

TRABAJO DE FIN DE GRADO EN FÍSICA

Instituto de Nanociencia de Aragón
y
Departamento de Física de la Materia Condensada
Facultad de Ciencias

DETERMINACIÓN DE LA ABSORCIÓN DE POTENCIA INTRACELULAR MEDIANTE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS: POSIBILIDADES Y LIMITACIONES DE LA HIPERTERMIA MAGNÉTICA

Autor:
Leyre Hernández López

Tutor:
Gerardo F. Goya

Junio de 2016

Contenido

Contenido	1
ABREVIATURAS.....	2
INTRODUCCIÓN	2
Hipertermia Magnética (HT).....	3
Nanomagnetismo y NPMs	4
OBJETIVOS	5
MÉTODO EXPERIMENTAL.....	6
Síntesis de las nanopartículas	6
Caracterización de las nanopartículas	7
Determinación de la concentración del coloide: espectrofotometría.....	7
Estimación del tamaño medio y dispersión de las nanopartículas: TEM.....	7
Ciclo de Histéresis: VSM.....	9
Medida de la Potencia Específica Absorbida (SPA)	10
Aplicación: hipertermia magnética para la inducción de muerte celular	10
Medida del SPA	10
Dual Beam	12
EDX	13
Hipertermia magnética para la inducción de muerte celular	16
CONCLUSIONES	20
BIBLIOGRAFÍA.....	21
Agradecimientos	21

ABREVIATURAS

NPs: nanopartículas

NPMs: nanopartículas magnéticas

SPA: absorción específica de potencia

PEI: polietilenimina

TEM: microscopio electrónico de transmisión

FIB: haz de iones focalizados

SEM: microscopio electrónico de barrido

EDX: espectroscopia de dispersión de rayos X

HT: hipertermia

HTM: hipertermia magnética

INTRODUCCIÓN

La nanotecnología es el estudio y manipulación de sistemas en los que al menos una de sus dimensiones es ≤ 100 nm. [1] En el caso en el que las tres dimensiones cumplan este requisito estaremos hablando de nanopartículas, que son el objeto principal de este trabajo. La nanotecnología está emergiendo en diversos campos en los últimos años debido a sus múltiples aplicaciones y en concreto en este trabajo nos centramos en las aplicaciones biomédicas, dado que estas nanopartículas, del orden de los nanómetros, (Figura 1) nos permiten llegar a la célula, del orden de los micrómetros. Se entiende por aplicaciones biomédicas aquellas aplicaciones que involucran el estudio de los aspectos biológicos de la medicina, incluyendo los mecanismos moleculares, bioquímicos, celulares y genéticos de las enfermedades humanas.

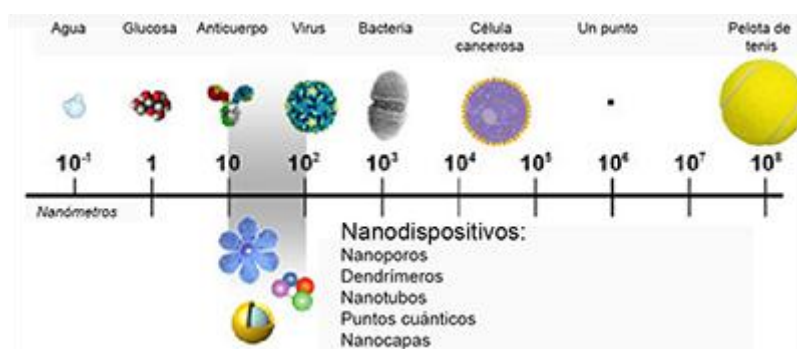


Ilustración 1 Escala, en nanómetros, de diferentes elementos con sus tamaños.

Una propiedad importante de las nanopartículas magnéticas (denominadas como NPMs en adelante) es que, gracias a tener un momento magnético neto, μ , pueden ser atraídas por un

gradiente de un campo magnético, B , que interactúa con el momento magnético según la expresión[2]

$$\vec{F} = (\vec{\mu} \cdot \vec{\nabla}) \vec{B}$$

Otra propiedad interesante de estas NPMs es que, en presencia de un campo magnético H_0 alterno de frecuencia angular ω rad/s, es decir del tipo $H(t) = H_0 \cos(\omega \cdot t)$, el acoplamiento del momento magnético con $H(t)$ origina la absorción de potencia y les induce pérdidas de calor. Esto se refleja en un parámetro denominado poder específico de absorción, SPA, y tiene la siguiente expresión[3]:

$$SPA = \frac{m_{NP} \cdot C_{NP} + m_I \cdot C_I}{m_{NP}} \cdot \left(\frac{\Delta T}{\Delta t} \right)$$

del cual se hablará más tarde.

Este control a distancia que se tiene de las nanopartículas magnéticas (NPMs), las hace aún más interesantes. En concreto en este trabajo se hace uso de la inducción de pérdidas de calor a través de campos magnéticos alternos.

Hipertermia Magnética (HT)

La hipertermia magnética es un protocolo terapéutico basado en el calentamiento a partir de campos magnéticos alternos, dada la disipación de calor que un material ferromagnético sufre bajo la acción de estos. [4] La función de las MNPs es transformar la energía magnética de un campo alterno, aplicado de forma remota, en calor localizado. Si conseguimos elevar la temperatura a unos 45°, se puede llegar a producir la muerte celular, concretamente de las células tumorales, cuya sensibilidad al calor es mucho mayor que la de otro tipo de células. [5] En este trabajo se hace uso de MNPs de Fe_3O_4 , que es un material ferromagnético bien conocido y que no presenta altos niveles de toxicidad en el cuerpo. La principal ventaja de esta terapia con respecto a otras conocidas es que se minimizan los efectos colaterales; la radiación utilizada en este caso no es de frecuencia tan alta como para ionizar material genético y se puede seleccionar dónde actuar, evitando dañar tejido sano. Por otro lado, no hay problemas de penetrabilidad, como puede suceder en otras terapias. Las MNPs actúan como fuentes de calor mediante la transformación de la potencia absorbida del campo magnético aplicado. Esto provoca el incremento de temperatura y por tanto induce la muerte celular. A las frecuencias utilizadas (el rango más bajo de RF, 100 kHz -1 MHz) las bases físicas de generación de calor implican la interacción entre el momento magnético de las MNPs y el componente magnético de la onda electromagnética aplicada. A esas frecuencias la interacción de ambas componentes de las ondas RF con los seres vivos no es relevante y se puede despreciar. [3]

Las aplicaciones biomédicas requieren que las NPMs tengan un grado mínimo de biocompatibilidad, es decir, que la toxicidad para sistemas biológicos se mantenga por debajo de niveles mínimos tolerados. [6] Por este motivo, las MNPs se presentarán suspendidas en agua, en forma de coloide, teniendo así un coloide magnético o ferrofluido. Hay que tener en cuenta que, en una aplicación clínica, es fundamental la reproducibilidad del coloide para tener control sobre la dosis, así como la estabilidad del mismo.

Nanomagnetismo y NPMs

Las propiedades magnéticas de un material vienen determinadas por la susceptibilidad magnética, que está definida como la relación entre la magnetización del material y un campo externo aplicado[2]:

$$M = \chi \cdot H$$

En función de la susceptibilidad magnética, el material puede categorizarse como diamagnético, paramagnético, antiferromagnético, ferromagnético o ferrimagnético. Estos dos últimos están caracterizados por una fuerte interacción entre momentos magnéticos. Se caracterizan por su estructura en dominios, que viene dada por un equilibrio entre la energía de intercambio, que tiende a alinear los dipolos magnéticos en torno a una misma dirección y sentido, y la energía magnetostática, que tiende a romper el sistema en distintos dominios. Esta estructura en dominios hace que la relación entre magnetización y campo magnético venga dada por el ciclo de Histéresis. Dentro de cada dominio, los dipolos magnéticos están alineados en una misma dirección y las paredes de estos son zonas altamente energéticas. Por esta razón, si las MNPs tienen un tamaño menor al tamaño crítico, será más favorable energéticamente que solo exista un dominio, haciendo que la MNP tenga un gran momento magnético en una dirección. El tamaño crítico depende de cada material. Este fenómeno se llama superparamagnetismo y es muy importante en la hipertermia magnética. En este caso el ciclo de Histéresis se verá modificado, reduciéndose fuertemente el campo coercitivo y la magnetización remanente.

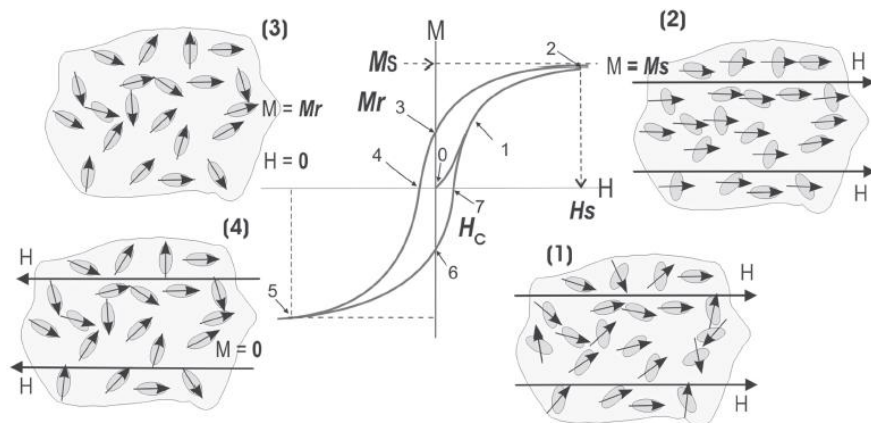


Ilustración 2 Ciclo de Histéresis de una partícula monodominio. En (1) se aplica un campo magnético externo y los momentos magnéticos de la partícula comienzan a orientarse en esa misma dirección y sentido hasta que llega un punto (2) en el que la magnetización ha alcanzado su máximo; magnetización de saturación, Ms. Si ahora se quita el campo magnético externo(3), el material seguirá teniendo una magnetización menor a la de saturación pero en la misma dirección que esta, se denomina magnetización remanente. Para eliminarla, se aplicará un campo denominado coercitivo (4) en sentido contrario esta.

La capacidad del coloide magnético de calentar viene dado por el poder específico de absorción (SPA) del mismo. El SPA es la cantidad de energía convertida en calor por unidad de masa y tiempo. El SPA a una determinada amplitud y frecuencia del campo magnético viene dado por la expresión:

$$SPA = \frac{m_{NP} \cdot C_{NP} + m_l \cdot C_l}{m_{NP}} \cdot \left(\frac{\Delta T}{\Delta t} \right)$$

donde C_{NP} y C_l son las capacidades caloríficas de las nanopartículas y del solvente; y m_{NP} y m_l las masas correspondientes. Como $m_{NP} \cdot C_{NP} \ll m_l \cdot C_l$, podemos aproximar la expresión a:

$$SPA = \frac{\delta_l \cdot C_l}{\phi} \cdot \left(\frac{\Delta T}{\Delta t} \right)$$

donde δ_l será la densidad del solvente (agua) y ϕ la concentración del coloide.

El término $(\Delta T/\Delta t)$ es el ritmo de aumento de temperatura máximo que se obtiene al aplicarle el campo magnético alterno al coloide. Este aumento temperatura se puede modelizar mediante la ecuación de Box-Lucas[7]:

$$T(t) = (T_O - T_{eq}) e^{-t/\tau} + T_{eq}$$

El tiempo de relajación τ que aparece en esta ecuación repercutirá en el SPA del coloide. Hay dos mecanismos por los que un momento magnético puede rotar y por tanto disipar calor, que son descritos por las contribuciones al tiempo de relajación total.

El tiempo de relajación de Brown describe la rotación de la nanopartícula, que conlleva la rotación del momento; mientras que el tiempo de relajación de Néel describe la rotación del momento magnético atómico contra el campo de anisotropía. Vienen dados por las siguientes expresiones[8]:

$$\tau_B = \frac{3 \eta V_H}{k_B T} \quad \tau_N = \frac{\sqrt{\pi}}{2} \cdot \frac{e^{KV/k_B T}}{\sqrt{KV/k_B T}}$$

Siendo η la viscosidad del medio, V_H el volumen hidrodinámico, $K_B T$ la constante de Boltzmann y la temperatura, K la constante de anisotropía y V el volumen. KV es la barrera de potencial que el momento magnético tiene que superar para cambiar su orientación entre dos puntos de equilibrio. [8]

El tiempo de relajación total es $\tau^{-1} = \tau_B^{-1} + \tau_N^{-1}$.

Como se puede ver, este tiempo de relajación depende del tamaño de la nanopartícula, que implica que el SPA dependerá del tamaño. La importancia de esto radica en que a la hora de sintetizar dos factores importantes serán la homogeneidad de la muestra y la reproducibilidad.

OBJETIVOS

En este trabajo el primer objetivo era la introducción y familiarización con un campo tan emergente en los últimos años como lo es la nanociencia. Para ello se sigue todo el camino de una nanopartícula en el laboratorio. Primero se realizará la síntesis, a continuación se caracterizará el material mediante diferentes técnicas y por último, se hará una aplicación práctica. Esta aplicación práctica es la hipertermia magnética para inducir mortalidad celular, técnica que se está utilizando como complemento de la radioterapia y quimioterapia; y en la que se está investigando actualmente.

MÉTODO EXPERIMENTAL

Síntesis de las nanopartículas

La síntesis de nanopartículas de magnetita se ha realizado mediante una modificación del método clásico de hidrólisis oxidativa. Consiste en preparar una primera disolución con nitrato de potasio (KNO_3) y sosa (NaOH); que constituirá el surfactante, y otra con sulfato de hierro (II) heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), polímero polietilenimina (PEI) y ácido sulfúrico (H_2SO_4); que será el precursor. [9],[7] La primera disolución se prepara en un matraz de tres cuellos con un agitador mecánico y a continuación se vierte la segunda gota a gota. Con un flujo de nitrógeno N_2 burbujeando en la disolución total, se eleva la temperatura hasta 90°C . Se coloca un refrigerador que evita la evaporación de la disolución y se mantiene a esta temperatura durante 24 horas. Una vez que la disolución ha alcanzado temperatura ambiente por un baño de hielo, se separa la parte sólida, las nanopartículas. El método usado es decantación magnética con agua milli-Q y, ya que la síntesis se ha realizado en un medio básico, se repite el proceso hasta que el medio tiene un pH neutro. Ya que vamos a tener las MNPs en forma de coloide, en la última repetición se vierte el volumen de agua deseado que constituirá la muestra, que en mi caso han sido 20ml.

El polímero cumple un papel importante en el coloide magnético en este tipo de síntesis. Las nanopartículas se formarán dentro de la cadena polimérica, con lo cual esta condiciona tanto su forma como su tamaño. En el caso del polímero PEI, obtendremos una forma octaédrica de las MNPs debido a la estructura ramificada del mismo. Por otro lado, el polímero disminuye las interacciones dipolares entre MNPs, lo cual favorecerá la estabilidad del coloide.

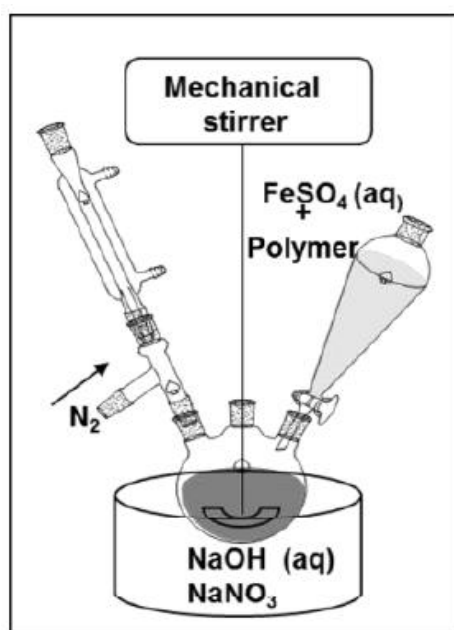


Ilustración 3 Montaje experimental para la síntesis de nanopartículas mediante una modificación de hidrólisis oxidativa. En el matraz de tres cuellos está la disolución con NaOH y KNO_3 con un agitador mecánico, mientras que la que contiene FeSO_4 y el polímero PEI se vierte gota a gota por el recipiente de la derecha. Por la izquierda está el flujo de nitrógeno mientras que por arriba está el motor del agitador. El recipiente de abajo es el que eleva la temperatura.

Se sabe que este tipo de coloide magnético tiene una estabilidad de unos 6 meses, que será suficiente para desarrollar este trabajo.

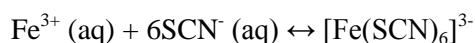
Caracterización de las nanopartículas

Determinación de la concentración del coloide: espectrofotometría

Conocer la concentración del coloide magnético nos va a permitir tanto conocer la masa de nanopartículas que tenemos, como determinar posteriormente diferentes parámetros magnéticos que caracterizan al mismo, como el SPA o la magnetización de saturación.

Este proceso se lleva a cabo mediante el llamado protocolo de tiocianatos, el cual nos permite determinar la concentración de iones hierro Fe^{3+} en una muestra. Para ello lo primero que hay que hacer en el coloide de nanopartículas de magnetita es digerir el hierro. Cada molécula de magnetita tiene dos hierros Fe^{3+} y un hierro Fe^{2+} . A 100 μl de muestra se añaden 500 μl de ácido nítrico HNO_3 y 500 μl de ácido clorhídrico HCl . Cuando el color del fluido es amarillo pálido, significa que todos los hierros son hierros (III) y que se han digerido.

En este punto se procede con el protocolo. A 200 μl de la muestra digerida se añaden 300 μl de ácido clorhídrico y 500 μl de tiocianato de potasio. Cuando una muestra que contiene Fe^{3+} se le añade tiocianato, se produce la siguiente reacción química:



Instantáneamente, la muestra se vuelve de un color rojo intenso. Se sabe que $[\text{Fe}(\text{SCN})_6]^{3-}$ tiene un pico en su espectro de absorción para $\lambda=478\text{nm}$. Con lo cual en un espectrofotómetro se mide la absorbancia a esta longitud de onda y mediante una curva de calibración se calcula la concentración de hierro.

La absorbancia obtenida en mi coloide fue $A_{478}= 0'4991$. La curva de calibración se puede resumir en la siguiente expresión:

$$A_{\lambda} = 200,14 \cdot [\text{Fe}^{3+}] - 0,009$$

Teniendo en cuenta las diluciones hechas durante el protocolo y que la concentración a obtener es la de magnetita y no la de hierro, la concentración del coloide inicial es

$$[\text{Fe}_3\text{O}_4] = 1,69 \text{ mg/ml}$$

Estimación del tamaño medio y dispersión de las nanopartículas: TEM

Dado que las nanopartículas tienen un tamaño menor que la longitud de onda del visible, para la obtención de imágenes de las mismas se hace uso de un microscopio electrónico de transmisión (TEM). El microscopio electrónico de transmisión consiste en un cañón donde se aceleran electrones a 30-300KV, es decir, 30-300KeV, dependiendo del modelo. A lo largo del cañón, diferentes lentes tienen la función de concentrar el haz de electrones. Al incidir sobre la muestra, los electrones que han sido transmitidos son los que forman la imagen.

Para que haya suficientes electrones transmitidos como para formar una imagen, es importante que el grosor de la muestra sea mínimo; para lo cual se diluye el coloide. Además, al preparar la muestra, se limpia con agua milli-Q para eliminar el polímero, que podría dificultar la visualización de las nanopartículas. En mi caso, las imágenes han sido tomadas con un voltaje de 200 kV.

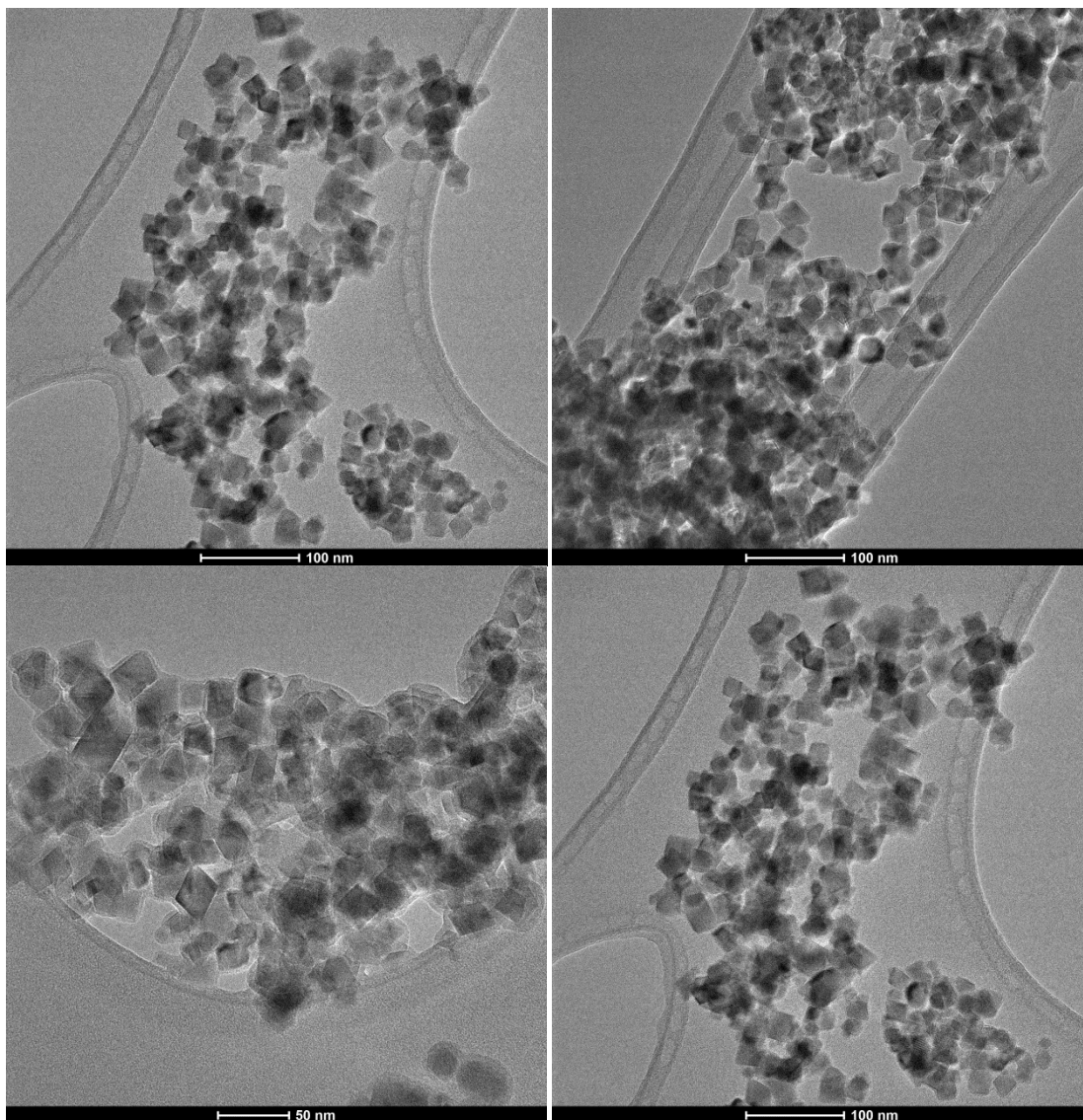


Ilustración 4 Imágenes tomadas con el microscopio TEM de las nanopartículas de magnetita a distintas escalas.

Como se aprecia en las imágenes, las nanopartículas tienen una forma octaédrica, y puede apreciarse también la cobertura de espesor aproximado de 1-2 nm sobre la superficie de las NPMs, que es el polímero que no se ha eliminado. Para la construcción del histograma de los tamaños de las nanopartículas se han medido unas 1000 en las imágenes del TEM. El resultado es una distribución que se ajusta bien a una gaussiana, con un tamaño central $\langle d \rangle = 23,6$ nm ($\sigma = 4,8$).

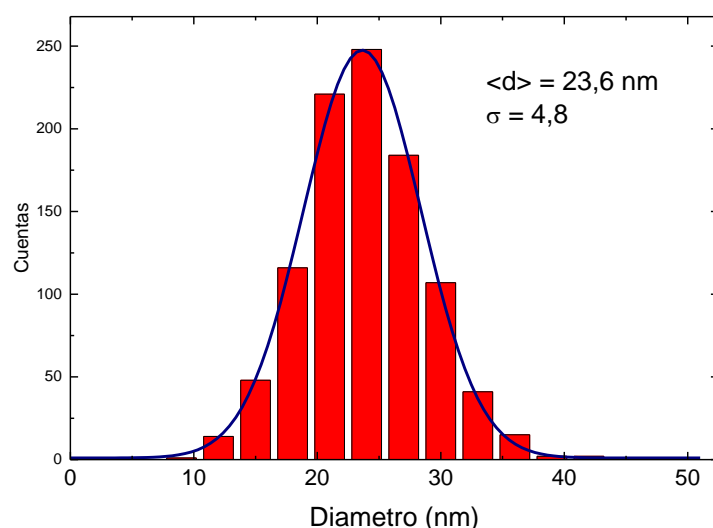


Ilustración 5 Histograma de los diámetros de 1000 nanopartículas con ajuste a una gaussiana.

Ciclo de Histéresis: VSM

Para medir el ciclo de Histéresis se hace uso del magnetómetro de muestra vibrante, VSM (Vibrating Sample Magnetometer). Para evitar el movimiento de la muestra, se deja evaporar durante un día el coloide hasta que solo quede sólido. A continuación, se coloca un algodón presionando para que se muevan lo mínimo posible. El funcionamiento del VSM consiste en inducirle una vibración a la muestra perpendicularmente a un campo magnético continuo. De esta manera la muestra genera unas variaciones de flujo magnético que mide el VSM y así se obtiene el ciclo de Histéresis. Un parámetro importante de éste es la magnetización de saturación, que en este caso está entre los 80 y 90 Am^2/kg . Por otro lado, se puede ver como el campo coercitivo y la imanación remanente se anulan casi completamente por ser el material superparamagnético.

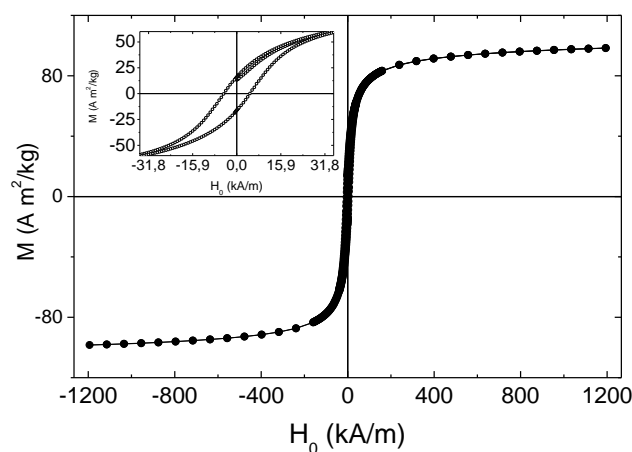


Ilustración 6 Ciclo de Histéresis experimental. Se puede apreciar el bajo campo coercitivo y magnetización de saturación característicos del superparamagnetismo.

Medida de la Potencia Específica Absorbida (SPA)

Como se ha visto en la introducción, la expresión simplificada del SPA depende de la concentración y del ritmo de aumento de temperatura. La concentración se ha calculado en un apartado anterior, con lo cual queda calcular el ritmo de aumento de la temperatura. Esta medida se lleva a cabo con el DM1. El DM1 consiste en un solenoide que es atravesado por una corriente induciendo un campo magnético en su interior, donde se coloca la muestra. Aquí, se induce vacío para aislar térmicamente. Pueden aplicarse distintas amplitudes y frecuencias de campo magnético; en mi caso he dejado la frecuencia fija a 571Hz, que permite la máxima intensidad del equipo, y he variado la amplitud hasta los 24kA/m. Midiendo por triplicado en cada valor del campo, he obtenido los siguientes datos.

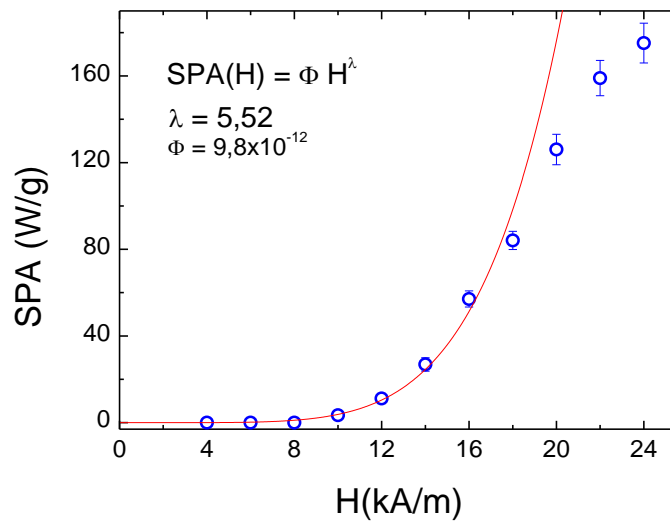


Ilustración 7 Ajuste del SPA obtenido experimentalmente a una potencia del campo magnético.

Ajustando el SPA a la función de tipo $f(H) = \Phi H^\lambda$, se ha obtenido $\lambda=5.52$, mientras que la teoría LRT (teoría de la respuesta lineal) dice que $\lambda=2$. Esto puede ser debido a que esta relación solo vale para campos magnéticos mucho menores que el campo coercitivo del material. Esta condición, como se ha visto al analizar el ciclo de Histéresis, no se cumple.

Aplicación: hipertermia magnética para la inducción de muerte celular

Una vez caracterizadas las nanopartículas y sus propiedades magnéticas, se pueden realizar experimentos con las células. Se utiliza la línea celular BV2 que son macrófagos del sistema nervioso y componen el sistema inmunitario de este. Tienen la capacidad de fagocitar, es decir, absorber partículas sólidas rodeándolas con la membrana e incluyéndolas en el interior celular. Esta característica es la que va a permitir que las NPMs lleguen al interior de las células.

Medida del SPA

Un día antes al experimento, las células se encuentran en un medio de cultivo, DMEM, que contiene suero con proteínas, de manera que están nutridas. Entonces se retira el líquido que queda y se lava con PBS (tampón fosfato salino, por sus siglas en inglés). Como las células vivas se adhieren al frasco de cultivo celular y las muertas no, así conseguimos mantener solamente las que están en buen estado. Después se les añade DMEM con una concentración de

NPMs para que fagociten las nanopartículas y se incuban 24 horas a temperatura corporal. Pasado este tiempo, se lavan dos veces con PBS las células para eliminar las nanopartículas que no hayan sido absorbidas por las células. Esto es importante ya que si no eliminásemos estas partículas, contribuirían al SPA desde un medio que no es el intracelular. A continuación, se levantan las células del frasco de cultivo celular y se centrifugan para colocarlas en un pequeño volumen en un eppendorf. En este recipiente tendremos pues, medio de cultivo y células con nanopartículas en su interior.

Para los experimentos de este trabajo se contaron 8.890.000 células y posteriormente se determinó una concentración de 3'59 mg/ml de nanopartículas de magnetita. El proceso de medida es igual que cuando no había células, pero a la hora de situar la fibra óptica que mide la temperatura hay que tener en cuenta que las células decantarán, con lo cual se coloca al fondo del eppendorf.

Como se puede observar en las ilustraciones 7 y 8 el SPA en las células es mucho menor que el medido en agua. Esto es debido a que el tiempo de Brown está bloqueado, ya que es proporcional a la viscosidad del medio, y las células tienen una viscosidad mucho mayor que el agua:

$$\eta_{\text{agua}} = 0,9 \cdot 10^{-3} \text{ kg/m} \cdot \text{s} \quad \eta_{\text{célula}} = 50 \cdot 10^{-3} \text{ kg/m} \cdot \text{s}$$

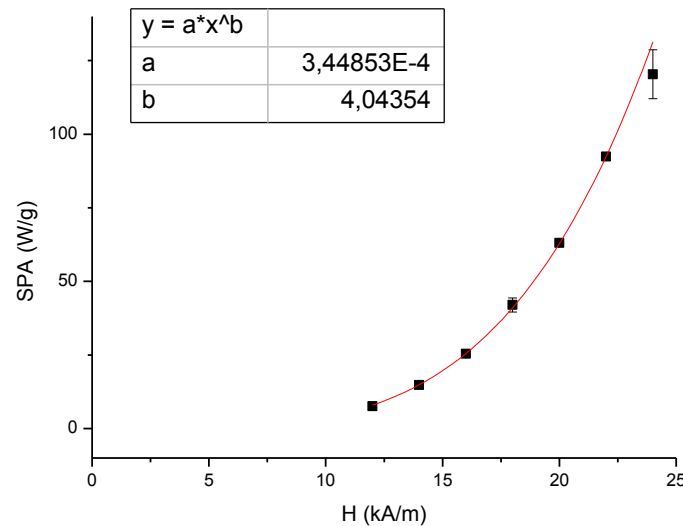


Ilustración 8 Medida experimental del SPA en las células BV2.

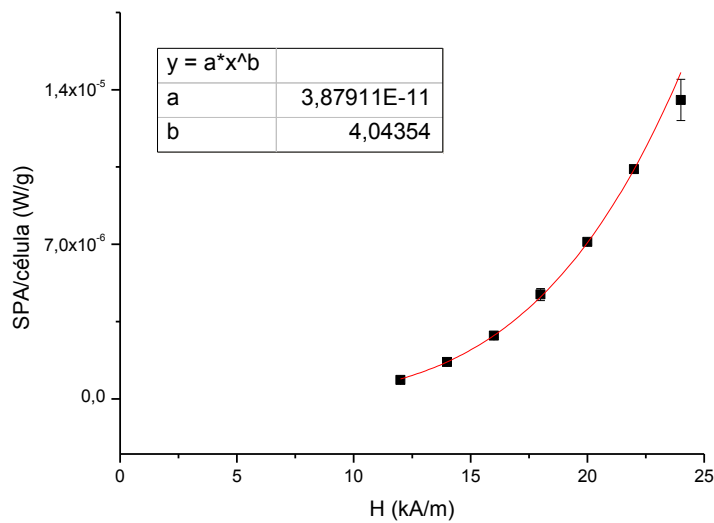


Ilustración 9 Medida experimental del SPA por célula BV2.

Dual Beam

El sistema dual beam incluye una columna de haz de electrones que constituye un sistema SEM (microscopio electrónico de barrido) y una columna de haz de iones, que constituye un sistema FIB (focused ion beam). La primera es vertical, mientras que la segunda está colocada a 52°. La muestra se colocará en el punto en el que los dos haces intersecten, que para el caso de este dual beam, el SEM focaliza a 5mm del cañón y en el caso del FIB, a 16mm.

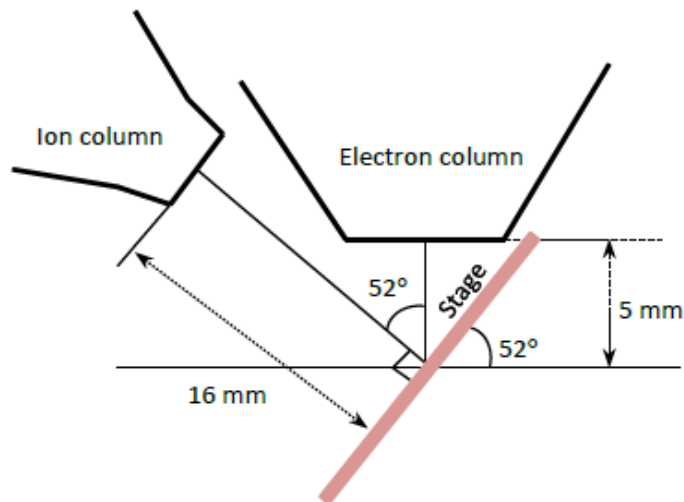


Ilustración 10 Esquema de un dual beam. Arriba se ve la columna del SEM, mientras que a la izquierda, a 52° del anterior, se sitúa el FIB.

El microscopio electrónico de barrido es un microscopio que forma sus imágenes con electrones acelerados a través de una diferencia de potencial y lentes correctoras. Al colisionar los electrones con la muestra, se producen, entre otros, electrones secundarios, que son los que formarán la imagen.

El sistema FIB es similar al SEM, con la diferencia de que utiliza iones en vez de electrones, es decir, la principal diferencia es la masa de las partículas que emite. Consiste en una punta de wolframio recubierto con iones metálicos en estado líquido. El metal que contienen es galio, por diferentes motivos: tiene una baja presión de vaporización, su número atómico es grande y es relativamente fácil de manejar. El haz del ión es provocado igual que el de electrones: mediante una diferencia de potencial y lentes correctoras.

Debido a la gran masa de los iones de galio, al colisionar con la muestra, producirán cambios en la misma. Esta modificación puede controlarse mediante la energía y la intensidad del haz de iones. Esto, junto con el control nanométrico que se tiene sobre este haz, hace que se puedan modificar de manera muy precisa las muestras con las que se trabaja. Se realizarán a las células cortes transversales para ver su interior y la distribución de las nanopartículas en el mismo. Con la energía y la intensidad del haz hay que encontrar un compromiso, ya que cuanto más alto el voltaje y más baja la intensidad, el corte en el material será más preciso, pero se tardará más tiempo. Para este trabajo se ha usado para el haz de galio un voltaje de 30kV y una intensidad de 10 pA, que permite un haz bastante preciso. Por otro lado, el haz de electrones tenía un voltaje de 5 kV y las intensidades se fueron variando de una imagen a otra, todas ellas en torno a algunos picoamperios.

Antes de llevar una muestra biológica al dual beam hay que prepararla. Para ello primero se fija la muestra con glutaraldehído en tampón cacodilato de sodio a 4°C durante una hora y media y posteriormente con tetraóxido de osmio y ferrocianato de potasio durante una hora y media tapado de la luz. A continuación, se deshidrata la muestra con distintas concentraciones de acetona, 10 minutos cada una: 30%, 50%, 70%, 90% y 100% dos veces. Por último se recubren las muestras de platino quedando así listas para el dual beam.

EDX

EDX significa espectroscopia de dispersión de energía de rayos X y es una técnica utilizada para análisis químico de muestras. Para ello se usan electrones acelerados, que al colisionar con la muestra, emiten rayos X que tendrán una energía característica en función del elemento con el cual han colisionado. A continuación, los electrones pasan por un prisma magnético, que a través de la fuerza de Lorentz separa a los electrones en función de su energía, es decir, de su velocidad.

$$\vec{F} = q \cdot (\vec{v} \times \vec{B})$$

Una vez separados por energías, podemos construir un espectro, de manera que cada energía corresponde a un elemento y la cantidad de electrones de cada elemento, a la abundancia del mismo.

Con la técnica de FIB-SEM-dual beam se analizaron los cultivos celulares con partículas incorporadas, con objeto de conocer el estado de aglomeración en las células, así como la distribución final. Se obtuvieron secuencias de imágenes de las células co-cultivadas con las NPMs, como se muestra en la Ilustración 11.

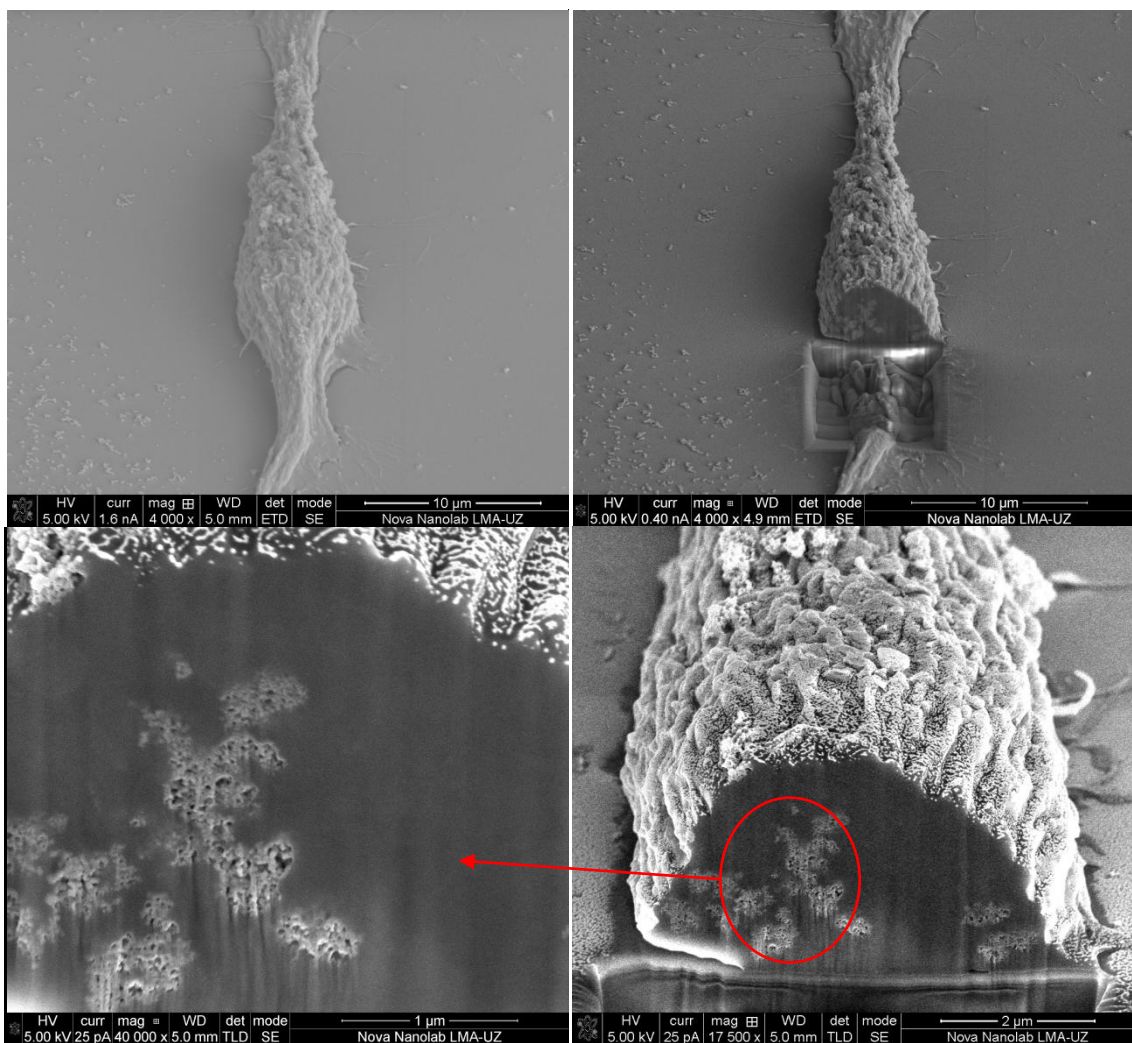


Ilustración 11 Imágenes de microscopía electrónica FIB-SEM dual beam de una célula con NPMs en su interior.

En el panel superior izquierdo de la Ilustración 11 puede verse una célula completa, observándose la forma alargada que tiene es debido a los procesos de adhesión sobre la superficie. En el panel superior derecho de la misma Ilustración se muestran las etapas iniciales de un corte transversal realizado con el haz de iones Ga del FIB-SEM dual beam. El material que se ve justo debajo en el interior de la célula son restos de material la célula que se han ido depositando. En los dos paneles inferiores de la Ilustración 11 se puede ver un detalle amplificado de las nanopartículas distribuidas en el interior de la célula. El estado de aglomeración de las NPMs es evidente en estas imágenes. Por otro lado, para comprobar que efectivamente lo que se ve son las nanopartículas de magnetita se han realizado las otras dos técnicas descritas más arriba. El espectro de EDX obtenido se muestra en la Ilustración 12, donde se indica con un recuadro morado el área de donde se ha extraído la información espectral. En el espectro EDX se pueden observar claramente los picos de C y O, elementos naturales de todo material biológico, y adicionalmente el pico de Fe proveniente de nuestras NPMs. La magnetita tiene átomos tanto de hierro como de oxígeno y vemos que ambos aparecen en el espectro. Sin embargo, el oxígeno no es exclusivo de las MNPs, ya que también existe en el interior celular. Es el hierro el que confirma que lo que hay en el interior de las células son las MNPs.

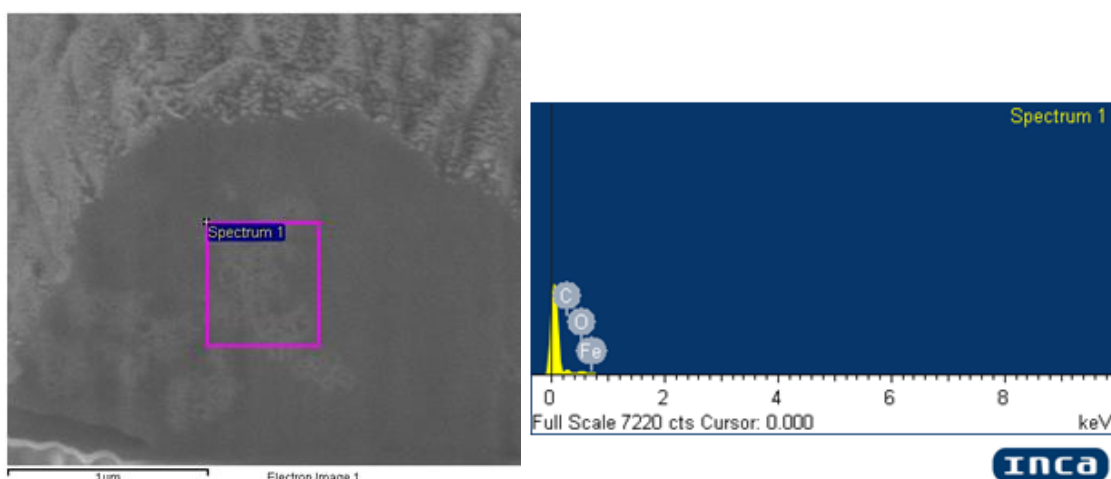


Ilustración 12 Espectro EDX correspondiente al interior de la célula

Si se toma el espectro durante un tiempo prolongado, podemos realizar la cuantificación de los elementos identificados. Las cantidades relativas de C, O, Na y Fe se muestran en la Ilustración 13.

Element	Weight%	Atomic%
C (K)	32.66	54.47
O (K)	21.97	27.51
Na (K)	3.40	2.96
Fe (L)	41.98	15.06

Ilustración 13 Abundancia de cada elemento del anterior espectro.

En el caso de la observación de NPMs en la membrana celular, podemos realizar esta cuantificación de elementos y al mismo tiempo ver la disposición espacial de dichos elementos realizando una técnica denominada Mapping. En este caso filtramos la energía en las ventanas del hierro y del oxígeno (solo por comparación pues como hemos dicho, la determinante es la del hierro) y se recoge la información en un detector CCD que asigna cada pixel a una posición que luego se superpone con la imagen de electrones, obteniéndose un mapa de composiciones.

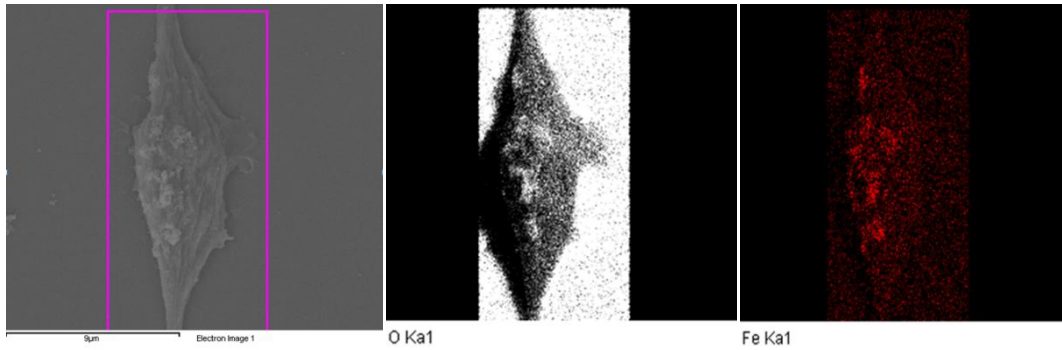


Ilustración 14 Imágenes en modo 'mapping' que provee la distribución de elementos (hierro en este caso) en la superficie celular.

Hipertermia magnética para la inducción de muerte celular

Para realizar el experimento de hipertermia magnética, se prepara la muestra igual que en el caso del cálculo del SPA. Para este caso se ha utilizado una concentración de $100\mu\text{g/ml}$ de NPMs en el DMEM. Es importante en este caso comprobar que después de las 24 horas de incubación de las células con las NPMs, estas siguen vivas, es decir, que las NPs por sí solas no son tóxicas.

El experimento se realiza en el DM1, pero en este caso se programa de manera que fijamos la frecuencia del campo y la temperatura a la que queremos llegar, en este caso 45°C . La amplitud del campo va variando automáticamente para ajustarse a la temperatura mediante un control de tipo feedback, que se calibra con los parámetros de PID similares a los utilizados en controladores de temperatura. Durante los primeros momentos, la amplitud será la máxima del equipo, 24 kA/m , pero conforme la muestra llega a la temperatura deseada, la amplitud del campo empieza a oscilar. En este caso, una vez alcanzada la temperatura de 45° se deja 30 minutos actuando el campo magnético sobre la muestra.

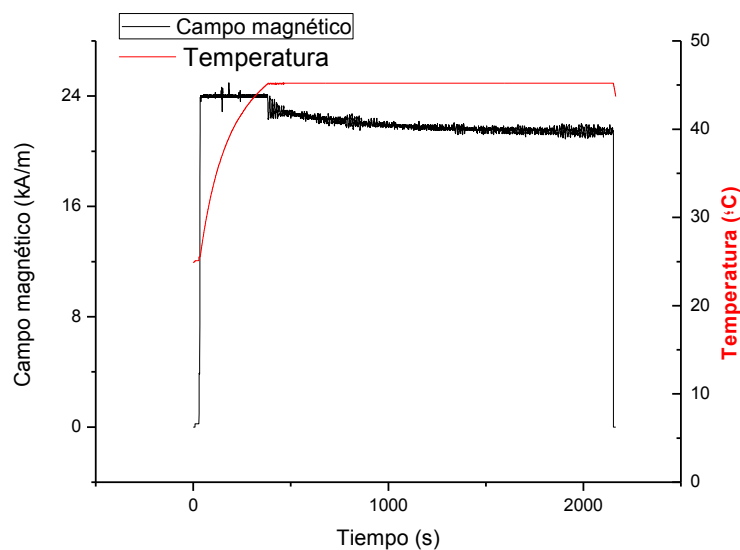


Ilustración 15 Gráfica del proceso de HTM. En negro el campo magnético y en rojo la temperatura. Se puede ver que la amplitud del campo magnético es máxima (300G) hasta que la temperatura deseada es alcanzada, y en ese momento empieza a oscilar para mantener esos 45°C .

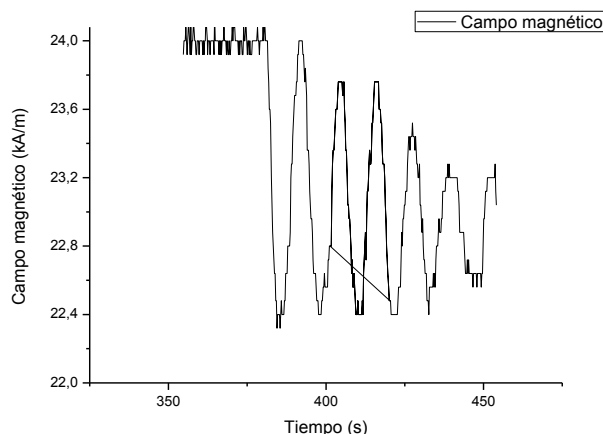


Ilustración 16 Detalle del momento en el que la temperatura alcanza los 45°C, donde el campo magnético empieza a oscilar para mantener dicha temperatura constante.

La hipertermia se realiza por triplicado en tres muestras iguales para obtener una medida del error experimental involucrado y por otro lado se realiza una cuarta vez con células pero sin NPMs en su interior. Esta muestra será el control, con el cual se comprueba que el campo magnético no es tóxico para las células, sino que lo que produce la muerte celular es la hipertermia.

Una vez realizado el experimento para las cuatro muestras, se hace el cálculo de la viabilidad. Los mecanismos de muerte celular se van activando a lo largo del tiempo, no son procesos instantáneos, con lo cual se mide esta viabilidad a tiempo cero (nada más hacer el experimento) y a las seis horas. Estas seis horas se deja la muestra incubando a 36°C. Para determinar la viabilidad, se usa Trypan blue. Las células vivas tienen su membrana impermeable, mientras que las células muertas, la tienen permeable. El Trypan blue es un tinte azul que solamente teñirá las células muertas. Esto permite contar en el microscopio óptico invertido las células muertas y vivas en una pequeña fracción de la muestra y después extrapolar.

Los resultados obtenidos han sido que para tiempo cero, la viabilidad media en las tres muestras es de 72,3% mientras que a las seis horas la viabilidad desciende a un 22,3%. Se ve aquí claro el hecho de que los procesos de muerte celular no se activan instantáneamente. Por otro lado, la viabilidad en células que han sido sometidas al campo, pero que no tenían NPs en su interior es de en torno al 100% en ambos tiempos.

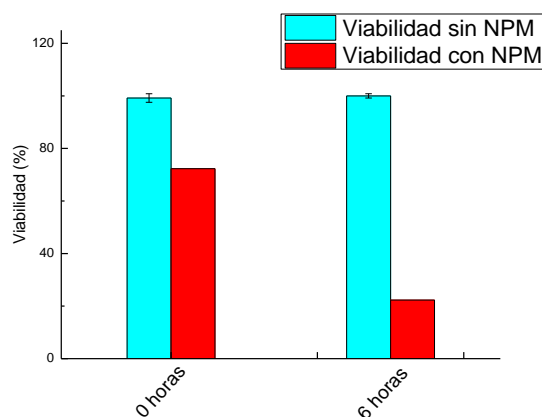


Ilustración 17 Gráfico del porcentaje de viabilidad celular tras la hipertermia. Las células sin NPM tienen una viabilidad de alrededor del 100%. Las células con NPMs tienen una viabilidad del 72% que se ve reducida hasta el 22% a las 6 horas del experimento.

Una vez finalizado el experimento de HTM, se vuelve a proceder con el protocolo de fijado y deshidratación para obtener imágenes de las muestras en el FIB-SEM dual beam. En este caso, al lavar las células con PBS para levantarlas, es importante no deshacerse de este fluido, ya que llevará consigo células muertas, que no se adhieren al recipiente. En las imágenes obtenidas en este caso, vemos que en las células han aparecido huecos, que son propios de algunos procesos de muerte celular, tanto en la membrana como en el interior. Seguimos viendo las nanopartículas distribuidas en el interior de la célula, al igual que antes de la HTM.

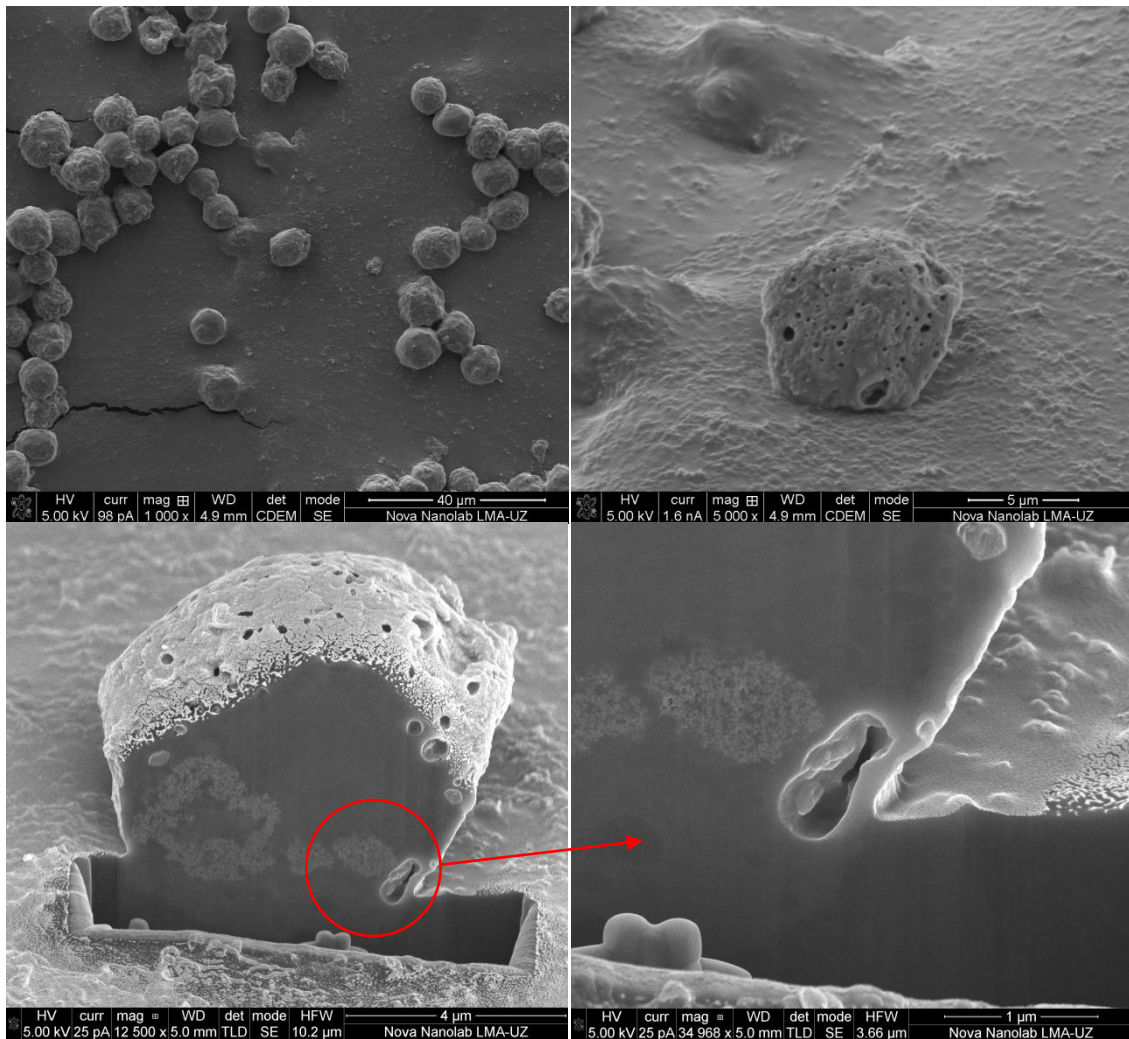


Ilustración 18 Imágenes de una célula después de la hipertermia magnética. Las oquedades son la evidencia de que se ha producido la muerte celular.

Finalmente, se ha realizado también el análisis EDX para comprobar la existencia de magnetita en el interior de las células:

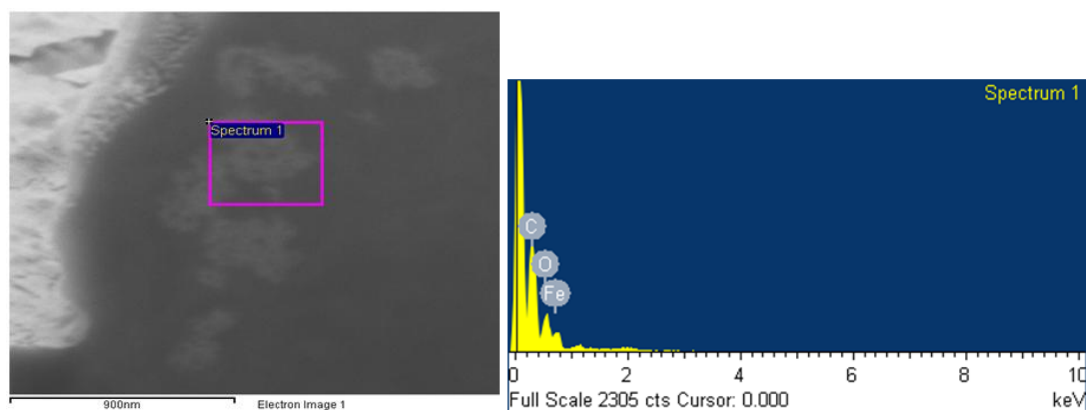


Ilustración 19 Espectro EDX de los elementos en el interior de la célula. La existencia de hierro es la que delata la presencia de NPMs

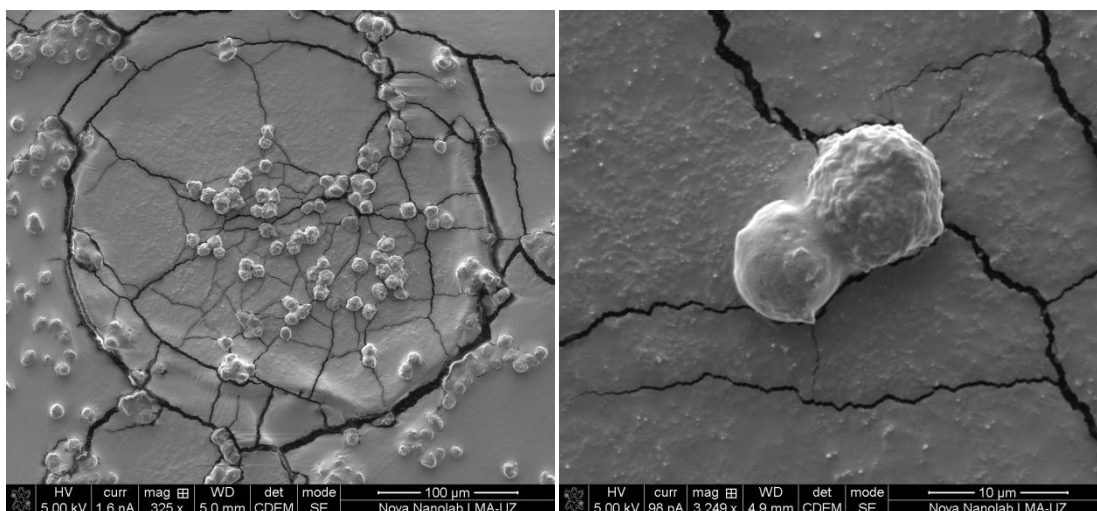


Ilustración 20 Muestra de control. Se puede notar la diferencia entre las imágenes anteriores y estas imágenes, que en estas células el campo magnético sin NPMs no ha modificado las células, quedando demostrado que el campo magnético no es tóxico para las mismas.

CONCLUSIONES

En este trabajo se han sintetizado con éxito nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 funcionalizadas con polietilenimina (PEI), pensadas como agentes de calentamiento para hipertermia magnética en cultivos celulares. Se han caracterizado sus propiedades coloidales y magnéticas para calentamiento bajo la acción de campos magnéticos de radiofrecuencia (SPA $f=571$ kHz, $0 < H_0 < 24$ kA/m). El estudio de la interacción de dichas MNPs con células mostró no solo la eficiencia del calentamiento hasta temperaturas de apoptosis, sino también una baja toxicidad en el rango de concentraciones estudiados ($10\text{--}100\mu\text{g/ml}$). Se han utilizado técnicas de Microscopía electrónica para analizar la biodistribución intracelular final de las MNPs, encontrando que éstas se presentan parcialmente en aglomerados adheridos a la membrana celular, mientras que la fracción restante aparece en distribuciones de aglomerados en el citoplasma. Demostramos que es posible, utilizando las NPMs sintetizadas, alcanzar temperaturas de 45°C adecuadas para experimentos de hipertermia magnética. Esta temperatura seleccionada provoca una reducción de la viabilidad en los cultivos celulares de hasta el 23% a las 6 horas de haber aplicado el protocolo de campos magnéticos alternos. El análisis de la morfología de las células después de la hipertermia indica que la muerte celular está asociada a una destrucción de la membrana celular. Esta prueba de concepto a nivel celular debe considerarse como un paso necesario para entender los parámetros más importantes a la hora de realizar los protocolos de HTM que podrían, potencialmente, aplicarse en seres vivos en el futuro.

BIBLIOGRAFÍA

1. (NRC), N.R.C., *A research strategy for environmental, health and safety aspects of engineered nanomaterials report*. 2012.
2. Cullity, B.D., *INTRODUCTION TO MAGNETIC MATERIALS*. 1972.
3. Goya, G., V. Grazu, and M. Ibarra, *Magnetic nanoparticles for cancer therapy*. Current Nanoscience, 2008. **4**(1): p. 1-16.
4. Asin, L., et al., *Controlled cell death by magnetic hyperthermia: effects of exposure time, field amplitude, and nanoparticle concentration*. Pharm Res, 2012. **29**(5): p. 1319-27.
5. Goya, G.F., L. Asin, and M.R. Ibarra, *Cell death induced by AC magnetic fields and magnetic nanoparticles: current state and perspectives*. Int J Hyperthermia, 2013. **29**(8): p. 810-8.
6. Calatayud, M.P., et al., *The effect of surface charge of functionalized Fe₃O₄ nanoparticles on protein adsorption and cell uptake*. Biomaterials, 2014. **35**(24): p. 6389-99.
7. Sanz, B., et al., *Long-Term Stability and Reproducibility of Magnetic Colloids are Key Issues for Steady Values of Specific Power Absorption Over Time*. European Journal of Inorganic Chemistry, 2015: p. n/a-n/a.
8. Rosensweig, R.E., *Heating magnetic fluid with alternating magnetic field*. Journal of magnetism and magnetic materials, 2002. **252**: p. 370-374.
9. Calatayud, M.P., et al., *Neuronal cells loaded with PEI-coated Fe₃O₄ nanoparticles for magnetically guided nerve regeneration*. Journal of Materials Chemistry B, 2013. **1**(29): p. 3607-3616.

Agradecimientos

Agradecer a mi tutor, Gerardo, por toda la ayuda y el apoyo recibido durante estos meses. Dar las gracias también a Bea por su inestimable ayuda en el laboratorio, así como a Teo y a Lizbet.