

CAPITULO 5

RESULTADOS

5.1. TAMAÑO Y MORFOLOGÍA DE LAS NANOPARTÍCULAS

Al inicio de la reacción de reducción (justo cuando se añade la mezcla de iones a la solución de NH_4OH) las concentraciones de FeCl_3 y Na_2SO_4 son de 0.075 y 0.025 mol dm^{-3} , respectivamente. Esto equivale a una relación $[\text{Fe}^{+3}]/[\text{SO}_3^{-2}]$ de 3 y, por lo tanto, la composición de las NP corresponda a magnetita pura (Qu, S. *et al*, 1999). De la misma manera, dicha concentración inicial de FeCl_3 determina (al menos bajo la metodología referida) que el diámetro de las NP formadas se encuentre alrededor de los 4 nm. Sin embargo, como muestran las imágenes obtenidas por TEM (figura 9), el diámetro de las NP sintetizadas en este trabajo tuvo un rango de distribución muy amplio, alrededor de 6 y 17 nm y con un promedio cercano a los 10 ó 12 nm. Los patrones de dispersión son completamente aleatorios, con tendencia a formar aglomerados de gran tamaño.

5.2. FUNCIONALIZACIÓN

Los espectros de infrarrojo de las NP sin modificar y las NP funcionalizadas con AF-Fluo se presentan en la figura 10. Es posible observar bandas características que

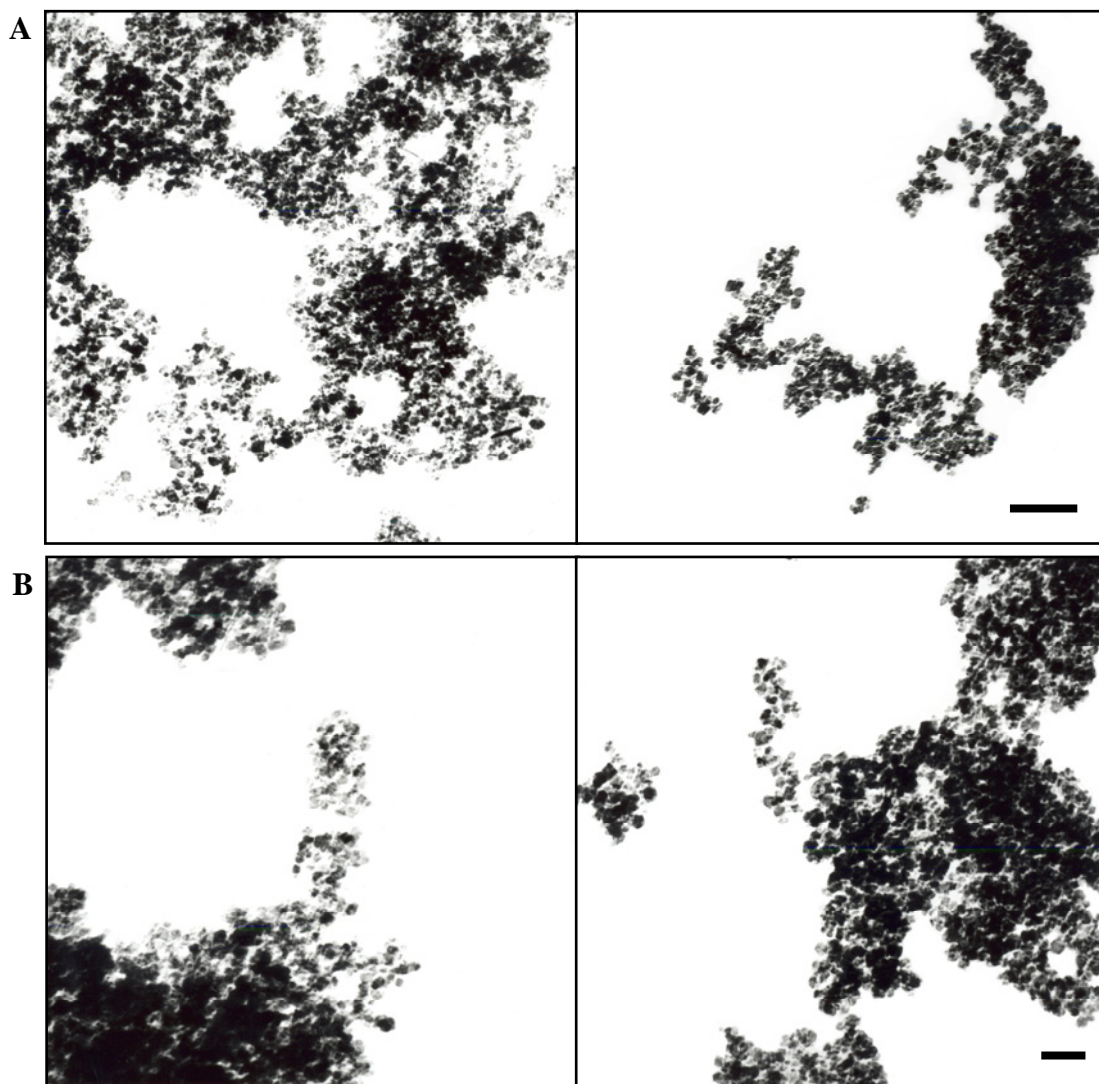


Figura 9. Imágenes por TEM de NP sintetizadas. A pesar del alto grado de aglomeración de las NP pueden apreciarse algunos grupos relativamente aislados (A) 100 nm, (B) 50 nm.

sugieren el acoplamiento de AF en 1488 y 1600 cm^{-1} , y de Fluo en 1497 y 1638 cm^{-1} , siendo consistentes con la referencia considerada anteriormente (Zhang, Y. *et al*, 2002). Pueden consultarse los espectros de AF y Fluo puros en la figura 11.

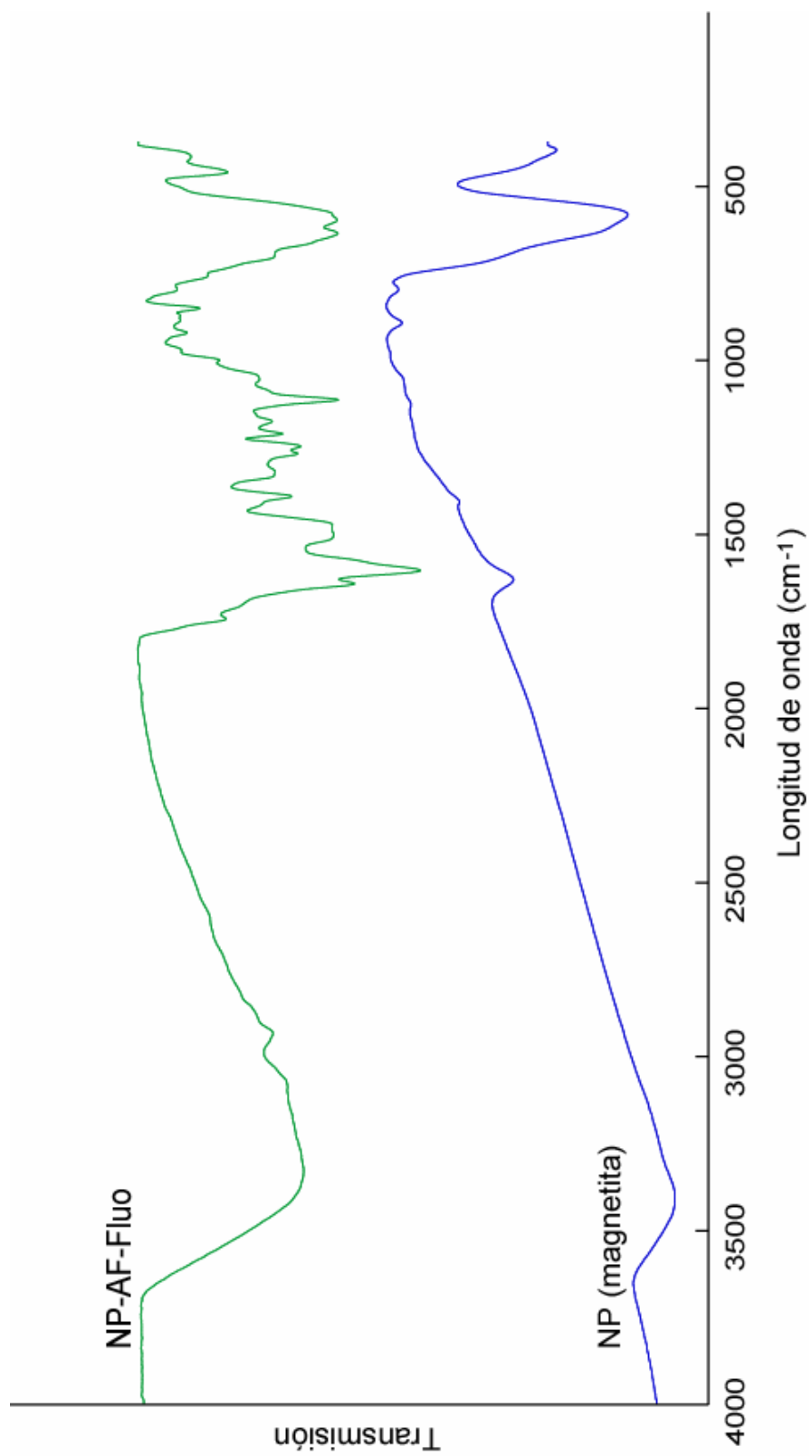


Figura 10. Espectros por FTIR de magnetita y NP modificadas con AF-Fluo.

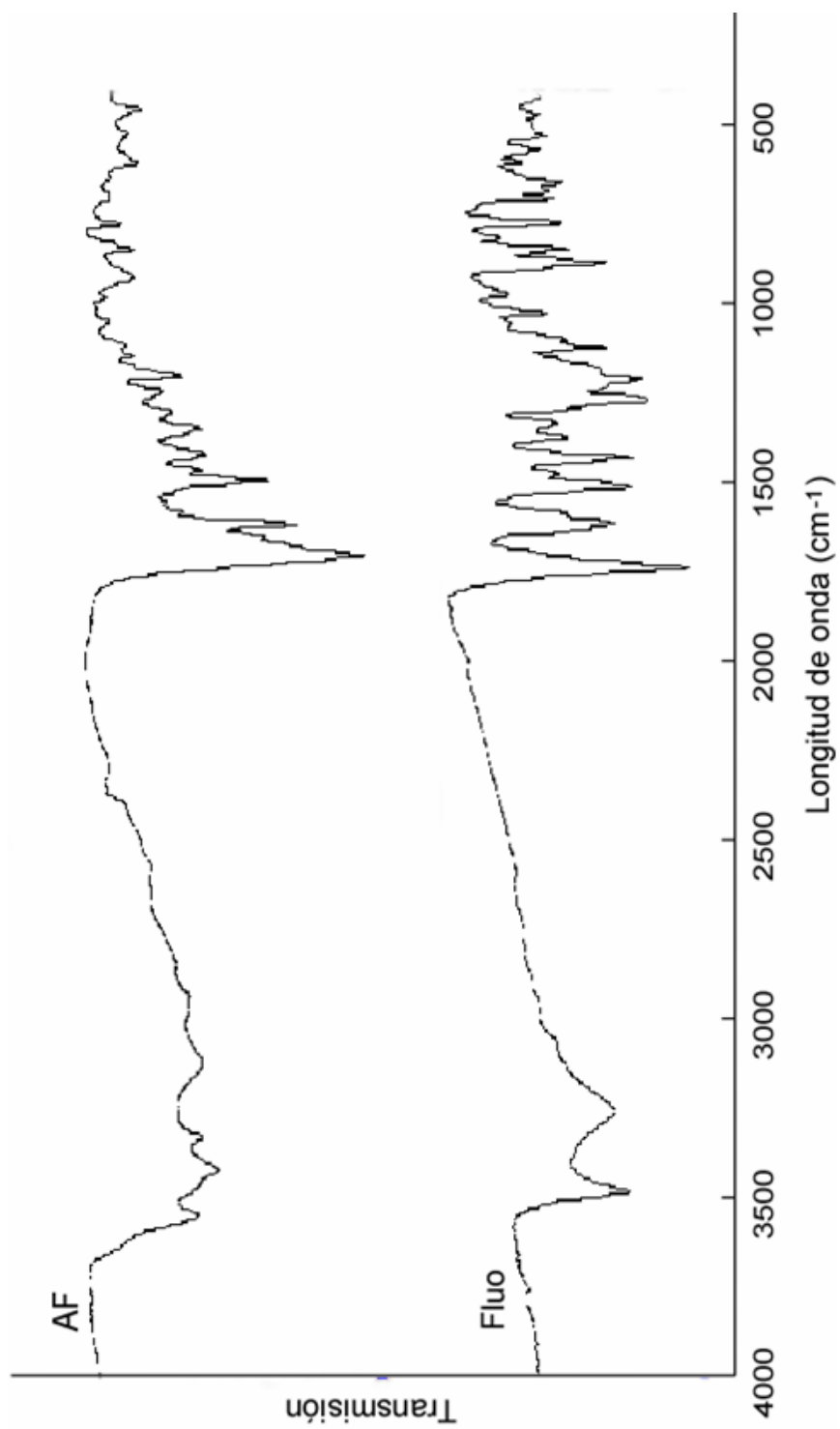


Figura 11. Espectros por FTIR de AF y Fluo puros (modificados de www.chemexper.com).

Las imágenes de CF y F (figura 12) confirman el acoplamiento de Fluo a la superficie de las NP. A grandes rasgos, el área funcionalizada abarca entre un 60 y 70% de la superficie visible. La facilidad de aglomeración de las NP debido a sus propiedades magnéticas también es evidente a partir de dichas fotografías.

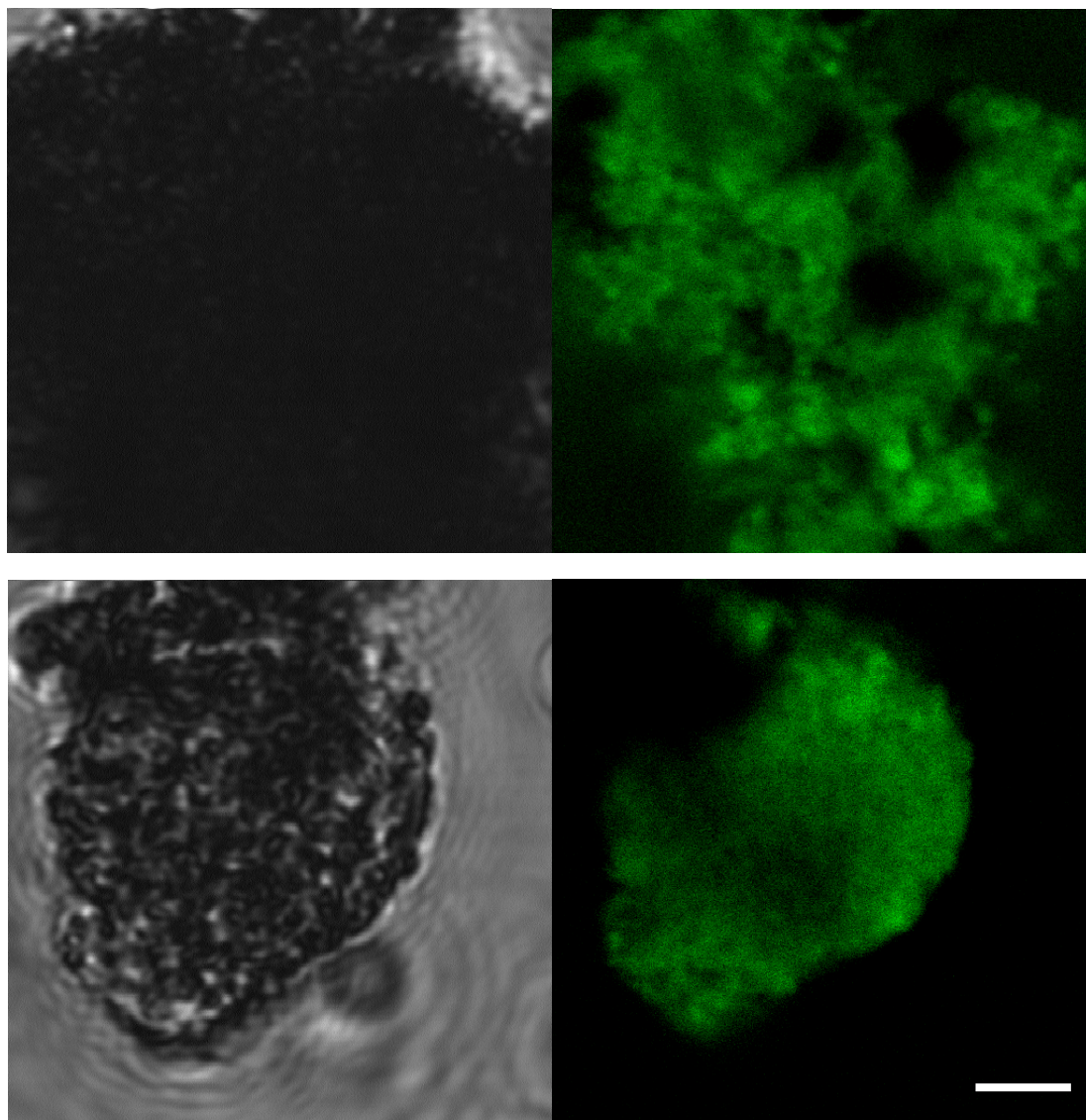


Figura 12. Imágenes por CF y F de NP funcionalizadas con AF-Fluo. Dimensión de la barra: 5 μm .

5.3. INCORPORACIÓN CELULAR

A continuación se presentan los resultados obtenidos de CPN cultivadas en presencia de NP a razón de 0.2 mg/mL (figuras 13 y 14). En la figura 13, el montaje de las

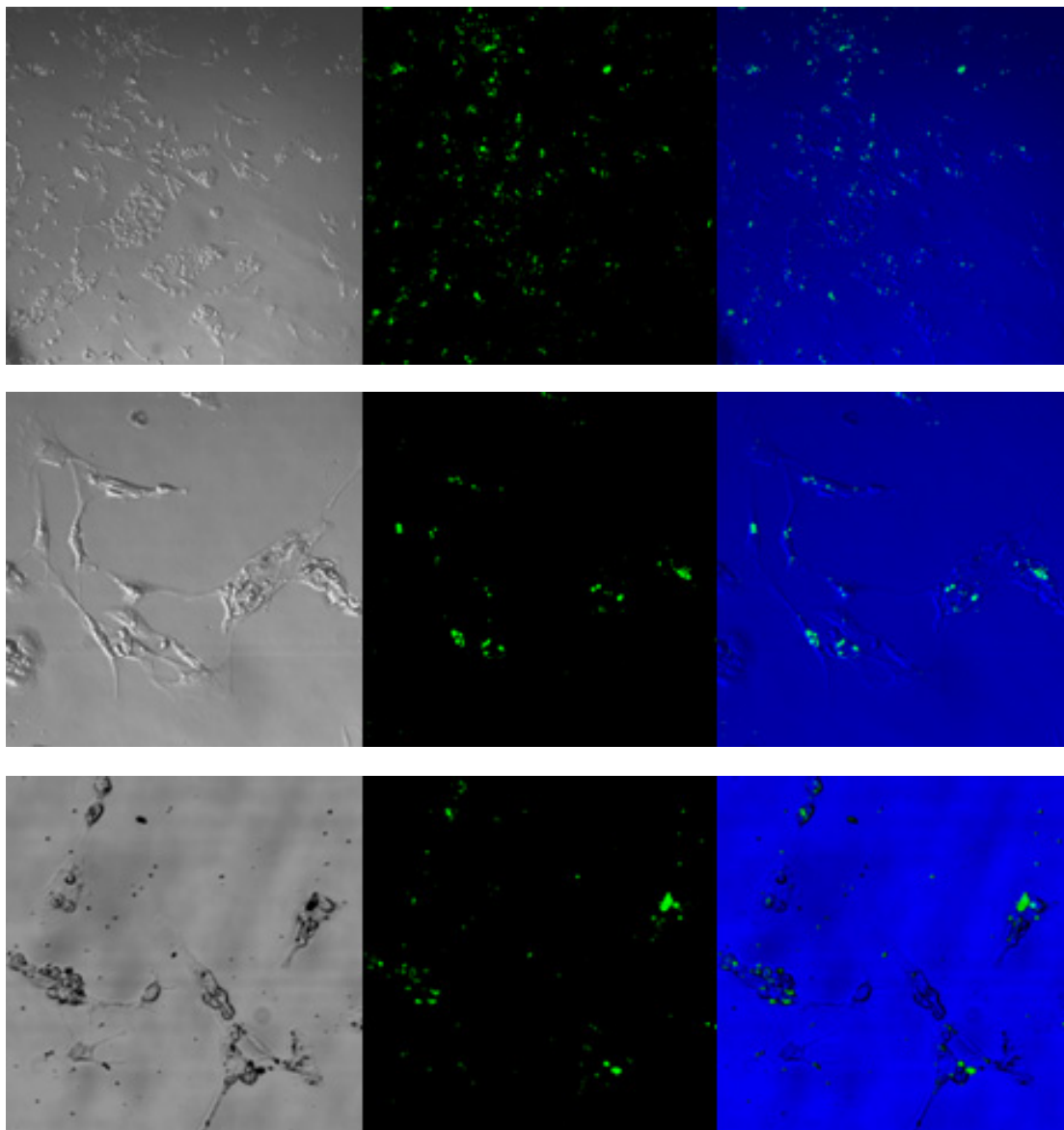


Figura 13. Imágenes del cultivo de CPN en presencia de NP a 0.2 mg/mL. Observadas por CF (izquierda) y F (centro), y su montaje (derecha).

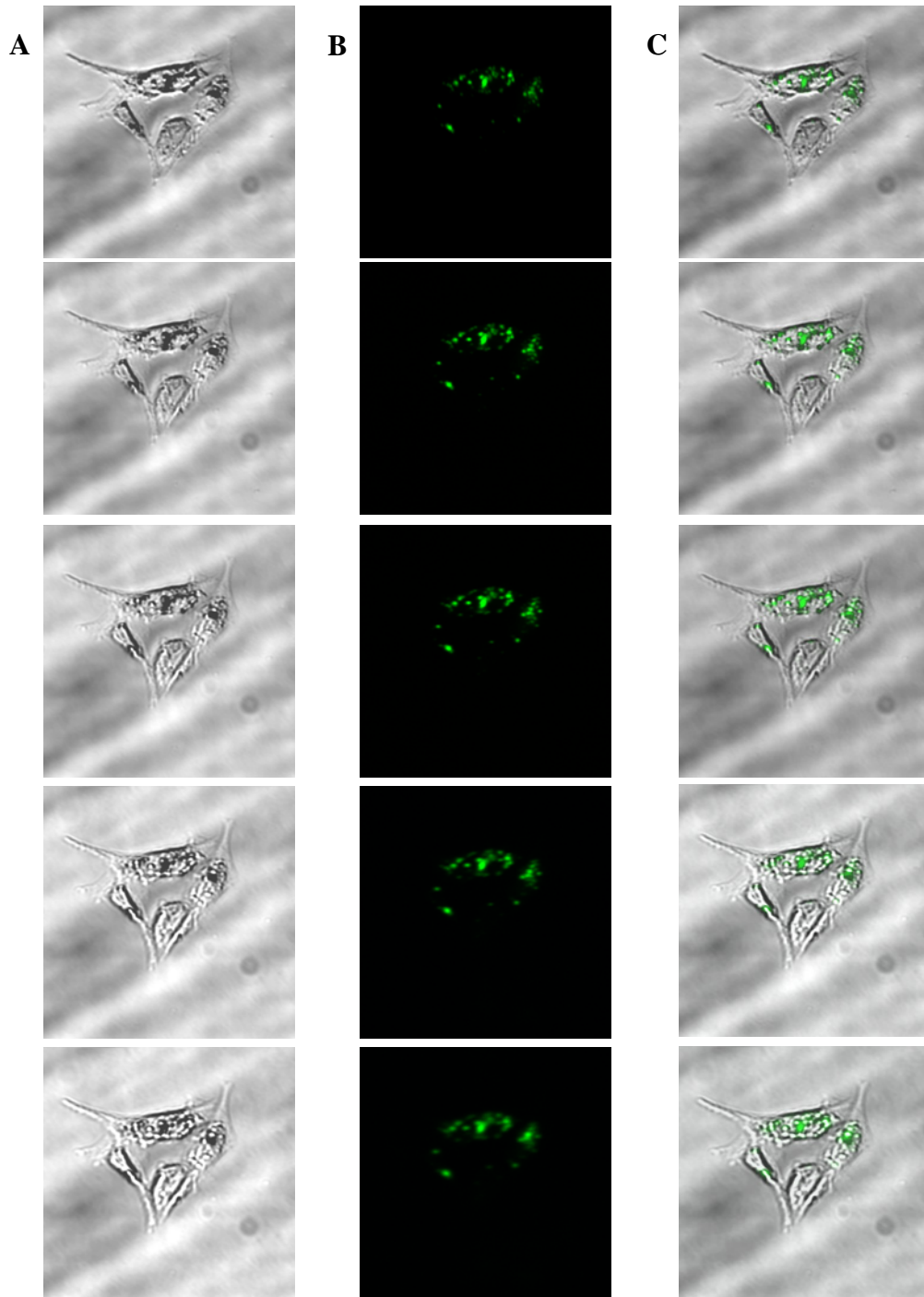


Figura 14. Imágenes por CF y F a diferentes profundidades de campo. El montaje de ambas señales (columna C) comprueba la incorporación de NP en las CPN. Los planos se presentan desde la parte anterior del campo (arriba) y hacia la parte posterior (abajo).

señales de CF y F de las imágenes tomadas sugiere que un buen número de NP han sido incorporadas en las CPN; sin embargo, no descarta la posibilidad de que simplemente se encuentren adheridas a la membrana celular. Para aclarar esta cuestión, se tomaron imágenes a diferentes profundidades de campo, tanto por CF como por F, y se realizó el montaje de ambas señales (figura 14). El aumento de intensidad de la fluorescencia en los planos medios comprueba que en esas células las NP han sido internalizadas y permanecen en el espacio citoplásmico.

El análisis por MC de los cultivos de CPN con NP a concentración de 2 mg/mL de medio se presenta en la figura 15. En las imágenes B a D de dicha figura se observa que la mayoría de las NP permanecen en el espacio extracelular y sólo algunas parecen haberse incorporado. Sin embargo, al correlacionar las imágenes B y C con las reconstrucciones respectivas, se respalda más la opción de que las NP estén adheridas a la membrana celular y no en el citoplasma. En la imagen D, por el contrario, tanto la fotografía como la reconstrucción muestran una alta posibilidad de que la NP se encuentre integrada al espacio citoplásmico de la célula.

Para analizar los resultados de la prueba *in vivo* (figura 16) se tomó una imagen panorámica del sitio de inyección y las zonas adyacentes por CF y F (A). Se perciben señales de fluorescencia inespecífica en el canal para Fluo, principalmente en el estriado y en las paredes del ventrículo. Más aún, el común denominador en estas áreas fue la presencia de diversos aglomerados de NP de gran tamaño y la ausencia de CPN con NP

incorporadas. No se observó influencia alguna del CME (por el imán implantado) en la distribución de las NP.

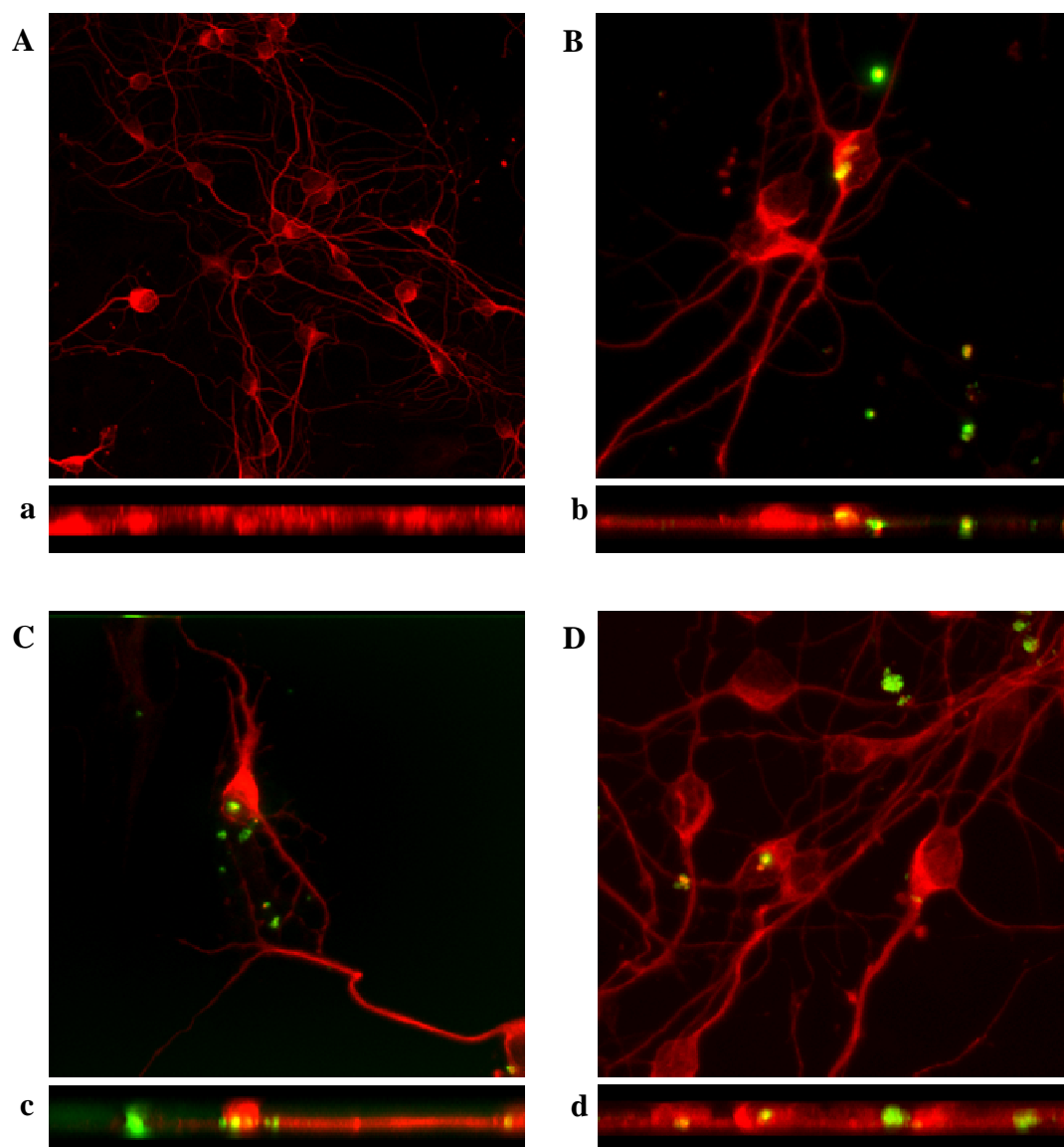


Figura 15. Imágenes por MC-F de CPN-Tuj1⁺ cultivadas con NP a 2 mg/mL. Cultivo control, sin NP (A), cultivos con NP (B-D) y reconstrucciones en el eje horizontal (a-d).

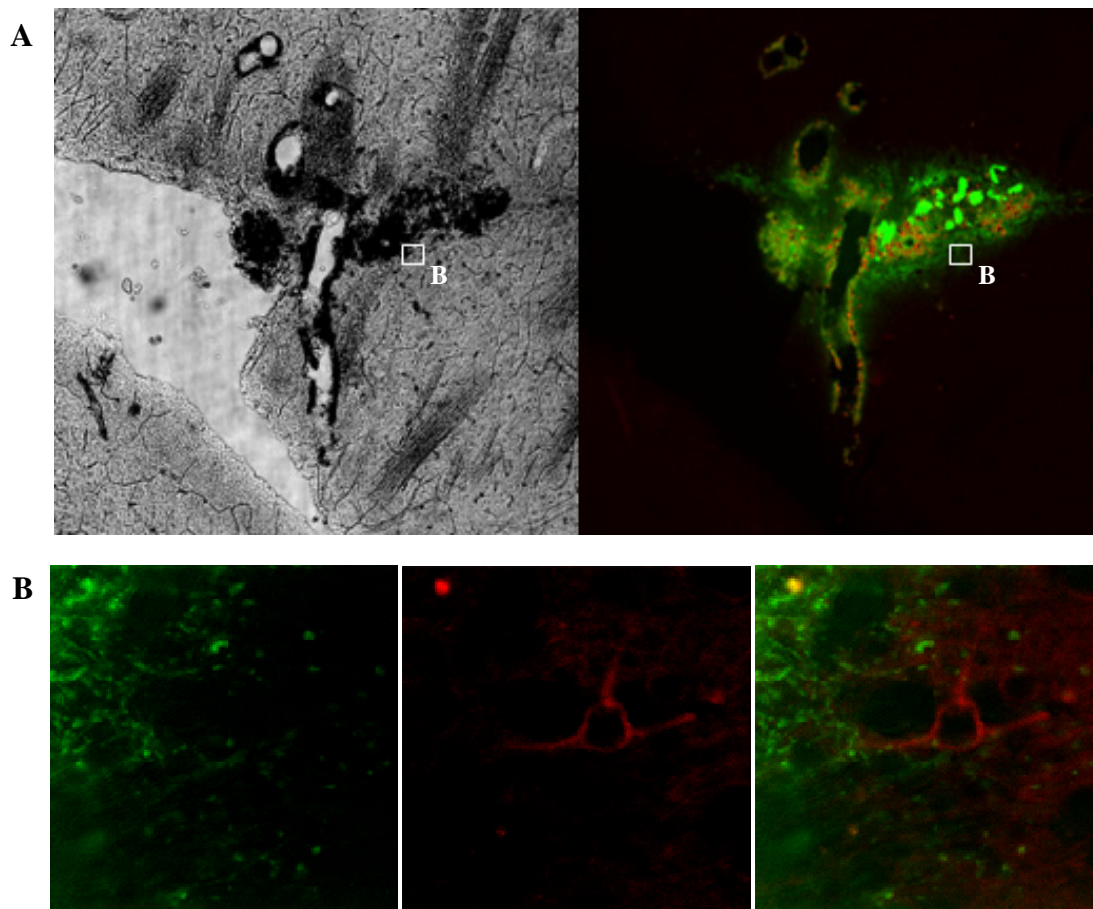


Figura 16. Imágenes por MC de la zona de implante de NP funcionalizadas. (A) Fotografías por CF (izquierda) y F (derecha) del ventrículo. Se observan células Tuj1⁺ (rojo) y grandes aglomerados de NP funcionalizadas con Fluo (verde). (B) Amplificación en la zona del estriado, observando canales independientes para Fluo (izquierda) y Tuj1⁺ (centro), así como el montaje de ambas (derecha), que muestra una incorporación nula de NP en las CPN.