

Transfección de células por medio de ondas de choque

E. Armenta Ruiz, A. Varela Echavarría y G. Martínez de la Escalera
*Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México,
Campus Juriquilla, 76230 Qro., Querétaro,
e-mail: gmel@servidor.unam.mx*

A.M. Loske Mehling
*Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, Universidad Nacional Autónoma de México,
Apartado Postal 1-1010, 76000 Qro., Querétaro,
División de Ciencias de la Salud, Universidad del Valle de México,
Campus Querétaro, 76230 Qro., Querétaro,
e-mail: loske@fata.unam.mx*

Recibido el 30 de marzo de 2006; aceptado el 6 de junio de 2006

La incorporación de material genético al interior de una célula puede ser de gran utilidad para el tratamiento de algunas enfermedades heredadas y adquiridas. Desgraciadamente, la mayoría de los métodos para lograr dicha incorporación (transfección) no son selectivos. Este artículo describe la aplicación de ondas de choque como método para incorporar un gen reportero al interior de células en suspensión. Se diseñó un dispositivo experimental para generar ondas de choque por medio de descargas eléctricas en agua y enfocarlas con un reflector elipsoidal sobre los viales que contenían las células en suspensión. La transfección celular se logró debido a la cavitación acústica generada en el interior de los viales por el paso de las ondas de choque. A pesar de que el número de células transfectadas fue bajo, se demostró que, desde el punto de vista físico, es factible transfectar células con ondas de choque.

Descriptor: Ondas de choque; cavitación acústica; transfección.

Treatments for inherited and acquired diseases are pointing towards gene therapy, which depends on methods to introduce foreign genetic material into cells. Unfortunately, most of the methods available to allow incorporation of transgenes into the genome are not selective to target a particular population of cells. The present article describes the use of shock waves as a cell – permeabilization method to load a reporter gene into cultured cells. Shock waves were generated by underwater electrical breakdown and focused on the vials containing cell suspension using an ellipsoidal reflector. Transfection was achieved due to acoustic cavitation generated inside the test vials after passage of each shock wave. The number of transfected cells was still low; nevertheless, our results show the feasibility of cell transfection by underwater shock waves.

Keywords: Shock waves; acoustic cavitation; transfection.

PACS: 43.25.Cb; 43.40.Jc; 47.40.Nm; 43.25.Yw; 43.35.Ei

1. Introducción

Las ondas de choque, de hasta 150 MPa, se aplican en medicina para la desintegración de cálculos renales sin cirugía (litotricia extracorpórea), así como para el tratamiento de algunos padecimientos en ortopedia [1,2]. Actualmente, también se está estudiando la interacción de ondas de choque con bacterias, para su posible aplicación a pacientes con infecciones localizadas o como método de conservación de alimentos [3]. En la mayoría de las aplicaciones clínicas, dichas ondas se generan en agua, se acoplan al paciente por medio de una membrana de látex y se enfocan hacia la región a tratar (cálculo renal) usando espejos o lentes. La coincidencia de la llamada “región focal” con el cálculo, se logra mediante sistemas de fluoroscopia y/o ultrasonido en línea. Las ondas de choque consisten en un pulso de compresión seguido de un pulso de rarefacción. La presión aumenta desde el valor de equilibrio, hasta el máximo en unos cuantos nanosegundos. Después de aproximadamente uno a tres microsegundos disminuye a valores de hasta 30 MPa debajo de la presión de equilibrio (Fig. 1). Finalmente, algunas millonésimas de segundo más tarde, se reestablece la presión hidrostática. Pa-

ra pulverizar un cálculo renal se aplican cientos de ondas de choque con una frecuencia de repetición de aproximadamente una onda por segundo. Los litos que se encuentran en el riñón o en las vías urinarias del paciente se fracturan por la acción de diferentes mecanismos. Entre los más importantes pueden citarse la compresión, el efecto Hopkinson y la cavitación acústica [1,4].

Los líquidos generalmente poseen gases disueltos y burbujas con diámetros menores a una décima de milímetro. Al paso de una onda de choque, estas diminutas burbujas se comprimen súbitamente por la acción del pulso positivo (compresión) de la onda de choque. Un instante después la presión disminuye drásticamente, aumentándoles su volumen cientos de veces. Este crecimiento dura aproximadamente 50 μ seg. Posteriormente, las burbujas permanecen estables durante 200 a 450 μ seg, para finalmente sufrir un colapso violento. Durante el colapso, cada burbuja puede emitir ondas de choque secundarias muy intensas, así como pequeños chorros de líquido a velocidades de hasta 400 m/seg [1,4,5]. A pesar de que el alcance de estos “microjets” es pequeño, las burbujas que colapsan cerca de un objeto sólido (cálculo renal), pueden producir daños severos en su superficie.

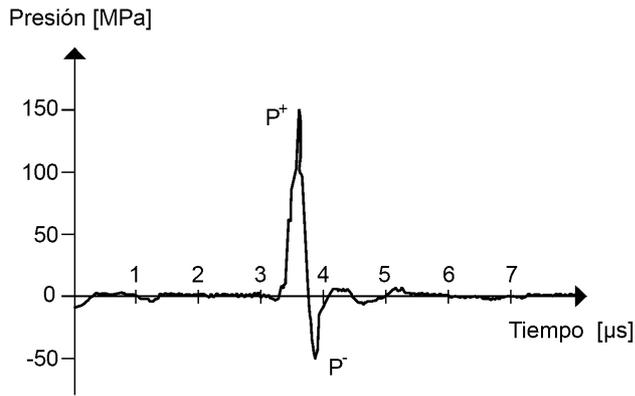


FIGURA 1. Variación de presión producida por un generador de ondas de choque electrohidráulico.

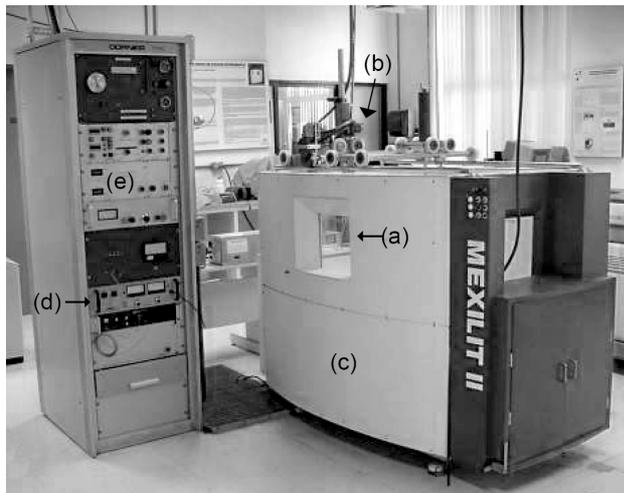


FIGURA 2. Fotografía del generador de ondas de choque electrohidráulico. Puede apreciarse (a) la tina de fibra de vidrio y una de las cuatro ventanas, (b) la grúa móvil de precisión, (c) la base, dentro de la cual se encuentra el circuito de descarga, (d) la fuente de alto voltaje y (e) el panel de control.

En 1994 un grupo de investigadores demostró que al aplicar ondas de choque a células eucariotas en suspensión (células que tienen núcleos separados del citoplasma por una membrana doble), es posible inducir un aumento en la permeabilidad de la membrana celular [6]. La posibilidad de incorporar material genético al interior de las células es de gran interés clínico. El objetivo principal de este trabajo es demostrar que físicamente es factible transfectar células con ondas de choque producidas con un generador electrohidráulico experimental. Se piensa que la cavitación acústica es el mecanismo responsable del aumento en la permeabilidad de las membranas de células expuestas a la acción de ondas de choque.

La transfección, es decir, la incorporación de fragmentos de ácido desoxirribonucleico (ADN) al interior de las células, se usa en protocolos para el tratamiento de cáncer, algunos desórdenes metabólicos o enfermedades cardiovasculares. El término transfección se refiere a la introducción de ADN al interior de células eucariotas. Para verificar la eficiencia de

transfección de una población celular determinada, se emplean marcadores fluorescentes. Para cada tipo de transfección se han seleccionado moléculas específicas, denominadas “vectores”. El tipo de vector más empleado es el plasmídico (molécula circular de ADN de doble cadena), que se replica de forma independiente en las bacterias. Existen varios métodos para realizar transfección. Su eficiencia depende del tipo celular y del método usado. Pueden dividirse en métodos físicos, como la electroporación, la biobalística o la microinyección, y en métodos químicos, como la co-precipitación con fosfato de calcio o el uso de liposomas artificiales [7-11]. Una desventaja de los métodos físicos actuales es que están limitados a aplicaciones *in vitro*, sin embargo, las ondas de choque podrían ser el primer método físico de transfección aplicable *in vivo*.

2. Desarrollo experimental

2.1. El generador de ondas de choque

Para producir ondas de choque del tipo empleado en equipos clínicos, se diseñó un generador electrohidráulico, que produce ondas de choque por descargas eléctricas en agua [12]. Básicamente consiste en una tina de fibra de vidrio rectangular de $120 \times 80 \times 60$ cm, con ventanas de vidrio en cada lado (Fig. 2). Debajo de la tina se encuentra el circuito que almacena la energía eléctrica en un arreglo de ocho capacitores de $10 \mu\text{F}$ cada uno, conectados en paralelo. El arreglo de capacitores es cargado a un voltaje previamente establecido (15 - 30 kV) por medio de una fuente de alto voltaje. Un generador de pulsos regula la frecuencia de generación de las ondas de choque, activando un interruptor de chispa que transmite la descarga eléctrica de alto voltaje hacia una bujía con dos electrodos de tungsteno, situada en el interior de un semielipsoide de revolución. Los electrodos de la bujía se encuentran en el primer foco (F1) de un reflector elipsoidal, colocado en el fondo de la tina (Fig. 3). Dependiendo del tipo de experimento, la tina se llena al nivel deseado con agua potable desgasificada. El equipo cuenta con varios reflectores de acero inoxidable, con geometrías diferentes, que pueden ser intercambiados de acuerdo con las necesidades específicas. Una grúa móvil, con tres grados de libertad permite colocar muestras pequeñas, viales o transductores en cualquier sitio dentro de la tina. Cada descarga eléctrica entre los electrodos, produce un plasma que se expande súbitamente, generando una onda de compresión esférica. Gran parte de la energía liberada en F1 se refleja en la superficie interna del reflector y se concentra en el segundo foco (F2), sitio en el cual se coloca el objeto a tratar (Fig. 3). En este caso se usó un reflector con semieje mayor de 13.9 cm y semieje menor de 7.8 mm. Todas las bujías fueron “precalentadas” con 200 descargas eléctricas a 20 kV y renovadas después de 2200 descargas. Además de la generación de una onda de choque, la descarga eléctrica produce un pulso de luz ultravioleta, con longitudes de onda entre 55 y 150 nm, así como luz visible muy intensa. Al igual que la onda de choque, esta radiación también es parcialmente concentrada por el reflector.

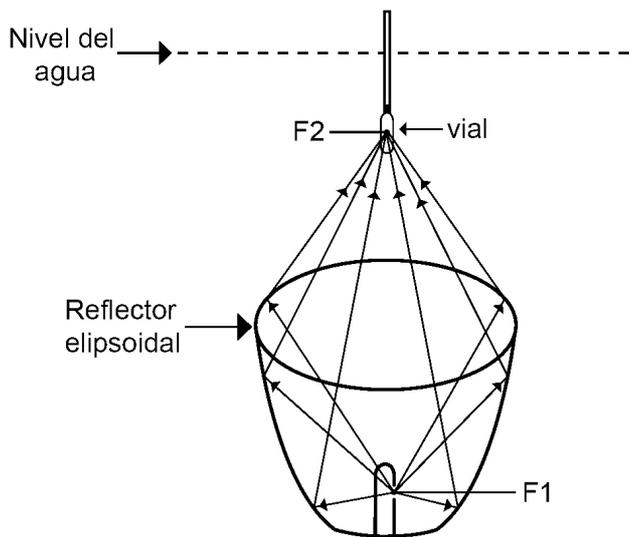


FIGURA 3. Concentración de una onda de choque generada por medio de una descarga eléctrica de alto voltaje en agua en el primer foco (F1) de un elipsoide de revolución. Gran parte de la energía liberada en F1 se concentra en el segundo foco (F2).

2.2. Medición de presión

Para evaluar las variaciones de presión generadas con el equipo descrito en la sección anterior, se realizaron mediciones colocando un transductor de aguja de fluoruro de polivinilideno (PVDF) marca Imotec GmbH (Würselen, Alemania), con tiempo de ascenso de 20 ns, conectado a un osciloscopio digital de 100 MHz, marca Tektronix, modelo 2430A (Beaverton, Oregon, EUA), en la vecindad de F2. Se seleccionaron cinco posiciones a lo largo del eje de simetría del reflector (40 mm arriba de F2, 20 mm arriba de F2, en F2, 20 mm debajo de F2 y 40 mm debajo de F2). Además, se midió la presión a 20 y 40 mm de distancia, a la altura de F2, perpendicularmente al eje de simetría. Por cada posición se registraron 10 perfiles de presión. El voltaje en el generador se mantuvo fijo en 24 kV.

2.3. Fotografía de alta velocidad

Con la finalidad de registrar eventos de cavitación acústica al paso de una onda de choque, se enfocó una cámara de alta velocidad (marca Redlake, modelo PCI 8000S) en el segundo foco (F2), a través de una de las ventanas del generador de ondas de choque anteriormente descrito. En la ventana opuesta se colocó una lámpara de halógeno de 300 watts. El disparador de la cámara se sincronizó con el circuito de descarga del generador de ondas de choque.

2.4. Cultivo de células

En este estudio se usaron células de tumor cérvico uterino de la línea HeLa. Las células se sembraron en un plato de cultivo con 10 ml de medio DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) y se colocaron dentro de una incubadora con 5 % de bióxido de carbono a 37°C. Las células se dividieron 1:2 cada tercer día para permitir su proliferación. Como

gen reportero se usó la proteína verde fluorescente y como vector el plásmido pCA β mGFP. Los protocolos usados para la proliferación de las células, la transformación y la purificación del plásmido son extensos, motivo por el cual no se describen aquí. El lector interesado puede consultarlos en la referencia citada al final del artículo [13]. Las células se colocaron en un tubo Falcon de 50 ml con 40 ml de DMEM-10 % SFB, se mezclaron y se contaron con un hemocitómetro. Posteriormente, se centrifugaron a 1300 revoluciones por minuto durante 5 minutos y se aspiró el sobrenadante, manteniendo intacta la pastilla. Una vez calculado el número total de células, se diluyó la pastilla en medio OPTIMEM, equilibrado a 5 % de CO₂ a 37°C. La suspensión se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 ml, donde se mezcló con el plásmido, dejándose incubar por un minuto. La suspensión se trasladó a los viales usando una jeringa. Los viales control no contenían plásmido. La suspensión expuesta a las ondas de choque consistió de una mezcla de 10⁷ células por mililitro en medio OPTIMEM, con 12 o 30 μ g de plásmido. En cada caso se colocó 1 ml de esta suspensión dentro de viales de polietileno de 4 ml (Tyco/Healthcare, KENDALL).

2.5. Aplicación de ondas de choque

Los viales con las células en suspensión se colocaron, uno por uno, en el segundo foco (F2) del generador de ondas de choque (Fig. 3), usando la grúa móvil de precisión. El error en la colocación de los viales fue de aproximadamente un milímetro. Se formaron tres grupos experimentales. En cada grupo se realizaron 4 réplicas independientes con su respectivo control. El tiempo total de manipulación, incluyendo la extracción de la incubadora, la aplicación de las ondas de choque y la preparación del cultivo, fue de aproximadamente 90 minutos. La frecuencia de descarga de las ondas de choque se ajustó en 0.5 Hz. En el grupo I y II se usaron 12 μ g de plásmido y se aplicaron 100, 250, 450, 700 y 1500 ondas de choque, generadas con un voltaje de 24 y 20 kV, respectivamente. Los viales del grupo III se prepararon con 30 μ g de plásmido y recibieron 100 y 250 ondas de choque, generadas con descargas eléctricas de 24 y 20 kV, respectivamente. Las dosis de ondas de choque aplicadas, así como los voltajes usados se determinaron en base a experimentos previos, no reportados en este artículo. La temperatura del agua dentro de la tina del generador de ondas de choque se mantuvo en 37°C. Los viales control se colocaron en la misma tina, pero fuera de la acción de las ondas de choque.

2.6. Determinación de la eficiencia de transfección

Después de la aplicación de ondas de choque, el contenido de cada vial se sembró en tres platos de cultivo, junto con 9 ml de medio DMEM-10 % SFB y se incubó a 37°C con 5 % de CO₂. De los tres platos con células tratadas, el primero se analizó mediante microscopía de fluorescencia después de 24 horas, el segundo después de 48 horas y el tercero después de 72 horas. El número de células viables se determinó mediante

la exclusión de azul de tripano. La eficiencia de transfección se definió como el número de células transfectadas, dividido entre el número total de células, multiplicado por cien. Para encontrar el número de células transfectadas se usó un hemocitómetro y un microscopio de fluorescencia. Se contó el total de células con luz blanca e inmediatamente después se cambió a una fuente fluorescente para contar el número de células transfectadas que expresaron la proteína verde fluorescente.

3. Resultados

3.1. Medición de presión

Las presiones registradas, así como las variaciones de presión entre una onda de choque y la siguiente, resultaron ser equivalentes a las que se reportan en la literatura para equipos clínicos [14]. La onda de choque directa, que llegó al transductor sin ser reflejada, apareció en el trazo del osciloscopio aproximadamente $150 \mu s$ antes que la onda reflejada. La amplitud de la onda no reflejada fue del orden de 3 MPa. En la Tabla I aparece el promedio de las amplitudes de las ondas reflejadas, correspondientes a cada una de las posiciones seleccionadas a lo largo del eje de simetría del reflector. El coeficiente de variación (desviación estándar dividida entre el promedio), que aparece en la columna vecina, da información sobre la reproducibilidad del fenómeno. Puede observarse que las variaciones mínimas (coeficiente de variación más pequeño) se obtuvieron 20 mm arriba de F2. La diferencia entre las presiones obtenidas en F2 y aquellas registradas 20 mm debajo de F2 no resultó ser significativa.

3.2. Fotografía de alta velocidad

En la Fig. 4 puede apreciarse una secuencia representativa de tres fotografías en las que se muestran dos burbujas (a) antes de la llegada de una onda de choque, (b) durante su expansión y (c) después de sufrir un colapso violento. Las burbujas se inyectaron en el agua con un capilar situado 10 mm debajo de F2. La aguja que aparece en la parte superior de cada imagen se usó como referencia para localizar las burbujas en el espacio. En (a) se tiene una burbuja exactamente en F2. En la parte inferior puede apreciarse una segunda burbuja saliendo del capilar. Los puntos claros en el centro de las burbujas se deben a la luz no reflejada, proveniente de la lámpara situada justamente detrás de ellas. La imagen (b) se obtuvo después del paso de las ondas de choque, motivo por el cual ambas burbujas se observan en fase de expansión. En vista de que la región focal del generador (definida como el volumen dentro del cual cualquier punto posee una presión igual o mayor que el 50 % del valor máximo) mide varios centímetros de largo, la burbuja que se encontraba saliendo del capilar también sufrió una expansión considerable. La vida de estas burbujas depende de su tamaño. Debido a que el tamaño de las burbujas inyectadas fue relativamente grande, el tiempo entre expansión y colapso resultó mayor al reportado por otros autores para burbujas de cavitación de fracciones de milímetro [5].

TABLA I. Máximos de presión registrados con un hidrófono de fluoruro de polivinilideno, colocado en diferentes posiciones sobre el eje de simetría del reflector de un generador de ondas de choque electrohidráulico. Cada dato es el promedio de diez mediciones.

Posición (mm)	Presión (MPa)	Coficiente de variación
+ 40 [¥]	77.6	0.21
+ 20	93.9	0.17
0	112.3	0.18
- 20	115.8	0.18
- 40	78.1	0.19

[¥] Las distancias se midieron a partir de F2. Las distancias negativas se definieron para posiciones que se encuentran entre F1 y F2. Las positivas se refieren a posiciones más altas que F2.

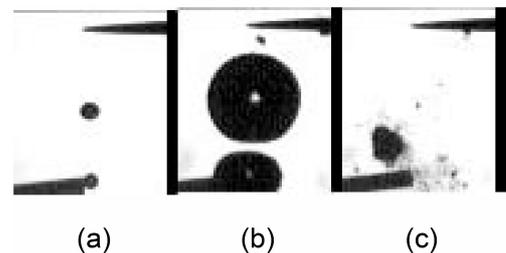


FIGURA 4. Secuencia de fotografías de alta velocidad de una burbuja de 1.3 mm de diámetro en agua, (a) antes, (b) 850 μs después y (c) 2125 μs después del paso de la onda de choque.

3.3. Eficiencia de transfección

Del total de aproximadamente 10 millones de células contenidas en cada vial, el número máximo de células que resultaron transfectadas fue 18,300. El análisis estadístico reveló que las ondas de choque afectan la viabilidad celular, en función del voltaje, del número de ondas de choque y de la cantidad de plásmido. A mayor voltaje y a mayor número de ondas de choque, se produce mayor daño celular. Las máximas eficiencias de transfección se obtuvieron aplicando 100 ondas de choque a 24 kV y 250 ondas de choque a 20 kV (ver Fig. 5). Independientemente del voltaje usado, aumentar el número de ondas de choque influyó directamente en la integridad de las células tratadas, en la viabilidad celular después de los tratamientos, en la proliferación celular y en la eficiencia de transfección medida 24, 48 y 72 hrs después del tratamiento, excepto cuando se aplicaron 100 o 250 ondas de choque a 20 kV. En este caso, el número de células no viables fue estadísticamente el mismo, independientemente del número de ondas de choque. La Fig. 6 muestra el porcentaje de células destruidas, células no viables y células viables. Las células destruidas son aquellas que se fragmentaron y, por lo tanto, no pudieron ser observadas en el microscopio. Las células no viables, aunque enteras, no fueron capaces de proliferar. Puede observarse que al aumentar el voltaje – y con ello la energía de las ondas de choque – aumentó significativamente

la cantidad de células destruidas. Con el voltaje bajo (20 kV), el número de células destruidas no varió mucho al aumentar el número de ondas de choque. Al aplicar ondas de choque generadas con descargas eléctricas de 24 kV, aumentó el porcentaje de células destruidas al incrementarse el número de ondas de choque (Fig. 6b.) Referente a la eficiencia de transfección determinada a las 24, 48 y 72 hrs post-tratamiento, los resultados indicaron que ésta depende del número de ondas de choque y del voltaje utilizado en los tratamientos, más no de la cantidad de plásmido.

4. Discusión y conclusiones

Los perfiles de presión registrados mostraron que el generador de ondas de choque se comporta de manera equivalente a los equipos clínicos. Este tipo de generador se caracteriza por variaciones de presión de hasta 40 % entre una descarga eléctrica y otra. En la práctica esto no es problemático, ya que en todas las aplicaciones clínicas se usan cientos de ondas de choque. Dichas fluctuaciones se deben a que las descargas

eléctricas no siempre se producen exactamente entre los mismos puntos. Además, se deben a variaciones en las propiedades físicas del agua entre los electrodos y a cambios en la forma de los mismos. En cuanto a las mediciones de presión, la conclusión más importante es que las ondas de choque usadas en este estudio podrían aplicarse clínicamente, es decir, son del tipo usado en litotricia extracorpórea.

Las fotografías de alta velocidad muestran el crecimiento y colapso de burbujas en agua potable. En vista de que la vida de estas burbujas, es decir, el tiempo entre su crecimiento y colapso, es corto en comparación con la velocidad de la cámara, no fue posible capturar suficientes instantes en la vida de una sola burbuja. En cierta medida, esto se solucionó obteniendo secuencias provenientes de un gran número de burbujas; sin embargo, sería recomendable el uso de una cámara que pudiera captar cien mil cuadros por segundo o más.

En 1999 Huber y colaboradores reportaron resultados de un estudio *in vitro* [15], en el que compararon la eficiencia de transfección de células HeLa obtenida con ultrasonido (1.18 MHz), con la eficiencia de transfección lograda usando

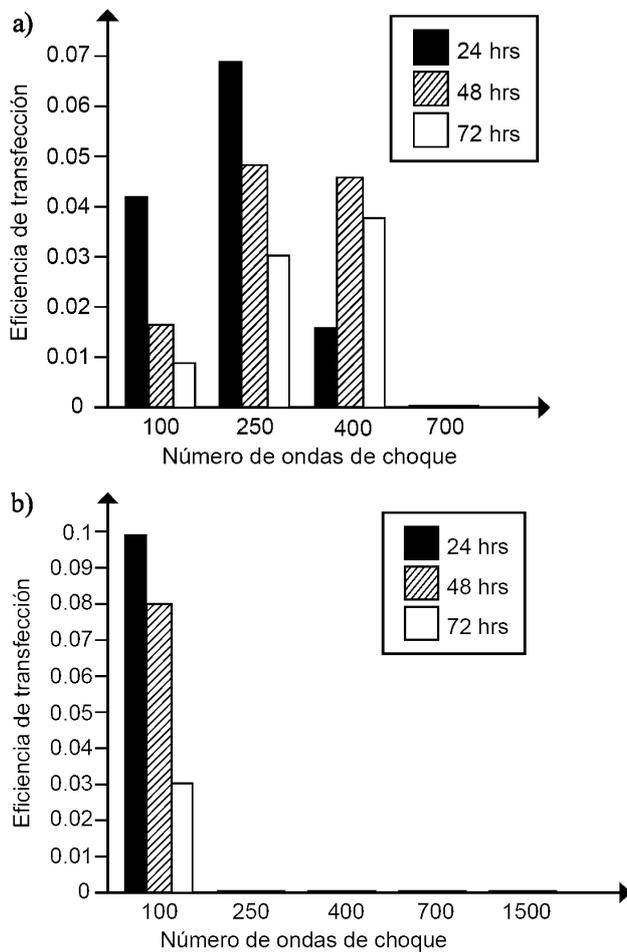


FIGURA 5. Eficiencia de transfección determinada 24, 48 y 72 horas después aplicar diferente número de ondas de choque, generadas con (a) 20 kV, (b) 24 kV, a células de tumor cérvico uterino. Los valores mostrados son el promedio de cuatro réplicas independientes por grupo experimental.

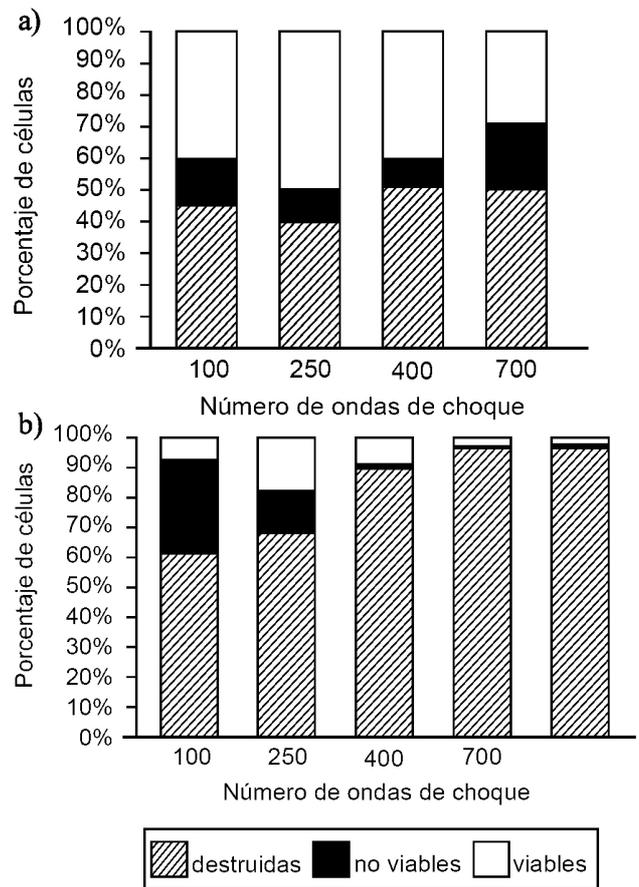


FIGURA 6. Porcentaje de células destruidas, células no viables y células viables, después de aplicar diferente número de ondas de choque, generadas con un voltaje de (a) 20 kV, (b) 24 kV. Los valores mostrados son el promedio de cuatro réplicas independientes por grupo experimental.

ondas de choque. Las máximas eficiencias de transfección fueron de 3 y 0.08 % para ultrasonido y ondas de choque, respectivamente. A pesar de que estos resultados se obtuvieron en condiciones similares a las descritas en el presente artículo, es importante mencionar que se usaron principios de generación de ondas de choque diferentes. Los generadores electromagnéticos, como el usado por Huber *et al.*, producen ondas de choque con un tiempo de ascenso más largo que aquellas generadas con sistemas electrohidráulicos como el nuestro. Una consecuencia de ello es que los sistemas electromagnéticos producen menos cavitación. Es probable que este sea uno de los motivos por los cuales la máxima eficiencia de transfección que obtuvimos (0.18 %) supera la eficiencia reportada por el grupo mencionado (0.08 %). Independientemente de que esto representa un avance importante, nuestro trabajo es original en el sentido de que se usó un generador electrohidráulico experimental en lugar de los costosos equipos clínicos empleados por otros autores. Además de la enorme diferencia en el precio, nuestro equipo experimental permite variar parámetros que no pueden ajustarse en un equipo clínico (geometría del reflector, capacitancia, tipo de electrodos, etc.) De esta manera, se tiene un potencial mucho mayor para ejecutar protocolos que, en un futuro, pueden dar lugar a eficiencias de transfección mayores.

La eficiencia de transfección usando ultrasonido [15] es mucho mayor a la que se ha obtenido con ondas de choque; sin embargo, el aumento de la temperatura en los tejidos sometidos a ultrasonido limita su aplicación clínica. Una ventaja de las ondas de choque en comparación con el ultrasonido es que poseen un espectro de frecuencias más amplio. El poder de penetración de las frecuencias bajas de las ondas de choque facilita su aplicación a órganos o tumores internos. De esta manera, podría lograrse un aumento transitorio de la permeabilidad celular, permitiendo la asimilación de moléculas de ácido nucleico en zonas determinadas.

Se sabe que las ondas de choque pueden causar daño a los tejidos [16,17]; sin embargo, si la transfección puede darse a energías tan bajas como las usadas en este estudio, los daños a los órganos serían despreciables. En principio, esto abre la posibilidad de realizar transfección *in vivo*, sin embargo, la eficiencia de transfección máxima lograda aún es baja. Nuestros resultados muestran que cierta cantidad de células es destruida por la acción de las ondas de choque. Ajustando la dosis (número y energía de las ondas de choque), se espera lograr que un número mayor sobreviva y prolifere normal-

mente. Al aplicar ondas de choque generadas con un voltaje de 20 kV, la eficiencia de transfección disminuyó conforme aumentó el número de ondas de choque. A 24 kV la eficiencia de transfección fue nula al aplicar tan sólo 250 ondas. Esto puede deberse a que la magnitud de la presión – factor moderado por el voltaje – es la variable que regula el tamaño del poro en la membrana de las células. Si los poros generados son demasiado grandes, la célula no logra reparar el daño y muere. Lo anterior hace pensar que es recomendable usar voltajes más bajos y aumentar el número de ondas de choque.

Es importante tener en mente que la radiación que emite la descarga eléctrica en F1, también puede influir en la viabilidad de las células. Afortunadamente, en el caso clínico, dicha radiación prácticamente no penetra a través del paciente.

Como se mencionó anteriormente, se cree que la cavitación acústica, producida por el paso de cada onda de choque, es responsable del aumento de la permeabilidad celular [15,18]. Un método para aumentar la cavitación dentro de los viales que contienen la suspensión con las células sería introducir burbujas en la suspensión o usar parejas de ondas de choque. Este tipo de ondas, denominadas ondas de choque *tandem*, ha sido aplicado con éxito para aumentar la cavitación en experimentos destinados a la desintegración de cálculos renales [19]. Finalmente cabe mencionar que, debido a que la composición de la membrana celular cambia de un tipo de célula a otro, sería interesante repetir los ensayos descritos aquí con otros tipos celulares.

Agradecimientos

Los autores agradecen la ayuda técnica de Claudia Hernández, Arturo Méndez, René Preza, Esperanza Meléndez, Gabriela Trucco, Edgar Méndez y Carmen Mejía. La asesoría del Dr. Eduardo Castaño y del M. en C. Ulises Mora fue importante. Todas las fotografías de alta velocidad fueron obtenidas por el Dr. Roberto Zenit, el M. en C. Francisco Fernández y el M. en C. Guillermo Canseco con una cámara de alta velocidad proporcionada por el Instituto de Investigación en Materiales de la UNAM. La instrumentación y el mantenimiento de los equipos estuvieron a cargo del M. en C. Francisco Fernández. Este trabajo fue apoyado por la DGAPA de la UNAM, a través del Proyecto de Investigación IN-101202.

1. A.M. Loske, en *Handbook of Shock Waves*, editado por G. Bendor, T. Elperin, O. Igra y A. Lifshitz (Academic Press, San Diego, New York, 2001).
2. A.M. Loske y F.E. Prieto, *Fundamentos Técnicos de Litotripsia Extracorporal* (JGH Editores, México D.F., 1999).
3. U.M. Álvarez, A.M. Loske, E. Castaño-Tostado y F.E. Prieto, *Innov. Food Sc. & Emerg. Technol.* **5** (2004) 459.
4. M. Lokhandwalla y B. Sturtevant, *Phys. Med. & Biol.* **45** (2000) 1923.
5. L.A. Crum, *J. Urol.* **140** (1988) 1587.
6. U. Lauer *et al.*, *Gene Therapy* **7** (1997) 710.
7. S. Bao, B.D. Thrall y D.L. Miller, *Ultrasound Med. & Biol.* **23** (1997) 953.

8. S.Y. Ho y G.S. Mittal, *Crit. Rev. Biotechnol.* **16** (1996) 349.
9. S. Koch, P. Pohl, U. Cobet y N.G. Rainov, *Ultrasound Med. & Biol.* **26** (2000) 897.
10. P.C. Ross y S.W. Hui, *Gene Therapy* **6** (1999) 651.
11. E.C. Unger, T.P. McCreery y R.H. Sweitzer, *Invest. Radiol.* **32** (1997) 723.
12. F.E. Prieto, A.M. Loske y F.L. Yarger, *Rev. Sci. Instrum.* **62** (1991) 1849.
13. E. Armenta, *Transfección de células HeLa por ondas de choque, Tesis de maestría*. Instituto de Neurobiología, UNAM (2005).
14. A.J. Coleman y J.E. Saunders JE, *Ultrasound Med. & Biol.* **15** (1989) 213.
15. P. Huber, J. Jenne, J. Debus, M.F. Wannemacher y P. Pfisterer, *Ultrasound Med. & Biol.* **25** (1999) 1451.
16. A.P. Evan, L.R. Willis, J.E. Lingeman y J.A. McAteer, *Nephron.* **78** (1998) 1.
17. M. Delius, *Shock Waves* **4** (1994) 55.
18. S. Bao, B.D. Thrall, R.A. Gies y D.L. Miller, *Cancer Res.* **15** (1998) 219.
19. A.M. Loske, F.E. Prieto, F. Fernández y J. van Cauwelaert, *Phys. Med. & Biol.* **47** (2002) 3945.