

Universidad de Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Departamento de Física de la Materia Condensada

**UTILIZACIÓN DE CAMPOS MAGNÉTICOS
Y NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS
PARA LA ORIENTACIÓN DE CÉLULAS
NEURONALES**

Junio 2014

Miren Tamayo Elizalde

Directores:

Gerardo F. Goya Rossetti

M^a Pilar Calatayud Sanz

ÍNDICE

RESUMEN.....	Pág. 3
INTRODUCCIÓN.....	Pág. 4
Nanotecnología	Pág. 4
Nanopartículas magnéticas	Pág. 4
Fuerza y energía magnéticas	Pág. 7
Respuesta celular a los campos magnéticos.....	Pág. 11
OBJETIVOS	Pág. 12
METODOLOGÍA.....	Pág. 14
Línea celular del experimento.....	Pág. 14
Microscopio óptico.....	Pág. 15
Microscopía de haz de iones (SEM/FIB Dual Beam)	Pág. 16
Análisis estadístico de la orientación	Pág. 17
Diseño y construcción de los aplicadores de campo.....	Pág. 20
Primer aplicador de imanes.....	Pág. 21
Segundo aplicador de imanes	Pág. 25
RESULTADOS	Pág. 29
Resultados aplicador 1	Pág. 31
Resultados aplicador 2	Pág. 35
DISCUSIÓN GENERAL	Pág. 38
CONCLUSIONES	Pág. 43
REFERENCIAS	Pág. 46
ACRÓNIMOS.....	Pág. 48
ANEXO.....	Pág. 49

RESUMEN

Este Trabajo Fin de Grado se centra en el estudio de la capacidad de nanopartículas de magnetita (MNPs) biocompatibles de orientar células cuando éstas las ingieren y son sometidas a un campo magnético estático. Se pretende desarrollar una configuración de campo que optimice la fuerza magnética que actúa sobre estas MNPs absorbidas. El papel de la fuerza es orientar los organismos celulares. Por tratarse de componentes del tejido nervioso, las células empleadas poseen unas ramificaciones cortas e irregulares en el cuerpo celular, en cuya observación nos centraremos para hablar de esa orientación. Tras un estudio teórico previo de los parámetros a optimizar de la fuerza, se simulará el campo magnético mediante un algoritmo de elementos finitos (FEMM). Este método proporcionará resultados numéricos de los diseños de perfiles magnéticos realizados, que servirán como modelo para la construcción de un aplicador de imanes de NdFeB. Se busca reproducir en el laboratorio del INA los valores simulados y terminar haciendo un análisis estadístico del ángulo de la orientación de las células neuronales con el campo magnético, para concluir que tal orientación existe.

INTRODUCCIÓN

Nanotecnología

En los últimos años la Nanotecnología se ha convertido en uno de los campos de estudio más importantes y vanguardistas en variadas disciplinas como Física, Química, Ingeniería y Biología. La Nanotecnología estudia los objetos con tamaños típicamente inferiores a 100 nanómetros, que confieren nuevas propiedades y nuevos comportamientos a las nanoestructuras que con ellas se construyen [1]. Esto sucede porque al reducir las dimensiones de un material, sus propiedades se modifican, como son la conductividad, reactividad, temperatura de fusión y propiedades mecánicas [1].

El área de investigación de la Nanotecnología es multidisciplinar. Se requiere de un trabajo conjunto de las diferentes ramas para llegar a todos los aspectos que esta tecnología engloba. En el trabajo nos centraremos en su aplicación en la Medicina. Puesto que la mayoría de los procesos biológicos naturales se dan a escala nanométrica, se ha demostrado y se espera que lo siga haciendo que la acción conjunta de la Nanotecnología y la Biología resuelva muchos problemas biológicos y dé lugar a nuevas técnicas de diagnóstico y terapia.

Nanopartículas magnéticas

Dentro de la Nanomedicina podemos destacar el empleo de partículas magnéticas nanométricas. Son partículas con tamaños menores de 100nm y con altos valores de imanación [1, 3]. Destacan por sus numerosas aplicaciones tecnológicas y por sus propiedades magnéticas singulares. Poseen una amplia gama de aplicaciones: producción de materiales más resistentes y ligeros, incremento en la capacidad de almacenamiento de cintas magnéticas, creación de conmutadores más veloces para los ordenadores [1], empleo en ferrofluidos (suspensiones de partículas magnéticas en líquidos), o incluso refrigeración magnética a temperaturas por debajo de las del helio líquido [4].

Centrándonos en las aplicaciones de las nanopartículas (NPs) en el campo de la Nanomedicina podemos citar su utilidad como transportadores de fármacos guiados a un órgano específico [5, 6, 7], para eliminar bacterias y virus [8], inducir la apoptosis celular e inhibir el crecimiento de tumores [9, 10, 11] o para el diagnóstico y terapia del Alzheimer [12]. Dependiendo de la finalidad que se les quiera dar se recubren de películas no tóxicas y biocompatibles que además permitan un transporte selectivo a un objetivo determinado en un área específica [3, 13]. Las NPs pueden unirse a fármacos, proteínas (en algunos casos fluorescentes), enzimas, anticuerpos o nucleótidos que pueden dirigirse a un órgano, tejido o tumor usando campos magnéticos externos, resultando en un mejor contraste en las imágenes de resonancia

magnética, reparación de tejidos, desintoxicación de fluidos biológicos y separación celular. Si el campo magnético aplicado es alterno, las NPs se calientan y se puede llegar a provocar la muerte de la célula por hipertermia [3].

Nanopartículas de óxido de hierro

En los experimentos que llevaremos a cabo en este trabajo se usarán nanopartículas de magnetita, Fe_3O_4 , en forma de cubos y relativamente grandes, entre 20 y 50 nm (ver figura 2). Se recubren de ácido laúrico que las hacen biocompatibles.

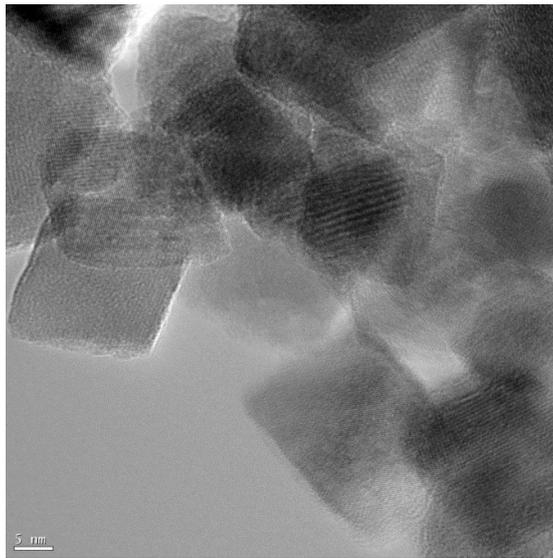


Figura 1. Imagen de TEM (microscopio electrónico de transmisión) de los cubos de magnetita.

Cuando una partícula está por debajo de su denominado tamaño crítico su estructura magnética está compuesta por un mono-dominio: en esta configuración no existen paredes de dominios magnéticos debido al balance entre la energía magnetostática y magneto-cristalina. En este sentido, el momento total de cada partícula es simplemente la suma de todos los momentos atómicos, por lo que se comporta como un *super-spin*. A temperaturas finitas (que dependerán del tamaño de la partícula) aparece un nuevo estado denominado superparamagnético, en el que el momento magnético de la partícula fluctúa entre dos orientaciones con mínimos locales de energía. Esto es debido a la naturaleza estocástica de la energía térmica ($k_B T$), que en el estado superparamagnético iguala o supera a la energía de anisotropía de la partícula:

$$E_a = KV_c \sin^2 \theta$$

donde K es la constante de anisotropía del material, V_c es el volumen crítico de la partícula y θ es el ángulo entre la imanación y la *dirección fácil* (determinada por la interacción spin-red y por la forma de la muestra).

Para muchos experimentos interesa que el momento magnético fluctúe. Sin embargo, nosotros queremos un momento magnético fijo para poder hablar de unos

valores de fuerza y energía magnéticas determinados, que no oscilen. Así, trabajaremos con partículas multidominio en estado ferromagnético. A efectos prácticos podemos decir que se trata de un *super-spin*, puesto que los momentos (ferro)magnéticos de los diferentes dominios se orientarán con el campo (comportamiento ferromagnético). Para las NPs de magnetita el tamaño crítico a temperatura ambiente es de 10 nm [14, 15] y las que usaremos en los experimentos tienen un tamaño medio de 48,44 nm, con una desviación estándar de 4,11 nm, por lo que, efectivamente, su comportamiento será ferromagnético:

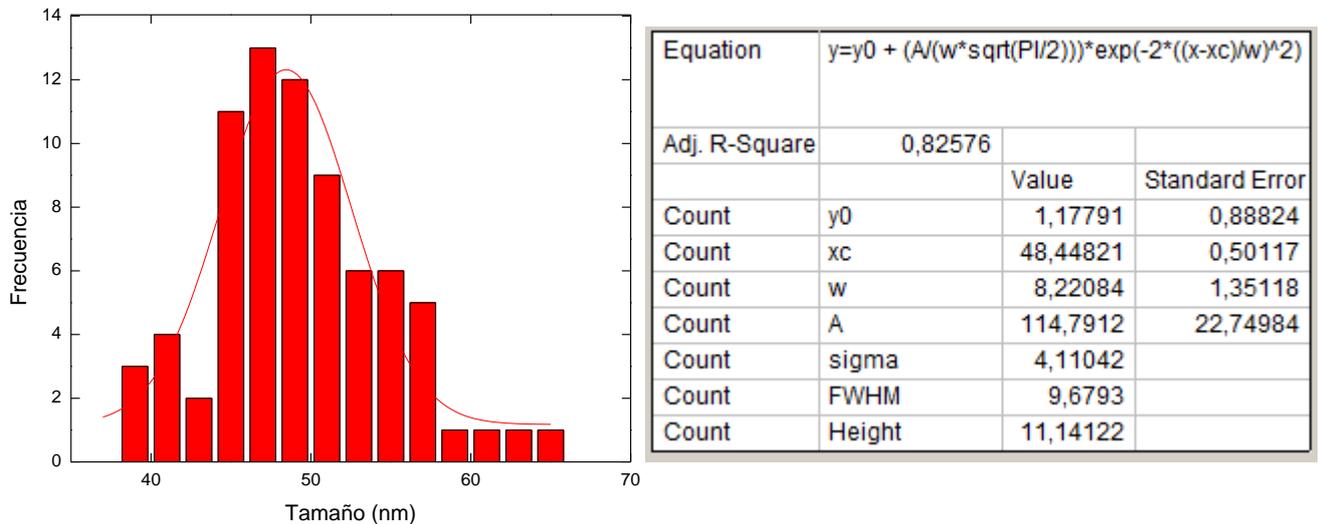


Figura 2. Histograma de los tamaños de las NPs de magnetita usadas en los experimentos

Estos tamaños de las NPs nos aseguran que sus momentos magnéticos están fijos (partículas bloqueadas) a las temperaturas a la cuales trabajaremos, entre temperatura ambiente, 25°C y la óptima para el cultivo celular, de 36°C, temperatura que proporciona la estufa en la que se cultivan. Así, los valores de la energía de anisotropía de las NPs (proporcional al tamaño de la partícula) superarán en todo momento los de la energía térmica, $E_a > k_B T$, evitando que las fluctuaciones térmicas deriven en oscilaciones de los momentos magnéticos de las MNPs.

Fuerza, par de fuerzas y energía magnéticas

Si una densidad de corriente $\vec{J}(x)$ se encuentra en una densidad de flujo magnético externo $\vec{B}(x)$, tenemos que la fuerza que actúa sobre la distribución de corriente es:

$$\vec{F} = \int \vec{J}(\vec{x}) \times \vec{B}(\vec{x}) d^3x \quad (1)$$

Si ahora suponemos que la inducción magnética varía lentamente en la región de la corriente, podemos llevar a cabo una expansión en serie de Taylor para encontrar los términos dominantes en la fuerza. Por tanto, desarrollamos \vec{B} en serie alrededor del origen:

$$B_k(\vec{x}) = B_k(0) + \vec{x} \cdot \vec{\nabla} B_k(0) + \dots \quad (2)$$

La componente i -ésima de la fuerza dada por (1) es:

$$F_i = \sum_{j,k} \epsilon_{ijk} \left[B_k(0) \int J_j(\vec{x}') d^3x' + \int J_j(\vec{x}') \vec{x}' \cdot \vec{\nabla} B_k(0) d^3x' + \dots \right] \quad (3)$$

con ϵ_{ijk} tensor antisimétrico, que cumple que $\epsilon_{ijk} = 1$ para $i = 1, j = 2, k = 3$ y para cualquier permutación cíclica, $\epsilon_{ijk} = -1$ para otras permutaciones y $\epsilon_{ijk} = 0$ si dos o más índices son iguales.

La integral de volumen de \vec{J} se hace cero para corrientes estacionarias, como pueden considerarse los dipolos magnéticos ($\vec{\mu} = I\vec{S}$), por lo que la contribución de menor orden la da el segundo término. Además, cuando $x \rightarrow \vec{\nabla} B_k(0)$ podemos expresar el momento magnético como

$$\vec{\mu} = \frac{1}{2} \int \vec{x}' \times \vec{J}(\vec{x}') d^3x'$$

y entonces queda

$$F_i = \sum_{j,k} \epsilon_{ijk} (\vec{\mu} \times \vec{\nabla})_j B_k(\vec{x})$$

Después de diferenciar $B_k(\vec{x})$ hacemos tender x a 0 (al origen) y podemos escribirlo vectorialmente:

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

Puesto que generalmente $\vec{\nabla} \cdot \vec{B} = 0$, se tiene que el menor orden de fuerza en una distribución localizada de corriente en un campo magnético externo \vec{B} es [16]:

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

Ahora, basándonos en la relación:

$$\vec{\nabla}(\vec{A} \cdot \vec{B}) = (\vec{A} \cdot \vec{\nabla})\vec{B} + (\vec{B} \cdot \vec{\nabla})\vec{A} + \vec{A} \times (\vec{\nabla} \times \vec{B}) + \vec{B} \times (\vec{\nabla} \times \vec{A})$$

desarrollamos la expresión de la fuerza:

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

Como ya hemos dicho, $\vec{\mu}$ es constante para estas NPs y en ese punto tenemos que $\vec{j} = 0 = \frac{1}{\mu_0} \vec{\nabla} \times \vec{B}$, luego queda:

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

Tenemos que la depende de la variación de $\vec{B}(\vec{r})$ con las coordenadas [17].

Puesto que diferentes bibliografías emplean indistintamente \vec{B} o \vec{H} a la hora de hablar de campo magnético, teniendo en mente que en realidad son magnitudes diferentes: inducción magnética \vec{B} e intensidad de campo magnético \vec{H} y que su relación está dada por la permeabilidad del material: $\vec{B} = \mu\vec{H}$ (escalar, no confundir con momento magnético, vectorial), por costumbre en este trabajo emplearemos la notación \vec{B} para referirnos al campo magnético.

Tenemos que la imanación o momento magnético por unidad de volumen se define como:

$$\vec{M} = N\vec{\mu} = \chi\vec{B}$$

la expresión final de la fuerza queda:

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

Podemos desarrollar esta expresión por componentes para ver la dependencia de la fuerza con el campo y con la derivada del mismo. Según los resultados, veremos qué parámetro deberemos aumentar para que el valor de la fuerza magnética sea máximo.

Más adelante expondremos que trabajaremos con campo en dos dimensiones, luego para simplificar, tomamos $\vec{B} = (B_x, B_y)$. Entonces:

$$\vec{F} = \chi(B_x, B_y) \left(\hat{x} \frac{\partial}{\partial x} + \hat{y} \frac{\partial}{\partial y} \right) \vec{B} = \chi \left(B_x \frac{\partial}{\partial x} + B_y \frac{\partial}{\partial y} \right) \vec{B}$$

$$F_x = \chi \left(B_x \frac{\partial B_x}{\partial x} + B_y \frac{\partial B_x}{\partial y} \right)$$

$$F_y = \chi \left(B_x \frac{\partial B_y}{\partial x} + B_y \frac{\partial B_y}{\partial y} \right)$$

Observamos que cada componente de la fuerza aparece como suma de los productos cruzados de cada componente del campo por el gradiente de la otra componente. Así si incrementamos cada componente del campo un factor n :

$$B_x' = nB_x \quad B_y' = nB_y$$

$$|\vec{B}'| = \sqrt{(B_x')^2 + (B_y')^2} = \sqrt{(nB_x)^2 + (nB_y)^2} = n\sqrt{(B_x)^2 + (B_y)^2} = n|\vec{B}|$$

las derivadas también se verán incrementadas en ese factor:

$$\begin{aligned} \frac{\partial B_x'}{\partial x} &= \frac{\partial(nB_x)}{\partial x} = n \frac{\partial B_x}{\partial x} & \frac{\partial B_y'}{\partial y} &= \frac{\partial(nB_y)}{\partial y} = n \frac{\partial B_y}{\partial y} \\ \frac{\partial B_x'}{\partial y} &= \frac{\partial(nB_x)}{\partial y} = n \frac{\partial B_x}{\partial y} & \frac{\partial B_y'}{\partial x} &= \frac{\partial(nB_y)}{\partial x} = n \frac{\partial B_y}{\partial x} \end{aligned}$$

con lo que las componentes de la fuerza, producto de dos factores, se verán incrementadas en el cuadrado de ese factor:

$$\begin{aligned} F_x' &= \chi \left(B_x' \frac{\partial B_x'}{\partial x} + B_y' \frac{\partial B_x'}{\partial y} \right) = \chi \left(nB_x \frac{\partial(nB_x)}{\partial x} + nB_y \frac{\partial(nB_x)}{\partial y} \right) = \chi n^2 \left(B_x \frac{\partial B_x}{\partial x} + B_y \frac{\partial B_x}{\partial y} \right) \\ &= n^2 F_x \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} F_y' &= \chi \left(B_x' \frac{\partial B_y'}{\partial x} + B_y' \frac{\partial B_y'}{\partial y} \right) = \chi \left(nB_x \frac{\partial(nB_y)}{\partial x} + nB_y \frac{\partial(nB_y)}{\partial y} \right) = \chi n^2 \left(B_x \frac{\partial B_y}{\partial x} + B_y \frac{\partial B_y}{\partial y} \right) \\ &= n^2 F_y \end{aligned}$$

Si sólo aumenta la derivada del campo la fuerza aumentará un factor n , por lo que concluimos que para conseguir fuerza magnética sobre las NPs máxima hay que maximizar el módulo del campo magnético al que éstas están sometidas. Además, parece más intuitivo y fácil trabajar con valores del campo que con su derivada.

Para producir las fuerzas que orientarán nuestro sistema (células eucariotas) buscaremos un campo de módulo alto y más o menos uniforme en una pequeña región de menos de 1 mm. Por el principio de mínima energía que cumple todo sistema suponemos que los momentos magnéticos de las NPs se orientarán en una dirección tal que se minimice energía dada por:

$$F = -\frac{\partial U}{\partial r} \rightarrow U = -\vec{\mu} \cdot \vec{B} = -|\vec{\mu}| |\vec{B}| \cos \theta$$

con θ ángulo que forman momento y campo magnéticos. El valor mínimo de la energía se corresponde con el estado más estable de la partícula. La expresión de U presenta módulo máximo con signo negativo cuando $\cos \theta = 1$, esto es, para $\theta = 0$. En efecto, conocíamos el resultado de que la posición de mínima energía es aquella en la que momento magnético se alinea en el sentido del campo. En tal caso:

$$U_{min} = -|\vec{\mu}| |\vec{B}| = -\mu B$$

De igual manera, para una densidad de corriente $\vec{J}(\vec{x})$ en un campo magnético $\vec{B}(\vec{x})$ externo podemos definir el momento o par de fuerzas dado con la expresión

$$\vec{N} = \int \vec{x} \times (\vec{J}(\vec{x}) \times \vec{B}(\vec{x})) d^3x$$

y si suponemos una variación lenta del campo en la posición de la corriente, podemos sustituirlo por su desarrollo de Taylor en torno al origen, expresión (2). Conociendo además la relación

$$\vec{A} \times (\vec{B} \times \vec{C}) = \vec{B}(\vec{A} \cdot \vec{C}) - \vec{C}(\vec{A} \cdot \vec{B})$$

llegamos a

$$\vec{N} = \int [\vec{j}(\vec{x}' \cdot \vec{B}) - \vec{B}(\vec{x}' \cdot \vec{j})] d^3x$$

La primera integral tiene la misma forma que la expresión (3) por lo que aplicamos los mismos argumentos y la segunda integral es cero para una distribución de corriente estacionaria, el momento magnético. Así, la expresión para el par de fuerzas queda:

$$\vec{N} = \vec{\mu} \times \vec{B}$$

Si analizamos esta expresión, vemos que el módulo del par va con el seno del ángulo que forman momento magnético y campo:

$$N = |\vec{\mu}| |\vec{B}| \sin \theta$$

Como supondremos que los momentos magnéticos de las NPs de las células de nuestro sistema se alinearán con el campo (posición de mínima energía), tendremos $\theta = 0$, con lo que el seno será también 0 y tendremos par de fuerzas nulo actuando sobre las NPs orientadas. Esto permite que las NPs permanezcan en su posición más estable, la de mínima energía, que hemos dicho que era $\theta = 0$, por lo que una vez orientadas con el campo, continuarán en esa posición. De esta manera, las que estén orientadas dejarán de rotar (el momento de fuerzas que actúe sobre ellas será nulo) y el par o torque tenderá a colocar las que no lo estén en esa dirección $\theta = 0$.

Recapitulando, tenemos que para la orientación de mínima energía que supondremos que tomarán las MNPs sometidas al campo magnético, el valor de la fuerza en esa dirección será alto si el módulo del campo lo es y el torque contribuirá a que las partículas se alineen formando un ángulo nulo con \vec{B} . Supondremos así que la acción conjunta de estas magnitudes tendrán como efecto la orientación de las células con MNPs en su interior.

Respuesta celular a los campos magnéticos

Hasta ahora no hemos tenido en cuenta que las NPs se encuentran en un medio orgánico, con su correspondiente viscosidad, carga (concentraciones de iones) y que responde ante estímulos externos.

Numerosos estudios han demostrado que la célula responde a propiedades mecánicas cambiantes del ambiente que la rodea, adaptando sus niveles de estiramiento o rigidez [18, 19]. La mecanotransducción es el proceso de transducción de señales celulares que aparece en respuesta a estímulos mecánicos; en este caso, el proceso por el cual las células convierten una fuerza mecánica en una señal biomecánica. Podemos destacar aquí el papel de las integrinas, una familia de proteínas que mantiene unida la célula con la matriz extracelular [18, 20].

Los organismos celulares también responden ante la presencia de un campo magnético estático: las prolongaciones celulares crecen en una dirección específica debido a que el campo afecta a la polaridad de la interacción microtúbulos-actina. Esta dirección es la perpendicular al campo [21]. Sin embargo, como hemos demostrado en el apartado anterior, si sembramos las células con MNPs y comprobamos que las absorben, la fuerza magnética actuará sobre ellas, creando una tensión mecánica en las ramificaciones que las forzarán a crecer en la dirección impuesta por el campo magnético. A su vez, hemos dicho que la célula se adaptará para contrarrestar esta nueva situación de estar sometida a una fuerza mecánica. Vemos por tanto que aparecen diferentes factores (físicos y biológicos) que llevarán a la respuesta final del organismo. En este trabajo estudiaremos empíricamente esa respuesta real e intentaremos entender los procesos físicos y biológicos por los que se llega a ella.

OBJETIVOS

Los objetivos de este TFG son tanto didácticos como experimentales. Será la primera vez que trabaje en un laboratorio de manera más o menos independiente, lo que conlleva una responsabilidad alta y una confianza en el trabajo propio. Además comenzaré a formar parte de un grupo de investigación por lo que podré aprender de mis compañeros y profesores observando cómo trabajan y pudiendo preguntarles dudas.

En cuanto al ámbito experimental, el proyecto busca la comprobación empírica de que la suposición de orientación paralela de las partículas con el campo (debido al principio de mínima energía) es válida también para las NPs que se encuentran en el interior de una célula eucariota. En tal caso tendremos una orientación de las células en la dirección del campo magnético externo al que están expuestas. Aparece aquí un tema complicado, que es la aplicación del principio de mínima energía a seres vivos. Los organismos orgánicos y sus células están constantemente ordenándose, requiriendo aportes de energía, por lo que a priori parece que existe una tendencia a reducir la entropía. Esto va en contra del segundo principio de la Termodinámica o principio de máxima entropía. En este TFG valoraremos, en la medida que podamos desde nuestro punto de vista de Físicos, todos estos procesos y estudiaremos e intentaremos entender cómo se comporta una partícula no orgánica dentro de una célula que sí lo es.

Este trabajo es una continuación de un proyecto realizado el año pasado en el INA en un Trabajo Fin de Máster y lo que ahora se pretende es mejorar la parte referida al diseño del campo magnético, para así optimizar los resultados de la orientación de las células.

Los estudios se realizan con una línea celular de macrófagos (Bv2) del Sistema Nervioso Central. Estas células desarrollan unas prolongaciones que permiten el análisis de la orientación. Una vez que las células han sido incubadas con NPs se espera que al aplicarles un campo magnético crezcan y desarrollen sus ramificaciones en la dirección del campo. Si a pequeña escala probamos estos resultados, podremos extrapolarlos a escalas mayores y hablar de este método como una terapia para la regeneración de tejido nervioso, un tejido que de manera natural se regenera de manera muy lenta (SNP) o no se regenera (SNC).

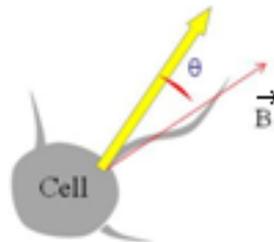


Figura 3. Ilustración del análisis hecho sobre las células

Este TFG se presenta como un reto por el hecho de que no existe un manual de pautas a seguir, sino que se basará más bien en el método de prueba-error. Tendremos que probar si lo esperado en teoría, fundamentado en las leyes de la Mecánica y el Magnetismo, se observa a posteriori en un sistema biológico a través del microscopio.

Elegí este trabajo porque quería iniciarme de alguna manera en la investigación, ver la aplicación práctica de lo que hemos ido aprendiendo a lo largo del Grado. Además, considero que la Nanociencia es hoy en día uno de los ámbitos que más crecimiento y progreso está teniendo y combinarlo con aplicaciones biológicas me pareció un tema muy atractivo. El hecho de que se realizase en el INA implicaba que trabajaría con instrumentos y métodos nuevos, lo cual también despertó mi curiosidad.

METODOLOGÍA

Línea celular del experimento

Como se ha mencionado anteriormente, como modelo de célula neuronal se ha empleado la línea celular microglial Bv2. Son células con habilidad fagocítica del sistema nervioso central, que incluye el cerebro y la médula espinal. Presentan núcleos ovalados y prolongaciones delgadas, cortas e irregulares. Tienen un tamaño medio de $20 \mu\text{m}$.

El hecho de que sean células tumorales las hace más resistentes a cualquier cultivo o manipulación, por lo que puede trabajarse mejor y durante períodos más largos de tiempo con ellas. Al ser macrófagos fagocitan (ingieren) todo tipo de sustancias.

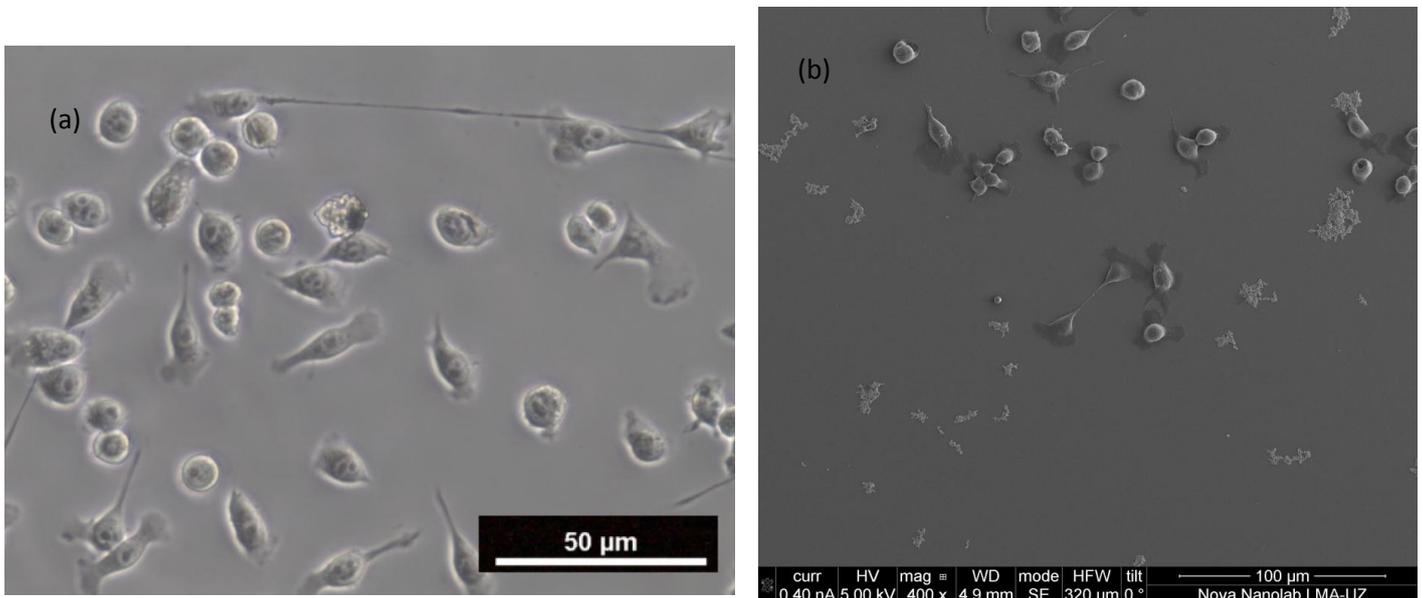


Figura 4. Imágenes de las células Bv2 incubadas con MNPs tomadas con el microscopio óptico (a) y con el SEM (b)

Para la preparación de las muestras que se usarán en el experimento se realizan cultivos de estas células Bv2 en DMEM (suero proteico que asemeja el medio celular). Permanecen una noche (incubación overnight) con este medio de cultivo, durante la cual se pegan a la base del recipiente, puesto que se trata de células adherentes. Este hecho es importante en nuestro experimento, puesto que si estuvieran suspendidas libremente en disolución, al ingerir NPs magnéticas y someterlas a un campo, se aglomerarían en la zona del imán y apenas podríamos observar nada, salvo un cúmulo de células. Al pegarse a la base podremos estudiar de manera individual su orientación progresiva con el campo, ya que la respuesta de orientación instantánea ideal no se da en un sistema biológico, donde intervienen muchos y diferentes factores.

La concentración de células de las muestras debe ser la óptima teniendo en cuenta que deben tener espacio suficiente para poder desarrollar dendritas y además no puede ser mínima, puesto que la experiencia en experimentos previos en el INA ha demostrado que en una cantidad muy pequeña las células Bv2 crecen mal, sin apenas desarrollar prolongaciones. Tienen que, de alguna manera, interactuar entre ellas.

Una vez pegadas, se lavan las células con PBS para desechar las que no se han pegado (generalmente en mal estado) y se añade nuevo medio de cultivo DMEM, a una concentración de MNPs de 20 $\mu\text{g/ml}$. Permanecen así una noche más, tras lo cual se procede a volverlas a lavar para eliminar las MNPs que no hayan sido absorbidas. Entonces se puede colocar el cultivo, con medio DMEM renovado, sobre el soporte de imanes, donde permanecerán otra noche más. A la mañana siguiente podremos hacer fotografías para estudiar su orientación.

Vemos que la preparación del experimento requiere tres noches y además el INA permanece cerrado los fines de semana, con lo que nos quedan dos días laborales para estudiar la orientación de las células. Así, cada experimento nos ocupará una semana, lo cual es bastante tiempo si queremos repetirlos un determinado número de veces para poder hacer un buen tratamiento estadístico de los datos. En este trabajo expondremos los resultados que obtendremos en el máximo número de experimentos que nos dé tiempo a realizar.

En cuanto al recipiente en el que se cultivan las células, en los diferentes experimentos probaremos con varios modelos, a los que haremos referencia más adelante. Todos deben estar cerrados y esterilizados, por lo que la manipulación de los frascos debe hacerse en una campana de flujo laminar horizontal. Uno de los directores de este TFG se encargaba de la preparación de las muestras y yo estuve presente en un pasaje celular realizado por una compañera del grupo que me explicó los pasos e instrumentación del proceso.

Por tratarse estas Bv2 de macrófagos suponemos que fagocitarán e ingerirán cualquier sustancia o partícula que les echemos, incorporándola a su interior. Intentaremos comprobar este hecho con diferentes técnicas experimentales de microscopía.

Microscopio óptico

En el laboratorio, el microscopio óptico será la herramienta principal de trabajo para realizar este TFG. Esta unidad posee tres objetivos, de aumentos 10x, 20x y 40x. Cuenta además con unas manivelas para mover la platina sobre la que descansa la muestra y con un regulador de luz. Los diferentes objetivos permitirán elegir entre un estudio más general de la muestra o más detallado de una zona en concreto. Así, si queremos observar la orientación de las ramificaciones, usaremos los objetivos de 10 o 20 aumentos, mientras que si queremos comprobar si el interior de la prolongación presenta MNPs (que se ven más oscuras), emplearemos el de 40x. Las imágenes tomadas con este último objetivo no se veían demasiado nítidas, debido a algún

problema con el programa de ordenador, puesto que su visión al microscopio era buena.

Como hemos comentado y vemos en la siguiente imagen, el microscopio está conectado a un ordenador y posee una cámara que permite ver la muestra en la pantalla del mismo y tomar fotografías, las cuales estudiaremos para obtener las direcciones de las ramificaciones.

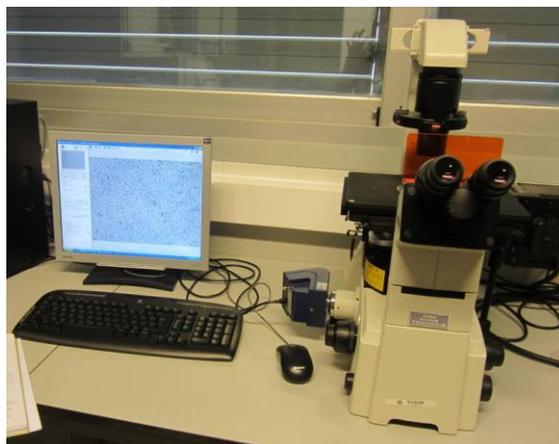


Figura 5. Microscopio óptico empleado, asociado a un software (Jenoptik Optical Systems)

En el Anexo se muestran fotografías de las células y sus ramificaciones, tomadas con los diferentes aumentos del microscopio óptico.

Microscopía de haz de iones (SEM/FIB Dual Beam)

Se trata de una técnica de haz de iones focalizados (FIB por sus siglas en inglés) que emplea un haz de iones, generalmente Ga^+ , que es acelerado (por una diferencia de potencial) hacia un punto de la muestra, de forma análoga al haz de electrones focalizados del microscopio de barrido o SEM (Scanning Electron Microscope). Sin embargo, estos iones son mucho más masivos que los electrones, por lo que al impactar sobre la superficie de la muestra, arrancan material de ésta. De esta manera podemos hacer un corte transversal en la muestra y observar, en nuestro caso, el interior de la célula, para comprobar si ha ingerido MNPs.

Además del haz de iones, el equipo incorpora un SEM, de ahí que también se le conozca como *Dual beam*. Esto permite emplear el haz de electrones para hacer la imagen de la muestra a la vez que ésta se está cortando con el haz de iones. El cañón de iones está inclinado 52° con respecto al de electrones, que está vertical.

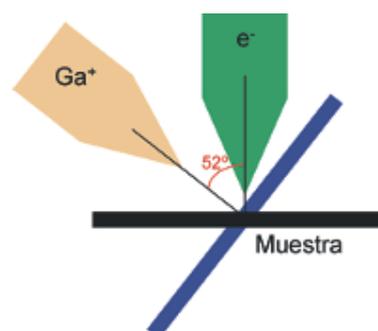


Figura 6. Cañones del dual beam

El equipo puede llevar a cabo espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDX), que permite determinar la composición elemental de la muestra (ver apartado Resultados).

Las muestras a estudiar deben ser preferiblemente planas y obligatoriamente conductoras, para que se descarguen al conectarlas a tierra. Si no se descarga correctamente, la muestra se desplaza (puesto que repele el cañón de electrones) y se dificulta su estudio. Por ello las células, previamente fijadas a un porta con productos específicos, se recubren con una capa de platino. Es necesario controlar el voltaje de aceleración de ambos cañones para no dañar la muestra.

En el Anexo aparecen imágenes tomadas con este microscopio de barrido.

Análisis estadístico de la orientación

El trabajo se basa en hacer estadística de una variable angular, que representa la orientación de las células en estudio.

Tras la primera noche que pasan las células con MNPs en una estufa a 36°C, sometidas al acción del imán, se llevan a analizar al microscopio óptico, asociado a un software que permite guardar fotografías de la muestra en estudio.

Antes de cultivar células en su interior y realizar la preparación de la muestra, se marca el recipiente de cultivo en su base, con dos líneas paralelas separadas la misma distancia que la diagonal a estudiar. Había que hacer coincidir, siempre que se dejase el recipiente con cultivo celular sobre el soporte de imanes, esas marcas con los límites de la zona de estudio. Además, estas señalizaciones permitían localizar con el microscopio óptico sin dificultades el área en la cual las células habían estado bajo los efectos del imán, que será donde tomaremos fotografías para después analizarlas. Así, colocamos el frasco de cultivo sobre la platina del microscopio con la diagonal marcada en posición horizontal. Sabemos entonces que el campo magnético tiene dirección perpendicular a estas líneas, por lo que su dirección al mirar las células bajo el microscopio será la vertical. Se espera que las células presenten esa misma orientación.

Valiéndonos del microscopio óptico observaremos cómo, en un primer análisis cualitativo de la zona de interés, efectivamente, los cúmulos de MNPs que no se desprendieron al lavar con PBS la muestra se orientan en el sentido del campo, hecho que nos permite en todo momento ser conscientes de su dirección. Esto era de esperar. Tenemos que ver cómo responden al campo las MNPs que se encuentran en el interior o superficie de las células.

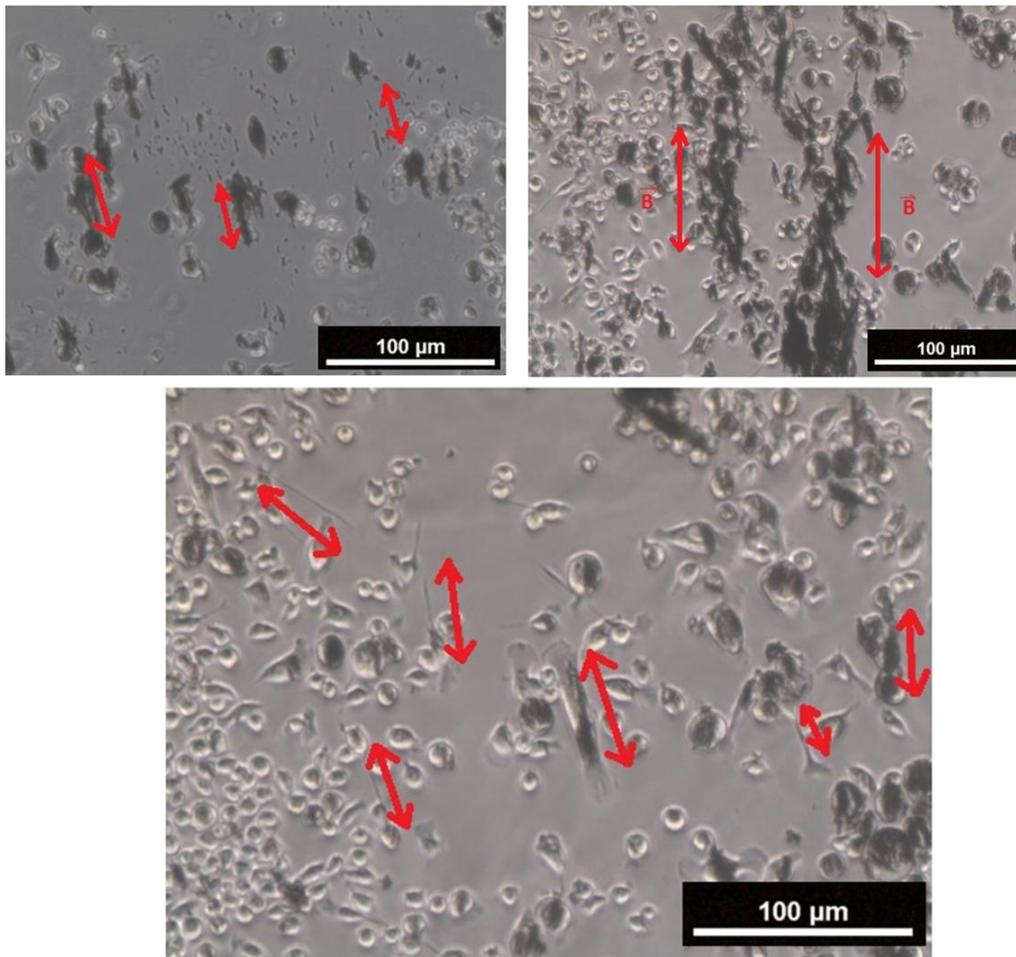


Figura 7. Fotografías tomadas con el microscopio óptico con el objetivo 10x

En la figura se ha señalado la dirección del campo magnético con los dos sentidos posibles. A la hora de observar con el microscopio conocíamos el sentido del campo gracias a las líneas que habíamos dibujado en la base del matraz que señalaban la zona que había sido impuesta a campo intenso (campo perpendicular a ellas). Debido a la simetría del problema sólo interesa la dirección del campo, pues ambos sentidos llevan a una misma orientación de las células.

En cada experimento haremos fotografías de la diagonal a estudiar y, conociendo la dirección del campo magnético, posteriormente pasaremos a analizar esos datos con el programa *ImageJ*, con el que obtendremos el ángulo de orientación de las ramificaciones celulares con respecto al campo. Con los datos que nos proporcione el programa haremos un histograma para los ángulos, entre -90° y 90° con respecto a la dirección del campo. Será necesario hacer equivalencias de ángulos, que con la simetría de nuestro sistema aparecen entre los cuadrantes primero y segundo y entre el tercero y el cuarto. En el caso ideal este histograma debería ser una función delta de Dirac en el ángulo 0: todas las células que han ingerido MNPs se han orientado paralelas al campo. Sin embargo, veremos cómo en medios biológicos existen numerosos factores de los cuales depende que una célula ingiera o no NPs, presente más o menos resistencia a desplazarse, responda de manera específica ante una fuerza mecánica... Con lo que tomaremos como válido un ajuste del histograma a una distribución gaussiana o normal.

En cada experimento y cada día (realizaremos un total de 4, con dos soportes de imanes diferentes, como veremos) se tomaron una media de 30 fotografías, lo que daba un análisis de unos 200 prolongaciones. Este número fluctuaba en cada experimento, puesto que las condiciones de concentración de las muestras eran diferentes y la localización de prolongaciones celulares más o menos complicada (no se tomaban imágenes de cúmulos o aglomeraciones de células sin dendritas, pues de ellas no sacábamos información útil). Como sabemos, el ajuste será mejor cuanto mayor sea el número de datos analizados, pero, como hemos dicho, este número estará limitado por el estado de la muestra. Analizaremos los resultados que nos dé el programa *Image J* dibujando en un histograma la frecuencias de aparición de los diferentes ángulos. Ajustaremos la curva a una distribución normal o gaussiana, dada por Origin de la siguiente forma:

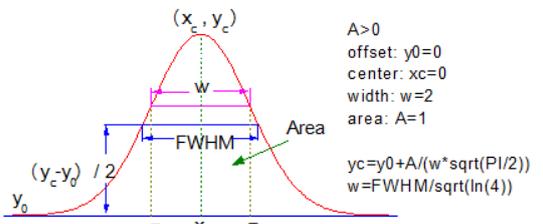
$$y = y_0 + \frac{A}{w\sqrt{\pi/2}} e^{-2\frac{(x-x_c)^2}{w^2}}$$


Figura 8. Fórmula y parámetros de ajuste de la distribución normal de Origin

El único parámetro que fijaremos será $y_0 = 0$, puesto que puede haber algún rango de ángulos en el que ninguna ramificación se oriente (representaremos los ángulos en grupos de 20°). Los valores de los parámetros restantes saldrán de un ajuste por iteraciones. Compararemos los resultados de este ajuste (sus parámetros) para los diferentes experimentos que realizaremos con distintos aplicadores de imanes y para cada una de las medidas de cada experimento, correspondientes al número de noches que las células estuvieron con imán.

Podríamos igualmente haber hecho un tratamiento estadístico de la longitud de las ramificaciones con y sin MNPs, expuestas y no expuestas a campo... Sin embargo, ello llevaría a excederse en la extensión de esta memoria y no se encuentra entre los objetivos de este trabajo, por lo que nos remitimos a los resultados obtenidos en el TFM elaborado el año pasado en el propio INA sobre el tema: la presencia de hierro en el interior celular favorece el crecimiento de las prolongaciones [22] y el sometimiento de células a campo magnético favorece igualmente su crecimiento [21], luego la combinación de ambos supone la elongación máxima de las ramificaciones. La presencia de campo sin MNPs no afecta al tamaño de estas prolongaciones.

Diseño y construcción de los aplicadores de campo

El primer paso del trabajo es simular numéricamente los valores de campo magnético que se logran con diferentes configuraciones de fuentes de campo (en nuestro caso, imanes permanentes de NdFeB). Para optimizar el campo estático se realizan simulaciones mediante el método de elementos finitos (FEMM) utilizando un enfoque bidimensional, que es la geometría de los cultivos celulares. El método consiste en descomponer el problema (en este caso, un problema magnético) en un número N de regiones ($N \gg 100$), cada una con una geometría simple (por ejemplo, triángulos). En cada región el algoritmo del programa resuelve las ecuaciones de Maxwell pertinentes para obtener valores para el campo magnético, valiéndose de una aproximación numérica a la solución "verdadera" de las ecuaciones de Maxwell. Este método ha demostrado ser completamente eficaz para el diseño de aplicadores de campo estático utilizados en orientación neuronal. En las simulaciones se lograron como veremos gradientes de campo magnético de hasta 30 T/m, que se mostraron eficaces en ensayos in vitro previos.

En este TFG se pretende mejorar el diseño del aplicador de imanes anterior, mostrado en las figuras siguientes:

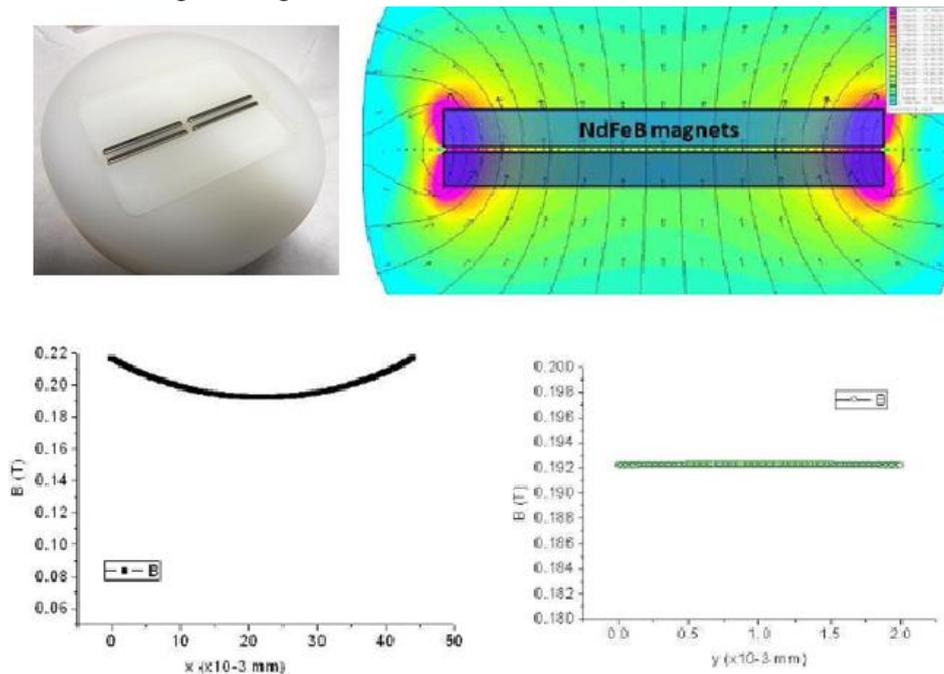


Figura 9. Soporte de imanes antiguo y resultados de FEMM

En la zona central entre imanes se consigue un campo más o menos uniforme de módulo 0,19 T, siendo el gradiente del mismo de 0,19 T/m. Ese área de estudio tenía una anchura de 2 mm y proporcionó superficie suficiente para encontrar medidas con las cuales hacer un buen tratamiento estadístico, por lo que se tomó como referencia. Sin embargo, cuanto menor era la distancia entre imanes más intenso era el módulo del campo magnético entre ambos. Sabiendo que las células Bv2 tienen tamaños de alrededor de $20 \mu m = 0.02 mm$, una zona de estudio de las mismas de 1 mm de ancho parecía razonable.

PRIMER APLICADOR DE IMANES

Diseño del primer aplicador

Tras varios diseños menos efectivos o cuya construcción requería una mayor complejidad, optamos por una estructura de cuadrupolo. De esta manera, reconduciendo el flujo magnético mediante piezas de hierro puro (material de alta permeabilidad magnética), lo concentrábamos en la zona en la cual estudiaríamos la orientación de las células. Para su diseño y simulación previas teníamos la restricción del tamaño de los imanes, puesto que se trataba de imanes comerciales de NdFeB de tamaños y formas estandarizados (pedir algo más específico lleva mucho tiempo). El proveedor de los imanes es la empresa Supermagnete, de Alemania.

Las configuraciones más efectivas, a la par que sencillas (el soporte para los imanes y las piezas de hierro se construirían por un técnico del propio INA), presentaban disposiciones simétricas, por lo que los cuatro imanes serían idénticos y cuadrados. Consultando en la web de la empresa los tamaños disponibles y llevándolos a la simulación de FEMM, terminamos eligiendo imanes cuadrados de 15x15x8 mm:

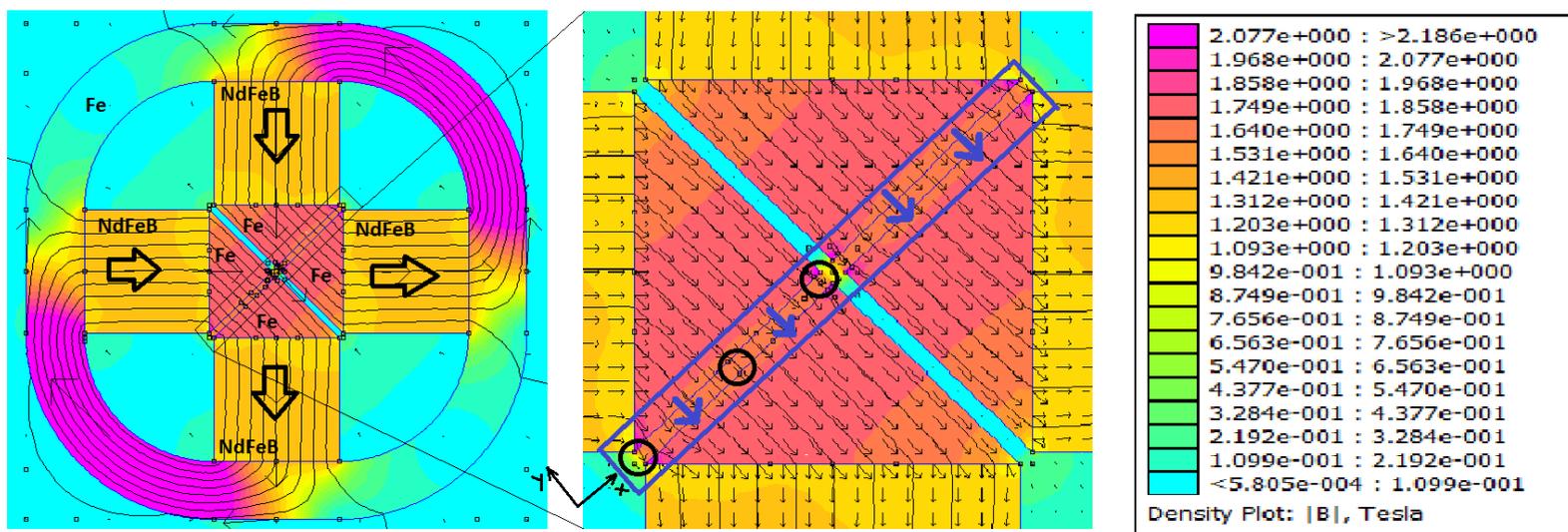


Figura 10. Primer soporte de imanes nuevo

En la simulación, los imanes y piezas de hierro puro estaban rodeadas de aire. En la implementación práctica del diseño se empleará poliamida 6 (nylon). En un principio el aplicador tendrá una altura homogénea de 8 mm, puesto que es la altura impuesta por los imanes. A la hora de colocar los imanes y terminar el montaje, las piezas triangulares de hierro de la diagonal de estudio se atraían con fuerza, por lo que tuvimos que colocar un material "aislante" magnético entre ellas. No había plástico en ese momento en el taller, por lo que colocamos latón, que tiene permeabilidad magnética despreciable, para separar las piezas imanadas.

Comprobamos en las figuras sacadas de FEMM cómo las líneas de campo magnético describen un ciclo más o menos cerrado, luego las pérdidas deberían ser

mínimas. El propósito del anillo de hierro es, precisamente, cerrar el flujo magnético, de forma que el campo producido por los imanes llegue, sin haberse visto disminuido, a la zona deseada: la diagonal de estudio, marcada en la figura 10 con un rectángulo azul. En esa diagonal, que presenta campo paralelo y uniforme de alto módulo, estudiaremos la orientación de las células.

En el momento en el que aparece la zona de material de baja permeabilidad magnética (latón, en este caso) entre las dos piezas de hierro (conductoras magnéticas), algunas líneas de campo salen de una pieza de hierro y llegan a la otra describiendo trayectorias curvilíneas (parabólicas) en el eje Z. Es gracias a esto que, si colocamos un material magnético en esa zona, se verá afectado por estas líneas de campo.

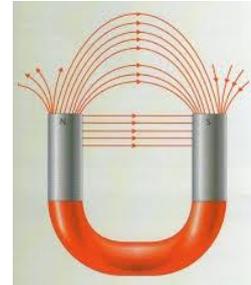


Figura 11. Cómo las líneas de campo pasan de un polo magnético a otro

Exportamos de FEMM valores numéricos del campo y los representamos con Origin, obteniendo las siguientes gráficas para el campo magnético en el eje Y para los valores de X marcados con círculos negros sobre la diagonal de la figura 10 ($x=0$, 5.30, 10.60 mm) y los de la componente X para $Y=0$:

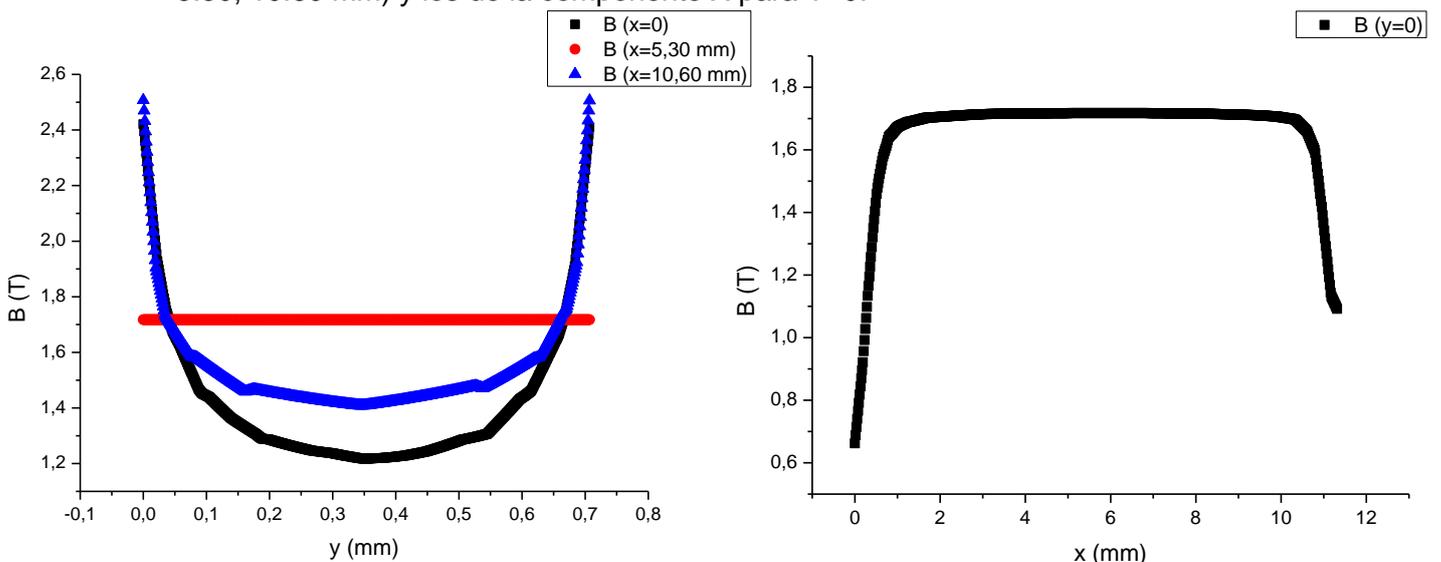


Figura 12. Campos según los ejes X e Y para diferentes posiciones en el montaje de imanes primero

Vemos que el campo en el eje X es prácticamente constante e igual a 1,7 T a lo largo de toda la diagonal (las gráficas sólo muestran media diagonal, pero ésta es simétrica con respecto al centro). En la coordenada Y los valores de los campos para inicio ($x=0$), posición media ($x=5.30$ mm) y final ($x=10.60$ mm) de la mitad de la diagonal son de 1,2 T, 1,5 T y 1,7 T respectivamente. El más uniforme es el correspondiente al punto medio de la semidiagonal, donde las líneas de flujo magnéticas son paralelas. Teniendo en cuenta que con el soporte de imanes anterior (empleado el año pasado) se había conseguido un campo de 0,9 T, vemos que hemos llegado casi a duplicar el módulo del mismo. Observamos también que existen

variaciones de los valores del campo en los extremos de las semidiagonales. Ello llevará a que la derivada del campo con la posición sea no nula:

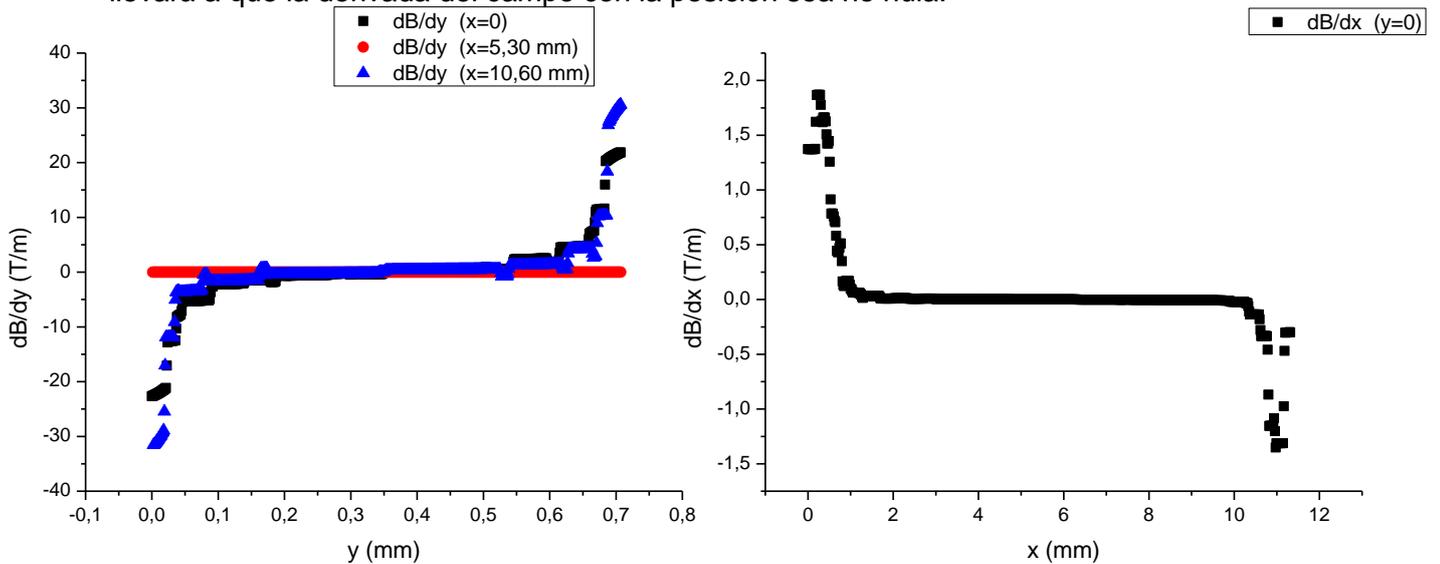


Figura 13. Valores de las derivadas del campo con la posición

Observamos que en los extremos de la semidiagonal se alcanzan valores del gradiente del campo en el eje Y de hasta 30 T/m. El gradiente en X alcanza un valor máximo de 2 T/m. En la zona media el gradiente en ambas coordenadas es prácticamente nulo. Podemos concluir aquí que en estos puntos la fuerza magnética que actúa sobre las NPs será nula, puesto que uno de sus factores (el gradiente) lo es. Sin embargo, vimos en el análisis de esta fuerza que se descomponía en sumandos que englobaban términos cruzados de campo y gradiente en diferentes coordenadas, luego a nada que uno de ellos sea distinto de cero, existirá una fuerza magnética no nula actuando sobre las MNPs. En los experimentos que realizamos no distinguimos zonas de estudio dentro de la diagonal, por lo que no podemos corroborar la magnitud de la fuerza en cada zona y compararlas.

Construcción del primer aplicador

El soporte final quedó de la siguiente manera:

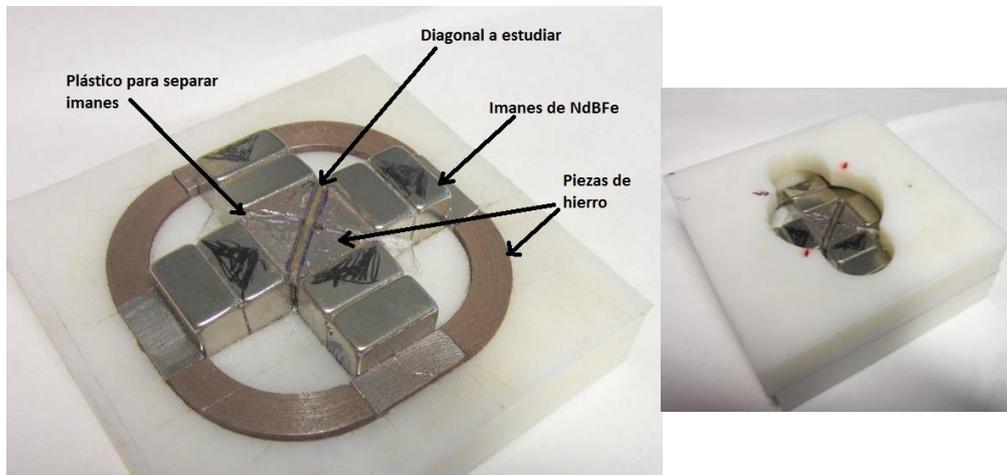


Figura 14. Primer soporte de imanes

En la imagen comprobamos que el aplicador tiene además una "tapa" superior que permite fijar la posición de la placa de Petri (placa de 3 cm de diámetro donde crece el cultivo celular). Es importante que la placa no se mueva en todo el experimento, puesto que teniendo en cuenta el tamaño micrométrico de las células, cualquier mínima variación de la posición del frasco con respecto al aplicador de imanes resultará en una fuerza de magnitud diferente actuando sobre las células.

Aunque el propósito del anillo de hierro era que no se escapasen líneas de flujo, al colocar el aplicador sobre una superficie metálica se notaba cierta atracción, lo que hacía pensar que se escapaban más líneas de flujo de las deseadas. Este efecto se debe probablemente a que los imanes sobresalían con respecto a las piezas de hierro que debían reconducir el flujo, luego parte del mismo se perdía en todas las direcciones del espacio.

Comprobamos la efectividad del diseño estudiando el comportamiento de una pequeña cantidad de ferrofluido (MNPs de hierro disueltas en agua) dentro de una placa de Petri, recipiente que utilizaremos para cultivar y estudiar las células Bv2 con este soporte de imanes

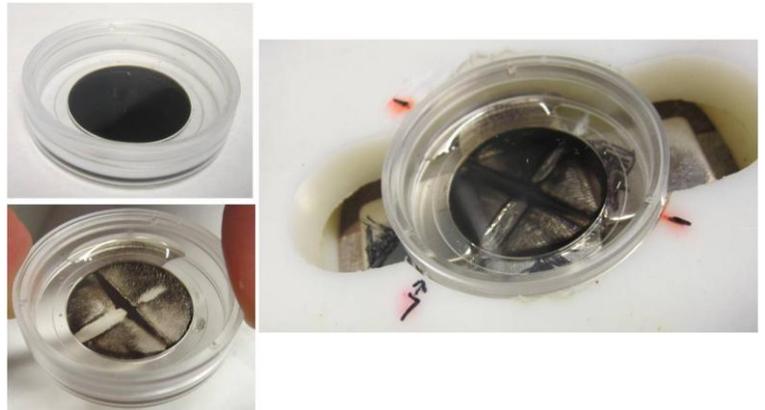


Figura 15. Ferrofluido sometido a soporte de imanes

En la figura última observamos cómo dos imanes o las piezas triangulares de hierro anexas a ellas están en contacto cuando en teoría no deberían estarlo, puesto que la diagonal perpendicular a la de estudio debería estar vacía de ferrofluido (puesto que no la atraviesan líneas de campo) y se observan MNPs en un extremo de la misma.

En un principio usamos una placa de Petri graduada. Queríamos valernos de las marcas para comparar el crecimiento de grupos concretos de células. Sin embargo, estas placas no funcionaron bien puesto que los grabados se encontraban en su superficie interior, la misma a la que se pegaban las células, con lo que éstas tendían a colocarse a lo largo de las marcas. Al mirar la muestra al microscopio se observaban células coincidiendo con las líneas y ello dificultaba la distinción de sus prolongaciones. Además, comprobamos que en una noche las células se desplazaban mucho, por lo que era difícil estudiar la evolución de una célula individual o de un grupo de células concreto, puesto que sus posiciones variaban mucho.

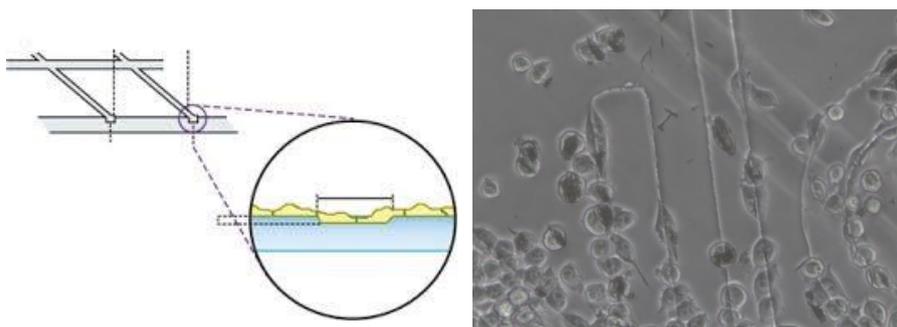


Figura 16. Placa de Petri graduada en su superficie interna

SEGUNDO APLICADOR DE IMANES

Diseño del segundo aplicador

Habíamos detectado fallos en el primer diseño de imanes: se escapaba una cantidad no despreciable de flujo magnético del anillo y dos piezas supuestas separadas estaban en contacto, por lo que los valores del campo en la zona de estudio eran menores que los estimados. Procedimos por tanto a diseñar un nuevo soporte. Utilizamos imanes de NdFeB cúbicos, de 12x12x8 mm. La simulación con FEMM fue la siguiente:

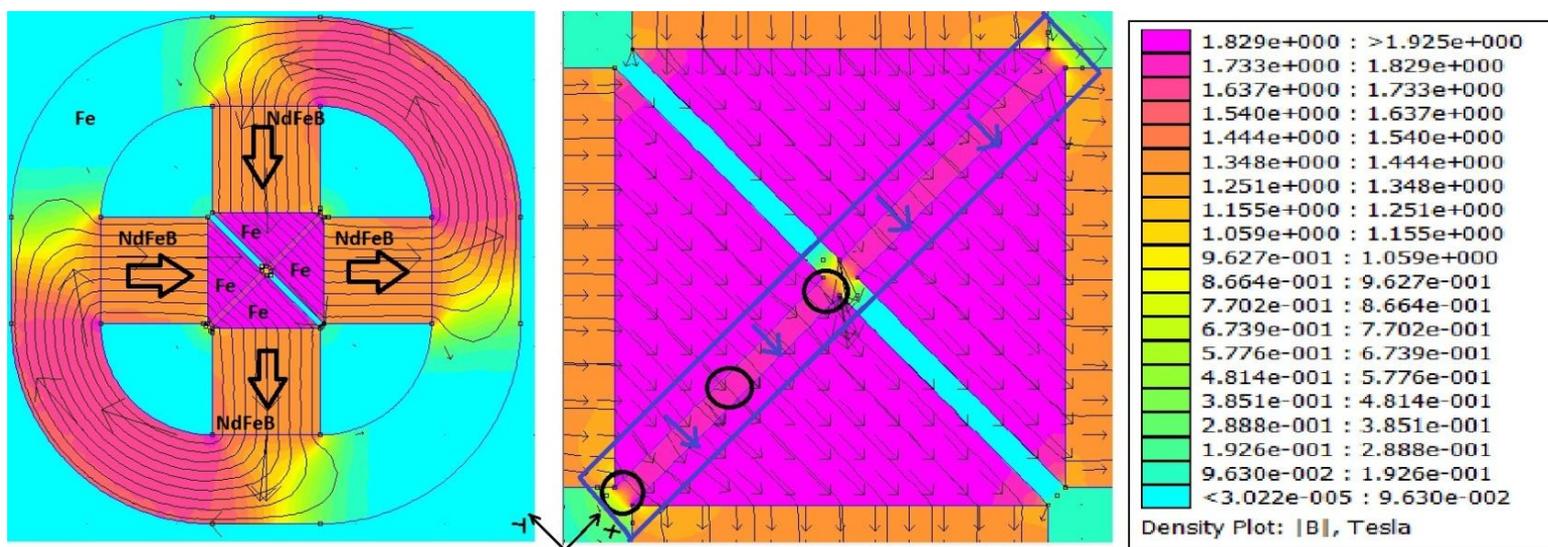


Figura 17. Segundo soporte de imanes nuevo

Los materiales con los que fue diseñada esta simulación fueron los mismos que para el anterior (hierro puro e imanes de NdFeB).

Se aumentó la anchura del anillo de hierro para asegurar que no se escapase, en teoría, ninguna línea de campo.

Los valores del campo magnético en el eje Y para diferentes posiciones de X (marcadas en la figura 22) correspondientes al inicio ($x=0$) de la semidiagonal, mitad y final de la misma ($x=4.24$ y 8.48 mm) y los valores del campo en el eje X para $Y=0$ se muestran en las gráficas siguientes:

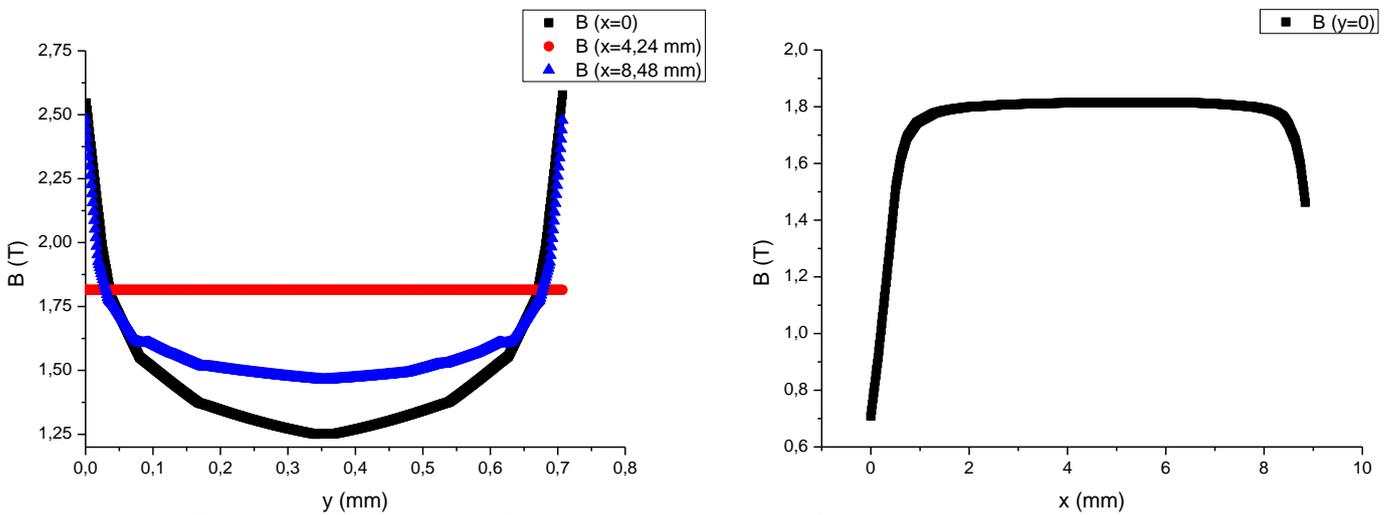


Figura 18. Campos según los ejes X e Y para diferentes posiciones en el montaje de imanes segundo

Comparando estas gráficas con las de la figura 12 del primer soporte de imanes vemos que el módulo del campo magnético ha aumentado en todos los casos en 0,5 T. En el eje X el campo es prácticamente uniforme y de valor 1,8 T. En el eje Y, para las posiciones marcadas en la figura y especificadas en la gráfica, tiene valores algo menos uniformes de 1,25, 1,55 y 1,75 T. La diagonal en la que nos centramos para estudiar la orientación de las células tiene la misma anchura que el diseño primero, puesto que proporcionaba un área óptima para el estudio de la dirección de las ramificaciones y permitía hacer estadística de sus ángulos con respecto al campo. Para mantener la anchura de la diagonal hubo que acortar en unos milímetros la longitud de la misma, debido al menor tamaño de los nuevos imanes.

Representamos, para las posiciones X marcadas en la figura 17, los valores del gradiente del campo en los dos ejes:

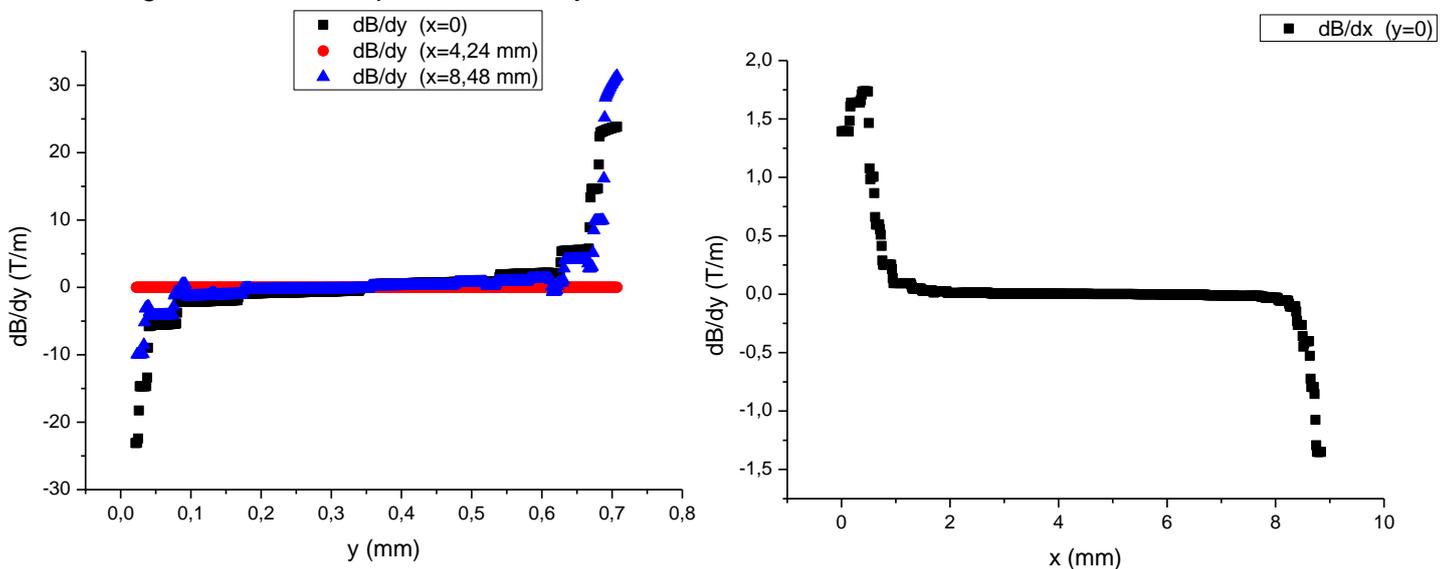


Figura 19. Valores de las derivadas del campo con la posición

Observamos que tienen formas parecidas y alcanzan valores prácticamente iguales a los logrados con el montaje anterior.

Construcción segundo aplicador

El soporte final quedó:

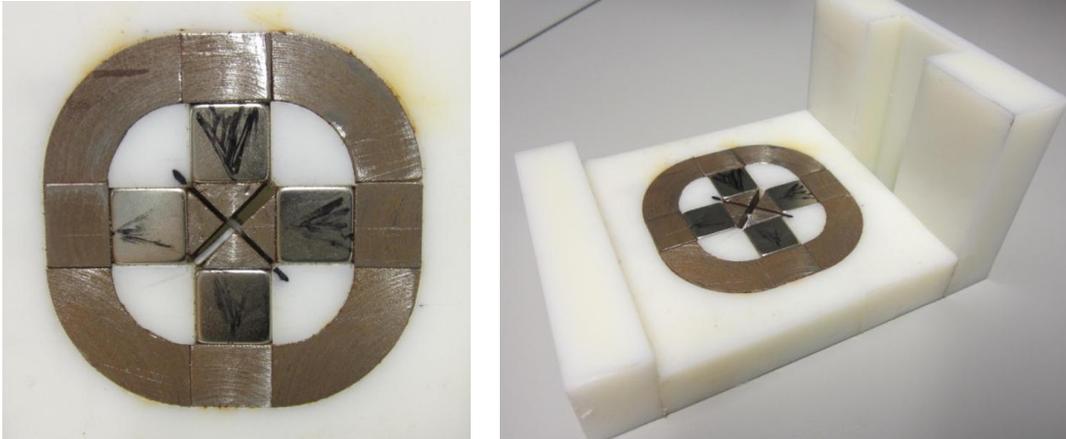


Figura 20. Segundo soporte de imanes

La estructura de poliamida 6 (nylon) que se muestra en la figura sirve para fijar la botella T25 (botellas donde se mantienen y crecen cultivos celulares) y evitar que cambie de posición antes y después de realizar fotografías al microscopio y a la hora de manipularlo introduciéndolo y sacándolo de la estufa.

En esta ocasión, para separar las piezas triangulares de hierro que se atraen debido al sentido del campo en la diagonal de estudio, empleamos una delgada lámina de teflón de anchura 0,8 mm. Preferimos no volver a usar latón puesto que, aunque no presenta comportamiento magnético, se trata de un metal, por lo que podría, aunque de manera muy leve, imanarse. Con el empleo del plástico nos aseguramos de que esto no sucederá.

Observamos, como hemos comentado, que la altura del aplicador es homogénea, por lo que suponemos que se perderán menos líneas de flujo con respecto al diseño anterior y lo comprobamos dejándolo sobre una superficie metálica. Sigue mostrando atracción, pero mucha menos en comparación con el soporte primero.

Hacemos de nuevo la prueba con el ferrofluido para comprobar que la dirección de las líneas de flujo magnético se corresponden con el diseño:



Figura 21. Prueba con ferrofluido para comprobar la dirección de las líneas de campo

Comprobamos en la imagen que las NPs disueltas se concentran en la diagonal a estudiar, signo indicativo de que esa zona es en la que más densidad de líneas de campo hay, por lo que la intensidad de campo magnético será mayor. Comprobamos también que en la diagonal perpendicular, en la que debería haber un valor de campo nulo, no se acumulan partículas magnéticas. Concluimos por tanto que hemos mejorado el diseño del aplicador de campo.

Es imprescindible que el T25 esté en contacto directo con el aplicador, para que lleguen a él (y por tanto también a las células pegadas a la base) el mayor número de líneas de campo magnético. Los T25 presentan en los límites de la base unos salientes, los cuales tuvimos que lijar para que el matraz tocara el montaje de imanes.

RESULTADOS

A través del microscopio óptico se apreciaban dentro del núcleo celular zonas más oscuras y alineadas en el sentido del campo que relacionamos con las MNPs que la célula había ingerido. Sin embargo, para comprobar si las ramificaciones presentaban igualmente MNPs se requería un estudio con el Focused Ion Beam. A continuación se muestran imágenes tomadas con este microscopio de una célula que presentaba una prolongación relativamente ancha y que estaba localizada en una zona que parecía ser la que había estado sometida al imán, puesto que se observaba una orientación preferente de los cúmulos de MNPS (figura 22). Los portales sobre los que se fijan las muestras son muy delicados y tienen muchos y diferentes productos químicos, por lo que no es posible marcarlos para luego detectar con facilidad el área sobre la que se aplicó el campo magnético. En un primer momento realizamos una espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDX) en diferentes zonas de la ramificación y al encontrar en dos de ellas hierro, procedimos a cortarlo, para encontrar las MNPS:

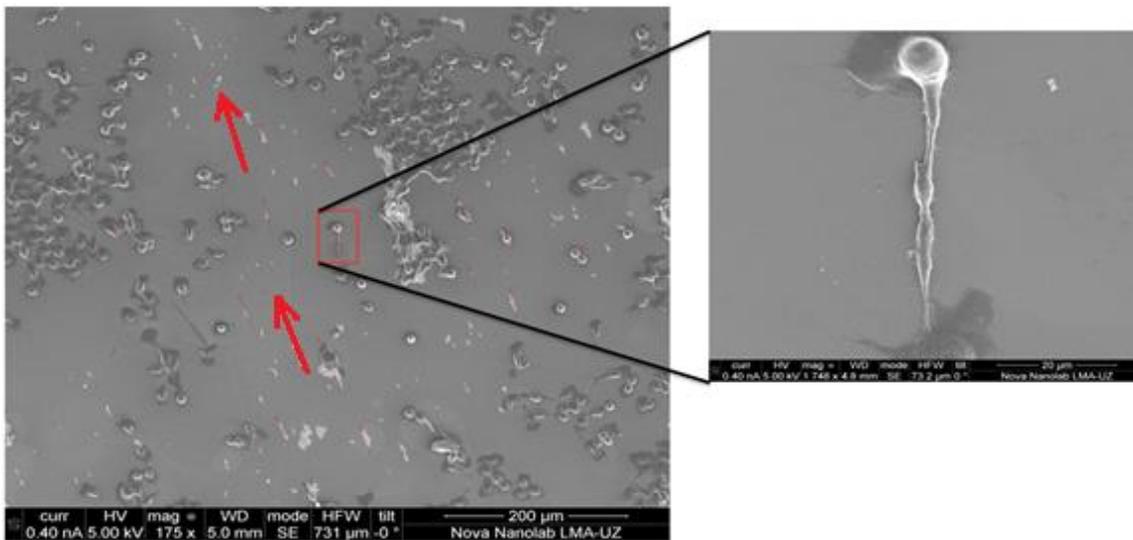
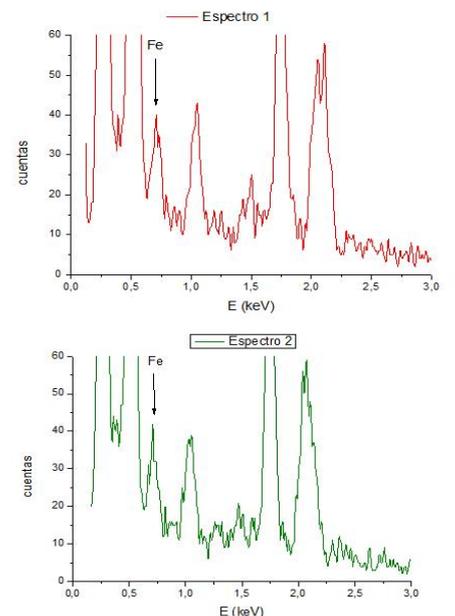
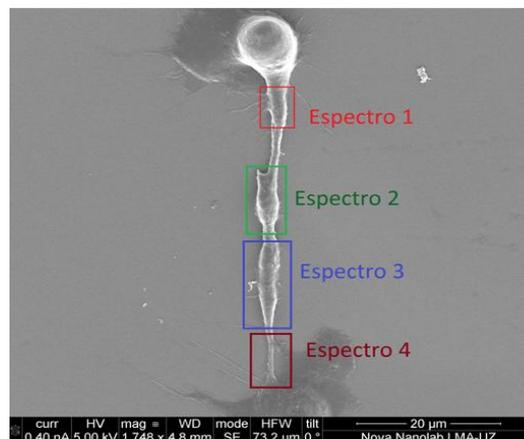


Figura 22. Localización de una prolongación celular orientada

Figura 23. Espectrometría de dispersión de energía de rayos X



Distinguimos en los dos espectros los picos correspondientes a la transición L del hierro, con una energía:

$$(L_{\alpha})_{Fe} = 0.7048 \text{ keV}$$

Los picos de menores energías que aparecen cortados se corresponden a las transiciones K del carbono y el oxígeno (su presencia es abundante en organismos vivos), con energías:

$$(k_{\alpha})_C = 0.2774 \text{ keV}$$

$$(k_{\alpha})_O = 0.5249 \text{ keV}$$

Aparecen además en el espectro picos correspondientes a elementos como el silicio, circonio o platino empleados en los procesos de recubrimiento de la muestra que se llevaron a cabo para fijarla. También hay sodio, presente en el interior celular.

Procedimos a cortar la prolongación de la célula para encontrar esas MNPs en su interior y las medimos, corroborando que se trataba de las MNPs con las que habíamos incubado las células, cubos de magnetita de tamaño medio 40nm:

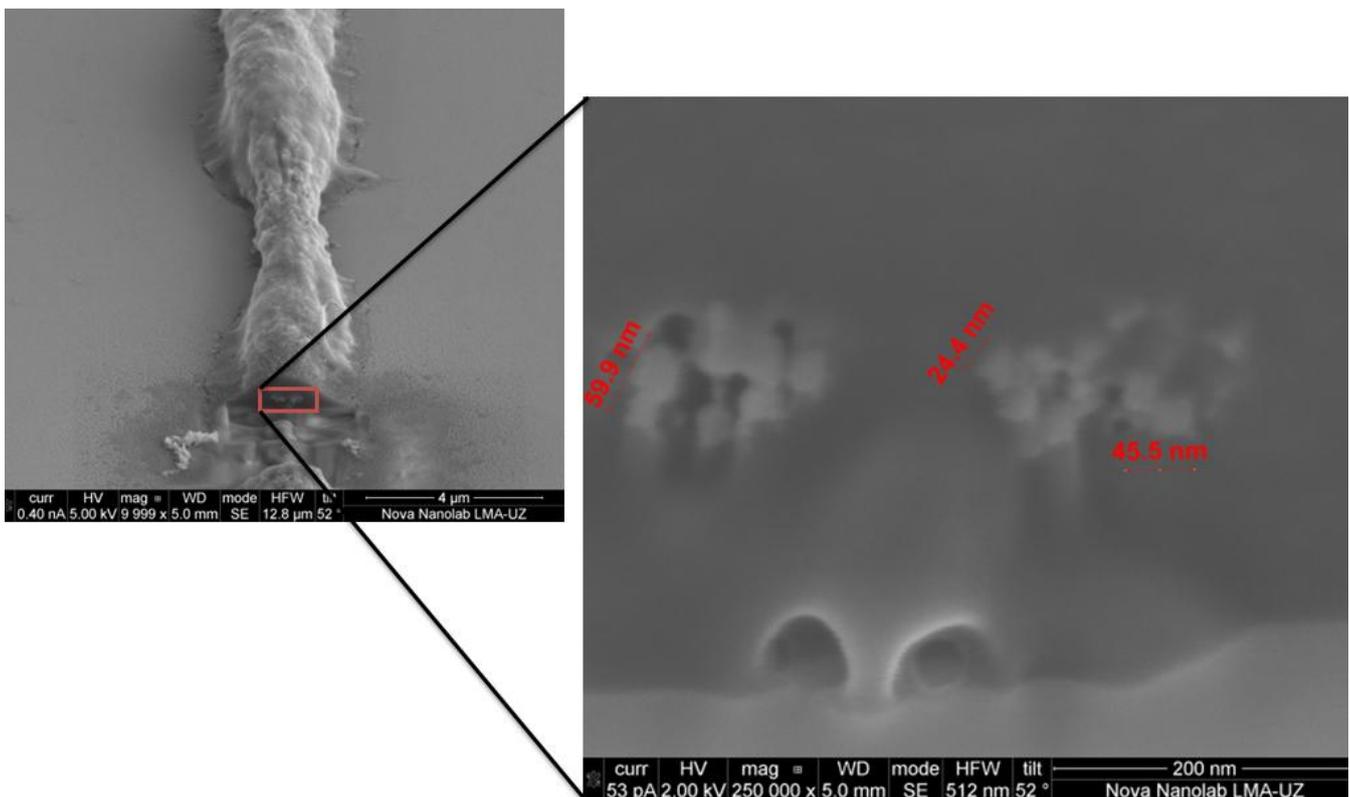


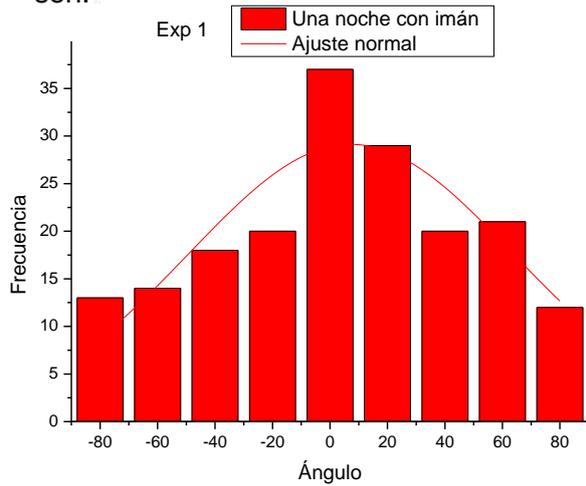
Figura 24. Localización de MNPs en el interior de una ramificación

Con cada uno de los dos aplicadores de imanes que primero diseñamos y luego construimos para realizar este TFG realizamos dos experimentos. En cada experimento se midió la orientación de las células con MNPs tras una y dos noches de incubación del cultivo celular con el soporte de imanes. Por tanto, tenemos un total de 4 experimentos diferentes. Analizaremos los resultados obtenidos en cada uno y en el apartado Discusión los compararemos y veremos la evolución de los mismos.

RESULTADOS APLICADOR 1

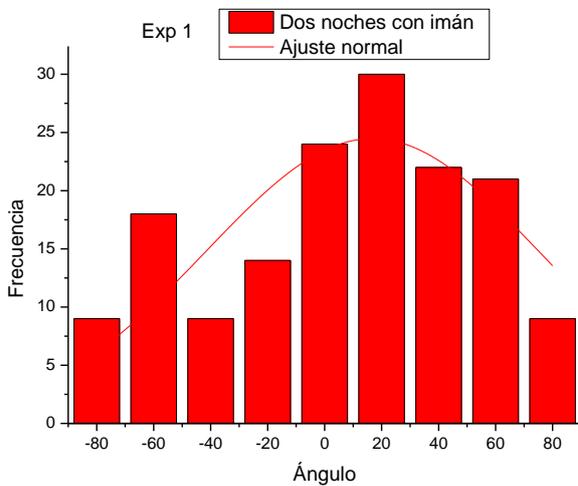
Resultados y discusión del experimento 1

El primer experimento se realizó con el aplicador de imanes mostrado en la figura 14 y con una placa de Petri graduada (figura 16). Los resultados para una y dos noches de incubación con imán, con los respectivos parámetros del ajuste gaussiano son:



Model	Gauss		
Equation	$y=y_0 + (A/(w*\sqrt{\pi/2}))*\exp(-2*((x-x_c)/w)^2)$		
Reduced Chi-Sqr	25,28289		
Adj. R-Square	0,61269		
		Value	Standard Error
Count	y0	0	0
	xc	7,26921	6,79482
	w	112,70771	16,92516
	A	4114,52023	479,36122
	sigma	56,35386	
	FWHM	132,70319	
	Height	29,12766	

Figura 25. Histograma y ajuste de los datos del experimento 1 tras 1 noche con imán



Model	Gauss		
Equation	$y=y_0 + (A/(w*\sqrt{\pi/2}))*\exp(-2*((x-x_c)/w)^2)$		
Reduced Chi-Sqr	33,59673		
Adj. R-Square	0,41571		
		Value	Standard Error
Count	y0	0	0
	xc	16,74514	10,17368
	w	116,3754	25,3843
	A	3568,83723	605,86713
	sigma	58,1877	
	FWHM	137,02156	
	Height	24,4684	

Figura 26. Histograma y ajuste de los datos del experimento 1 tras 2 noches con imán

Observamos que el primer histograma se ajusta mejor con lo esperado. El fitting gaussiano está centrado en $x_c = 7.27^\circ$, luego la mayoría de las células se han orientado en el sentido del campo magnético (aproximadamente paralelas a él, con un ángulo en torno a 0°). El segundo histograma presenta frecuencias de aparición mayores para ángulos de alrededor de 20° , vemos que está centrado en $x_c = 16.74^\circ$. Ambos ajustes tienen desviaciones estándar parecidas, de $\sigma = 56.35$ y $\sigma = 56.35$. Recordamos que la distribución normal tiene una desviación estándar típica de 34 y es entonces cuando decimos que el 68% de la distribución se encuentra en el intervalo

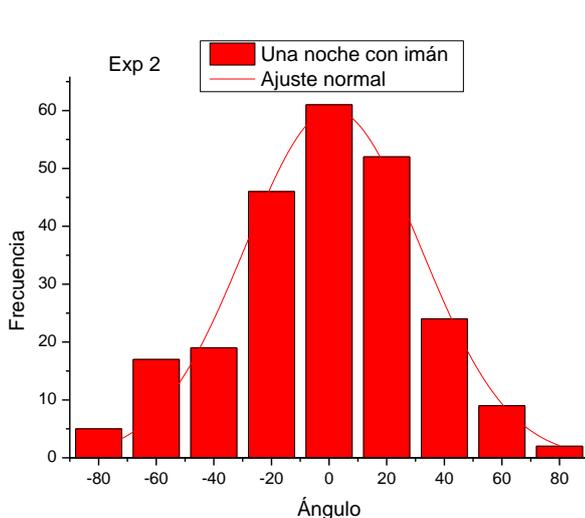
$[x_c - \sigma, x_c + \sigma]$. Tenemos por tanto unas desviaciones algo altas que esperamos que disminuyan para experimentos siguientes.

Factores a mejorar del experimento 1

Como ya habíamos comentado, tuvimos problemas con las placas de Petri graduadas del experimento. Resultaba en ocasiones difícil distinguir las prolongaciones celulares de las líneas grabadas en la base del matraz. Además, el crecimiento de las células Bv2 no fue el óptimo en estos recipientes, ya que apenas desarrollaron ramificaciones. Se observó también una gran densidad de células en la segunda medición (tras la segunda noche), que sumado al problema de las marcas de grabado, dificultó la localización de las prolongaciones para tomar fotografías de las mismas. Consideramos que de ahí se deriva que el segundo histograma tenga un peor ajuste. Sin embargo, conviene comprobar que este hecho no se repite, puede que la orientación de las células sea más efectiva a corto que a largo plazo.

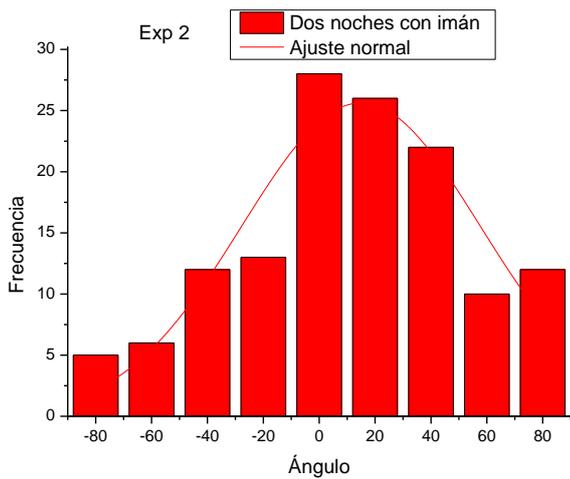
Resultados y discusión del experimento 2

Repetimos el experimento con el mismo aplicador de imanes pero esta vez con una placa de Petri no graduada. Queremos probar si, mejorando las condiciones que fallaron en el experimento anterior, conseguimos disminuir el valor de la desviación estándar del ajuste normal de la distribución de los ángulos. En esta ocasión cultivamos una pequeña cantidad de células desde el viernes, que estuvieron en incubación (sin NPs) todo el fin de semana, para así adelantar un día el proceso, por lo que pudimos hacer tres días de mediciones (fotografías), con sus correspondientes análisis de la orientación celular con el campo. Los resultados fueron:



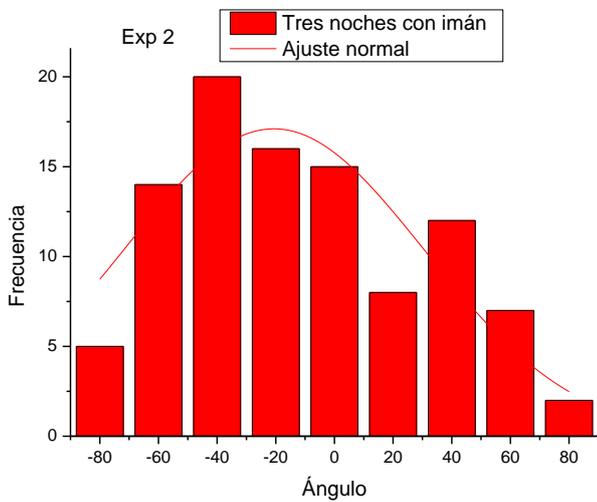
Model	Gauss		
Equation	$y=y_0 + (A/(w*\sqrt{\pi/2}))\exp(-2*((x-x_c)/w)^2)$		
Reduced Chi-Sqr	22,13795		
Adj. R-Square	0,95266		
		Value	Standard Error
Count	y0	0	0
	xc	1,297	2,05058
	w	60,83093	4,10729
	A	4583,9576	267,77455
	sigma	30,41547	
	FWHM	71,62295	
	Height	60,12515	

Figura 27. Histograma y ajuste de los datos del experimento 2 tras 1 noche con imán



Model	Gauss		
Equation	$y=y_0 + (A/(w*\sqrt{PI/2}))*\exp(-2*((x-xc)/w)^2)$		
Reduced Chi-Sqr	15,13348		
Adj. R-Square	0,78643		
		Value	Standard Error
Count	y0	0	0
	xc	14,94926	4,86147
	w	85,44392	10,49981
	A	2743,98432	278,05678
	sigma	42,72196	
	FWHM	100,60253	
	Height	25,62362	

Figura 28. Histograma y ajuste de los datos del experimento 2 tras 2 noches con imán



Model	Gauss		
Equation	$y=y_0 + (A/(w*\sqrt{PI/2}))*\exp(-2*((x-xc)/w)^2)$		
Reduced Chi-Sqr	11,81451		
Adj. R-Square	0,65505		
		Value	Standard Error
Count	y0	0	0
	xc	-20,61476	7,73592
	w	102,42177	18,01549
	A	2195,93929	306,52109
	sigma	51,21088	
	FWHM	120,59241	
	Height	17,10677	

Figura 29. Histograma y ajuste de los datos del experimento 2 tras 3 noches con imán

En un análisis cualitativo previo de los histogramas concluimos que el primero vuelve a ser el que mejor resultados da.

Comprobamos, con la ayuda de los parámetros del ajuste normal, que la distribución para el primer día está centrada en $x_c = 1.30^\circ$, que es prácticamente 0° y la desviación estándar es de $\sigma = 30.42$. Estos resultados son sorprendentemente buenos. Sin embargo, los de la segunda noche son peores: $x_c = 14.95^\circ$ y $\sigma = 42.72$. Siguen empeorando con el paso del tiempo, puesto que tenemos que los de la tercera noche son: $x_c = -20.61^\circ$ y $\sigma = 51.21$. El segundo día de análisis había un número de células muy elevado que dificultaba la extensión de sus ramificaciones y, por tanto, el estudio al microscopio.

Factores a mejorar del experimento 2

Para el siguiente experimento debíamos probar con una cantidad de células bastante menor, pero recordamos que debía ser lo suficientemente grande como para que las células no se encontrasen aisladas y pudieran interactuar entre sí.

Con los dos primeros experimentos pudimos comprobar que las células crecían mal en las placas de Petri, no desarrollaban sus ramificaciones. De manera simultánea estábamos realizando un experimento paralelo con el aplicador de imanes empleado el año anterior y en él hacíamos crecer las células en T25 (capacidad de 25 cm²). Los resultados del crecimiento de las Bv2 en los T25 eran mucho mejores. Esto puede deberse a que la composición o rugosidad del material con el que están fabricados ambos fuera diferente. Decidimos por tanto hacer otro diseño del soporte de imanes que requiriese el uso del T25 como recipiente para el cultivo celular:



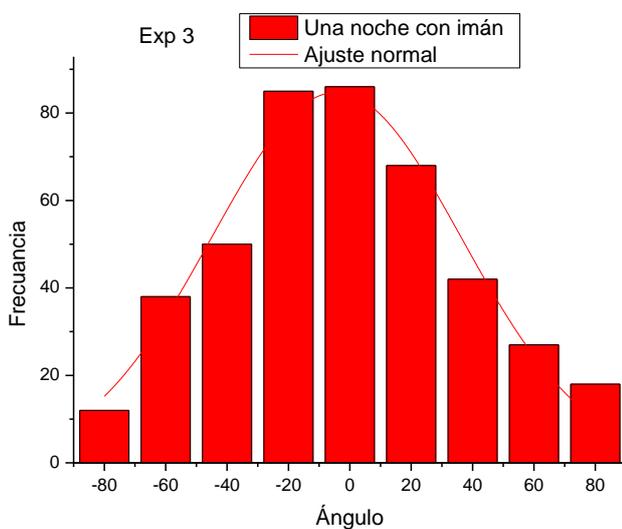
Figura 30. Frasco empleado en los experimentos con el segundo montaje de imanes

RESULTADOS APLICADOR 2

Con este segundo aplicador volvimos a llevar a cabo otros dos experimentos, volviendo a observar y a analizar la orientación de las células con MNPs tras una y dos noches de incubación con imán.

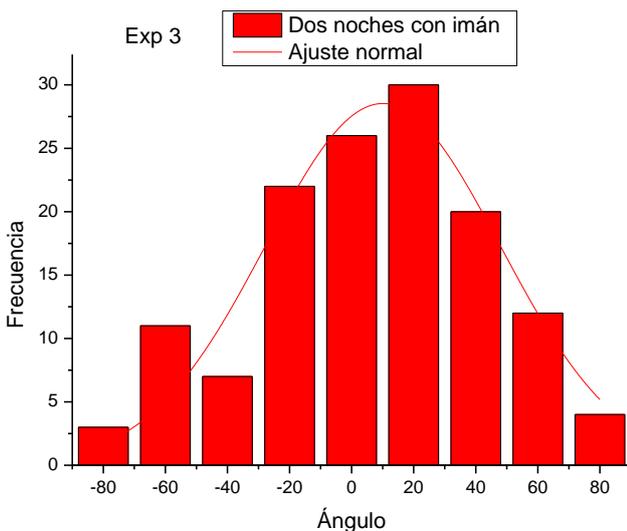
Resultados y discusión del experimento 3

Tras una y dos noches de incubación de las células sobre el aplicador de imanes se toman fotografías y del análisis de su orientación salen los siguientes histogramas:



Model	Gauss		
Equation	$y=y_0 + (A/(w*\sqrt{\pi/2}))\exp(-2*((x-xc)/w)^2)$		
Reduced Chi-Sqr	39,75438		
Adj. R-Square	0,94687		
		Value	Standard Error
Count	y0	0	0
	xc	-4,37086	2,28081
	w	81,58674	4,7642
	A	8663,98387	426,03266
	sigma	40,79337	
	FWHM	96,06105	
	Height	84,73018	

Figura 31. Histograma y ajuste de los datos del experimento 3 tras 1 noche con imán



Model	Gauss		
Equation	$y=y_0 + (A/(w*\sqrt{\pi/2}))\exp(-2*((x-xc)/w)^2)$		
Reduced Chi-Sqr	11,9771		
Adj. R-Square	0,87621		
		Value	Standard Error
Count	y0	0	0
	xc	10,07795	3,57205
	w	75,70162	7,36832
	A	2706,8652	223,59097
	sigma	37,85081	
	FWHM	89,13185	
	Height	28,52998	

Figura 32. Histograma y ajuste de los datos del experimento 3 tras 2 noches con imán

Observamos que una vez más se obtiene un resultado que concuerda mejor con lo esperado la primera noche que la segunda. Comparamos los parámetros del

ajuste: el primer histograma está mejor centrado aunque tiene una desviación estándar algo mayor: $x_c = -4.37^\circ$ y $\sigma = 40.79$, mientras que el pico del segundo está más alejado del 0 pero tiene una desviación menor: $x_c = 10.08^\circ$ y $\sigma = 37.85$. Recordamos que en los experimentos anteriores hablábamos de desviaciones estándar de 50 y ahora rondan el valor de 40.

Factores a mejorar del experimento 3

Para realizar este experimento cambiamos el frasco de cultivo, pasamos de usar placa de Petri a una botella T25. Volvimos a tener problemas de concentración excesiva de células. En muchas de las fotografías tomadas en este experimento y sobre todo en las medidas tras la segunda noche, no podrían diferenciarse y localizar prolongaciones celulares, por lo que las fotografías quedaban invalidadas y el número de sucesos a analizar se veía menguado. Reduciríamos, para el próximo experimento, la concentración de células a cultivar, esperando que las ramificaciones creciesen más y mejor.

Resultados y discusión del experimento 4

Es el último experimento que realizamos. Sembramos una cantidad menor de células, con lo que éstas crecieron mejor y el análisis de la orientación de sus prolongaciones fue más fácil y efectivo. Los resultados que obtuvimos de las orientaciones tras una y dos noches de incubación fueron:

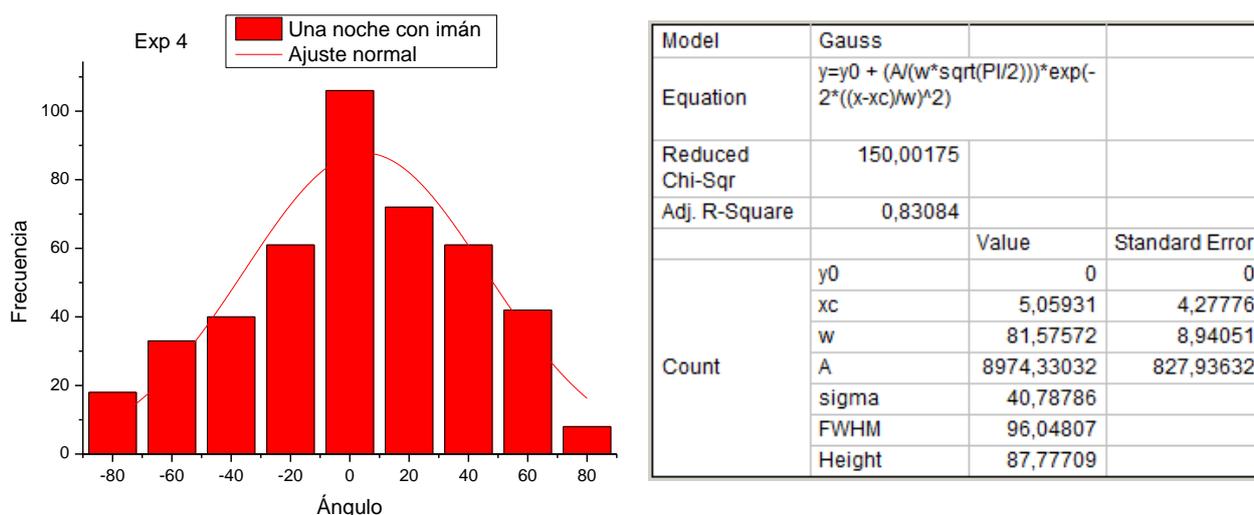
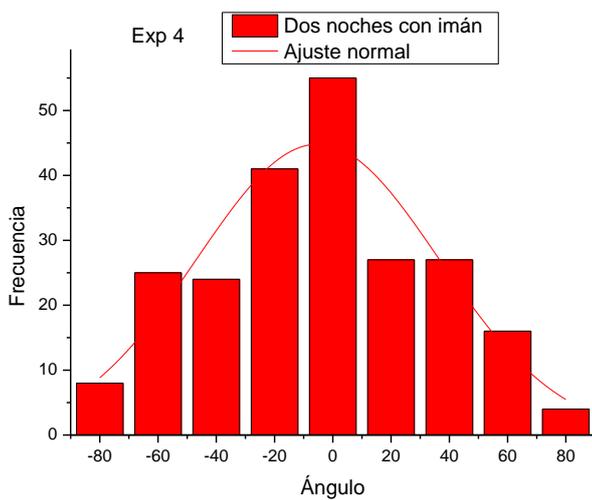


Figura 33. Histograma y ajuste de los datos del experimento 4 tras 1 noche con imán



Model	Gauss		
Equation	$y=y_0 + (A/(w*\sqrt{\pi/2}))*\exp(-2*((x-x_c)/w)^2)$		
Reduced Chi-Sqr	54,99435		
Adj. R-Square	0,7773		
		Value	Standard Error
Count	y0	0	0
	x _c	-5,15243	5,13024
	w	83,05118	10,78633
	A	4663,30309	507,95004
	sigma	41,52559	
	FWHM	97,78529	
	Height	44,80102	

Figura 34. Histograma y ajuste de los datos del experimento 4 tras 2 noches con imán

Observamos que la frecuencia de aparición de prolongaciones de células con orientación paralela al campo (0°) es la que más destaca en ambos histogramas. Además, los dos están centrados prácticamente en el cero. Los parámetros del ajuste para cada uno de los histogramas son, para el primero: $x_c = 5.06^\circ$ y $\sigma = 40.79$ y para el segundo: $x_c = -5.15^\circ$ y $\sigma = 41.53$. Luego vemos que los picos tienen una desviación mínima del centro ($0 \pm 5^\circ$) y las desviaciones estándar no se alejan mucho del típico $\sigma = 34$ de la gaussiana. Seguimos con desviaciones en torno a 40 frente a 50 de los experimentos realizados con el otro montaje de imanes.

DISCUSIÓN

Es importante hacer controles paralelos a los experimentos, para así comparar cómo crecen las células y cuál es su orientación si están o no sometidas a los efectos de un imán o si tienen o no MNPs en su interior. Debemos tener un cultivo de referencia para comprobar si los cambios introducidos producen modificaciones apreciables en las células. Recordamos que en los experimentos las muestras eran células con MNPs sometidas a campo magnético. Así, es necesario hacer los siguientes controles:

- Células con MNPs sin campo
- Células sin MNPs sin campo
- Células sin MNPs con campo

No dio tiempo a realizar este último control, puesto que requería el uso del aplicador y ello impedía que pudiera llevarse a cabo un experimento para estudiar la orientación de las células esa misma semana. Sin embargo, partiendo de que la célula *per se* no tiene componentes que presenten comportamientos magnéticos, deducimos que su respuesta al campo será nula o, a lo sumo, no apreciable. Los resultados de los experimentos del TFM del año pasado corroboran este resultado, por lo que lo supondremos válido también para el nuestro. No obstante hay estudios que presentan datos contrarios, exponiendo que las células se orientan perpendiculares al campo [21]. Puesto que las medidas experimentales llevadas a cabo el pasado año en el INA no daban prueba de esta orientación, no la tomaremos como válida.

Mostramos los resultados de uno solo de cada uno de los controles que realizamos, ya que todos ellos tuvieron resultados equivalentes: las ramificaciones de las células que no se exponen a los efectos de un campo magnético, independientemente de que hayan o no ingerido MNPs, presentan orientaciones *random* o aleatorias, sin existir una dirección preferente:

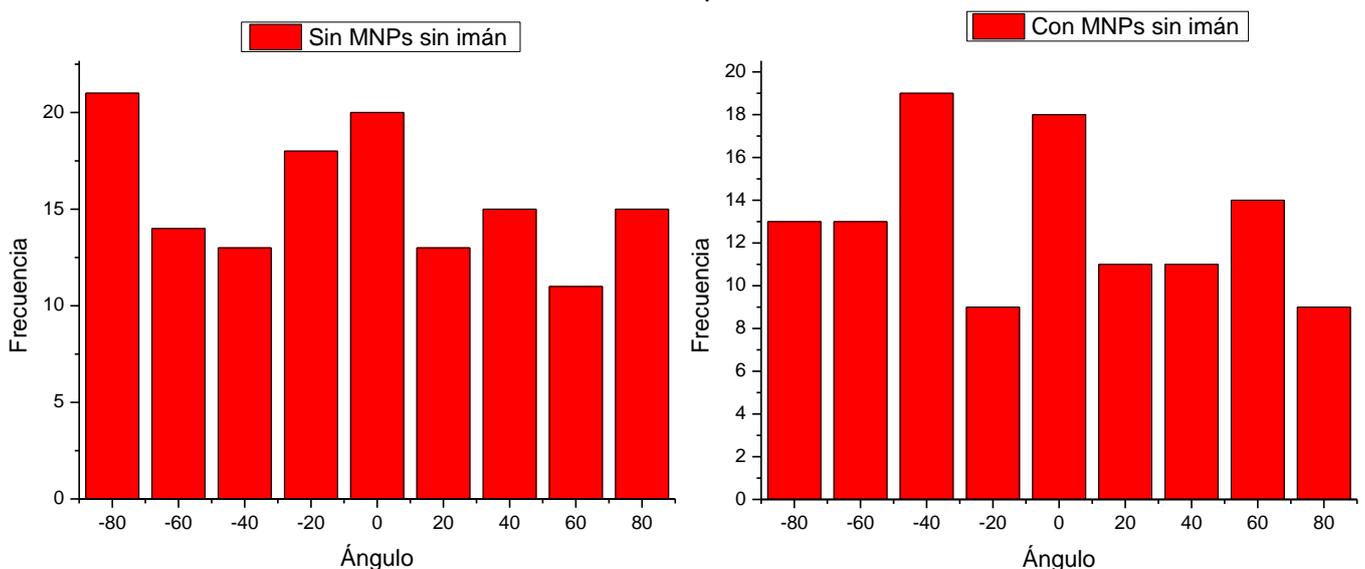


Figura 35. Controles del experimento

No tiene sentido realizar un ajuste normal de estas gráficas puesto que la distribución es continua y uniforme: no existe una dirección preferente.

Con estos controles comprobamos que las MNPs no afectan a la orientación de una célula que no está bajo influencia de un campo magnético. De igual modo vimos que el campo magnético propiciaba el crecimiento de prolongaciones en las células, siempre y cuando tuvieran MNPs en su interior.

Para tener una visión global de la evolución de los resultados de los experimentos agrupamos los histogramas (mostrados todos en la página siguiente) y los parámetros relevantes de sus ajustes. En total tenemos 4 experimentos, tres de ellos con dos tandas de datos y otro con tres.

Compararemos los valores del pico de la gráfica o centro de la distribución gaussiana y los valores de la desviación estándar de la misma:

		Centro	Desv. Estándar
Exp 1	Una noche	7,27	53,35
	Dos noches	16,75	58,19
Exp 2	Una noche	1,3	30,42
	Dos noches	14,95	42,72
	Tres noches	-20,61	51,21
Exp 3	Una noche	-4,37	40,79
	Dos noches	10,08	37,85
Exp 4	Una noche	5,06	40,79
	Dos noches	-5,15	41,53

Tabla 1. Valores de los parámetros relevantes de los ajustes de los histogramas

Vemos que el centro del ajuste se aleja del cero conforme avanza el número de noches que las células pasan bajo el imán. A su vez la desviación estándar se hace más grande, ensanchándose en las gráficas la función distribución de los ángulos. Definitivamente, salen mejores resultados en las primeras noches. Lo comprobamos agrupando todos los histogramas para apreciar a simple vista la evolución de los resultados de los diferentes experimentos:

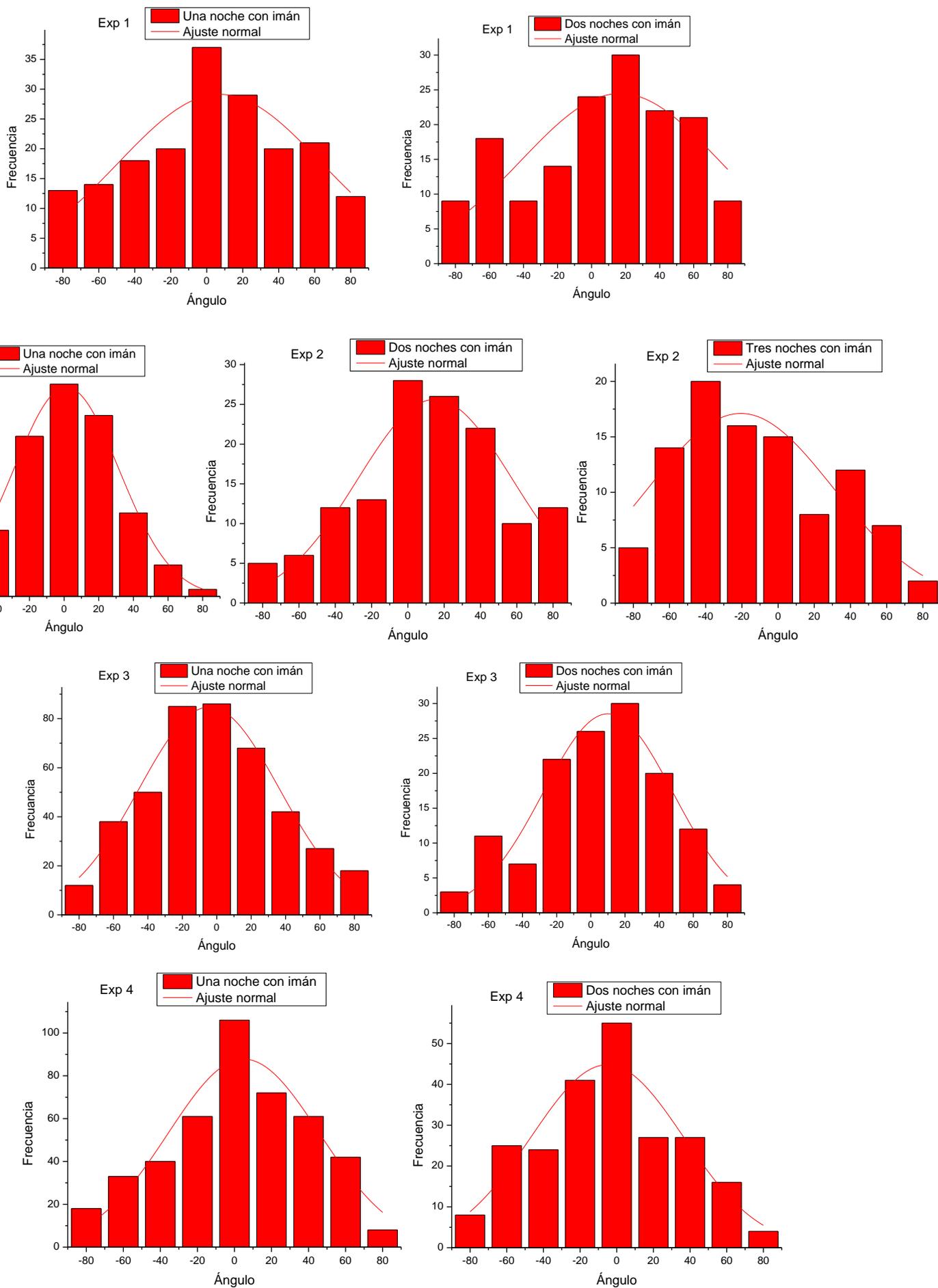


Figura 36. Histogramas de la orientación de las células con MNPs sometidas a campo tras cada noche de cada experimento

Observando las gráficas comprobamos que, dentro de un mismo experimento, las células se alinean mejor con el campo tras la primera noche, notándose peores orientaciones en las noches sucesivas. Como ya hemos comentado, esto puede deberse a errores en el tratamiento de los datos, relacionados con la gran cantidad de células que se observaba tras la segunda noche. De hecho, fijándonos en los ejes de ordenadas de las gráficas, podemos comprobar que el número total de sucesos analizados para un mismo experimento disminuye en la segunda (y tercera) noche(s) con respecto a la primera (y segunda). Las zonas de aglomeraciones de células eran mayores y más numerosas conforme éstas crecían y se reproducían. Así, el número de ramificaciones analizadas en esos experimentos era menor y ello lleva a fluctuaciones estadísticas debidas a un bajo número de sucesos. No debemos descartar, sin embargo, la posibilidad de que sea un comportamiento típico de las células y que verdaderamente presenten algún mecanismo biológico de respuesta a un campo magnético. Puede que la estadística que hemos hecho haya sido suficiente y que los resultados reflejen correctamente la respuesta celular al campo magnético.

Si nos fijamos en la evolución de las distribuciones vemos que hay una disminución de la desviación estándar conforme mejorábamos las condiciones de los experimentos. Podemos por tanto decir que el desarrollo de los experimentos ha resultado positivo. No obstante, para concluir que las condiciones (concentración de células, matraz de cultivo y soporte de imanes empleados) en las que se ha realizado el último experimento son las idóneas, habría que repetir las más veces y ver si los resultados siguen siendo buenos. Además, convendría volver a realizar los experimentos con otra línea celular diferente (se emplean con frecuencia las PC12) y con MNPs de distinto material (cobalto, por ejemplo) para corroborar la bondad de los resultados.

Existen distintas hipótesis que puedan justificar la orientación celular tras su exposición a un campo magnético. Hay artículos que exponen que las células (sin NPs) bajo efecto de un campo tienden a orientarse perpendiculares al mismo, debido a la polaridad de la interacción microtúbulo-actina, a gradientes de iones que aparecen en su interior y a la acción conjunta de diversas proteínas y factores de adhesión [18, 19, 21]. Otra idea personal puede ser la de que existan mecanismos biológicos en el interior del organismo por los que éste se oponga a la modificación de su estado, puesto que una célula (y en concreto, también sus ramificaciones) crece en una determinada dirección por motivos específicos de alimento, efectos de cargas, interacción con otras células... Podemos suponer (seguimos haciendo hipótesis) que ante un campo magnético de módulo alto las MNPs se orientan antes de que estos procesos se activen, por lo que tras una noche obtenemos buenos resultados de la orientación de las células con el campo, pero van empeorando conforme esos mecanismos van cobrando fuerza.

Podemos concluir finalmente que las prolongaciones de las células con MNPs se orientan de manera apreciable en el sentido del campo. El mecanismo mediante el cual se orientan sigue sin ser claro hoy en día. Se conoce, como hemos dicho, que la fuerza magnética que actúa sobre las MNPs de la ramificación induce procesos biomecánicos en su interior. Se dan entonces de manera simultánea muchos y complicados procesos que requieren altos conocimientos de biología molecular o celular. Desde nuestro punto de vista de la Física podemos decir que la forma en que

una MNP aislada responde a un campo magnético no puede aplicarse directamente a cómo lo hace dentro de una célula. Es necesario tener en cuenta diferentes interacciones y procesos biológicos cuyos efectos no podemos despreciar pero cuya comprensión se aleja de nuestro área de estudio y, desde luego, de los objetivos de este TFG.

CONCLUSIONES

Como mencionamos al comienzo de esta memoria, uno de los objetivos de este Trabajo Fin de Grado era optimizar el diseño de un modelo ya existente de aplicador de campo magnético, para mejorar la eficiencia en la orientación de células neuronales con MNPs y campos magnéticos. Los resultados de las simulaciones de los nuevos diseños indicaban que era posible prever una mejora efectiva en la homogeneidad y porcentajes de dicha orientación.

Comparación aplicadores de campo antiguo y nuevo

Inicialmente realizamos un experimento con el montaje de imanes paralelos ya existente, mostrado en la figura 11. Conviene corroborar si verdaderamente hemos introducido una mejora en el proyecto. Comparamos los resultados obtenidos en la incubación de células con NPs con el imán anterior y con el último diseño del imán, el aplicador mejorado (figura 16). Así, tenemos cuatro histogramas (dos experimentos y dos noches cada uno) de cada aplicador. Hacemos una media de los resultados de la primera y segunda noche con cada montaje:

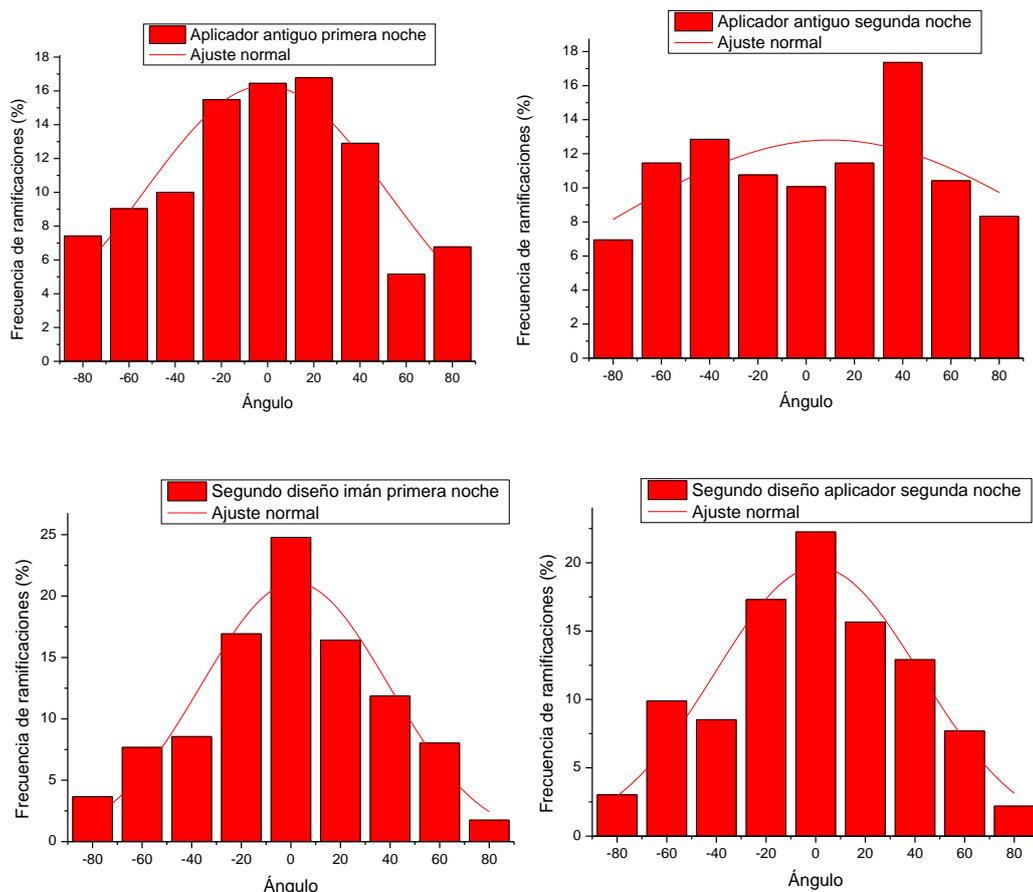


Figura 37. Comparación de resultados con aplicador viejo y nuevo

Puede observarse que con el nuevo aplicador se consigue mayor orientación paralela al campo, reflejada en una distribución de ángulos con un máximo para $\theta=0^\circ$. Podemos comparar también los parámetros del ajuste:

		Centro	Desv. Estándar
Aplicador antiguo	Una noche	-0,88	53,8
	Dos noches	3,65	100,75
Aplicador nuevo	Una noche	0,42	41,55
	Dos noches	0,84	41,45

Tabla 2. Comparación resultados de los parámetros de ajuste para los diferentes aplicadores de campo magnético

Observamos que en todos los casos la distribución de ángulos está centrada en 0° , pero que las desviaciones estándar son menores para los experimentos con el aplicador nuevo. Así, los histogramas del nuevo montaje de imanes se ajustan más a lo esperado en teoría, una función Gaussiana centrada en el cero. Luego podemos decir que al haber llegado casi a duplicar el valor del campo magnético en la zona de estudio, la orientación de células con MNPs en ese área se ha visto mejorada.

Podemos mencionar que el problema que ha aparecido continuamente a lo largo de los experimentos relacionado con una excesiva cantidad de cultivo celular no sería tan importante si la línea celular no fuese cancerígena. Es bien sabido que las células tumorales se reproducen a ritmos mucho más elevados de lo habitual, por lo que podemos suponer que si realizásemos los mismos experimentos con células sanas la concentración se mantendría más constante a lo largo de las diferentes noches, aunque probablemente aparecieran otro tipo de dificultades.

Como ya hemos comentado en la Discusión, se ha llegado a la conclusión de que existe, como era de esperar, una tendencia de las células con NPs a orientarse paralelas al campo magnético al que son sometidas. El proceso exacto mediante el cual lo hacen sigue siendo desconocido, pero daremos como válida la tendencia de todo sistema a permanecer en su estado de menor energía, puesto que es lo que hemos observado empíricamente. En el caso de una MNP con momento magnético, este estado de máxima estabilidad es el correspondiente a tener su momento magnético paralelo al sentido del campo.

Hemos comprobado también que la orientación es más efectiva a corto plazo, disminuyendo conforme aumenta el tiempo. Éste es un resultado sorprendente, puesto que se esperaba una paulatina orientación de las prolongaciones de las células, aproximándose cada vez más a la dirección del campo. La diferenciación de ramificaciones la segunda noche era más complicada puesto que las células habían crecido más y en muchas zonas se habían aglomerado, impidiendo su desarrollo y llevando a un menor número de sucesos analizados. Sin embargo creemos que esto no puede ser la causa única de la tendencia observada en todos los experimentos y que verdaderamente existe un efecto contrario al campo magnético que tarda un cierto tiempo en llevarse a cabo. Como ya hemos mencionado, se trata únicamente de una hipótesis, puesto que nuestros conocimientos de Biología no nos permiten ir más allá.

La respuesta mecanobiológica de la célula está relacionada con diferentes procesos llevados a cabo por proteínas determinadas (como pueden ser las integrinas [18, 20]), que están fuera de los propósitos de este TFG, aunque resultaría interesante indagar en ellos.

Según los resultados obtenidos en los experimentos podemos pensar en una posible técnica para la efectividad de la implementación de este método en la regeneración de tejido nervioso. Consistiría en someter a las células con MNPs a campos altos durante períodos de tiempo breves, mínimos para que se orienten. Incubaríamos el cultivo celular con alguna hormona de crecimiento o proteína activadora del crecimiento e intercalaríamos períodos del cultivo sometido a campo magnético con períodos libres de él. Así, esperaríamos el crecimiento de las ramificaciones celulares en el sentido del campo "intermitente" aplicado. Es importante señalar que esto no equivaldría a campo alterno, puesto que el período de intermitencia sería lo suficientemente alto (una noche).

Concluimos que es necesaria una profundización en la teoría en la que está fundamentado este método de regeneración de tejido nervioso (mecanotransducción, fuerza magnética) para entender mejor el proceso de orientación de las células con MNPs. Sin embargo, los resultados se muestran positivos, como hemos dicho, a corto plazo. Convendría repetir los experimentos un mayor número de veces y probar con diferentes nanopartículas magnéticas y diferentes líneas celulares, así como diseñar una configuración de imanes que combinase altos valores del campo magnético con valores altos del gradiente del mismo.

Este trabajo me ha servido para comprobar que el área de investigación científica es multidisciplinar y considero que ahí reside su riqueza. Me ha resultado interesante aplicar mis conocimientos de Física a un sistema biológico y, suponiendo a priori una respuesta teórica ideal, observar que los procesos reales son mucho más complicados e involucran una gran cantidad de factores. Entender todos los mecanismos, tanto físicos como biológicos, que se dan al inducir una orientación preferente en las células, requiere una investigación mucho más profunda y detallada.

REFERENCIAS

- [1] Poole CP, Owens FJ. Introduction to Nanotechnology. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons; 2003
- [2] Buschow KHJ, De Boer FR. Physics of Magnetism and magnetic materials. New York: Kluwen Academic/Plenum Publishers; 2003
- [3] Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* 26 (2005) 3995–4021
- [4] Mørup S. Studies of Superparamagnetism in Samples of Ultrafine Particles. *NATO ASI Series Volume 247*, 1993, pp 93-99
- [5] Vergoni AV, Tosi G, Tacchi R *et al.* Nanoparticles as drug delivery agents specific for CNS: in vivo biodistribution. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 5 (2009) 369–377
- [6] Thaler M, Roy S, Fornara A *et al.* Visualization and analysis of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in the inner ear by light microscopy and energy filtered TEM. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 7 (2011) 360–369
- [7] Douglas SJ, Davis SS, Illum L. Nanoparticles in drug delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 1987;3(3):233-61.
- [8] Zhana S, Yanga Y, Shenc Z *et al.* Efficient removal of pathogenic bacteria and viruses by multifunctional amine-modified magnetic nanoparticles. *Journal of Hazardous Materials* 274 (2014) 115–123
- [9] Zhang G, Lai BB, Zhou YY *et al.* Fe₃O₄ nanoparticles with daunorubicin induce apoptosis through caspase 8-PARP pathway and inhibit K562 leukemia cell-induced tumor growth in vivo. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 7 (2011) 595–603
- [10] Brannon-Peppas L, Blanchette JO. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 64 (2012) 206–212
- [11] Calero M, Gutiérrez L, Salas G *et al.* Efficient and safe internalization of magnetic iron oxide nanoparticles: Two fundamental requirements for biomedical applications. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 10 (2014) 733–743
- [12] Brambilla D, Le Droumaguet B, Nicolas J *et al.* Nanotechnologies for Alzheimer's disease: diagnosis, therapy, and safety issues. *Nanomedicine* 2011 Oct;7(5):521-40
- [13] Kadar E, Batalha IL, Fisher A *et al.* The interaction of polymer-coated magnetic nanoparticles with seawater. *Sci Total Environ* 2014 Jul 15;487:771-7
- [14] Lam UT, Yoganathan R, Carr AG *et al.* Encapsulation of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles by the Supercritical Antisolvent Process. *Australian Journal of Chemistry* 65(1) 40-44

- [15] Muxworthy AR, Williams W. Critical superparamagnetic/single-domain grain sizes in interacting magnetite particles: implications for magnetosome crystals. *J. R. Soc. Interface* 2009 6
- [16] Jackson JD. *Classical Electrodynamics*. 3rd edition. New York: John Wiley & Sons; 1998
- [17] López Rodríguez V. *Electromagnetismo*. 1a edición. Madrid: Universidad Nacional de Educación a Distancia; 2002
- [18] Katsumi A, Naoe T, Matsushita T *et al*. Integrin activation and matrix binding mediate cellular responses to mechanical stretch. *J Biol Chem* 2005 Apr 29;280(17):16546-9.
- [19] Ali MH, Schumacker PT. Endothelial responses to mechanical stress: where is the mechanosensor? *Crit Care Med* 2002 May;30(5 Suppl):S198-206
- [20] Ross TD, Coon BG, Yun S *et al*. Integrins in mechanotransduction. *Current Opinion in Cell Biology* Volume 25, Issue 5, October 2013, Pages 613–618
- [21] Kima S, Imb WS, Kangb L *et al*. The application of magnets directs the orientation of neurite outgrowth in cultured human neuronal cells. *J. Neurosci Methods* 2008 Sep 15;174(1):91-6
- [22] Kim AJ, Lee N, KIM BH *et al*. Enhancement of neurite outgrowth in PC12 cells by iron oxide nanoparticles. *Biomaterials* 2011 Apr;32(11):2871-7

ACRÓNIMOS

A continuación se muestran, ordenados por orden alfabético, los acrónimos que aparecen en la memoria, junto con su correspondiente significado.

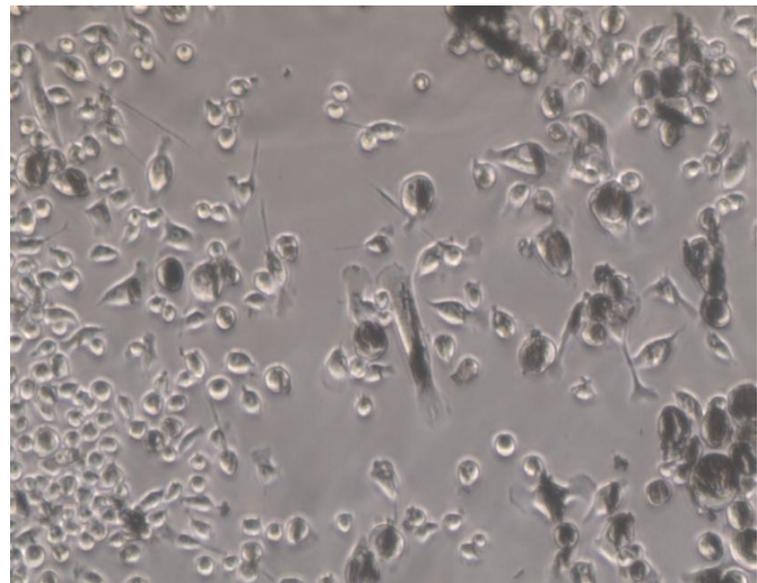
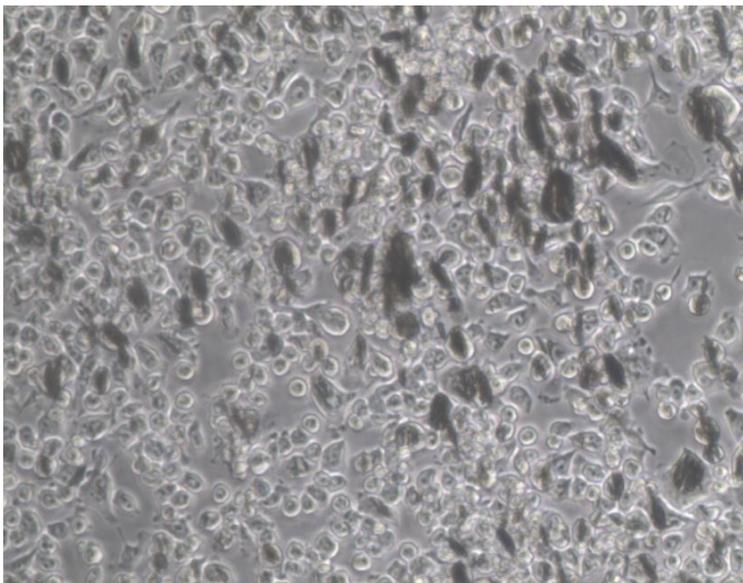
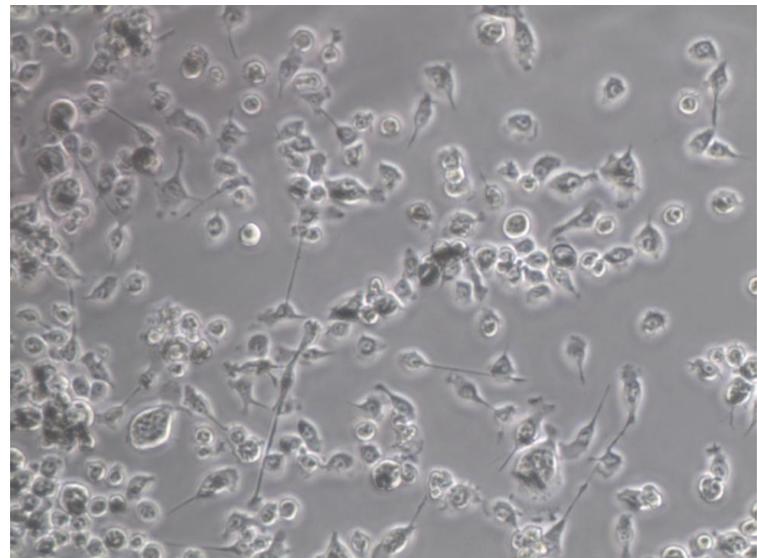
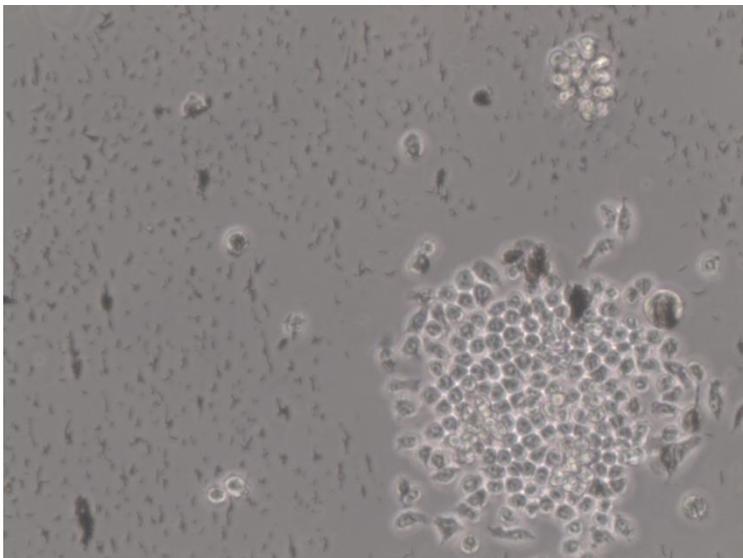
Bv2	Línea celular de macrófagos del SNC
DMEM	(Dulbecco's Modified Eagle Medium). Suero proteico para cultivo celular
EDX	Espectrometría de Dispersión de rayos X
FEMM	Finite Element Method Magnetics
FIB	Microscopía de haz de iones
INA	Instituto de Nanociencia de Aragón
MNP	Nanopartícula magnética
NdFeB	Neodimio Hierro Boro
NP	Nanopartícula
PC12	Línea celular de la médula suprarrenal de la rata
SEM	Microscopio Electrónico de barrido
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
TEM	Microscopio Electrónico de Transmisión
TFG	Trabajo Fin de Grado
TFM	Trabajo Fin de Máster

ANEXO

Células Bv2 en el microscopio óptico

Aumento 10x:

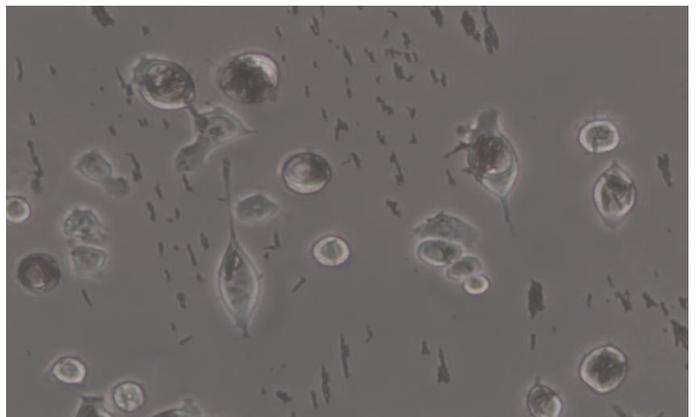
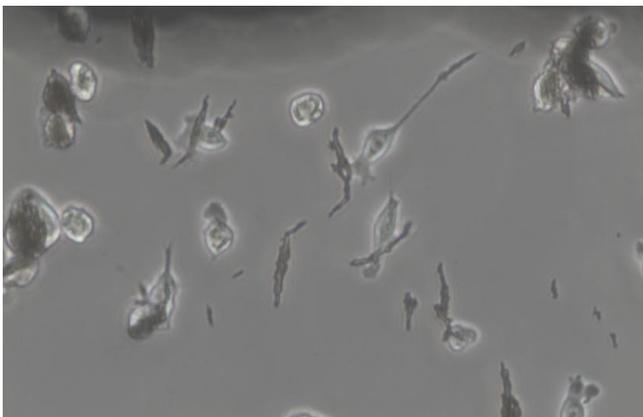
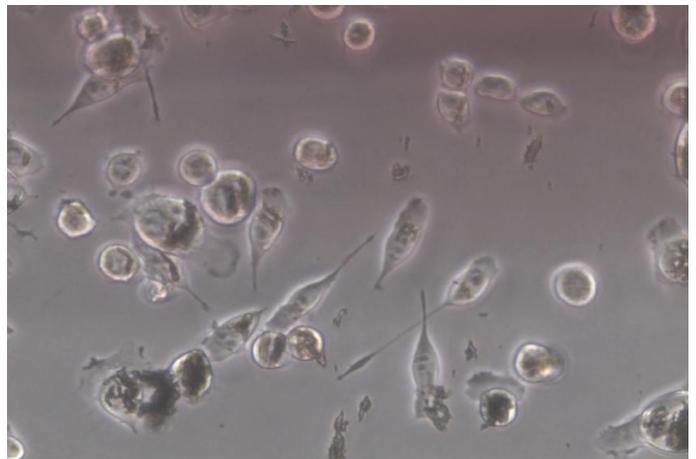
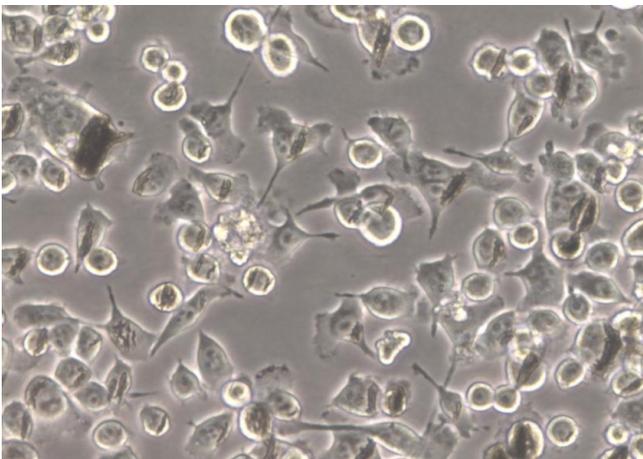
Con este objetivo teníamos una visión más general de la muestra. Pudimos observar cómo las células Bv2 tienden a aglomerarse. Por ello es complicado determinar la cantidad idónea a sembrar. Podíamos comprobar la dirección del campo magnético en la zona entre imanes gracias a la orientación de los cúmulos de MNPs (zonas más oscuras).



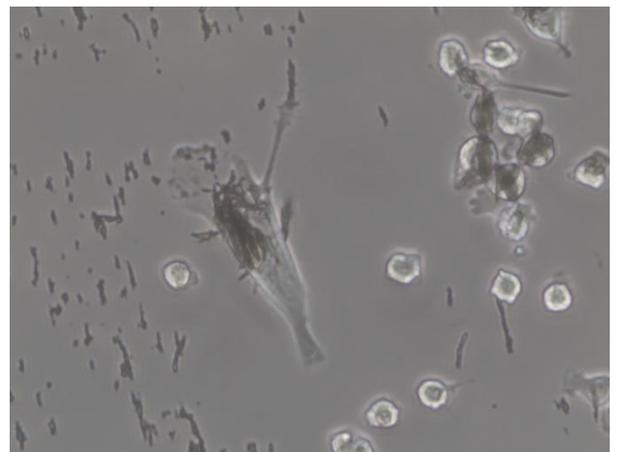
Aumento 20x:

Fue el objetivo que más usamos, puesto que permitía la fácil diferenciación de las ramificaciones de las células. En las siguientes imágenes puede observarse una tendencia de las prolongaciones de las células a la orientación vertical, la misma que la del campo. También se observa que las MNPs forman clusters que se orientan en esta dirección. Volvemos a ver protuberancias en los extremos de algunas ramificaciones, que hacen pensar que son las MNPs, que de alguna manera "tiran" de estas prolongaciones en el sentido del campo.

En las siguientes imágenes puede verse que los núcleos celulares más grandes son los que más cantidad de MNPs tienen. Puede que fueran los más grandes y por ello ingerieran más partículas o al revés, que el hecho de ingerir partículas con hierro activase su crecimiento. Hay estudios que hablan de esto, pero los resultados no siguen un patrón claro.

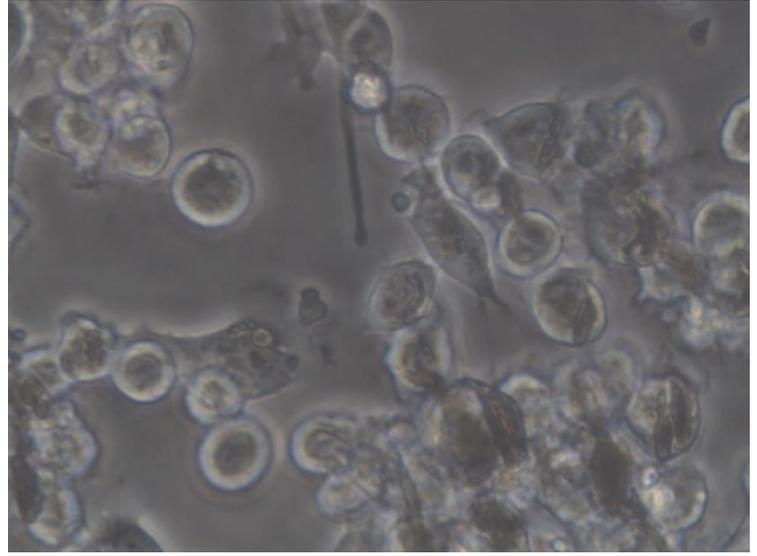
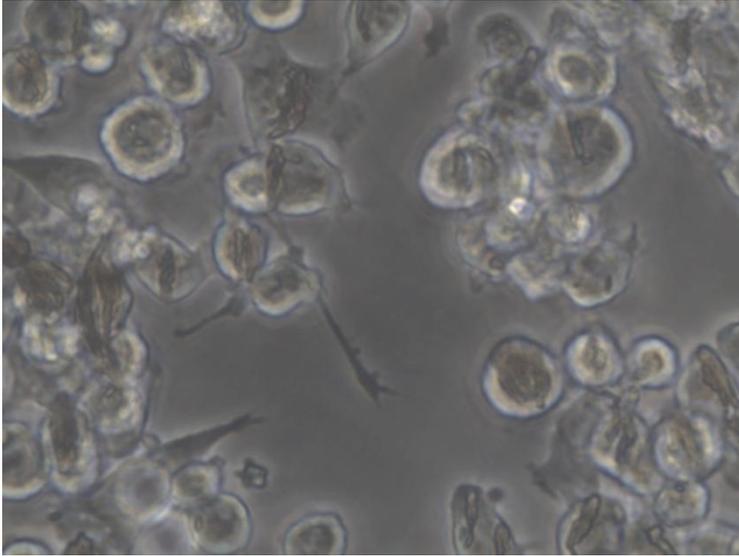


De hecho, vimos que muchas células en cuyo interior se apreciaban grandes cúmulos de MNPs, como se muestra en la imagen de la derecha, estaban "explotadas" en la dirección del campo. Podemos pensar que las MNPs fuerzan a la célula a orientarse en esa dirección y terminan incluso sobrepasando su límite de elasticidad:



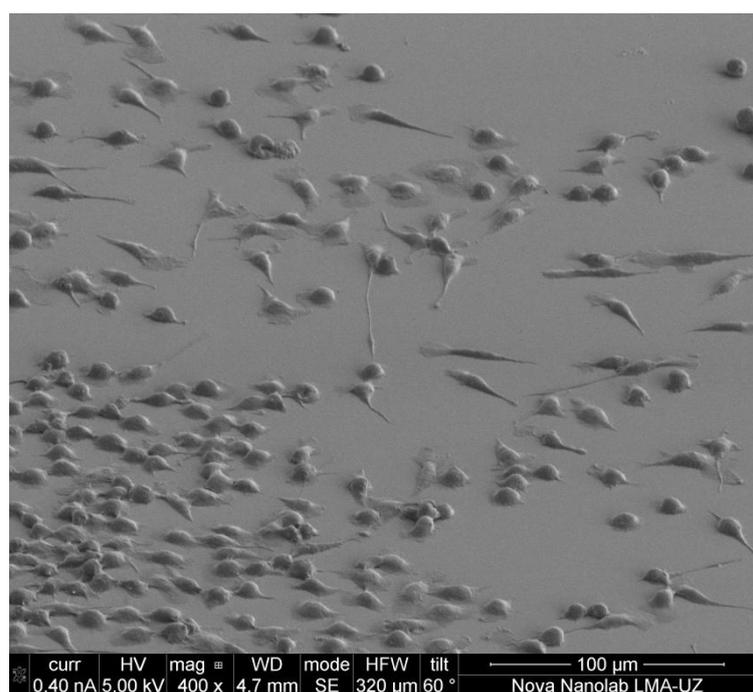
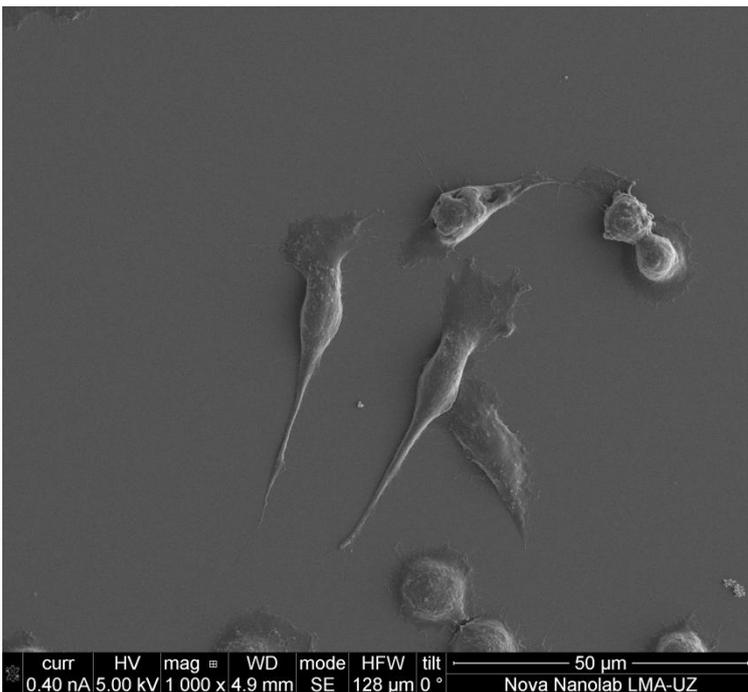
Aumento 40x:

Con este aumento parecían diferenciarse ensanchamientos en zonas determinadas de la ramificación, que asociamos con la presencia de MNPs dentro de él.

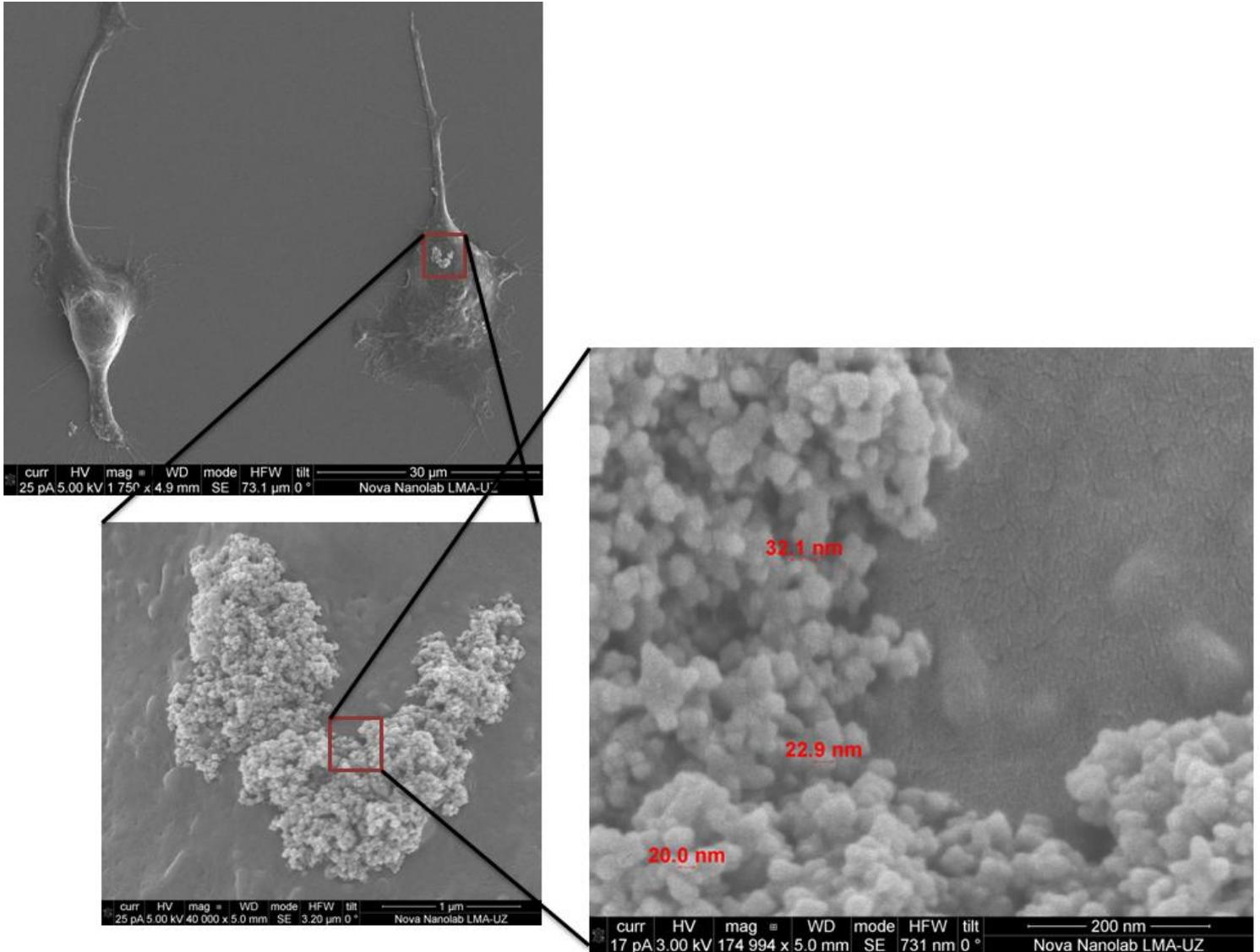


Células Bv2 en el FIB

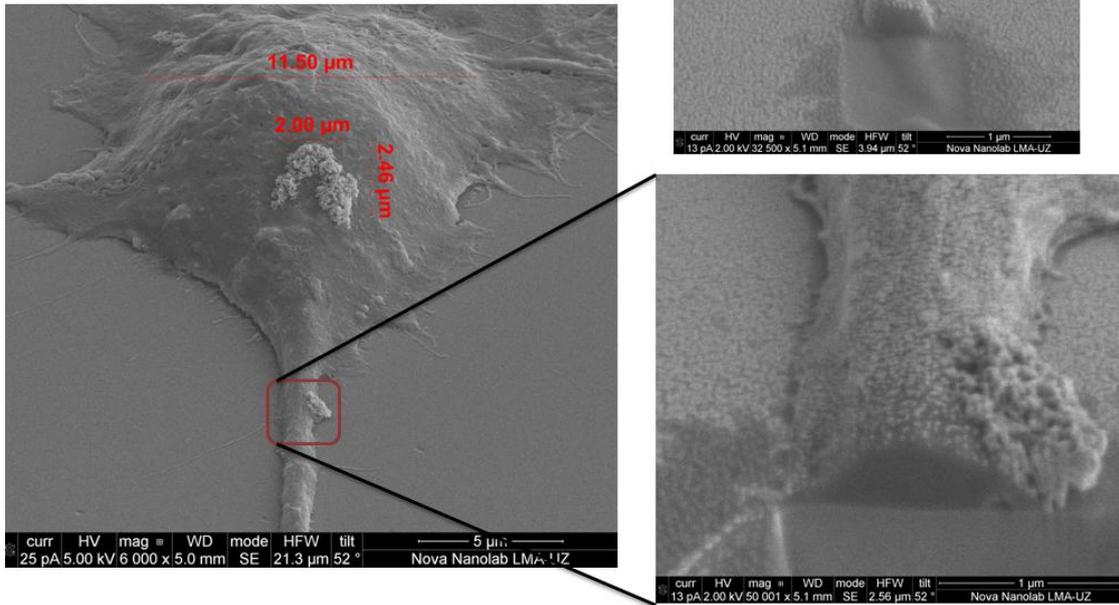
Con este microscopio observamos tres muestras diferentes: células Bv2 cultivadas sin MNPs, células con MNPs que no habían estado bajo influencia de imán y células con MNPs sometidas a imán.



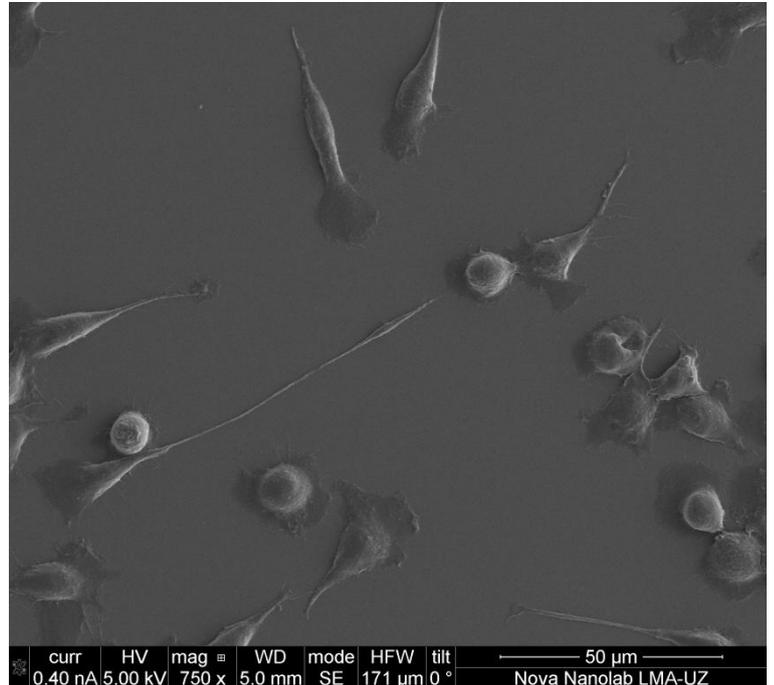
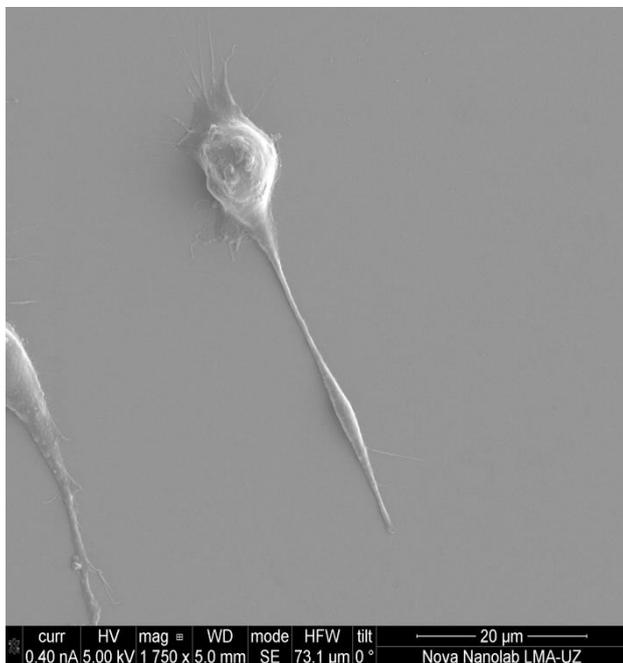
Observamos partículas en la superficie de la células. Se distinguían porque eran más brillantes que el material celular y se presentaban en aglomeraciones. Comprobamos que, por sus dimensiones, se trataba en efecto las partículas de magnetita con las que habíamos sembrado las células:



Supusimos que, al tener MNPs pegadas a su superficie, también las habría ingerido y estarían en su interior. Procedimos a cortar la prolongación celular pero no encontramos partículas:

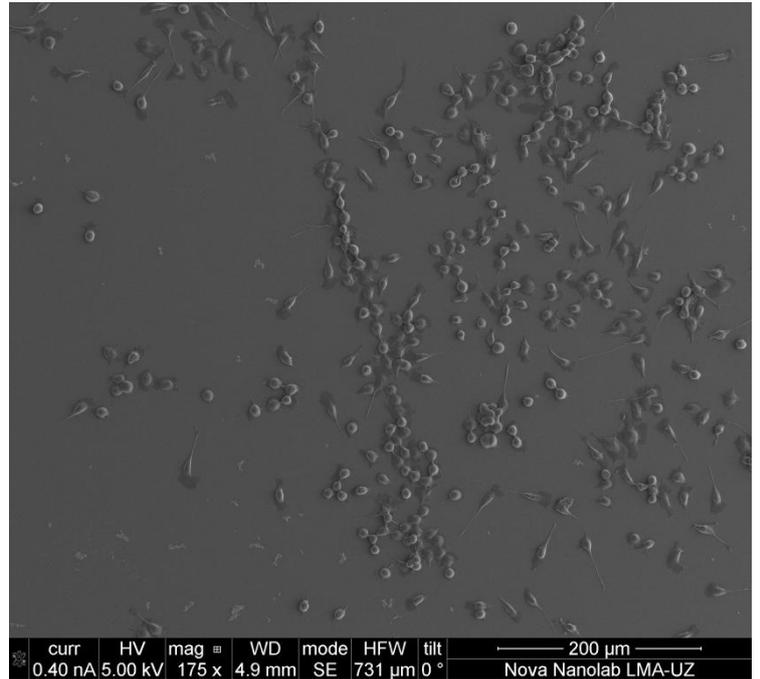
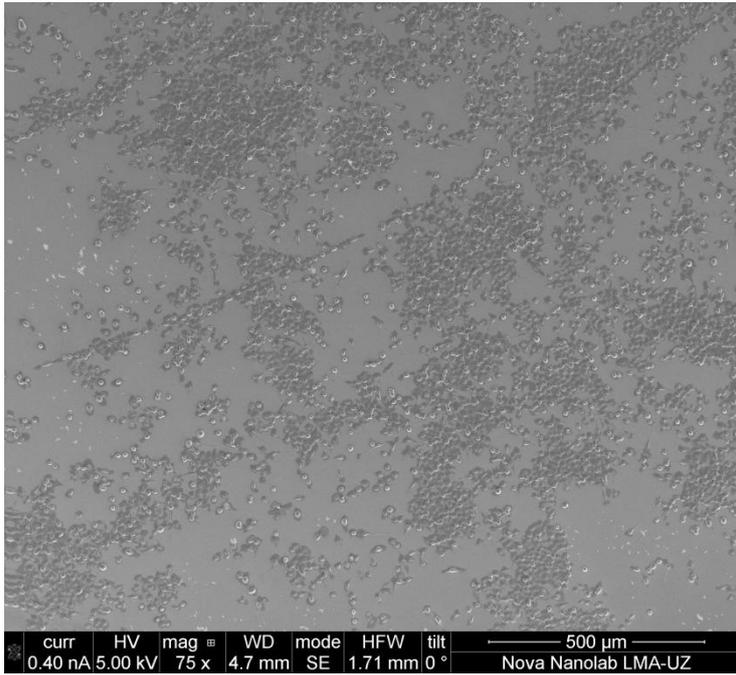


Detectamos protuberancias en las ramificaciones de estas células pero al cortarlas no encontramos MNPs, por lo que los ensanchamientos de las ramificaciones no eran único síntoma de que hubieran ingerido partículas. A la izquierda, célula sin MNPs y a la derecha células con MNPs:



Comprobamos una vez más la tendencia que tienen estas células Bv2 a alinearse. En la izquierda las células no tienen NPs, por lo que la interacción que surge

de esa alineación no es magnética. A la derecha sí que habían sido sembradas con MNPs, por lo que la interacción puede (o no) ser magnética.



En la muestra en la cual las células con MNPs habían estado sobre el aplicador de imanes creímos encontrar la zona de la diagonal en la que el campo magnético era uniforme e intenso. Teníamos como referencia la orientación de los cúmulos de MNPs y distinguimos un posible área de anchura similar a la de la diagonal de estudio, marcada en la siguiente imagen:

