



ISSN: 2395-9711

Revista

Memorias Ingeniería y Desarrollo

Congreso Internacional de
Investigación Científica
Multidisciplinaria

MEMORIAS CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINARIA, Año 1, No. 1, Enero – Diciembre 2015, es una publicación anual editada por el Instituto Tecnológico de Monterrey Campus Chihuahua, Calle H. Colegio Militar, 4700, Col. Nombre de Dios, Chihuahua, Chih. C.P. 31300, Tel (614) 439-5000 ext. 5524, www.congresoinvestigacion.com, investigacion.chi@itesm.mx. Editor Responsable: Elías Solís Rivera. Reserva de Derechos uso exclusivo No. 04-2014-082208051900-01, ISSN en trámite, ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor, calle Puebla 143, Col Roma, Delegación Cuauhtémoc. C.P. 06700. Responsable de la última Actualización de este número, Departamento de Investigación del Tecnológico de Monterrey Campus Chihuahua, Ing. Elías Solís Rivera, Calle H. Colegio Militar, 4700, Col. Nombre de Dios, Chihuahua, Chih. C.P. 31300, fecha de última modificación 5 de Marzo del 2015.

NANOTUBOS DE CARBONO COMO UNA ALTERNATIVA PARA LA TRANSFECCIÓN DE OVOCITOS MADUROS DE *Bos taurus*

Autores:

C.D.Ph. Cynthia Lizeth González Trevizo cynthial.gonzalez@itesm.mx

Dra. Silvia Lorena Montes Fonseca silvialorena.montes@itesm.mx

Tecnológico de Monterrey, campus Chihuahua, Ave. Heroico Colegio Militar 4700, Chihuahua, Chihuahua, México, 31300.

D.Ph. María Eduvigis Burrola Barraza mburrola1@uach.mx

Dr. Everardo González Rodríguez evegonzal@uach.mx

Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Zootecnia y Ecología, Periférico Francisco R. Almada Kilómetro 1, Chihuahua, Chihuahua, México, 31415

Dra. Norma Rosario Flores Holguín norma.flores@cimav.edu.mx

Dra. María Antonia Luna Velasco antonia.luna@cimav.edu.mx

Dr. Erasmo Orrantia Borunda erasmo.orrantia@cimav.edu.mx

Centro de Investigación en Materiales Avanzados, S.C. Ave. Miguel de Cervantes 120, Industrial Chihuahua, Chihuahua, Chihuahua, México, 31109

RESUMEN

La introducción de material genético dentro de células animales tiene múltiples ventajas en el área farmacéutica y otras áreas de interés económico, como la agrícola y la pecuaria. Las técnicas de transfección existentes, sobre todo aquellas basadas en el uso de agentes lipofectantes, no son exitosas en ovocitos y cigotos debido a que la zona pelúcida que los recubre impide la penetración del material genético. Otras, como la microinyección, demandan el uso de equipos altamente costosos y especializados. Por esta razón este proyecto propone el uso de nanotubos de carbono (NTC) funcionalizados con ADN como un sistema de transfección de células. Debido a que no se sabe si los NTC son capaces de atravesar la zona pelúcida, el objetivo del presente trabajo es evaluar la internalización de los NTC funcionalizados con diacetato de fluoresceína en ovocitos maduros de *Bos taurus* mediante microscopía confocal. Para esto NTC fueron sintetizados, purificados y funcionalizados con diacetato de fluoresceína. En los estudios de internalización los ovocitos obtenidos de ovarios de vacas sacrificadas fueron madurados *in vitro* y separados en dos grupos, un grupo control (sin interacción con NTC) y un grupo interaccionado con NTC funcionalizados con diacetato de fluoresceína (1 mg/ml) por 30 min. Terminado el tiempo los ovocitos de ambos grupos fueron fijados y permeabilizados con paraformaldehído al 4% amortiguado y PBS-Tritón 0.2% respectivamente. Los núcleos de las células fueron teñidos con DAPI y analizados mediante microscopía confocal. Los resultados muestran que los NTC utilizados tienen un tamaño de 1.8 μm longitud y 40-70 nm de diámetro y presentaron una efectiva funcionalización con el fluorocromo. Los estudios de internalización indican la presencia de los NTC en la zona nuclear y en el citoplasma de las células. Estos resultados nos permiten concluir que los NTC pueden atravesar la zona pelúcida de los ovocitos maduros, convirtiéndose en excelentes candidatos para ser utilizados como vectores para la transfección de genes.

Palabras Clave: Nanotubos de Carbono, ovocitos maduros, zona pelúcida, internalización.

INTRODUCCIÓN

La transfección es la introducción de material genético exógeno a células animales con el fin de silenciar genes, generar líneas celulares estables, aumentar la producción de una proteína con diversas aplicaciones, inclusive manipular la reprogramación y diferenciación de células madre¹². La introducción de material genético en las líneas germinales de ganado vacuno ofrece beneficios como la producción a gran escala de proteínas de interés farmacéutico para el mejoramiento agrícola, así como un incremento en la calidad de los productos obtenidos del mismo. Sin embargo, las técnicas existentes hasta el momento presentan una pobre eficiencia de transfección y son sumamente costosas⁵. La microinyección de ADN en el pronúcleo de cigotos es una técnica ampliamente extendida, pero exige el uso de equipo especializado y un alto nivel de conocimiento técnico¹, su eficiencia es baja y se ha observado que únicamente hasta el 2% de los cigotos microinyectados resultan en animales transgénicos. La lipofección por su parte, es un procedimiento simple, pero su uso en ovocitos y cigotos es restringido, ya que la zona pelúcida impide la penetración del agente lipofectante en el citoplasma⁷.

La zona pelúcida es una capa extracelular especializada que rodea la membrana plasmática de los ovocitos y embriones en etapas tempranas de desarrollo⁹. Esta red paracristalina elástica se compone de proteínas de zona (ZP), glicoproteínas y polisacáridos que hacen de ésta, una estructura porosa semipermeable que permite el paso selectivo de macromoléculas¹⁷. Su presencia es indispensable para la ovogénesis, fertilización y desarrollo preimplantación³, donde desempeña varias funciones como: permitir la unión de espermatozoides de manera especie-específica evitando la polispermia; servir de cubierta protectora durante los procesos de división celular y tránsito por el oviducto; y evitar la dispersión de blastómeros en las etapas previas a la implantación¹⁴, lo que hacen de ella, una barrera que dificulta el paso de agentes transfectantes hacia el interior del ovocito.

En los últimos años se han buscado nuevas estrategias para una efectiva transfección de células a bajos costos. Entre éstas se encuentra el uso de la nanotecnología, la cual tiene el potencial de crear nuevas estructuras con la habilidad de atravesar membranas celulares y aumentar la solubilidad, la estabilidad y la biodisponibilidad de biomoléculas, mejorando así su eficiencia de liberación¹⁵. Diversos estudios han mostrado eficiencias de transformación hasta de un 80.7% al utilizar nanopartículas como sistemas de liberación de genes, comparado con el 54.4% por infección con virus y sólo el 8% usando ADN desnudo¹³. El uso de nanotubos de carbono (NTC) como un sistema de liberación de genes ya ha sido investigado por algunos autores mostrando excelentes resultados en la transfección de genes en diversas células de mamíferos.

Los NTC son estructuras cilíndricas formadas por láminas de grafito enrolladas, las cuales están compuestas por anillos de átomos de carbono perfectamente estructurados. Una de sus principales características es que se les pueden unir un sin número de moléculas químicas a su superficie, proceso que se llama funcionalización, y de esta manera potencializar sus aplicaciones en el área médica como acarreadores biológicos⁶. El ADN se puede funcionalizar sobre los NTC a través de interacciones iónicas y promover la liberación eficiente de éste dentro de las células. Estudios han demostrado que los NTC no interfieren con la movilidad del ADN y también se encontró un efecto protector contra nucleasas celulares, así como una pobre degradación enzimática del mismo¹⁸. Del mismo modo las células transfectadas con el sistema ADN-NTC han mostrado niveles de expresión de 5-10 veces más altos en comparación con células transformadas por vectores convencionales. Estos hallazgos revelan un nuevo potencial de los NTC como un sistema avanzado de liberación de genes.

A pesar de las evidencias anteriores actualmente se desconoce si los NTC pueden atravesar la zona pelúcida de los ovocitos maduros y poder funcionar en un futuro como un nuevo sistema de liberación de genes más eficiente y económico para ser utilizado en la transfección de embriones bovinos. Por tal motivo el presente trabajo tiene como objetivo evaluar la internalización de los NTC funcionalizados con diacetato de fluoresceína en ovocitos maduros de *Bos taurus* mediante microscopía confocal.

METODOLOGÍA

Síntesis y Purificación de los NTC: los NTC fueron sintetizados mediante el método de spray pirólisis, utilizando 25 mL de tolueno y 0.25 g de ferroceno como fuente de carbono y catalizador, respectivamente durante un tiempo de síntesis de 2 min en un horno a 800°C, obteniendo así los NTC no purificados (NP-NTC)¹¹. Para la purificación 0.2 g de NP-NTC fueron suspendidos en 400 mL de una mezcla concentrada de H₂SO₄ (90%)/ HNO₃ (70%) 3:1 v/v y sonicados en un baño de agua por 48 h. Los NTC purificados (P-NTC) resultantes fueron filtrados a través de una membrana de politetrafluoretileno (PTFE) con un tamaño de poro de 0.45 µm y lavados cuatro veces con agua y metanol respectivamente. Finalmente los P-NTC se secaron a temperatura ambiente por 24 h (Montes-Fonseca, 2015). Tanto los NP-NTC como los P-NTC fueron caracterizados mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) en un microscopio JEOL SEM, modelo JSM-5800 LV equipado con analizador de dispersión de rayos X (EDS) y por espectrofotometría Raman utilizando un micro-Raman LabRAM HR de Horiba Jobn Yvon, acoplado a un microscopio Olympus BX-4 con un láser a una excitación de 632.8 nm.

Funcionalización de los P-NTC con diacetato de fluoresceína (DF): 10 mg de P-NTC se resuspendieron en 20 mL de una solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M pH 7.5) y se adicionaron 25 mg de EDAC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodimida). Esta mezcla se sonicó por 2 horas. Terminado el tiempo se adicionaron 5 mL de una solución que contenía 10 mg de DF y 250 mg de BSA disueltos en una solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M pH 7.5) previamente homogenizada durante 2 h, y se agitó por 24 h a 4°C en oscuridad. Finalmente los NTC funcionalizados con el DF (DF-NTC) fueron filtrados en una membrana de 0.22 µm de poro y se lavaron con agua estéril 4 veces. Los DF-NTC fueron recuperados de la membrana y resuspendidos en 10 mL de PBS 1X estéril (concentración final 1mg/mL de DF-NTC) y caracterizados mediante espectrofotometría Raman.

Maduración de ovocitos: Se recolectaron ovarios de vacas provenientes de la Empacadora Prieto de la ciudad de Chihuahua inmediatamente después del sacrificio y se enjuagaron con solución salina estéril 0.15 M para retirar restos hematológicos. Posteriormente, los folículos de 2 a 8 mm de diámetro fueron aspirados con aguja BD Precision Glide 18G x 1½" acoplada a sistema de vacío (WOB-L® Dry Vacuum Pumps, Standard-Duty, Welch®) a fin de obtener los complejos ovocito-cúmulos (COC's). Dichos complejos se colocaron en medio químicamente definido para el manejo de ovocitos (H-CDM-M). Con ayuda del estereoscopio Leica MS5, se seleccionaron aquellos que presentaron ovocitos con más de 3 capas de células cumulares no expandidas y citoplasma homogéneamente granuloso. Posteriormente se colocaron en grupos de 50 en platos de cuatro pozos (Thermo Scientific), con 1000 µL de medio químicamente definido para la maduración *in vitro* de ovocitos (IVM) en atmósfera húmeda al 5% de CO₂ a 38.5 °C durante 23 h. Transcurrido el periodo de incubación, los ovocitos fueron desprovistos de las células cumulares expandidas por vórtex.

Estudios de internalización: los ovocitos maduros se dividieron en dos grupos equitativos de 10 células, el grupo control sin interacción con NTC y el grupo experimental en interacción con los DF-NTC. Los ovocitos del grupo control fueron colocados en 100 μL de buffer de fosfatos salino (PBS) 1X estéril y los ovocitos del grupo experimental en 100 μL de la solución de DF-NTC (1 mg/mL) y se incubaron a 38.5°C por 30 min en una atmósfera húmeda con 5% de CO_2 . Terminado el tiempo, los ovocitos fueron lavados 3 veces por 5 min con PBS 1X adicionado con polivinilpirrolidona (PVP) al 0.1% y se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% amortiguado por 1 h a 37°C, seguido de una permeabilización con una solución de Tritón X-100 al 0.2% en PBS por 15 min a temperatura ambiente. Los ovocitos fijados y permeabilizados fueron lavados nuevamente 3 veces por 5 min con PBS-PVP 1X. El núcleo de los ovocitos fue teñido con 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y la evaluación de la internalización se realizó mediante microscopía confocal (LSM 700, Carl Zeiss).

RESULTADOS

El tamaño y la composición elemental de los NP-NTC y los P-NTC fue caracterizada mediante MEB y análisis EDS. Los NP-NTC mostraron diámetros en un rango de 40 - 75 nm, así como una longitud de 37.79 μm (Figura 1, A y B respectivamente). Los P-NTC presentaron la misma distribución de diámetros y una longitud de 1.8 μm (Figura 2, A y B respectivamente). El análisis elemental de los NP-NTC y los P-NTC (Tabla 1) mostró una disminución del contenido de Fe de 2.53% a 1.43% así como un aumento en el contenido de O de 14.29% a 16.30% en los P-NTC. También se observa un contenido de S de 14.41% en los P-NTC, los cual será discutido en la siguiente sección.

Para evaluar la calidad estructural de los NTC se utilizó espectrofotometría Raman. Los espectros Raman de los NP-NTC y los P-NTC se muestran en la Figura 3 (A y B, respectivamente). El espectro de los NTC se caracteriza por la presencia de dos bandas, la banda G a 1600 cm^{-1} correspondiente a las vibraciones de los enlaces de los átomos de C de la lámina de grafito, y la banda D a 1338 cm^{-1} que es producto de los defectos presentes en la misma lámina. La relación de la intensidad de ambas bandas (I_G/I_D) es una medida de la calidad estructural de los NTC^{2,8}. La intensidad de la banda D en los P-NTC es mayor en comparación con los NP-NTC, y su relación I_G/I_D es de 0.73. Por otro lado la relación I_G/I_D de los NP-NTC es de 0.99. Estos resultados nos indican un menor calidad estructural en los P-NTC debido probablemente al proceso de purificación el cual origina defectos sobre la superficie de los NTC.

Los P-NTC fueron funcionalizados con DF mediante una amidación activada por carbodimida. Los DF-NTC fueron caracterizados mediante espectrofotometría Raman (Figura 3C). El espectro muestra la presencia de la banda G específica de las láminas de grafito del NTC, sin embargo se pierde la banda D debido a la interferencia producida por el fluorocromo. Esto nos indica una efectiva adición del fluorocromo sobre los NTC.

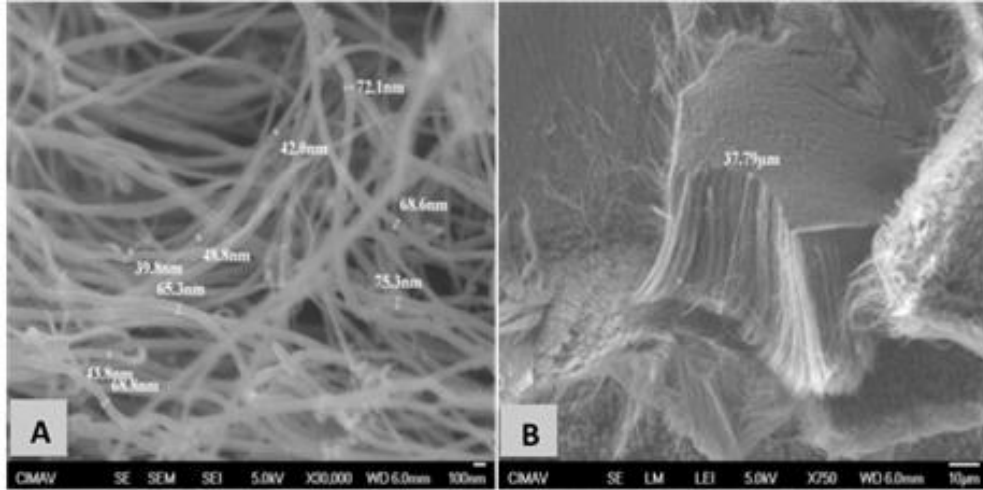


Figura 1. Micrografías de los NP-NTC obtenidas por MEB. En A se muestra el diámetro y en B la longitud de los NP-NTC.

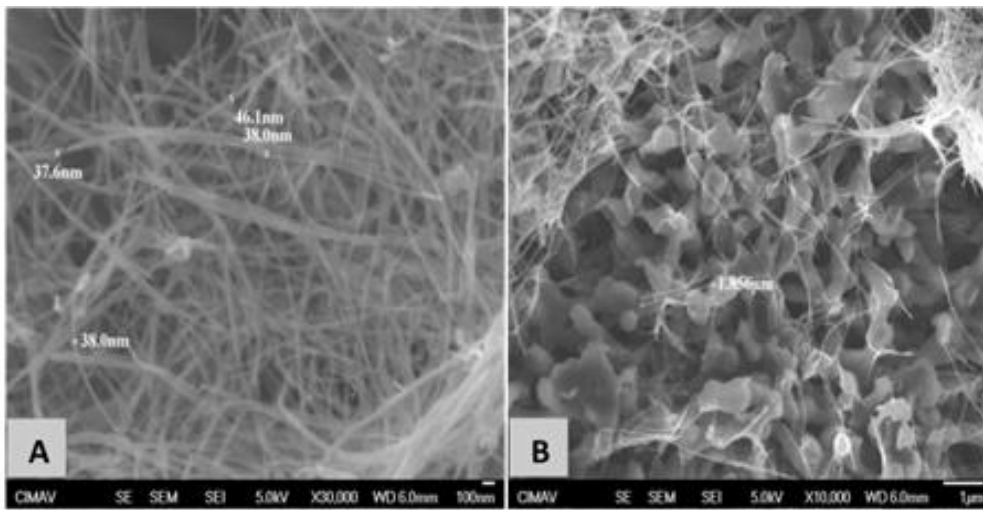


Figura 2. Micrografía de los P-NTC obtenidas por MEB. En A se muestra el diámetro y en B la longitud de los P-NTC

Elemento	% en peso	
	NP-NTC	P-NTC
O	14.29	16.305
C	83.13	66.97
Fe	2.53	1.43

S	0	14.41
TOTAL	100	100

Tabla 1. Análisis Elemental de los NP-NTC y los P-NTC

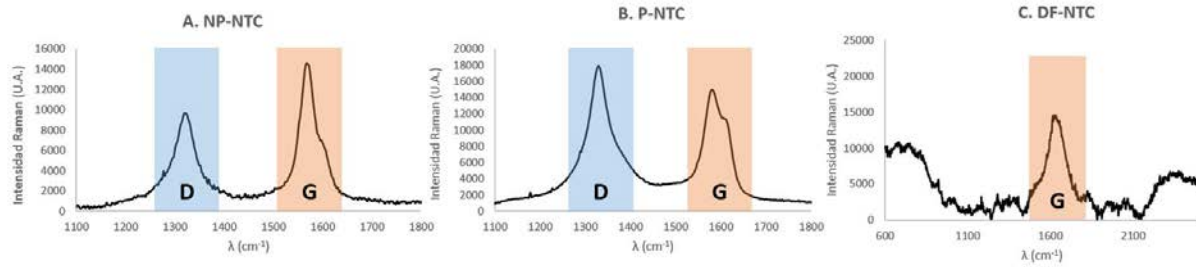


Figura 3. Espectros Raman de los NP-NTC (A), P-NTC (B) y DF-NTC (C).

La maduración de los ovocitos fue comprobada por análisis microscópico (Figura 4A). Se observó la mucificación y expansión de las células cumulares en los COC's debido a la formación de la matriz de hialorano. La remoción de las células cumulares permitió efectuar el análisis de la morfología celular. La Figura 4B muestra el citoplasma uniformemente granulado de los ovocitos maduros y la integridad de la zona pelúcida, esencial para este ensayo.

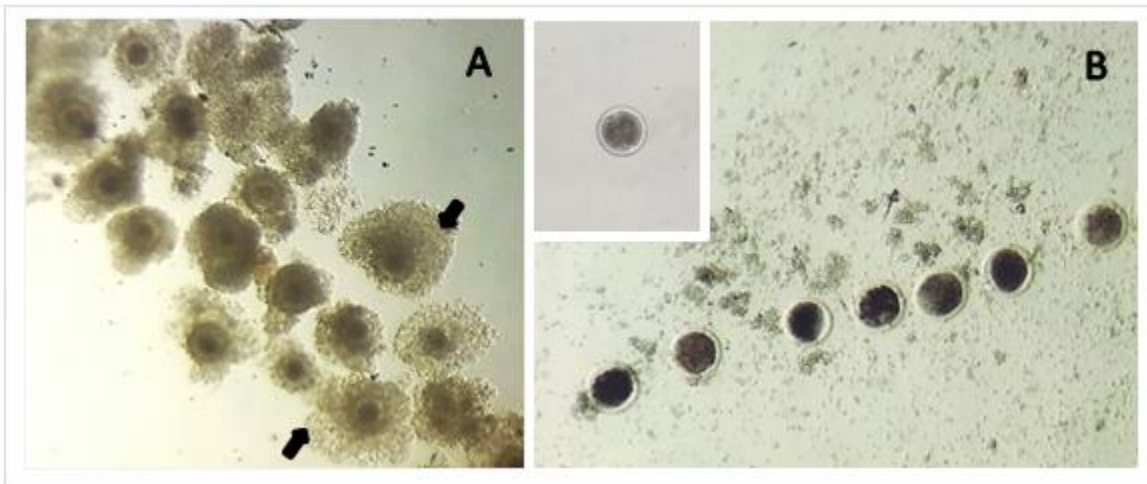


Figura 4. Selección y maduración ovocitaria. En A se muestran complejos ovocito-cúmulus después del proceso de maduración. La expansión de las capas de células cumulares es indicada por flechas; en B se aprecia la morfología celular de los ovocitos maduros sometidos a vórtex. En el recuadro superior izquierdo se muestra un ovocito después del proceso de desnudamiento.

El estudio de internalización de DF-NTC en ovocitos maduros se realizó por microscopía confocal. El núcleo celular fue teñido con DAPI como se observa en la Figura 5. En las células control, que no fueron interaccionadas con los DF-NTC, únicamente se observó la señal producida por DAPI (color azul) (Figura 5A), mientras que en los ovocitos maduros que fueron interaccionados con DF-

NTC se detectó además de DAPI, la señal verde fluorescente característica del DF tanto a nivel nuclear (Figuras 5B y 5C) como a nivel citoplasmático (Figura 5C).

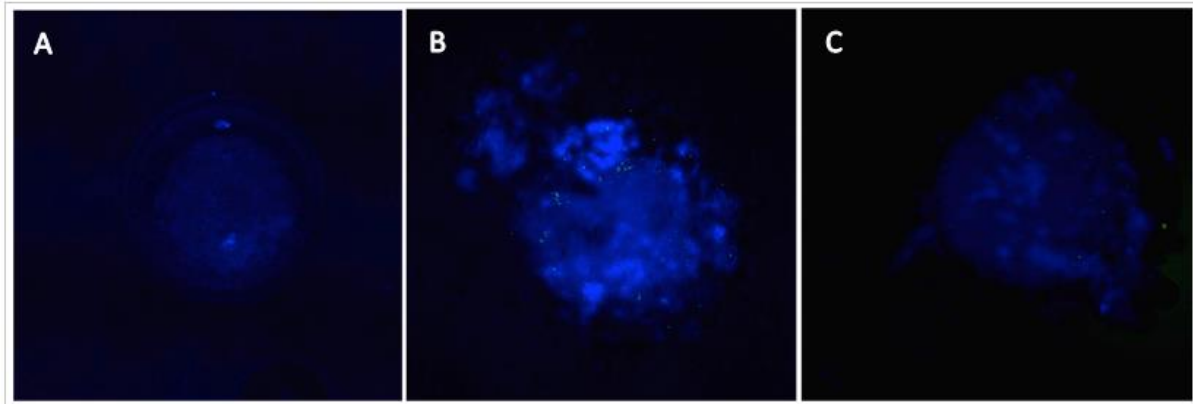


Figura 5. Imagen confocal de ovocitos maduros interaccionados con DF-CNT. En A se muestra el ovocito control sin estímulo, en B y C se observan ovocitos interaccionados con DF-CNTs.

DISCUSIÓN

Los NTC tienen múltiples aplicaciones en el área médica debido a su potencial de funcionar como sistemas acarreadores, sin embargo su efecto tóxico es aún un tema de estudio. Diversas investigaciones han demostrado que el tamaño, la pureza y la funcionalización son factores importantes que modulan este efecto. Los P-NTC con un longitudes $< 1 \mu\text{m}$ y los NTC funcionalizados presentan un menor efecto tóxico en comparación con los NP-NTC¹⁰. Debido a esto los NP-NTC suelen ser sometidos a un proceso de purificación con ácidos con el fin de remover los residuos de Fe de su superficie y promover el acortamiento de los mismos. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el proceso de purificación con H_2SO_4 (90%)/ HNO_3 (70%) 3:1 v/v fue exitoso ya que se obtuvieron P-NTC con un rango de longitud cercanos $1 \mu\text{m}$, así como una efectiva remoción de Fe. Por otro lado el aumento del contenido de O en los P-NTC indica la adición de grupos oxidados (CO, OH y COOH) sobre su superficie los cuales son importantes para el proceso de funcionalización. De acuerdo a Zhang *et. al.*, (2003) estos grupos son originados por la interacción de los ácidos concentrados utilizados en el proceso de purificación con la superficie de los NTC originando defectos que permiten el rompimiento de los mismos y la oxidación de los átomos de carbono expuestos¹⁹. El espectro Raman reafirma esta teoría debido a la disminución de la calidad estructural en los P-NTC y concuerda con los resultados obtenidos por Montes-Fonseca *et. al.*, (2012)¹⁰. El contenido de S en los P-NTC proviene probablemente del mismo proceso de purificación, por lo que se implementaron más lavados antes de proceder a su funcionalización.

Los grupos COOH incorporados a la superficie de los NTC durante el proceso de purificación fueron utilizados como puentes de anclaje para la funcionalización del fluorocromo. Para esto el DF se adhirió a moléculas de Albúmina seguido de la formación de un enlace iónico entre el grupo COOH de los P-NTC y el grupo amino de la albúmina. El espectro Raman de los DF-NTC corroboran la presencia de moléculas fluorescentes en la muestra debido a que ésta origina interferencias a lo largo del espectro.

La zona pelúcida es una barrera semipermeable que impide el paso de agentes hacia el espacio perivitelino. Su presencia, dificulta enormemente los procesos de transfección celular, tanto en líneas germinales como en ovocitos en etapas de desarrollo temprano. Por esta razón, ha sido necesario el

uso de equipos como los micromanipuladores, que elevan los costos de estas técnicas moleculares¹. Los resultados obtenidos en el presente estudio, muestran que los NTC poseen la capacidad de atravesar esta matriz, penetrando tanto los poros de las capas externas como también los escasos poros de diámetro menor que las capas internas de la ZP de ovocitos maduros presentan¹⁴. Resulta de relevancia el hecho, de que las nanopartículas observadas, no sólo fueron capaces de evadir la capacidad selectiva del oolema, sino que además se adentraron a nivel nuclear, mostrando el claro potencial de estas estructuras para evadir la maquinaria lisosomal.

CONCLUSIÓN

Los DF-NTC lograron atravesar la zona pelúcida de los ovocitos maduros, ya que se encontraron en la zona nuclear y citoplasmática de los mismo. Este hallazgo sugiere que los NTC pueden ser utilizados como un sistema de transfección de células y eficientar los procesos existentes. Sin embargo mayores estudios son necesarios para poder evaluar si el sistema ADN-NTC presenta el mismo comportamiento y si el material genético transfectado logra expresarse.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al equipo iGEM (Tec-Chihuahua) por su apoyo en el desarrollo del protocolo experimental del trabajo: Romina Castellanos Rincón, Sebastian Delgado Reyes, Adrián Díaz Chávez, Manuel Lerma Porras, Saúl Pizarro Medina, América Ramírez Colmenero, Carolina Ramírez Márquez, Ariel Orlando Sotelo Reyes y Abril Valverde Rascón.

También agradecemos el CIMAV y a la Facultad de Zootecnia y Ecología por el apoyo recibido en reactivos, préstamo de equipos y espacios de trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Auerbach A. B. (2004). Alternative methods to pronuclear microinjections for random transgene integration in mouse. *Transgenics*, 4: 169-187.
- Datsyuk, M. Kalyva, K. Papagelis, J. Parthenios, D. Tasis, A. Siokou, I. Kallitsis, C. Galiotis.(2008). Chemical oxidation of multiwalled carbon nanotubes. *Carbon*, 46: 833-840.
- Gupta, S. K., Bhandari, B., Shrestha, A., Biscual, B. K., Palaniappan, C., Malhotra, S. S., Gupta, N. (2012). Mammalian zona pellucida glycoproteins: structure and function during fertilization. *Cell and Tissue Research* 349 (3): 665-678.
- Hammer R. E, Pursel V. G, Rexroad C. E, Jr. Wall R. J, Bolt D. J, Ebert KM, Palmiter R. D, Brinster R. L. (1985). Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*, 315: 680-683.
- Hofmann, A., Zakhartchenko, V., Weppert, M., Sebald, H., Wenigerkind, H., Brem, G., Wolf, E., Pfeifer, A. (2004). Generation of transgenic cattle by lentiviral gene transfer into oocytes. *Biology of Reproduction*, 71(2): 405-409.
- Hu H., Zhao B., Itkis M. E., Haddon R. C. (2003). Nitric acid purification of single-walled carbon nanotube. *Journal of Physical Chemistry B*. 107: 13839-13842.
- Jura J., Smorag Z., Slomski R., Lipiński D., Jura J., Gajda B. (2009). Comparison of transfection methods for porcine zygotes. *Ann. Anim. Sci.* 9 (3): 279-285.

- Keszler, L. Nemes, S. R. Ahmad, X. Fang. (2004) Characterization of carbon nanotube materials by raman spectroscopy and microscopy-a case study of multiwalled and singlewalled samples. *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, 6: 1269-1274.
- Korkmaz, C., Sakinci, M., Tekin, B. Y., Ercan, C. M. (2014). Do quantitative birefringence characteristics of meiotic spindle and zona pellucida have an impact on implantation in single embryo transfer cycles? *Arch Gynecol Obstet* 289: 433-438.
- Montes-Fonseca, S. L., Orrantia-Borunda, E., Duarte-Möller, A., Luna-Velasco, A., Román-Aguirre, M., Horta, C. G., & Sánchez-Ramírez, B. (2012). Cytotoxicity of carbon nanotubes on J774 macrophages is a purification-dependent effect. *Journal of Nanomaterials*, 2012, 16.
- Montes-Fonseca, S. L., Sánchez-Ramírez, B., Luna-Velasco, A., Arzate-Quintana, C., Silva-Cazares, M. B., González Horta, C., & Orrantia-Borunda, E. (2015). Cytotoxicity of Protein-Carbon Nanotubes on J774 Macrophages Is a Functionalization Grade-Dependent Effect. *BioMed Research International*, 2015.
- Narbón Fernández P. (2008). Transferencia genética en animales. Universidad Nacional de Educación a Distancia. Tesina.
- Naqvi, S., Maitra, A. N., Abdin, M. Z., Akmal, M., Arora, I., & Samim, M. (2012). Calcium phosphate nanoparticle mediated genetic transformation in plants. *Journal of Materials Chemistry*, 22(8), 3500-3507.
- Vanroose, G., Nauwynck, H., Van Soom, A., Ysebaert, M. T., Charlier, G., Van Oostveldt, P., de Kruit A. (2000). Structural aspects of the zona pellucida of in vitro produced bovine embryos: a scanning electron and confocal laser scanning microscopic study. *Biology of Reproduction* 62: 463-469.
- Vardharajula, S., Ali, S. Z., Tiwari, P. M., Eroğlu, E., Vig, K., Dennis, V. A., & Singh, S. R. (2012). Functionalized carbon nanotubes: biomedical applications. *International journal of nanomedicine*, 7, 5361.
- Wall RJ. Transgenic livestock: progress and prospects for the future (1996). *Theriogenology*, 45:57-68.
- Wassarman, P., Litscher, E. (2008). Mammalian fertilization: the egg's multifunctional zona pellucida. *Int J Dev Bio* 52: 665-676.
- Wu, Y., Phillips, J. A., Liu, H., Yang, R., & Tan, W. (2008). Carbon nanotubes protect DNA strands during cellular delivery. *Acs Nano*, 2(10), 2023-2028.
- Zhang J., Zou H., Qing Q., Yang Y., Li Q., Liu Z., Guo X., Du Z. (2003). Effect of chemical oxidation on the structure of single-walled carbon nanotubes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 107: 3712-3718.