



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA

ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE ONDAS DE CHOQUE CON
EMBRIONES DE *DROSOPHILA MELANOGASTER* EMPLEANDO
NANOPARTÍCULAS COMO MARCADORES

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Licenciado en Tecnología

P R E S E N T A:

DANIEL TAPIA MERINO

ASESORES:

DR. JUAN RAFAEL RIESGO ESCOVAR, director de tesis

DR. ACHIM MAX LOSKE MEHLING, co-director de tesis



Juriquilla, Querétaro, 2019



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 y amigos

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, como al elegir la universidad y licenciatura de la que he egresado, o cursar un semestre de movilidad en Sídney, Australia.

A mis compañeros de licenciatura, con quienes pude compartir muchas ideas que me ayudaron a crecer. También a mis compañeros en el Laboratorio de Genética de Transducción de Señales quienes nunca dudaron que lograría mis objetivos.

Agradezco al Dr. Remy Fernand Ávila Foucat, con quien pude aprender mucho de lo que ahora sé de microscopía óptica y me tuvo mucha confianza mientras estuve en su equipo de trabajo, pese a que aún estaba iniciando mi labor científica.

Se agradece ampliamente a la empresa Richard Wolf GmbH (Knittlingen, 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.

Al Dr. Gabriel Ramos Ortiz del Centro de Investigaciones en Óptica (CIO), por suministrar las nanopartículas fluorescentes utilizadas en el trabajo experimental.

Un agradecimiento especial para la laboratorista Paula Bernardino Peláez, quien hizo posible prácticamente todos los experimentos llevados a cabo en el Laboratorio de Ondas de Choque. Así mismo, agradezco el apoyo técnico brindado por el Dr. Juan Manuel Murillo Maldonado en los experimentos con moscas, realizados en el Laboratorio de Genética de Transducción de Señales.

No puedo concluir esta pequeña sección sin agradecer al Dr. Juan Rafael Riesgo Escovar y al Dr. Achim Max Loske Mehling, quienes me permitieron integrarme a su equipo de trabajo en el Laboratorio de Genética de Transducción de Señales y el Laboratorio de Ondas de Choque, respectivamente. Gracias a la confianza que han depositado en mí es que he completado este trabajo de tesis.

Contenido

Resumen	5
1. Introducción.....	6
1.1 Ondas de choque del tipo usado para aplicaciones biomédicas.....	6
1.1.1 Cavitación acústica	6
1.1.2 Aplicaciones biomédicas.....	7
1.1.3 Aplicaciones biológicas	8
1.2 <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo biológico.....	9
1.2.1 Importancia de <i>Drosophila melanogaster</i>	9
1.2.2 Estudio del funcionamiento de genes en <i>Drosophila melanogaster</i>	10
1.2.3 Desarrollo temprano del embrión en <i>Drosophila melanogaster</i>	11
1.2.4 Capas exteriores del embrión en <i>Drosophila melanogaster</i>	12
1.2.5 Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	13
1.3 Nanomateriales	15
1.3.1 Aplicaciones tecnológicas	16
1.3.2 Toxicidad de nanomateriales en <i>Drosophila melanogaster</i>	16
1.4 Antecedentes	17
1.5 Justificación	18
1.6 Objetivo general.....	19
1.6.1 Objetivos específicos	19
1.7 Hipótesis	19
2. Metodología.....	20
2.1 Cría de moscas y recolección de embriones	20
2.2 Pruebas del efecto de las ondas de choque en embriones con solución de nanopartículas	20
2.3 Registro y observación de moscas	22
2.4 Preparación y observación de cortes histológicos	22
2.5 Microinyección de nanopartículas fluorescentes en larvas de moscas con el equipo <i>Nanoliter 2000</i>	23
2.6 Manejo apropiado de moscas de la fruta	24
3. Resultados	25

3.1 Tratamiento de embriones con ondas de choque en solución de nanopartículas	25
3.1.1 Registro de supervivencia de moscas	25
3.1.2 Observación con fluorescencia de larvas	27
3.1.3 Efectos en el desarrollo de las moscas.....	29
3.2 Moscas microinyectadas con solución de nanopartículas con el equipo <i>Nanoliter 2000</i>	30
3.2.1 Observación de larvas en fluorescencia	30
3.2.2 Observación de fluorescencia de nanopartículas en microscopio	31
3.2.3 Observación de cortes histológicos	32
3.3 Cortes histológicos de moscas tratadas con ondas de choque	34
3.3.1 Observación de moscas control.....	34
3.3.2 Observación de cortes de moscas tratadas.....	35
4. Aplicaciones propuestas.....	38
4.1 Método de transfección en <i>Drosophila melanogaster</i>	38
4.2 Inserción de nanopartículas	39
5. Conclusiones generales	40
6. Anexo: Figuras suplementarias	41
6.1 Tratamiento de embriones con ondas de choque en solución de nanopartículas	41
6.1.1 Efectos en el desarrollo de las moscas.....	41
6.2 Moscas microinyectadas con solución de nanopartículas con el equipo <i>Nanoliter 2000</i>	42
6.2.1 Observación de larvas en fluorescencia	42
6.2.2 Observación de cortes histológicos	43
6.3 Cortes histológicos de moscas tratadas con ondas de choque	44
6.3.1 Observación de moscas control.....	44
6.3.2 Observación de cortes de moscas tratadas.....	45
7. Índice de figuras	46
8. Glosario.....	48
9. Referencias	49

Resumen

La ciencia y la tecnología requieren de la integración de diversas disciplinas para dar solución a una problemática. Hoy en día es más frecuente encontrar trabajos de investigación que involucren distintas áreas, lo cual requiere a su vez que los investigadores se aventuren a explorar conocimientos más allá de su especialidad. La física y la biología normalmente se encuentran en aplicaciones tecnológicas, generando un área de interés para muchas personas.

En la presente tesis se estudian los efectos que tienen las ondas de choque en la perforación de las capas externas del embrión temprano de la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), utilizando nanopartículas fluorescentes de carbono como marcadores. Este trabajo busca dar bases para el desarrollo de una nueva técnica que facilite el estudio de los genes presentes en *Drosophila melanogaster*, un modelo biológico ampliamente utilizado en investigación de distintas enfermedades humanas, así como en toxicología.

El primer apartado presenta información sobre la cavitación acústica generada por las ondas de choque en un medio líquido, así como las aplicaciones biomédicas y biológicas. También se incluye la importancia de *Drosophila* como modelo genético, haciendo hincapié en las características únicas de la mosca de la fruta que hacen interesante la inserción de material exógeno y los aspectos a considerar para hacerlo posible. Se agrega una breve discusión sobre el uso documentado de nanomateriales, incluyendo estudios que involucran *Drosophila*, los cuales están enfocados en toxicología. También se mencionan los primeros pasos que han sido reportados sobre el tema de esta tesis.

El segundo apartado muestra la metodología del trabajo realizado para conocer la supervivencia de las moscas al tratamiento con ondas de choque, así como observaciones *in vivo* de posibles cúmulos de nanopartículas insertados en las moscas gracias a la acción de las ondas de choque, además de la observación hecha en cortes de larvas y adultos de *Drosophila*, tratados con ondas de choque o microinyectados con el equipo *Nanoliter 2000*.

El tercer capítulo muestra y describe los resultados obtenidos en distintas pruebas, además de ofrecer la respectiva discusión.

El cuarto apartado discute la posible aplicación que tiene esta investigación, relacionadas a la introducción de material exógeno en el embrión temprano de *Drosophila*.

Por último, se encuentran las conclusiones generales, un anexo con imágenes suplementarias de los resultados y la bibliografía citada en este trabajo.

1. Introducción

1.1 Ondas de choque del tipo usado para aplicaciones biomédicas

Una onda de choque es una perturbación de presión transitoria que se propaga en el espacio tridimensional, con un aumento repentino de la presión ambiental a su máxima presión en el frente de onda, que en aplicaciones clínicas suelen generarse en un medio acuoso y utilizando un gel de acoplamiento para facilitar la transmisión en tejidos biológicos (Ogden *et al.*, 2001). El empleo biomédico de las ondas de choque suele ser referido como terapia con ondas de choque extracorpóreas (ESWT, por su nombre en inglés), o en el caso de la pulverización de cálculos renales, como litotricia con ondas de choque extracorpóreas (ESWL, por su nombre en inglés) (Wang, 2012). Aunque no se profundiza al respecto en esta discusión, se conoce que las ondas de choque pueden transmitirse por distintos medios, por lo que una onda de choque también puede encontrarse en fenómenos como el cambio de presión causado por un avión supersónico (Krehl, 2008).

1.1.1 Cavitación acústica

La cavitación acústica es un fenómeno físico que involucra eventos rápidos de expansión y compresión (colapso) de burbujas dentro de un medio, el cual produce sono-luminiscencia, efectos sono-químicos e incrementa la acción erosiva (Neppiras, 1980). Se trata de uno de los fenómenos principales que es responsable de los efectos observados en ESWL y ESWT (Loske, 2017). La cavitación se produce con la transformación rápida de la presión positiva de la onda de choque en un esfuerzo de tensión en el agua, lo cual resulta en la compresión de cavidades llenas de vapor, o “burbujas”, las cuales se expanden y abruptamente se comprimen de forma asimétrica (figura 1), generando microjets de alta velocidad que provocan daños a un material, acompañados de ondas de choque secundarias (Sass *et al.*, 1991). La velocidad de los microjets en promedio es de 210 m/s, pero pueden llegar a velocidades alrededor de 770 m/s, dependiendo del tamaño original de la burbuja (Philipp *et al.*, 1993).

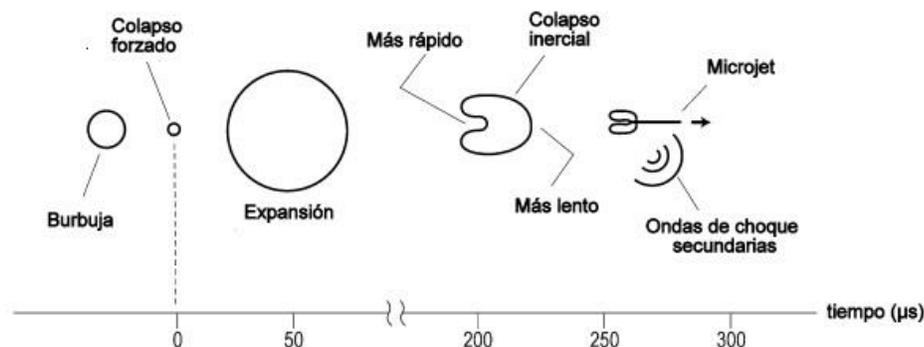


Figura 1. Esquema del fenómeno de cavitación acústica inducido por las ondas de choque de uso médico (modificado de López-Marín et al., 2017).

1.1.2 Aplicaciones biomédicas

Las ondas de choque pueden desintegrar cálculos renales y biliares, sin embargo, sus aplicaciones se han extendido también a tratamientos ortopédicos (Thiel, 2001). En este sentido, la terapia de ondas de choque se ha utilizado exitosamente en pacientes con padecimientos como la tendinitis calcificante de hombro (Loew *et al.*, 1999), y la fascitis plantar (Wang *et al.*, 2002), con las ventajas de no ser invasiva y tener un bajo grado de complicaciones. Los efectos bactericidas de las ondas de choque han sido demostrados y podrían servir como un nuevo tratamiento no invasivo de infecciones (Gerdesmeyer *et al.*, 2005).

Su uso clínico en urología se remonta a inicios de la década de 1980 siendo rápidamente aceptado como tratamiento, ya que no se presentaron repercusiones mayores en los pacientes (Chaussy *et al.*, 1982). Las ondas de choque en el cuerpo tienen efectos similares a los que se observan bajo agua, causando el colapso de microburbujas, y formando microjets de agua que pueden dañar tejido vivo (Crum, 1988), lo cual es un efecto no deseado en la remoción de cálculos renales, que debe ser minimizado. Por otra parte, esto se ha aprovechado para el tratamiento de trombosis cerebral (Takayama *et al.*, 2004). Las ondas de choque generadas por los litotriptores extracorporales son capaces de producir cantidades significativas de cavitación acústica (Coleman *et al.*, 1987). Las principales complicaciones de los tratamientos con ondas de choque en la remoción de cálculos renales son los remanentes de fragmentos del cálculo, los cuales obstruyen las vías urinarias en el 7% de los pacientes, y la formación de hematomas perirrenales, que se presentan en el 0.4 % de los pacientes (Wolff *et al.*, 1997). Daños en los tejidos aledaños a los riñones son esperados, pero la evidencia experimental con tejidos animales muestra que generalmente no son suficientemente significativos como para requerir de un tratamiento clínico (Jaeger *et al.*, 1988).

Para usos biomédicos, las ondas de choque se producen utilizando generadores piezoeléctricos, electrohidráulicos o electromagnéticos (Magaña *et al.*, 2013; Shrivastava, 2005; Rivera *et al.*, 2012). Los sistemas piezoeléctricos utilizan un pulso de alto voltaje a través de una serie de cristales piezoeléctricos montados sobre un cascarón esférico de aluminio, causando una rápida expansión y contracción de los cristales, resultando en un pulso de presión, que degenera en una onda de choque en la vecindad del centro del arreglo. Los voltajes usualmente utilizados van de 5 a 10 kV.

La terapia con ondas de choque extracorpóreas puede ser clasificada de acuerdo a los niveles de densidad de energía. Las ondas de choque de baja energía tienen una densidad de energía focal de hasta 0.08 mJ/mm^2 , las moderadas entre 0.09 y 0.28 mJ/mm^2 , y las de alta energía arriba de 0.6 mJ/mm^2 (Mouzopoulos *et al.*, 2007).

1.1.3 Aplicaciones biológicas

Utilizando ondas de choque bajo agua se ha logrado transformar genéticamente organismos procariontes como bacterias (Jagadeesh *et al.*, 2004), o eucariontes, como plantas (Rivera *et al.*, 2012), y hongos filamentosos (Magaña *et al.*, 2013), gracias a la permeabilidad transitoria ocasionada en la membrana de las células (Lauer *et al.*, 1997). La permeabilidad transitoria de la membrana lipídica fue conocida en primera instancia en células de leucemia en ratón (Gambihler *et al.*, 1992), siendo desconocido hasta la fecha el fenómeno exacto por el que esto sucede, pero se atribuye a que la cavitación acústica actúa sobre la membrana lipídica, generando poros por la acción de los microjets de alta velocidad (Li *et al.*, 2013). La permeabilidad de las membranas en líneas celulares humanas expuestas a ondas de choque también ha sido investigada, analizando la posibilidad de usar este método para transformar genéticamente las células, o bien, para administración dirigida de fármacos (López-Marín *et al.*, 2017). Al emplear las ondas de choque para transformación genética, debe considerarse que el DNA presente en la solución que rodea la célula está sujeto a ser dañado (Kochański *et al.*, 2001); no obstante, estableciendo parámetros adecuados, es posible lograr una buena eficiencia de transfección genética (Magaña *et al.*, 2013).

1.2 *Drosophila melanogaster* como modelo biológico

Los trabajos experimentales en *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) tienen un registro que comienza a principios de los años 1900, introducidos por William E. Castle y su grupo de investigación en la universidad de Harvard (Kohler, 1993). El estudio genético en *Drosophila* fue introducido por Thomas H. Morgan, quien comenzó sus trabajos en 1909 después de interesarse por las variaciones genéticas observadas en las moscas. Su trabajo junto a otros brillantes investigadores lo llevó a explicar los mecanismos de la herencia en base a las leyes de Mendel publicadas previamente en 1866 (Bellen & Yamamoto, 2015). La mosca de la fruta se ha utilizado ampliamente como un modelo genético, debido a características como el ciclo de vida en un periodo de 10 a 12 días, mantenimiento económico y su biología evolutivamente conservada. Además, se ha estimado que el 75% de los genes relacionados a enfermedades en humanos tienen ortólogos funcionales en la mosca (Pandey & Nichols, 2011). Una hembra de *Drosophila melanogaster* es capaz de poner un promedio de 500 huevos en toda su vida (Hyde, 1921), por lo que se cuenta con un gran número de descendientes para analizar en la experimentación con moscas. La secuenciación del genoma de la mosca de la fruta, dada a conocer a finales del milenio anterior, ha impulsado en gran medida la investigación de la función de sus genes (Adams *et al.*, 2000).

1.2.1 Importancia de *Drosophila melanogaster*

Los estudios en este modelo biológico permitieron encontrar genes que afectan la visión, el olfato, la conducta sexual, los ciclos circadianos y el envejecimiento, entre otros (Bellen & Yamamoto, 2015). Una de las temáticas de mayor interés donde *Drosophila* se ha utilizado es en el estudio de enfermedades neurodegenerativas (Ghosh & Feany, 2004); por ejemplo, experimentando con los genes que están involucrados en la enfermedad de Alzheimer (Greeve *et al.*, 2004). La mosca de la fruta ha destacado como un modelo para dilucidar enigmas en biología del desarrollo, que, debido a su biología conservada, involucra varios tópicos, como el estudio de vías de señalización. Como ejemplos, se pueden estudiar vías involucradas en la generación de cáncer, como la vía de Hippo (Maugeri-Sacca & De Maria, 2018), la vía de Notch (Kidd, S. & Lieber, 2016), y la vía JAK-STAT (Herrera & Bach, 2019), además de la vía de señalización de la insulina, colocando a *Drosophila* como un modelo para estudiar efectos de la diabetes (Graham & Pick, 2017). Los discos imaginales, sacos de células epiteliales que representan los primordios de estructuras adultas como patas y alas, han sido estudiados extensivamente para conocer las vías de señalización y los mecanismos involucrados en el crecimiento y la reparación de tejido (Worley *et al.*, 2012).

Drosophila también es útil en estudios sobre el comportamiento del ciclo circadiano (You *et al.*, 2018), y los efectos de distintas dietas en la salud (Lüersen *et al.*, 2019).

1.2.2 Estudio del funcionamiento de genes en *Drosophila melanogaster*

En 1940, el biólogo Edward B. Lewis, propuso que el estudio de las moscas mutantes era útil para dilucidar los mecanismos del desarrollo embrionario, mapeando defectos genéticos y asociándolos con anomalías observadas, como alas adicionales (Campbell & Reece, 2007). Para crear mutaciones se pueden utilizar técnicas como elementos P, los cuales son transposones que mutan los genes al insertarse en ellos (Martin *et al.*, 2001), o bien, utilizar compuestos químicos como el metanosulfonato de etilo (Blumenstiel, 2009). Durante los últimos años, la técnica CRISPR/Cas9, capaz de realizar mutaciones dirigidas en base a un mecanismo de protección antiviral de las bacterias, también ha sido aplicada en la mosca de la fruta (Bassett *et al.*, 2013).

El método de RNA de interferencia, donde se utiliza RNA de doble cadena para interferir con la traducción ó la vida media de RNA mensajero, así como la transferencia de genes entre organismos (transfección) en *Drosophila*, también se han utilizado para estudiar el funcionamiento de los genes; no obstante, ambos métodos confían en la microinyección como primer paso, una técnica demandante en tiempo (Yuen *et al.*, 2008). Debido al grado de experiencia que se requiere para realizar la microinyección y la naturaleza del método, el porcentaje de moscas transformantes respecto a las microinyectadas típicamente es de 0.5-5% (Rubin & Spradling, 1983).

La transgénesis se puede lograr utilizando elementos P, lo que genera mutaciones aleatorias (Tower, 2000), o de forma más específica utilizando el fago Φ C31 (Bischof *et al.*, 2007). Se debe inyectar DNA con una fuente de enzima que cataliza la transposición, ya sea la P-transposasa o la Φ C31 integrasa dependiendo del método, en la parte posterior del embrión donde se formarán las células polares, que son las células precursoras de las células germinales, para lograr la transmisión a los descendientes al transformar al menos una de estas células. Posteriormente los adultos se cruzan con moscas silvestres y se hace un cribado para buscar animales transgénicos en la siguiente generación (Cartwright, 2009).

La electroporación es una técnica que se ha utilizado para permeabilizar la membrana de las células e introducir material como DNA, aplicando un campo eléctrico, siendo ampliamente utilizada en organismos como las bacterias (Dower *et al.*, 1988) y los hongos (Becker & Guarente, 1991). En *Drosophila*, se ha reportado que la transformación de organismos es posible mediante electroporación en embriones, contando una buena eficiencia y representando un gran ahorro de

tiempo respecto a la microinyección (Kamdar *et al.*, 1995); no obstante, la microinyección sigue siendo la técnica de rutina (Cartwright, 2009).

1.2.3 Desarrollo temprano del embrión en *Drosophila melanogaster*

En el desarrollo temprano de la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), el embrión inicia el desarrollo presentando actividad mitótica sin divisiones celulares, dando lugar a un sincisio. Esta etapa de las divisiones nucleares es la de preblastodermo. Después de 13 ciclos de división nuclear (figura 2), se inicia la celularización del embrión, para pasar del estadio de blastodermo sincisial al de blastodermo celular (Campos-Ortega & Hartenstein, 1997). En el preblastodermo, las membranas celulares no se han formado, lo que permite que el material dentro del embrión se pueda difundir en el citoplasma, incluyendo los núcleos que ya se han formado. De este modo el embrión se encuentra en un estado de célula multinucleada o sincisio (Gilbert, 2000). Esta etapa es de gran interés para los propósitos de esta investigación, ya que permite considerar el embrión como una sola célula. Dicha célula multinucleada tiene cambios en su interior. En las primeras 7 divisiones los núcleos aumentan exponencialmente y se mantienen en la parte central, pero después sólo una pequeña cantidad se queda en el centro para formar el vitelo, mientras el resto comienza a migrar hacia la superficie del embrión (Foe & Alberts, 1983). El citoplasma también cambia como se observa durante la décima división, donde hay presencia de un citoesqueleto de microtúbulos y microfilamentos que rodean cada núcleo (Karr & Alberts, 1986). Después de la décima división, los primeros núcleos que llegan al polo posterior del embrión se separan para formar células polares, las cuales serán la línea germinal en el adulto (Cartwright, 2009). La velocidad de las divisiones nucleares en la etapa preblastodermo es mayor ya que no se presentan las fases G₁ y G₂ del ciclo celular (Rabinowitz, 1941). Durante la fase G₁, las células resultantes de la división pueden crecer y reponer las reservas proteicas y energéticas, además de ser la etapa donde se regula si la célula comienza a diferenciarse (Lee & Orr-Weaver, 2013). El tiempo en el que ocurren las primeras 13 divisiones nucleares, independientemente del momento de la puesta, se enlista a continuación, de acuerdo a Campos-Ortega & Hartenstein, 1997:

- 0 - 0:25 h. Primeras dos divisiones nucleares.
- 0:25 h - 1:05 h. Divisiones nucleares 3-8.
- 1:05 h - 1:20 h. Novena división nuclear.
- 1:20 h - 2:10 h. Divisiones nucleares 10-13.

El embrión temprano sincisial está rodeado de una membrana plasmática por arriba de los núcleos que migran a la periferia (Reversi *et al.*, 2014). De acuerdo también a Campos-Ortega & Hartenstein (1997), determinar la etapa de desarrollo

en la que se encuentra el embrión tomando el tiempo después de ser puesto, está sujeto a cierta incertidumbre, ya que entra en juego el tiempo en el que la hembra retiene los embriones, por lo que, si se requiere un método más confiable, se recomienda observar en un microscopio compuesto los embriones dentro de un medio, como cloruro de sodio al 0.9%.

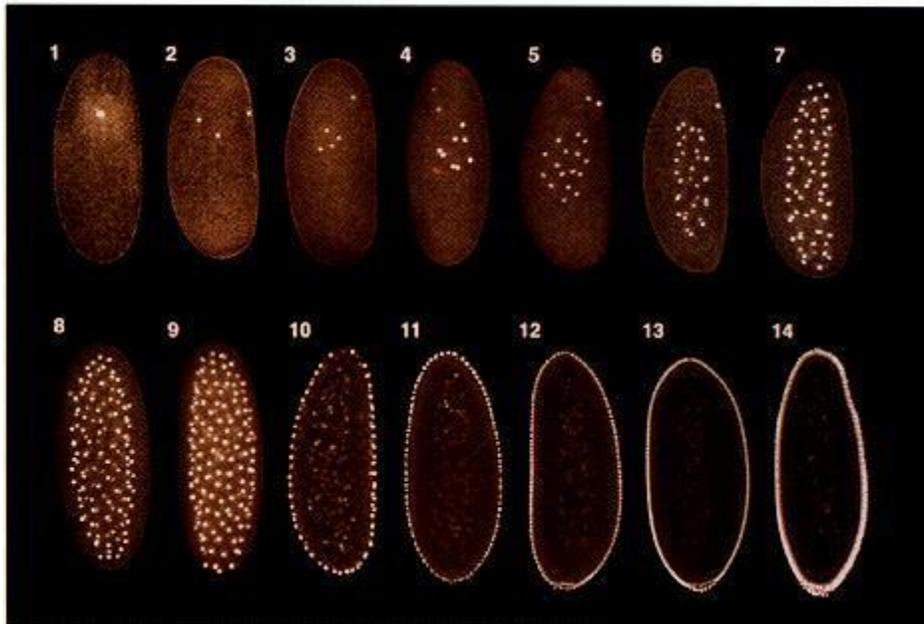


Figura 2. 14 ciclos de divisiones nucleares en el embrión temprano de la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*). En blanco están marcados los núcleos. Antes del ciclo 13, el embrión es una célula multinucleada. Esta imagen se obtuvo por microscopía de campo oscuro (Gilbert, 2000).

1.2.4 Capas exteriores del embrión en *Drosophila melanogaster*

Las distintas capas que están en el exterior del sincisio complican la tarea de introducir material exógeno, comparado con células de hongos o bacterias. El exterior o cáscara del embrión de *Drosophila melanogaster* está compuesto principalmente por las capas proteínicas de la membrana vitelina y el corion; éste es la capa más externa y a su vez se divide en el exocorion y el endocorion (Margaritis *et al.*, 1980). Adicionalmente, hay una membrana de cera que cubre la membrana vitelina (Papassideri *et al.*, 1991). Durante la ovogénesis, la membrana vitelina se secreta a partir de las células foliculares que rodean el ovocito en formación, dejando un espacio entre la membrana del ovocito y la membrana vitelina: el espacio perivitelino. Luego, las células foliculares secretan otra capa protectora, más externa, el corion. Este segundo recubrimiento es más impermeable, y después las células foliculares mueren (Cummings & King, 1969; Pascucci *et al.*, 1996). El espermatozoide fecunda el ovocito a través de un conducto al exterior formado por la membrana vitelina llamado micrópilo (Nonidez, 1920). Se

sabe que los embriones en sus primeras etapas tienen un potencial eléctrico de reposo negativo en su superficie, con una contribución mínima de la membrana vitelina y una gran contribución de la membrana celular (Miyazaki & Hagiwara, 1976).

1.2.5 Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*

La mosca de la fruta tiene un ciclo de vida que dura aproximadamente 10 días a una temperatura de 25°C (figura 3). La hembra puede ovipositar cientos de huevos. La embriogénesis dura aproximadamente veinticuatro horas, de manera que una larva emerge de cada huevo al final de esta etapa de desarrollo. Cada larva se alimentará y pasará por 3 estadíos, los cuales culminarán entre el sexto y séptimo día de desarrollo, cuando la larva deje de comer, y forme la pupa (Allocca *et al.*, 2018). La pupa continúa en desarrollo e iniciará un proceso de metamorfosis, el cual culminará en unos días más hasta emerger como adulto (Campbell & Reece, 2007). La esperanza de vida de los adultos en *Drosophila* está entre 50 y 80 días (Parkes *et al.*, 1998).

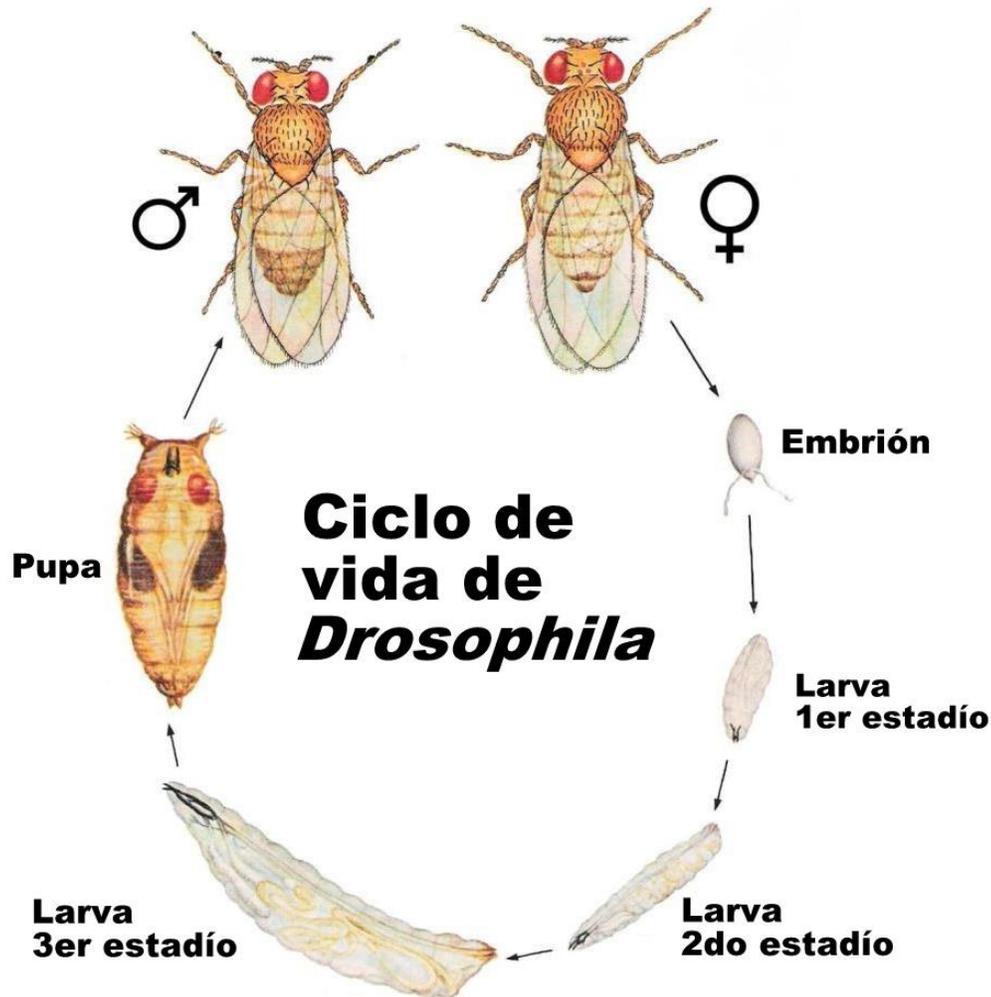


Figura 3. Ciclo de vida de la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*). En aproximadamente 10 días a una temperatura de 25 °C se completa el ciclo de vida. La embriogénesis es corta (24 horas), al final de la cual sale del huevo una larva. Ésta comerá para crecer y pasar por 3 estadios, terminando en la formación de la pupa, la cual pasa por un estado de metamorfosis hasta emerger como adulto (modificado de Flagg, 1988).

El embrión de *Drosophila melanogaster* tiene una longitud promedio de 0.51 mm (Markow *et al.*, 2009). Las larvas miden aproximadamente 1 mm 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 y un macho maduro 2.51 mm (Caldwell *et al.*, 2005).

El desarrollo en la mosca de la fruta es segmentado, por lo que los adultos tienen 3 zonas claramente definidas: cabeza, tórax y abdomen (figura 4). A su vez el tórax se encuentra segmentado en 3 regiones, una con sólo dos patas, otra con dos patas y alas, y una con dos patas y halterios (Campbell & Reece, 2007).

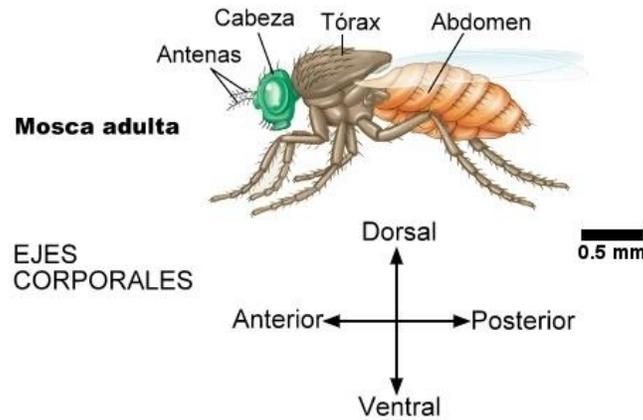


Figura 4. Anatomía del adulto de la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) (modificado de Campbell & Reece, 2007).

1.3 Nanomateriales

En 1959, Richard Feynman, galardonado años más tarde con un premio Nobel de Física, dio paso al desarrollo de la nanotecnología al discutir la posible creación de máquinas de tamaños tan pequeños que involucrarían la manipulación de átomos a gusto del diseñador, involucrando desafíos causados por las interacciones moleculares (Feynman, 1992, transcripción). Durante décadas, uno de los aspectos más interesantes de la nanotecnología ha sido la elaboración de nanomateriales con propiedades únicas (Zhang & Webster, 2009). En la práctica se considera nanomaterial aquel que tenga alguna de sus dimensiones dentro de la nanoescala (1-100 nm, $1 \text{ nm} = 1 \times 10^{-9} \text{ m}$), siendo una nanopartícula un material que tiene todas sus dimensiones dentro de esta escala (Boverhof *et al.*, 2015). Sin embargo, no hay una definición de nanomaterial que termine de convencer a toda la comunidad científica, e incluso, se advierten riesgos derivados de trabajar con una definición inapropiada, dejando a la subjetividad la regulación de materiales virtualmente peligrosos (Maynard, 2011). Los nanomateriales presentan ventajas al medio ambiente como su uso en biorremediación o mejorando la eficiencia de paneles solares y celdas de combustible, pero podrían representar riesgos a la salud al utilizarlos en productos de escala industrial, ya que llegan a asociarse con toxicidad limitada, como los nanotubos de pared simple. No obstante, para considerar la toxicidad de un nanomaterial como un verdadero riesgo, se requieren de varios estudios (Borm *et al.*, 2006).

1.3.1 Aplicaciones tecnológicas

Como se mencionó en el subapartado anterior, se obtienen nuevas propiedades en el desarrollo de los nanomateriales, debido a que en la nanoescala se presentan fenómenos físicos únicos, por ejemplo, se puede ajustar la banda de valencia de los semiconductores modificando las dimensiones del material, además de propiciarse el desarrollado de superconductores (Guozhong, 2004). Una mayor área de superficie y la posibilidad de modificar el espacio entre las capas de un nanomaterial, como es el caso del grafeno, permiten diseñar nuevas y mejores baterías que tengan un espacio óptimo para que los iones y las moléculas intercalen en los procesos de carga y descarga (Pumera, 2011).

En cuanto a biorremediación, los nanomateriales han sido propuestos para remediar el suelo y contaminantes de agua, debido a su mayor reactividad con los contaminantes (frente a micropartículas) y mayor área superficial. Ejemplos de esto es la degradación de pentaclorofenol (PCF) con nanotubos de TiO_2 y la adsorción de iones de metales pesados con nanotubos de carbono de pared múltiple (Cameotra & Dhanjal, 2010). En aplicaciones medicinales, se han investigado para su uso en sistemas de suministros de medicamentos en la terapia contra el cáncer, donde además de aspectos como el tamaño y la forma del nanomaterial, se debe considerar su balance hidrófilo-lipofílico, para garantizar el correcto funcionamiento en un sistema biológico (Barreto *et al.*, 2011). Además, las nanopartículas se han usado como marcadores en aplicaciones biológicas, tal es el caso del uso de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro para asistir la resonancia magnética en células (Bulte, 2005), así como nanopartículas funcionalizadas de silicio para marcar células cancerígenas (Eliseeva *et al.*, 2010).

1.3.2 Toxicidad de nanomateriales en *Drosophila melanogaster*

Debido a que la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) cuenta con características conservadas como sus genes y vías metabólicas, es útil para estudios toxicológicos. Hay reportes en la literatura sobre toxicidad de diversos nanomateriales, entre otros agentes tóxicos (Rand *et al.* 2014). Los efectos encontrados han sido diversos con los distintos nanomateriales probados, a veces encontrando efectos en la supervivencia y en la fertilidad, y en otras ocasiones sin efectos aparentes. Con nanopartículas de oro se encontraron mutaciones que afectaban la línea germinal, con efectos notables de defectos en los ojos de la segunda generación, después de haber mutado un individuo con un nanomaterial y haber hecho una cruce con la descendencia (Vecchio *et al.*, 2012). Nanopartículas de plata en dosis no letales interfieren en la homeostasis celular del cobre, afectando la melanización cuticular, causado por la presencia excesiva de especies

de oxígeno reactivo (ROS, por su nombre en inglés). Además, los efectos crónicos incluyen reducción de la fertilidad en las hembras y una caída de la habilidad motora (Armstrong *et al.*, 2013). Al probar nanofibras de carbono en moscas se encontró una reducción en los individuos que llegaban a desarrollarse hasta la etapa de pupa. Otros factores como la habilidad motora, la fertilidad y la supervivencia de adultos también fueron negativamente afectados (Lee *et al.*, 2015). En el caso de nanopartículas de óxido de zinc las pruebas sugieren un ligero potencial genotóxico (Carmona *et al.*, 2016). Mutantes aberrantes como efecto de la exposición crónica a estas nanopartículas también han sido reportados (Anand *et al.*, 2017), pero la investigación carece de valores significativos y un control que fortalezca estos hallazgos. Por otro lado, al hacer pruebas en *Drosophila* con nanocables de fosforo de galio, no se encontraron efectos negativos (Adolfsson *et al.*, 2013). El efecto puede cambiar en las distintas etapas de desarrollo de las moscas, por ejemplo, nanotubos de carbono no tienen un efecto adverso en larvas de mosca pese a la evidencia de que el material se aloja en el tejido, pero afectan negativamente la locomoción y pueden causar letalidad en adultos (Liu *et al.*, 2009).

1.4 Antecedentes

Experimentos previos para conocer los efectos de las ondas de choque en *Drosophila melanogaster* han arrojado evidencia que soporta la supervivencia de los embriones al tratamiento de ondas de choque, los cuales alcanzan en un porcentaje mayor la etapa adulta al aplicar 50 ondas (frecuencia = 1Hz, presión del pulso positivo = 18 MPa) en un *Piezoson 100 plus* (Richard Wolf GmbH, Knittlingen, Alemania) (figura 5). Los resultados también sugieren la posible generación de poros en las capas exteriores de los embriones (Velázquez *et al.*, 2018).

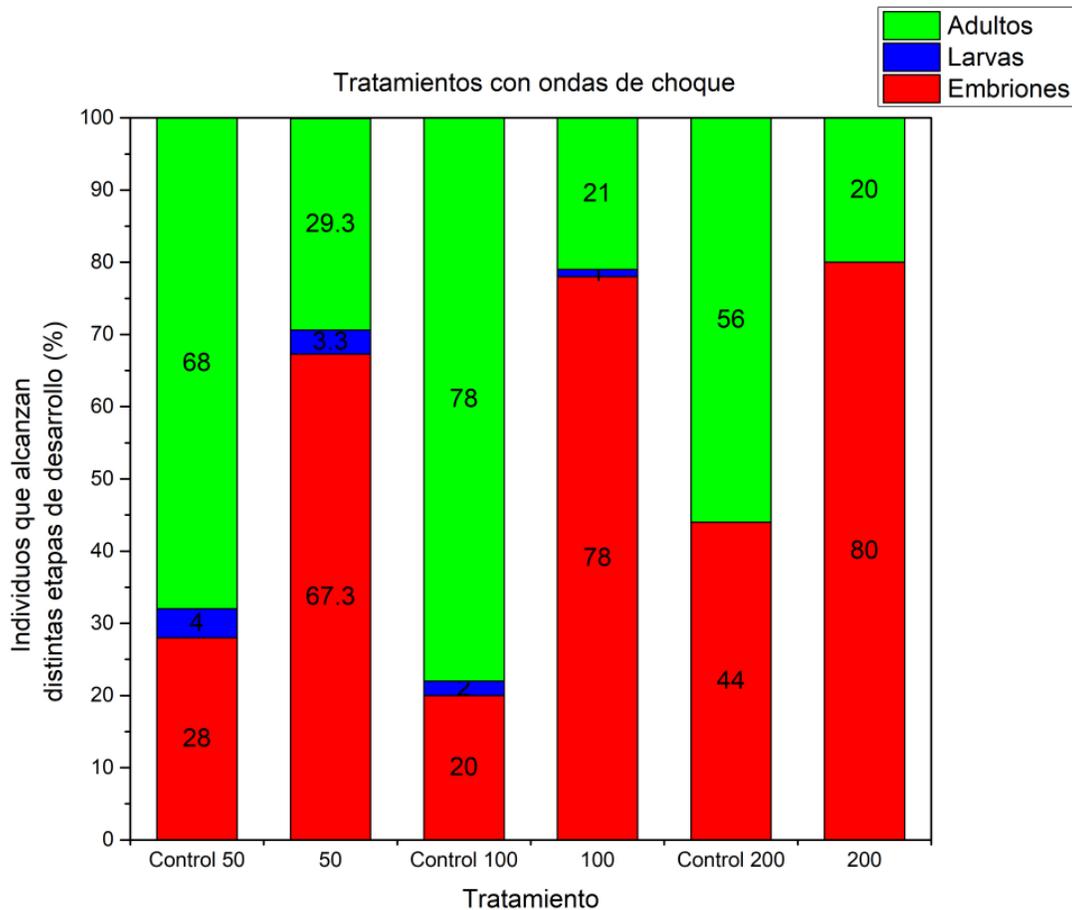


Figura 5. Registro de supervivencia de moscas de la fruta tratadas con 50, 100 y 200 ondas de choque. En cada experimento las ondas de choque ($p^+ = 18$ MPa) se aplicaron en bolsas con 50 embriones con una frecuencia de 1Hz. Se muestra el porcentaje de las moscas que viven hasta cada etapa de desarrollo: 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).

1.5 Justificación

Drosophila melanogaster es un modelo ampliamente utilizado en la investigación de enfermedades humanas (Pandey & Nichols, 2011). La inserción de material exógeno con ondas de choque puede facilitar procesos en las investigaciones con *Drosophila*, por lo que vale la pena realizar pruebas utilizando nanopartículas como marcadores de modo que se pueda comprobar su inserción.

1.6 Objetivo general

Conocer los efectos de las ondas de choque en embriones de *Drosophila melanogaster*, para evaluar el desarrollo de una nueva técnica de inserción de material exógeno con aplicaciones biológicas.

1.6.1 Objetivos específicos

► Tratar embriones de moscas con ondas de choque en solución de nanopartículas fluorescentes.

- Obtener una supervivencia aceptable de embriones tratados con ondas de choque en solución de nanopartículas fluorescentes.
- Explorar la presencia de nanopartículas fluorescentes en larvas tratadas.
- Preparar cortes histológicos de moscas en estado larvario y como adultos, después de ser tratadas con ondas de choque.
- Observar y registrar cortes histológicos para determinar si las nanopartículas se han insertado dentro de las moscas y de ser así, en qué tipo de tejido se encuentran.

► Microinyectar nanopartículas fluorescentes en larvas de moscas de la fruta con el equipo *Nanoliter 2000*.

- Preparar cortes histológicos de moscas en estado larvario y como adultos, después de ser microinyectadas.
- Observar cortes histológicos para determinar si las nanopartículas se encuentran localizadas en los tejidos de las moscas.

1.7 Hipótesis

La aplicación de ondas de choque ayuda a perforar las capas externas del embrión temprano de *Drosophila melanogaster*, permitiendo introducir nanopartículas.

2. Metodología

2.1 Cría de moscas y recolección de embriones

Las moscas se mantuvieron en un bioterio a 25°C. Para su 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 ovipositan los huevos. La caja tiene un medio base de agarosa. Para las pruebas con ondas de choque, los embriones fueron transferidos a una bolsa 2 horas después de haber sido puestos por las moscas, en donde el embrión pasa por las últimas divisiones nucleares en su etapa como sincisio (Campos-Ortega & Hartenstein, 1997). En todos los experimentos se utilizaron moscas de la cepa silvestre *yellow white*.

2.2 Pruebas del efecto de las ondas de choque en embriones con solución de nanopartículas

Para producir las ondas de choque se utilizó un generador piezoeléctrico modelo *Piezoson 100 plus* (Richard Wolf GmbH, Knittlingen, Alemania), montado en el fondo de una tina de acrílico transparente (278 mm x 278 mm x 235 mm). El agua se mantuvo a una temperatura controlada de 23 °C, empleando un circulador digital termostático de inmersión, de la marca *Cole-Parmer*. 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 6).

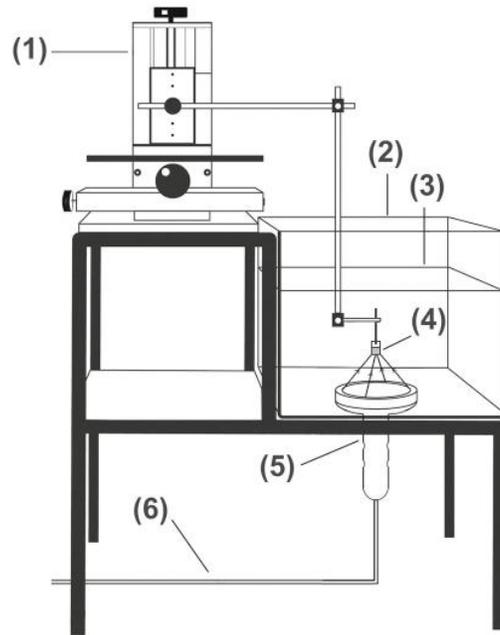


Figura 6. Esquema simplificado del generador de ondas de choque Piezoson 100 plus. Los elementos básicos son (1) posicionador, (2) tina, (3) nivel de agua, (4) muestra (bolsa), (5) fuente de ondas de choque, (6) conexión a la unidad de control (modificado de Lukes et al., 2016).

La muestra consiste en una bolsa de 15 mm x 25 mm, con 90 μ l de *buffer* TE y 10 μ l de una solución 100 nM de nanopartículas fluorescentes (figura 7), donde se han incluido 50 embriones. Las nanopartículas fueron donadas por el Centro de Investigaciones en Óptica (CIO). Fueron seleccionadas por tener una alta eficiencia cuántica, de modo que se facilite su observación con fluorescencia. 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 obtiene al ajustar el nivel de intensidad del equipo en su máximo valor.

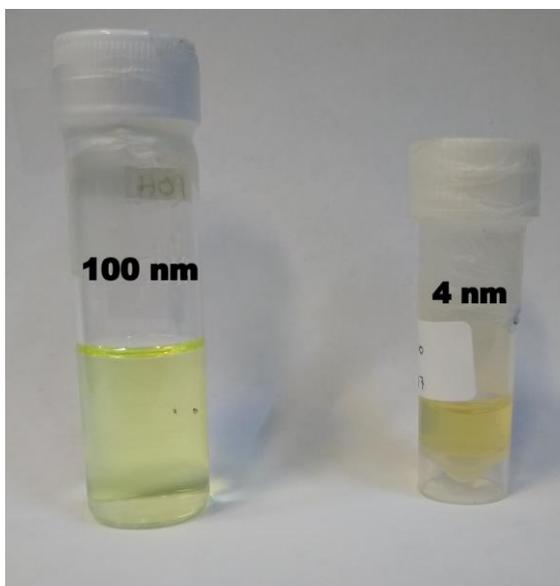


Figura 7. Nanopartículas fluorescentes de carbono en suspensión. El diámetro es de 100 nm (izquierda) y 4 nm (derecha).

2.3 Registro y observación de moscas

Después de tratar los embriones con ondas de choque, se recuperaron de la bolsa y se colocaron en una caja Petri. Por medio de un microscopio estereoscópico marca *Nikon*, modelo SMZ-2T, se observaron los huevos tratados para registrar cuántos embriones se desarrollan hasta la etapa de larva y cuántos hasta adultos. Los adultos fueron anestesiados con dióxido de carbono (CO_2) para observarlos. Para conservar los adultos obtenidos hasta el procesamiento, se colocaron en un frasco con alcohol etílico al 70%. Para buscar posibles cúmulos fluorescentes atribuibles a las nanopartículas, se acopló un set de iluminación de la marca *Nightsea* en el microscopio, el cual permite observar cualquier fluorescencia en las larvas al irradiarlas con luz azul.

2.4 Preparación y observación de cortes histológicos

Para poder observar de forma clara los cúmulos de nanopartículas, así como ubicarlos dentro de la mosca, las larvas fueron fijadas y cortadas. Después de obtener larvas sobrevivientes al tratamiento con ondas de choque, éstas se seccionaron por la mitad, luego 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 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 2 o 3 días. Los cortes se realizaron en un microtomo marca *Leica*, modelo RM2265, cada uno con un grosor de 1 μm , utilizando una navaja de vidrio. Finalmente se colocaron en un porta objetos y se calentaron a 70°C en una parrilla. Las muestras control sin el tratamiento de ondas de choque, así como las muestras tratadas, se fijaron por igual.

Para observar si las nanopartículas estaban bien incorporadas en el tejido, después de los experimentos con ondas de choque, las larvas se dejaron desarrollar hasta la etapa adulta, se anestecieron con CO₂ y se fijó todo el cuerpo de la mosca con el procedimiento descrito en el párrafo anterior, incluyendo la manipulación para obtener los cortes.

La observación se realizó en un microscopio óptico marca *Nikon*, modelo E600, utilizando un objetivo *Nikon Plan Fluor 20x/0.50*. Para inspeccionar los cúmulos de nanopartículas, se observaron con luz blanca, azul, verde y roja. Para las últimas 3 se requirió una lámpara de mercurio y la luz fue dirigida a los filtros de epifluorescencia B-2A, G-2A y Y-2E/C TX RED, respectivamente. En algunas tomas se usaron simultáneamente luces azul y blanca, esta última proveniente de la lámpara del microscopio. Las fotos de los cortes se toman con una cámara *CoolSNAP cf* de *Photometrics*. Para ajustar la escala de las imágenes se utilizó la graduación de una cámara de Neubauer, y el software *ImageJ*. Una muestra con nanopartículas en *buffer TE* fue observada con fluorescencia en el microscopio y se usó como referencia del comportamiento de las nanopartículas con la luz.

2.5 Microinyección de nanopartículas fluorescentes en larvas de moscas con el equipo *Nanoliter 2000*

Para tener una referencia de cómo se ven y se distribuyen las nanopartículas dentro de las moscas, la solución con nanopartículas se microinyectó directamente en las larvas, durante su tercer estadio, con un equipo *Nanoliter 2000*. A partir de capilares de vidrio, previamente se prepararon capilares estirados. Uno de los extremos del capilar se estira con un *puller pul-100* de *World Precision Instruments*, para formar una punta que sirve para penetrar el embrión. Estos capilares se rellenaron con la solución de nanopartículas. Se esperó 30 minutos después de inyectar para dejar que las nanopartículas se distribuyeran y las larvas se fijaron de la misma forma que se hizo con las tratadas con ondas de choque, con el objetivo de hacer cortes histológicos y observarlos en microscopio. Para observar si las nanopartículas estaban bien incorporadas dentro de la mosca, algunas larvas

microinyectadas se dejaron desarrollar hasta la etapa adulta, donde se hizo la fijación de todo su cuerpo como se ha descrito anteriormente, para la posterior observación de los respectivos cortes histológicos.

2.6 Manejo apropiado de moscas de la fruta

Pese a que no hay legislación sobre alguna forma ética de disponer las moscas, todos los adultos fueron anestesiados con dióxido de carbono (CO_2) e inmersos en etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, 70%), antes de ser sacrificados.

3. Resultados

Las gráficas e imágenes de los resultados obtenidos se muestran a continuación. Para evitar redundancia en la presentación de éstos, se han colocado imágenes adicionales en el sexto capítulo, correspondiente a las figuras suplementarias (sup.).

3.1 Tratamiento de embriones con ondas de choque en solución de nanopartículas

3.1.1 Registro de supervivencia de moscas

Al tratar embriones de moscas de la fruta con 50 ondas de choque en solución de nanopartículas de 100 nm de diámetro se notó un efecto en la supervivencia producido por la aplicación de ondas de choque (figura 8). Además, hubo una disminución notable en la supervivencia de los adultos respecto al mismo tratamiento sin nanopartículas, donde casi el 30% de las moscas llegó la etapa adulta (Velázquez *et al.*, 2018).

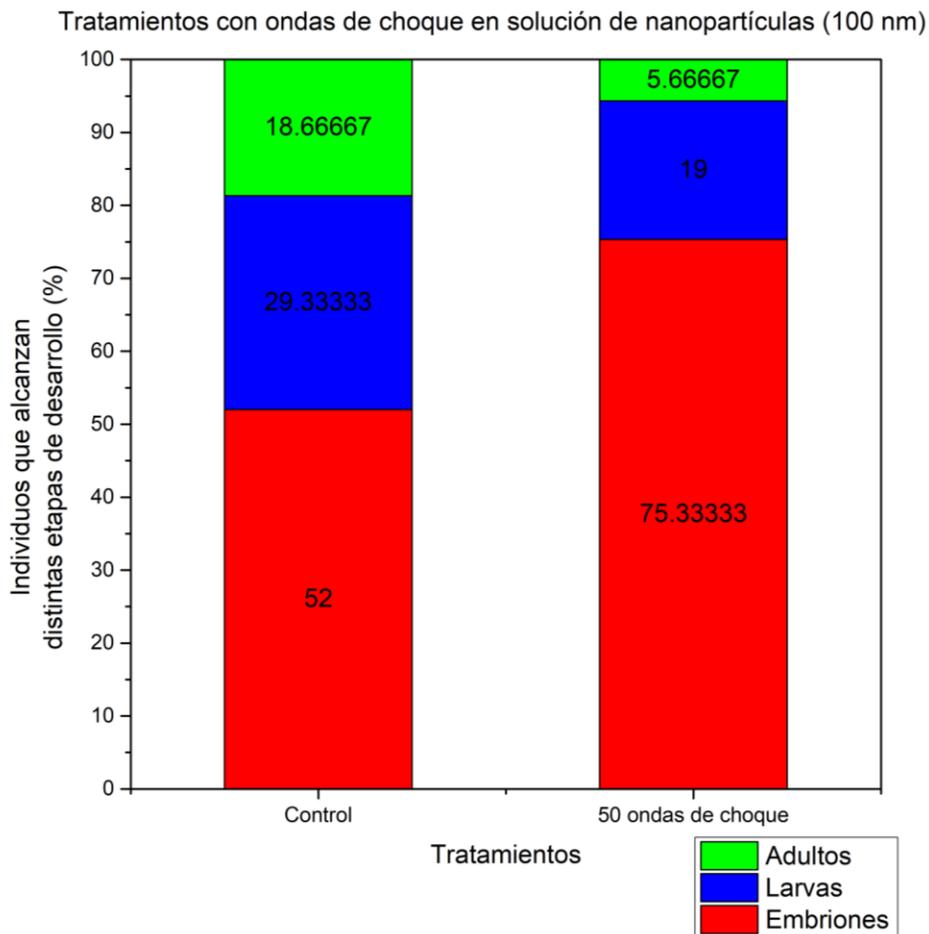


Figura 8. Gráficas del registro de vida de moscas en solución con nanopartículas (100 nm) fluorescentes, expuestas a 50 ondas de choque ($p^+ = 18$ MPa) con el equipo Piezason 100 plus. Se muestra el porcentaje de las moscas que viven hasta cada etapa de desarrollo: embrión (rojo), larva (azul) o adulto (verde).

Este comportamiento puede indicar que el efecto de las ondas de choque en la supervivencia se suma a cierta toxicidad de las nanopartículas utilizadas. El porcentaje de moscas que llegaron hasta la etapa embrionaria, incluye los huevos que explotaron por el tratamiento con ondas de choque, y los que simplemente no pasaron a la etapa de larva. Factores que evidentemente afectan la supervivencia en los experimentos aún sin aplicar ondas de choque son la manipulación al introducir los embriones y recuperarlos de la bolsa de plástico, así como el hecho de que los embriones se encuentran totalmente sumergidos en líquido durante el tratamiento.

Utilizando nanopartículas de 4 nm de diámetro en el tratamiento, la supervivencia también decae al aplicar las ondas de choque (figura 9), aunque también disminuye el porcentaje de adultos respecto a los tratamientos sin nanopartículas. Esta supervivencia aún es mayor que con los tratamientos con

nanopartículas de 100 nm, lo que puede indicar que en un tamaño menor tienen menor toxicidad.

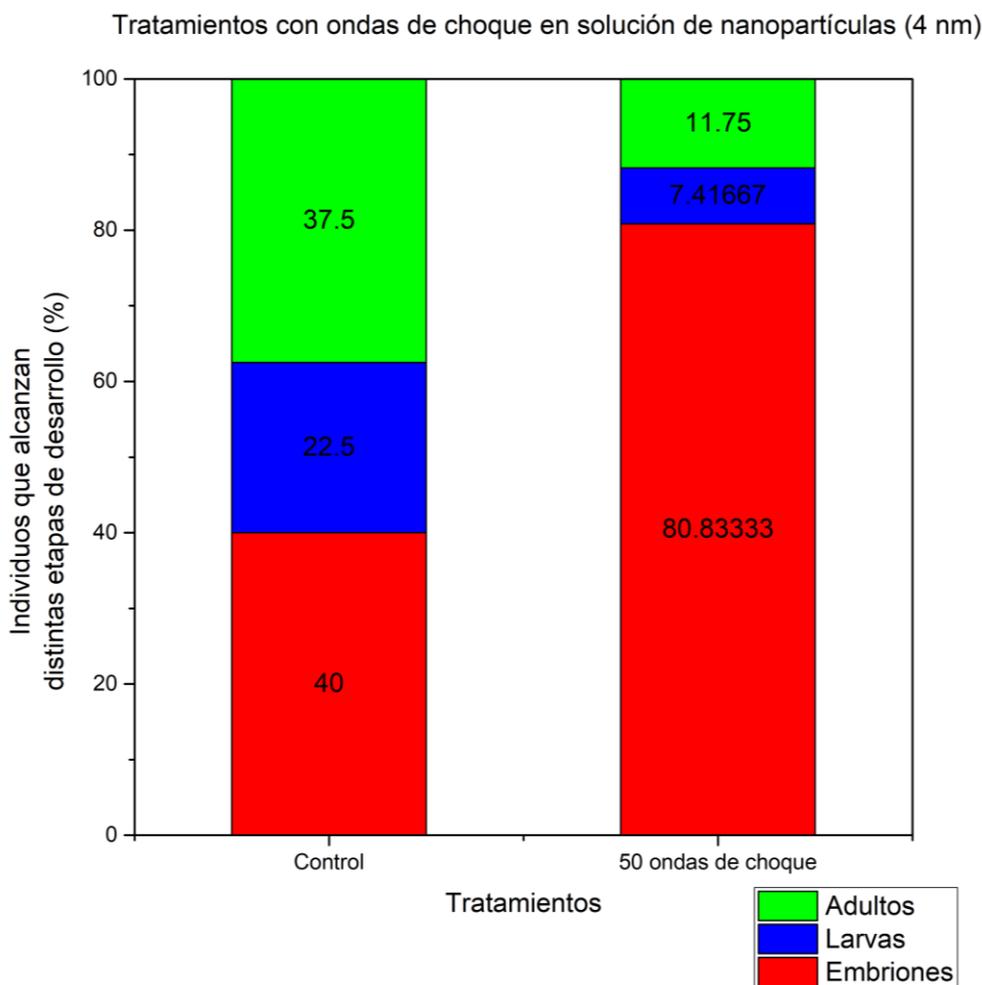


Figura 9. Gráficas del registro de vida de moscas en solución con nanopartículas (4 nm) fluorescentes, expuestas a 50 ondas de choque ($p^+ = 18$ MPa) con el equipo Piezoson 100 plus. Se muestra el porcentaje de las moscas que viven hasta cada etapa de desarrollo: embrión (rojo), larva (azul) o adulto (verde).

3.1.2 Observación con fluorescencia de larvas

Después de los tratamientos con nanopartículas de 100 y 4 nm, las larvas fueron observadas en fluorescencia, con un kit de iluminación *Nightsea*, acoplado a un microscopio estereoscópico *Nikon*, modelo SMZ-2T. En los tratamientos con nanopartículas de 100 nm, se encontraron cúmulos fluorescentes en algunas larvas. Los controles exhiben una fluorescencia endógena tenue. En este caso se observa

una fluorescencia añadida que se puede atribuir a la inserción de nanopartículas (figura 10).

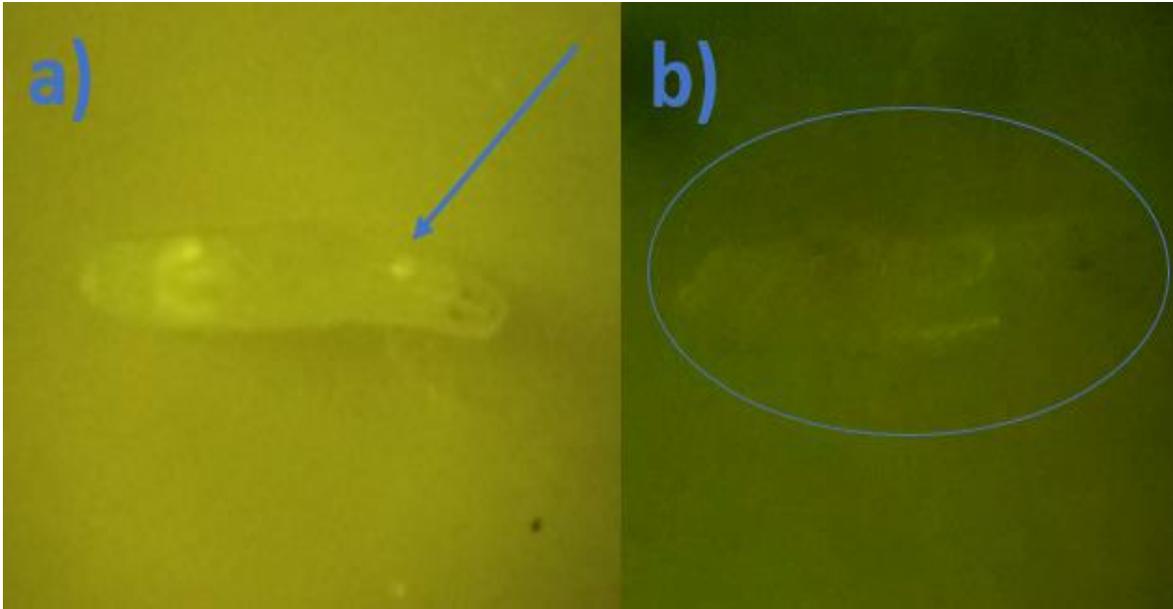


Figura 10. Larvas observadas en fluorescencia, después del tratamiento con ondas de choque en solución de nanopartículas de 100 nm. a) Larva con un cúmulo de nanopartículas en su interior (ver flecha). b) Larva control donde no se observan nanopartículas dentro.

En los tratamientos en solución de nanopartículas de 4 nm de diámetro, se observaron algunos cúmulos fluorescentes, no obstante, el brillo es de menor intensidad que con las nanopartículas de 100 nm de diámetro. En este caso, se observan cúmulos en la zona intestinal (figura 11).

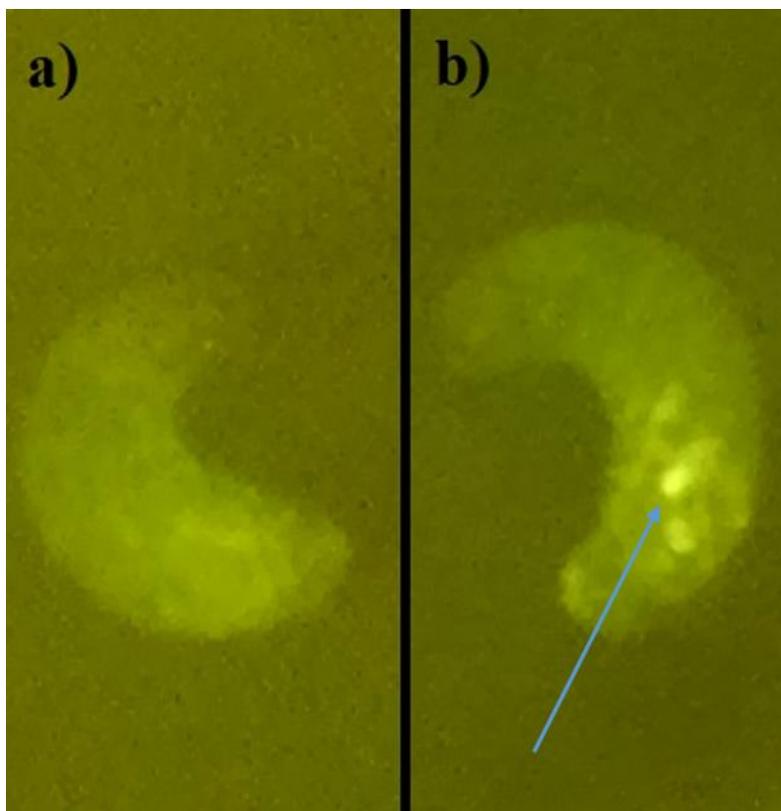


Figura 11. Larvas observadas en fluorescencia, después del tratamiento con ondas de choque en solución de nanopartículas de 4 nm. a) Larva control a la que no se le aplicaron ondas de choque. b) Larva donde se observan zonas fluorescentes (ver flecha).

Los cúmulos observados pueden indicar que las nanopartículas se están integrando en las moscas debido al efecto que tienen las ondas de choque; no obstante, en el apartado 3.3 se muestran las pruebas de cortes histológicos para tener mayor evidencia. La integración de las nanopartículas de distintos diámetros puede dar diferencias en la interacción debido a la diferencia de áreas superficiales, sin embargo, lo observado en las larvas sólo es resultado del tamaño de los cúmulos.

3.1.3 Efectos en el desarrollo de las moscas

Las moscas tratadas con ondas de choque que llegaron a la etapa adulta presentaron un fenotipo normal (figura 12, figura 20 sup.), además fueron capaces de dejar descendencia, por lo que su fertilidad no se vio afectada. La posible toxicidad de las nanopartículas, además de disminuir la supervivencia, retrasó el ciclo normal del desarrollo en algunos casos, extendiendo la etapa de larva hasta las dos semanas de desarrollo.

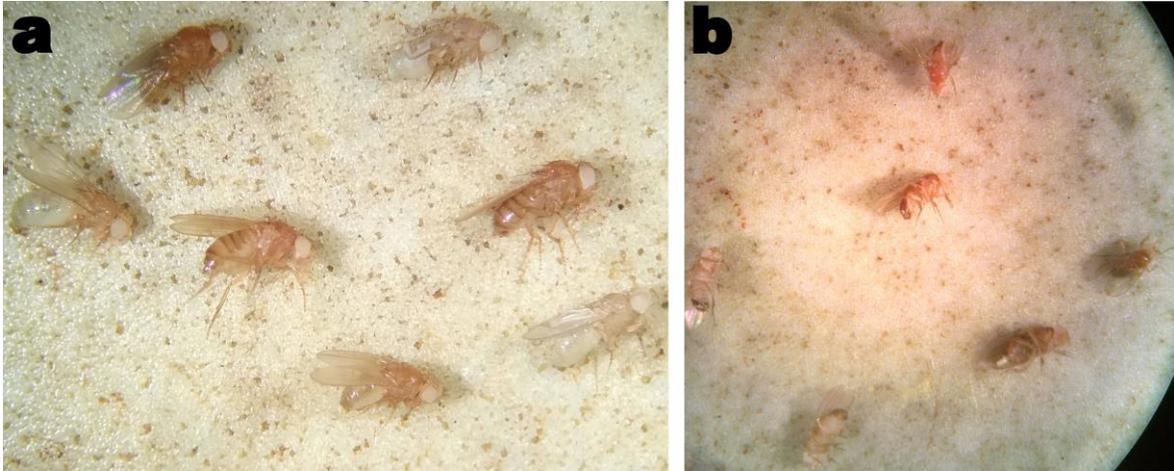


Figura 12. Moscas adultas que fueron tratadas con ondas de choque. El fenotipo de las moscas no presentó alteración alguna. a) Adultos de los tratamientos con nanopartículas de 100 nm de diámetro. Las alas corrugadas de la mosca en la parte superior derecha son típicas de adultos que acaban de salir de la pupa. b) Adultos de los tratamientos con nanopartículas de 4 nm de diámetro.

3.2 Moscas microinyectadas con solución de nanopartículas con el equipo *Nanoliter 2000*

3.2.1 Observación de larvas en fluorescencia

Después de ser microinyectadas con la solución de nanopartículas de 100 nm, las larvas fueron observadas en fluorescencia, con un kit de iluminación *Nightsea*, acoplado a un microscopio estereoscópico *Nikon*, modelo SMZ-2T. Se encontraron cúmulos fluorescentes de nanopartículas (figura 13, figura 21 sup.), de forma similar a lo visto en algunas larvas de los tratamientos con ondas de choque (figura 10).



Figura 13. Larva microinyectada con nanopartículas de 100 nm, utilizando el equipo Nanoliter 2000. Se señala con una flecha un cúmulo fluorescente debido a la inyección de nanopartículas.

3.2.2 Observación de fluorescencia de nanopartículas en microscopio

Para visualizar la muestra de prueba con nanopartículas en *buffer* TE, se utilizó un microscopio óptico *Nikon*, modelo E600, con un objetivo *Nikon Plan Fluor* 20x/0.50. Una lámpara de mercurio y filtros de epifluorescencia fueron requeridos para obtener luz azul, verde y roja. En esta muestra se pueden observar varias aglomeraciones (figura 14), las cuales solamente presentan fluorescencia al incidir luz azul en la muestra. No hubo ningún efecto observado al incidir luz verde o roja. Con la luz blanca, sólo se observaron deformaciones en el corte debido a la presencia de los cúmulos de nanopartículas (figura 14e). Estas observaciones resultan útiles para establecer el comportamiento de las nanopartículas y poder descartar que se tratan de micropartículas que hayan contaminado el corte o el portaobjetos.

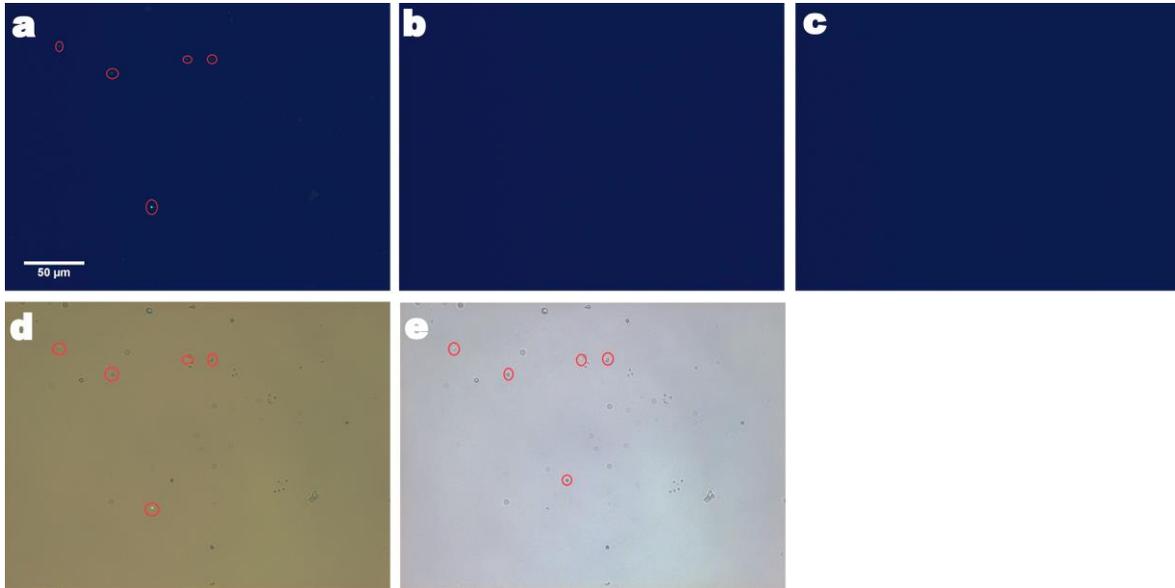


Figura 14. Cinco cúmulos fluorescentes de nanopartículas observados en microscopio. Se muestran las imágenes vistas con a) luz azul, b) luz verde, c) luz roja, d) luz azul y luz blanca simultáneamente, e) luz blanca. No se presenta fluorescencia con luz verde y roja. El diámetro aproximado del cúmulo más grande (inferior) es de: $1.14 \mu\text{m}$. La barra de escala mide $50 \mu\text{m}$.

3.2.3 Observación de cortes histológicos

Para visualizar los cortes histológicos se utilizó el mismo equipo que en la muestra anterior con nanopartículas en *buffer* TE. Al observar cortes de larvas microinyectadas con solución de nanopartículas de 100 nm de diámetro, como se esperaba se encontraron cúmulos que sólo son fluorescentes al incidirles luz azul. En este caso se observaron dos en el mismo corte (figura 15). No obstante, debido a la manipulación de las larvas los cortes presentaron desgarres en los tejidos, por lo que los cúmulos seguramente se desplazaron del lugar en el que se encontraban originalmente en la larva (figura 15, figura 22 sup.).

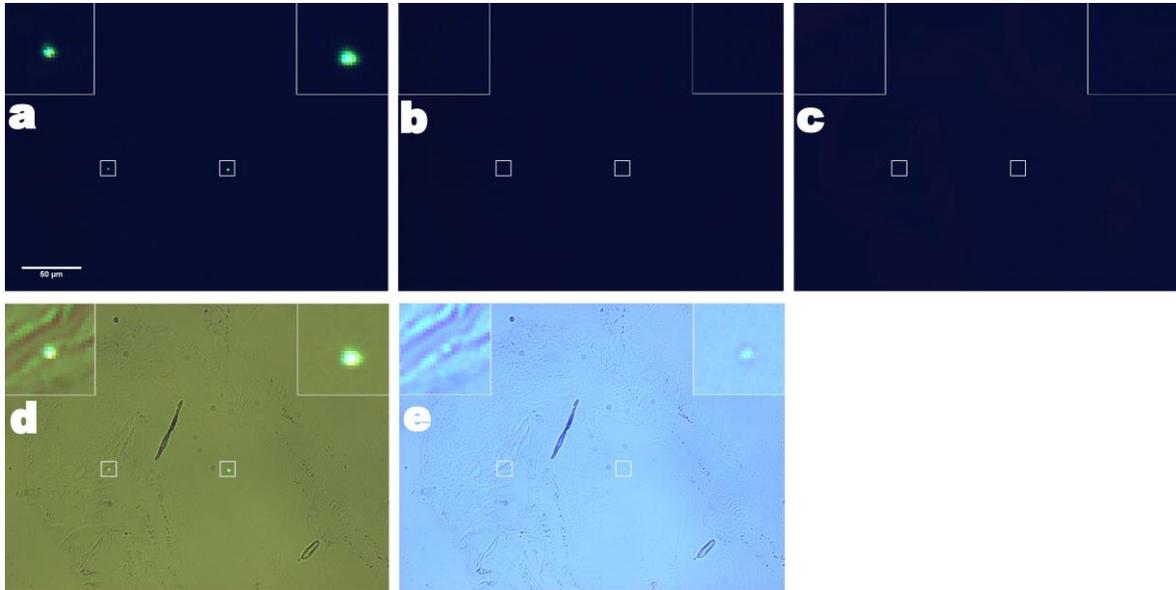


Figura 15. Corte histológico de larva inyectada con una solución de nanopartículas de 100 nm de diámetro, utilizando el equipo Nanoliter 2000. En cada imagen las dos regiones donde se encuentra un punto fluorescente se han aumentado 6 veces y se ha colocado en las esquinas superiores. Se muestran las observaciones del mismo corte histológico con a) luz azul, b) luz verde, c) luz roja, d) luz blanca y azul simultáneamente, e) luz blanca. Diámetro aproximado del cúmulo izquierdo: 1.43 μm . Diámetro aproximado del cúmulo derecho: 1.86 μm . La barra de escala mide 50 μm .

En las moscas inyectadas que llegaron hasta la etapa adulta, se observaron cúmulos que han permanecido en el tejido, preferentemente en tejido liso (figura 16, figura 23 sup.). Con esto, la presencia de las nanopartículas introducidas en las moscas queda confirmada incluso en la etapa adulta. A diferencia de los cortes en larva, aquí los tejidos se encuentran completamente desarrollados y se descarta que los cúmulos se hayan desplazado al momento de manipular las moscas.

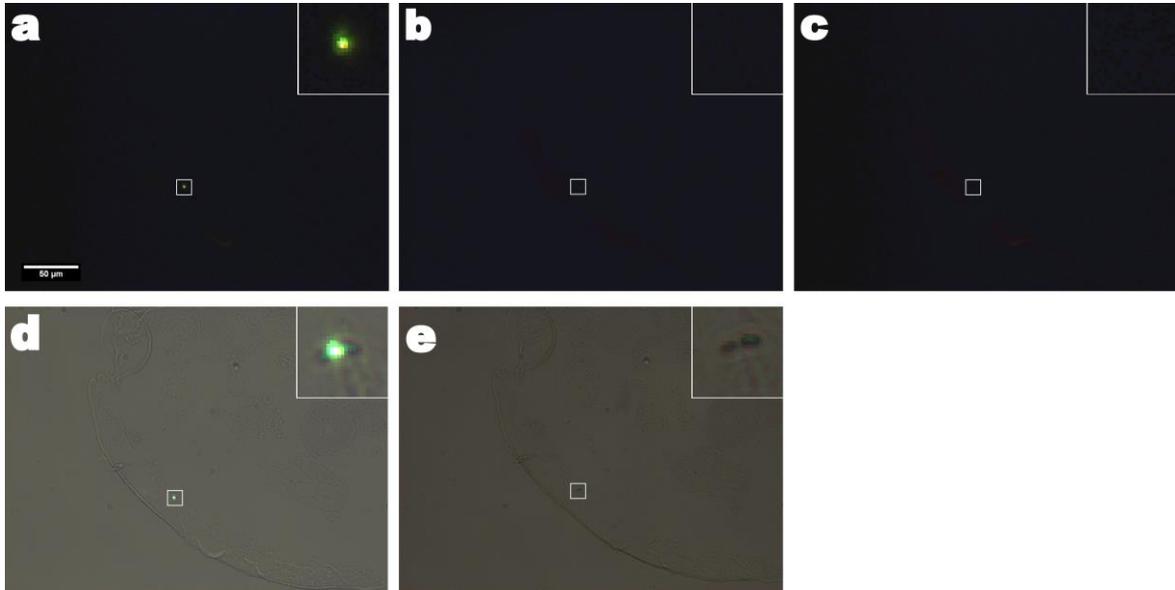


Figura 16. Corte histológico de adulto, inyectado en larva con una solución de nanopartículas de 100 nm de diámetro, utilizando el equipo Nanoliter 2000. En cada imagen las dos regiones donde se encuentra un punto fluorescente se han aumentado 6 veces y se ha colocado en las esquinas superiores. Se muestran las observaciones del mismo corte histológico con a) luz azul, b) luz verde, c) luz roja, d) luz blanca y azul simultáneamente, e) luz blanca. Diámetro aproximado del cúmulo: 0.88 µm. La barra de escala mide 50 µm.

Con los resultados de los cortes de moscas microinyectadas, se puede confirmar que las nanopartículas utilizadas resisten el procedimiento de fijación de tejidos. De esta forma, se descarta que las nanopartículas se removieran o se degradaran, debido a algún paso experimental, como podría ser el proceso de deshidratación de los tejidos con las soluciones de acetona, o el calentamiento de las muestras para endurecer el Spurr.

3.3 Cortes histológicos de moscas tratadas con ondas de choque

3.3.1 Observación de moscas control

Al igual que con los cortes de moscas microinyectadas, para visualizar estos cortes de experimentos con ondas de choque, se utilizó un microscopio óptico *Nikon*, modelo E600, con un objetivo *Nikon Plan Fluor 20x/0.50*. Una lámpara de mercurio y filtros de epifluorescencia fueron requeridos para obtener luz azul, verde y roja. Al observar cortes de moscas puestas en solución de nanopartículas, pero sin contar con el tratamiento de ondas de choque, las cortes de tejido de larvas no

mostraron evidencia alguna de la inserción de nanopartículas en el tejido (figura 17, figura 24 sup.), como era de esperarse, pues no se favoreció la inserción.

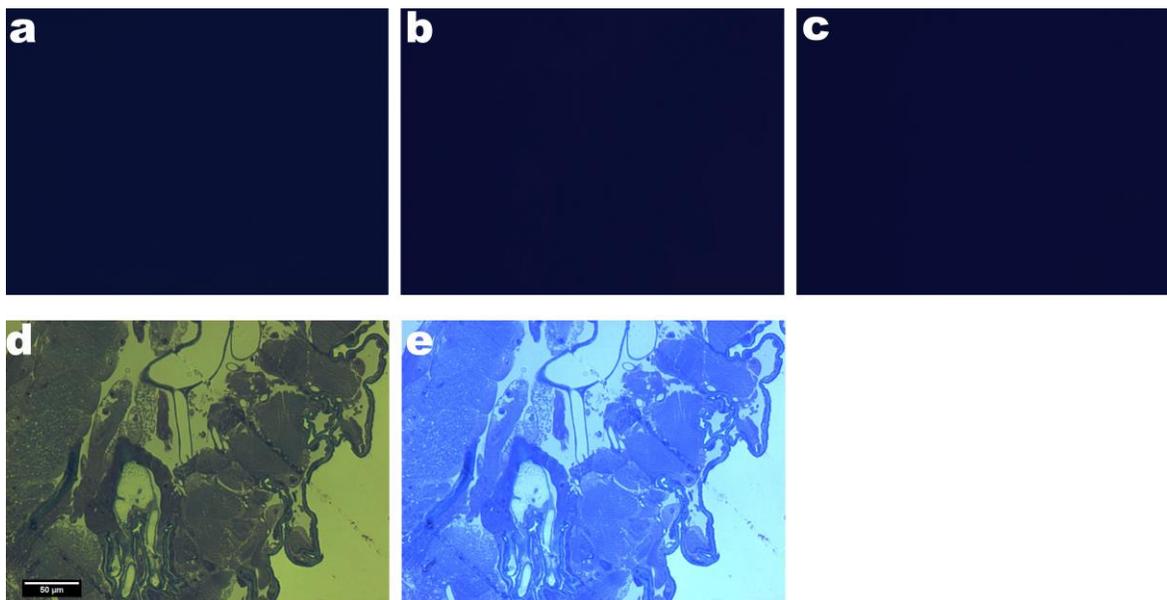


Figura 17. Corte histológico de larva tratada en solución de nanopartículas sin ondas de choque. Se muestran las observaciones del mismo corte histológico con a) luz azul, b) luz verde, c) luz roja, d) luz blanca y azul simultáneamente, e) luz blanca. Como se esperaba, no hay evidencia alguna de la presencia de nanopartículas fluorescentes. La barra de escala mide 50 µm.

3.3.2 Observación de cortes de moscas tratadas

Observando larvas tratadas en solución con nanopartículas de 4 nm, aparecieron pequeños cúmulos fluorescentes que tienen el comportamiento de las nanopartículas utilizadas, es decir, sólo presentaron fluorescencia al incidirles luz azul. Estos cúmulos fueron encontrados en tejido liso (figura 18, figura 25 sup.).

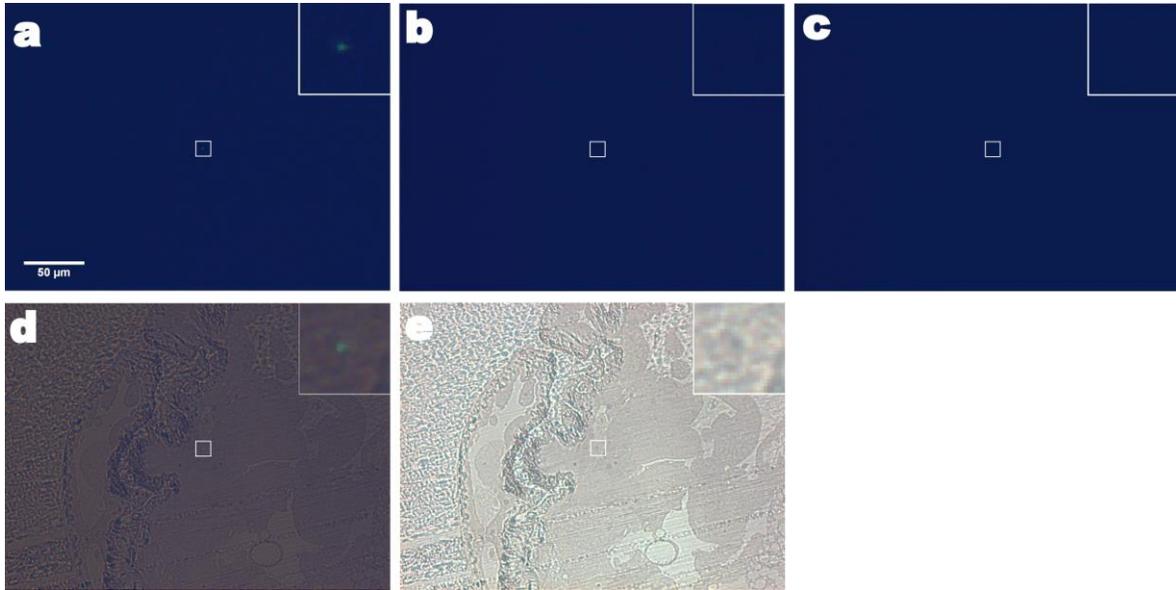


Figura 18. Corte histológico de larva tratada con ondas de choque en solución con nanopartículas de 4 nm. En cada imagen la región donde se encuentra el punto fluorescente se ha aumentado 6 veces y se ha colocado en la esquina superior derecha. Se muestran las observaciones del mismo corte histológico con a) luz azul, b) luz verde, c) luz roja, d) luz blanca y azul simultáneamente, e) luz blanca. Diámetro aproximado del cúmulo: 0.96 μm . La barra de escala mide 50 μm .

En los adultos tratados en solución de nanopartículas de 100 nm de diámetro, también se observaron cúmulos fluorescentes que se comportan como las nanopartículas utilizadas, en este caso en el tejido intestinal (figura 19).

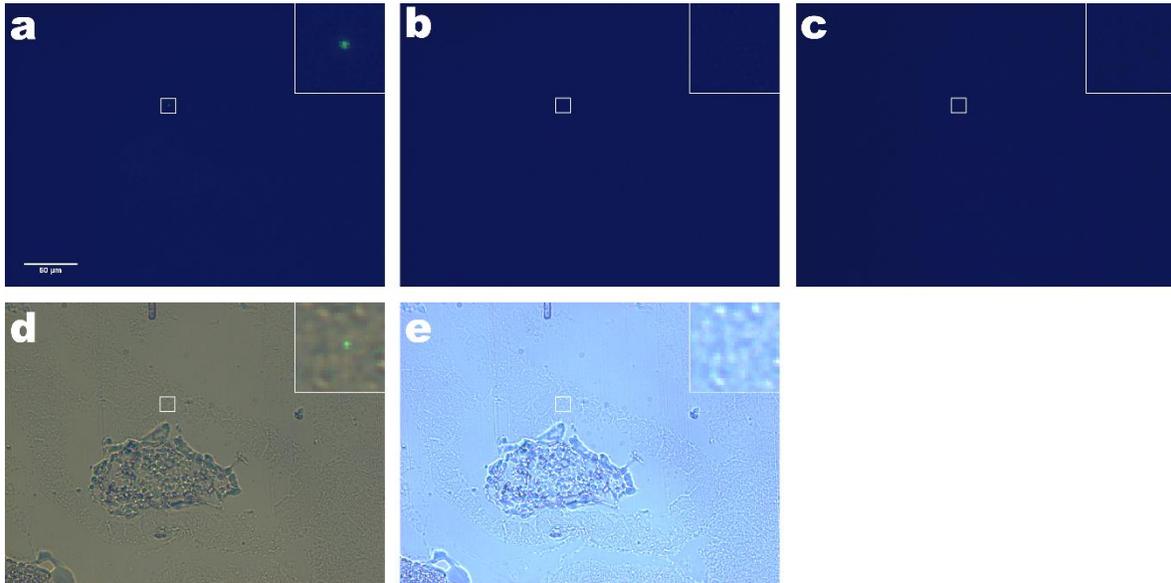


Figura 19. Corte histológico de adulto tratado con ondas de choque en solución con nanopartículas de 100 nm. En cada imagen la región donde se encuentra el punto fluorescente se ha aumentado 6 veces y se ha colocado en la esquina superior derecha. Se muestran las observaciones del mismo

Figura 19 continuación

corte histológico con a) luz azul, b) luz verde, c) luz roja, d) luz blanca y azul simultáneamente, e) luz blanca. Diámetro aproximado del cúmulo: 0.68 μm . La barra de escala mide 50 μm .

Se ha encontrado que ambos tamaños de nanopartículas ingresan dentro de las moscas, ya que estaban presentes en cortes histológicos de larvas (4 nm) y adultos (100 nm). No obstante, la eficiencia de la inserción es baja. Sin embargo, se debe considerar que en estas observaciones sólo somos capaces de ver cúmulos de nanopartículas, por lo que no se descarta la presencia de más nanopartículas. Debido a que las nanopartículas se encuentran originalmente en un surfactante, los cúmulos se podrían formar al ser acumulados por el sistema inmune de la mosca, o al interactuar con la solución de *buffer* TE antes de los tratamientos con ondas de choque. Posiblemente se trata del segundo caso, ya que cúmulos de nanopartículas se encontraron en la muestra que sólo contenía la preparación con *buffer* TE (figura 14).

Como se mencionó anteriormente, la permeabilidad de la membrana debido a la acción de ondas de choque en distintos organismos biológicos eucariontes ya ha sido comprobada (Gambihler *et al.*, 1994; Rivera *et al.*, 2012; Magaña *et al.*, 2013). En el caso particular del embrión temprano de la mosca de la fruta, entran en juego capas como la membrana vitelina y el corion (Margaritis *et al.*, 1980). En otros experimentos para permeabilizar la membrana se ha utilizado como primer paso la remoción del corion, lo cual es un proceso relativamente sencillo (Watson, 1990). No obstante, esto puede hacer menos atractiva la técnica, ya que se consume tiempo valioso de las etapas del embrión como célula multinucleada, además de la posibilidad de afectar seriamente la supervivencia de los embriones a un tratamiento con ondas de choque. Tener pruebas de inserción de material exógeno es una buena señal de que se puede evitar la remoción previa del corion. Los cúmulos observados en los cortes histológicos se ven distorsionados por la dispersión de la luz incidente. Al observar las muestras a las que se les aplicó ondas de choque en solución de nanopartículas, en ocasiones se encontraron cúmulos fuera de los cortes histológicos, lo que puede indicar que las nanopartículas no se acoplan perfectamente a la matriz con Spurr. Otra alternativa es que son lo suficientemente duras para ser desplazadas por la navaja de vidrio. La posibilidad de que sean remanentes de nanopartículas queda descartada, ya que esto no se observó en los cortes de las moscas control, donde se siguió el mismo procedimiento, pero sin aplicar ondas de choque.

4. Aplicaciones propuestas

4.1 Método de transfección en *Drosophila melanogaster*

Como se ha discutido en la introducción en cuanto al estudio de los genes en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), la microinyección es el método más utilizado para insertar material exógeno dentro del embrión, por lo que los métodos de transfección están sujetos a la microinyección como primer paso (Cartwright, 2009). La microinyección requiere de mucho tiempo de trabajo y de experiencia para ser exitosa, ya que emplea un aparato de precisión que se opera manualmente (Xu, 2018). Utilizar ondas de choque para crear moscas transgénicas ofrecería mayor velocidad en el procedimiento, en el lapso máximo de unos minutos, usando más embriones a la vez. Vectores y nanopartículas dopadas podrían utilizarse para asistir el proceso. De esta forma, se vería facilitado el estudio de genes en *Drosophila melanogaster*.

Otro método que se ha considerado en la literatura para introducir material genético en organismos biológicos es la biobalística, en la cual se utilizan microproyectiles de alta velocidad. Sin embargo, es un método más agresivo para el organismo a transformar genéticamente, y sólo se ha utilizado regularmente en las plantas, cuyas células cuentan con pared celular (Sanford, 1990). No obstante, se han reportado un par de intentos para transformar genéticamente moscas por medio de biobalística. En el primero, se precipitó una solución de DNA en partículas de tungsteno de 1.2 μm de diámetro, después se bombardearon embriones con un sistema de biobalística y se obtuvo una mosca transformante (Baldarelli & Lengyel, 1990). En el segundo, se probó con biobalística cubriendo partículas de oro de 1 μm de diámetro con elementos P, vectores *piggyBac*, y RNA de doble cadena. Con elementos P y vectores *piggyBac*, se obtuvo un porcentaje de transformantes de entre 3 y 4%, muy similar al reportado normalmente para la microinyección (0.5-5%). En cuanto al empleo de RNA de doble cadena, se obtuvo un éxito moderado (Yuen *et al.*, 2008). Hasta la fecha, este método no ha cobrado relevancia para crear transformantes de *Drosophila*, y en lo concerniente a la inyección de RNA de doble cadena, solamente ha sido señalado como una posible técnica de control de plagas de insectos mediante RNA de interferencia (Katoch *et al.*, 2013).

Las ondas de choque también podrían emplearse para introducir otro tipo de material biológico en los embriones de la mosca de la fruta, como se ha hecho con la microinyección. Ejemplos de esto son la introducción de RNA (Rosenberg *et al.* 1985), o de proteínas (Brust-Mascher & Scholey, 2009).

4.2 Inserción de nanopartículas

Las nanopartículas han sido utilizadas en sistemas biológicos, particularmente células, donde se tiene que considerar aspectos como la superficie de la nanopartícula y su dispersión en el medio utilizado (Verma & Stellacci, 2010). Usando ondas de choque, se podrían introducir nanopartículas en el embrión de *Drosophila melanogaster* para investigaciones biológicas, dando información sobre la dirección preferente que toman o la forma en que se integran con el sistema biológico desde etapas tempranas del desarrollo, dependiendo del tipo de estudio que se está haciendo. Estudiar el tamaño y forma de los poros generados por la inserción de nanopartículas en un organismo biológico podría ser de interés para investigadores en ciencia de materiales. Al introducir nanopartículas con o sin material biológico, queda la posibilidad de utilizarlas para saber si la inserción está ocurriendo, de forma similar a como se ha hecho en este trabajo.

5. Conclusiones generales

En esta tesis se reporta una técnica para introducir material exógeno en el embrión temprano de la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), obteniendo pruebas de la inserción de nanopartículas fluorescentes. Hay evidencia de la inserción de nanopartículas de 4 nm y 100 nm de diámetro, con la única diferencia notable de que las nanopartículas de 4 nm parecían dirigirse con facilidad a los intestinos de las larvas en las observaciones *in vivo*. Estos resultados dieron las primeras pruebas de que las nanopartículas se insertan en las moscas, lo que se ve reforzado por la observación en los cortes histológicos. Se ha encontrado que las ondas de choque tienen un efecto sobre la supervivencia de las moscas, lo que confirma que están respondiendo a los tratamientos. Las nanopartículas no se encontraron dentro de las moscas en los experimentos sin ondas de choque, por lo que queda constatada su contribución. Además, se confirma que las nanopartículas que se incorporan se encuentran dentro de la mosca hasta la etapa adulta. Los principales responsables de la perforación del exterior del embrión podrían ser los microjets de alta velocidad, generados por la cavitación acústica, al igual que como ocurre con otras células (Li *et al.*, 2013; Magaña *et al.*, 2013), Esta es una hipótesis que quedaría por confirmarse. Ya que las observaciones reportadas en esta tesis se limitan a ver cúmulos de nanopartículas, probablemente formados en la preparación de nanopartículas con *buffer* TE, no se puede establecer la eficiencia de inserción. Sería interesante tomar imágenes en microscopía electrónica de barrido de los embriones tratados con ondas de choque para analizar el tamaño y forma de los poros creados.

La inserción de material genético para transformar moscas de la fruta se perfila como la mejor aplicación a la que se puede dirigir esta investigación, lo cual representaría una buena alternativa frente a la microinyección al emplear menos tiempo, requiriendo sólo experiencia mínima en el manejo de los embriones. Al realizarla en los primeros ciclos de división nuclear del embrión de *Drosophila*, se esperaría que el material genético se integre sin tener que apuntar específicamente a los núcleos involucrados en la formación de la línea germinal.

6. Anexo: Figuras suplementarias

6.1 Tratamiento de embriones con ondas de choque en solución de nanopartículas

6.1.1 Efectos en el desarrollo de las moscas



Figura 20 sup. Moscas adultas que fueron tratadas con ondas de choque, con solución de nanopartículas de 100 nm de diámetro. El fenotipo no presenta alteración alguna. Las alas corrugadas de la mosca en la parte superior derecha son típicas de adultos que acaban de salir de la pupa.

6.2 Moscas microinyectadas con solución de nanopartículas con el equipo *Nanoliter 2000*

6.2.1 Observación de larvas en fluorescencia



Figura 21 sup. Larva microinyectada con nanopartículas de 100 nm, utilizando el equipo Nanoliter 2000. Se señala con una flecha un cúmulo fluorescente debido a la inyección de nanopartículas.

6.2.2 Observación de cortes histológicos

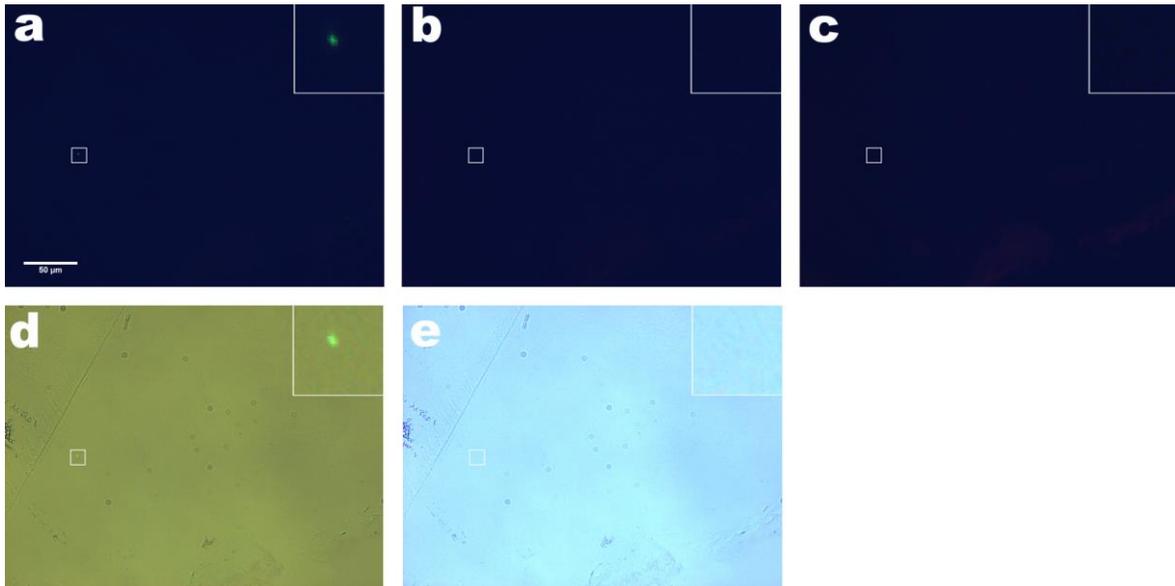


Figura 22 sup. Corte histológico de larva inyectada con una solución de nanopartículas de 100 nm de diámetro, utilizando el equipo Nanoliter 2000. En cada imagen las dos regiones donde se encuentra un punto fluorescente se han aumentado 6 veces y se ha colocado en las esquinas superiores. Se muestran las observaciones del mismo corte histológico con a) luz azul, b) luz verde, c) luz roja, d) luz blanca y azul simultáneamente, e) luz blanca. Diámetro aproximado del cúmulo: 0.60 μm . La barra de escala mide 50 μm .

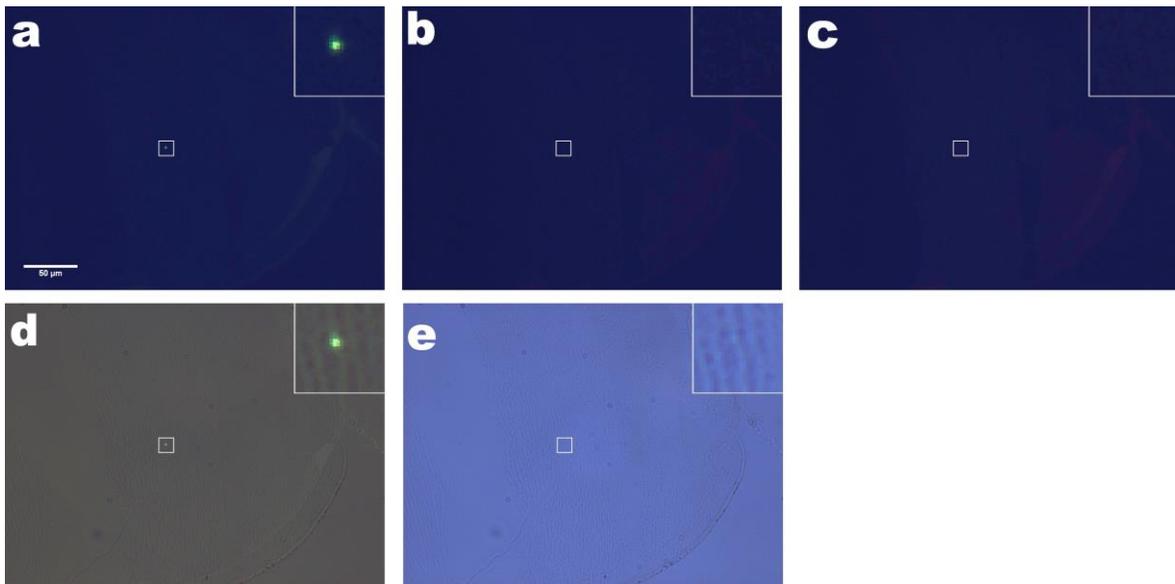


Figura 23 sup. Corte histológico de adulto, inyectado en larva con una solución de nanopartículas de 100 nm de diámetro, utilizando el equipo Nanoliter 2000. En cada imagen las dos regiones donde se encuentra un punto fluorescente se han aumentado 6 veces y se ha colocado en las esquinas superiores. Se muestran las observaciones del mismo corte histológico con a) luz azul, b) luz verde,

Figura 23 sup. continuación

c) luz roja, d) luz blanca y azul simultáneamente, e) luz blanca. Diámetro aproximado del cúmulo: 0.61 μm . La barra de escala mide 50 μm .

6.3 Cortes histológicos de moscas tratadas con ondas de choque

6.3.1 Observación de moscas control

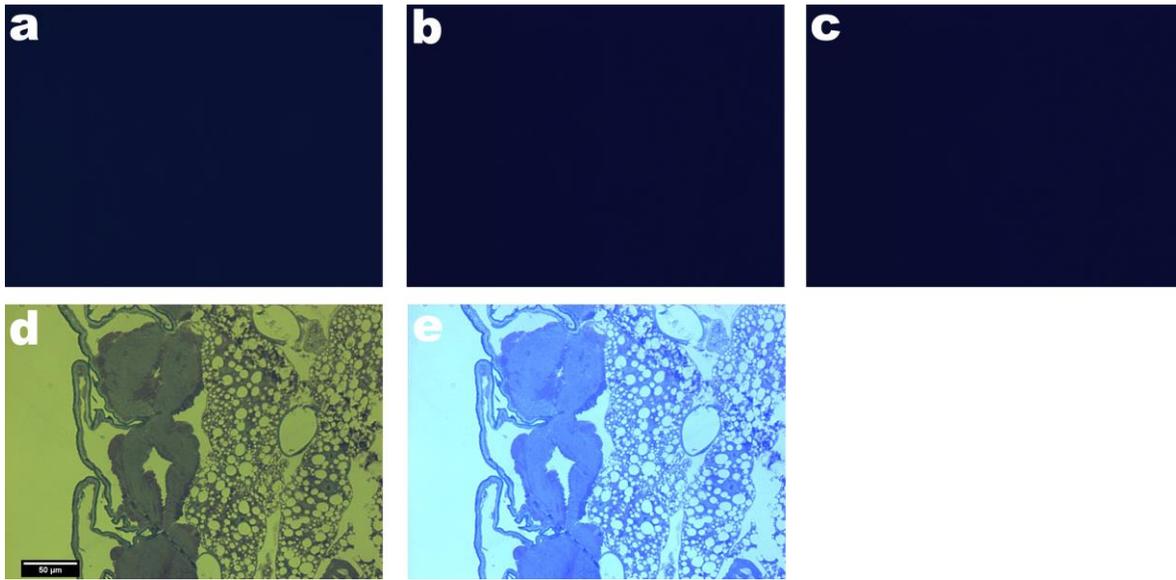


Figura 24 sup. Corte histológico de larva tratada en solución de nanopartículas sin ondas de choque. Se muestran las observaciones del mismo corte histológico con a) luz azul, b) luz verde, c) luz roja, d) luz blanca y azul simultáneamente, e) luz blanca. Como se esperaba, no hay evidencia alguna de la presencia de nanopartículas fluorescentes. La barra de escala mide 50 μm .

6.3.2 Observación de cortes de moscas tratadas

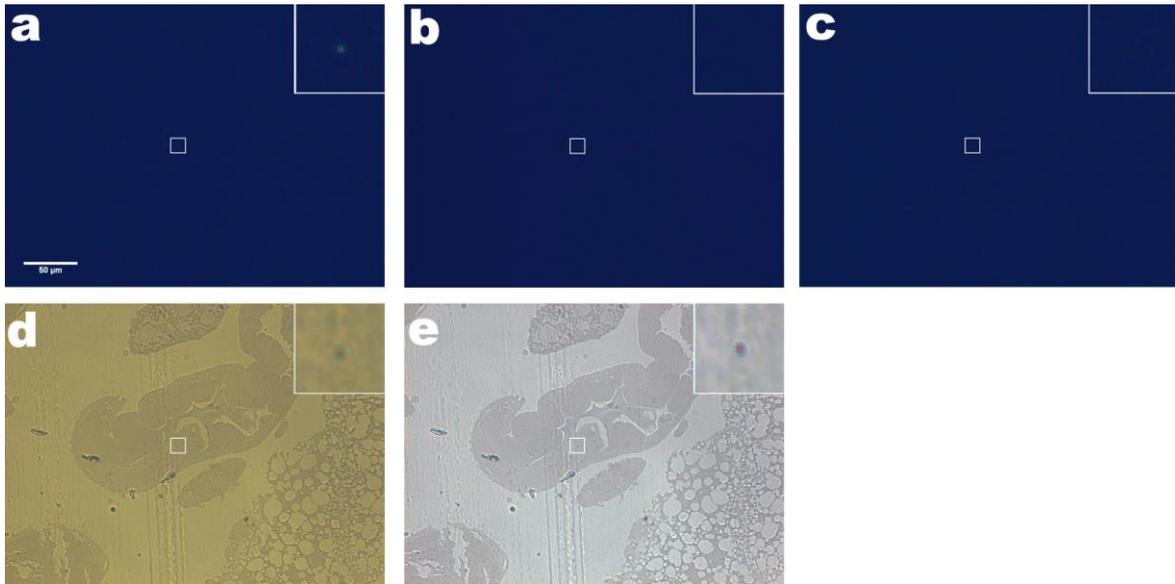


Figura 25 sup. Corte histológico de larva tratada con ondas de choque en solución con nanopartículas de 4 nm. En cada imagen la región donde se encuentra el punto fluorescente se ha aumentado 6 veces y se ha colocado en la esquina superior derecha. Se muestran las observaciones del mismo corte histológico con a) luz azul, b) luz verde, c) luz roja, d) luz blanca y azul simultáneamente, e) luz blanca. El tamaño aproximado del cúmulo es de: 0.48 μm . La barra de escala mide 50 μm .

7. Índice de figuras

Figura 1. Esquema del fenómeno de cavitación acústica inducido por las ondas de choque de uso médico	7
Figura 2. 14 ciclos de divisiones nucleares en el embrión temprano de la mosca de la fruta (<i>Drosophila melanogaster</i>)	12
Figura 3. Ciclo de vida de la mosca de la fruta (<i>Drosophila melanogaster</i>)	14
Figura 4. Anatomía del adulto de la mosca de la fruta (<i>Drosophila melanogaster</i>)	15
Figura 5. Registro de supervivencia de moscas de la fruta tratadas con 50, 100 y 200 ondas de choque	18
Figura 6. Esquema simplificado del generador de ondas de choque <i>Piezoson 100 plus</i>	21
Figura 7. Nanopartículas fluorescentes de carbono en suspensión	22
Figura 8. Gráficas del registro de vida de moscas en solución con nanopartículas (100 nm) fluorescentes	26
Figura 9. Gráficas del registro de vida de moscas en solución con nanopartículas (4 nm) fluorescentes	27
Figura 10. Larvas observadas en fluorescencia, después del tratamiento con ondas de choque en solución de nanopartículas de 100 nm	28
Figura 11. Larvas observadas en fluorescencia, después del tratamiento con ondas de choque en solución de nanopartículas de 4 nm	29
Figura 12. Moscas adultas que fueron tratadas con ondas de choque	30
Figura 13. Larva microinyectada con nanopartículas de 100 nm, utilizando el equipo <i>Nanoliter 2000</i>	31
Figura 14. Cinco cúmulos fluorescentes de nanopartículas observados en microscopio	32
Figura 15. Corte histológico de larva inyectada con una solución de nanopartículas de 100 nm de diámetro, utilizando el equipo <i>Nanoliter 2000</i>	33
Figura 16. Corte histológico de adulto, inyectado en larva con una solución de nanopartículas de 100 nm de diámetro, utilizando el equipo <i>Nanoliter 2000</i>	34
Figura 17. Corte histológico de larva tratada en solución de nanopartículas sin ondas de choque	35
Figura 18. Corte histológico de larva tratada con ondas de choque en solución con nanopartículas de 4 nm	36
Figura 19. Corte histológico de adulto tratado con ondas de choque en solución con nanopartículas de 100 nm	36
Figura 20 sup. Moscas adultas que fueron tratadas con ondas de choque, con solución de nanopartículas de 100 nm de diámetro	41
Figura 21 sup. Larva microinyectada con nanopartículas de 100 nm, utilizando el equipo <i>Nanoliter 2000</i>	42

Figura 22 sup. Corte histológico de larva inyectada con una solución de nanopartículas de 100 nm de diámetro, utilizando el equipo <i>Nanoliter 2000</i>	43
Figura 23 sup. Corte histológico de adulto, inyectado en larva con una solución de nanopartículas de 100 nm de diámetro, utilizando el equipo <i>Nanoliter 2000</i>	43
Figura 24 sup. Corte histológico de larva tratada en solución de nanopartículas sin ondas de choque.....	44
Figura 25 sup. Corte histológico de larva tratada con ondas de choque en solución con nanopartículas de 4 nm	45

8. Glosario

Eficiencia cuántica: Cantidad definida para un dispositivo fotosensible como el porcentaje de fotones que chocan con la superficie fotorreactiva que producirá un par electrón-hueco. Es una medida precisa de la sensibilidad del dispositivo.

Elementos P: Secuencias de DNA que pueden moverse a lo largo del genoma (transposón), lo que implica que permiten la transferencia de segmentos específicos de DNA evitando problemas de reacomodamiento de la secuencia. Fueron propuestos por primera vez para crear transformantes en la mosca de la fruta por Rubin & Spradling (1982).

Fase G₁: Periodo del ciclo celular de crecimiento y duplicación de las organelas citoplásmicas, previo a la replicación del DNA en la fase S (Curtis *et al.*, 2008).

Fase G₂: Etapa del ciclo celular en donde los cromosomas recién duplicados comienzan a enrollarse lentamente y condensarse en forma compacta, lo que permite los movimientos complejos y separación del material genético que se desarrollará posteriormente en la mitosis. Esta etapa es subsecuente a la fase S (Curtis *et al.*, 2008).

Fluorescencia: Emisión de fotones de una molécula excitada, la cual involucra una transición radioactiva entre estados vibracionales de la misma multiplicidad (Valeur, 2003).

Spurr: Resina utilizada en la fijación de tejidos, ya que su baja viscosidad (60 cP) le permite penetrar con mayor profundidad en los tejidos y formar una matriz para cortes histológicos.

yellow white: Cepa silvestre de *Drosophila melanogaster*, con fenotipo característico de color amarillo claro en el tórax y blanco en los ojos.

9. Referencias

- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F. & George, R.A., 2000. *The genome sequence of Drosophila melanogaster*. Science, 287(5461), pp.2185-2195.
- Adolfsson, K., Schneider, M., Hammarin, G., Häcker, U. & Prinz, C.N., 2013. *Ingestion of gallium phosphide nanowires has no adverse effect on Drosophila tissue function*. Nanotechnology, 24(28), pp.1-7.
- Allocca, M., Zola, S. & Bellosta, P. (2018). *The Fruit Fly, Drosophila melanogaster: The Making of a Model (Part I), Drosophila melanogaster - Model for Recent Advances in Genetics and Therapeutics*, Farzana Khan Perveen, IntechOpen, pp.115-117.
- Alpatov, W.W., 1929. *Growth and variation of the larvae of Drosophila melanogaster*. Journal of Experimental Zoology, 52(3), pp.407-437.
- Anand, A.S., Prasad, D.N., Singh, S.B. & Kohli, E., 2017. *Chronic exposure of zinc oxide nanoparticles causes deviant phenotype in Drosophila melanogaster*. Journal of hazardous materials, 327, pp.180-186.
- Armstrong, N., Ramamoorthy, M., Lyon, D., Jones, K. & Duttaroy, A., 2013. *Mechanism of silver nanoparticles action on insect pigmentation reveals intervention of copper homeostasis*. PLoS One, 8(1), pp.1-8.
- Baldarelli, R.M. & Lengyel, J.A., 1990. *Transient expression of DNA after ballistic introduction into Drosophila embryos*. Nucleic acids research, 18(19), p.5903.
- Barreto, J.A., O'Malley, W., Kubeil, M., Graham, B., Stephan, H. & Spiccia, L., 2011. *Nanomaterials: applications in cancer imaging and therapy*. Advanced materials, 23(12), pp.H18-H40.
- Bassett, A.R., Tibbit, C., Ponting, C.P. & Liu, J.L., 2013. *Highly efficient targeted mutagenesis of Drosophila with the CRISPR/Cas9 system*. Cell reports, 4(1), pp.220-228.
- Becker, D.M. & Guarente, L., 1991. [12] *High-efficiency transformation of yeast by electroporation*. Methods in enzymology (Vol. 194). Academic Press. pp. 182-187.
- Bellen, H.J. & Yamamoto, S., 2015. *Morgan's legacy: fruit flies and the functional annotation of conserved genes*. Cell, 163(1), pp.12-14.
- Bischof, J., Maeda, R.K., Hediger, M., Karch, F. & Basler, K., 2007. *An optimized transgenesis system for Drosophila using germ-line-specific ϕ C31 integrases*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 104(9), pp.3312-3317.
- Blumenstiel, J.P., Noll, A.C., Griffiths, J.A., Perera, A.G., Walton, K.N., Gilliland, W.D., Hawley, R.S. & Staehling-Hampton, K., 2009. *Identification of EMS-induced mutations in Drosophila melanogaster by whole-genome sequencing*. Genetics, 182(1), pp.25-32.

- Borm, P.J., Robbins, D., Haubold, S., Kuhlbusch, T., Fissan, H., Donaldson, K., Schins, R., Stone, V., Kreyling, W., Lademann, J. & Krutmann, J., 2006. *The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC*. Particle and fibre toxicology, 3(1), p.11.
- 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), pp.137-150.
- Brust-Mascher, I. & Scholey, J.M., 2009. *Microinjection techniques for studying mitosis in the Drosophila melanogaster syncytial embryo*. Journal of visualized experiments: JoVE, (31). pp. 1-3.
- Bulte, J.W., 2005. *Magnetic nanoparticles as markers for cellular MR imaging*. Journal of Magnetism and Magnetic materials, 289, pp.423-427.
- 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), pp.1785-1795.
- Cameotra, S.S. & Dhanjal, S., 2010. *Environmental nanotechnology: nanoparticles for bioremediation of toxic pollutants*. Bioremediation technology. Springer, Dordrecht. pp. 348-353
- Campbell, N.A. & Reece, J.B., 2007. *Biología*. Ed. Médica Panamericana. p. 422
- Campos-Ortega, J.A. & Hartenstein, V., 1997. *The Embryonic Development of Drosophila Melanogaster*. Springer Science & Business Media. pp. 9-25.
- Carmona, E.R., Inostroza-Blancheteau, C., Rubio, L. & Marcos, R., 2016. *Genotoxic and oxidative stress potential of nanosized and bulk zinc oxide particles in Drosophila melanogaster*. Toxicology and industrial health, 32(12), pp.1987-2001.
- Cartwright, E.J., 2009. *Transgenesis Techniques*. Humana Press. pp.3-4.
- Chaussy, C., Schmiedt, E., Jocham, B., Brendel, W., Forssmann, B. & Walther, V., 1982. *First clinical experience with extracorporeally induced destruction of kidney stones by shock waves*. The Journal of urology, 127(3), pp.417-420.
- Coleman, A.J., Saunders, J.E., Crum, L.A. & Dyson, M., 1987. *Acoustic cavitation generated by an extracorporeal shockwave lithotripter*. Ultrasound in medicine & biology, 13(2), pp.69-76.
- Crum, L.A., 1988. *Cavitation microjets as a contributory mechanism for renal calculi disintegration in ESWL*. The Journal of urology, 140(6), pp.1587-1590.
- Cummings, M.R. & King, R.C., 1969. *The cytology of the vitellogenic stages of oogenesis in Drosophila melanogaster. I. General staging characteristics*. Journal of morphology, 128(4), pp.427-441.

- Curtis, H., Sue Barnes, N., Schnek, A. & Massarini, A.B., 2008. *Biología*. Séptima edición en español. Santiago de Chile, Chile. Editorial Médica Panamericana. p. 129.
- Dower, W.J., Miller, J.F. & Ragsdale, C.W., 1988. *High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation*. Nucleic acids research, 16(13), pp.6127-6145.
- Eliseeva, S.V., Song, B., Vandevyver, C.D., Chauvin, A.S., Wacker, J.B. & Bünzli, J.C.G., 2010. *Increasing the efficiency of lanthanide luminescent bioprobes: bioconjugated silica nanoparticles as markers for cancerous cells*. New Journal of Chemistry, 34(12), pp.2915-2921.
- Feynman, R.P., 1992. *There's plenty of room at the bottom [data storage]*. Journal of microelectromechanical systems, 1(1), pp.60-66.
- Flagg, R.O., 1988. *Carolina Drosophila Manual*. Burlington: Carolina Biological Supply Company. p.8
- Foe, V.E. & Alberts, B.M., 1983. *Studies of nuclear and cytoplasmic behaviour during the five mitotic cycles that precede gastrulation in Drosophila embryogenesis*. Journal of cell science, 61(1), pp.31-70.
- Gambihler, S., Delhis, M. & Ellwart, J.W., 1994. *Permeabilization of the plasma membrane of L1210 mouse leukemia cells using lithotripter shock waves*. The Journal of membrane biology, 141(3), pp.267-275.
- Gambihler, S., Delius, M. & Ellwart, J.W., 1992. *Transient increase in membrane permeability of L1210 cells upon exposure to lithotripter shock waves in vitro*. Naturwissenschaften, 79(7), pp.328-329.
- Gerdesmeyer, L., von Eiff, C., Horn, C., Henne, M., Roessner, M., Diehl, P. & Gollwitzer, H., 2005. *Antibacterial effects of extracorporeal shock waves*. Ultrasound in medicine & biology, 31(1), pp.115-119.
- Ghosh, S. & Feany, M.B., 2004. *Comparison of pathways controlling toxicity in the eye and brain in Drosophila models of human neurodegenerative diseases*. Human molecular genetics, 13(18), pp.2011-2018.
- Gilbert, S.F., 2000. *Developmental Biology*. 6th edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates. *Early Drosophila Development*. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10081/>
- Graham, P. & Pick, L., 2017. *Drosophila as a model for diabetes and diseases of insulin resistance*. Current topics in developmental biology (Vol. 121). Academic Press. pp. 397-419.
- Greeve, I., Kretschmar, D., Tschäpe, J.A., Beyn, A., Brellinger, C., Schweizer, M., Nitsch, R.M. & Reifegerste, R., 2004. *Age-dependent neurodegeneration and Alzheimer-amyloid plaque formation in transgenic Drosophila*. Journal of Neuroscience, 24(16), pp.3899-3906.

- Guozhong, C., 2004. *Nanostructures and nanomaterials: synthesis, properties and applications*. World scientific. p.5.
- Herrera, S.C. & Bach, E.A., 2019. *JAK/STAT signaling in stem cells and regeneration: from Drosophila to vertebrates*. *Development*, 146(2), pp.1-12.
- Hyde, R.R., 1921. *A high fecundity record for Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the Indiana Academy of Science (Vol. 31)*, pp. 259-260.
- Jaeger, P., Redha, F., Uhlschmid, G. & Hauri, D., 1988. *Morphologic changes in canine kidneys following extracorporeal shock wave treatment*. *Journal of Endourology*, 2(2), pp.205-213.
- Jagadeesh, G., Nataraja, K.N. & Udayakumar, M., 2004. *Shock waves can enhance bacterial transformation with plasmid DNA*. *Current Science*, 87(6), pp.734-735.
- Kamdar, K.P., Wagner, T.N. & Finnerty, V., 1995. *Electroporation of Drosophila embryos*. *Animal Cell Electroporation and Electrofusion Protocols*. Humana Press. pp.239-243
- Karr, T.L. & Alberts, B.M., 1986. *Organization of the cytoskeleton in early Drosophila embryos*. *The Journal of cell biology*, 102(4), pp.1494-1509.
- Katoch, R., Sethi, A., Thakur, N. & Murdock, L.L., 2013. *RNAi for insect control: current perspective and future challenges*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 171(4), pp.847-873.
- Kidd, S. & Lieber, T., 2016. *Mechanism of notch pathway activation and its role in the regulation of olfactory plasticity in Drosophila melanogaster*. *PloS one*, 11(3), pp.1-25.
- Kochański, A.M., Mejnartowicz, J.P., Latos-Bieleńska, A., Etienne, J. & Filipczyński, L., 2001. *DNA damage induced by lithotripter generated shock waves*. *International urology and nephrology*, 32(3), pp.419-422.
- Kohler, R.E., 1993. *Drosophila: A life in the laboratory*. *Journal of the History of Biology*, 26(2), pp.281-310.
- Krehl, P.O., 2008. *History of shock waves, explosions and impact: a chronological and biographical reference*. Springer Science & Business Media. p. 6.
- Lauer, U., Bürgelt, E., Squire, Z., Messmer, K., Hofschneider, P.H., Gregor, M. & Delius, M., 1997. *Shock wave permeabilization as a new gene transfer method*. *Gene therapy*, 4(7), p.710.
- Lee, L.A. & Orr-Weaver, T.L., 2003. *Regulation of cell cycles in Drosophila development: intrinsic and extrinsic cues*. *Annual review of genetics*, 37(1), pp.545-578.
- Lee, S.H., Lee, H.Y., Lee, E.J., Khang, D. & Min, K.J., 2015. *Effects of carbon nanofiber on physiology of Drosophila*. *International journal of nanomedicine*, 10, p.3687.

- Li, Z.G., Liu, A.Q., Klaseboer, E., Zhang, J.B. & Ohl, C.D., 2013. *Single cell membrane poration by bubble-induced microjets in a microfluidic chip*. Lab on a Chip, 13(6), pp.1144-1150.
- Liu, X., Vinson, D., Abt, D., Hurt, R.H. & Rand, D.M., 2009. *Differential toxicity of carbon nanomaterials in Drosophila: larval dietary uptake is benign, but adult exposure causes locomotor impairment and mortality*. Environmental science & technology, 43(16), pp.6357-6363.
- Loew, M., Daecke, W., Kusnierczak, D., Rahmzadeh, M. & Ewerbeck, V., 1999. *Shock-wave therapy is effective for chronic calcifying tendinitis of the shoulder*. The Journal of bone and joint surgery. British volume, 81(5), pp.863-867.
- López-Marín, L.M., Millán-Chiu, B.E., Castaño-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), pp.41-52.
- Loske, A.M., 2017. *Medical and biomedical applications of shock waves*. Springer International Publishing. pp. 7-9.
- Lüersen, K., Röder, T. & Rimbach, G., 2019. *Drosophila melanogaster in nutrition research—the importance of standardizing experimental diets*. Genes & nutrition, 14(1), p.3.
- 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), pp.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, pp.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), pp.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), pp.430-434.
- Martin, S.G., Dobi, K.C. & St Johnston, D., 2001. *A rapid method to map mutations in Drosophila*. Genome biology, 2(9), pp.2-8.
- Maugeri-Sacca, M. & De Maria, R., 2018. *The Hippo pathway in normal development and cancer*. Pharmacology & therapeutics, 186, pp.60-72.
- Maynard, A.D., 2011. *Don't define nanomaterials*. Nature, 475(7354), p.31.
- Miyazaki, S.I. & Hagiwara, S., 1976. *Electrical properties of the Drosophila egg membrane*. Developmental biology, 53(1), pp.91-100.

- Mouzopoulos, G., Stamatakos, M., Mouzopoulos, D. & Tzurbakis, M., 2007. *Extracorporeal shock wave treatment for shoulder calcific tendonitis: a systematic review*. Skeletal Radiology, 36(9), pp.803-811.
- Neppiras, E.A., 1980. *Acoustic cavitation*. Physics reports, 61(3), pp.159-251.
- Nonidez, J.F., 1920. *The internal phenomena of reproduction in Drosophila*. The Biological Bulletin, 39(4), pp.207-230.
- Ogden, J.A., Tóth-Kischkat, A. & Schultheiss, R., 2001. *Principles of shock wave therapy*. Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007), 387, pp.8-17.
- Pandey, U.B. & Nichols, C.D., 2011. *Human disease models in Drosophila melanogaster and the role of the fly in therapeutic drug discovery*. Pharmacological reviews, 63(2), pp.411-436.
- Papassideri, I., Margaritis, L.H. & Gulik-Krzywicki, T., 1991. *The egg-shell of Drosophila melanogaster VI, structural analysis of the wax layer in laid eggs*. Tissue and Cell, 23(4), pp.567-575.
- Parkes, T.L., Elia, A.J., Dickinson, D., Hilliker, A.J., Phillips, J.P. & Boulianne, G.L., 1998. *Extension of Drosophila lifespan by overexpression of human SOD1 in motorneurons*. Nature genetics, 19(2), p.171.
- Pascucci, T., Perrino, J., Mahowald, A.P. & Waring, G.L., 1996. *Eggshell Assembly in Drosophila: Processing and Localization of Vitelline Membrane and Chorion Proteins*. Developmental biology, 177(2), pp.590-598.
- Philipp, A., Delius, M., Scheffczyk, C., Vogel, A. & Lauterborn, W., 1993. *Interaction of lithotripter-generated shock waves with air bubbles*. The Journal of the Acoustical Society of America, 93(5), pp.2496-2509.
- Pumera, M., 2011. *Graphene-based nanomaterials for energy storage*. Energy & Environmental Science, 4(3), pp.668-674.
- Rabinowitz, M., 1941. *Studies on the cytology and early embryology of the egg of Drosophila melanogaster*. Journal of Morphology, 69(1), pp.1-49.
- Rand, M.D., Montgomery, S.L., Prince, L. & Vorobjikina, D., 2014. *Developmental toxicity assays using the Drosophila model*. Current protocols in toxicology, 59(1), pp.1-12.
- Reversi, A., Loeser, E., Subramanian, D., Schultz, C. & De Renzis, S., 2014. *Plasma membrane phosphoinositide balance regulates cell shape during Drosophila embryo morphogenesis*. J Cell Biol, 205(3), pp.395-408.
- Rivera, A.L., Gomez-Lim, M., Fernandez, F. & Loske, A.M., 2012. *Physical methods for genetic plant transformation*. Physics of life reviews, 9(3), pp.308-345.

- Rosenberg, U.B., Preiss, A., Seifert, E., Jäckle, H. & Knipple, D.C., 1985. *Production of phenocopies by Krüppel antisense RNA injection into Drosophila embryos*. Nature, 313(6004), p.703.
- Rubin, G.M. & Spradling, A.C., 1982. *Genetic transformation of Drosophila with transposable element vectors*. Science, 218(4570), pp.348-353.
- Rubin, G.M. & Spradling, A.C., 1983. *Vectors for P element-mediated gene transfer in Drosophila*. Nucleic acids research, 11(18), pp.6341-6351.
- Sanford, J.C., 1990. *Biolistic plant transformation*. Physiologia Plantarum, 79(1), pp.206-209.
- Sass, W., Bräunlich, M., Dreyer, H.P., Matura, E., Folberth, W., Priesmeyer, H.G. & Seifert, J., 1991. *The mechanisms of stone disintegration by shock waves*. Ultrasound in medicine & biology, 17(3), pp.239-243.
- Shrivastava, S.K., 2005. *Shock wave treatment in medicine*. Journal of biosciences, 30(2), pp.269-275.
- Takayama, K. & Saito, T., 2004. *Shock wave/geophysical and medical applications*. Annu. Rev. Fluid Mech., 36, pp.347-379.
- Thiel, M., 2001. *Application of shock waves in medicine*. Clinical Orthopaedics and Related Research, 387, pp.18-21.
- Tower, J., 2000. *Transgenic methods for increasing Drosophila life span*. Mechanisms of ageing and development, 118(1-2), pp.1-14.
- Valeur, B., 2003. *Molecular fluorescence*. Digital Encyclopedia of Applied Physics, pp.477-531.
- Vecchio, G., Galeone, A., Brunetti, V., Maiorano, G., Rizzello, L., Sabella, S., Cingolani, R. & Pompa, P.P., 2012. *Mutagenic effects of gold nanoparticles induce aberrant phenotypes in Drosophila melanogaster*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 8(1), pp.1-7.
- 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. pp. 9-45.
- Verma, A. & Stellacci, F., 2010. *Effect of surface properties on nanoparticle–cell interactions*. Small, 6(1), pp.12-21.
- Wang, C.J., 2012. *Extracorporeal shockwave therapy in musculoskeletal disorders*. Journal of orthopaedic surgery and research, 7(1), p.11.
- Wang, C.J., Chen, H.S. & Huang, T.W., 2002. *Shockwave therapy for patients with plantar fasciitis: a one-year follow-up study*. Foot & ankle international, 23(3), pp.204-207.

Watson, C.E., 1990. *The permeability of Drosophila melanogaster embryos* (Master dissertation, University of British Columbia). pp. 50-52.

Wolff, J.M., Mattelaer, P., Boeckmann, W., Kraemer, U. & Jakse, G., 1997. *Evaluation of possible tissue damage in patients undergoing extracorporeal shock wave lithotripsy employing C-reactive protein*. Scandinavian journal of urology and nephrology, 31(1), pp.31-34.

Worley, M.I., Setiawan, L. & Hariharan, I.K., 2012. *Regeneration and transdetermination in Drosophila imaginal discs*. Annual review of genetics, 46, pp.289-310.

Xu, Q., 2018. *Review of Microinjection Systems*. Micromachines for Biological Micromanipulation. Springer, Cham. pp. 15-47

You, S., Fulga, T.A., Van Vactor, D. & Jackson, F.R., 2018. *Regulation of circadian behavior by astroglial MicroRNAs in Drosophila*. Genetics, 208(3), pp.1195-1207.

Yuen, J.L., Read, S.A., Brubacher, J.L., Singh, A.D. & Whyard, S., 2008. *Biolistics for high-throughput transformation and RNA interference in Drosophila melanogaster*. Fly, 2(5), pp.247-254.

Zhang, L. & Webster, T.J., 2009. *Nanotechnology and nanomaterials: promises for improved tissue regeneration*. Nano today, 4(1), pp.66-80.