldes para preparar modelos de cálculos de sulfato de calcio infectado.

## 4.3

### Preparación de los modelos infectados

Se pesaron 1g de *Vel-Mix Stone* (*Kerr Corporation, USA*) y 9g de sulfato de calcio dihidratado; se mezclaron ambos compuestos y posteriormente se les agregaron 10 ml de la solución salina isotónica con la bacteria. Esto se hizo sobre una charola para pesar, mezclando con una espátula de acero inoxidable. Una vez homogeneizada la mezcla, se vertió con cuidado con la misma espátula en los moldes previamente preparados. Se dejaron secar cerca del mechero encendido. Al término de las dos horas, se retiró el parafilm, se sacaron los cálculos del molde con ayuda de una varilla de vidrio, y se obtuvieron los cálculos renales artificiales infectados, como se ilustra en la figura 4.3.

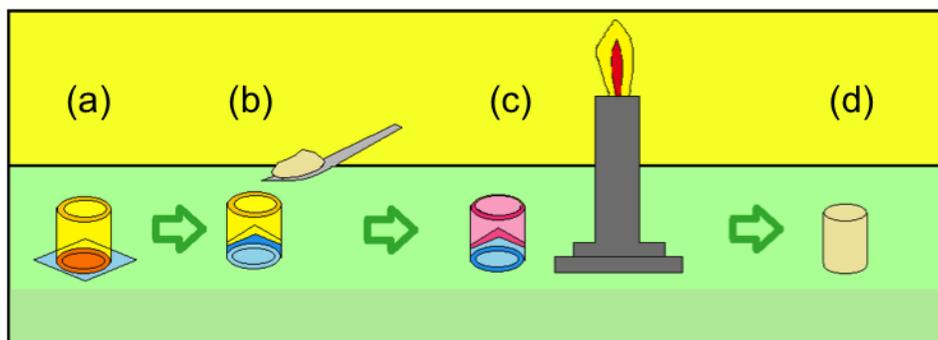


Figura 4.3: Fabricación del modelo infectado. (a) Sellar un extremo con parafilm, (b) llenar con la suspensión de sulfato de calcio y la bacteria, (c) dejar secando bajo el mechero por 2 horas, (d) sacar el modelo del molde.

## 4.4

### Preparación de la cepa adaptada

Se tomó un cálculo renal artificial infectado, después de 8 horas de su preparación y se colocó en una bolsa estéril, se añadieron 10 ml de solución salina isotónica y se disolvió con los dedos hasta obtener un líquido blanco y sin sedimentos. Con una micropipeta y usando puntas estériles, se tomó 1 ml de dicha muestra, se hicieron 6 diluciones consecutivas con el contenido infectado (detalles de este procedimiento en el capítulo siguiente) y se cultivaron por 24 horas en cajas petri con agar de soya tripticaseina, 1 ml del contenido de la dilución 5 y otra caja con

1 ml de la dilución 6.

Trascurridas las 24 horas, se observó si había unidades formadoras de colonias (UFC) en la caja petri con el contenido de la dilución 6. En tal caso, se tomó con un asa una muestra de una UFC y se cultivó en 50 ml de caldo de soya tripticaseína. Después de 24 horas de incubación, se usó este caldo para la preparación de la cepa como se describió en el primer apartado del presente capítulo.

## 4.5

### Preparación del modelo para la micrografía en microscopio electrónico de barrido

Para tomar una imagen del modelo infectado por microscopía electrónica de barrido (MEB) se requirió una preparación previa. Una vez sintetizado el cálculo artificial infectado se introdujo en un recipiente pequeño con una solución de paraformaldehído al 8% por 3 días en refrigeración a 4°C [13]. Este procedimiento se utilizó para fijar la estructura de la célula mediante entrecruzamiento de los enlaces formados entre el formaldehído y grupos amina, dejando una estructura inmóvil. Transcurridos los 3 días en la solución de paraformaldehído, se retiró la muestra con unas pinzas, evitando tocar la sección a observar.



Figura 4.4: Izquierda: Cámara Branson 3210. Derecha: *Sputter Coater* (EMS 550).

Posteriormente, la muestra fue deshidratada para ser analizada mediante MEB. En resumen, la muestra fue colocada en una solución al 30% de etanol por una hora. Después se sumergió otra hora en una solución de etanol al 50%. Este procedimiento se repitió en concentraciones de 70%, 80% y 90% por una hora en cada solución. Al final se dejó la muestra por 2 horas en una concentración de etanol absoluto (99.8%). Se pulió el portamuestras de cobre (cilindro de 15 mm de alto por 10 mm de diámetro) con un abrasivo y se sometió a un baño ultrasónico en acetona por 10 minutos (en la cámara Branson 3210 Ultrasonic System) para eliminar impurezas.

Después de sacar el portamuestras del baño ultrasónico sólo se usaron pinzas para manipularlo. Se le colocó un cuadro de 10 mm por lado de cinta de carbono de dos caras de adherencia y se colocó la muestra encima haciendo presión para que no se mueva y quedara fijada correctamente.



Figura 4.5: Microscopio electrónico de barrido JEOL JSM 6060LV.

Se colocó el portamuestras con el modelo adherido en el *Sputter Coater* (EMS 550), una

cámara que mediante gas argón, rocía oro sobre la muestra para que pueda ser visible en el MED. El modelo fue sometido a este proceso 10 minutos y luego se llevó la muestra al microscopio (JEOL JSM 6060LV) para las observaciones.

## 4.6

### Identificación del lipopolisacárido

Los lipopolisacáridos (LPSs) que desencadenan la respuesta inmune en el organismo pueden ser monitoreados mediante análisis de sus ácidos grasos específicos. Estos ácidos grasos tienen grupos OH en posición 3 de la cadena. El método seleccionado para detectar estos ácidos 3-hidroxilados fue el análisis por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (GC-MS, por sus siglas en inglés gas chromatography-mass spectrometry).

El análisis de ácidos grasos mediante GC-MS fue realizado después de liberar los ácidos grasos totales de la muestra (en este caso utilizamos 1 ml de cultivo de *Escherichia coli* XL Blue) mediante solvólisis alcalina, y transformación de los ácidos derivados en productos volátiles para análisis por cromatografía de gases (Fig. 4.6).

La solvólisis alcalina fue realizada añadiendo 5 ml de KOH (hidróxido de potasio) 1 N en metanol e incubando 1 hora a 80°C. Enseguida, los ácidos grasos liberados por ruptura de enlaces éster, fueron extraídos con hexano, previa acidificación de la muestra con ácido acético glacial.

Una vez que se evaporó la muestra se le agregó nitruro de carbono, a fin de transformar el grupo carboxil -CO-OH a un éster de metilo -CO-OCH<sub>3</sub>, obteniéndose un derivado volátil, analizable por cromatografía de gases.

Para completar el tratamiento de la muestra, se le agregó n-trimetilsilil-n-metil trifluoroacetamida (abreviado MSTFA). Al reaccionar el alcohol terciario, aumentando la volatilidad del derivado graso. El proceso resumido se ilustra en la figura 4.6. Obtenida la muestra tratada se le introdujo en el EMG y se analizó.

Por ejemplo, el peso molecular del hidrógeno es 1 y el del oxígeno es 16. Para identificar un grupo alcohol (OH) debemos ver en la tabla un pico en 17 uma. Dependiendo de la altura del pico es la abundancia de dicha molécula en la muestra.

El equipo utilizado es un GC-MS modelo 5975, del fabricante Agilent Technologies, Massy, Francia. La columna utilizada fue una HP-SMS, 5 % fenil-metil-siloxano, de 30m x 0.25 mm y un espesor de la película de 0.25 micras. Los espectros se realizaron a 70 eV en modo de impacto de electrones.

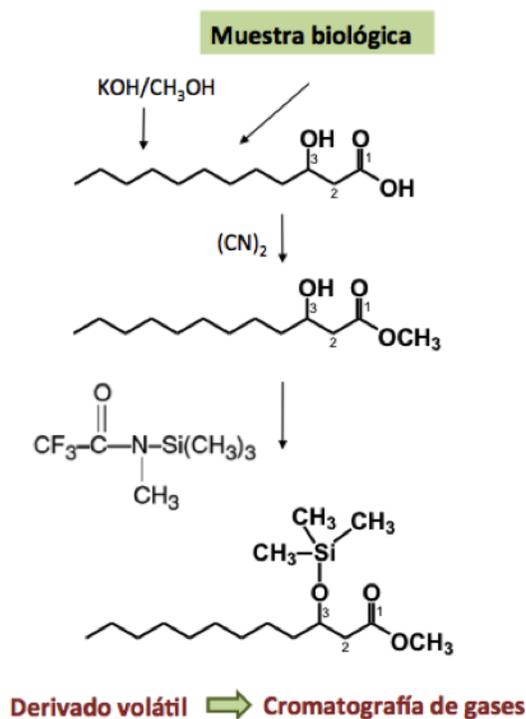


Figura 4.6: Reacción de la funcionalización del biomarcador en la molécula del LPS.

## 4.7

### Evaluación de los modelos infectados

Se evaluaron dos cepas de *Escherichia coli*, la variedad XL Blue y la ATCC 25922, ambas no patógenas y por tanto manejables en laboratorios con nivel de bioseguridad 1. Ambas cepas se analizaron realizando experimentos con distintas variables con el fin de conocer su comportamiento ante condiciones diferentes de conservación hasta su uso. De los resultados presentados se pudo hacer una selección de la bacteria a utilizar, el tratamiento que se le debe dar y las condiciones en que debe estar, de tal forma que se puedan obtener resultados con menos variabilidad en los experimentos que se llevarán a cabo con estos cálculos renales artificiales infectados. Se estimó el número de bacterias en los cálculos infectados en un lapso de 8 horas, se determinó la vida útil de los mismos, así como el intervalo óptimo para realizar las pruebas con los cálculos renales artificiales infectados.

## 4.7.1

### Preparación del material

Para la evaluación de los modelos en 5 tiempos diferentes (hora cero, dos, cuatro, seis y ocho), por triplicado se prepararon 150 tubos con tapa de rosca y 9 ml de solución salina isotónica al 0.85% en cada uno. Estos tubos se esterilizaron en autoclave (121°C por 15 minutos), al igual que 20 varillas de vidrio, dos cajas de puntas para micropipeta. Se prepararon además 65 cajas petri con agar nutritivo de soya tripticaseína.

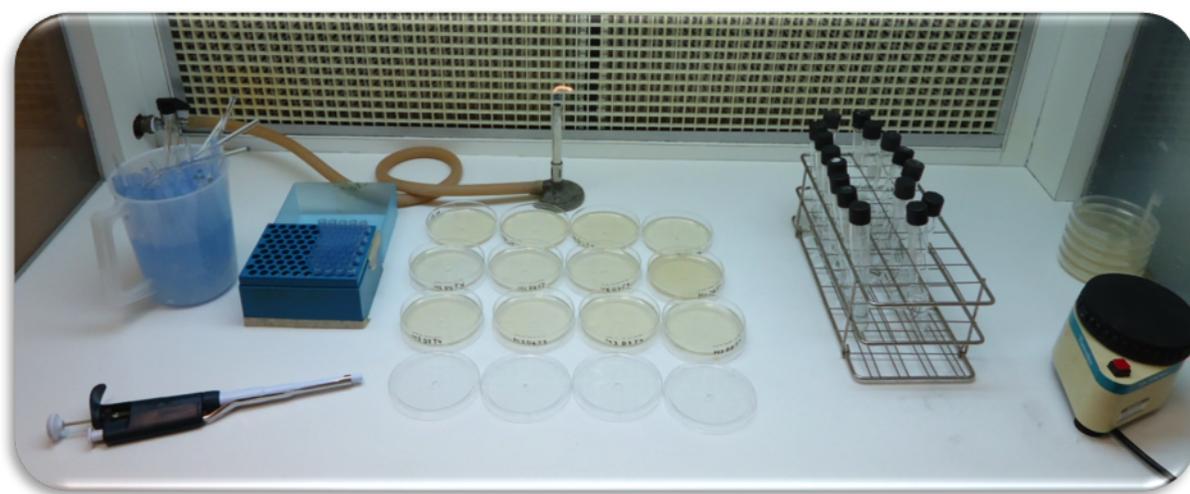


Figura 4.7: Material usado en la evaluación del modelo.

## 4.7.2

### Procedimiento

El procedimiento se realizó en una campana de flujo laminar, usando un mechero bunsen, un agitador tipo vortex, una micropipeta de 1 ml, guantes y bolsas estériles. A la hora cero (inmediatamente después de que el cálculo se solidificó), se tomó un modelo, se metió en una bolsa de plástico, se le agregaron 9 ml de solución salina isotónica y se disolvió con los dedos hasta formar un líquido blanco sin sedimentos. De esta solución se tomó 1 ml con la micropipeta y se vació en un tubo de solución salina, se agitó con el vortex y se tomó otro ml de este tubo, se vertió en el siguiente, y así hasta tener 8 tubos con diluciones consecutivas del líquido en el que se disolvió el cálculo infectado. En cada toma de muestra se cambió la punta para evitar

contaminación.

Posteriormente se tomó 1 ml de las últimas 4 diluciones (5, 6, 7 y 8) y se colocó cada ml en una caja petri con agar nutritivo, se homogeneizó la superficie de la caja distribuyendo el líquido con una varilla de vidrio, y se dejó secar en la campana de flujo laminar, junto al mechero bunsen, por 2 horas. Transcurrido ese tiempo se metieron las cajas en una incubadora a 37°C por 24 horas. Esta prueba se hizo por triplicado y cada dos horas. Después de las 24 horas se contó la cantidad de UFC usando un analizador de cajas petri.



Figura 4.8: Incubadora (izquierda) y caja petri con varias unidades formadoras de colonias (derecha).

## CAPÍTULO

### 5

## RESULTADOS

### 5.1

#### Evaluación de la cepa XL Blue

Esta variedad se evaluó en 4 condiciones distintas, todas las pruebas se realizaron por triplicado, obteniéndose los siguientes resultados por tipo de prueba. Cabe señalar que en todos los casos se muestra la gráfica a lo largo del tiempo de la dilución 5, por ser la más representativa en cuanto al número de UFC en el lapso de las primeras 8 horas.

#### 5.1.1

##### Prueba 1

Esta se llevó a cabo con la metodología descrita en el capítulo 3, pero sin la parte de adaptación de la bacteria. Se evaluaron los modelos infectados con el procedimiento del capítulo 4. Los modelos infectados se dejaron a temperatura ambiente (25°C en un ambiente estéril) antes de evaluarlos.

Bacteria XL Blue sin adaptar y en intemperie					
Tiempo	UFC promedio	Desv. Est.	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
0	608	629	893	407	525
2	141	33.1	132	134	156
4	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0

Figura 5.1: Número de UFC de la dilución 5 por muestra a 5 tiempos diferentes.

En la figura 6.2 podemos observar que existe gran cantidad de bacterias en la hora cero (608 UFC), pero también hay gran variabilidad, pues la barra de error incluso se sale del gráfico ( $\pm 629$ ). En la hora dos vemos una disminución considerable de bacteria viable, y desde la hora cuatro ya no hay registro de infección en la evaluación de la dilución 5.

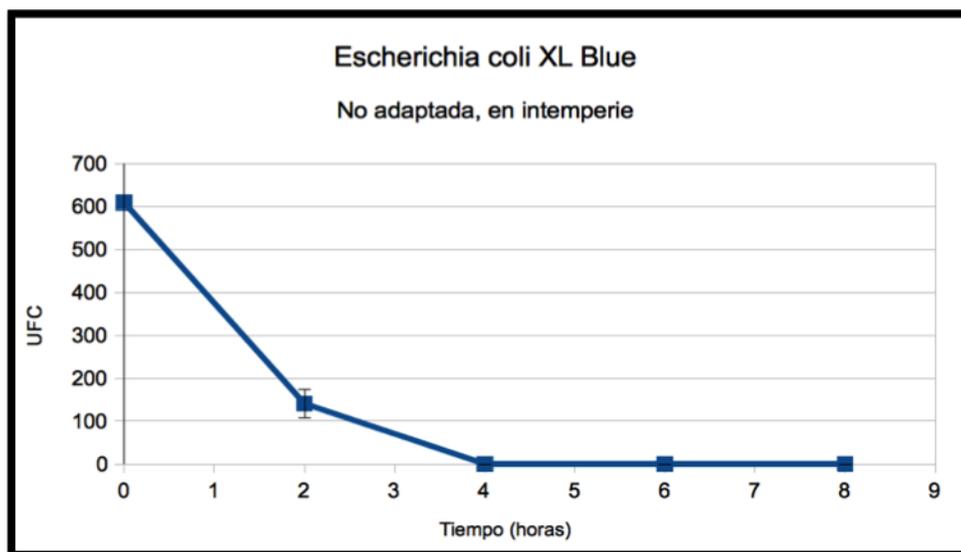


Figura 5.2: Gráfico que muestra la disminución de las UFC a través del tiempo.

## 5.1.2

### Prueba 2

Con la misma bacteria sin adaptar, se almacenaron los cálculos en bolsas separadas con 9 ml de solución salina isotónica al 0.85 % dentro de la incubadora, a 37°C hasta el momento de evaluarlos (con excepción de los 3 modelos analizados en la hora cero).

Bacteria XL Blue sin adaptar y en incubación					
Tiempo	UFC promedio	Desv. Est.	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
0	608	629	893	407	525
2	85	100	130	53	71
4	65	106	114	47	34
6	40	13.8	45	41	34
8	17	20.7	24	20	8

Figura 5.3: Tabla de resultados del número de UFC de la dilución 5 por muestra a 5 tiempos diferentes.

Durante las primeras dos horas hubo una inactivación de aproximadamente 80 % y posteriormente se observa una disminución hasta la hora ocho. Es apreciable también una disminución de la desviación estándar en las últimas dos horas del periodo.

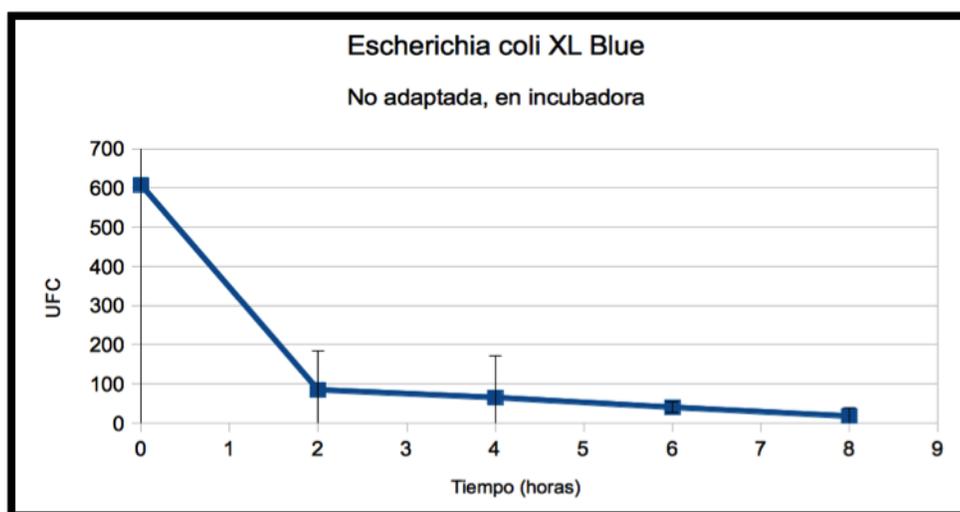


Figura 5.4: Gráfico que muestra la disminución de las UFC a través del tiempo.

### 5.1.3

#### Prueba 3

Para esta prueba se usó el procedimiento de adaptación, usando bacterias que resistieron las últimas horas en sulfato de calcio, recolectadas de la caja de cultivo de la dilución menor con presencia de UFC. Una vez sintetizados los modelos se dejaron a la intemperie, como en la prueba 1 y se obtuvo la figura 5.6.

Bacteria XL Blue adaptada y en incubación					
Tiempo	UFC promedio	Desv. Est.	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
0	86	51.8	63	90	104
2	102	61.7	74	109	122
4	70	51.9	84	46	80
6	125	104.4	163	133	80
8	0	0	0	0	0

Figura 5.5: Número de UFC de la dilución 5 por muestra a 5 tiempos diferentes.

Al usar esta cepa adaptada se obtuvo menor carga microbiana desde la hora cero, aproximadamente un sexto de bacteria viable en comparación con la no adaptada. Durante las dos primeras horas no hubo un cambio significativo, pero sí hubo una disminución considerable entre la hora dos y la cuatro, llegando a cero a la hora seis.

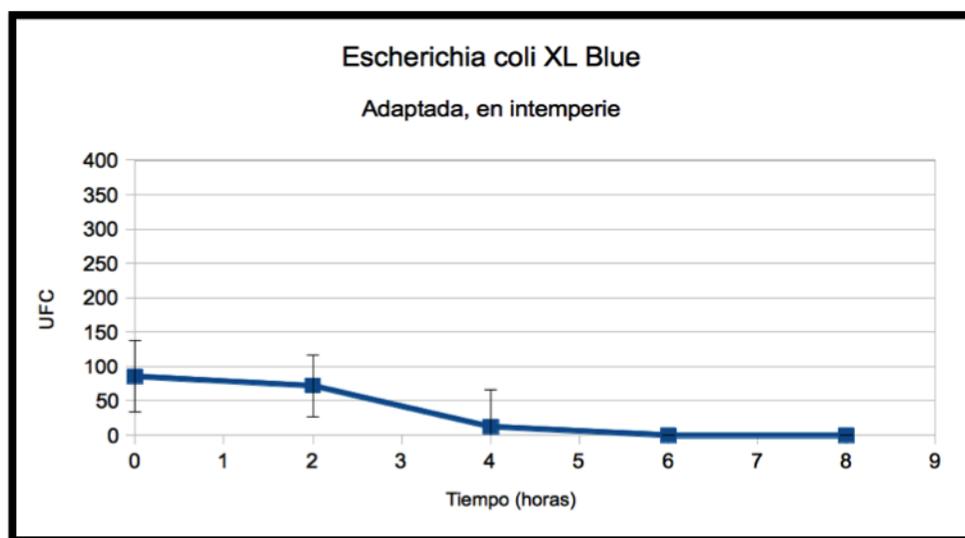


Figura 5.6: Gráfico que muestra la disminución de las UFC a través del tiempo.

## 5.1.4

### Prueba 4

Para este procedimiento se usó la misma cepa adaptada de la prueba 3, pero en lugar de dejar los modelos a la intemperie se almacenaron en incubación, a 37°C en 9 ml de solución salina isotónica.

Bacteria XL Blue adaptada y en incubación					
Tiempo	UFC promedio	Desv. Est.	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
0	86	51.8	63	90	104
2	102	61.7	74	109	122
4	70	51.9	84	46	80
6	125	104.4	163	133	80
8	-	-	-	-	-

Figura 5.7: Número de UFC de la dilución 5 por muestra a 5 tiempos diferentes.

En la figura 6.8 puede apreciarse que el número de bacterias se mantiene prácticamente constante durante las primeras seis horas. La hora ocho no se evaluó.

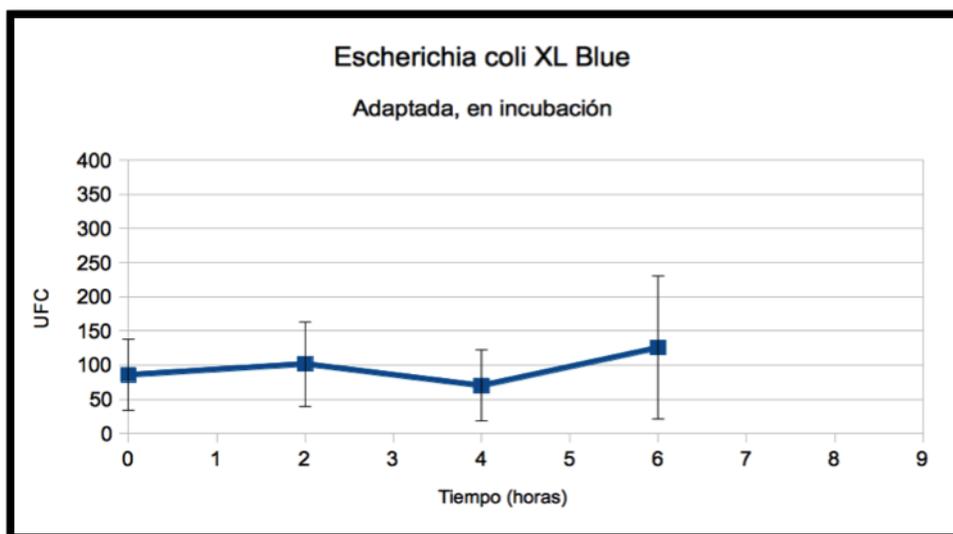


Figura 5.8: Gráfico que muestra la disminución de las UFC a través del tiempo.

## 5.2

### Evaluación de la cepa ATCC 25922

Se trabajó con una cepa diferente para comparar la resistencia al medio de sulfato de calcio y determinar si existe una diferencia significativa al usar otra variedad de *Escherichia coli*.

#### 5.2.1

##### Prueba 5

Se utilizó esta cepa sin adaptación y dejando los modelos a la intemperie. Lo más notorio fue que con el procedimiento básico se encontró presencia de UFC hasta la hora ocho, habiendo menor variabilidad en número desde la hora cuatro hasta el término del experimento. Durante las primeras 4 horas se advierte una incertidumbre grande, pero una disminución de 200 a 20 UFC en ese primer lapso.

Bacteria ATCC 25922 sin adaptar y en intemperie					
Tiempo	UFC promedio	Desv. Est.	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
0	207	109	256	192	172
2	155	130	174	195	96
4	18	25	26	22	7
6	25	26.3	33	13	29
8	15	7.5	15	12	18

Figura 5.9: Número de UFC de la dilución 5 por muestra a 5 tiempos diferentes.

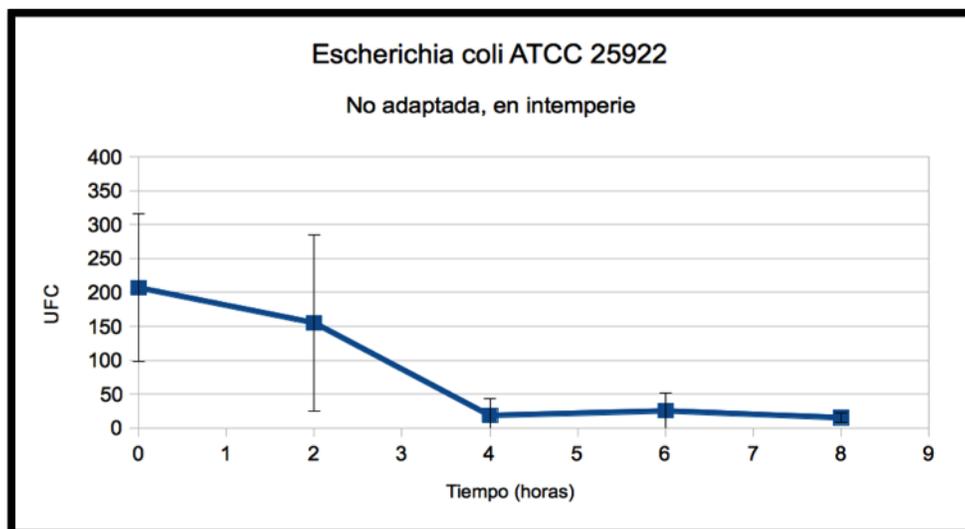


Figura 5.10: Gráfico que muestra la disminución de las UFC a través del tiempo.

## 5.2.2

### Prueba 6

Se usó la cepa adaptada y los modelos inoculados se dejaron a la intemperie hasta la evaluación. Los resultados mostraron una menor incertidumbre en el intervalo de la hora dos a la hora ocho y menor disminución en el número de bacterias presentes desde la hora cero hasta la hora ocho. Al adaptarse la cepa es visible una disminución de la infección en los modelos, al igual que con la variedad XL Blue, pero aproximadamente 25% menor con respecto al cultivo original. El periodo de menor disminución en la carga microbiana se registra desde la hora cuatro hasta la hora ocho.

Bacteria ATCC 25922 adaptada y en intemperie					
Tiempo	UFC promedio	Desv. Est.	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
0	152	68.1	183	140	132
2	125	38.1	122	128	-
4	46	57	84	32	23
6	32	24.9	42	33	22
8	32	25.8	20	38	38

Figura 5.11: Número de UFC de la dilución 5 por muestra a 5 tiempos diferentes.

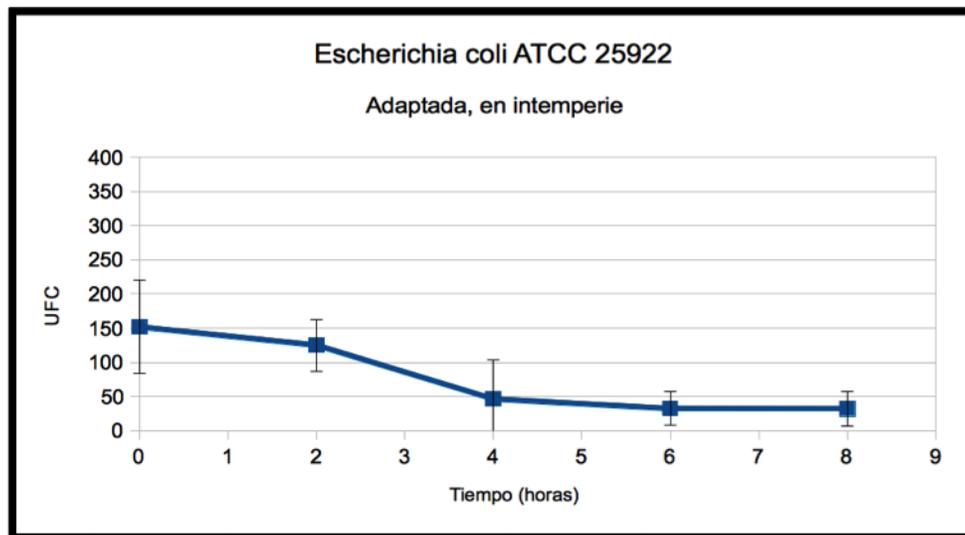


Figura 5.12: Gráfico que muestra la disminución de las UFC a través del tiempo.

## 5.3

### Micrografías del modelo

Para poder hacer una evaluación más completa de los modelos infectados es importante conocer no sólo su composición química y su carga bacteriana, sino también su morfología. En la siguiente figura podemos apreciar el tamaño de los cristales de sulfato de calcio en 4 micrografías a diferentes aumentos. Dichas imágenes se obtuvieron mediante microscopía electrónica de barrido, habiendo preparado las muestras con el procedimiento estándar de fijación con paraformaldehído, secado con etanol y recubierto con una capa fina de oro.

Se observa una serie de cristales con formas prismáticas alargadas y terminaciones en ángulos muy cerrados. Es en ese ambiente donde se encuentran las bacterias en los modelos. En la siguiente micrografía se puede apreciar la presencia de la bacteria (recuadro) en un modelo infectado. Es sencillo identificar a la bacteria por su característica forma de grano de arroz, con los extremos redondeados y por su tamaño característicos de aproximadamente 8-10 micras.

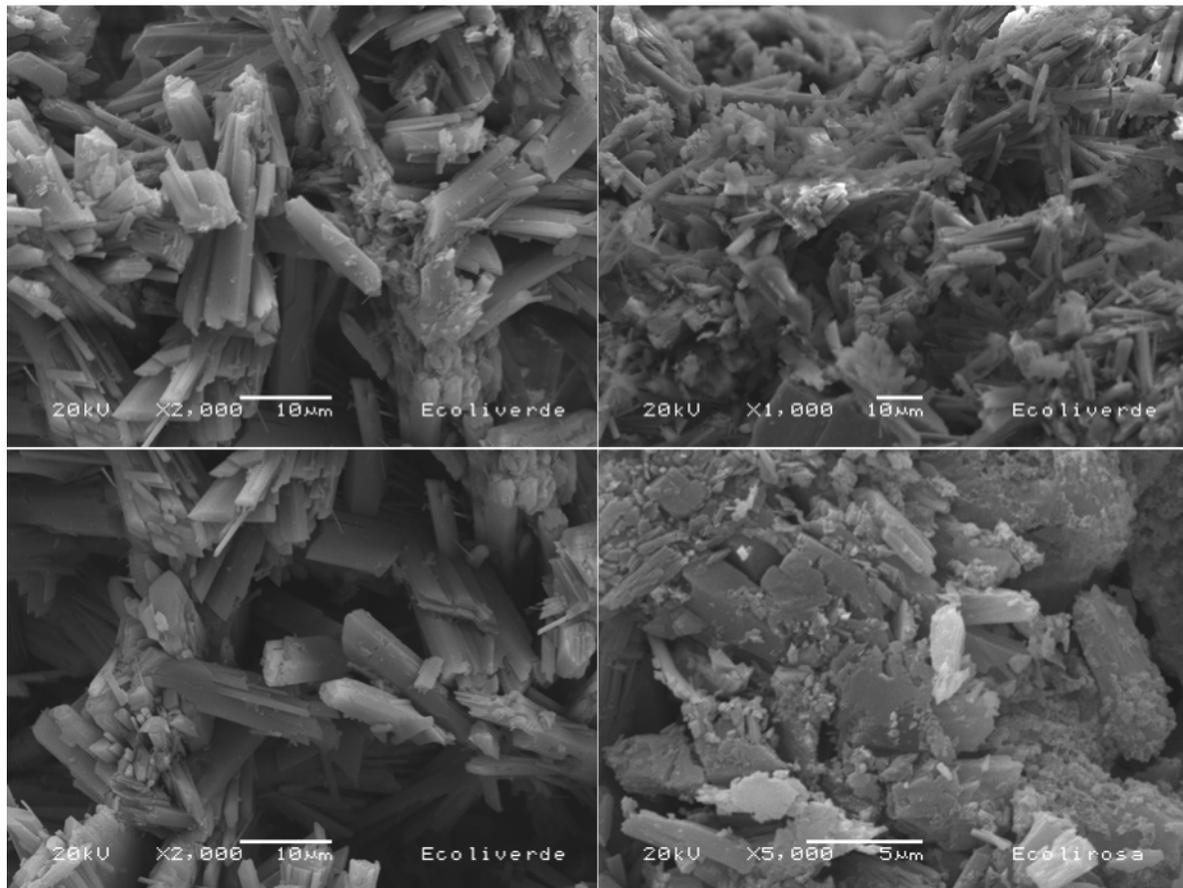


Figura 5.13: Micrografías de un modelo de cálculo renal artificial compuesto de 90% sulfato de calcio dihidratado y 10% sulfato de calcio a diferentes aumentos.

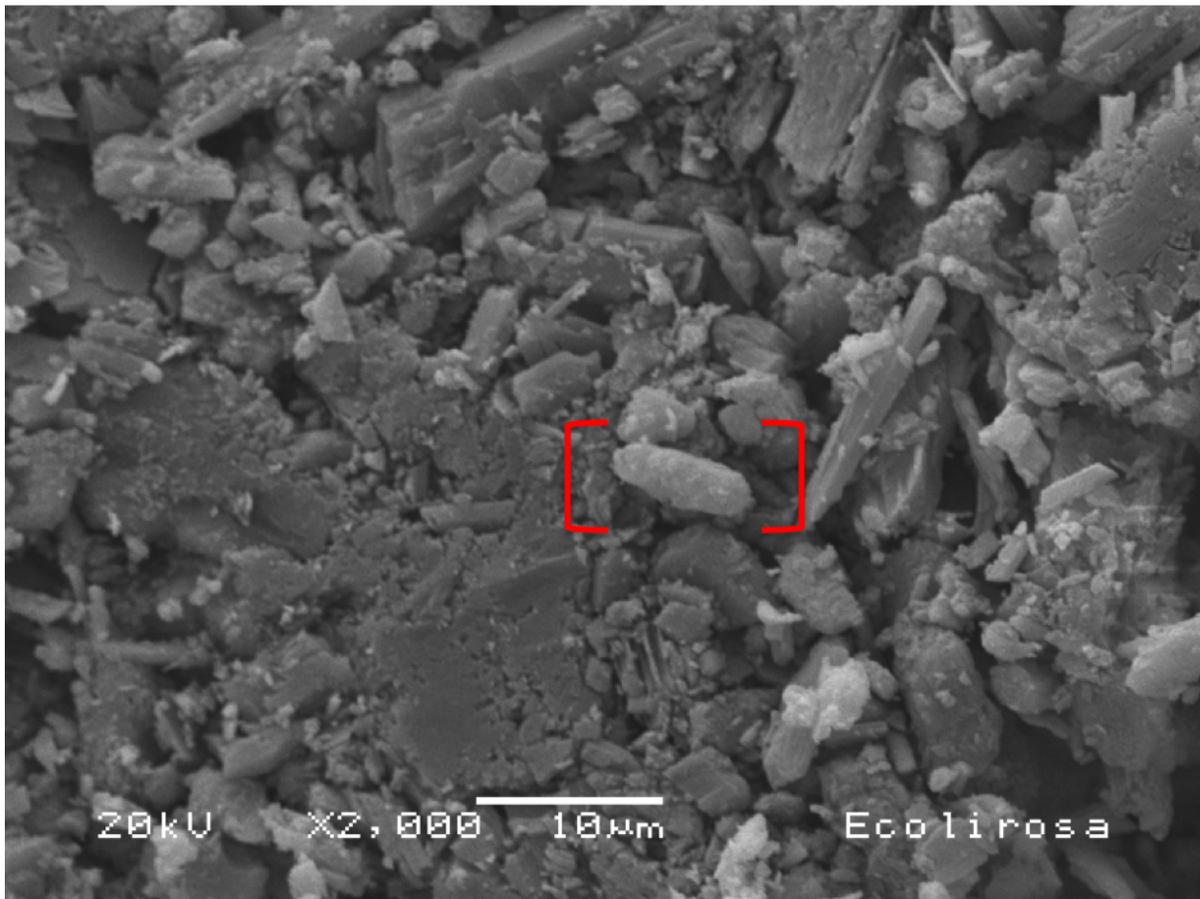


Figura 5.14: Micrografía de un modelo señalando una bacteria.

Las etiquetas mostradas en las micrografías con las leyendas "Ecoliverde" y "Ecolirosa" corresponden a la clave asignada para el análisis de las muestras fijadas con paraformaldehído y glutaraldehído respectivamente, no tiene que ver con alguna característica de la cepa.

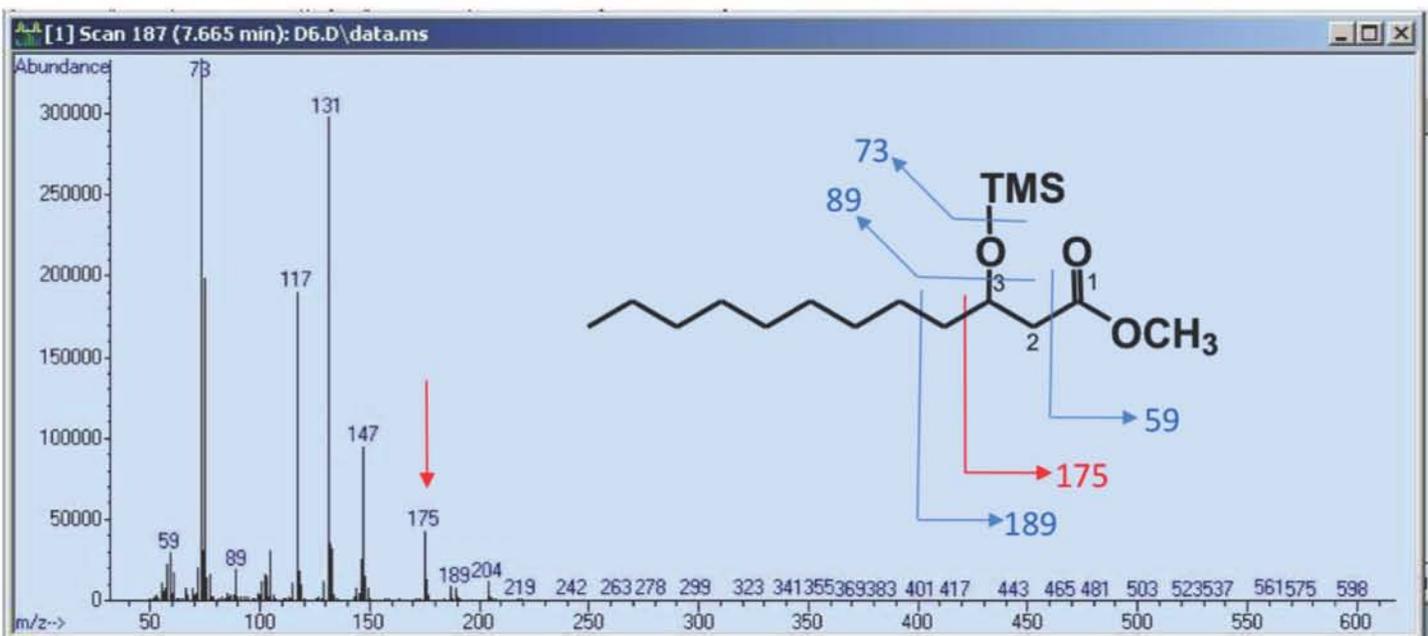
## 5.4

### Análisis del LPS en el GC-MS

Obtenida la muestra tratada se le introdujo en el GC-MS y se analizó. Lo que mide la espectroscopía de masas-gases es la masa de las moléculas introducidas a la columna y transportadas por un gas acarreador que no reacciona con la muestra, separando los núcleos atómicos en función de su relación masa-carga. En el espectro de masas se observan picos que determinan el número de uma. Conociendo la molécula que se quiere identificar y calculando las uma de su fragmentación en diferentes puntos de la cadena molecular es posible identificar la presencia de ese compuesto en la muestra.

Se observa el pico característico en 175 uma, correspondiente a una ruptura que genera un fragmento característico de derivados de ácidos grasos 3-OH, típicos de LPS. También se generan señales a 59, 73, 89 y 189, correspondientes a fragmentaciones de los mismos compuestos grasos (figura 6.15).

Figura 5.15: Espectro del LPS con el biomarcador TMS.



## CAPÍTULO

### 6

# DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En estudios anteriores se trabajó con diversos tipos de bacteria, como *Salmonella typhimurium* y *Listeria monocytogenes* [20], con el fin de investigar su inactivación por medio de ondas de choque. Se había investigado este mismo proceso incluso en diferentes cepas de *Escherichia coli*, como la 0157:H7 y la ATCC 10536. En estos casos se buscaba observar el efecto de las ondas de choque sobre la bacteria contenida en soluciones e incluso explorando una potencial aplicación en la preservación de alimentos.

Hasta ahora no se había investigado el uso de las cepas XL Blue y ATCC 25922 de *Escherichia coli* para realizar experimentos *ex vivo* con la suficiente justificación experimental para ser representativas del caso clínico. Tampoco se había contemplado la posibilidad de darle un tratamiento previo a la cepa seleccionada, sólo se utilizaba la bacteria sin adaptar.

Fue inesperado el comportamiento de la primera cepa utilizada, la XL Blue, pues no se había contemplado la posibilidad de usar otra sino hasta que, después de repetidos intentos en los que se variaban las condiciones buscando reducir el error experimental, se encontró que era muy sensible a un medio rico en sulfato de calcio. Lo anterior tenía como consecuencia un periodo muy corto de viabilidad de la bacteria sin protección y sin adaptación al medio.

Se optó por explorar otra cepa, pensando en la ATCC 25922 por ser no patógena (al igual que la XL Blue) y por su disponibilidad. Desde los primeros experimentos mostró un comportamiento de mayor resistencia al medio. La adaptación de la cepa contribuyó a disminuir la desviación estándar en los resultados al usar los modelos infectados en los estudios subsecuentes.

---

Se buscó una cepa de *E. coli* con las características adecuadas para asegurar una vida útil mayor del cálculo artificial infectado y una variabilidad menor en la determinación de la carga microbiana del mismo. Se encontró que de las combinaciones analizadas la de mejor comportamiento es la cepa ATCC 25922 en condiciones de adaptación y con un almacenamiento en intemperie (sin incubación).

En la investigación llevada a cabo por Gutiérrez J. *et al* [18], se menciona la medición de las proteínas de la bacteria posterior al tratamiento de ondas de choque (medía su concentración en mg/ml). Sin embargo, en el presente estudio se hace una caracterización y cuantificación del LPS que provoca el choque séptico y se obtuvo una metodología más precisa para medir el fenómeno. Se dejó de lado la medición de proteínas pues las que actúan como endotoxinas son muy específicas y la medición realizada en el estudio de Gutiérrez no hizo la distinción particular entre los componentes proteicos.

Adicional al proceso de caracterización de la cepa se debe modelar la curva de contenido de LPS en el medio a través del tiempo sin usar el litotritor y determinar el contenido de endotoxina que se genera por el metabolismo natural de la carga microbiana. Restando este contenido se podrá contar con un procedimiento con menor variabilidad en las mediciones.

Al momento ninguno de los estudios realizados en el estudio de cálculos artificiales infectados había considerado la morfología del mismo como factor para la lisis de las células. Se menciona como hipótesis [8 y 18], pero esta es la primera vez que se observa la microestructura de los litos infectados por MEB y se ve que la estructura de los cristales de sulfato de calcio, al tener una forma prismática alargada y con terminaciones en ángulos cerrados, puede influir de manera considerable en la lisis de las bacterias al momento de colapsar la estructura cuando la onda de choque incide sobre el modelo.

Ese fenómeno estructural en sí mismo es objeto de otro estudio más detallado, sin embargo lo planteado en el presente escrito es una base en la búsqueda de un procedimiento de LEOCH que fragmente los cálculos renales dispersando la menor cantidad posible de endotoxina.

## CAPÍTULO

### 7

# CONCLUSIONES

1. Si bien, con 3 réplicas por experimento fue posible encontrar una tendencia en la disminución de la carga microbiana, se requiere de un número mayor de repeticiones para poder analizar estadísticamente el fenómeno estudiado.
2. La cepa que muestra un mejor comportamiento para su uso en fabricación de cálculos renales infectados es la ATCC 25922, pues tiene un tiempo de vida mayor que la cepa XL Blue.
3. La metodología presentada para adaptar la cepa ATCC 25922 es recomendable para cumplir los objetivos propuestos en esta tesis.

# BIBLIOGRAFÍA

- [1] CASS A.S. (1992). *In situ extracorporeal shock wave lithotripsy for obstructing ureteral stones with acute renal colic*. The Journal of Urology. 148 (6), pp. 1786-1787.
- [2] SECRETARÍA DE SALUD (marzo 2009). *Infecciones urinarias pueden derivar en daño al riñón*. México Sano. 7, p. 11.
- [3] SECRETARÍA DE SALUD (número 18, 2010). *La enfermedad renal crónica tarda hasta 10 años en anunciarse*. México Sano. 18, p.12.
- [4] RIBAS V.J.; VELLIDO A.; RUIZ-RODRÁGUEZ, J.C.; RELLO, J. (2012). *Severe sepsis mortality prediction with logistic regression over latent factors*. Expert Systems with Applications. 39, pp. 1937-1943
- [5] LOSKE, A.M. (2007). *Shock Wave Physics for Urologists*. UNAM. ISBN 978-970-32-4377-8. p. 19
- [6] FOLBERTH W.; KOHLER G.; ROHWEDDER A.; MATURA E. (1992). *Pressure distribution and energy flow in the focal region of two different electromagnetic shock waves sources*. Journal of Lithotripsy and Stone Disease. 4 (1), pp. 1-7.
- [7] SORKHI H.; HEDAIATI F.; BIJANI A.; (2011). *Efficacy of potassium citrate solution in children with urolithiasis*. Journal of Babol University of Medical Sciences. 13 (6), pp. 10.
- [8] QUINTERO M.D.S.; ÁLVAREZ, U.M., WACHER C.; GUTIÉRREZ J.; CASTAÑO-TOSTADO E.; FERNÁNDEZ F.; LOSKE A.M. (2008). *Interaction of Shockwaves with Infected Kidney Stones: Is There a Bactericidal Effect?*. Journal of Endourology.. 22 (8), pp. 1629-1637.

- 
- [9] GERDESMEYER L.; VON EIFF C.; HORN C.; HENNE M.; ROESSNER M.; DIEHL P.; GOLLWITZER H; (2005) *Antibacterial effects of extracorporeal shock waves*. *Ultrasound in Med. & Biol.* 31 (1), pp. 115-119.
- [10] ZIGLIOLI F.; FERRETTI S.; SALSÌ P.; DINALE F.; CIUFFREDA M.; CAMPOBASSO D.; FRATTINI A. (2010). *Percutaneous nephrolithotomy (PCNL) in a 9-year-old patient with horseshoe kidney*. *Urologia*. 77 (2), pp. 150-153.
- [11] BERTRAND R.; DANIELSON D.; GONG V.; OLYNIK B.; EZE M.O. (2011). *Sodium nitroprusside may modulate Escherichia coli antioxidant enzyme expression by interacting with the ferric uptake regulator*. *Medical Hypotheses*. (Artículo preimpreso).
- [12] SENEGES C.; WRBAS K-T.; ALTENBURGER M.; FOLLO M.; SPITZMULLER B.; WITTMER A.; HELLWIG E.; AL-AHMAD A. (2011). *Bacterial and Candida albicans Adhesion on Different Root Canal Filling Materials and Sealers*. *Journal of Endodontics*. 37 (9), pp. 1247-1252.
- [13] MICHAELS E.K.; FOWLER JR.; J.E.; MARIANO M. (1988). *Bacteriuria following extracorporeal shock wave lithotripsy of infection stones*. *The Journal of Urology*. 140 (2), pp. 254-256.
- [14] PRABAKHARAN S.; TEICHMAN J.M.H.; SPORE S.S.; SABANEHGH E.; GLICKMAN R.D.; MCLEAN R.J.C. (1999). *Proteus Mirabilis viability after lithotripsy of struvite calculi*. *The Journal of Urology*. 162 (5), pp. 1666-1669.
- [15] RIAD E.M.; ROSHDY M.; ISMAIL M.A.A.; EL-LEITHY T.R.; EL GHOUBASHY S.; EL GANZOURY H.; EL BAZ A.G.; KAMEL A.I. (2009). *Extracorporeal shock wave lithotripsy (ESWL) versus percutaneous nephrolithotomy /PCNL in the eradication of persistent bacteriuria associated with infected stones* . *Urotoday International Journal*. 2 (1).
- [16] STOLLER M.L.; WORKMAN S.J. (1990). *The effect of extracorporeal shock wave lithotripsy on the microbiological flora of urinary calculi*. *The Journal of Urology*. 144 (3), pp. 619-621.
- [17] MCALEER I.M.; KAPLAN G.W.; BRADLEY J.S.; CARROLL S.F.; GRIFFITH D.P. (2003). *Endotoxin content in renal calculi*. *The Journal of Urology*. 169 (5), pp. 1813-1814.
- [18] GUTIÉRREZ J.; ÁLVAREZ U.M.; MUES E.; FERNÁNDEZ F.; GÓMEZ G.; LOSKE A.M. (2008). *Inactivation of bacteria inoculated inside urinary stone-phantoms using intracorporeal lithotripters*. *Urol Res*. 36 (1), pp. 67-72
- [19] GÓMEZ-NÚÑEZ J.G.; ÁLVAREZ U.M.; FERNÁNDEZ F.; ACEVES J.G.; LOSKE A.M. (2009). *Interaction of intracorporeal lithotripters with Proteus mirabilis inoculated inside artificial calcium and struvite stones*. *Urol Res*. 23 (3), pp. 519-522.
- [20] ÁLVAREZ U.M.; LOSKE A.M.; CASTAÑO-TOSTADO E.; PRIETO F.E. (2004). *Inactivation of Escherichia coli 0157:H7, Salmonella typhimurium and Listeria monocytogenes by*

*underwater shock waves*.. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 5 (4) pp. 459-463

- [21] LOSKE A.M.; ÁLVAREZ U.M.; HERNÁNDEZ-GALICIA C.; CASTAÑO-TOSTADO E.; PRIETO F.E. (2002). *Bactericidal effect of underwater shock waves on Escherichia coli ATCC 10536*.. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 3 (4), pp. 321-327