



INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA

DIVISIÓN DE MATERIALES AVANZADOS

**Toxicidad de Nanopartículas Magnéticas en un
Modelo *in-vitro* de Barrera Hematoencefálica**

Tesis de investigación presentada por

Ing. Lorena Gárate Vélez

Para optar al título:

Maestra en Ciencias en Nanociencias y Materiales

Co-Dirección de Tesis:

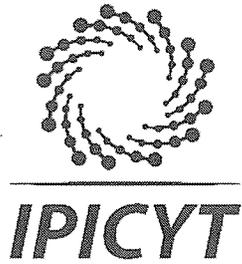
Dr. José Luis Rodríguez López

División de Materiales Avanzados IPICYT

Dra. Claudia Escudero Lourdes

Facultad de Ciencias Químicas UASLP

San Luis Potosí, 2018



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "***Toxicidad de Nanopartículas Magnéticas en un Modelo in-vitro de Barrera Hematoencefálica***" presentada para obtener el Grado de Maestra en Nanociencias y Materiales fue elaborada por **Lorena Gárate Vélez** y aprobada el **tres de agosto de dos mil dieciocho** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Materiales Avanzados del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. José Luis Rodríguez López
Codirector de la tesis

Dra. Claudia Escudero Lourdes
Codirectora de la tesis

Dr. Rubén Hipólito López Revilla
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Armando Encinas Oropesa
Miembro del Comité Tutorial

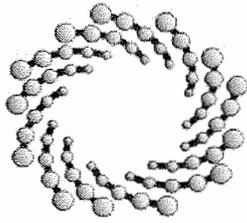


CRÉDITOS INSTITUCIONALES

El trabajo experimental de esta tesis fue realizado en el Laboratorio de Materiales Nanoestructurados: Síntesis y Propiedades, correspondiente a la División de Materiales Avanzados del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., y en el Laboratorio de Inmunotoxicología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, bajo la co-dirección del Dr. José Luis Rodríguez López y de la Dra. Claudia Escudero Lourdes, respectivamente.

Durante la realización del trabajo, la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con No. **453890**.

Parte de ésta investigación recibió el apoyo técnico del Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA), así como del Laboratorio Nacional de Investigaciones de Nanociencias y Nanotecnología (LINAN).



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 037 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Nanociencias y Materiales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 3 días del mes de agosto del año 2018, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Rubén Hipólito López Revilla	Presidente	IPICYT
Dr. Román López Sandoval	Secretario	IPICYT
Dr. Claudia Escudero Lourdes	Sinodal externo	UASLP
Dr. José Luis Rodríguez López	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN NANOCIENCIAS Y MATERIALES

sustentó la C.

Lorena Gárate Vélez

sobre la Tesis intitulada:

Toxicidad de Nanopartículas Magnéticas en un Modelo in-vitro de Barrera Hematoencefálica

que se desarrolló bajo la dirección de

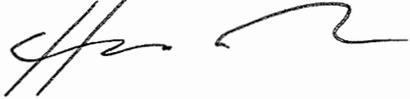
Dr. José Luis Rodríguez López
Dra. Claudia Escudero Lourdes (UASLP)

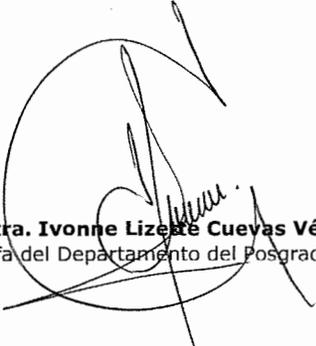
El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 18:10 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 3 días del mes de agosto de 2018.


Dr. Horacio Flores Zúñiga
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



DEDICATORIA

Para todos los que amo y me aman

AGRADECIMIENTOS

Durante éste período he recibido el apoyo de muchas personas a las que quiero mostrar mi más sincero agradecimiento.

Agradezco a mis directores de Tesis, los Doctores José Luis Rodríguez y Claudia Escudero todo el apoyo y ánimos que durante día tras día me han brindado a lo largo de este tiempo para que todo el trabajo realizado tuviese su fruto en esta memoria de tesis y, sobre todo, el haberme dado la oportunidad de trabajar con ellos.

Expreso también mi agradecimiento al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA), especialmente a la Dras. Olga Araceli Patrón y Carmen Rocha Medina por todo su apoyo técnico en la aplicación de nuevas tecnologías de caracterización, así como a los M.C. Guillermo Vidriales y Dulce Partida del Laboratorio de Análisis Instrumental. Al Dr. Daniel Bahena adscrito al Laboratorio Avanzado de Nanoscopía Electrónica. Así mismo al Laboratorio Nacional de Investigaciones de Nanociencias y Nanotecnología (LINAN), y a la Dra. Gladis Labrada quien actualmente ocupa su dirección, con un agradecimiento especial a la M.C. Iris Maldonado y al Dr. Héctor Silva Pereyra por todo su apoyo técnico y excelentes consejos.

Gracias también a los estimados del Laboratorio de Inmunotoxicología y del Laboratorio de Materiales Nanoestructurados, a la Dra. Elizabeth Reynaga Hernández, a mis compañeros Ildemar Alvarado y Clara de la Luz Carreón, por todo su apoyo tanto en el ámbito profesional y técnico como en momentos difíciles.

Por último, el agradecimiento más grande de todos va dirigido a mi familia, porque ésta tesis es una realidad gracias a ellos, por su apoyo incondicional en los buenos y malos momentos. Por inspirarme a continuar.

Muchas gracias a todos.

ABREVIATURAS

BHE	Barrera hematoencefálica
DCFH-DA	Diacetato de 2'7'- diclorofluorescina
DLS	Dispersión Dinámica de Luz
DRX	Difracción de Rayos X
FTIR	Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier
ICP	Espectrometría con Plasma Acoplado Inductivamente
LDH	Ensayo de Liberación de Deshidrogenasa Láctica
MP	Materia particulada
Nm	Nanómetros
NPs	Nanopartículas
NPMs	Nanopartículas magnéticas
PPMS	Sistema de Medición de Propiedades Físicas
ROS	Especies Reactivas de oxígeno
SEM	Microscopia de Barrido por Electrones
SNC	Sistema Nervioso Central
TEER	Resistencia Eléctrica Trans Endotelial
TEM	Microscopía de Transmisión por Electrones
TEOS	Tetra Etil Ortho Silicato
TJs	Tight Junctions (Uniones Estrechas “UEs”)
XPS	Espectroscopía de Fotoelectrones Emitidos por Rayos X
µm	Micrómetros
µg	Microgramos

CONTENIDO

	Pág.
CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE TESIS	II
CRÉDITOS INSTITUCIONALES	III
COPIA ACTA DE EXAMEN	IV
DEDICATORIA	V
AGRADECIMIENTOS	VI
AREVIATURAS	VII
LISTA DE TABLAS	X
LISTA DE FIGURAS	XI
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XIII
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	19
DESARROLLO EXPERIMENTAL	20
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
CONCLUSIONES	59
REFERENCIAS	61
ANEXO 1	69

CONTENIDO GENERAL

	Pág.
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	
1.1 NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE HIERRO	
Origen, composición y características de las nanopartículas magnéticas (NPMs)	1
NPs de Fe ₃ O ₄ en el ambiente	3
Implicaciones en la salud	5
Posibles rutas de entrada de las NPs al cerebro: conducto olfatorio y BHE	5
Anatomía general del bulbo olfatorio y estructura y función de la barrera BHE	7
1.2 NANOTOXICOLOGIA: TOXICIDAD DE NPMs EN SISTEMAS BIOLÓGICOS	
Ensayos de toxicidad.	11
Evaluación de toxicidad en NPs sin estabilización.	13
Evaluación de toxicidad de NPs en aplicaciones biomédicas	14
Modelos in vitro de la BHE-monocultivo, Co-cultivo, Cultivos primarios y Líneas celulares.	15
1.3 NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS EN BIOMEDICINA	17
1.4 JUSTIFICACIÓN	17
CAPÍTULO 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	
2.1 HIPÓTESIS	19
2.2 OBJETIVO GENERAL	19
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
CAPITULO 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL	
3.1 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS	
Síntesis de NPs de Fe ₃ O ₄	20
Recubrimiento con SiO ₂	21
3.2 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL	
Difracción de Rayos X (DRX)	22
Espectroscopía Raman	23
3.3 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA	
Microscopía Electrónica de barrido (SEM) y Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM)	24
3.4 CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL	
Espectroscopia de Fotoelectrones emitidos por Rayos X (XPS)	26
Potencial Z	26
3.5 CARACTERIZACIÓN MAGNÉTICA	
Sistema de Medición de Propiedades Físicas (PPMS)	28
3.6 CONDICIONES DE CULTIVO DE rBMECs	
Cultivo celular	29
Subcultivo celular	29
3.7 EVALUACIÓN DEL POTENCIAL TÓXICO DELAS NPMs DE FE ₃ O ₄ SOBRE LAS CÉLULAS DEL ENDOTELIO MICROVASCULAR DEL CEREBRO.	

Determinación del efecto de las NPs sobre la integridad de la membrana mediante la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH)	31
Evaluación del metabolismo celular (mitocondrial) mediante ensayos de reducción de MTS	32
3.8 ENSAYOS DE INTERNALIZACIÓN DE LAS NPMs EN LAS rBMECs	
Preparación de las células para su análisis por TEM	33
Análisis de la interacción de las NPs en rBMECs mediante TEM utilizando el sistema Transwell®	35
Determinación de la capacidad de transitosi de las NPs a través de la monocapa de rBMECs: <i>Técnica de plasma de acoplamiento inductivo (ICP) con espectrofotómetro de emisión óptica (OES).</i>	35
CAPITULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL	
Difracción de Rayos X (DRX)	36
Espectroscopía Raman	38
4.2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA	
Microscopía Electrónica de barrido (SEM) y Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM)	40
4.3 CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL	
Espectroscopia de Fotoelectrones emitidos por Rayos X (XPS)	43
Potencial Z	45
4.4 CARACTERIZACIÓN MAGNÉTICA	
Sistema de Medición de Propiedades Físicas (PPMS)	46
4.5 EVALUACIÓN DEL POTENCIAL TÓXICO DELAS NPMs DE Fe_3O_4 SOBRE LAS CÉLULAS DEL ENDOTELIO MICROVASCULAR DEL CEREBRO.	
Análisis morfológico	48
Determinación del efecto de las NPs sobre la integridad de la membrana mediante la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH)	49
Evaluación del metabolismo celular (mitocondrial) mediante ensayos de reducción de MTS	51
4.6 ENSAYOS DE INTERNALIZACIÓN DE LAS NPs EN LAS rBMECs.	
Análisis de la interacción de las NPs en rBMECs mediante TEM utilizando el sistema Transwell®	53
Determinación de la capacidad de transitosi de las NPs a través de la monocapa de rBMECs: <i>Técnica de plasma de acoplamiento inductivo (ICP) con espectrofotómetro de emisión óptica (OES).</i>	56
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES	59
REFERENCIAS	61
ANEXO 1: DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NPs/ML DE Fe_3O_4.	69

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Porcentajes obtenidos por refinamiento de Rietveld de las fases identificadas en Fe_3O_4 y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$. **37**

Tabla 2. Valores obtenidos para la determinación del diámetro (en nm) de las NPs a partir de TEM, SEM y DRX correspondientes a (a) Fe_3O_4 y (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$. **42**

Tabla 3. Valores obtenidos en DLS de potencial Z para concentraciones de 100, 40 y 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ correspondientes a NPs de Fe_3O_4 y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$. **45**

Tabla 3. Concentraciones de Fe presentes en el medio de cultivo celular contenido en la cámara basolateral del sistema Transwell®, mediante la técnica de ICP. **57**

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Micrografías electrónicas de transmisión de secciones del cerebro identificando dos tipos de morfologías de NPMs dentro de las células frontales.	4
Figura 2. Rutas sugeridas para la translocación neuronal de partículas sólidas nanométricas y para componentes solubles de partículas más grandes en humanos, roedores y primates.	6
Figura 3. Anatomía general del bulbo olfatorio la cual es considerada como posible ruta de ingreso de xenobióticos al organismo tales como NPs.	8
Figura 4. Esquema representativo de xenobióticos que atraviesan la barrera hematoencefálica de los capilares en el tejido nervioso a través de las uniones estrechas en células endoteliales.	9
Figura 5. Células Microvasculares Cerebrales Endoteliales (rBMEC) en monocapa, presentando una confluencia del 100%.	13
Figura 6. Configuraciones comúnmente usadas para el cultivo de células endoteliales de la microvasculatura cerebral en monocultivo o en co-cultivos.	16
Figura 7. Síntesis de NPs de Fe_3O_4 mediante coprecipitación	20
Figura 8. Reacción química de precipitación de Fe_3O_4	21
Figura 9. Proceso de recubrimiento de Fe_3O_4 con SiO_2 .	21
Figura 10. Ley de Bragg	22
Figura 11. Ecuación de Scherrer	23
Figura 12. Ecuación de Einstein	26
Figura 13. Estructura de MTS tetrazolio y su transformación a producto formazán	32
Figura 14. Representación de un modelo de barrera biológica in vitro basado en Transwell	33
Figura 15. Esquema de una monocapa celular en un soporte permeable	34
Figura 16. Patrones de DRX de (a) Fe_3O_4 y (b) $Fe_3O_4@SiO_2$ analizados por tamaño y comparados con las tarjetas (c) JCPDS 99-0073 y (d) 39-1346 para Fe_3O_4 y Fe_2O_3 .	37
Figura 17. Espectroscopía Raman de (a) Fe_3O_4 y (b) $Fe_3O_4 @ SiO_2$.	39
Figura 18. Micrografías electrónicas de transmisión y barrido de muestras de Fe_3O_4 .	41
Figura 19. Micrografías electrónicas de transmisión y barrido de muestras de $Fe_3O_4@SiO_2$.	42
Figura 20. Espectro XPS de inspección para: (a) Fe_3O_4 y (b) $Fe_3O_4 @ SiO_2$; de alta resolución para: (c) Fe 2p en Fe_3O_4 , (d) Si en $Fe_3O_4@SiO_2$ y (e) O1s en $Fe_3O_4@SiO_2$.	44
Figura 21. A) Curvas de magnetización para Fe_3O_4 (en rojo) y para $Fe_3O_4 @ SiO_2$ (en negro) a 300K, ambas con aumento en "B".	46
Figura 22A. Imágenes de los cultivos celulares expuestos a diferentes concentraciones de NPMs de Fe_3O_4	48

Figura 22B. Imágenes de los cultivos celulares expuestos a diferentes concentraciones de NPMs de $Fe_3O_4@SiO_2$	49
Figura 23. Efecto de diferentes concentraciones de NPMs (1-100 $\mu g/mL$) sobre la liberación de LDH en células rBMEC.	50
Figura 24. Efecto de diferentes concentraciones de NPMs (1-100 $\mu g/mL$) sobre la actividad metabólica del compuesto MTS en células rBMEC.	51
Figura 25. Ensayo de Internalización de nanopartículas de Fe_3O_4 y $Fe_3O_4@SiO_2$ de dos concentraciones (5 y 40 $\mu g/ml$) en monocapa de células rBMEC después de una exposición de 24 horas mediante caracterización en TEM.	55

RESUMEN

Toxicidad de Nanopartículas Magnéticas en un Modelo *in-vitro* de Barrera Hematoencefálica

Las nanopartículas magnéticas (NPMs) de origen antropogénico, como son las nanopartículas de hierro que se encuentran principalmente en fase de magnetita (Fe_3O_4), son liberadas al medio ambiente como resultado principalmente de la abrasión de cilindros de combustión y frenos de disco del vehículo, por lo que se pueden encontrar en muestras de polvo en áreas con alta densidad de tráfico. Estas NPs de Fe_3O_4 se han encontrado en el tejido cerebral humano,¹ sin embargo a diferencia de la magnetita biogénica cuyo tamaño de NP es menor (8 nm), las NPs de Fe_3O_4 tienen un diámetro medio de 18 nm y presentan una morfología euédrica. En la literatura se ha propuesto que llegan al cerebro directamente a través del nervio olfativo, sin embargo no se descarta la posibilidad de que éstas también hayan ingresado al tejido cerebral desde la circulación sanguínea por medio de capilares, atravesando la barrera hematoencefálica (BHE). Se ha propuesto que su presencia en este tejido pudiera estar asociada con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, debido a que las NPs de Fe_3O_4 son fuertes inductores del estrés oxidativo y respuesta inflamatoria. Un amplio espectro de estudios ha evaluado la toxicidad de las NPMs de Fe_3O_4 modificadas superficialmente para su uso con fines de administración de fármacos, sin embargo, existe escasa información sobre la capacidad de internalización y toxicidad de las NPs de Fe_3O_4 desnudas en las células que forman la BHE, lo cual, podría contribuir a explicar su presencia en el tejido cerebral y su posible función en la neurodegeneración.

En el presente trabajo se llevó a cabo la síntesis, caracterización y evaluación de la toxicidad de las NPs de Fe_3O_4 desnudas en un modelo *in vitro* de BHE, consistente en una monocapa de células endoteliales primarias de la microvasculatura de cerebro de rata (rBMECs). El sistema de NPs cubiertas con sílica ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$) se incluyó para propósitos de comparación. En la caracterización de la composición estructural y superficial de las NPs de Fe_3O_4 , la adición del revestimiento en $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ no alteró los resultados, sin embargo exhibió variaciones posicionales de los mismos. Ambos tipos de NPs presentaron un diámetro de alrededor de 11.4 y 17.5 nm para Fe_3O_4 y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ en SEM en comparación con TEM con un valor de 8.45 y 14.33 nm respectivamente. Así mismo, se pudo determinar para ambas muestras la presencia de propiedades superparamagnéticas,

resaltando que en las NPs cuya superficie fue modificada con SiO₂, evidenció un incremento de saturación magnética en comparación con aquellas sin recubrimiento.

Los ensayos de toxicidad de las NPMs de Fe₃O₄ y Fe₃O₄@SiO₂ sobre la monocapa de rBMECs, que incluyeron el efecto sobre la permeabilidad de la membrana a través de la liberación de LDH y la evaluación del metabolismo celular mediante MTS, mostraron que a bajas concentraciones (5 y 15 µg/mL) de tratamientos con NPs de Fe₃O₄ muestra mayor toxicidad en comparación con el uso de mayores concentraciones de NPs, lo cual puede deberse a que concentraciones bajas de NPs presentan una mayor dispersión en el medio de cultivo celular que las concentraciones mayores, las cuales generan aglomeraciones de NPs de tal manera que impiden su ingreso al interior de la célula. Así también se sugiere que la actividad metabólica de las células bajo concentraciones de NPs de 5 y 15 µg/mL se encuentra alterada, por lo que requiere de acciones enzimáticas para contrarrestar el daño inducido, de tal manera que se incrementa el metabolismo celular a nivel mitocondrial el cual puede determinarse mediante la reducción del compuesto de MTS. Por otra parte, las NPs de Fe₃O₄@SiO₂ evidenciaron una menor toxicidad, sin embargo para éste análisis es posible que a mayores concentraciones de éstas NPs se obtengan respuestas comparables con aquellas NPs de Fe₃O₄ desnudas debido a la cantidad de NPs expuestas en cultivo.

Por otra parte, los resultados de la evaluación del ingreso de las NPs sintetizadas en las rBMECs, mostraron que ambos tipos de NPs, desnudas y cubiertas con SiO₂ se internalizan de manera efectiva a través del proceso de endocitosis, cuando éstas células se expusieron tanto a 5 como a 40 µg/mL. Además, en concentraciones de 40 µg/mL las células expuestas mostraron alteración de las uniones estrechas (UEs), donde la concentración de NPs en las células aparentemente generó un aumento de proteínas en el área para el refuerzo de tales uniones. Finalmente las células expuestas a NPs de Fe₃O₄ mostraron signos evidentes de toxicidad mediante una mayor producción de retículo endoplásmico liso y una aparente discontinuidad de la membrana plasmática, incluyendo un significativo incremento de tales signos en aquellas células expuestas a una concentración de 40 µg/mL.

De significativa relevancia es la observación de que ambos tipos de NPs son capaces no sólo de penetrar a las células que forman la monocapa de rBMECs, sino también de cruzar hasta el compartimiento inferior del sistema Transwell. Esto fue constatado a través de la determinación por ICP de la concentración de Fe³⁺ y Fe²⁺ en el medio de cultivo celular contenido en la cámara basolateral del sistema Transwell® utilizado para realizar el ensayo de internalización de las NPs.

En resumen, estos resultados sugieren que las NPs de Fe_3O_4 sintetizadas químicamente pero que simulan a las NPs de Fe_3O_4 que se encuentran suspendidas en el ambiente y que se han encontrado en el cerebro humano (de 8.45 nm de diámetro, con propiedades superparamagnéticas además de la presencia de la fase Fe_2O_3). Éstas NPs son capaces de cruzar las células del endotelio vascular por medio de transitosis. Dentro las NPs producen alteración en el metabolismo celular, principalmente mitocondrial, alteran la integridad de la membrana y al parecer modifican la expresión de las proteínas de UE.

Estos resultados sugieren que las NPs de Fe_3O_4 producidas de manera antropogénica y liberadas al medio ambiente podrían ingresar al tejido cerebral a través de las células endoteliales que recubren la microvasculatura cerebral, causando además importante daño en la integridad de la membrana y en la funcionalidad de la BHE, lo cual podría así mismo contribuir a incrementar el riesgo en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas.

ABSTRACT

Toxicity of Magnetic Nanoparticles in an In-vitro Blood-Brain Barrier Model

Magnetic nanoparticles (NPMs) of anthropogenic origin, such as iron nanoparticles that are mainly found in magnetite phase (Fe_3O_4), are released to the environment mainly as a result of the abrasion of the vehicle's combustion cylinders and disc brakes, so they can be found in dust samples in areas with high traffic density. These NPs of Fe_3O_4 have been found in human brain tissue,¹ however unlike biogenic magnetite whose NP size is smaller (8 nm), Fe_3O_4 NPs have a mean diameter of 18 nm and present a euhedral morphology. In the literature it has been proposed that they could reach the brain directly through the olfactory nerve, however the possibility that they have also entered the brain tissue from the blood circulation through capillaries, crossing the blood brain barrier (BBB) is not ruled out. It has been proposed that its presence in this tissue could be associated with the development of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's, due Fe_3O_4 NPs are strong inducers of oxidative stress and inflammatory response. A broad spectrum of studies has evaluated the toxicity of surface modified Fe_3O_4 NPs used for drug administration purposes, however, there is limited information about the internalization and toxicity of naked Fe_3O_4 NPs in the cells that form BBB, which could contribute to explain its presence in brain tissue and its possible role in neurodegeneration.

In the present work, the synthesis, characterization and evaluation of the toxicity of naked Fe_3O_4 NPs was carried out in an in vitro model of BBB, consisting of a monolayer of primary rat brain microvascular endothelial cells (rBMECs). The system of NPs covered with silica ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$) was included for comparison purposes. In the characterization of the structural and surface composition of the NPs of Fe_3O_4 , the addition of the coating in $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ did not alter the results, however it exhibited positional variations of the same. Both types of NPs had a diameter of around 11.4 and 17.5 nm for Fe_3O_4 and $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ in SEM compared by TEM, with a value of 8.45 and 14.33 nm respectively. In the other hand, it was possible to determine for both samples the presence of superparamagnetic properties, highlighting that in the NPs whose surface was modified with SiO_2 , it showed an increase of magnetic saturation in comparison with those without coating.

The toxicity tests of the NPMs of Fe_3O_4 and $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ on the monolayer of rBMECs, which included the effect on the permeability of the membrane through the release of LDH and the evaluation of cellular metabolism by MTS, showed that at low concentrations (5 and 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of treatments with Fe_3O_4 NPs shows greater toxicity compared to higher concentrations of NPs, which may be due to the fact low concentrations of NPs present a greater dispersion in the cell culture medium than higher concentrations, which generate agglomerations of NPs in such a way that they prevent their entry into the cell. It is also suggested that the metabolic activity of the cells under NPs concentrations of 5 and 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ is altered, so it requires enzymatic actions to counteract the induced damage, in such a way that cellular metabolism is increased at the same level mitochondrial which can be determined by reducing the MTS compound. Furthermore, the NPs of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ showed less toxicity, however for this analysis it is possible that at higher concentrations of these NPs, comparable responses are obtained with those naked Fe_3O_4 NPs due to the amount of NPs exposed in culture.

Additionally, the results of the evaluation of the income of the NPs synthesized in the rBMECs, showed that both types of NPs, naked and covered with SiO_2 are internalized effectively through the process of endocytosis, when these cells were exposed to both 5 and at 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Furthermore, at concentrations of 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ the exposed cells showed alteration of tight junctions (TJs), where the concentration of NPs in the cells apparently generated an increase of proteins in the area for the reinforcement of such unions. Finally, the cells exposed to NPs of Fe_3O_4 showed evident signs of toxicity through a greater production of smooth endoplasmic reticulum and an apparent discontinuity of the plasma membrane, including a significant increase of such signs in those cells exposed to a concentration of 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Of significant relevance is the observation that both types of NPs are capable not only of penetrating the cells that form the monolayer of rBMECs, but also of crossing to the lower compartment of the Transwell system. This was verified through the determination by ICP of the concentration of Fe^{3+} and Fe^{2+} in the cell culture medium contained in the basolateral chamber of the Transwell® system used to perform the NPs internalization assay.

In summary, these results suggest that the Fe_3O_4 NPs are chemically synthesized but simulate the Fe_3O_4 NPs that are suspended in the environment and that have been found in the human brain (8.45 nm in diameter, with superparamagnetic properties in addition to the presence of the Fe_2O_3 phase). These NPs are able to cross vascular endothelial cells by means of transits. Within the NPs produce alteration in cellular metabolism, mainly

mitochondrial, alter the integrity of the membrane and apparently modify the expression of TJs proteins.

These results suggest that the $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ NPs produced in an anthropogenic manner and released into the environment could enter the brain tissue through the endothelial cells that line the cerebral microvasculature, causing important damage in the integrity of the membrane and in the functionality of the BBB, which could also contribute to increase the risk in the development of neurodegenerative diseases.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE HIERRO.

Origen, composición y características de las nanopartículas magnéticas (NPMs).

Las nanopartículas magnéticas (NPMs) de óxido de hierro poseen un diámetro menor a los 100 nm, así como irreversibilidad de campo y un alto estado de saturación.² Debido a estas características, las partículas pueden no mostrar interacción magnética posterior a la supresión de un campo magnético externo. Se encuentran constituidas principalmente por fase magnetita (Fe_3O_4), aunque la maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) y la hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) son otros óxidos de hierro que entran dentro de la categoría de NPMs.

Por otra parte, la Fe_3O_4 es un mineral que se encuentra de manera natural en la corteza terrestre y está formado por un óxido mixto de Fe^{2+} y Fe^{3+} , de tal manera que su fórmula se puede expresar como FeFe_2O_4 y puede ser llamado también como óxido ferroso férrico; por su parte la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) lo nombra como óxido de hierro (II, III). Dentro de las estructuras cristalinas la Fe_3O_4 pertenece al grupo de las espinelas, puesto que es un tipo de mineral con una fórmula general $\text{A}^{2+}\text{B}_2^{3+}\text{O}_4$, que cristaliza en el sistema cristalino cúbico, siendo A y B iones metálicos. Los iones de oxígeno forman una red (FCC), mientras que el catión A generalmente bivalente ocupa sitios tetraédricos y el catión B normalmente es trivalente y ocupa sitios octaédricos ($\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4$), aunque, en concreto esta es una espinela inversa, debido a que el catión divalente Fe^{2+} se encuentra en los sitios octaédricos, mientras el catión trivalente Fe^{3+} se encuentra en los sitios tetraédricos y octaédricos. Por consiguiente, los electrones pueden saltar entre los iones Fe^{2+} y Fe^{3+} que están en los sitios octaédricos a temperatura ambiente confiriéndole algunas propiedades metálicas al material.³

Así mismo, la magnetita se produce de manera natural en diversos entornos geológicos, desde rocas ígneas (p. ej., rocas ultra básicas en capas, basaltos), sedimentarias (p. ej., formaciones de hierro con bandas, arenas de playa) y en rocas metamórficas de alto grado (por ejemplo esquistos), donde se puede producir a través de una multitud de reacciones

químicas. Debido a su tendencia a reaccionar con oxígeno para formar hematita (Fe_2O_3) y varios oxihidróxidos (p. ej., ferrihidrita, goetita), Fe_3O_4 puede ser empleada como una herramienta para determinar concentraciones de oxígeno en rocas durante procesos geológicos, cambios en la concentración de oxígeno en la atmósfera y condiciones redox en entornos cercanos a la superficie. Además, su propiedad ferrimagnética es esencial para investigaciones que ayudan a reconstruir las placas tectónicas a través de la historia de la Tierra.⁴

Los cristales de magnetita químicamente puros, biogénicos y de dimensiones nanométricas se encuentran en los cuerpos de una amplia gama de organismos dentro de los reinos de Monera, Protista y Animalia (por ejemplo, microbios magnetotácticos, insectos, moluscos, peces, aves, mamíferos, etcétera).⁵ En estos organismos, Fe_3O_4 forma la base de un tipo de mecanismo biofísico de detección de campo magnético, que facilita la orientación y la navegación de los organismos que lo poseen.^{6,7} En el cerebro humano se sintetiza de manera natural como parte del metabolismo del hierro.^{8,9}

Por otra parte, como producto de la nanotecnología, las NPs de Fe_3O_4 son obtenidas artificialmente a través de procesos tecnológicos a partir de rutas de síntesis física o química, donde la segunda es la ruta globalmente más empleada. Por mencionar algunos métodos de síntesis de estas NPMs se encuentra el método de microemulsión, donde se emplean gotas de agua como nanoreactores en una fase continua en presencia de moléculas de surfactante.¹⁰ En el proceso de rutas sonoquímicas un ultrasonido de alta energía crea cavitaciones acústicas que pueden proporcionar calor localizado a una temperatura de aproximadamente 5000 K, dando lugar a la formación y el crecimiento de los núcleos. Para la deposición electroquímica en condiciones oxidadas, el ánodo se puede oxidar en especies de iones metálicos en solución y el ion metálico se reduce posteriormente a metal mediante el cátodo en presencia de estabilizadores. En el método hidrotermal los precursores de hierro en medio acuoso se pueden calentar a alta temperatura a presión autógena.¹¹ Para el proceso de descomposición térmica pueden emplearse agentes como citrato de colina y hierro, carbonato de hierro y carboxilato de hierro.¹² El método más común de síntesis es el de coprecipitación, donde la adición de una base a una solución acuosa de iones ferrosos (Fe^{2+}) y férricos (Fe^{3+}) en una estequiometría 1:2 produce un precipitado negro de NPs de Fe_3O_4 con tamaños uniformes en un ambiente libre de oxígeno.

Finalmente es menester mencionar que la Fe_3O_4 es un componente indispensable de una variedad de materiales y productos sintéticos (p. ej., polvo de tóner), empleándose profusamente en forma de NPs para tales aplicaciones. Debido a que su uso se lleva a cabo en el sector industrial esencialmente, estas NPs pueden ser liberadas al ambiente en forma de materia particulada y entrar en contacto directo de manera accidental con el humano.¹³

NPs de Fe_3O_4 en el ambiente

La contaminación del aire comprende no solo gases (por ejemplo, óxidos de nitrógeno, ozono, dióxido de azufre) sino también partículas sólidas, con variaciones en su tamaño, que abarcan el rango de escalas nanométricas hasta micrométricas. Estas partículas, conocidas como materia particulada (MP), son generadas a partir de procesos naturales así como de aquellos procedentes de la actividad humana (antropogénicas), las cuales son emitidas de forma directa en la atmósfera o bien pueden formarse dentro de la misma. Al estudiar las propiedades físicas y morfológicas de la composición de polvo de área de tráfico de alta densidad, se evidenció la presencia de esférulas magnéticas,¹⁴ dentro de las cuales se encuentran las NPMs proliferando en el aire urbano.^{1,15} Por consiguiente, se ha identificado su emisión en gases de escape diésel, aire de estaciones subterráneas, a lo largo de líneas de ferrocarril, en áreas donde se llevan a cabo procesos de soldadura, emisiones de procesos correspondientes a combustión industrial y en mayor medida por la abrasión producida en los cilindros de combustión, pastillas y frenos de disco de vehículos.¹⁶ Ocasionando importantes impactos atmosféricos, ambientales y ecológicos.

Millones de personas alrededor del mundo, 74 millones en los Estados Unidos y 24 millones viviendo en la CDMX, se encuentran inhalando de manera involuntaria concentraciones de MP por encima de los estándares de seguridad.¹⁷ A modo de ilustrar el problema, la Ciudad de México en el área metropolitana (CMAM) es una mega ciudad contaminada que cuenta con más de 40 000 industrias, conjuntamente, alrededor de 4 millones de vehículos consumen 40 millones de litros de petróleo por día produciendo así miles de toneladas de contaminantes.¹⁸ Debido a que la CMAM se encuentra ubicada en una cuenca elevada a 2240 m sobre el nivel del mar la cual está rodeada por tres crestas montañosas, es que se generan frecuentemente inversiones de temperatura, atrapando éstas emisiones en altitudes cercanas a la superficie agravando así tal problemática.¹⁹ De ésta manera, la MP aerotransportada puede tener efectos adversos para la salud, tanto agudos como crónicos,

debido a que con cada respiración realizada por los individuos, millones de partículas sólidas, incluidas las NPMs, logran ingresar al organismo.

En la revista *Proceedings of the National Academy of Science* (PNAS),²⁰ en el año de 2016, Maher y colaboradores relacionan el sistema respiratorio como mecanismo de ingreso de NPMs al organismo, puesto que describen la presencia abundante de NPs de óxido de hierro en cerebros de personas que nacieron y murieron en un solo territorio, tomando como caso de estudio la Ciudad de México y Manchester, imperando los índices de mayor concentración en aquellas personas originarias de la Ciudad de México. Los especialistas sugieren en este estudio que las NPs pueden generarse a partir de una fuente externa, las cuales son derivadas de la contaminación del aire. Aunado a los resultados, los autores argumentan sus hipótesis con base a la estructura de las NPMs encontradas en el tejido cerebral: las partículas derivadas de la abrasión son típicamente de forma irregular y angular. Así mismo, en partículas endógenas su morfología tiende a ser esférica debido a su crecimiento *in situ* (p. ej., dentro del cerebro).⁹ Las imágenes del microscopio electrónico presentadas por Maher y colaboradores (Fig. 1), documentan dos tipos de nanopartículas de Fe_3O_4 esférica y euhedral, cuyas morfologías están presentes en los cerebros analizados, lo que sugiere que se derivan de dos fuentes distintas: una interna (es decir, biogénica) donde alcanzan un diámetro promedio a los 8nm y cuya morfología es esférica (que se observa en A con aumento en B) y otra externa (procedente de la contaminación del aire) cuyo diámetro promedio es de 18 nm y pueden alcanzar hasta los 150 nm (la cual podemos observar en C con aumento en D), las cuales presentan además un porcentaje en fase de Fe_2O_3 . A su vez, esta conclusión se ve respaldada por la presencia de otras nanopartículas de metales de transición, que son comunes en los aerosoles de MP en las áreas contaminadas.

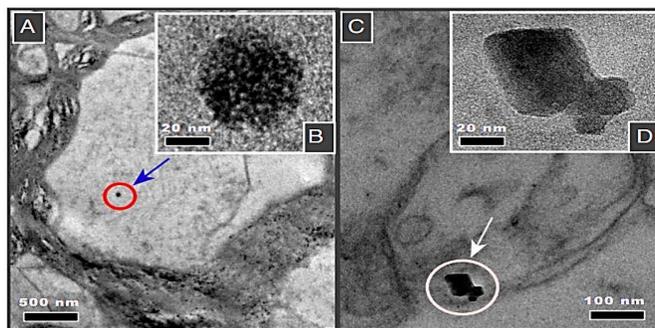


Figura 1. Micrografías electrónicas de transmisión de secciones del cerebro identificando dos tipos de morfologías de NPMs dentro de las células frontales: (A y F) partículas redondeadas (A se muestra con mayor aumento en B); y (C) partículas angulares, euhedral, que se atribuye a la formación endógena (partículas de C. se muestra con mayor aumento en D). (Tomado de Maher, et al., 2016)

Implicaciones en la salud

Como es bien sabido a partir de estudios epidemiológicos y toxicológicos, la evidencia se centra en efectos asociados a la exposición a MP_{2.5} (materia particulada <2.5 µm de ancho) a corto y largo plazo, la cual está relacionada con el aumento de la mortalidad, e ingresos hospitalarios, principalmente a causa de enfermedades respiratorias y cardiovasculares.²¹ Así mismo, se presenta en aumentos en la cantidad de leptina, hormona que actúa como pro inflamatorio implicado en la obesidad y diabetes tipo II, neuroplasticidad, etc.²² En el tracto respiratorio genera la producción de inmunoglobulinas específicas del antígeno, aumento de la susceptibilidad de los pulmones a la infección microbiana, bronquitis crónica, exacerbación del asma, fibrosis y cáncer de pulmón,²³ así como cambios en la presión arterial y la variabilidad de la frecuencia cardíaca.²⁴

Los mecanismos detrás de estas enfermedades, así como su dependencia de las propiedades de las partículas, todavía son poco conocidas. El más probable implica la sobreproducción de radicales libres [p. ej., especies de oxígeno reactivo (ROS)], que pueden conducir a daño oxidativo de las membranas celulares, las proteínas y el ADN, así como a la liberación celular de mediadores químicos que desencadenan y perpetúan inflamación.^{25,26}

Actualmente se conoce que su presencia en el cerebro puede estar vinculada a varias enfermedades neurodegenerativas, incluida la enfermedad de Alzheimer,²⁷ debido a que se considera que el óxido de hierro juega un papel importante en el desarrollo de la inflamación a través del estrés oxidativo causado por radicales hidroxilo, los cuales a su vez son generados durante el ciclo redox entre los estados Fe³⁺ y Fe²⁺.²⁸ En el cerebro, el estrés oxidativo suele ocasionar deformación en las células que conforman la barrera hematoencefálica (BHE), así como la expresión de proteínas asociadas con lesión neuronal, desempeñando así un papel clave en la patogénesis cerebral.²⁹

Posibles rutas de entrada de las NPs al cerebro: Conducto olfatorio y BHE.

Una vez inhaladas, las NPs pueden depositarse como partículas gruesas (generalmente definidas como partículas con un diámetro >2.5 µm) en las superficies de las vías respiratorias conductoras del sistema respiratorio superior, mientras que las partículas más pequeñas (MP_{2.5}) pueden migrar a las partes más profundas del pulmón donde tiene lugar el intercambio de gases.³⁰ Las partículas ultrafinas (<100 nm), o NPs, pueden penetrar a través del tejido celular que recubre el tracto respiratorio y translocarse a la circulación

sanguínea y a órganos extrapulmonares, sin embargo también se ha descrito que algunas NPs pueden ingresar a través de los axones del nervio olfativo (Fig. 2) teniendo la capacidad de translocarse al cerebro.^{31,32}

A su vez, en este proyecto se planteó la hipótesis de que éstas NPs pueden ingresar por una ruta alternativa como es la barrera hematoencefálica (BHE) mediante los capilares localizados en el cerebro, a partir de procesos implicados en el transporte al interior las células de la unidad neurovascular, ocasionando de esta manera efectos directos en el organismo.

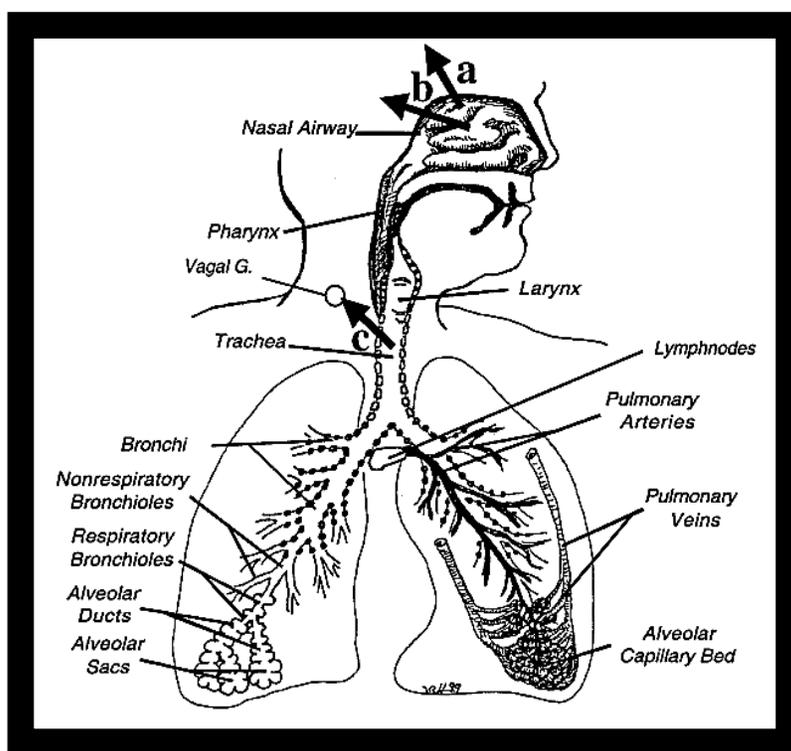


Figura 2. Rutas sugeridas para la translocación neuronal de partículas sólidas nanométricas y para componentes solubles de partículas más grandes en humanos, roedores y primates (Tomado de Oberdörster G., et al., 2004)

Anatomía del bulbo olfatorio y estructura y función de la BHE

El Bulbo olfatorio

La mucosa olfativa de los organismos vertebrados contiene varios millones de neuronas sensoriales localizadas en un epitelio en columna pseudo estratificado de 200 μm de grosor. Tres tipos de células forman este tipo de epitelio: las neuronas sensoriales olfativas, las células de soporte y las células basales. Las células de soporte actúan como una glía celular que secreta parte de los componentes de la mucosa, y las células basales son células madre que se dividen y se diferencian durante toda su vida para convertirse finalmente en neuronas sensoriales olfativas.

El receptor celular olfatorio es una neurona sensorial bipolar donde sobresale una dendrita no ramificada hacia la superficie epitelial y a un axón no mielinizado hacia el bulbo olfatorio. Cada dendrita finaliza en un nudo, que da lugar a 5-20 cilios delgados dentro del lumen nasal. Estos cilios (0.1-0.2 μm de diámetro y arriba de 200 μm de longitud) se encuentran en una delgada capa de mucosa de la superficie epitelial. Un pequeño axón no mielinizado sobresale desde el polo opuesto de la célula penetrando a través de la membrana basal y después de hacer un ángulo de 90° se une a otros 10-100 para formar un paquete de axones enmascarados con células Schwann. Estos paquetes penetran a través de la placa cribosa (una región porosa del hueso etmoidal) para formar el nervio olfatorio (el primer nervio craneal) y proyectar al bulbo olfatorio ipsilateral. Cada axón hace sinapsis a las neuronas secundarias, esta sinapsis es una estructura compleja conocida como Glomérulo que consta de 100-1000 axones olfativos aferentes que convergen hasta un enramado de una célula mitral. Esto permite a las células mitrales muestrear de manera quimio sensorial la información de un área del epitelio olfativo, incrementando la posibilidad de detectar pequeñas concentraciones de aromas que puedan tener lugar de manera no uniforme.³³

De esta manera al considerar la anatomía en el bulbo olfatorio se ha identificado que la absorción a través de las neuronas olfatorias puede constituir una ruta por la cual las nanopartículas tengan acceso directo al cerebro (Fig. 3), localizándose en mayor concentración principalmente en el área del hipotálamo.³⁴

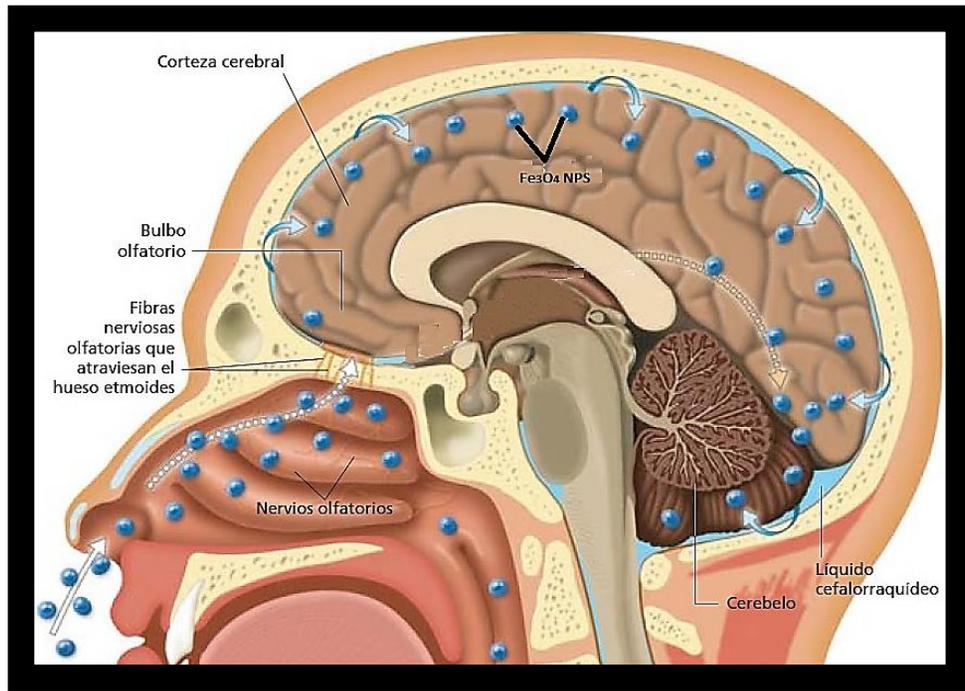


Figura 3. Anatomía general del bulbo olfatorio la cual es considerada como posible ruta de ingreso de xenobióticos al organismo tales como NPs (Imagen modificada de Benhard, 2018)

Barrera hematoencefálica (BHE)

El Sistema Nervioso Central (SNC) es el sistema de órganos más crítico y sensible en el cuerpo humano. Su función neuronal y glial requiere una regulación precisa del medio extracelular del cerebro. Por lo tanto, la interfaz entre el sistema nervioso central y la circulación sistémica debe ser altamente selectiva y poseer mecanismos efectivos que puedan facilitar el transporte de nutrientes, regular el equilibrio iónico y proporcionar una barrera a xenobióticos potencialmente tóxicos que pueden estar presentes en la circulación sistémica (Fig. 4). El requerimiento de una barrera física y metabólica, se enfatiza aún más por la extrema sensibilidad de los tejidos del SNC a los solutos exógenos. Por lo tanto, la homeostasis cerebral debe controlarse estrictamente permitiendo que algunas sustancias permeen el parénquima cerebral con la exclusión de otras. Esta función homeostática de la microvasculatura cerebral se produce principalmente en la BHE a nivel del endotelio microvascular cerebral.³⁵

Anatómicamente, las células endoteliales que conforman la BHE se distinguen de las de la periferia por la falta de fenestraciones, actividad pinocítica mínima y presencia de uniones

estrechas (UEs).³⁶ Las células endoteliales cerebrales están demarcadas por un mayor contenido mitocondrial en comparación con otros endotelios en el cuerpo.³⁷ Además, varios receptores, canales iónicos y proteínas de transporte de entrada/salida se expresan de forma prominente en células endoteliales microvasculares del cerebro.

La BHE depende de las células circundantes y componentes estructurales del tejido neural que interactúan directamente con el endotelio microvascular cerebral. Tal fenómeno ha dado lugar al concepto de la unidad neurovascular, que refleja la participación de la glía (es decir, astrocitos y microglía, principalmente), pericitos, neuronas y matriz extracelular, tanto en el desarrollo como en la fisiología de la BHE.³⁸

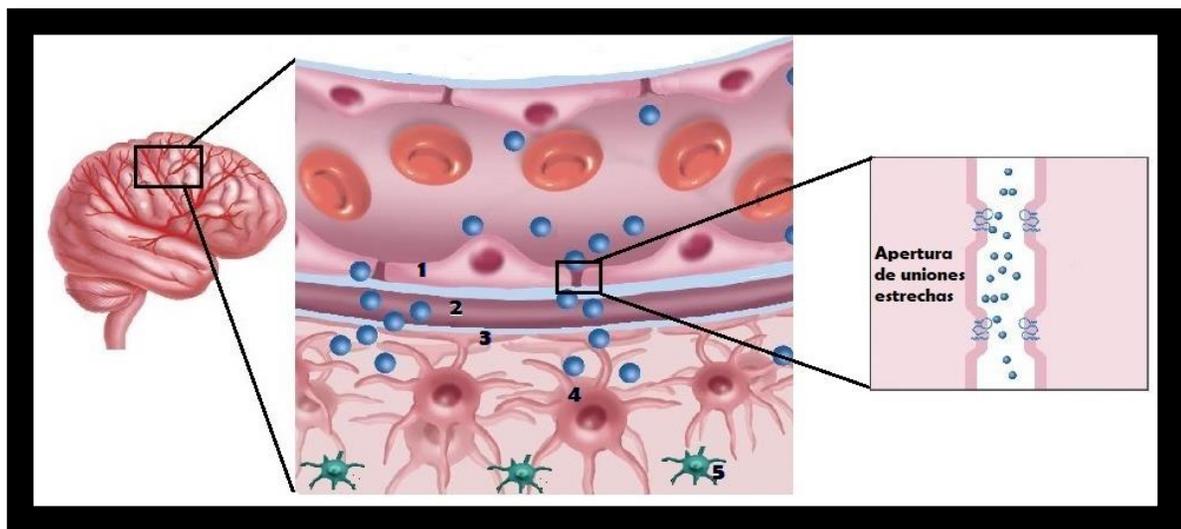


Figura 4. Esquema representativo de xenobióticos que atraviesan la barrera hematoencefálica de los capilares en el tejido nervioso a través de la deformación de las uniones estrechas en células endoteliales, mostrando además sus principales componentes 1) Células endoteliales 2) Membrana basal 3) Pericitos 4) Astrocitos 5) Microglía. (Imagen modificada de Sunnybrook, 2018)

Los astrocitos pueden estar involucrados en la regulación transitoria de la permeabilidad microvascular cerebral, en particular a través de la señalización dinámica de Ca^{2+} entre los astrocitos y el endotelio a través de las UEs. La evidencia reciente también sugiere que los astrocitos pueden desempeñar un papel crítico en la regulación del intercambio de agua y iones a lo largo del endotelio microvascular cerebral.³⁹

La microglía es el tipo celular primario involucrado en la inmunidad innata y adaptativa en el SNC, contribuyendo a la homeostasis de la BHE al participar en la limpieza del líquido extracelular y la desactivación de neurotransmisores. Durante una enfermedad o trauma, la

microglía puede activarse, correlacionándose directamente con el tipo y la gravedad de la lesión cerebral. La activación y proliferación de microglía se asocia con la disfunción de la BHE caracterizada por cambios en la expresión proteica de las UEs y la permeabilidad paracelular.⁴⁰

Además de la glía, los pericitos son células planas, indiferenciadas y contráctiles que se unen a intervalos irregulares a lo largo de las paredes capilares y se comunican con otros tipos de células de la unidad neurovascular. Además, inducen la expresión de ocludina (una de las principales proteínas de las UEs) en la BHE, lo que sugiere que están directamente implicados en la inducción y/o mantenimiento de las propiedades de barrera. Otra evidencia de los pericitos en el mantenimiento del fenotipo BHE proviene de la observación de que estos migran lejos del endotelio durante un trauma cerebral,⁴¹ condiciones que son asociadas a un aumento de la permeabilidad microvascular. Además de los componentes celulares anteriormente señalados, la matriz extracelular está fuertemente asociada con el aumento de la permeabilidad de la BHE en estados anómalos.⁴²

Finalmente, se ha considerado que la BHE limitará la absorción de cationes metálicos de la circulación sistémica al SNC, sin embargo se ha demostrado que ocurre una interrupción en la integridad de BHE ocasionada por factores fisiopatológicos (es decir, inflamación que puede ser producida por la penetración de xenobióticos al sistema, hipertensión, etc.) que a menudo acompaña a los cambios en el flujo sanguíneo cerebral y presión de perfusión. De esta manera dicha apertura de BHE puede ser un evento selectivo y compensatorio, por lo que la comunicación entre las neuronas y la microvasculatura del cerebro puede no simplemente regular el flujo sanguíneo, sino también la permeabilidad de la BHE.⁴³

Ensayos de toxicidad.

Para determinar si una sustancia o partícula resulta tóxica para los humanos, se requiere realizar pruebas en sistemas biológicos, las cuales en general involucran una serie de tratamientos de diferentes tipos de células en cultivo.

Diversos autores a su vez han investigado la toxicidad de nanopartículas, reportando que su acumulación dentro de la célula depende de la concentración, tiempo de incubación, y tamaño.⁴⁴ A sí mismo, su interacción está influenciada por otras características de las partículas, éstas incluyen su estructura, composición química, forma, área de superficie, reactividad, propiedades de sorción y solubilidad.²³ De manera general, se conoce que al interactuar NPs y componentes celulares, éstas conducen al daño celular a partir de la degradación de proteínas, lípidos, enzimas y ácidos nucleicos, desencadenando procesos de necrosis o apoptosis.⁴⁵

La combinación de la información obtenida de cada uno de estos análisis proporciona información crítica para la evaluación de la toxicidad del material y estimar el nivel de exposición en donde se observan cambios celulares, que van desde su morfología hasta su metabolismo. Los estudios toxicológicos son de gran relevancia para la evaluación de riesgos a la salud humana debido a la exposición de las NPs, ya sea de manera accidental o deliberada.

A continuación se mencionarán las pruebas más comunes que se llevan a cabo para determinar la toxicidad de un nanomaterial sobre las células con las que éste tiene contacto.

- A) Evaluación de la integridad de la membrana celular mediante la determinación de la actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH). El ensayo de LDH es ampliamente utilizado y se fundamenta en el hecho de que esta enzima se encuentra normalmente en el citoplasma de las células vivas y sólo se libera en el medio de cultivo celular al permeabilizarse la membrana de las células cuando éstas han muerto o bien bajo la existencia de una alteración metabólica o que presentan gran deterioro por acción de un agente tóxico. El ensayo consiste en medir cuantitativamente la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), mediante un ensayo enzimático acoplado de 30 minutos, que da como resultado la conversión de una sal de tetrazolio (Violeta yodonitrotetrazolio; INT) en un producto de formazán rojo, cuyos datos son analizados usando un lector de placas estándar de 96 pocillos en

una absorbancia de longitud de onda visible en 490 nm. Una longitud de onda a 630 nm es empleada como referencia para eliminar el fondo aportado por restos celulares, huellas dactilares y otras absorbancias no específicas. La cantidad de color derivada del incremento en la actividad LDH en el sobrenadante del cultivo es proporcional al número de células lisadas.⁴⁶

- B) Evaluación del metabolismo celular (principalmente mitocondrial) mediante la transformación de MTS. El ensayo de MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H tetrazolio] es un método colorimétrico empleado para determinar el número de células viables. Este ensayo se fundamenta en la reducción de una sal de tetrazolio la cual es producida por la NADH (forma reducida del dinucleótido nicotinamida adenina) mediante enzimas deshidrogenasas mitocondriales, predominantemente la succinato deshidrogenasa⁴⁷ que se encuentran en células metabólicamente activas, las cuales están inmersas en un producto de formazán el cual es soluble en un medio de cultivo tisular. De igual manera que en el ensayo anterior, la cantidad de producto transformado es determinado por su absorbancia en un lector de placas de 96 pozos en una longitud de onda de 490 nm, la cual es directamente proporcional al número de células vivas en cultivo. Así mismo, se emplea una longitud de onda de referencia a 630-700 nm.⁴⁸
- C) Evaluación de la inducción de estrés oxidativo. A su vez, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) son moléculas químicamente reactivas que contienen oxígeno y son generadas como un residuo natural del metabolismo del oxígeno, sin embargo, en condiciones anormales los niveles de ROS puede aumentar drásticamente y provocar estrés oxidativo. Éste puede identificarse a partir del compuesto diacetato de 2'7'- diclorofluorescina (DCFH-DA, por sus siglas en inglés) el cual en presencia de especies reactivas el (DCFH) es oxidado a diclorofluorescina altamente fluorescente (DCF), para ser empleado como indicador en la cuantificación del estrés oxidativo presente en las células.⁴⁹
- D) La internalización celular, es un método en donde el microscopio electrónico de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) es utilizado como la herramienta principal para controlar la calidad de barreras biológicas y para visualizar sus estructuras celulares, incluidas aquellas relacionadas con la formación de barreras (Fig. 5). También permite la visualización de la localización de nanopartículas en

orgánulos celulares tales como endosomas, lisosomas, etcétera, capturando eventos de interacción de nanopartículas con monocapas celulares para adquirir pruebas concluyentes que revelen mecanismos de transporte de nanopartículas.⁵⁰

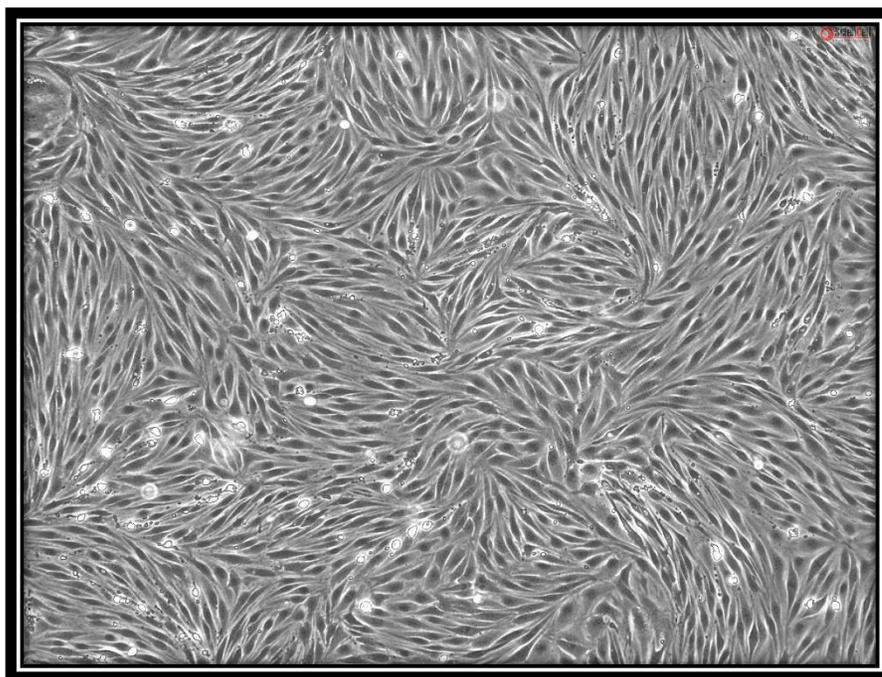


Figura 5. Células Microvasculares Cerebrales Endoteliales (rBMEC) en monocapa, presentando una confluencia del 100%, la cual es adecuada para la formación de uniones estrechas a nivel intercelular y posteriormente evaluarse por TEM. (Imagen tomada de ScienCell Laboratories, 2018).

Evaluación de toxicidad en NPs sin estabilización.

Existen estudios realizados con la finalidad de evaluar la toxicidad de nanopartículas de diferentes materiales los cuales presentan una problemática poblacional, debido a que la exposición a las mismas en sectores de extracción minera ha generado daños severos a la salud. Es por ello que ensayos en roedores han demostrado que tanto los compuestos de níquel solubles como insolubles pueden inducir lesiones celulares y atrofia en el epitelio nasal olfatorio y respiratorio, pudiendo ocurrir una translocación de NPs sólidas hacia otros órganos.³⁴ De igual manera, ensayos realizados por De Lorenzo⁵¹ demuestran inequívocamente la existencia de una vía olfativa neuronal al SNC, revelando que el nervio y los bulbos olfatorios son portales de entrada al SNC para partículas ultrafinas de Zn. Colectivamente, estos estudios muestran que las nanopartículas pueden ser absorbidas

eficazmente por terminaciones nerviosas sensoriales en varios sitios del tracto respiratorio y obtener acceso al SNC.

Con la finalidad de evaluar la toxicidad en las NPMs una vez que han sido absorbidas por el organismo y ser translocadas a otros órganos, se han llevado a cabo experimentos *in vitro* empleando células de pulmón humano las cuales fueron expuestas durante 24h a diferentes tamaños de NPs y dosis, debido a que tienden a generar ROS a causa de los estados de oxidación presentes en el material, revelando así que las partículas estudiadas, aunque ligeramente citotóxicas, condujeron a una mayor formación de ROS, daño mitocondrial y efectos genotóxicos,⁵² permitiendo concluir que la formación de ROS desempeña un papel importante en la genotoxicidad de las células del pulmón. Sin embargo, es preciso mencionar que existen escasos estudios acerca de la internalización de NPs de Fe sin recubrimiento en células que conforman la BHE, sin el empleo de un elemento magnético durante su transporte y cuyo propósito principal sea el de evaluar su comportamiento para efectos de nanotoxicidad por exposición en el ambiente; debido a que además del nervio olfatorio, para éste proyecto se ha considerado que éstas NPs pueden albergarse en el cerebro por medio de translocación generada por su transporte en los capilares sanguíneos de aquellas NPMs provenientes del intercambio de oxígeno en el pulmón.

Evaluación de toxicidad de NPs en aplicaciones biomédicas

En contraste con el referente anterior, se han llevado a cabo diversos ensayos en modelos experimentales con NPs modificadas superficialmente para mejorar su compatibilidad con sistemas biológicos con la intención de ser empleadas principalmente en tecnologías de administración de fármacos, tales como la determinación de la neurotoxicidad *in vivo* inducida por SPIONs para superar las restricciones en la BHE, donde se emplearon tales NPs (50-100 nm y -16.9 ± 0.6 mV) como agentes de liberación de fármacos a diferentes concentraciones (35,70 y 140 $\mu\text{g/mL}$), investigando su capacidad para pasar a través de células endoteliales facilitadas por un imán externo.⁵³ Así mismo, se determinó la cantidad de interruptores moleculares inducidos por estrés oxidativo mediante ensayos de toxicidad con nanopartículas SPIONs (10 y 30 nm y -33.9 ± 2.3 y -32.9 ± 0.4 mV) en concentraciones de 10 $\mu\text{g/mL}$ en un modelo (BHE) de rata, analizando adicionalmente si su integridad en el mismo se veía comprometida.⁵⁴ Adicionalmente, se determinó la nanotoxicidad *in vitro* de NPs esféricas de Bismuto (20 nm) en una matriz de microtejidos tridimensionales (3D) a

concentraciones de 2, 20 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mediante la siembra de células en micropocillos, permitiendo que las células se agregaran, dando lugar a su crecimiento y preservación de una morfología definida.⁵⁵

Modelos *in vitro* de la BHE-monocultivo, Co-cultivo, Cultivos primarios y Líneas celulares.

A lo largo de años de investigación, se han implementado diferentes modelos de cultivos celulares para el estudio de la BHE y su interacción con sustancias o materiales con potencial tóxico, los cuales tuvieron inicio en los años setenta, mediante el aislamiento de capilares de la vasculatura cerebral, las cuales fueron de gran utilidad para determinar la integridad de las UEs, así como otros mecanismos relacionados. A continuación, los métodos para aislar los capilares cerebrales fueron optimizados para producir el aislamiento de células endoteliales primarias mediante el uso de una mezcla de enzimas cuya función era degradar las membranas basales, eliminar los pericitos y liberar las células endoteliales. Estos cultivos se basan principalmente en células del endotelio sin la participación de otras células pertenecientes a la unidad neurovascular.⁵⁶ Posteriormente, se implementaron métodos que incluían el co-cultivo de las células endoteliales de la microvasculatura cerebral con astrocitos en monocapa en cajas o botellas de cultivo.⁵⁷ Subsiguientemente se implementaron co-cultivos de células endoteliales y astrocitos cultivados en superficies opuestas de cámaras Transwell®, lo que promovía el establecimiento de mayores UEs, dando lugar a mayores respuestas de retención de la actividad de la g-glutamyl transpeptidasa, así como un aumento de la resistencia eléctrica transendotelial (TEER) hasta aproximadamente $660 \Omega \cdot \text{cm}^2$.⁵⁸

La capacidad de los astrocitos para aumentar TEER en cultivos de células endoteliales se ha demostrado en numerosos estudios posteriores, tanto para co-cultivos en contacto como sin contacto (astrocitos sembrados en la parte inferior del placa debajo del inserto del filtro) y con monocultivos de células endoteliales cultivadas en astrocitos con medio acondicionado.⁵⁹ Más recientemente, los pericitos han sido incluidos en algunos modelos de BHE, ya sea como reemplazo para astrocitos o en cultivo triple con astrocitos y células endoteliales, demostrado valores ligeramente más altos en TEER que en co-cultivos de células y astrocitos (Fig. 6).⁶⁰

Años de desarrollo de pruebas han resultado en una gama de modelos bien establecidos y caracterizados para ser empleados de manera rutinaria en laboratorios. Estos tienen sus

bases en células endoteliales de cerdo,⁶¹ bovino,⁶² rata,⁶³ y ratón,⁶⁴ proporcionando una gran cantidad de información sobre fisiología y fisiopatología de la BHE, permitiendo una validación cruzada de gran valor entre los modelos. Anteriormente, algunos investigadores habían establecido y caracterizado modelos con células endoteliales de cerebro humano inmortalizadas⁶⁵ así como células endoteliales derivadas de células madre con el fin de obtener células humanas,⁶⁶ sin embargo en la actualidad el tejido humano puede adquirirse en presentación de cultivos primarios de células endoteliales de microvasculatura del cerebro de forma comercial.

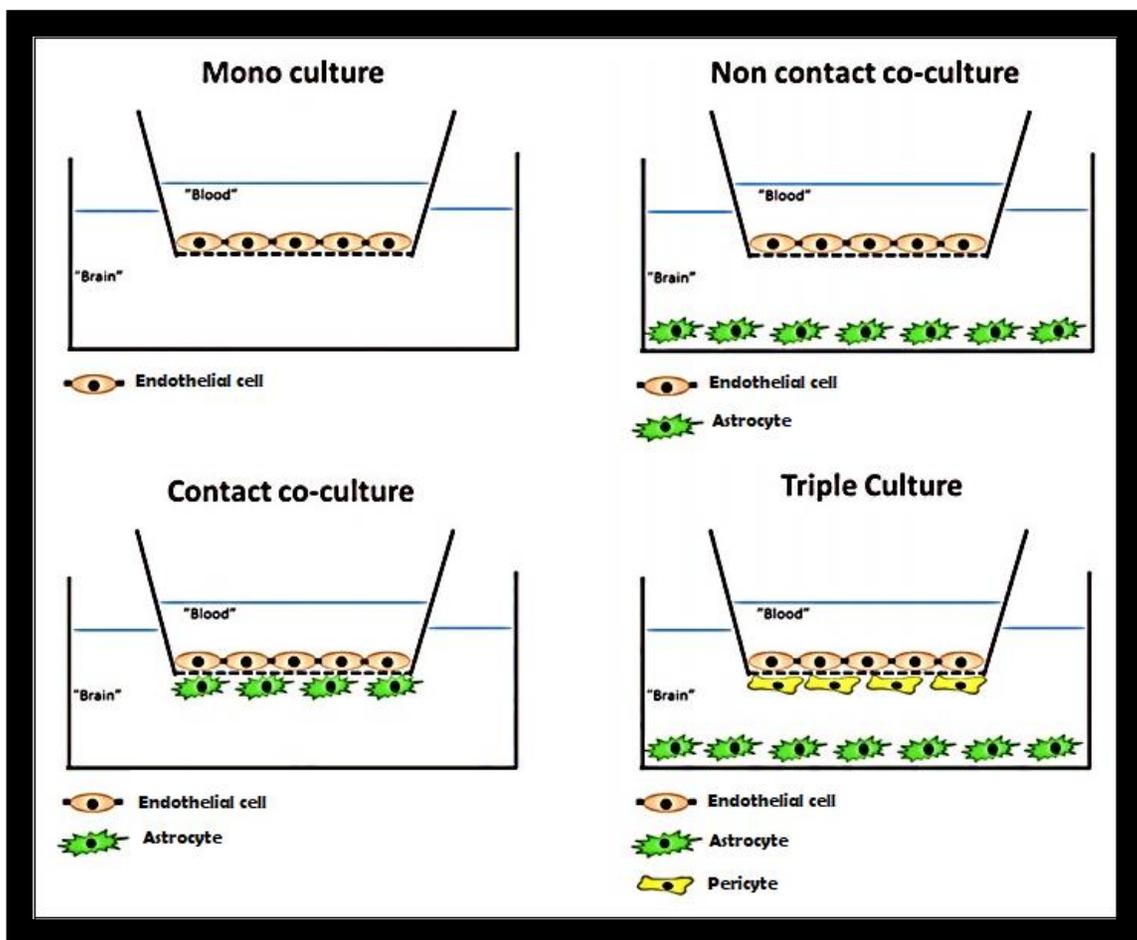


Figura 6. Configuraciones comúnmente usadas para el cultivo de células endoteliales de la microvasculatura cerebral en monocultivo o en co-cultivos. (Tomado de Helms, et al., 2016).

1.3 NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS EN BIOMEDICINA

La presencia de estas nanopartículas en humanos, tiene también otras implicaciones potenciales al emplearse ampliamente en ciencias biológicas y médicas debido a la superioridad que presentan en biocompatibilidad, bioactividad y estabilidad química en medio fisiológico. Como se ha mencionado anteriormente, las NPMs pueden desencadenar interacciones magnéticas en la capa superficial, teniendo un efecto notable en sus propiedades, por lo que se considera el uso de recubrimientos tales como dextrano,⁶⁷ quitosano,⁶⁸ poli(etilenimina) (PEI),⁶⁹ poli(etilenglicol) (PEG),⁷⁰ liposomas,⁷¹ etc.

Estas NPs son de especial interés en las ciencias biomédicas, ya que pueden usarse como vectores para la administración dirigida de fármacos.⁷² Además, sus propiedades pueden explotarse para la terapia contra el cáncer basada en la hipertermia, donde el calor inducido por la aplicación de un campo magnético alterno causa la necrosis de las células cancerosas sin dañar el tejido normal circundante.⁷³ Por último cabe mencionar que un gran número de investigadores han propuesto que el empleo de las NPMs podría desempeñar un papel clave en la percepción, la transducción y el almacenamiento a largo plazo de la información en el cerebro humano y en otros organismos.⁷⁴

1.4 JUSTIFICACIÓN

Las NPMs se encuentran presentes en el aire urbano, ocasionando efectos severos en la salud como alteraciones en el sistema respiratorio, cardiovascular, cerebral, entre otros; contribuyendo además al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. De esta manera ocasionan un deterioro en la calidad de vida de la población expuesta a este tipo de polución. Concretamente, se ha reportado que la BHE presenta un proceso regulatorio en la permeabilidad de la membrana como una medida compensatoria, cuando se encuentra bajo condiciones alteradas, impidiendo así el paso de sustancias o partículas que puedan generar variaciones al sistema. Sin embargo, una de las principales preguntas que surge del descubrimiento de NPMs de origen externo en el tejido cerebral es si su presencia compromete la permeabilidad de la barrera hematoencefálica cuando estas actúan como sustancias xenobióticas, de tal manera que su penetración pueda no ser regulada debido a la existencia de mecanismos alterados patológicamente y esto a su vez tenga como consecuencia la generación de mayores efectos adversos. Otros factores de relevancia en

esta problemática se encuentran intrínsecamente relacionados, como es la dependencia del tiempo de exposición de las NPMs, su nivel de concentración en el tejido, ausencia de revestimiento, agentes involucrados en su síntesis, etcétera.

Finalmente, como se ha logrado cotejar en el marco de información anterior, la investigación en la actualidad sigue siendo escasa en cuanto a la determinación de la toxicidad de NPs de hierro desnudas en tejidos o en modelos celulares que forman la BHE, lo que podría contribuir a explicar su presencia en el tejido cerebral y evaluar su posible papel en la neurodegeneración.

CAPÍTULO 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS

Las NPs de Fe_3O_4 desnudas son capaces de ingresar y atravesar las células endoteliales de la microvasculatura cerebral que conforman la barrera hematoencefálica (BHE) a través del proceso de endocitosis; dentro de éstas células modifican significativamente el metabolismo mitocondrial, alteran la integridad de la membrana, provocan toxicidad y modifican la expresión de proteínas de las UE.

2.2 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad de internalización de las NPs de Fe_3O_4 en un modelo de BHE constituido por una monocapa de células endoteliales microvasculares cerebrales.

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Sintetizar de NPs de Fe_3O_4 con y sin recubrimiento de SiO_2 mediante el método de coprecipitación.
2. Caracterizar ambos tipos de NPs mediante técnicas específicas de ciencias de materiales.
3. Evaluar el potencial citotóxico de NPs en cultivos de rBMECs mediante la evaluación de la integridad de la membrana a través del ensayo LDH y evaluación del metabolismo celular mediante transformación de MTS.
4. Evaluar la internalización de las NPs de Fe_3O_4 en la monocapa de rBMECs cultivadas en el sistema Transwell® mediante TEM.

CAPÍTULO 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS

En el presente trabajo se consideró un diseño de experimentos que permitiera recolectar de manera adecuada los resultados de cada uno de los análisis realizados, con el fin de obtener información concreta, comparable y que permita evaluar la hipótesis planteada. Así mismo, un óptimo tratamiento de los resultados permite verificar los objetivos específicos, identificar factores influyentes, procedimientos o pruebas particulares, así como optimizar el manejo de los recursos y materiales disponibles.

Puesto que en este trabajo se desea evaluar el ingreso de NPMs a través de la BHE y su posible efecto tóxico, se sintetizarán y utilizarán NPs Fe_3O_4 de 12 nm de diámetro aproximadamente, desnudas (como aquellas localizadas en el cerebro humano²⁰). Así mismo, como control se decidió comparar con los efectos observados al emplear NPs Fe_3O_4 con un revestimiento de SiO_2 , ya que es reconocido que aumenta su biocompatibilidad en sistemas biológicos, disminuye su toxicidad y regula su capacidad de dispersión.

Síntesis de NPs de Fe_3O_4 .

El protocolo de síntesis adoptado en este trabajo involucra el método de coprecipitación, utilizando sales de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en una proporción 2:1,⁷⁵ por consiguiente el sobrenadante final se decantó magnéticamente para obtener el producto de NPs de magnetita, al que posteriormente se sometió a lavados de agua destilada y secado a 60°C (Fig. 7).

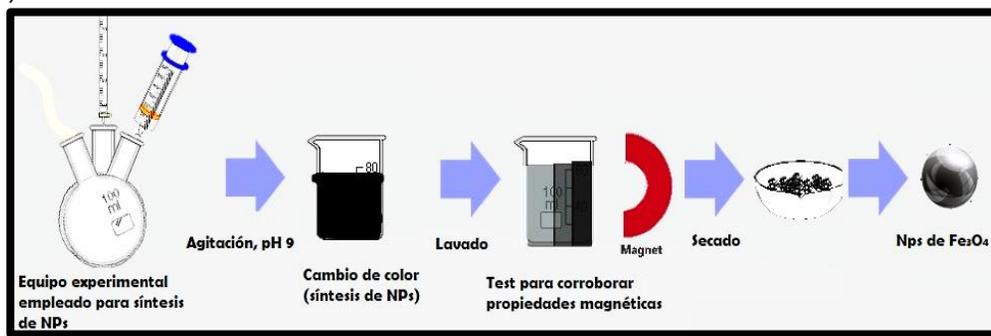
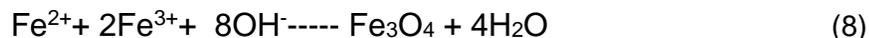


Figura 7. Síntesis de NPs de Fe_3O_4 mediante coprecipitación.

De acuerdo a la termodinámica en la reacción, una precipitación completa de Fe_3O_4 es esperada entre un pH 9 y 14, mientras que se mantenga la relación molar requerida bajo un ambiente libre de oxígeno. De manera general, la reacción química de la precipitación de Fe_3O_4 se describe de la siguiente manera:



Recubrimiento con SiO_2 .

Posterior al secado, las nanopartículas previamente sintetizadas con el protocolo anterior fueron resuspendidas en agua destilada en un volumen de 100 mL por gramo obtenido de Fe_3O_4 y se añadieron 50 mL de la solución al 10% de tetraetilortosilicato acuoso (TEOS) junto con 70 ml de alcohol. El pH de la suspensión se ajustó a 9.0 con NaOH. Posteriormente se elevó su temperatura a 90°C manteniéndose en agitación y alimentación constante de agua y alcohol durante 6 h.⁷⁶ En seguida, la suspensión se enfrió a temperatura ambiente y se llevó a cabo el proceso de lavado: dos veces con alcohol y seis veces con agua destilada. El volumen de la suspensión final se ajustó a 100 ml con agua destilada (Fig. 9).

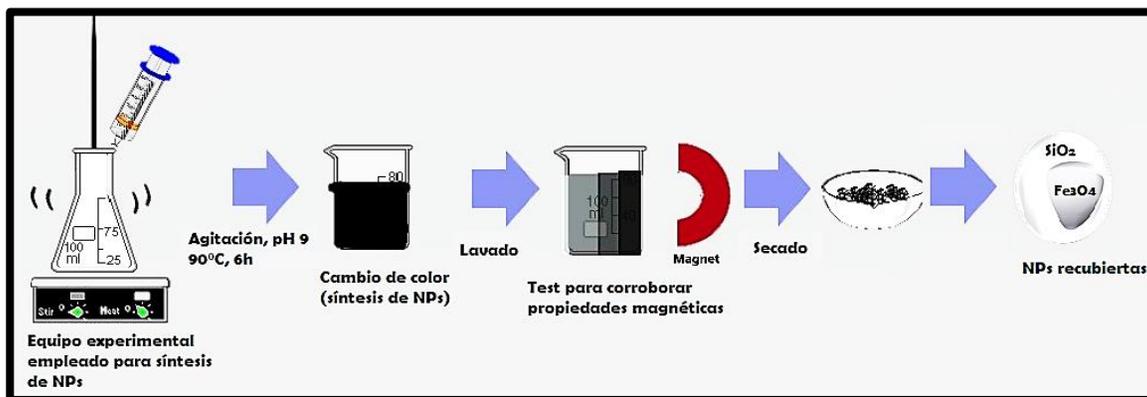


Figura 9. Proceso de recubrimiento de Fe_3O_4 con SiO_2 .

3.2 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL

La caracterización estructural se llevó a cabo con Difracción de rayos X y Espectroscopía Raman debido a que entre sus principales ventajas se encuentra que las mediciones realizadas sobre la muestra no son destructivas, otorgando información vasta referente a sus propiedades.

Difracción de Rayos X (DRX)

Posterior al proceso de síntesis y recubrimiento, se obtuvieron NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ y NPs de Fe_3O_4 desnudas las cuales fueron caracterizadas mediante un difractómetro con radiación de $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda = 0.15405 \text{ nm}$) *SmartLab Rigaku* bajo condiciones ambientales, debido a que es una de las técnicas más usadas en la caracterización estructural puesto que permite obtener información tal como estructuras cristalinas, tamaño de grano, identificación de fases, entre otros. Al incidir un haz de rayos X sobre una estructura cristalina, se puede conocer su ordenamiento periódico a través de la interferencia generada por la radiación incidente sobre los átomos del material. La interferencia generada es de tipo constructivo produciendo diferentes reflexiones con direcciones e intensidades específicas, estas reflexiones reciben el nombre de reflexiones de Bragg.

$$\lambda = 2d_{hkl} \sin \theta \quad (10)$$

Donde λ es la longitud de onda de la radiación incidente, d_{hkl} es la distancia entre los planos atómicos hkl y θ es el ángulo de difracción respecto al plano en el cual se logra una interferencia constructiva.⁷⁷ Para identificar las fases presentes en un difractograma obtenido a partir del análisis de difracción por rayos X de una muestra se utiliza la información de la intensidad de los picos y la ubicación de los mismos en el eje 2θ , posteriormente estas medidas son introducidas en la base de datos Powder Diffraction File (PDF) en donde se encuentra la información reportada de materiales analizados.

Refinamiento Rietveld

El método de Rietveld es una técnica utilizada para ajustar un difractograma experimental a partir de un difractograma calculado, adaptando las intensidades de las diferentes reflexiones del parámetro de difracción teórico, dicho ajuste se lleva a cabo empleado la aproximación de mínimos cuadrados. Con la implementación de esta técnica se pueden encontrar los parámetros cristalográficos del material analizado.

Empleando el programa Powder Cell se realizó el refinamiento con el fin de encontrar el porcentaje de cristalinidad en Fe_3O_4 y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$, así como sus parámetros cristalográficos. El tamaño promedio del cristal se estimó usando la ecuación de Scherrer:

$$\tau = K\lambda / (B \cos \theta) \quad (11)$$

donde K es el factor de forma con un valor de 1, λ es la longitud de onda (0.154 nm), B es el ancho a la altura media (FWHM, Full Width Half Maximum por sus siglas en inglés) y θ es el ángulo de Bragg.

Espectroscopía Raman

Así mismo, la espectroscopía Raman se obtuvo en un espectrofotómetro Shimadzu IRTracer 100, la cual es una técnica espectroscópica empleada para el análisis cuantitativo de prácticamente cualquier material, ya sea orgánico o inorgánico. El procedimiento de análisis se lleva a cabo cuando un haz de luz monocromático incide sobre la muestra, dispersándose de manera elástica, es decir cuando la frecuencia del fotón incidente y emitido es la misma (dispersión Rayleigh) en su mayor parte, sin embargo existe una cantidad de luz que ha sido dispersada inelásticamente, y por tanto presenta un cambio en su frecuencia.⁷⁸ Estos cambios en la frecuencia son característicos de la naturaleza química y del estado físico de la muestra.

Para la preparación de las muestras previa a su análisis en ambas técnicas, fueron secadas a 60°C durante 24 h y posteriormente pulverizadas por medio de un mortero de ágata. Para la técnica de Rayos X, las muestras fueron recolectadas y colocadas en un portamuestras para ser analizadas. En espectroscopía Raman un trozo de cinta doble cara fue colocado al portamuestras y posteriormente fue adicionada una pequeña cantidad de analito por medio de una espátula de plástico para evitar pérdidas por adherencia del material.

3.3 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

Mediante las técnicas de caracterización en SEM y TEM se obtienen imágenes aumentadas (en TEM con una mayor resolución) de una muestra que permiten conocer información acerca de su microestructura, morfología y composición.

Microscopía Electrónica de barrido (SEM) y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Microscopía Electrónica de barrido (SEM)

Al incidir sobre la muestra el haz de electrones se generan diferentes tipos de radiación de los cuales generalmente son empleados los electrones secundarios y los retrodispersados. En el primer caso es resultado de la interacción del haz con la banda de conducción de la muestra, generando así imágenes topográficas del material. En el segundo caso es producido por la interacción del haz con los átomos del material y la dispersión generada se encuentra estrechamente relacionada con el número atómico del átomo en el que los electrones inciden.

La morfología y tamaño de partícula de cada muestra como primer análisis se caracterizó por microscopía electrónica de barrido (SEM) utilizando un Microscopio Electrónico de Barrido de Haz Doble (FIB/SEM) FEI-Helios Nanolab 600, que consta de un cañón de electrones con su óptica, cámara de muestras, circuito de vacío, electrónica de detección y registro de imagen.⁷⁹

Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

En TEM, un haz de electrones de alta energía (300 keV) atraviesa una muestra menor a los 150 nm, alterando varias propiedades físicas del haz de electrones que pueden ser recopiladas por diversos detectores. De acuerdo al funcionamiento de la lente objetiva tenemos dos modos de operación del instrumento: en modo imagen y en modo difracción. Así mismo, al interactuar el haz de electrones con la muestra, esta última emite rayos X característicos que son colectados por un detector EDS OXFORD especial.

De acuerdo a las técnicas en las que el TEM se especializa se destacarán 3 de ellas para el propósito de la investigación en un equipo JEOL ARM200-F en modo de operación STEM.

En la técnica de Campo Claro se obtienen micrografías (en forma de un “positivo”) que poseen una resolución mayor que la Microscopía de Barrido (SEM), pero que dificulta mucho distinguir los materiales encimados o muy aglomerados, por lo que sólo se recomienda para una muestra con material muy disperso o separado. A su vez, la técnica de Contraste Z, se obtienen micrografías cuyas zonas más brillantes corresponden a una gran cantidad de materia (mayor densidad o mayor número atómico), que en principio se podría cuantificar. Es recomendada para estudios de morfología o de estadística de las nanoestructuras. La técnica de alta resolución (HRTEM) permite tener micrografías con resolución atómica (1.8 Å), siempre y cuando el material tenga zonas o bordes bien aislados y delgados (menores a los 50 nm de espesor), cuya localización se oriente en un eje de zona “amplio”. Confirmándose la estructura cristalina del objeto.⁸⁰

En el proceso del tratamiento de las muestras para ambas técnicas tal como en el apartado anterior, las dos muestras (Fe_3O_4 y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$) fueron secadas (60°C, 24h) y posteriormente pulverizadas. Posteriormente se tomaron alícuotas de cada una para llevar a cabo diluciones en alcohol isopropílico para obtener soluciones cercanas a la transparencia, de tal manera que presentaran una nitidez similar. Finalmente fueron llevadas a sonicación a temperatura ambiente durante 5 min y posteriormente se añadieron por medio de la técnica de goteo 10 μL de estas soluciones a rejillas de Cu para microscopía electrónica de transmisión, manteniéndose en un período de secado de 1 h.

Por último, para evaluar el tamaño de las NPs sintetizadas se llevó a cabo su análisis a partir de la medición de micrografías obtenidas por TEM mediante el software ImageJ® (versión 1.51j8, Wayne Rasband, USA) en el que posterior a la calibración y la escala de la micrografía se determinó el diámetro de cada NP a partir de su medición transversal considerando sus bordes como puntos de inicio y final del tamaño estimado de una morfología semiesférica. Se realizaron alrededor de 150 mediciones por muestra para obtener el diámetro promedio y su respectiva desviación estándar.

3.4 CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL

Como se ha observado anteriormente, las características intrínsecas a Fe_3O_4 están determinadas por su estructura química, es por ello que los analitos deben analizarse con una técnica de alta sensibilidad que permita determinar su estado químico así como su estructura electrónica elemental. La carga eléctrica presente en el material es de gran importancia para determinar si una NP puede interactuar con el medio en el que se encuentra inmerso.

Espectroscopia de Fotoelectrones emitidos por Rayos X (XPS)

Su funcionamiento se basa en el efecto fotoeléctrico. Un haz de fotones de rayos X con energía conocida incide sobre el material excitando los electrones de los niveles más profundos. La energía incidente excede a la energía de enlace del material y los electrones salen liberados con una energía cinética que es detectada y convertida en una señal digital (espectro). Así, a través de la relación en la ecuación de Einstein se obtiene información de la energía de enlace de los elementos que componen la superficie:

$$KE = hn - EB \quad (12)$$

donde valor de h es conocido y en este caso es de 1486.7 eV que corresponde al ánodo de aluminio que emite los rayos X. KE es la energía cinética detectada por el analizador y EB es la energía de enlace del electrón o fotoelectrón, nombrada de acuerdo al proceso por el que fue liberado.⁸¹ Las mediciones de espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS) se llevaron a cabo en el equipo *PHI 5000 VersaProbe II*. Los espectros de nivel de núcleo de Fe2p, Si2p, y O1s se registraron a partir de los compuestos Fe_3O_4 y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$.

Para el tratamiento de las muestras al igual que en apartados anteriores fueron requeridas en polvo, procediendo a su fijación en el portamuestras por medio de una cinta doble cara de Cu de dimensiones 0.5 cm x 0.5 cm. Posteriormente las muestras fueron colocadas en la precámara del equipo durante 24 h aproximadamente a una presión de 10^6 Pa.

Potencial Z

Para efectos de liberación de fármacos tal como se mencionó en el referente de aplicaciones biomédicas, el mecanismo de la captación celular de nanopartículas está dirigida por un proceso de dos pasos. La fijación superficial inicial a la membrana celular es

seguida por la etapa de internalización.⁸² Teniendo en consideración tal procedimiento, es posible que la internalización de NPs de Fe₃O₄ sintetizadas en el presente estudio presenten un comportamiento similar cuando interactúan en un sistema biológico como es el cultivo en monocapa de rBMECs. Es por ello que el Potencial Z es una herramienta importante para comprender el estado de la superficie de las NPs y predecir su estabilidad a largo plazo.

Las mediciones del potencial Zeta se realizaron en un *Malvern Zetasizer Nano ZS* (láser He-Ne 633 nm, máximo 4 mW) con un ángulo de dispersión de luz de 173 °. Posteriormente los datos fueron registrados por *Malvern Zetasizer Software* versión 6.20. Las mediciones fueron realizadas por triplicado a una temperatura de 25 °C.⁸³

Las muestras fueron diluidas en medio de cultivo DMEM libre de indicador rojo fenol a concentraciones de 15, 40 y 100 µg/mL para su análisis sin filtración. Posteriormente cada muestra fue sometida a sonicación para lograr una mayor dispersión del material durante 5 minutos. Finalmente 600 µL de cada analito fueron depositados en la celda de medición del equipo para su análisis.

3.5 CARACTERIZACIÓN MAGNÉTICA

La magnetización de una muestra de material se obtiene por medio de la medición de su momento magnético en función del campo aplicado o en función de la temperatura, dichos valores se dividen entre el volumen o la masa de la muestra utilizada. Para la medida del momento magnético en función del campo aplicado se parte de un campo de magnitud cero, el cual se incrementa hasta un valor máximo, posteriormente el campo invierte su magnitud hasta llegar primero a cero y continuar hasta un valor igual al valor máximo pero de magnitud negativa, finalmente el campo cambia de nuevo su polaridad a positiva pasando de nuevo por cero, hasta llegar al valor máximo positivo del inicio. De esta manera se obtiene la curva de histéresis del material.

Sistema de Medición de Propiedades Físicas (PPMS)

Las medidas de magnetización a temperatura ambiente en función del campo aplicado se efectuaron empleando un magnetómetro VersaLab 3 Tesla, PPMS (Physical Property Measurement System) de *Quantum Design*, cuyo portamuestras con el espécimen de estudio está contenido en la varilla de sujeción de muestras y se ubica en medio de un campo magnético constante, al mismo tiempo que el motor transmite un movimiento lineal a la muestra en torno al centro de las bobinas sensoras que captan el cambio en el flujo magnético producido por dicha vibración, de esta forma las bobinas sensoras producen una señal que es proporcional a la magnetización de la muestra.

Para ésta caracterización no fue requerida una preparación previa en las muestras, únicamente se colocaron 0.020g de analito en el portamuestras el cual posteriormente fue sellado, llevándose a cabo su análisis. Finalmente se tomaron medidas de magnetización a temperatura constante para las muestras en polvo en función del campo aplicado (0 ± 2500 Oe).

3.6 CONDICIONES DE CULTIVO DE LAS RBMECS

Cultivo celular

Una reserva criogénica que contenía aproximadamente 1×10^6 células de rBMEC (rat Brain Microvascular Endothelial Cells, por sus siglas en inglés), fueron descongeladas mediante la técnica de deshielo.

Una vez descongelado, el criovial con células se suspendió suavemente en solución amortiguadora fría de fosfatos (PBS) libre de Ca^{++} y Mg^{++} , $\text{pH}=7.4$ Posteriormente fueron centrifugadas a 1000 rpm durante 5 min.

El sobrenadante fue descartado y el botón conteniendo las células fue resuspendido en medio ECM (Endothelial Cell Medium, ScienCell) y luego depositadas en un frasco de 75 cm^2 cubierto previamente por una matriz de fibronectina al 2%, realizando el cambio de medio de cultivo cada 4 días y permaneciendo en incubación a 37°C , bajo una atmósfera humidificada al 90% con 5% de CO_2 , hasta que las células alcanzaron una confluencia del 80%.

Así mismo, para el cultivo celular así como para los ensayos de citotoxicidad, los medios de cultivo para las rBMEC se suplementaron con suero fetal de bovino (FBS) al 2%, suplementado con factor de crecimiento ECGS (5 mL) y solución de penicilina /estreptomicina P/S con 10,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de penicilina y 10,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina (ScienCell).

Subcultivo celular

Posterior a que las células cultivadas alcanzan una confluencia del 80%, éstas son subcultivadas con el propósito de generar una mayor cantidad de células. El procedimiento a seguir requiere la remoción del medio celular ECM en el que las células se encuentran inmersas, éste fue eliminado por medio de aspiración aséptica con bomba de vacío, subsecuentemente se llevaron a cabo lavados con solución salina tamponada con fosfato PBS $\text{pH} 7.5$ (5mL) libre de Ca^{++} y Mg^{++} , $\text{pH}=7.4$ a temperatura ambiente, la cual a su vez es removida para adicionar 4 mL de tripsina 1X manteniéndose en incubación durante 10 minutos hasta observar el desprendimiento de las células en un microscopio invertido. Posteriormente se adicionaron 4 mL de PBS con FBS al 2% para detener la acción de la tripsina, llevándose a centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante fue descartado y el botón conteniendo las células fue resuspendido en medio ECM. La cantidad

de células en el medio ECM fueron ajustadas por medio de conteo por hematocitómetro a una densidad promedio de 0.5×10^6 células/mL, las cuales fueron depositadas en un frasco de 75 cm^2 cubierto previamente por una matriz de fibronectina al 2%, realizando el cambio de medio de cultivo cada 4 días y permaneciendo en incubación a 37°C , bajo una atmósfera humidificada al 90% con 5% de CO_2 , hasta que las células alcanzaron una confluencia del 80% para dar lugar nuevamente al subcultivo celular. Sin embargo, debido a que las células rBMEC son pertenecientes a un cultivo primario poseen un número limitado de pases o subcultivos (5 pases/cultivo), puesto que posterior a estos es posible que las células lleguen a diferenciarse, perdiendo así sus características y funciones esenciales.

3.7 EVALUACIÓN DEL POTENCIAL TÓXICO DELAS NPs DE Fe_3O_4 SOBRE LAS CÉLULAS DEL ENDOTELIO MICROVASCULAR DEL CEREBRO:

Determinación del efecto de las NPs sobre la integridad de la membrana mediante la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH)

A fin de determinar el efecto de las NPMs de Fe_3O_4 y $Fe_3O_4@SiO_2$ sobre la integridad de la membrana de las rBMECs se realizó el ensayo colorimétrico basado en la determinación de la actividad de la enzima LDH (Citotoxycity Detection Kit LDH 11644793001, Roche®). La cantidad de células en el medio ECM fueron ajustadas por medio de conteo por hematocitómetro a una densidad de 1×10^4 células/mL, las cuales se colocaron en una placa de microtitulación de 96 pocillos, siendo incubadas durante 24 h para lograr la adherencia celular en los pocillos. Antes del ensayo, el medio de cultivo ECM fue reemplazado por DMEM de alta glucosa, HEPES, libre de indicador rojo fenol junto con la adición de NPMs en concentraciones que variaron de (1-100 μ g/mL) las cuales fueron añadidas a los pozos que contenían células. Para el análisis se incluyó un control positivo que consta de células con solución de lisis (Tritón X-100 al 2% en medio DMEM), un control negativo con células en medio DMEM y un blanco con medio DMEM. Las células fueron entonces incubadas con los dos tipos de NPs por separado durante 24 h, a 37°C, 5% de CO_2 y 90% de humedad.

Al término del periodo de exposición, se tomó una alícuota de 50 μ L de cada uno de los pozos y fueron colocados en una nueva placa de 96 pozos. Finalmente, se agregaron 50 μ L de solución de sustrato a cada pocillo de acuerdo a las especificaciones del fabricante, incubándose a 37°C, 5% de CO_2 y 90% de humedad durante 30 minutos.

La absorbancia a 490 nm se midió con un lector de microplaca, restando la longitud de onda de referencia de 630 nm a las muestras. Así mismo, cada experimento fue realizado por triplicado. Los resultados de citotoxicidad son expresados en relación con la liberación de lactato deshidrogenasa basal por células de control no tratadas. Los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se analizaron por ANOVA de una vía.

Evaluación del metabolismo celular (mitocondrial) mediante ensayos de reducción de MTS.

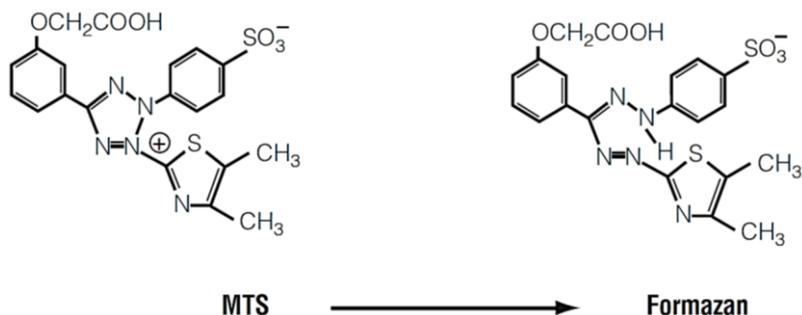


Figura 13. Estructura de MTS tetrazolio y su transformación a producto formazán (Tomada de Promega, 2012).

La prueba utilizada fue un ensayo colorimétrico utilizando el reactivo de tetrazolio (MTS: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2,4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium Promega®. Para esta prueba se utilizaron placas de 96 pozos y se sembraron 1×10^6 células por pozo de acuerdo a lo recomendado por el fabricante. Se permitió su adherencia en la placa durante 24 horas, posteriormente se realizó el cambio el medio a DMEM libre de fenol junto con el estímulo, el cual consta de diferentes concentraciones de NPMs (1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) manteniendo un tiempo de exposición con las NPs de 24 h más. El grupo control consistió en células mantenidas en medio de cultivo y no tratadas. Transcurrido ese tiempo se adicionó el reactivo MTS según las recomendaciones del fabricante, incubándose a 37°C , 5% de CO_2 y 90% de humedad durante 2 h. Finalmente la cantidad de formazán producido fue medido por absorbancia a 490 nm por medio de un lector de microplaca, dicha medida es directamente proporcional al número de células vivas en el ensayo. Además, se restó la longitud de onda de referencia de 630 nm a las muestras, debido a que ésta respuesta puede ser el resultado de la interferencia química de ciertos compuestos con reacciones de reducción de tetrazolio. Los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se analizaron por ANOVA de una vía.

3.8 ENSAYOS DE INTERNALIZACIÓN DE LAS NPMs EN LAS RBMECs.

Preparación de las células para su análisis por TEM.

Para determinar el tipo de interacción que ocurre entre las NPMs y las células endoteliales, las rBMECs fueron cultivadas en la cámara apical de un sistema Transwell®. Brevemente, para el proceso de preparación de la muestra con un protocolo modificado de ⁸⁴ las células fueron sembradas en una densidad de (5×10^6) células/pozo) en la cámara apical de placas Transwell de 6 pozos con membrana de poliéster y tamaño de poro de $0.45 \mu\text{m}$. Los insertos fueron recubiertos previamente con una matriz de fibronectina al 10%. En la cámara basolateral del sistema Transwell se adicionaron 3 mL de ECM para mantener el cultivo en condiciones adecuadas de humedad y nutrientes tal como la muestra la figura 14.

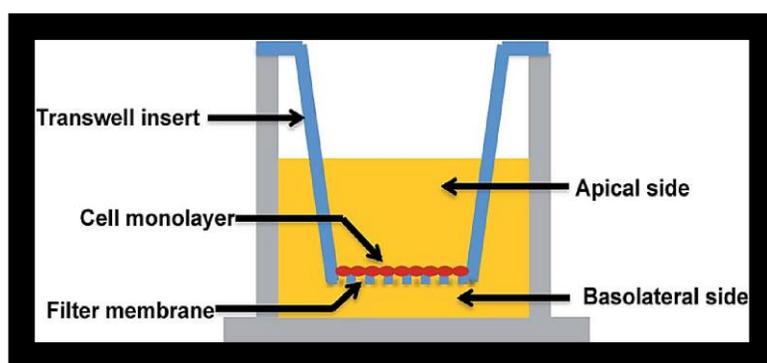


Figura 14. Representación de un modelo de barrera biológica in vitro basado en Transwell (Dong, et. al., 2015).

La placa fue llevada a incubación bajo las condiciones anteriormente señaladas durante 24h, donde el cultivo no fue manipulado para asegurar la formación de la monocapa en la membrana. Subsiguientemente se realizó el cambio de medio ECM cada 4 días hasta llegar al 100% de confluencia (5-6 días), posterior a este período las células permanecieron 48 h más en incubación para la formación de uniones estrechas (Fig.15). Posteriormente se realizó un cambio de medio ECM a cultivo DMEM alta glucosa, HEPES, libre de indicador rojo fenol (Dulbecco's modified Eagle's medium) con el estímulo, el cual consta de diferentes concentraciones de NPMs (5 y $40 \mu\text{g/mL}$) manteniendo un tiempo de exposición con las NPs de 24 h. El grupo control consistió en células mantenidas en medio de cultivo DMEM y no tratadas. Para un mejor análisis de imagen, es importante eliminar las NPs y soluciones de ambas cámaras de cada Transwell antes de realizar la fijación, por lo que

después de la incubación, las células se lavaron completamente con PBS y se fijaron con glutaraldehído al 4% en PBS a 4°C durante 23 h. Posteriormente se lavaron con buffer PBS y se añadió 1% de tetróxido de osmio (OsO_4) a la monocapa celular durante 1 hora, agregando 0.5 ml y 1.5 ml a la cámara apical y basolateral respectivamente. Después de la eliminación de OsO_4 , el tampón de fosfato Sorensen se aplicó para lavar durante 10 min, siguiendo así la deshidratación de las monocapas celulares con etanol en diferentes tiempos de inmersión y concentraciones: 30, 50, 70, 90 y 100%. Seguido de la deshidratación, las monocapas se embebieron con una mezcla de epoxi resina (Spurr) y etanol (1:1 v/v) durante 1 hora, seguido de 2 horas en resina epoxi completa al 100% para su incrustación a 37°C que posteriormente se reemplazó por resina fresca para ser polimerizada a 65°C durante 24h. Se cortaron secciones ultrafinas de los bloques celulares (70-80 nm), obteniéndose secciones integrales que se obtuvieron como trapezoidales. Para el montaje de secciones, se emplearon rejillas de cobre de 3.05 mm de diámetro que a continuación se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se observaron con un microscopio electrónico TEM, JEOL 200 CX, Lanbama, IPICyT.

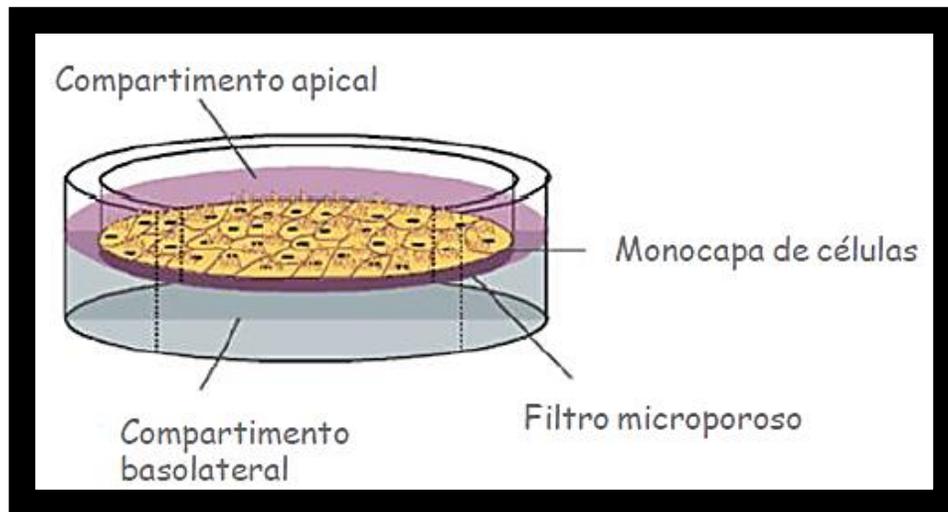


Figura 15. Esquema de una monocapa celular en un soporte permeable para propiciar la formación de uniones estrechas. (Tomado de Clemente,2007)

Análisis de la interacción de las NPs con las rBMECs mediante TEM utilizando el sistema Transwell®

El microscopio electrónico de transmisión fue operado a 100 kV. Antes de encender el instrumento, se preparó nitrógeno líquido con el fin de equilibrar la temperatura de la cámara de la columna de electrones. Así mismo se alinearon sucesivamente la apertura del condensador, apertura del objetivo, lente objetivo, y el haz de electrones. Las rejillas se cargaron primero en el receso circular de la punta del portamuestras y se insertaron en la cámara de la pistola de electrones. Finalmente para la adquisición de imágenes, los objetos de interés se fotografiaron a niveles de aumento más altos con el fin de ilustrar las características morfológicas de las muestras en diferentes campos de visión.

Determinación de la capacidad de transitis de las NPs a través de la monocapa de rBMECs: *Técnica de plasma de acoplamiento inductivo (ICP) con espectrofotómetro de emisión óptica (OES).*

Debido a que se pretende analizar el mecanismo que valga como ruta a las NPMs para ingresar al SNC mediante BHE, cabe la posibilidad de que éstas NPs atraviesen la monocapa, la cual actúa en éste análisis como modelo de la BHE. Es por ello que su determinación es imprescindible en secciones donde éstas NPs no fueron situadas en primera instancia, como es el medio de cultivo DMEM de la cámara basal cuando se lleva a cabo su exposición en la monocapa. La técnica propuesta para realizar este proceso es a partir de un Espectrofotómetro de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) *Modelo 738 Marca Varian*, la cual puede determinar cantidades de elementos presentes en el medio en un rango de concentraciones de partes por billón (ppb).

En esta técnica, la introducción continua de la muestra líquida y un sistema de nebulización forma un aerosol que es transportado por el Argón a la antorcha del plasma, acoplado inductivamente por radio frecuencia. En el plasma, debido las altas temperaturas generadas, el medio de cultivo es atomizado e ionizado generándose los espectros de emisión atómicos de líneas características los cuales son dispersados por la red de difracción y el detector sensible a la luz mide las intensidades de las líneas cuya información es procesada por el sistema informático.

Para la preparación de la muestra en ICP, se tomó una pequeña alícuota de medio de cultivo DMEM (0.5 mL) perteneciente al adiciónado en la cámara basal del modelo BHE tanto de los ensayos con tratamiento como de los blancos. Posteriormente el analito fue digerido para obtención del Fe mediante una solución de H₂SO₄ al 2% (10 mL).

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL

Difracción de Rayos X (DRX)

La estructura cristalina de las NPMs de Fe_3O_4 con y sin recubrimiento se caracterizó por difracción de rayos X. En los patrones de difracción obtenidos se determinó que el polvo del analito está compuesto por dos fases diferentes: magnetita y maghemita (Figura 16a y 16b), las líneas verticales corresponden a las posiciones reportadas en los datos de JSCD (99-0073) y (39-1346) correspondientes a magnetita (Fe_3O_4) y maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) respectivamente. Los analitos muestran un buen ajuste con los valores de espaciado d en la red cristalina de picos significativos. El difractograma de la forma cúbica de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ es semejante al de Fe_3O_4 con algún cambio de línea hacia ángulos más altos.⁸⁵ Los picos de difracción pertenecientes a Fe_3O_4 en 2θ son: 18.29, 30.07, 35.42, 37.05, 43.05, 53.45, 56.93 y 62.52, los cuales corresponden a los planos (111), (220), (311), (222), (400), (422), (511) y (440), respectivamente. Mientras que para la $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ se obtiene un buen ajuste con los picos en 18.37, 30.22, 35.60, 37.24, 43.27, 53.69, 57.23 y 62.57 que dan correspondencia a los planos (111), (220), (311), (222), (400), (422), (511) y (440) indicando para ambas fases un óxido estructurado cúbico de tipo espinela.⁸⁶ Así mismo, para determinar el porcentaje de cada fase presente en el material se llevó a cabo por refinamiento de Rietveld, obteniendo que Fe_3O_4 se encuentra en mayor proporción con respecto a $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ en ambas muestras (Tabla 1). La inestabilidad intrínseca de las NPs de Fe_3O_4 , las cuales al entrar en contacto con el aire o al encontrarse inmersas en un medio acuoso tienden a oxidarse con mayor facilidad, llevando a cabo su transformación a fase maghemita. En la muestra cuya superficie fue modificada, se considera que hay poco efecto del recubrimiento de SiO_2 en la estructura cristalina de la Fe_3O_4 debido a que en la determinación de su respectivo patrón de difracción se realizó mediante ángulos por encima de los 15 grados y la aparición de picos significativos para SiO_2 ocurre en 23.35, por lo que para su completa detección era necesario llevar a cabo su análisis a bajos ángulos, siendo ésta característica en los resultados obtenidos una limitante para la determinación de picos significativos en la muestra mediante la técnica convencional (Fig. 16a). Finalmente, el tamaño de cristal para Fe_3O_4 y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ adquirió un valor de 15

nm, por lo que se considera que no hay un cambio en el tamaño del cristal en Fe_3O_4 independientemente de si presenta o no un recubrimiento (Tabla 2).⁸⁶ Este resultado que guarda relación con los espectros reportados, dado que para llevar a cabo el recubrimiento con SiO_2 se emplean los mismos núcleos de Fe_3O_4 , por lo tanto el tamaño del cristal para la Fe_3O_4 no resulta modificado.

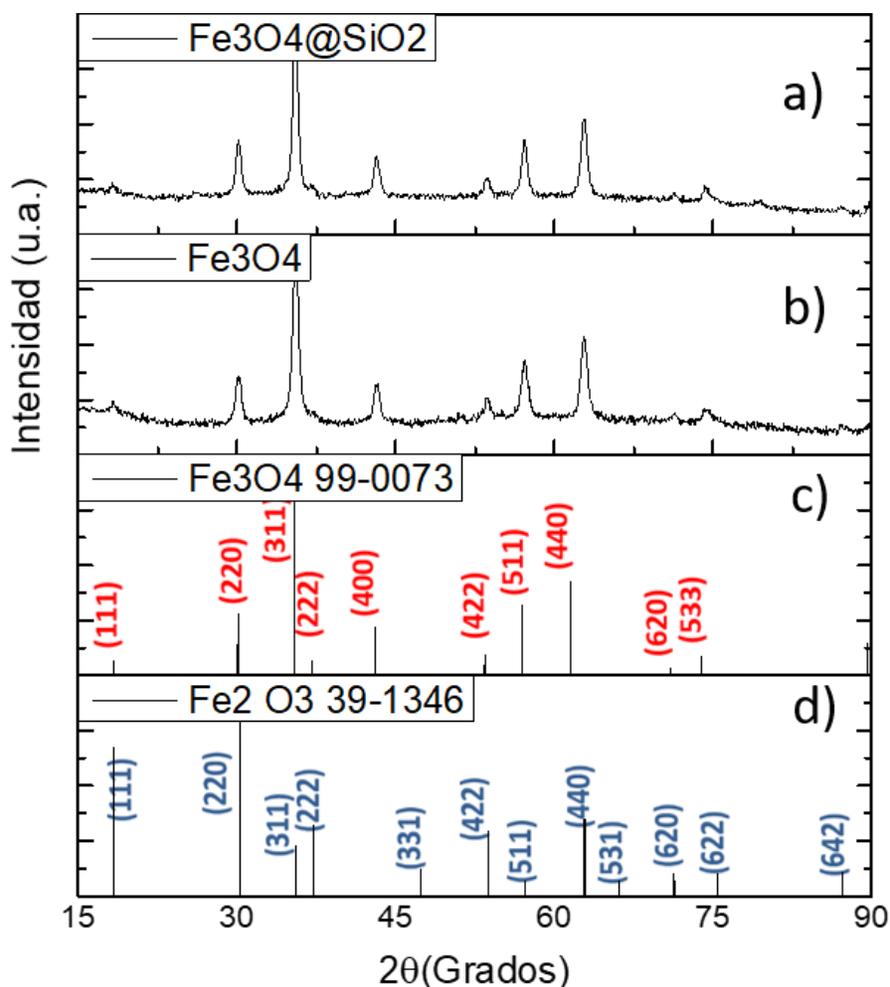


Figura 16. Patrones de DRX de (a) Fe_3O_4 y (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ analizados por tamaño y comparados con las tarjetas (c) JCPDS 99-0073 y (d) JCPDS 39-1346 para Fe_3O_4 y Fe_2O_3 respectivamente. La adición de revestimiento en $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2$ no alteró el patrón de difracción. Los respectivos índices de Miller de cada pico se representan entre paréntesis.

Tabla 1. Porcentajes obtenidos por refinamiento de Rietveld de las fases identificadas en Fe_3O_4 y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$.

Muestra	Fe_3O_4	$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$
Fe_3O_4	97.2%	2.8%
$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$	95.6%	4.4%

La conversión de magnetita a maghemita es usual en la naturaleza, por ser estas dos fuentes minerales de hierro abundantes en la tierra. En casi todos los tipos de rocas donde se producen óxidos de hierro, la sustitución mutua de magnetita y maghemita se lleva a cabo a través de reacciones redox (reducción-oxidación) y reacciones hidrotérmicas en medios acuosos. Fe_2O_3 contiene tan solo hierro con un estado de oxidación Fe^{3+} (férrico) lo que la hace estable ante la presencia de oxígeno, pero se reduce a magnetita en presencia de hidrogeno o materia orgánica. Por su parte la magnetita contiene hierro en dos estados de oxidación Fe^{3+} y Fe^{2+} (férrico y ferroso) siendo más inestable en presencia de oxígeno, produciendo su transformación a través de una reacción de oxidación a maghemita.⁸⁷

Espectroscopía Raman

La espectroscopía Raman ha surgido como una herramienta versátil para la caracterización de nanoestructuras de óxido, especialmente cuando no se puede confirmar la formación de una fase particular tras el análisis semicuantitativo por medio de difracción de rayos X, o bien para corroborar que dicha información es auténtica, como es el caso de las fases presentes en las muestras de este proyecto.

En los resultados obtenidos por espectroscopía Raman para las NPMs, puede observarse en la Figura 17a una banda intensa a $\sim 650 \text{ cm}^{-1}$, la cual puede atribuirse al modo de vibración A_{1g} de estiramiento simétrico de átomos de oxígeno a lo largo del enlace Fe-O el cual es correspondiente a la fase Fe_3O_4 .^{87,88} De acuerdo a las otras señales presentes en los espectros, diversas investigaciones señalan que las bandas localizadas alrededor de $717 (A_{1g})$, $520 (T_{2g})$ y $357 (E_g) \text{ cm}^{-1}$ son asociadas con $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.⁸⁶ Por lo tanto, las NPs están compuestas por fases de magnetita y de maghemita, resultado con el cual se puede confirmar la presencia de dichas fases en esta caracterización tal como se había expuesto previamente por difracción de rayos X. Sin embargo, se desconoce si la maghemita se encuentra presente debido a un proceso de oxidación posterior a la síntesis de las NPs o bien si esta fase forma parte desde el proceso de coprecipitación. Adicionalmente para la muestra de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$, se confirma al igual que en los patrones de difracción que la cantidad de recubrimiento no es lo bastante significativa como para generar la aparición de bandas características pertenecientes a SiO_2 , por lo que únicamente se observa un ligero desplazamiento posicional de las bandas anteriormente señaladas tanto para Fe_3O_4 como para $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (Figura 17 b).

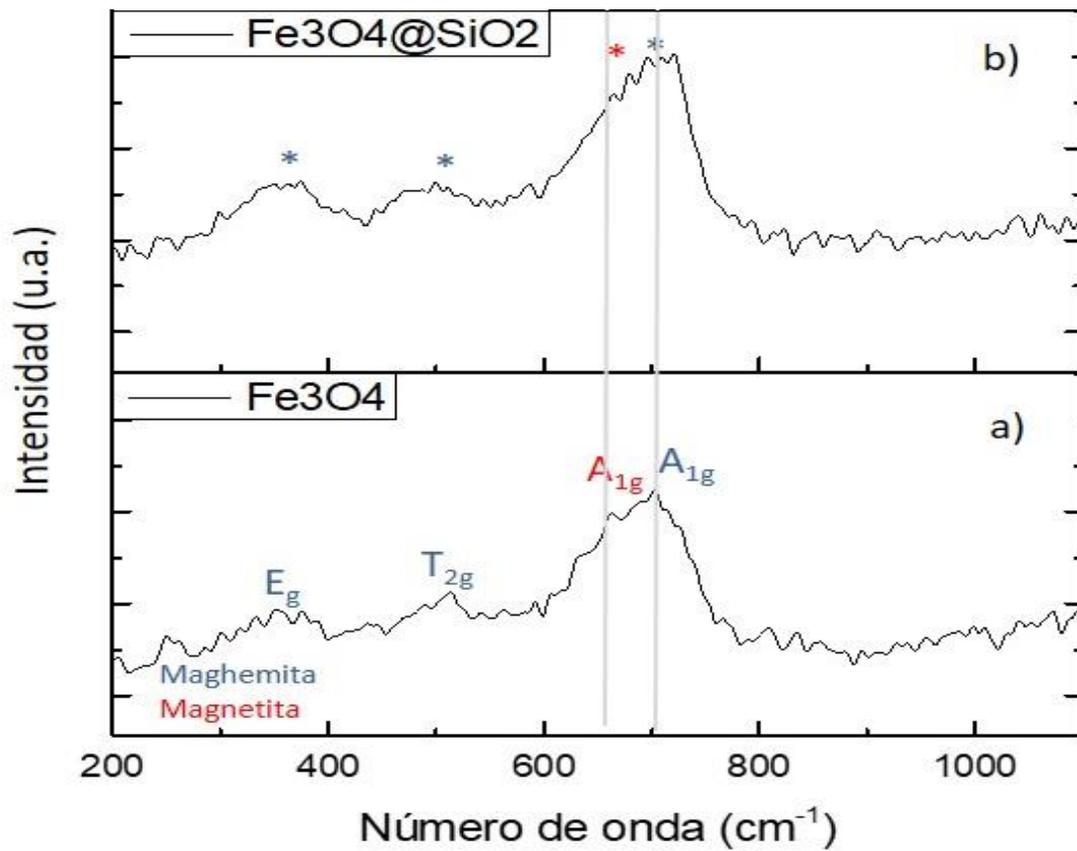


Figura 17. Espectroscopía Raman de (a) Fe_3O_4 y (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2$. De forma similar a DRX, las bandas encontradas en Raman a $\sim 650 \text{ cm}^{-1}$ se refieren a Fe_3O_4 y aproximadamente a 717 (A_{1g}), 520 (T_{2g}) y 357 (E_g) cm^{-1} que pertenecen a Fe_2O_3 .

4.2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

Microscopía Electrónica de barrido (SEM) y Microscopía Electrónica de Transmisión

Se tomaron imágenes de las muestras con el fin de evaluar la morfología, dispersión y homogeneidad del material particulado y disperso en las rejillas de Cu para su visualización. En la figura 18 se observan micrografías de la magnetita en polvo sin recubrimiento mediante ambas técnicas de caracterización morfológica, empleando una perspectiva general mediante la caracterización por SEM (18a), mientras que para determinar las características del material con mayor detalle fueron analizadas mediante TEM (18b y 18c). Para la relación molar empleada se aprecian como productos nanopartículas de un diámetro alrededor de $8.45 \text{ nm} \pm 0.14$ en caracterización en TEM, los cuales poseen una forma euhedral manteniendo una relación de aspecto mostrado en 18b, estos resultados concuerdan con la descripción del material encontrado en el trabajo de Maher *et al.*¹, por lo que pueden ser consideradas como NPs viables para su evaluación toxicológica e internalización. Así mismo, de manera visual es posible determinar si la muestra es morfológicamente homogénea mediante su periodicidad. La micrografía obtenida en modo STEM (18c) muestra la resolución atómica donde se puede observar el arreglo cristalino de las NPs. Los espaciamentos interplanares cuyos valores son 4.957 y 2.971 Å corresponden a las distancias interplanares de las familias de planos {111} y {220} de Fe_3O_4 (JCPDS 99-0073).

De igual manera para $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ su caracterización se llevó a cabo mediante ambas técnicas de caracterización morfológica empleando una perspectiva general mediante la caracterización por SEM (19a) y para observar las características del material con mayor detalle se observan en TEM (19b y 19c) donde las nanopartículas obtenidas presentaron un diámetro promedio en TEM de $14.33 \text{ nm} \pm 0.12$, especulándose que el incremento de tamaño se deba al recubrimiento empleado (Fig.19b y 19d). Además, en su periferia presentan una morfología que se aproxima a un tipo de grano semiesférico de forma irregular.

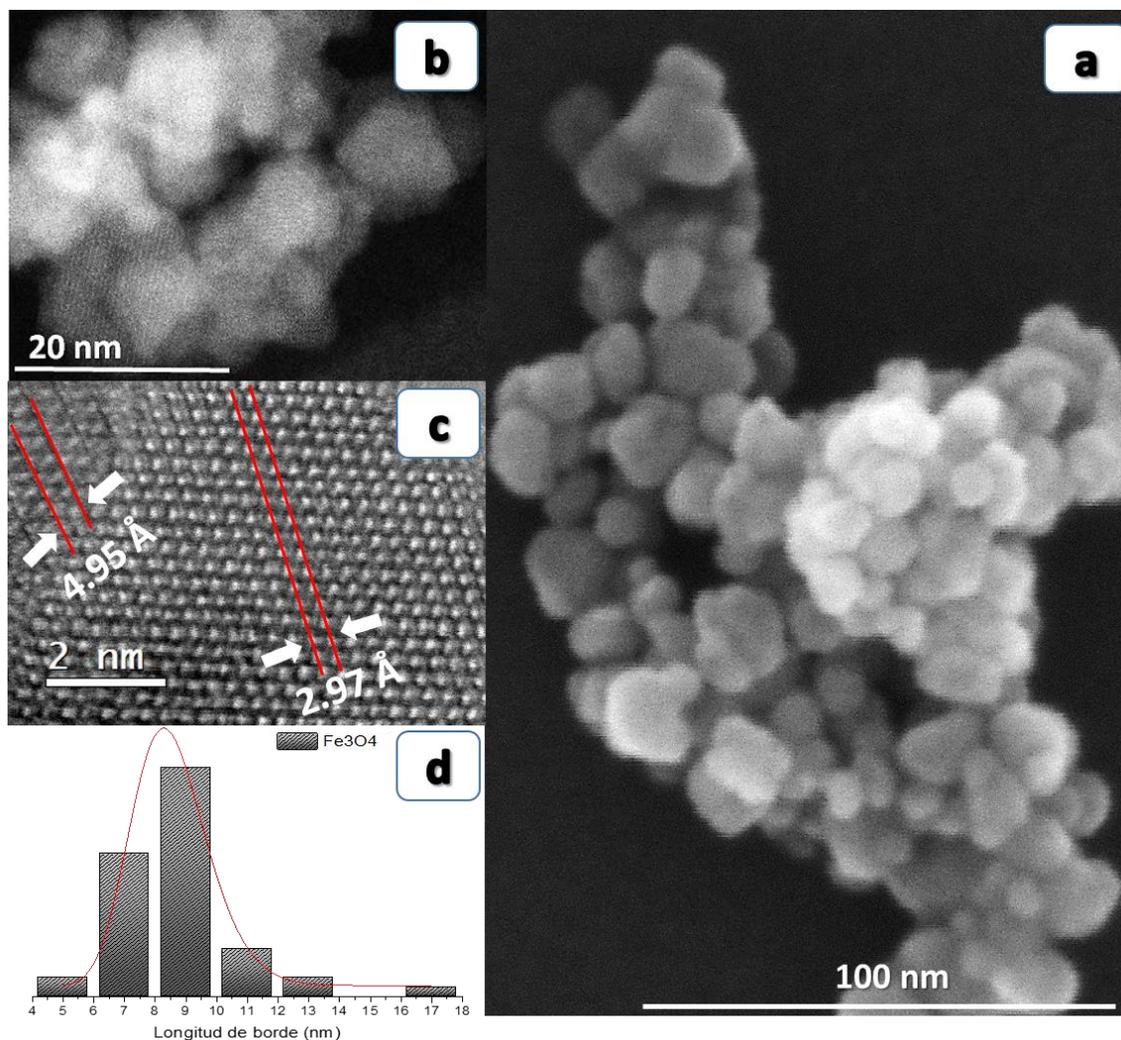


Figura 18. Micrografías electrónicas de transmisión y barrido de muestras de Fe_3O_4 , que identifican un tipo de morfología de partículas angulares de tipo euédral (partículas de “a” se muestran con mayor aumento en “b”). c) Amplificación de NPs realizada mediante STEM. La imagen muestra el arreglo atómico, donde se señalan los espacios interplanares de 4.95 y 2.97 Å, correspondientes a los planos {111} y {220} de Fe_3O_4 . d) histograma de distribución de tamaño promedio $8.45 \text{ nm} \pm 0.1$ ajustado a una distribución

Por otra parte, mediante la técnica de Contraste Z se observa en la figura 19c una zona más brillante en la micrografía, que de acuerdo a la resolución empleada así como el tamaño promedio que poseen las NPs recubiertas, es correspondiente al núcleo de Fe_3O_4 , ya que presenta un mayor número atómico en comparación con el SiO_2 , por lo que puede corroborarse que las NPs de Fe_3O_4 se encuentran recubiertas con SiO_2 .

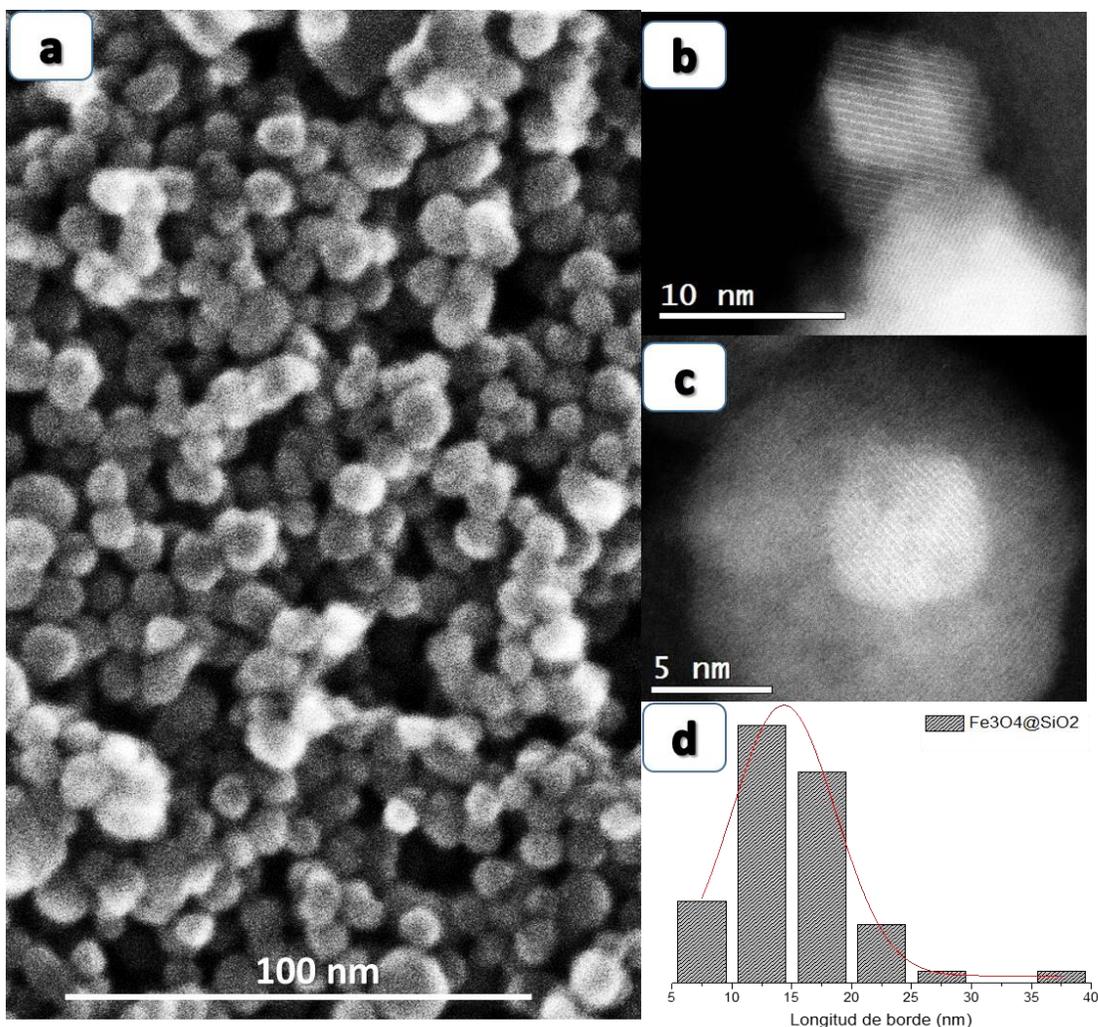


Figura 19. Micrografías electrónicas de transmisión y barrido de muestras de $Fe_3O_4@SiO_2$, que identifican un tipo de morfología de partículas semiesféricas (partículas de “a” se muestran con mayor aumento en “b”). c) Micrografía de NPs realizada mediante TEM bajo la técnica de contraste Z, el cual depende directamente del número atómico. d) histograma de distribución de tamaño $14.33\text{nm} \pm 0.12$ ajustado a una distribución logarítmica normal (línea roja).

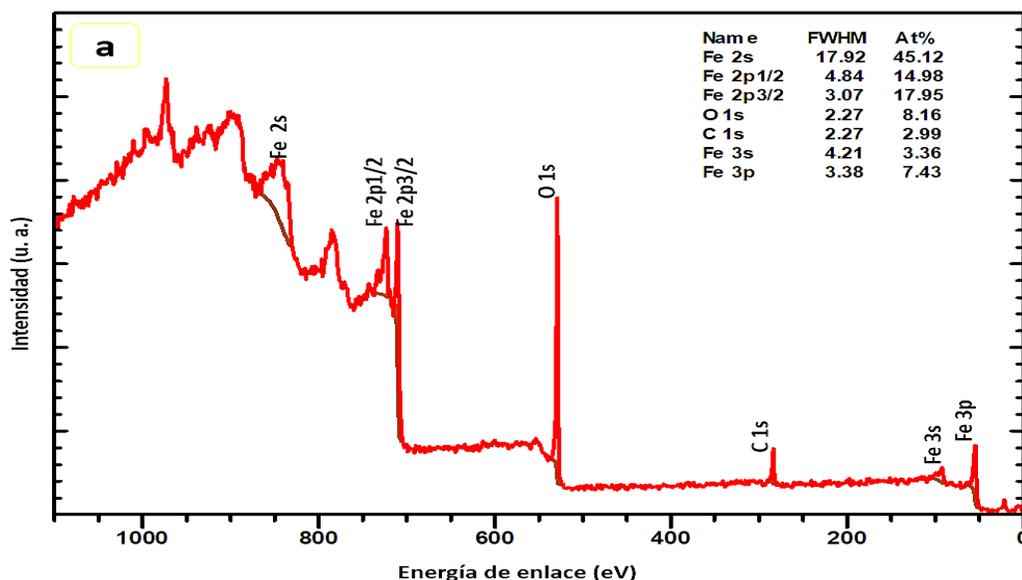
Tabla 2. Valores obtenidos para la determinación del diámetro (en nm) de las NPs a partir de TEM, SEM y DRX correspondientes a (a) Fe_3O_4 y (b) $Fe_3O_4@SiO_2$.

Muestra	Técnica de análisis		
	TEM	SEM	DRX
Fe_3O_4	8.45 ± 0.14	11.41 ± 0.17	15.04 ± 0.01
$Fe_3O_4@SiO_2$	14.33 ± 0.12	17.53 ± 0.17	

4.3 CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL

Espectroscopía de Fotoelectrones emitidos por Rayos X (XPS)

Mediante bases de datos como *NIST XPS*, *Thermo Scientific XPS®* y *CasaXPS®*, el análisis de composición de superficie mediante un espectro de inspección en ambos analitos de Fe_3O_4 y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ (Fig. 20a y 20b) evidenció claramente la presencia de picos característicos correspondientes a Fe_3O_4 , que posteriormente mediante alta resolución se determinó que son asociados a $\text{Fe} (2p^{3/2})$ en 711.76 eV y $\text{Fe} (2p^{1/2})$ a 725.3 eV. Adicionalmente en el mismo análisis se determinó la aparición de picos satélites, los cuales fueron atribuidos a $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, indicando que una parte de la muestra se encontraba oxidada (Fig. 20c).⁸⁹ Sin embargo, debido a que en este análisis únicamente los picos satélites hace evidente la presencia de esta fase en el espécimen, se presume que tal fase puede encontrarse en la superficie de las partículas, puesto que la cantidad hallada tanto en esta caracterización como en difracción de rayos X no supone una concentración mayor, por lo tanto es posible que no se encuentre inmersa en la estructura de la nanopartícula, lo cual se confirma a su vez mediante STEM donde se observa una homogeneidad y periodicidad en los átomos de la nanopartícula. Finalmente, para confirmar la presencia de SiO_2 en la muestra de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$, se logró determinar un pico característico a partir de la curva de Si 2p (Fig. 20d) obtenida del compuesto en la posición de 102.06 eV y una contribución significativa de O 1s (Fig. 20e) donde pueden observarse dos bandas en 530.31 eV siendo atribuida a enlaces OH y en 532.12, adjudicada a enlaces Si-O.⁹⁰ Los cuales a su vez confirman la presencia de SiO_2 en la superficie, tal como puede observarse en las micrografías mostradas previamente.



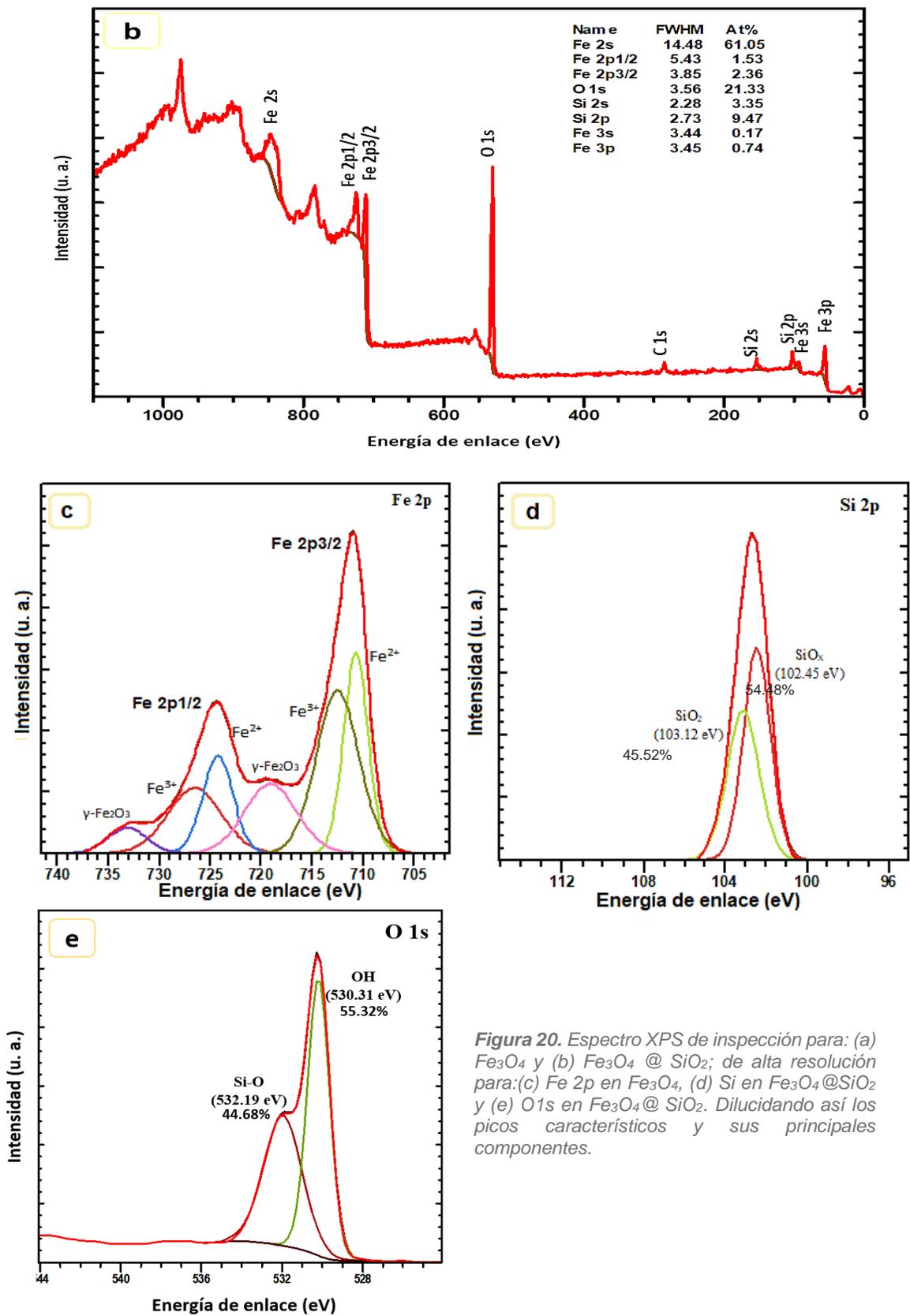


Figura 20. Espectro XPS de inspección para: (a) Fe_3O_4 y (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2$; de alta resolución para: (c) Fe 2p en Fe_3O_4 , (d) Si en $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2$ y (e) O 1s en $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2$. Dilucidando así los picos característicos y sus principales componentes.

Potencial Z

Las nanopartículas tienen una carga superficial que atrae a una delgada capa de iones de carga opuesta a la superficie de las nanopartículas. Esta doble capa de iones viaja con la nanopartícula a medida que se difunde a lo largo de la solución. Por lo tanto, es plausible que la química de la superficie de las nanopartículas representa un papel fundamental en la captación celular ya que es la interfaz con el sistema biológico. Las nanopartículas con un potencial zeta entre -10 y +10 mV se consideran aproximadamente neutras, mientras que las aquellas con potenciales zeta superiores a +30 mV o inferiores a -30 mV se consideran fuertemente catiónicas y fuertemente aniónicas respectivamente, las cuales poseen alto grado de estabilidad.⁹¹

Tabla 3. Valores obtenidos en DLS de potencial Z para concentraciones de 100, 40 y 15 $\mu\text{g/mL}$ correspondientes a NPs de Fe_3O_4 y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$.

NP	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Potencial Z (mV) (Media \pm DS)
Fe_3O_4	100	-6.01 \pm 0.16
	40	-7.24 \pm 0.99
	15	-11.70 \pm 0.70
$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$	100	-13.60 \pm 0.90
	40	-10.33 \pm 0.31
	15	-5.24 \pm 0.13

Los resultados en el caso de las NPs de Fe_3O_4 muestran una disminución del potencial con relación al incremento de su concentración, ésta tendencia puede deberse a que su valor se encuentra en el rango de potencial Z de neutralidad por lo que eventualmente se formarán agregados debido a las fuerzas Van Der Waals entre partículas⁹¹ así como a su inestabilidad química la cual también se hace presente en medios acuosos. No obstante para las NPs de Fe_3O_4 recubiertas con SiO_2 el valor de su potencial se incrementa en proporción a su concentración, lo cual sugiere que podría deberse a la cantidad de O_2 presente en la superficie del recubrimiento, el cual al tratarse de un elemento más electronegativo en comparación del silicio, éste genere mayor electronegatividad en el potencial. Así mismo, la modificación superficial en estas NPs permite que las fuerzas atractivas de Van Der Waals se supriman, por lo tanto es posible que la formación de agregados sea menor en comparación a las NPs de Fe_3O_4 desnudas, por lo que podría favorecer al incremento de NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ internalizadas cuando éstas interactúan en un sistema biológico.

4.4 CARACTERIZACIÓN MAGNÉTICA

Sistema de Medición de Propiedades Físicas (PPMS)

Como se ha mencionado anteriormente, las nanopartículas magnéticas son aquellas que pueden ser manipuladas bajo la influencia de un campo magnético externo, por lo que las muestras fueron sometidas a pruebas de magnetización a temperatura constante frente un campo magnético aplicado. Estas pruebas permitieron determinar si existe una variación en las propiedades del material, como la magnetización de saturación (M_s), la magnetización remanente (M_R), el campo coercitivo (H_c) y la susceptibilidad magnética (χ) respecto a la concentración de magnetita en las muestras y la interacción entre las partículas. Las propiedades magnéticas de las muestras de óxido de hierro dependen en gran medida del tamaño, la morfología, el contenido y la metodología de la síntesis,⁹² sin embargo para la Fe_3O_4 dentro de sus propiedades magnéticas características se encuentra la magnetización de saturación a temperatura ambiente (84 emu g^{-1}).

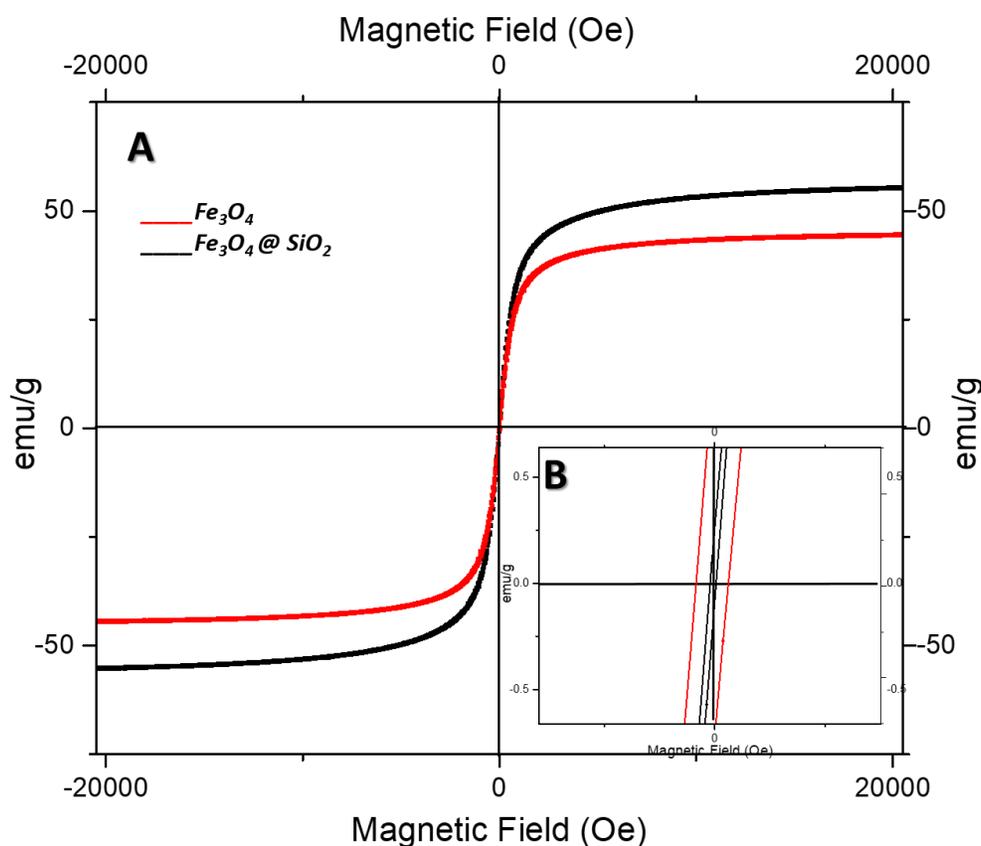


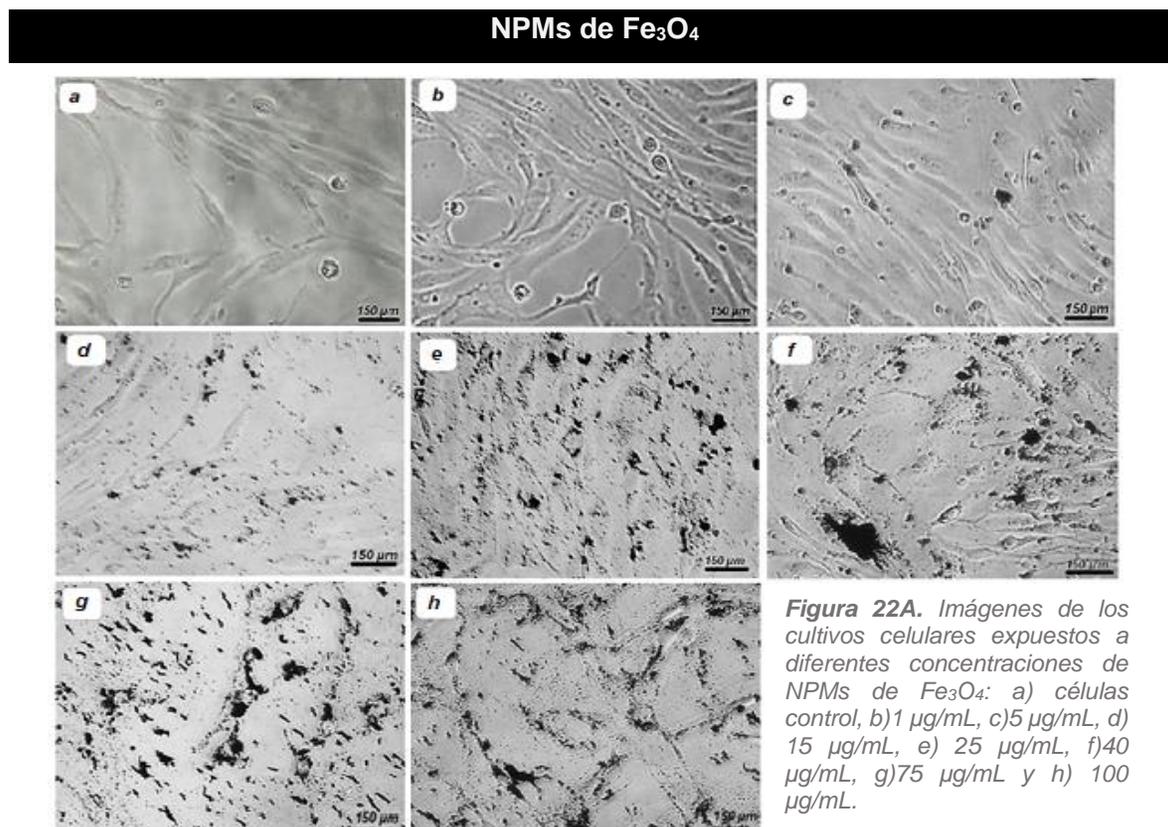
Figura 21. A) Curvas de magnetización para Fe_3O_4 (en rojo) y $Fe_3O_4 @ SiO_2$ (en negro) a 300K, ambas con aumento en "B".

De acuerdo a los resultados obtenidos en la caracterización magnética, puede observarse que las NPs de Fe_3O_4 recubiertas con SiO_2 presentan susceptibilidad magnética (55.7 emu g^{-1}) respecto al campo aplicado la cual en comparación con aquellas NPs sin recubrimiento (44.6 emu g^{-1}) es mayor (Fig. 21). Este comportamiento puede atribuirse a que las NPs de óxido de hierro sin recubrimiento presentan mayor inestabilidad intrínseca que puede presentarse a lo largo del tiempo, ya que son más activas químicamente y tienden a oxidarse fácilmente en $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ bajo condiciones ambientales, produciendo así una pérdida de magnetismo. No obstante se logró identificar para ambas muestras la presencia de propiedades superparamagnéticas debido a que consiguieron desmagnetizarse de manera espontánea en ausencia de un campo aplicado aun cuando previamente se encontraban en un estado saturado, por lo que presentan un valor de H_c y M_R de 0, no presentando además un lazo de histéresis en ambos analitos. Dichos atributos les son conferidos a partículas SPION (nanopartículas de hierro superparamagnéticas), las cuales son un subtipo de nanopartículas magnéticas altamente magnetizables y que poseen un núcleo de partículas de óxido de hierro compuesto de magnetita (Fe_3O_4) y maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$).⁹³

4.5 EVALUACIÓN DEL POTENCIAL TÓXICO DE LAS NPs DE Fe_3O_4 SOBRE LAS CÉLULAS DEL ENDOTELIO MICROVASCULAR DEL CEREBRO:

Análisis morfológico.

Para evaluar de manera general el efecto citotóxico de las NPMs sobre las rBMECs, una densidad de 6×10^3 células fueron cultivadas en placas de 95 pozos en medio ECM y posteriormente fueron expuestas por triplicado a diversas concentraciones de NPs ($1-100 \mu\text{g/mL}$) de Fe_3O_4 y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ por separado, cuyo número de NPs en tales concentraciones correspondió a un estimado de 1×10^{13} a 1×10^{11} NPs/mL (Anexo 1) en medio de cultivo DMEM libre de indicador rojo fenol. Tras 24 h de incubación, los posibles cambios en la morfología de las rBMECs fueron registrados con una cámara digital unida a un invertoscopio Nikon, donde puede determinarse el deterioro de las células con relación a la concentración de NPs de Fe_3O_4 (Fig. 22A) y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ (Fig. 22B) en exposición, siendo más evidente en concentraciones 75 y $100 \mu\text{g/mL}$ donde las células se observan con pérdida de su constitución estructural así como mayor formación de aglomerados de NPs. Cien microlitros del sobrenadante de cada uno de los pozos fue utilizado para realizar el ensayo de LDH. Por otro lado, a los cultivos celulares se les realizó el ensayo de MTS, cuyos resultados se describen más adelante.



NPMs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$

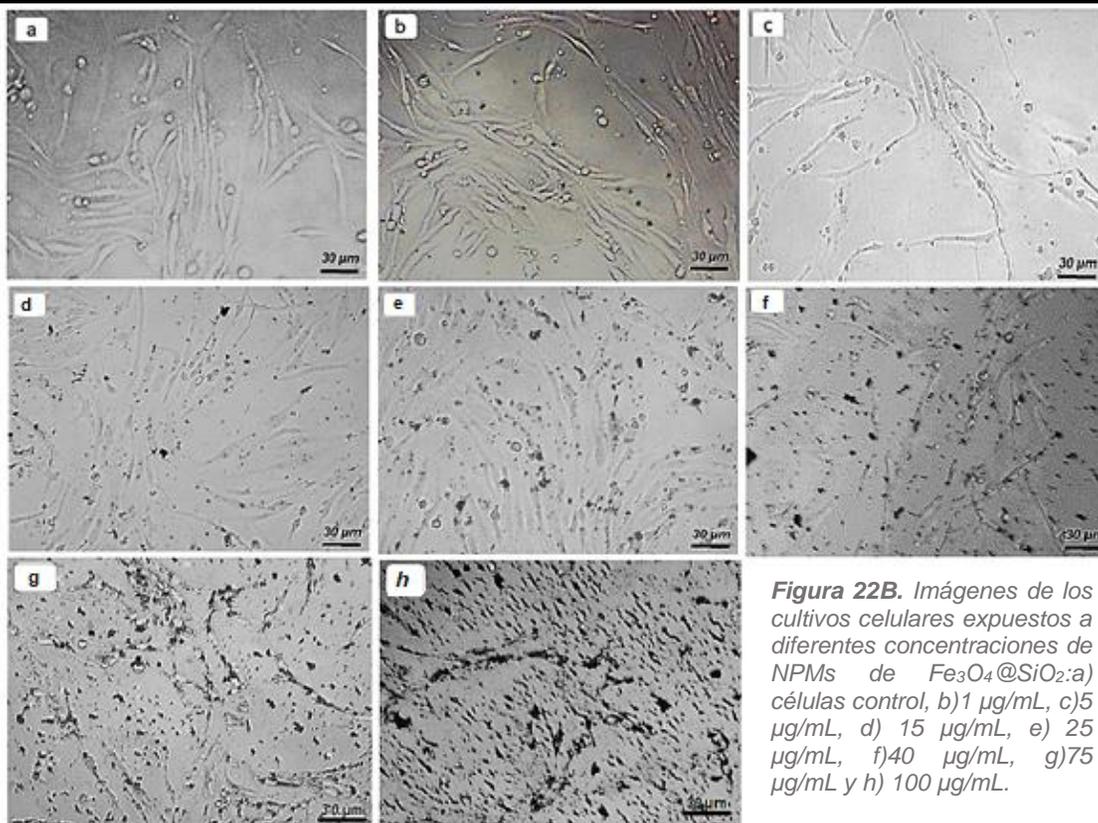


Figura 22B. Imágenes de los cultivos celulares expuestos a diferentes concentraciones de NPMs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$: a) células control, b) 1 µg/mL, c) 5 µg/mL, d) 15 µg/mL, e) 25 µg/mL, f) 40 µg/mL, g) 75 µg/mL y h) 100 µg/mL.

Determinación del efecto de las NPs sobre la integridad de la membrana mediante la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH)

En relación a los análisis para la determinación de la toxicidad empleando cultivos celulares a diferentes concentraciones de NPs se conoce que las células de diferente origen reaccionan de forma distinta después de su exposición; siendo este fenómeno conocido como "visión celular". Demostrando así que las células cerebrales son bastante sensibles a NPMs en comparación con células cardíacas y del hígado.^{94,95} En ensayos previos con fines experimentales de liberación de fármacos, no se revelaron signos de pérdida de viabilidad de las células epiteliales carunculares bovinas (BCEC) después de haber sido incubados durante 24 horas con diversas concentraciones de NPs modificadas superficialmente y en presencia de una fuerza magnética (35, 70 y 140 µg/ml).⁵³ Sin embargo el presente estudio evidenció un efecto tóxico sobre las células rBMEC posterior a las de 24 horas de incubación con NPs sin estabilización.

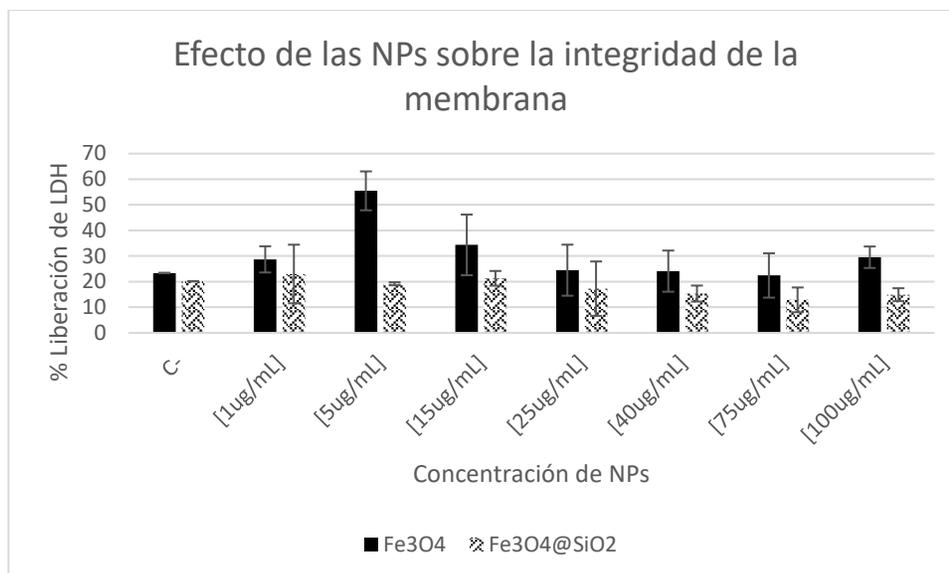


Figura 23. Efecto de diferentes concentraciones de NPMs (1-100 µg/mL) sobre la liberación de LDH en células rBMEC. Resultados presentados como media ± DS (n=4).

Con respecto a los datos presentados en los tratamientos con NPs de Fe₃O₄, en la Figura 23 los cuales fueron analizados estadísticamente, éstos no presentaron diferencias significativas respecto al control ($p < 0.05$). Sin embargo, visiblemente puede constatar que se produjo un aumento de liberación de LDH en los ensayos cuya concentración de las NPs es más baja (5 y 15 µg/mL). Concretamente, se observó que el ensayo de 5 µg/mL tuvo un incremento aproximado del 30% de liberación de LDH con respecto al control. Este comportamiento puede deberse a que las células posiblemente se encuentren deterioradas debido a la inestabilidad de las NPs, alterando de esta manera la continuidad de su membrana y ocasionando que exista una mayor liberación de LDH al medio. En concentraciones más altas, su comportamiento puede asociarse con la cantidad de NPs adicionadas, en las cuales al incrementar en número también aumentan la posibilidad de generar aglomerados con mayor volumen, dificultando su ingreso al interior de la célula. Adicionalmente, se sugiere que las NPs afectan la actividad de la LDH por lo tanto no le es posible llevar a cabo su reacción catalítica adecuadamente.

Para las NPs con SiO₂ se observa que el porcentaje de liberación de LDH no posee una variabilidad significativa respecto al control, por lo que puede corroborarse que la modificación superficial con SiO₂ en las NPs de Fe₃O₄ no genera una liberación significativa de LDH en el rango de concentraciones analizadas.

Evaluación del metabolismo celular (mitocondrial) mediante ensayos de reducción de MTS

Para este ensayo se estudió el efecto de diferentes concentraciones de NPMs (1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) suspendidas en medio de cultivo DMEM sobre la actividad metabólica de las células rBMEC. Los resultados obtenidos, representados en la Figura 24 muestran diferencias en función de la concentración de NPMs con y sin recubrimiento.

Referente a los resultados puede observarse que la actividad metabólica de las células con tratamiento de NPs de Fe_3O_4 presentan un incremento de la actividad metabólica respecto a la actividad de las células control en la mayoría de los tratamientos cuya concentraciones son pequeñas (5 y 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$), presenciándose una consistencia de resultados respecto a los resultados obtenidos del ensayo de LDH donde a estas concentraciones se observan señales de la actividad de la enzima.

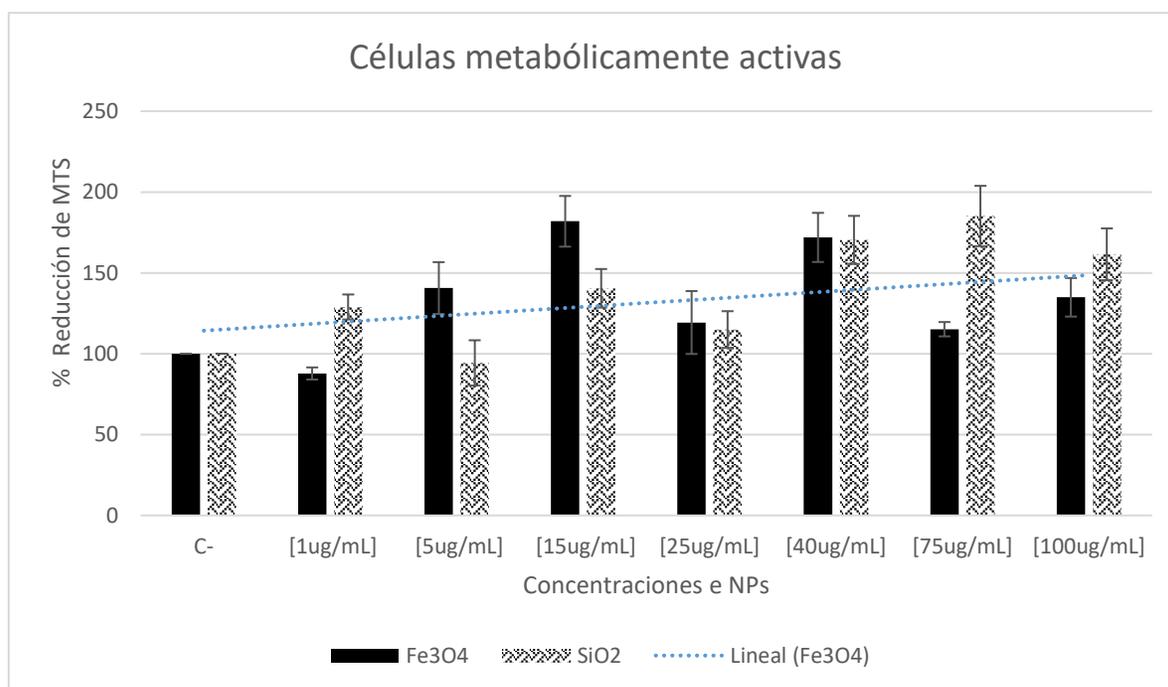


Figura 24. Efecto de diferentes concentraciones de NPMs (1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre la actividad metabólica del compuesto MTS en células rBMEC. Resultados presentados como media \pm DS

De acuerdo al mecanismo del ensayo MTS, ocurre una mayor transformación de la sal de MTS en células sanas, detectando así las células metabólicamente activas por medio de un viraje colorimétrico en el cual la absorbancia determina su comportamiento. Sin embargo, concretamente para éste ensayo tal viraje se hace presente en mayor intensidad

en células bajo tratamiento con NPs. Esta conducta puede deberse a la acción de cinasas,⁹⁶ y principalmente al complejo succinato deshidrogenasa, los cuales se encuentran involucradas en el metabolismo celular, específicamente en el proceso de fosforilación oxidativa en la mitocondria, la cual es encargada de la respiración celular. En consecuencia, las células al encontrarse bajo estrés debido a la acción de las NPs durante su exposición a bajas concentraciones, da lugar a que éstas enzimas modifiquen su función metabólica, generando una mayor transformación de la sal y por ende, una reducción defectuosa del oxígeno durante la fosforilación oxidativa, generando especies reactivas del oxígeno en la matriz mitocondrial⁹⁷ ocasionando así variaciones en su asimilación.

En cultivos celulares expuestos a concentraciones mayores de NPMs (75 y 100 µg/ mL) se observó una disminución del metabolismo mitocondrial, el cual puede deberse a la cantidad de NPs, las cuales al igual en LDH forman aglomerados y por lo tanto la posibilidad de que ingresen a las células es menor.

Contrariamente a los resultados anteriores, para las concentraciones en NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ se observó que la actividad metabólica en cantidades de 5, 15 y 25 µg/ mL no presentaron variación significativa con respecto al control ($p < 0.05$). Sin embargo a mayores concentraciones se observó el aumento en la actividad metabólica mitocondrial donde su respuesta, al igual que en bajas concentraciones de NPs de Fe_3O_4 , puede deberse a que las células llevan a cabo una actividad compensatoria de regulación metabólica por medio de enzimas las cuales alteran dicha acción. Por lo tanto al considerar que las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ poseen una menor toxicidad, cabe la posibilidad de que al inducir concentraciones mayores de éstas en las células se obtengan respuestas comparables con aquellas concentraciones bajas de NPs de Fe_3O_4 debido a la cantidad de NPs en exposición.

4.6 ENSAYOS DE INTERNALIZACIÓN DE LAS NPs EN LAS rBMECS.

Análisis de la interacción de las NPs en rBMEC mediante TEM utilizando el sistema Transwell®

Para estudiar la interacción de las NPMs de Fe_3O_4 y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ con un monocultivo de rBMEC mediante un modelo BHE, éstas fueron incubadas y expuestas a concentraciones de NPs de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 24 horas (Fig.25). Cabe resaltar que se consideraron tales concentraciones debido a que en los ensayos anteriores de potencial tóxico, éstas presentaron una mayor respuesta en el deterioro de la integridad de la membrana celular así como la alteración de su metabolismo, cuyo efecto ha evidenciado el deterioro de las células en concentraciones relativamente bajas.

Los resultados del ensayo de internalización mostraron que la incorporación de las NPMs en el modelo BHE resultaron en la absorción de éstas NPs por parte de las células, donde se especula que pudo llevarse a cabo a través del proceso de endocitosis⁹⁸ debido a la cantidad de invaginaciones que estaban presentes en las membranas de las rBMEC que fueron internalizadas en comparación con las células control. Adicionalmente para los ensayos con NPs de Fe_3O_4 se observó un incremento en la cantidad de membrana correspondiente al retículo endoplásmico liso (Fig. 25c), el cual muy probablemente se asocia a la pérdida de integridad de la membrana celular y la presencia de especies reactivas de oxígeno.⁹⁹

Conjuntamente, en las imágenes obtenidas por TEM, se analizaron las UEs para ambos ensayos, donde en aquellos tratamientos con concentraciones de NPs de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se observó la presencia de tales uniones las cuales se evidencian al presentar mayor contraste en las imágenes (Fig. 25e y 25i). Esto a su vez sugiere que dicho comportamiento es asociado al aumento de proteínas en el área, las cuales al ser expuestas a un incremento en la concentración de NPs, éstas refuerzan dichas uniones lo que da como resultado su dilatación. Sin embargo, no se descarta que las UEs sean un posible acceso de las NPs por estas rutas aún en condiciones reguladas.

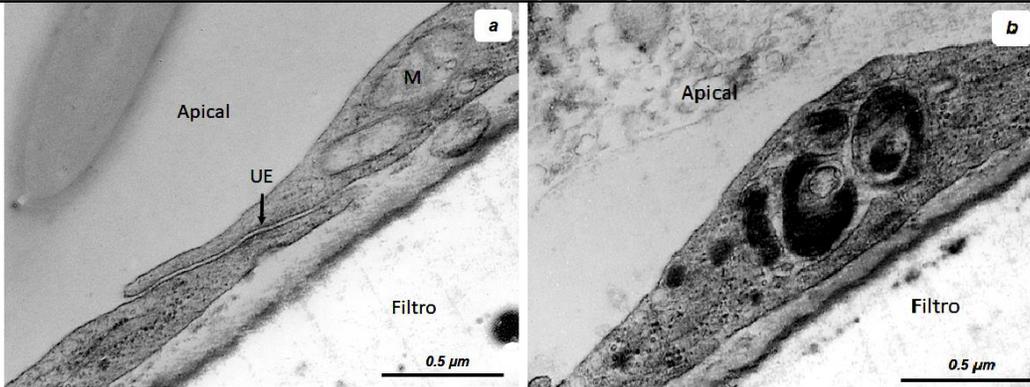
Es de gran importancia destacar que en ensayos previos no se había encontrado evidencia de nanopartículas que lograran atravesar las células sin haber sido sometidas a un imán externo y, por lo tanto, el paso de NPMs a través del monocultivo de rBMEC sin la ayuda de un imán probablemente se deba al transporte transcelular activo dependiente de la energía,¹⁰⁰ donde la célula gasta energía (por ejemplo, en forma de ATP) para mover una sustancia contra su gradiente de concentración. En este plano, estudios han demostrado

que la interacción entre células y nanopartículas es compleja, debido a que la mayoría de nanopartículas administradas tanto *in vivo* como *in vitro* se encuentran recubiertas de proteínas y lípidos del plasma del medio en el que se encuentran inmersas, de ésta manera forman una corona en sus superficies, siendo probable que ésta corona sea lo que reconocen las células y no la propia nanopartícula.^{100,101}

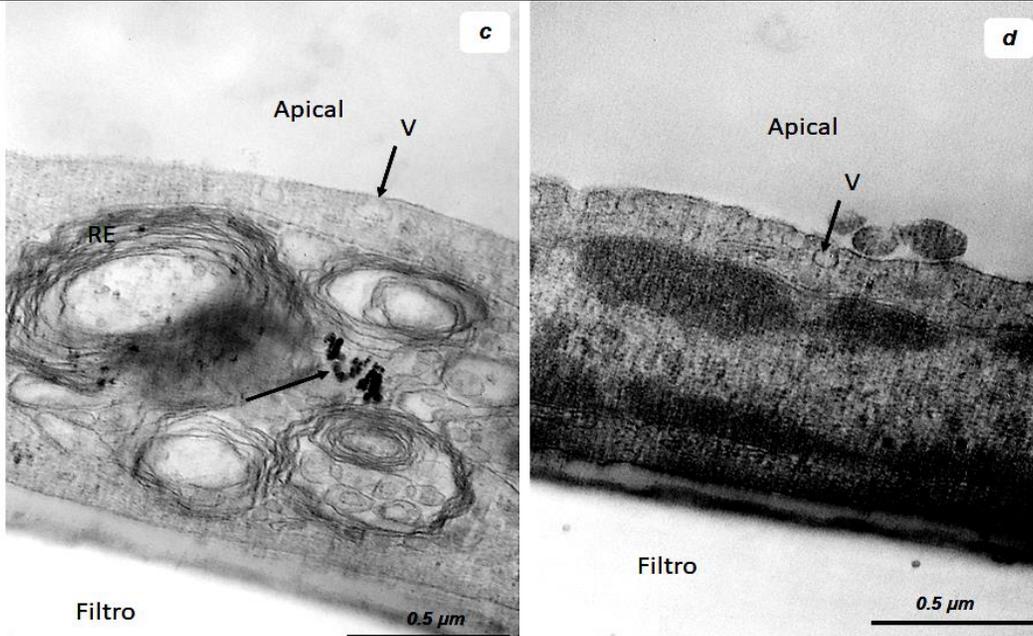
Con respecto al referente anterior, la mayoría de las membranas celulares poseen carga negativa debido a que su superficie está dominada por especies cargadas negativamente tales como proteoglicanos de heparán sulfato, fosfatidilserina y fosfolípidos aniónicos.¹⁰² Por lo tanto, la carga de una NP puede afectar la tendencia a permear las membranas. Debido a que las NPMs en el presente estudio se localizan dentro del rango de carga neutra, aquellas NPs de Fe_3O_4 que poseen una mayor dispersión debido a su concentración (5 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y un menor diámetro respecto a las NPs recubiertas con SiO_2 , se sugiere que ambas características les permitieron atravesar la membrana. De acuerdo con lo observado en el ensayo de liberación de LDH, la naturaleza de las NPs a producir estrés oxidativo generó un deterioro en la membrana. Por otra parte para las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$, la superficie del recubrimiento de las NPs favorece una mayor dispersión, por lo tanto se sugiere que su difusión al interior de la célula fue llevada a cabo mediante la adherencia de cargas positivas en su superficie, de tal manera que lograron difundirse al interior de la célula sin provocar un deterioro significativo en la membrana.

Estos resultados indican que las NPs son absorbidas por las rBMEC incluso sin la adición de una fuerza magnética externa que pueda estimularlas, como lo señalan los ensayos previos para fines de liberación de fármacos. Por lo tanto, éstas NPMs no necesariamente requieren cambios físicos o químicos en su superficie para interactuar con el monocultivo, y, posteriormente, para ser internalizados por el mismo.

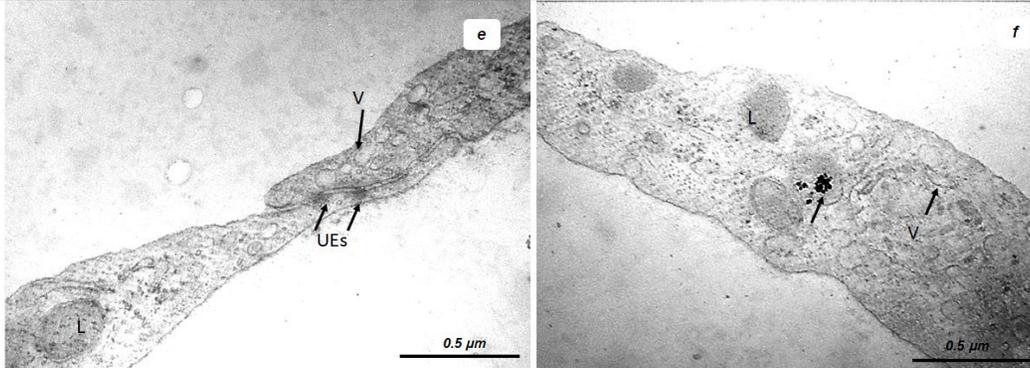
rBMECs control (no expuestas)



Interacción con de Fe₃O₄ (5 μg/mL)



Interacción con de Fe₃O₄ (40 μg/mL)



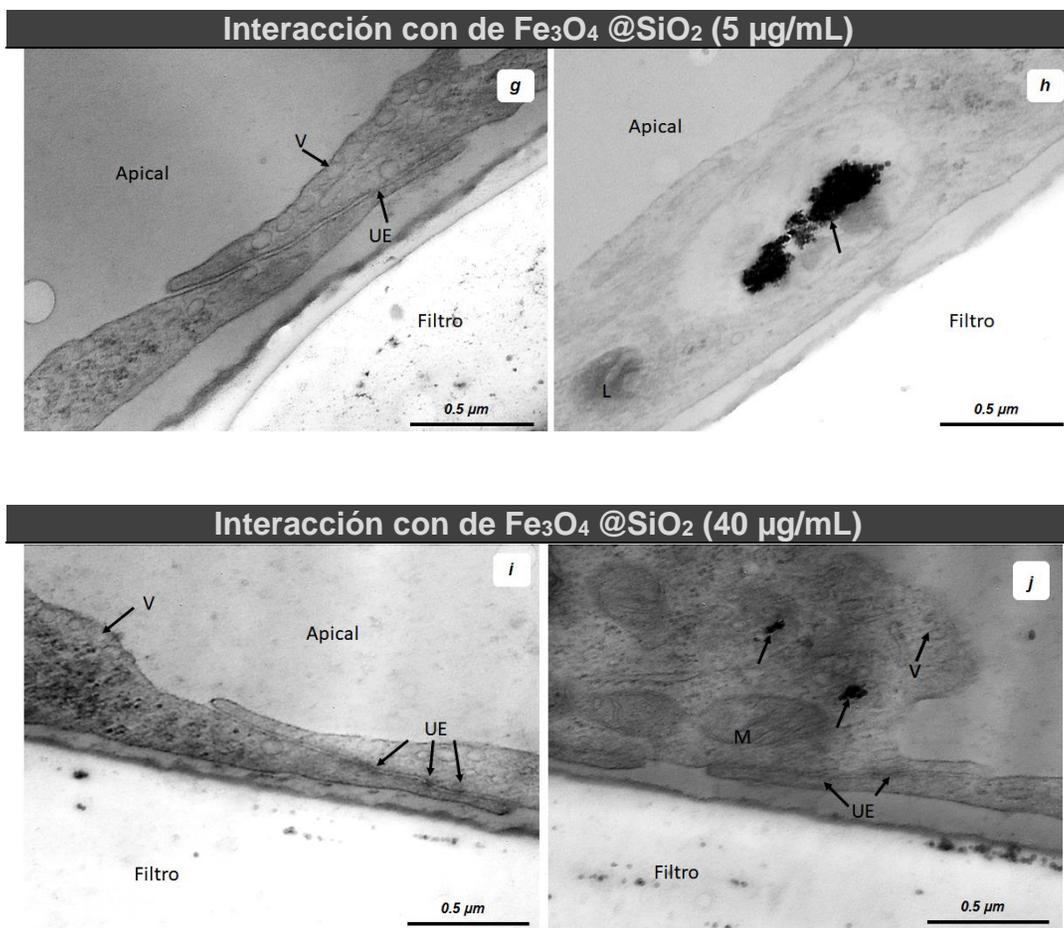


Figura 25. Ensayo de Internalización de nanopartículas de Fe_3O_4 y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ en dos concentraciones (5 y 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en monocapa de células rBMEC después de una exposición de 24 horas mediante caracterización en TEM. (a,b) Células control cuyas uniones estrechas y membrana celular se encuentran íntegros, (c,d) Presencia de vesículas en membrana celular así como NPs dentro de la célula, (e,f) Membrana celular pareció perder integridad localizándose múltiples vesículas así como un aglomerado de NPs dentro de un lisosoma (indicado por la flecha), (g,h) Presencia de vesículas, uniones estrechas intactas, aparición de NPs dentro de la célula en mayor volumen. (i,j) Aparición de múltiples NPs a través de la membrana basal así como al interior de la célula, aparición de vesículas en uniones estrechas. Abreviaturas: UE, uniones estrechas; V, vesículas; L, lisosoma; M, mitocondria; RE, retículo endoplásmico.

Determinación de la capacidad de transitosi de las NPs a través de la monocapa de rBMECs: Técnica de plasma de acoplamiento inductivo (ICP) con espectrofotómetro de emisión óptica (OES).

Mediante el análisis por la técnica de ICP, los resultados revelaron la presencia de concentraciones de Fe en el medio de cultivo DMEM con previa digestión ácida, las cuales se encuentran en forma de FeO y Fe_2O_3 en muestras sometidas a exposición con NPMs. Así mismo, el valor obtenido de Fe^{2+} y Fe^{3+} en DMEM sin tratamiento, el cual se encuentra

de forma intrínseca en el medio, fue sustraído al valor obtenido por las muestras. Así mismo, su cuantificación fue llevada a cabo por el equipo de tal manera que Fe_3O_4 fue calculado mediante la separación de sus valencias de Fe, adicionando además la presencia de Fe_2O_3 detectada por las caracterizaciones previas. Los resultados se expresan de la siguiente manera:

Tabla 4. Concentraciones de Fe presentes en el medio de cultivo celular contenido en la cámara basolateral del sistema Transwell®, mediante la técnica de ICP.

Analito	Unidades	Fe_3O_4		$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$	
		5 μg (2.98E+12)	40 μg (2.38E+13)	5 μg (1.72E+12)	40 μg (1.38E+13)
Fe^{2+}O	$\mu\text{g}/\text{mL}$	0.16	2.6	0	0.76
$\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_3$	$\mu\text{g}/\text{mL}$	0.16	2.88	0.28	0.84
Total	$\mu\text{g}/\text{mL}$	0.32	5.48	0.28	1.6
NPs/mL que migraron hacia la cámara basolateral del Transwell®		1.91E+11 (6.41%)	3.26E+12 (13.70%)	9.67E+10 (5.62%)	5.52E+11 (4%)

Los resultados muestran que las NPMs a concentraciones relativamente bajas no sólo pueden ser internalizadas por células en monocapa mediante transitos, sino que además logran atravesar la membrana del filtro Transwell hasta llegar a la cámara baso-lateral. Tal como se puede constatar en los resultados, existe una mayor concentración en los tratamientos con NPs de Fe_3O_4 , mientras que aquellos tratamientos con $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ poseen una menor concentración. Estas deducciones guardan relación con lo reportado en las caracterizaciones anteriores, donde las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ en comparación con NPs de Fe_3O_4 poseen una mayor estabilidad química, carga negativa y biocompatibilidad con el sistema, confiriéndoles además una dispersión superior, por lo que se sugiere que éstas se hallaron en mayor concentración inmersas en el cultivo, tal como el análisis de internalización en TEM sugiere.

A su vez podría considerarse que las NPs de Fe_3O_4 no destruyen a las células, sin embargo deterioran su membrana lo que ocasiona la liberación de LDH, requiriendo la acción de actividades metabólicas compensatorias para su regulación. Así mismo, la discontinuidad en la membrana plasmática impide que el ingreso de las NPs pueda ser regulado, por consiguiente éstas pueden ingresar al sistema por medio de endocitosis y atravesar la célula hasta llegar finalmente a la cámara basolateral del modelo BHE. Este mecanismo puede llevarse a cabo en concentraciones relativamente bajas donde la generación de

aglomerados en el material no es considerable como para impedir su ingreso al interior de las células. Por lo tanto y en relación con lo reportado por ICP, la posibilidad de que NPs Fe_3O_4 que atraviesen la membrana celular es mayor en concentraciones menores a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

El motivo de ésta tesis surgió directamente del interés de generar conocimiento en el mecanismo de ingreso de las NPs de Fe_3O_4 de a través de la BHE, mismas que han sido localizadas recientemente en el tejido cerebral. Es por ello que los resultados obtenidos presentan interesantes aportes e innovaciones en el campo de la nanotoxicología.

Los resultados obtenidos permiten extraer las siguientes conclusiones:

- Se han sintetizado NPs de Fe_3O_4 con características semejantes a las generadas por la combustión vehicular, lo que hizo posible emplearlas para los ensayos propuestos. Así mismo, el empleo de un recubrimiento con SiO_2 permitió obtener resultados que ayudarán como comparación en términos de caracterización e interacción en un sistema biológico.
- De acuerdo a las caracterizaciones realizadas, se obtuvo que la adición del revestimiento en $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ no alteró los resultados obtenidos, sin embargo presentó variaciones posicionales de los mismos. Las NPs de Fe_3O_4 y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ evidenciaron un diámetro de alrededor 8.45 y 14.33 nm en TEM. Para ambas muestras, se determinó la presencia de propiedades superparamagnéticas, resaltando que en las NPs cuya superficie fue modificada con SiO_2 , presentó un incremento de saturación magnética en comparación con aquellas sin recubrimiento.
- Al evaluar el potencial citotóxico, se encontró que las NPs de Fe_3O_4 generan una mayor toxicidad la cual es determinada por la liberación de LDH así como la alteración del metabolismo celular mediante la reducción defectuosa del oxígeno durante el proceso de fosforilación oxidativa, generando especies reactivas de oxígeno en la matriz mitocondrial, principalmente a bajas concentraciones, en comparación con células sin tratamiento. En las NPs con recubrimiento de SiO_2 no se presentó toxicidad estadísticamente significativa, sin embargo la alteración

metabólica fue evidente en tratamientos expuestos a mayores concentraciones de NPs.

- Los resultados en la evaluación de la interacción de las NPs sintetizadas en las rBMECs, mostraron que ambos tipos de NPs de Fe_3O_4 desnudas y cubiertas con SiO_2 , se internalizan de manera efectiva a través del proceso de endocitosis. A concentraciones de $40 \mu\text{g/mL}$ las células expuestas mostraron alteración de UEs, donde la concentración de NPs en las células aparentemente generó un aumento de proteínas en el área para el refuerzo de tales uniones. Sin embargo, en células expuestas a NPs de Fe_3O_4 generó la presencia de retículo endoplásmico liso y discontinuidad en la membrana plasmática, principalmente en células expuestas a una concentración de $40 \mu\text{g/mL}$.

En conjunto, estos resultados sugieren que el análisis integral realizado en este proyecto permite determinar que las NPs de Fe_3O_4 son tóxicas a bajas concentraciones y éstas ingresan a las células rBMEC por medio de endocitosis a la membrana plasmática. Finalmente tales resultados pueden considerarse como un primer acercamiento a los mecanismos implicados por los que las NPs de Fe_3O_4 pudieran ingresar al sistema nervioso central.

REFERENCIAS

1. Mitchell R, Maher BA. Evaluation and application of biomagnetic monitoring of traffic-derived particulate pollution. *Atmos Environ.* 2009;43(13):2095-2103. doi:10.1016/j.atmosenv.2009.01.042
2. Kodama R. Magnetic nanoparticles. *J Magn Magn Mater.* 1999;200(1-3):359-372. doi:10.1016/S0304-8853(99)00347-9
3. Thapa D, Palkar V., Kurup M., Malik S. Properties of magnetite nanoparticles synthesized through a novel chemical route. *Mater Lett.* 2004;58(21):2692-2694. doi:10.1016/J.MATLET.2004.03.045
4. Gie R. Magnetite in the human body: Biogenic vs. anthropogenic. doi:10.1073/pnas.1613349113
5. Kirschvink JL, Walker MM, Diebel CE. Magnetite-based magnetoreception. *Curr Opin Neurobiol.* 2001;11(4):462-467. doi:10.1016/S0959-4388(00)00235-X
6. Mouritsen H, Ritz T. Magnetoreception and its use in bird navigation. *Curr Opin Neurobiol.* 2005;15(4):406-414. doi:10.1016/J.CONB.2005.06.003
7. Kirschvink JL, Winklhofer M, Walker MM. Biophysics of magnetic orientation: strengthening the interface between theory and experimental design. *J R Soc Interface.* 2010;7(Suppl_2):S179-S191. doi:10.1098/rsif.2009.0491.focus
8. Kirschvink JL, Kobayashi-Kirschvink a, Woodford BJ. Magnetite biomineralization in the human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(16):7683-7687. doi:10.1073/pnas.89.16.7683
9. Kirschvink JL, Kobayashi-Kirschvink a, Diaz-Ricci JC, Kirschvink SJ. Magnetite in human tissues: a mechanism for the biological effects of weak ELF magnetic fields. *Bioelectromagnetics.* 1992;Suppl 1:101-113. doi:10.1002/bem.2250130710
10. Inouye K, Endo R, Otsuka Y, Miyashiro K, Kaneko K, Ishikawa T. Oxygenation of ferrous ions in reversed micelle and reversed microemulsion. *J Phys Chem.* 1982;86(8):1465-1469. doi:10.1021/j100397a051
11. Materials Research Society. Y., ScienceDirect (Online service) S., Potdar H., et al. *Materials Letters.* Vol 56. North-Holland; 1982. https://www.academia.edu/28507262/Microwave_hydrothermal_preparation_of_submicron-sized_spherical_magnetite_Fe3O4_powders. Accessed May 28, 2018.
12. Yu WW, Falkner JC, Yavuz CT, Colvin VL. Synthesis of monodisperse iron oxide nanocrystals by thermal decomposition of iron carboxylate salts. *Chem Commun.* 2004;0(20):2306. doi:10.1039/b409601k
13. Gminski R, Decker K, Heinz C, et al. Genotoxic effects of three selected black toner powders and their dimethyl sulfoxide extracts in cultured human epithelial A549 lung cells in vitro. *Environ Mol Mutagen.* 2011;52(4):296-309. doi:10.1002/em.20621

14. Zhang C, Qiao Q, Appel E, Huang B. Discriminating sources of anthropogenic heavy metals in urban street dusts using magnetic and chemical methods. *J Geochemical Explor.* 2012;119-120:60-75. doi:10.1016/j.gexplo.2012.06.014
15. Moreno T, Martins V, Querol X, et al. A new look at inhalable metalliferous airborne particles on rail subway platforms. *Sci Total Environ.* 2015;505:367-375. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.10.013
16. Giere R, Querol X. Solid Particulate Matter in the Atmosphere. *Elements.* 2010;6(4):215-222. doi:10.2113/gselements.6.4.215
17. Chen B, Kan H. Air pollution and population health: a global challenge. *Environ Health Prev Med.* 2008;13(2):94-101. doi:10.1007/s12199-007-0018-5
18. Villarreal-Calderon R, Dale G, Delgado-Chavez R, et al. Intra-city Differences in Cardiac Expression of Inflammatory Genes and Inflammasomes in Young Urbanites: A Pilot Study. *J Toxicol Pathol.* 2012;25(2):163-173. doi:10.1293/tox.25.163
19. Bravo-Alvarez H, Torres-Jardón R. Air Pollution Levels and Trends in the Mexico City Metropolitan Area. In: *Urban Air Pollution and Forests: Resources at Risk in the Mexico City Air Basin.* Springer, New York, NY; 2002:121-159. doi:10.1007/978-0-387-22520-3_6
20. Maher BA, Ahmed IAM, Karloukovski V, et al. Magnetite pollution nanoparticles in the human brain. *Proc Natl Acad Sci.* 2016;113(39):10797-10801. doi:10.1073/pnas.1605941113
21. Englert N. Fine particles and human health—a review of epidemiological studies. *Toxicol Lett.* 2004;149(1-3):235-242. doi:10.1016/J.TOXLET.2003.12.035
22. Calderón-Garcidueñas L, Franco-Lira M, D'Angiulli A, et al. Mexico City normal weight children exposed to high concentrations of ambient PM_{2.5} show high blood leptin and endothelin-1, vitamin D deficiency, and food reward hormone dysregulation versus low pollution controls. Relevance for obesity and Alzheimer disease. *Environ Res.* 2015;140:579-592. doi:10.1016/j.envres.2015.05.012
23. PARTICLE TOXICOLOGY. doi:10.2113/GSELEMENTS.3.6.407
24. Brook RD, Franklin B, Cascio W, et al. Air Pollution and Cardiovascular Disease: A Statement for Healthcare Professionals From the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. *Circulation.* 2004;109(21):2655-2671. doi:10.1161/01.CIR.0000128587.30041.C8
25. Donaldson K, Tran CL. INFLAMMATION CAUSED BY PARTICLES AND FIBERS. *Inhal Toxicol.* 2002;14(1):5-27. doi:10.1080/089583701753338613
26. Schoonen MAA, Cohn CA, Roemer E, Laffers R, Simon SR, O'Riordan T. Mineral-Induced Formation of Reactive Oxygen Species. *Rev Mineral Geochemistry.* 2006;64(1):179-221. doi:10.2138/rmg.2006.64.7
27. Tabner BJ, Mayes J, Allsop D. Hypothesis: soluble a β oligomers in association with redox-active metal ions are the optimal generators of reactive oxygen species in Alzheimer's

- disease. *Int J Alzheimers Dis*. 2010;2011:546380. doi:10.4061/2011/546380
28. Karlsson HL, Gustafsson J, Cronholm P, Möller L. Size-dependent toxicity of metal oxide particles—A comparison between nano- and micrometer size. *Toxicol Lett*. 2009;188(2):112-118. doi:10.1016/j.toxlet.2009.03.014
 29. Pankhurst Q, Hautot D, Khan N, Dobson J. Increased Levels of Magnetic Iron Compounds in Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis*. 2008;13(1):49-52. doi:10.3233/JAD-2008-13105
 30. Plumlee GS, Morman SA, Ziegler TL. The Toxicological Geochemistry of Earth Materials: An Overview of Processes and the Interdisciplinary Methods Used to Understand Them. *Rev Mineral Geochemistry*. 2006;64:5-57. doi:10.2138/rmg.2006.64.2
 31. Calderón-Garcidueñas L, Serrano-Sierra A, Torres-Jardón R, et al. The impact of environmental metals in young urbanites' brains. *Exp Toxicol Pathol*. 2013;65(5):503-511. doi:10.1016/j.etp.2012.02.006
 32. Calderón-Garcidueñas L, Calderón-Garcidueñas A, Torres-Jardón R, Avila-Ramírez J, Kulesza RJ, Angiulli AD. Air pollution and your brain: what do you need to know right now. *Prim Health Care Res Dev*. 2015;16(4):329-345. doi:10.1017/S146342361400036X
 33. Hammond C (Constance). *Cellular and Molecular Neurobiology*. Academic Press; 2001.
 34. Henriksson J, Tallkvist J, Tjälve H. Uptake of nickel into the brain via olfactory neurons in rats. *Toxicol Lett*. 1997;91(2):153-162. doi:10.1016/S0378-4274(97)03885-X
 35. Ronaldson PT, Davis TP. Targeting blood-brain barrier changes during inflammatory pain: an opportunity for optimizing CNS drug delivery. *Ther Deliv*. 2011;2(8):1015-1041. doi:10.4155/tde.11.67
 36. Abbott NJ. Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation. *Cell Mol Neurobiol*. 2005;25(1):5-23. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15962506>. Accessed May 24, 2018.
 37. Oldendorf WH, Cornford ME, Brown WJ. The large apparent work capability of the blood-brain barrier: A study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Ann Neurol*. 1977;1(5):409-417. doi:10.1002/ana.410010502
 38. Hawkins BT, Davis TP. The Blood-Brain Barrier/Neurovascular Unit in Health and Disease. *Pharmacol Rev*. 2005;57(2):173-185. doi:10.1124/pr.57.2.4
 39. Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood–brain barrier: an overview. *Neurobiol Dis*. 2004;16(1):1-13. doi:10.1016/j.nbd.2003.12.016
 40. Zlokovic B V. The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders. *Neuron*. 2008;57(2):178-201. doi:10.1016/j.neuron.2008.01.003
 41. Dore-Duffy P, Owen C, Balabanov R, Murphy S, Beaumont T, Rafols JA. Pericyte Migration from the Vascular Wall in Response to Traumatic Brain Injury. *Microvasc Res*. 2000;60(1):55-69. doi:10.1006/mvre.2000.2244
 42. del Zoppo GJ. The neurovascular unit, matrix proteases, and innate inflammation. *Ann N Y*

- Acad Sci.* 2010;1207:46-49. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05760.x
43. VITAL SA, TERAO S, NAGAI M, GRANGER DN. Mechanisms Underlying the Cerebral Microvascular Responses to Angiotensin II-Induced Hypertension. *Microcirculation.* 2010;17(8):641-649. doi:10.1111/j.1549-8719.2010.00060.x
 44. Villanueva A, Cañete M, Roca AG, et al. The influence of surface functionalization on the enhanced internalization of magnetic nanoparticles in cancer cells. *Nanotechnology.* 2009;20(11):115103. doi:10.1088/0957-4484/20/11/115103
 45. Mahmoudi M, Hofmann H, Rothen-Rutishauser B, Petri-Fink A. Assessing the In Vitro and In Vivo Toxicity of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Chem Rev.* 2012;112(4):2323-2338. doi:10.1021/cr2002596
 46. Manual I. Cytotoxicity Detection Kit (LDH). *E-LabdocRocheCom.* 2012;(11):1-20. https://e-labdoc.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/11644793001_en_06.pdf.
 47. Rai Y, Pathak R, Kumari N, et al. Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. *Sci Rep.* 2018;8(1):1531. doi:10.1038/s41598-018-19930-w
 48. Promega Corporation. CellTiter 96 ® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. *WwwPromegaCom/Protocols/.* 2012:2014-12-15. www.promega.com/protocols/.
 49. Total Reactive Oxygen Species (ROS) Assay Kit 520 nm - Thermo Fisher Scientific. <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/88-5930-74>. Accessed May 30, 2018.
 50. Chakra SC. CuO/TiO₂ Metal Oxide Nanocomposite Synthesis via Room Temperature Ionic Liquid. *J Nanomater Mol Nanotechnol.* 2016;5(April):2-5. doi:10.4172/2324-8777.1000178
 51. De Lorenzo AJD. The Olfactory Neuron and the Blood-Brain Barrier. In: Wiley-Blackwell; 2008:151-176. doi:10.1002/9780470715369.ch9
 52. Könczöl M, Ebeling S, Goldenberg E, et al. Cytotoxicity and Genotoxicity of Size-Fractionated Iron Oxide (Magnetite) in A549 Human Lung Epithelial Cells: Role of ROS, JNK, and NF-κB. *Chem Res Toxicol.* 2011;24(9):1460-1475. doi:10.1021/tx200051s
 53. Thomsen LB, Linemann T, Pondman KM, et al. Uptake and transport of superparamagnetic iron oxide nanoparticles through human brain capillary endothelial cells. *ACS Chem Neurosci.* 2013;4(10):1352-1360. doi:10.1021/cn400093z
 54. Imam SZ, Lantz-McPeak SM, Cuevas E, et al. Iron Oxide Nanoparticles Induce Dopaminergic Damage: In vitro Pathways and In Vivo Imaging Reveals Mechanism of Neuronal Damage. *Mol Neurobiol.* 2015;52(2):913-926. doi:10.1007/s12035-015-9259-2
 55. Luo Y, Wang C, Hossain M, et al. Three-Dimensional Microtissue Assay for High-Throughput Cytotoxicity of Nanoparticles. *Anal Chem.* 2012;84(15):6731-6738. doi:10.1021/ac301191j
 56. DeBault LE, Cancilla PA. gamma-Glutamyl transpeptidase in isolated brain endothelial cells: induction by glial cells in vitro. *Science.* 1980;207(4431):653-655. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6101511>. Accessed May 29, 2018.

57. Tao-Cheng JH, Nagy Z, Brightman MW. Tight junctions of brain endothelium in vitro are enhanced by astroglia. *J Neurosci.* 1987;7(10):3293-3299. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3668629>. Accessed May 29, 2018.
58. Dehouck MP, Méresse S, Delorme P, Fruchart JC, Cecchelli R. An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro. *J Neurochem.* 1990;54(5):1798-1801. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2182777>. Accessed May 29, 2018.
59. Cecchelli, Dehouck, Descamps, et al. In vitro model for evaluating drug transport across the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev.* 1999;36(2-3):165-178. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10837714>. Accessed May 29, 2018.
60. Helms HC, Abbott NJ, Burek M, et al. In vitro models of the blood–brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2016;36(5):862-890. doi:10.1177/0271678X16630991
61. Franke H, Galla HJ, Beuckmann CT. An improved low-permeability in vitro-model of the blood-brain barrier: transport studies on retinoids, sucrose, haloperidol, caffeine and mannitol. *Brain Res.* 1999;818(1):65-71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9914438>. Accessed May 29, 2018.
62. Helms HC, Waagepetersen HS, Nielsen CU, Brodin B. Paracellular Tightness and Claudin-5 Expression is Increased in the BCEC/Astrocyte Blood–Brain Barrier Model by Increasing Media Buffer Capacity During Growth. *AAPS J.* 2010;12(4):759-770. doi:10.1208/s12248-010-9237-6
63. Nakagawa S, Deli MA, Kawaguchi H, et al. A new blood–brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem Int.* 2009;54(3-4):253-263. doi:10.1016/j.neuint.2008.12.002
64. Burek M, Salvador E, Förster CY. Generation of an Immortalized Murine Brain Microvascular Endothelial Cell Line as an In Vitro Blood Brain Barrier Model. *J Vis Exp.* 2012;(66):e4022. doi:10.3791/4022
65. Weksler BB, Subileau EA, Perrière N, et al. Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB J.* 2005;19(13):1872-1874. doi:10.1096/fj.04-3458fje
66. Ponio JB-D, El-Ayoubi F, Glacial F, et al. Instruction of Circulating Endothelial Progenitors In Vitro towards Specialized Blood-Brain Barrier and Arterial Phenotypes. Deli MA, ed. *PLoS One.* 2014;9(1):e84179. doi:10.1371/journal.pone.0084179
67. Hong RY, Feng B, Chen LL, et al. Synthesis, characterization and MRI application of dextran-coated Fe₃O₄ magnetic nanoparticles. *Biochem Eng J.* 2008;42(3):290-300. doi:10.1016/j.bej.2008.07.009
68. Hritcu D, Popa MI, Popa N, Badescu V, Balan V. Preparation and characterization of magnetic chitosan nanospheres. *Turk J Chem.* 2009;33:785-796. doi:10.3906/kim-0812-42

69. Yiu HHP, McBain SC, Lethbridge ZAD, Lees MR, Dobson J. Preparation and characterization of polyethylenimine-coated Fe₃O₄-MCM-48 nanocomposite particles as a novel agent for magnet-assisted transfection. *J Biomed Mater Res Part A*. 2010;92A(1):386-392. doi:10.1002/jbm.a.32363
70. Mukhopadhyay A, Joshi N, Chattopadhyay K, De G. A Facile Synthesis of PEG-Coated Magnetite (Fe₃O₄) Nanoparticles and Their Prevention of the Reduction of Cytochrome C. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2012;4(1):142-149. doi:10.1021/am201166m
71. Reddy LH, Arias JL, Nicolas J, Couvreur P. Magnetic nanoparticles: Design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. *Chem Rev*. 2012;112(11):5818-5878. doi:10.1021/cr300068p
72. Duguet E, Vasseur S, Mornet S, Devoisselle J-M. Magnetic nanoparticles and their applications in medicine. *Nanomedicine*. 2006;1(2):157-168. doi:10.2217/17435889.1.2.157
73. Kobayashi T. Cancer hyperthermia using magnetic nanoparticles. *Biotechnol J*. 2011;6(11):1342-1347. doi:10.1002/biot.201100045
74. Martínez Banaclocha MA, Bókkon I, Banaclocha HM. Long-term memory in brain magnetite. *Med Hypotheses*. 2010;74(2):254-257. doi:10.1016/j.mehy.2009.09.024
75. Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*. 2005;26(18):3995-4021. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.10.012
76. Quy D Van, Nguyen MH, Tra PT, et al. Synthesis of silica-coated magnetic nanoparticles and application in the detection of pathogenic viruses. *J Nanomater*. 2013;2013:603940, 7. doi:10.1155/2013/603940
77. Callister WD, Rethwisch DG. *Materials Science and Engineering: An Introduction*. <https://www.wiley.com/en-us/Materials+Science+and+Engineering%3A+An+Introduction%2C+9th+Edition-p-9781118324578>. Accessed June 4, 2018.
78. Raman E, Fundamento :, Otero J. Espectroscopía Raman: Fundamento y aplicaciones. 2015. doi:10.13140/RG.2.1.5015.5362
79. Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR, Cervantes González S, Anzures MB. *Principios de Análisis Instrumental*. Cengage Learning; 2008. <https://latam.casadellibro.com/libro-principios-de-analisis-instrumental-6-ed/9789706868299/1613471>. Accessed June 4, 2018.
80. Microscopios Electrónicos de Transmisión (TEM). http://www.linan-ipicyt.mx/Microscopio_HR-TEM.html. Accessed June 4, 2018.
81. Electrones Fotoemitidos. [http://www.linan-ipicyt.mx/Electrones_fotoemitidos_\(XPS\).html](http://www.linan-ipicyt.mx/Electrones_fotoemitidos_(XPS).html). Accessed June 4, 2018.
82. Khine YY, Callari M, Lu H, Stenzel MH. Macromolecular Chemistry and Physics Direct Correlation Between Zeta Potential and Cellular Uptake of Poly(methacrylic acid) Post-Modifi

- ed with Guanidinium Functionalities. 2016. doi:10.1002/macp.201600161
83. ZETASIZER NANO Series.
 84. Ye D, Dawson KA, Lynch I. A TEM protocol for quality assurance of in vitro cellular barrier models and its application to the assessment of nanoparticle transport mechanisms across barriers. *Analyst*. 2015;140(1):83-97. doi:10.1039/C4AN01276C
 85. Wu W, Wu Z, Yu T, Jiang C, Kim W-S. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Sci Technol Adv Mater*. 2015;16:23501. doi:10.1088/1468-6996/16/2/023501
 86. Evelyn C. S. Santos, a Thiago C. dos Santos, a Renato B. Guimarães, b Lina Ishida, c Rafael S. Freitas c CMR. Guanidine-functionalized Fe₃O₄ magnetic nanoparticles as basic recyclable catalysts for biodiesel production. *R Soc Chem*. 2010;4(8):1166-1169. doi:10.1039/b000000x
 87. S. Majumder, a, b S. Dey A, K. Bagani B, S. K. Dey A, S. Banerjee * and S. Kumara. A comparative study on structural, optical and magnetic properties of Fe₃O₄ and Fe₃O₄@SiO₂ core-shell microspheres along with assessment of their potentiality as electrochemical double layer capacitor. *Dalt Trans*. 2017. doi:10.1039/C7DT00900C
 88. Panta P, Bergmann C. Raman Spectroscopy of Iron Oxide of Nanoparticles (Fe₃O₄). *J Mater Sci Eng*. 2015;5(1):1-3. doi:10.4172/2169-0022.1000217
 89. Kokate M, Garadkar K, Gole A. One pot synthesis of magnetite–silica nanocomposites: applications as tags, entrapment matrix and in water purification. *J Mater Chem A*. 2013;1(6):2022-2029. doi:10.1039/C2TA00951J
 90. Yang L, Zou P, Cao J, et al. Facile synthesis and paramagnetic properties of Fe₃O₄@SiO₂ core-shell nanoparticles. *Superlattices Microstruct*. 2014;76:205-212. doi:10.1016/j.spmi.2014.10.011
 91. Zeta Potential Analysis of Nanoparticles. https://cdn.shopify.com/s/files/1/0257/8237/files/nanoComposix_Guidelines_for_Zeta_Potential_Analysis_of_Nanoparticles.pdf. Accessed July 8, 2018.
 92. Dar MI, Shivashankar SA. Single crystalline magnetite, maghemite, and hematite nanoparticles with rich coercivity. *RSC Adv*. 2014;4(8):4105-4113. doi:10.1039/c3ra45457f
 93. Boyer C, Whittaker MR, Bulmus V, Liu J, Davis TP. The design and utility of polymer-stabilized iron-oxide nanoparticles for nanomedicine applications. *NPG Asia Mater*. 2010;2(1):23-30. doi:10.1038/asiamat.2010.6
 94. Laurent S, Burtsea C, Thirifays C, Häfeli UO, Mahmoudi M. Crucial Ignored Parameters on Nanotoxicology: The Importance of Toxicity Assay Modifications and “Cell Vision.” Chin W-C, ed. *PLoS One*. 2012;7(1):e29997. doi:10.1371/journal.pone.0029997
 95. Mahmoudi M, Laurent S, Shokrgozar MA, Hosseinkhani M. Toxicity Evaluations of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Cell “Vision” versus Physicochemical

- Properties of Nanoparticles. *ACS Nano*. 2011;5(9):7263-7276. doi:10.1021/nn2021088
96. Ducray AD, Felser A, Zielinski J, et al. Effects of silica nanoparticle exposure on mitochondrial function during neuronal differentiation. *J Nanobiotechnology*. 2017;15(1):49. doi:10.1186/s12951-017-0284-3
 97. Tornero D, Ceña V, Jordán J. *Offarm*. Doyma <http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-la-mitocondria-como-diana-farmacologica-13041301>. Accessed July 2, 2018.
 98. Naqvi S, Samim M, Abdin M, et al. Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress. *Int J Nanomedicine*. 2010;5:983-989. doi:10.2147/IJN.S13244
 99. Fofelle F, Fromenty B. Role of endoplasmic reticulum stress in drug-induced toxicity. *Pharmacol Res Perspect*. 2016;4(1):e00211. doi:10.1002/prp2.211
 100. Walczyk D, Bombelli FB, Monopoli MP, Lynch I, Dawson KA. What the Cell “Sees” in Bionanoscience. *J Am Chem Soc*. 2010;132(16):5761-5768. doi:10.1021/ja910675v
 101. Monopoli MP, Walczyk D, Campbell A, et al. Physical–Chemical Aspects of Protein Corona: Relevance to *in Vitro* and *in Vivo* Biological Impacts of Nanoparticles. *J Am Chem Soc*. 2011;133(8):2525-2534. doi:10.1021/ja107583h
 102. Bondar O V, Saifullina D V, Shakhmaeva II, Mavlyutova II, Abdullin TI. Monitoring of the Zeta Potential of Human Cells upon Reduction in Their Viability and Interaction with Polymers. *Acta Naturae*. 2012;4(1):78-81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22708066>. Accessed July 24, 2018.
 103. Por / /, Bernhard F, Danielyan L, Gleiter C. Passagem secreta para o cérebro. [http://www.torrentonline.com.br/NovoPortal/arquivos/Passagem secreta_FFJ55S.pdf](http://www.torrentonline.com.br/NovoPortal/arquivos/Passagem_secreta_FFJ55S.pdf). Accessed July 1, 2018.
 104. First Alzheimer’s patient treated with focused ultrasound to open the blood-brain barrier - Sunnybrook Hospital. <https://sunnybrook.ca/media/item.asp?page=38&i=1562>. Accessed April 11, 2018.
 105. Primary Cells, Culture Media, Reagents, Stem Cells and Gene Expression Products | Bovine Brain Microvascular Endothelial Cells. <https://www.sciencellonline.com/bovine-brain-microvascular-endothelial-cells.html>. Accessed July 1, 2018.
 106. Preventiva M. *Universidad Complutense de Madrid*. Vol 17.; 2007. doi:10.1016/S0141-0229(03)00220-5.L

ANEXO 1: DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NPS/ML DE Fe_3O_4 .

Volumen de la celda: $5.90 \times 10^{-22} \text{cm}^3$

Átomos de Fe en celda: 24

Átomos de O en celda: 32

Peso en gramos del átomo de Fe: $1 \text{ átomo} \times \frac{55.84 \text{ g}}{6.02 \times 10^{23} \text{ átomos}} = 9.28 \times 10^{-23} \text{g}$

Peso en gramos del átomo de O: $1 \text{ átomo} \times \frac{16 \text{ g}}{6.02 \times 10^{23} \text{ átomos}} = 2.65 \times 10^{-23} \text{g}$

CONSIDERANDO EL NÚMERO DE ÁTOMOS DE O Y FE POR CELDA UNITARIA:

Peso en gramos de celda unitaria: $(9.28 \times 10^{-23} \text{g} * 24) + (2.65 \times 10^{-23} \text{g} * 32) = 3.07 \times 10^{-21} \text{g}$

Diámetro de la nanopartícula: $8.45 \times 10^{-07} \text{cm}$

Volumen de la nanopartícula: $\frac{4}{3} \pi * (8.45 \times 10^{-07} \text{cm}/2)^3 = 3.15 \times 10^{-19} \text{cm}^3$

No. De celdas unitarias por nanopartícula: $3.15 \times 10^{-19} \text{cm}^3 / 5.90 \times 10^{-22} \text{cm}^3 = 534.72 \text{ celdas}$

Peso en gramos de la nanopartícula: $(534.72 \text{ celdas} * 3.07 \times 10^{-21} \text{g}) = 1.64 \times 10^{-18} \text{g}$

Peso en gramos de Fe_3O_4 en síntesis: 0.392 g

Total de nanopartículas por síntesis realizada: $0.392 \text{ g} / 1.64 \times 10^{-18} \text{g} = \mathbf{2.38 \times 10^{17}}$

Concentración de NPs/ mL en análisis fueron estimadas mediante el cálculo de NPs en diluciones a partir de una solución stock: (1 mg/mL)