

PROYECTO FINAL DE INGENIERIA

EFECTO DE LA RADIOFRECUENCIA EN LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR EN CULTIVOS CELULARES

Tuvio, Micaela – LU: 1029416

Zola, Guillermina – LU: 1030849

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

Prada, Federico. Fundación UADE

Co-tutor:

Tropeano, Francisco. Fundación UADE

Mayo 27, 2017



**FUNDACION UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERIA Y CIENCIAS EXACTAS**

CONTENIDOS

Contenidos	2
AGRADECIMIENTOS	4
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. Electromedicina	7
1.1.1. Magnetoterapia	7
1.1.2. Radiofrecuencia	8
1.1.3. La piel, principal blanco de la radiofrecuencia en estética	13
1.2. La célula y su entorno: la matriz extracelular	14
1.3. Proteínas de la matriz: colágeno y proteínas matricelulares	16
1.4. Antecedentes	22
1.4.1. Efecto de la radiofrecuencia en la remodelación de la piel	22
1.4.2. Participación de SPARC y colágeno en la remodelación de la matriz extracelular	27
1.5. Modelo biológico usado: los cultivos celulares	31
2. HIPOTESIS	35
3. OBJETIVOS	36
4. MATERIALES Y MÉTODOS	38
4.1. Lugar de trabajo	38
4.1.1. Laboratorio de electrónica y telecomunicaciones	38
4.1.2. Sala de cultivo celular	39
4.1.3. Laboratorio de biotecnología y microbiología	40
4.1.4. Sala de revelado	41
4.2. Líneas celulares usadas	41
4.3. Mantenimiento de la línea celular	42
4.3.1. Generación de stock celular	42
4.3.2. Materiales requeridos para el mantenimiento de la línea celular	43
4.3.3. Protocolo para preparación del medio de cultivo	44
4.3.4. Protocolo de descongelado	45
4.3.5. Protocolo de repique de monocapa	46
4.3.6. Protocolo de cambio de medio	47
4.3.7. Protocolo de congelamiento de las líneas	47
4.3.8. Protocolo de recuento de células	48
4.3.9. Protocolo para determinación de contaminación por micoplasma	49
4.4. Tratamientos con equipo de radiofrecuencia	50
4.4.1. Tratamientos elegidos y modo de aplicación a las placas de cultivo celular	50
4.4.2. Caracterización de los tratamientos de radiofrecuencia elegidos	52
4.5. Condiciones de obtención del extracto proteico	54
4.5.1. Materiales requeridos para la obtención del extracto proteico	55
4.5.2. Protocolo de aplicación del tratamiento con radiofrecuencia	56

4.5.3.	Protocolo de precipitación de proteínas con acetona y preparación del extracto proteico para corrida por SDS-PAGE	57
4.5.4.	Protocolo de uso de Centricones y preparación del extracto proteico para corrida por SDS-PAGE	57
4.5.5.	Protocolo de lisis celular y preparación del extracto proteico para corrida por SDS-PAGE	59
4.6.	SDS-PAGE y Western Blot	60
4.6.1.	Materiales requeridos para la electroforesis por SDS-PAGE y para la realización del Western Blot	62
4.6.2.	Protocolo de electroforesis por SDS-PAGE	64
4.6.3.	Protocolo de Inmublotting	65
4.6.4.	Protocolo de tinción de geles con Azul Coomassie	68
4.6.5.	Protocolo de tinción de membranas con Rojo Ponceau	68
4.6.6.	Protocolo de stripping de membranas	69
4.7.	Obtención y análisis de datos	69
4.7.1.	Programas informáticos utilizados para la obtención y análisis de datos	69
4.7.2.	Protocolo para obtención de datos numéricos por Image J	69
4.7.3.	Análisis estadístico: Infostat	71
4.7.4.	Protocolo de análisis de datos mediante Infostat	72
5.	RESULTADOS	73
5.1.	Puesta a punto del modelo celular y técnicas para analizar la expresión de proteínas de la MEC	73
5.2.	Preparación del stock celular necesario para el diseño propuesto	81
5.3.	Puesta a punto de la aplicación de los tratamientos de radiofrecuencia	83
5.4.	Ensayo de expresión de proteínas de la MEC	89
5.4.1.	Diseño experimental y preparación de muestras	89
5.4.2.	Cuantificación de proteínas de la MEC	90
5.5.	Análisis estadístico de datos del ensayo de expresión de proteínas de la MEC	92
6.	DISCUSIÓN	98
6.1.	Puesta a punto del ensayo de expresión de proteínas de la MEC	98
6.2.	Efecto biológico de la Radiofrecuencia	101
6.3.	Proyecciones experimentales de este trabajo	106
7.	CONCLUSIONES	107
8.	BIBLIOGRAFÍA	108
9.	ANEXOS	114
9.1.	ANEXO I: Diagramas de protocolos usados	114
9.2.	ANEXO II: Técnica aséptica	117
9.3.	ANEXO III: Comprobación de supuestos para análisis estadístico	120

AGRADECIMIENTOS

Quisiéramos agradecer a todos aquellos que formaron parte del proyecto:

A nuestras familias, por el acompañamiento permanente y la motivación brindada durante el desarrollo de toda nuestra carrera;

A los técnicos de laboratorio, Lic. José Ignacio Fernández e Ignacio Pascual, por habernos aconsejado en el día a día en el trabajo en los laboratorios;

A la Fundación Instituto Leloir por el suministro de líneas celulares usadas y habernos permitido usar sus instalaciones y, en especial, al Dr. Leandro Güttlein por su tiempo y ayuda siempre que se le consultó;

Al Lic. Julián Cardozo y a la Dra. Milagros Camara, por su predisposición y constante apoyo;

A nuestro co-tutor Francisco Tropeano, por apoyar esta iniciativa de investigación;

Por último, quisiéramos agradecer especialmente a nuestro tutor y docente, Dr. Federico Prada, por haber respaldado el proyecto desde un comienzo y habernos guiado a lo largo de su desarrollo.

RESUMEN

El colágeno es el mayor componente de la piel y uno de los mayores componentes estructurales de la matriz extracelular. Esta matriz también está compuesta por otras moléculas no estructurales que modulan la actividad del resto de los compuestos. Dentro de este grupo no estructural, se encuentra la proteína matricelular SPARC (del inglés, *secreted protein acidic and rich in cysteine*) la cual se ha asociado a procesos patológicos como el cáncer y procesos fisiológicos normales como el desarrollo o la cicatrización de heridas.

En la actualidad, existen numerosos tratamientos estéticos que involucran el uso de radiofrecuencias. Según estudios realizados en los últimos años, estos tratamientos producen efectos en la piel atribuibles a la remodelación de la matriz extracelular. Se ha observado que provoca una inmediata restructuración del colágeno y una respuesta inflamatoria similar a la desarrollada en el cierre de las heridas.

En función de estos antecedentes y de las herramientas disponibles en nuestro lugar de trabajo, se planteó como objetivo de esta tesis estudiar los efectos *in vitro* de la radiofrecuencia en la producción de proteínas de la MEC. Cabe destacar que hasta el momento no se han encontrado estudios que evalúen los efectos de equipos estéticos de RF en modelos celulares *in vitro*.

La línea celular HaCaT (queratinocitos humanos) fue la seleccionada para este trabajo. Monocapas subconfluentes de dichas células fueron sometidas a 3 tratamientos de radiofrecuencia de distinta intensidad (mínima, media y máxima). Posteriormente, se analizaron por Western Blot los niveles de SPARC producidos en su medio condicionado.

Al analizar los datos obtenidos con los distintos tratamientos de radiofrecuencia seleccionados no encontramos diferencias significativas en relación a la expresión de SPARC. Dadas las condiciones seleccionadas para nuestro diseño experimental, no es posible aseverar que los tratamientos con radiofrecuencia afecten los niveles de expresión de SPARC en modelos *in vitro* de laboratorio.

En este trabajo se logró poner a punto el crecimiento de la línea celular HaCaT, que se utilizó como modelo biológico para estudiar los efectos biológicos de la radiofrecuencia, y la optimización del método de concentración de proteínas mediante precipitación con acetona y de un método de análisis semicuantitativo de los niveles de expresión de la proteína SPARC.

ABSTRACT

Collagen is the main component of the skin and one of the principal components of the extracellular matrix. This matrix also includes non-structural components that modulate the activity of its other components. The matricellular proteins, such as SPARC (Secreted protein acidic and rich in cysteine), are found within this last group. SPARC has been extensively studied in relation to pathological processes such as cancer, as well as, in normal physiological processes as development or wound healing.

Currently, there are several esthetic treatments that involve the use of radiofrequencies. According to previous studies, these treatments produce certain effects in the skin related to the remodeling of the extracellular matrix. It has been observed that it generates an immediate restructuring of collagen and an inflammatory response like the one found in a wound healing.

Taking into consideration this background information and the equipment and materials available in our workplace, this project aims to study the *in vitro* effects of radiofrequency in the production of proteins of the extracellular matrix. It is important to mention that there are currently no studies that evaluate the effects of esthetic devices of RF in cellular models *in vitro*.

The HaCaT cell line (human keratinocytes) was chosen as the biological model for this project. During this work, subconfluent monolayers of these cells were subjected to 3 radiofrequency treatments of different intensity (minimum, medium and maximum). Later the expression levels of SPARC were analyzed in its conditioned medium by Western Blot.

After analyzing the data obtained from the different radiofrequency treatments, no significant differences were found on SPARC expression levels. Under the tested conditions, it is not possible to affirm that treatments with radiofrequency affect the expression levels of SPARC on *in vitro* laboratory models.

During this study, it was possible to optimize the cell growth of the cellular line HaCaT, used as a biological model for the study of the biological effects of radiofrequency, and to adjust the method for protein concentration based on acetone precipitation and the semi-quantitative analysis method for the expression levels of the protein SPARC.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Electromedicina

La electromedicina es una rama de la ingeniería biomédica que busca aplicar principios eléctricos, mecánicos, químicos y ópticos para entender, modificar o controlar sistemas biológicos. También, busca involucrar el diseño y manufactura de productos que puedan monitorear funciones fisiológicas y asistir en el diagnóstico e, incluso, para tratar pacientes. Generalmente, cuando la ingeniería biomédica trabaja con hospitales o clínicas es llamada **ingeniería clínica o electromedicina** (Bronzino, 2006).

El campo de la ingeniería biomédica es cada vez más amplio (Bronzino, 2006). Ha evolucionado desde el desarrollo de instrumentos principalmente médicos en los años 50s y 60s hacia una gama mucho más extensa de actividades, entre las que se destacan las siguientes:

- Aplicación de sistemas de ingeniería en el modelamiento fisiológico para analizar problemas biológicos;
- Detección, medición y monitoreo de señales fisiológicas (biosensores e instrumentos biomédicos);
- Interpretación de diagnósticos mediante técnicas de procesamiento de señales de data bioeléctrica;
- Dispositivos de procedimientos terapéuticos y de rehabilitación (ingeniería de rehabilitación);
- Dispositivos de reemplazo y aumento de funciones corporales (órganos artificiales);
- Análisis computacionales de data relacionada a los pacientes con el objetivo de ayudar a la hora de llevar a cabo decisiones clínicas (informática médica e inteligencia artificial);
- Generación de imágenes médicas (imágenes con detalles anatómicos o funciones fisiológicas);
- Creación de nuevos productos biológicos (biotecnología, ingeniería de tejidos);
- Desarrollo de nuevos materiales para ser utilizados en el cuerpo (biomateriales).

1.1.1. Magnetoterapia

Dentro de la electromedicina, se encuentra la **magnetoterapia**. La misma se basa en la creación de dispositivos que utilizan radiaciones electromagnéticas de distinta longitud de onda para generar diversos efectos en el cuerpo humano. El uso de los campos electromagnéticos para resolver problemas de salud proviene de muchos años atrás, aunque es muy difícil determinar el momento exacto donde comenzaron a utilizarse. Una de las primeras referencias a este tipo de tratamiento es de William Gilbert en el año 1600 quien utilizaba la piedra magnetita para tratar una variedad de problemas médicos de ciudadanos ingleses, inclusive de la Reina de Inglaterra (Markov, 2009).

La magnetoterapia contemporánea se inicia en Japón luego de la segunda guerra mundial introduciendo campos magnéticos y electromagnéticos en la práctica clínica. Esta metodología, se expandió luego por Europa y entre los años 1960-1985 casi todos los países europeos diseñaban y manufacturaban sus propios sistemas de magnetoterapia de varias frecuencias. Existe como evidencia, el libro escrito por Torodov en 1982, que resume la experiencia de utilizar campos magnéticos para el tratamiento de 2.700 pacientes con 33 patologías diferentes (Markov, 2009).

Durante los años 70s, uno de los equipos liderados por el investigador Basset C.A. introdujo un nuevo tratamiento para fracturas, utilizando una señal muy específica de baja frecuencia bifásica. Una década más tarde, el uso de campos de radiofrecuencia pulsada para tratamientos de dolor y en tejido suave fue aprobado por la FDA (del inglés *Food and Drug Administration*) (Markov, 2009).

Hoy en día esta tecnología no solo se encuentra aceptada, sino que también, se ha visto que el uso de pequeños campos electromagnéticos es capaz de iniciar procesos de curación en enfermedades, como la esclerosis múltiple y la enfermedad de Parkinson, y también, mejorar la reparación de fracturas (Markov, 2009). Además, el uso de estas radiaciones electromagnéticas presenta importantes ventajas frente a métodos más invasivos como son las cirugías, entre las que se destacan: ser un método más seguro y fácil de aplicar en la zona deseada ya sea, por ejemplo, para tratar directamente un sitio herido o una fuente de dolor y/o inflamación, como también una gran variedad de enfermedades y patologías (Lolis y Goldberg, 2012). Dentro de la magnetoterapia, uno de los tratamientos con mayor auge actualmente es el basado en el uso de las ondas de radio o radiofrecuencia.

1.1.2. Radiofrecuencia

El término **radiofrecuencia** (RF) refiere a la radiación electromagnética en una frecuencia de onda entre 3Hz y 300 GHz (**Figura 1**) (Elsaie, 2009). La radiación electromagnética es energía que puede considerarse como campos electromagnéticos que se propagan mediante ondas, transportando cantidades discretas (cuantos o corpúsculos) de energía (Miralles, 1991). Las ondas electromagnéticas son capaces de viajar a través del vacío y existen un amplio rango de las mismas que se diferencian por su frecuencia (Aristegui *et al*, 1999).

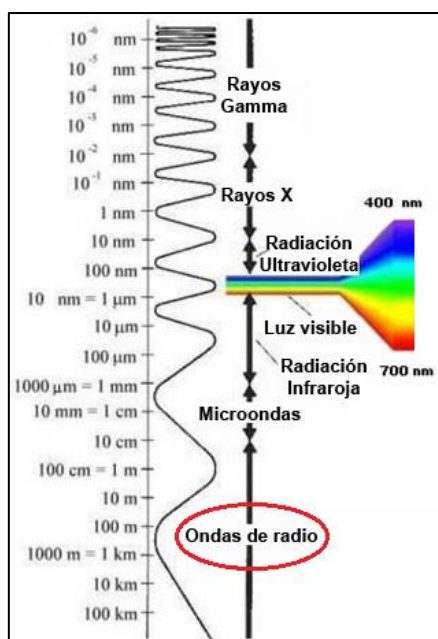


Figura 1: Espectro electromagnético. Las radiaciones electromagnéticas se pueden clasificar según su longitud de onda, de la cual depende la energía de la radiación y la frecuencia de onda. Tal como se muestra, las radiofrecuencias u ondas de radio se encuentran en el extremo con mayor longitud de onda, por lo tanto, son las de menor energía. Adaptada del *sitio web de la Universidad de Barcelona*.

La radiofrecuencia se puede subdividir en función de la frecuencia de onda, marcando distintas bandas en el espectro (*tabla 1*). Cabe destacar que la que se suele utilizar en la medicina estética se encuentra entre las ondas medias y cortas (Veléz Gonzalez, 2008).

Tipo de onda	Longitud de onda	Frecuencia	Energía
<i>Ultra alta frec. Radio</i>	< 1m	> 300MHz	>1,99e ⁻²⁵ J
<i>Muy alta frec. Radio</i>	<10m	>30MHz	>2,05e ⁻²⁶ J
<i>Onda Corta Radio</i>	<180m	>1,7MHz	>1,12e ⁻²⁷ J
<i>Onda Media (AM) Radio</i>	< 650m	>650kHz	>4,31e ⁻²⁸ J
<i>Onda Larga Radio</i>	< 10km	>30 kHz	>1,98e ⁻²⁹ J
<i>Muy Baja frec. Radio</i>	>10km	<30kHz	<1,99e ⁻²⁹ J

Tabla 1: Distintas bandas del espectro de la radiofrecuencia. Se muestra la longitud de onda, la frecuencia y la energía correspondiente a cada tipo de onda dentro de la radiofrecuencia. Adaptada de la página web de *Info Radiofrecuencia*.

El uso de los equipos de radiofrecuencia en dermatología fue aprobado en el año 2002 por la FDA de Estados Unidos, solo para el mejoramiento de la piel facial. Luego, 4 años más tarde, se ganó la aprobación para estos tratamientos en el resto del cuerpo. A partir de esto, ha sido muy aplicada durante la última década en dermatología, por lo que se han realizado varios estudios para asegurar que esta no interfiriera en la salud del paciente (Lolis y Goldberg, 2012).

Uno de los mecanismos de acción más estudiados de la radiofrecuencia se basa en la elevación de temperatura de los tejidos. La corriente eléctrica oscilatoria genera colisiones entre las moléculas cargadas y los iones del tejido, que luego se transforman en calor. Este aumento de temperatura también está dado por la transferencia de energía electromagnética a la matriz dermal rica en agua (Nicoletti *et al*, 2014). Las moléculas de agua se excitan por la onda electromagnética incidente que provoca una rotación rápida, la cual produce un efecto mecánico de fricción que se transforma en calor. El calentamiento que se genera lleva a la desnaturalización del colágeno provocando la contracción y el aumento del grosor del mismo. Parte de este último proceso ocurre de forma instantánea, pero continúa con una respuesta natural inflamatoria del cierre de heridas, lo que desencadena la neocolagénesis y más contracción de la piel (Lolis y Goldberg, 2012).

El efecto térmico nombrado se encuentra condicionado por varios factores (Elsaie, 2009; Nicoletti *et al*, 2014):

- *Nivel de energía empleado.* A mayor frecuencia (menor longitud de onda), menor penetrabilidad;
- *Características del tejido target.* A mayor resistencia (mayor impedancia) se genera más calor, por lo tanto, hay efectos térmicos más profundos. Se debe

destacar, que a pesar de que el cuerpo humano es conductivo, no todos sus componentes tienen la misma conductividad (*tabla 2*);

- *Características del electrodo utilizado* (configuración, tamaño, diseño del electrodo). Por ejemplo, si el electrodo emisor es pequeño, toda la radiofrecuencia se concentrará en un punto; mientras que, si el electrodo emisor es de mayor superficie, la energía se distribuirá en una mayor superficie del tejido, causando un aumento de temperatura más moderado con características más penetrantes;
- *Dosis empleada*. Se ha observado que, a mayor tiempo de aplicación, mayor efecto térmico.

Tejido	Componentes
<i>Tejidos pocos conductores</i>	Piel gruesa, huesos, grasa, uñas y pelos.
<i>Tejidos medianamente conductores</i>	Piel, cartílago, fascias gruesas y tendones.
<i>Tejidos buenos conductores</i>	Muscular, nervioso, conjuntivo, viseras, sangre, linfa, líquido intersticial y líquidos y jugos orgánicos.

Tabla 2: Clasificación de los tejidos del cuerpo en función de su conductividad. Adaptada de *Castro et al, 2006*.

Existen evidencias de que los efectos de la radiofrecuencia no se basan únicamente en el elevamiento de la temperatura de los tejidos. Estos efectos se conocen como los efectos biológicos no térmicos de la radiación. Los mismos se encuentran estudiados en menor medida y su mecanismo de acción sobre los tejidos se encuentra aún en investigación. Sin embargo, se cree que podrían estar relacionados a cambios en los flujos celulares de Ca^{+2} (Mohammed *et al*, 2013).

Actualmente, existen distintos tipos de equipos de radiofrecuencia según como entregan las ondas de RF. Los más desarrollados y conocidos son los *monopolares* y *bipolares*. Los primeros tienen mayor penetrabilidad que los bipolares, que en general, se usan combinados con otras fuentes de energía como son los láseres. Una de las variantes más novedosas, son los equipos de RF *multipolar* que se caracterizan por entregar la energía sin entrar en contacto con la piel (Beasley y Weiss, 2014).

El equipo utilizado en este trabajo utiliza un sistema de **radiofrecuencia monopolar**. Este tipo de configuración, presenta dos variantes. Existen sistemas que contienen 2 electrodos, uno inductivo y otro de recuperación, y los conocidos como sistema antena, donde no se cuenta con la presencia del electrodo de recuperación (Sitio web de Instituto Médico

Laser). El electrodo inductivo concentra la mayor parte de la energía cerca del punto de contacto y la energía va rápidamente disminuyendo mientras que la corriente fluye por el cuerpo hacia el electrodo de recuperación o, en el segundo caso, hacia el contacto a tierra. Debido a esto, el área tratada del tejido se calienta de manera relativamente profunda (hasta aproximadamente 20mm) e intensamente (Nicoletti *et al*, 2014). No obstante, este sistema genera mayores niveles de dolor que otras configuraciones. Es por esto que existen preocupaciones en cuanto a la seguridad en la utilización de esta configuración para aplicaciones dermatológicas (Elsaie, 2009). El equipo utilizado en esta investigación funciona solo con el electrodo de emisión.

Al momento de aplicar el tratamiento, se debe hacer deslizando el electrodo de manera circular esperando lograr un aumento de temperatura que le sea tolerable al paciente. Por lo tanto, el terapeuta debe contar con experiencia para encontrar la relación óptima entre potencia, velocidad y el área de aplicación para alcanzar la temperatura adecuada. En general, se comienza con una potencia mínima y se va incrementándola gradualmente. En zonas faciales, suelen ser necesarios niveles de potencia mucho menores que en aplicaciones corporales. En los centros de estética, los tratamientos varían debido a que no todos utilizan los mismos equipos. Algunos de ellos involucran entre 4-10 sesiones con 15 días aproximadamente de por medio y cada sesión dura entre 30-50 minutos, dependiendo del tipo de piel y la zona a tratar (Sitio web de Galmed; Sitio web de Clínica Simkin).

Se han encontrado numerosas aplicaciones para la radiofrecuencia. Uno de los primeros usos hallados fue para la electrocauterización de tejidos en el año 1920. Después de ello, sus aplicaciones médicas han ido aumentando y varían desde el tratamiento de articulaciones hasta la erradicación de neoplasma en próstata e hígado (Lolis y Goldberg, 2012). Otros ejemplos de su utilización en la medicina involucran la electrocoagulación, la alteración de la curvatura de la córnea y cerrado de venas incompetentes. Actualmente, su uso avanzó a la dermatología hacia tratamientos tales como mejoras en cicatrices de acné y en celulitis, como también en el tratamiento de arrugas (Valentim da Silva *et al*, 2013; Nicoletti *et al*, 2014; Simmons *et al*, 2014).

La demanda de métodos no invasivos para el rejuvenecimiento de la piel y el cuerpo ha tenido un aumento exponencial en la última década. Existe un particular interés por tratamientos seguros y efectivos que disminuyan la laxitud de la piel y las irregularidades en el contorno y textura del cuerpo, pero que no conlleven mucho tiempo de recuperación como

ocurre principalmente con las cirugías. Los tratamientos con RF se han valorado tradicionalmente por ser no ablativos (no implican la remoción o escisión de partes del cuerpo) y por no tener prácticamente tiempos de recuperación ni efectos secundarios. Por lo tanto, la utilización de esta tecnología ha aumentado mucho en el último tiempo como alternativa de las cirugías y otros métodos invasivos como los láseres (Beasley y Weiss, 2014).

1.1.3. La piel, principal blanco de la radiofrecuencia en estética

La **piel** es una capa de tejido que recubre a los animales, funcionando como una efectiva barrera de defensa. La misma permite la trasmisión de información sensorial del ambiente y cumple un importantísimo rol en el mantenimiento de la homeostasis. Este complejo órgano se compone de tres capas: epidermis, dermis y tejido subcutáneo (Kolarsick *et al*, 2011) (**Figura 2**).

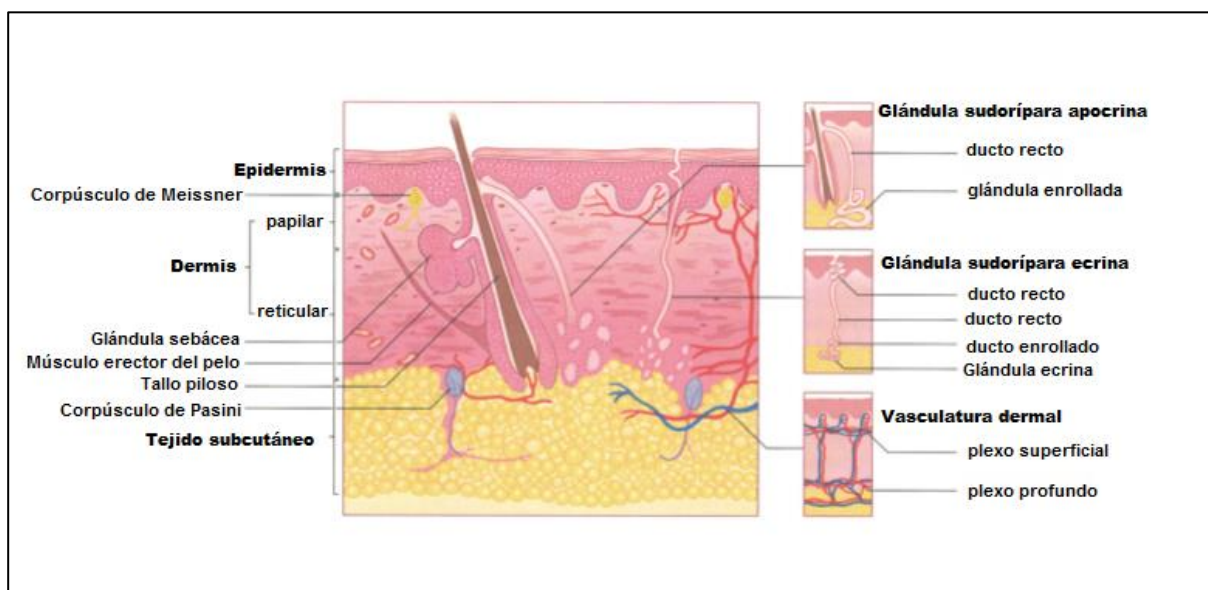


Figura 2: Estructura de la piel. Se representan las tres capas de la piel (epidermis, dermis y tejido subcutáneo) en conjunto a los diversos componentes que se encuentran en ella. Adaptada de Jones W., Elston D. y Berger T., 2016.

La *epidermis*, es la capa externa de la piel y se caracteriza por ser escamosa y estratificada, compuesta principalmente de queratinocitos y células dendríticas. Además, se pueden encontrar otras células como células de Langerhans o Merkel. La misma, se divide en cuatro capas distintas que dependen de la morfología de los queratinocitos y su posición mientras se diferencian a células córneas. Esta capa es importante para la prevención de la

perdida de agua y evitar la entrada de bacterias y sustancias externas al cuerpo (Kolarsick *et al*, 2011).

La *dermis* se encuentra a continuación de la epidermis, separada de la misma por una capa de matriz extracelular conocida como lámina basal. La dermis es un sistema integrado de tejido conectivo amorfo, filamentoso y fibroso y que, además, incluye entradas de nervios, redes vasculares, fibroblastos, macrófagos, mastocitos y anejos derivados de epidermis. Es responsable de proveer flexibilidad, elasticidad y resistencia a la tracción a la piel. Asimismo, interactúa con la epidermis para mantener las propiedades del tejido. Ambas colaboran durante el desarrollo en la morfogénesis de la unión dermal-epidermal y están involucradas en la reparación y la remodelación al curarse las heridas (Kolarsick *et al*, 2011).

Por último, debajo de la dermis se posiciona la *grasa subcutánea*. La misma se encuentra compuesta por lóbulos de células grasas, o lipocitos, separadas por un septo fibroso compuesto por grandes venas y colágeno. Dependiendo de la zona del cuerpo, varía en su grosor. Funciona como una bodega de energía. Además, es donde ocurren algunas conversiones hormonales. Asimismo, los lipocitos producen leptina, una hormona reguladora del peso corporal a través del hipotálamo (Kolarsick *et al*, 2011).

1.2. La célula y su entorno: la matriz extracelular

La **matriz extracelular** (MEC) se describe como una red organizada compuesta por diversas proteínas y polisacáridos secretados localmente. Su composición y características varían en los distintitos tejidos, otorgándoles así funciones específicas a cada uno. Considerando esto, es posible dividir los tejidos animales en dos grandes categorías: tejidos conjuntivos y tejidos epiteliales (Alberts *et al*, 2008).

Los **tejidos conjuntivos** (hueso, tendón y dermis, entre otros) suelen caracterizarse por contener una matriz extracelular más voluminosa que las células que esta rodea. Por ende, las interacciones directas entre células son poco frecuentes. La función de la misma no solo se basa en proveer soporte físico, sino que, además, tiene un rol en la señalización de las células con las que se encuentra en contacto. En la mayoría de estos tejidos, incluyendo la dermis, los mayores productores de MEC son los fibroblastos.

Las dos principales macromoléculas que componen la MEC de los tejidos conjuntivos son los glicosaminoglicanos y las proteínas fibrilares. Los *glicosaminoglicanos* (GAGs) son cadenas de polisacáridos cargadas negativamente, que forman geles hidratados que oponen

resistencia a las fuerzas de compresión. Este gel compuesto por una red de GAGs se entrelaza con las proteínas fibrilares presentes. Las principales proteínas fibrilares estructurales que se encuentra en la MEC de los tejidos conjuntivos son el *colágeno* (mayormente los tipos I, II, III, V, y XI), que refuerzan la matriz ofreciendo resistencia a las fuerzas de tracción y colaboran en su organización, y la *elastina*, que forma fibras elásticas. Estas últimas se entrelazan con las fibras de colágeno para limitar la extensión de estiramiento del tejido y evitar su desgarrar. También se encuentran proteínas fibrilares principalmente adhesivas, como la *fibronectina*, que cumple una función importante en la adhesión de células del tejido conectivo a la matriz extracelular. Esta posee dominios reconocidos por integrinas y dominios de unión a componentes de la MEC (Alberts *et al*, 2008).

En los **tejidos epiteliales**, por otro lado, las células se encuentran muy unidas entre sí y la matriz extracelular suele ser escasa. En estos casos, la matriz se denomina lámina basal, la cual se compone de un delgado entramado. La misma se localiza debajo de las células epidermales y rodeando células nerviosas, grasas y musculares. De esta forma, logran separar estas células y epitelios de los tejidos conjuntivos subyacentes o periféricos a la vez que forman una conexión mecánica entre estos. Entre sus funciones está actuar como soporte para la epidermis y establecer polaridad celular y dirección de crecimiento. También, dirige la organización del citoesqueleto en células basales, provee señales de desarrollo y funciona como una barrera semipermeable entre las capas (Alberts *et al*, 2008; Prada, 2007).

La *laminina* es el principal componente de la MEC de los tejidos epiteliales. Dicha molécula tiene un papel central en la organización del ensamblaje de la lámina basal y en el anclaje de ésta a las células. El *colágeno tipo IV* es el segundo elemento esencial de la lámina basal, el cual se ensambla en una red flexible que otorga resistencia a la tracción. En la lámina basal de la piel, el colágeno es principalmente producido por queratinocitos. A la vez contiene *entactina* y un proteoglicano del tipo heparán sulfato llamado *perlecano*, que funcionan como enlaces que conectan las redes de laminina y de colágeno tipo IV (Kolarsick *et al*, 2011; Alberts *et al*, 2008).

Además de los componentes de la MEC recién mencionados en ambos tipos de tejidos, también se encuentran proteínas conocidas como matricelulares. Las mismas se definen como proteínas asociadas a la matriz extracelular pero que no poseen un rol estructural, sino que actúan como moduladores de las interacciones entre el espacio extracelular y la célula.

Actualmente, la familia de las *proteínas matricelulares* incluye miembros de las familias de SPARC (SPARC y hevina/SC1), de la trombospondina o TSP (TSPs 1-5) y de la tenascina (tenascina-R, W, X e Y). A pesar de la gran diversidad que existe entre los integrantes de este grupo, lo que todos tienen en común es su capacidad de interactuar con receptores celulares, macromoléculas de la MEC, factores de crecimiento y proteasas. De este modo, ya sea directa o indirectamente, regulan funciones celulares tanto en la membrana plasmática, intracelularmente, en fluidos corporales o desde la MEC (Murphy-Ullrich y Sage, 2014).

Los componentes de la MEC, tanto estructurales como no estructurales, interactúan entre sí manteniendo la conformación de la misma y a la vez intervienen en las uniones de esta con la superficie celular. Las células se unen a la matriz extracelular mediante uniones de anclaje, que se clasifican en dos grupos: adhesiones célula-matriz asociada a filamentos de actina y hemidesmosomas. Estas uniones involucran proteínas transmembrana que presentan un dominio intracelular unido al citoesqueleto y otro extracelular unido a otras estructuras, entre las cuales se destacan las integrinas (Alberts *et al*, 2008).

Las *integrinas* se caracterizan por ser moléculas heterodiméricas que al unirse a un ligando sufren fuertes cambios conformacionales que les permiten transmitir señales al interior de la célula (señalización *outside-in*). Asimismo, la interacción con su ligando puede verse modificada por señales químicas provenientes del interior de la célula (señalización *inside-out*). En otras palabras, las integrinas son capaces de mediar la transducción de señales en ambos sentidos a través de la membrana plasmática. Estas señales están involucradas en diversos aspectos del comportamiento celular, como la proliferación, la supervivencia, la polaridad celular y migración celular (Alberts *et al*, 2008).

1.3. Proteínas de la matriz: colágeno y proteínas matricelulares

Como se expuso anteriormente, dentro de los componentes estructurales de la matriz extracelular se encuentra el **colágeno**. Este se caracteriza por tener una estructura muy particular. La misma se basa en tres polipéptidos ricos en prolina y glicina, llamados cadenas α , los cuales se enrollan sobre si mismos formando una superhélice filiforme. Los residuos prolina estabilizan la conformación helicoidal de estas cadenas, mientras que las glicinas debido a su pequeño tamaño favorecen el denso empaquetamiento de las mismas (**Figura 3**).

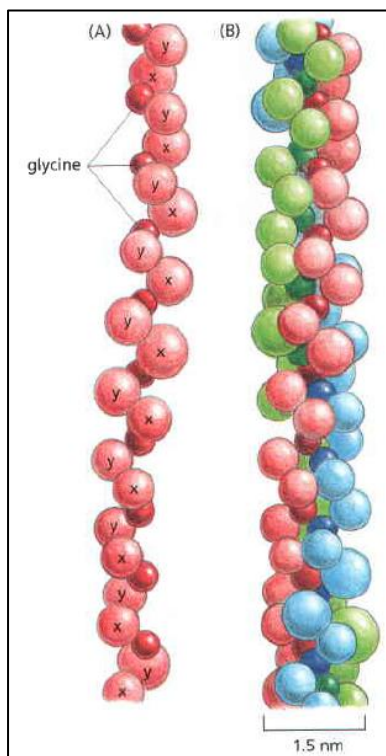


Figura 3: Estructura de una típica molécula de colágeno. **A.** Representa una cadena α levógira. Cada aminoácido es representado por una esfera. Contiene tres aminoácidos por giro con glicina cada tercer aminoácido. X e Y pueden ser cualquier aminoácido, aunque X suele ser prolina e Y hidroxiprolina. **B.** Modelo de parte de una molécula de colágeno donde se muestran tres cadenas α representadas con diferentes colores enrolladas entre sí formando la triple hélice. Solo la glicina es suficientemente pequeña como para ocupar el interior de la triple hélice. Adaptada de Alberts *et al*, 2008.

Se han identificado 42 genes distintos del genoma humano que dan como resultado diferentes cadenas α . La expresión diferencial de estas secuencias daría como resultado un número importante de combinaciones triméricas. No obstante, sólo es posible un número limitado de las mismas. Según la estructura final de la triple hélice, las moléculas de colágeno se pueden clasificar en distintos tipos (Alberts *et al*, 2008).

El *colágeno tipo I* es el colágeno más común entre los tejidos y es el principal de la piel. Se clasifica dentro del grupo de colágenos fibrilares, junto con los tipos II, III y V. La función de este tipo de colágeno es otorgar resistencia a las fuerzas de tracción, lo cual lo logra gracias a su estructura. Además, presenta una larga estructura fibrosa consistente en repeticiones continuas de $(\text{Gly-X-Y})_n$, con pocas interrupciones o incluso ninguna. La síntesis de esta subfamilia es la más conocida y conlleva una gran variedad de pasos enzimáticos, tanto dentro de la célula como en el espacio extracelular (Alberts *et al*, 2008).

Otro tipo de colágeno presente en la MEC de varios tejidos es el *tipo IV*, el cual es uno de los componentes más importantes de la lámina basal. Este está compuesto por moléculas más largas que las fibrilares y que contienen varias discontinuidades en las repeticiones (Gly-X-Y)_n. Además, difieren en el proceso de síntesis de las mismas. Este tipo de colágeno, a diferencia de los fibrilares, no tiene precursor en su síntesis, sino que los extremos N- y C-terminales, llamados dominios 7S y NC1 respectivamente, forman parte de la estructura final de la molécula. Estas moléculas interactúan mediante estos dominios formando una red extracelular flexible y proporcionándole a la lámina basal resistencia a la tracción (Martinek *et al*, 2007; Alberts *et al*, 2008).

Por otro lado, se encuentran en la MEC las proteínas matricelulares. Estas cumplen sus funciones al unirse a un componente de la matriz, receptor de superficie celular o una molécula como son las citoquinas que, a su vez, se unen a la superficie celular. Aunque estas se asocien a otras moléculas, no contribuyen a la integridad estructural del espacio extracelular (Murphy-Ullrich y Sage, 2014).

Una de las proteínas matricelulares que ha sido, y sigue siendo, extensamente estudiada es la **glicoproteína SPARC**, llamada así por las siglas en inglés de proteína secretada, acídica y rica en cisteína (*secreted protein acidic and rich in cysteine*). También se la conoce como BM-40 y osteonectina, nombres que surgieron en los primeros estudios que se realizaron de esta (Lane y Sage, 1994).

Estudios de los productos de traducción a partir de cDNAs en variadas especies, dejaron en evidencia un elevado grado de conservación de esta proteína. Por ejemplo, la secuencia de la proteína humana, posee un grado de similitud muy elevado (>90%) con respecto a la murina y bovina (Bradshaw, 2009). Asimismo, la secuenciación del gen humano, murino y bovino permitió la identificación de varias características inusuales y de elementos promotores potenciales. Aunque este gen no contiene las clásicas secuencias de las cajas TATA o CAAT, se han identificado elementos de respuesta a cAMP, shocks térmicos, glucocorticoides y hormonas de crecimiento como también repeticiones de cajas GCA (Lankat-Buttgereit *et al*, 1988).

El gen encontrado en vertebrados codifica para una proteína de 298-304 aminoácidos, de los cuales los primeros 17 forman un péptido señal que es removido previamente a la secreción. La masa esperada para la proteína madura es de aproximadamente 32kDa. En la estructura final de la misma se identifican tres módulos (**Figura 4**): *módulo I o acídico*,

ubicado en el extremo N-terminal; *módulo II o tipo folistateína* (FS), que comprende los residuos 50-130 aproximadamente; y el *módulo III* que se encuentra en el extremo C-terminal, el cual posee sitios de unión a Ca^{2+} extracelular (EC). Los últimos dos dominios poseen estructuras cristalinas bien diferenciadas. Por un lado, el dominio FS tiene una forma elongada y consiste en un β -*harpin* N-terminal y un pequeño grupo de estructuras α y β mezcladas. Por su lado, el EC es globular y mayormente hélice α . La interfase entre estos dos módulos es pequeña, principalmente polar y se localizan los dos motivos de manos EF (o en inglés *EF-hands motifs*) de unión a calcio, lo que podría indicar que la orientación relativa de los dos dominios es dependiente de la presencia de calcio (Brekken y Sage, 2001).

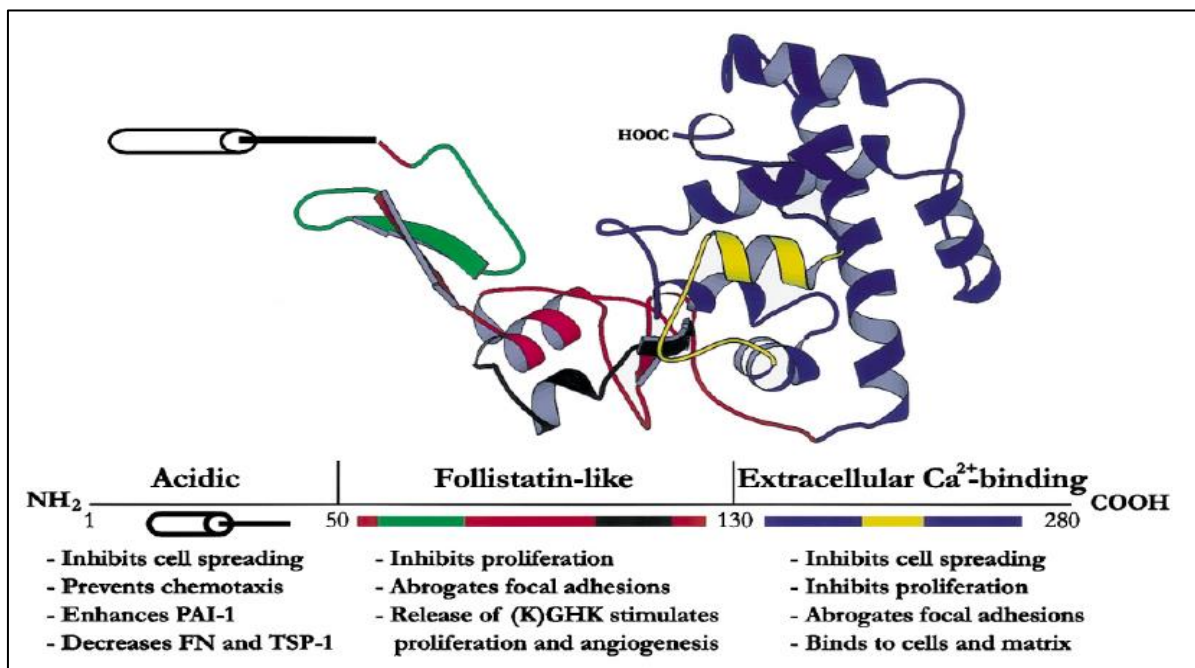


Figura 4: Estructura modular de SPARC humana. El diagrama de cintas obtenido por cristalografía indica la presencia de 3 módulos estructurales. El dominio tipo folistateína (53-137) se muestra en rojo excepto el péptido 2.1 (aa 55-74, en color verde) y péptido angiogénico (K)GHK (aa 114-130, color negro). El módulo EC (aa 138-286) está coloreado de azul, con excepción del péptido 4.2 (aa 255-278) el cual corresponde al color amarillo. Adaptado de Brekken y Sage, 2001.

Entre las modificaciones post-traduccionales que sufre SPARC la principal es la glicosilación. La misma causa que cerca del 10% de la masa de SPARC sea de carbohidratos. El agregado de los grupos glicanos provoca que esta proteína en geles SDS-PAGE corra con un peso mayor al predicho por su secuencia de aminoácidos (32kDa) (**Figura 5**). Además, la corrida de muestras de diversas fuentes ha demostrado que estas no siempre migran igual,

teniendo un peso de entre 40 y 45kDa, según las N-glicosilaciones presentes (Kaufmann, *et al*, 2004).

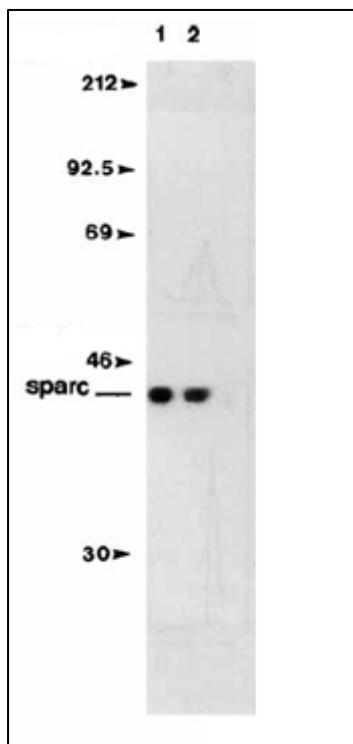


Figura 5: Electroforesis en gel del SDS-poliacrilamida. Las muestras corridas provienen de medio condicionado con células PYS, del cual se precipitaron las proteínas mediante el uso de un anticuerpo específico contra el péptido C-terminal de SPARC. La imagen se obtuvo por fluorografía. Adaptación de *Holland et al, 1987*.

En los organismos adultos se ha descubierto que los niveles de expresión de esta glicoproteína no son elevados, excepto en áreas de morfogénesis activa, poblaciones de células que muestran altos índices de recambio o que requieren de reparación ya sea durante el cierre de una herida o en procesos naturales o patológicos. Sin embargo, se vio que estos niveles aumentan significativamente durante varias etapas del desarrollo embrionario (Brekken y Sage, 2001).

Entre todas las proteínas que forman la familia de las matricelulares, SPARC es considerada el prototipo de estas debido a su relativa simplicidad estructural y a la aparente diversidad de funciones que cumple. De estas últimas, las más destacadas son:

- *Actuar como factor anti-adhesivo.* Tiene la capacidad de romper las adhesiones focales que se forman en ciertos cultivos celulares (Bradshaw, 2009);
- *Intervenir en la actividad de las proteasas extracelulares.* Aumenta la producción y actividad de las metaloproteinasas de matriz, las cuales forman una familia

considerada como las principales mediadoras de la proteólisis y el recambio de la MEC (Brekken y Sage, 2001);

- *Modular la actividad de ciertos factores de crecimiento;*
- *Capacidad de unirse a varios constituyentes de la matriz.*

Todas estas funciones son compatibles con la idea de que SPARC actúa regulando las interacciones de la célula con la MEC. Esto la convirtió en una proteína muy estudiada no sólo en cultivos celulares, sino que también *in vivo*, mayormente en tres organismos evolutivamente diversos: *Caenorhabditis elegans*, *Xenopus laevis* y ratones *Mus musculus*. En estos se han buscado los efectos producidos por aumentos en la expresión de SPARC, como también de la disminución de su actividad mediante la inactivación de su mRNA, bloqueo de la proteína o mediante la mutación del gen (*tabla 3*) (Bradshaw y Sage, 2001).

Organismo	Técnica	Fenotipo
<i>C. elegans</i>	cRNA de interferencia	Letalidad del embrión
		Falta de gránulos intestinales
		Gónadas no funcionales
<i>X. laevis</i>	Bloqueo por anticuerpo	Ejes embrionarios cortos y curvados
<i>Mus musculus</i>	Transgénico nulo o <i>Knock-out</i>	Desarrollo anormal de los ojos
		Aparición de cataratas
		Cierre de heridas acelerado
		Fibras de colágeno aberrantes
		Colas rizadas
		Osteopenia
		Aumento en la deposición de grasa

Tabla 3: Anormalidades fenotípicas causadas por la inactivación *in vivo* de SPARC. Fuente: Bradshaw y Sage, 2001.

Las funciones de SPARC recién mencionadas, la llevan a tener una fuerte influencia en importantes procesos fisiológicos y patológicos, debido a que afectan varios aspectos del comportamiento celular como son la migración, proliferación y diferenciación. Comprender los mecanismos con los cuales actúa contribuiría a entender mejor procesos tales como el desarrollo de los organismos, la curación de heridas, la angiogénesis y el cáncer.

Como se mencionó, SPARC tiene la capacidad de regular las interacciones de la matriz extracelular y la superficie de las células. Por lo tanto, puede unirse a una gran cantidad de componentes de la MEC, como son la trombospondina 1, vitronectina, entactina, los colágenos fibrilares tipo I, II, III y V y el colágeno tipo IV. De todas estas, las que están mejor caracterizadas son las uniones con los distintos colágenos, ya que estos son los

componentes más abundantes de la MEC. La unión que se establece entre las moléculas de colágeno y SPARC sugiere que la glicoproteína es necesaria para el correcto ensamblaje de las fibras en la MEC (Bradshaw, 2009).

1.4. Antecedentes

1.4.1. Efecto de la radiofrecuencia en la remodelación de la piel

El aumento en el uso de la radiofrecuencia (RF) como tratamiento para el mejoramiento de la piel ha llevado a que se realicen investigaciones principalmente *ex vivo* e *in vivo*, que se han basado especialmente en evaluar su eficiencia y mecanismo de acción. La tecnología de RF utiliza una corriente eléctrica en busca de la remodelación de la piel, en lugar de un láser o luz como tecnologías anteriores. Estas últimas, al igual que las cirugías estéticas, buscan mejorar el aspecto de la piel, ya sea facial o de otra parte del cuerpo, pero con la desventaja de presentar importantes efectos secundarios. En el caso de los láseres, por ejemplo, las complicaciones conocidas involucran: eritemas prolongados post-operatorios, edema, erupciones acneiformes, formación de milia, despigmentación, formación de cicatrices hipertróficas, y retraso del saneamiento de heridas (Alnomair, Nazarian y Marmur, 2012). Las terapias que utilizan la radiofrecuencia casi no contienen efectos secundarios, preservaban mucho más la epidermis, conllevan menos complicaciones y tienen un menor tiempo de recuperación. Dadas estas ventajas, hoy en día los tratamientos con radiofrecuencia son una de las opciones más prometedoras (Lolis y Goldberg, 2012).

Zelickson y colaboradores, fue uno de los primeros grupos de investigación que evaluó los efectos de la RF e intentó esclarecer su mecanismo de acción. A través de un estudio piloto, para evaluar los efectos histológicos y moleculares de la RF en la piel, pudieron mostrar el efecto inmediato y a corto plazo de estos tratamientos. Ellos trabajaron con muestras de tendón bovino y con biopsias extraídas de dos pacientes mujeres. Luego de los tratamientos, las muestras fueron analizadas mediante el uso de un microscopio electrónico. Con este observaron alteraciones morfológicas en las fibras de colágeno inmediatamente después de realizar el tratamiento, comprobándose un aumento en el diámetro de las mismas. Además, midieron los niveles de producción de colágeno en la piel, específicamente estudiando los niveles del mRNA del colágeno fibrilar tipo I, luego de unos pocos días de haber sido tratada, usando la técnica de Northern Blot (**Figura 6**) Los resultados del estudio de Zelickson *et al*, demostraron que ocurre un cambio claro en la morfología del

colágeno presente en la dermis. Sin embargo, los resultados del Northern Blot realizado no muestran diferencias tan definidas dado que la calidad del mismo es muy pobre. Debido a esto, no se podría concluir solo con este resultado que realmente hay un aumento en los niveles del RNA mensajero del colágeno tipo I luego de la radiación con RF (Zelickson *et al*, 2004).

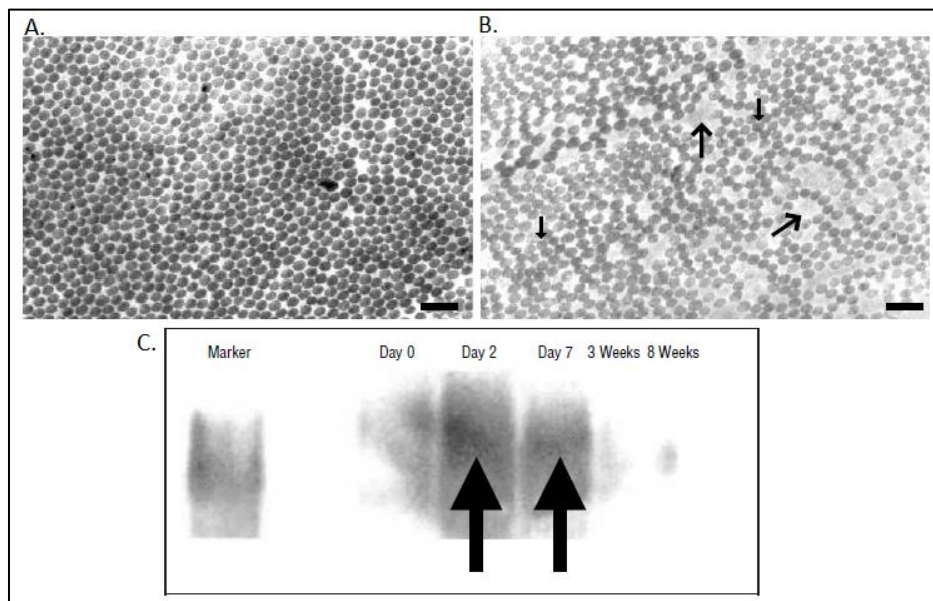


Figura 6: Resultados obtenidos por los investigadores Zelickson et al en un estudio piloto sobre el efecto de la RF en la dermis. A. Imagen del microscopio de transmisión electrónico en los que se muestran las fibras de colágeno de una biopsia control (sin tratamiento). **B.** Ídem A, pero de la biopsia tratada con RF en donde se observan fibras de colágeno de distintos diámetros. Las fechas de mayor tamaño indican aquellas fibras de mayor diámetro, mientras que las pequeñas señalan las normales. Las barras horizontales indican 600nm. **C.** Northern Blot de las biopsias de piel humana, en los que se muestran los niveles de expresión del RNA mensajero en distintos momentos (muestra de biopsia sin tratar (día 0) y muestras de biopsias de distintos tiempos posteriores a ser tratados). Adaptada de Zelickson *et al*, 2004.

Se han observado distintos efectos de los tratamientos con RF en distintas partes de la piel. El-Domyati y su equipo, por ejemplo, han resaltado cambios en la epidermis, dermis, y en la unión dermal-epidermal causados por esta tecnología. Con el objetivo de estudiar la RF como un tratamiento anti-edad utilizaron un equipo de RF monopolar y trataron a 6 voluntarios por un lapso de 3 meses (involucraron 6 sesiones cada dos semanas) y realizaron biopsias antes y luego de los 3 meses de tratamiento y también 3 meses después de la finalización de este. En relación a la epidermis, detectaron un aumento significativo en el grosor de la misma luego de los 3 meses de tratamiento y 3 meses post-tratamiento (al comprar ambos con los resultados obtenidos antes del tratamiento). Especialmente resaltaron

un aumento en la capa granular (**Figura 7, A**). Sugieren que estos hallazgos podrían relacionarse con un incremento en la proliferación de células de la epidermis y que esto podría estar contribuyendo a una mejora en la apariencia de la piel. Sin embargo, también expresan que mayores estudios son requeridos para explicar estos cambios. A su vez encontraron cambios en la unión dermal-epidermal, específicamente vieron aumentado el grosor de la banda de colágeno en la misma, luego del tratamiento y de los 3 meses post- tratamiento en comparación con la observada previa al tratamiento (**Figura 7, B**). Por último, observaron cambios en la dermis, detectaron aumentos significativos en el colágeno tipo I y III tanto inmediatamente después del tratamiento, como 3 meses después del mismo, al compararse con los valores observado antes del tratamiento (El-Domyati *et al*, 2011).

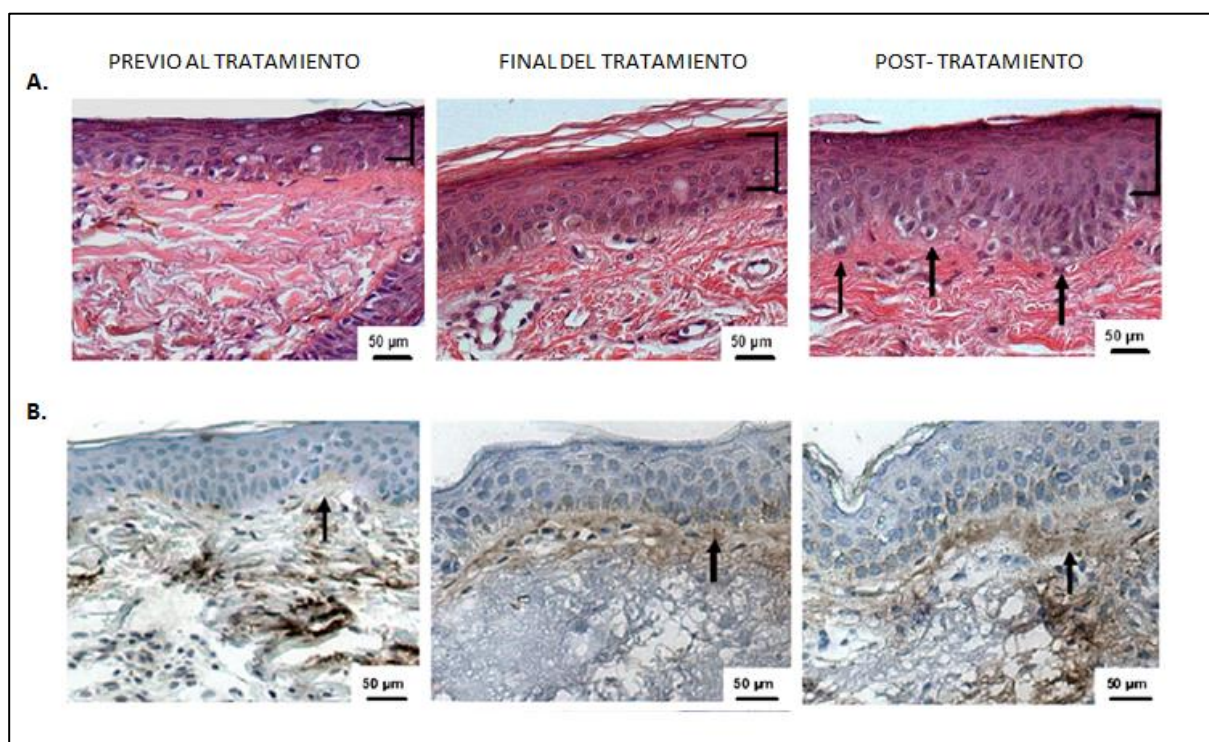


Figura 7: Resultados observados en el estudio de Radiofrecuencia en la piel realizado por El-Domyati y colaboradores. A. Se muestran imágenes de microscopía de biopsias obtenidas de la piel teñidas con hematoxilina-eosina. De izquierda a derecha se observan correspondientemente una muestra previa a realizar el tratamiento, muestra luego de los 3 meses de tratamiento y muestra posterior a 3 meses de tratamiento. Se observa un incremento en el grosor de la epidermis específicamente en la capa granular (marcada con corchetes) y un desarrollo de crestas de Rete (ondulaciones marcadas en la región dermal-epidermal) marcado con flechas. **B.** Imágenes de microscopía de biopsias obtenidas de la piel que muestran colágeno total teñido por inmunotinción. De izquierda a derecha se observan, correspondientemente, una muestra previa a realizar el tratamiento, muestra luego de los 3 meses de tratamiento y muestra posterior a 3 meses de tratamiento. Se visualiza en las imágenes de final de tratamiento y post tratamiento un aumento en

la banda de colágeno en la unión dermal-epidermal comparándolas a la muestra previo al tratamiento (se indica con flechas). Adaptada de *El-Domyati et al, 2011*.

Otro grupo de investigadores (Nicoletti y colaboradores), realizó un estudio experimental de 2 etapas para evaluar la efectividad y seguridad de un dispositivo de RF con una configuración cuadripolar. En primer lugar, llevaron a cabo un experimento *ex vivo*, en el cual se trataron muestras provenientes de biopsias, cada una tratada con una determinada combinación de potencia y tiempo. Los efectos de cada tratamiento fueron evaluados por 3 métodos: examinación clínica por fotografías, medición de la temperatura antes y después de la irradiación y examinación histológica por microscopia. En función de los resultados obtenidos, se seleccionó un rango efectivo y seguro para la aplicación *in vivo*, analizando los efectos de la misma manera. Concluyeron que los efectos biológicos de la aplicación de RF estaban relacionados con la energía térmica transferida al tejido, y esta era proporcional tanto a la temperatura local como al tiempo de exposición (**Figura 8**).

	<i>T pre</i>	<i>T post 4' 25%</i>	<i>T post 4' 50%</i>	<i>T post 4' 75%</i>	<i>T post 45'' 100%</i>
Skin surface	25.8°	37°Δ+11.2°	47.7°Δ+21.9°	55 Δ+29.2°	60 Δ+34.2°
Subcutaneous adipose tissue	27.5°	28.8°Δ+1.3°	27.5°Δ 0	27.2 Δ-0.3°	27 Δ-0.5°

T, temperature in degrees Celsius; Δ, average temperature delta between pre- and post-treatment; ', minutes; '', seconds.

Figura 8: Valores de temperaturas registrados en muestras *ex vivo* luego de aplicar RF durante distintos tiempos y a potencias diferentes. La potencia de cada uno de estos tratamientos fueron las siguientes: 25% 13,75W; 50% 27,50W; 75% 41,25W y 100% 55W. Fuente: *Nicoletti et al, 2014*.

Después de las aplicaciones de RF, se vio que las fibras nativas de colágeno sufrieron un rearrreglo inducido por el calor generado y una desnaturalización parcial, siendo a su vez metabolizadas progresivamente por macrófagos. Como consecuencia de estos eventos, ocurrió un total engrosamiento y un rearrreglo espacial que se apreció tanto en las fibras de colágeno como en las de elastina, provocando así una apariencia juvenil en la piel tratada. Esto concuerda con las observaciones inmediatas luego de los tratamientos con RF que había visto Zelickson y su equipo (aumento en el grosor de las fibras de colágeno).

Las fibras de colágeno comienzan a curvarse cerca de los 55°C y se contraen a 65°C, mientras que el umbral de desnaturalización se encuentra entre 60 y 70°C. Según los resultados de las imágenes térmicas obtenidas en el estudio de Nicoletti y su equipo, tanto *ex vivo* como *in vivo*, las temperaturas alcanzadas eran lejanas a este umbral (**Figura 9**). Los autores suponen que teóricamente en pequeños puntos si se llegaba a estas. Esto lleva a la

hipótesis de los investigadores de que los cambios observados en la estructura de las fibras de colágeno no se deben únicamente al efecto térmico sino también a otros factores aquí no estudiados (Nicoletti *et al*, 2014).

	T_{pre}	T_{post}	Δ
Skin surface	29.6°	38.2°	+ 8.6°

T, temperature in degrees Celsius; Δ , average temperature delta between pre- and post-treatment.

Figura 9: Registro de temperaturas in vivo antes y luego de ser irradiada la piel con RF. En este caso, la potencia seleccionada fue del 25-40%, es decir, entre 11 y 22W. Fuente: Nicoletti *et al*, 2014.

Hantash y colaboradores, examinaron la respuesta a la radiofrecuencia luego de tratamientos con RF bipolar fraccionada mediante técnicas histológicas, inmunohistoquímicas y moleculares. Estudiaron inmediatamente después de la irradiación y luego a distintos períodos de tiempo para evaluar la evolución en el tiempo de esta respuesta *in vivo*. Al igual que en el estudio recién descrito, liderado por Nicoletti, también relacionan los efectos de la radiofrecuencia con aumentos focales de temperatura, a las cuales refiere como zonas térmicas de la RF (RFTZ, del inglés *radiofrequency thermal zone*). En este estudio, se observó un incremento progresivo en la densidad de la respuesta inflamatoria en las RFTZ que, interesantemente, se expandió por varios milímetros fuera de las mismas. También, se estudió la expresión de la proteína HSP47, la cual es una proteína de respuesta a choque térmico reguladora del cierre de heridas que funciona como chaperona del colágeno. Esta fue detectada recién a los 2 días del tratamiento y continuó aumentando por más de un mes hasta estabilizarse a las 10 semanas del tratamiento. En ese momento, se observó evidencia de deposición de nuevo colágeno y elastina. Por lo tanto, demostraron que la aplicación de RF desató un proceso de remodelación en la dermis dirigido por la chaperona del colágeno HSP47 causando un reemplazo completo del colágeno en las zonas tratadas, además de la activación de la neoelastogénesis (Hantash *et al*, 2009).

Las investigaciones recién mencionadas, principalmente las lideradas por Nicoletti y Hantash, consideran que los efectos observados ocurren debido a la respuesta microinflamatoria desencadenada por el efecto térmico de la RF, lo que estimula la producción de colágeno (neocolagénesis), elastina (neoelastogénesis) y otras sustancias que potencian la remodelación de la piel (Hantash *et al*, 2009, Nicoletti *et al*, 2014). No obstante,

otros investigadores han resaltado que los efectos de la radiofrecuencia pueden no deberse únicamente a un aumento de la temperatura en los tejidos. Tal es el caso del investigador Kubat y su equipo que han estudiado los efectos de la radiofrecuencia pulsada en células de fibroblastos, queratinocitos y células mononucleares *in vitro* con el objetivo de buscar los mecanismos por los cuales actúa la radiofrecuencia. En este caso, el equipo utilizado no tiene el objetivo de generar un profundo calentamiento del tejido tratado cuando se usa en pacientes. Para su investigación posicionan la antena del equipo a 5cm de las células en cultivo. Luego de estudiar los niveles de mRNA de diversos factores involucrados en la inflamación, apoyan la idea de que los tratamientos con RF llevan a cambios en la expresión génica de distintos factores implicados en la regulación de la inflamación, incluyendo de la fase resolutive de la misma. Por ejemplo, observaron aumentos significativos en la expresión de hemo-oxigenasa 1 (enzima importante en el aplacamiento de la respuesta inflamatoria) en los tres tipos celulares y reducciones en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, como la interleuquina 1 beta, entre otras (Kubat, Moffet y Fray, 2015).

Se cree que la terapia con RF podría regular la expresión de genes influenciando la activación de canales iónicos dependientes de voltaje de Ca^{+2} . La activación de estos canales llevaría a la activación de rutas de segundos mensajeros que terminaría generando subsecuente regulación en la expresión génica (Kubat, Moffet, Fray, 2015). Rao lideró una investigación para estudiar el efecto de campos de RF en los picos de Ca^{+2} celulares. Lo hicieron mediante la aplicación de RF a células neuronales diferenciadas de células madre de ratón y células P19 (células de carcinoma embrionaria de ratón). Las expusieron a distintas frecuencias, entre 700 y 1100 MHz. Observaron aumentos significativos en la cantidad de picos de Ca^{+2} , mas marcadamente en las células neuronales. Además, vieron que los cambios eran dependientes de la frecuencia de radiación, viéndose mayor cantidad de picos a 800MHz (V.S Rao, *et al* 2008). Cabe destacar las frecuencias aquí utilizadas son mayores a las comúnmente usadas en tratamientos estéticos, no obstante, no se encuentran estudios que demuestren que esto no pueda ocurrir a menores frecuencias.

1.4.2. Participación de SPARC y colágeno en la remodelación de la matriz extracelular

La aplicación de ondas de radiofrecuencia se vio que provoca el rearrreglo inmediato de las moléculas de colágeno de la piel, lo que lleva al estiramiento de la piel. A su vez, se ha

detectado que causa la síntesis de nuevo colágeno. Todo esto lleva a una mejora en el aspecto de la piel (Beasley y Weiss, 2014).

La síntesis de nuevo colágeno es un proceso complejo en el que intervienen muchas proteínas (Martinek *et al*, 2007). Entre estas se ha puesto especial interés en la glicoproteína de matriz SPARC. Aunque la relación entre el colágeno y esta última no está completamente establecida hay varios estudios que han trabajado en esto (Bradshaw, 2009).

La unión SPARC-colágeno es dependiente de calcio. La afinidad entre estas proteínas es elevada para los distintos tipos de colágeno, aunque puede variar en ciertas situaciones: corte de SPARC con determinadas metaloproteinasas de matriz en sitios específicos o por los patrones de glicosilación de SPARC tejido-específicos (Bradshaw, 2009). Dos estudios describieron la unión de esta glicoproteína con los colágenos fibrilares, especialmente con el colágeno tipo I. En ambos se descubrieron 2 sitios de unión a SPARC en este tipo de colágeno: uno en los residuos 650-800 aproximadamente (a 87,5-125 nm del extremo C-terminal del pro-colágeno I) y otro entre los aminoácidos 100-200, ubicado a 237,5-262,5nm del extremo C-terminal (Wang *et al*, 2005; Giudici *et al*, 2008). Sin embargo, Giudici y colaboradores identificaron otro sitio de unión a unos 180nm del extremo C-terminal. Según ellos, los dos anteriores eran menos relevantes. Observaron que el último encontrado era el principal sitio de unión y que su secuencia está conservada en la cadena α de los colágenos tipo I, II, III y IV (Giudici *et al*, 2008). Las diferencias entre estos trabajos se pueden deber a las distintas fuentes de rSPARC que utilizaron (en el primero, células de insecto y en el segundo, células de mamíferos), como también al hecho de que, en un caso se usa pro-colágeno recombinante y en el otro humano. A pesar de estas diferencias, la identificación de estos sitios en los colágenos sugiere que SPARC puede influenciar la interacción de estos con sus receptores de superficie celular, así como en la interacción con otros componentes de la MEC. Esto se basa en que los sitios de unión a SPARC se han identificado cercanos a sitios de unión de otros componentes (Bradshaw, 2009).

Otro grupo de investigación reportó el sitio de unión a colágeno en la proteína SPARC. Se compone de la hélice αA y el lazo adyacente αE - αF . Estos dos elementos forman una profunda cavidad que acomoda al residuo F23 de la cadena retrasada del colágeno. Esta se denominó "bolsillo Phe" y está formada por varios residuos apolares y un puente salino. Curiosamente, este arreglo no se encuentra en la proteína libre, sólo aparece cuando se une a la triple hélice, demostrando que la unión del colágeno a SPARC provoca, en esta última,

importantes rearrreglos en su estructura, siendo este el más notable. La presencia de una fenilalanina en la posición 23 de la hebra retrasada, se encontró en los colágenos fibrilares tipos I, II y III y también en el colágeno de lámina basal tipo IV. Esto se consideró como requerimiento para la unión a SPARC. Por lo tanto, el haber hallado este residuo en los tipos de colágenos mencionados permitió predecir los sitios de unión a SPARC (Hohenester *et al*, 2008).

El cambio estructural que sufre SPARC al unirse al colágeno sugiere que hay una relación funcional entre estas dos moléculas. Se han realizado numerosos estudios en búsqueda de esta relación.

Una de las consecuencias más notables de la ausencia de SPARC en ratones, es la apariencia de la piel, la cual es mucho más laxa y débil que los ratones normales. También, se encontró que sus colas tenían una flexibilidad anormal, adoptando en ocasiones una forma enroscada. Se comparó el contenido de colágeno en la piel de estos ratones mediante un análisis de hidroxiprolina y se comprobó que la cantidad de colágeno total en la piel de los animales nulos para SPARC era sustancialmente menor. Además, se midió la resistencia a la tracción de la piel de los ratones SPARC^{-/-} observándose valores mucho menores en estos con respecto a los de genotipo salvaje. A su vez, se observó que las fibras de colágeno en la piel en ausencia de SPARC tenían un diámetro menor y más uniforme en comparación a cuando esta proteína está presente. Estos resultados demostraron que la ausencia de la glicoproteína SPARC afecta la maduración del colágeno en la MEC, comprometiendo las propiedades mecánicas de la piel de estos animales (Bradshaw *et al*, 2003).

Otra de las anomalías presentes en los ratones nulos para SPARC es la aparición temprana de cataratas. En estos se observó que la integridad estructural de la membrana basal de las células epiteliales de las lentes estaba afectada. Se reveló que la distribución del colágeno tipo IV, el mayor componente de esta membrana, estaba alterada. Interesantemente, las células presentaban una morfología aberrante. Mientras que la membrana celular de las células epiteliales de los animales WT formaba una superficie firme y estrecha adyacente a la lámina basal, las células SPARC^{-/-} aparecían en forma de serpiente y con gran cantidad de protrusiones de la membrana extendiéndose en la lámina basal. Estos resultados indican que SPARC participa en la síntesis, ensamblaje y/o estabilización de la lámina basal de las lentes (Yan *et al*, 2002).

Hay evidencia también de que SPARC interviene en el ensamblaje de la lámina basal en organismos invertebrados. Por ejemplo, un estudio realizado por Martinek y su equipo en embriones de *Drosophila*, no detectaron colágeno tipo IV en la lámina basal de los embriones nulos en SPARC. En estos, se encontró colágeno tipo IV en los hemocitos mutantes, pero no en su lámina basal, lo que indicaría que la ausencia de SPARC no afecta la expresión y síntesis de este colágeno. Los datos que obtuvieron sugieren que la deposición de colágeno IV en la lámina basal de embriones requiere de la co-expresión de este colágeno y SPARC. Se podría considerar que SPARC tiene un rol intracelular en la secreción del colágeno (Martinek *et al*, 2008).

Los ratones nulos para SPARC se caracterizan por tener una mayor velocidad de cicatrización de las heridas que los salvajes. Gran cantidad de eventos celulares deben ocurrir para lograr el cierre de una herida y la regeneración de la dermis dañada: proliferación y migración celular, contracción y degradación y síntesis de la matriz extracelular. Todo esto depende de la expresión y activación espacial y temporal de una variedad de proteínas como son ciertos factores de crecimiento, citoquinas, metaloproteinasas y componentes de la MEC. En el caso de SPARC, se han detectado incrementos en los primeros momentos luego de provocada la herida, registrándose los más altos en la última parte del proceso durante la remodelación de la MEC. Sorprendentemente, se observó que las heridas producidas en los ratones nulos en SPARC cierran más rápido que en los WT. Uno de los mecanismos por los que la ausencia de SPARC potenciaría este proceso podría estar relacionado con la menor cantidad de colágeno presente en la piel de estos ratones sumado a un menor tamaño en las fibras de colágeno en los ratones SPARC-nulos y con otras alteraciones en la MEC, que resultarían en un medio más permisivo para la infiltración celular y la cicatrización. Probablemente en ausencia de SPARC la matriz extracelular es degradada con mayor facilidad por las metaloproteinasas y al ser menos estructurada, las contracciones de la matriz necesarias para el cierre de las heridas también se producirían más fácilmente (Bradshaw y Sage, 2001; Bradshaw *et al*, 2003)

Todos los trabajos que fueron mencionados indican que tanto la expresión nula como la expresión ectópica de SPARC o sin la regulación apropiada provoca defectos en la organización de la matriz extracelular, principalmente en la formación del colágeno durante el desarrollo embrionario y en la adultez de los organismos. Por lo tanto, la presencia de SPARC es un factor crítico en la formación del colágeno de la matriz extracelular (Bradshaw, 2009).

Una posibilidad de la función de SPARC es que sirva como chaperona intracelular en los últimos pasos de la secreción del colágeno. Martinek y colaboradores propusieron que SPARC, junto con la proteína de choque térmico HSP47, estabilizan las triples hélices de colágeno antes de que estas salgan del retículo endoplasmático (RE). De esta manera, solo las moléculas de colágeno correctamente plegadas salen del RE. Además, SPARC es transportada desde el RE a través de la red de Golgi y en vesículas secretorias hacia la membrana plasmática. Esto indicaría que esta glicoproteína también tiene un rol en la regulación de los eventos posteriores al retículo endoplasmático que promueven la fibrillogénesis del colágeno. Por lo tanto, SPARC funcionaría estabilizando la triple hélice de los colágenos fibrilares y tipo IV, su secreción y el ensamblaje supramolecular en el espacio extracelular (Martinek *et al*, 2007).

La proteína HSP47, recién mencionada, es una chaperona específica del colágeno en vertebrados. Se ha visto que los ratones HSP47^{-/-} producen colágeno tipo I inmaduro y forman láminas basales discontinuos. Matsuoka y colaboradores, encontraron que el colágeno tipo IV secretado por estos ratones son mucho más susceptibles a ser digeridos por proteasas en comparación al de los ratones salvajes. Esto era consistente con resultados anteriores en relación al colágeno fibrilar tipo I. Este resultado sugiere que las moléculas de colágeno secretadas por células nulas para HSP47 no están correctamente plegadas, evidenciando un rol esencial de esta proteína en el ensamblaje del colágeno tipo I y IV (Matsuoka *et al*, 2004).

Todos los resultados presentados en los párrafos anteriores apoyan la actividad de SPARC como factor crítico en la formación del colágeno y el ensamblaje del mismo en la matriz extracelular. Estos junto con las evidencias presentadas sobre los efectos de la radiofrecuencia en la producción de las moléculas de colágeno, llevan a pensar que tal vez la radiación de estas ondas, tenga también consecuencias en la síntesis de SPARC.

1.5. Modelo biológico usado: los cultivos celulares

Los **cultivos celulares** son células que han sido removidas de un animal (o vegetal) para luego ser crecidas en un medio favorable artificial. En este pueden crecer en suspensión o adheridas a una superficie. Estos cultivos pueden derivar de explantes primarios o de una suspensión de células dispersas. La formación de una línea celular a partir de un cultivo primario implica un aumento en el número total de células a través de varias generaciones, lo cual es posible gracias a la proliferación de las células. Esta línea celular puede sufrir cambios

genéticos o una transformación que deriva en una línea continua o establecida. La misma se caracteriza por un aumento en la tasa de proliferación y una mayor eficiencia de plaqueo (Freshney, 2005c).

Una de las principales razones por las cuales se utiliza este modelo biológico es debido a la posibilidad de controlar el ambiente fisicoquímico (pH, temperatura, presión osmótica, tensión de O₂ y de CO₂) y las condiciones fisiológicas. Otra ventaja que tienen los cultivos celulares es que hay diversas pruebas que permiten identificar cada línea celular y así validar la misma para asegurarse que estén libres de contaminaciones cruzadas. Además, un cultivo requiere menos reactivos que los utilizados en experimentos *in vivo*, donde el 90% se pierde por excreción y distribución a otros tejidos que no se encuentran en estudio. Asimismo, los cultivos pueden exponerse directamente a los reactivos logrando así acceso directo a la célula. De esta manera, los ensayos tienen un menor costo en cuanto a la cantidad de reactivos necesarios. Otra ventaja del trabajo con células *in vitro* es que se evitan las cuestiones legales y éticas que conlleva el trabajo con animales (Freshney, 2005c).

Igualmente, este modelo también posee desventajas. Uno de los inconvenientes más frecuentes es la aparición de contaminaciones de diversos orígenes. Estas pueden ser contaminaciones cruzadas entre distintas líneas o de microorganismos, tales como las bacterias, hongos y levaduras. A su vez, las células cultivadas pueden sufrir la pérdida de las características fenotípicas del tejido del cual provienen las células, proceso definido como desdiferenciación. Sin embargo, actualmente, el aislamiento de linajes específicos es más viable debido al desarrollo de medios selectivos libres de suero. La inestabilidad cromosómica es otro de los problemas que puede sufrir este modelo. Esto es causado porque las líneas celulares continuas suelen contener una composición inestable de cromosomas aneuploides.

Además, surgen diferencias en el comportamiento de células cultivadas y las mismas *in vivo*. Esto se debe principalmente a la disociación de las células de la geometría tridimensional *in vivo* a una bidimensional, generando la pérdida de varias interacciones características de cada tejido. Del mismo modo, se debe tener en cuenta que el ambiente de un cultivo *in vitro* no equivale al de los modelos *in vivo* (Freshney, 2005c).

Se han utilizado tres distintas líneas de cultivo celular a lo largo de este trabajo:

CHO. La línea celular conocida como CHO (del inglés, *chinese hamster ovary*) es una línea celular epitelial establecida en el laboratorio del Dr. Theodore T. Puck en el año 1957. Se originó a partir de tejido de ovario perteneciente a un hámster chino. En principio se

generó un cultivo donde predominaban células tipo fibroblasto que contenían un cariotipo mayoritariamente diploide de 22 cromosomas. El cultivo primario generado se mantuvo por más de diez meses y luego ocurrió un cambio en la morfología celular hacia una morfología más epitelioides. Las modificaciones observadas fueron causadas por alteraciones genéticas de origen desconocido. Las células sufrieron una inmortalización espontánea. A continuación, el clonado de estas células con su morfología modificada dio como resultado la línea celular conocida hoy en día como CHO (Wurm, 2013).

La línea celular CHO se caracteriza por una alta eficiencia de clonado, inclusive a bajas concentraciones de suero fetal bovino. Por otro lado, son conocidas por tener un alto nivel de diversidad genética y fenotípica. Esta diversidad fue causada por las fuerzas selectivas impuestas por distintos laboratorios al crecer las células bajo diversas condiciones de cultivo. Por ende, el nombre CHO representa a distintas familias de cuasiespecies que difieren genética y fenotípicamente, y varían en su comportamiento en cultivo (Wurm, 2013).

WI-38. Se originó en los años 60s por Leonard Hayflick (Wadman, 2013). Las mismas, son células de fibroblastos obtenidas de tejido pulmonar fetal de un embrión de aproximadamente tres meses de gestación (Hayflick, 1964).

Las WI-38 fueron las primeras células “normales” humanas disponibles en cantidades prácticamente ilimitadas para los centros científicos y la industria (Wadman, 2013). Se caracterizan por mantenerse diploides por largos periodos en cultivo sin alteración (Hayflick y Moorhead, 1961). Asimismo, tienen un límite de vida finito: entran en senescencia luego de 50 ± 10 pasajes (2:1 relación de separación) (Hayflick, 1964).

HaCaT. La línea celular HaCaT fue establecida por Petra Boukamp y su equipo en el año 1988. Corresponde a células de queratinocitos humanos originadas a partir de la periferia distante de un melanoma localizado en la parte superior de la espalda de un hombre de 62 años de edad. La línea se estableció por inmortalización espontánea. En principio se estimuló el crecimiento de las células del cultivo primario al incubarlas con bajas concentraciones de Ca^{+2} y elevadas temperaturas ($38,5^{\circ}C$), de aquí surgió su nombre. Luego de cultivarlas por un prolongado tiempo, las células comenzaron a comportarse de manera más autónoma, logrando independizarse de la regulación del ambiente (liberadas de la concentración de Ca^{+2} y las elevadas temperaturas) y consiguiendo crecer bajo diversas condiciones de cultivo (Boukamp *et al*, 1988).

Las células que componen esta línea celular se caracterizan por ser inmortales (> 140 pasajes), con un fenotipo transformado, pero no tumorigénicas al transplantarse en ratones. Asimismo, se ha demostrado que son similares a los queratinocitos normales humanos y reforman el tejido de epidermis estructurada al trasplantarse en ratones. Se han documentado alteraciones cromosomales en diferentes etapas de la transformación celular. A pesar de que estas no están del todo establecidas, el hecho de que haya aparecido cierta estabilidad en cambios citogenéticos específicos indican que son necesarios para controlar el crecimiento y generar la inmortalidad (Boukamp *et al*, 1988).

2. HIPOTESIS

Las ondas de radiofrecuencia inducen la expresión de colágeno y SPARC en líneas celulares *in vitro*.

3. OBJETIVOS

En el siguiente proyecto final se plantea como objetivo general evaluar el efecto de la radiofrecuencia sobre la expresión de proteínas de la matriz extracelular en un modelo celular.

Dentro de este, se encuentran una serie de objetivos específicos. Los mismos son:

- Desarrollar un modelo celular que permita evaluar los efectos biológicos de las ondas de radiofrecuencia.
- Determinar el diseño experimental a utilizar para evaluar el efecto de la radiofrecuencia en la expresión de colágeno y SPARC (controles necesarios, cantidad de réplicas y tratamientos a aplicar sobre el cultivo celular).
- Evaluar el efecto de la radiofrecuencia sobre la expresión de colágeno y SPARC mediante un método estadístico.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Lugar de trabajo

4.1.1. Laboratorio de electrónica y telecomunicaciones

El laboratorio de electrónica y telecomunicaciones se encuentra en el piso n° 11 del edificio de UADE Labs. El mismo cuenta con equipos que miden distintos parámetros físicos, los cuales permitieron una mejor caracterización del equipo de radiofrecuencia con el que se trabajó. Se hizo uso de un **osciloscopio (Figura 10 A)**, un instrumento de visualización electrónica para la representación gráfica de señales eléctricas que pueden variar en el tiempo. Además, se utilizó un **wattímetro (Figura 10 B)**, con el que se midió el consumo del equipo en distintas situaciones. En estas últimas las mediciones fueron realizadas a la tensión nominal del equipo (220V).

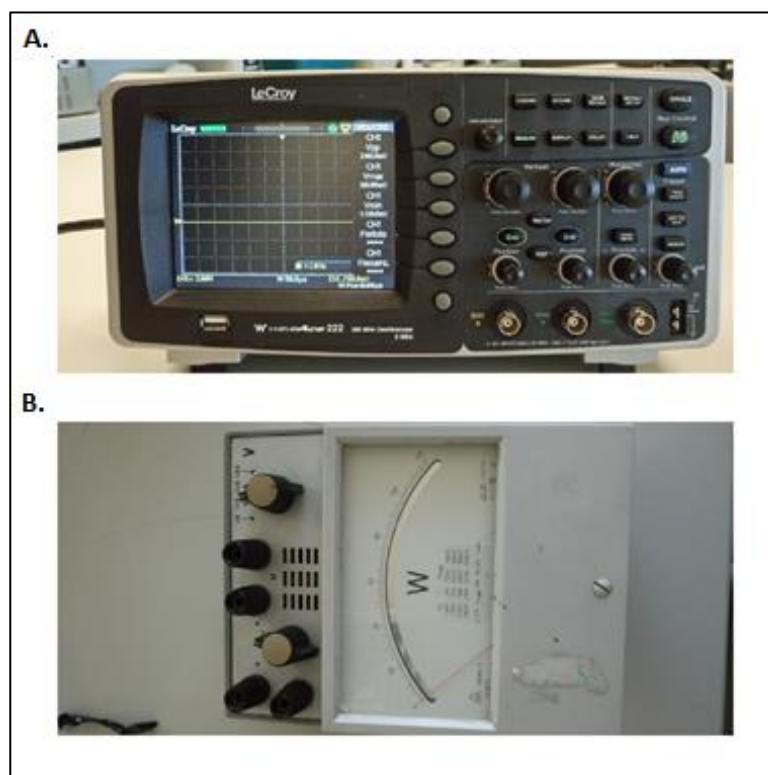


Figura 10: Equipos usados del laboratorio de electrónica y telecomunicaciones para la medición de parámetros del equipo de radiofrecuencia. A. Osciloscopio (LeCroy 222 Wave Ace 200MHz 2 canales digital). B. Wattímetro (Ganz HEWa-2).

4.1.2. Sala de cultivo celular

El laboratorio del piso n° 9 de UADE Labs cuenta con una sala destinada específicamente al trabajo con cultivos celulares eucariotas. La misma está equipada para el mantenimiento de los mismos y, además, tiene una antesala en la cual los operadores deben colocarse la vestimenta adecuada (guardapolvo, cofia y/o botas descartables) antes de entrar a la sala. Además, esta antesala disminuye la formación de corrientes de aire contaminado desde el exterior al interior de la sala. Por lo tanto, siempre que la puerta de ingreso a la antesala este abierta, la de entrada a la sala de cultivos debe permanecer cerrada.

Al momento de trabajar en la sala de cultivo, es sumamente importante hacerlo en condiciones de total asepsia para evitar la contaminación de los cultivos. Para ello es necesario combinar buenas técnicas de laboratorio, equipos de seguridad y las instalaciones adecuadas. Esta combinación dependerá del nivel de bioseguridad con el que se tenga que trabajar.

Las actividades que se realizaron en esta sala fueron: la preparación del stock celular para la realización del ensayo, el descongelamiento y posterior tratamiento con radiofrecuencia de las células y la toma de muestras.

Todo esto se llevó a cabo utilizando el equipamiento de la sala de cultivos (**Figura 11**). Se cuenta con dos cabinas de flujo laminar vertical (*ESCO Class II BSC*) en las que se realizó todo el trabajo con los cultivos, como el repique de la línea celular, el tratamiento de la misma y la toma de muestras. Para el crecimiento de las células, se utilizó una estufa (*SANYO CO₂ incubator*) a 37°C con atmósfera humidificada y 5% CO₂. Además, se usó un microscopio invertido (*Olympus CKX41*) para la visualización del estado de adhesión de las células, grado confluencia y recuento en cámara de Neubauer. En caso de que hubiera contaminaciones, este permitió identificarlas, especialmente con el aumento de 200X. Otros equipos usados fueron el baño termostático (*VICKING Modelo Masson D*), para atemperar el medio de cultivo y otras soluciones estériles antes de colocarlas sobre la monocapa de células ya que estas eran conservadas en heladera a 4°C; una centrífuga de mesada para obtener el pellet de células durante el congelamiento y descongelamiento de las mismas y 2 controladores de pipetas (*Pipet-aid model 4000-220-TC*), los que agilizaron la toma y descarte de los líquidos dentro de la cabina de flujo laminar. Para la preservación de las líneas celulares, se contó con un ultra-freezer (*Righi*) a -80°C y un tanque de nitrógeno a -196°C (*MVE Millenium XC 20*). El primero se usó para guardar los críotubos dentro del contenedor

con isopropanol y así lograr que la temperatura de los mismos vaya descendiendo lentamente. Las células podían mantenerse en este freezer durante varios meses, pero para períodos de tiempos más prolongados, se debían pasar al tanque de nitrógeno.

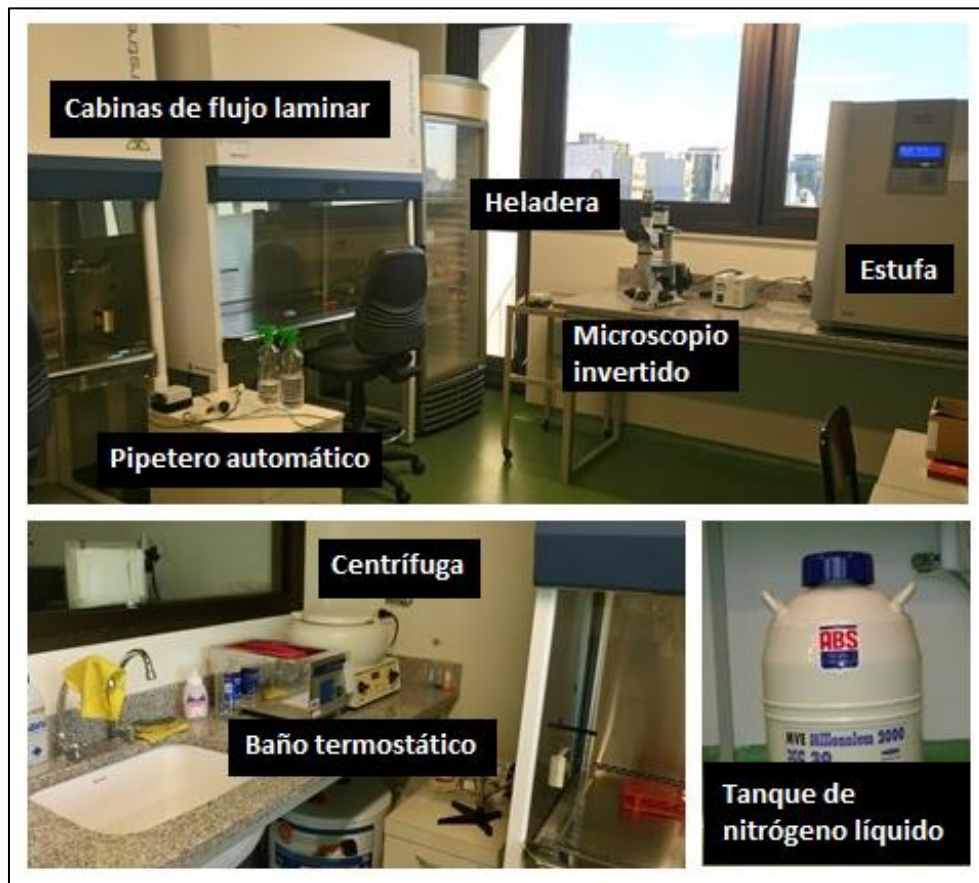


Figura 11: Sala de cultivo celular. En las imágenes se muestra como están dispuestos los equipos usados en la sala. El tanque de nitrógeno líquido, suele estar fuera de la sala de cultivo.

4.1.3. Laboratorio de biotecnología y microbiología

El laboratorio de biotecnología y microbiología se encuentra en el piso n° 9 del edificio UADE Labs. Dicho laboratorio está equipado con 8 mesadas disponibles para su uso como, también, cuenta con las instalaciones eléctricas necesarias para conectar los equipos requeridos y grifos para la limpieza de los materiales utilizados.

En este laboratorio, se llevó a cabo la preparación de las muestras luego de los tratamientos y parte del Western Blot, incluidas la técnica PAGE, la transferencia del gel a la membrana de nitrocelulosa, el bloqueo de la misma y la incubación con los anticuerpos primario y secundario.

4.1.4. Sala de revelado

La misma se localiza en el piso n° 9 del edificio UADE Labs dentro de la Universidad. Esta consta de doble puerta, ambas en color negro que no permiten el traspaso de luz hacia su interior. Además, contiene una lámpara de luz roja, requerida para el revelado de placas en cuarto oscuro, y también está equipada con tubos fluorescentes para los momentos en los cuales no se requiere oscuridad.

Aquí se llevaron a cabo los revelados de las placas, correspondientes a los distintos tratamientos realizados, sobre la mesada disponible en el cuarto.

4.2. Líneas celulares usadas

Se utilizaron tres líneas celulares distintas a lo largo de esta investigación (*Anexo D*): línea celular CHO, línea celular WI-38 y línea celular HaCaT (**Figura 12**).

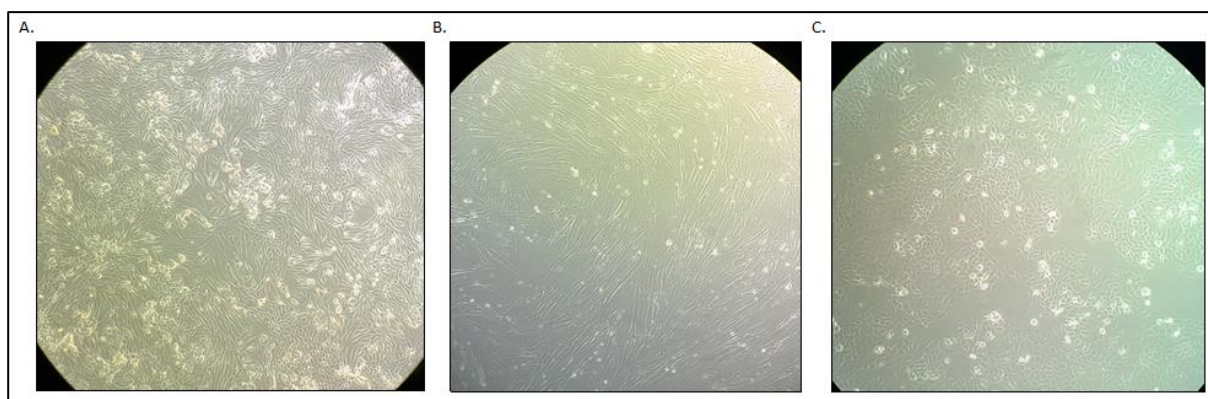


Figura 12: Monocapas subconfluentes de las líneas células usadas observadas en microscopio invertido. Las imágenes están tomadas con un aumento de 100X. **A.** Línea CHO. **B.** Línea WI-38. **C.** Línea HaCaT.

Línea celular CHO (Figura 12, A): Para cultivar esta línea celular se utilizó medio de cultivo DMEM/F12 con agregado de suero fetal bovino (SFB) a una concentración final de 10%. Pasadas dos semanas aproximadamente de la preparación del medio se agregaba glutamina a una concentración final de 2mM. En un momento, también se agregó antibiótico-antimicótico a una concentración final de 100U/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomicina y 0,25µg/ml de anfotericina B (1x), para evitar contaminaciones. Se observó una elevada tasa de crecimiento. Al repicar una placa p100 subconfluyente con una dilución al 1/3, al cabo de 24hs se alcanzaba una confluencia de aproximadamente 90%-100%.

Línea celular WI-38 (Figura 12, B): Para su cultivo se utilizó el mismo medio que el usado con las células CHO (DMEM/F12), con agregado de SFB a un 10% de concentración final, glutamina a 2mM luego de 15 días de preparado el medio y antibiótico-antimicótico a una concentración final de 100U/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomicina y 0,25µg/ml de anfotericina B. Sin embargo, la tasa de proliferación de estas células fue extremadamente baja. Al repicar una botella T75 (80-90% de confluencia) con una dilución al ¼ en placa p100, luego de 2-3 días se llegaba únicamente a confluencia de aproximadamente 60% y el crecimiento se estancaba.

Línea celular HaCaT (Figura 12, C): Esta se cultivó con el mismo medio que las anteriores, con el agregado de SFB a una concentración final de 10%, antibiótico-antimicótico a una concentración final de 100U/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomicina y 0,25µg/ml de anfotericina B y glutamina a una concentración final de 2mM a las 2 semanas de preparado el medio. A este medio completo, se le agregó glucosa a una concentración final de 4,5g/L. La tasa de proliferación de esta línea celular era buena, similar a la observada con CHO. Partiendo de una placa p100 subconfluente, se realizaba un repique al 1/3 y luego de 1 día se llegaba a aproximadamente a un 90% o más de confluencia.

4.3. Mantenimiento de la línea celular

4.3.1. Generación de stock celular

Para generar el stock de células HaCaT, se prosiguió a descongelar un tubo de las mismas en una placa p100 y se esperó que su confluencia sea cercana a 100%. Mientras tanto se realizaron cambios de medio rutinarios para asegurarle a las células el mejor ambiente posible de crecimiento. Se prosiguió a repicar las células con una dilución de 1/3 en placas p100. Alcanzada la confluencia deseada en 3 placas p100 (90% aprox.), se resolvió congelar 15 críotubos, todos pertenecientes al mismo pasaje (pasaje 27). Para esto, se levantó la monocapa celular de cada placa mediante el uso de tripsina y se hizo un *pool* de células, el cual luego se dividió en los 15 críotubos.

Los tubos congelados se mantuvieron en el ultra-freezer (-70°C) hasta su utilización, en lugar de ser posteriormente llevados a nitrógeno líquido. Esto se decidió debido a la pérdida de tubos anteriormente por muerte celular al ser guardadas en este último. A su vez, esto se pudo hacer porque los experimentos se llevarían a cabo en un corto período de tiempo.

Además, previo al congelamiento, se realizó el recuento de células y un ensayo para asegurarse que no existiera contaminación por micoplasma.

4.3.2. Materiales requeridos para el mantenimiento de la línea celular

- Agua bidestilada estéril por autoclave
- Aguja con punta curva
- Antibiótico-antimicótico 100x (10.000 U/ml penicilina, 10.000µg/ml estreptomicina y 25µg/ml anfotericina B; *Anti-Anti 100x Gibco, Life*)
- Baño termostático a 37°C
- Bicarbonato de sodio (NaHCO₃)
- Bomba hidráulica de vacío
- Botellas tipo SHOT de 250ml esterilizadas por autoclave
- Cámara de Neubauer
- Campana de flujo laminar
- Centrífuga de mesada
- Contenedor para congelar críotubos
- Críotubo congelado con células en solución de congelamiento
- Críotubos estériles
- Cubreobjetos de 12mm y portaobjetos
- Estufa a 37°C, atmósfera humidificada y 5% de CO₂
- Etanol 70%
- Gelvatol
- Glutamina estéril 200mM
- Gradillas para tubos Falcon
- Heladera
- Mechero de alcohol
- Medio de cultivo completo estéril (DMEM/F12 con 10% SFB, glucosa 0,45%, anti-anti concentración final 1x (100U/ml penicilina, 100µg/ml estreptomicina y 0,25µg/ml anfotericina B))
- Medio de cultivo DMEM/F12 (Dulbeccos's Modified Eagle Medium Gibco, Life)

- Micropipetas automáticas p1000, p200 y p20 con sus respectivos tips estériles
- Microscopio invertido
- Papel absorbente
- Paraformaldehído 4%
- PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma Aldrich) esterilizado por autoclave
- Pinza pico de pato
- Pipetas serológicas de 2, 5 y 10ml estériles
- Placa de cultivo de 24 pocillos (MW-24)
- Placas con monocapa subconfluente de células HaCaT
- Placas de cultivo estériles
- Sistema de filtración con membrana de nylon de 0,22 micrones esterilizado en autoclave
- Solución de Azul Tripán al 0,4%
- Solución de colorante Hoësch 50ng/ml
- Solución de congelamiento (70% medio DMEM/F12, 20% SFB y 10% DMSO. *Este último se agrega inmediatamente antes de usar*)
- Solución de glucosa al 10% esterilizada por filtración
- Suero fetal bovino (SFB, *Natocor*).
- Tanque de nitrógeno líquido a -196°C
- Tripsina 10x (2,5%, *Gibco*. Se usa a una concentración de 2x (0,5%), diluida en PBS)
- Tritón X-100 0,1% en PBS
- Tubos Eppendorf de 1,5ml
- Tubos Falcon estériles de 15ml y 50ml
- Ultra-freezer a -70°C (*Righi*)
- Vaso de precipitado de 1L

4.3.3. Protocolo para preparación del medio de cultivo

Para preparar 1 litro de medio de cultivo:

1. Pesar 12g de medio DMEM/F12 en conjunto con 2,438g de bicarbonato de sodio dentro de un vaso de precipitado de 1 litro.
2. Agregar agua destilada previamente esterilizada por autoclave y agitar hasta lograr la disolución del polvo.
3. Controlar que el pH sea el correcto (pH 7).
4. Ingresar a la campana de flujo laminar el sistema de filtración. El mismo se conecta a una bomba hidráulica para generar vacío (también debe encontrarse en el flujo laminar).
5. Colocar el medio líquido preparado en la parte superior y encender la bomba.
6. El medio filtrado se obtiene en la parte inferior al filtro y se coloca en frascos *SHOT* estériles de 250ml para su conservación.
7. Conservar en heladera.

Observaciones: el medio se puede conservar un largo período de tiempo en la heladera. Luego de un prolongado período (1 mes o más), se deben realizar controles para descartar posibles contaminaciones. Por otro lado, pasado los 15 días de su preparación se deberá adicionarle glutamina al mismo en una concentración final de 2mM debido a que esta se descompone rápidamente y es esencial para el metabolismo celular.

4.3.4. Protocolo de descongelado

El descongelamiento de un tubo de células, debe llevarse a cabo de la manera más rápida posible para minimizar el crecimiento de cristales de hielo intracelulares durante el proceso de calentamiento (ver diagrama de trabajo en *Anexo I*). A continuación, se describen todos los pasos del protocolo.

Observación: Todo manejo de células se hace dentro del flujo laminar y acorde a la técnica aséptica (Anexo II).

1. Tomar el tubo de células descongeladas del ultra freezer o del tanque de nitrógeno líquido y descongelarlo rápidamente colocándolo en el baño termostático a 37°C. Recordar anotar el nombre de la línea y el pasaje que se está descongelando.
2. Rociar el críotubo con etanol 70% y llevarlo bajo campana.

3. Tomar un tubo Falcon de 15ml y agregar 8ml de medio de cultivo termostatzado a 37°C.
4. Destapar el críotubo y traspasar el medio con células al tubo Falcon del paso número 3.
5. Centrifugar el tubo Falcon de 15ml a 1200rpm por 10 minutos.
6. Rociar el tubo Falcon nuevamente con etanol 70% y llevarlo nuevamente a la campana de flujo laminar.
7. Retirar el sobrenadante.
8. Resuspender el pellet celular por pipeteo suave con medio de cultivo completo. La cantidad depende del tamaño de la placa en la cual se desee descongelar.
9. Colocar la suspensión celular en la placa de cultivo y de ser necesario agregar más medio de cultivo completo.
10. Incubar en estufa a 37°C, atmósfera humidificada y 5% CO₂.

4.3.5. Protocolo de repique de monocapa

Las células HaCaT se propagan como monocapas adherentes. Son células dependientes de anclaje que requieren de la adhesión al sustrato y de un estiramiento para poder proliferar. Llegado el punto donde la concentración de células excede la capacidad de la placa, es decir, cuando la base de la placa se encuentra 100% confluyente, el crecimiento cesa o se reduce de manera notable. Es en estos momentos donde se decide llevar a cabo una división del cultivo (diagrama de trabajo en *Anexo I*).

Observación: Todo manejo de células se hace dentro del flujo laminar y acorde a una buena técnica aséptica (*Anexo II*).

1. De la placa que se desee llevar a cabo el repique, retirar el medio de cultivo.
2. Realizar 2 lavados con PBS de la misma.
3. Agregar la cantidad necesaria de tripsina 2x para cubrir la monocapa celular.
4. Incubar en la estufa hasta observar el levantamiento de células (aproximadamente 30 minutos).

Nota: aunque este proceso suele llevar mucho menos tiempo (alrededor de 10 minutos) para la línea celular HaCaT en las condiciones y reactivos con los que se trabajaba, esto se llegaba a extender a 30 minutos. Recién ahí se lograba levantar la monocapa.

5. Frenar la acción de la tripsina con medio completo.
6. Resuspender las células suavemente con el uso de la pipeta para lograr una suspensión celular homogénea.
7. Colocar la suspensión en un tubo Falcon de 15ml.
8. Dividir la suspensión en la cantidad de placas de cultivo deseadas.
9. Agregar a las placas el medio de cultivo completo necesario para la placa que se esté utilizando.
10. Resuspender suavemente para homogenizar.
11. Incubar en estufa a 37°C, atmósfera humidificada y 5% CO₂.

4.3.6. Protocolo de cambio de medio

Observación: todo manejo de células debe llevarse a cabo en una campana de flujo laminar, manteniendo las condiciones asépticas necesarias (Anexo II).

1. Extraer la placa de cultivo celular a la cual se desea cambiar el medio de la estufa e introducirla dentro del flujo laminar.
2. Retirar el medio de cultivo.
3. Llevar a cabo 2 lavados con PBS y agregar medio de cultivo completo.
4. Reingresar la placa de cultivo a la estufa.

4.3.7. Protocolo de congelamiento de las líneas

Con el objetivo de conservar las células y así minimizar cambios genéticos y el envejecimiento se pueden congelar las mismas (ver en *Anexo I* diagrama del protocolo de congelamiento).

Observación: Todo manejo de células debe llevarse a cabo bajo una campana de flujo laminar, manteniendo las condiciones asépticas necesarias (Anexo II).

1. Revisar lo siguiente en el cultivo de células a congelar:
 - a. Óptimo crecimiento en fase logarítmica.
 - b. Crecimiento libre de contaminaciones.
 - c. Presencia de las características típicas de la línea celular.
2. Preparar la solución de congelamiento (ver componentes en Materiales) y mantener en hielo hasta usar.
3. Retirar el medio de cultivo de la placa celular con las células a congelar.
4. Llevar a cabo 2 lavados con 5ml de PBS.

5. Agregar una suficiente cantidad de tripsina 2x para cubrir la monocapa celular.
6. Incubar en la estufa a 37°C hasta visualizar el levantamiento de las células (30 minutos aproximadamente).
7. Frenar la acción de la tripsina agregando medio de cultivo que contenga 10% SFB.
8. Pipetear suavemente hasta obtener una suspensión celular homogénea.
9. Colocar la suspensión en un tubo Falcon de 15ml.
10. Centrifugar el tubo por 5 minutos a 1200rpm.
11. Descartar el sobrenadante.
12. Resuspender el pellet de células obtenido en la solución preparada en el punto 2.
13. Agregar 1,5ml de la suspensión del punto 12 a cada críotubo a congelar.
14. Colocar los críotubos en el contenedor el cual contiene isopropanol en su interior permitiendo un descenso lento de la temperatura de los críotubos y llevar al ultra freezer a -80°C.
15. Si se desea, para conservar por un largo período de tiempo, al otro día, traspasar los críotubos a un tanque de nitrógeno líquido (-196°C).

4.3.8. Protocolo de recuento de células

Para la criopreservación y para llevar a cabo los experimentos, fue necesario realizar un recuento celular. Para ello se utilizó una **cámara de Neubauer**. Dicho dispositivo consta de un portaobjetos con una depresión en el centro que se encuentra marcado con una cuadrícula. La cuadrícula consiste en un cuadrado de 3x3mm, con una separación entre dos líneas consecutivas de 0,25mm. Se encuentran marcadas cuatro áreas. La solución que cabe dentro de la cámara corresponde a 0,1ml³ (0,1μl). Cabe destacar que por convención no se cuentan aquellas células que se encuentran en el borde superior y en el borde izquierdo. Al contarse las cuatro áreas, observándose una cantidad de células “X” en cada una, la concentración de la suspensión celular se puede calcular con la siguiente ecuación:

$$(células/ml) = (X \text{ células}/4) \times 10 \times 1000 \times \text{inversa de factor de dilución en AT}$$

Asimismo, para lograr diferenciar entre células vivas y muertas se puede utilizar solución de Azul Tripán. Aquellas células que no se encuentren viables han perdido su permeabilidad selectiva y por ende se tiñeran de azul, mientras que las células viables expulsaran el colorante y permanecerán incoloras.

Los pasos de este protocolo se describen a continuación.

1. Tomar una alícuota (0,5ml - 1ml) de la solución celular y colocarla en un tubo Eppendorf.
2. Agregar Azul de Tripán para una dilución final de las células de 2/3.
3. Lavar la cámara de Neubauer con abundante agua, secar y luego rociarla con etanol 70%. Mojar los bordes de la cámara con agua y colocar el vidrio encima.
4. Tomar 10µl de la solución y cargar la cámara de Neubauer.
5. Contar las células viables (incoloras con refringencia verdosa) en cada uno de los cuadrantes y estimar la concentración celular en la suspensión utilizando la formula mencionada previamente. Este valor corresponde al número de células viables en 1ml de suspensión. Para conocer el total de células presentes en la botella o tubo original deberá multiplicarse este valor por el volumen total de la misma.

4.3.9. Protocolo para determinación de contaminación por micoplasma

La contaminación por micoplasma puede alterar el cultivo y su metabolismo de una manera sutil. Es por esto, que es necesario asegurar que no se encuentran presentes. Las contaminaciones por micoplasma no pueden ser detectadas simplemente al observar las células por microscopio, pero sí puede detectarse mediante tinción fluorescente. Para ello se llevó a cabo la tinción de los núcleos con el **colorante de Hoechst**. A través de este método se logra ver a los micoplasmas, si es que se encuentran presentes, como filamentos delgados en el citoplasma de las células, al ser observadas en una magnificación de 400X. A pesar de que el núcleo de las células deseadas también se tiñe, se diferencian de la contaminación por su mayor tamaño (ver diagrama de protocolo de tinción con Hoescht en *Anexo I*).

Los pasos para llevar a cabo la tinción de las células con Hoescht se detallan a continuación.

Observación: los siguientes pasos se deben realizar en una campana de flujo laminar, manteniendo las condiciones asépticas necesarias (Anexo II).

1. Agregar en un MW-24 cubreobjetos estériles por flameado con el mechero de alcohol en la base de cada pocillo.
2. Plaquear células HaCaT en el MW-24 que contiene los cubreobjetos e incubar en la estufa durante 24hs para que las células se adhieran al vidrio.
3. Retirar el medio de cultivo de cada pocillo.
4. Agregar paraformaldehído al 4%, cubriendo el cubreobjetos.
5. Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente.
6. Retirar el paraformaldehído y realizar 2 lavados con PBS.
7. Permeabilizar las células incubándolas 5 minutos con 0,1% de tritón X-100 en PBS.
8. Retirar el tritón X-100 y lavar 2 veces en PBS al igual que indicado en el punto 6.
9. Asegurarse que los cultivos se encuentren por fuera de la luz y proseguir a agregar 10µl de dilución de colorante H \ddot{o} echst a cada pocillo.
10. Incubar 1 hora en la estufa a 37°C.
11. Extraer el colorante y realizar 2 lavados.
12. Colocar una gota de Gelvatol en los portaobjetos (la cantidad depende del número de cubreobjetos utilizados).
13. Retirar cada cubreobjetos del MW-24 y montarlo boca abajo sobre la gota de Gelvatol.
14. Dejar secar.
15. Observar el resultado de la tinción en microscopio de fluorescencia.

4.4. Tratamientos con equipo de radiofrecuencia

4.4.1. Tratamientos elegidos y modo de aplicación a las placas de cultivo celular

El equipo de radiofrecuencia utilizado contaba con una perilla para regular la potencia de radiación. Para estudiar si esta radiación afectaba la remodelación de la matriz en los cultivos celulares, se optó por trabajar con 3 potencias distintas y así poder comparar los posibles efectos de distintos niveles de radiación. Para asegurarse que siempre se usaba la

misma potencia en cada uno de los tratamientos, se marcó la posición de la perilla para cada uno de estos (**Figura 13**).

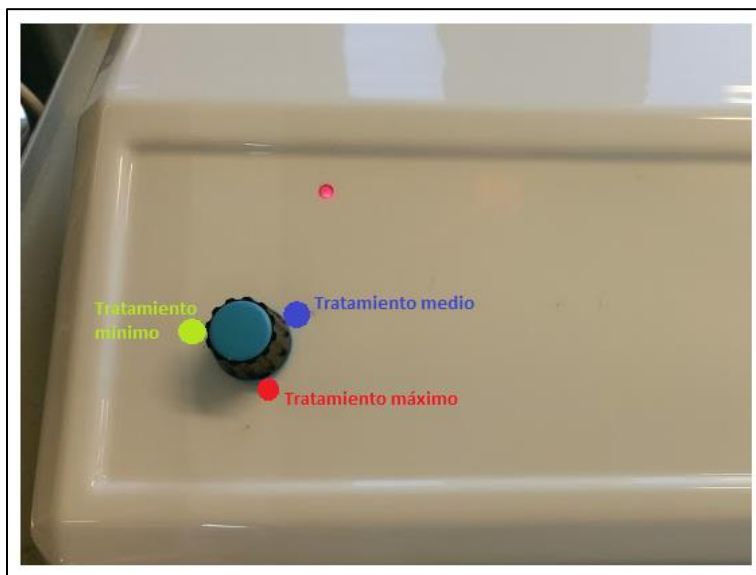


Figura 13: Posición de la perilla reguladora de la potencia, según el tratamiento a realizar.

A su vez, para acentuar las diferencias entre los tratamientos, se decidió aplicarlos durante lapsos de tiempo distintos, basándose en la premisa de que, a mayor tiempo de exposición, mayor efecto térmico (Nicoletti *et al*, 2014). Estos tiempos fueron fijados según lo que se usa normalmente en los tratamientos de estética, que son exposiciones de entre 15 minutos y 1 hora (Sitio web de Galmed). Por otro lado, debido al estrés que le genera a la célula salir de la estufa, se concluyó que los tiempos seleccionados fueran de 1 hora o menos.

Los 4 tratamientos definidos fueron los siguientes:

- *Tratamiento mínimo:* Aplicación de ondas de radiofrecuencia a las placas por 15 minutos con una potencia mínima;
- *Tratamiento medio:* Aplicación de ondas de radiofrecuencia a las placas por 30 minutos con una potencia media;
- *Tratamiento máximo:* Aplicación de ondas de radiofrecuencia a las placas por 1 hora con una potencia máxima;
- *Grupo control:* No se le aplicó ningún tratamiento con el electrodo.

Para equiparar el tiempo de las placas fuera de la estufa, todas permanecieron por 60 minutos totales en el flujo laminar, consistiendo de la duración del tratamiento y el tiempo

extra requerido para alcanzar la hora. En el caso del grupo control, en este tiempo sólo se dejaron las placas en un flujo sin ser sometidas a tratamiento alguno.

En los centros de estética, los tratamientos de radiofrecuencia se realizan colocando el electrodo sobre la piel del paciente y realizando movimientos circulares por toda la zona que se desea tratar. Sin embargo, en este trabajo el uso de cultivos celulares impidió que el electrodo pudiese colocarse directamente sobre la monocapa de células. En primer lugar, el hecho de introducir algo no estéril en el medio de cultivo, iba a causar la contaminación y la consecuente pérdida del cultivo. En segundo lugar, el apoyar el electrodo sobre las células adheridas causaría daños sobre las mismas, provocándoles más estrés, lo que condicionaría todo el trabajo posterior con las mismas. Por lo tanto, el **modo de aplicación del electrodo** fue apoyar el mismo sobre la tapa de la placa. Para esto, el electrodo fue sostenido con una pinza 3 dedos que estaba agarrada por el otro extremo a un pie universal, permitiendo fijar la altura deseada (**Figura 14, izquierda**). Las placas de cultivo seleccionadas para realizar el ensayo, fueron las p35 ya que el diámetro de estas era casi el mismo que el del electrodo de radiofrecuencia (**Figura 14, derecha**).



Figura 14: Modo de aplicación de los tratamientos a las placas de cultivo. El equipo de radiofrecuencia se mantenía en el exterior del flujo laminar, mientras que solo se introducía en el mismo el electrodo. Este último fue sostenido por un trípode para poder fijar la posición correcta sobre cada placa a tratar, como se muestra en la figura de la izquierda. En la figura de la derecha se observa cómo se aplicaba el tratamiento a placas p35 dentro del flujo laminar.

4.4.2. Caracterización de los tratamientos de radiofrecuencia elegidos

Mediante el uso del osciloscopio y el wattímetro presentes en el Laboratorio de Electrónica y Telecomunicaciones (L1101), se midieron ciertos parámetros del equipo de radiofrecuencia con el objetivo de conocer en mayor profundidad los tratamientos a los cuales las células iban a ser sometidas.

En el caso del osciloscopio, las mediciones se realizaron colocando la punta de medición en contacto con el interior del cabezal de radiofrecuencia. De esta manera, se obtuvieron dos parámetros físicos: la amplitud y período de la onda (**Figura 15**).

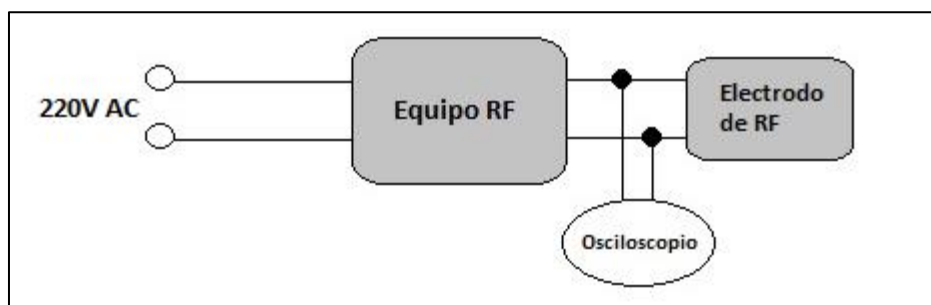


Figura 15: Esquema de medición de parámetros físicos del equipo de radiofrecuencia con el osciloscopio.

En el caso de la **amplitud de la onda** refiere al valor máximo que alcanza la onda con respecto al cero. Además, debido a que la señal del electrodo de radiofrecuencia es una señal periódica, se pudo obtener el valor del **período de la onda**, entendiéndose a este como el tiempo que transcurre entre 2 puntos equivalentes de la onda. A su vez, también se obtuvo el valor de la **frecuencia de onda**, cuyo valor es igual a la inversa del período.

Por otro lado, se buscó obtener el valor de la **potencia** del equipo, debido a que se quería conocer si la misma realmente variaba entre las 3 potencias elegidas para realizar los tratamientos a los cultivos celulares. La potencia del equipo es la energía que el equipo entrega por unidad de tiempo, medida en este caso en Watt (Joule/segundo). Los valores de potencia que se obtuvieron fueron los de energía consumidos por el equipo, utilizando el wattímetro (**Figura 16**). La potencia que consume el equipo es proporcional a la entregada.

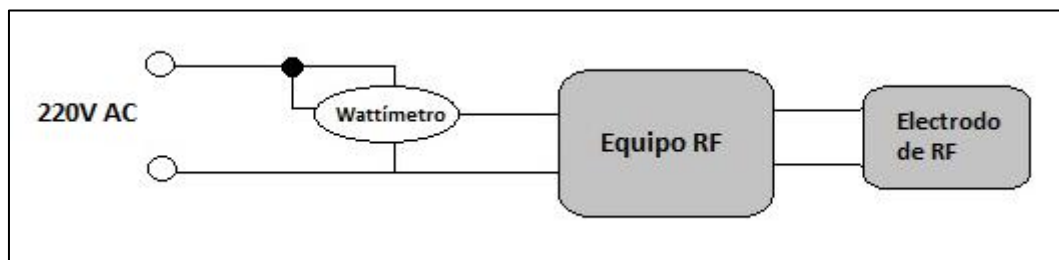


Figura 16: Esquema de medición de parámetros físicos del equipo de radiofrecuencia con el wattímetro.

Aparte de los resultados de los parámetros físicos recién mencionados, se realizaron mediciones de temperatura a las placas de cultivo luego de tratarlas con cada uno de los tratamientos definidos. La aplicación de radiofrecuencia sobre la piel se sabe que causa un efecto térmico, elevando la temperatura de la misma según la potencia y la duración de la aplicación (Nicoletti *et al*, 2014). Por este motivo, se buscó medir la temperatura del medio de cultivo luego de cada tratamiento para saber si este efecto se daba o no.

Para realizar la medición de la temperatura del medio de cultivo, se utilizó un **termómetro infrarrojo o de sin contacto** ya que de esta manera no se corría riesgo de contaminar el medio de cultivo de las placas y la medición solo tardaba unos segundos. Esta se realizó sobre el medio de cultivo, con la placa abierta, apuntando el termómetro hacia el mismo. También, se midió la temperatura del electrodo. Esta medición se llevó a cabo para cada potencia. Esto se llevó a cabo dentro del flujo laminar, pero, apagándolo antes de la medición para que la corriente de aire no interfiriera en las mediciones. Estas mediciones se realizaron 3 veces a modo de prueba y luego se descartaron las placas, ya que al apagar el flujo laminar se pone el riesgo la esterilidad del aire dentro del mismo y, en consecuencia, del medio de cultivo.

4.5. Condiciones de obtención del extracto proteico

Una vez elegidas las condiciones en las cuales se realizarían los tratamientos se tuvo que decidir la forma más conveniente de obtener las muestras, es decir, el extracto proteico. Para esto, sabiendo que el colágeno tipo I y SPARC, son proteínas secretadas por las células se optó por utilizar como muestra el *medio condicionado* de las mismas. Para obtenerlo, luego de cada tratamiento se dejó cada una de las placas 2hs dentro de la estufa para que se recuperen. Pasado este tiempo, se cambió el medio de las células para comenzar con el condicionamiento del medio.

Además, hubo que decidir cuál iba a ser el *tiempo para condicionar el medio y el volumen de medio a condicionar*. En cuanto al tiempo, se decidió que fuera de 48hs para prevenir la muerte celular y pérdida de medio por evaporación. Por otro lado, el volumen seleccionado para condicionar fue 0,6ml.

Debido a que las proteínas en la muestra estaban muy diluidas, fue necesario concentrar las mismas. El primer método utilizado consistió en el uso de sistemas filtrantes denominados *Centricones*. El segundo método probado y el que fue elegido para el ensayo final fue la precipitación de proteínas con *acetona*.

Aunque esa fue la muestra seleccionada para la realización de los ensayos, en un principio hasta poner a punto la técnica de concentración de proteínas de la muestra, se trabajó con el *lisado de células* para avanzar con la puesta a punto de los pasos siguientes a la obtención de la muestra (corrida en geles PAGE y transferencia).

Para lograr una mejor *conservación de la muestra*, se determinó agregar inhibidores de proteasas. Se utilizó un cóctel comercial de estos inhibidores con el agregado de EDTA (1mM final). El coctel que se encontraba disponible en la universidad pertenecía a la marca *Calbiotech*.

4.5.1. Materiales requeridos para la obtención del extracto proteico

- Acetona pre-enfriada a -20°C
- Baño termostático a 100°C
- Baño termostático a 37°C
- Buffer de carga reductor 5x (60mM de Tris-Cl pH 6,8; 25% de glicerol; 2% de SDS; 100mM de DTT y 0,1% de azul de bromofenol)
- Buffer de lisis (5ml de Tris-Cl 1M pH 8; 1ml de EDTA 0,5M pH 8; 5ml de SDS 10% y 489ml de agua bidestilada)
- Campana de flujo laminar
- Centrífuga refrigerada
- Coctel de inhibidores de proteasas + EDTA 0,5M
- Críotubo del stock celular
- Equipo de radiofrecuencia
- Estufa a 37°C, atmósfera humidificada y 5% de CO₂
- Freezer a -20°C

- Heladera a -4°C
- Medio de cultivo DMEM/12 con 10% de SFB
- Medio de cultivo para condicionamiento (DMEM/F12 con agregado de 0,45% glucosa, anti-anti a una concentración de 100U/ml de penicilina, 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomycin y 0,25 $\mu\text{g/ml}$ de anfotericina B)
- PBS estéril por autoclave
- Placas de cultivo p35
- Sistemas de filtración Centricones Amicon[®] Ultra-2ml
- Tripsina 2x (diluida en PBS)
- Tubos Eppendorf de 1,5ml estériles
- Tubos Falcon de 15ml
- Ultra-freezer a -70°C

4.5.2. Protocolo de aplicación del tratamiento con radiofrecuencia

Observación: los siguientes pasos se deben realizar en una campana de flujo laminar, manteniendo las condiciones asépticas necesarias (Anexo II).

1. Descongelar un críotubo del stock y sembrarlo en 12 placas p35, como lo indica el protocolo correspondiente.
2. Conservar en estufa a 37°C con atmósfera humidificada y 5% CO_2 , durante 5 días para que alcancen la confluencia deseada (70%-90%), haciendo un único cambio de medio para mantener las condiciones óptimas de crecimiento.

Para cada placa:

3. Aplicar el tratamiento correspondiente a cada placa como se determinó anteriormente (ver en *Anexo I* esquema representativo de este protocolo).
4. Pasada 1 hora desde la salida de la placa, volver a colocarla en la estufa por 2hs.
5. Extraer el medio de cultivo de la placa y realizar 2 lavados con 0,5ml de PBS.
6. Colocar 0,6ml de medio de condicionamiento.
7. Llevar nuevamente la placa a la estufa a 37°C , atmósfera humidificada y 5% CO_2 .

8. Luego de 48hs, retirar el medio condicionado y colocar el mismo en un tubo Eppendorf de 1,5ml. Los medios de las placas que fueron sometidas al mismo tratamiento se juntan en un único tubo Eppendorf.
9. Adicionar al tubo, inhibidor de proteasas para una concentración de 1:200 final + EDTA 1mM final.
10. Conservar en freezer -20°C.

4.5.3. Protocolo de precipitación de proteínas con acetona y preparación del extracto proteico para corrida por SDS-PAGE

1. Preparar stock del **buffer de carga reductor 5x** con los componentes que se indican en la lista de materiales y llevar a las concentraciones finales indicadas con agua bidestilada.
2. Descongelar los tubos Eppendorf con las muestras de los 4 tratamientos de cada experimento.
3. Centrifugar a máxima velocidad (14000rpm) por 1 minuto a cada tubo.
4. Traspasar cada uno de los sobrenadantes a distintos tubos Falcon de 15ml rotulando apropiadamente cada uno.
5. Adicionar 3 volúmenes de acetona (pre-enfriada a -20°C) a todos.
6. Incubar en el ultra freezer (-80°C) ON (ver en *Anexo I* esquema representativo de este protocolo).
7. Pasar de 1,5ml del contenido del Falcon a tubos Eppendorf (rotulados correctamente con cada tratamiento) y centrifugar los mismos a máxima velocidad (14000rpm) por 20 minutos. Descartar sobrenadante y agregar otros 1,5ml del mismo Falcon a cada Eppendorf. Repetir esto hasta que se haya pasado todo el volumen del Falcon inicial.
8. Resuspender los pellets obtenidos en 40µl de buffer de carga reductor 1x (se diluye el buffer 5x en PBS).
9. Incubar los tubos en un baño maría a 100°C por 5 minutos (*crackeo de muestra*).
10. Enfriar en heladera (4°C).

4.5.4. Protocolo de uso de Centricones y preparación del extracto proteico para corrida por SDS-PAGE

1. Armar el Centricon como muestra la figura a continuación, colocar el medio condicionado en la zona de filtrado y luego poner la tapa en la parte superior (**Figura 17, izquierda**).

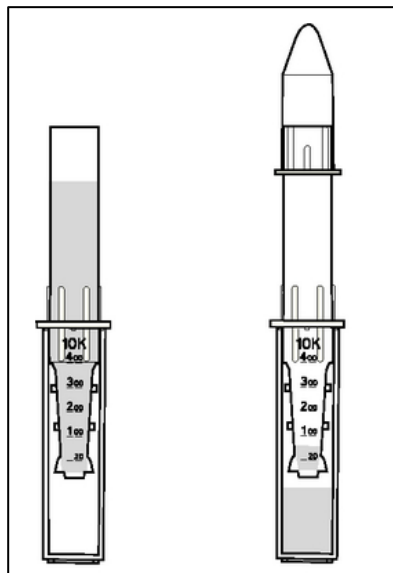


Figura 17: Armado del Centricon para obtención de la muestra concentrada. La figura de la izquierda muestra dónde colocar la muestra a concentrar y en la de la derecha se observa cómo queda la muestra luego de la centrifugación.

2. Colocar el Centricon con la muestra en la centrífuga y centrifugar a 4°C durante 1h, 2hs o 3,5hs, según la concentración a la que se quiera llegar (**Figura 17, derecha**).
3. Sacar el tubo de descarte de la parte de abajo del Centricon y colocar el Centricon invertido en la centrífuga (**Figura 18**).

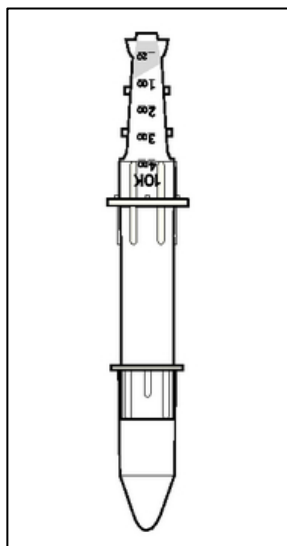


Figura 18: Posición del Centricon en la centrífuga para recolectar la muestra concentrada.

4. Centrifugar a 4°C durante 2 minutos a 1000rpm para obtener la muestra concentrada en el tubo con punta.
5. Retirar la muestra del tubo con punta y colocarla en un tubo Eppendorf.
6. Adicionar el coctel de inhibidor de proteasas en una concentración de 1:200 y EDTA 1mM final.

Observación: este protocolo se puede detener en este punto y guardar las muestras en freezer a -20°C o continuar inmediatamente con el crackeado de las mismas.

7. Agregar la cantidad necesaria de buffer de muestra reductor 5x y colocar en un baño térmico a 100°C durante 5 minutos (*crackeo de muestras*).
8. Dejar enfriar y sembrar en gel SDS-poliacrilamida o guardar en freezer a -20°C.

4.5.5. Protocolo de lisis celular y preparación del extracto proteico para corrida por SDS-PAGE

1. Preparar el **buffer de lisis** como se indica en la lista de materiales requeridos.
2. Retirar el medio de la placa de cultivo.
3. Realizar 2 lavados con PBS. Para p100: 5ml para cada lavado; para p35: 1ml para cada lavado.

4. Agregar la tripsina 2x a la placa e incubar a 37°C durante 20-30 minutos. Para p100: 1ml; para p35: 0,3ml.
5. Inactivar la tripsina adicionando el medio con suero. Para p100: 9ml; para p35: 1,5ml.
6. Disgregar completamente las células subiendo y bajando el líquido varias veces con la pipeta y luego colocar todo en un tubo Falcon.
7. Centrifugar el tubo Falcon a 1200rpm durante 10 minutos.
8. Resuspender el pellet en buffer de lisis y pasar todo el volumen a un tubo Eppendorf. El volumen de buffer usado para p100: 1,2ml y para p35: 0,5ml.
9. Adicionar el coctel inhibidor de proteasas 1:200 y EDTA a 1mM final.
Observación: el protocolo puede ser detenido en este paso y guardar las muestras en freezer a -20°C hasta que tengan que ser usadas y ahí continuar con los siguientes pasos o se puede continuar inmediatamente con el crackeo.
10. Agregar cantidad necesaria de buffer de muestra reductor 5x y colocar en baño térmico a 100°C durante 5 minutos (*crackeo de muestra*).
11. Dejar enfriar y sembrar en gel SDS-poliacrilamida o guardar en freezer a -20°C hasta que tenga que ser usado.

4.6. SDS-PAGE y Western Blot

La técnica seleccionada para estudiar la proteína de interés fue la de Western Blot o Inmunoblotting. Esta involucra transferir las proteínas de una muestra a un soporte sólido y luego sobre este realizar la detección de la molécula target. En este caso, las muestras primero fueron corridas en un gel por SDS-PAGE, y a continuación transferidas a una membrana de nitrocelulosa por un método húmedo. Finalmente se detectó la molécula target por una reacción de quimioluminiscencia.

El primer paso involucró la electroforesis de proteínas en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE), la cual presenta distintas variantes. La elegida para este ensayo fue un sistema buffer discontinuo, el cual permite obtener bandas con mejor resolución. Este se prepara con dos tipos de geles: el gel de separación, el cual tiene un pH más ácido y menor tamaño de poro, lo que permite que este tenga un efecto tamiz; y el gel de *stacking* o apilamiento, el cual tiene un pH más alcalino y mayor tamaño de poro. En este último, se produce lo que se denomina “efecto sándwich”, en el cual las proteínas quedan entre los iones glicina y cloruro

a causa de las diferencias de movilidad que estos poseen. De esta manera se concentran las proteínas en una delgada línea, entrando todas en el mismo momento al gel de separación. Además, la corrida se realiza utilizando un buffer de muestra con SDS y agentes desnaturizantes. Las muestras luego de ser resuspendidas en este buffer se someten a un proceso de *crackeo*. Luego de esto las distintas proteínas de la muestra se encuentran totalmente desnaturizadas y cargadas negativamente. Por lo tanto, la velocidad a la cual va a migrar cada proteína en el gel de separación depende exclusivamente de su tamaño. Esto permite hacer una estimación del tamaño molecular de las mismas al correr con estas un marcador de peso molecular. Para la preparación y corrida de estos geles se usaron todos los componentes del sistema Mini-PROTEAN[®] Tetra Cell, de Bio Rad (Manual de instrucciones del Mini-PROTEAN[®] Tetra Cell).

Una vez obtenido el gel, se prosiguió a la transferencia de las proteínas a un soporte sólido o “blotting”, en este caso una membrana de nitrocelulosa. El equipo de transferencia que se utilizó fue el Mini Trans-Blot[®] Cell, el cual se basa en el método de transferencia húmeda o en tanque. Esta inmovilización de las proteínas deja que luego se pueda llevar a cabo una detección específica del target, en este caso la glicoproteína SPARC, mediante el uso de anticuerpos. En esta última parte, primero se debe incubar la membrana con el anticuerpo primario y posteriormente con el anticuerpo secundario, del cual depende el método de revelado (Manual de instrucciones del Mini-Trans Blot Cell).

Los anticuerpos usados durante el trabajo fueron un anti-colágeno tipo I comercial (*Anti-collagen type I, Abcam*) y un anti-SPARC, producido por el hibridoma AON-1. Como anticuerpos secundarios, se eligieron anticuerpos contra IgG de conejo y ratón, respectivamente. Ambos estaban conjugados con peroxidasa y fueron producidos en cabra (*Anti-rabbit IgG (Fc specific)-peroxidase antibody produced in goat, Sigma Aldrich; Anti-mouse IgG (Fc specific)-peroxidase antibody produced in goat, Sigma Aldrich*). Estos últimos tenían unido la peroxidasa de rabanito (HRP, por *horseradish peroxidase*) haciendo que el método final de revelado sea por detección de luminiscencia. Debido a esto, se utilizó un reactivo con luminol (*Pierce[®] ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific*) el cual tiene el sustrato con el que la HRP emite luz. El último paso fue exponer placas radiográficas en un cuarto oscuro y en estas quedaron impresas las bandas correspondientes a las proteínas blanco.

Se realizó también la detección de proteínas totales en las muestras. Se probaron 2 tinciones distintas. Por un lado, se llevó a cabo la tinción de geles con **Azul Coomassie** y, por otro lado, se tiñeron las membranas con **Rojo Ponceau**. Para esto se corrían geles por duplicado, así se podía teñir uno con la primera tinción y transferir el otro a la membrana de nitrocelulosa para a continuación teñirla con la segunda. Estas se realizaron ya que los límites de detección de ambas tinciones son distintos, por lo que había que asegurarse que para ambas el resultado era positivo. En el caso de la tinción de Coomassie el límite de detección es más chico, por lo que permite ver muestras más diluidas. Sin embargo, la desventaja de esta tinción, es que es un proceso irreversible sobre el gel. Por su parte, la tinción con Rojo Ponceau, aunque su límite de detección sea mayor que el de la anterior, es un procedimiento reversible, pudiéndose seguir con los pasos posteriores del WB sin problema.

Además, se probó utilizar como *housekeeping* o control de carga la proteína **actina** dado que el anticuerpo para la misma se encontraba disponible en la universidad.

A continuación, se detallan los todos los protocolos.

4.6.1. Materiales requeridos para la electroforesis por SDS-PAGE y para la realización del Western Blot

- Acrilamida/bisacrilamida 29,1:0,9 (*Acrilamide-bis ready-to-use 29,1:0,9 40%, MERCK*)
- Agitador orbital
- Agua bi-destilada
- Anticuerpo primario anti-SPARC (producido por el hibridoma AON-1)
- Anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con HRP
- APS 10% (persulfato de amonio) (*Sigma-Aldrich*)
- **Buffer de apilamiento o *stacking* 4x** (6g de Tris en 40ml de agua bidestilada; agregar HCl hasta pH 6,8; 4ml de SDS 10% y llevar hasta 100ml con agua bidestilada)
- **Buffer de corrida 10x** (144g de glicina; 30g de Tris y 10g SDS en 1L de agua bidestilada)
- **Buffer de separación 4x** (18,2g de Tris en 40ml de agua bidestilada; agregar HCl hasta pH 8,8 4ml de SDS 10% y agua bidestilada hasta 100ml)

- **Buffer de transferencia 10x** (144g de glicina y 30g de Tris en 1L de agua bidestilada)
- Cassette
- Componentes del sistema Mini Trans-Blot[®] Cell
- Componentes del sistema Mini-PROTEAN[®] Tetra Cell
- ECL (*Pierce[®] ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific*)
- Folio
- Fuente de poder
- Heladera (4°C)
- Horno de hibridación
- Marcador de peso molecular (*Amersham[™] LMW Calibration kit for SDS Electrophoresis*)
- Membrana de nitrocelulosa de 6x9cm
- Metanol
- Papeles de filtro Wattman de 6x9cm
- PBST (PBS con 0,05% de Tween-20)
- Placas autoradiográficas (*AGFA*)
- Recipiente plástico
- **Solución de bloqueo a 2 y 5%** (PBS con 2 o 5%p/v de leche en polvo descremada)
- **Solución de desteñido de Azul de Coomassie** (20ml de metanol; 10ml de ácido acético y 70ml de agua bidestilada)
- **Solución de Rojo Ponceau** (5mg de colorante; 5ml de ácido acético y 95ml de agua bidestilada)
- **Solución de stripping** (0,1M de β-mercaptoetanol; 2%p/v de SDS y 0,06M de Tris-Cl pH 7, en agua bidestilada)
- **Solución de tinción con Azul de Coomassie** (0,2g de colorante en 25ml de agua bidestilada; 7,5ml de ácido acético; 50ml de etanol y 17,5ml de agua bidestilada)
- Solución fijadora (*GBX Carestream Dental*)
- Solución reveladora (*GBX Carestream Dental*)
- TEMED (N, N, N', N''-tetrametiletilendiamina 99%) (*Sigma-Aldrich*)

- Tubos Falcon de 15ml

4.6.2. Protocolo de electroforesis por SDS-PAGE

1. Preparar los geles de poliacrilamida, primero el de separación y luego el de apilamiento según las proporciones correspondientes, esperando 10 y 15 minutos, respectivamente para que polimerice la acrilamida (*tabla 4*).

Reactivo	Gel de separación 12,5%	Gel de apilamiento 5%
<i>Agua bidestilada</i>	1650µl	1740µl
<i>Acrilamida/bisacrilamida</i>	2000µl	420µl
<i>Buffer de separación 4X</i>	1250µl	-
<i>Buffer de apilamiento 4X</i>	-	320µl
<i>TEMED</i>	10µl	5µl
<i>APS 10%</i>	30µl	25µl

Tabla 4: Reactivos y cantidades necesarias para la preparación de un gel discontinuo de SDS-poliacrilamida usando el sistema Mini-PROTEAN® Tetra Cel.

2. Armar los geles en los vidrios contenedores, luego de sujetarlos en los soportes correspondientes (**Figura 19**).

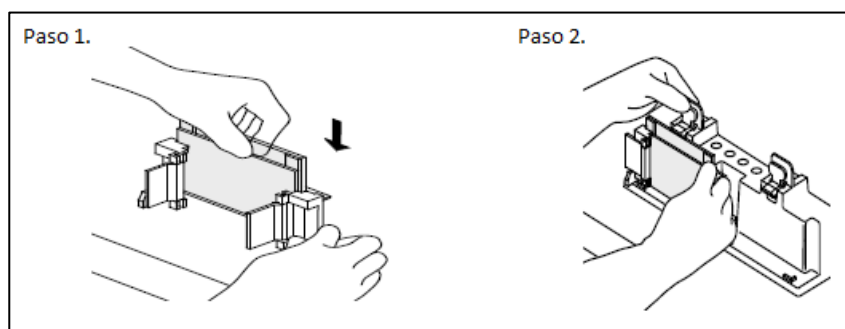


Figura 19: Ensamblado de los vidrios contenedores en el soporte sostenedor para la preparación de los geles. Fuente: *Manual de instrucción del Mini-PROTEAN® Tetra Cell.*

3. Colocar los vidrios contenedores con los geles en el ensamblador. Una vez esto armado, ubicar todo dentro del tanque de electroforesis (**Figura 20**).

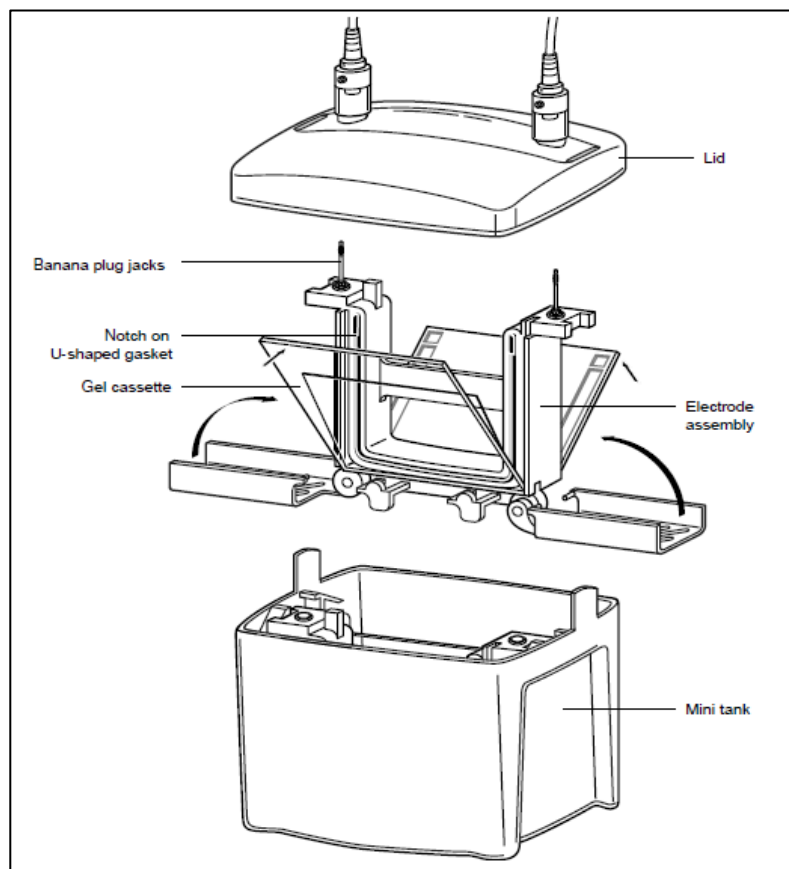


Figura 20: Ensamblaje de los componentes de la celda para siembra y corrida de los geles de poliacrilamida. Fuente: *Manual de instrucción del Mini-PROTEAN® Tetra Cell.*

4. Sembrar 5 μ l de marcador de peso de proteínas y 20 μ l de cada muestra (tratamiento control, mínimo, medio y máximo).
5. Conectar la fuente de poder a la cuba de electroforesis y correr los geles durante 90 minutos aproximadamente, fijando el voltaje en 120V.
6. Sacar el gel de los vidrios contenedores y cortar el gel de apilamiento para descartarlo. El gel de separación es cortado en uno de sus extremos para tener un punto de referencia. Continuar inmediatamente con el protocolo de Immunoblotting.

4.6.3. *Protocolo de Immunoblotting*

1. Sumergir el gel obtenido en el protocolo anterior, la membrana de nitrocelulosa, los papeles de filtro y esponjas en el buffer de transferencia 1x con 20% de metanol pre-enfriado a 4°C durante 15 minutos.

2. Armar el “sándwich” con todos los componentes recién mencionados en el cassette contenedor en el orden correcto y cerrarlo firmemente. Colocar en el módulo contenedor en la orientación correcta (**Figura 21**).

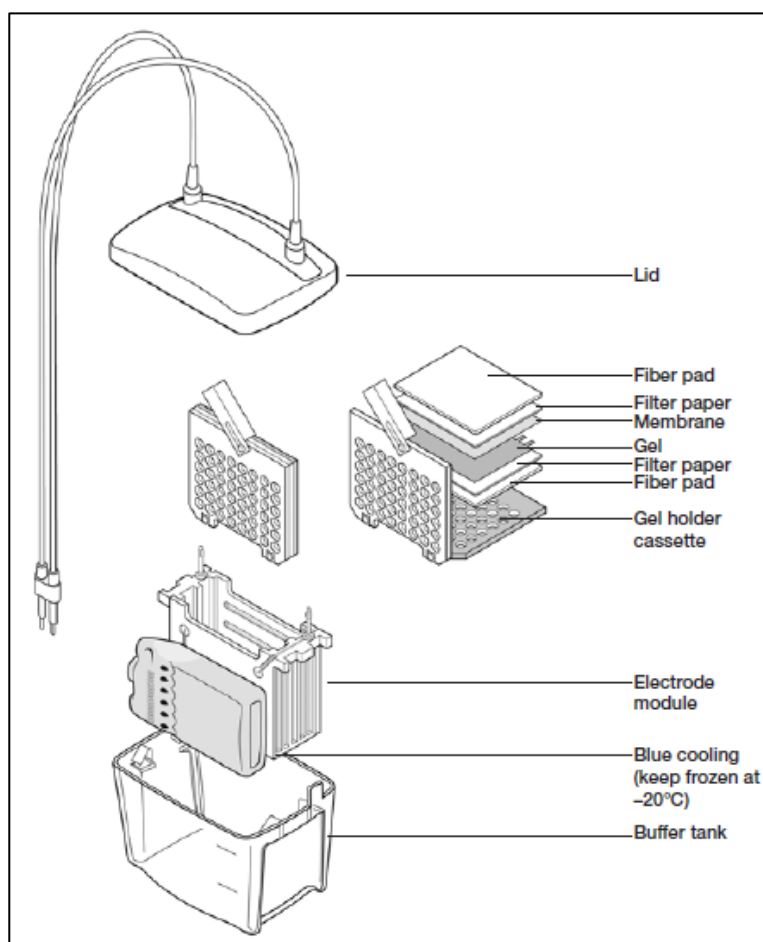


Figura 21: Ensamblado de los componentes de la celda de transferencia y orden de los materiales que van dentro del cassette de transferencia. Fuente: *Manual de instrucción del Mini-Trans Blot Cell*.

3. Agregar al módulo una unidad de enfriamiento y rellenar con buffer de transferencia pre-enfriado a 4°C (**Figura 21**).
4. Conectar a la fuente de poder y transferir por 90 minutos a un voltaje constante de 100V.
5. Retirar cuidadosamente la membrana del “sándwich” y realizar un corte de referencia para poder luego identificar el lado en el que se adhirieron las proteínas.

Observación: este procedimiento se puede detener en este punto dejando secar la membrana al aire y guardándola luego entre papeles de filtro o se puede continuar con los siguientes pasos.

6. Realizar la tinción de la membrana con Rojo Ponceau (detallado en la siguiente sección).
7. Colocar la membrana en solución de bloqueo al 5% a temperatura ambiente (RT) con agitación constante durante 1 hora.
8. Incubar con el anticuerpo primario 1:100 (diluido en solución de bloqueo al 2%) ON a 4°C en agitación.

Observación: este paso se realizó colocando las membranas en bolsitas de nylon selladas herméticamente por calor y luego estas se colocaron en la superficie del shacker orbital sujetándolas firmemente con cinta adhesiva. Todo esto se colocó en la heladera hasta el otro día.

9. Retirar la membrana de la solución anterior y realizar 3 lavados con PBST 0,05% de 5 minutos cada uno.
10. Sumergir la membrana lavada en el anticuerpo secundario 1:2000 (diluido en solución de bloqueo al 2%) a RT por 90 minutos.
11. Repetir los mismos lavados que en el paso 16.
12. Colocar la membrana en un recipiente plano con la cara que tiene adheridas las proteínas hacia arriba y cubrirla con 500µl del reactivo ECL durante 1 minuto.

Observación: para optimizar este paso, se inclinaba el recipiente y se volvía a rociar la membrana con el ECL varias veces, asegurándose que le llegue a toda la superficie.

13. Escurrir sobre un papel absorbente el excedente del reactivo sosteniendo la membrana desde una punta con una pinza y ubicarla dentro del folio evitando que queden burbujas en la superficie.
14. Ubicar el folio en el cassette con el lado de la membrana con las proteínas transferidas hacia arriba.

Observación: antes del siguiente paso, se le pegó al folio stickers luminiscentes delimitando la membrana para tener una referencia luego del revelado.

15. En **cuarto oscuro**, sacar las placas radiográficas de su envoltorio y poner una sobre la membrana en el cassette durante el tiempo necesario (entre 1 y 5 minutos).
16. Pasar la placa expuesta a la solución reveladora y agitar continuamente durante unos segundos.
17. Tomarla de una esquina y pasar a un recipiente con agua corriente para enjuagar el excedente agitando el recipiente.
18. Sumergir la placa en la solución fijadora y agitar por unos segundos. Recién en este momento se puede volver a **encender la luz**.
19. Darle un último enjuague en el agua y mirar el resultado a la luz, dejando luego escurrir el líquido hasta que se seque completamente.
20. Una vez seca, escanear la placa con el rótulo correspondiente.

*Observación: este protocolo se llevó a cabo para todas las réplicas con las que se contaba. Luego de esto, se procedió a realizar un **protocolo de stripping** (ver protocolo a continuación) para luego conservarlas en PBS a 4°C. Sin embargo, los resultados no fueron buenos para todas. Debido a esto, aquellas con las que no fue satisfactorio lo que se obtuvo, fueron reveladas nuevamente con un equipo que se encuentra en la Fundación Instituto Leloir.*

4.6.4. Protocolo de tinción de geles con Azul Coomassie

1. Sumergir el gel de SDS-poliacrilamida suficiente **solución de teñido de Azul Coomassie** dentro de un recipiente plástico.
2. Colocar el recipiente en agitación suave a RT durante 45 minutos.
3. Retirar la solución de Azul Coomassie y guardarla para poder reusarla.
4. Agregar al gel suficiente **solución para desteñir el gel** y dejar 24hs – 48hs hasta que se haya logrado visualizar solo las bandas de proteínas teñidas.

4.6.5. Protocolo de tinción de membranas con Rojo Ponceau

1. Sumergir la membrana transferida en suficiente **solución de Rojo Ponceau** dentro del recipiente.
2. Agitar con la mano durante 1-2 minutos.
3. Enjuagar la membrana con agua corriente hasta sacar el exceso de tinción y se logren observar correctamente cada una de las calles transferidas.

4. Colocar en un film plástico transparente y escanear inmediatamente.
5. Lavar la membrana con agua hasta que quede totalmente desteñida.

4.6.6. Protocolo de stripping de membranas

El término *stripping* refiere al procedimiento que se lleva a cabo para remover los anticuerpos primario y secundario que se pegaron a una membrana durante las incubaciones con las soluciones de los mismos. Es una técnica útil en varias situaciones como, por ejemplo, cuando se quiere repetir un revelado, cuando algún paso no fue el correcto o cuando se quieren detectar proteínas distintas sobre la misma membrana. En este caso, se ahorraría muestra, materiales y tiempo. No obstante, la desventaja que se presenta es que al llevar a cabo este método se pierde una pequeña parte de la muestra adherida a la membrana. Es por ello, que no se recomienda hacer comparaciones cuantitativas entre lo observado previo y posterior a la técnica de stripping.

El protocolo de este proceso se detalla a continuación.

1. Realizar 2 enjuagues de la membrana con PBST 0,05%.
2. Introducir la membrana en la **solución de stripping** e incubarla a 60°C durante 30 minutos en el horno de hibridación.
3. Remover la solución de stripping y realizar tres lavados de la membrana de 5 minutos cada uno con PBS T 0,05%.
4. Conservar la membrana en PBST en la heladera (4°C) hasta su próximo uso.

4.7. Obtención y análisis de datos

4.7.1. Programas informáticos utilizados para la obtención y análisis de datos

A partir de las imágenes de los revelados, se prosiguió a transformar las intensidades de las bandas de las placas reveladas en datos numéricos utilizando un procesador de imágenes denominado **Image J** (Schindelin *et al*, 2015). Los valores obtenidos fueron normalizados utilizando los valores adquiridos a partir de las calles de membranas teñidas con colorante Rojo Ponceau, igualmente con este programa. Luego, para estudiar si hubo diferencias significativas entre los datos de los distintos tratamientos, se llevó a cabo un análisis estadístico mediante el software **Infostat** (FCA, Universidad de Córdoba).

4.7.2. Protocolo para obtención de datos numéricos por Image J

1. Abrir las imágenes en el programa y seleccionar en el formato de estas la opción 8 bits.
2. Seleccionar las secciones adecuadas de cada imagen (**Figura 22**):
 - *Tinción Ponceau*: marcar con un rectángulo cada una de las calles;
 - *Placa radiográfica*: encuadrar la banda de cada calle.

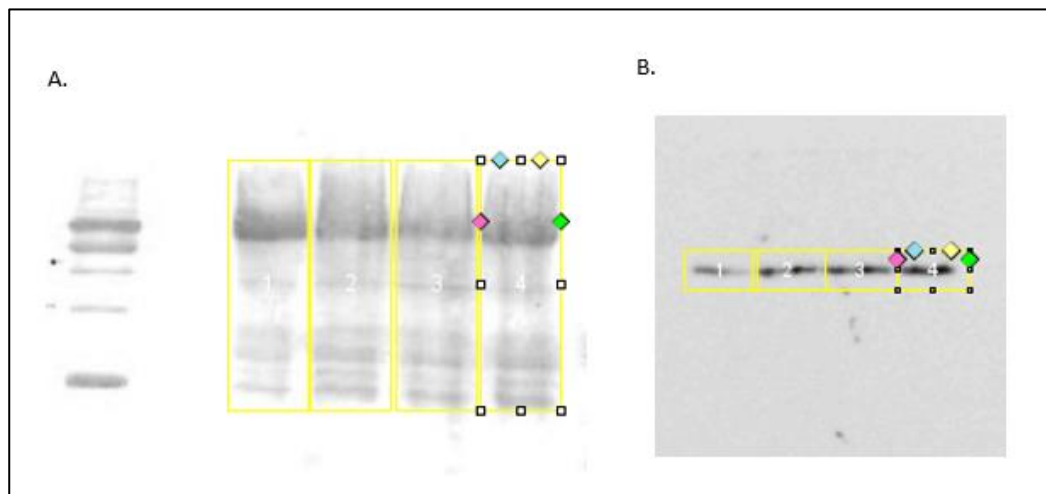


Figura 22: Ejemplificación del tratamiento de imágenes de las membranas teñidas con rojo Ponceau y las placas radiográficas utilizando el programa ImageJ. A. Muestra como en las imágenes de las membranas teñidas con rojo Ponceau debe seleccionarse un rectángulo completo alrededor de cada calle. **B.** Demuestra cómo se debe trazar un rectángulo alrededor de cada banda observada.

3. Ir a la opción Plot Lanes, dentro del menú Analysis→Gels para obtener el gráfico de densidad óptica correspondiente a las secciones seleccionadas en el paso 3.
4. En cada gráfico cerrar las áreas bajo la curva para obtener el valor de la misma (**Figura 23**):
 - *Tinción Ponceau*: dibujar una línea recta en el extremo derecho desde el final de la curva hacia el eje horizontal del gráfico;
 - *Placa radiográfica*: trazar dos líneas verticales que delimiten el pico principal.

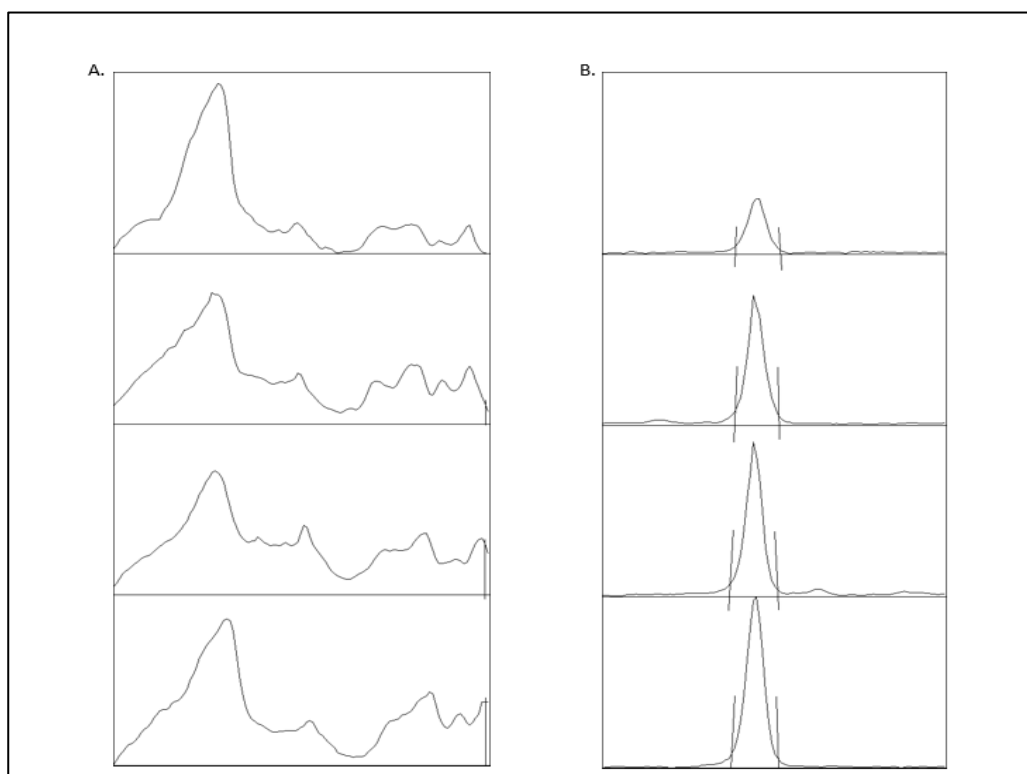


Figura 23: Gráficos de densidad óptica (Plot lanes) obtenidos a través del uso del programa Image J. A. Ejemplifica un gráfico obtenido por una imagen de una membrana teñida con rojo Ponceau, donde de ser necesario se debe cerrar la curva dibujando una línea recta en el extremo derecho. **B.** Muestra una curva obtenida a partir de una imagen de una placa radiográfica. Sobre la misma, debe delimitarse el pico principal con dos líneas rectas.

5. Ir a la opción de la “**varita**” dentro de las herramientas y clicar dentro de cada área delimitada en el punto anterior para generar una nueva ventana que incluye una tabla con los valores de las áreas.
6. Pasar los datos obtenidos a una tabla de Excel. Para descartar el error por diferencia en cantidad de muestra cargada en cada pocillo del gel al llevar a cabo la técnica PAGE, es necesario normalizar los datos obtenidos. Para ello, se divide el valor de área obtenido a partir de las bandas de cada placa sobre el valor obtenido a partir de la correspondiente calle en la membrana teñida con rojo Ponceau.

4.7.3. Análisis estadístico: Infostat

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante análisis de la varianza con diseño en bloque al azar, en un diseño completamente aleatorizado con 7 réplicas. Se consideraron significativas aquellas pruebas con $p < 0,05$. Es necesario mencionar, que todos los análisis

estadísticos fueron efectuados utilizando el programa estadístico Infostat, diseñado por la FCA de la Universidad Nacional de Córdoba.

4.7.4. *Protocolo de análisis de datos mediante Infostat*

1. Verificar los **supuestos** necesarios para lograr realizar la prueba estadística deseada, análisis de la varianza con diseño en bloque al azar:
 - La escala de la variable respuesta debe ser cuantitativa;
 - Las muestras deben ser aleatorias y las observaciones independientes entre sí;
 - Los tratamientos deben tener la misma variabilidad o alternativamente los residuos deben tener una variabilidad constante (homocedasticidad);
 - Las observaciones de cada tratamiento deben proceder de poblaciones normales.
2. Realizar la prueba estadística.
3. Observar la significancia de los resultados ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. Puesta a punto del modelo celular y técnicas para analizar la expresión de proteínas de la MEC

El ensayo de expresión de proteínas de la MEC tuvo como objetivo evaluar el efecto de las ondas de radiofrecuencia en la expresión de proteínas relevantes para la integridad de la matriz. Para esto, fue necesario realizar una serie de pruebas para seleccionar el cultivo celular adecuado, optimizar la obtención y concentración de muestras y poner a punto la detección y cuantificación de la proteína blanco (*tabla 5*).

Prueba 1: Muestra obtenida a partir del medio condicionado de células CHO concentrado mediante filtración por Centricones. La proteína blanco a testear en esta prueba es el colágeno.

La primera línea celular con la que se trabajó fue la línea CHO (del inglés *chinese hamster ovary cells*). Estas células provienen de ovario de hámster chino y tienen una morfología de tipo epitelial. La elección de las mismas se debió a que son células que han sido extensamente utilizadas en investigación básica y aplicada de mamíferos, su simple manejo en cultivo y su disponibilidad en el laboratorio de la Universidad.

Durante el trabajo con estas células, ocurrieron contaminaciones, mayormente de origen bacteriano. Para poder determinar su origen, se realizaron los controles pertinentes dentro del lugar de trabajo y de los reactivos utilizados. Además, para maximizar la erradicación de las contaminaciones, durante la etapa de amplificación se decidió tratar a las células con un antibiótico-antimicótico. Como resultado de esta puesta a punto se logró obtener una muy buena tasa de crecimiento. Partiendo de placas p100 subconfluentes y, repiques al 1/3 se lograba, aproximadamente, una confluencia del 100% a las 24 horas.

La primera proteína de matriz que se decidió estudiar fue el colágeno tipo I. La razón de esta elección fue que es uno de los principales componentes de la MEC que se ve afectado por las ondas de RF. Se ha observado que luego de la aplicación de RF en la piel de pacientes, aumenta la síntesis de esta proteína (Beasley y Weiss, 2014). Debido a que esta es secretada por la célula, se usó como muestra el medio condicionado de las células CHO. Dicho medio, fue concentrado mediante la utilización de sistemas filtrantes denominados Centricones (**Figura 24**).

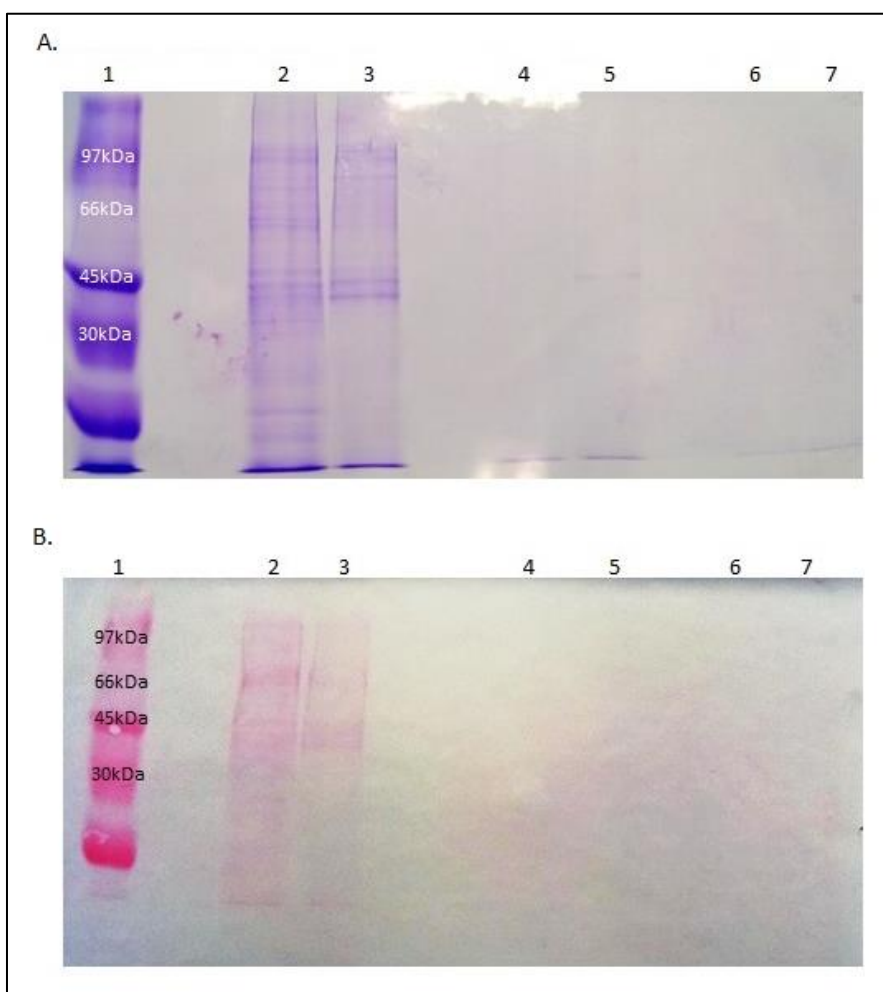


Figura 24: Preparación de muestras a partir de medios condicionados concentrados de células CHO. Corrida por duplicado de geles de SDS-poliacrilamida (gel de separación 7,5%; condiciones de corrida: 200V, 45 minutos), en los que las calles correspondían a: 1 marcador de peso de proteínas (5 μ l); 2 y 3 medio condicionado concentrado 3 veces (20 μ l); 4 y 5 medio condicionado concentrado 5 veces (20 μ l) y 6 y 7 medio condicionado concentrado 9 veces (20 μ l). **A.** Se muestra la tinción con azul de Coomassie de uno de los geles. **B.** Tinción con rojo Ponceau de la membrana posterior a la transferencia (condiciones de transferencia: 100V, 1 hora).

Los resultados muestran que solo se logró obtener proteínas detectables por Coomassie y Rojo Ponceau al concentrar los medios condicionados 9 veces (9x), correspondiente a las calles 2 y 3 (**Figura 24**). En estas calles, a pesar de visualizar las proteínas, su intensidad fue muy débil, arrojando resultados negativos en el Western Blot con anticuerpos anti- actina y colágeno (Datos no mostrados).

- *Habiendo probado con concentraciones cercanas a 9x la cantidad de proteínas presente en el medio condicionado concentrado por Centricones, no llegó a ser suficiente para detectar la presencia de colágeno ni actina utilizando la técnica de Western Blot.*

Prueba 2: Muestra obtenida del lisado de cultivo de células CHO con el objetivo de detectar colágeno.

En esta prueba se intentó partir de lisados celulares de la línea CHO. Dicho procedimiento permitiría obtener muestra de manera más rápida y simple que con el protocolo de medio condicionado concentrado (**Figura 25**).

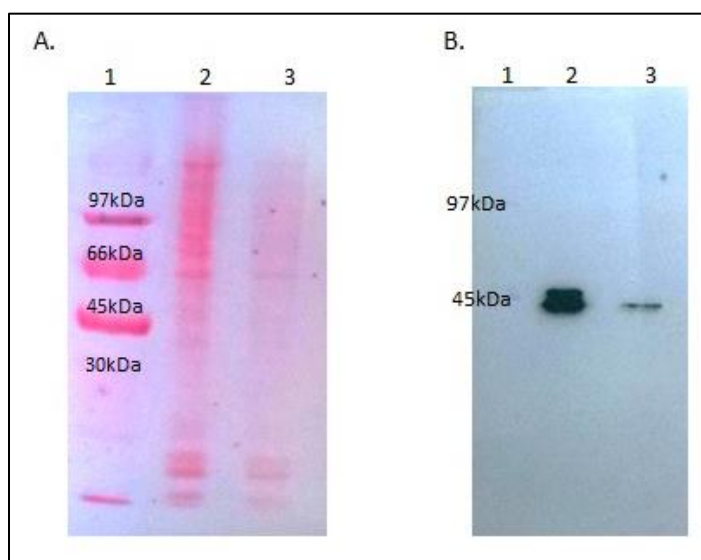


Figura 25: Preparación de muestras e identificación de proteínas a partir de lisados de células CHO. Las calles en ambas figuras corresponden a: 1 marcador de peso de proteínas (5µl) y calle 2 y 3 se sembró el extracto de célula CHO proveniente de una p100 subconfluente, 15µl y 5µl, respectivamente. **A.** Tinción de la membrana de nitrocelulosa con rojo Ponceau (condiciones de corrida de gel: gel de separación 10%, 200V, 90minutos; condiciones de transferencia: 100V, 1h). **B.** Resultado de revelado de la membrana A con actina y colágeno tipo I (condiciones del revelado: anticuerpos primarios 1:8000 durante 2,5hs; anticuerpos secundarios 1:10000 durante 1; tiempo de exposición de la placa 5min).

En los resultados mostrados se observa un buen rendimiento en las proteínas totales obtenidas, medidas mediante la tinción con Rojo Ponceau. No obstante, al realizar el Western Blot con los anticuerpos anti- actina y colágeno, solo se pudo detectar actina en las muestras preparadas. Este resultado negativo fue obtenido en numerosas repeticiones con muestras preparadas de manera independiente.

- *De esta prueba fue posible especular que el anticuerpo seleccionado para el ensayo no fue el óptimo para detectar colágeno tipo I de origen murino. Considerando que la preparación había funcionado correctamente para actina, se decidió probar el mismo protocolo, pero en este nuevo intento, utilizando una línea celular humana.*

Prueba 3: Muestra obtenida del lisado de cultivo de células WI-38 con el objetivo de detectar colágeno.

Las células WI-38 son fibroblastos humanos, de pulmón fetal. Estas células fueron escogidas ya que los fibroblastos son los mayores productores de colágeno tipo I de la MEC.

La línea celular WI-38 se creció en cultivo durante varias semanas. Se partió de una botella T75 (80%-90% confluyente) a placas p100 con diluciones al ¼. Luego de 3 días se observó una confluencia de un 60% y el crecimiento se detuvo. Debido a este arresto, no fue posible amplificar y lograr un stock de células necesario para el ensayo. Estas células fueron cedidas por la Fundación Instituto Leloir. Al momento de la donación, los investigadores informaron sobre la tasa de crecimiento lenta y la posibilidad de arresto. De todas formas, se decidió probar la obtención de muestra e identificación de colágeno y actina (**Figura 26**).

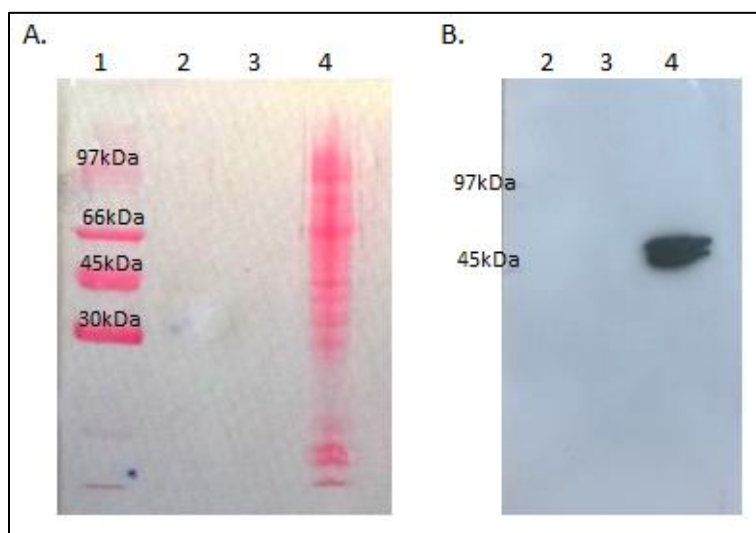


Figura 26: Preparación de muestras e identificación de proteínas a partir de lisados de células WI-38. Membrana de nitrocelulosa a la que se transfirieron muestras provenientes del lisado de células CHO y WI-38 plaqueadas en p35. Las calles corresponden a: 1 marcador de peso de proteínas (5µl), 2 extracto de WI-38 (15µl), 3 extracto de WI-38 (10µl) y 4 extracto de CHO (10µl). **A.** Tinción con rojo Ponceau de membrana (condiciones de corrida de gel: gel de separación 10%, 200V, 1h; condiciones de transferencia: 100V, 1h). **B.** Placa radiográfica obtenida del revelado de la membrana de A incubada con los anticuerpos anti- actina y colágeno tipo I (condiciones de revelado: anticuerpos

primarios, colágeno 1:5000 y actina 1:8000 durante 2,5hs; anticuerpos secundarios 1:10000 durante 1h; tiempo de exposición 10min).

En la membrana teñida con Rojo Ponceau de la **Figura 26** se observa escasa proteína total proveniente del extracto de WI-38 en comparación con el de CHO. El revelado de la membrana solo fue positivo para actina en CHO.

➤ *El bajo número de células WI-38 sumado a un supuesto estado de arresto no permitió obtener cantidad suficiente de proteínas totales bajo las condiciones planteadas para detectar colágeno y actina mediante Western Blot. Debido a este resultado, se decidió cambiar la línea celular por otra humana.*

Prueba 4: Muestra obtenida del lisado de cultivo de células HaCaT con el objetivo de detectar actina.

Las células humanas seleccionadas para esta prueba fueron HaCaT, las cuales son células epiteliales del tipo queratinocitos. Dado el tipo celular, estas células no producen colágeno tipo I por lo que solo se probó con el anticuerpo anti-actina (Benny *et al*, 2015). Esto se realizó a modo de verificar el correcto crecimiento de las mismas y la obtención de suficiente cantidad de proteínas totales para que sean detectadas en el Western Blot.

Durante el trabajo con estas células, surgieron varios inconvenientes. En un principio, se debió ajustar la concentración de glucosa en el medio de cultivo ya que estas células requieren altas concentraciones de la misma. Por otro lado, surgieron contaminaciones bacterianas que se solucionaron realizando controles más exhaustivos de los reactivos e incorporando antibiótico-antimicótico al medio de cultivo. Superados estos inconvenientes, se logró amplificar y criopreservar correctamente la línea HaCaT. La tasa de crecimiento lograda fue la misma que para la línea CHO.

En esta prueba, se usó como muestra el lisado concentrado de las células HaCaT. Luego de tener el extracto celular, se precipitaron las proteínas totales usando el protocolo de acetona (**Figura 27**).

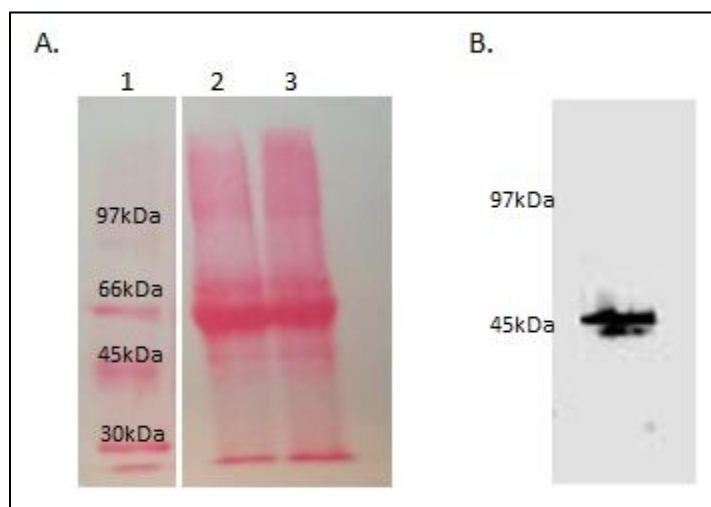


Figura 27: Preparación de muestras e identificación de proteínas a partir de lisados de células HaCaT. **A.** El extracto fue obtenido de un cultivo de células HaCaT en una placa p35 y se precipitaron las proteínas del mismo usando acetona. La muestra obtenida se corrió en un gel por SDS-PAGE (condiciones de corrida: gel de separación 10%, 200V durante 70min) y luego se transfirió a la membrana (condiciones de transferencia: buffer con 20% de metanol, 100V durante 1h). Las calles mostradas corresponden a: 1 marcador de peso de proteínas (3 μ l) y 2 y 3 extracto de células HaCaT concentrado con acetona (15 μ l). *Nota: las calles que fueron eliminadas entre el marcador y las correspondientes al lisado de HaCaT no fueron mostradas ya que correspondían a otras muestras.* **B.** Resultado de revelado de membrana sembrada con extracto concentrado de células HaCaT plaqueadas en una p100. Se sembraron 20 μ l de la muestra obtenida. El revelado se llevó a cabo en un equipo (no manualmente) luego de incubar la membrana con el anticuerpo anti-actina luego de 5min de exposición (condiciones de corrida y transferencia: ídem A; condiciones de revelado: anticuerpo primario 1:8000 ON 4°C; anticuerpo secundario 1:10000 durante 2hs RT).

El resultado de la tinción con Rojo Ponceau muestra una cantidad considerable de proteínas totales. Luego de realizar las incubaciones con el anticuerpo anti-actina y el secundario, se reveló mediante un sistema de “gel and blot image” en otro laboratorio. Esto se debió a que se quiso probar un método de mayor sensibilidad que la técnica manual.

➤ *El resultado obtenido llevó a la conclusión de que se habían logrado obtener las condiciones correctas de crecimiento para esta nueva línea celular y suficiente cantidad de proteínas totales para la detección de actina por la técnica seleccionada.*

Prueba 5: Muestra obtenida del medio condicionado con células HaCaT y concentrado con acetona, con el objetivo de detectar la proteína SPARC.

Dado que la amplificación de las células HaCaT había sido exitosa y que la detección de actina funcionaba perfectamente, se decidió cambiar la proteína blanco por la molécula

SPARC. Esta proteína ha sido extensamente estudiada junto con el colágeno ya que cumple una función reguladora en la síntesis del mismo (Bradshaw, 2009). Debido a esto, se supuso que las ondas de RF podían tener efecto sobre la expresión de la misma. Además, se sabe que la expresión de SPARC aumenta cuando están en marcha procesos de remodelación de la MEC (Bradshaw, Reed y Sage, 2002) que, bajo nuestra hipótesis, podría estar provocando la radiación con RF. Para cuantificar esta molécula, se consiguió el anticuerpo anti-SPARC generado por el hibridoma AON-1, el cual reconocía la proteína de origen humano.

SPARC, al igual que el colágeno, es secretada de la célula, por lo que se cultivaron células HaCaT en placas p35 para luego condicionar el medio producido por la línea y, finalmente, precipitar las proteínas totales con acetona. Como los resultados fueron satisfactorios (Datos no mostrados), se llevó a cabo una prueba del ensayo. Se descongeló un vial en 12 placas p35 y se las trató con el tratamiento de radiofrecuencia correspondiente. Luego de 48hs, se tomó el medio condicionado, se precipitaron las proteínas con acetona y se realizó el Western Blot (**Figura 28**).

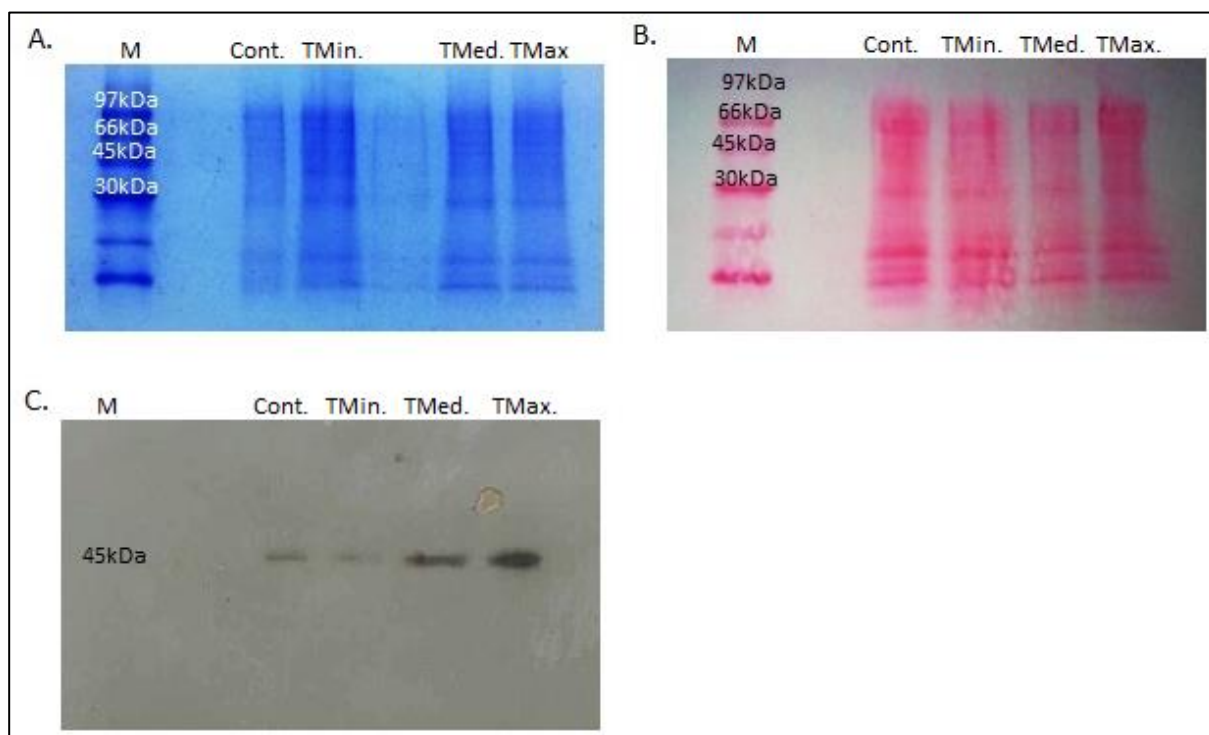


Figura 28: Western Blot de muestras obtenidas de la precipitación de las proteínas del medio condicionado con células HaCaT tratadas con RF. Referencias de siembra: **M**, marcador de peso (5µl); **Cont.**, muestra control; **TMin.**, muestra del tratamiento mínimo; **TMed.**, muestra del tratamiento medio y **TMax.**, muestra del tratamiento máximo. **A.** Tinción con azul de Coomassie del gel de poliacrilamida. **B.** Tinción con rojo Ponceau de la membrana de nitrocelulosa. **C.** Revelado de la membrana mostrada en B, luego de haber sido incubada con el anticuerpo anti-SPARC (AON-1)

(condiciones de revelado: anticuerpo primario 1:100 ON 4°C; anticuerpo secundario 1:10000 durante 2hs; tiempo de exposición de la placa 10min).

Como se observa en la **Figura 28**, todos los pasos del Western Blot fueron bien resueltos. Se observan a abundantes cantidades de proteínas en ambas tinciones. Además, las bandas de SPARC se observan con gran nitidez, lo que permitiría utilizar las mismas para su posterior cuantificación.

La elección de SPARC como proteína blanco de la MEC hizo que se tenga que cambiar el control de carga seleccionado previamente. Hasta ese momento, se utilizaba actina, pero esta proteína y SPARC tienen pesos moleculares muy similares (42kDa y 40-45kDa, respectivamente) (**Figura 29**).

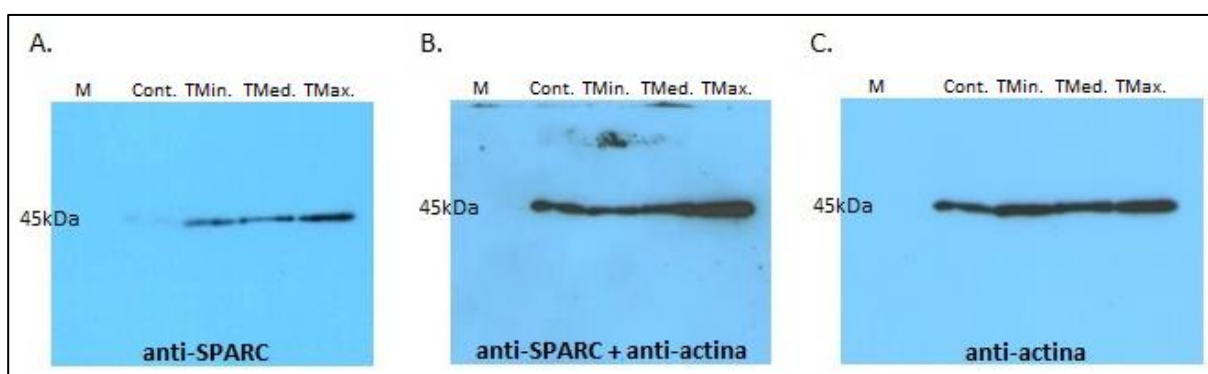


Figura 29: Placas radiográficas reveladas con los anticuerpos anti-SPARC y anti-actina. Los resultados mostrados corresponden a la misma membrana la cual fue *strippeada* dos veces para poder hacer las distintas incubaciones. Referencias de siembra: **M**, marcador de peso molecular de proteínas; **Cont.**, muestra control; **TMin.**, muestra tratamiento mínimo; **TMed.**, muestra tratamiento medio y **TMax.**, muestra tratamiento máximo. En esta las calles fueron sembradas con: 1 marcador de peso de proteínas, 2 tratamiento control, 3 tratamiento mínimo, 4 tratamiento medio y 5 tratamiento máximo. **A.** Resultado obtenido de la incubación con el anticuerpo anti-SPARC (condiciones de revelado: anticuerpo primario anti-SPARC 1:100; anticuerpo secundario 1:4000; 1min exposición). **B.** Resultado obtenido de la incubación con los anticuerpos anti-SPARC y anti-actina (condiciones de revelado: anticuerpos primarios anti-SPARC 1:100 y anti-actina 1:1000; anticuerpo secundario 1:2000; tiempo de exposición 5min). **C.** Resultado de la incubación con el anticuerpo anti-actina (condiciones de revelado: anticuerpo primario anti-actina 1:1000; anticuerpo secundario 1:2000; tiempo de exposición 5min).

En las tres placas radiográficas las bandas se observan con distintas intensidades, pero en el mismo lugar. Los resultados obtenidos demuestran que es posible visualizar SPARC (**Figura 29, A**) y actina (**Figura 29, C**) por separado, pero que no es posible diferenciarlas cuando se intentan ver en una misma placa (**Figura 29, B**). Por esta razón, hubo que cambiar

el método utilizado para controlar la carga. Según la bibliografía encontrada, la tinción de la membrana con Rojo Ponceau es una excelente alternativa al uso de actina como *housekeeping*. Por un lado, la tinción es un proceso mucho más fácil, menos costoso y totalmente reversible. Por otro lado, no se depende de solo una proteína para la normalización de los datos, sino que todas las proteínas transferidas son teñidas (Romero-Calvo *et al*, 2010). Debido a todo esto, la tinción con Rojo Ponceau fue seleccionada como control de carga en esta prueba.

➤ *Luego de realizar esta última prueba, fue posible concluir que los parámetros y variables utilizados (línea HaCaT como modelo biológico, muestras de medio condicionado concentrado por precipitación con acetona, SPARC como proteína blanco y tinción de membranas con Rojo Ponceau como método de control de carga) serían los más adecuados para llevar a cabo el ensayo.*

# Prueba	Células	Muestra	Proteína blanco + <i>housekeeping</i>	Tratamiento con RF
1	CHO (hámster)	MCC* x Centricones	Colágeno ✗	✗
			Actina ✗	
2	CHO (hámster)	Lisado	Colágeno ✗	✗
			Actina ✓	
3	WI-38 (humano)	Lisado	Colágeno ✗	✗
			Actina ✗	
4	HaCaT (humano)	Lisado	Actina ✓	✗
5	HaCaT (humano)	MCC* x acetona	SPARC ✓	✓
			Rojo Ponceau ✓	

Tabla 5: Pruebas realizadas durante la puesta a punto del cultivo celular, método de obtención y concentración de la muestra, proteína blanco y housekeeping. Las secciones pintadas con rojo muestran las técnicas o materiales probados con los que no se obtuvieron resultados satisfactorios, mientras que las secciones de verde fueron con los que si se logró el resultado esperado. *MCC: medio condicionado concentrado.

5.2. Preparación del stock celular necesario para el diseño propuesto

Una vez que se seleccionó la línea celular HaCaT como modelo biológico para realizar el ensayo, fue necesario preparar el stock celular de dicha línea. Para esto, se congelaron 15

críotubos (1×10^5 células/ml) de estas células a partir de un único pool de bajo pasaje. De esta manera, se lograron congelar suficientes tubos como para ir descongelando de manera independiente y así lograr las réplicas biológicas necesarias para la evaluación estadística del ensayo funcional.

Antes del congelamiento de los críotubos, a modo de validación de la línea celular, se analizó que no tuvieran contaminaciones con micoplasma. El resultado de la prueba realizada con colorante H \ddot{o} echst fue negativo. La presencia de micoplasma se puede visualizar con esta t \acute{e} cnica debido a que todos los n \acute{u} cleos se ti \acute{e} nen, pero los n \acute{u} cleos de micoplasma son de menor tama \acute{n} o que n \acute{u} cleos celulares de las c \acute{e} lulas HaCaT (**Figura 30**). Por ende, la ausencia de n \acute{u} cleos peque \acute{n} os te \acute{n} idos llev \acute{o} a la conclusi \acute{o} n de que no exist \acute{i} a dicha contaminaci \acute{o} n.

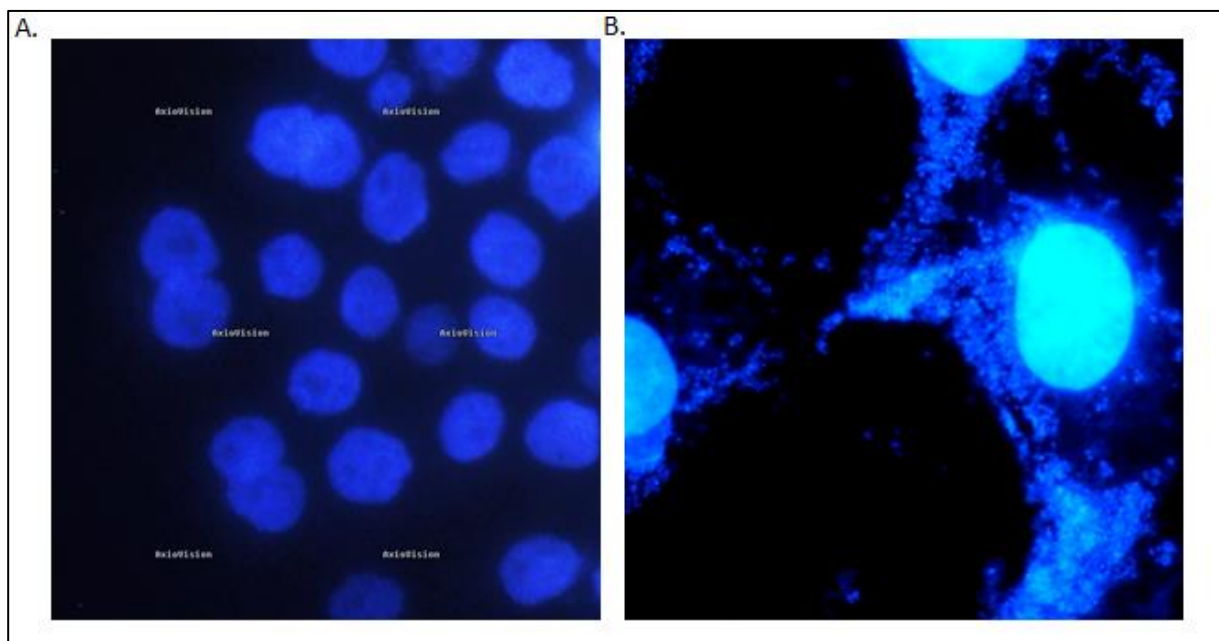


Figura 30: Tinci \acute{o} n con H \ddot{o} echst de cultivos celulares para detecci \acute{o} n de presencia de micoplasmas. A. Resultado de la tinci \acute{o} n de las c \acute{e} lulas HaCaT donde no se ve presencia de micoplasma ya que solo se observa la tinci \acute{o} n del n \acute{u} cleo de las mismas. **B.** Ejemplo de resultado positivo, en el cual se observa la diferencia en el tama \acute{n} o de los dos tipos de n \acute{u} cleos. (Fuente imagen B: *Pharmaceutical microbiology*, sitio web).

En paralelo con este ensayo, se realiz \acute{o} una prueba con un kit de detecci \acute{o} n de micoplasma desarrollado en UADE Labs. El mismo se basa en la amplificaci \acute{o} n de secuencias del 16s RNA de micoplasma por PCR, que luego son detectadas por electroforesis (Farias Foresi y Mestre, 2016). Los resultados de esta prueba tambi \acute{e} n fueron negativos.

5.3. Puesta a punto de la aplicación de los tratamientos de radiofrecuencia

Para analizar si la exposición a las ondas de radiofrecuencia provoca un efecto en la remodelación de la MEC, se planteó un diseño experimental basado en tres tratamientos distintos:

- **Mínimo:** equipo en potencia mínima durante 15 minutos;
- **Medio:** equipo en potencia media durante 30 minutos;
- **Máximo:** equipo en potencia máxima durante 1 hora.

Además de definir cuáles serían los tratamientos a realizar, hubo que determinar la manera en la que se aplicarían los mismos y el tamaño de placa de cultivo más adecuado.

En un principio se probó con placas p100. Se realizaron los tratamientos sosteniendo el electrodo con la mano y haciendo movimientos circulares sobre la tapa de la placa. Así se lograba que la exposición a la radiofrecuencia sea homogénea para todas las células de la placa.

Para optimizar el tiempo, se decidió colocar el electrodo agarrado de una pinza 3 dedos. Al dejar el electrodo en una posición fija y, al ser este de menor diámetro que el de la placa p100, no todas las células plaqueadas recibían la misma exposición a la radiofrecuencia. Se probaron entonces las placas de 6 pocillos. En el caso de estas, al encontrarse los pocillos tan cerca entre sí, cada pocillo podría estar recibiendo parte del tratamiento de pocillos adyacentes. Además, el *multi-well* tendría que estar afuera de la estufa durante mucho más tiempo, lo que provocaría aún más estrés a las células. Por ende, para aumentar la homogeneidad de los tratamientos, la placa elegida para los ensayos fue la p35, cuyo diámetro es prácticamente igual que el del electrodo utilizado (**Figura 31**).

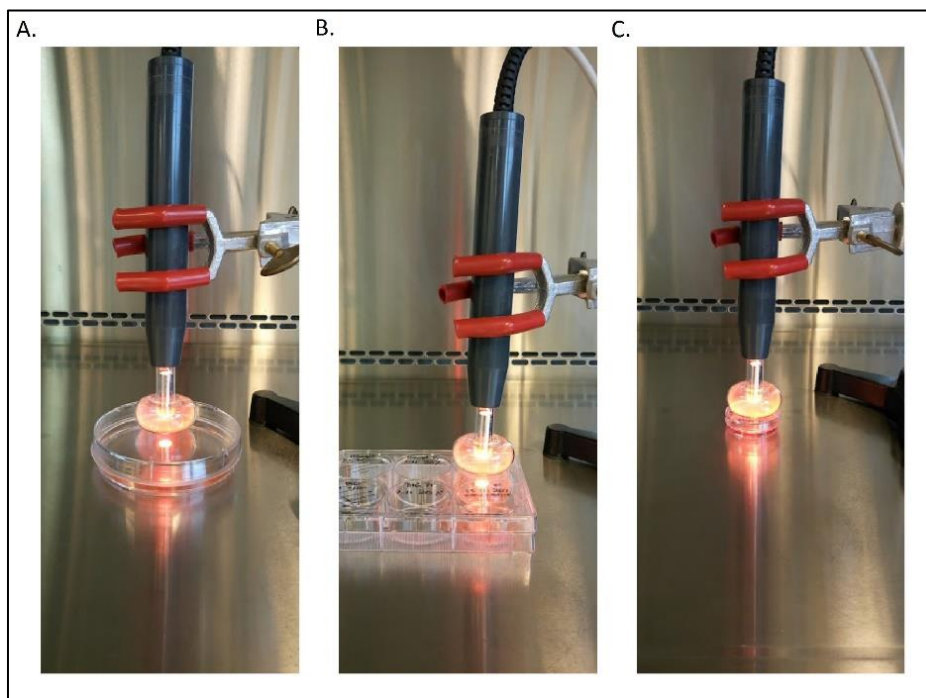


Figura 31: Placas probadas para la realización de los tratamientos de las células en cultivo. Los tamaños de las placas que se probaron fueron: **A.** Placa p100. **B.** *Multi-well* x 6. **C.** Placa p35.

Otro motivo que llevó al descarte de las placas p100 y los *multi-well* de 6 pocillos fue la altura de los mismos. Ambos tipos de placas tenían una altura que provocaba que la distancia entre el electrodo y las células sea demasiado grande, perdiéndose potencia de irradiación. Las placas p35 tienen una altura menor a la mitad de las 2 anteriores, haciendo que fueran más aptas para la realización del ensayo. Por lo tanto, los tratamientos se aplicaron sobre las placas p35, sosteniendo el electrodo con una pinza 3 dedos como se muestra en la **Figura 31**.

Luego de definidos los tratamientos y el tamaño de placa, se procedió a realizar la medición de los parámetros físicos del equipo de radiofrecuencia de manera tal de caracterizar el mismo.

En el laboratorio de Electrónica y Telecomunicaciones, se realizó la medición de la amplitud y frecuencia de onda del equipo mediante el uso de un osciloscopio. Asimismo, se obtuvo un valor aproximado de la potencia que consume el equipo de RF utilizando un wattímetro. Todos estos valores fueron medidos para los 3 tratamientos del diseño experimental.

Las mediciones con el osciloscopio se llevaron a cabo colocando y sin colocar el electrodo de radiofrecuencia (*tabla 6*).

Tratamiento	Con y sin el electrodo		Con el electrodo	Sin el electrodo
	Período [μs]	Frecuencia [MHz]	Amplitud de onda [V]	
<i>Mínimo</i>	604,0	1,66	<i>Fuera de rango</i>	2,92
<i>Medio</i>	605,0	1,65	<i>Fuera de rango</i>	3,60
<i>Máximo</i>	603,0	1,66	<i>Fuera de rango</i>	4,12

Tabla 6: Medición de parámetros físicos del equipo de RF, mediante el uso de un osciloscopio.

Los valores de la amplitud de onda solo se pudieron obtener sin el electrodo colocado en el cabezal. Al colocar el electrodo, estos valores eran demasiado elevados y quedaban fuera del rango de medición del osciloscopio disponible. Las mediciones sin el electrodo son mediciones en vacío ya que no está colocada la carga, en este caso el electrodo. A pesar de esto, los valores se pueden tomar como referencia para comprobar que hay diferencias en la amplitud de onda entre los tratamientos planteados. Además, se observa como a mayor tratamiento, mayor amplitud de la onda, es decir una mayor potencia entregada. Esto se debe a que:

$$P(t) = V(t) \cdot I(t)$$

donde P es la *potencia*, t es el *tiempo*, V es el *voltaje*, I es la *intensidad de la corriente*. A su vez,

$$V(t) = A \cdot \sin(\theta + \omega t)$$

en la cual A es la *amplitud de la onda*, y ω es igual a:

$$\omega = 2\pi f$$

donde f es la *frecuencia de la onda*.

Los valores de la frecuencia y período de la onda son propios del equipo, por lo tanto, se mantienen constantes en todos los tratamientos y con y sin el electrodo colocado.

La metodología seleccionada para la aplicación de los tratamientos de RF sobre los cultivos supone que las ondas de radio traspasen tanto el material plástico de la placa como también el medio de cultivo para llegar a la monocapa de células. La velocidad de propagación de las ondas electromagnéticas a través de los materiales depende de varios factores, tanto de la onda misma como del material. Esta velocidad, en comparación con la velocidad que tiene la onda en el vacío, puede disminuir en función de las interacciones que ocurran entre la onda y el material por el que pasa. La relación entre la velocidad en el vacío y un determinado material se denomina índice de refracción. Este valor es propio de cada

material y da una idea de la **atenuación** que provoca el mismo sobre una onda electromagnética. En cuanto a los materiales, se puede diferenciar entre los conductores y los dieléctricos (no conductores). Los primeros se caracterizan por causar una mayor atenuación en las ondas debido a que la presencia de electrones libres en ellos hace que la onda interactúe en gran medida con el material y parte de su energía se consume en este proceso, disminuyendo así la intensidad de la onda incidente. Por el contrario, en el caso de los materiales dieléctricos, se supone que las ondas se propagan de manera indefinida sin atenuación en su amplitud de onda. Sin embargo, la realidad es que todos los materiales provocan cierto grado de atenuación. Además, esto también depende del grosor del material (por ejemplo, si un material conductor es muy delgado podría comportarse como uno dieléctrico) (Hewitt, 2007; Muñoz *et al.*, 2012). En cuanto a la situación que se plantea en este trabajo, se sabe que el plástico es un material dieléctrico y que el agua es más bien conductora (Muñoz, 2012). A pesar de esto último, el efecto de atenuación que el medio de cultivo puede provocar se consideró prácticamente nulo dado que el grosor era menor a los 5mm. Por lo tanto, se concluyó que el grado de atenuación que provoca el plástico de la placa y el medio de cultivo (considerado como si fuese agua) fue casi nulo.

Además de las mediciones con el osciloscopio, se decidió medir la potencia que consumía el equipo mediante el uso de un wattímetro. El valor de esta potencia no es igual a la potencia que entrega el equipo en cada tratamiento, pero si es directamente proporcional. Por lo tanto, si la potencia consumida es mayor en un tratamiento, también lo será la potencia entregada.

Las mediciones se llevaron a cabo conectando el equipo de RF a 220V y colocando el electrodo en el cabezal. Se realizaron en 4 situaciones (*tabla 7*):

- Equipo encendido, a potencia nula;
- Equipo encendido y potencia mínima;
- Equipo encendido y potencia media;
- Equipo encendido y potencia máxima.

Tratamiento	Potencia consumida (W)
<i>Solo equipo encendido</i>	10
<i>Mínimo</i>	20
<i>Medio</i>	30
<i>Máximo</i>	40

Tabla 7: Valores de potencia consumida por el equipo de RF, medidas por un wattímetro.

Los valores resultantes demostraron que la variación en la potencia consumida en los distintos tratamientos. La medición que se hizo con el equipo prendido a potencia nula se consideró la potencia que consumió el equipo para funcionar, sin tener en cuenta el electrodo. Por ende, para ver la potencia que se consume el electrodo en cada tratamiento, se le restó el valor del equipo. Los valores resultantes fueron:

- Potencia consumida para potencia **mínima**: 10W
- Potencia consumida para potencia **media**: 20W
- Potencia consumida para potencia **máxima**: 30W

Se observa que cuanto mayor es el tratamiento, mayor es la potencia consumida por el equipo. Por lo tanto, la potencia entregada es mayor cuanto mayor es el tratamiento aplicado.

A partir de estas mediciones, se pudo concluir que entre los tratamientos aplicados hubo diferencia en la cantidad de energía que se le entregaba al cultivo celular. Además, esta energía depende del tiempo por el cual se aplique el tratamiento:

$$E = \int_0^t P dt$$

donde P es la *potencia* y t el *tiempo*. Por lo tanto, a mayor tiempo mayor energía.

Otro de los parámetros medidos en los distintos tratamientos fue la **temperatura de los cultivos celulares** posterior a ser tratados. Esto se realizó debido a que se demostró que la exposición a ondas de radiofrecuencia genera un efecto térmico (Nicoletti *et al*, 2014). Dado que se comprobó que la potencia variaba en los distintos tratamientos, se esperaba que cuanto mayor sea el tratamiento, mayor sería la temperatura del cultivo. A la vez, era necesario asegurarse que las temperaturas alcanzadas por los cultivos, no fueran excesivas y produjeran daños a los mismos.

La medición de la temperatura del medio de cultivo se llevó a cabo antes y luego de tratar el cultivo con radiofrecuencia utilizando un termómetro infrarrojo (**Figura 32**).

Además, se midió la temperatura del electrodo de vidrio en cada caso (**Figura 33**). Los resultados obtenidos se muestran en gráficos de barra, donde se muestra el valor de la media de cada una de las temperaturas junto con el desvío estándar correspondiente.

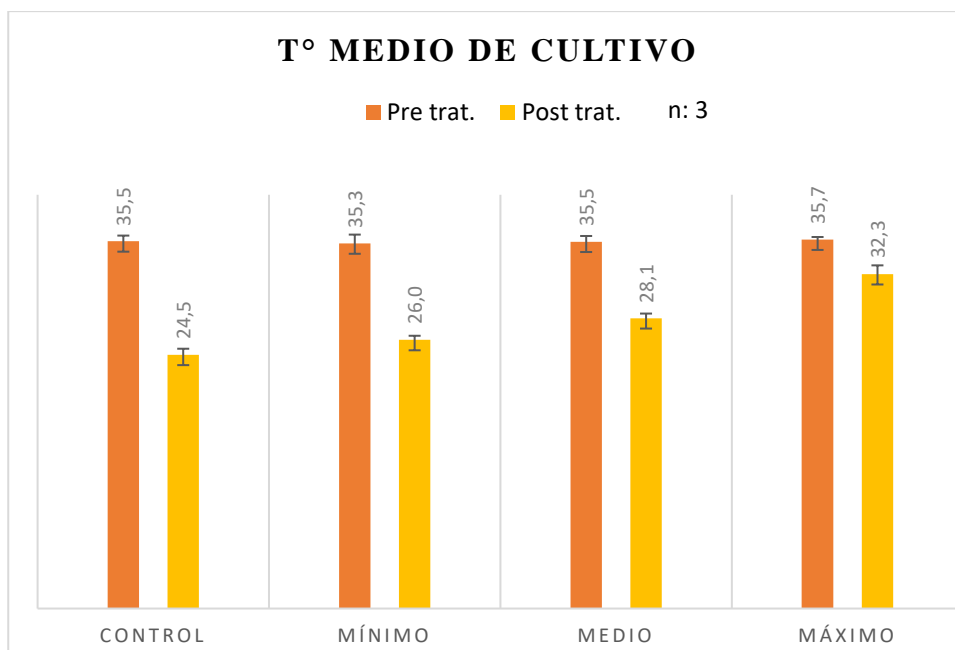


Figura 32: Gráfico de barras de las temperaturas del medio de cultivo, antes (Pre trat.) y luego (Post trat.) del tratamiento de RF correspondiente.

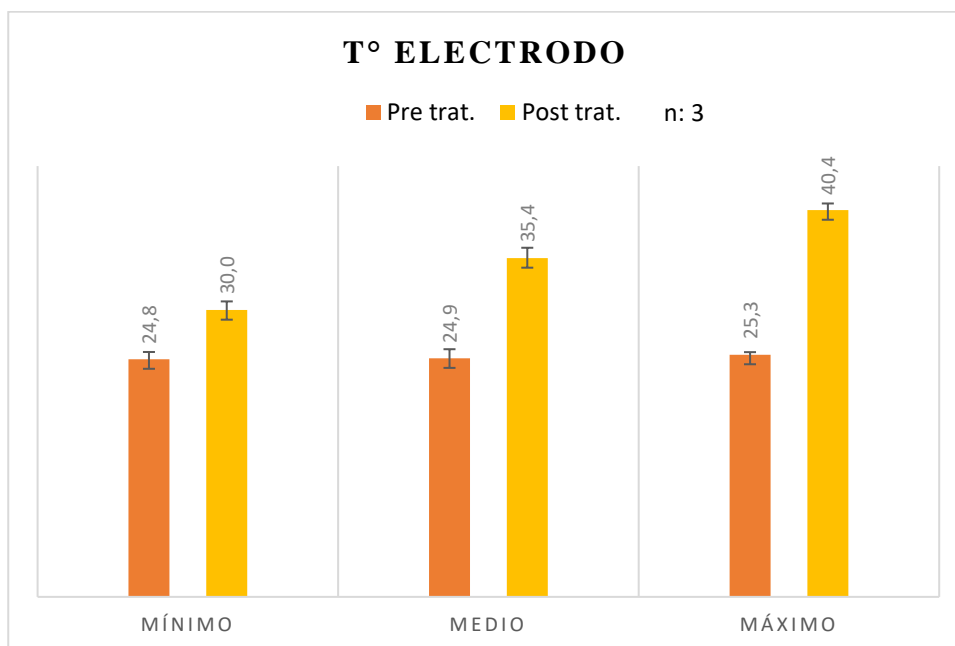


Figura 33: Gráfico de barras de las temperaturas del electrodo, antes (Pre trat.) y luego (Post trat.) del tratamiento de RF correspondiente.

Las mediciones de las placas fueron tomadas apenas eran extraídas de la estufa y luego de ser tratadas con el tratamiento correspondiente. Para todos los tratamientos, los medios de cultivo de las placas recién sacadas de la estufa tenían una temperatura de 36°C o muy cercana a esta. La medición post-tratamiento del **control** se hizo al pasar los 60 minutos fuera de la estufa dado que este no recibía ningún tratamiento. En este caso, la temperatura era la temperatura del ambiente, 24,5°C. El tratamiento **mínimo** fue medido al finalizar los 15 minutos de tratamiento, donde la temperatura era un poco más elevada que la ambiente (25,9°C). En cuanto al tratamiento **medio**, la medición se realizó transcurridos los 30 minutos de tratamiento y la temperatura fue mayor a la anterior (28,1°C). Por último, el tratamiento **máximo** fue el que tuvo el mayor valor luego de 60 minutos de tratamiento, siendo este de 32,3°C. Asimismo, al observar las temperaturas de los electrodos al finalizar cada tratamiento se ve que las temperaturas de los medios de cultivos son muchos menores en todos los casos en comparación con la del electrodo. Cabe aclarar que las monocapas sometidas a cada uno de estos tratamientos no mostraron levantamiento ni signos de arresto celular en ninguno de los casos, tanto en el control como en ninguno de los tratamientos con radiofrecuencia (mínimo, medio y máximo).

Las mediciones de los parámetros físicos del equipo en los distintos tratamientos, confirmaron que realmente existían diferencias entre los tratamientos planteados. Además, el hecho de que se observara mínimos cambio de temperatura en los medios de cultivo al aplicar los distintos tratamientos, podría apoyar esta idea. Así se aseguraba de que las células fueran sometidas a distintos tratamientos de radiofrecuencia con el fin de lograr ver si estos provocaban o no diferencias en los niveles de expresión de SPARC.

5.4. Ensayo de expresión de proteínas de la MEC

5.4.1. Diseño experimental y preparación de muestras

Habiendo logrado la puesta punto de los pasos necesarios del ensayo comparativo de los distintos tratamientos, se prosiguió con el análisis de las muestras. Se realizó el descongelamiento de 7 críotubos de células HaCaT. Cada uno de estos críotubos se dividió en 12 placas p35 y se aguardó 5 días para lograr la confluencia deseada (80-90%). Estas placas se dividieron en grupos de 3, donde un grupo se mantuvo como control y los grupos restantes fueron sometidos a los 3 tratamientos de radiofrecuencia: mínimo (15 minutos a potencia mínima), medio (30 minutos a potencia media) y máximo (1 hora a potencia máxima).

Para descartar la posible variabilidad generada por los distintos tiempos de las placas fuera de la estufa, todas se mantuvieron fuera de la misma por 60 minutos (incluyendo el tiempo de tratamiento). Una vez cumplida la hora, cada placa fue reintroducida en la estufa (37°C, atmósfera humidificada y 5% CO₂) donde se mantuvieron por 2 horas con el objetivo de que las células se recuperaran del estrés. Cabe aclarar que las células soportaron perfectamente todos los tratamientos, sin haberse despegado o sufrido arresto. Pasadas las 2 horas, se realizaba un cambio de medio a uno sin suero, para comenzar con el condicionamiento del mismo. El medio condicionado era recogido luego de 48 horas.

A continuación, las muestras se precipitaron con acetona para concentrar las proteínas, se las resuspendió en buffer de carga 1x y se crackearon para desnaturalizarlas (**Figura 34**). Todos estos pasos eran necesarios para poder correr estas muestras por SDS-PAGE y continuar con los siguientes pasos del Western Blot.

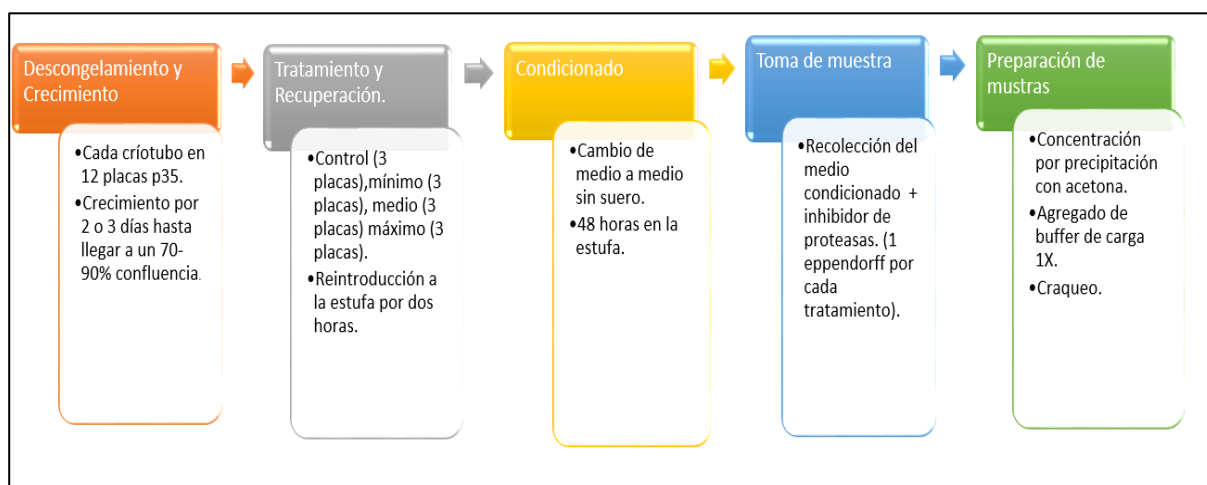


Figura 34: Esquema de obtención y preparación de muestras. Resume el proceso llevado a cabo desde el descongelamiento de un vial hasta obtener las muestras de los distintos tratamientos con radiofrecuencia preparadas para correr luego por SDS-PAGE y proseguir con el método de Western Blot. En total se descongelaron 7 críotubos.

5.4.2. Cuantificación de proteínas de la MEC

Con las muestras obtenidas de los distintos tratamientos de radiofrecuencia en la línea celular HaCaT, se realizó el Western Blot para detectar la presencia de la glicoproteína SPARC y de esta forma, analizar el efecto entre los diferentes tratamientos.

Con el objetivo de cuantificar la proteína SPARC, fue necesario realizar un control de carga obtenido a través de la digitalización y cuantificación de las proteínas totales presentes

en las membranas teñidas con el colorante Rojo Ponceau (**Figura 35**). Dichos valores se utilizaron para normalizar los resultados obtenidos a partir de la señal generada en el Western Blot con el anticuerpo específico anti-SPARC (**Figura 36**). Ambos resultados se generaron para cada una de las 7 réplicas biológicas del ensayo (tratamientos independientes). Cabe aclarar que algunos de los revelados no se hicieron de forma manual en los UADE Labs. Los revelados realizados en el laboratorio de la universidad fueron los de los viales 2 y 4; los restantes fueron revelados en el equipo *ImageQuant LAS 4000 (GE)* perteneciente a la Fundación Instituto Leloir.

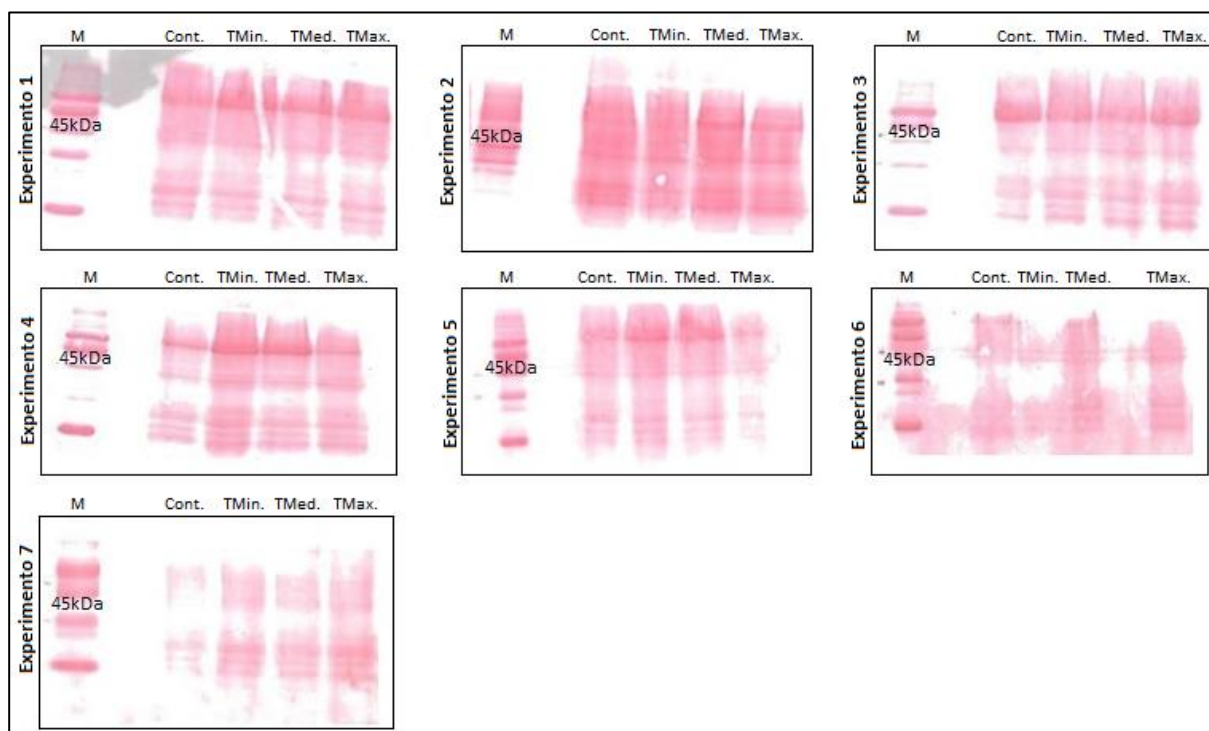


Figura 35: Control de carga de los ensayos de remodelación. Referencias: **M**, marcador de peso; **Cont.**, muestra control; **TMin.**, muestra tratamiento mínimo; **TMed.**, muestra tratamiento medio y **TMax.**, muestra tratamiento máximo.

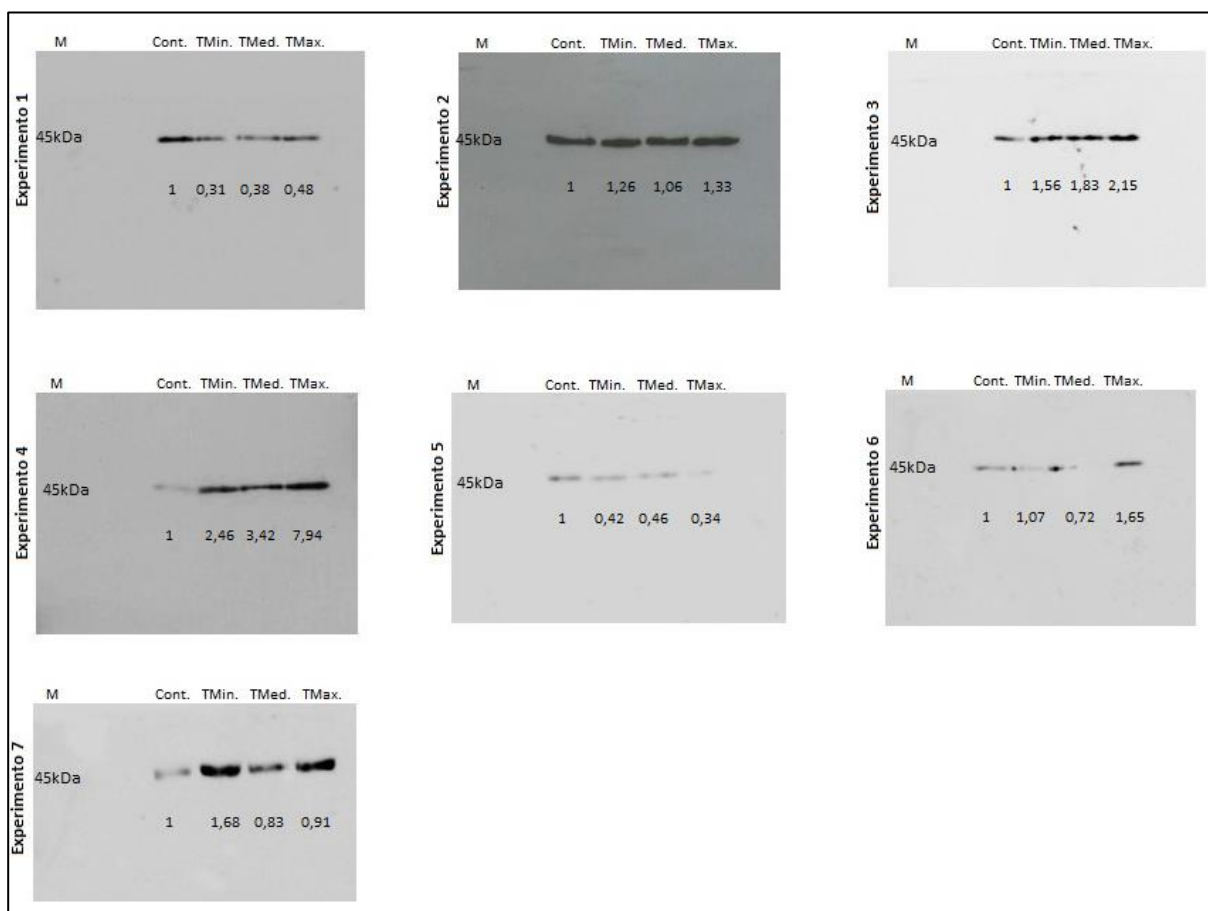


Figura 36: Expresión de SPARC en el ensayo de remodelación de la MEC. Referencias: **M**, marcador de peso; **Cont.**, muestra control; **TMin.**, muestra tratamiento mínimo; **TMed.**, muestra tratamiento medio y **TMax.**, muestra tratamiento máximo. El tiempo de exposición fue de 1min para los viales 1-4 y 5min para los viales 5-7. Cada experimento corresponde a una réplica biológica (tratamientos independientes). Los valores mostrados debajo de cada calle corresponden a los valores de DO obtenidos por el programa ImageJ. Cada uno se calculó normalizando los valores de DO del revelado con el correspondiente de su control de carga (tinción Ponceau mostrada en figura anterior) y luego referenciándolo al control del experimento.

5.5. Análisis estadístico de datos del ensayo de expresión de proteínas de la MEC

Para comparar si hubo variaciones en la cantidad de SPARC presente entre los tratamientos se hizo uso del programa **Image J** (Schindelin *et al*, 2015), con el cual se transformaron las imágenes en valores numéricos. Los datos resultantes de las tinciones Ponceau (*tabla 8*) fueron utilizados como control de carga de cada muestra para luego poder normalizar los valores obtenidos del revelado de cada una (*tabla 9*). Para la realización del análisis estadístico del ensayo, se usaron como datos los valores normalizados (*tabla 10*).

Tratamiento	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5	Exp. 6	Exp. 7
<i>Control</i>	43364,0	74141,7	27346,0	15860,0	51904,4	49819,2	8177,6
<i>Mínimo</i>	43821,7	55476,7	36181,6	42468,7	72328,5	29916,4	30899,1
<i>Medio</i>	37116,9	68902,4	35749,0	31852,6	62238,9	65841,1	23490,6
<i>Máximo</i>	39627,7	52929,3	36262,7	28471,1	22855,5	56789,0	44678,6

Tabla 8: Valores de densidad óptica correspondientes a las tinciones con rojo Ponceau de los experimentos realizados.

Tratamiento	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5	Exp. 6	Exp. 7
<i>Control</i>	6944,4	17362,8	2466,3	741,2	5786,4	3157,3	1355,9
<i>Mínimo</i>	2168,3	16361,7	5088,7	4887,3	3412,7	2022,9	8593,8
<i>Medio</i>	2258,2	17090,0	5892,3	5094,2	3193,7	2991,9	3251,9
<i>Máximo</i>	3037,7	16490,7	7035,5	10565,9	864,2	5954,0	6763,3

Tabla 9: Valores de densidad óptica correspondientes a las imágenes de los revelados de los experimentos realizados.

Tratamiento	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5	Exp. 6	Exp. 7
<i>Control</i>	6,2	4,3	11,1	21,4	9,0	15,8	6,0
<i>Mínimo</i>	20,2	3,4	7,1	8,7	21,2	14,8	3,6
<i>Medio</i>	16,4	4,0	6,1	6,3	19,5	22,0	7,2
<i>Máximo</i>	13,0	3,2	5,2	2,7	26,4	9,5	6,6

Tabla 10: Valores de densidad óptica normalizados, obtenidos a partir del cociente entre valores de las tinciones de Ponceau y de los revelados de cada uno de los experimentos realizados.

El análisis estadístico se llevó a cabo para verificar si hubo diferencias significativas en la expresión de SPARC entre los distintos tratamientos. En primer lugar, fue necesario definir las variables. La variable respuesta correspondió al valor de expresión de SPARC (valores normalizados, *tabla 10*) y las variables explicatorias fueron la dosis de radiofrecuencia aplicada y número de vial (1 a 7). Las dosis de radiofrecuencia se pueden clasificar en 4 grupos, siendo tres niveles de tratamientos (mínimo, medio y máximo) y un grupo control. Como ya mencionó, se trabajó con 7 réplicas biológicas (cada crótubo del stock de HaCaT pasaje 27). Por otro lado, en este estudio, el azar intervino cuando se le asignó el tratamiento aleatoriamente a cada placa de las 12 totales de cada réplica. Además, se

intentó controlar el error haciendo que la confluencia de las placas sea lo más homogénea posible y que los respectivos tratamientos se apliquen de la misma manera.

En función de esto, y con la colaboración de Adriana Pérez (profesora de Bioestadística en la UADE), se decidió utilizar la prueba paramétrica de **análisis de la varianza con diseño de bloques al azar**. Se sabe que la variable respuesta es resultado de la media poblacional, en este caso, la cantidad media de SPARC expresada en los controles, sumada al efecto producido por la dosis de radiofrecuencia (pudiendo aumentar o disminuir la media de la expresión de SPARC) y al error aleatorio. Este último se espera que sea similar en todos los casos debido a la asignación aleatoria de los tratamientos. Por lo tanto, el modelo fue el siguiente:

$$\text{Cantidad de SPARC expresada} = \text{Media poblacional} + \text{Efecto de la radiofrecuencia} + \text{Error aleatorio}$$

Primero se analizó la **estadística descriptiva** a partir de las medidas resumen, las cuales incluyen la media, mediana, el coeficiente de variación, desvío estándar, el mínimo y máximo valor (*tabla 11*).

Tratamiento	Variable	n	Media	D. E	C. V	Mínima	Máxima	Mediana
<i>Control</i>	SPARC	7	10,54	6,14	58,27	4,27	21,40	8,97
<i>Mínimo</i>	SPARC	7	11,28	7,48	66,29	3,39	21,19	8,69
<i>Medio</i>	SPARC	7	11,64	7,41	63,66	4,03	22,01	7,22
<i>Máximo</i>	SPARC	7	9,53	8,30	87,08	2,69	26,45	6,61

Tabla 11: Medidas resumen: Incluyen las medidas de Desvío estándar (D.E), media, mediana, Coeficiente de variación (C.V) y valores mínimo y máximo para cada tratamiento y grupo control. n: Población muestral. Se utilizó el software Infostat, FCA, Universidad de Córdoba.

A partir de los datos de medidas resumen se generaron los siguientes gráficos para lograr una mejor interpretación de la tendencia central y la variabilidad de los datos.

- **Box-plot:** permite llevar a cabo la observación de datos atípicos al igual que la cercanía entre la media y la mediana representadas como un punto y una línea que atraviesa la caja, respectivamente; además, da una idea de la distribución de los datos (**Figura 37**).

- **Q-Q plot:** sirve para analizar mejor la distribución de los datos, dando una aproximación de la simetría de los mismos (ver en *Anexo III*).

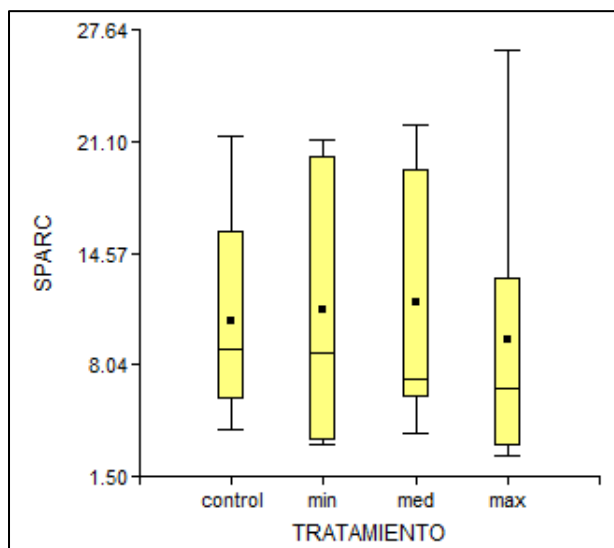


Figura 37: Box plot: Se representan los tratamientos mínimo, medio y máximo y el grupo control. Se utilizó el software Infostat, FCA, Universidad de Córdoba.

Tendencia central: se compararon los valores obtenidos de media y mediana de cada uno de los 4 tratamientos, viendo que son cercanas entre sí, lo que muestra que existe cierta simetría en los datos.

Por otro lado, se puede observar en el gráfico Box Plot que no se cuenta con puntos sueltos, es decir, que no hay presencia de datos atípicos.

Variabilidad: en este caso, se analizaron los valores del Desvío estándar (D.E) y coeficiente de variabilidad (C. V). En cuanto a los primeros se ven que los valores entre los tratamientos son similares. Para estudiar si estos desvíos son considerados altos o no, se analizaron los C.V, los cuales tienen valores superiores a lo considerado normal (20%) para sistemas naturales. Esto muestra que hay cierta heterogeneidad.

Entre las medias resultantes de los distintos tratamientos se pueden observar variaciones entre uno y otro, pero no existe una tendencia clara que indique que la expresión de SPARC aumenta o disminuye al aplicar radiofrecuencia (**Figura 38**).

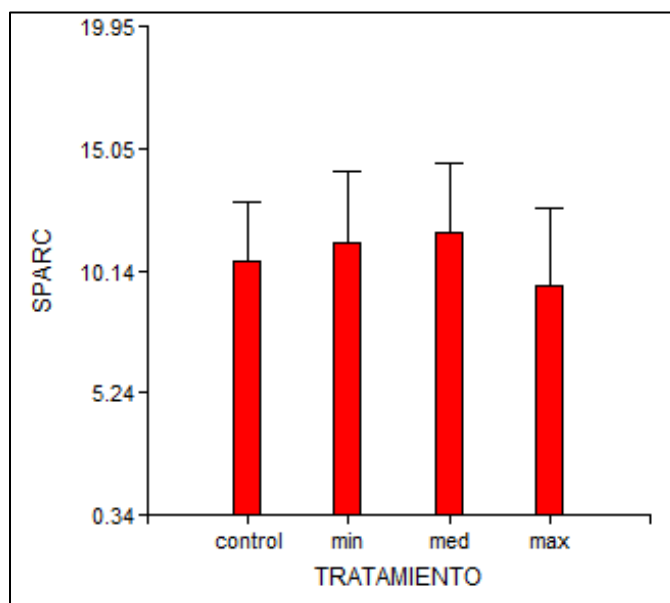


Figura 38: Gráfico de barra de las medias de la expresión de SPARC vs los tratamientos y grupo control. Se utilizó el software Infostat, FCA, Universidad de Córdoba.

A continuación, se realizó la prueba estadística **Análisis de la Varianza de Bloques al Azar** para verificar si hay diferencias significativas en la expresión de SPARC entre los distintos tratamientos. Para poder utilizarla es necesario que se cumplan una serie de supuestos. Los mismos se encuentran corroborados en el *Anexo III*.

Se plantearon dos hipótesis para esta prueba: por un lado, la hipótesis nula (H_0) o del no efecto, es decir, la que asegura que no hay diferencias en la población; por otro lado, la hipótesis alternativa (H_1) que plantea un cambio en la población que se espera que sea verdadera.

H_0 : la radiofrecuencia no tiene efecto sobre la expresión de SPARC

$$\mu_{control} = \mu_{mínima} = \mu_{medio} = \mu_{máximo}$$

H_1 : la radiofrecuencia tiene efecto sobre la expresión de SPARC

$$alguna \mu_i \neq \mu_{control}$$

Los resultados obtenidos en la prueba mencionada se muestran en la siguiente tabla (*tabla 12*).

Análisis de la varianza				
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SPARC	28	0,58	0,37	51,64

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	768,39	9	85,38	2,77	0,0314
TRATAMIENTO	18,34	3	6,11	0,20	0,8961
VIAL	750,06	6	125,01	4,06	0,0095
Error	554,70	18	30,82		
Total	1323,09	27			

Tabla 12: Resultado de prueba ANOVA de bloques al azar. Se utilizó el software Infostat, FCA, Universidad de Córdoba.

Debido a que el p-valor (0,8961) es mayor a α (0,05), se concluye que no hay evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula. Es decir, que no se presentan diferencias significativas en la expresión de SPARC entre los distintos tratamientos.

6. DISCUSIÓN

6.1. Puesta a punto del ensayo de expresión de proteínas de la MEC

Actualmente existen varios tratamientos, especialmente dermatológicos, que se basan en el uso de equipos de radiofrecuencia. El uso de las ondas de radiofrecuencia en el último tiempo ha aumentado mucho como alternativa de las cirugías y otros métodos invasivos como son los láseres. Según varias publicaciones, esta tecnología mejora el aspecto de la piel, disminuyendo su laxitud y las irregularidades en el contorno y textura del cuerpo, con menores tiempos de recuperación y menos efectos secundarios (Beasley y Weiss, 2014).

El mecanismo de acción de las terapias con RF se basa en los supuestos efectos que esta produce en algunos componentes de la matriz extracelular. En investigaciones previas, se han detectado aumentos en la expresión de ciertas moléculas luego de la aplicación de RF, como son el colágeno y la elastina (Hantash *et al*, 2009; Beasley y Weiss, 2014). Al momento de comenzar este proyecto de investigación (2014) no se habían encontrado investigaciones *in vitro* en relación a los efectos de la RF de equipos de uso estético, las encontradas fueron *in vivo* o *ex vivo*. Las únicas investigaciones que se podían encontrar realizadas con modelos *in vitro*, hasta el momento, por lo general utilizaban radiofrecuencias con frecuencias mayores a las frecuencias que usan los equipos estéticos (Rao *et al*, 2008). Por esto, se planteó evaluar el efecto de la radiofrecuencia generada por equipos estéticos en proteínas de la MEC en un modelo celular. Para lograr este objetivo, se requirió de una extensiva puesta a punto. La misma involucró la selección del modelo celular adecuado, la optimización de la obtención y concentración de muestras de medio condicionado y poner a punto la técnica de Western Blot para la detección y cuantificación de la proteína blanco (colágeno tipo I y SPARC).

La selección de los cultivos celulares como modelo biológico aporta algunas ventajas. Se pueden controlar las condiciones del ambiente fisicoquímico, como la temperatura, presión del CO₂, humedad y cantidad de nutrientes en el medio. Además, al poder paquearlas en monocapa se consigue una exposición directa de las células a la radiofrecuencia. El uso de cultivos en monocapa permitiría estudiar el efecto de esta exposición en un único tipo celular y de esta manera analizar cómo el mismo responde a estos tratamientos. Es decir, se podría identificar específicamente que tipo celular es el responsable de la generación de cambios causados por la radiofrecuencia en la matriz extracelular. Por otro lado, con este modelo es más sencillo conseguir un número muestral más amplio que en los modelos *ex vivo* e *in vivo*,

otorgando así mayor relevancia a los valores estadísticos que se obtienen. Por estas razones, se consideró que el modelo biológico era adecuado para la realización de estos tratamientos aportando las ventajas mencionadas.

Uno de los primeros pasos de esta tesis, fue medir los niveles de expresión de una proteína relevante de la MEC, en medio condicionado concentrado de células CHO. La molécula blanco en este primer paso fue el colágeno, específicamente el tipo I, ya que es el más estudiado en relación a los efectos de la RF (Beasley y Weiss, 2014). La línea murina fue elegida ya que se encontraba disponible en el laboratorio y por ser células epiteliales (Wurm, 2013). La muestra seleccionada fue el medio condicionado debido a que la proteína target escogida es secretada. Para poder detectar colágeno por Western Blot, se debió concentrar la muestra. Con dicho fin, se optó por el sistema de concentración por Centricones. Con este método, se lograron concentrar los medios hasta nueve veces (9x). No obstante, con la cantidad de proteínas obtenida no se detectó colágeno y tampoco actina, usada como *housekeeping*. Probablemente, mayores concentraciones eran necesarias para tener resultados positivos. Sin embargo, los tiempos de centrifugación requeridos para esto eran muy largos con la centrífuga con la que se contaba. Lo ideal hubiese sido utilizar una centrífuga de mayor potencia, para poder conseguir mayor velocidad y así lograr muestras más concentradas en tiempos mucho más cortos.

Al no haber conseguido la detección de las proteínas blanco luego del uso de Centricones, se probó trabajar con el lisado de células CHO. Con esta técnica se obtenía de forma rápida gran cantidad de proteínas, lo que permitió verificar si el funcionamiento de los anticuerpos anti- actina y colágeno era correcto. En este caso, a diferencia del anterior, se logró obtener abundante cantidad de proteínas. Esto quedó demostrado en las tinciones de proteínas totales, por lo que se esperaban resultados positivos tanto para colágeno como para actina. A pesar de esto, solo se detectó actina. Habiendo obtenido abundantes proteínas en el lisado y sabiendo que las células usadas producían colágeno, este resultado llevó a pensar que el anticuerpo anti-colágeno utilizado no reconocía la proteína de origen murino. Asimismo, no había evidencias bibliográficas previas de que el anticuerpo usado la reconociera (*Datasheet Anti-collagen I antibody*, Abcam). Debido a esto, se prosiguió al remplazo de la línea CHO por otra de células humanas. Este cambio, además, se consideró una ventaja dado que su origen humano le otorga más relevancia a la investigación.

Las primeras células humanas que se probaron fueron los fibroblastos WI-38. Este tipo celular es el mayor productor de colágeno tipo I en la piel, por lo que se esperaban resultados positivos en la detección del mismo. A pesar de ello, no se logró detectar colágeno ni actina. Creemos que la ausencia de señal para colágeno y actina se debe a la baja concentración de proteínas totales obtenidas en las condiciones experimentales probadas. Las células WI-38 son una línea no establecida por lo que mantenerlas en cultivo era muy difícil. Tendían a sufrir arresto celular y se frenaba el crecimiento. Una solución a este problema hubiese sido conseguir esta línea celular nueva y poner a punto a partir de esta el método para lograr el extracto proteico. Dado que no se contaba con los recursos necesarios para esto, se decidió elegir otra línea humana a la cual se podía tener acceso en un corto plazo.

A continuación, se seleccionó la línea celular HaCaT derivada de queratinocitos humanos. Se consiguió una alta tasa de proliferación de las células. A su vez, las tinciones de proteínas totales, mostraban una considerable cantidad de las mismas. Además, en la autoradiografía, se observó la banda correspondiente a actina. En este caso, no se podía detectar colágeno tipo I dado que las células por ser queratinocitos no lo producen (Benny *et al*, 2015). El resultado obtenido en el revelado junto con el hecho de haber obtenido extractos de proteínas abundantes, permitió que se continuara con esta línea, pero cambiando la proteína de interés.

La nueva proteína blanco fue SPARC. La elección se basó en que esta glicoproteína ha sido extensamente estudiada como una reguladora de la síntesis del colágeno (Bradshaw, 2009). Además, se contaba con la posibilidad de disponer rápidamente de un anticuerpo específico para su detección. Continuando con la línea celular HaCaT, se tomó como muestra el medio condicionado concentrado de las mismas, ya que SPARC también era secretada por las células. La precipitación con acetona permitió obtener una cantidad detectable de proteínas totales. Esto junto con la evidencia de que el anticuerpo a utilizar reconocía la proteína humana (Sweetwyne *et al*, 2004), hizo que se esperaran resultados satisfactorios. Afortunadamente, se logró observar la banda correspondiente a SPARC (aproximadamente 45kDa).

Para utilizar a SPARC como proteína blanco, hubo que cambiar el control de carga. Esta molécula tiene un peso molecular muy similar al de la actina (*housekeeping*), 45kDa y 42kDa respectivamente, por lo que las bandas en la autoradiografía se superponen. En la **Figura 29** esto se observa claramente. Las alternativas disponibles en UADE Labs eran las

tinciones de proteínas totales: Azul de Coomassie sobre el gel o Rojo Ponceau sobre la membrana transferida. Estas, a diferencia del uso de actina, tienen la ventaja de que la normalización de los datos se hace en función del total de proteínas y no de una única proteína, por lo que se pueden considerar más representativas (Romero-Calvo *et al*, 2010). Finalmente, el método escogido fue la tinción con Rojo Ponceau. Las razones de esto fueron la rapidez de la técnica (2min para teñir), la reversibilidad (basta solo enjuagar con agua unos minutos y se destiñe) y el hecho de que se haga sobre la misma membrana en la que se va a llevar a cabo la detección de SPARC. Además, se encontró evidencia bibliográfica que apoya el uso de esta técnica como control de carga (Romero-Calvo *et al*, 2010).

6.2. Efecto biológico de la Radiofrecuencia

En un estudio realizado por El-Domyati y colaboradores se evaluaron los efectos que producen las ondas de radiofrecuencia en distintas capas de la piel. Se observaron aumentos significativos en el grosor de la epidermis, lo cual podría sugerir que la tasa de proliferación celular está aumentada. A la vez, se detectó un incremento significativo en la banda de colágeno en la unión dermal-epidermal. Asimismo, se vieron cambios en la estructura de la dermis, específicamente aumentos en la cantidad de colágenos tipo I y III (El-Domyati *et al*, 2011).

Se ha encontrado evidencia de que los efectos recién mencionados podrían deberse al desencadenamiento de una respuesta microinflamatoria característica del proceso de cicatrización de una herida, generado por el efecto térmico causado por la radiofrecuencia (Hantash *et al*, 2009). Por otro lado, la respuesta microinflamatoria podría ser causada por otros factores que no involucren el calentamiento del tejido (Kubat, Moffet y Fray, 2015). La glicoproteína SPARC se ha descrito como un factor crítico en la formación y ensamblaje de las moléculas de colágeno en la MEC (Martinek *et al*, 2007; Bradshaw, 2009). Los niveles de expresión de esta se ven aumentados en situaciones que conllevan la remodelación de la matriz extracelular, como la cicatrización de heridas. Debido a la participación de SPARC en los procesos de remodelación de la MEC y a los efectos de la radiofrecuencia en estos procesos, se hipotetizó que la aplicación de esta tecnología sobre células epiteliales causaría un aumento en la expresión de SPARC. No obstante, luego de realizar el Ensayo de expresión de proteínas de la MEC y el posterior análisis estadísticos de los datos obtenidos, no se

observaron diferencias significativas en la expresión de la proteína SPARC entre los distintos tratamientos con radiofrecuencia.

En investigaciones previas, Hantash y su equipo y, posteriormente, Nicoletti y colaboradores encontraron evidencia que la RF genera una respuesta micro-inflamatoria que sería una consecuencia del efecto térmico generado por la radiación. El aumento de la temperatura en las zonas tratadas generaría la desnaturalización parcial del colágeno, que a su vez provocaría que este sea metabolizado progresivamente por macrófagos (Nicoletti *et al*, 2014). Además, se han detectado mayores niveles de proteínas de respuesta a choque térmico, en especial de la chaperona del colágeno HSP47. Todos estos eventos conducen a la generación de nuevas moléculas de colágeno (Hantash *et al*, 2009). En nuestro trabajo, es posible que el efecto térmico logrado en los cultivos no haya sido suficiente para generar esta respuesta de las células. En el ensayo realizado solo el tratamiento máximo alcanzó una temperatura cercana a la lograda en estudios *in vivo*. Nicoletti y su equipo mostraron que la temperatura de la superficie de la piel tratada llegaba a los 38,2°C y este aumento era suficiente para lograr el rearreglo de las fibras de colágeno y desencadenar la respuesta micro-inflamatoria (Nicoletti *et al*, 2014). En nuestro caso, la máxima temperatura que se logró fue de 33,2°C, siendo esta una temperatura mucho menor a la cual crecen las células *in vitro* (37°C). Debido a esto, los cambios térmicos logrados en este trabajo difícilmente generarían la respuesta inflamatoria mencionada. Creemos que la temperatura alcanzada no fue alta debido a que la resistencia que genera la placa y el medio de cultivo es muy poca. Cuando se aplican los tratamientos de RF en la piel, la corriente eléctrica de la radiación aplicada produce calor debido a la elevada resistencia que tiene la piel (Lolis y Goldberg, 2012). Esta resistencia o impedancia es característica de cada tipo de piel y en general de cada material. Cuanto mayor es la resistencia, mayor es el calor generado. Por lo tanto, dado que el plástico de la placa es un material no conductor (Muñoz *et al*, 2012), la resistencia que genera al paso de la radiación se podría considerar casi nula ya que no interacciona con las ondas. En cuanto al medio de cultivo, este es un material conductor y que en consecuencia si interacciona con las ondas generando cierta resistencia (Muñoz *et al*, 2012). Sin embargo, su espesor es muy chico para generar una resistencia similar a la de un tejido. Esto hace que los cambios de temperatura que observamos en los tratamientos sean mínimos. Cabe destacar que dadas las características mencionadas del plástico y del medio de cultivo, podemos asegurar que las ondas de RF llegan al cultivo, pero sin generar un efecto térmico considerable.

En el trabajo llevado a cabo por Kubat *et al*, se describieron cambios en la expresión génica de distintos factores involucrados en la regulación del proceso de inflamación luego de ser tratados con RF. En este caso, no relacionan estos resultados con un efecto térmico que puede provocar la radiación. Una hipótesis sería que las variaciones en la expresión génica observada podrían estar relacionadas a los efectos en los canales dependientes de voltaje de Ca^{+2} . La activación de estos canales llevaría a la activación de vías de señalización que tiene al Ca^{+2} como segundo mensajero (Kubat, Moffett y Fray, 2015). Considerando que las ondas electromagnéticas atraviesan el material de la placa de cultivo, en nuestro trabajo supusimos que efectos no térmicos de la RF podrían ocurrir y tal vez afectar la expresión de SPARC al ser una proteína que se ha visto involucrada en procesos de inflamación (Bradshaw, 2009). Sin embargo, los resultados obtenidos en nuestro trabajo no muestran evidencia de que los distintos tratamientos de RF provoquen lo efectos mencionados.

El trabajar con un cultivo celular en monocapa tiene la desventaja de que no se cuenta con todas las interacciones presentes *in vivo*, como son las interacciones con la matriz extracelular y entre distintos tipos de célula (Freshney, 2005c). Por esta razón, no están presentes todas las interacciones características del proceso de micro-inflamación que generaría la RF. La inflamación es un proceso complejo y altamente regulado que involucra acción de distintas moléculas y tipos celulares, tales como neutrófilos, leucocitos, citoquinas, factores de crecimiento y proteasas (Hantash *et al*, 2009; Kubat, Moffett y Fray, 2015). La ausencia de algunos de los factores involucrados en este proceso, podría provocar que los efectos de la RF observados *in vivo* y *ex vivo* no ocurran completamente *in vitro*. Esta es otra de las posibles razones por las que puede que no se haya observado una diferencia en la expresión de SPARC en nuestra investigación.

Es importante destacar que hasta el momento las investigaciones que han estudiado los mecanismos de acción de la RF lo han hecho principalmente con el colágeno o la elastina como foco (Hantash *et al*, 2009). Además, no se encuentran estudios que relacionen directamente a la RF con la proteína SPARC. Se sabe que esta última es una glicoproteína que afecta la formación y el ensamblaje de colágeno. Está probado que modula la interacción de colágeno con la superficie de las células y que regula la maduración e incorporación de este en la matriz extracelular (Martinek *et al*, 2007; Rentz *et al*, 2007; Bradshaw, 2009). Por ello, consideramos que, si la RF genera aumento en la síntesis de colágeno, la expresión de la SPARC podría verse aumentada también. A su vez, esta glicoproteína se encuentra

involucrada en el proceso de reparación de heridas y se incrementa su expresión en los acontecimientos más tardíos cuando ocurre la remodelación de la MEC (Bradshaw, Reed y Sage, 2002). Considerando que la radiación con ondas de RF genera en la piel una respuesta similar a la reparación de una herida, supusimos que la expresión de SPARC también aumentaría por esta razón. El hecho de que no hayamos detectado diferencias significativas en la expresión de SPARC luego de tratar las células con RF, no es suficiente para descartar que esto esté ocurriendo. Tal vez los cambios suceden, pero en proporciones pequeñas las cuales no se detectan con el método usado (Western Blot).

Muchos trabajos que han estudiado los efectos de la RF en relación a tratamientos estéticos, vieron resultados luego de tiempos prolongados desde la aplicación del tratamiento. Por ejemplo, Nicoletti y colaboradores realizaron biopsias a los pacientes antes de aplicar RF y luego de 2 semanas de haber recibido el tratamiento (Nicoletti *et al*, 2014). Además, en varios estudios llevan a cabo varias sesiones de RF durante los ensayos. Hantash *et al*, tomaron muestras a los 2, 14 y 28 días luego de comenzado el ensayo y en cada tiempo también aplicaron radiofrecuencia a los pacientes. De esta forma, pudieron observar un progresivo aumento de la respuesta inflamatoria (Hantash *et al*, 2009). En el caso de nuestro trabajo, se realizó una única aplicación y al cabo de 2 días se hizo la toma de muestras. Es posible que esto no haya sido suficiente para lograr detectar los cambios esperados en la expresión de SPARC.

Cabe la posibilidad de que la línea celular utilizada no hay sido la más apropiada para la realización del ensayo. Las células más usadas en estudios relacionados con los efectos de la RF son los fibroblastos debido a que son los mayores productores de colágeno tipo I de la piel (Alberts *et al*, 2008). Los queratinocitos, con los que se trabajó en este ensayo, también producen colágeno, pero principalmente del tipo IV (Kolarsick *et al*, 2011). Además, los efectos de la RF han sido estudiados y relacionados principalmente con la dermis, donde se encuentran los fibroblastos. Por lo tanto, es posible que el uso de queratinocitos como modelo no haya sido el más adecuado para evaluar los efectos supuestos de la radiofrecuencia en la piel.

Dentro de los UADE Labs, se ha llevado a cabo un estudio previo que también se relaciona con la electromedicina. Específicamente, se realizó la aplicación de magnetoterapia a un modelo celular *in vitro*, línea celular CHO, por el lapso de una hora con el propósito de medir posibles efectos en cicatrización (representada con la técnica de *scratching* celular) y en

proliferación celular. En esta investigación, tampoco se observaron cambios significativos en ninguno de estos procesos y se concluyó que bajo las condiciones establecidas la magnetoterapia no afecta la migración ni la proliferación celular (Caruso y Del Grosso, 2015). Al igual que en este trabajo, se utilizó un modelo biológico *in vitro* para probar los efectos de un tratamiento con frecuencias electromagnéticas. Debido a esto, y como fue mencionado anteriormente, surge la duda si el modelo celular *in vitro* es el adecuado para estudiar este tipo de tratamientos. Para poder verificar esto se podría estudiar lo mismo que se estudió en estos proyectos pero en modelos *in vivo* y comparar entre ellos los resultados obtenidos.

Es posible que el método de precipitación con acetona para la concentración de proteínas, pueda haber afectado el resultado obtenido. Distintos grados de pérdida de proteínas con este método han sido reportados y parecen depender de las distintas condiciones de la muestra. Condiciones como la fuerza iónica, presencia de surfactantes o buffers de pH, pueden interferir con la recuperación de proteínas. Actualmente, no existe una detallada investigación sobre esto. En una investigación realizada por Crowell y su equipo, ellos se enfrentaron en algunos casos a pellets proteicos grandes y difíciles de aislar del sobrenadante por pipeteo cuando trabajaban con altas concentraciones de proteínas (Crowell *et al*, 2013). Esta dificultad también estuvo presente en esta investigación y pudo estar influenciando las proteínas totales obtenidas en los experimentos. Es cierto que la variabilidad de la técnica debería ser la misma en todos los experimentos. Sin embargo, lo cierto es que los pellets generados no siempre eran de iguales, incluso dentro de un mismo experimento, elevando la posibilidad de que se pierda más o menos muestra en cada caso.

Actualmente, el uso de RF en dermatología continúa creciendo debido principalmente a la seguridad, efectividad y los mínimos tiempos de recuperación que necesita el paciente. Sin embargo, es una tecnología relativamente nueva en comparación a otras terapias que usan frecuencias electromagnéticas, como es la magnetoterapia. El uso de la RF para aplicaciones faciales fue aceptado por la FDA de los EE. UU en el año 2002 y luego en el 2006 se aprobó para su uso en general en dermatología. En general, los estudios han reportado resultados positivos y satisfacción de los pacientes tratados. Sin embargo, se requieren de estudios clínicos más controlados y realizados de forma más aleatoria para poder asegurarse que los tratamientos se hagan con los parámetros ideales para lograr efectividad y la seguridad del paciente. Continuar investigando, permitirá también, conocer más en profundidad el

mecanismo de acción de esta tecnología y así asegurar los efectos favorables en el paciente (Lolis y Goldberg, 2012; Beasley y Weiss, 2014).

6.3. Proyecciones experimentales de este trabajo

A partir del trabajo realizado en esta investigación, se proponen algunas alternativas para futuros proyectos relacionados. En primer lugar, llevar a cabo el ensayo utilizando un anticuerpo que logre detectar colágeno tipo I ya que es la proteína de matriz que más se estudió en relación a la RF, en fibroblastos, pues son los principales productores de este tipo de colágeno. Asimismo, se podrían estudiar los efectos de la RF mediante técnicas de transcriptómica para evaluar posibles diferencias en la expresión a nivel de mRNA. Además, en algunos casos, estos efectos de RF han sido estudiados a largo plazo *in vivo*. Por esto, se recomienda diseñar un ensayo que permita evaluar los mismos *in vitro*.

Tomando en cuenta las instalaciones que se encuentran en UADE Labs, se propone estudiar los efectos de esta tecnología en otros modelos celulares como, por ejemplo, una línea celular originaria de fibroblastos. A su vez, podrían probarse modelos de cultivos 3D en matrices de colágeno para imitar más fielmente lo que ocurre *in vivo*, lo que permitiría la obtención de resultados fisiológicamente más relevantes. También, se podría llevar a cabo estudios *in vivo* con algún modelo biológico presente en la Universidad, como es el caso de *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans*.

7. CONCLUSIONES

A lo largo de la realización de esta tesis se logró:

- Poner a punto el crecimiento de la línea celular HaCaT y sus tratamientos de radiofrecuencia de distinta intensidad como modelo experimental para el estudio de los efectos biológicos de la RF;
- Optimizar el método de obtención del medio condicionado de células, concentración de las proteínas totales mediante precipitación con acetona y cuantificación con métodos colorimétricos;
- Optimizar un método de análisis de los niveles de expresión de la proteína extracelular SPARC en células HaCaT sometidas a distintos niveles de RF;

No obstante, no se logró obtener evidencias que permitan vincular el efecto de la radiofrecuencia con los niveles de la expresión de SPARC en el modelo estudiado. Sin embargo, no es posible descartar que resultados opuestos puedan hallarse en otras condiciones de estudio o en otros modelos alternativos.

En resumen, los objetivos alcanzados permitirán a futuros alumnos abordar la problemática del efecto de la RF en los tratamientos de estética desde más perspectivas, modelos biológicos y condiciones experimentales, con una base experimental más sólida que la existente en los UADE Labs antes de comenzar este proyecto de investigación.

8. BIBLIOGRAFÍA

ALBERTS, Bruce *et al.* Chapter 19: Cell Junctions, Cell Adhesion, and the Extracellular Matrix. En: *Molecular Biology of the Cell*. 5a. ed. New York: Garland Science, 2008, p. 1131-1204.

ALNOMAIR, Naif, Nazarian, Rachel y Ellen Marmur. Complications in Lasers, Lights and Radiofrequency Devices. En: *Facial Plastic Surgery*. 2012, vol. 28, no. 3, p. 340-346.

ARISTEGUI, Rosana A. La Luz En: *Física I: Energía. Mecánica. Termodinámica. Electricidad. Ondas. Nuclear*. Buenos Aires: Santillana, 1999, p. 51.

BEASLEY, Karen L. y Weiss, Robert A. Radiofrequency in cosmetic dermatology. En: *Dermatologic clinics*. Ene. 2014, vol. 32, no 1. p. 79-90.

BENNY, Paula, et al. Making More Matrix: Enhancing the Deposition of Dermal–Epidermal Junction Components In Vitro and Accelerating Organotypic Skin Culture Development, Using Macromolecular Crowding. En: *Tissue Engineering*. 2015, vol. 21, no.1 y 2, p.183-192.

BOUKAMP, Petra, *et al.* Normal Keratinization in Spontaneously Immortalized Aneuploid Human Keratinocyte Cell Line. En: *The Journal of Cell Biology*. Mar. 1988, vol. 106, p. 761-771.

BRADSHAW, Amy D. The role of SPARC in extracellular matrix assembly. En: *Journal of Cell Communication and Signaling*. Oct. 2009, vol. 3, no. 3-4, p. 239-246.

BRADSHAW, Amy D. y E. Helene, Sage. SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue injury. En: *The Journal of Clinical Investigation*. May. 2001, vol. 107, no. 9, p. 1049-1054.

BRADSHAW, Amy D., *et al.* SPARC-null mice display abnormalities in the dermis characterized by decreased collagen fibril diameter and reduced tensile strength. En: *Journal of Investigative Dermatology*. Jun. 2003, vol. 120, no. 6, p. 949-955.

BRADSHAW, Amy D., Reed, May J. y E. Helene Sage. SPARC-null mice exhibit accelerated cutaneous wound healing. En: *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2002, vol. 50, no. 1, p. 1-10.

BREKKEN, Rolf A. y Sage, E. Helene. SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix communication. En: *Elsevier, Matrix Biology*. Ene. 2001, vol. 19, no. 8, p. 815-827.

BRONZINO, Joseph D. Introduction and Preface. En: *The Biomedical Engineering Handbook: Medical Devices and Systems*. 3a. ed. Florida: Taylor & Francis Group, 2006.

CARUSO Paula y Del Grosso, Agustina. Estudio del efecto de la magnetoterapia en la cicatrización de heridas en un modelo celular. 2015.

CASTRO, Juan Carlos L., *et al.* *Fisioterapeutas del Servicio Gallego de la Salud: Temario Volumen 2*. 1a. ed. Sevilla: Mad, S. L, 2006, p. 189.

CLÍNICA SIMKIN, sitio web. Disponible en: www.clinicasimkin.com.ar/radiofrecuencia/

CROWELL, Andrew M. J., Crowell, Mark J. y Doucette, Alan A. Maximizing the recovery of water-soluble proteins through acetone precipitation. En: *Analytical Chimica Acta*. Sept. 2013, vol 796, p.48-54.

Datasheet *Anti- collagen I antibody* [EPR7785] ab138491. Abcam.

EL-DOMYATI, Moetaz, *et al.* Radiofrequency facial rejuvenation: Evidence-based effect. En: *Journal of the American Academy of Dermatology*. Mar. 2011, vol. 64, no. 3, p. 524-535.

ELSAIE, Mohamed L. Cutaneous remodeling and photorejuvenation using radiofrequency devices. En: *Indian Journal of Dermatology*. Sep. 2009, vol. 54, no. 3, p. 201-205.

FARIAS FORESI, Leandro y Mestre, Diego. Diseño y desarrollo de un kit de detección de contaminaciones por micoplasma en cultivos celulares. 2016.

FRESHNEY, Ian R. Aseptic Technique. En: *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. 5a. ed. New Jersey: Wiley-Liss Pearson, 2005a, p. 73-87.

FRESHNEY, Ian R. Defined Media and Supplements. En: *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. 5a. ed. New Jersey: Wiley-Liss Pearson, 2005b, p. 73-87.

FRESHNEY, Ian R. Introduction. En: *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. 5a. ed. New Jersey: Wiley-Liss Pearson, 2005c, p. 1-11.

GALMED, sitio web. Disponible en: www.galmed.com.ar/radiofrecuenciamonopolar.html

GIUDICI, Camilla, *et al.* Mapping of SPARC/BM40/Osteonectin-binding sites on fibrillar collagen. En: *Journal of Biological Chemistry*. May. 2008, vol. 283, no. 28, p. 19551-19560.

HANTASH, Basil M., *et al.* Bipolar fractional radiofrequency treatment induces ne elastogenesis and neocollagenesis. En: *Lasers in surgery and medicine*. Ene. 2009, vol. 41, no. 1, p. 1-9.

HAYFLICK, Leonard y MOORHEAD P. S. The Serial Cultivation of Human Diploid Cell Strains. En: *Experimental Cell Research*. May. 1961, vol. 25, p. 585-621.

HAYFLICK, Leonard. The Limited In vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. En: *Experimental Cell Research*. May. 1964, vol. 37, p. 614-636.

HEWITT, Paul G. Luz. En: *Física conceptual*. 10ma edición. Pearson Educación. 2007, p. 495-618.

HOHENESTER, Erhard, *et al.* Structural basis of sequence-specific collagen recognition by SPARC. En: *PNAS*. Nov. 2008, vol. 105, no. 47, p. 18273-18277.

HOLLAND, Peter W. H. *et al.* In vivo expression of mRNA for de Ca⁺²-binding protein SPARC revealed by *in-situ* hybridization. En: *Journal of Cell Biology*. Jul. 1987, vol. 105, p. 473-482.

HULMES, D. J. S. Collagen Diversity, Synthesis and Assembly. En: FRANTZ, Peter. *Collagen Structure and Mechanics*. Potsdam: Springer Science and Business Media, 2008, p. 15-47.

INFO RADIOFRECUENCIA, sitio web. Disponible en: <http://info-radiofrecuencia.es/propiedades-de-la-radiofrecuencia/>

JONES, William D., Elston, Dirk M. y Berger, Timothy G. Skin: Basic Structure and Function. En: *Diseases of the Skin: Clinical Dermatology*. 12a ed. Philadelphia: ELSEVIER 2016. p. 1-11.

KAUFMANN, Brigitte, *et al.* Structural variability of BM-40/SPARC/osteonectina glycosylation: implications for collagen affinity. En: *Journal of Glycobiology*. Mar. 2004, vol. 14, no. 7, p. 609-619.

KOLARSICK, Paul A.J., Kolarsick, Maria Ann y Goodwin, Carolyn. Anatomy and Physiology of the skin. En: *Journal of the Dermatology Nurses' Association*. Jul/Ago. 2011, vol. 3, no. 4, p. 203-213.

KUBAT, Nicole J., Moffett, John y Fray, Linley M. Effect of pulsed electromagnetic field treatment on programmed resolution of inflammation pathway markers in human cells in culture. En: *Journal of Inflammation Research*. Feb. 2015, vol. 8, p. 59-69.

LANE, Timothy F. y Sage, E. Helene. The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions. En: *FASEB Journal*. Feb. 1994, vol. 8, no. 2, p. 163-173.

LANKAT-BUTTGEREIT, Brigitte, *et al.* Cloning and complete amino acid sequences of human and murine basement membrane protein BM-40 (SPARC, osteonectina). En: *Elsevier, Biomedical Division*. Ago. 1988, vol. 236, no. 2, p. 352-356.

LOLIS, Margarita S. y Goldberg, David J. Radiofrequency in cosmetic dermatology: a review. En: *Dermatology Surgery*. Nov. 2012, vol. 38, no. 11, p. 1765-1776.

Manual de instrucciones de Mini-PROTEAN[®] Tetra Cell. BIO-RAD.

Manual de instrucciones de Mini-Trans Blot Cell. BIO-RAD.

MARKOV, Markos S. Expanding Use of Pulsed Electromagnetic Field Therapies. En: *Electromagnetic Biology and Medicine*. Jul. 2009, vol. 26, p. 257-274.

MARTINEK, N., *et al.* Haemocyte-derived SPARC is required for collagen-IV-dependent stability of basal laminae in *Drosophila* embryos. En: *Journal of Cell Science*. Feb. 2008, vol. 121, no. 10., p. 1671-1680.

MARTINEK, N., *et al.* Is SPARC an evolutionarily conserved collagen chaperone? En: *Journal of Dental Research*. 2007, vol. 86, no. 4, p. 296-305.

MATSUOKA, Yasuhiro, *et al.* Insufficient folding in type IV collagen and formation of abnormal basement membrane-like structure in embryoid bodies derived from Hsp-47 null embryonic stem cells. En: *Molecular Biology of the Cell*. Oct. 2004, vol. 15, p. 4467-4475.

MIRALLES, Joaquín M. Fundamentos físicos de la teledetección: Leyes y principios básicos. En: *La teledetección en el seguimiento de los fenómenos naturales. Recursos renovables: Agricultura*. Valencia: Universitat de València Estudi General, 1991, p. 51.

MOHAMMED, Haitham, *et al.* Non-thermal continuous and modulated electromagnetic radiation fields effects on sleep EEG of rats. En: *Journal of Advanced Research*. Jun. 2013, vol. 4, no. 2, p. 181-187.

MUÑOZ, Jordi B., *et al.* Propagación de las ondas electromagnéticas. En: *Física II*. Módulo 5. 1ra edición. FUOC, 2012.

MURPHY-ULLRICH Joanne E. y Sage, E. Helene. Revisiting the matricellular concept. En: *Matrix Biology*. Jul. 2014, vol. 37, p. 1-14.

NICOLETTI, Giovanni, *et al.* The biological effects of quadripolar radiofrequency sequential application: a human experimental study. En: *Photomedicine and laser surgery*. Oct. 2014, vol. 32, no. 10, p. 561-573.

PHARMACEUTICAL MICROBIOLOGY, sitio web. Disponible en: www.pharmamicroresources.com/2014_12_01_archive.html.

PRADA, Federico. Rol del gen SPARC en la progresión tumoral y su uso como blanco de terapia génica. 2007.

RAO,V.S., *et al.* Nonthermal Effects of Radiofrequency-Field Exposure on Calcium Dynamics in Stem Cell-Derived Neuronal Cells: Elucidation of Calcium Pathways. En: *Radiation Research*. Mar. 2008, vol. 169, no.3, p. 319-329.

RENTZ, Tyler J., *et al.* SPARC regulates processing of procollagen I and collagen fibrillogenesis in dermal fibroblasts. En: *Journal of Biological Chemistry*. Jul. 2007, vol. 282, no. 30, p. 22062-22071.

ROMERO-CALVO, Isable, *et al.* Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western Blots. En: *Analytical Biochemistry, ELSEVIER*. May. 2010, vol. 401, no. 2, p. 318-320.

SCHINDELIN, J., *et al.* The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. En: *Molecular Reproduction and Development*. Jul-Ago. 2015, vol. 82., no. 7-8., p. 518-529.

SIMMONS, Brian J., *et al.* Use of radiofrequency in cosmetic dermatology: focus on nonabative treatment of acne scars. En: *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*. Dic. 2014, vol. 7, p. 335-339.

SWEETWYNE, Mariya, *et al.* Functional analysis of the matricellular protein SPARC with novel monoclonal antibodies. En: *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. Jun. 2004, vol. 52, no. 6, p. 723-733.

UNIVERSIDAD DE BARCELONA, sitio web. Espectro electromagnético. Disponible en: <http://www.ub.edu/talq/es/node/259>.

VALENTIM DA SILVA, Rodrigo M., *et al.* Effect of Capacitive Radiofrequency on the Fibrosis of Patients with Cellulite. En: *Dermatology Research and Practice*. Sept. 2013, vol. 2013, p. 1-6.

VELEZ-GONZALEZ, Mariano. Actualización de los sistemas de radiofrecuencia en rejuvenecimiento. En: *Revista Medicina Estética* [en línea]. Mar. 2008. Disponible en: <http://www.med-estetica.com/Colaboradores/index.html>

WADMAN, Meredith. *Cell Division: In 1962, Leonard Hayflick created a cell strain from an aborted fetus. More than 50 years later, WI-38 remains a crucial, but controversial, source of cells.* En: *Nature*. Jun. 2013, vol. 498, p. 422-426.

WANG, Hue, *et al.* Identifying the SPARC binding sites in collagen I and procollagen I by atomic force microscopy. En: *Analytical Chemistry*. Nov. 2005, vol. 77, no. 21, p. 6765-6771.

WURM, Florian M. CHO Quasispecies-Implications for Manufacturing Processes. En: *Processes*. Oct. 2013, vol. 1, p. 296-311.

YAN, Qi y SAGE E. Helene. SPARC, a matricellular glycoprotein with important biological functions. En: *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. Jun. 1999, vol. 47, no 12, p. 1495-1505.

YAN, Qi, *et al.* Alterations in the lens capsule contribute to cataractogenesis in SPARC-null mice. En: *Journal of Cell Science*. Jul. 2002, vol. 115, no. 13, p. 2747-2756.

ZELICKSON, Brian D., *et al.* Histological and ultrastructural evaluation of the effects of a radiofrequency-based nonablative dermal remodeling device. En: *Archives of Dermatology*. Feb. 2004, vol. 140, p. 204-209.

9. ANEXOS

9.1. ANEXO I: Diagramas de protocolos usados

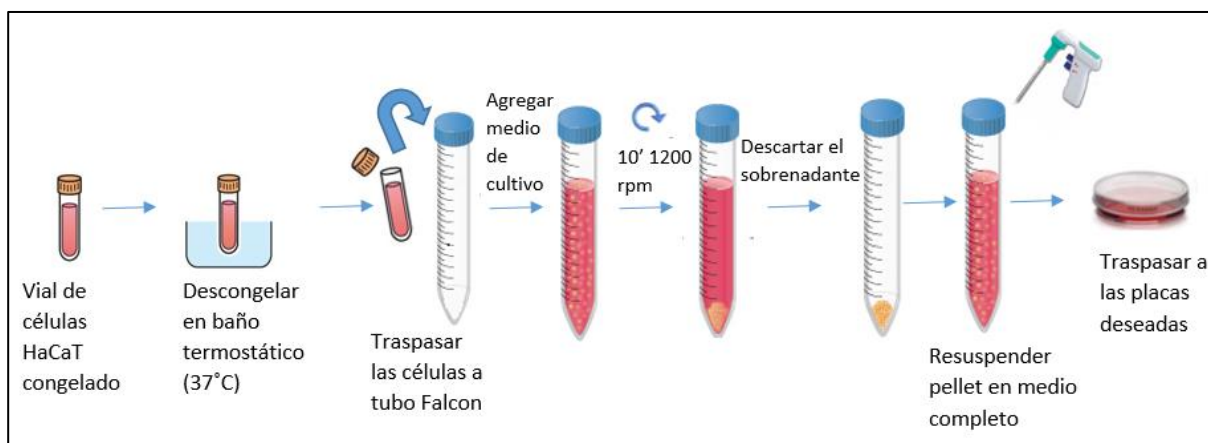


Figura 39: Diagrama de protocolo de descongelamiento de criotubos.

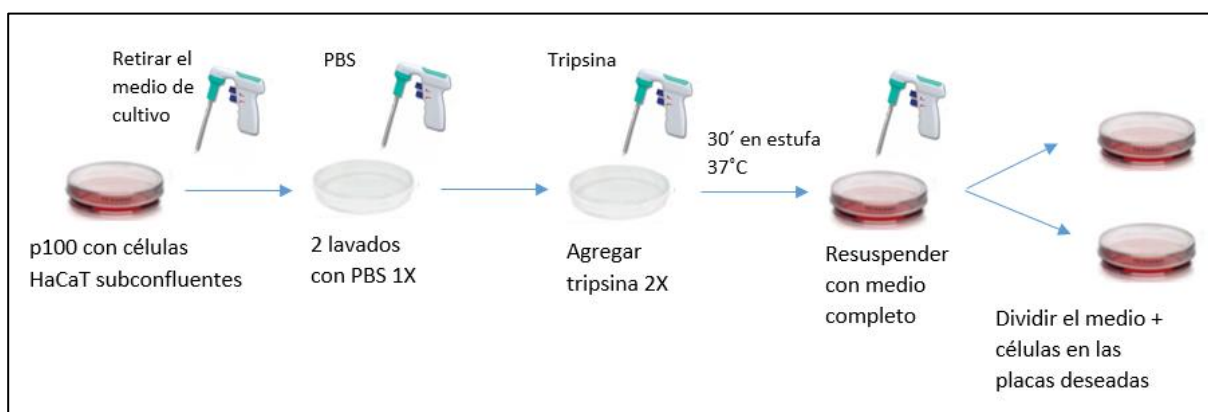


Figura 40: Diagrama de protocolo de repique de monocapa.

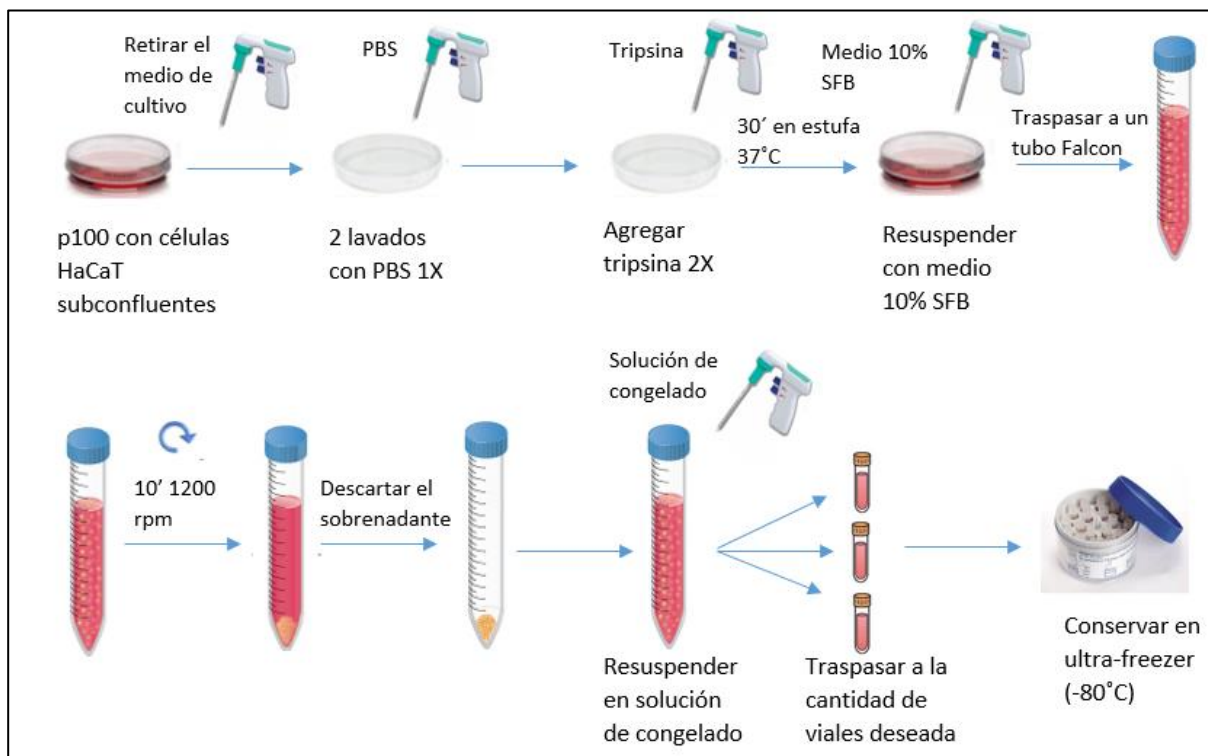


Figura 41: Diagrama de protocolo de congelamiento de críotubos

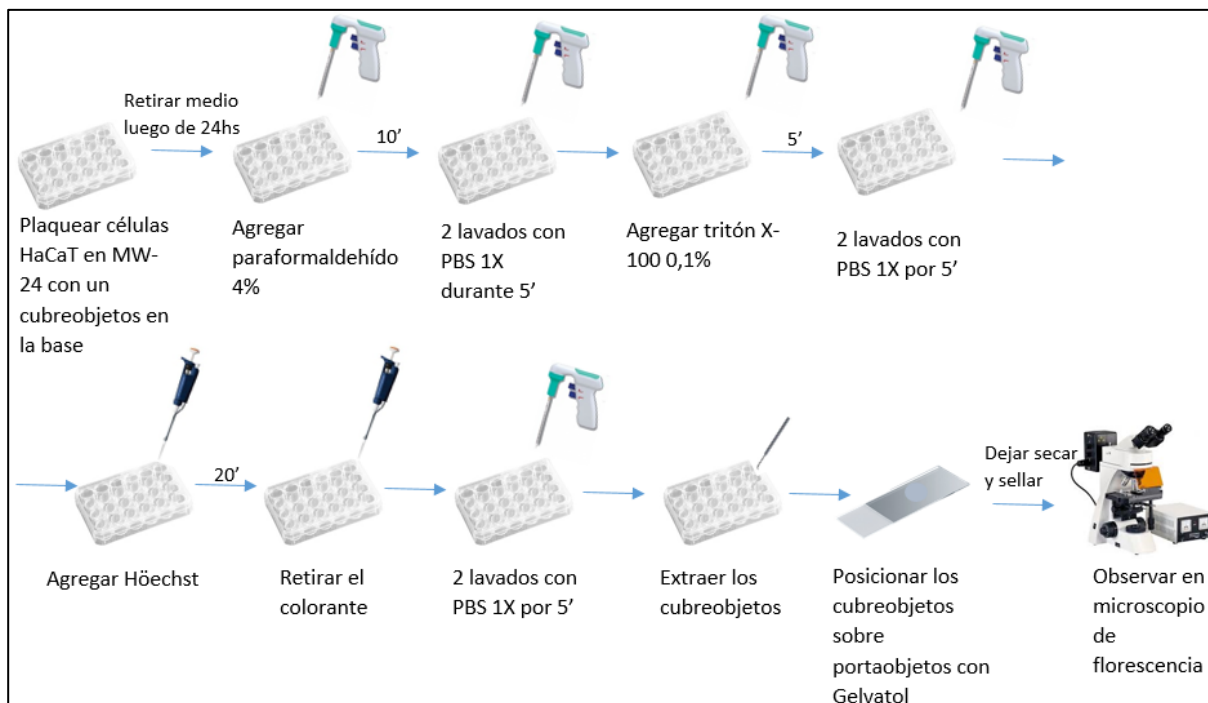


Figura 42: Diagrama de protocolo de tinción con Hoescht.

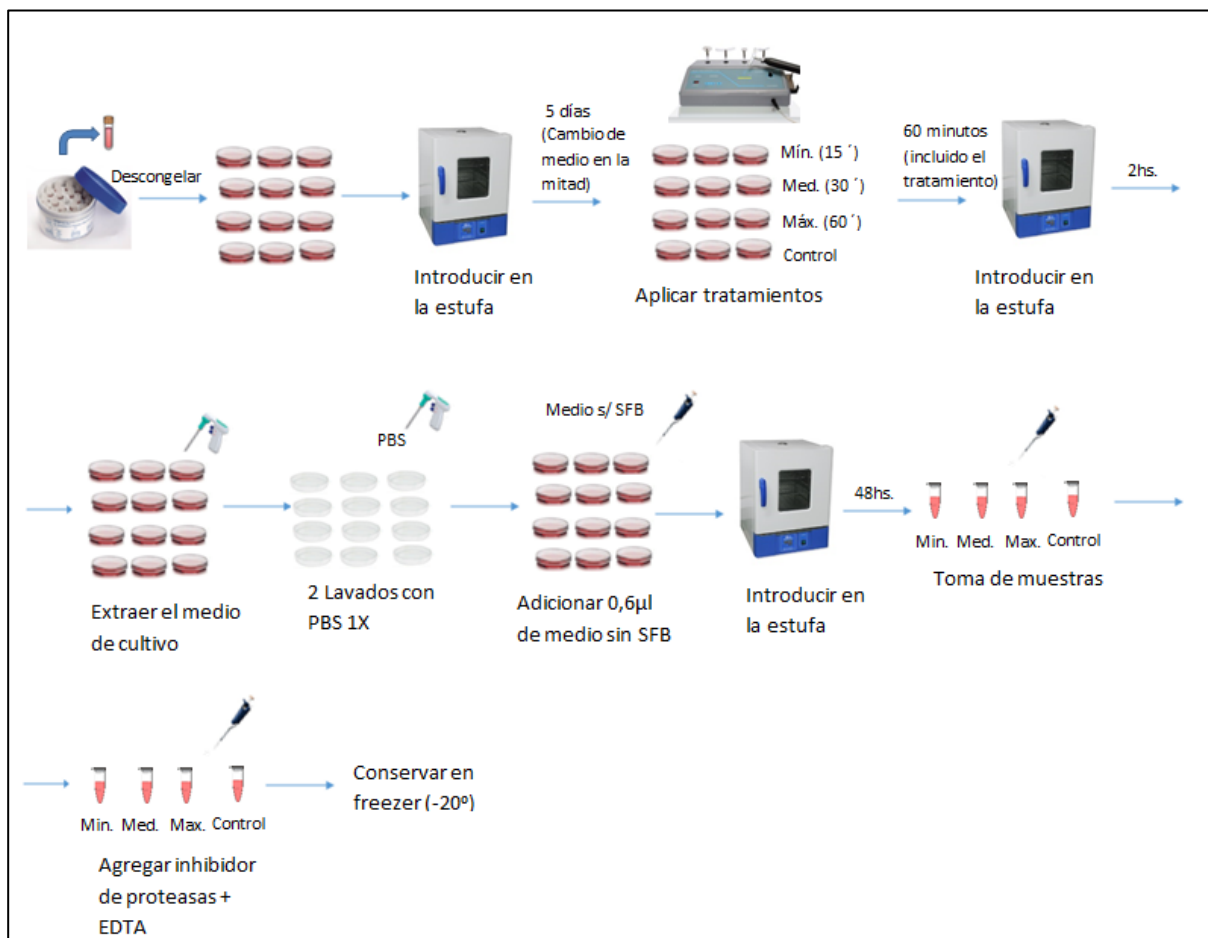


Figura 43: Esquema representativo de los tratamientos con radiofrecuencia y la obtención del medio condicionado.

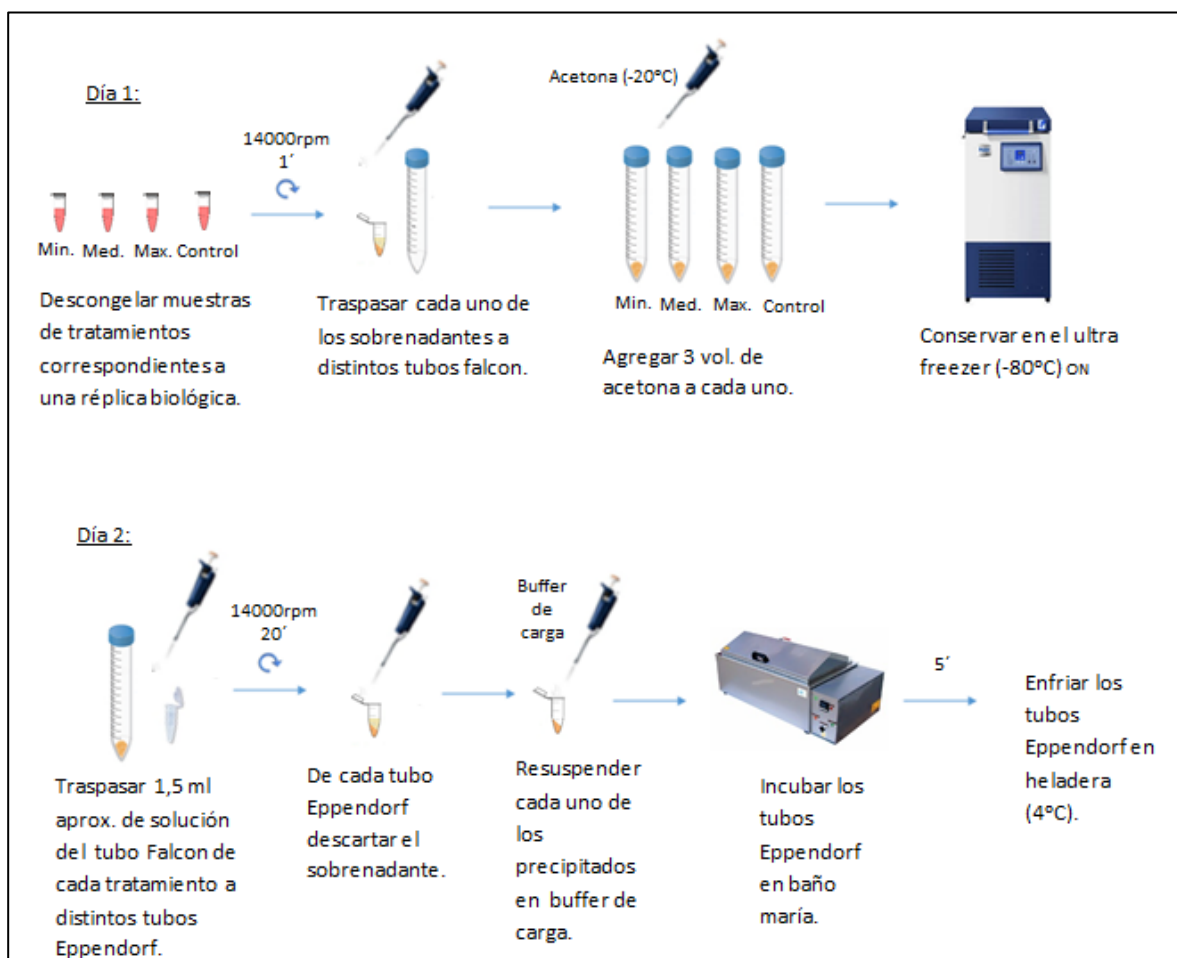


Figura 44: Diagrama representativo del proceso de precipitación de proteínas con acetona y el posterior tratamiento del extracto proteico obtenido para la corrida de estos por SDS-PAGE.

9.2. ANEXO II: Técnica aséptica

La técnica aséptica involucra una combinación de procedimientos diseñados para reducir la probabilidad de infección. Una correcta técnica aséptica debe proveer una barrera ente los microorganismos en el ambiente fuera del cultivo y el cultivo puro. Para ello, todos los materiales que vayan a entrar en contacto con el cultivo celular deben encontrarse estériles y la manipulación debe ser la adecuada para que no haya contacto directo entre el cultivo y el ambiente no estéril que lo rodee (Freshney, 2005a).

Los elementos y prácticas en un ambiente aséptico incluyen los descriptos en los siguientes párrafos:

Un área de trabajo y su equipamiento. La misma debe encontrarse en un lugar libre de corrientes aéreas provenientes de puertas o ventanas. Además, no debe tener un alto tráfico de gente y no deben encontrarse equipos que generen corrientes de aire. Si los hay, como por

ejemplo un aire acondicionado, los mismos deben colocarse de manera que las corrientes no comprometan el funcionamiento del flujo laminar. Igualmente, la actividad dentro del área debe restringirse únicamente al uso de cultivo de tejidos, no a cultivos microbiológicos o animales. También, es necesario que se mantenga limpia y libre de polvo. Tampoco debe contener equipos que no se relacionen con los cultivos celulares. Asimismo, actividades no estériles, tales como procesamientos de muestra, tinciones o extracciones deben llevarse a cabo en otra área (Freshney, 2005a).

Además, todos los aparatos dentro del área de cultivos deben limpiarse regularmente para evitar la acumulación de polvo y prevenir el crecimiento microbiano. También, todos los objetos que requieran de algún replazo deben ser limpiados antes de ser introducidos al área de cultivos celular y no deben ocurrir muchos movimientos de equipos mientras los investigadores se encuentren trabajando asépticamente (Freshney, 2005a).

La incubadora húmeda es una gran fuente de contaminación. Es por esto que debe higienizarse regularmente. Se suele recomendar una limpieza de la misma por semana o mensualmente, dependiendo de la frecuencia de acceso. Para ello, es necesario quitar todos sus contenidos incluyendo sus estantes y limpiar todo con un detergente no tóxico. Los restos del detergente deben luego ser removidos con alcohol 70%. Una vez que el mismo se evapore, se deben reintroducir nuevamente los estantes y los cultivos a la incubadora. Igualmente, existe la posibilidad de adicionar un fungicida, por ejemplo, Rocall 2% o sulfato de cobre 1% en la bandeja húmeda del fondo para retrasar el crecimiento de hongos (Freshney, 2005a).

La superficie de trabajo. Esta debe mantenerse limpia y ordenada. Para ello se recomienda seguir las siguientes reglas (Freshney, 2005a):

- Comenzar con una superficie vacía y rociarla con alcohol 70%.
- Ingresar a la superficie únicamente los materiales que vayan a ser necesarios y quitar todos aquellos que no vayan a serlo.
- Entre procedimientos, limpiar con alcohol 70%.
- El área de trabajo debe estar acomodada de la mejor manera para lograr un acceso sencillo a todos los elementos necesarios de manera cómoda y debe quedar un amplio espacio en el centro para poder trabajar.
- No debe haber obstrucciones entre el área central de trabajo y el filtro HEPA.
- El operador debe trabajar dentro de su rango de visión.

- En el caso de un derrame, el mismo debe ser inmediatamente limpiado con alcohol 70%.
- Una vez finalizado el trabajo, quitar todo y limpiar el área con alcohol 70%.

Por otro lado, es ventajoso trabajar en flujos laminares, dado que el ambiente de trabajo se encuentra protegido de polvo y contaminación por un flujo constante de aire filtrado que pasa sobre la superficie de trabajo. Para asegurar su correcto funcionamiento, se recomienda chequeos en los filtros primarios cada tres a seis meses. Además, cada seis meses se debe monitorear el principal filtro HEPA sobre la superficie de trabajo. Es necesario asegurarse que el mismo no contenga huecos. Igualmente, revisiones semanales deben llevarse a cabo bajo la superficie de trabajo. En estas revisiones, cualquier volcado de líquido que no fue detectado, debe limpiarse, la bandeja debe ser lavada y el área debe ser esterilizada con desinfectante fenólico 5% en alcohol 70%. Cabe destacar que se recomienda dejarlos correr continuamente, dado que mantiene el área de trabajo limpia. Por último, se pueden utilizar luces ultravioletas entre sus usos para esterilizar el aire y la superficie de trabajo (Freshney, 2005a).

La higiene personal. El operador debe lavarse las manos con el objetivo de remover la piel seca que pueda llegar a caer en el cultivo y de reducir los microorganismos adheridos que son un riesgo para el cultivo. Se pueden utilizar guantes quirúrgicos y se recomienda el uso de cofias, delantales exclusivos para el trabajo en el área de cultivos, y máscaras faciales. Además, si el operador consta de pelo largo este debe ser atado. Asimismo, se debe evitar hablar a la hora de manipular los cultivos (Freshney, 2005a).

Reactivos y medios. Cuando son recién comprados suelen venir estériles, pero no necesariamente sus botellas por fuera. Cualquier envoltorio, debe ser quitado fuera del flujo laminar y las botellas o cajas siempre deben ser limpiadas con alcohol 70%, cada vez, antes de ingresarlas al flujo (Freshney, 2005a).

Cultivos. Si se importan células de un laboratorio externo, deben pasar un periodo de cuarentena. Deben manejarse por separado del resto de los stocks del laboratorio y deben ser mantenidas libres de antibiótico hasta que se pruebe que no están contaminadas. Luego, pueden ser incorporadas al stock principal (Freshney, 2005a).

Con el objetivo de minimizar los riesgos de contaminación de los cultivos celulares, se recomienda, no dejar las placas de cultivo abiertas por extensos periodos de tiempo. Además, se debe tener cuidado en el transporte de las mismas hacia la incubadora, evitar torcerlas y

agitarlas, para evitar la acumulación del medio entre la tapa y la base de la placa. Si es que sucede, se puede sacar la tapa y limpiar el medio cuidadosamente con papel estéril y alcohol 70% y a continuación remplazar la tapa por una nueva. Asimismo, se recomienda dejar todas las placas dentro de una caja plástica en la incubadora, siempre rociándola con alcohol 70% cuando se retorne a la misma (Freshney, 2005a).

Por otro lado, siempre es necesario tener un **buen manejo estéril**, este involucra:

- Rociar y limpiar toda la superficie de trabajo con alcohol 70%, antes durante y una vez finalizado el trabajo;
- Rociar las botellas, tubos, recipientes, y todo lo que vaya a ser ingresado al flujo laminar, con alcohol 70%. Es necesario resaltar que como el alcohol puede eliminar las etiquetas se recomienda utilizar un marcador resistente al mismo;
- Cuando se encuentren abiertas botellas u otros recipientes de reactivos o placas o tubos de cultivo, ni las manos ni otros ítems deben interponerse entre ellos o las pipetas estériles en uso y el filtro HEPA;
- Se recomienda el uso de pipetas estériles de vidrio o plásticas descartables para manipular líquidos, siguen siendo las más fáciles de usar. Las mismas deben encontrarse estériles. Además, debe generarse un lugar para descartarlas, o en el caso de las de vidrio, para luego enviarlas a ser esterilizadas. Asimismo, aquellas que no son usadas deben ser guardadas en un contenedor libre de polvo;
- Muchas de las pipetas descartables tienen doble envoltorio, el primero de ellos debe ser quitado antes de introducir la misma en el flujo;
- No se debe pipetear con la boca. Lo mismo aumenta la posibilidad de contaminación con micoplasma, además de ser un riesgo innecesario para el operador;
- En el caso de utilizar pipetas de vidrios se debe poner un tapón de algodón en la parte superior para que las mismas se mantengan estériles. En el caso de las pipetas descartables ya lo traen incluido;
- Evitar volcar líquido desde un contenedor estéril a otro.

9.3. ANEXO III: Comprobación de supuestos para análisis estadístico

Antes de poder llevar a cabo el análisis estadístico utilizando la prueba de análisis de la varianza con diseño de bloques al azar, fue necesario corroborar los supuestos.

Uno de los supuestos es que la escala de la **variable respuesta sea cuantitativa**. En este caso, la variable corresponde a los niveles de expresión de la proteína SPARC. La misma corresponde a una variable cuantitativa de razón, por ende, este supuesto se cumple. Además, **las muestras son aleatorias y las observaciones son independientes** entre sí, por lo que también se cumple el segundo supuesto exigido.

Asimismo, para poder realizar la prueba estadística deseada, los tratamientos deben tener la misma variabilidad o alternativamente los residuos deben tener una variabilidad constante. Es decir, deben cumplir con el supuesto de **homocedasticidad**. Para comprobar este, se utilizó un método gráfico (**Figura 45**) (gráfico de dispersión de residuos versus predichos) y la prueba estadística de Levene (*tabla 13*). Esta última consiste en realizar un análisis de la varianza utilizando como variable dependiente el valor absoluto de los residuos. Los mismos se muestran a continuación.

- Gráfico de dispersión

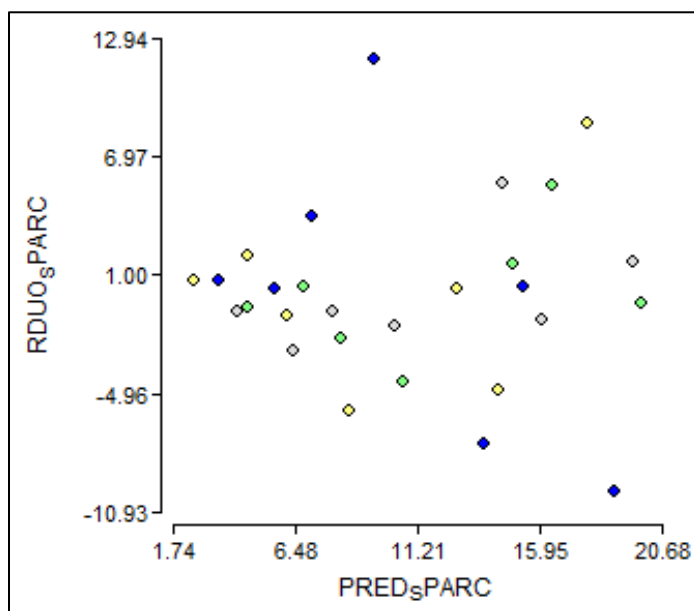


Figura 45: Gráfico de dispersión de Residuos vs. Predichos de la variable dependiente, expresión de SPARC. Se utilizó el software Infostat, FCA, Universidad de Córdoba.

- Prueba de Levene

Esta prueba se plantea como hipótesis nula (H_0) que no existe heterocedasticidad entre las variables, y se rechaza H_0 cuando el p-valor obtenido es menor a 0,05 (α).

$$H_0: \sigma^2_{\text{control}} = \sigma^2_{\text{mínimo}} = \sigma^2_{\text{medio}} = \sigma^2_{\text{máximo}}$$

$$H_1: \text{alguna } \sigma^2_i \neq \sigma^2_{\text{control}}$$

El resultado obtenido fue el siguiente:

Análisis de la Varianza				
Variable	N	R2	R2 Aj	CV
<i>Rabs. SPARC</i>	28	0,14	0,03	101,13

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F. V	S.C	Gl	C.M	F	p-valor
<i>Modelo</i>	37,80	3	12,60	1,25	0,3129
<i>Tratamiento</i>	37,80	3	12,60	1,25	0,3129
<i>Error</i>	241,46	24	10,06		
<i>Total</i>	279,26	27			

Tabla 13: Resultados obtenidos de la prueba de Levene. Se utilizó el software Infostat, FCA, Universidad de Córdoba.

Al observar el *diagrama de dispersión* no es posible distinguir si las variaciones son muy similares entre los 4 grupos. No obstante, la *prueba de Levene* da como resultado un p-valor de 0,3129. Al ser mayor que 0,05 (α) no rechazamos H_0 de dicha prueba. Por lo tanto, se concluye que no hay pruebas de que las varianzas de los cuatro tratamientos sean distintas y se cumple con el supuesto de homocedasticidad.

Por último, se debe cumplir con el supuesto de que las observaciones de cada tratamiento deben proceder de **poblaciones normales**. Para ello se usó un método gráfico y otro analítico. El método gráfico utilizado fue la generación de Q-Q plots con los residuos como variable (**Figura 46**). En los mismos se observa cuán bien se ajustan los datos a la recta $Y=X$, sugiriendo una distribución normal. Por otro lado, el método analítico utilizado fue la prueba de Shapiro-Wilks, que se trata de una prueba no paramétrica (*tabla 14*). A continuación, se plantean ambos métodos.

- Gráficos Q-Q plot

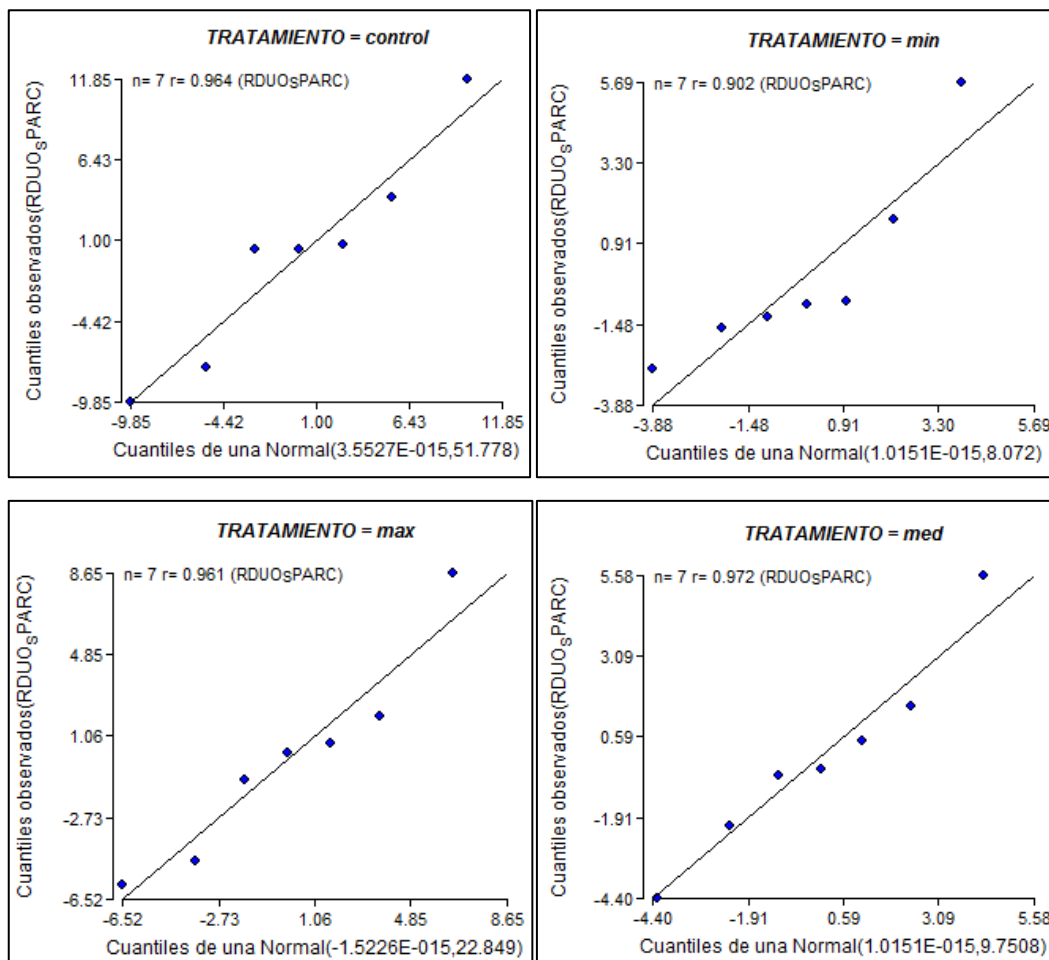


Figura 46: Gráficos Q-Q plot de cuantiles observados en residuos de la variable dependiente (expresión de SPARC) vs. Cuantiles de una normal. Se utilizó el software Infostat, FCA, Universidad de Córdoba.

- Prueba de Shapiro-Wilks

Se plantea como hipótesis:

H_0 : La variable tiene un buen ajuste a una distribución normal.

H_1 : La variable no tiene un buen ajuste a una distribución normal.

Los resultados de esta prueba fueron los siguientes.

Shapiro-Wilks (modificado)

Tratamiento	Variable	n	Media	D.E	W*	p (Unilateral D)
<i>Control</i>	RDUO_SPARC	7	0,00	7,20	0,94	0,6964
<i>Mínimo</i>	RDUO_SPARC	7	0,00	2,84	0,84	0,1383
<i>Medio</i>	RDUO_SPARC	7	0,00	3,12	0,97	0,9260
<i>Máximo</i>	RDUO_SPARC	7	0,00	4,78	0,94	0,6848

Tabla 14: Resultados de la prueba estadística Shapiro-Wilks: Se utilizó el software Infostat, FCA, Universidad de Córdoba.

En los *Q-Q plots* correspondientes a los distintos tratamientos se observa que los datos tienen cierto acercamiento a la recta de la distribución normal. Además, la *prueba de Shapiro-Wilks* entrega p-valores mayores a 0,05 (α) para todos los tratamientos. Es decir, que no se rechaza la hipótesis H_0 de esta prueba en ninguno de los casos. Por ende, no hay evidencias suficientes que demuestren que la distribución no sea normal.

Se han comprobado entonces todos los supuestos requeridos para realizar la prueba ANOVA con diseño de bloques al azar.