



**Universidad**  
Zaragoza

## Trabajo Fin de Grado

Desarrollo de nanopartículas magnéticas optimizadas para uso biomédico en hipertermia por radiofrecuencia, y prueba de concepto en células de microglía.

Development of magnetic nanoparticles for biomedical uses in hyperthermia by radiofrequency, and proof of concept in microglial cells.

*Autor/es*

**Laura Celorrio Aranda**

*Director/es*

**Gerardo F. Goya Rossetti**

**Beatriz Sanz Sagué**

ESCUELA DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA

2017



**Escuela de**  
**Ingeniería y Arquitectura**  
**Universidad Zaragoza**





## *Agradecimientos*

*A Gerardo Fabián Goya por acogerme en este grupo de trabajo durante la realización de mi Trabajo Fin de Grado así como su ayuda y dedicación.*

*A Beatriz Sanz por su paciencia, atención, constancia y apoyo día tras día.*

*A otros miembros del grupo, como Teobaldo Torres Molina que nunca me han negado su ayuda cuando la he necesitado.*

*A mis amigos y compañeros siempre dispuestos a apoyarme y sacarme una sonrisa, no solo en este proyecto sino durante toda la carrera.*

*A mi familia por su apoyo incondicional durante estos cuatro años.*

Desarrollo de nanopartículas magnéticas optimizadas para uso biomédico en hipertermia por radiofrecuencia, y prueba de concepto en células de microglía.

## Resumen

La Hipertermia Magnética (HM) es una terapia oncológica basada en el calentamiento de tumores mediante la aplicación remota de un campo magnético de radiofrecuencia sobre nanopartículas magnéticas (NPMs) previamente incorporadas al tejido diana. La interacción magnética entre NPMs y campo resulta en la generación de calor, elevando la temperatura local hasta 42°C – 45°C e induciendo la muerte de las células diana. Las potenciales aplicaciones de las NPMs dependen en gran medida del diseño de nuevas partículas con gran capacidad de producir calor bajo la acción de campos magnéticos.

En este trabajo se sintetizaron y caracterizaron diferentes muestras coloidales compuestas por NPMs de  $MnFe_2O_4$  con el fin de seleccionar las que posean las propiedades óptimas para HM, maximizando la absorción específica de potencia (SPA) y minimizando su citotoxicidad para células microgliales BV2. Estudios teóricos recientes que sugieren que las interacciones dipolares debidas a la aglomeración intracelular de las NPMs en condiciones *in vitro* resultan ser la causa principal de cambios en la relajación magnética, lo que conlleva la disminución del SPA. Para confirmar estas hipótesis, realizamos una prueba de concepto para la HM *in vitro*: la generación de cadenas de NPMs internalizadas en el citoplasma celular (aplicando campos magnéticos continuos durante el crecimiento) y la comparación de su eficiencia de calentamiento (SPA) con la correspondiente a las NPMs agregadas en el citoplasma. Mediante el diseño experimental propuesto hemos confirmado que la aglomeración de NPMs en el interior celular resulta en menores valores de SPA que en el coloide original. Este proceso pudo ser revertido mediante la formación de cadenas que evitan los aglomerados en el interior celular. Estos experimentos constituyen una base experimental inicial para desarrollar modelos físicos de absorción de potencia, que permita la optimización de los parámetros más relevantes en hipertermia magnética clínica, minimizando el daño en los tejidos sanos.

## **Abstract**

Magnetic Hyperthermia (HM) is a clinical therapy in oncology based on the heating of tumors by the remote application of a radiofrequency magnetic field on magnetic nanoparticles (NPMs) previously incorporated into the target tissue. The magnetic interaction between NPMs and magnetic fields yields the generation of heat, raising the local temperature to 42°C - 45°C and inducing the death of the target cells. The potential applications of NPMs rely heavily on the design of new particles with greater capacity to produce heat under the action of magnetic fields.

In this work, different colloidal samples composed of  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  NPMs were synthesized and characterized in order to select the ones with optimal properties for HM, maximizing the specific power absorption (SPA) and minimizing their cytotoxicity for BV2 microglial cells. Recent theoretical studies suggest that the dipole interactions due to intracellular agglomeration of NPMs under *in vitro* conditions are the main cause of changes in the magnetic relaxation of the MNP, which leads to the decrease of the SPA. In order to confirm this hypothesis, we performed a proof of concept for HM *in vitro*: the generation of NPM chains internalized in the cellular cytoplasm (applying continuous magnetic fields during cell growth) and the comparison of their heating efficiency (SPA) against the SPA of NPMs agglomerated within the cytoplasm. Through the proposed experimental design we have confirmed that the agglomeration of NPMs in the cytoplasm lowers the values of SPA respect to the original colloid. This process could be reversed by the formation of chains that avoid the agglomerates inside the cell. These experiments constitute an experimental basis for further physical models of power absorption by NPMs, aiming the optimization of those most relevant parameters in clinical magnetic hyperthermia, and minimizing damage in healthy tissues.



TRABAJOS DE FIN DE GRADO / FIN DE MÁSTER



Escuela de  
Ingeniería y Arquitectura  
Universidad Zaragoza

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD

(Este documento debe acompañar al Trabajo Fin de Grado (TFG)/Trabajo Fin de  
Máster (TFM) cuando sea depositado para su evaluación).

D./D<sup>a</sup>. Laura Celorrio Aranda

con nº de DNI 77216715B en aplicación de lo dispuesto en el art.

14 (Derechos de autor) del Acuerdo de 11 de septiembre de 2014, del Consejo  
de Gobierno, por el que se aprueba el Reglamento de los TFG y TFM de la  
Universidad de Zaragoza,

Declaro que el presente Trabajo de Fin de (Grado/Máster)  
Grado \_\_\_\_\_, (Título del Trabajo)

Desarrollo de nanopartículas magnéticas optimizadas para uso biomédico en  
hipertermia por radiofrecuencia, y prueba de concepto en células de microglía.

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

es de mi autoría y es original, no habiéndose utilizado fuente sin ser citada  
debidamente.

Zaragoza, 20 Junio 2017

Fdo: \_\_\_\_\_

## ABREVIACIONES

AT: Azul de tripán

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DML: Dispersión dinámica de luz

EDX: Espectroscopia de energía dispersiva

H: Campo magnético

HM: Hipertermia magnética

Ms: magnetización de saturación

NP: Nanopartícula

NPM: Nanopartícula magnética

PBS: Tampón fosfato salino

SPA: Potencia específica absorbida

TEM: Microscopía de transmisión electrónica

VSM: Magnetómetro de muestra vibrante

## ÍNDICE

ABREVIACIONES .....	7
1.INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	10
1.1 Nanopartículas magnéticas .....	10
1.2 Comportamiento magnético de las NPs .....	11
1.3 Hipertermia magnética .....	13
1.4 Cultivo celular .....	16
1.5 Avances clínicos y problemas a investigar.....	17
2. METODOLOGIA Y RESULTADOS.....	18
2.1 Síntesis de Nanopartículas .....	18
2.2 Caracterización.....	19
2.2.1 TEM.....	19
2.2.2 Concentración del coloide: espectrofotometría UV-Vis .....	21
2.2.3 Potencia específica absorbida (SPA).....	22
2.2.4 Ciclo de histéresis .....	24
2.2.5 EDX.....	26
2.2.6 Radio hidrodinámico .....	28
2.3 Experimentos <i>In vitro</i> .....	30
2.3.1 Cultivo células BV2 (microglia).....	30
2.3.2 Toxicidad e incorporación de NPMs.....	31
2.3.3 Hipertermia magnética <i>in vitro</i> .....	33
3. CONCLUSIONES .....	39
BIBLIOGRAFÍA .....	39
ANEXOS.....	42
Anexo I: Recta de calibrado para la cuantificación de NPMs .....	42
Anexo II: Protocolo de cultivo celular .....	43
Anexo III: Imágenes del TEM.....	45





## **1.INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**

La utilización de partículas magnéticas y la aplicación de un campo electro-magnético variable como medio de generación de calor en células para el tratamiento del cáncer se remonta al menos hasta el año 1957 cuando Gilchrist [9] y colaboradores publicaron resultados de esta técnica como una forma de tratar el cáncer en los nódulos linfáticos tras la extracción de un tumor.

La llegada de la nano-tecnología y el desarrollo de ferro-fluidos inspiraron a investigadores a utilizarlos como portadores. Las nano-partículas depositadas en el tejido canceroso pueden ser activadas mediante un campo magnético alterno para calentar selectivamente tejidos tumorales sin dañar los tejidos sanos de alrededor, dando lugar a lo que hoy se conoce como Hipertermia magnética (HM).

### **1.1 Nanopartículas magnéticas**

Se denomina comúnmente nanopartícula (NP) a una partícula cuyo tamaño está comprendido en el rango entre 1 y 100 nm. Actualmente las nanopartículas, son objeto de intensa investigación tecnológica y científica, debido a la amplia variedad de aplicaciones potenciales en diversos campos. En partículas nanométricas el número de átomos puede oscilar entre  $10^3$ - $10^4$ y, debido a la alta razón de superficie/volumen un alto porcentaje de ellos se encuentran situados en la superficie de las partículas. Esto hace que las propiedades físicas de estas partículas puedan ser muy diferentes de las que se observan en un sólido macroscópico con la misma composición química.

Se están utilizando técnicas experimentales que permiten fabricar, caracterizar y manipular materiales a escala nanométrica. La combinación de nuevas propiedades físicas detectadas en diferentes tipos de NPs nos aporta muchas posibilidades en el futuro. El hecho de que puedan fabricarse con un tamaño homogéneo que va desde unos pocos nanómetros hasta decenas, hace que la dimensión sea semejante a una entidad biológica como una célula, lo cual permite su interacción y les aporta un gran potencial para aplicaciones biomédicas. (Figura 1.1) [7]

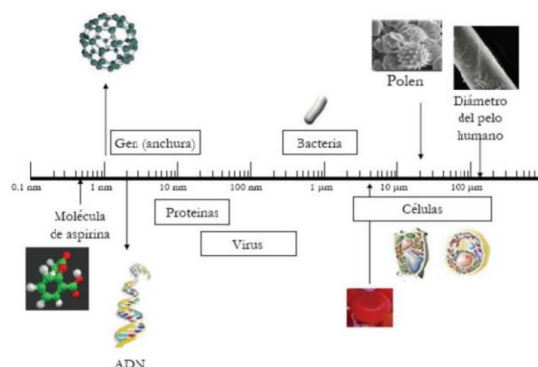


Figura [1.1]: Esquema donde se puede observar el tamaño de las nanopartículas en comparación con otras entidades biológicas.[10]

Entre los nanomateriales más utilizados en biomedicina, se encuentran las nanopartículas magnéticas (NPMs) las cuales pueden ser manipuladas bajo la influencia de un campo magnético externo. Están formadas por átomos magnéticos, tales como el hierro, cobalto y sus óxidos.[10] Las NPMs son muy activas químicamente y se oxidan fácilmente con el aire, produciéndose usualmente una pérdida de ferromagnetismo y de su capacidad de dispersarse. Para mejorar su dispersión y estabilidad coloidal las NPs se suelen recubrir con un componente conocido como surfactante. Este surfactante puede ser un polímero que influye en la forma, tamaño y estructura de las nanopartículas, además de prevenir la aglomeración por repulsiones estáticas, posibilita su biocompatibilidad y las protege y estabiliza químicamente. Cuando las nanopartículas magnéticas se dispersan en un líquido se forma un ferrofluido.

La utilización de NPMs puede tener una verdadera importancia en fenómenos como la hipertermia y el transporte selectivo de fármacos, ambos de prometedor futuro en la terapia oncológica. Estos procesos están basados en la endocitosis celular mediante la cual la célula capta e introduce en su interior a las NPMs.

## 1.2 Comportamiento magnético de las NPs

El magnetismo es una propiedad de la materia que surge como consecuencia de la existencia de partículas con masa y carga (electrones), que cuando giran, generan un dipolo magnético.

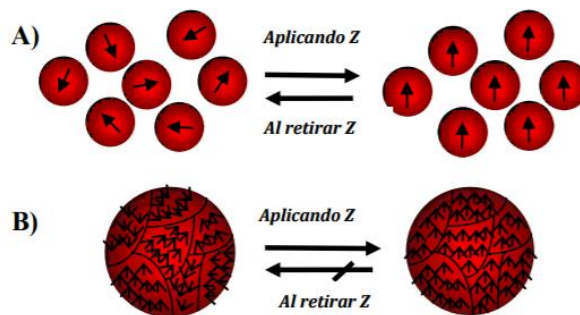
Los electrones girando en torno al núcleo son equivalentes a corrientes circulares o elípticas dentro de las moléculas que generan sus propios campos magnéticos. En función de las características electrónicas de un átomo se producen los diferentes

comportamientos magnéticos de un material: diamagnetismo, paramagnetismo, ferromagnetismo, ferrimagnetismo y antiferromagnetismo.

Debido a la presencia de interacciones entre los momentos individuales, algunos materiales presentan orden magnético a largo alcance por debajo de una cierta temperatura crítica. Si la naturaleza de la interacción es tal que los momentos individuales ordenados se suman unos a otros para dar lugar a un momento macroscópico no nulo, incluso en ausencia de campo magnético aplicado, se dice que el material es ferromagnético.

A pesar de la existencia de una imanación espontánea local, un bloque de una sustancia ferromagnética se encuentra normalmente en un estado desimanado. La razón de esto es que el interior del bloque se divide en dominios magnéticos, cada uno de ellos imanados espontáneamente a lo largo de direcciones diferentes. De esta manera, la imanación total puede ser nula, de forma que se minimiza la energía magnetostática del sistema. Cuando se aplica un campo externo, la imanación macroscópica del bloque del material cambia, tal y como muestra la figura 1.2 B). Cuando el campo aplicado es lo suficientemente intenso, se alcanza la imanación de saturación  $M_s$ , en este momento todos los momentos magnéticos se encuentran orientados en la dirección del campo aplicado.[23]

A medida que el material ferromagnético se va haciendo más pequeño el seccionamiento por dominios requiere más energía de tal forma que por debajo de cierto tamaño crítico ya no es factible la creación de dominios y se tienen entonces partículas monodominio (ver figura 1.2 A))



Figura[1.2]: a) momento macroscópico que tiene un material ferromagnético con y sin la aplicación de campo magnético. b) dominios magnéticos de un bloque de material.[23]

Una partícula de único monodominio se encuentra en un estado de magnetización uniforme en cualquier campo. Este comportamiento es similar al del paramagnetismo atómico solo que en las NPMs con monodominios es mucho más grande. Además, para tamaños suficientemente pequeños una partícula ferromagnética monodominio presenta efectos de histéresis en presencia de un campo magnético, lo que se conoce como

superparamagnetismo. Que una NPM se encuentre en el estado superparamagnético depende de factores tales como la temperatura y el tiempo de medida. En ausencia de campo magnético aplicado, las NP superparamagnéticas en una muestra poseen su momento magnético orientado aleatoriamente, por lo cual no presentan ni remanencia magnética ni campo coercitivo.

### 1.3 Hipertermia magnética

El término hipertermia deriva del griego “hiper” (más allá, por encima, arriba o exceso), y “termos” (calor), el cual se refiere a un aumento en la temperatura del cuerpo humano inducido de manera artificial, ya sea de manera interna o externa, localizada o sistémica. [8]

En medicina se usa la hipertermia como un procedimiento terapéutico que se basa en el aumento de la temperatura de una región del cuerpo, afectada por un proceso maligno, con el fin de eliminar dicho proceso.

Hasta ahora, la hipertermia ha sido usada en tumores superficiales, como un tratamiento complementario dentro de la Oncología, pero cada vez existen más investigaciones y publicaciones que sitúan a la hipertermia en un papel más importante. Se ha descrito el uso de la hipertermia en el tratamiento de tumores cerebrales, prostáticos, pélvicos, cáncer de mama, carcinomas escamosos de cabeza y cuello, etc.

Esta técnica se basa en la introducción de la nanopartículas magnéticas en el interior de una célula cancerosa y al aplicar un campo magnético alterno se provoca un calentamiento local de esas células (41-45 °C) produciéndose la muerte celular. La explicación a este fenómeno es que un campo magnético variable permite que los dominios dentro del núcleo de las NPs se alternen, generando una reacción exotérmica.[15]

La ventaja del empleo de la hipertermia para eliminar células cancerosas se debe a que son más susceptibles a las altas temperaturas que las células o tejidos sanos. Por ello, con el empleo de la hipertermia se podrían reducir los tumores sin provocar lesiones en los tejidos sanos circundantes. La ventaja que presenta la hipertermia magnética frente a la hipertermia sistémica, es el calentamiento localizado producido por las nanopartículas magnéticas, previniendo los efectos no deseados en el organismo al aumentar la temperatura global del cuerpo. Los mecanismos moleculares por los que actúa la hipertermia no se conocen con exactitud, aunque se han determinado algunos de los cambios celulares que se producen tras este shock térmico. Estos cambios incluyen variaciones en la membrana celular, metabolismo, núcleo y estructuras del citoesqueleto, síntesis de macromoléculas, expresión de genes de shock térmico y transducción

intracelular de señales.[14] Sin embargo, se cree que la desnaturalización proteica y los daños en la membrana son los principales responsables del efecto de la hipertermia ya que las proteínas comienzan a desnaturalizarse a temperaturas superiores a 40° C.

Cuando un sistema de nanopartículas magnéticas se somete a un campo magnético oscilante, estas absorben energía que luego transforman en calor. Eso sucede principalmente por dos procesos, histéresis y relajación. El proceso de relajación será diferente en función del tamaño de la partícula, la anisotropía, el volumen hidrodinámico y la viscosidad del medio. Los momentos magnéticos de partículas monodominio en el rango nanométrico pueden reorientarse de dos formas: mediante relajación de Néel o bien mediante relajación de Brown.(Figura 1.3)

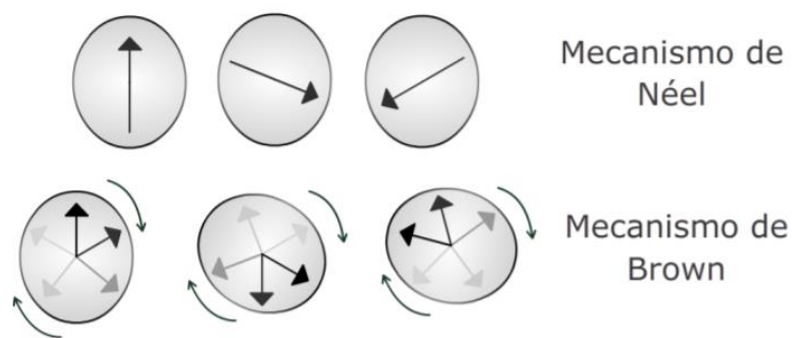


Figura1.3: Esquema del mecanismo de relajación de Néel y de Brown.[23]

En la relajación de Néel se presenta una rotación del vector de momento magnético sin que haya una rotación mecánica de la misma mientras que en la relajación de Brown la partícula rota manteniendo su momento magnético en la misma dirección con respecto a ella. Para partículas pequeñas el mecanismo dominante se debe a la relajación de Néel mientras que para partículas grandes la relajación de Brown se explica por rotación de la partícula dentro del líquido transportador.[15],[6],[23].

El tiempo de relajación de Néel viene dado por:

$$\tau_N = \tau_0 e^{\frac{K_a V}{k_B T}} \quad \text{Ecuación 1.1}$$

Y el tiempo de relajación de Brown por:

$$\tau_B = \frac{3\eta V_H}{k_B T} \quad \text{Ecuación 1.2}$$

El tiempo total de relajación es:

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_N} + \frac{1}{\tau_B} \quad \text{Ecuación 1.3}$$

Donde  $\eta$  es la viscosidad del líquido transportador,  $V_H$  el volumen hidrodinámico,  $K_a$  la constante de anisotropía por unidad de volumen,  $V$  el volumen de la partícula,  $T$  la temperatura,  $\tau_0 = 10^{-9}$  s y  $k_B$  la constante de Boltzmann.

La capacidad de calentamiento de un coloide magnético puede describirse con la potencia específica absorbida (SPA, por sus siglas en inglés “Specific Power Absorption”), a un campo magnético y frecuencia determinada. La energía absorbida se libera después al medio por diferentes procesos que dependen de las características de las partículas y de la intensidad del campo aplicado, en forma de calor.

El SPA da un valor numérico para comparar el potencial de calentamiento de diferentes partículas bajo diferentes condiciones, y puede determinarse experimentalmente mediante la ecuación 1.4:[3]

$$SPA = \frac{m_l \cdot C_l}{m_{NP}} \cdot \left( \frac{\Delta T}{\Delta t} \right) \quad \text{Ecuación 1.4}$$

Donde  $C$  es el calor específico del agua (4,18 J/g.K) y  $\Delta T/\Delta t$  la máxima pendiente de la curva de temperatura frente al tiempo de calentamiento.

El modelo teórico del SPA es de alta complejidad y tras un desarrollo matemático viene dado por:[18]

$$SPA = \mu_0 f H_0^2 \chi_0 \frac{2\pi f \tau}{(2\pi f \tau)^2 + 1} \quad \text{Ecuación 1.5}$$

Donde  $\tau$  es el tiempo de relajación total o efectivo dado por la ecuación 1.3. Como se observa en la ecuación 1.5, el SPA depende del tiempo de relajación, pero no de forma lineal. Su dependencia es compleja, por lo que la comunidad científica pretende dar una solución matemática que permita la optimización de las nanopartículas como agentes de calentamiento. Es importante mencionar que la ecuación 1.5 contiene los parámetros de la muestra tales como anisotropía magnética, volumen de las NPMs, viscosidad del medio, y temperatura, dentro del parámetro  $\tau$  definido en las ecuaciones 1.1 y 1.2. Esta dependencia funcional es compleja, y no existe actualmente solución analítica, por lo que la aproximación a este problema es mediante simulaciones numéricas. De esa forma se puede estudiar la dependencia funcional del SPA con los tiempos de relajación de Néel y Brown, que a su vez dependen críticamente de los parámetros de la muestra como se dijo antes. Puesto que este tipo de análisis numérico excede los objetivos del presente trabajo, nos hemos restringido al *análisis cualitativo de los resultados experimentales*.

## 1.4 Cultivo celular

Se entiende por cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células '*in vitro*', manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas.[12] Esta técnica se considera imprescindible para la investigación científica, ya que permite estudiar toda la biología y bioquímica celular además de las interrelaciones celulares. El cultivo celular tiene numerosas aplicaciones en sectores como parasitología, bacteriología, virología, desarrollo de fármacos, nuevas técnicas diagnósticas para patógenos, siendo actualmente imprescindible en el estudio oncológico.

En este proyecto se va a utilizar como modelo celular la línea BV2, que proviene de células de microglía del sistema nervioso. Las células de la microglía son los macrófagos del cerebro que sirven al sistema inmunitario en el cerebro, evitando o reparando los daños en el tejido nervioso. Cuando se produce algún daño o acontece una infección bacteriana o vírica, la microglía se activa, lucha con insistencia y pide ayuda a otras células inmunitarias y cuando no está activada vigila de manera constante el tejido cerebral, solventando las pequeñas lesiones. Se ha seleccionado esta línea celular por dos razones, en primer lugar porque ya se había trabajado con ellas anteriormente en el laboratorio y se conoce su fisiología. Además presenta un interés biológico por su relación con el glioblastoma, el tumor más común y maligno entre las neoplasias de las células del tejido nervioso.

En el presente proyecto utilizaremos el cultivo celular primario a partir del cual las células son capaces de proliferar y la población celular crece notablemente. Cuando las células ocupan toda la superficie disponible se dice que han alcanzado la confluencia. En esta etapa, las células establecen contactos entre ellas que inhiben su proliferación y el crecimiento se detiene. Por eso, al cabo de un tiempo hay que trasplantar las células a un nuevo soporte de cultivo. Esta operación se denomina pase y una sucesión de pases de un cultivo genera las llamadas líneas celulares. Para lograr la expansión y crecimiento de las líneas, será necesario elegir un medio de cultivo para el crecimiento de las células. Los medios son una compleja mezcla de componentes que consta de cuatro elementos: Sustrato de cultivo, condiciones fisiológicas del medio, condiciones físico químicas y fase gaseosa. [11]



## 1.5 Avances clínicos y problemas a investigar

El principal interés de la hipertermia reside en su potencial aplicación combinado con terapias convencionales antitumorales. Maier-Hauff, K. y cols. llevaron a cabo un estudio de Fase II en el que se ensayó en 66 pacientes con Glioblastoma uniforme recurrente. A los pacientes se les inyectó el fluido acuoso con las MNPs en el cerebro mediante un catéter. Las nanopartículas de hierro utilizadas tenían un tamaño de 12 nm y estaban recubiertas con una capa de aminosilano para mantener su estabilidad, además, estas no fueron tóxicas ni se produjeron ningún efecto secundario. A los pacientes se les trató antes o después de la hipertermia con radioterapia y el ensayo determinó un aumento en la supervivencia desde el diagnóstico.[19]

También se ha llevado a cabo un estudio clínico en fase I para investigar la termoterapia en diez pacientes con cáncer de próstata localizado y recidiva local. La toxicidad relacionada con el tratamiento fue moderada y la calidad de vida afectó solo temporalmente, aunque las NPM persistieron en el sistema hasta un año después del tratamiento.[20]

Los resultados de hipertermia magnética en terapias oncológicas son esperanzadores pero se sigue investigando esta técnica con propósito de ir resolviendo algunos problemas a los que nos enfrentamos a la hora de una aplicación *in vivo*:

a) Implantación de las partículas en el área tumoral: Además de la biocompatibilidad de las nanopartículas nos enfrentamos a otro problema de igual importancia, la inyección de las nanopartículas en el torrente sanguíneo y su guiado hasta el tumor sin que nuestro organismo las elimine. Las nanopartículas, una vez inyectadas son recubiertas por proteínas del plasma, este proceso hace que los fagocitos las eliminen por lo que se están estudiando recubrimientos para las NPs con el objetivo de ralentizar el proceso.[7]

b) Confinamiento de las partículas en el área tumoral: las partículas deben estar confinadas en el tumor para que el tratamiento por hipertermia sea eficaz.[7]

c) Generación y control de la temperatura: Los efectos que se han observado, son tanto menores cuanto menor es el tamaño de las partículas. Sin embargo la reducción de tamaño conlleva un aumento del volumen de material inyectado, así como de la intensidad y

frecuencia del campo magnético alterno utilizado, para generar la misma potencia calorífica.[7]

En este trabajo se muestra el estudio de inducir a las NPMs a formar cadenas lineales intracelulares sometiéndolas a un campo magnético estático externo con el fin de comprobar si con esta disposición se aumenta la eficacia de calentamiento con una concentración menor de NPS de cara a una posible investigación y aplicación futura en terapias oncológicas.

## **2. METODOLOGIA Y RESULTADOS**

### **2.1 Síntesis de Nanopartículas**

Las nanopartículas de  $MnFe_2O_4$  se prepararon mediante el método de hidrólisis oxidativa modificada para introducir un polímero en el proceso de síntesis y obtener las nanopartículas funcionalizadas “in situ” con un biopolímero. Este proceso de síntesis consiste en mezclar una disolución de NaOH en 135 mL de agua milli-Q (disolución A) con una solución de cloruro férrico ( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ) o cloruro ferroso ( $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ ) y cloruro de manganeso  $MnCl_2$  (disolución B). La disolución B consta además de polímero polietilenimina (PEI) y ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ); que será el precursor. La primera disolución se prepara en un matraz de tres cuellos con un agitador mecánico y se calienta a una determinada temperatura. Cuando esta es alcanzada se procede a añadir la disolución B gota a gota. Es necesario mantener un flujo de  $N_2$  burbujeando en la disolución total para que la magnetita no se oxide y un refrigerador para evitar la evaporación en la disolución y mantener la temperatura. Se deja reaccionar un tiempo determinado y se enfría con un baño de hielo.

Una vez que la disolución ha alcanzado la temperatura ambiente se procede a tres lavados con agua milli-Q para disminuir el pH básico a neutro. Las nanopartículas se decantan magnéticamente en el fondo del matraz, el cual está sobre un imán, para favorecer la precipitación de las nanopartículas.

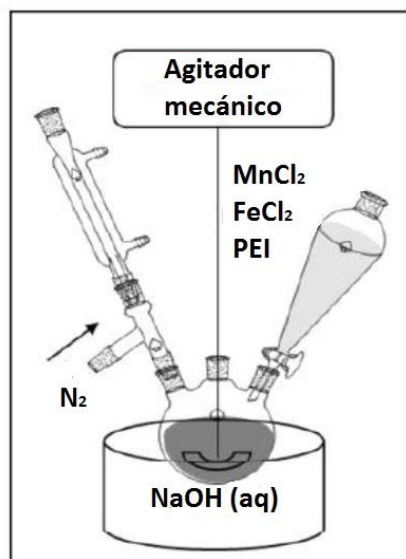


Figura 2.1: Esquema de montaje de síntesis de NPMs

Para la realización de este trabajo se han cambiado las condiciones y concentraciones de cada muestra para encontrar el tamaño y dispersión óptimos para su aplicación en hipertermia magnética (HM). Las muestras obtenidas se han caracterizado y posteriormente se ha seleccionado la muestra más eficiente. Se han realizado 4 síntesis (L1, L2, L3 y L4). Los parámetros de cada una de ellas se recogen en la tabla [2.1]

Tabla 2.1: Valores y condiciones para la síntesis de cada muestra.

	DISOLUCIÓN 1		DISOLUCIÓN 2				CONDICIONES		
	NaOH (g)	KNO <sub>3</sub> (g)	FeCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O (g)	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O (g)	PEI (g)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (μL)	Velocidad (rpm)	Tiempo (h)	T <sup>a</sup> (°C)
L1	0,48	1,365	0,15	0,072	0,22	8,3	100	24	90
L2	0,2	-	0,2	0,1	0,15	8,3	300	3	90
			FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O (g)						
L3	4,8	-	0,82	0,29	0,125	8,3	300	0,5	100
L4	4,2	-	0,82	0,29	0,31	8,3	300	3	100

## 2.2 Caracterización

### 2.2.1 TEM

El microscopio electrónico de transmisión (TEM) es un instrumento que se basa en la difracción de electrones acelerados con energías de 80-300 KeV cuando atraviesan muestras adecuadamente acondicionadas para tal fin. Cuando los electrones colisionan

con la muestra parte de ellos son dispersados selectivamente. Todos ellos son conducidos y modulados por unas lentes para formar una imagen final. El TEM se utiliza para analizar las propiedades cristalinas de las nanopartículas sintetizadas permitiendo medir el tamaño medio del núcleo magnético, la distribución y la morfología. El microscopio utilizado es un microscopio electrónico de transmisión T20 (FEI tecnai) trabajando a 200 KeV.

Se han caracterizado las NPMs en relación a la distribución de tamaños obtenida en cada síntesis. Las muestras quedan descritas por dos parámetros: el tamaño medio  $\langle d \rangle$  y la polidispersión ( $\sigma$ ). La longitud y el ancho de las nanopartículas y sus correspondientes porcentajes de polidispersividad se determinaron mediante tratamiento estadístico en una población de 100 partículas y se realizó un ajuste mediante una distribución gaussiana. La imagen del TEM da información sobre la estructura y tamaño de la muestra.

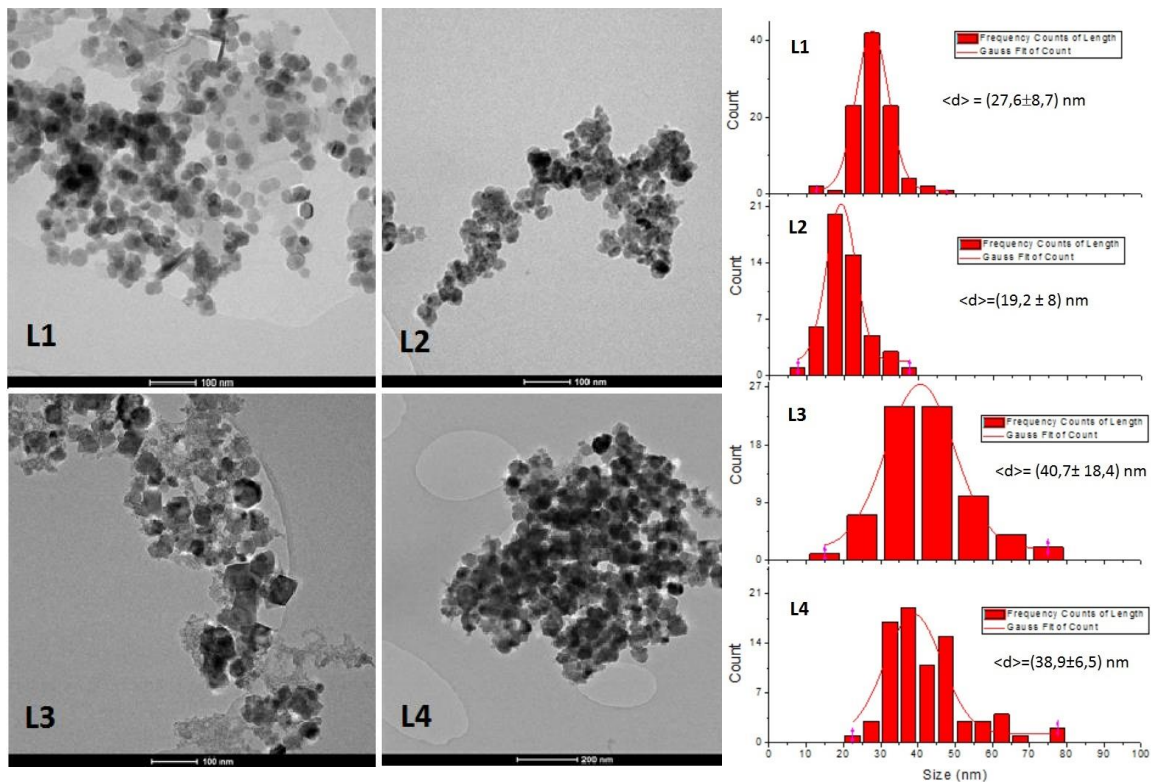


Figura [2.2]A la izquierda, cuatro imágenes hechas con el TEM, una de cada muestra donde se observa la forma y tamaño de las nanopartículas. A la derecha, los histogramas de tamaño de nanopartículas de cada muestra.

Para el caso de las NPs L1 se observa una morfología esférica y regular con un tamaño medio de 27,6 nm y una polidispersidad de 8,7 (tabla 2.2). En el caso de L2 y L3 también se observa una morfología esférica pero más irregular como tamaños medios de 19,2 y 38,9

nm respectivamente. Cabe destacar el grado de aglomeración en estas muestras debido al magnetismo presente de las NPMs.

Por otra parte se observa en la figura 2.2 que la morfología de L3 es poco esférica y muy irregular con una alta polidispersidad. La morfología cuadrada nos indica que hay una cristalización de las NPs. Se pueden diferenciar unas NPMs de un tamaño medio de 40,7 nm y una masa entre estas que puede ser una segunda población NPMs más pequeñas.

Tabla 2.2: Tamaño medio y polidispersidad de cada una de las muestras.

Muestra	<d> (nm)	Polidispersidad (nm)
L1	27,6	8,7
L2	19,2	8
L3	40,7	18,4
L4	38,9	6,5

En el Anexo III se adjuntan más imágenes hechas con el TEM.

### 2.2.2 Concentración del coloide: espectrofotometría UV-Vis

El espectrofotómetro es un instrumento que permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto, y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia.

La ferrita de manganeso ( $MnFe_2O_4$ ) está compuesta por dos iones Fe (III) por cada fórmula unidad que participan en una reacción de complejación con el ion  $[SCN^-]$  y cuyo producto posee una banda de absorción en el espectro visible utilizada para la cuantificación del material. En este procedimiento se procede a la digestión del hierro mediante la adición de ácido clorhídrico HCl y ácido nítrico  $HNO_3$  y se espera hasta conseguir un color amarillo.

A la muestra se le añade el tiocianato de potasio, produciéndose la siguiente reacción química:



El ión tiocianato así formado tiene un pico de absorción a una longitud de onda  $\lambda=480$  nm, por lo que se procede a medir la absorbancia en esa longitud de onda de unas disoluciones patrón y mediante una curva de calibración (que se muestra en el Anexo I) se calcula la concentración de hierro según la ecuación:

$$A = 200,5 \cdot [Fe^{3+}] \quad \text{Ecuación 2.2}$$

Tabla 2.3: Concentraciones de ferrita de manganeso obtenidas a partir de la recta de calibración.

	A	[MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ] (mg/ml)
<b>L1</b>	0,49	2,52
<b>L2</b>	0,42	2,16
<b>L3</b>	0,70	7,21
<b>L4</b>	0,31	1,60

Conocer la concentración del coloide permite conocer la masa de nanopartículas que tenemos así como determinar el SPA.

### 2.2.3 Potencia específica absorbida (SPA)

La eficiencia de las NPMs para el calentamiento se mide a través de la absorción específica de potencia (SPA) en un campo magnético alterno que a su vez determina su potencial para usarlas en hipertermia magnética. Los valores de SPA se determinaron utilizando un aplicador comercial (nB nanoScale Biomagnetics S.L.) de campo magnético que genera intensidades de campo  $H_0$   $3,98 \leq H_0 \leq 23,87$  kA/m a frecuencias desde 260 a 832 kHz. Las medidas de calorimetría se realizaron dentro de un Dewar aislado térmicamente mediante una doble pared en la que se realiza un vacío ( $10^{-7}$ mbar) y posicionando 1 ml de la muestra con concentración conocida en el centro del campo  $H_0$ . Se mide la tasa de calentamiento de los coloides colocando una fibra óptica en el centro del vial que contiene la muestra y que registra el aumento de temperatura ( $\Delta T$ ) inducido por la aplicación de un campo magnético alterno. El SPA viene determinado por la ecuación 1.4. [3] Todos los experimentos se realizaron después de un tiempo de espera de 60-120s con el campo magnético apagado, para permitir la termalización de las muestras. Se realizan tres mediciones de cada una de las muestras (figura 2.3) a unas condiciones de 570 kHz y 300 Gauss. La representación de los datos se hace restando la temperatura de referencia hasta la termalización, por tanto se está representando *el incremento* de temperatura el lugar de la temperatura absoluta de la muestra.

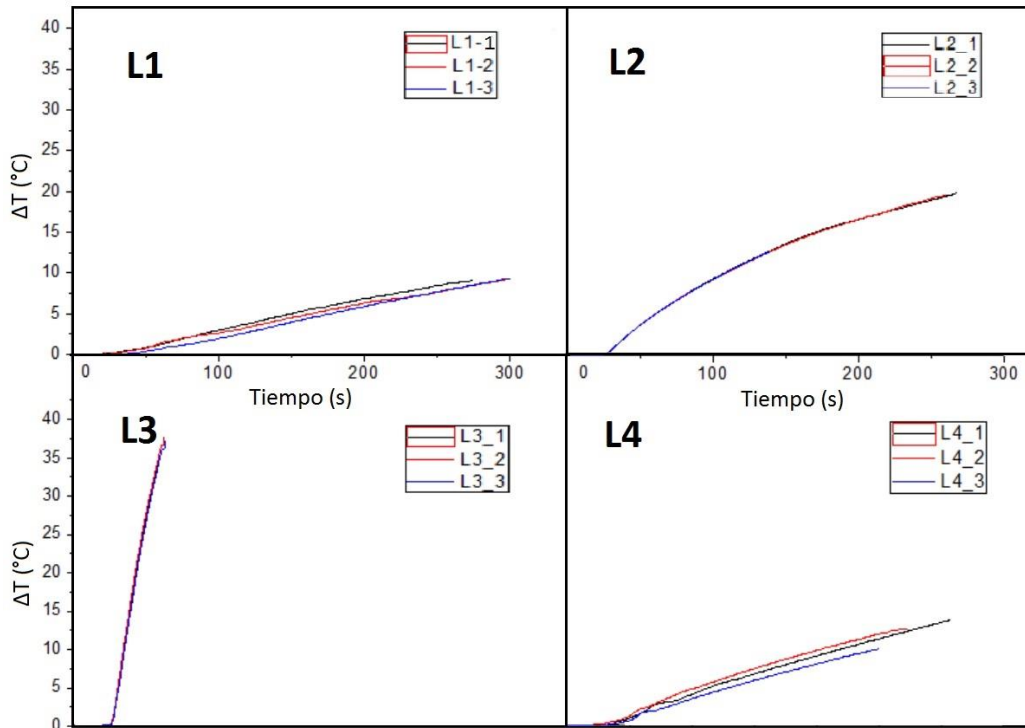


Figura [2.3]: Representación de la variación de temperatura de cada muestra en el tiempo al aplicar un campo magnético. Experimento de hipertermia para L1, L2, L3 y L4.

En los casos L1 y L4 se observa una baja eficiencia en el calentamiento mientras que L3 es la muestra que más calienta con una clara diferencia al resto. También es la muestra que mayor concentración de NPMs tiene por lo que el parámetro que nos interesa comparar es el SPA. Dado que las 4 muestras están medidas en agua ( $\eta=1$  mPa/s) tendremos que tener en cuenta la relajación de Néel y de Brown, esta última dependiente del radio hidrodinámico, medido experimentalmente para cada una de las muestras y que se explicará más adelante.

Para calcular la pendiente máxima tomamos los datos de los primeros 30 segundos en los que la muestra ha empezado a calentar y se realiza una regresión lineal. Los datos de estas pendientes así como el cálculo de la potencia específica absorbida (SPA) dada por la ecuación 1.4 se encuentran en la tabla 2.4.

Tabla 2.4: Valores de SPA y datos necesarios para su cálculo.

	[MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ] (mg/ml)	$\Delta T/\Delta t$ (°C/s)	SPA (W/g)
L1	2,52	0,0267±0,0003	44,25±0,5
L2	2,16	0,1509±0,0005	291,2±1
L3	7,21	1,1331±0,006	655,2±4
L4	1,60	0,0554±0,0006	145,0±2

Tal y como se esperaba tras analizar las curvas del experimento (figura 2.3), la muestra con mayor potencia de absorción específica resultó ser la muestra denominada L3, con más del doble de SPA (W/g) que las demás muestras. El análisis de los motivos de estas variaciones de SPA en muestras relativamente similares queda fuera del alcance de este trabajo, pero como comentamos en la introducción, los mecanismos físicos de la absorción de potencia en NPMs no están completamente consensuados, aunque se sabe que los valores de SPA dependen fuertemente de pequeñas variaciones en el tamaño medio de las NPMs, el grado de polidispersión en la distribución de tamaños, así como del radio hidrodinámico en la suspensión coloidal. Asimismo, como se verá más abajo, estos valores de SPA pueden cambiar radicalmente en la experimentación *in vitro*.

#### 2.2.4 Ciclo de histéresis

La caracterización de las muestras se lleva a cabo mediante un magnetómetro de muestra vibrante (Lake Shore 7400 Series VSM). Su funcionamiento consiste en la oscilación de una muestra magnética en la cercanía de una configuración de bobinas. De acuerdo a la ley de inducción magnética de Faraday, se inducirá un voltaje en las bobinas y estas crearan un campo magnético continuo (H) proporcional a la magnetización de la muestra. La oscilación perpendicular de la muestra hará que se generen unas variaciones de flujo magnético, a partir de las cuales se obtiene el ciclo de histéresis. [4] Las curvas de histéresis obtenidas proporcionan información acerca de la respuesta magnética del material al estar en contacto con un campo magnético. La magnetización de saturación (Ms) fue medida a temperatura ambiente hasta H=2 T. Los coloides magnéticos se secan antes de la medida y se depositan en contenedores de policarbonato. Se utiliza un trozo de algodón (material diamagnético) para presionar el polvo y minimizar el error debido al movimiento producido por la vibración.



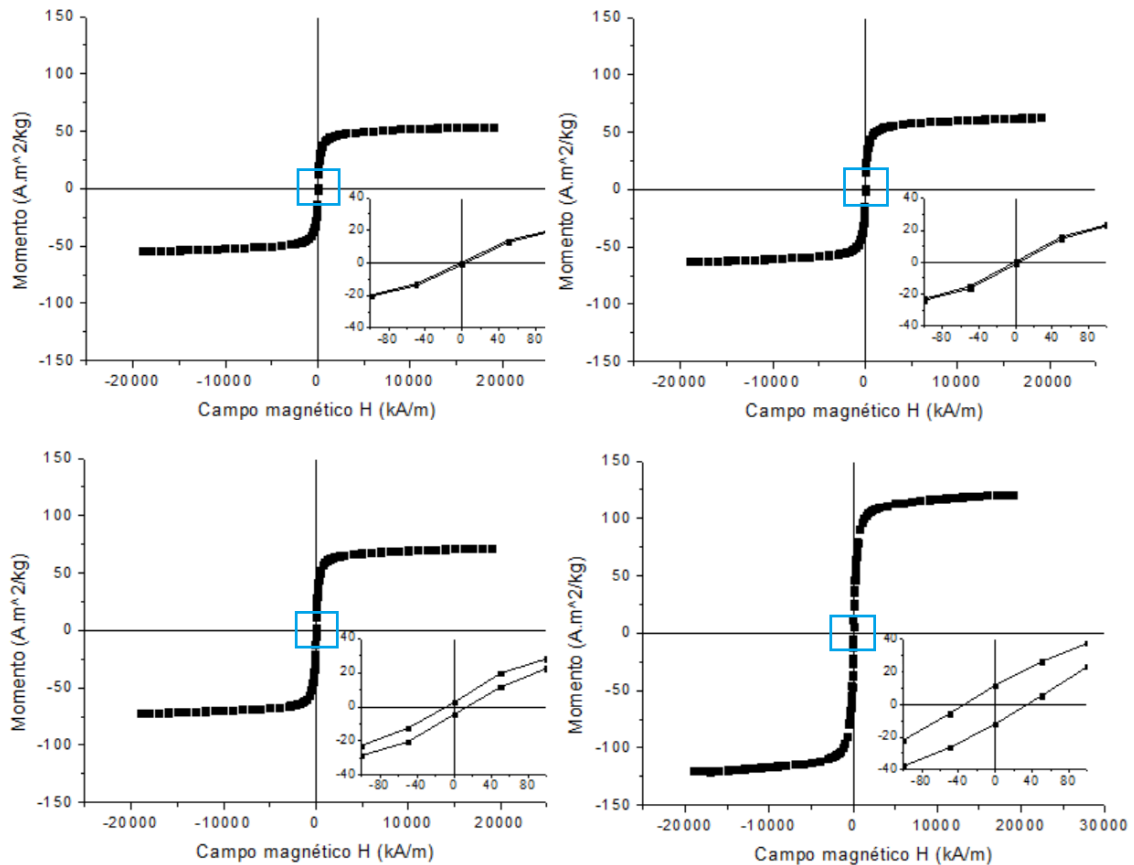


Figura [2.4]: Curvas de magnetización frente a campo aplicado registradas a temperatura ambiente. Se muestra una ampliación a bajo campo que indica la ausencia de remanencia (relajación superparamagnética).

En la figura 2.4, se presenta las medidas de magnetización frente a campo aplicado obtenidas mediante un magnetómetro de muestra vibrante (VSM) a temperatura ambiente. Las curvas de magnetización de L1 y L2 presentaron un campo coercitivo nulo y ausencia de remanencia. Las muestra L3 y L4 presentaron una pequeña remanencia, esto se puede deber a que ambas tienen tamaños superiores a las anteriores y se empiezan a alejar de un comportamiento superparamagnético. Aunque el tamaño de la muestra L3 es superior al de la muestra L4, esta se acerca más a un comportamiento superparamagnético debido posiblemente a diferencias en su estructura cristalina. Así pues, en las muestras L1, L2 y L3 exhiben una relajación superparamagnética a temperatura ambiente. El ciclo de histéresis para las muestras presenta una separación estrecha entre líneas, lo cual indica que se requiere poca energía para anular la magnetización. Debido a la poca separación en el ciclo de histéresis las NPs se magnetizan y desmagnetizan con mayor facilidad, disipando calor.

### 2.2.5 EDX

La espectroscopia de energía dispersiva (EDX) proporciona información acerca de la composición química elemental de las partículas ya que cuando la muestra es irradiada con un haz de electrones se generan rayos X que pueden ser detectados. El espectro de EDX se obtiene tras recoger los fotones emitidos por la muestra durante un determinado periodo y permite identificar y cuantificar los diferentes elementos presentes en el material.

Para llevar a cabo las medias es necesario tener las muestras en polvo y para ello se toman 2 ml de NPs L1, L2, L3 y L4 y se ponen  $-80^{\circ}\text{C}$ . Después se introducen en el liofilizador para permitir que el agua congelada en las muestras se sublime directamente desde la fase sólida a la fase gaseosa, sin pasar por el estado líquido.

Se realizan 3 espectros por muestra con unas condiciones de 15 kV y 2,2 nA.

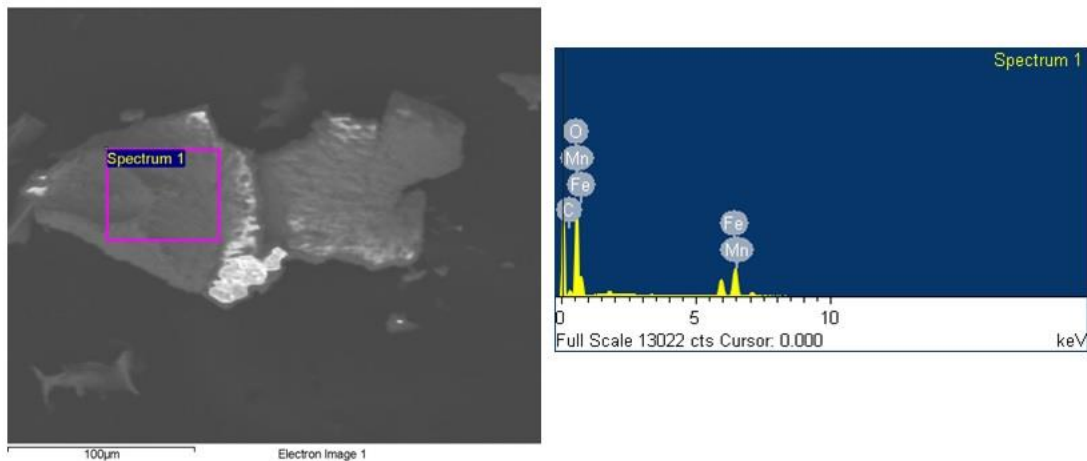


Figura [2.5]: A la izquierda la imagen que se ve en el microscopio antes de hacer el ensayo de EDX y a la derecha el espectro 1 de la muestra L1.

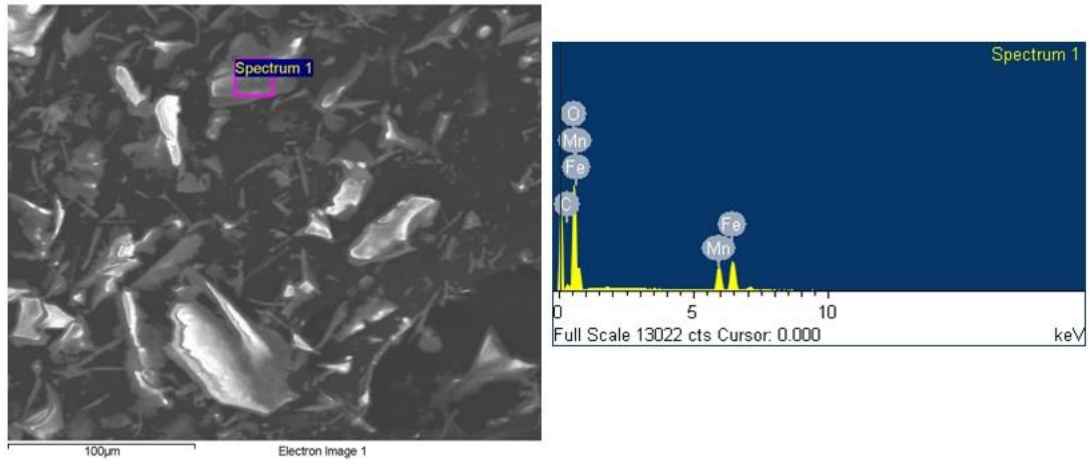


Figura [2.6]: A la izquierda la imagen que se ve en el microscopio antes de hacer el ensayo de EDX y a la derecha el espectro 1 de la muestra L2.

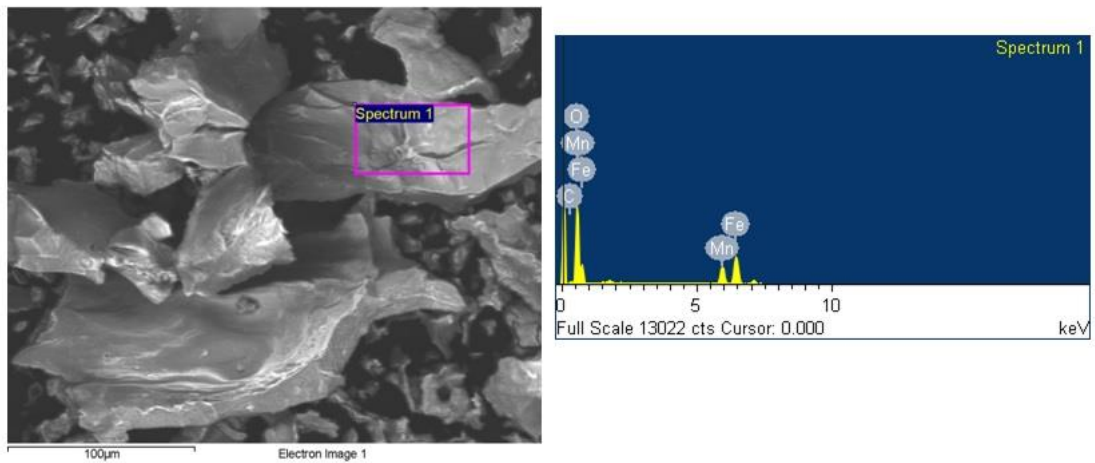


Figura [2.7]: A la izquierda la imagen que se ve en el microscopio antes de hacer el ensayo de EDX y a la derecha el espectro 1 de la muestra L3.

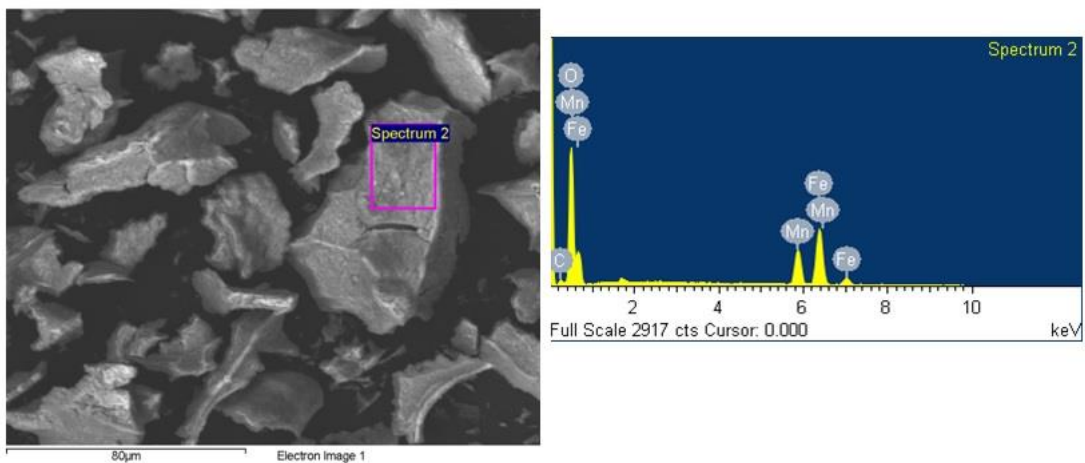


Figura [2.8]: A la izquierda la imagen que se ve en el microscopio antes de hacer el ensayo de EDX y a la derecha el espectro 1 de la muestra L4.

En la tabla 2.5 se encuentra un resumen de la proporción de manganeso y hierro que hay en cada muestra.

Tabla 2.5: porcentaje de cada elemento en las muestras y relación de la estequiometría atómica.

	Mn		Fe		R <sub>E</sub>
	% peso	% atómico	% peso	% atómico	
L1	33,46	33,82	66,54	66,18	1,96
L2	40,95	41,35	59,05	58,65	1,44
L3	34,60	34,97	65,40	65,03	1,85
L4	34,05	34,39	65,96	65,62	1,91

La relación estequiométrica experimental que más se acerca a la teórica de la ferrita de manganeso ( $MnFe_2O_4$ ) es L1 mientras que L2 es la que más se aleja. Debido a la estructura de espinela del sistema de  $MnFe_2O_4$  estos desvíos en la estequiometría pueden resultar en cambios de la magnetización de saturación de las NPMs, así como de su anisotropía magnética, ambos parámetros determinantes del SPA resultante en las nanopartículas.

### 2.2.6 Radio hidrodinámico

La dispersión dinámica de luz (DDL o DLS, por sus siglas en inglés de "Dynamic light Scattering"), espectroscopía de correlación de fotones PCS (Photon Correlation Spectroscopy) o dispersión QELS (Quasi Elastic Light scattering) es una técnica físico-química empleada para la determinación de la distribución de tamaños de partículas en suspensión. [5] El equipo utilizado es Brookhaven 90 plus (ZetasizerNano™ from Malvern Instrument) equipado con un láser de estado sólido (trabajando a una longitud de 660 nm)

Mediante la técnica DLS se miden las fluctuaciones en la intensidad de dispersión con el tiempo para determinar el coeficiente de difusión traslacional (D). La velocidad de fluctuaciones depende del tamaño de la partícula y estas fluctuaciones son resultado del movimiento browniano y puede correlacionarse con el coeficiente de difusión y el tamaño.

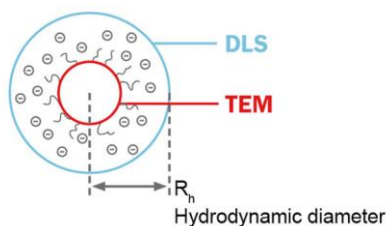


Figura 2.9: Esquema radio hidrodinámico.[22]

A continuación se recogen en la tabla 2.6 los valores del radio hidrodinámico de cada muestra así como su polidispersidad.

Tabla 2.6: Diámetro hidrodinámico de las muestras

	Diámetro (nm)	Error (nm)
L1	3354	1260
L2	786,4	196
L3	335,7	12,5
L4	4635	3353

Se observa que la muestra L3 tiene el diámetro hidrodinámico más pequeño aunque en el TEM nos indicaba que el tamaño de la NP era el más grande. Este valor de  $R_H$  coincide con los resultados aportados por el experimento de hipertermia, ya que el valor de SPA está ligado con el tiempo de relajación de Brown, y por tanto, con el volumen hidrodinámico. Además se observa que el error es el menor. Por otra parte L1 y L2 tienen un diámetro hidrodinámico muy elevado, esto coincide con el SPA que nos daba los valores más bajos.

Finalmente se recogen en la tabla 2.7 un resumen de toda la caracterización de las cuatro muestras (L1, L2, L3 y L4) para comparar y elegir con la que se llevará a cabo el experimento *in vitro*.

Tabla 2.7: Datos recogidos de la caracterización de las muestras L1, L2, L3 y L4

	Tamaño (nm)	Concentración (mgMnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> /mL)	SPA (W/g)	%Mn	%Fe	Ms (A.m <sup>2</sup> /kg)	<d <sub>DLS</sub> > (nm)
L1	27,6±8,7	2,52	44,25±0,5	33,46	66,54	54	3355 ± 1260
L2	19,2±8,0	2,16	291,2±1	40,95	59,05	62,5	786 ± 196
L3	40,7±18	7,21	655,2±4	34,6	65,4	71,4	336 ± 12,5
L4	38,9±6,5	1,60	145,0±2	34,1	65,9	120,7	4635 ± 2254

Un objetivo relevante para este trabajo es encontrar las NPMs más apropiadas para ser usadas como agentes de calentamiento *in vitro*, por los que se han seleccionado las partículas que tienen un mayor SPA al aplicar un campo magnético alterno, que corresponde a la muestra identificada como L3. Como se verá más abajo, la citotoxicidad de las muestras ha sido otro de los parámetros relevantes a considerar en esta selección.

## 2.3 Experimentos *In vitro*

### 2.3.1 Cultivo células BV2 (microglia)

Los experimentos *in vitro* realizados en este trabajo se llevaron a cabo en la sala de cultivos celulares del Grupo de Hipertermia Magnética del Instituto de Nanociencia de Aragón (INA). El experimento se llevó a cabo con células BV2, que son células comerciales procedentes de la microglia (tejido cerebral) de ratón (*Mus musculus*) provenientes de la ATCC. El crecimiento de las líneas celulares se lleva a cabo en medio de cultivo, que pretende recrear con exactitud las condiciones fisiológicas que las células necesitan para crecer y desarrollarse. En este caso se utiliza Dubelco's Modified Eagle's Medium (DMEM). Este medio se compone de glucosa, aminoácidos, vitaminas y factores de crecimiento. Además se suplementa con suero fetal bovino (SFB) al 10%v, glutamina y antibiótico. Estas condiciones garantizan que las células realizarán un crecimiento adherente, lo que conllevará que las células se fijen a la parte inferior de un bote de cultivo celular, T25 (25 cm<sup>3</sup>) en nuestro caso, para expandirse. Otros aspectos a controlar son los físico-químicos, como mantener el pH entre 7 y 7,7 y que se desarrollen a temperaturas sobre los 36-37 °C por lo que permanecen en la estufa de CO<sub>2</sub> cuando no se manipulen. Estas estufas mantienen la temperatura, la humedad, y el contenido de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y de oxígeno (O<sub>2</sub>) en su atmosfera interior.

Debido a la posible aparición de contaminación se debe ser estrictos en algunas pautas como el correcto mantenimiento de la asepsia a la hora de la manipulación, la limpieza de los equipos que vayan a utilizarse, la esterilización de la instrumentación necesaria así como el suplemento de agentes antibióticos en el medio. Se explica con detenimiento el protocolo en el Anexo II.

Para comprobar que el desarrollo del cultivo celular ha sido el adecuado así como para saber la viabilidad de las células cuando se trabaje con las NPMs, se realiza un proceso de tripsinización (ver Anexo II) para desprender las células del T25. La viabilidad celular y la toxicidad de las NMPs se cuantifican mediante el método de exclusión por azul de tripán (AT) mediante el cual se diferencian las células vivas y muertas. Las células se tiñen con AT en proporción 1:1 en volumen (células:AT). Se realiza su contaje a través del microscopio óptico invertido (Nikon Eclipse 2000) en una cámara de Neubauer. Esta prueba utiliza el colorante señalado para determinar el número de células presentes en suspensión, basado en el principio de exclusión ya que las células vivas poseerán una membrana celular intacta que no permitirá a los colorantes teñir las células, mientras que

si podrá teñir las células con la membrana dañada, como las células con las células muertas. Si el porcentaje de células teñidas es alto, se considerará el cultivo inviable.

### 2.3.2 Toxicidad e incorporación de NPMs

Antes de hacer experimentos de hipertermia con nanopartículas en células, es necesario conocer la toxicidad de estas NPMs para ver si es viable el experimento de cara a una aplicación médica.

De acuerdo al protocolo de exclusión de AT (Anexo II) se hace un conteo de las células que tenemos en nuestro T25. Se toman 20  $\mu$ l de la dilución del pellet en 6 ml de DMEM y 20  $\mu$ l de AT que se mezcla bien y se llevan a la cámara de Neubauer. Bajo el microscopio óptico se realiza un conteo de células en cada una de las cuatro hemicámaras y se calcula la media. La ecuación para calcular la densidad celular (cel/mL) es:

Como ejemplo:

$$64,5 \text{ cel} \times 2 \cdot 10^4 = 1.290.000 \text{ cel/ml}$$

Como hemos diluido en 6 ml de medio:

$$1.290.000 \frac{\text{cel}}{\text{ml}} \times 6 \text{ ml} = 7.740.000 \text{ cel}$$

Para hacer los experimentos de viabilidad y de internalización de NPMs en células se procede a tomar dos placas de 6 pocillos cada una. Serán necesarios 9 pocillos con aproximadamente 300.000 células cada uno. Se dejan adherir durante 24 horas. Al día siguiente los tres primeros se dejarán sin NPMs y lo utilizaremos como control, los tres siguientes servirán para medir la toxicidad de las NPMs en las células y los 3 últimos para determinar la concentración de NPMs internalizadas. (Se utilizan 3 pocillos para cada experimento con intención de disminuir los errores). (ver figura 2.10).

Una vez preparados los 6 pocillos agregamos las NPMs seleccionadas, L3, en una concentración de 50  $\mu$ g/ml.

Se añaden por tanto 100  $\mu$ g de NPMs L3 y puesto que la concentración es de 7,21 mg/ml (tabla 2.3) será necesario añadir 13,8  $\mu$ l en cada pocillo.

Las dejamos incubar durante 24 horas y se mide la toxicidad de estas.

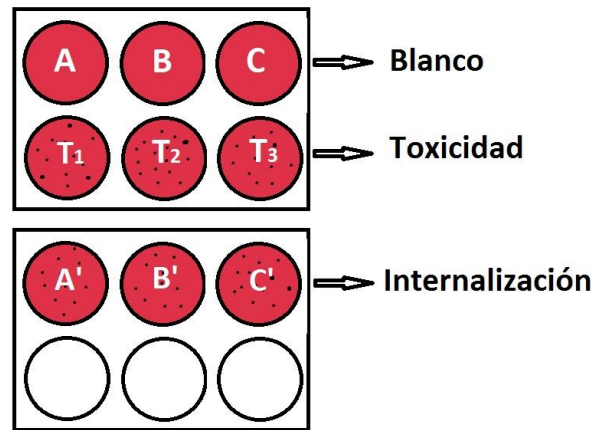


Figura 2.10: Esquema de las dos placas empleadas así como numeración de cada uno de los pocillos para los experimentos. A, B y C serán blanco y no contienen NPMs. T1, T2 y T3 contienen NPMs y serán para experimentos de toxicidad y finalmente, A', B' y C' son para el experimento de internalización.

Como indica el protocolo (Anexo II) se procede al levantamiento de las células con tripsina y a partir de la cámara de Neubauer se hace el conteo de células vivas y células muertas. La viabilidad se define como el número de células vivas entre el número de células totales en %. Para poder utilizar una línea celular esta debe ser mayor del 90%.

$$viabilidad(\%) = \frac{células\ vivas}{células\ totales} \cdot 100 \quad \text{Ecuación [2.4]}$$

Tabla 2.8: resultados de la viabilidad de las NPMs en células BV2.

	Células totales	Células vivas	Viabilidad (%)
T <sub>1</sub>	885000	885000	100
T <sub>2</sub>	1230000	1215000	98,78
T <sub>3</sub>	1755000	1680000	95,73
Media	1290000	1260000	98,17
Desviación estándar	438092	399406	2,20

Los resultados en cuanto a la viabilidad son muy altos por encima del 95% lo que demuestra la baja toxicidad de las NPMs para las células.

Como paso siguiente, estudiamos la internalización de las NPMs en las células BV2. Para ello, hicimos uso de la técnica de Espectrofotometría UV-visible (UV-vis) que permite identificar una línea de absorción característica para el complejo tiocianato de hierro, (SCN)Fe, explicada anteriormente. En primer lugar las muestras A', B' y C' se digieren con 500µl de HNO<sub>3</sub> concentrado y 500 µl de HCl 6 M. Luego se lleva a un volumen de 5 ml adicionando HCl 6 M. Como blanco tomamos la muestra de uno de los pocillos sin NPMs



digerida en medio ácido de la misma manera que las muestras. En este caso se ha tomado la muestra B del experimento de toxicidad. Midiendo los valores de absorbancia y a partir de la recta de calibrado (Anexo I) se calculan la concentración de los iones de  $\text{Fe}^{3+}$  en la cubeta y a partir de estos la concentración de ferrita de manganeso en la muestra. Los datos de absorbancia y la concentración se encuentran en la tabla 2.9.

Tabla 2.9: Concentración de NPMs en el interior de las células

	A	$[\text{Fe}^{3+}]$ (mg/ml)	$[\text{MnFe}_2\text{O}_4]$	Células	$[\text{MnFe}_2\text{O}_4]/\text{cel}$ (pg/cel)
<b>Blanco</b>	0,00	0,00000	0,00000		
<b>Muestra A'</b>	0,35	0,01746	0,03604	1230000	29,30
<b>Muestra B'</b>	0,20	0,00998	0,02060	1140000	18,07
<b>Muestra C'</b>	0,20	0,00998	0,02060	1155000	17,83
		Media	0,02575	1175000	<b>21,7</b>
		Desviación estándar	0,00892	48218	<b>6,6</b>

Para el cálculo de la concentración de NPMs en las células se ha medido la concentración de cada una de las muestras y se ha dividido entre el número de células que esta tenía obteniendo la masa de  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  por células (pg/cel).

La concentración media de NPMs en cada célula es de 21,7 pg, valor similar a otros previamente reportados en la literatura para este tipo de células. [16],[17]

### 2.3.3 Hipertermia magnética *in vitro*

Tras realizar un estudio de la absorción de potencia de las diferentes NPMs sintetizadas (L1, L2, L3 y L4), se ha seleccionado la muestra que mayor eficiencia de calentamiento presenta (L3) para realizar pruebas *in vitro*. Como hemos comentado anteriormente, diferentes aproximaciones teóricas demuestran NPMs internalizadas formando una cadena presentarán mayor SPA que un agregado de NPMs. Por lo que con este trabajo se pretende demostrar experimentalmente estas aproximaciones.

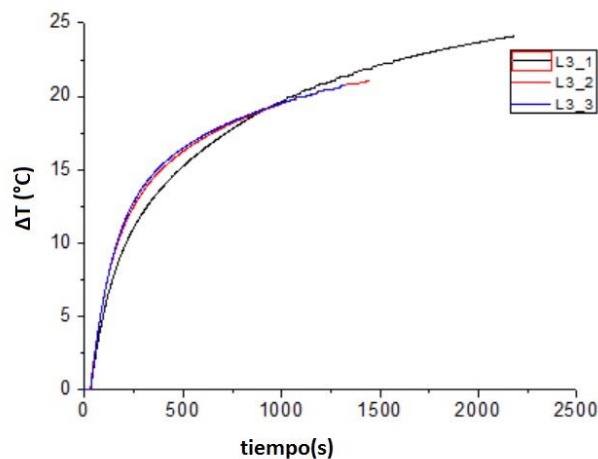
#### 2.3.3.1 Células con NPMs sin cadenas

Se añaden 10 ml de NPMs 7,21 mg/ml a dos botes de cultivo celular de 75 cm<sup>3</sup>, T75, con células BV2 y se incuban a 37 °C durante 24 horas.

Cuando ha pasado el tiempo estimado y haciendo uso del protocolo (Anexo II) se hace el levantamiento celular y posteriormente la centrifugación de forma que el pellet se observa que en lugar de ser de un color blanquecino es de un color marrón debido a la presencia de NPMs. Se tira todo el medio en la botella de residuos de forma que nos quedamos solo

con el pellet marrón y con cuidado lo pasamos a un microtubo de 150  $\mu\text{l}$  que encajamos en un vial adecuado al equipo de hipertermia.

Con el contenido de células en el otro T75 y ya dispuesto en el vial hacemos el experimento de hipertermia para ver la capacidad de calentamiento que tienen las NPMS en células al aplicar un campo magnético de 300 Gauss y frecuencia de 500 KHz. Se realizan 3 medidas y se calcula la pendiente máxima a partir de la media del cada unos de los valores en un tiempo.



*Figura 2.11: variación de la temperatura respecto al tiempo en experimento de hipertermia para células con NPMS sin cadenas.*

Se calcula la pendiente máxima como la pendiente inicial desde  $t=0$  hasta  $t=70$  segundos y esta es de  $0,0870 \pm 0,0003^\circ\text{C/s}$ .

Para el cálculo del SPA (ecuación 1.4) es necesario saber la concentración de nanopartículas en la muestra en la que se ha realizado el experimento de hipertermia por lo que digerimos la muestra y la llevamos al espectrofotómetro UV-vis con unas condiciones de 1000 ms y 5 scans.

Para la digestión de muestra de células con NPMS se echa en un falcón 500  $\mu\text{l}$  de  $\text{HNO}_3$  concentrado y 500  $\mu\text{l}$  de  $\text{HCl}$  6M y luego se lleva a un volumen de 5 ml con la adición de  $\text{HCl}$  6M. En la cubeta del espectrofotómetro se introducen 100  $\mu\text{l}$  de esta disolución, 400  $\mu\text{l}$  de  $\text{HCl}$  y 500  $\mu\text{l}$  de  $\text{SCN}$  observándose una coloración roja al añadir este último.

La absorbancia que nos da es de 0,28, por tanto a partir de la recta de calibrado (Anexo I) podemos saber los iones de hierro (III) en la cubeta de forma que:

$$A = 0,28 \rightarrow [\text{Fe}^{3+}] = \frac{0,28}{200,5} = 1,39 \cdot 10^{-3} \text{ mg/ml (cubeta)}$$

$$\begin{aligned}
 & 1,39 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mg Fe}^{3+}}{\text{ml cubeta}} \times \frac{1 \text{ ml cubeta}}{0,1 \text{ ml dis}} \times \frac{5 \text{ ml de dis}}{0,15 \text{ ml muestra}} \times \frac{230,6 \text{ mg MnFe}_2\text{O}_4}{111,7 \text{ mg Fe}} \\
 & = 0,9566 \frac{\text{mg MnFe}_2\text{O}_4}{\text{ml}}
 \end{aligned}$$

$$SPA_{\text{sin cadenas}} = \frac{4,18 \frac{\text{J}}{\text{ml K}}}{0,9566 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}} \cdot 1000 \frac{\text{mg}}{\text{g}} \cdot (0,0870 \pm 0,0003) \frac{\text{K}}{\text{s}} = \mathbf{380 \pm 2 \frac{W}{g}}$$

La SPA bajo condiciones *in vitro* varía en comparación a las NPMs preparadas en agua (apartado 2.2.3). Esto se debe a que cuando los MNPs son absorbidos por las células, cambia la viscosidad  $\eta$  en la que se mueven, que pasa de ser de 1 a 50-140 mPa/s.[21] El tiempo de relajación de Brown (ecuación 1.2) es linealmente proporcional a la viscosidad del medio por lo que un aumento de esta proporciona un incremento en este tiempo hasta que las partículas se pueden encontrar bloqueadas y no se produce rotación. En este caso el tiempo de relajación efectivo (ecuación 1.3) dependerá únicamente del tiempo de relajación de Néel. Este suceso está ligado con la variación de SPA, disminuyéndolo respecto al SPA determinado en agua.

El contenido del primer T75 lo someteremos a 46°C y 570 kHz durante 30 minutos de forma que contaremos la viabilidad justo después del experimento y a las 4 horas para ver el efecto producido por la hipertermia en el tiempo, ya que desencadena mecanismos biológicos que producen la muerte celular que no son instantáneos. La viabilidad después del experimento es de 89,05 % y tras el transcurso de las 4 horas es del 35,36%.

### 2.3.3.2 Células con NPMs con cadenas

Se procede de forma similar al apartado anterior sembrando dos botes T75 con una concentración de NPMs L3 de 50  $\mu\text{g/ml}$ . Tras 24 horas de incubación se lleva a cabo el levantamiento celular y tras la centrifugación introducimos el pellet (también de color marrón por la presencia de NPMs) en un microtubo de 1,5 ml con medio de cultivo. Para inducir la formación de cadenas en el interior celular se exponen a un campo magnético. Para ello se ha diseñado un aplicador (ver figura 2.12) que consta de dos imanes y un orificio en el centro donde encaja el microtubo, todo ellos sobre un soporte. Las partículas

se alinean porque las NPs actúan como diminutos imanes de barra, todas apuntando en la misma dirección de acuerdo con el campo aplicado.

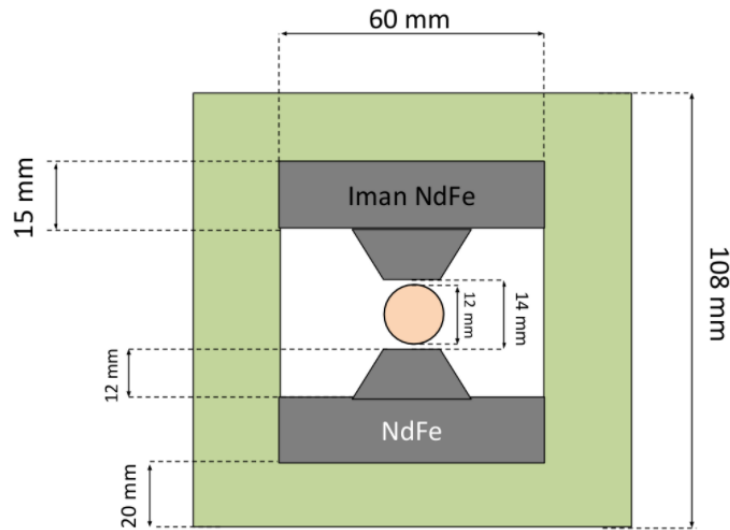


Figura 2.12: Esquema del aplicador magnético diseñado para cultivos celulares bajo campo aplicado.

Se deja el microtubo con las células con NPMs en el orificio del aplicador y se pincha con una aguja la parte superior para que pueda entrar el oxígeno. Además se introduce en la estufa para mantener las condiciones óptimas de temperatura y de humedad. Tras 24 horas se saca el microtubo del aplicador y se observa que las células con NPMs se han quedado pegadas en las paredes paralelas a los dos imanes como refleja la figura 2.13.

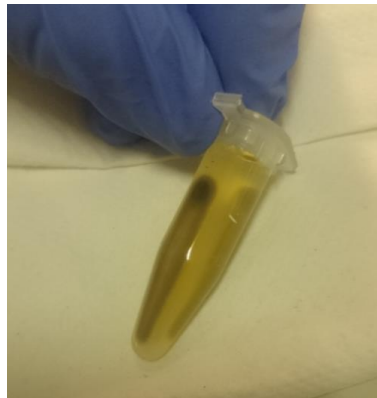


Figura 2.13: Imagen de la disposición de las células en las paredes tras 24h en el aplicador.

Para comprobar la formación de cadenas de NPMs en las células observamos a través del microscopio óptico. Se observan cadenas de nanopartículas (ver imagen 2.14 A) que, además se alinean todas en la misma dirección cuando acercamos un imán como se puede observar en la figura 2.14 B.

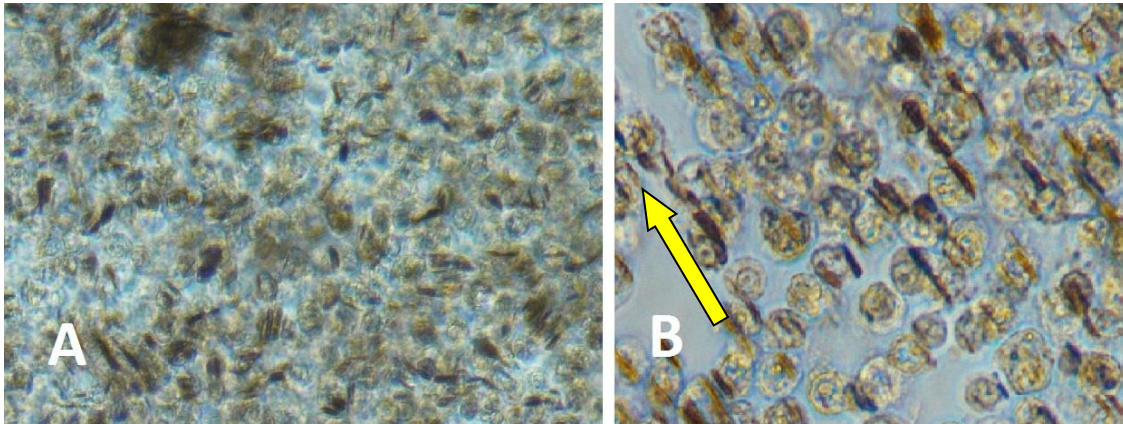


Figura 2.14: A) Imagen de microscopía óptica (20 aumentos) de las cadenas de NPMs formadas tras el cultivo en campo aplicado. B) La misma muestra (50 aumentos) cuando se aplica un pequeño campo externo (en la dirección indicada por la flecha amarilla) mostrando la orientación de las cadenas interiores.

Una vez que hemos comprobado que se han formado las cadenas se va a proceder a realizar los mismos experimentos de hipertermia que en el apartado 2.3.3.1 con el fin de comparar si las cadenas influyen en la capacidad de calentamiento por hipertermia magnética.

Las curvas para los 3 ensayos se observan la figura 2.15. Conforme pasa el tiempo las curvas de los tres ensayos se van separando y se observa una caída en el ensayo 3. Esto se debe a que se observa precipitación cuando retiramos la muestra del DM1. Sin embargo, la región inicial de las tres curvas que se corresponden con la máxima pendiente y se utilizan para el cálculo del SPA, se mantuvieron esencialmente constantes en los ensayos realizados.

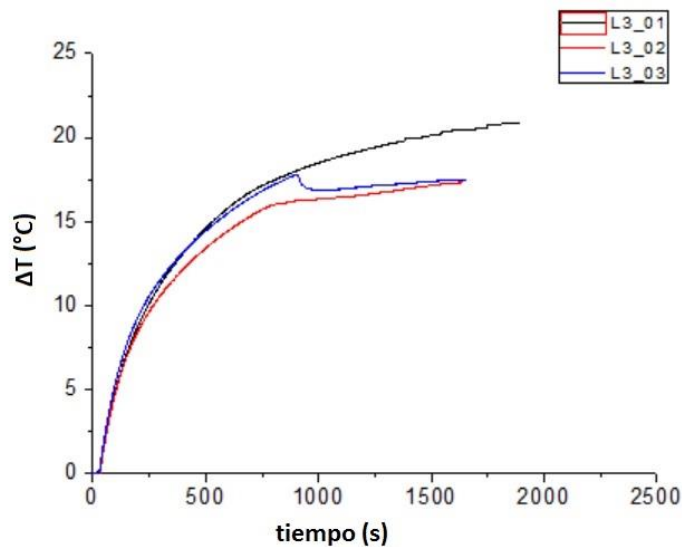


Figura 2.15: variación de la temperatura respecto al tiempo en experimento de hipertermia para células con NPMs con cadenas.

La máxima pendiente se toman dibujando la curva a partir de la media de los tres ensayos en cada tiempo y de esta se calcula la pendiente entre  $t=0$  y  $t=70$ .

La máxima pendiente es  $0,0637 \pm 0,0003$  °C/s

La concentración se calcula de la misma forma que en el apartado 3.2.2.1 a partir del espectrofotómetro.

$$A = 0,26 \rightarrow [Fe^{3+}] = \frac{0,28}{200,5} = 1,29 \cdot 10^{-3} \text{ mg/ml (cubeta)}$$

$$1,29 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mg Fe}^{3+}}{\text{ml cubeta}} \times \frac{1 \text{ ml cubeta}}{0,2 \text{ ml dis}} \times \frac{5 \text{ ml de dis}}{0,15 \text{ ml muestra}} \times \frac{230,6 \text{ mg MnFe}_2\text{O}_4}{111,7 \text{ mg Fe}}$$

$$= 0,444 \frac{\text{mg MnFe}_2\text{O}_4}{\text{ml}}$$

$$SPA_{\text{con cadenas}} = \frac{4,18 \frac{\text{J}}{\text{ml K}}}{0,444 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}} \cdot 1000 \frac{\text{mg}}{\text{g}} \cdot (0,0637 \pm 0,0003) \frac{\text{K}}{\text{s}} = 600 \pm 3 \frac{\text{W}}{\text{g}}$$

Tabla 2.10: Comparación de parámetros para determinar el SPA en células con NPMs con y sin cadenas

	Absorbancia	Concentración (mgMnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> /mL)	$\Delta T/\Delta t$ (°C/s)	SPA W/g
Células con NPMs	0,28	0,956	0,0870±0,0003	380±2
Células con cadenas de NPMs	0,26	0,444	0,0637±0,0003	600±3

La potencia específica absorbida es muy superior con cadenas del valor obtenido con NPMs en su disposición inicial intracelular. Dado que el mecanismo de relajación de Brown se encuentra bloqueado por la viscosidad del medio, podemos suponer que este incremento de SPA se debe a un cambio en el mecanismo de Néel asociado a la orientación de los dipolos de las NPMs en las cadenas. Otro aspecto que afecta a la eficiencia de calentamiento es la aglomeración de NMPs, pues al cambiar la estructura de estas ha aumentado el SPA. Con estos resultados se comprueba que podemos conseguir la misma potencia de calentamiento con concentraciones más pequeñas de NPMs.

### **3. CONCLUSIONES**

En este trabajo hemos estudiado las propiedades de nanopartículas de  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  sintetizadas para aplicaciones biomédicas. Las propiedades fisicoquímicas y magnéticas de las NPMs obtenidas han mostrado variaciones apreciables según las condiciones de síntesis, con la característica común que su estructura magnética es de monodominio y se encuentran en estado superparamagnético a temperatura ambiente. Para el estudio de las propiedades físicas y químicas de las muestras producidas hemos empleado diversas técnicas de caracterización y determinado los parámetros de interés tales como el tamaño (TEM Y DLS), la composición química (EDX) y el comportamiento magnético de los materiales (VSM Y DM1). La selección de las NPMs óptimas (muestra L3), se fundamentó en dicha caracterización y principalmente por el criterio de obtener la máxima eficiencia de calentamiento (SPA) y la mínima citotoxicidad *in vitro* para células de microglía BV2.

Finalmente, realizamos una prueba de concepto en relación al cultivo celular bajo campos magnéticos, para generar estructuras subcelulares (cadenas magnéticas) y medir así la capacidad de calentamiento modificada por estas nanoestructuras. Como resultado, comprobamos que el SPA y dichas cadenas de MNP *in vitro* se ve modificada por interacciones magnéticas dipolares y procedentes de la aglomeración de MNPs, aumentando el valor de SPA y por lo tanto la eficiencia de calentamiento *in vitro*. Estos resultados indican el potencial de la hipertermia magnética y la importancia del análisis fisicoquímico y magnético de las nanopartículas utilizadas como agentes de calentamiento, para el desarrollo de modelos físicos que puedan optimizar aun más la técnica de hipertermia en su uso oncológico.

### **BIBLIOGRAFÍA**

1. García Celda, L.A; Rodríguez Fernández O.S; Betancourt-Galindo, R. y Saldivar-Guerrero R. (2003). Síntesis y propiedades de ferrofluidos de magnetita. *Superfies y vacío* 16(1), 28-31 [https://www.researchgate.net/profile/R\\_Saldivar-Guerrero/publication/284773270\\_Sintesis\\_y\\_propiedades\\_de\\_ferrofluidos\\_de\\_magnetita/links/568a8a9608ae051f9afa596a.pdf](https://www.researchgate.net/profile/R_Saldivar-Guerrero/publication/284773270_Sintesis_y_propiedades_de_ferrofluidos_de_magnetita/links/568a8a9608ae051f9afa596a.pdf)
2. Adams, Paul E. Determining Iron Content in Foods by Spectrophotometry. *Filtrates & residues*. Volumen 72 number 7, July 1995.



3. Sanz, B., Calatayud, M. P., Cassinelli, N., Ibarra, M. R., & Goya, G. F. (2015). *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(27), 4524-4531.*
4. Steven Avilés Félix, L. 2012. *Caracterización Y Estudio de Materiales Magnéticos. Implementación de un Magnetómetro de Muestra Vibrante para la caracterización de Materiales Magnéticos.*
5. Cuadros-Moreno, A., Pimentel, R. C., Martínez, E. S. M., & Fernandez, J. Y. (2014). *Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas. Latin-American Journal of Physics Education, 8(4), 14.*
6. Bruvera, I. J., Hernández, R., Mijangos, C., & Goya, G. F. (2015). *An integrated device for magnetically-driven drug release and in situ quantitative measurements: Design, fabrication and testing. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 377, 446-451.*
7. Grande, A. H. (2007). *Nanotecnología y nanopartículas magnéticas: La física actual en lucha contra la enfermedad. Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat, 101(2), 321-327.*
8. Hernández, A. V., Quero, J. E. C., Salas, L. L., Mier, Y. H., Marchal, C., & Eléctrica, S. B. (2001). *Hipertermia electromagnética, una alternativa para el tratamiento del cáncer: antecedentes, aspectos físicos y biológicos. Rev Mex Ing Biom, 2, 78-88.*
9. Gilchrist, R., Medal, R., Shorey, W., Hanselman, R., Parrott, J., Taylor, C., "Selective inductive heating of lymph", *Annals of Surgery, 146, 596-606 (1957)*
10. Jimeno, S. G. (2013). *Nanopartículas magnéticas para aplicaciones biomédicas (Doctoral dissertation, Universitat de Barcelona).*
11. Sánchez, R. D., & Zysler, R. D. (2005). *Magnetismo de sistemas nanoscópicos, algunas aplicaciones. Ciencia Hoy, 15(85), 43.*
12. Vitoria Sanz, Mikel (2016). *Mantenimiento del toxoplasma goldii en cultivos celulares. TFG facultad de Veterinaria. Zaragoza <https://zaguan.unizar.es/record/58032/files/TAZ-TFG-2016-4376.pdf>*
13. Arshad Chaudry (Agosto de 2004). *Cell Culture. The Science Creative Quarterly. <http://www.scq.ubc.ca/cell-culture/>*



14. Vertree RA, Leeth A, Girouard M, Roach JD, Zwischenberger JB. *Whole-body hyperthermia: a review of theory, design and application. Perfusion* 2002; 17: 279-90
15. Karely Chamé Fernández. (2013). *Síntesis y Caracterización de Nanopartículas Magnéticas. (Tesis doctoral). Centro de investigaciones en óptica, A.C.*
16. Pilar Calatayud, M., et al., *Neuronal cells loaded with PEI-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for magnetically guided nerve regeneration. Journal of Materials Chemistry B*, 2013. 1(29): p. 3607-3616.
- 17 Goya, G.F., et al., *Dendritic cell uptake of iron-based magnetic nanoparticles. Cell Biology International*, 2008. 32(8): p. 1001-1005.
18. Torres Molina, T.E, *Power Absortion mechanism in high-anisotropy CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles. Doctoral thesis, Diciembre 2015.*
19. Maier-Hauff, K, Rothe, R., Scholz, R., Gneveckow, U., Wust, P., Thiesen, B., ... & Jordan, A. (2007). *Intracranial thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external beam radiotherapy: results of a feasibility study on patients with glioblastoma multiforme. Journal of neuro-oncology*, 81(1), 53-60.
20. Johannsen, M., Gneveckow, U., Taymoorian, K., Cho, C. H., Thiesen, B., Scholz, R., ... & Jordan, A. (2007). *Termoterapia en cáncer de próstata mediante el uso de nanopartículas magnéticas. Actas Urológicas Españolas*, 31(6), 660-667.
21. Sanz, B., Calatayud, M. P., De Biasi, E., Lima Jr, E., Mansilla, M. V., Zysler, R. D., ... & Goya, G. F. (2016). *In Silico before In Vivo: how to Predict the Heating Efficiency of Magnetic Nanoparticles within the Intracellular Space. Scientific Reports*, 6.
22. Günther Croll, *Diametro hidrodinámico. Fritsch* URL:<http://www.fritsch.es/medicion-de-particulas/conocimientos-de-fritsch/diametro-hidrodinamico/>
23. Briones, P. R. *TRABAJO FIN DE GRADO Nanopartículas Magnéticas para Tratamiento y Diagnóstico de Cáncer.*
23. Mojica Piscioti, M. L. (2009). *Estudio del proceso de calentamiento de nanopartículas magnéticas con campos magnéticos AC para su utilización en el tratamiento de tumores por hipertermia (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Cuyo).*

## ANEXOS

### Anexo I: Recta de calibrado para la cuantificación de NPMs

Se preparan disoluciones patrón tomando volúmenes de 0, 5, 15, 30, 50, 80, y 100  $\mu\text{l}$  de disolución de Fe de concentración 1mg/ml y se diluyen con HCl hasta 10 ml en matraces.

(En primer lugar se añade 500  $\mu\text{l}$  de  $\text{HNO}_3$  y 500  $\mu\text{l}$  de HCl para la digestión del hierro)

Para medir la absorbancia en el espectrofotómetro se introduce en la cubeta 500  $\mu\text{l}$  de disolución de cada matraz y 500  $\mu\text{l}$  de HCl.

Tabla A1.1: Valores de absorbancia medidos para las disoluciones patrón.

$[\text{Fe}^{3+}]$ (mg/ml)	$\lambda$ (nm)
0	0,00
0,00025	0,07
0,00075	0,11
0,00150	0,30
0,00250	0,50
0,00400	0,80
0,00500	1,01

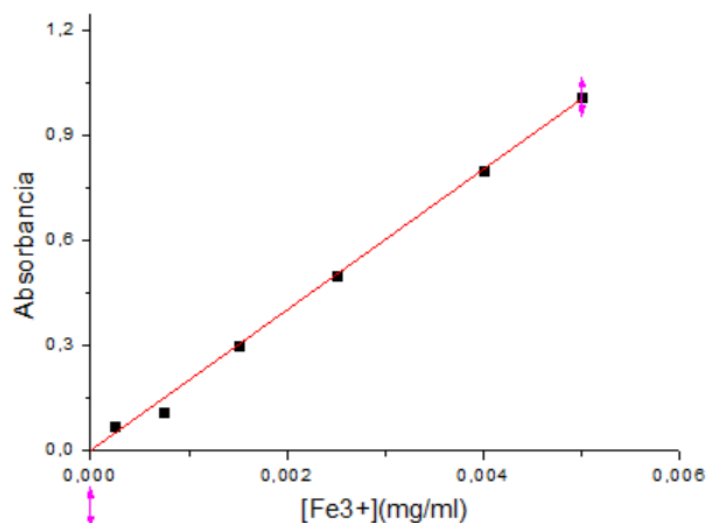


Figura A1.1. Recta de calibrado

Se digieren 100  $\mu\text{l}$  de muestra con 500  $\mu\text{l}$  de ácido clorhídrico HCl 6M y 500  $\mu\text{l}$  de  $\text{HNO}_3$  concentrado, cuando la muestra toma un color amarillento se diluyen con HCl 6M hasta 10 ml.

Se toman 200  $\mu\text{l}$  de la disolución anterior y se introducen en la cubeta con 300  $\mu\text{l}$  de HCl 6M y 500  $\mu\text{l}$  de tiocianato  $\text{SCN}^-$  y se observa que se toma un color rojo. Esto se debe a la formación de  $[\text{Fe}(\text{NCS})(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$  e indica la presencia de hierro (III) en la muestra.

En la muestra L3 se han introducido en la cubeta 100  $\mu\text{l}$  en lugar de 200  $\mu\text{l}$  ya que con este último valor daba una absorbancia alta y oscilante.

Se mide la absorbancia a una longitud de onda de 480 nm y a partir de la recta de calibrado (Ecuación 1) se obtienen las concentraciones de hierro en la cubeta de cuarzo.

$$A = 200,5 \cdot [\text{Fe}^{3+}] \quad \text{Ecuación 1}$$

Luego a partir de los cálculos pertinentes obtendremos la concentración en cada una de nuestras muestras. Se pone como ejemplo la muestra L1.

$$\frac{2,44 \cdot 10^{-3} \text{ mg Fe}}{\text{ml cubeta}} \cdot \frac{1 \text{ ml cubeta}}{0,2 \text{ ml falcon}} \cdot \frac{10 \text{ ml falcon}}{0,1 \text{ ml muestra}} \cdot \frac{230,64 \text{ mg MnFe}_2\text{O}_4}{111,7 \text{ mg Fe}} = 2,52 \frac{\text{mg MnFe}_2\text{O}_4}{\text{ml muestra L1}}$$

*Tabla A1.2: Valores de absorbancia obtenidos a partir del espectrofotómetro, cálculo de la concentración de iones hierro en la disolución de la cubeta a partir de la recta de calibrado y concentración de ferrita de manganeso en las muestras.*

	A	[Fe <sup>3+</sup> ] (mg/ml)	[MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ]
<b>L1</b>	0,49	0,00244	2,52
<b>L2</b>	0,42	0,00209	2,16
<b>L3</b>	0,70	0,00349	7,21
<b>L4</b>	0,31	0,00155	1,60

## Anexo II: Protocolo de cultivo celular

Las condiciones bajo las que se ha trabajado en la sala de cultivo siempre han sido de máxima esterilidad en una cabina de flujo laminar. Todo el material que se ha utilizado debe ser estéril (cubres, pipetas, matraces de cultivo, etc). El manejo de los botes de cultivo, así como el de los frascos con los distintos medios y reactivos, se ha realizado evitando tocar las superficies de las bocas y cuellos de los mismos, minimizando así posibles contaminaciones. Las pipetas utilizadas han sido estériles y desechables, tratando de evitarse que la punta de las mismas tocara ninguna superficie antes de que fueran introducidas en los botes de cultivo además de en los botes de medio, haciendo uso de guantes y su desinfección con alcohol de los mismos antes de introducirlos dentro de la cabina para reducir el riesgo de contaminación. Antes de iniciar el manejo de la línea celular, la superficie de la cabina ha de ser limpiada con un producto desinfectante (etanol al 70%) para posteriormente poder introducir en la cabina el material que se vaya a utilizar. En primer lugar, se enciende la luz ultravioleta y se deja actuar durante unos 15 minutos. Durante el tiempo de esterilización de la cabina, los medios de cultivo (DMEM) y

el PBS se irán atemperando ya que éstos se mantienen a 4°C. Transcurrido el tiempo de esterilización se apaga la luz ultravioleta, se enciende la luz blanca de la cabina y se conecta el flujo laminar (hasta que no se estabilicen los ventiladores no se puede iniciar el trabajo).

Se saca el T25 donde se encuentran las células BV2 de la estufa y se observa bajo el microscopio óptico. El bote T25 se introduce en la cabina limpiándolo previamente con etanol así como el DMEM y PBS atemperados.

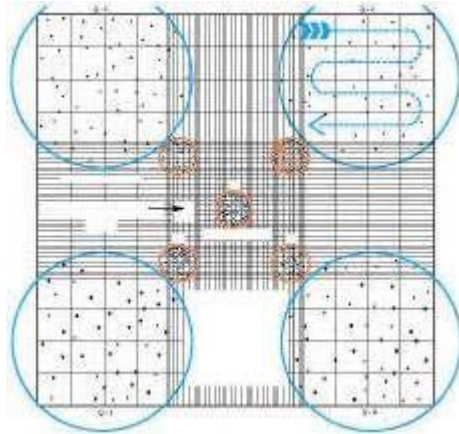
Con una pipeta se retira el DMEM y se desecha en una botella de residuos. Se lava el frasco de células 2 veces con 2 ml de PBS cada vez moviéndolo suavemente para que entre en contacto con toda la superficie celular y retirándolo con la misma pipeta. Un vez lavado se procede a añadir 1 ml de tripsina dejándolo actuar durante 2-3 minutos en la estufa ya que la acción se ve favorecida con el calor. Transcurrido este periodo se revisa a trasluz y se comprueba si las células se han despegado (si no se observa bien, se puede dar unos suaves golpecitos para favorecer el proceso de despegado). Posteriormente se añaden 5 ml de medio de cultivo para neutralizar la tripsina y se resuspende con una pipeta desechable introduciendo todo el contenido en un falcón estéril de 15 ml que se lleva a centrifugación.

Las condiciones en la centrifugación son de 1200 rpm durante 6 minutos. Al sacarlo de la centrifugadora se observa un cúmulo de células que llamamos pellet. La precipitación de las células en el fondo del falcón se debe a la fuerza centrífuga. Se limpia el falcón con etanol y lo introducimos de nuevo en la cabina donde girándolo con cuidado y sin tocar la boca de la botella de residuos tiramos la parte líquida compuesta por el DMEM y la tripsina y nos quedamos con el pellet. Se resuspende con DMEM (los mililitros de este serán acordes con la dilución que nos interese según el volumen de pellet que tengamos).

Para hacer un pasaje se toma un pequeño volumen del falcón y se introduce en un T25 nuevo y estéril al que añadiremos 5 ml de DMEM. En la parte superior del T25 se anota la fecha de pasaje y las características de las células, todo ello sin salir de la campana. Un vez listo y cerrado el frasco T25 se puede introducir en la estufa.

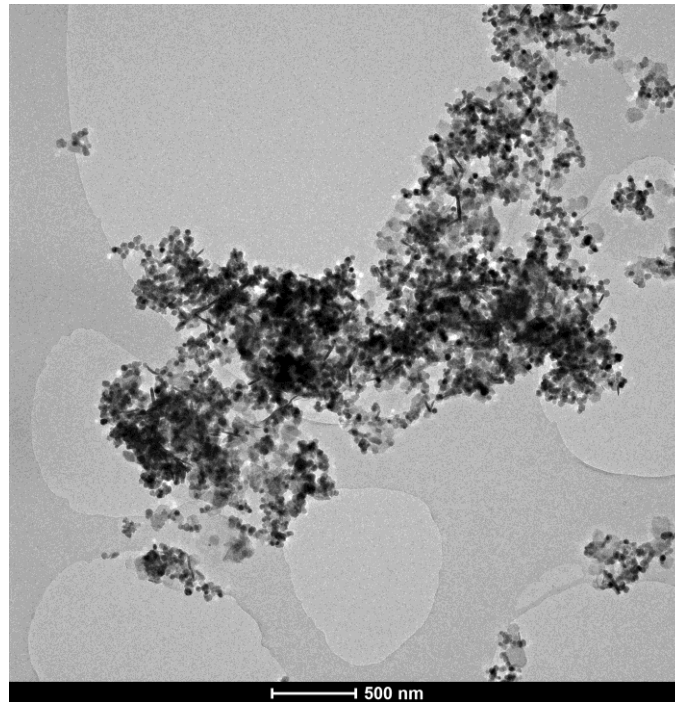
Para conocer la concentración de las células obtenidas así como la viabilidad de las mismas se realiza el recuento en una cámara de Neubauer (ver figura 2). Para ello, se toman 20 µl de la dilución de la suspensión celular (el pellet resuspendido en el medio tras la centrifugación) y se mezclan con la misma cantidad de azul de tripán (relación 1:1). Se contabilizan 4 hemicámaras y se hace la media de los cuatro recuentos. Para cuantificar las células/ml se utiliza la siguiente fórmula: media del recuento  $\times 2 \times 10^4$ . Para cuantificar

todas las células que tenemos en el falcón se multiplica por el volumen total en el que  
hemos diluido el pellet.

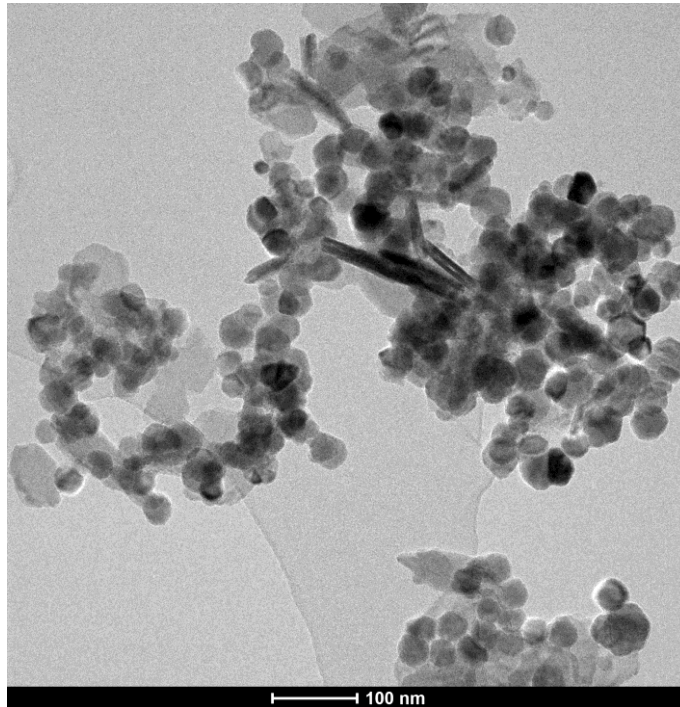


*Figura AII.1: esquema del conteo en una cámara de Neubauer*

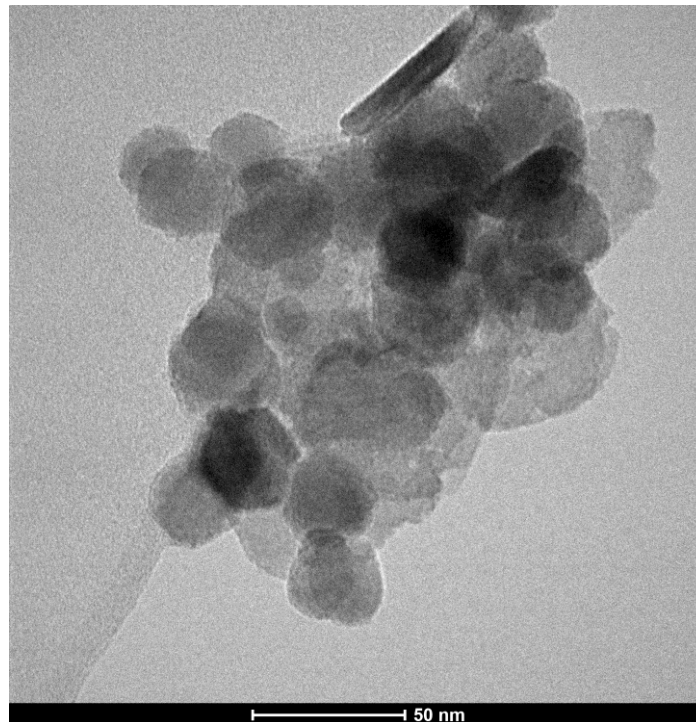
### Anexo III: Imágenes del TEM



*Figura AIII.1: Imagen de nanopartículas L1 tomada con el TEM.*



*Figura AIII.2: Imagen de nanopartículas L1 tomada con el TEM.*



*Figura AIII.3: Imagen de nanopartículas L1 tomada con el TEM.*



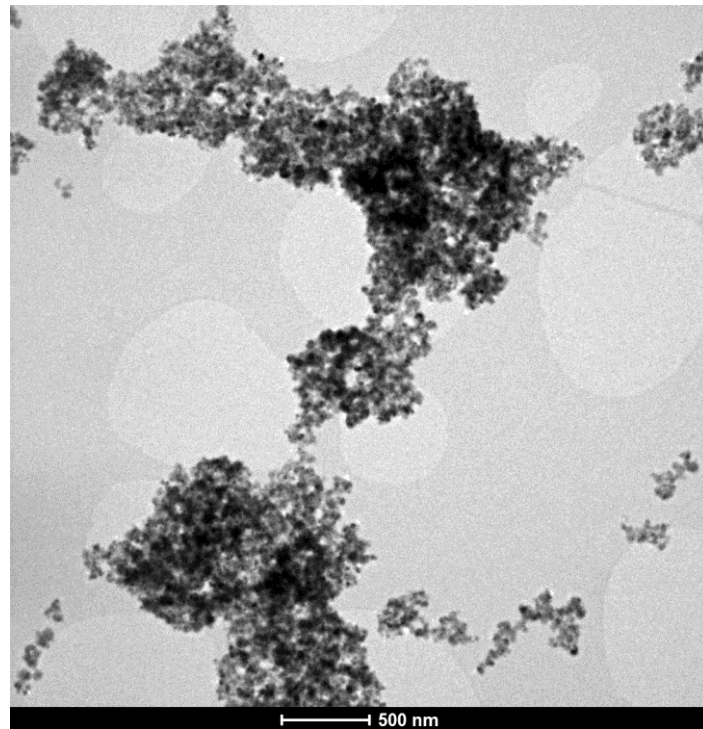


Figura AIII.4: Imagen de nanopartículas L2 tomada con el TEM.

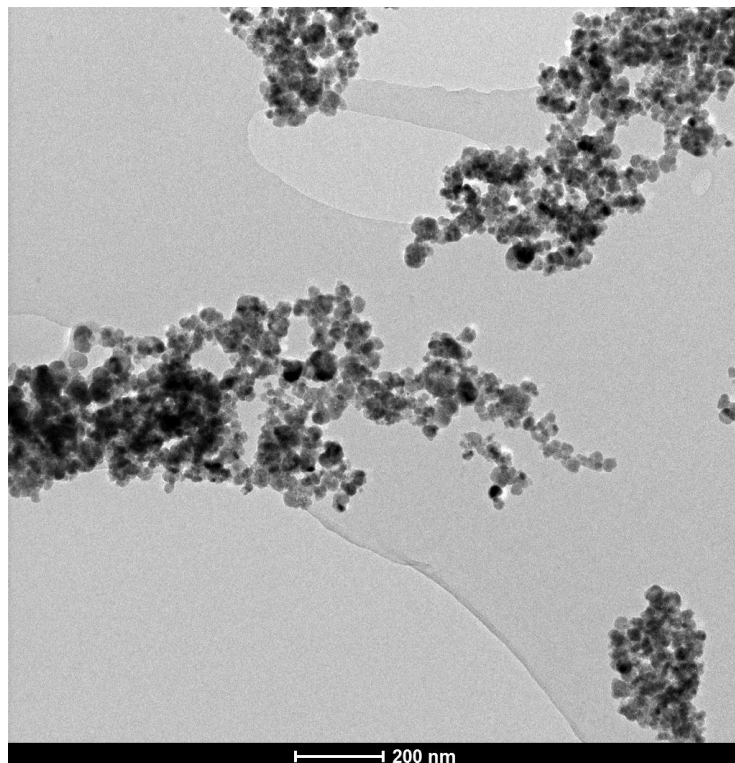
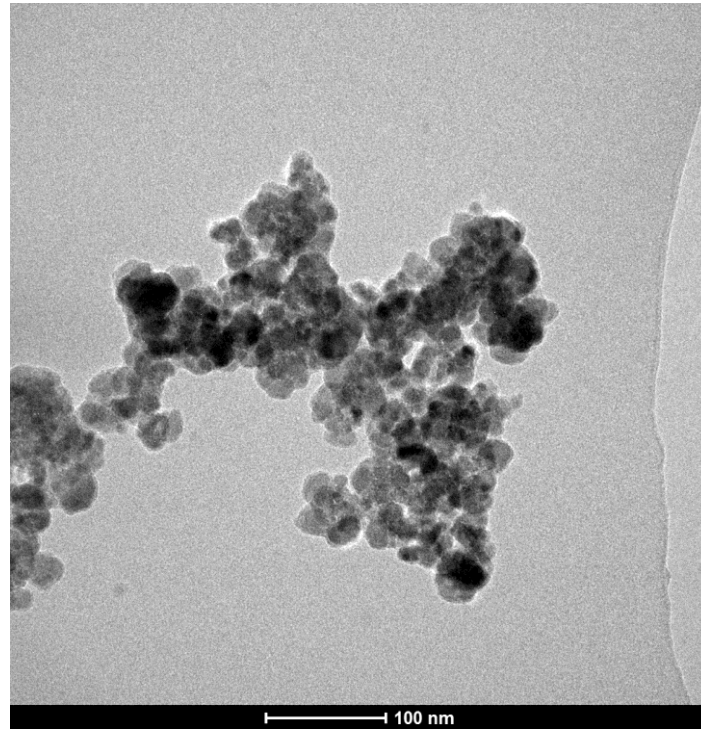
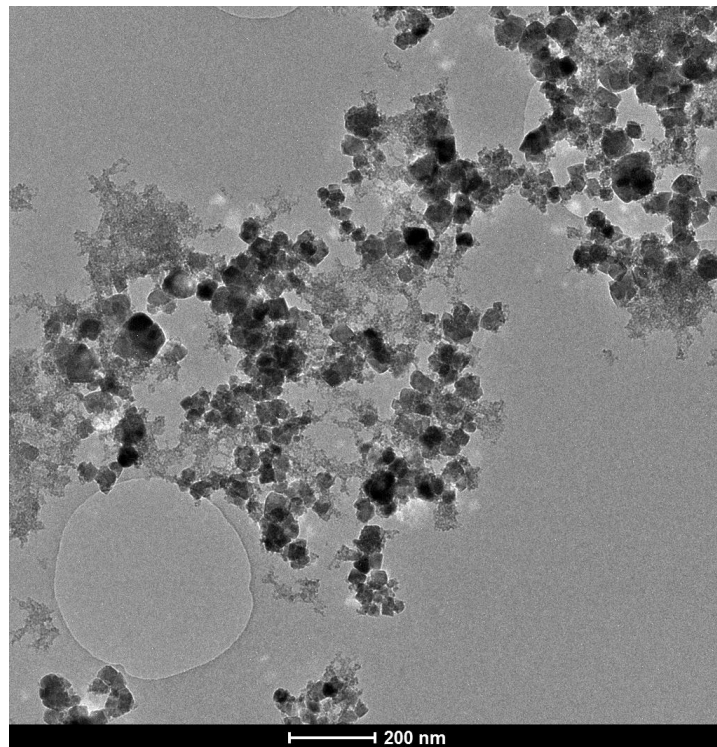


Figura AIII.5: Imagen de nanopartículas L2 tomada con el TEM.

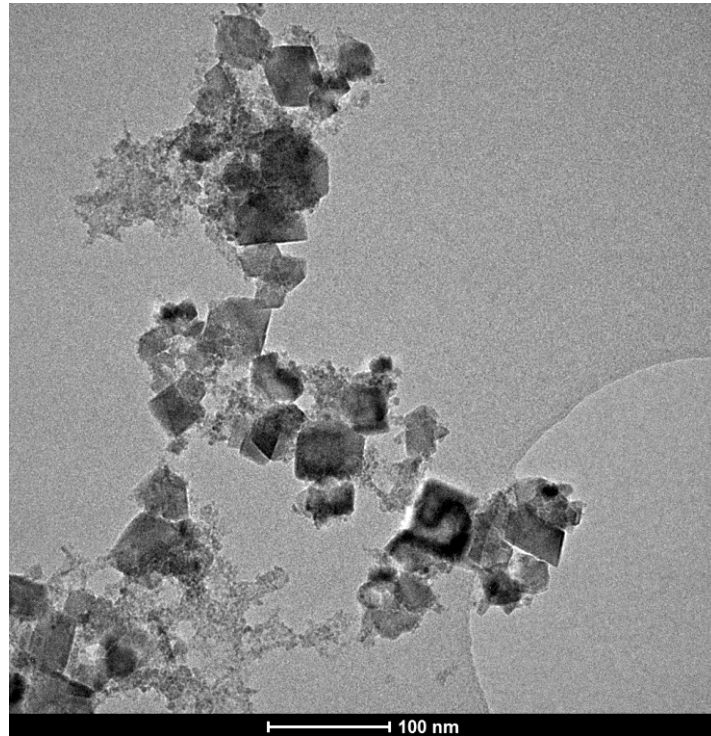


*Figura A3.6: Imagen de nanopartículas L2 tomada con el TEM.*

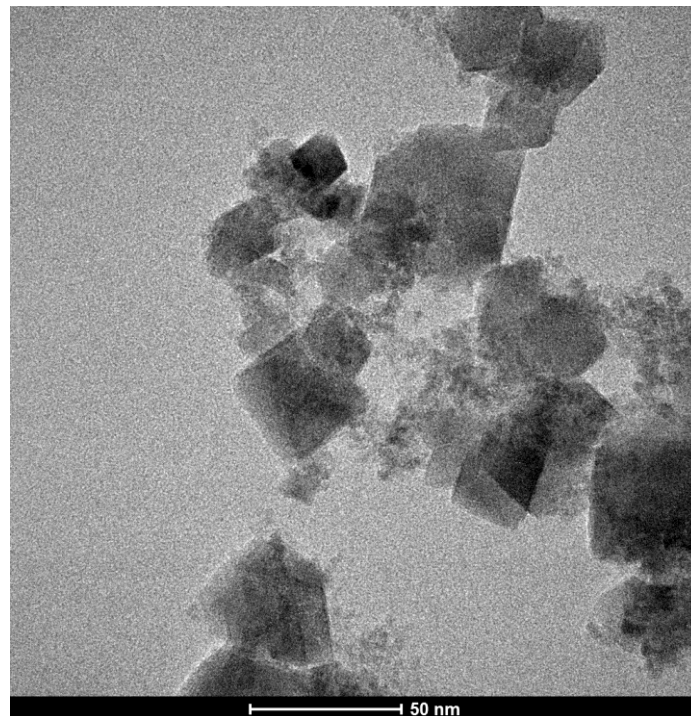


*Figura AIII.7: Imagen de nanopartículas L3 tomada con el TEM.*

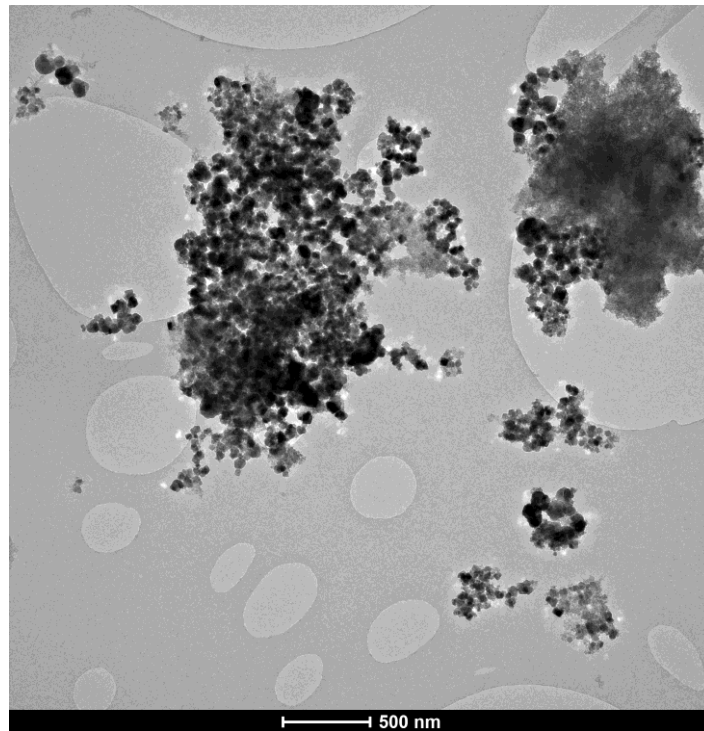




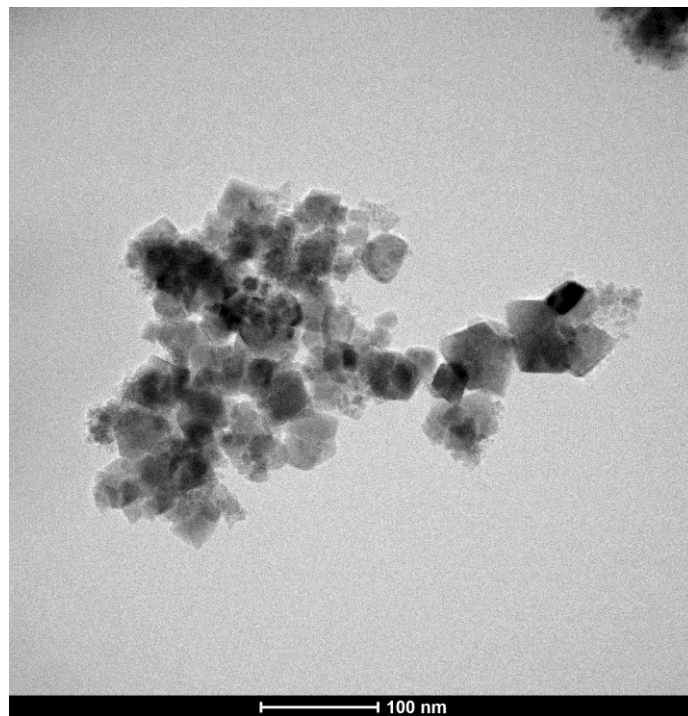
*Figura AIII.8: Imagen de nanopartículas L3 tomada con el TEM.*



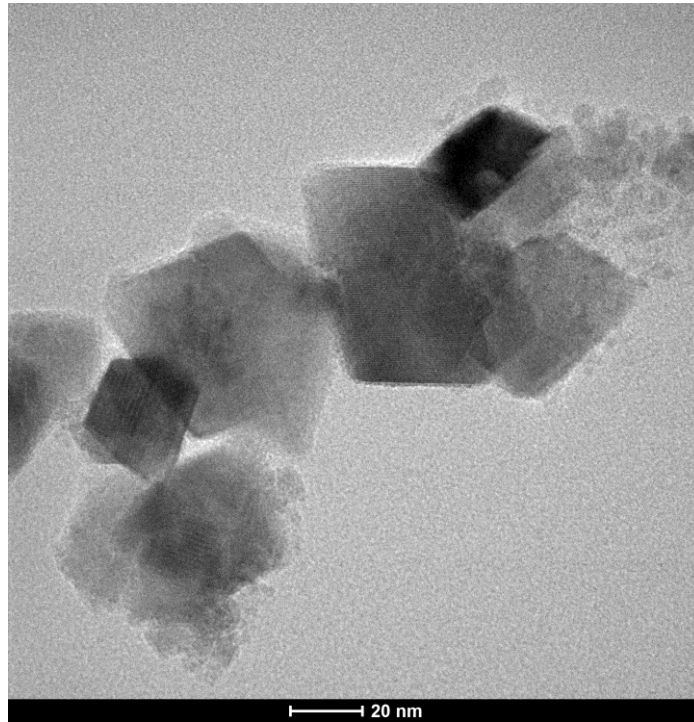
*Figura AIII.9: Imagen de nanopartículas L3 tomada con el TEM.*



*Figura AIII.10: Imagen de nanopartículas L4 tomada con el TEM.*



*Figura AIII.11: Imagen de nanopartículas L4 tomada con el TEM.*



*Figura AIII.12: Imagen de nanopartículas L4 tomada con el TEM.*