



Estudio de la distribución de nanopartículas magnéticas en medios líquidos

orientado a la interpretación de experimentos de magnetofección in vitro

Nicolás G. Mele

Tesis de grado - Lic. en Física Médica

Dirección:

Prof. Dr. Francisco H. Sánchez

Departamento de Física. Fac. de Cs. Exactas

LA PLATA, 2017

Agradecimientos

Si bien esta tesis no es más que una expresión escrita de una materia, también lleva acarreada la finalización de una gran etapa en mi vida. Es por esto que me gustaría hacer un pequeño apartado para recordar a quienes me ayudaron a llegar aquí.

Quisiera comenzar agradeciendo a mi queridísima Universidad Nacional de La Plata, que me cobija desde la formación secundaria, dándome no sólo el conocimiento y la experiencia que lo forman a uno como persona, sino los lazos y amistades que me brindó en el camino.

A mis padres. Por ser mi ejemplo a seguir tanto en la vida personal como en la profesional. Por haberme enseñado el valor de la humildad y el trabajo, y por ayudarme en cada aspecto de mi vida.

A Camila. Mi compañera de vida, la familia que se elige. No sólo me dio contención, sino fortaleza para seguir adelante, sobre todo en los momentos en donde uno está por tirar la toalla.

A mi familia, ya que tuve la suerte de tener un apoyo que pocos pueden recibir, simplemente esperando un mejor futuro para mí, que es lo que estoy logrando gracias a ellos.

A mi segunda familia, los Vallefín, que desde el principio me recibieron, dándome el afecto que se le da a un hijo o hermano.

A mis compañeros de la Facultad, con el temor de olvidar a alguien: Mati, Turco, Edu, Tincho, Seba, Ramón, Fran, Nahuel, Laura, Ceci, Monse... Gracias por su gran compañía.

Al Dr. Francisco Sánchez, o mejor Quique, que me recibió desde un principio (no sabía qué le esperaba). Siempre mostrando, sin buscarlo, que con humildad y respeto se puede llegar muy alto.

A los doctores Gustavo Pasquevich y Pedro Mendoza, increíbles científicos y aún mejores personas. Desde el principio se involucraron con este trabajo y sin tener ningún compromiso formal, tuve dos co-directores adicionales.

Al grupo G3M en general, por su gran compromiso, dedicación y aprecio.

Al IFLP, querido instituto donde realicé este trabajo final.

Al INIBIOLP y al grupo dirigido por el Dr. Goya, que nos permitieron utilizar sus instalaciones para los experimentos de magnetofección.

Índice de contenido

1. Introducción	6
1.1 Nanopartículas magnéticas	6
1.1.1 Propiedades físicas de las NPM	9
1.1.2 Movimiento de NPM	10
1.2 Transferencia génica asistida magnéticamente	12
1.3 Objetivos	13
2. Metodología y materiales	16
2.1 Magnetofección	16
2.1.1 Coloide	17
2.1.2 Complejo Virus - NP y campo magnético	17
2.1.3 Cuantificación de la efectividad	18
2.2 Experimento A de distribución de NPMs	19
2.2.1 Coloides utilizados	20
2.2.2 Sistema de medida	20
2.2.3 Cálculo de fuerzas	21
2.2.4 Gravimetría de muestra encapsulada	23
2.3 Experimento B de distribución de NPMs	24
2.3.1 Sistema de medida	25
3. Resultados y discusión	28
3.1 Transferencia génica asistida magnéticamente	28
3.2 Experimento A de distribución de NPMs	30
3.2.1 Cantidad de NPMs a partir de F	37
3.3 Experimento B de distribución de NPMs	39
4. Conclusiones	46
5. Referencias	48
6. Anexo	52
Software realizado para procesamiento de imágenes	52

Índice de figuras

Figura 1.1. Tecnologías involucradas en el campo de la nanomedicina	7
Figura 1.2. Nanopartículas basadas en óxido de hierro para imágenes multimodales y terapia magneto-responsiva.....	8
Figura 1.3. Esquema de partículas de FFs funcionalizados.....	9
Figura 1.4. Esquema descriptivo del complejo NPM-virus que se utiliza en MF	13
Figura 2.1. Esquema básico de la técnica de magnetofección	16
Figura 2.2. Fotografía TEM de una nanopartícula de la muestra PEI-Mag2	17
Figura 2.3. Espectrofotómetro utilizado	19
Figura 2.4. Sistema experimental de medida, soporte de la placa de Petri, aplicador magnético y cámara digital.....	20
Figura 2.5 Esquema del sistema experimental de toma de imágenes.....	21
Figura 2.6. Posiciones en las que se midió el campo del imán.....	22
Figura 2.7. Características del imán modelado.....	22
Figura 2.8. Balanza utilizada en gravimetría.....	24
Figura 2.9. Disposición experimental del Experimento B.....	25
Figura 3.1. Fotografía de microscopía de fase y fluorescencia. Muestra a 0.9 mm de distancia con el imán, con complejo PEI-Mag2 + rAd-GFP.	28
Figura 3.2. Fotografía de microscopía de fase y fluorescencia. Muestra con complejo PEI-Mag2 + rAd-GFP sin aplicador magnético.....	29
Figura 3.3. Fotografía de microscopía de fase y fluorescencia. Muestra a la que se incorporó virus desnudo.....	29
Figura 3.4. Resultados obtenidos mediante espectrofotometría para las diferentes muestras analizadas.....	30
Figura 3.5. Fotografías del coloide PEI-Mag2 tras 10 min de exposición al campo magnético.	31
Figura 3.6. Fotografías del coloide Fe ₃ O ₄ con ác. cítrico tras 4 min de exposición al campo magnético.	31
Figura 3.7. Comparación de medidas con el coloide PEI-Mag2 tras 10 min y 30 min de exposición al campo magnético.	32
Figura 3.8. Comparación de medidas con el coloide con ácido cítrico tras 4 min y 10 min de exposición al campo magnético	32

Figura 3.9. Perfiles de intensidad de la imagen respecto a la posición radial en el recipiente. El FF utilizado fue NPM-Ac. Cada curva corresponde a una separación determinada imán- recipiente.	33
Figura 3.10. Medida de magnetización realizada en el equipo de VSM del IFLP.....	34
Figura 3.11 Distribución de las fuerzas radiales para distintas alturas (z) y separaciones del centro del imán (r), sobre NPM-Ac.	35
Figura 3.12. Distribución de las fuerzas radiales para distintas alturas (z) y separaciones del centro del imán (r), sobre NPMs PEI-Mag2.....	36
Figura 3.13. Distribución de las fuerzas axiales para distintas alturas (z) y separaciones del centro del imán (r), sobre NPMs PEI-Mag2.....	37
Figura 3.14. Curva de Fuerza Magnética sobre el coloide NPM-Ac respecto a la distancia imán-muestra, obtenida mediante el procesamiento de los datos del estudio de gravimetría.	38
Figura 3.15. Curva, obtenida bajo simulación del campo magnético, de Fuerza Magnética sobre una NPM del coloide NPM-Ac respecto a la distancia al imán.....	38
Figura 3.16. Curva, obtenida bajo simulación del campo magnético, de Fuerza Magnética sobre una NPM del coloide NPM-Ac respecto a la distancia al imán.....	39
Figura 3.17. Fotografías del coloide NPM-Ac tras 10 min de exposición al campo magnético. En cada imagen se muestra la distancia imán-muestra en mm.	40
Figura 3.18. Perfiles de intensidad de la imagen respecto a la posición radial en el recipiente. Cada curva corresponde a una separación determinada imán- recipiente.	41
Figura 3.19. Radio de los primeros cinco discos de NPMs formados en el recipiente para cada distancia.....	41
Figura 3.20. Distribución de las fuerzas radiales para distintas alturas (z) y separaciones del centro del imán (r), sobre NPM-Ac.	42
Figura 3.21. Perfiles de intensidad respecto a la altura del ferrofluido en una vista lateral... ..	42
Figura 3.22. Intensidad a una altura 9,18 mm a diferentes tiempos, para una distancia imán-muestra de 2 mm.	43
Figura 3.23. Estudio gravimétrico del mismo sistema para distancias de 0 mm y 5 mm (2 y 7 mm al sumar el espesor de la base del recipiente)	43
Figura 3.24. Sistema gravimétrico utilizado para comparar las fuerza magnética en z con los perfiles de intensidad.	44
Figura A. Programa realizado para el procesamiento de las imágenes.....	53

Introducción

*Cuando suelto mi canto lo habrán de ver
desnudo como el alma que pongo en él.*
José Larralde

1. Introducción

1.1 Nanopartículas magnéticas

La nanociencia es una disciplina que ha ganado increíble importancia en la ciencia moderna, debido a que permite trabajar a niveles moleculares y celulares para producir grandes avances en la vida cotidiana y la salud a través de diversos diseños en la nanoescala **(1)**. La nanotecnología implica la manipulación de la materia con al menos una dimensión del tamaño de entre 1 a 100 nanómetros. La aplicación en el campo de la salud ha dado lugar a la Nanomedicina, que es empleada para mejorar la calidad de vida de los seres humanos, combatiendo las enfermedades de una forma innovadora.

La Nanomedicina utiliza las herramientas y principios derivados de la nanotecnología para mejorar la salud humana y provee la capacidad de revolucionar drásticamente la cura, alivio y prevención de enfermedades, así como de reforzar el cuidado de la salud, a través del diseño, la caracterización, la producción y la aplicación de nanomateriales inteligentes, a partir de su capacidad para ser tanto biointeractivos, en el sentido que poseen la facultad de inducir alteraciones en células y bacterias, así como bioreactivos, ya que inducen la respuesta funcional de los organismos biológicos **(2)**. Es un campo interdisciplinario donde confluyen la medicina, la ética, la matemática, la ingeniería, la física, la química, la bioquímica, y la ciencia de los materiales **(Fig.1.1)**

En las últimas décadas ha habido una gran expansión en el campo de la nanomedicina con el desarrollo de nuevas partículas para el diagnóstico y tratamiento del cáncer **(3)**. Las nanopartículas tienen propiedades únicas debido a sus dimensiones pequeñas y la gran relación área/volumen que les permite unirse, adsorberse y acarrear compuestos tales como pequeñas moléculas de drogas, DNA, RNA, proteínas, etc. con muy alta eficiencia. Sus propiedades particulares las hacen altamente atractivas para el tratamiento del cáncer.

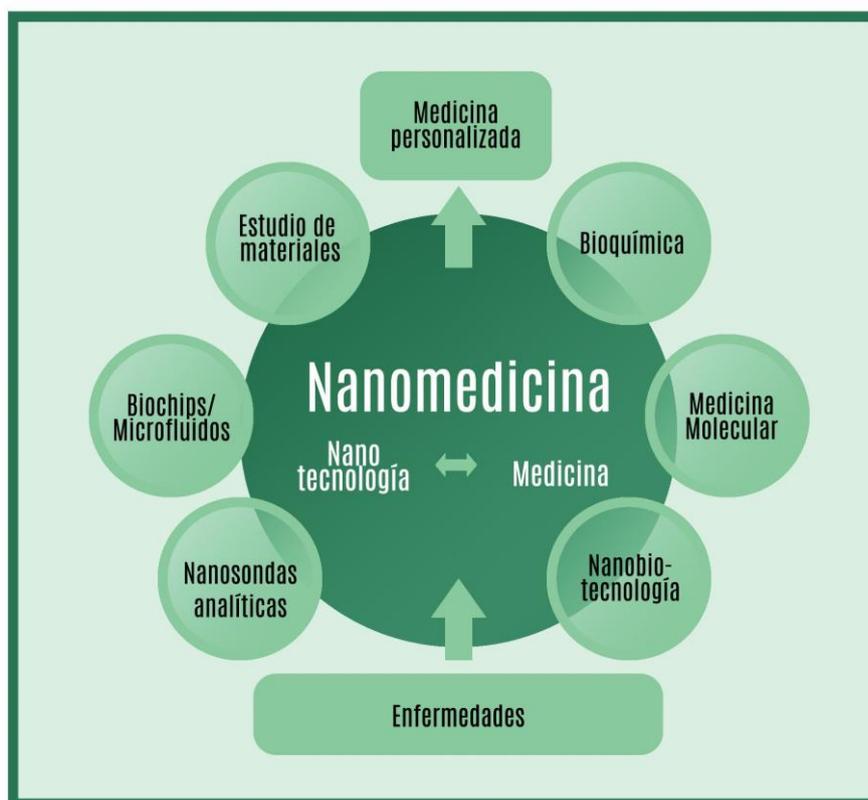


Figura 1.1. Tecnologías involucradas en el campo de la nanomedicina. Traducción del esquema de Riehemann et al. (3)

Las nanopartículas magnéticas (NPM) son una clase de nanopartículas que pueden ser manipuladas a través de un campo magnético. Las NPM exhiben baja toxicidad (4,5) y propiedades fisicoquímicas fácilmente controlables. Las aplicaciones que se han encontrado de las nanopartículas magnéticas (NPM) son de gran relevancia, desde industriales, como las tintas magnéticas, sellados para motores, entre otros; hasta las aplicaciones biomédicas (6–8). Estas últimas son posibles debido a las características que las NPM presentan, como su tamaño, comparable a las dimensiones de las entidades biológicas intracelulares, sumado a sus particulares características magnéticas: la configuración monodominio que da lugar al comportamiento superparamagnético bajo condiciones específicas a temperatura ambiente, les confiere una elevada magnetización espontánea y una alta susceptibilidad magnética (1,9). Esto permite que se las pueda manipular externamente, una vez ingresadas al organismo, mediante campos que no son dañinos para este último y fácilmente obtenibles en el ámbito de la investigación y la clínica. A pesar de que se han producido nanopartículas de todo tipo y composición, las más usuales son las de magnetita (Fe_3O_4) y maghemita ($\alpha\text{-Fe}_3\text{O}_4$), autorizadas por la DFA y la ANMAT. También suelen funcionalizarse las NPM mediante recubrimientos que aumentan su estabilidad y biocompatibilidad, y que les confieren selectividades específicas (10).

Las principales aplicaciones biomédicas pueden dividirse en terapéuticas y diagnósticas (11). Las diagnósticas incluyen mejoras en los estudios de imagen por resonancia magnética, aplicando las nanopartículas como elementos de contraste; separación magnética, en donde se unen microesferas magnéticas a un revestimiento biocompatible

funcionalizado para unir a él las células blanco, y atraerlas para estudios posteriores mediante un imán externo; y la detección marcada, que utiliza nanopartículas funcionalizadas para detectar enfermedades en etapas muy tempranas (**Fig. 1.2**)(8).

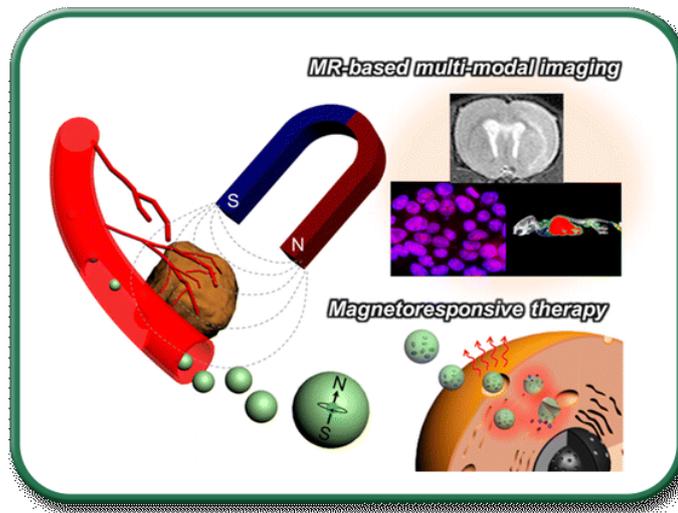


Figura 1.2. Nanopartículas basadas en óxido de hierro para imágenes multimodales y terapia magneto-responsiva (8)

Las aplicaciones terapéuticas, por otro lado, buscan producir un cambio en el organismo, ya sea destruyendo un agente extraño o maligno por medios físicos o químicos, como lo son la *hipertermia magnética*, o inducir un cambio para solventar una falencia de una célula dañada, como ocurre en la *magnetofección* (MF) (5). En la hipertermia magnética se interiorizan nanopartículas en una región y luego se las expone a una campo magnético alterno. Si se elige una frecuencia y una intensidad de campo adecuados, las NPM absorberán suficiente energía, la cual, al ser disipada en el medio, elevará su temperatura hasta el valor terapéutico deseado. Esto permite una aplicación en ciertos tipos de cáncer, aprovechando que las células malignas poseen una mayor sensibilidad a la temperatura que las células normales. Las temperaturas utilizadas preferencialmente son entre 41°C y 46°C. La MF será desarrollada más adelante en este capítulo.

Es entonces necesario tener presente que las NPM muestran las siguientes particularidades: i) son más pequeñas o comparables a los tamaños de las células (10-100um), que los virus (20-450nm), que las proteínas (5-50nm) que los genes (2nm ancho y 10-100 nm de largo), ii) pueden ser manipuladas por un campo magnético externo, que conduce al transporte e inmovilización de las MNPs, iii) pueden disipar energía de un campo externo, transformándose en agentes hipertérmicos (5,6).

Los ferrofluidos (FF) se componen de NPMs, normalmente de magnetita, frecuentemente del orden de 10 nm (12,13). Este tamaño es lo suficientemente pequeño para que la agitación térmica las distribuya uniformemente dentro del fluido portador, así como para contribuir a la respuesta magnética general del fluido (14–16). Los FFs han sido utilizados en medicina desde hace varias décadas para tratamientos de aneurismas, embolización selectiva guiada magnéticamente en arterias renales, como agentes de contraste para

diagnóstico de tumores de hígado, para detección temprana de cáncer por separación inmuno-magnética, en el desarrollo de corazones implantables, entre otras aplicaciones (9,10).

En la figura 1.3 (10) se muestran distintos tipos de recubrimientos de partículas descritos en la literatura:

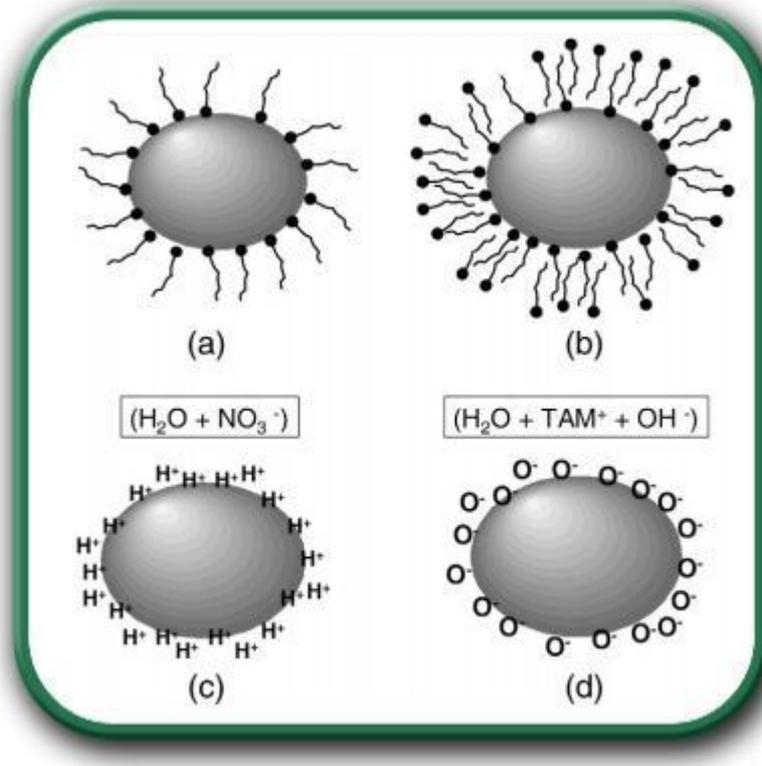


Figura 1.3. Esquema de partículas de FFs funcionalizados con a) capa lipídica simple; b) capa lipídica doble; c) capa ácida; d) capa alcalina. (10)

1.1.1 Propiedades físicas de las NPM

Los materiales magnéticos suelen presentar dominios magnéticos, que son regiones en donde los momentos magnéticos de los átomos o iones se encuentran alineados uniformemente, aun en ausencia de un campo magnético externo (17). Si se reduce el tamaño de una partícula ferromagnética por debajo de un tamaño crítico D_s , está tendrá un único dominio (partícula monodominio). Para una partícula esférica de magnetita D_s , se encuentra entre los 76 y 80 nm de diámetro (18).

Es posible caracterizar a las nanopartículas monodominio por su momento magnético neto μ , el cual puede aproximarse por $\mu = M_s V$, siendo M_s su magnetización espontánea y V su volumen. Debe notarse que el momento μ de una partícula monodominio es miles de veces más grande que los momentos atómicos, siendo, por ejemplo, $\mu = 9200\mu_B$ para una partícula de óxido de hierro de diámetro medio $D = 7\text{nm}$.

Una partícula monodominio con anisotropía uniaxial expuesta a un campo externo H , con momento magnético μ

posee una energía

$$E = KV \sin^2(\theta) + \mu H \cos(\phi)$$

donde K es la constante de anisotropía, ϕ es el ángulo entre el campo externo y el momento, y θ es el ángulo entre el eje de fácil magnetización y el momento.

Si consideramos un conjunto de nanopartículas inmersas en un medio líquido, de manera tal que las partículas se encuentran libres de rotar, la magnetización del conjunto de nanopartículas en equilibrio termodinámico, bajo un campo H a una temperatura T , estará determinada por la distribución de Boltzmann, siendo **(19)**

$$M(H, T) = N\mu \left(\coth \left(\frac{\mu_0 \mu H}{k_B T} \right) - \frac{k_B T}{\mu_0 \mu H} \right)$$

con μ_0 la permeabilidad en el vacío y k_B la constante de Boltzmann. Nótese que la función que aparece entre paréntesis es la función de Langevin $L(x)$, con $x = \mu_0 \mu H / k_B T$.

Ahora bien, un sistema real estará compuesto por partículas con diferente momento magnético y tamaño. Es aquí donde surge el concepto de sistema polidisperso, en donde podemos definir una función $f(\mu)$ que represente la distribución de momentos, donde $f(\mu)d\mu$ indicará el número de partículas con momento magnético entre μ y $\mu + d\mu$. Así, la magnetización del sistema queda de la forma de

$$M(H, T) = N \langle \mu_z \rangle = \frac{1}{\langle V \rangle} \int_0^\infty \mu L(x) f(\mu) d\mu$$

en donde N es el número medio de NPMs por unidad de volumen en el sistema, $\langle \mu_z \rangle$ la componente media del momento de las NPMs en la dirección z del campo externo, $\langle V \rangle$ el volumen medio de las NPM. En la bibliografía se suele utilizar la función de distribución log normal para describir $f(\mu)$

$$f(\mu) = \frac{1}{\mu \sigma_\mu \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{\ln^2(\mu/\psi)}{2\sigma_\mu^2}}$$

siendo sus parámetros σ y ψ , y sus estimadores estadísticos, el momento magnético medio $\langle \mu \rangle$ y la desviación estándar σ_{SD} , con la forma

$$\langle \mu \rangle = \psi e^{\sigma_\mu^2/2}$$

$$\sigma_{SD} = \psi e^{\sigma_\mu^2/2} \sqrt{e^{\sigma_\mu^2/2} - 1}$$

1.1.2 Movimiento de NPM

Un sistema de nanopartículas en un medio líquido y sometido a un campo magnético experimentará una redistribución espacial por diferentes causas: (i) magnética, (ii) arrastre por el fluido, (iii) interacción partícula-fluido, (iv) energía cinética térmica, (v) efectos

interpartícula (interacciones de Van der Waals y dipolares magnéticas) **(12)**. Para un análisis más sencillo, consideraremos sistemas con concentración de NPMs suficientemente baja como para poder despreciar las interacciones interpartícula. Consideraremos que la interacción fluido-partícula es suficientemente intensa como para garantizar la estabilidad del coloide. Así, podemos describir su movimiento a partir de la ecuación de difusión de Fick modificada

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \vec{\nabla} \cdot (D\vec{\nabla}c + \vec{U}c)$$

en donde $D = \nu_c kT$ es la constante de difusión de las partículas en el fluido de viscosidad η , y $\nu_c = 1/(6\pi\eta R_{p, hid})$ es la movilidad de una nanopartícula de radio hidrodinámico efectivo $R_{p, hid}$, el cual considera el recubrimiento de la partícula.

La velocidad de arrastre $\vec{U} = \mu\vec{F}$ está dada por la fuerza total \vec{F} sobre la NPM, que en este caso, consideraremos compuesta por la fuerza magnética \vec{F}_m , la fuerza de arrastre \vec{F}_f , y la fuerza de gravedad \vec{F}_g

$$\vec{F} = \vec{F}_g + \vec{F}_f + \vec{F}_m = 0$$

Respecto a la fuerza de arrastre, se puede calcular a partir de la movilidad μ_c y la diferencia de velocidades, de la nanopartícula v_p y la del fluido, v_f :

$$\vec{F}_f = \frac{1}{\mu_c}(\vec{v}_p - \vec{v}_f)$$

La fuerza magnética, por su parte, surge a partir del dipolo magnético de momento $\vec{\mu}$ de la NPM estudiada y el campo magnético aplicado sobre ella. La expresión para la fuerza magnética toma la forma

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

expresión válida para sistemas en ausencia de corrientes eléctricas o de desplazamiento. Bajo las condiciones que hemos impuesto con anterioridad, es decir, partículas no interactuantes entre sí, esta última expresión puede reescribirse, teniendo en cuenta que $\vec{\mu} = \vec{M}V$, siendo $V = \langle V \rangle$ el volumen medio de las nanopartículas y M la magnetización media de la NPM. Esto permite reescribir la ecuación anterior como

$$\vec{F}_m = V(\vec{M} \cdot \vec{\nabla})\vec{B}$$

Una geometría de interés para este trabajo es la cilíndrica, ya que es simple, y es la que se usa frecuentemente en experimentos de magnetofección, en particular el que se discutirá en este trabajo. Usando coordenadas cilíndricas la fuerza magnética puede escribirse como

$$\vec{F}_m = V \left(M_\rho \frac{\partial}{\partial \rho} + M_z \frac{\partial}{\partial z} \right) \vec{B}$$

Nótese que para obtener la fuerza magnética, es necesario medir la magnetización de la muestra y el campo magnético externo.

El trabajo teórico realizado por Furlani y Ng (20) describe un estudio sobre la fuerza magnética aplicada a nanopartículas de magnetita, en condiciones similares a un experimento de magnetofección y resuelve numéricamente la ecuación de difusión. Este trabajo se utilizará como marco comparativo de uno de los experimentos a presentar, en el cual se respetaron las proporciones utilizadas en el mencionado artículo. En presente trabajo se obtendrá la fuerza media sobre partículas de dos coloides, para dos aplicadores magnéticos diferentes, en función de la posición, y se la utilizará para interpretar los resultados. La solución de la ecuación de difusión será abordada en un trabajo futuro.

1.2 Transferencia génica asistida magnéticamente

El genoma humano contiene la información codificada necesaria para la expresión, altamente coordinada y adaptable al ambiente, del proteoma humano, es decir, del conjunto de las proteínas del ser humano. Con los asombrosos conocimientos del genoma humano, no era raro esperar que surgiera una técnica que pudiera reemplazar algún gen mutado o ausente en una célula por otro sano, para promover la expresión normal de una proteína que se vio afectada por una enfermedad o por envejecimiento celular. Para esto, puede hacerse uso de la naturaleza invasiva de los virus (o vectores virales), que tienden a verter su ARN dentro de una célula blanco para que esta produzca las proteínas por él (7,21–23). Ahora bien, si el virus es sintetizado artificialmente, sería posible generarlo para que promueva la expresión de una proteína en particular. Sin embargo, esta técnica por sí sola posee tres grandes inconvenientes: ineficiencia en la recepción por la célula, liberación insuficiente de ADN dentro de la célula, y transporte y localización poco efectiva del núcleo. En este aspecto, las NPMs pueden proveer mayor flexibilidad y precisión para controlar la estructura y composición del sistema de administración, incluso facilitar la fijación del virus a la célula, si es que las NPMs están funcionalizadas.

La técnica de MF consiste en favorecer la formación de complejos entre vectores virales y las NPMs, y así acelerar y controlar el transporte del material genético mediante un campo magnético externo uniforme. Las variables que se suelen considerar en este tipo de técnica son el tiempo en el que se expone al complejo virus-NPMs (al que se introdujo en un medio celular) al campo magnético externo, denominado tiempo de magnetofección t_{MF} ; y las intensidades de campo y gradiente del campo aplicado (definidos por la posición relativa imán-muestra, para un imán específico)(24–26).

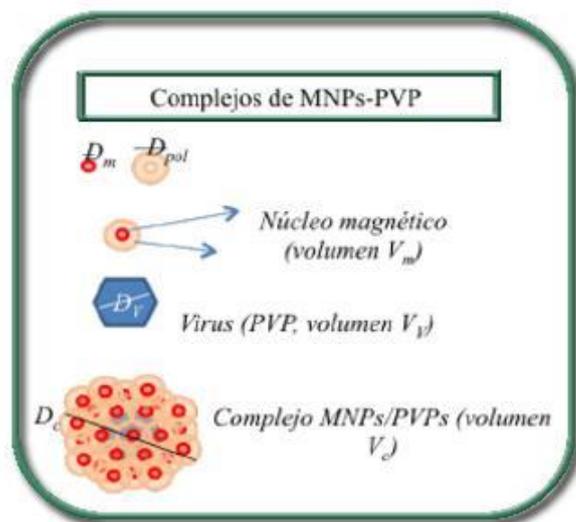


Figura 1.4. Esquema descriptivo del complejo NPM-virus que se utiliza en magnetofección (27)

1.3 Objetivos

El presente trabajo inicia con una experiencia de magnetofección *in vitro*, en donde sus preparativos iniciales, como el cultivo celular y la síntesis del virus, fueron realizados previamente por la Dra. Lorena Arciniegas e investigadores del grupo de investigación del Dr. Rodolfo Goya del INIBIOLP.

A partir de este experimento surge el interrogante de cómo se redistribuyen las NPMs al ser expuestas a un campo magnético externo, en las condiciones de MF. Con ese propósito, se desarrollarán ensayos que tendrán como fin variar convenientemente la distancia imán-muestra y el tiempo t_{MF} (aquél durante el cual se expone al complejo virus-NPMs al imán) con configuraciones *ad hoc*. Estas configuraciones no sólo se aplican al caso específico de MF, sino que pueden usarse en cualquier técnica de concentración de NPMs, como puede ser una liberación controlada de fármacos. Una posible aplicación directa es el tratamiento de tejidos neuronales en contacto con ventrículos cerebrales, que se encuentran interconectados entre sí y contienen líquido cefalorraquídeo, aprovechando que éste fluye muy lentamente.

Bajo el marco teórico de la MF, se realizaron entonces dos experimentos para estudiar la distribución de NPMs. El primero fue bajo las mismas condiciones que un experimento convencional de MF, esto es, el coloide dentro de una placa de Petri, expuesto al mismo aplicador que en dicho experimento, variando las distancias entre este último y la placa.

Para el segundo experimento se consideró el trabajo teórico realizado por Furlani y Ng (20) donde se estudia la fuerza ejercida sobre nanopartículas de magnetita por un imán de NdFeB, en condiciones aplicables a un estudio de magnetofección. Para poder contrastar con este estudio, se eligió un sistema tal que mantenga las proporciones que se describían en éste. Así es que se utilizó un arreglo de 4 imanes de 2 cm de diámetro y 0.5 cm de alto, que en conjunto lograban 2 cm de alto, y un recipiente de 1.6 cm de diámetro y un alto

mayor a 1.2 cm (2400 ml aproximadamente), que es la altura que se requería que tuviera el coloide.

El presente trabajo se realizó en el Instituto de Física de la Plata (IFLP), junto al grupo de investigaciones G3M, a quien quisiera agradecer especialmente por su excelente predisposición, amabilidad y compromiso.

Metodología y materiales

2. Metodología y materiales

2.1 Magnetofección

La transferencia génica es una práctica que se basa en utilizar la naturaleza invasiva del virus (o un vector viral) para lograr que la célula blanco sintetice aquella proteína que uno desea. Esto se logra ya que el virus utilizado es sintetizado artificialmente, por lo que al hacerlo, es posible imponer cuál es el ARN con el que se va a “infectar” a la célula blanco (28).

Ahora bien, si con esos vectores virales formamos un complejo con NPMs, el movimiento de estos mismos ya no dependerá sólo del arrastre o del movimiento Browniano para alcanzar la célula, sino que se verá afectado por la presencia de un campo magnético externo. Por lo tanto, es posible dirigir y localizar complejos mediante un campo magnético externo especialmente diseñado. En estos casos se habla de transferencia génica asistida magnéticamente o magnetofección (Fig. 2.1)

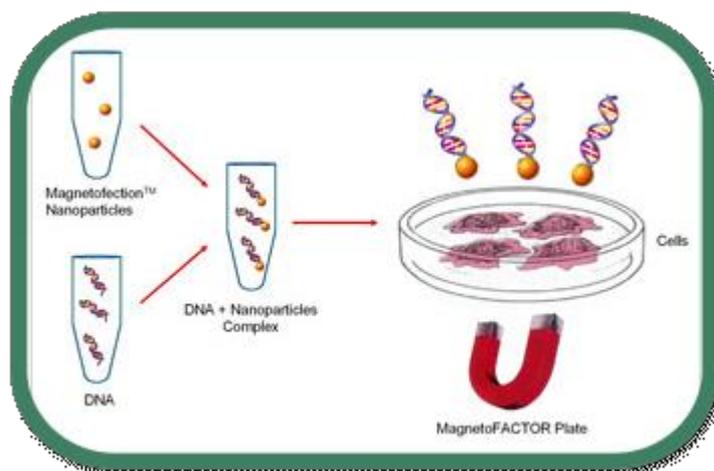


Figura 2.1 Esquema básico de la técnica de magnetofección. Se complejizan NPMs con virus para infectar una célula blanco con mayor rapidez y eficiencia

Los experimentos *in vitro* se realizan sobre cultivos de células B92 (línea celular tumoral derivada de células gliales de tejido nervioso de rata) en placas de Petri de 35 mm de diámetro. El aplicador magnético utilizado para esta experiencia fue un imán cilíndrico de NdFeB, de 5 cm de diámetro y 1 cm de alto.

En los estudios reportados en bibliografía que se llevan a cabo en esta práctica, se varía sistemáticamente el tiempo de magnetofección (t_{MF}), que es el tiempo al que se expone el complejo de NPM-virus al campo magnético, en el medio celular, y la distancia entre el imán y las células. En este trabajo se ha realizado un estudio para un tiempo $t_{MF} = 30$ minutos y una distancia $d = 2$ mm (29). Las lecturas se realizaron sobre tres tipos de muestras: una muestra control, en donde se coloca sobre las células sólo el virus, sin complejar; otra

muestra con virus complejados con NPMs, pero sin aplicar un campo magnético externo; y la tercera con todos los elementos.

Gracias a la tutela de la Dra. Lorena Arciniegas, se pudo realizar este experimento en los laboratorios del INIBIOLP, en la Facultad de Cs. Médicas de la UNLP.

2.1.1 Coloide

Las nanopartículas magnéticas que se utilizaron para este experimento fueron sintetizadas en Alemania, en la Universidad Técnica de Munich, por integrantes del laboratorio dirigido por la Dra. Olga Mykhaylyk y el Dr. Christian Plank (28). Las mismas pertenecen a un coloide denominado PEI-Mag2, el cual se compone de nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4), con un recubrimiento de polietilenimina (PEI), polímero biocompatible que evita la agregación de las NPMs. Esto último permite que las NPMs sean estables en un medio acuoso. Poseen un carozo de aproximadamente 6.5 nm de diámetro y una cubierta de unos 4.5-5 nm de espesor (Fig. 2.2).

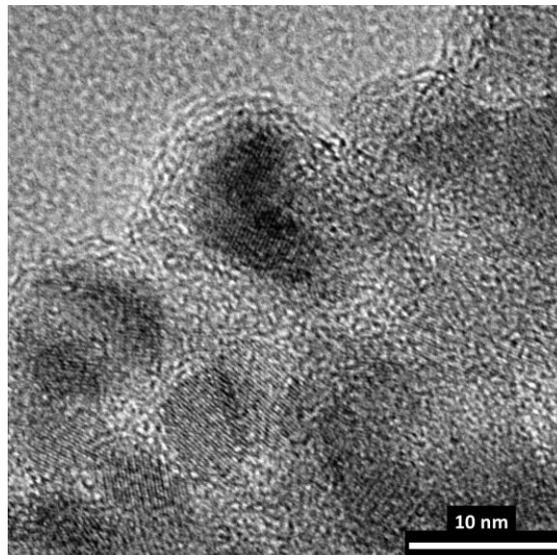


Figura 2.2 Fotografía TEM de una nanopartícula de la muestra PEI-Mag2

2.1.2 Complejo Virus - NP y campo magnético

El complejo Virus-NPMs será el que se adicione a las células cultivadas *in vitro* para lograr la magnetofección. Para poder armarlo se requiere seguir un protocolo adecuado, que se detalla a continuación.

El virus utilizado es un adenovirus replicante con capacidad para sintetizar la proteína fluorescente verde (rAd-GFP por sus siglas en inglés). Al mismo, sintetizado y criogenizado, se lo diluye en 3 mL de un medio de cultivo especial (MEM) sin suero, el cual se compone de 2 mL de MEM y otros 1000 uL, colocados cada 200 uL, del virus (27).

Al FF de NPMs se lo debe diluir en MEM en una proporción 1/10. En un estudio previo se ha encontrado que la relación óptima entre las nanopartículas y la partícula viral física (PVP) es de 0,5 fg/PVP. Por este motivo se siguió con las siguientes proporciones **(28)** :

- 200 uL de MEM con virus
- 1,5 uL de NP con MEM (dilución 1/10)
- 198,5 uL de MEM sola.

El sistema se debe dejar en reposo 30 min con el objeto que llegue a complejizar los virus con las NPMs. En este lapso se le cambia el medio a las células que se utilizarán como blanco.

Una vez transcurrido el tiempo de complejización, se colocan 10 uL de complejo MAG-Ac con rAd-GFP en cada placa de Petri y se las somete a un tiempo de magnetofección $t_{MF} = 30$ minutos, bajo la influencia de un campo magnético y en una estufa de cultivo, para que los virus tomen contacto con las células. La configuración geométrica del sistema consta de la placa de Petri colocada inmediatamente encima de la superficie del imán, haciendo coincidir los ejes de ambos elementos.

Una vez finalizado este segundo lapso, se realizará nuevamente un cambio del medio celular, para eliminar posibles complejos que no han ingresado a las células. Se procede de esta forma para contabilizar solamente aquellos complejos que lograron entrar en las células durante el tiempo de magnetofección. Para finalizar, se lo deja incubar 72 horas.

2.1.3 Cuantificación de la efectividad

El proceso de cuantificación de la efectividad de la magnetofección se lleva a cabo gracias a que el virus utilizado en estos estudios no es el virus terapéutico, sino uno que sintetiza la proteína fluorescente verde. De esta forma es fácilmente cuantificable si el método es efectivo o no, ya que es una proteína que no sintetizan las células blanco escogidas. Por lo tanto, se contabilizará la síntesis de esta proteína en las células blanco debido a la infiltración del virus. Para esto se realizarán dos estudios diferentes.

El primero consta de una observación de la fluorescencia mediante un microscopio invertido Olympus IX71, adquiriendo fotografías con una cámara digital Olympus E-330 adaptada al mismo. Se seleccionan 3 zonas al azar y se contabilizan las células que presentan fluorescencia respecto a las que no la poseen.

El segundo método consiste en usar el espectrofotómetro **(Fig. 2.3)**. Este equipo medirá la fluorescencia de cada muestra específicamente, siendo esta medida proporcional a la cantidad de proteína fluorescente verde sintetizada.



A. Espectrofotómetro DTX 880



B. Placa lectora de 96 pocillos con fondo óptico

Figura 2.3. Espectrofotómetro utilizado (27)

Para realizar este paso se deben lisar las células de cada placa. Con este fin se prepara un buffer de lisis de PBS (Phosphate Buffered Saline). Se retira el MEM que poseen las células, se agregan 350 uL del buffer y se lo deja actuar por 30 minutos a 4°C.

Una vez transcurridos los treinta minutos, se procede a centrifugar la muestra. Para este tiempo, las células ya están muertas y desintegradas, por lo que se procede a un raspado de las placas de Petri con el buffer de lisis y posteriormente se los centrifuga a 13000 rpm por 2 minutos, logrando una separación de los restos celulares (células no lisadas, organelas, etc.) de la proteína GFP y elementos más pequeños. Del sobrenadante de la solución de centrifugado se colocaron aproximadamente 300 uL en cada pocillo de la placa lectora del espectrofotómetro DTX 880. También se colocó buffer de lisis en algunos pocillos para tener muestras control.

2.2 Experimento A de distribución de NPMs

El primer experimento realizado buscó emular las condiciones en las que se trabaja en MF, por lo que se utilizó una placa de Petri como recipiente del FF, el mismo imán, variando la separación imán-muestra, como se explica a continuación y dos FFs diferentes.

La idea inicial, tanto de este experimento como del experimento en medio cilíndrico (**sección 2.3**) fue repetir más adelante los experimentos en medios semi-líquidos, como podrían ser hidrogeles, para simular la capa celular presente en los experimentos reales de magnetofección *in vitro*. Esta idea finalmente no pudo concretarse, ya que luego de varios ensayos con los hidrogeles que pudieron obtenerse, los mismos no se adherían a la base de la placa de Petri, como sí lo hace la monocapa celular. Incluso, la capa de hidrogel flotaba, por lo que se hizo imposible su realización hasta encontrar una solución factible.

2.2.1 Coloides utilizados

Este experimento se realizó con dos tipos de coloides, uno de NPM PEI-Mag2 que poseen un carozo de magnetita de diámetro entre 6.0 y 6.5 nm y una cubierta de polietilenimina, el mismo que fue utilizado en el experimento de magnetofección; y un segundo coloide sintetizado en el IFLP, bajo la tutela de la Ing. Diana Arrieta, de Fe_3O_4 funcionalizado con ácido cítrico (NPM-Ac).

Al coloide de magnetita sintetizado en el IFLP se le realizó una valoración de hierro con dicromato de potasio 0,704 N, que dio como resultado una concentración de 10.2 (0.8) mg/mL (masa de Fe total por volumen de FF).

2.2.2 Sistema de medida

Para observar la respuesta del FF al imán, se realizaron registro de capturas fotográficas durante el proceso de decantado a diferentes distancias relativas imán-coloide. en un lapso total de tiempo de entre 4 y 30 minutos, según el coloide, a una distancia fija, diferente en cada medida. La disposición era la siguiente: se colocó el imán en una plataforma de altura graduable, y en una estructura de aluminio se situó la muestra de FF, la cual quedaba fija, manteniendo una simetría cilíndrica, esto es, haciendo coincidir los ejes del imán y de la placa de Petri. Durante el tiempo de la medida, una cámara fotográfica (Nikon D3100), también alineada haciendo coincidir el eje de la misma con el del sistema, capturaba imágenes en una vista superior de la placa, con una frecuencia determinada por un software de computadora (DigiCamControl) a la que se encontraba conectada. En las **figuras 2.4 y 2.5** se muestra una fotografía del dispositivo experimental.

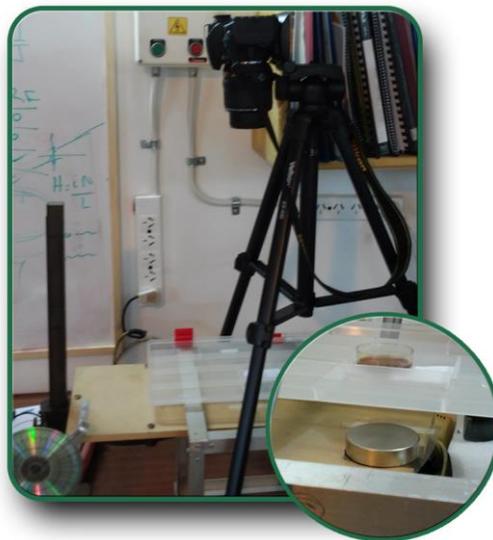


Figura 2.4 Sistema experimental de medida donde se observa la plataforma de altura graduable, el soporte de la placa de Petri, el aplicador magnético y la cámara digital.

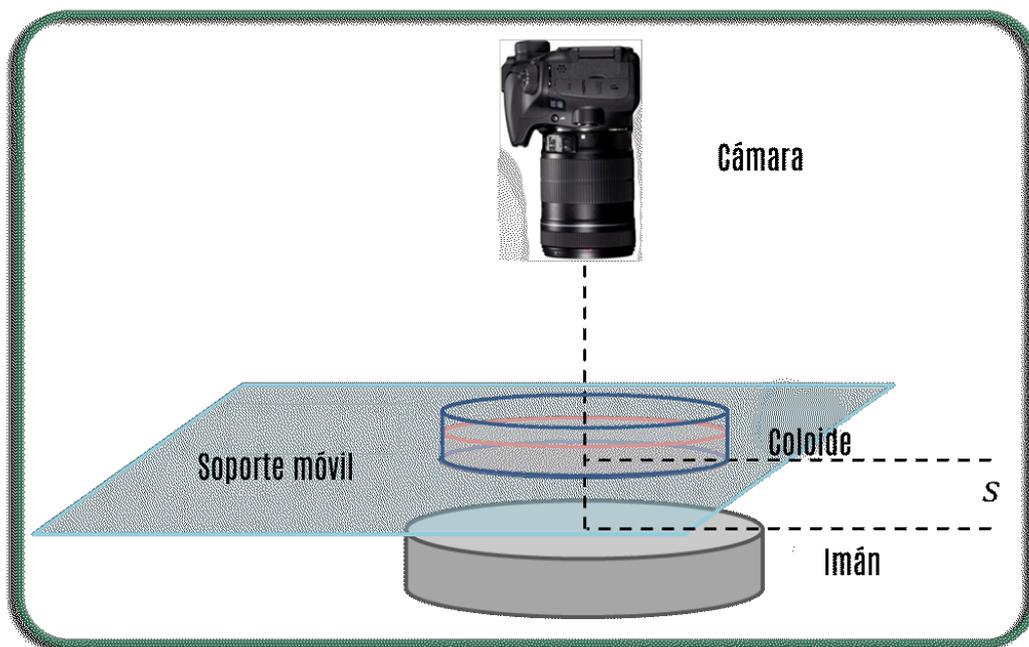


Figura 2.5 Esquema del sistema experimental de toma de imágenes.

La muestra se diluyó en una placa de Petri para que adquiriera un contraste tal que se puedan distinguir patrones visualmente. La placa de Petri se colocó en un esqueleto de aluminio y un imán de 5 cm de diámetro y 1 cm de alto, de NdFeB de 0.3 T en la plataforma de altura graduable, manteniendo una simetría cilíndrica. Para esta experiencia se tomaron imágenes desde una vista superior con la cámara fotográfica, y se observaron los patrones que las NPM dejaban tras estar expuestas a fuerzas magnéticas durante periodos de tiempos entre 4 y 30 minutos, dependiendo del FF. La selección de tiempos se eligió debido a que los diferentes FF presentaban distintas respuestas, siendo el FF de magnetita con cubierta de ácido cítrico (aquel sintetizado en el IFLP), el de mayor respuesta, en comparación con el PEI-Mag2. Para determinar el tiempo que se iba a utilizar en cada muestra, se procedió a hacer una medida a una distancia imán-muestra de 45 mm de 30 minutos cada una, y luego se observó a qué tiempo alcanzaban un estado de equilibrio.

Las distancias entre el imán y la muestra están comprendidas entre 3 mm (espesor combinado del soporte y de la placa de Petri) y 45.8 mm.

2.2.3 Cálculo de fuerzas

Como se vio anteriormente, para calcular fuerza ejercida sobre las NPMs del FF, es necesario obtener el valor de la magnetización de la muestra y el campo magnético externo (**Véase sección 1.1.2**). El campo fue modelado a partir de datos experimentales, mientras que la magnetización se midió en un equipo magnetómetro de muestra vibrante (VSM por sus siglas en inglés).

Las medidas experimentales del campo se realizaron con una sonda Hall, para diferentes distancias a la superficie del imán y a diferentes separaciones del eje. En la **figura 2.6** se muestra un esquema de los puntos de medida. En cada punto se colocó el detector de la

sonda Hall para medir la componente vertical del campo magnético, asumiendo una homogeneidad cilíndrica. Estas medidas se repitieron para un arreglo de cuatro imanes unidos de 2 cm de diámetro y 0.5 cm de alto cada uno, concierne al experimento siguiente. En este caso también se midió la componente radial del campo.

Con estos datos, se procedió a modelar el imán como un arreglo de N espiras de radio a , separadas una distancia d , por las que corre una corriente i (**Fig. 2.7**). El modelado lo realizó el Dr. Gustavo Pasquevich mediante una secuencia de comandos en el lenguaje Python, donde se realizó un ajuste múltiple sobre todos los datos medidos, para diferentes valores de r y z .

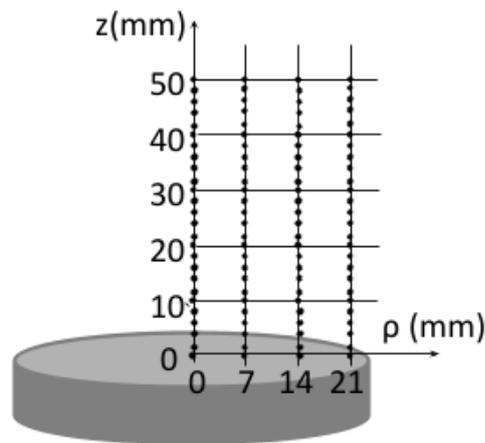


Figura 2.6. Se muestran las posiciones en las que se midió el campo del imán.

Para estudiar la respuesta magnética de las partículas y ver la dependencia de la magnetización M respecto de un campo variable H , se utilizó un VSM. Bajo las condiciones necesarias que exige el equipo, la muestra fue encapsulada en un tubo termo-contraíble, similar al utilizado en el estudio de gravimetría, pero esta vez, con un tubo de diámetro de 4 mm. El procedimiento de encapsulación se describe en la **sección 2.2.4.1**.

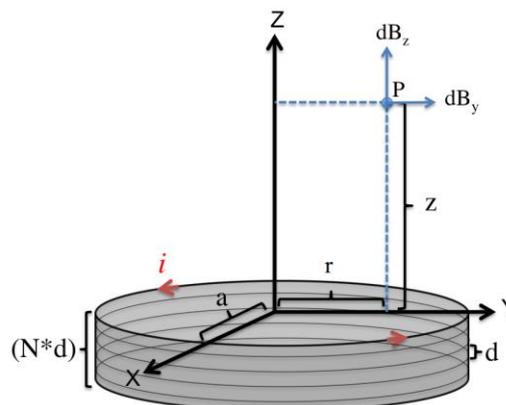


Figura 2.7. El imán se modeló como un arreglo de N espiras de radio a , por las que corre una corriente i , separadas a una distancia d . Se calculan las componentes radial (r) y axial (z) del campo magnético B

2.2.4 Gravimetría de muestra encapsulada

Para comenzar a caracterizar la muestra se realizó una serie de medidas gravimétricas, en donde se colocó la muestra de FF encapsulada sobre una balanza, bajo la influencia de un campo magnético generado por un imán de NdFeB, a diferentes distancias. El imán utilizado fue el mismo que para el experimento anterior, cilíndrico de 5 cm de diámetro y 1 cm de altura.

2.2.4.1 Encapsulación

Para proceder con la encapsulación, se requirió un tubo termocontraíble de 154 mm de diámetro (sin contraer). Al mismo se le calentó uno de sus extremos para luego sellarlo a presión. Acto seguido, se vertió, mediante una micropipeta, 900 μ l de la muestra previamente homogeneizada por agitación, para luego sellar el otro extremo del tubo, teniendo cuidado de que no quede aire en la cápsula.

Tras sellar el primer extremo, luego de la incorporación de la muestra y seguido del sellado final, se pesó el tubo termocontraíble para tener una certeza de la cantidad de FF dentro de la encapsulación. La mayor incertidumbre surge al calentar el plástico para su contracción y sellado, ya que puede suceder que parte del FF se evapore. Aunque también existe posibilidad de que se generen pérdidas al cerrar completamente el encapsulado, por lo que hay que trabajar con mucho cuidado. La calidad del sellado puede inferirse pesando el encapsulado con el fluido antes y después de sellar. En este experimento es muy importante conocer con precisión la cantidad de FF para una correcta titulación.

Al realizar la encapsulación se buscaba que la forma de la misma quede lo más homogénea y plana posible, para poder considerar que su altura es despreciable, respecto de la separación imán-muestra y que las nanopartículas no realicen un recorrido vertical extenso dentro del preparado. Para esto se requirió encapsular varias veces, hasta llegar a una muestra adecuada.

2.2.4.2 Medición del peso relativo

La disposición experimental del sistema (**Fig. 2.8**) se basó en una balanza electrónica Radwag PS 1000/C/2, con una precisión de $d= 0,001$ g, y una plataforma de altura graduable. La balanza tomaba las medidas del peso aparente de la muestra, influenciado por el campo magnético de un imán de NdFeB de 5 cm de diámetro y un cm de espesor, y con un campo de 0,3 T. Los datos de la balanza eran adquiridos y guardados en tiempo real en una computadora personal, mediante un programa en código Python realizado por miembros del grupo G3M.

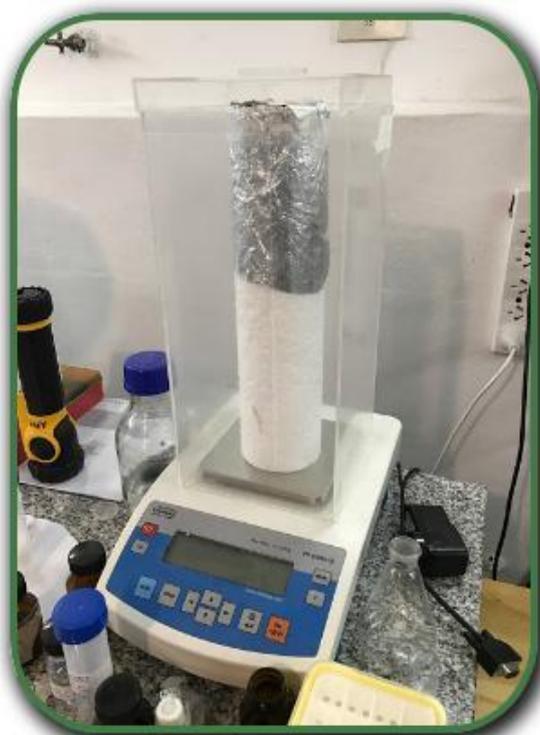


Figura 2.8. Balanza utilizada en la experiencia, donde se muestra la columna de telgopor que se utilizó para evitar que el imán altere la lectura.

El imán se colocó en la plataforma de altura graduable, por encima de la muestra, y se iba cambiando la altura regularmente cada 40 segundos. Durante este tiempo, a partir de las lecturas del peso aparente, se estimó que las nanopartículas lograban estabilizarse bajo la influencia del imán en cada altura. La graduación en la altura se estableció con un indicador de grados que posee el engranaje que moviliza la plataforma, de tal manera que cada diferencia en altura fue de 10° , lo que equivale a 0.72 mm en cada paso.

Con el fin de que el imán no altere las lecturas de la balanza, ni su funcionamiento, se alejó el sistema muestra-imán de la balanza, colocando para ello la muestra sobre una columna de telgopor. En la **figura 2.8** se muestra con detalle el sistema.

2.3 Experimento B de distribución de NPMs

Para comenzar, se observó la respuesta del FF dentro de un cilindro de acrílico, a cuatro imanes de NdFeB en contacto mutuo (simulando así un único imán de 2 cm de diámetro y 2 cm de altura). Esta metodología especial se hizo de tal forma que siguiera las proporciones del estudio realizado por Furlani y Ng (20), adecuándose a la disponibilidad de las geometrías presentes en el mercado y manipulables. Este último artículo expone resultados teóricos, mediante una simulación, de la respuesta de NPMs de hierro bajo la influencia de imanes del mismo material que el utilizado en el presente trabajo.



Figura 2.9 Disposición experimental para mantener las proporciones del trabajo de Furlani y Ng (20). Se muestra el arreglo de imanes a la izquierda, el dispositivo fabricado en la impresora 3D y el recipiente de acrílico.

2.3.1 Sistema de medida

Para estudiar el comportamiento del FF bajo la influencia del imán anteriormente mencionado, se diseñó un envase de acrílico de 8 mm de radio interno y 20 mm de altura (el cual se lo rellenaba con 2410 uL de FF diluido, equivalente a 12 mm de altura). Por otro lado, se compraron 4 imanes de NeFeB de 10 mm de radio y 5 mm de altura, los cuales se unieron para formar un equivalente a un imán de 10 x 20 mm. De esta forma se respetaron las proporciones del trabajo de Furlani y Ng (20) cuyas medidas eran $R_C = 2$ mm, $L_C = 3$ mm, $R_M = 2.5$ mm y $L_M = 5$ mm, donde R_C y L_C se refieren al radio y altura del envase para el FF, y R_M y L_M el radio y altura del imán utilizado para la simulación.

Por otra parte se diseñó un sistema de posicionamiento relativo imán-receptáculo teniendo en cuenta la geometría particular de ambos, haciendo uso de una impresora 3D. Se imprimió un cilindro hueco de 2mm de radio interno, para introducir aquí al imán. En ambos extremos se encastraron dos bases, una que brindaba soporte a todo el sistema y una segunda superior, con centro hueco, que sostenía el recipiente con la muestra de NP, pero permitiendo que el imán esté en contacto con este último. Las paredes laterales del cilindro contenían perforaciones, lugar donde se colocaban topes para fijar la posición del imán. Las mismas permitían un rango de distancias desde 2 mm (espesor de la base del recipiente) hasta 24 mm, con intervalos de a 3 mm entre cada perforación. La **figura 2.9** muestra este nuevo sistema. Con esta configuración fue posible adquirir imágenes más cercanas y con mayor comodidad a la hora del monitoreo, cuando se adquirirían los datos.

El protocolo experimental fue el siguiente:

Se tomaron del FF inicial 400 uL y se los vertió en el recipiente de acrílico. Seguidamente, se tomaron 2000 uL de agua destilada para diluirlo. De esta manera, la muestra alcanzó una altura de 12 mm y asimismo fue factible visualizar diferencias significativas en los resultados, ya que con las muestras concentradas, ya que con la muestra concentrada esto era imposible.

Al recipiente se lo dejó dos minutos en un equipo de limpieza por ultrasonido Branson 2510, en modo sonicador. Esto fue para evitar aglomeración de las nanopartículas, especialmente luego de cada medida, debido a su prolongado tiempo de exposición al campo magnético del imán.

Seguido a esto se “setearon” las cámaras para un disparo automático. Las cámaras utilizadas fueron una Nikon D3100 y otra Nikon D5100. El “seteo” fue tanto mediante el software de la misma cámara D5100 como desde un software libre para computadora DigiCamControl.

Una vez que se verificó que todo estaba en posición, se activaron las cámaras y se colocó el recipiente en su soporte, dejándolo expuesto al campo magnético durante 12 minutos.

Resultados y discusión

3. Resultados y discusión

3.1 Transferencia génica asistida magnéticamente

En esta sección se muestran los resultados obtenidos en los experimentos de magnetofección. Los mismos se obtuvieron a partir de dos diseños experimentales, uno haciendo uso de captura de imágenes por microscopía, y el otro utilizando un espectrofotómetro.

Los ensayos se realizaron a un tiempo de magnetofección de 30 minutos y a una distancia de 2 mm de separación para tres tipos de muestras: complejadas (PEI-Mag2 + rAd-GFP) bajo acción del imán, complejadas sin el imán y con el adenovirus desnudo.

Las **figuras 3.1, 3.2 y 3.3** incluyen las fotografías adquiridas en las condiciones antes descriptas. En el primer ejemplo (**Fig. 3.1**) se pudo constatar que de aproximadamente 650 células de la muestra, unas 245 fueron correctamente infectadas, sintetizando la proteína GFP.

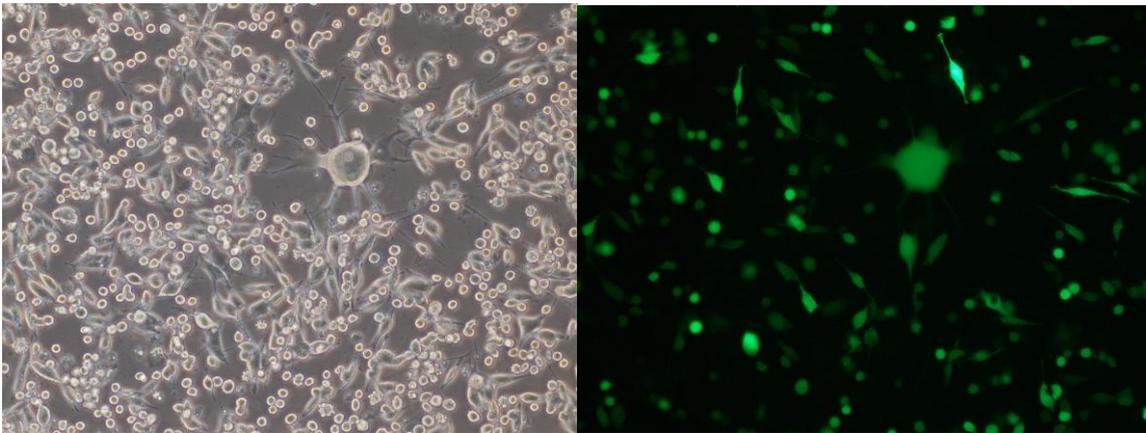


Figura 3.1. Fotografía de microscopía de fase y fluorescencia. Muestra a 0.9 mm de distancia con el imán, con complejo PEI-Mag2 + rAd-GFP.

La siguiente figura (**Fig. 3.2**) muestra la respuesta cuando se agrega el complejo PEI-Mag2 + rAd-GFP, sin exponer las células a un campo magnético. Aquí se nota una abrupta caída en la transferencia génica, ya que sólo unas 80, de un total de aproximadamente 840 células, pudieron sintetizar la proteína fluorescente verde.

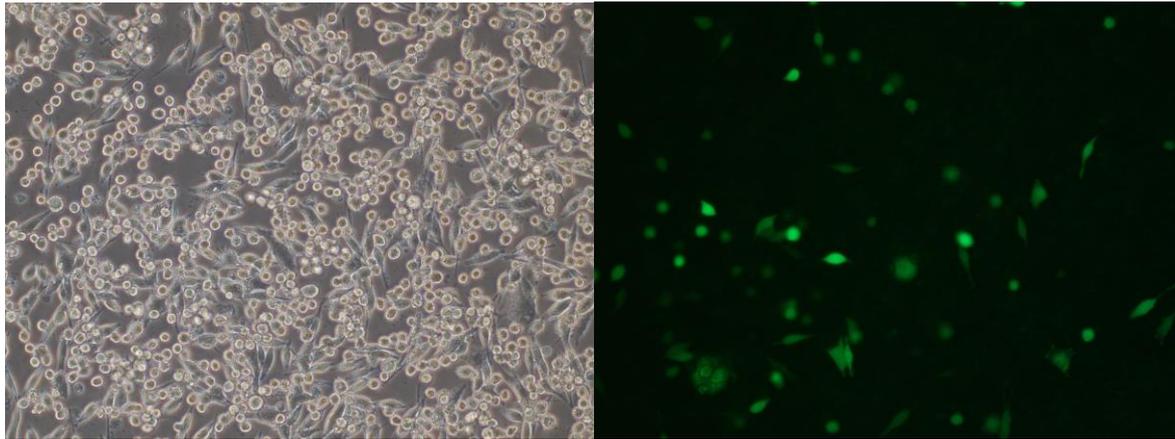


Figura 3.2. Fotografía de microscopía de fase y fluorescencia. Muestra con complejo PEI-Mag2 + rAd-GFP sin aplicador magnético.

Para finalizar, se muestran (**Fig. 3.3**) los resultados para una muestra con vectores virales desnudos. Nuevamente puede observarse una disminución del número de células fluorescentes, respecto a los resultados anteriores, incluso comparando con las mostradas en la **figura 3.2**. El total de células contabilizadas fue aproximadamente 820, mientras que tan sólo 45 expresaron el gen de la GFP.

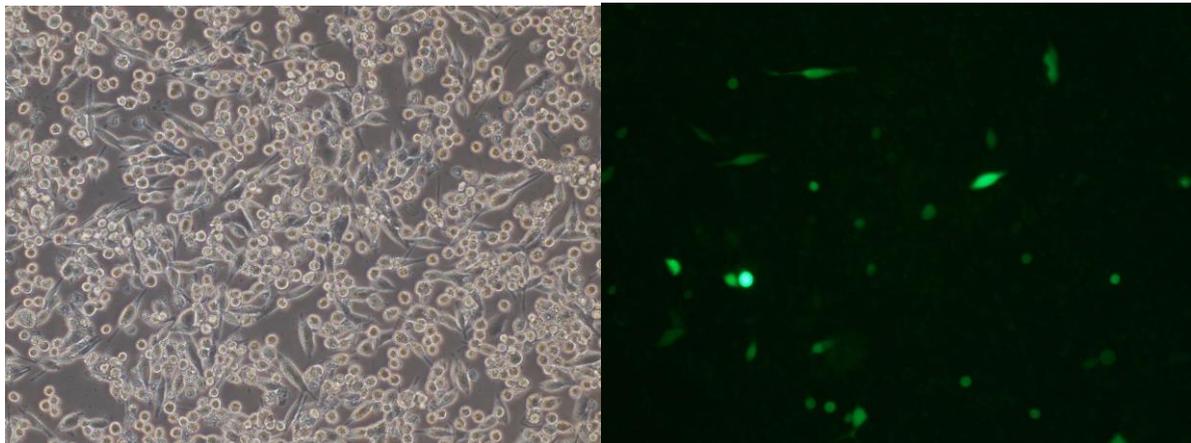


Figura 3.3. Fotografía de microscopía de fase y fluorescencia. Muestra a la que se incorporó virus desnudo.

Seguidamente se procedió a realizar medidas espectrométricas. Por cada placa de Petri se rellenaron 3 pozos de la cubeta del equipo, adicionalmente se incluyeron 4 pozos con buffer como control. Las lecturas individuales y sus promedios se muestran en la **figura 3.4**.

Como puede observarse en estos gráficos, la transferencia génica aumenta notablemente su rendimiento cuando es asistida magnéticamente. Incluso las partículas adheridas al virus aumentan el rendimiento respecto al virus desnudo. Esto puede deberse tanto a una mayor fuerza de gravedad que experimenta la muestra complejada, como a una mayor afinidad debido a su coraza de PEI.

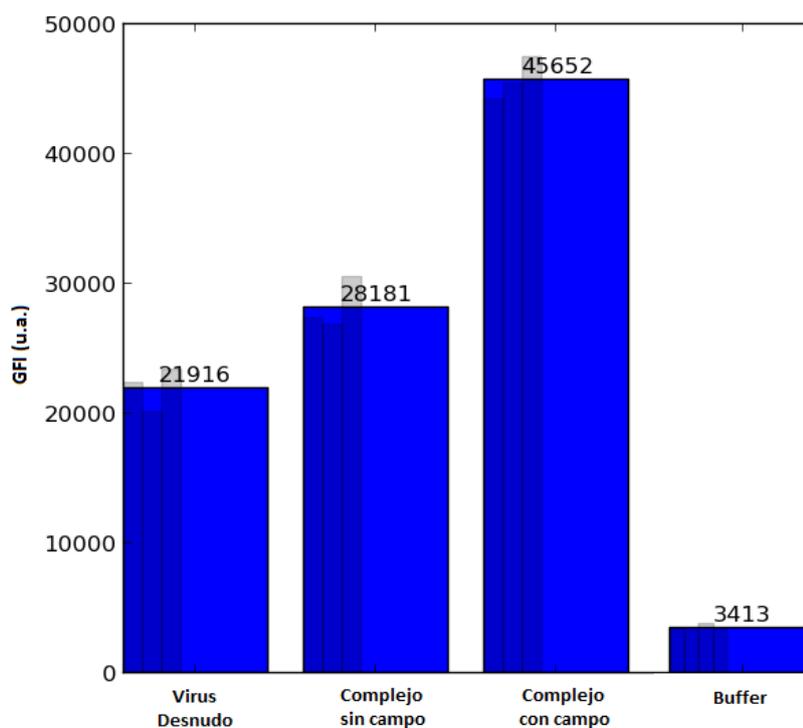


Figura 3.4. Resultados obtenidos mediante espectrofotometría para las diferentes muestras analizadas. El promedio se muestra con las barras azules más gruesas, indicando su valor en la parte superior.

3.2 Experimento A de distribución de NPMs

Los ensayos de distribución de las NPMs se realizaron utilizando dos sistemas experimentales, A y B. Los experimentos tipo A se llevaron a cabo utilizando dos coloides: uno constituido por el coloide con PEI-Mag2 y un segundo con NPMs de magnetita recubiertas con ácido cítrico (NPM-Ac), dentro de una placa de Petri.

La **figuras 3.5 y 3.6** muestran la vista superior de las placas de Petri conteniendo a los dos coloides que se supusieron en estado estacionario. En ambos casos se pueden distinguir anillos y discos de diferentes diámetros o distribuciones uniformes. La exposición al campo magnético de cada coloide fue de 4 minutos para el NPMs-Ac y de 10 minutos para el PEI-Mag2.

La observación comparativa de estas dos figuras revela que en el caso del coloide NPM-Ac la disposición de las NPMs muestra una distribución anular en la mayoría de los casos. Por otra parte, las NPMs PEI-Mag2 solo se distribuyen formando anillos en los primeros tres casos (distancias 3 mm, 7 mm y 11,3 mm).

Para comprobar que se había alcanzado el estado estacionario, se realizaron experiencias a mayores tiempos de exposición. Pudo evidenciarse que aquellos estados del coloide NPM-Ac con una distancia imán-muestra mayor a 24,24 mm y que inicialmente

presentaron anillos, a tiempos más prolongados mostraron discos (ver figura 3.8). Se pudo constatar que la suposición inicial que asumía estado estacionario luego de un periodo de 4 minutos era errónea. Dicho estado sólo se evidenció luego de los 10 minutos, donde se corroboró que la configuración del sistema ya no cambiaba considerablemente.

El ensayo a tiempos de 30 minutos con el coloide PEI-Mag2 reveló que al aumentar el tiempo de exposición, el diámetro de los discos se reducía. Esto se muestra en la figura 3.7.

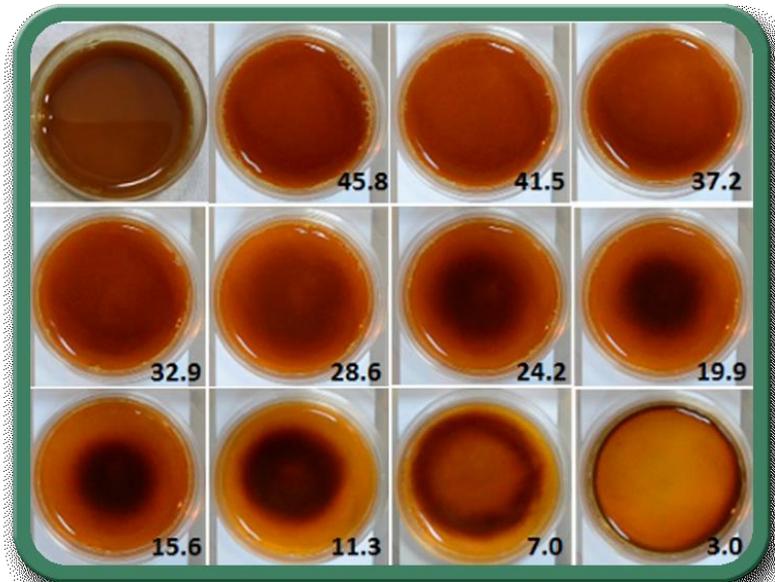


Figura 3.5. Fotografías del coloide PEI-Mag2 tras 10 min de exposición al campo magnético. En cada imagen se muestra la distancia imán-muestra en mm.

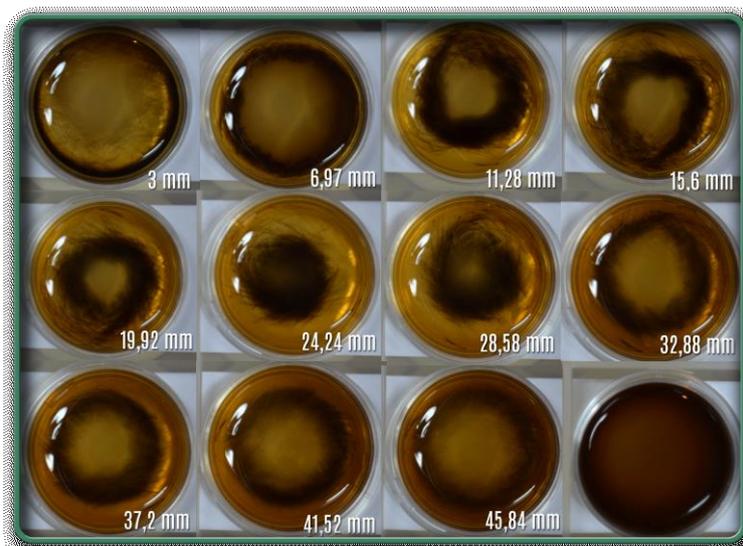


Figura 3.6 Fotografías del coloide Fe_3O_4 con ác. cítrico tras 4 min de exposición al campo magnético. En cada imagen se muestra la distancia imán-muestra en mm.

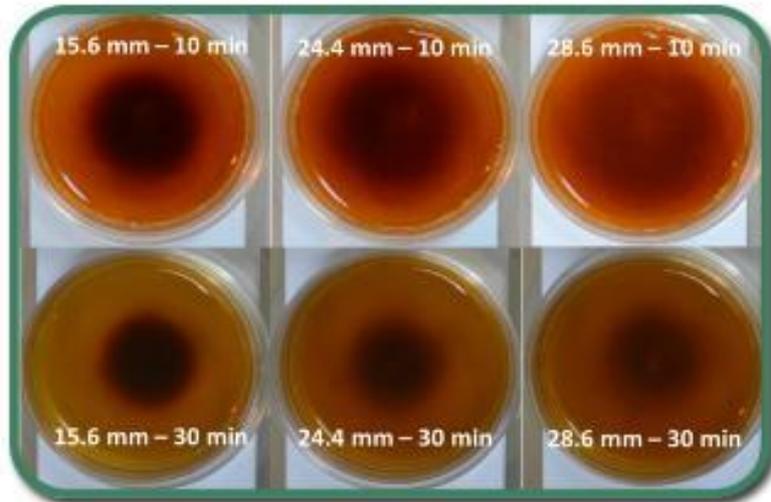


Figura 3.7. Comparación de medidas con el coloide PEI-Mag2 tras 10 min y 30 min de exposición al campo magnético. En cada imagen se muestra la distancia imán-muestra en mm.

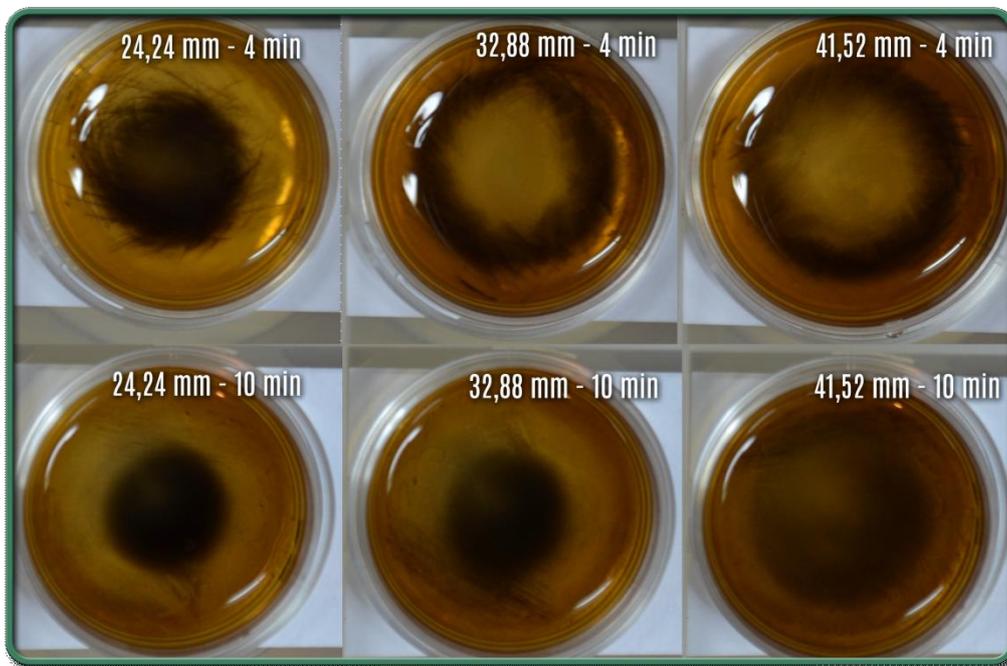


Figura 3.8 Comparación de medidas con el coloide con ácido cítrico tras 4 min y 10 min de exposición al campo magnético. En cada imagen se muestra la distancia imán-muestra en mm.

Posteriormente se realizó el análisis de las imágenes obtenidas en tonos de grises. En dichas imágenes se buscó encontrar una relación entre intensidad en la escala de grises y posición. De esta forma se buscó estimar la cantidad de nanopartículas en cada posición, asumiendo que la concentración de NPMs y la Intensidad en la imagen seguían una relación:

$$I = A - f(c)$$

con I la intensidad, A una constante y $f(c)$ una función creciente que depende de la concentración. Para esto se desarrolló un programa computacional empleando la interfaz gráfica del usuario (GUI) en Matlab para el procesado de imágenes. Esta tarea se realizó en el marco de las actividades de la materia de grado “Procesamiento de imágenes biomédicas”, dictada por el Ing. Jorge Runco. El programa permite seleccionar una sección rectangular (que se busca lo más fina posible) en cada fotografía, calcularle la intensidad media y graficarla respecto a la posición (**ver Anexo**).

Se puede observar, tanto en las fotografías como en los perfiles de intensidad, la formación de anillos (ausencia de NPMs en el centro) y de discos, los cuales van a depender de la distancia muestra-imán y del tiempo al que se expongan al campo magnético. Observando los estados a 10 minutos de exposición para el PEI-Mag2 (**Fig. 3.5 y 3.9**) se puede distinguir la formación de anillos para las distancias más cortas, hasta la medida de 11 mm de altura. Esta forma en particular podría deberse a que la fuerza radial ejercida a las NPMs, en algún punto cerca del anillo, se anula, siendo positiva (es decir, apuntando hacia afuera del recipiente) en el centro, y negativa en la zona exterior del anillo (apuntando al centro).

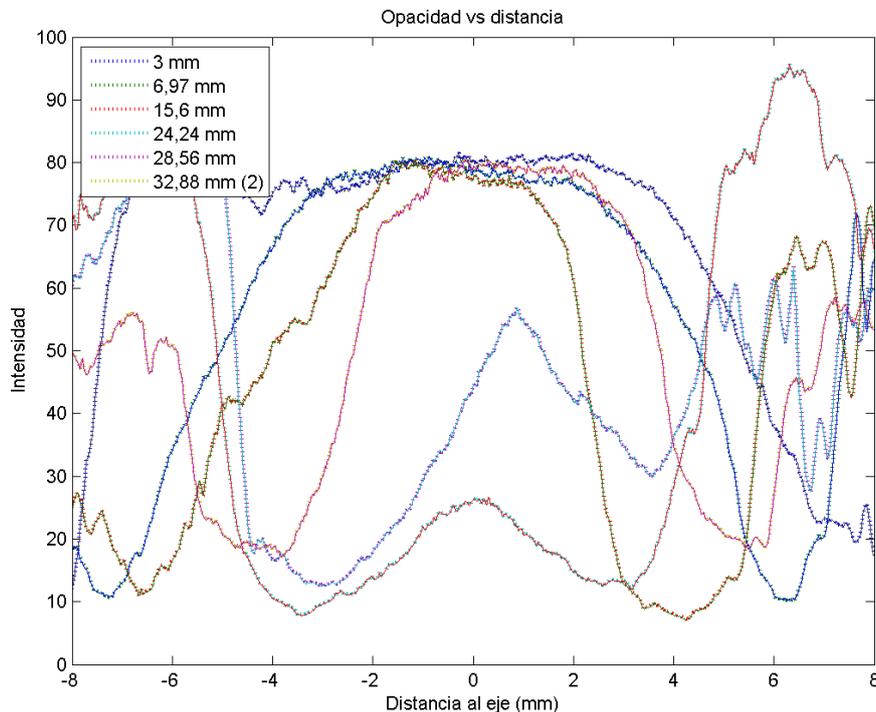


Figura 3.9. Perfiles de intensidad de la imagen respecto a la posición radial en el recipiente. El FF utilizado fue NPM-Ac. Cada curva corresponde a una separación determinada imán-recipiente.

Para obtener información semicuantitativa de las fotografías, también se calculó la fuerza ejercida sobre las NPMs del FF. Para esto, fue necesario medir la magnetización de la muestra y el campo magnético externo (**véase sección 1.1.2**).

La magnetización medida y ajustada (mediante distribuciones log-normal de funciones de Langevin) del ferrofluido NPMs-Ac se muestra en la **figura 3.10**. Los parámetros estadísticos de este ajuste son los siguientes:

Parámetro	Valor
σ	$1.2046 \pm 3.7167e-004$
φ	$1.026e+004 \pm 1.859e-008$
T	300 K (pre-ajustada)
N	$5.836e+013$
Hc	$-3.475e-001 \quad 1.305e-008$
Cte paramagnética	$7.116e-008 \quad 1.854e-009$
Cte	$1.820e-005 \quad 9.917e-008$

Tabla 3.1 Parámetros del ajuste de la función lognormal de las medidas de magnetometría del VSM. El N presenta un error mucho menor que su valor ajustado.

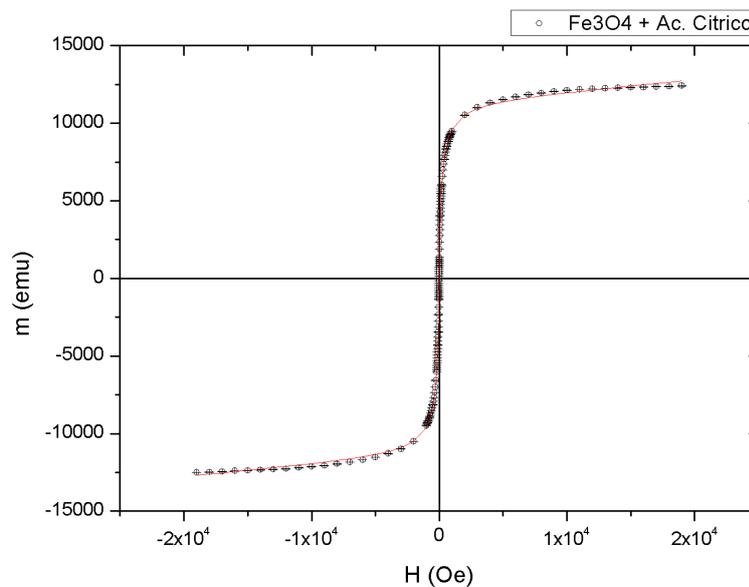


Figura 3.10. Medida de magnetización realizada en el equipo de VSM del IFLP.

Como puede observarse en la **figura 3.11**, la fuerza radial se anula en el eje (curva de nivel gruesa), a un valor de 10 mm, y va disminuyendo a medida que se acerca al borde del imán. Por encima de esta curva, la fuerza radial es negativa. Esto impulsa a las NPMs hacia el centro. Sin embargo, por debajo de la curva de fuerza nula, la fuerza radial es positiva, lo que hace que las partículas se alejen del centro del recipiente.

Por lo tanto, para entender la formación de anillos basta considerar en la **figura 3.11** una línea de z constante, que sea $z < 10mm$. Cerca del centro, la fuerza es positiva, expulsando las nanopartículas del centro hacia los bordes, hasta que se alcanza un r tal que se anula la fuerza (se atraviesa la línea de $F_r = 0$). A partir de este punto, la fuerza, que ahora es negativa, impulsa a las NPMs en dirección al centro. Es decir, este punto es un punto de equilibrio para el movimiento en la dirección radial. La distribución de fuerzas radiales anteriormente detallada puede explicar la formación de anillos.

Los discos, se entienden debido a que a partir de distancias $z > 10\text{mm}$, la fuerza radial siempre es negativa y más intensa cerca de los bordes, por lo que se irán agrupando hacia el centro formando discos.

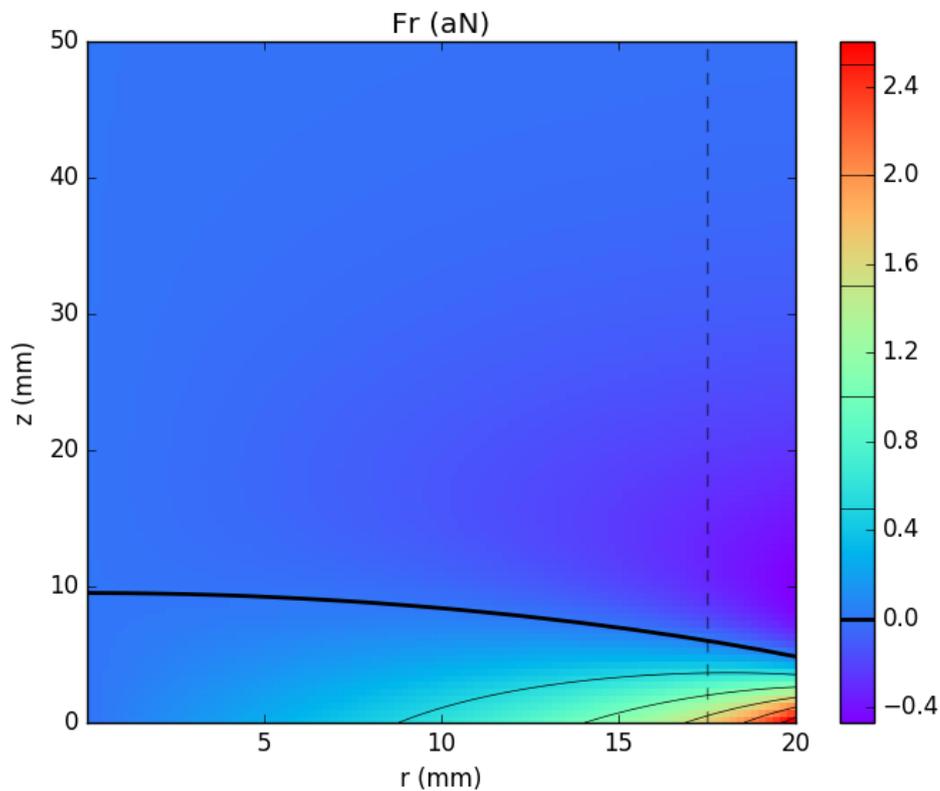


Figura 3.11 Distribución de las fuerzas radiales para distintas alturas (z) y separaciones del centro del imán (r), sobre NPM-Ac. La fuerza se encuentra expresada en attoNewtons (aN) y su intensidad varía de acuerdo a la escala de colores de la derecha. La curva remarcada pertenece a la posición en la cual $F_r=0$. La línea punteada marca el límite de la placa de Petri.

Es interesante notar en particular que la línea correspondiente a la fuerza radial nula es idéntica para ambos gráficos (**Figura 3.11 y 3.12**), sin embargo, en general, la intensidad depende del momento de las NPMs. En otras palabras, geoméricamente los patrones de fuerzas sólo dependen del aplicador, pero su intensidad depende también del momento de las NPMs.

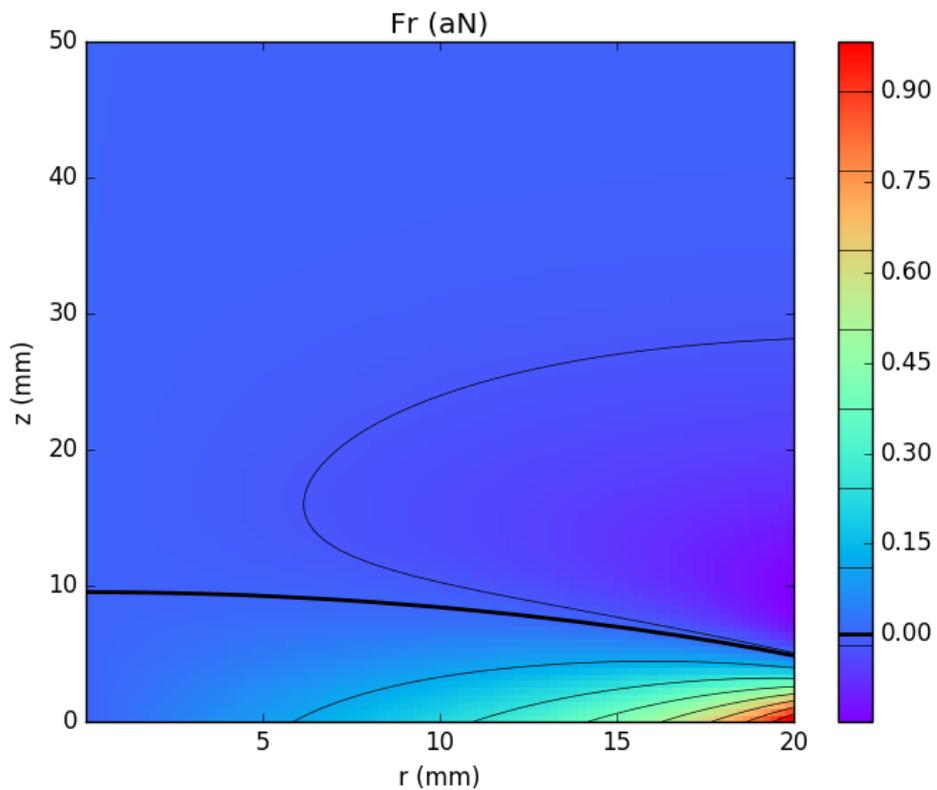


Figura 3.12. Distribución de las fuerzas radiales para distintas alturas (z) y separaciones del centro del imán (r), sobre NPMs PEI-Mag2. La fuerza se encuentra expresada en attoNewtons (aN) y su intensidad varía de acuerdo a la escala de colores de la derecha. La curva remarcada pertenece a la posición en la cual $F_r=0$. La línea punteada marca el límite de la placa de Petri.

La componente modelada de la fuerza en z (F_z) para el imán de 5 cm de diámetro y nanopartículas NPM-Ac, se muestra en la **figura 3.13**.

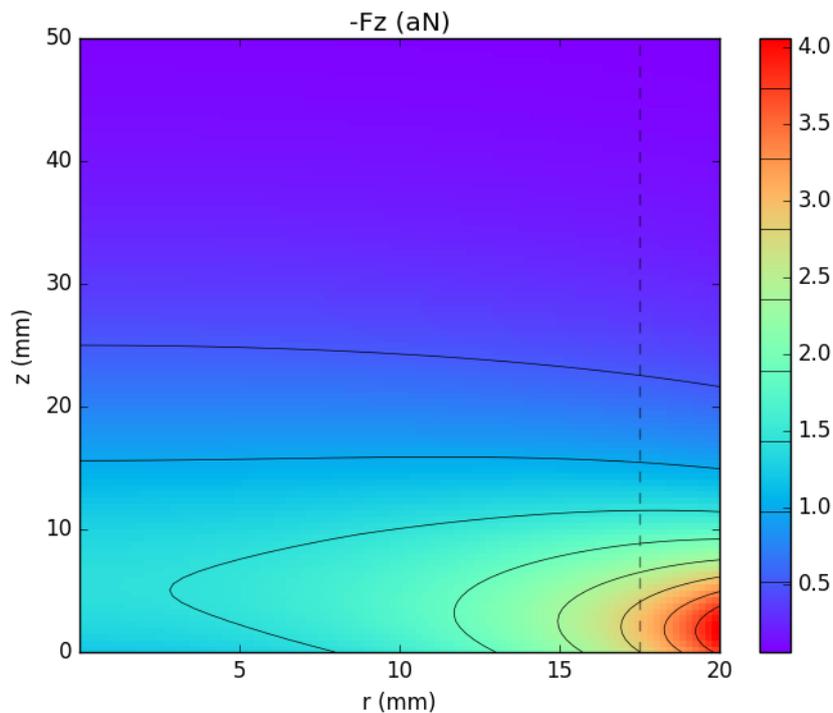


Figura 3.13 Distribución de las fuerzas axiales para distintas alturas (z) y separaciones del centro del imán (r), sobre NPMs PEI-Mag2. La fuerza se encuentra expresada en attoNewtons (aN) y su intensidad varía de acuerdo a la escala de colores de la derecha. La curva remarcada pertenece a la posición en la cual $F_r=0$. La línea punteada marca el límite de la placa de Petri.

3.2.1 Cantidad de NPMs a partir de F

Con las experiencias de gravimetría realizadas con la balanza y la muestra encapsulada, se logró obtener curvas de relación fuerza magnética vs distancia. Estas se realizaron a partir de los datos que tomó la balanza, y que se guardaron en un ordenador gracias a un *script* realizado en lenguaje Python por el Dr. Gustavo Pasquevich, registrando el tiempo de la medida y la lectura de la balanza. Como la distancia de la muestra era modificada en intervalos de tiempo iguales, el tiempo de la medida guardaba relación directa con la distancia imán-muestra. Con un segundo *script* desarrollado en Matlab, se encontró esta relación, graficada en la **Fig. 3.14**. Téngase en cuenta que para poder asignar las distancias indicadas en la figura a cada valor de fuerza, debe considerarse que el espesor del encapsulado es despreciable, lo que implicaría que las NPMs no pueden realizar movimientos en sentido vertical.

Si se compara esta curva con la fuerza axial sobre una NPM, modelada para este imán en $r = 0$ (**Fig. 3.15**), se observa una relación íntima. Como la figura 3.14 es una fuerza total sobre la muestra de NPMs y la figura 3.15 es la fuerza sobre una sola, podría estimarse el número de nanopartículas y su concentración, al calcular la relación entre ambas. Para esto es que se desarrolló una interpolación de las medidas gravimétricas, que se muestra en la figura 3.14 como una curva roja.

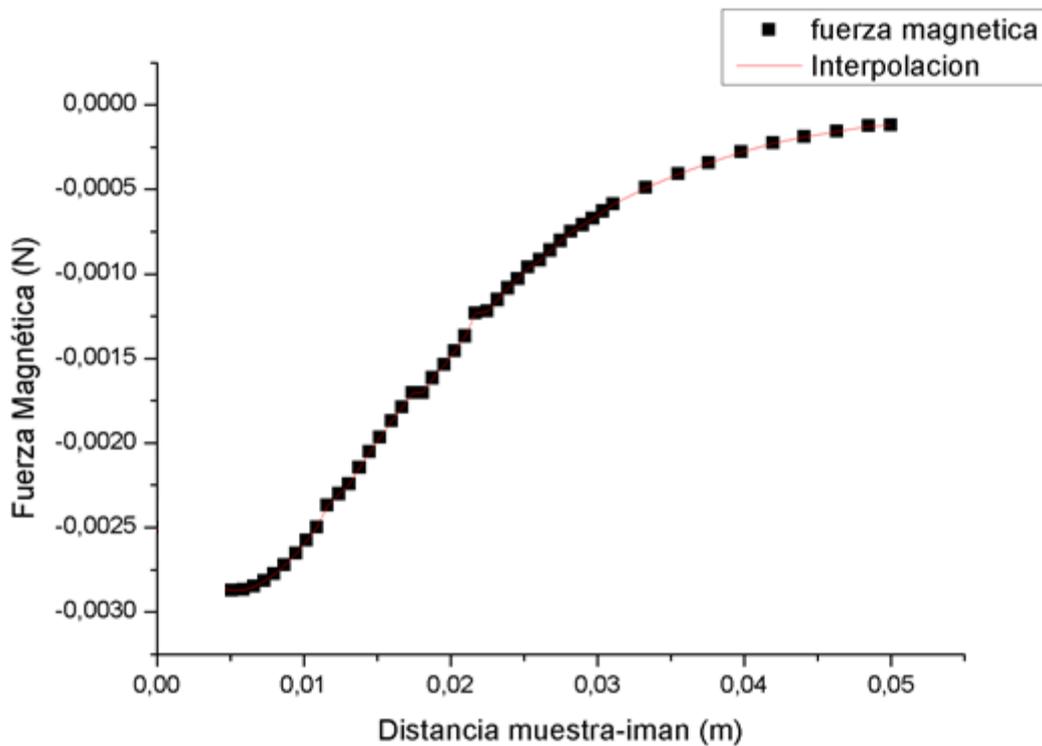


Figura 3.14 Curva de Fuerza Magnética sobre el coloide NPM-Ac respecto a la distancia imán-muestra, obtenida mediante el procesamiento de los datos del estudio de gravimetría. En rojo se muestra una interpolación que se realizó para poder calcular el número de NPMs.

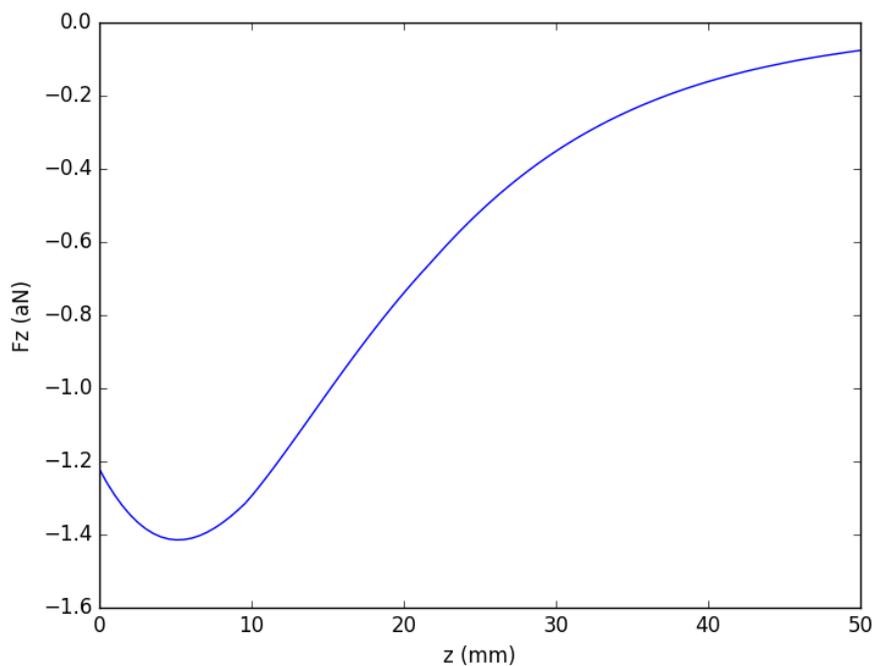


Figura 3.15 Curva, obtenida bajo simulación del campo magnético, de Fuerza Magnética sobre una NPM del coloide NPM-Ac respecto a la distancia al imán.

El cociente entre ambas curvas para cada separación se puede observar en la **figura 3.16**, donde muestra que el número de NPMs se encuentra entre $6.1 \cdot 10^{13}$ y $8.38 \cdot 10^{13}$. Estos resultados fueron comparados con los obtenidos a partir de la medición de la magnetización de la muestra en el VSM. El ajuste de dicha medición bajo una distribución lognormal de funciones de Langevin presentó, entre otros parámetros, el número de partículas N de la muestra. Este es el que figura en el gráfico de la Fig. 3.16 en rojo con la leyenda VSM.

Los resultados obtenidos, si bien difieren, demuestran ser consistentes entre sí. Esta diferencia podría estar sujeta, por ejemplo, a posibles errores sistemáticos que pudieron ocurrir durante las medidas gravimétricas. Pese a esto, el modelo del campo magnético puede considerarse adecuado y consistente. A su vez, estos resultados demuestran que puede medirse la fuerza ejercida por el imán sobre la muestra en función de la posición, empleando una simple balanza.

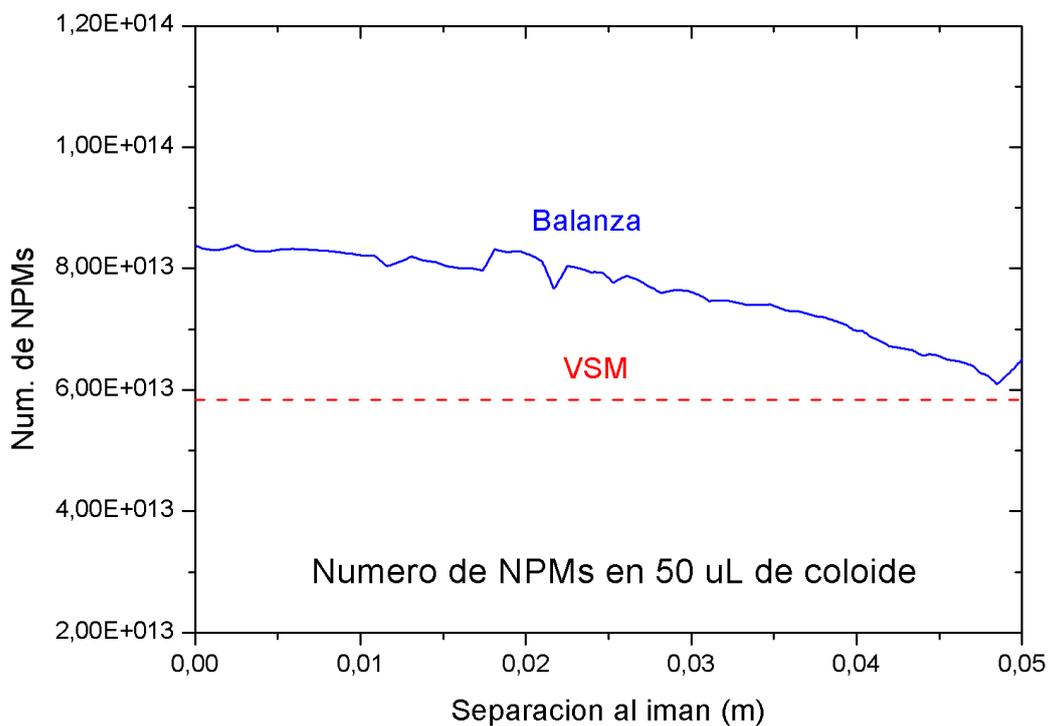


Figura 3.16 Cociente de los valores interpolados de las curvas 3.14 y 3.15, de la Fuerza Magnética sobre una NPM del coloide NPM-Ac respecto a la distancia al imán.

3.3 Experimento B de distribución de NPMs

En este experimento se utilizó tanto el recipiente de acrílico diseñado como el sistema de posicionamiento relativo imán-receptáculo. Al igual que en los ensayos descritos anteriormente, las imágenes correspondientes a la vista superior al final de cada medida, muestran patrones que dependen de la distancia y tiempo de exposición al imán (**Fig. 3.17**).

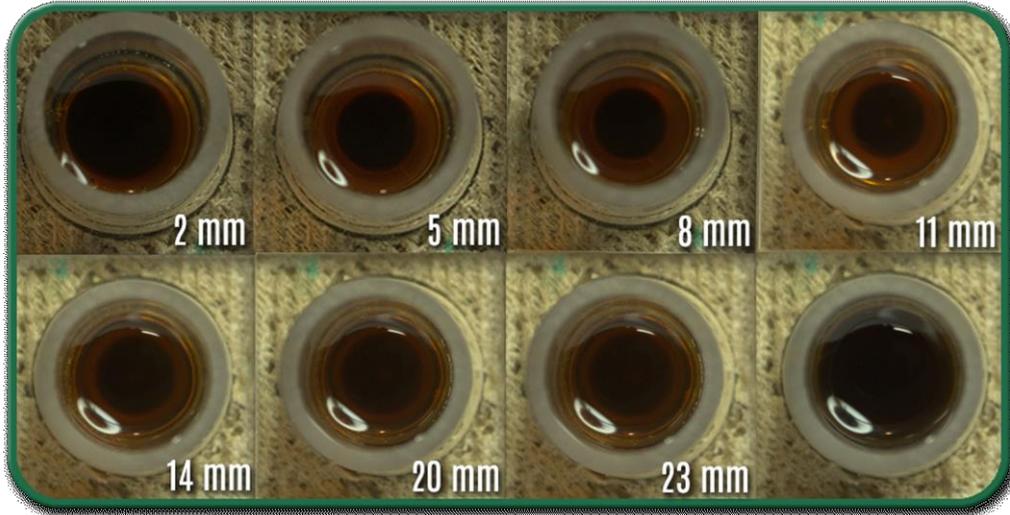


Figura 3.17. Fotografías del coloide NPM-Ac tras 10 min de exposición al campo magnético. En cada imagen se muestra la distancia imán-muestra en mm.

Nuevamente, se realizó el análisis de las imágenes obtenidas. En dichas imágenes se buscó encontrar una relación entre intensidad en la escala de grises y posición.

En los perfiles de intensidad, obtenidos a partir del programa desarrollado en Matlab, **(figura 3.18)** es evidente la presencia de discos dentro de los cuales se concentran las NPMs. Estos discos se generan de diferentes tamaños según la distancia a la que se encuentre la muestra respecto al imán **(figura 3.19)**. El disco más grande se encuentra a 2 mm, reduciendo su radio abruptamente a distancias cercanas a 5 mm.

Cabe mencionar que la fuerza magnética no es suficiente para determinar la redistribución espacial de las NPMs en función del tiempo. Dicha distribución sólo puede obtenerse resolviendo la expresión de difusión **(Véase sección 1.1.2)**, lo cual será objeto de un trabajo posterior. No obstante, como se remarcó anteriormente, un dato muy característico, es el punto de equilibrio estable radial, ya que las NPMs tenderán a acumularse en esa posición.

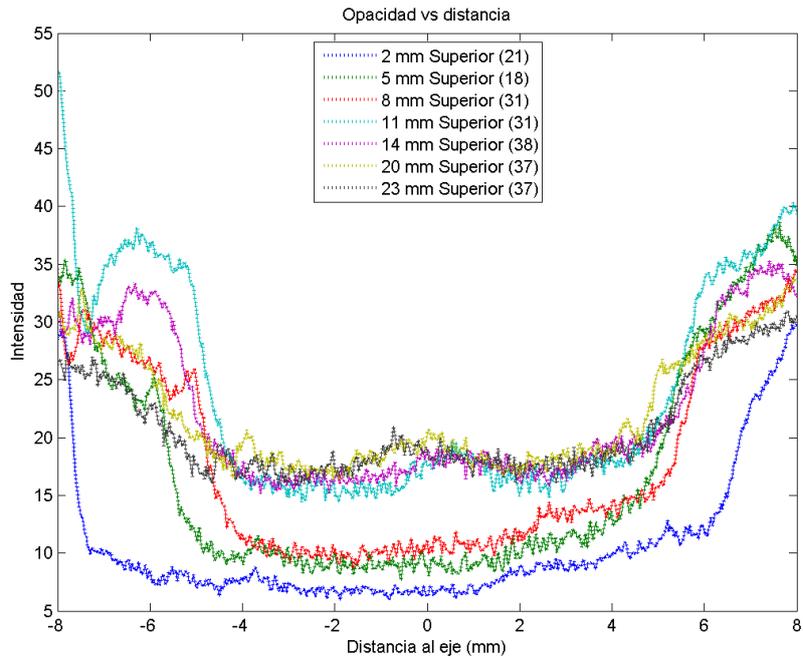


Figura 3.18. Perfiles de intensidad de la imagen respecto a la posición radial en el recipiente. Cada curva corresponde a una separación determinada imán-recipiente luego de 10 minutos de exposición.

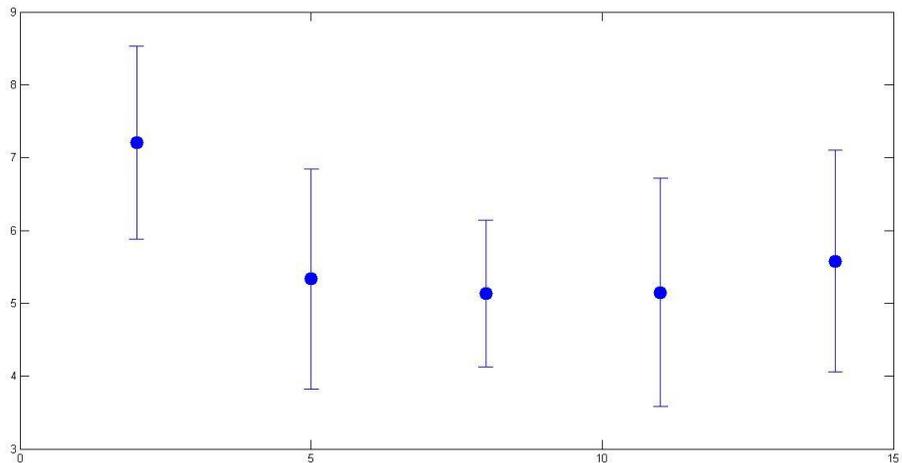


Figura 3.19: Radio de los primeros cinco discos de NPMs formados en el recipiente para cada distancia al cabo de 10 minutos de exposición.

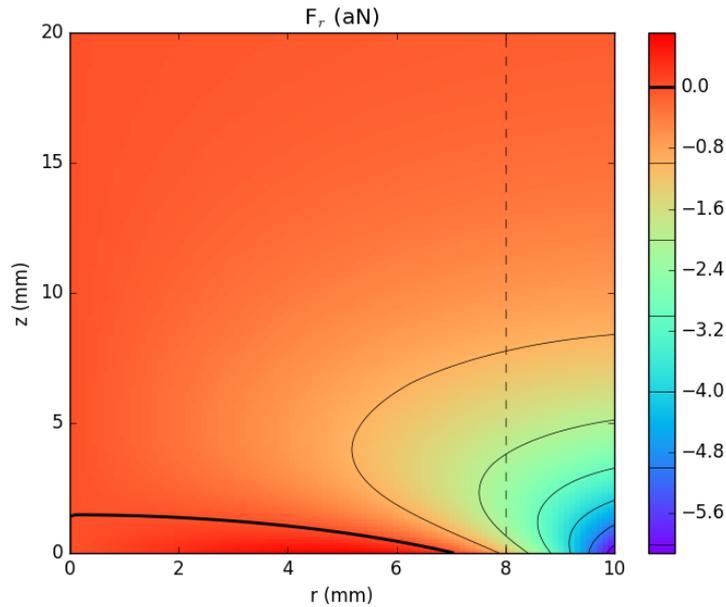


Figura 3.20. Distribución de las fuerzas radiales para distintas alturas (z) y separaciones del centro del imán (r), sobre NPM-Ac. La fuerza se encuentra expresada en attoNewtons (aN) y su intensidad varía de acuerdo a la escala de colores de la derecha. La curva remarcada pertenece a la posición en la cual $F_r=0$. La línea punteada marca el límite del recipiente.

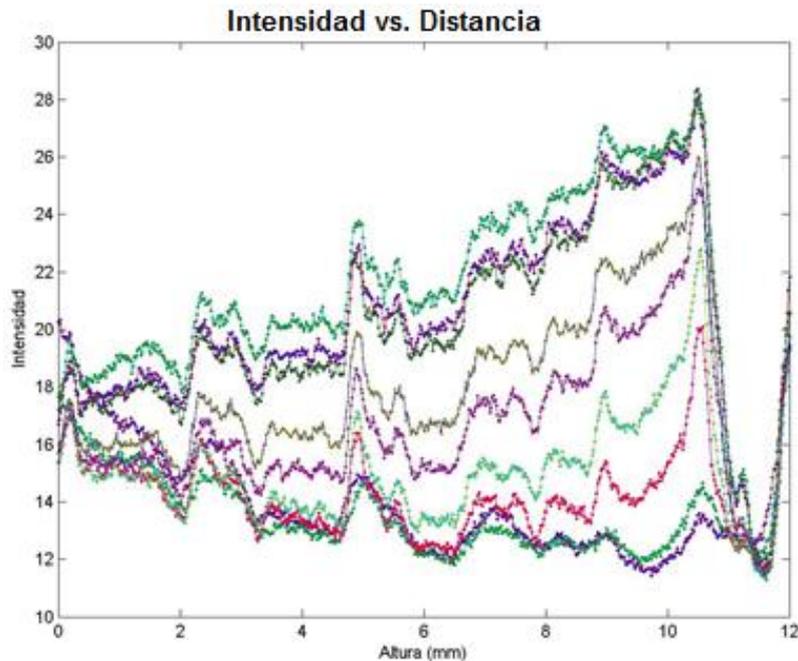


Figura 3.21. Perfiles de intensidad respecto a la altura del ferrofluido en una vista lateral, para una distancia imán-muestra de 2 mm y para tiempo de abajo hacia arriba de 0, 5, 10, 15, 20, ... , 40, 45 segundos.

La figura 3.20 muestra la intensidad de la fuerza radial proveniente del imán de 2 cm de diámetro por 2 cm de alto, utilizado en esta experiencia. La línea gruesa muestra nuevamente la posición que corresponde a la fuerza radial nula.

En este caso particular, la ausencia de anillos, como pasaba en el experimento anterior es razonable, ya que la fuerza radial se anula aproximadamente para $z \leq 1,5 \text{ mm}$. Pero la distancia mínima que se pudo leer es de 2 mm, espesor de la base del recipiente. Esto implicó que todas las medidas estuvieran por encima de la curva de $F_r = 0$.

Los perfiles de intensidad laterales que se muestran en la **figura 3.21** son para una misma distancia imán-muestra (2 mm) en diferentes tiempos. Esto muestra cómo el fluido va decantando, lo que aumenta la intensidad de la imagen. En la **figura 3.22** se seleccionó una altura fija (9,18 mm) de la figura anterior, y se graficó la intensidad en esa altura para diferentes tiempos. Aquí puede verse que la intensidad crece con el tiempo, alcanzando un valor máximo, luego de 45 segundos.

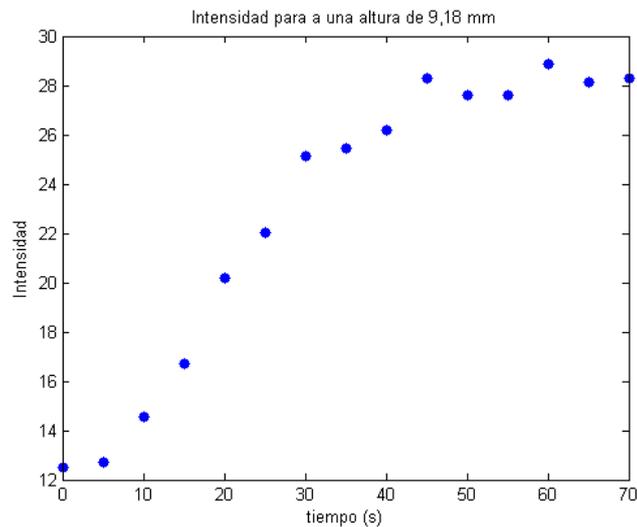


Figura 3.22. Intensidad a una altura 9,18 mm a diferentes tiempos, para una distancia imán-muestra de 2 mm.

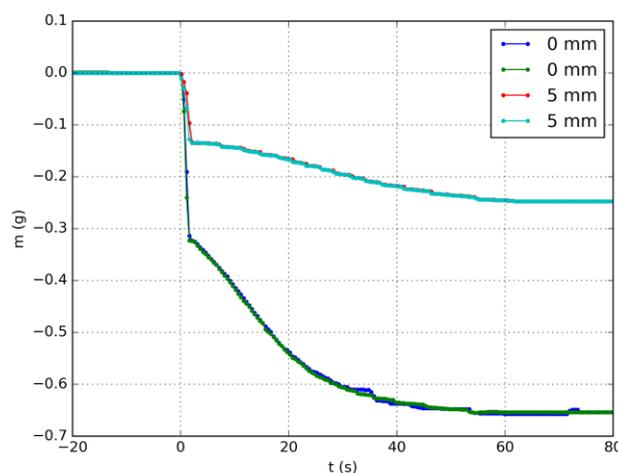


Figura 3.23. Estudio gravimétrico del mismo sistema para distancias de 0 mm y 5 mm (2 y 7 mm al sumar el espesor de la base del recipiente). La masa aparente negativa que se muestra es proporcional a la fuerza magnética ejercida sobre las nanopartículas.

En la **figura 3.23** se muestra la variación del peso de las NPMs con el tiempo, para una distancia imán-muestra de 2 y 7 mm, tras ser expuestas a un campo magnético.

El objetivo de este ensayo fue continuar utilizando la geometría del experimento B e intentar obtener alguna información acerca de la componente de la fuerza magnética en z. Con ese propósito, se colocó sobre un soporte de telgopor de la balanza el arreglo de imanes del experimento, y sobre una plataforma de altura graduable, la muestra de nanopartículas, con la misma concentración utilizada anteriormente. Para estas medidas se utilizaba la tara de la balanza para compensar el peso del sistema montado con el imán sobre la balanza, tal como se muestra en la **figura 3.24**. De esta forma, el peso aparente $P = mg$ que se podía obtener de la balanza una vez colocado el FF en interacción con el campo, tiene un valor proporcional a la fuerza magnética.

Los gráficos **3.22 y 3.23** plasman de dos maneras diferentes la fuerza promedio en la dirección del eje z. Una, mediante la intensidad de la imagen a una altura dada en el recipiente para distintos tiempos, y otra, midiendo la diferencia entre las fuerzas gravitatoria y magnética.

Analizando los gráficos (**Fig. 3.22 y 3.23**) podemos notar que presentan una tendencia asintótica hacia un estado de estacionario, el cual se alcanza luego de aproximadamente 60 segundos, en ambos casos. También se muestra en la **figura 3.23** la curva respectiva para una lectura a 7 mm de distancia imán-muestra. Aquí el estado estacionario también se alcanza a unos 60 segundos.



Figura 3.24. Sistema gravimétrico utilizado para comparar las fuerza magnética en z con los perfiles de intensidad.

Conclusiones

4. Conclusiones

Los resultados obtenidos en los experimentos de transferencia génica en presencia de NPMs evidenciaron mayor efectividad que en ausencia de las mismas. Pudo comprobarse que la misma es aún mayor cuando el proceso es asistido con un campo magnético.

Los ensayos mostraron detalles de la variación de la distribución de NPMs con la distancia imán-muestra y con el tiempo de exposición. Pudieron observarse cambios de forma de anillos a discos para tiempos de 10 minutos y distancias de mayores a 24,24 mm, antes de llegar al estado estacionario.

Se pudo constatar que la componente en z de la fuerza magnética es más intensa que la radial, lo que genera que las nanopartículas se desplacen con mayor rapidez en esta dirección, pudiendo tardar cerca de 3 veces más en llegar a un equilibrio aparente en la dirección radial respecto de la axial.

A su vez, gracias a la comparación de las medidas realizadas en el VSM y los estudios gravimétricos, es importante destacar que es posible medir la fuerza magnética en función de la posición, experimentalmente sobre las NPMs con una simple balanza. Esta conclusión permitiría implementar un método simple y rápido de caracterización preliminar de coloides magnéticos.

Pudo comprobarse que todo aplicador (imán) cilíndrico de radio R presenta un punto de equilibrio radial para $r < R$ a una separación $z < z_{\max}$ próxima a la superficie del mismo, específico para cada sistema, siendo r una función de z que sólo depende del tipo de imán que se esté utilizando. Como consecuencia, cuando $z < z_{\max}$ los patrones de equilibrio serán anillos.

También se ha mostrado que el modelo del campo magnético utilizado parece ser consistente, tanto en los resultados de distribución de NPMs, como en los estudios gravimétricos. Esta herramienta puede ser muy útil en estudios futuros que utilicen los mismos aplicadores magnéticos.

Como trabajo futuro se proyecta resolver la ecuación de difusión para las partículas, con el objeto de contar con las herramientas suficientes determinar la redistribución espacial de las NPMs en el fluido, en función del tiempo.

Referencias

5. Referencias

1. Varadan VK, Chen L, Xie J. Biomedical Applications of Magnetic Nanoparticles. En: Nanomedicine: Design and Applications of Magnetic Nanomaterials, Nanosensors and Nanosystems. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2008. p. 129-73.
2. Chrzanowski W, Khademhosseini A. Biologically inspired 'smart' materials. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. abril de 2013;65(4):403-4. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23500192>
3. Riehemann K, Schneider SW, Luger TA, Godin B, Ferrari M, Fuchs H. Nanomedicine- Challenge and Perspectives. *Angew Chemie Int Ed* [Internet]. 19 de enero de 2009;48(5):872-97. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.200802585>
4. Hedayatnasab Z, Abnisa F, Daud WMAW. Review on magnetic nanoparticles for magnetic nanofluid hyperthermia application. *Mater Des* [Internet]. junio de 2017;123:174-96. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264127517302757>
5. Stocke NA, Sethi P, Jyoti A, Chan R, Arnold SM, Hilt JZ, et al. Toxicity evaluation of magnetic hyperthermia induced by remote actuation of magnetic nanoparticles in 3D micrometastatic tumor tissue analogs for triple negative breast cancer. *Biomaterials*. 2017;120:115-25.
6. Yurenya AY, Polikarpov MA, Chukalova AA, Moskaleva EY, Taldenkov AN, Panchenko VY. The magnetic introduction of magnetite nanoparticles into live cells for radiosensibility enhancement. *J Magn Magn Mater*. 2017;427:111-3.
7. Choi J-W, Park JW, Na Y, Jung S-J, Hwang JK, Choi D, et al. Using a magnetic field to redirect an oncolytic adenovirus complexed with iron oxide augments gene therapy efficacy. *Biomaterials*. 2015;65:163-74.
8. Lee N, Yoo D, Ling D, Cho MH, Hyeon T, Cheon J. Iron Oxide Based Nanoparticles for Multimodal Imaging and Magnetoresponse Therapy. *Chem Rev*. 2015;115(19):10637-89.
9. Devendiran DK, Amirtham VA. A review on preparation, characterization, properties and applications of nanofluids. *Renew Sustain Energy Rev*. 2016;60:21-40.

10. Shokrollahi H. Structure, synthetic methods, magnetic properties and biomedical applications of ferrofluids. *Mater Sci Eng C*. 2013;33(5):2476-87.
11. Medeiros SF, Santos AM, Fessi H, Elaissari A. Stimuli-responsive magnetic particles for biomedical applications. *Int J Pharm*. 2011;403(1):139-61.
12. Nochetto RH, Salgado AJ, Tomas I. A diffuse interface model for two-phase ferrofluid flows. *Comput Methods Appl Mech Eng*. 2016;309:497-531.
13. Ramimoghadam D, Bagheri S, Abd Hamid SB. Stable monodisperse nanomagnetic colloidal suspensions: An overview. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2015;133:388-411.
14. Genc S, Derin B. Synthesis and rheology of ferrofluids: a review. *Curr Opin Chem Eng*. 2014;3:118-24.
15. Habera M, Hron J. Modelling of a free-surface ferrofluid flow. *J Magn Magn Mater*. 2016;
16. Shi Z, Sun J, Jia S, Zhang P. Simulation of magnetophoresis of magnetic nanoparticles in liquids. *J Phys D Appl Phys [Internet]*. 24 de agosto de 2016;49(33):335005. Disponible en: <http://stacks.iop.org/0022-3727/49/i=33/a=335005?key=crossref.0b2beb34491af4200451bcab9e3c3370>
17. Zubarev AY. On the theory of transport phenomena in ferrofluids. Effect of chain-like aggregates. *Phys A Stat Mech its Appl*. 2013;392(1):72-8.
18. Butler RF, Banerjee SK. Theoretical single-domain grain size range in magnetite and titanomagnetite. *J Geophys Res [Internet]*. 10 de octubre de 1975;80(29):4049-58. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1029/JB080i029p04049>
19. Yasumori I, Reinen D, Selwood PW. Anisotropic behavior in superparamagnetic systems. *J Appl Phys [Internet]*. diciembre de 1963;34(12):3544-9. Disponible en: <http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.1729255>
20. Furlani EP, Ng KC. Nanoscale magnetic biotransport with application to magnetofection. Disponible en: http://www.photonics.buffalo.edu/docs/Nanoscale_magnetic_biotransport_with_application_to_magnetofection.pdf
21. Afifah AN, Syahrullail S, Sidik N. Magnetoviscous effect and thermomagnetic convection of magnetic fluid: A review. *Renew Sustain Energy Rev*. 2016;55:1030-40.

22. Schillinger U, Brill T, Rudolph C, Huth S, Gersting S, Krötz F, et al. Advances in magnetofection—magnetically guided nucleic acid delivery. *J Magn Magn Mater*. 2005;293(1):501-8.
23. Tresilwised N, Pithayanukul P, Holm PS, Schillinger U, Plank C, Mykhaylyk O. Effects of nanoparticle coatings on the activity of oncolytic adenovirus–magnetic nanoparticle complexes. *Biomaterials* [Internet]. enero de 2012;33(1):256-69. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21978891>
24. Mykhaylyk O, Antequera YS, Vlaskou D, Plank C. Generation of magnetic nonviral gene transfer agents and magnetofection in vitro. *Nat Protoc* [Internet]. octubre de 2007 ;2(10):2391-411. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17947981>
25. Mykhaylyk O, Zelphati O, Hammerschmid E, Anton M, Rosenecker J, Plank C. Recent Advances in Magnetofection and Its Potential to Deliver siRNAs In Vitro. En: *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) [Internet]. 2009. p. 1-36. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19301645>
26. Plank C, Zelphati O, Mykhaylyk O. Magnetically enhanced nucleic acid delivery. Ten years of magnetofection—Progress and prospects. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. noviembre de 2011;63(14-15):1300-31. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21893135>
27. Arciniegas Vaca ML. Estudio de la respuesta magnética de nanopartículas en hidrogeles y en coloides. Efecto desmagnetizante debido a las interacciones dipolares magnéticas entre nanopartículas. Fuerza magnética y transporte de nanopartículas magnéticas y adenovirus durante I. Universidad Nacional de La Plata; 2016.
28. Pardo J, Sosa YE, Reggiani PC, Arciniegas ML, Sánchez FH, Goya RG. Transferencia génica asistida por campos magnéticos : Estudios en células gliales. *Acta Bioquímica Clínica Latinoam* [Internet]. 2013;47(2):399-406. Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/pdf/abcl/v47n2/v47n2a16.pdf>
29. Pereyra AS, Mykhaylyk O, Lockhart EF, Taylor JR, Delbono O, Goya RG, et al. Magnetofection Enhances Adenoviral Vector-based Gene Delivery in Skeletal Muscle Cells. *J Nanomed Nanotechnol* [Internet]. 2016 ;7(2). Disponible en: <http://www.omicsonline.org/open-access/magnetofection-enhances-adenoviral-vectorbased-gene-delivery-inskeletal-muscle-cells-2157-7439-1000364.php?aid=71417>

Anexo

6. Anexo

Software realizado para procesamiento de imágenes

En el marco de la cátedra “Procesamiento de imágenes biomédicas” se realizó, bajo el entorno gráfico de usuario (GUI) de Matlab, un programa para poder realizar un procesamiento de las imágenes obtenidas en los experimentos descritos en las secciones 2.2 y 2.3 de este trabajo. En estos experimentos se tomaron fotografías de un recipiente cilíndrico que contenía un coloide con NPMs, continuamente durante diez minutos o más, para observar la distribución que tomaban estas con el paso del tiempo.

El objetivo principal del programa es, con las imágenes adquiridas en los experimentos, obtener un perfil de intensidad sobre un área seleccionada de la imagen, luego de que esta última sea convertida a una escala de grises. Específicamente, el perfil de intensidad puede ser asociado a la concentración de NPMs respecto a la posición radial del recipiente, ya que estas se observan oscuras, y al concentrarse, la intensidad en la imagen baja. El algoritmo que sigue el script para poder realizar este perfil es el siguiente:

Una vez seleccionada un área en la imagen, se guardará en una variable la posición y dimensiones de la misma. Para un área de M píxeles de largo por N de alto, se realizará un promedio de los valores de intensidad de cada píxel para una dada posición lateral m (con valores de entre 1 y M). Esto es, todos aquellos píxeles con posición m se suman y se dividen por el número total de píxeles con esta posición, que será N . Este proceso se repetirá M veces hasta obtener los puntos para la gráfica deseada.

El programa consta de una interfaz gráfica que posee dos áreas de trabajo. En la primera es donde se carga la imagen y se realiza el procesamiento. Para este último se cuenta con herramientas como la de rotación de la imagen, un conversor a escala de gris, zoom y selector de área rectangular. También hay un botón para volver la imagen a su estado original. Cada una de estas herramientas fue personalizada para este propósito.

En el caso de la herramienta de rotación, el programa abre una ventana de diálogo en donde invita al usuario a elegir el ángulo de rotación deseado. Esto se hizo de esta forma ya que, para seleccionar una sección en la imagen, había que tener cuidado de no abarcar áreas con imperfecciones, burbujas o reflejos en el líquido, que no tendrían una concordancia con la concentración de NPMs.

La herramienta de selección rectangular se hizo a partir de una función predefinida por Matlab, pero con una particularidad. Si en una misma sesión se utiliza la herramienta más de una vez, el programa guardará la posición y dimensiones de la última vez que se la utilizó y mostrará dicha área. Esto permitió agilizar mucho el proceso de graficado, mientras que permitía mantener constante el número total de datos seleccionados.

La segunda área de trabajo es donde se grafican los perfiles de intensidad de cada foto que se cargue. Mientras una misma sesión es iniciada, el programa es capaz de graficar múltiples perfiles, para varias imágenes. Un ejemplo de esta herramienta es la **figura A.1** donde se muestran los perfiles de intensidad finales para diferentes distancias imán-muestra.

El botón para graficar va a comenzar su comando buscando las coordenadas del área rectangular seleccionada y luego pasa la foto a escala de gris (sin mostrarla al usuario). Luego mediante un loop hará el promedio mencionado anteriormente de los elementos que forman el rectángulo seleccionado. Ya con los datos de intensidad promediados, y con la determinación de la distancia, se realiza el ploteo.

Para finalizar, un botón de guardado realiza un comando *saveas* sobre el gráfico ploteado y permite almacenarlo como un archivo PNG o JPG.

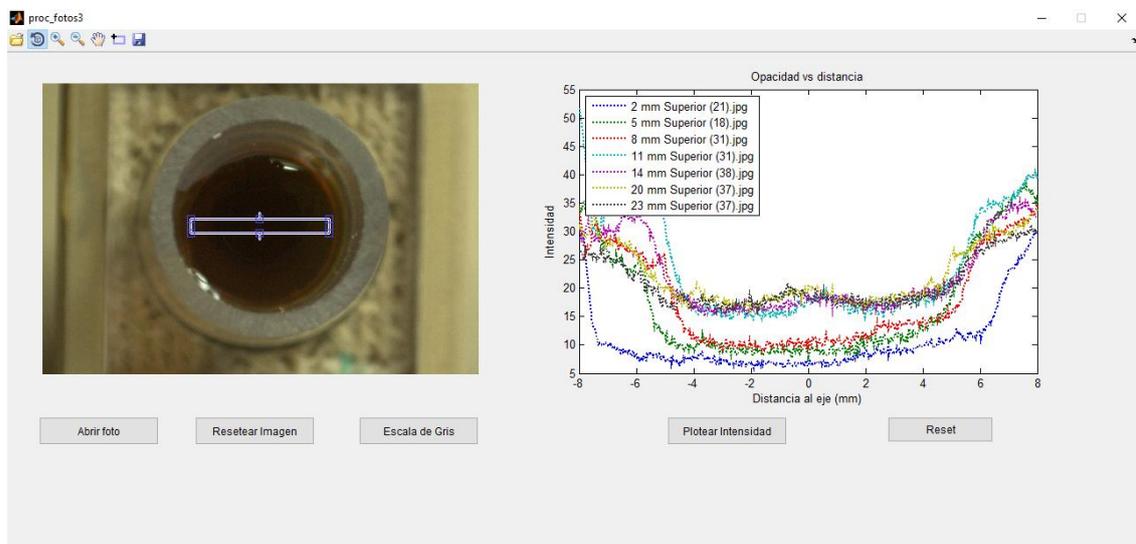


Figura A. Programa realizado para el procesamiento de las imágenes