

# CAPITULO 4

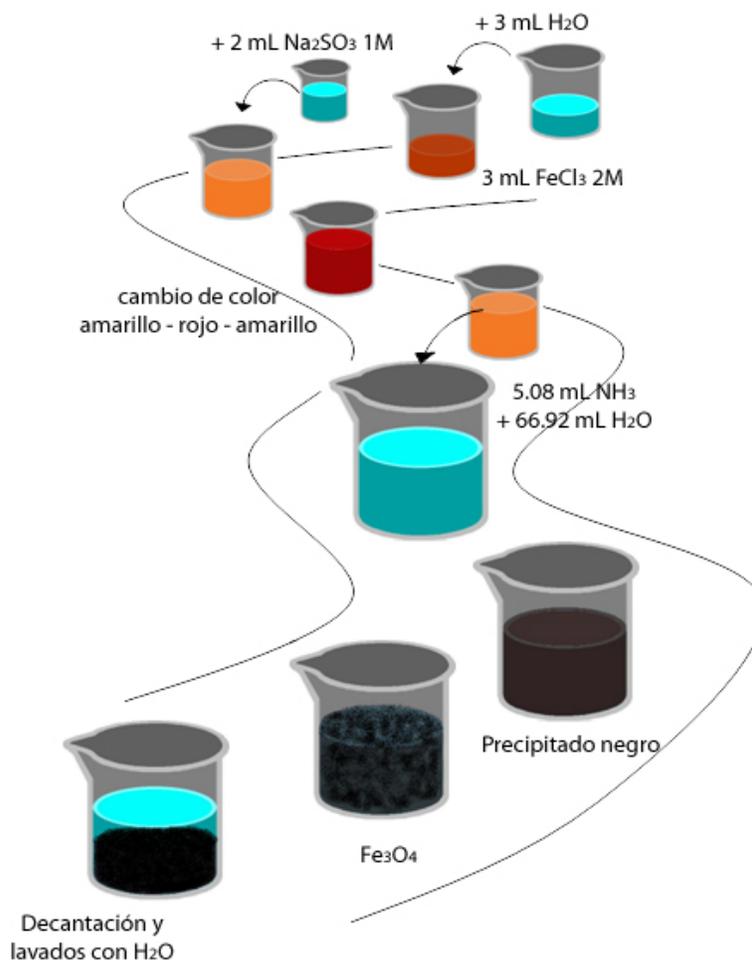
## MATERIAL Y MÉTODOS

---

### ***4.1. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA***

Las NP de magnetita fueron sintetizadas tomando como base un método de precipitación previamente reportado (Qu, S. *et al*, 1999), a partir de soluciones acuosas de FeCl<sub>3</sub> parcialmente reducido (figura 7). Todo el material de vidrio empleado en este proceso y durante la funcionalización fue lavado con HCl concentrado, enjuagado perfectamente con agua deionizada y secado previamente a su uso. Los reactivos y químicos empleados en la síntesis y funcionalización fueron grado analítico (Sigma) y se utilizaron sin purificación previa.

Se prepararon soluciones *stock* de FeCl<sub>3</sub> (en HCl 2 mol dm<sup>-3</sup>) y Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> a concentraciones de 2 y 1 mol dm<sup>-3</sup>, respectivamente, empleando agua deionizada. El procedimiento de precipitación, a diferencia del inicialmente reportado, fue realizado a miniescala como se indica a continuación: Se preparó una solución acuosa de NH<sub>4</sub>OH tomando 5.08 mL de NH<sub>4</sub>OH concentrado y diluyéndolos con 66.92 mL de agua deionizada. Esta solución se preparó en un vaso de precipitados de 100 mL y se mantuvo cerca para usarla más adelante. En un vaso de precipitados de 20 mL se colocaron 3 mL de



**Figura 7.** Esquema de síntesis de NP de magnetita. El paso determinante para la formación de magnetita pura con tamaño de partícula menor a 15 nm es el retorno de la solución  $[\text{Fe}^{+3}]/[\text{SO}_3^{-2}]$  al tono amarillo original.

la solución *stock* de FeCl<sub>3</sub> bajo agitación y se diluyeron con una misma cantidad (3 mL) de agua deionizada. Posteriormente se añadieron 2 mL de la solución *stock* de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> y, justo en el momento de contacto, pudo observarse el cambio de color de amarillo claro a rojo, indicando la formación de iones complejos.

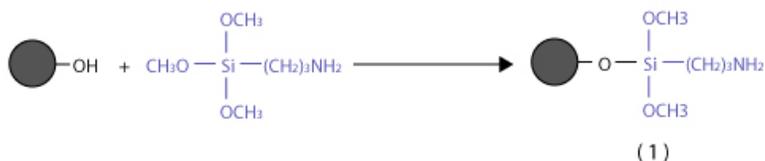
Esta mezcla se mantuvo bajo agitación moderada (500 rpm) hasta observarse el retorno de su color al tono amarillo inicial, momento en el cual se vertió rápidamente al vaso de precipitados conteniendo la solución de  $\text{NH}_4\text{OH}$ , ahora bajo agitación intensa (1000 rpm). De inmediato se observó el cambio de color de la mezcla a un color negro, indicando la reducción de los complejos iónicos. Se dejó continuar esta reacción durante 30 minutos, al término de los cuales se colocó el vaso de precipitados con la suspensión sobre un magneto permanente para hacer sedimentar las partículas formadas.

Se desechó el sobrenadante y se procedió a lavar el precipitado varias veces, para eliminar los iones retenidos, añadiendo agua destilada y separando el precipitado por centrifugación. Las partículas obtenidas se dejaron secar a temperatura ambiente y fueron almacenadas para su uso posterior. El tamaño de las NP y su morfología fueron determinados utilizando un microscopio electrónico JEOL modelo JEM-1200EXII.

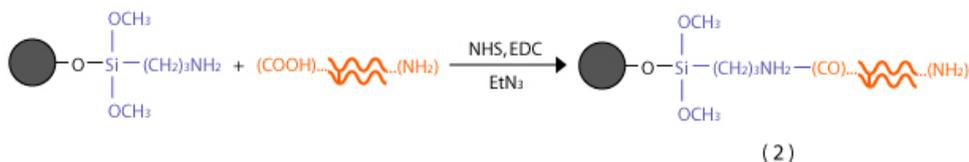
#### ***4.2. ACOPLAMIENTO DE ÁCIDO FÓLICO Y FLUORESCEINA***

Siguiendo como base la metodología descrita por Zhang, Y. *et al* (2002) para la funcionalización con AF-Fluo (figura 8), se prepararon las siguientes soluciones: TMS, 3  $\text{mmol dm}^{-3}$  en tolueno; AF, 10  $\text{mmol dm}^{-3}$  en DMSO; Fluo, 15  $\text{mmol dm}^{-3}$  en etanol; NHS, 15  $\text{mmol dm}^{-3}$ ; y EDC, 75  $\text{mmol dm}^{-3}$ . Las NP sintetizadas previamente fueron lavadas dos veces en etanol y secadas a  $110^\circ\text{C}$  por 1 hora para remover cualquier resto de agua adsorbida.

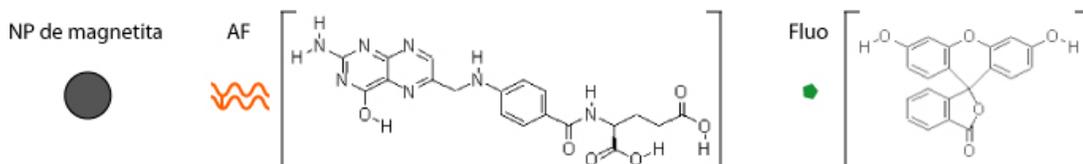
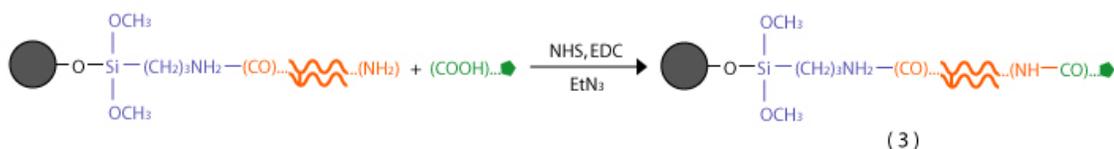
Silanización de la NP



Acoplamiento de AF



Acoplamiento de Fluo



**Figura 8.** Esquema de funcionalización de NP con AF-Fluo. La reacción con TMS acopla un grupo  $\text{-NH}_2$  a la superficie de la NP (1), que reacciona posteriormente con el extremo  $\text{-COOH}$  del AF (2). El acoplamiento de Fluo ocurre de igual manera entre el carboxilo de esta molécula y el grupo  $\text{-NH}_2$  del AF (3). Modificado de Zhang, Y. *et al*, 2002.

En un tubo para centrifuga de 15 mL de capacidad, se dispersaron 15 mg de estas NP en 5 mL de la solución de TMS y se sometieron a vortex y sonicación, seguido por un periodo de incubación a  $60^\circ\text{C}$  por 4 horas. Al término de dicho periodo, las partículas fueron separadas por centrifugación y posteriormente resuspendidas en tolueno para ser

sonicadas durante 10 minutos. Se centrifugó nuevamente y el precipitado fue lavado con tolueno y etanol.

Para el acoplamiento de AF, en otro tubo de iguales características se mezclaron las siguientes cantidades de las soluciones preparadas al inicio: 1 mL de AF 10 mM, 1.5 mL de NHS 15 mM y 1.5 mL de EDC 75 mM. A esta mezcla se añadieron las partículas silanizadas y se ajustó el pH a 9 con TEA para entonces dejarlo en incubación por 4 horas a 37°C. Se centrifugó la mezcla y el precipitado fue lavado con agua deionizada y secado al vacío durante la noche. Estas NP se añadieron a una mezcla de 4 mL de Fluo 15 mM, 1.5 mL de NHS 15 mM y 1.5 mL de EDC 75 mM, ajustada a pH 9 con TEA, y se dejaron incubar por 4 horas a 37°C. Se separó el precipitado por centrifugación, se lavó con agua deionizada y se permitió secar al vacío por la noche. Para determinar el acoplamiento de AF-Fluo a la superficie de las NP se corrieron espectros de FTIR, en pastilla de KBr, utilizando un espectrómetro Bruker Tensor 27. Así mismo, se obtuvieron imágenes por CF y F utilizando un equipo de MC BioRad 1024.

### ***4.3. PRUEBAS CELULARES***

#### **4.3.1. Obtención de células precursoras de neuronas**

Para la obtención de CPN se siguió el protocolo reportado por Doetsch *et al* (1999). Todas las ratas fueron tratadas conforme a los procedimientos del Comité de Bioética y Cuidado de Animales Experimentales de la UNAM. Se utilizaron ratas macho de la cepa

Wistar (75-100 g,  $n \approx 50$ ), sacrificándolos por dislocación cervical, previa anestesia con hidrato de cloral (100 mg/Kg), para extraer sus cerebros rápidamente y colocarlos en buffer de Yamamoto (pH 7.4). Inmediatamente se diseccionó la ZSV de ambos ventrículos laterales y se colectaron estos segmentos en buffer DMEM. Posteriormente fueron incubados en DMEM con 1 mL de papaína (activada media hora antes colocando 3 mg de papaína en 1 mL de EDTA 1.1 mM, y cisteína HCl 5.5 mM), manteniéndose en una plataforma de agitación a 37°C durante 20 minutos. Una vez disociadas las células, se colectaron por centrifugación (1000 rpm) durante 10 minutos y se resuspendieron en 2 mL de DMEM. De este stock se tomaron 200  $\mu$ L y se colocaron en cajas de cultivo ( $n = 10$ ) para agregar posteriormente 800  $\mu$ L de DMEM.

#### **4.3.2. Incorporación de nanopartículas *in vitro***

Para las pruebas de incorporación celular *in vitro* de NP modificadas se siguieron dos variantes. En un primer experimento, los precipitados celulares fueron resuspendidos en 1 mL de DMEM suplementado con 4.5 U/mL de insulina, 100 mg/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomina y 2.5 mg/mL de fungizona. A este medio se añadieron 2 mg de NP funcionalizadas con AF-Fluo, para después colocar las células en platos de cultivo de 35 mm ( $n = 10$ ; con 0.2 mg de NP por pozo) con el mismo medio. Un segundo experimento consistió en la obtención de nuevos precipitados celulares, como se describió anteriormente, añadiendo ahora las NP funcionalizadas directamente en los platos de cultivo a razón de 2 mg/mL de volumen final de medio para cada pozo ( $n = 5$ ; 2 mg de NP

por pozo). En ambos casos, los cultivos celulares fueron incubados por 8 días a 37°C, realizando diariamente el cambio del medio.

Los cultivos de la primera prueba se analizaron por microscopía confocal (MC). A las células del segundo experimento se les realizó adicionalmente inmunocitoquímica a Tuj1. Para esta técnica, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron tres veces con PBS (pH 7.4) y se incubaron por 1 hora en PBS conteniendo 10% de suero normal de cabra y 0.1% Triton X-100. Como anticuerpo primario se utilizó la IgG monoclonal murina anti-Tuj1, dejándose incubar toda la noche a 4°C. Tras tres series de lavado en PBS, se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario fluorescente anti-IgG murino conjugado con Cy3. Se lavaron nuevamente con PBS y se colocaron en portaobjetos para su análisis por MC.

#### **4.3.3. Incorporación de nanopartículas *in vivo***

Para las pruebas de incorporación *in vivo* se tomó como base la metodología descrita por Arias-Carrión *et al* (2004). Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (200-250 g, n = 5), Previa anestesia con ketamina-xilazina (87 y 13 mg/Kg, respectivamente), se colocaron en un aparato de cirugía estereotáxica. Se expuso el cráneo y se localizaron las coordenadas estereotáxicas correspondientes a la ZSV izquierda; éstas fueron Antero-posterior a bregma +1.6 mm, Lateral +1.5mm, y Vertical -4.2 mm debajo de la duramadre. La barra de incisivos se fijó en 2 mm debajo de la línea interaural. Una vez localizadas las coordenadas sobre la superficie del cráneo se utilizó un minitaladro para realizar un trepano en el hueso

frontal. De un stock de NP en DMEM previamente realizado, se aspiraron 4  $\mu\text{L}$  con una microcánula ( $< 100 \mu\text{m}$ ) acoplada a una jeringa Hamilton de 25  $\mu\text{L}$  y montada a un microinyector (KS Scientific). Esta suspensión con NP funcionalizadas se inyectó a una velocidad de flujo de 1  $\mu\text{L}/\text{min}$ , a cuyo término se recubrió la perforación craneal con acrílico dental.

Se implantó posteriormente un pequeño imán (5 mm de diámetro y 3 mm de grosor) en la superficie del cráneo, utilizando acrílico dental para inmovilizarla, y se suturó la incisión en seguida. Esto se realizó como una primera prueba hacia el uso de CME para inducir migración celular *in vivo*. Tras 15 días de cuidados normales, los animales recibieron una sobredosis de pentobarbital (100 mg/Kg, i.p.) para luego ser perfundidos con solución salina, seguida por paraformaldehído al 4%. Se retiraron los cerebros y se colocaron durante 24 horas en paraformaldehído al 4% para después ser resuspendidos en sacarosa al 20% durante 24 horas. Finalmente, los cerebros fueron seccionados en cortes coronales de 30  $\mu\text{m}$  de grosor. Estos cortes se lavaron tres veces con PBS (pH 7.4) y se procesaron para marcaje con Tuj1 tal y como se describió en las pruebas *in vitro*. La única variante en el procedimiento fue el periodo de incubación con el anticuerpo primario, que para este caso fue de 48 hrs. Las preparaciones obtenidas fueron analizadas por MC.

#### **4.3.4. Migración celular**

Puesto que los resultados de la metodología para incorporar NP en CPN *in vitro* no fueron contundentes (como se abordará más adelante), el siguiente objetivo, encaminado a

determinar los patrones de migración celular inducida por CME, no pudo llevarse a cabo. A grandes rasgos, el procedimiento planteado para dichas pruebas involucra que, una vez confirmada la presencia de NP en el citoplasma de las CPN cultivadas, se induzca en los platos de cultivo un campo magnético localizado. Dependiendo de la velocidad con que migren estas células, si es que sucede, se rastrea *in situ* el patrón de desplazamiento empleando la MC y se va variando la composición del medio para crear barreras físicas (matriz extracelular, presencia de otros tipos celulares, etc.) que pudieran afectar el desplazamiento inicial observado.

Para las pruebas con CME *in vivo* se llevó a cabo un experimento preliminar implantando un imán en la superficie del cráneo de la rata, como se describió en la sección anterior. La densidad de flujo magnético para el imán utilizado fue de 2 teslas, con una distancia entre el centro del imán y el sitio de inyección de las NP de aproximadamente 5 mm. De forma semejante a las pruebas *in vitro*, este procedimiento no mostró resultados favorables hacia la incorporación celular, por lo cual no pudo determinarse modelo de migración alguno.