

**EFFECTO CITO-GENOTÓXICO DE LA TRANSFECCIÓN CON LIPOSOMAS  
CATIONICOS EN LA LINEA CELULAR CHO-K1: UN ESTUDIO  
EXPLORATORIO**



ESTUDIANTE:

**JHON JAIRO GIRALDO GONZÁLEZ**

cc: 1 094 240 221

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA  
MEDELLIN  
2013

**EFFECTO CITO-GENOTÓXICO DE LA TRANSFECCIÓN CON LIPOSOMAS  
CATIÓNICOS EN LA LINEA CELULAR CHO-K1: UN ESTUDIO  
EXPLORATORIO**

ESTUDIANTE:

**JHON JAIRO GIRALDO GONZÁLEZ**

cc: 1 094 240 221

ASESORES:

**MAURICIO CAMARGO GUERRERO**

Profesor titular

Grupo Genética, Regeneración y Cáncer

&

**JEAN PAUL DELGADO CHARRIS**

Profesor asociado

Grupo Genética, Regeneración y Cáncer

CO-AUTORIA:

Jhon Jairo Giraldo, Jean Paul Delgado, Mauricio Camargo,

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

MEDELLIN

2013

## AGRADECIMIENTOS

Deseo aprovechar este corto espacio, en el que saldré de mi vestimenta científica, y les abriré un poco mi vida personal, para agradecer a todas aquellas personas que hicieron posible la finalización de mi carrera de pregrado y con ella, este proyecto de investigación.

En primer lugar, a mi madre, Blanca González, por todo el apoyo brindado durante toda mi vida. Por ser la fuente de mis valores esenciales, por haberme traído a este mundo y brindarme la educación de mis primeros años. A mi padre, Germán Giraldo, por sus enseñanzas, por inculcarme el valor de la libertad, y de la búsqueda incansable por lograr nuestras metas. Le debo también, por haber inspirado en mí el profundo significado de la lectura.

En segundo lugar, a mis amigos de la Universidad de Antioquia, a los que compartieron conmigo alegrías y tristezas durante todos estos años. Merecen especial mención los amigos de “las vegas”, entre ellos, “el richi”, “el kala”, “el barbas”, “la negra”, “el pale” y “el caco”, quienes me ayudaron a salir de grandes crisis, y aún hoy me brindan su amistad. Debo ser muy agradecido con “el mono”, por todo su apoyo económico y emocional en ocasiones supremamente duras.

Considero que es un momento oportuno para agradecer a la profesora Nora Henao y a su familia, por toda la confianza que me brindaron en las diferentes empresas que decidí acometer durante todos estos años.

A Raúl Vergara, mi amigo desde hace 16 años, cuya compañía y apoyo ha sido incondicional.

Agradezco a los profesores del instituto de Biología con los que tuve la oportunidad de compartir un poco de mi vida académica, de los cuales también recibí muchas enseñanzas.

Debo dar un gran agradecimiento a los compañeros del grupo Genética de poblaciones y mutacarcinogénesis, hoy llamado Genética, Regeneración y Cáncer, por brindarme un poco de su espacio. A Gloria Angélica, por su entrenamiento en genotoxicidad. A Lina Barrera, por sus entrenamientos en mis primeros pasos en el laboratorio.

Muchas gracias al profesor Jean Paul Delgado, por su infinita colaboración en el proyecto de investigación.

Pero nada de este trabajo final se habría podido realizar sin el apoyo del profesor Mauricio Camargo Guerrero, gran amigo y maestro. Le agradezco por sus enseñanzas técnicas, por inspirarme el gusto por la citogenética. Expreso mi gratitud porque fue quien confió en mí en momentos muy difíciles. Muchas gracias a él por permitir todos los medios que estuvieran a su alcance para recuperar mis capacidades intelectuales y académicas, las cuales en algún momento consideré perdidas.

Agradezco a todos los que compartieron conmigo, al menos un pedacito de su vida o un pedacito de la mía, y que de una forma u otra han influido en la persona que soy actualmente. A ellos también se debe el logro que estoy obteniendo.

Sé que en estos agradecimientos no puedo incluir una lista infinita de personas, por tal razón, a los que no pueda nombrar, o a los que en estos momentos olvido, quiero que sepan de antemano, que todo su aporte en mi vida, en mis proyectos, están respaldados por este triunfo, uno entre muchos, que están por llegar.

## TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABLAS.....	9
RESUMEN.....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1. TRANSFECCIÓN: GENERALIDADES.....	11
1.2. ALGUNAS EVIDENCIAS ACERCA DE LAS LIMITACIONES DEL METODO CON LIPOPLEXES: EFECTOS CITOTÓXICOS .....	17
1.3. JUSTIFICACION .....	19
1.4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	20
1.5. HIPOTESIS .....	21
1.6. OBJETIVOS .....	22
1.6.1. OBJETIVO GENERAL .....	22
1.6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	22
2.1. Cultivo Y Preparación de Las Células .....	22
2.2. Obtención de Los Plásmidos de DNA .....	23
2.3. Preparación de los Complejos Lipoplex .....	24
2.4. Lipofección .....	24
2.5. Determinación de la Eficiencia de Transfección .....	25
2.6. Pruebas de Genotoxicidad .....	26
2.6.1. ENSAYO DNA COMETA .....	26
2.6.2. TEST DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS .....	28
2.7. Esquema de Tratamiento .....	29
2.8. Análisis Estadístico .....	29
2.8.1. Ensayo DNA Cometa .....	29
3. RESULTADOS .....	31
3.1. PURIFICACIÓN DEL DNA PLASMÍDICO .....	31

3.2. DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA DE TRANSFECCIÓN	31
3.3. RESULTADOS DEL ENSAYO DNA COMETA	31
3.3.1. TIEMPO 0 HORAS	31
3.3.2. TIEMPO 6 HORAS	33
3.3.3. TIEMPO 12 HORAS	34
3.3.4. TIEMPO 24 HORAS	34
3.3.5. TIEMPO 36 HORAS	35
3.3.6. RESULTADO GENERAL DEL ENSAYO DNA COMETA	36
3.4. RESULTADOS DEL TEST DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS	
3.4.1. TIEMPO 0 HORAS	37
3.4.2. TIEMPO 6 HORAS	38
3.4.3. TIEMPO 12 HORAS	39
3.4.4. TIEMPO 24 HORAS	39
3.4.5. TIEMPO 36 HORAS	40
3.4.6. RESULTADO GENERAL DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS	40
4. DISCUSIÓN, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS	41
5. ANEXOS	47
6. BIBLIOGRAFÍA	76

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cultivo de células CHO-K1.

Figura 2: Selección de colonias bacterianas transformadas con el plásmido pEGFP-N2.

Figura 3: Electroforesis en Gel de Agarosa al 0.8%.

Figura 4: Microfotografía de Fluorescencia.

Figura 5: Microfotografía de fluorescencia con Objetivos 20X y 40X.

Figura 6: Microfotografía de fluorescencia en objetivo de 100X, mostrando una célula transfectada en metafase mitótica.

Figura 7. Gráfica de barras del % de DNA en cola promedio a las 0 Horas.

Figura 8: Diagrama de cajas (boxplot) para el % de DNA en cola a las 0 Horas.

Figura 9. Histograma de frecuencia y trazado de la curva normal de referencia para los datos de % DNA en cola 0 Horas.

Figura 10. Estadísticos descriptivos para el % DNA en cola en 0 Horas.

Figura 11. Resumen del análisis estadístico no paramétrico para % DNA en cola a las 0 Horas.

Figura 12. Gráfica de barras del % de DNA en cola promedio a las 6 Horas.

Figura 13. Diagrama de cajas (boxplot) para el % de DNA en cola a las 6 Horas.

Figura 14. Histograma de frecuencia y trazado de la curva normal de referencia para los datos de % DNA en cola 6 Horas.

Figura 15. Estadísticos descriptivos para el % DNA en cola en 6 Horas.

Figura 16. Resumen del análisis estadístico no paramétrico para % DNA en cola a las 6 Horas.

Figura 17. Gráfica de barras del % de DNA en cola promedio a las 12 Horas.

Figura 18. Diagrama de cajas (boxplot) para el % de DNA en cola a las 12 Horas.

Figura 19. Histograma de frecuencia y trazado de la curva normal de referencia para los datos de % DNA en cola 12 Horas.

Figura 20. Estadísticos descriptivos para el % DNA en cola en 12 Horas.

Figura 21. Resumen del análisis estadístico no paramétrico para % DNA en cola a las 12 Horas.

Figura 22. Gráfica de barras del % de DNA en cola promedio a las 24 Horas.

Figura 23. Diagrama de cajas (boxplot) para el % de DNA en cola a las 24 Horas.

Figura 24. Histograma de frecuencia y trazado de la curva normal de referencia para los datos de % DNA en cola 24 Horas.

Figura 25. Estadísticos descriptivos para el % DNA en cola en 24 Horas.

Figura 26. Resumen del análisis estadístico no paramétrico para % DNA en cola a las 24 Horas.

Figura 27. Gráfica de barras del % de DNA en cola promedio a las 36 Horas.

Figura 28. Diagrama de cajas (boxplot) para el % de DNA en cola a las 36 Horas.

Figura 29. Histograma de frecuencia y trazado de la curva normal de referencia para los datos de % DNA en cola 36 Horas.

Figura 30. Estadísticos descriptivos para el % DNA en cola en 36 Horas.

Figura 31. Resumen del análisis estadístico no paramétrico para % DNA en cola a las 36 Horas.

Figura 32. % DNA en cola en función del tiempo pos-transfección. Resultados generales gráficos del ensayo DNA cometa.

Figura 33: Imágenes representativas del ensayo DNA cometa.

Figura 34: Numero de Alteraciones cromosómicas en el tiempo 0 Horas.

Figura 35. Numero de Alteraciones cromosómicas en el tiempo 6 Horas.

Figura 36. Extendido que presenta cromosomas multidañados en el tiempo 6 horas.

Figura 37. Numero de Alteraciones cromosómicas en el tiempo 12 Horas.

Figura 38. Vista en detalle de una figura multirradiada MR en el tiempo 12 horas.

Figura 39. Extendido que contiene cromosomas multidañados en el tiempo 12 horas.

Figura 40. Numero de Alteraciones cromosómicas en el tiempo 24 Horas.

Figura 41. Numero de Alteraciones cromosómicas en el tiempo 36 Horas.

Figura 42. Número de Alteraciones Cromosómicas en Función del Tiempo Pos-Transfección.

Figura 43. Extendido cromosómico de células CHO-K1 señalando el cromosoma X y su sitio frágil en el brazo largo.

Figura 44. Cariotipo normal de células CHO-K1.

Figura 45. Extendido con un quiebre cromatídico (B).

Figura 46. Vista en detalle de una figura multirradiada (MR).

Figura 47. Extendido con un quiebre cromosómico (BB).

Figura 48. Extendido cromosómico con una figura multirradiada.



## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Ensayo DNA cometa a 0 Horas.

Tabla 2. Ensayo DNA cometa a 6 Horas.

Tabla 3. Ensayo DNA cometa a 12 Horas.

Tabla 4. Ensayo DNA cometa a 24 Horas.

Tabla 5. Ensayo DNA cometa a 36 Horas.

Tabla 6. Número de Alteraciones cromosómicas a 0 Horas.

Tabla 7. Número de Alteraciones cromosómicas a 6 Horas.

Tabla 8. Número de Alteraciones cromosómicas a 12 Horas.

Tabla 9. Número de Alteraciones cromosómicas a 24 Horas.

Tabla 10. Número de Alteraciones cromosómicas a 36 Horas.

Tabla 11. Porcentaje de células con Alteraciones cromosómicas.

## RESUMEN

### EFFECTO CITO-GENOTÓXICO DE LA TRANSFECCION CON LIPOSOMAS CATIONICOS EN LA LÍNEA CELULAR CHO-K1: UN ESTUDIO EXPLORATORIO

Giraldo, Jhon Jairo<sup>1</sup>; Delgado, Jean Paul<sup>1</sup>; Camargo, Mauricio<sup>1</sup>

1. Grupo Genética, Regeneración y Cáncer, Sede de Investigación Universitaria (SIU), Universidad de Antioquia

Los lípidos catiónicos son uno de los tipos de vectores no virales de mayor uso en la actualidad en el procedimiento de transfección, debido a sus probadas ventajas para la transferencia génica en células eucarióticas. Sin embargo, poco se ha evaluado sobre las transformaciones colaterales que pueden ocurrirle a las células sometidas a lipofección, tales como efectos citotóxicos y genotóxicos. A pesar de la existencia de algunos trabajos previos, el mecanismo molecular que conduce, por ejemplo, a la pérdida de viabilidad causada por los complejos liposoma/DNA, permanece poco comprendido.

Por tal motivo, en este estudio piloto exploratorio, se pretendió determinar si esta disminución inicial de viabilidad celular postransfección está relacionada con inestabilidad genómica como respuesta temprana a la introducción de material genético exógeno. Interesantemente, se encontró una notable inducción de daño de tipo SSB y DSB en el DNA de células CHO-K1 en las primeras 6 -12 horas después del tratamiento de lipofección. Pero luego, a las 26-36 horas el nivel de daño disminuye a niveles cuasi basales, i.e. a niveles estadísticamente no significativos en relación al control. En consecuencia, Los niveles de genotoxicidad encontrados en el DNA genómico de las células huéspedes en etapas tempranas postransfección, podrían constituir una evidencia inicial de que la entrada de múltiples copias de DNA plasmídico en el núcleo de la célula diana, activa los mecanismos de defensa y reparación celular de DNA.

Palabras clave: **Transfección, Lipoplex, genotoxicidad, SSB, DSB, Plásmido, reparación de DNA.**

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. TRANSFECCIÓN: GENERALIDADES

La transfección es un método que consiste en insertar material genético (DNA, RNA) o incluso proteínas, en el interior de una célula, para lograr algunos cambios en la expresión de ciertos genes o respuestas biológicas de interés. La aplicación de éste método ha permitido incrementar el acervo de conocimientos biológicos acerca de la regulación y la expresión génicas, así como de la función de muchas proteínas en los sistemas celulares. También se aplica ampliamente en gran número de diseños experimentales, en la generación de animales transgénicos, en la producción y selección de líneas celulares modificadas, y quizás, con el mayor impacto biomédico, en la terapia génica y celular.

Para que la estrategia de transfección actual se desarrollara, se necesitó del desarrollo de 2 aproximaciones teórico-metodológicas. De un lado, inició con el descubrimiento de la “Transformación o Principio Transformante” por Friederick Griffith en 1928 a partir de sus trabajos con la bacteria *S. pneumoniae*. Posteriormente, Joshua Lederberg y Norton Zinde en 1951 estudiando la recombinación genética en diferentes cepas de *Salmonella typhimurium*, dilucidaron los mecanismos de transducción generalizada y especializada (Klug et al. 2006)<sup>26</sup>, aportando un gran baluarte en la comprensión de lo que se conoce en nuestros días como transferencia genética horizontal (TGH).

Gracias a esto, hoy se conoce de la posibilidad que una célula transfiera material genético a otra que no es descendiente directa suya. Lo que inicialmente se conoció en procariontes, fue luego generalizado a una amplia variedad de células eucariotas, y hoy llega a ser claro que, en teoría, siguiendo los procedimientos adecuados, cualquier tipo de célula puede albergar material

genético procedente de otros organismos, incluso los más alejados evolutivamente.

La segunda confluencia a la estrategia de transfección, reside en el desarrollo de la biología molecular, que brindó los conocimientos para que surgiera la tecnología del DNA recombinante, unido a los desarrollos biotecnológicos de las últimas décadas, con los cuales, es posible construir casi cualquier tipo de secuencias genéticas, en la que se logra unir DNAs provenientes de organismos incluso muy distantes filogenéticamente.

De esta manera, en la actualidad es posible construir gran diversidad de secuencias de ácidos nucleicos de interés y lograr que una amplia gama de tipos celulares incorporen dichas secuencias, mediante varias formas.

Por regla general, tales secuencias se incorporan en las células, mediante vectores. Un vector, es un vehículo de transferencia donde se transporta la secuencia de interés, y permite su inserción en la célula específica. Existen dos tipos de vectores: Virales y No virales. Los primeros incluyen todos aquellos que se han obtenido a partir de un virus modificado genéticamente, tratando de eliminar sus características patológicas/infectivas y de adaptarlos a su nueva función como transportadores de material genético exógeno. El principio de esta metodología se aprovecha de la capacidad de los virus como máquinas eficientes para infectar las células e insertar el material genético que portan. El segundo tipo de vectores, los no virales, se basan principalmente en una estrategia de síntesis química que posibilita el transporte efectivo de genes en el interior de la célula (Narbón Fernández, 2008)<sup>1</sup>.

Las características de un vector ideal para poder adaptarlo luego a situaciones concretas serían las siguientes: (a) Reproducible, (b) Estable, (c) Que permita la inserción de material genético sin restricción de tamaño, (d) Que alcance concentraciones elevadas, (d) Que permita la transducción tanto de células

en división como quiescentes, (e) Que posibilite la integración específica de un gen, (f) Que reconozca y actúe sobre células específicas, (g) Que la expresión del gen pueda ser regulada, (h) Que carezca de elementos que induzcan una respuesta inmune, (i) Que pueda ser caracterizado completamente, (j) Que sea inocuo, bioseguro y minimice sus posibles efectos secundarios, y, (k) Que sea fácil de producir y almacenar a costos razonables (Narbón Fernández, 2008).<sup>1</sup>

El vector es una parte importante en el sistema de transferencia génica, pero el sistema consta de dos componentes: el vector (vehículo de transporte) y el inserto (material a ser transportado). El inserto a su vez se subdivide en: el efector (gen a introducir) y el soporte (las secuencias que permiten y condicionan su expresión). El inserto suele ser una estructura de tipo plasmídico (DNA bicatenario y circular), aunque puede ser de diversa naturaleza y complejidad, desde un simple oligonucleótido hasta un cromosoma artificial, que permite incorporar una cantidad elevada de material genético con capacidad de perpetuación en el tiempo (Narbón Fernández, 2008)<sup>1</sup>.

Uno de los tipos de vectores no virales, son los cationes lipídicos, los cuales forman liposomas que engloban el inserto, formando un complejo DNA/lípido llamado "lipoplex" y facilitando su entrada celular mediante la fusión de los fosfolípidos de la membrana plasmática con dichos liposomas, mediante el proceso de la endocitosis.

Según reportes, la lipofección, o transferencia de ácidos nucleicos por vía liposomal, ofrece un número de ventajas sobre otros métodos corrientes de transfección. Los liposomas catiónicos son muy eficientes en la transferencia de genes *in vitro*, no destruyen la membrana celular, son capaces de transfectar muchos tipos de células, son metabolizables y tienen el potencial de marcar tejidos específicos *in vivo* (Smith et al. 1993).<sup>2</sup>

Felgner y colaboradores fueron pioneros en la transferencia génica basada en lípidos catiónicos (Felgner et al. 1987)<sup>3</sup>. Desde entonces, la lipofección ha empezado a representar el método no viral más comúnmente usado y ampliamente investigado. Cientos de formulaciones lipídicas se han desarrollado y evaluado en la transfección.

Se ha documentado que la etapa más limitante de la eficiencia de lipofección, es el paso a través de la membrana plasmática, principal barrera anatómica y mecánica que deben vencer los lipoplexes para llegar a su destino final, el núcleo de la célula diana. Los ácidos nucleicos por lo general no atraviesan la membrana celular a menos que su entrada sea facilitada por la creación de poros transitorios o mediante varios mecanismos de ingesta celular activa, tales como endocitosis, macropinocitosis o fagocitosis (Medina-Kauwe et al. 2005)<sup>4</sup>.

Una vez que los complejos lipoplex son tomados por medio de endocitosis, las macromoléculas capturadas por la célula dentro de los endosomas, usualmente se transforman en lisosomas digestivos a menos que posean mecanismos de escape para interceptar este proceso. Se han explorado dos de dichos mecanismos. El primero implica el uso de moléculas fusogénicas tales como péptidos de fusión (Li et al. 2004)<sup>5</sup>, o también mediante lípidos con enlaces sensibles a ácidos y largas porciones hidrofóbicas para romper la membrana de los endosomas (Xu et al. 1996)<sup>6</sup>. El segundo tipo de mecanismo implica generar una gran presión osmótica dentro del compartimiento endosomal que eventualmente gatilla la hinchazón o explosión de la vesícula endosómica (Akinc et al. 2005)<sup>7</sup>.

Una vez se liberan los endosomas, las moléculas de DNA o RNA en su forma libre o como complejos, deben atravesar el espacio citoplasmático (lleno de proteínas viscosas y de matriz citoesquelética), hacia el núcleo, donde la transcripción toma lugar (Lukacs et al. 2000)<sup>8</sup>. El mecanismo implicado en este

transporte intracitoplasmático hacia el núcleo de la célula huésped, permanece aún poco dilucidado.

La envoltura nuclear representa también una barrera importante para la entrada del DNA. Para células en replicación, muchas moléculas entran al núcleo mediante el proceso de disolución y reorganización de la envoltura nuclear durante la fase de mitosis. Para células interfásicas, el pasaje a través de esta barrera constituye una etapa limitante de la eficiencia de transfección ya que el tamaño significativo de una molécula de plásmido de DNA hace que sea improbable que su entrada nuclear ocurra por simple difusión pasiva. (Dean et al. 2005)<sup>9</sup>

Existen algunas evidencias iniciales que indican que el DNA plasmídico puede atravesar el complejo de poro nuclear (NPC) por un mecanismo similar al transporte activo de polipéptidos mayores a 60 KDa (Dean et al. 2005)<sup>9</sup>. No obstante, el mecanismo de importación nuclear de DNA foráneo es aún poco claro.

Finalmente, el desensamble de los complejos lipoplexes para liberar el DNA, podría constituir otra etapa que limita la eficiencia de la transfección (Chen et al. 2008)<sup>10</sup>.

Paralelo a la dilucidación de los factores celulares que limitan la eficiencia de incorporación y expresión de los complejos lipoplex, se han reportado algunos parámetros fisicoquímicos que están implicados en la eficiencia y toxicidad de la transfección. Dichos parámetros están relacionados con la cinética de formación de los complejos lipoplex, entre ellos se encuentran: la proporción lípido/DNA, la fuerza iónica y la temperatura del medio de suspensión, el orden de adición de los dos componentes, la tasa de mezcla de los reactivos, la composición del medio y la presencia o ausencia de suero (Masotti et al. 2008).<sup>11</sup>

Por todos estos procesos que dependen de la estructura, el metabolismo celular y la cinética de formación e incorporación de los complejos lipoplex, la técnica de lipofección es el procedimiento que ha reportado mayores ventajas sobre otros métodos en la transferencia génica. Debido a estas ventajas, es que la lipofección ha adquirido un lugar privilegiado en la terapia génica.

La terapia génica ha emergido como una de las más potentes y promisorias estrategias para el desarrollo de tratamientos para desórdenes adquiridos y heredados que conducen a enfermedades (Patil et al. 2003)<sup>12</sup>.

Sin embargo, la simplicidad conceptual de la terapia génica, se enfrenta a dos grandes retos biológicos y técnicos, a saber, (a) el desarrollo de tecnologías eficientes de entrega génica, y (b) la posible inducción de respuesta inmune del huésped. En cuanto al primer desafío, éste ha sido considerado como “el talón de Aquiles de la terapia génica” ya que los resultados clínicos requieren de la reparación genética de un alto número de células y, dependiendo de la naturaleza de la enfermedad, también se requiere una expresión estable a largo término del gen de interés. Para la gran mayoría de enfermedades potencialmente tratables, las tecnologías existentes no son eficientes para transfectar suficiente número de células para conferir beneficios terapéuticos (Alexander et al. 2004).<sup>25</sup>

Respecto al segundo desafío, los vectores no virales como los liposomas catiónicos (CL) se han preferido debido a que son aparentemente no inmunogénicos, son relativamente fáciles de ensamblar y apropiados para una producción a gran escala e industrial (Brown 2001)<sup>13</sup>.

Las ideas iniciales fueron dirigidas hacia el tratamiento de desórdenes monogénicos, y hoy ha llegado a ser claro que los genes pueden ser considerados un nuevo agente farmacéutico para el tratamiento de varios tipos de enfermedades. En las últimas dos décadas la terapia génica ha pasado



desde estudios preclínicos hacia estudios clínicos para varias enfermedades que varían desde desórdenes monogénicos como la fibrosis quística y la distrofia muscular de Duchenne, hasta enfermedades más complejas como cáncer y desordenes cardiovasculares. La terapia génica para Inmunodeficiencia combinada severa (SCID) es el éxito histórico más significativo hasta la fecha, aunque son significativos también los progresos en otras áreas (Alton. 2007).<sup>14</sup>

Según Alton, se han presentado algunos efectos adversos siguientes a la terapia génica, pero se han dado muchos progresos en la comprensión y superación de esos problemas. En ese sentido Alton declara que “los estudios para evaluar la genotoxicidad de cualquier vector de transferencia génica, serán una característica fundamental de la investigación en terapia génica” (Alton. 2007).<sup>14</sup>

## **1.2. ALGUNAS EVIDENCIAS ACERCA DE LAS LIMITACIONES DEL METODO CON LIPOPLEXES: EFECTOS CITOTÓXICOS**

Uno de los reactivos liposomales actuales se denomina “**TurboFect™ *in vitro* Transfection Reagent**” el cual es producido y comercializado por la compañía Fermentas S.A. que forma parte de Thermo Fisher Scientific. En su página web oficial, la casa farmacéutica expresa al respecto que se trata de “un reactivo de transfección altamente eficiente, fácil de usar y no inmunogénico. Es una solución estéril de un polímero catiónico apropiado que forma complejos estables, compactos y positivamente cargados con DNA. Esos complejos protegen el DNA de la degradación y facilitan la transferencia génica en células eucarióticas.”<sup>23</sup>

Ahora bien, ya que el uso de la transfección con liposomas es una herramienta promisoría para la comprensión de gran variedad de procesos celulares y moleculares, y presenta grandes aplicaciones en la investigación básica y

biomédica, se requieren más estudios acerca de sus posibles efectos citotóxicos y genotóxicos, como requisitos fundamentales para comprender mejor algunas consecuencias celulares de su uso; además, para asignarle mayor sustento como vehículo de transferencia génica.

Las escasas evidencias sobre el daño citotóxico causado por la lipofección comenzaron con algunos reportes acerca de la actividad inmunomoduladora de los vectores liposomales en células efectoras del sistema inmune (Filion y Phillips, 1997)<sup>15</sup>. En ese trabajo, se recomienda realizar una evaluación previa de la toxicidad de diferentes formulaciones de lípidos catiónicos hacia las dos mayores poblaciones de células efectoras del sistema inmune, macrófagos y linfocitos T, antes de establecer el potencial de los liposomas catiónicos como vectores en la transferencia génica.

Años más tarde, se reportó la inducción de apoptosis en macrófagos por liposomas catiónicos. Allí, se manifiestan algunas ideas acerca de la necesidad de adelantar estudios sobre la toxicidad y la inmunomodulación antes de realizar cualquier generalización sobre la inocuidad de los liposomas en el sistema inmune. Se establece que los liposomas ejercen cambios en las células con los que ellos interactúan, y que dichos cambios permanecen aún sin dilucidarse. Por tal razón, evaluaron si los liposomas catiónicos podrían causar apoptosis en macrófagos esplénicos de ratones, encontrando altos niveles de muerte celular, relacionada con la carga lípido:DNA de los liposomas, independientemente de su composición lipídica (Aramaki et al. 1999).<sup>16</sup>

Posteriormente, en 2007, se reporta que la formación de complejos de lipofectamina con plásmidos de DNA incrementa la citotoxicidad en células HeLa. Así, Nguyen et al., utilizando ensayos de citotoxicidad como el MTT y detectando apoptosis tanto cualitativa como cuantitativamente, documentaron que la citotoxicidad y la apoptosis se vieron incrementadas de una manera dependiente de la dosis de lipoplex. Además, mediante un análisis de

microarreglos para 20227 genes, encontraron sobreexpresión de 45 genes implicados en la regulación del ciclo celular, apoptosis, factores de transcripción y factores de respuesta al daño en DNA como reparación y recombinación (Nguyen et al. 2007)<sup>17</sup>.

Finalmente, en 2011, se realiza un estudio acerca de la inducción de estrés celular y cambios indeseados en los patrones de expresión génica de células transfectadas con lipofectamina-2000. Mediante la lipofección de células de melanoma de ratón B16F10 con un constructo de DNA plasmídico que contiene el gen reportero CAT (cloranfenicol acetil transferasa), controlado por el promotor de Hspa1b (proteína implicada en respuesta a estrés térmico), los autores observaron que la actividad del reportero se inducía en igual medida tanto en células en condiciones fisiológicas (37°C) como en células bajo estrés térmico (42°C) (Kierzkowska et al. 2011)<sup>18</sup>.

En el mismo trabajo, se analizó la cinética de activación del promotor Hspa1b ocasionada por las formulaciones lipídicas. Se evaluó la actividad del gen reportero en varios puntos de tiempo hasta las 48 horas pos-transfección. En células mantenidas a temperatura fisiológica (37°C), se detectó un alto nivel de actividad reportera comenzando desde 12 horas luego de la lipofección.

### **1.3. JUSTIFICACIÓN**

El procedimiento de transfección es ampliamente utilizado en la ciencia básica y biomédica moderna. De hecho, la búsqueda de la palabra “transfection” en la base de datos PubMed, arroja 154.543 resultados (25 de Abril de 2013), y el término “Turbofect”, en la misma base de datos, genera 236 resultados. Esto evidencia la cantidad de publicaciones que directa o indirectamente se relacionan con esta herramienta de transferencia génica. En la actualidad, se realizan grandes esfuerzos, tanto de los investigadores como de los fabricantes por mejorar progresivamente las eficiencias de los

protocolos. Si una de las características de un vector ideal es su inocuidad, con el mínimo de efectos secundarios, es razonable recomendar, la evaluación de los cambios indeseados a nivel celular, molecular y genético, debido a que éstos podrían incrementar, atenuar, o incluso enmascarar, los efectos deseados al realizar un procedimiento de inserción génica.

Existen algunos estudios que han empezado a evaluar transformaciones colaterales en las células sometidas a transfección, tales como la pérdida de viabilidad y efectos citotóxicos, y han solicitado estudios adicionales y mucha prudencia antes de certificar definitivamente a la técnica de lipofección como vehículo de transferencia génica.

Se ha reportado, por ejemplo, que las células sufren compactación, número reducido de mitosis y vacuolización del citoplasma (Lappalainen et al. 1994)<sup>19,20</sup>. Se ha descrito además, que esta toxicidad puede deberse, en parte, al gran tamaño o a la alta carga de los lipoplexes requeridos para su incorporación eficiente (Friend et al. 1996)<sup>21</sup>.

A pesar de la existencia de estos trabajos previos, el mecanismo molecular que conduce a la muerte celular causada por los lipoplexes, permanece poco comprendido.

#### **1.4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

A pesar de la amplia utilización, aún no es claro porqué la lipofección genera pérdida de viabilidad celular, que luego se restablece por aparente selección clonal. Por tanto, dado que existen pocos estudios rigurosos que hayan abordado este tema, en este trabajo de pregrado, se planteó un estudio exploratorio que permitiera documentar si la disminución inicial de viabilidad está relacionada con inestabilidad genómica como respuesta celular temprana a la introducción de material genético exógeno. De ahí que inicialmente se

buscara determinar si durante las primeras etapas después de la transfección hay o no concurrencia de viabilidad disminuida y genotoxicidad aumentada.

La reducción en la viabilidad y clonabilidad celular post-transfección reportada por investigadores (ver Sección 1.2, y Schiavone et al 2000)<sup>22</sup>, y corroborada en nuestro laboratorio (resultados no publicados) motivó el planteamiento del presente estudio piloto exploratorio, que en caso de generar resultados esperados (congruentes con la hipótesis de trabajo), conllevaría a preguntas fundamentales respecto a la respuesta genética de las células sometidas al tratamiento convencional de transfección con lipoplexes, y eventualmente, plantear futuras estrategias para optimizar dichos procesos.

Y aunque solo se pretendió hacer una primera exploración con indicadores de daño genómico, en un futuro se podría profundizar en la idea de si la respuesta de las células ante la introducción de material genético foráneo, activa la maquinaria celular de reparación-recombinación del DNA.

Es necesario aclarar también, que el planteamiento de este trabajo está fundamentado en una pregunta de investigación de biología básica. Los reactivos comerciales de transfección utilizados durante la realización de este trabajo fueron seleccionados debido a su disponibilidad comercial y su amplio uso de rutinas en muchos laboratorios a nivel mundial. Dado lo anterior, no existen intereses comerciales ni económicos que hayan influenciado el desarrollo de esta propuesta ni sus resultados.

## **1.5. HIPOTESIS**

Si la transfección con liposomas se ha visto asociada con reducción en la eficiencia de clonación y viabilidad celular, es posible que lo anterior esté relacionado al daño genotóxico derivado de la respuesta celular (reparación-recombinación) a la entrada del DNA foráneo.

## **1.6. OBJETIVOS**

### **1.6.1. OBJETIVO GENERAL:**

Determinar si la transfección con lipoplex ("TurboFect™ *in vitro* Transfection Reagent"), induce inestabilidad genómica.

### **1.6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

Determinar si la lipofección con TurboFect ocasiona quiebres de cadena sencilla (SSB) en el DNA de células tratadas.

Determinar si la lipofección con TurboFect ocasiona quiebres de cadena doble (DSB) en el DNA de células tratadas y manifestado en alteraciones cromosómicas tipo quiebres cromatídicos, cromosómicos, cromosomas en anillo, cromosomas dicéntricos y figuras cromosómicas multirradiadas.

Elaborar conclusiones acerca de la inocuidad o toxicidad de los lípidos utilizados como vectores de transferencia génica, y en la medida de lo posible, plantear algún mecanismo según los efectos encontrados.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Cultivo y Preparación de las Células:**

Se utilizaron células CHO-K1 (Chinese Hamster Ovary) (ATCC CCL-61), que han estado mantenidas de manera estable en el laboratorio del grupo de investigación Genética, Regeneración y Cáncer, en el trabajo rutinario de docencia e investigación. Las condiciones de cultivo para estas células

son: Medio de cultivo Ham's F12 (SIGMA-ALDRICH) y 5% de suero de bovino recién nacido inactivado por calor (GIBCO). Estas células han sido adaptadas en nuestro laboratorio para crecer en incubadora a 37°C en ausencia de CO<sub>2</sub> (Ver figura 1).

## 2.2 Obtención de los Plásmidos de DNA:

Se utilizó el plásmido pEGFP-N2 (GenBank: U57608.1) que permite la expresión de la Proteína Verde Fluorescente (GFP) con señal de localización nuclear (NLS), como gen reportero a partir de un promotor de Citomegalovirus Humano (CMV). Posee también un gen de resistencia al antibiótico kanamicina. Es un plásmido ampliamente utilizado en investigación científica a nivel mundial, y fue puesto a disposición para la realización de esta tesis de pregrado por parte del Profesor Jean Paul Delgado Charris del laboratorio Genética, Regeneración y Cáncer de la Universidad de Antioquia.

El DNA plasmídico fue propagado en bacterias *E.coli* DH5α (ultracompetentes), en medio agar LB que contenía kanamicina (0.01 mg/mL) para la selección de las cepas transformadas (Ver figura 2).

Posteriormente, la extracción de este plásmido se realizó mediante el kit de purificación "Plasmid Maxi Kit" de la compañía QUIAGEN, estandarizado y con resultados satisfactorios en el laboratorio mencionado.

La concentración de DNA fue determinada utilizando el ensayo de absorbancia UV a 260 nm con el equipo nanodrop (NANODROP 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific) del laboratorio Genética Molecular de la Universidad de Antioquia.

La viabilidad e integridad del plásmido fue confirmada visualmente mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, teñido con 40  $\mu$ L de Bromuro de Etidio (0.2mg/mL) (Ver Figura 3).

### 2.3 Preparación de los Complejos Lipoplex:

La cantidad de DNA y de lípido catiónico TurboFect™ se utilizó de acuerdo a las instrucciones que recomienda la casa comercial Fermentas Thermo Scientific para transfectar en microplatos de 24 pozos.

Para la preparación de los complejos lipoplex, se utilizó 1  $\mu$ g de pEGFP-N2 diluido en 50  $\mu$ L de medio Opti-MEM libre de suero, y se adicionó a 2  $\mu$ L de la formulación lipídica TurboFect diluida en 50  $\mu$ L de Opti-MEM. Se utilizó un tiempo de incubación de 1 hora a 37°C para permitir la formación de los complejos liposomales que transportan el DNA.

### 2.4 Lipofección:

Se siguieron las condiciones y el protocolo de transfección recomendado por el fabricante, el cual fue adaptado a las condiciones del laboratorio.

24 horas previas a la transfección, las células CHO-K1 fueron sembradas en microplatos de 24 pozos (2  $\text{cm}^2$ /pozo) en una densidad aproximada de 200.000 células/pozo en 1mL de medio de crecimiento Ham's F12 (SIGMA-ALDRICH) suplementado con suero de bovino recién nacido (SRN, GIBCO) al 5%, inactivado por calor, y antibióticos penicilina (100 U/mL) y streptomicina (100  $\mu$ g/mL). Los cultivos fueron incubados a 37°C en ausencia de CO<sub>2</sub>.

Para la lipofección, se descarta el medio anterior, y se reemplaza por 250  $\mu$ L de medio fresco Ham's F12 en ausencia de suero y antibiótico.



Posteriormente se adicionan, a cada pozo, 100  $\mu$ L de la solución que contiene los lipoplexes (plásmido + formulación lipídica) y se deja incubando a 37°C por espacio de 4 horas. Transcurrido este tiempo, se retiran los complejos liposomales, se realiza un lavado con PBS y se reemplaza por medio F12 suplementado.

Las células control fueron tratadas únicamente con 100  $\mu$ L/pozo de Opti-MEM.

### 2.5 Determinación de la Eficiencia de Transfección:

Se determinó la eficiencia de la transfección por medio del conteo visual de células que expresan el gen reportero GFP nuclear, utilizando microscopía de fluorescencia.

Las células fueron sembradas en microplatos de 24 pozos que contenían laminillas cubreobjetos circulares (diámetro circular de 12 mm, comercializadas por VWR Internacional™) previamente tratadas con HCl 1M.

El protocolo de fijación y montaje de muestras para visualización en microscopía de fluorescencia está estandarizado en nuestro laboratorio. Brevemente descrito, 24 horas después del procedimiento de transfección, se realiza la fijación de la muestra con para-formaldehído (PFA) al 4% diluída en PBS. Posteriormente, se realizó la tinción de contraste con solución Hoescht 33258. Este colorante es excitado por la luz ultravioleta en una longitud de onda de 343 nm y emite fluorescencia de color azul/cian a una longitud de onda de 455 nm.

Se realizó el conteo de núcleos totales marcados con el colorante Hoescht 33258 (núcleos azules), y se comparó con el total de núcleos que expresan el gen reportero GFP (núcleos verdes), mediante la siguiente relación:

ET (Eficiencia de Transfección)= (# Núcleos Verdes/ # Núcleos Azules)\* 100

## 2.6 Pruebas de Genotoxicidad:

El efecto genotóxico se evaluó mediante indicadores de daño (ensayo DNA-cometa y test de Alteraciones Cromosómicas) ampliamente utilizados en el Laboratorio Genética, Regeneración y Cáncer (Antiguo GenPop).

Con el objeto de establecer una cinética de inducción de daño en las etapas tempranas después de la lipofección, se realizaron los ensayos de genotoxicidad en diferentes tiempos post-transfección que comprendían desde 0 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, hasta 36 horas después de retirados los complejos lipoplex. En paralelo se utilizaron controles no transfectados

### 2.6.1. ENSAYO DNA COMETA.

Con el ensayo de DNA-Cometa alcalino (Electroforesis en Gel de Células Individuales) se evaluó si el procedimiento de lipofección ocasionaría SSB (quebres de cadena sencilla) en el DNA.

Para este ensayo, las células (control y transfectadas) son desprendidas con tripsina durante 3 minutos, luego de inactivarse la acción de la enzima, son colectadas en viales eppendorf de 1.5 mL y centrifugadas a 3000 rpm durante 4 minutos. El pellet celular es resuspendido en 40 µL de medio

F12. Posteriormente, se adicionan 160  $\mu$ L de agarosa de bajo punto de fusión (LMP).

Las células en agarosa, son sembradas en láminas portaobjetos previamente tratadas con agarosa de punto de fusión normal (NMP), y sumergidas en solución de Lisis durante 1 hora (89% de buffer de lisis pH 10 <NaCl 146.1 g/L, EDTA 37.2 g/L, Tris 1.2 g/L, NaOH 12 g/L y Lauril Sarcocinato de Sodio 10 g/L>, 10% de DMSO y 1% de Tritón X-100).

Realizado esto, se lavan las placas con PBS y se sumergen en Buffer de electroforesis (14,7 g/L de NaOH + 5 mL de EDTA 200mM) durante 20 minutos. Posteriormente se procede a hacer la corrida electroforética en este mismo buffer, durante 20 minutos, utilizando la cámara PS 250-1 SIGMA CHEMICAL COMPANY, y con una intensidad de corriente máxima de 300 Amperios.

Una vez finalizada la electroforesis, se procede a realizar la neutralización con 3 lavados con buffer neutralizante (48.5 g/L de Tris, pH 7.5).

Para la coloración se adicionan 40  $\mu$ L de Bromuro de Etidio (0.010 mg/mL) en cada placa, y se visualiza el montaje en microscopio de fluorescencia LEICA DMLS. Se fotografían 50 núcleos analizables por cada placa, enfocados de manera aleatoria y en objetivo de 20X. Una vez logradas las fotografías se realiza el análisis en el software CASP (Comet Assay Software Project), el cual permite analizar y exportar los datos a un archivo de Excel, donde la variable principal que se consideró en este análisis fue el % de DNA en cola.

Se realizaron réplicas de cada una de las placas en cada ensayo; además, para asegurar la repetibilidad de los experimentos se consideraron dos ensayos independientes con separación en tiempo de 1 semana.

## 2.6.2. TEST DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS.

Posteriormente, mediante el test de alteraciones cromosómicas (quiebres cromatídicos, quiebres cromosómicos, figuras cromosómicas multirradiadas, y cromosomas dicéntricos y en anillo) se determinó la inducción de DSB (Double Strand Breaks) en los cromosomas de las células sometidas a lipofección. Para lograr esto, se empleó el procedimiento de “micro-cosecha” de cromosomas, documentado por Camargo et al. (Camargo et al. 2006)<sup>24</sup>.

Una vez retirados los complejos lipoplex del cultivo celular y transcurrido el tiempo respectivo (0, 6, 12, 24 y 36 horas) se adicionan 10 µL de Colchicina a cada pozo para detener una fracción del ciclo celular en metafase mitótica. Este inhibidor se dejó actuar durante 4 horas.

Cumplido este tiempo, se inició el desprendimiento convencional con tripsina y posterior recolección de estas células (control y transfectadas) en viales eppendorf de 1.5 mL.

Las condiciones de micro-cosecha fueron las siguientes: Centrifugación a 3000 rpm durante 4 minutos (BECKMAN Microfuge<sup>TM</sup>11), solución hipotónica de Citrato de Sodio 0.7% durante 10 minutos a 37°C y solución de fijación (Metanol: Ácido Acético) en una proporción (3:1) durante 15 minutos a temperatura ambiente (RT°).

El goteo se realizó con pipeta pasteur de 1 mL, dejando caer 2 gotas en cada placa, desde una altura aproximada de 50 cm para obtener finalmente el extendido cromosómico de células en mitosis.

La coloración de las placas se realizó con Giemsa al 5% durante 15 minutos. Luego de esto, se procede a la observación al microscopio óptico, analizando 100 mitosis.

Cada mitosis fue enfocada en objetivo 100X y los cromosomas metafásicos fueron observados para buscar las diferentes alteraciones.

Se realizaron 2 ensayos independientes separados por un tiempo aproximado de 1 semana.

## 2.7. Esquema de Tratamiento:

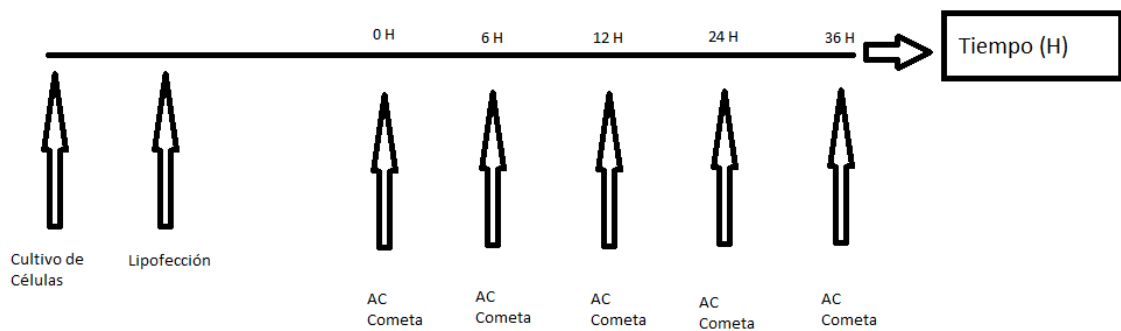


Figura 1: Esquema experimental. Los ensayos se realizaron por duplicado y con repetición en el tiempo para asegurar su reproducibilidad. Ver Materiales y Métodos.

## 2.8. Análisis estadístico.

### 2.8.1. Ensayo DNA cometa

Los datos correspondientes al promedio en el % de DNA en cola de los diferentes experimentos, se tabularon en el programa Excel 2010 de Microsoft Windows. En el mismo programa se realizaron los gráficos de barras, para representar los datos promedio del % de DNA en cola con sus

respectivas desviaciones estándar, en cada tratamiento, para cada uno de los ensayos realizados.

Además, se utilizó el programa estadístico SPSS versión 20.0, en el cual se hicieron las pruebas de distribución normal de los datos del ensayo DNA cometa. En caso de aceptar la hipótesis nula de normalidad de los datos, se procede a realizar una prueba t-student para comparar las medias de los tratamientos. En caso contrario, se debe utilizar la prueba no paramétrica de comparación de las medianas.

Utilizando el mismo programa se generaron los gráficos de distribución de frecuencias y diagramas de cajas (boxplot).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. PURIFICACIÓN DEL DNA PLASMÍDICO

El proceso de purificación del vector plasmídico mediante el kit “Maxi-prep” de QUIAGEN fue satisfactorio, al reportar un valor de 4964,15 ng/μL (de un máximo de 5000 ng/μL que especifica la casa comercial).

En la figura 3 se muestra el DNA plasmídico en sus tres conformaciones topológicas, DNA superenrollado, DNA circular relajado y DNA lineal de longitud completa. Mediante esta electroforesis se comprobó la integridad del plásmido y se determinó que este vector de expresión sería apto para realizar los experimentos de transfección contemplados en el proyecto.

#### 3.2. DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA DE TRANSFECCIÓN

Luego de realizar el conteo correspondiente a 5 campos aleatorios por cada montaje, en tres experimentos independientes, la eficiencia de transfección lograda con la formulación lipídica TurboFect en la línea celular CHO-K1 fue en promedio de (26,33 ± 3,22%) (Ver figuras 4, 5 y 6)

#### 3.3. RESULTADOS DEL ENSAYO DNA COMETA

##### 3.3.1. TIEMPO 0 HORAS:

Una vez retirados los complejos lipoplexes del cultivo celular, inmediatamente (0 horas) se inició el procesamiento para el ensayo DNA-cometa. Los resultados se resumen en la tabla 1. El % promedio de DNA en cola, fue de (5,85 ± 0,07%) y (6,99 ± 0,33%) para células control y

transfectadas, respectivamente. El % relativo de DNA en cola (el cual es un % de incremento en la inducción de daño) fue de 19%, que se calculó de la siguiente forma:

$$\% DNA_{rel} = \frac{T - C}{C} * 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

T= % DNA en cola en células transfectadas.

C= % DNA en cola en células control negativo.

En la figura 7 se muestra la gráfica de barras para el % promedio de DNA en cola para los grupos de tratamiento. Se expone la información correspondiente al % promedio de DNA en cola en cada uno de los ensayos independientes (A y B) junto con el promedio entre estos dos ensayos.

La figura 8 muestra el diagrama de cajas (boxplot). En este diagrama se puede apreciar la similitud de las medianas entre el grupo control y transfectado.

La figura 9 muestra un diagrama de frecuencias, trazando la curva normal de referencia. Puede notarse un ligero desplazamiento de los datos hacia la cola derecha en la distribución del grupo transfectado comparado con el grupo control, lo que podría explicar el 19% de incremento relativo (% relativo de DNA en cola) en el grupo de transfección. Las estadísticas descriptivas generales se relacionan en la figura 10.

El análisis estadístico inició evaluando si los datos se adecuaban a una distribución normal, y el resultado fue el rechazo de la hipótesis nula de normalidad, con valores  $p$  de 0,002 y 0,000 para el grupo control y transfectadas, respectivamente. Por consiguiente, se utilizó la prueba no paramétrica de comparación de medianas entre grupos.



En la figura 11 se presenta el resumen del análisis. Allí se indica que, con un valor p de 0,124 ( $\alpha = 0,05$ ), se acepta la hipótesis nula de igualdad de medianas, de lo que se sigue que, a 0 horas después de la transfección, no hay una inducción, estadísticamente significativa, de daño en DNA de tipo SSB.

### 3.3.2. TIEMPO 6 HORAS

En la tabla 2 puede verse que el % promedio de DNA en cola fue de ( $7,39 \pm 0,43\%$ ) y ( $10,64 \pm 0,66\%$ ) para células control y transfectadas, respectivamente. El % relativo de DNA en cola fue de 43,99%. Estos datos se presentan en forma gráfica en la figura 12.

En el diagrama de cajas (boxplot) se evidencia visualmente que la mediana en el grupo transfectado está incrementada (Figura 13). El histograma de frecuencias (Figura 14), con la curva normal de referencia, muestra un desplazamiento de los datos hacia la cola derecha de la distribución del grupo transfectado comparado con el grupo control.

En la figura 15, se pueden apreciar los resultados estadísticos descriptivos para los grupos de tratamiento.

Al realizar el análisis estadístico se encontraron diferencias significativas entre las medianas de cada uno de los grupos de tratamiento ( $p$  valor= 0,000). El resultado general es que a las 6 horas pos-transfección, existe una inducción, estadísticamente significativa, de daño de cadena sencilla (SSB) en el DNA de células transfectadas (Figura 16).

### 3.3.3. TIEMPO 12 HORAS

El % promedio de DNA en cola fue de  $(7,30 \pm 1,50\%)$  y  $(9,40 \pm 1,78\%)$  para células control y transfectadas, respectivamente. El % relativo de DNA en cola fue de 28,76% (Tabla 3 y figura 17)

Mediante el diagrama de cajas (boxplot) puede apreciarse que la mediana del grupo transfectado está incrementada con relación a la mediana del grupo control (Figura 18).

En la figura 19 se expone el histograma de frecuencias con la curva normal de referencia. Se observa un desplazamiento de los datos hacia la cola derecha de la distribución en el grupo transfectado comparado con el grupo control. Las estadísticas descriptivas básicas se exponen en la figura 20.

Con el análisis estadístico se encontraron diferencias significativas entre las medianas de los grupos de tratamiento ( $p$  valor= 0,007). Así que, a las 12 horas pos-transfección, existe una inducción, estadísticamente significativa, de daño en el DNA de tipo (SSB) en las células transfectadas (Figura 21).

### 3.3.4. TIEMPO 24 HORAS

Los resultados generales del ensayo se encuentran en la tabla 4 y en la figura 22. El % promedio de DNA en cola fue de  $(7,56 \pm 3,02\%)$  y  $(9,35 \pm 3,53\%)$  para células control y transfectadas, respectivamente. El % relativo de DNA en cola fue de 23,65%. Las estadísticas descriptivas se muestran en la figura 25.

De la figura 23, puede notarse el hecho que las medianas son similares en los dos grupos de tratamiento. En cuanto a la figura 24, aunque se observa un leve desplazamiento de los datos hacia la cola derecha de la distribución

en el grupo transfectado comparado con el grupo control, este desplazamiento de la curva es apreciablemente menor que el observado en los tiempos 6 horas y 12 horas. De ahí que pueda pensarse en una especie de “recuperación” o reparación del daño ocasionado en los tiempos 6 y 12 horas.

No se encontraron diferencias significativas entre las medianas de cada uno de los grupos de tratamiento ( $p$  valor= 0,964). Se establece entonces que a 24 horas pos-transfección, no existe daño significativo de tipo (SSB) en el DNA de células transfectadas. En la figura 26 se presenta el resumen del análisis.

### 3.3.5. TIEMPO 36 HORAS

El % promedio de DNA en cola fue de  $(6,96 \pm 0,88\%)$  y  $(8,75 \pm 1,18\%)$  para células control y transfectadas, respectivamente. El % relativo de DNA en cola fue de 25,83%. (Tabla 5 y figura 27).

En la figura 28 puede apreciarse la posición de las medianas en cada uno de los tratamientos.

En la figura 29, aunque se observa un leve desplazamiento de los datos hacia la cola derecha de la distribución en el grupo transfectado comparado con el grupo control, este desplazamiento es comparable, visualmente, al ocurrido a las 24 horas. De ahí que pueda pensarse que la “recuperación” o reparación del daño que iniciaría desde las 24 horas, mantendría la tendencia a las 36 horas después de la transfección.

Las estadísticas descriptivas generales, se encuentran consignadas en la figura 30.

No se encontraron diferencias significativas entre las medianas de cada uno de los grupos de tratamiento ( $p$  valor= 0,101). Quiere decir que a 36 horas pos-transfección, no existe daño, estadísticamente significativo, de tipo (SSB) en el DNA de células que fueron lipofectadas (Fig. 31).

### 3.3.6. RESULTADO GENERAL DEL ENSAYO DNA COMETA.

La figura 32 muestra los resultados generales del ensayo DNA cometa. Se representa el % promedio de DNA en cola (eje vertical) en función del tiempo pos-transfección (eje horizontal) para células control y transfectadas.

De la gráfica puede contemplarse una diferencia muy notable en el % DNA en cola entre las células control y lipofectadas, en el tiempo de 6 horas, que fue el tiempo de máxima inducción de daño de tipo SSB. Este daño continúa a las 12 horas, pero con menor significancia comparado con el reportado a 6 horas. Posteriormente en el tiempo 24 horas, no existe una diferencia significativa entre control y tratamiento, y esta tendencia se mantiene hasta el tiempo de 36 horas pos-transfección.

### 3.4. RESULTADOS DEL TEST DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS.

Para el análisis de las placas, se tuvo en cuenta excluir la particularidad citogenética del sitio frágil en el brazo largo del cromosoma X de las células CHO-K1. Este cromosoma presenta una forma muy característica para su distinción, ya que las cromátidas del brazo corto se observan más gruesas, ligeramente separadas y fuertemente teñidas por estar constituidas en su mayor parte por eucromatina. Las cromátidas del brazo largo contienen principalmente heterocromatina y se observan más delgadas y juntas. Además, en muchos extendidos cromosómicos se puede observar una doble ruptura en las 2 cromátidas hermanas del brazo

largo en el mencionado sitio frágil del cromosoma X de las células CHO-K1 (Ver figura 43).

Se tuvo la precaución, de diferenciar el sitio frágil del X para no reportarlo como un quiebre de tipo cromatídico (B) o cromosómico (BB), ya que esto generaría falsos positivos en el análisis de efecto clastogénico.

En la figura 44, se muestra un extendido de cromosomas metafásicos que corresponde a un cariotipo completamente normal.

En las figuras 45, 46, 47 y 48 se muestran diversas imágenes con cromosomas que presentan daños típicos como quiebres cromatídicos (B), quiebres cromosómicos (BB) y figuras multirradiadas (MR).

#### 3.4.1. TIEMPO 0 HORAS

Los resultados generales se resumen en la tabla 6 para los dos ensayos independientes A y B, y el promedio entre estos dos ensayos, para cada grupo de tratamiento. Con los datos provenientes del número y tipo de alteraciones cromosómicas, se realizó la gráfica de barras, que se muestra en la figura 34.

El número promedio de alteraciones en el grupo control, fue de 6 (referente a 100 mitosis analizadas), mientras que en el grupo transfectado se alcanzó un valor de 14 alteraciones cromosómicas, correspondiendo a un incremento de 133,33%. Este incremento fue calculado de la siguiente forma:

$$\% AC_r = [(AC_{\text{Transf}} - AC_{\text{Control}}) / (AC_{\text{Control}})] * 100 \quad (\text{ecuación 2})$$

Donde,

$\% AC_r$  = Es el incremento relativo en el número de alteraciones del grupo transfectado con respecto al grupo control.

$AC_{Transf}$  = Es el número promedio de alteraciones cromosómicas en el grupo transfectado.

$AC_{Control}$  = Es el número promedio de alteraciones cromosómicas en el grupo control.

Se tabuló también, el % de células con daño, que corresponde al número de mitosis que exhiben daño, por cada 100 mitosis evaluadas (Tabla 11). En este tiempo pos-transfección se encontró un leve incremento en el porcentaje de células dañadas en el grupo transfectado comparado con el grupo control, al pasar desde un promedio de 5,5% (control) hasta 8,5% (transfectado).

#### 3.4.2. TIEMPO 6 HORAS

Se encontró en promedio, un total de 6 y 27 alteraciones cromosómicas, para el grupo control y transfectado, respectivamente (Tabla 7 y Figura 35).

En este tiempo pos-transfección, se encontró un gran incremento de quiebres cromatídicos (B), al pasar de un número promedio de 5 en el grupo control hasta 22,5 en el grupo transfectado. Además, se encontró un promedio de 2 células con múltiples daños (mitosis con varias alteraciones cromosómicas) en el grupo transfectado, en tanto que en el grupo control, este tipo de células no fueron encontradas (Ver figura 36).

El % de células con daño sufrió un fuerte incremento desde 4,5% en el grupo control hasta 11,5% en el grupo transfectado (Tabla 11).

### 3.4.3. TIEMPO 12 HORAS

Las alteraciones cromosómicas en promedio fueron de 7,5 y 19,5 para grupo control y transfectado, respectivamente, correspondiendo a un incremento relativo de 160%. Estos datos se han organizado en la tabla 8 y en la figura 37.

El mayor incremento se presentó en los quiebres cromatídicos (B), al pasar de un número promedio de 6,5 en el grupo control hasta 15,5 en el grupo transfectado. Las figuras multirradiadas (MR) pasaron de 1 en el grupo control hasta 3,5 en el grupo transfectado (Figura 38). En este tiempo postransfección, se observaron en promedio 2 células con múltiples daños en el grupo transfectado, mientras en el grupo control no se encontraron este tipo de células (Figura 39).

### 3.4.4. TIEMPO 24 HORAS

El número promedio de alteraciones cromosómicas fue de 10,5 y 15 para grupo control y transfectado, respectivamente, representando un incremento relativo de 42,86% en el número de alteraciones en el grupo de células lipofectadas respecto a las células control (Tabla 9 y figura 40).

De forma interesante, el % de células con daño, fue similar en el grupo control y transfectado, al encontrarse valores de 8,5% y 10,5% respectivamente.

El número de quiebres cromosómicos (BB) en el grupo transfectado fue similar en ambos grupos, con valores de 3,5 en el control, y de 2,5 en el grupo transfectado. En cuanto a figuras multirradiadas (MR), éstas tuvieron un valor de 0,5 en el grupo control y 1,5 en el grupo transfectado.

#### 3.4.5. TIEMPO 36 HORAS.

El número promedio de alteraciones cromosómicas fue de 6,5 y 8,5 para grupos control y transfectado, respectivamente, correspondiendo a un incremento relativo de 30,77% en el número de alteraciones en el grupo de transfección con respecto al control. (Tabla 10 y figura 41).

El % de células con daño, es de 6,0% en el grupo control y 7,5% en el grupo transfectado. (Tabla 11).

En cuanto al número de quiebres cromatídicos (B), se reporta un promedio de 5 en el grupo control y 7 en el grupo transfectado. No se encontró un incremento en el número quiebres cromosómicos (BB) reportando un promedio igual de 1,5 tanto en el grupo control como en el grupo transfectado. No se encontraron células multidañadas en ninguno de los grupos de tratamiento.

#### 3.4.6. RESULTADO GENERAL ALTERACIONES CROMOSÓMICAS.

En la figura 42 se presenta el diagrama de barras con el número de alteraciones cromosómicas en función del tiempo pos-transfección. Esta grafica revela una fuerte inducción de daño de tipo DSB en células transfectadas que empezó desde las 6 horas, donde se encontraron daños complejos que implican varios cromosomas, manteniendo altos niveles a las 12 horas pero con una disminución con respecto a 6 horas. A 24 horas pos-transfección empezaría un proceso de disminución o reparación del daño, en tanto que a 36 horas, esta reparación se hace más evidente aún.



#### 4. DISCUSIÓN, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

En trabajos previos se ha reportado que la transfección de DNA con lípidos catiónicos, induce citotoxicidad, y que esta pérdida de viabilidad ocurre en etapas tempranas pos-transfección<sup>17-22</sup>. El mecanismo molecular asociado a este efecto deletéreo aún permanece poco claro. Por tal motivo, en este estudio piloto exploratorio, se pretendió determinar si esta disminución inicial de viabilidad celular pos-transfección está relacionada con inestabilidad genómica como respuesta temprana a la introducción de material genético exógeno. Los resultados, de modo interesante, mostraron una fuerte inducción de daño de tipo SSB y DSB en el DNA de células CHO-K1 en las primeras 6 -12 horas después de la lipofección. En horas posteriores (24-36 hrs) el daño disminuye, posiblemente como resultado de la confluencia de dos procesos biológicos: la selección clonal y la maquinaria celular de reparación de daños en el DNA.

La selección clonal es evocada aquí, ya que las células con daños más severos, y que no son reparados eficientemente en el tiempo adecuado, pueden activar “checkpoints” de ciclo celular y comprometerse en apoptosis. Este proceso sería congruente con los niveles de citotoxicidad incrementada referidos en esos trabajos previos y corroborados en nuestro laboratorio (resultados no mostrados). La muerte celular temprana podría explicar también, al menos en parte, la cinética en la expresión génica del DNA plasmídico inserto, en la que se observa una fuerte pero transitoria expresión inicial, que luego experimenta una rápida disminución y esta declinación sería causada por la muerte celular programada debido al daño celular propio del proceso de transfección<sup>17,27</sup>.

En cuanto al daño genotóxico encontrado en etapas iniciales pos-transfección, esto suscita una especial atención, debido a una importante consideración. Más allá de la citotoxicidad, permite dirigir algunas preguntas fundamentales relacionadas con el mecanismo celular básico de respuesta ante la llegada de DNA foráneo. Nuestra idea de que la inserción de material genético activa la maquinaria celular de reparación-recombinación del DNA, y que esta activación

podría expresarse y detectarse mediante indicadores de daño genómico, es coherente con algunos trabajos anteriores. Por ejemplo, Chen et al., plantearon que la transfección de dsDNA lineal en células de mamíferos, probablemente induce la activación de los sistemas enzimáticos responsables de la reparación del DNA (Chen et al. 2001)<sup>28</sup>. En otro trabajo, Alexander et al., establecieron que el tratamiento con agentes que dañan el DNA incrementa alrededor de 2 órdenes de magnitud la eficiencia de transducción con vectores rAAV (Virus Adeno-asociados) en células no mitóticas. Estos autores plantearon que el DNA genómico dañado podría proporcionar sitios para la integración, o alternativamente, conducir a la inducción de enzimas de reparación, que incluyen, DNA polimerasas, DNA ligasas y factores que modulan la progresión del ciclo celular, que incrementaría la transducción del vector (Alexander et al. 1994)<sup>29</sup>.

Por su parte, Schwartz et al., plantearon que la transfección con rAAV induce en las células huésped la activación de respuesta tipo DDR (DDR por sus siglas en inglés de “DNA-damaged response”). Esta respuesta está mediada por la replicación viral, que genera gran cantidad de DNA extracromosómico que puede ser detectado por la maquinaria de reparación, principalmente dirigida hacia la reparación de DSB, coordinada por la proteína DNA-PK (Schwartz et al. 2009)<sup>30</sup>.

En congruencia con estos reportes, en este trabajo hemos hipotetizado que la entrada de múltiples copias de DNA plasmídico en el núcleo de la célula diana, activa los mecanismos de defensa y reparación celular, al reconocer al DNA extracromosomal como “daño” en un proceso similar al desplegado ante una infección viral. Los niveles de genotoxicidad de tipo SSB y DSB en el DNA genómico de las células huéspedes, encontrados en nuestro estudio exploratorio, podrían constituir una evidencia adicional en este aspecto. Un análisis detallado de los patrones de daño cromosómico encontrados en los diferentes tiempos post-transfección, permite dar fuerza a los argumentos descritos anteriormente.

En cuanto a la detección de SSB, la cinética de inducción de este tipo de daño empezó desde las 6 y 12 horas, donde se encontró el pico máximo de genotoxicidad. Se podría plantear que la existencia de estos quiebres de cadena

sencilla en el DNA obedecería a la siguiente mecánica reparativa, que empezaría con un nivel basal de daño propio del tratamiento de transfección, que generaría algún tipo de estrés celular<sup>18</sup> resultante en la introducción de mellas (“nicks”) a las moléculas foráneas que desencadenarían procesos de digestión en ambos sentidos resultando en cadenas sencillas parciales. Este procesamiento enzimático se generaría por la entrada de múltiples copias de DNA plasmídico, algunas de las cuales pueden llegar dañadas al núcleo luego de su complejo tránsito intracelular; así, serían detectadas por la célula huésped como una situación de daño genómico, y gatillarían la activación de las enzimas endonucleasas y DNA glicosilasas que se encargan de las etapas iniciales de la reparación de daños de cadena sencilla. Los niveles de SSB detectados en las primeras horas pos-transfección, pueden ser el reflejo de ese proceso y podrían constituir especies intermedias en el procesamiento enzimático.

El hecho de la disminución del daño expresado en SSB a niveles cuasi basales, a las 24 y 36 horas pos-transfección, pone en evidencia que la activación de los procesos de reparación estuvieron en marcha.

En lo que concierne al daño de tipo DSB expresado en alteraciones cromosómicas, es necesario analizar que desde la hora cero pos-transfección, se encontró un potencial más eficiente para la generación de este tipo de daño comparado con SSB. Se comprende esto con la idea que el plásmido introducido es de doble cadena de DNA y esto activaría principalmente, mecanismos de respuesta celular de reparación de daños de tipo DSB. Cabe recordar que la llamada “hora cero” se refiere al primer muestreo que se realiza después de la incubación inicial de 4 horas que requiere el protocolo de transfección recomendado por la casa comercial.

Para el análisis de resultados de este primer muestreo pos-transfección, es importante tener en cuenta la duración del ciclo celular de las células CHO-K1 ( $\approx 16$  hrs) y en particular la duración de  $G_2$  (2-3 hrs). Por ejemplo, este primer muestreo de células mitóticas se hizo luego de un bloqueo de 4 hrs con colchicina; y en consecuencia, las células mitóticas analizadas y las alteraciones

cromosómicas detectadas, provienen primordialmente de G2 y algo de S tardía. Los quiebres cromatídicos y cromosómicos encontrados, refuerzan la idea de que la presencia de DNA extracromosomal foráneo induce la reparación de DSB, lo cual es un proceso de respuesta que inicia inmediatamente la célula detecta dicho DNA como daño genómico o, alternativamente, alguna señal que simule un daño, tal como la presencia de DNA linear o de extremos “expuestos”, teóricamente necesarios para que un plásmido se inserte en el genoma. Esta respuesta tan rápida o inmediata es entendible como un mecanismo primario de defensa para la preservación de la integridad genómica, y más aún si se tiene en cuenta que los DSB son las lesiones más serias y perjudiciales ya que pueden generar, entre otros, interrupción de secuencias, pérdida de material genético, e inestabilidad genómica.

En el tiempo pos-transfección de 6 horas, se acumulan y se cosechan en M las células que estuvieron en fase S en el momento de la lipofección. En este tiempo, es donde se observó el mayor nivel de rupturas cromatídicas, y además de las rupturas cromosómicas, empiezan a aparecer alteraciones más complejas como las figuras multirradiadas y células con daños múltiples como los presentados en la figura 35. Acá se pone en mayor evidencia la acción de la compleja maquinaria de reparación. La presencia de alteraciones como los de las figuras 35 y 48, corresponde a un patrón similar al encontrado en células sometidas a radiación ionizante. Se ha postulado que estas alteraciones complejas que involucran varios cromosomas parecen ser concatámeros de intercambios e intracambios simétricos y asimétricos con sus acompañantes fragmentos acéntricos. Estas figuras de intercambios sugieren que ellos fueron formados en fase S por la mala reparación de DSB mediados por NHEJ (por sus siglas en inglés de “non homologous end joining”) propenso a error, distribuidos a través de varios cromosomas no homólogos (Wilson et al. 2010)<sup>32</sup>.

Luego de 12 horas pos-transfección, se acumulan y cosechan las células que estuvieron en fase G1 en el momento de la lipofección. Aunque el daño es menor que en el tiempo de 6 horas, sigue siendo alto en células transfectadas con

relación al control. Se observan figuras multirradiadas y alteraciones complejas como las presentadas en las figuras 37 y 38. Esta disminución en el daño con relación al tiempo anterior, puede explicarse por el hecho que las células han recorrido la fase G1 (donde opera únicamente NHEJ), pasaron por fase S (donde opera HRR, del inglés “homologous recombination repair”, y NHEJ), luego G2 (donde opera HRR y NHEJ) para entrar finalmente a mitosis. En este recorrido por el ciclo celular, una gran fracción de rupturas DSB fueron reparadas, algunas correctamente, otras incorrectamente con propensión a error. También es necesario destacar, que en este recorrido por el ciclo, muchas células pudieron comprometerse en apoptosis antes de llegar a la etapa de mitosis, por lo que no todas las alteraciones generadas en G1 pueden detectarse.

Después de 24 horas, las células transfectadas ya han completado un ciclo, y se encuentran en parte del segundo, por lo que la observación de un nivel de daño más bajo que el encontrado en 6 y 12 horas, es congruente con la idea de una mayor reparación genómica y de ciertos niveles de selección celular, en el que las células más dañadas que no han reparado eficientemente las rupturas DSB y/o han generado mayor inestabilidad genómica, se han comprometido en apoptosis.

En el tiempo 36 horas, las células han realizado 2 ciclos aproximadamente. Los niveles de daño son comparables al control, por lo que puede pensarse en una reparación completa y en una eficiente selección.

De manera concomitante, este proceso de activación de la DDR puede tener consecuencias biológicas, tanto para el DNA foráneo entrante, como para los cromosomas de las células. Para el plásmido, se ha reportado que el principal evento temprano pos-transfección es la concatemerización o polimerización en largas cadenas de DNA. Este proceso de ligación de DNA, que exige la presencia de enzimas DNA polimerasas, DNA ligasas y un DNA sustrato con extremos expuestos, podría ser mediado por el complejo de reparación de DNA, especialmente el vinculado con la reparación de DSB. Las primeras indicaciones

que las moléculas de DNA insertadas mediante transfección podrían ser un sustrato para las enzimas de reparación provienen del trabajo de Folger et al., quienes determinaron que las moléculas de DNA plasmídico sufrían concatemerización en unos patrones que reflejaban la presencia de sistemas de recombinación homóloga (Folger et al. 1982)<sup>31</sup>.

Otra consecuencia biológica de los sistemas de reparación, que implica tanto al DNA foráneo como al DNA cromosómico de las células transfectadas, sería el proceso de integración, en el que la generación de extremos de DNA libres tanto en el plásmido como en los cromosomas eucarióticos, podrían ser ligados heterogéneamente por la acción de DNA ligasas implicadas en los mecanismos de recombinación homóloga (HRR) y la recombinación no homóloga NHEJ.

Este trabajo exploratorio, por su carácter soporta una evidencia inicial a un fenómeno biológico complejo, cuyo intrincado mecanismo requiere de mayores esfuerzos que permitan direccionar mejor los alcances logrados hasta este momento. Es necesario recomendar para trabajos futuros, evaluar el efecto citogenotóxico en otras líneas celulares y utilizando otras formulaciones liposomales con el fin de darle mayor sustento a lo que se ha encontrado en esta primera aproximación.

Además de la utilización de marcadores citogenéticos básicos como los de este trabajo, podría recomendarse el empleo de técnicas moleculares que permitan detectar la activación de proteínas celulares implicadas en la señalización, procesamiento y reparación de daño en el DNA. Técnicas robustas para detectar apoptosis y evaluar efectos en el ciclo celular, podrían ser útiles para dar mayores bases a lo ya establecido.

Este trabajo, que es importante por lo ya conseguido, que irá adquiriendo mayor interés por las perspectivas futuras que se abren, está dispuesto a críticas de parte de la comunidad académica. Si con la realización de este trabajo se posibilita en la comunidad científica el interés por un problema biológico fundamental, desde ya, se habrá cumplido con una gran labor.

## 5. ANEXOS

### A1. GRÁFICAS E IMÁGENES:

Figura 1: Cultivo de células CHO-K1

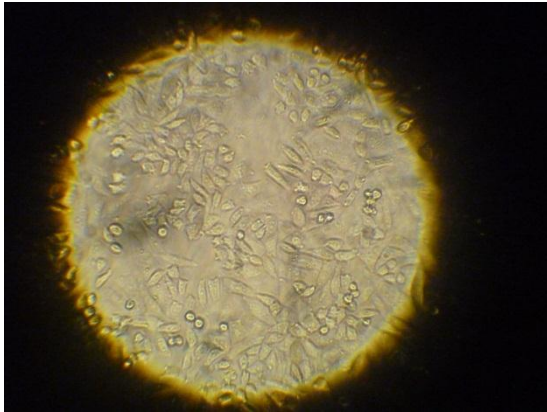


Figura 2: Selección de colonias bacterianas transformadas con el plásmido pEGFP-N2



Figura 3: Electroforesis en Gel de Agarosa al 0.8%

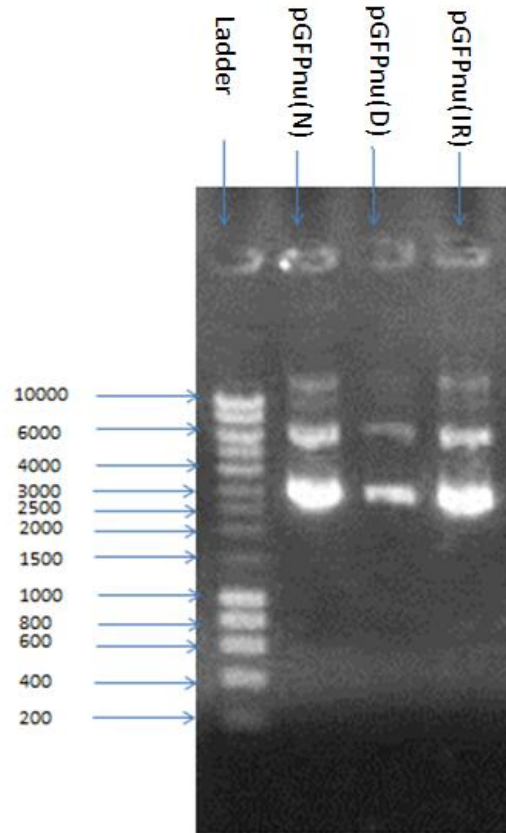


Figura 4: Microfotografía de Fluorescencia. En la fusión (merge) se muestran las células transfectadas (verdes) y células totales (azules). El color intermedio, representa las células que expresan los dos marcadores.

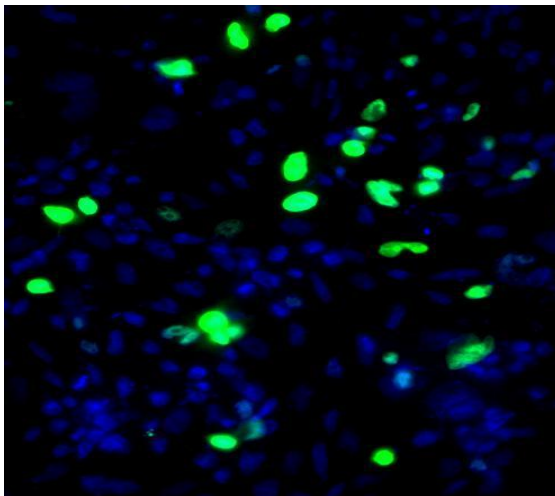




Figura 5: Microfotografía de fluorescencia con Objetivos 20X (izquierda) y 40X (derecha). Se han separado las imágenes de los 2 marcadores. Arriba, los núcleos con tinción Hoechst 33258. Abajo, los núcleos que contienen la proteína GFP.

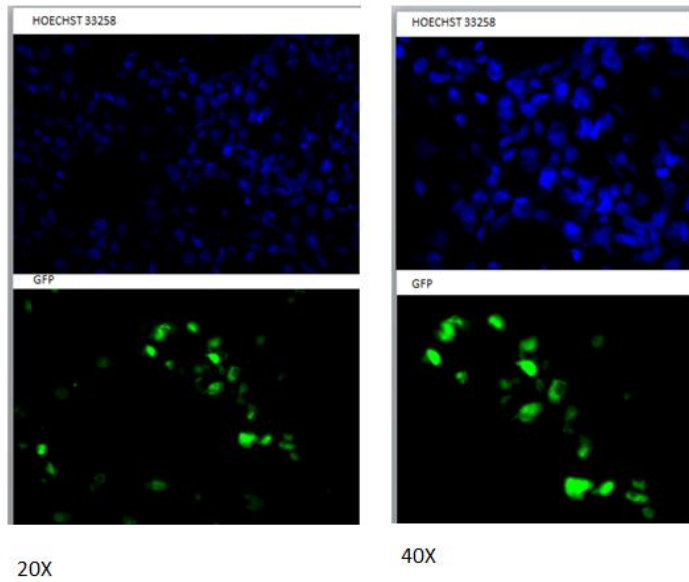


Figura 6: Microfotografía de fluorescencia en objetivo de 100X, mostrando una célula transfectada en metafase mitótica. En A se observa la coloración azul de Hoechst y en B se muestra la proteína GFP.

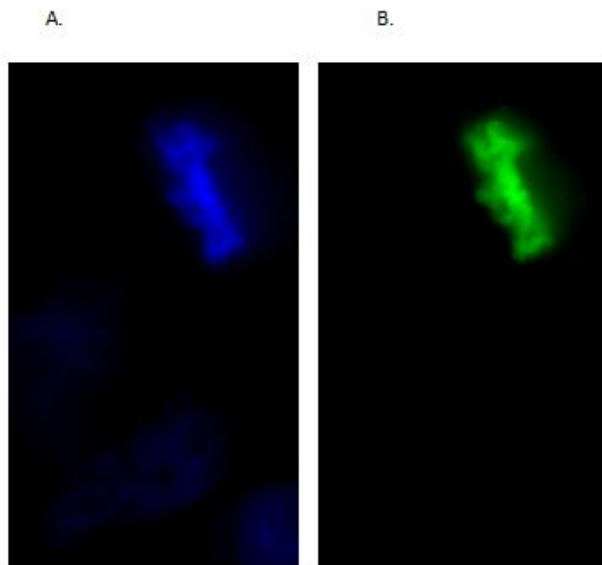


Figura 7. Gráfica de barras del % de DNA en cola promedio a las 0 Horas.

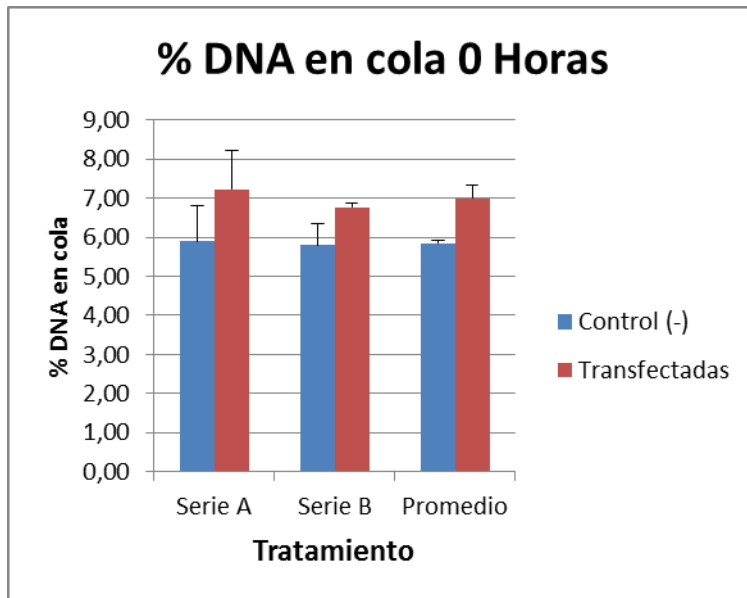


Figura 8: Diagrama de cajas (boxplot) para el % de DNA en cola a las 0 Horas. Las cajas sombreadas, representan los datos distribuidos en las 2 primeras desviaciones estándar. La línea horizontal gruesa dentro de las cajas, representa la mediana de los datos. Las líneas fuera de las cajas representan la desviación estándar.

Los círculos superpuestos son los datos superiores, mientras que las estrellas, corresponden a datos extremos de la distribución.

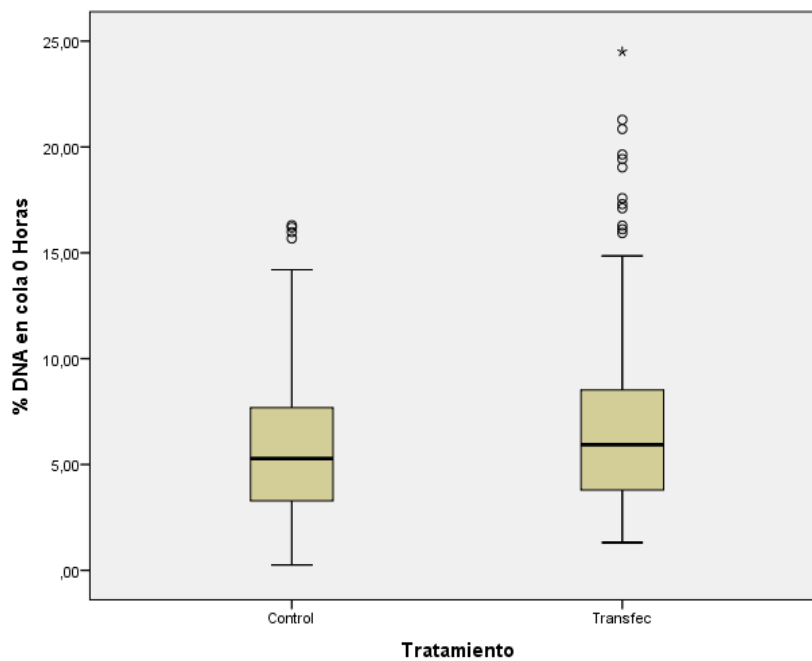


Figura 9. Histograma de frecuencia y trazado de la curva normal de referencia para los datos de % DNA en cola 0 Horas.

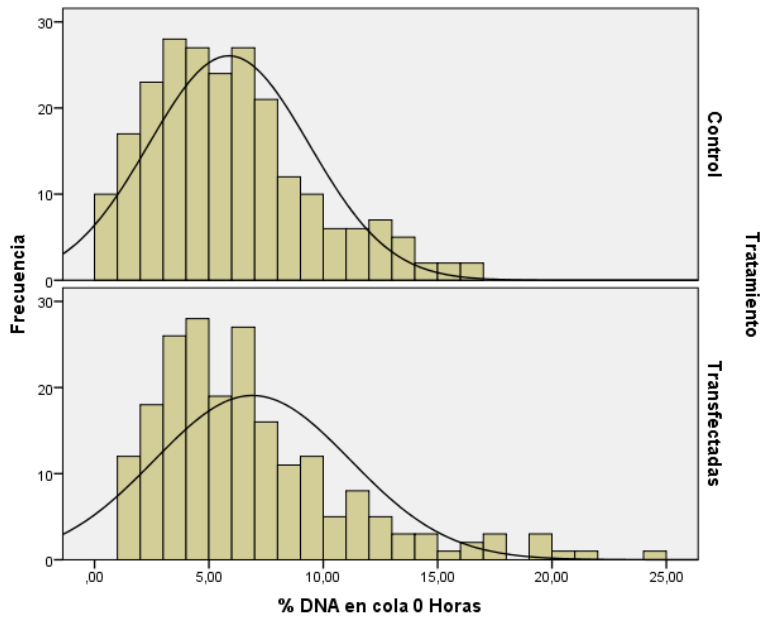


Figura 10. Estadísticos descriptivos para el % DNA en cola en 0 Horas.

Descriptivos				Estadístico	Error tip.
Tratamiento					
% DNA en cola 0 Horas	Control	Media		5,8739	,23164
		Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	5,4175	
			Límite superior	6,3303	
		Media recortada al 5%		5,6873	
		Mediana		5,2829	
		Varianza		12,287	
		Desv. tip.		3,50530	
		Mínimo		,26	
	Máximo		16,30		
	Rango		16,04		
	Amplitud intercuartil		4,47		
	Asimetría		,776	,161	
	Curtosis		,209	,320	
	Transfectadas	Media		6,9001	,29949
		Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	6,3096	
			Límite superior	7,4906	
Media recortada al 5%			6,5054		
Mediana			5,9362		
Varianza			18,387		
Desv. tip.			4,28802		
Mínimo			1,31		
Máximo		24,50			
Rango		23,19			
Amplitud intercuartil		4,81			
Asimetría		1,428	,170		
Curtosis		2,238	,338		

Figura 11. Resumen del análisis estadístico no paramétrico para % DNA en cola a las 0 Horas.

**Resumen de prueba de hipótesis**

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	Las medianas de % DNA en cola 0 Horas son las mismas entre las categorías de Tratamiento.	Prueba de medianas de muestras independientes	,124	Retener la hipótesis nula.
2	La distribución de % DNA en cola 0 Horas es la misma entre las categorías de Tratamiento.	Prueba U de Mann-Whitney de muestras independientes	,028	Rechazar la hipótesis nula.
3	La distribución de % DNA en cola 0 Horas es la misma entre las categorías de Tratamiento.	Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes	,028	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

Figura 12. Gráfica de barras del % de DNA en cola promedio a las 6 Horas.

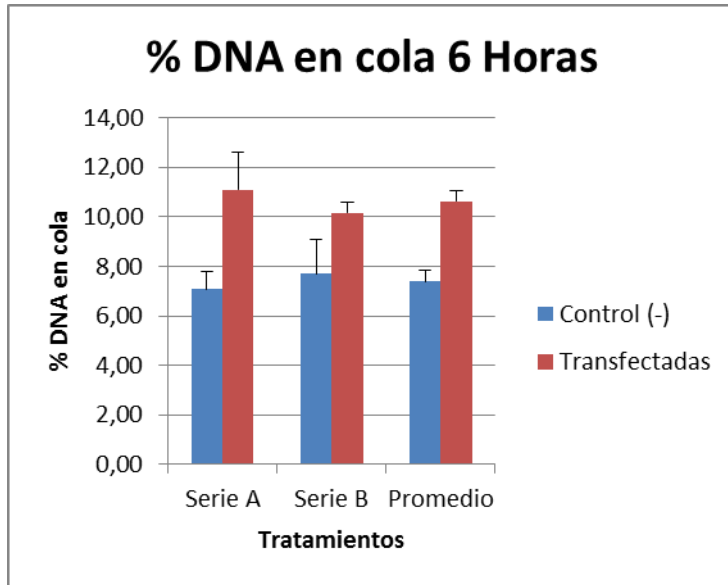


Figura 13. Diagrama de cajas (boxplot) para el % de DNA en cola a las 6 Horas.

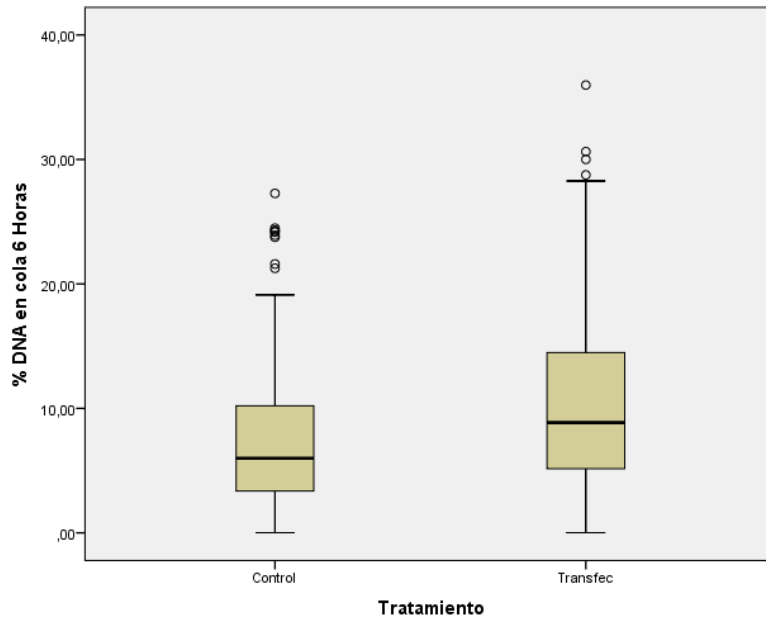


Figura 14. Histograma de frecuencia y trazado de la curva normal de referencia para los datos de % DNA en cola 6 Horas.

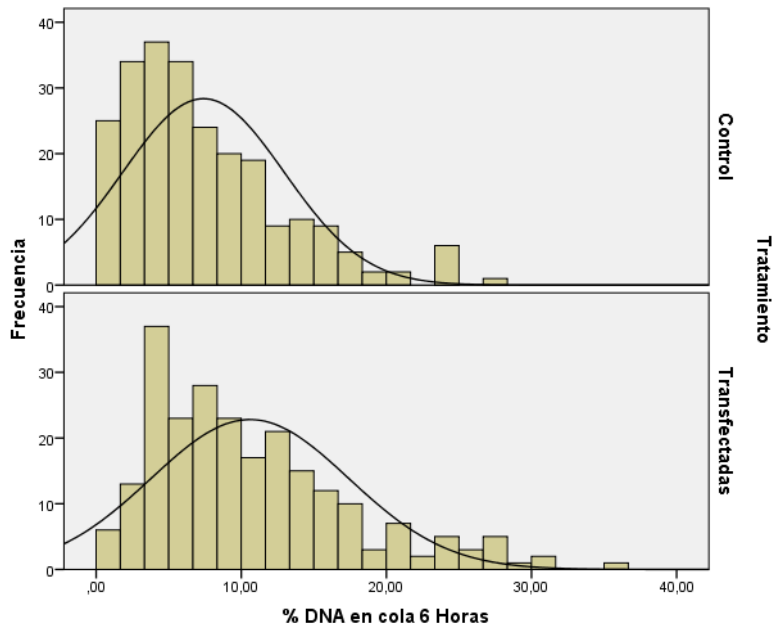


Figura 15. Estadísticos descriptivos para el % DNA en cola en 6 Horas.

Descriptivos			Estadístico	Error tip.	
Tratamiento					
% DNA en cola 6 Horas	Control	Media	7,3913	,36074	
		Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	6,6807	
			Límite superior	8,1020	
		Media recortada al 5%	6,9407		
		Mediana	5,9925		
		Varianza	30,842		
		Desv. tip.	5,55353		
		Mínimo	,01		
		Máximo	27,28		
		Rango	27,27		
	Amplitud intercuartil	6,89			
	Asimetría	1,165	,158		
	Curtosis	1,287	,315		
	Transfectadas	Media	10,5942	,44583	
		Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	9,7158	
			Límite superior	11,4726	
		Media recortada al 5%	10,0972		
		Mediana	8,8650		
		Varianza	46,511		
		Desv. tip.	6,81992		
Mínimo		,01			
Máximo		35,98			
Rango		35,97			
Amplitud intercuartil	9,35				
Asimetría	1,065	,159			
Curtosis	,835	,317			

Figura 16. Resumen del análisis estadístico no paramétrico para % DNA en cola a las 6 Horas.

Resumen de prueba de hipótesis				
	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	Las medianas de % DNA en cola 6 Horas son las mismas entre las categorías de Tratamiento.	Prueba de medianas de muestras independientes	,000	Rechazar la hipótesis nula.
2	La distribución de % DNA en cola 6 Horas es la misma entre las categorías de Tratamiento.	Prueba U de Mann-Whitney de muestras independientes	,000	Rechazar la hipótesis nula.
3	La distribución de % DNA en cola 6 Horas es la misma entre las categorías de Tratamiento.	Prueba Kolmogorov-Smirnov de muestras independientes	,000	Rechazar la hipótesis nula.
4	La distribución de % DNA en cola 6 Horas es la misma entre las categorías de Tratamiento.	Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes	,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

Figura 17. Gráfica de barras del % de DNA en cola promedio a las 12 Horas.

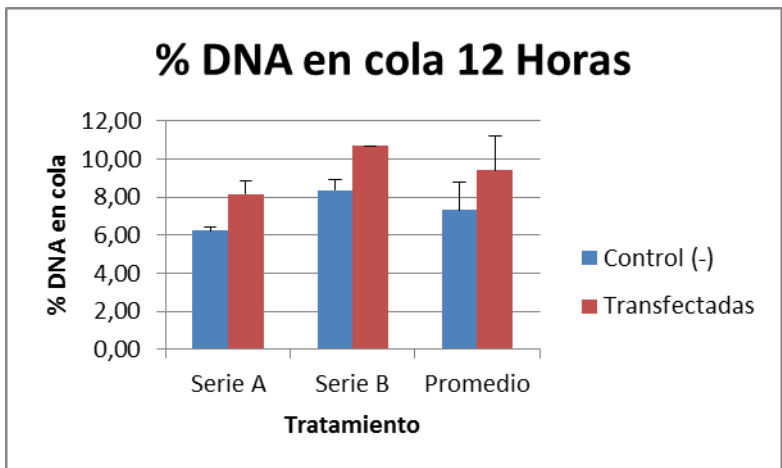


Figura 18. Diagrama de cajas (boxplot) para el % de DNA en cola a las 12 Horas.

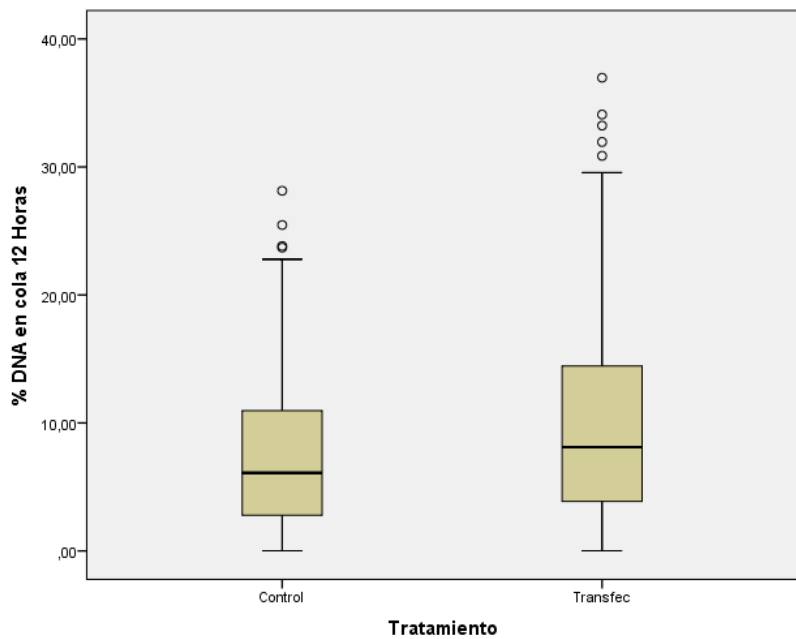


Figura 19. Histograma de frecuencia y trazado de la curva normal de referencia para los datos de % DNA en cola 12 Horas.

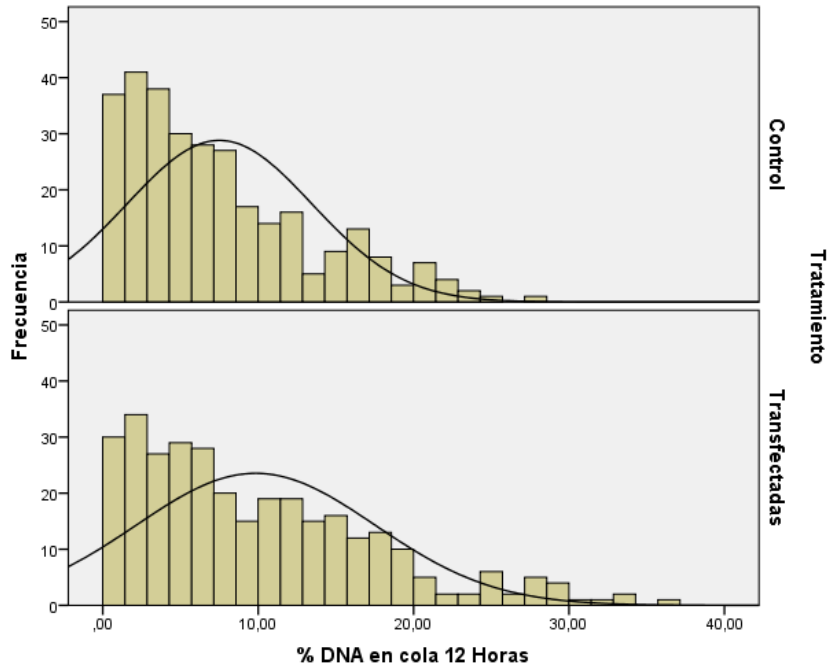


Figura 20. Estadísticos descriptivos para el % DNA en cola en 12 Horas.

Descriptivos				Estadístico	Error típ.		
Tratamiento							
% DNA en cola 12 Horas	Control	Media		7,5067	,34306		
		Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	6,8316			
			Límite superior	8,1818			
		Media recortada al 5%		7,0825			
		Mediana		6,0924			
		Varianza		35,424			
		Desv. típ.		5,95182			
		Mínimo		,01			
		Máximo		28,14			
		Rango		28,13			
		Amplitud intercuartil		8,20			
		Asimetría		,988	,140		
		Curtosis		,319	,280		
		Transfectedas	Transfectedas	Media		9,8366	,43157
				Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	8,9874	
					Límite superior	10,6857	
				Media recortada al 5%		9,2515	
Mediana				8,1074			
Varianza				59,229			
Desv. típ.				7,69603			
Mínimo				,01			
Máximo				36,97			
Rango				36,96			
Amplitud intercuartil				10,60			
Asimetría				,982	,137		
Curtosis				,551	,273		



Figura 21. Resumen del análisis estadístico no paramétrico para % DNA en cola a las 12 Horas.

**Resumen de prueba de hipótesis**

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	Las medianas de % DNA en cola 12 Horas son las mismas entre las categorías de Tratamiento.	Prueba de medianas de muestras independientes	,007	Rechazar la hipótesis nula.
2	La distribución de % DNA en cola 12 Horas es la misma entre las categorías de Tratamiento.	Prueba U de Mann-Whitney de muestras independientes	,000	Rechazar la hipótesis nula.
3	La distribución de % DNA en cola 12 Horas es la misma entre las categorías de Tratamiento.	Prueba Kolmogorov-Smirnov de muestras independientes	,002	Rechazar la hipótesis nula.
4	La distribución de % DNA en cola 12 Horas es la misma entre las categorías de Tratamiento.	Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes	,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

Figura 22. Gráfica de barras del % de DNA en cola promedio a las 24 Horas

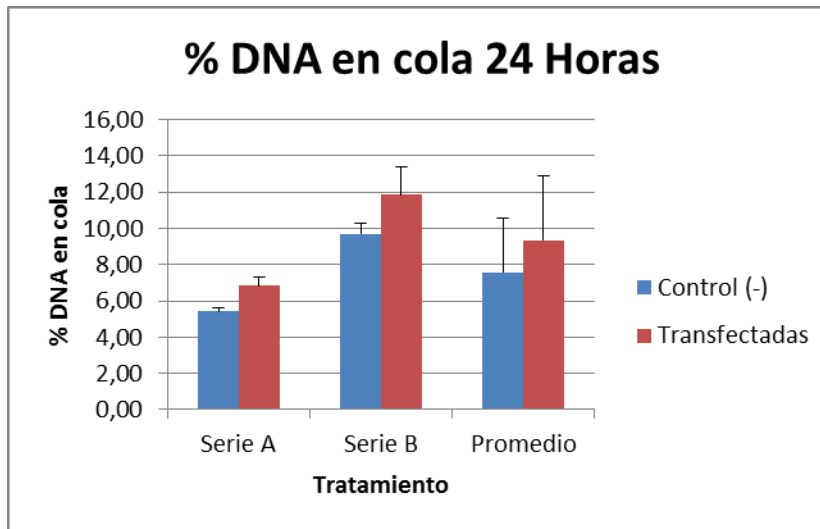


Figura 23. Diagrama de cajas (boxplot) para el % de DNA en cola a las 24 Horas.

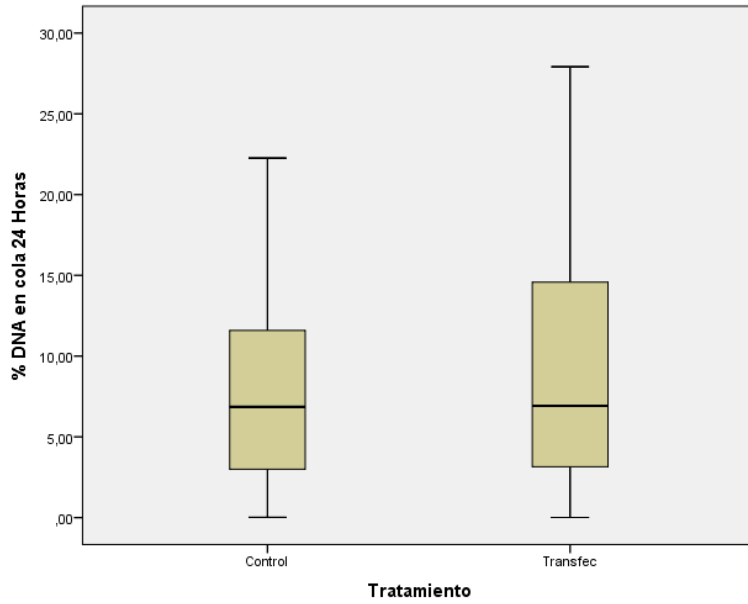


Figura 24. Histograma de frecuencia y trazado de la curva normal de referencia para los datos de % DNA en cola 24 Horas.

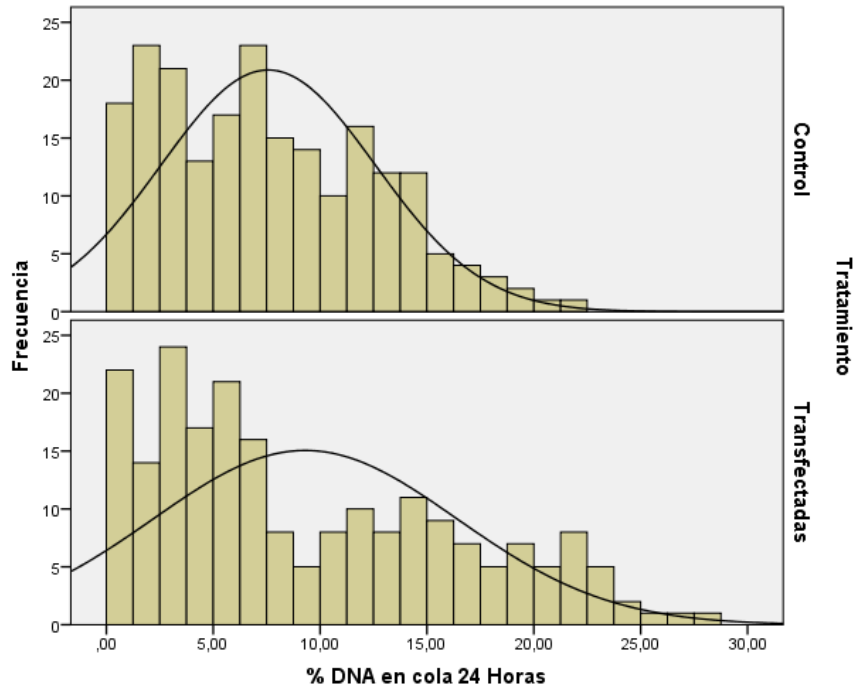


Figura 25. Estadísticos descriptivos para el % DNA en cola en 24 Horas.

Descriptivos					
Tratamiento			Estadístico	Error tip.	
% DNA en cola 24 Horas	Control	Media	7,5700	,34605	
		Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	6,8878	
			Límite superior	8,2521	
		Media recortada al 5%	7,3498		
		Mediana	6,8573		
		Varianza	25,147		
		Desv. tip.	5,01469		
		Mínimo	,02		
		Máximo	22,26		
		Rango	22,24		
		Amplitud intercuartil	8,62		
		Asimetría	,498	,168	
		Curtosis	-,540	,334	
	Transfectadas	Media	9,2991	,48557	
		Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	8,3420	
			Límite superior	10,2562	
		Media recortada al 5%	8,9746		
		Mediana	6,9193		
		Varianza	50,692		
		Desv. tip.	7,11983		
Mínimo		,00			
Máximo		27,92			
Rango		27,91			
Amplitud intercuartil		11,47			
Asimetría		,614	,166		
Curtosis		-,751	,330		

Figura 26. Resumen del análisis estadístico no paramétrico para % DNA en cola a las 24 Horas.

Resumen de prueba de hipótesis				
	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	Las medianas de % DNA en cola 24 Horas son las mismas entre las categorías de Tratamiento.	Prueba de medianas de muestras independientes	,961	Retener la hipótesis nula.
2	La distribución de % DNA en cola 24 Horas es la misma entre las categorías de Tratamiento.	Prueba U de Mann-Whitney de muestras independientes	,084	Retener la hipótesis nula.
3	La distribución de % DNA en cola 24 Horas es la misma entre las categorías de Tratamiento.	Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes	,084	Retener la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

Figura 27. Gráfica de barras del % de DNA en cola promedio a las 36 Horas.

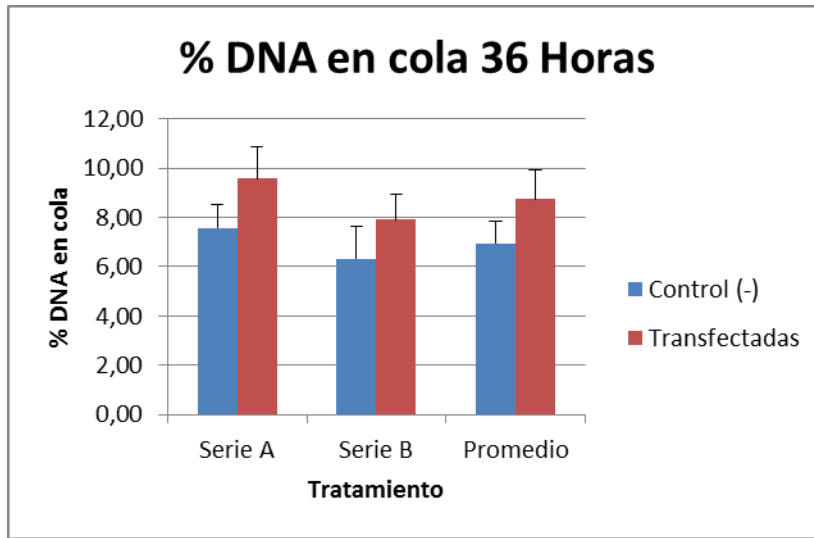


Figura 28. Diagrama de cajas (boxplot) para el % de DNA en cola a las 36 Horas.

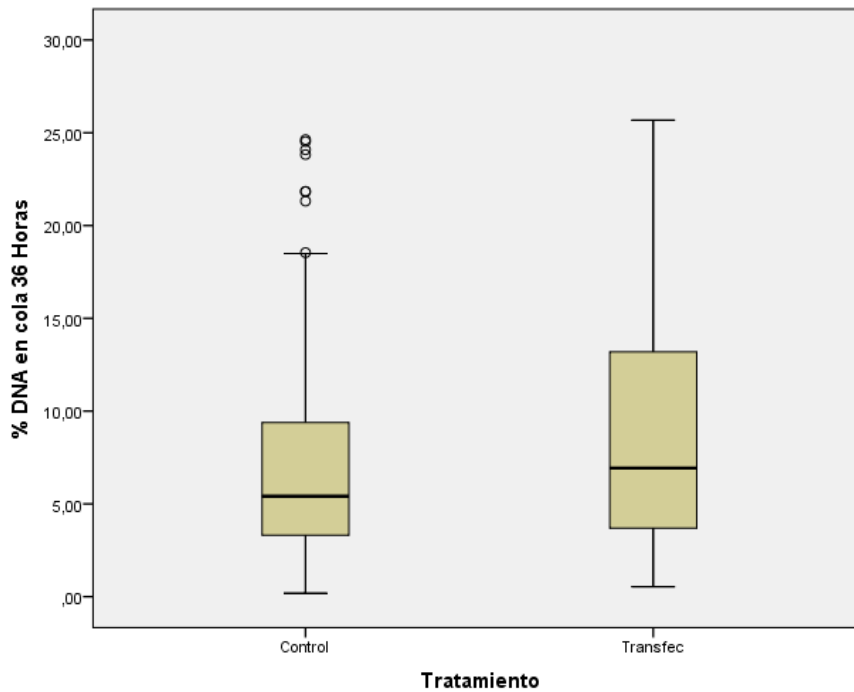


Figura 29. Histograma de frecuencia y trazado de la curva normal de referencia para los datos de % DNA en cola 36 Horas.

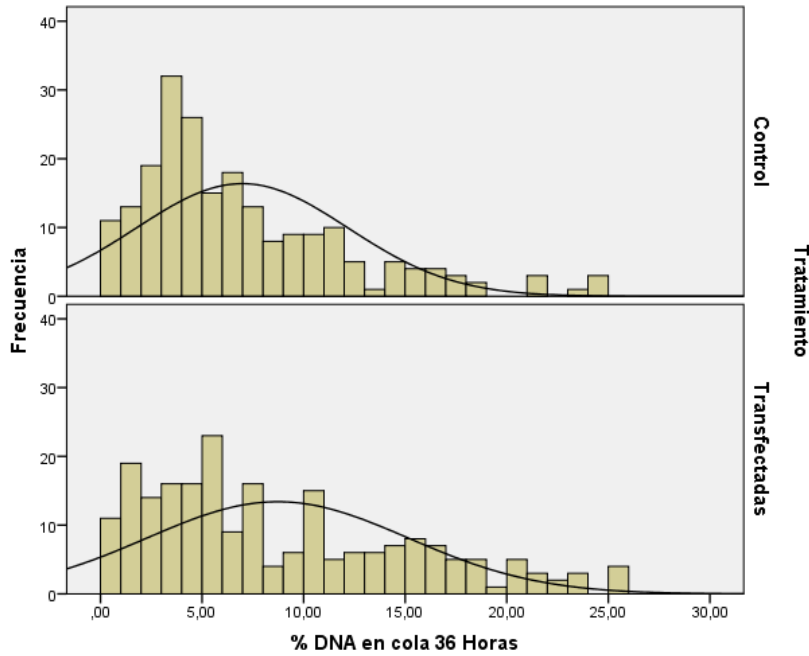


Figura 30. Estadísticos descriptivos para el % DNA en cola en 36 Horas.

Descriptivos			Estadístico	Error tip.		
Tratamiento						
% DNA en cola 36 Horas	Control	Media	6,9736	,35633		
		Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	6,2712		
			Límite superior	7,6759		
		Media recortada al 5%	6,5165			
		Mediana	5,4117			
		Varianza	27,172			
		Desv. típ.	5,21268			
		Mínimo	,18			
		Máximo	24,63			
		Rango	24,45			
		Amplitud intercuartil	6,09			
		Asimetría	1,321	,166		
		Curtosis	1,531	,331		
		Transfectadas	Transfectadas	Media	8,7170	,43750
				Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	7,8546
Límite superior	9,5793					
Media recortada al 5%	8,3256					
Mediana	6,9335					
Varianza	41,344					
Desv. típ.	6,42996					
Mínimo	,53					
Máximo	25,68					
Rango	25,15					
Amplitud intercuartil	9,52					
Asimetría	,794			,166		
Curtosis	-,274			,330		

Figura 31. Resumen del análisis estadístico no paramétrico para % DNA en cola a las 36 Horas.

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	Las medianas de % DNA en cola 36 Horas son las mismas entre las categorías de Tratamiento.	Prueba de medianas de muestras independientes	,101	Retener la hipótesis nula.
2	La distribución de % DNA en cola 36 Horas es la misma entre las categorías de Tratamiento.	Prueba U de Mann-Whitney de muestras independientes	,012	Rechazar la hipótesis nula.
3	La distribución de % DNA en cola 36 Horas es la misma entre las categorías de Tratamiento.	Prueba Kolmogorov-Smirnov de muestras independientes	,006	Rechazar la hipótesis nula.
4	La distribución de % DNA en cola 36 Horas es la misma entre las categorías de Tratamiento.	Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes	,012	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

Figura 32. % DNA en cola en función del tiempo pos-transfección. Resultados generales gráficos del ensayo DNA cometa.

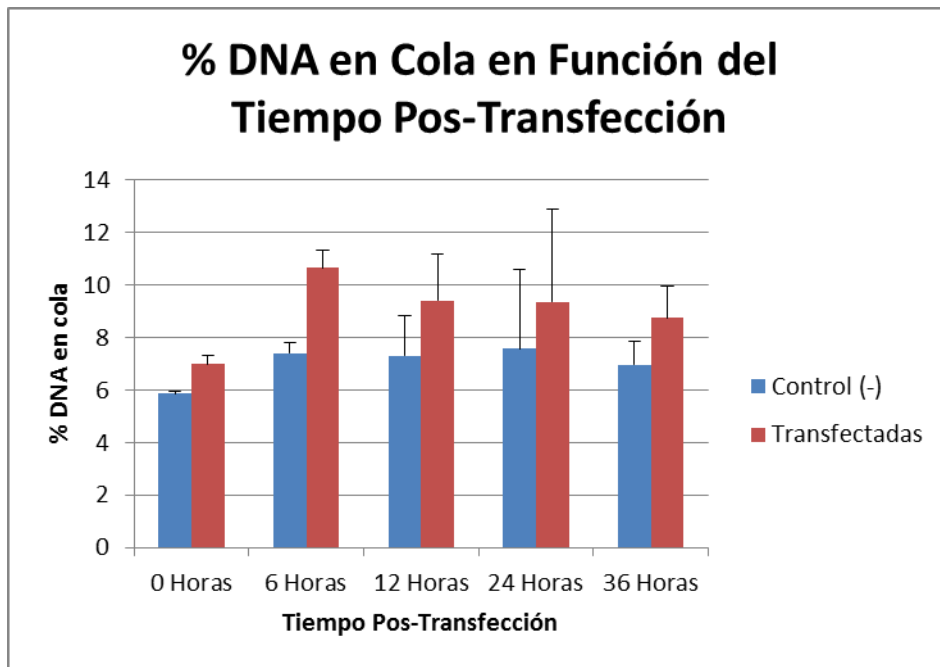


Figura 33: Imágenes representativas del ensayo DNA cometa. Se muestra en (A) células control y en (B) células transfectadas.

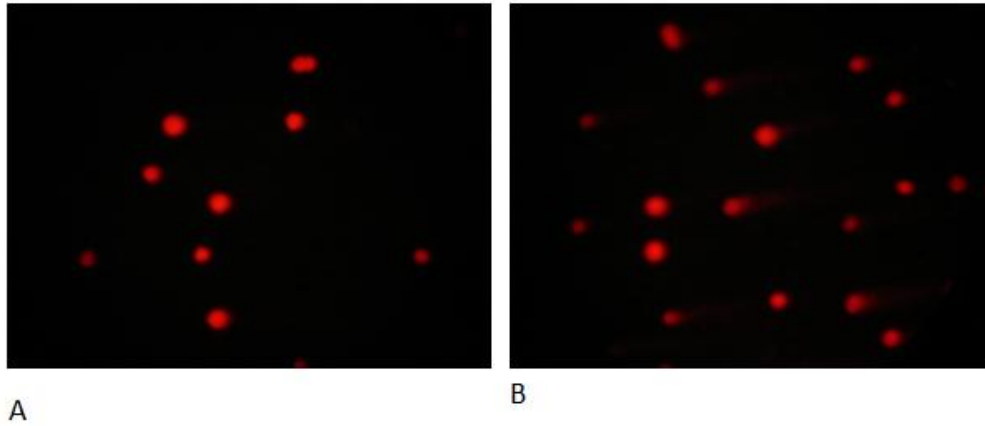


Figura 34: Numero de Alteraciones cromosómicas en el tiempo 0 Horas pos-transfección.

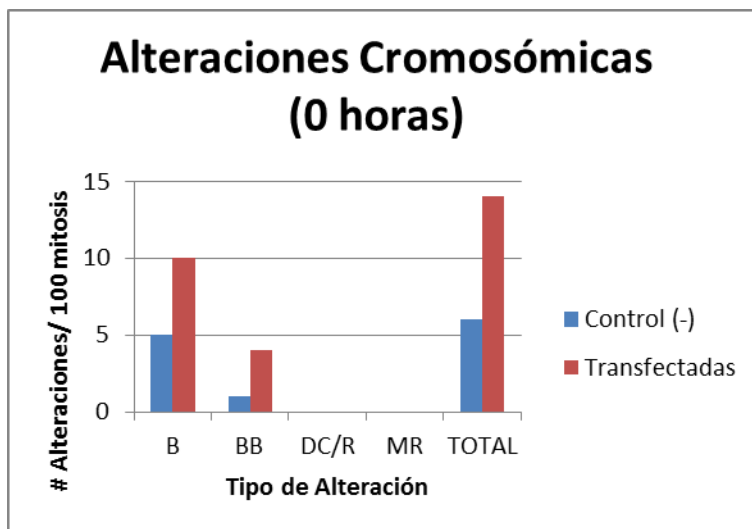


Figura 35. Numero de Alteraciones cromosómicas en el tiempo 6 Horas pos-transfección.

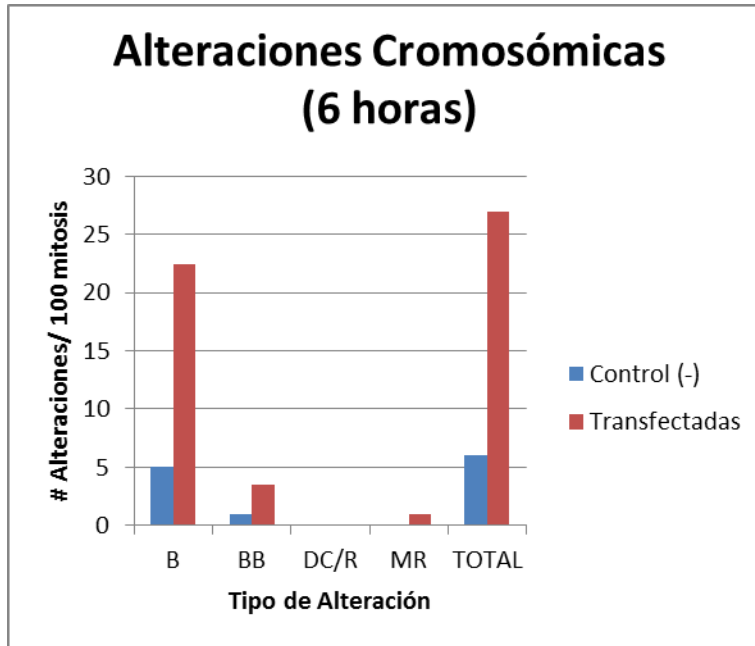


Figura 36. Extendido que presenta cromosomas multidañados en el tiempo 6 horas pos-transfección.

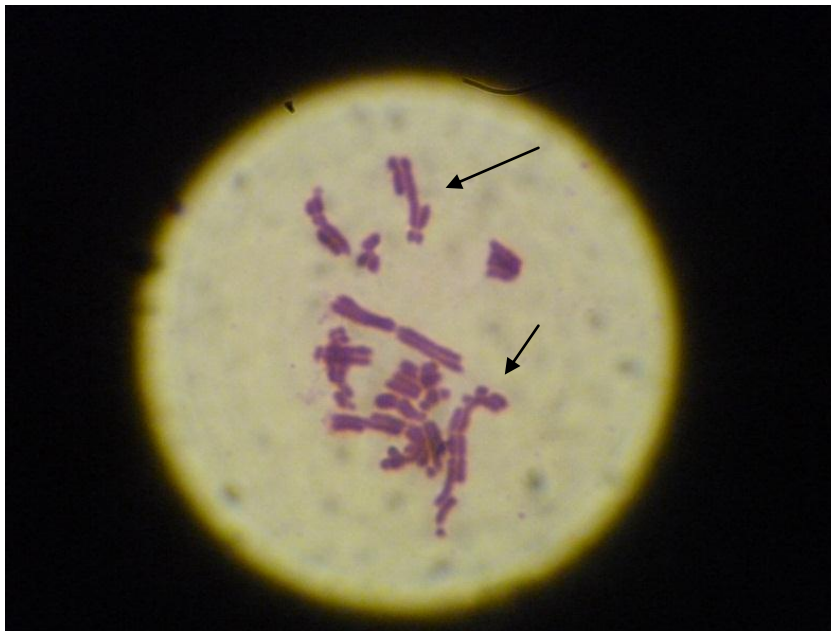




Figura 37. Numero de Alteraciones cromosómicas en el tiempo 12 Horas pos-transfección.

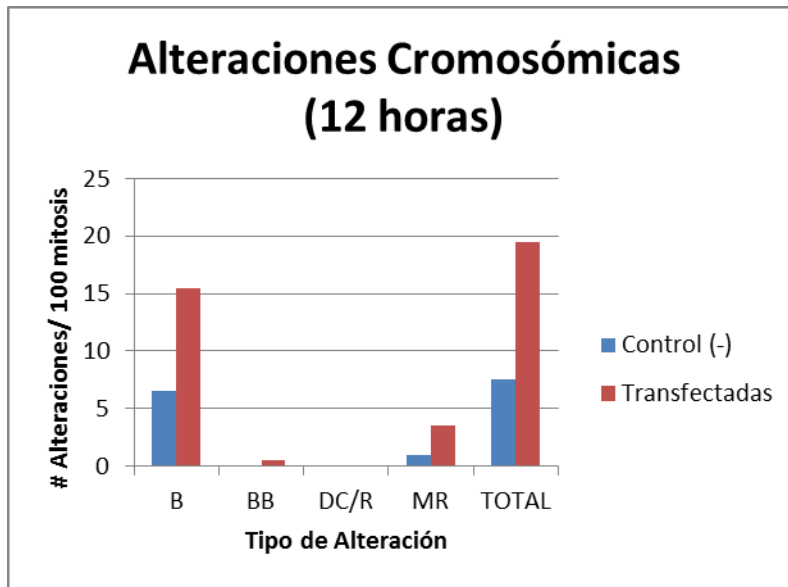


Figura 38. Vista en detalle de una figura multirradiada MR en el tiempo 12 horas pos-transfección.



Figura 39. Extendido que contiene cromosomas multidañados en el tiempo 12 horas pos-transfección.



Figura 40. Numero de Alteraciones cromosómicas en el tiempo 24 Horas pos-transfección.

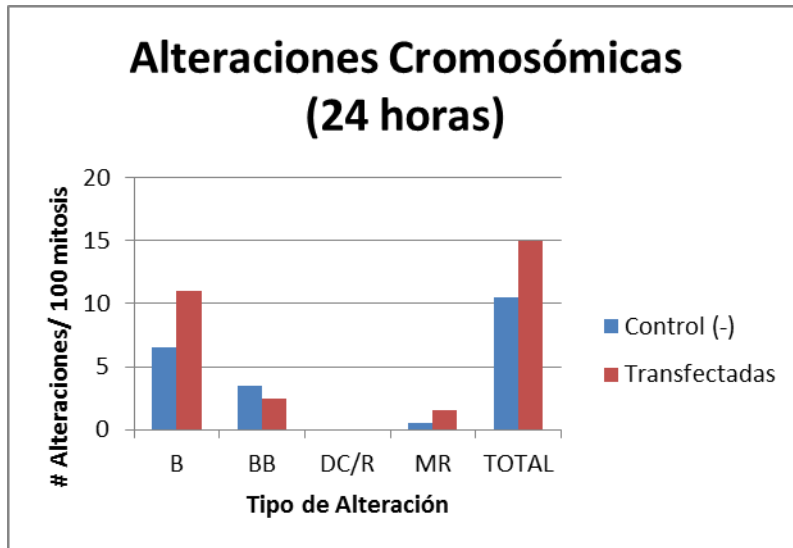


Figura 41. Numero de Alteraciones cromosómicas en el tiempo 36 Horas pos-transfección.

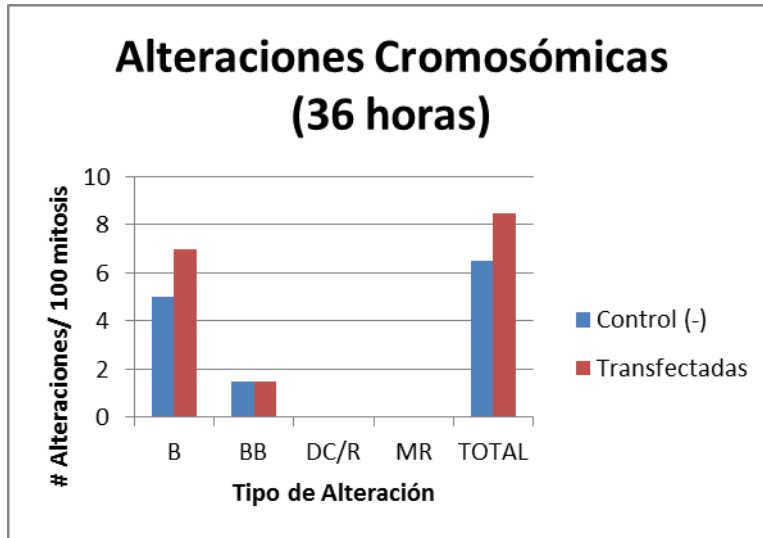


Figura 42. Número de Alteraciones Cromosómicas en Función del Tiempo Pos-Transfección.

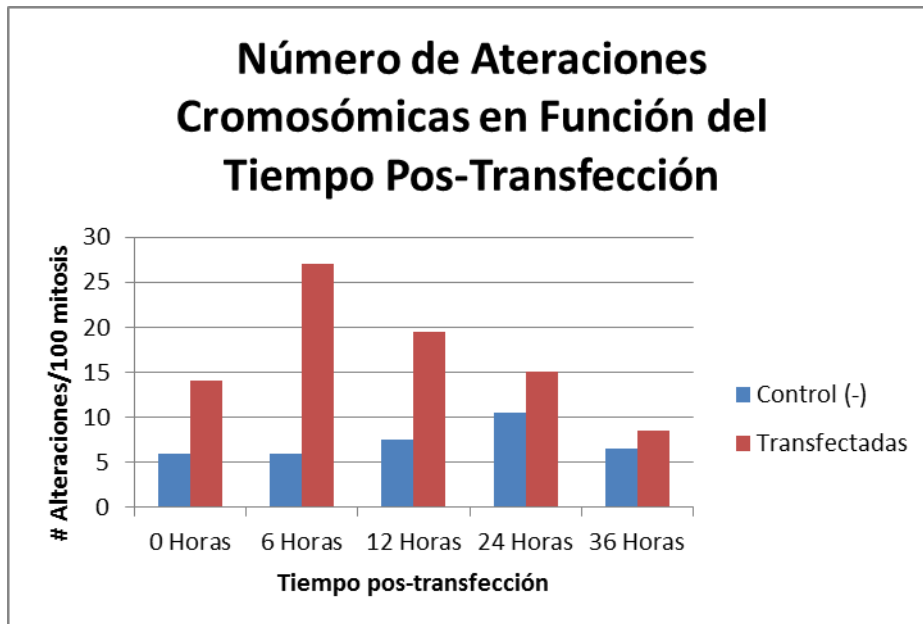


Figura 43. Extendido cromosómico de células CHO-K1. Con una flecha se ha señalado el cromosoma X y su sitio frágil en el brazo largo.



Figura 44. Cariotipo normal de células CHO-K1



Figura 45. Extendido con un quiebre cromatídico (B). Con una flecha se señala ese tipo de daño.

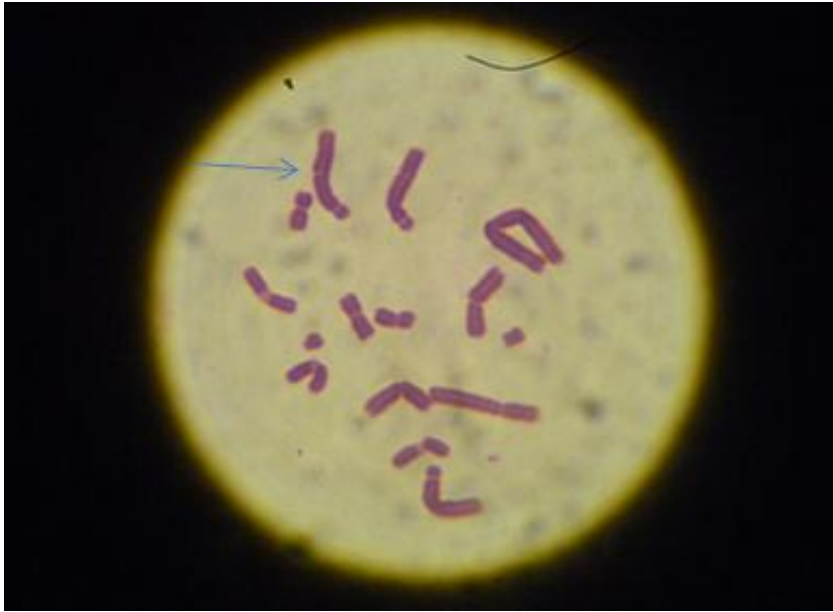


Figura 46. Vista en detalle de una figura multirradiada (MR).



Figura 47. Extendido con un quiebre cromosómico (BB). Con una flecha se señala ese tipo de daño.

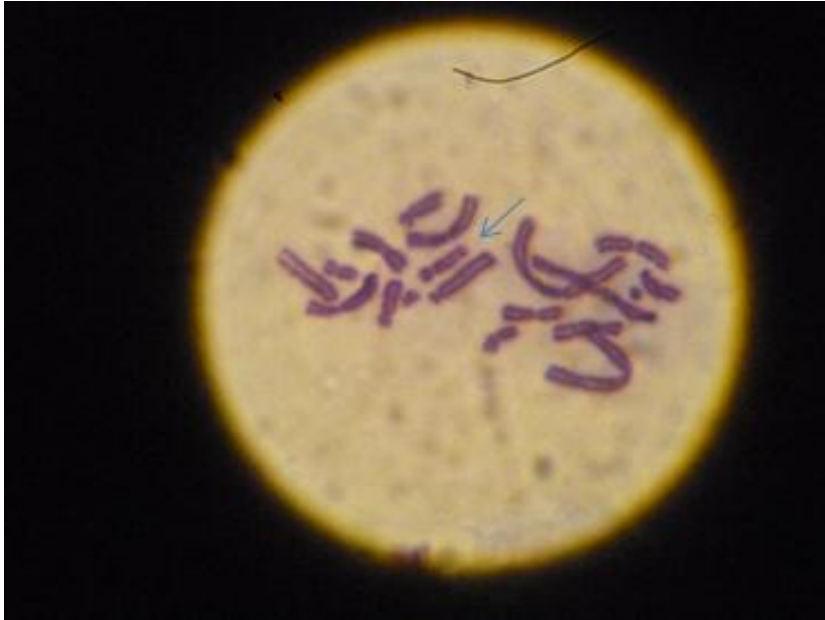
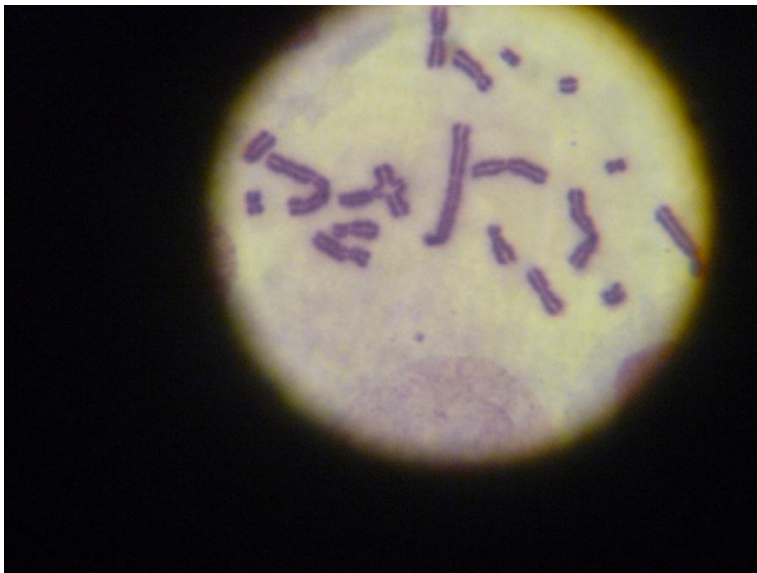


Figura 48. Extendido cromosómico con una figura multirradiada.



## A2. TABLAS.

Tabla 1. Ensayo DNA cometa a 0 Horas.

Ensayo DNA Cometa (0 Horas) Resultados Globales		
% DNA en Cola		
	Control (-)	Transfectadas
Serie A	5,90	7,22
Serie B	5,80	6,76
Promedio	5,85	6,99
Desviación Estándar	0,07	0,33
% relativo DNA en cola		19,49%

Tabla 2. Ensayo DNA cometa a 6 Horas.

Ensayo DNA Cometa (6 Horas) Resultados Globales		
% DNA en Cola		
	Control (-)	Transfectadas
Serie A	7,08	11,10
Serie B	7,69	10,17
Promedio	7,39	10,64
Desviación Estándar	0,43	0,66
% relativo DNA en cola		43,99%

Tabla 3. Ensayo DNA cometa a 12 Horas.

Ensayo DNA Cometa (12 Horas) Resultados Globales		
% DNA en Cola		
	Control (-)	Transfectadas
Serie A	6,24	8,14
Serie B	8,37	10,67
Promedio	7,30	9,40
Desviación Estándar	1,50	1,78
% relativo DNA en cola		28,76%

Tabla 4. Ensayo DNA cometa a 24 Horas.

Ensayo DNA Cometa (24 Horas) Resultados Globales		
% DNA en Cola		
	Control (-)	Transfectadas
Serie A	5,43	6,85
Serie B	9,70	11,85
Promedio	7,56	9,35
Desviación Estándar	3,02	3,53
% relativo DNA en cola		23,65%



Tabla 5. Ensayo DNA cometa a 36 Horas.

Ensayo DNA Cometa (36 Horas) Resultados Globales		
% DNA en Cola		
	Control (-)	Transfectadas
Serie A	7,58	9,58
Serie B	6,33	7,92
Promedio	6,96	8,75
Desviación Estándar	0,88	1,18
% relativo DNA en cola		25,83%

Tabla 6. Número de Alteraciones cromosómicas a 0 Horas.

# ALTERACIONES CROMOSÓMICAS/100 mitosis (0 Horas)							
		B	BB	DC/R	MR	TOTAL	% Incremento
Control (-)	Serie A	6	0	0	0	6	133,33
	Serie B	4	2	0	0	6	
	Promedio	5	1	0	0	6	
Transfectadas	Serie A	11	3	0	0	14	
	Serie B	9	5	0	0	14	
	Promedio	10	4	0	0	14	

Tabla 7. Número de Alteraciones cromosómicas a 6 Horas.

ALTERACIONES CROMOSÓMICAS (6 Horas)							
		B	BB	DC/R	MR	TOTAL	% Incremento
Control (-)	Serie A	6	1	0	0	7	350
	Serie B	4	1	0	0	5	
	Promedio	5	1	0	0	6	
Transfectadas	Serie A	20	3	0	1	24	
	Serie B	25	4	0	1	30	
	Promedio	22,5	3,5	0	1	27	

Tabla 8. Número de Alteraciones cromosómicas a 12 Horas.

ALTERACIONES CROMOSÓMICAS (12 Horas)							
		B	BB	DC/R	MR	TOTAL	% Incremento
Control (-)	Serie A	4	0	0	1	5	160
	Serie B	9	0	0	1	10	
	Promedio	6,5	0	0	1	7,5	
Transfectadas	Serie A	14	1	0	4	19	
	Serie B	17	0	0	3	20	
	Promedio	15,5	0,5	0	3,5	19,5	

Tabla 9. Número de Alteraciones cromosómicas a 24 Horas.

ALTERACIONES CROMOSÓMICAS (24 Horas)							
		B	BB	DC/R	MR	TOTAL	% Incremento
Control (-)	Serie A	6	2	0	1	9	42,86
	Serie B	7	5	0	0	12	
	Promedio	6,5	3,5	0	0,5	10,5	
Transfectadas	Serie A	8	1	0	1	10	
	Serie B	14	4	0	2	20	
	Promedio	11	2,5	0	1,5	15	

Tabla 10. Número de Alteraciones cromosómicas a 36 Horas.

ALTERACIONES CROMOSÓMICAS (36 Horas)							
		B	BB	DC/R	MR	TOTAL	% Incremento
Control (-)	Serie A	6	0	0	0	6	30,77
	Serie B	4	3	0	0	7	
	Promedio	5	1,5	0	0	6,5	
Transfectadas	Serie A	7	2	0	0	9	
	Serie B	7	1	0	0	8	
	Promedio	7	1,5	0	0	8,5	

Tabla 11. Porcentaje de células con Alteraciones cromosómicas.

% de Células con Daño			
		Control	Transfectadas
0 Horas	Serie A	6	10
	Serie B	5	7
	Promedio	5,5	8,5
6 Horas	Serie A	5	10
	Serie B	4	13
	Promedio	4,5	11,5
12 Horas	Serie A	4	9
	Serie B	6	7
	Promedio	5	8
24 Horas	Serie A	8	8
	Serie B	9	13
	Promedio	8,5	10,5
36 Horas	Serie A	6	7
	Serie B	6	8
	Promedio	6	7,5

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. **Narbón Fernández P.** 2008. *Transferencia Génica en Animales*. Trabajo Final de Tesis. UNED.
2. **Smith JG, Walzem RL, German JB.** 1993. *Liposomes as agents of DNA transfer*. *Biochim Biophys Acta*. 1154: 327–340.
3. **Felgner PL, Gadek TR.** 1987. *Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 84(21):7413-7417.
4. **Medina-Kauwe LK, Xie J, Hamm-Alvarez S.** 2005. *Intracellular trafficking of nonviral vectors*. *Gene Ther*. 12:1734–51.
5. **Li W, Nicol F, Szoka FC Jr.** 2004. *GALA: a designed synthetic pH-responsive amphipathic peptide with applications in drug and gene delivery*. *Adv Drug Deliv Rev*. 23:967–85.
6. **Xu Y, Szoka FC Jr.** 1996. *Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection*. *Biochemistry*. 35:5616–5623.
7. **Akinc A, Thomas M, Klibanov AM, Langer R.** 2005. *Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis*. *J Gene Med*. 7:657–663.
8. **Lukacs GL, Haggie P, Seksek O, Lechardeur D, Freedman N, Verkman AS.** 2000. *Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus*. *J Biol Chem*. 275: 1625–1629.
9. **Dean DA, Strong DD, Zimmer WE.** 2005. *Nuclear entry of nonviral vectors*. *Gene Ther*. 12:881–890.
10. **Chen HH, Ho YP, Jiang X, Mao HQ, Wang TH, Leong KW.** 2008. *Quantitative comparison of intracellular unpacking kinetics of polyplexes by a model constructed from quantum dot-FRET*. *Mol Ther*. 16:324–332.
11. **Masotti A, Mossa G, Cametti C.** 2009. *Comparison of different commercially available cationic liposome-DNA lipoplexes: parameters influencing toxicity and transfection efficiency*. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*. 68(2)136-144.

12. **Patil SD, Burgess DJ.** 2004. *Anionic Liposomal Delivery System For DNA Transfection.* AAPS Journal. 6 (4): 1-10.
13. **Brown MD, Schatzlein AG, Uchegbu IF.** 2001. *Gene delivery with synthetic (non viral) carriers.* Int J Pharm. 229: 1—21.
14. **Alton Eric.** 2007. *Progress and Prospects: Gene Therapy Clinical Trials.* Gene Therapy. 14: 1439-1447.
15. **Filion MC, Phillips NC.** 1997. *Toxicity and immunomodulatory activity of liposomal vectors formulated with cationic lipids toward immune effector cells.* Biochim Biophys Acta. 1329: 345—356.
16. **Aramaki Y, Takano S, Tsuchiya S.** 1999. *Induction of apoptosis in macrophages by cationic liposomes.* FEBS Lett.460: 472—476.
17. **Nguyen LT, Atobe K, Barichello JM, Ishida T, Kiwada H.** 2007. *Complex formation with plasmid DNA increases the cytotoxicity of cationic liposomes.* Biol Pharm Bull. 30:751—7.
18. **Fiszer-Kierzkowska.** 2011. *Liposome-based DNA carriers may induce cellular stress response and change gene expression pattern in transfected cells.* BMC Molecular Biology. 12:27
19. **Lappalainen K, Urtti A, Soderling E, Jaaskelainen I, Syrjanen K, Syrjanen S.** 1994. *Cationic liposomes improve stability and intracellular delivery of antisense oligonucleotides into CaSki cells.* Biochim Biophys Acta.1196: 201—208.
20. **Lappalainen K, Urtti A, Soderling E, Jaaskelainen I, Syrjanen K, Syrjanen S.** 1994. *Comparison of cell proliferation and toxicity assays using two cationic liposomes.* Pharm Res. 11(8):1127-1131.
21. **Friend DS, Papahadjopoulos D, Debs RJ.** 1996. *Endocytosis and intracellular processing accompanying transfection mediated by cationic liposomes.* Biochim Biophys Acta.1278: 41—45.
22. **Schivone N, Papucci L.** 2000. *Induction of Apoptosis and Mitosis Inhibition by Degraded DNA Lipotransfection Mimicking Genotoxic Drug Effects.* Biochemical and biophysical research communications. 270(2): 406-414.

23. **Thermo Scientific.** *Product Information TurboFect Transfection Reagent.* [Citado el 05 de abril de 2013], disponible en internet en <http://www.thermoscientificbio.com/uploadedFiles/Resources/r0530-product-information.pdf>
24. **Camargo M, Duque-Correa M, Berrío A.** 2006. *A micro-spreading improvement for spermatogenic chromosomes from Triatominae (Hemiptera-Reduviidae).* Mem Inst Oswaldo Cruz. 101 (3): 339-340.
25. **R. J. A. Trent, I. E. Alexander.** 2004. CLINICAL PERSPECTIVES. Gene therapy: applications and progress towards the clinic. *Internal Medicine Journal.* 34: 621–625.
26. **W.S. Klug, M.R. Cummings, C.A. Spencer.** 2006. *Conceptos de Genética.* Octava Edición. Prentice Hall (Pearson Educación S.A). Madrid. ISBN 10: 84-205- 5014- 0.
27. **Mohammed S. Al-Dosari, Xiang Gao.** 2009. *Non Viral Gene Delivery: Principles, Limitations, and Recent Progress.* AAPS journal. 11 (4): 671- 681.
28. **Zhi-Ying Chen, Stephen R. Yant, Cheng-Yi He.** 2001. Linear DNAs concatemerize *in Vivo* and Result in Sustained Transgene Expression in Mouse Liver. *Molecular Therapy.* 3 (3): 403- 410.
29. **Ian E. Alexander, David W. Russell, A. Dusty Miller.** 1994. *DNA-Damaging agents Greatly Increase the Transduction of Nondividing Cells by Adeno-Associated Virus Vectors.* Journal of Virology. 68 (12): 8282-8287.
30. **Rachel A. Schwartz, Christian T. Carson, Christine Schuberth, Matthew D. Weitzman.** 2009. *Adeno-Associated Virus Replication Induces a DNA Damage Response Coordinated by DNA-Dependent Protein Kinase.* Journal of Virology. 83 (12): 6269- 6278.
31. **Kim R. Folger, Eric A. Wong,1 Geoffrey Wahl, Mario R. Capecchil.** 1982. *Patterns of Integration of DNA Microinjected into Cultured Mammalian Cells: Evidence for Homologous Recombination Between Injected Plasmid DNA Molecules.* Molecular and Cellular Biology. 2 (11): 1372- 1387.

32. **Paul F. Wilson, John M. Hinz, Salustra S. Urbin, Peter B. Nham, Larry H. Thompson.** 2010. *Influence of homologous recombinational repair on cell survival and chromosomal aberration induction during the cell cycle in  $\gamma$ -irradiated CHO cells.* DNA Repair. 9: 737-744.
33. **Paola Fortini, Eugenia Dogliotti.** 2007. *Base damage and single-strand break repair: Mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways.* DNA Repair. 6: 398-409