



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE
ESCUELA DE INGENIERIA

COMPORTAMIENTO MICROREOLÓGICO DE CÉLULAS VIVAS BAJO LA ROTACIÓN CONTROLADA DE NANOCILINDROS MAGNÉTICOS

MATÍAS CASTILLO TOCORNAL

Tesis para optar al grado de
Magíster en Ciencias de Ingeniería

Profesor Supervisor:
ALFREDO CELEDÓN

Santiago de Chile, Junio, 2013



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE
ESCUELA DE INGENIERIA

COMPORTAMIENTO MICROREOLÓGICO DE CÉLULAS VIVAS BAJO LA ROTACIÓN CONTROLADA DE NANOCILINDROS MAGNÉTICOS

MATÍAS CASTILLO TOCORNAL

Tesis presentada a la Comisión integrada por los profesores:

ALFREDO CELEDÓN

MAGDALENA WALCZAK

DANIEL HURTADO

ROBERTO EBENSPERGER

MARCELO GUARINI

Para completar las exigencias del grado de
Magíster en Ciencias de Ingeniería

Santiago de Chile, Junio, 2013

*Dedicado a mi madre, a mi padre y a
toda mi familia, que me apoyaron
incondicionalmente durante todos
estos años académicos.*

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al profesor Alfredo Celedón por guiarme en el desarrollo de este trabajo, el cual no hubiera sido posible sin su ayuda. Quisiera agradecer también al profesor Roberto Ebensperger y María Ignacia Pavón, quienes me ayudaron durante toda la etapa de cultivo y manipulación celular. Además, agradezco a Luis Valdés, jefe del taller de Ingeniería Mecánica y Metalúrgica, cuya ayuda fue fundamental en la fabricación del sistema magnético rotatorio. También quiero agradecer a los profesores Magdalena Walczak y Daniel Hurtado que me guiaron en los análisis teóricos de esta investigación.

INDICE GENERAL

	Pág.
AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE GENERAL.....	iv
INDICE DE FIGURAS.....	vi
RESUMEN.....	ivii
ABSTRACT	viii
 1. CAPITULO INTRODUCTORIO.....	 1
1.1 Introducción	1
1.2 Motivación	2
1.3 Hipótesis.....	3
1.4 Objetivos	3
1.5 Magnetismo en nanocilindros de Pt-Ni.....	4
1.6 Metodología	5
1.6.1 Fabricación de nanocilindros magnéticos	5
1.6.2 Diseño del sistema magnético rotatorio	8
1.6.3 Cultivo Celular	11
1.6.4 Inserción de nanocilindros en las células	11
1.6.5 Análisis mecánico de los nanocilindros	12
1.7 Resultados	12
1.7.1 Inserción de nanocilindros en las células	12
1.7.2 Comportamiento de nanocilindros expuestos a distintas intensidades de campo magnético	¡Error! Marcador no definido.3
1.7.3 Comportamiento de los nanocilindros en el tiempo ante un campo magnético rotatorio	15
1.8 Análisis y discusión.....	16
1.9 Conclusiones y perspectivas a futuro	20
 2. CAPÍTULO DE PUBLICACIÓN	 21

REFERENCIAS	43
A N E X O S	46
Anexo A1: Parámetros utilizados para la electrodeposición de nanocilindros.	47
Anexo A2: Método para pasar células: Tripsinización.....	50

INDICE DE FIGURAS

Pág.

Figura 1 Esquema del sistema de electrodeposición	6
Figura 2 Fotografía de un nanocilindro de Ni-Pt (SEM).....	8
Figura 3 Configuraciones de los imanes permanentes	9
Figura 4 Esquema de imanes y variación del campo magnético	11
Figura 5 Movimiento restringido de los nanocilindros	13
Figura 6 Ángulo de desplazamiento respecto a diferentes intensidades de campo magnético	14
Figura 7 Deformación celular.....	15
Figura 8 Variación del desplazamiento de nanocilindros en el tiempo	16
Figura 9 Giro completo obtenido por un nanocilindro	16

RESUMEN

Esta investigación consistió en analizar el comportamiento mecánico que tienen nanocilindros magnéticos al interior de fibroblastos bajo la influencia de campos magnéticos de baja frecuencia (1 - 10 Hz), con el fin de evaluar su capacidad de inducir perturbación y deformación celular. Se fabricaron nanocilindros de Pt-Ni (□ 200 nm de diámetro) por medio de deposiciones electroquímicas de soluciones metálicas, con largos de 2 μm y 5 μm. Estos nanocilindros fueron implantados en fibroblastos NIH/3T3 y expuestos a campos magnéticos externos de diferentes intensidades. Un campo magnético de cientos de militeslas fue desarrollado para manipular los nanocilindros utilizando imanes permanentes. Se evidencia movimiento rotacional en los nanocilindros al ser expuestos a campos magnéticos de intensidades superiores a 20 mT. Éstos giran y por lo tanto perturban el interior de las células. Además, el torque producido por un campo de 300 mT permitió que los nanocilindros deformaran membranas celulares. La perturbación y deformación celular inducida por los nanocilindros podría ser causa de generación de necrosis celular luego de varios minutos de aplicación, lo que prueba el potencial de esta técnica como posible método de ablación tumoral.

Palabras claves: nanopartículas magnéticas, nanocilindros, fibroblastos, campo magnético rotatorio, daño celular.

ABSTRACT

This work consisted in the analysis of the mechanical response of magnetic nanorods implanted in fibroblasts as a potential method for tumor ablation when exposed to a rotational magnetic field. The nanorods (Pt-Ni, ~200 nm diameter), fabricated by electrodeposition in templates of porous alumina to the length of 2 or 5 μm , were inserted into NIH/3T3 fibroblasts and exposed to external magnetic fields. A low frequency magnetic field of hundreds of militeslas was designed using permanent magnets to manipulate the magnetic nanowires. Rotational movement of the nanorods inside the cells was induced by fields of minimum 20 mT resulting in internal perturbation of the cells. The magnetic torque produced by a 300 mT field ensued deformation of cellular structures, demonstrating potential of the technique to generate mechanical damage as a strategy of tumor ablation.

Key words: magnetic nanoparticles, nanorods, fibroblasts, rotational magnetic field, cellular damage.

1. CAPÍTULO INTRODUCTORIO

1.1 Introducción

La nanotecnología es un área científica moderna que estudia el comportamiento de los materiales a nanoescala, es decir, a nivel de cientos de átomos y moléculas. Esta área ha revolucionado la ciencia de los materiales, permitiendo fabricar materiales de pequeñísimas dimensiones y de las más variadas características. En el ámbito biológico, la nanotecnología ha permitido la interacción con los organismos a nivel celular y subcelular, pasando a ser una herramienta fundamental en el estudio y tratamiento de enfermedades, en el desarrollo de fármacos y en la fabricación de dispositivos médicos. Dentro de las distintas nanoestructuras, las nanopartículas magnéticas son particularmente interesantes para aplicaciones en biomedicina, ya que pueden ser manipuladas “a distancia” por medio de campos magnéticos externos.

En los últimos años se han investigado y desarrollado distintas tecnologías que utilizan nanopartículas magnéticas en biomedicina, ya sea con propósitos terapéuticos como de diagnosis, destacando su utilización para dirigir los remedios de manera directa a las células damnificadas (De Jong & Borm, 2008), para ablación de tumores (Ito, Shinkay, Honda, & Kobayashi, 2005; Lin, Naskar, & Giannelis, 2005), y como agentes de contraste en técnicas de imágenes magnéticas (Pankhurst et al., 2003).

En la ablación de tumores se busca dar muerte a las células cancerígenas de manera local (Maier-Hauff et al., 2007) (Maier-Hauff et al., 2011), evitando así una serie de efectos secundarios que generan las quimioterapias actuales. En general, el grueso de las investigaciones de ablación tumoral ha estado enfocado en el uso de pequeñas nanopartículas magnéticas esféricas que generan necrosis celular por medio de energía calórica (hipertermia).

Una alternativa a estos métodos podría ser la generación de muerte celular por medio de daño mecánico, al producirse un contacto directo entre nanopartículas y estructuras celulares. Recientemente fue probada la generación de muerte celular por medio de nanocilindros magnéticos (Fung et.al, 2008), pero no se ha estudiado la causa de muerte celular ni los efectos locales que los nanocilindros en movimiento tienen en las

células. En este trabajo se investiga de manera individual el comportamiento mecánico de nanocilindros magnéticos dentro del material celular, como posible opción para generar muerte celular por medio de deformación y perturbación de sus estructuras internas.

1.2 Motivación

Los tratamientos basados en hipertermia utilizan campos magnéticos alternantes de alta frecuencia (100 kHz – 1 MHz) para excitar nanopartículas aproximadamente esféricas implantadas en el tejido cancerígeno. Estos tratamientos se ven restringidos por el simultáneo calentamiento que tienen las células sanas al ser influenciadas por campos magnéticos de alta frecuencia (Bárcena, C., Sra, A. K., & Gao, J., 2009). Aquí describimos una alternativa a esta técnica usando nanocilindros magnéticos para producir daño mecánico mediante un campo de baja frecuencia (1-10 Hz). Las principales ventajas de esta estrategia es la acción altamente localizada y la relativa facilidad con que campos de baja frecuencia pueden ser generados.

La forma alargada que tienen los nanocilindros ferromagnéticos les permite generar torques de alta intensidad al ser influenciados por un campo magnético externo de baja frecuencia, lo que despierta interés en su utilización para generar daño debido a esfuerzos mecánicos. Además, se ha mostrado que nanocilindros de distintos materiales (óxidos de hierro, níquel) pueden ser fácilmente implantados dentro de células mostrando un alto nivel de biocompatibilidad con el ambiente celular (Das et al., 2010).

La alta complejidad que tienen las estructuras celulares hacen muy difícil de predecir la resistencia mecánica que pueden imponer a los nanocilindros, por lo tanto, para analizar la posibilidad de desarrollar este tipo de tratamientos es necesario realizar un estudio in vivo del comportamiento de éstos al interior de las células.

1.3 Hipótesis

La hipótesis de esta investigación es que nanocilindros magnéticos pueden generar esfuerzos mecánicos que perturben y deformen las estructuras intracelulares, siendo un potencial mecanismo de daño celular.

1.4 Objetivos

El principal objetivo de esta tesis es poder analizar el comportamiento mecánico de nanocilindros magnéticos de platino-níquel en el interior de células vivas y evidenciar perturbación y deformación celular al aplicarles un campo magnético externo. Dentro de los objetivos específicos de la investigación se propone:

- 1) Diseñar y construir un sistema capaz de generar un campo magnético rotatorio (CMR) de intensidad superior a 0,1 T y de baja frecuencia (1-10 Hz).
- 2) Fabricar, por medio de deposición electroquímica, nanocilindros magnéticos de platino-níquel capaces de girar junto al CMR. Además, los nanocilindros deben poder analizarse de manera individual, evitando las aglomeraciones.
- 3) Insertar los nanocilindros en un ambiente extracelular y dentro de células.
- 4) Manipular los nanocilindros que ingresaron a las células utilizando el CMR. Para esto se desea observar el movimiento que tienen los nanocilindros con distintas intensidades de campo, demostrando que pueden perturbar el ambiente celular. Además, se busca evidenciar deformación celular causada por el torque magnético inducido en los nanocilindros.

1.5 Magnetismo en nanocilindros de Pt-Ni

El níquel, al igual que el hierro y el cobalto, es considerado un material ferromagnético. Estos materiales destacan por mostrar una alta interacción entre sus momentos atómicos magnéticos, la que tiende a producir una alineación de éstos. Así, los materiales ferromagnéticos están formados por grupos de momentos magnéticos alineados llamados dominios.

Cuando estos materiales se ven expuestos a un campo magnético intenso, sus dominios magnéticos tienden a alinearse con éste, magnetizándose. Las características de magnetización que presenta cada material, tales como remanencia y coercividad, no dependen solamente de su composición química, sino que también de la organización microscópica de su estructura cristalina. Por ello, un material va a tener direcciones preferentes de magnetización, las que van a depender de su anisotropía magnética. Existen varios tipos de anisotropías que pueden influir en la anisotropía magnética efectiva que tiene un material, destacando la anisotropía magneto-cristalina y la anisotropía de forma (Moskowitz, 1991). La primera es una propiedad intrínseca del material, que se refiere a la magnetización que se alcanza según sus distintas orientaciones cristalográficas. La segunda indica la dependencia que tiene la magnetización del material respecto de la forma y tamaño que tienen sus granos.

El níquel tiene una baja anisotropía magneto-cristalina (Fung et al., 2008) y, por lo tanto, las características magnéticas de estos nanocilindros dependen principalmente de su anisotropía de forma. De esta manera, el eje principal de los nanocilindros va a ser la dirección energéticamente favorable de magnetización y la dirección del momento magnético μ de los nanocilindros va a quedar definida por la orientación de su eje principal.

El torque magnético generado en un nanocilindro por un campo magnético $\vec{H}$ externo está definido por la relación:

$$\tau = \mu \times \vec{H}$$

donde el momento magnético $\vec{m} = \vec{M}V$ es el producto de la magnetización $\vec{M}$, el volumen V y la densidad ρ del material.

En partículas de dimensiones nanométricas, el tamaño de éstas empieza a ser comparativo con el de sus dominios magnéticos, lo que puede causar que su comportamiento magnético difiera de la respuesta típica mostrada por ese material (como ocurre en el caso de las partículas con monodominio). Para el caso de nanocilindros de níquel de varios micrones de largo, el comportamiento es bastante similar al del níquel común, mostrando una magnetización de saturación cercana a $50 \text{ A}\cdot\text{m}^2\text{kg}^{-1}$ (Prina-Mello et al., 2006).

1.6 Metodología

1.6.1 Fabricación de nanocilindros magnéticos

Se fabricaron nanocilindros con segmentos de distintos metales (Fig. 2). Una sección fue compuesta por níquel, que les va a dar las características ferromagnética, y la otra fue compuesta por platino (no magnético), que va a servir para evitar la aglomeración de nanocilindros y para poder analizar el efecto del tamaño en la movilidad de los nanocilindros una vez depositados en el ambiente celular.

Los nanocilindros fueron fabricados por medio de deposición electroquímica de soluciones metálicas (Celedón et al., 2009). Este proceso se basa en depositar los cationes de la solución acuosa sobre un objeto conductor, por medio del paso de corriente eléctrica.

Sistema de electrodeposición

Se utiliza una celda electroquímica de tres electrodos, la que se llena con la solución electrolítica que tiene los iones a depositar. Este mecanismo de electrodeposición utiliza un electrodo de trabajo, uno auxiliar y otro de referencia. El electrodo de trabajo (en el que se realiza la deposición) va conectado a una superficie de cobre que hace de sustrato

conductor. Como electrodo auxiliar se utiliza un alambre de platino cuya función es hacer la conexión con el electrolito para cerrar el circuito y permitir el paso de corriente. Por último, se utiliza un electrodo de referencia Ag/AgCl de potencial estable, que sirve para medir el potencial en comparación con los otros electrodos de la celda.

Utilizando un potenciostato se fija un voltaje negativo en el electrodo de trabajo respecto al de referencia, generando una corriente directa entre el electrodo de trabajo (cátodo) y el electrodo auxiliar (ánodo), causando la migración de los cationes metálicos de la solución acuosa hacia el cátodo, en donde son depositados dentro de una membrana porosa para formar los nanocilindros (Fig. 1).

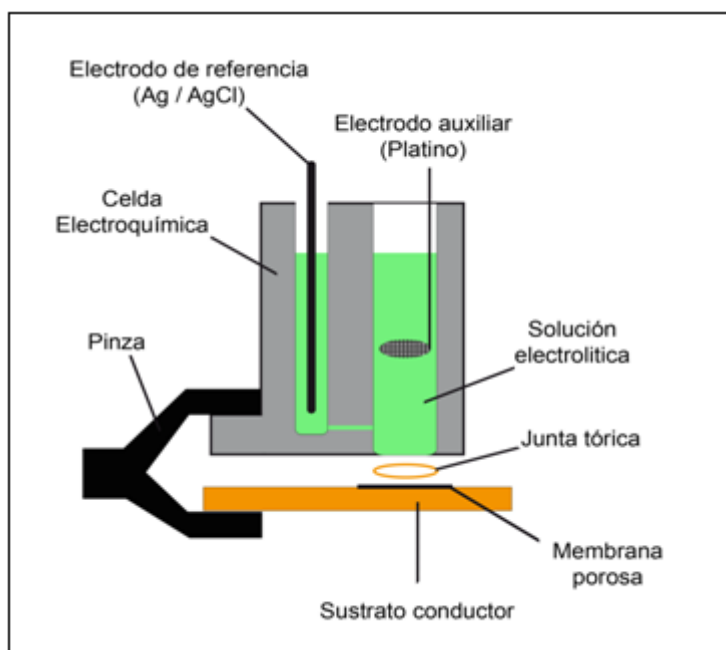


Figura 1: Esquema del sistema de electrodeposición utilizado.

Preparación de la Membrana

Para darle forma de nanocilindros al material depositado se utiliza una membrana de aluminio generada por oxidación anódica (AAO: anodized aluminum oxide template), la que en nuestro caso contiene poros de 200 nm de diámetro y 100 μ m de largo.

Para asegurar una buena conexión de la membrana con el cátodo del circuito y para tapar la base inferior de los nanoporos se depositó una delgada lámina de cobre de alta pureza (150 nm) en una de sus superficies, utilizando una fuente resistiva de tungsteno ubicada dentro de una cámara de vacío a 10⁻⁵ Pa.

Preparación de las soluciones electrolíticas

Previo a la deposición de platino y níquel, se va a depositar un segmento de cobre para asegurar la adecuada conexión de cada poro al cátodo.

A continuación se dan a conocer las concentraciones relativas de las distintas soluciones por litro de agua deionizada:

- a) Sulfato de cobre: 0,5M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, pH = 1,0
- b) Hexacloroplatinato de amonio: 17mM $(\text{NH}_4)_2\text{PtCl}_6$ y 250mM Na_2HPO_4 , pH = 7,8
- c) Sulfate de níquel: 0,5M $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 0,67M H_3BO_3 , pH = 3,8

Estas soluciones son preparadas el mismo día de la deposición, y son agitadas hasta alcanzar homogeneidad en la solución. Los tiempos requeridos de agitación para el cobre, platino y níquel, son de 1, 4 y 2 horas respectivamente.

Deposición de las soluciones:

Para asegurar una correcta deposición, se debe llenar la celda electroquímica con la solución correspondiente y se debe dejar reposar el tiempo suficiente para permitir que los nuevos iones metálicos fluyan hacia los poros de la membrana. Se dejan reposar durante 1,5 horas el cobre y el níquel, mientras que el platino requiere de un reposo de 2,5 horas. Además, entre cada deposición se debe lavar la celda varias veces y dejar reposar en agua deionizada durante 1,5 horas para asegurar que los iones del metal anterior fluyan hacia afuera de los poros de la membrana.

Primero fue depositado el cobre, luego el platino y por último el níquel. Se fabricaron nanocilindros de 3 μm y 5 μm de longitud, con razones de platino/níquel de 2:1 y 4:1, en donde la longitud de cada sección queda determinada por la carga eléctrica total circulada por el sistema. (Ver Anexo A1) El diámetro de los nanocilindros (200 nm) es determinado por el diámetro de los nanoporos de la membrana.

Retiro de los nanocilindros:

Primero se separa la membrana del sistema de deposición y se coloca en un frasco de vidrio. La capa superficial de cobre es removida mediante un ataque químico utilizando BTP (Copper etchant BTP). La membrana es bañada con este químico durante 13 horas a 40°C. Luego, para remover la máscara de aluminio, los nanocilindros son sumergidos en 2 M KOH durante 11 horas a 65°C. Finalmente, los nanocilindros son mantenidos en etanol y ultrasonificados para obtener una completa dispersión.

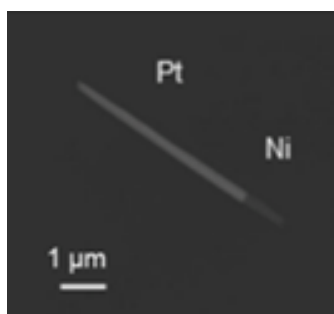


Figura 2: Fotografía de un nanocilindro de 5 μm obtenida con microscopía electrónica (SEM).

1.6.2 Diseño del sistema magnético rotatorio

Para obtener un campo magnético de alta intensidad en las muestras celulares a analizar, se utilizaron dos imanes permanentes de Nd – Fe – B (Neodimio – Hierro - Boro)

de dimensiones $25 \times 25 \times 10$ mm, los que deben ir acoplados correctamente al microscopio óptico.

Análisis del flujo magnético

Se analizaron dos posibles orientaciones que podrían tener los imanes (Fig. 3). Los imanes orientados de manera vertical (Fig. 3 (a)) tienen la máxima intensidad de campo sobre y bajo los imanes, mientras que aquellos orientados de manera horizontal (Fig. 3 (b)) muestran una intensidad máxima de campo en la zona entre imanes. Como las muestras son colocadas bajo los imanes en el eje vertical central, la orientación vertical fue la óptima para maximizar la intensidad de flujo en ellas.

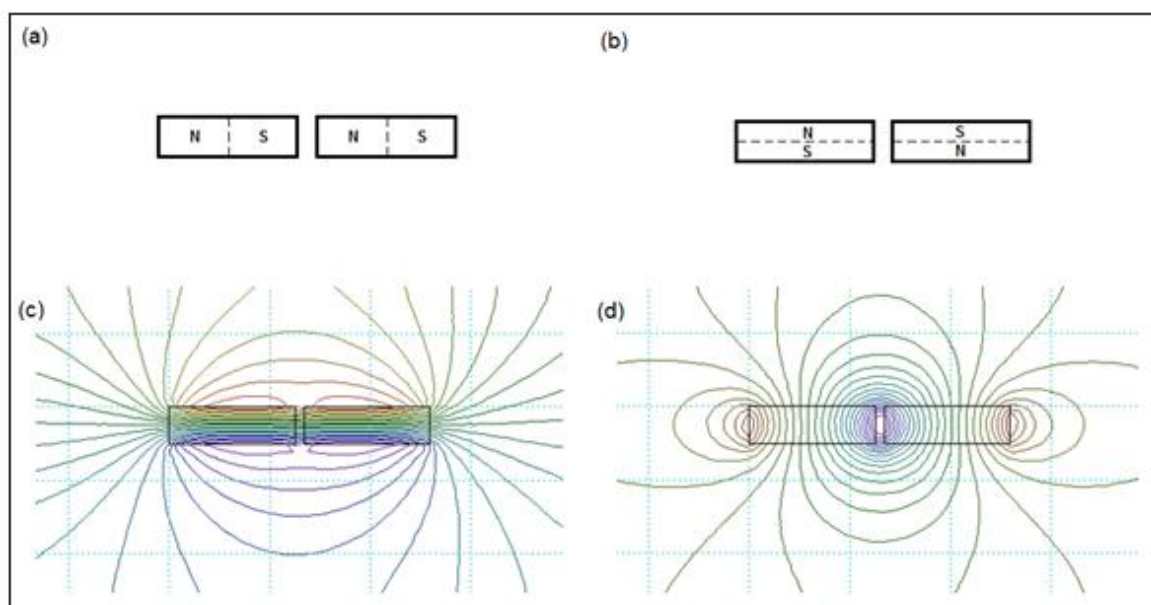


Figura 3: Análisis de las distintas configuraciones posibles de los imanes. Las imágenes (a) y (c) muestran la configuración horizontal, mientras que (b) y (d) muestran la configuración vertical. Se muestran las líneas de campo magnético que tienen ambas orientaciones, las que se realizaron con el programa de elementos finitos PERMAG 8.0 (Field Precision LLC).

Luego, para incrementar aún más la intensidad del campo magnético en las muestras, se colocan dos barras de fierro en la superficie superior lateral de los imanes (entre ambas barras queda un espacio para la luz), de tal manera que guíen la dirección del flujo, evitando que éste pierda intensidad por la separación de los imanes (Fig. 4 (a)). Por último, se analiza la separación que deben tener los imanes para que pase la luz del microscopio entre ellos. La distancia mínima requerida es cercana a 2 mm, analizando su influencia en el campo magnético, se decide diseñar el sistema con una separación de 3 mm pues asegura una buena iluminación y no disminuye de manera considerable la intensidad del flujo.

Fabricación del sistema giratorio.

Los imanes generan un flujo horizontal fijo de manera permanente en la posición de las muestras. Por lo tanto, para generar un campo horizontal giratorio de baja frecuencia, se empotran los imanes a un rodamiento, el que girará empujado por un motor eléctrico de velocidad regulable.

Se midieron, utilizando un gaussímetro (4048, F.W.Bell), las intensidades de campo magnético producidas por el sistema a lo largo del eje vertical donde se colocan las muestras (eje x en Figura 4a), obteniendo una intensidad de hasta 890 mT (Fig. 4(b)). Las muestras son colocadas a una distancia variable entre 11 y 33 mm bajo el centro de los imanes, lo que las expone a un campo magnético de intensidad entre 300 y 20 mT, respectivamente.

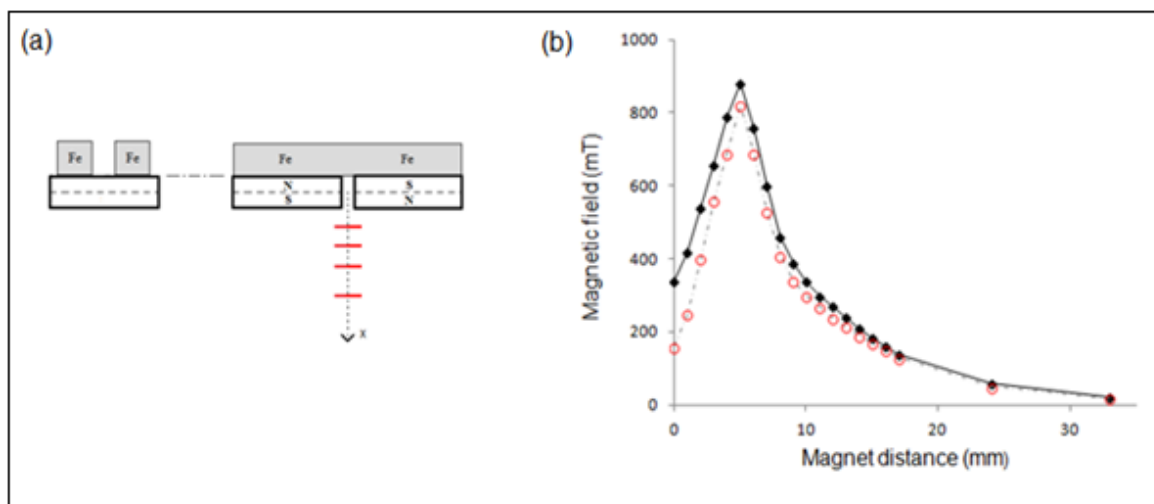


Figura 4: (a) Esquema de los imanes con el hierro, destacando las ubicaciones de las distintas muestras analizadas (líneas rojas horizontales). (b) Variación del campo magnético a medida que las muestras se van alejando del centro de los imanes.

1.6.3 Cultivo celular

Se cultivaron fibroblastos de embriones de ratones NIH/3T3 en placas plásticas utilizando medio de cultivo DMEM (Dulbecco's modified Eagle's) con alta glucosa. Este medio fue suplementado con 10% de suero fetal de ternera y 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). El cultivo era mantenido en una incubadora a 37°C, en un ambiente húmedo y con un 5% de CO₂. Cada 3-4 días las células eran “pasadas” en la relación 1/5 para mantener una baja confluencia. (Ver Anexo A2)

1.6.4 Inserción de nanocilindros en las células

Las células fueron colocadas en orificios de silicona de 9 mm de diámetro utilizando un volumen de 60 µl y una densidad de $\square$ 4000 células por muestra. Estas muestras fueron incubadas por 24 horas para asegurar la adherencia de las células al fondo y obtener una correcta confluencia. Luego, grupos de nanocilindros de 5 y 2 µm se separaron del etanol y se suspendieron en DMEM. A este fluido magnético se le aplicó ultrasonido por 5 segundos y fue depositado inmediatamente en las muestras celulares para

evitar aglomeraciones. Finalmente, las muestras son incubadas por varias horas para permitir la implantación de los nanocilindros en el interior de las células.

1.6.5 Análisis mecánico de los nanocilindros

Primero se aplicó una revolución del campo magnético rotatorio a las muestras y se analizó la respuesta de nanocilindros expuestos a distintas intensidades de campo. La intensidad fue regulada acercando y alejando los imanes de las muestras, según era requerido. Como segundo experimento, las muestras fueron expuestas a un campo magnético rotatorio de 300 mT y frecuencia de 10 Hz durante 40 minutos para estudiar el comportamiento de los nanocilindros y de las células en el tiempo.

El comportamiento de los nanocilindros es registrado por medio de fotografías utilizando un microscopio óptico invertido (Motic, AE2000) con contraste de fase.

1.7 Resultados

1.7.1 Inserción de nanocilindros en las células

Se analizaron las muestras luego de 24 horas de incubación con los nanocilindros. Los resultados obtenidos de implantación son los siguientes:

- Nanocilindros de 2 μm : Se obtuvo una tasa promedio de inserción cercana al 70%. Además la concentración promedio de implantación fue de 1 nanocilindro por célula, con una variación de 0 a 8 nanocilindros por célula.
- Nanocilindros de 5 μm : Se obtuvo una tasa promedio de inserción cercana al 30%. En promedio se obtuvo una concentración de 1 nanocilindro por célula, con una variación de 0 a 5 nanocilindros por célula.

1.7.2 Comportamiento de nanocilindros expuestos a distintas intensidades de campo magnético

Como primer resultado, se observa que los nanocilindros son capaces de rotar al interior de las células, tratando de orientarse en sincronía con la dirección del campo magnético aplicado. Aunque la rotación registrada era típicamente parcial, ésta prueba la capacidad que tienen los nanocilindros de perturbar el ambiente intracelular al ser expuestos a un campo rotatorio externo (Fig. 5).

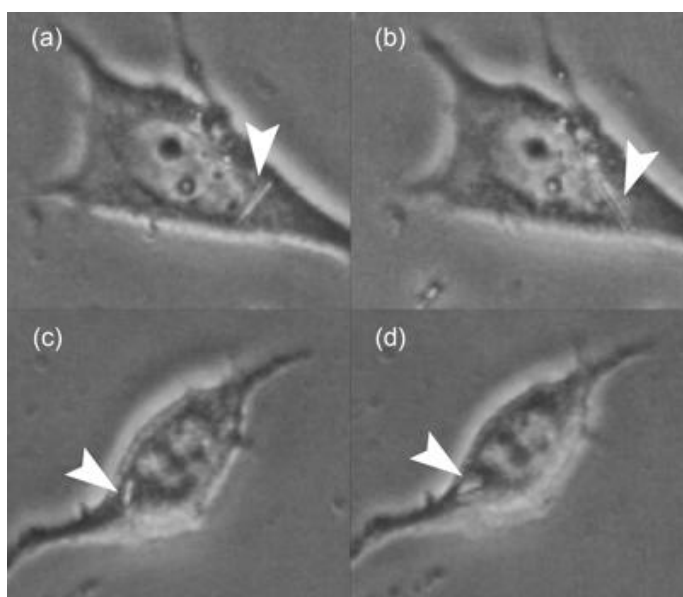


Figura 5: Movimiento restringido adquirido por los nanocilindros al ser expuestos a un campo magnético rotatorio de 300 mT. Las imágenes (a) y (b) muestran el desplazamiento de un nanocilindro de 5 μm , mientras que las imágenes (c) y (d) muestran el de un nanocilindro de 2 μm . Ambos son restringidos por los alrededores del núcleo y de la membrana plasmática.

Para cuantificar el movimiento de cada nanocilindro se define un “ángulo de máximo desplazamiento” denominado θ . Éste se refiere al máximo ángulo obtenido entre las distintas orientaciones adquiridas por el eje principal del nanocilindro durante una revolución completa del campo magnético (Fig. 6 (a)). Se midió el ángulo de máximo

desplazamiento que tenían 20 nanocilindros bajo campos magnéticos de distintas intensidades entre 20 y 300 mT (Figura 6 (b)). Se registró que con intensidades inferiores a 20 mT los nanocilindros rotaban en el medio extracelular, pero no mostraban movimiento alguno en el interior de las células. Para intensidades de 60 mT y superiores, se observó rotación de los nanocilindros dentro de las células, el que aumentaba a medida que incrementaba la intensidad del campo y el que luego disminuía al decrecer la intensidad de campo.

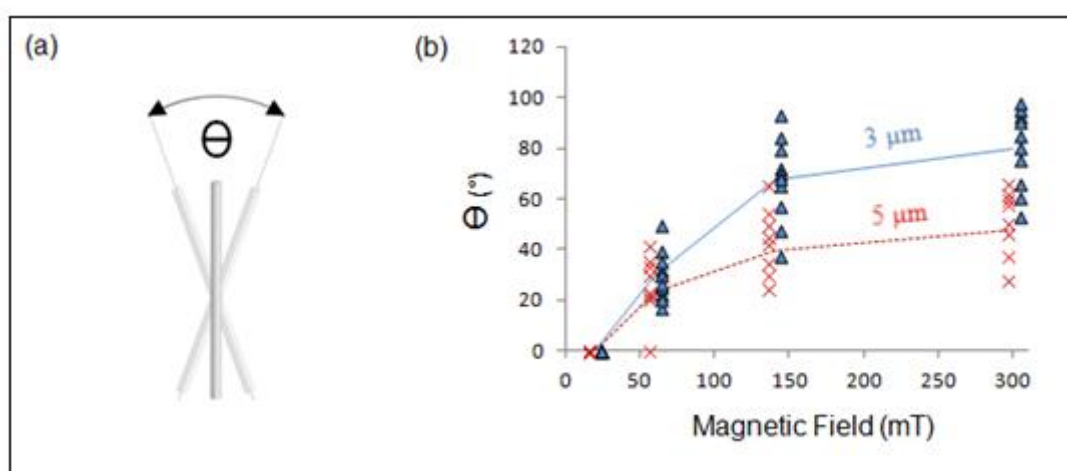


Figura 6: El esquema de la imagen (a) explica el “ángulo de máximo desplazamiento” denominado Θ . El gráfico (b) muestra el desplazamiento adquirido por los nanocilindros a medida que aumenta la intensidad del campo rotatorio a la que se exponen.

Se registraron deformaciones de estructuras celulares, causadas por los nanocilindros de manera individual. Entre ellas, destacan las deformaciones de la membrana plasmática y del núcleo (Fig. 7).

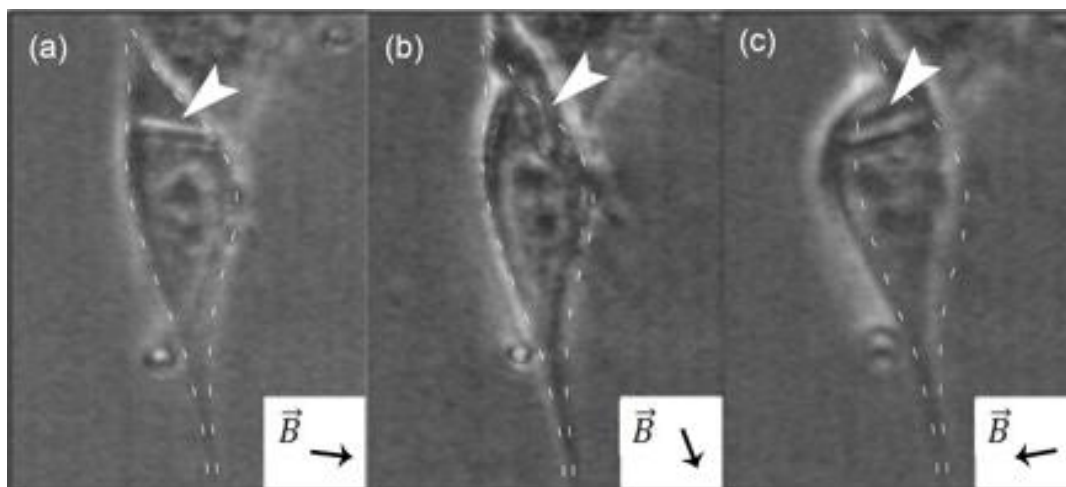


Figura 7: Las imágenes muestran la deformación del núcleo y de la membrana celular producidas por un nanocilindro.

1.7.3 Comportamiento de los nanocilindros en el tiempo ante un campo magnético rotatorio

Los nanocilindros de 2 μm mostraron, en promedio, un ángulo de máximo desplazamiento cercano a 90° al inicio, el que aumentó en un 135% luego de 20 minutos de aplicación del campo magnético (Fig. 8 (b)). Algunos de estos nanocilindros alcanzaron la rotación completa luego de 10-20 minutos (Fig. 9), lo que se cuantifica en la Figura 9 como 360° , mientras que otros no mostraron un aumento significativo en su movimiento. Además, se observaron pequeñas traslaciones de algunos nanocilindros.

Los nanocilindros de 5 μm no registraron rotación completa en todo el tiempo de aplicación, quedando su movimiento restringido permanentemente a un ángulo de máximo desplazamiento de alrededor de 60° , en promedio (Fig. 8 (a)).

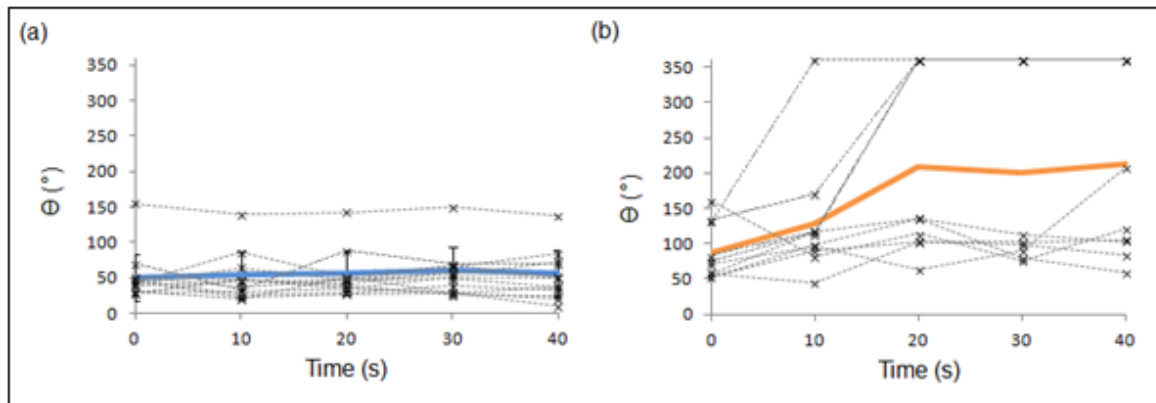


Figura 8 Ángulo de máximo desplazamiento obtenido por los nanocilindros de 5 μm (a) y por los de 2 μm (b) en el tiempo. Las líneas gruesas de color muestran la media de los desplazamientos.

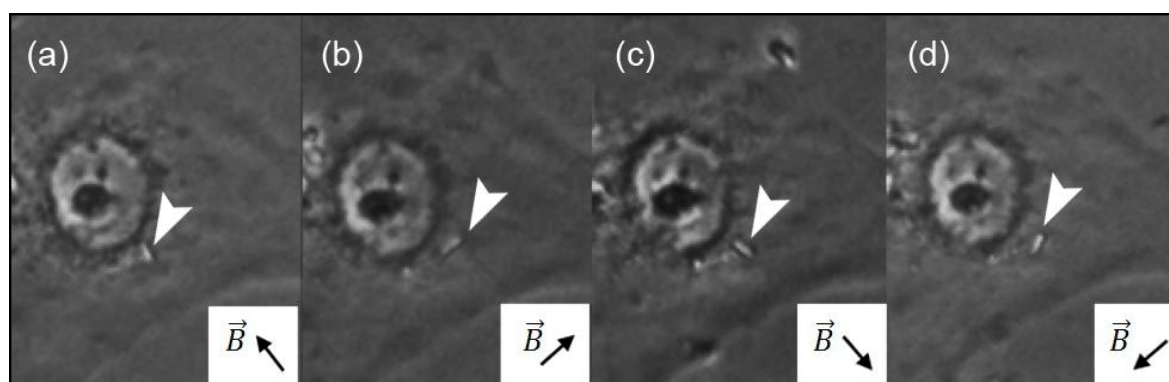


Figura 9: Giro completo obtenido por un nanocilindro de 2 μm en sincronismo con la rotación del campo magnético externo.

1.8 Análisis y discusión

Los nanocilindros adquirieron un movimiento parcial al interior de las células debido a la resistencia mecánica del ambiente intracelular. El nulo desplazamiento mostrado por los nanocilindros ante intensidades de 20 mT prueba la necesidad de un mínimo torque para rotar dentro del citoplasma. Además, el aumento y la disminución del

movimiento rotatorio mostrado por los nanocilindros al crecer y decrecer la intensidad de campo, respectivamente, prueban la capacidad que tienen de deformar elásticamente el citoesqueleto celular, además de mostrar que el ambiente intracelular no es puramente viscoso.

Analizando estadísticamente el desplazamiento que tienen los nanocilindros en el tiempo (test t de Welch), se obtiene que el ángulo de máximo desplazamiento de nanocilindros de 2 μm , en promedio, cambia significativamente luego de aplicarles un campo magnético rotatorio de 300 mT durante 40 minutos (grados de libertad $\approx 10,5$, valor $p < 0,025$), mientras que en los nanocilindros de 5 μm no varía de manera significativa (grados de libertad ≈ 24 , valor $p \gg 0,025$). Este análisis es consistente con el supuesto de que el menor tamaño de los nanocilindros de 2 μm les permite acomodarse entre las estructuras celulares próximas a ellos mientras se exponen al campo magnético, permitiéndoles mayor movilidad. De esta manera, los pequeños movimientos traslacionales y rotacionales evidenciados en los nanocilindros de 2 μm ocurrieron probablemente debido a empujes, compresiones y desplazamientos de las estructuras cercanas. Por otro lado, los nanocilindros de 5 μm aplican un torque magnético similar al de los de 2 μm (correspondiente a 1 μm de níquel ferromagnético) pero ante un área resistiva de mayor tamaño, lo que dificulta su movilidad. Además, los nanocilindros de 5 μm están típicamente limitados por extenderse hasta sectores próximos al núcleo y la membrana, los que destacan por su alta rigidez.

Los nanocilindros pertenecientes a un mismo grupo de electrodeposición (un grupo de 2 μm y otro de 5 μm) son capaces de generar fuerzas de magnitudes similares, debido a que tienen el mismo tamaño y forma. Sin embargo, el ángulo de máximo desplazamiento obtenido difiere bastante entre nanocilindros de un mismo grupo. Estas diferencias de movilidad pueden atribuirse a las distintas propiedades visco-elásticas mostradas por el ambiente cercano a cada nanocilindro, las que pueden variar dependiendo de la orientación y ubicación que tiene cada nanocilindro dentro de la célula. Las células son sistemas anisotrópicos que tienen un citoesqueleto de alta complejidad (Plodinec et al., 2011). De esta manera, presentan una rigidez heterogénea, causando que la movilidad mostrada por los nanocilindros sea diferente en cada caso.

Torque magnético

La curva de magnetización para nanocilindros de níquel desarrollada por Prina-Mello et al. (2006) nos muestra que los 300 mT son capaces de producir una magnetización cercana a la de saturación ($\approx 50 \text{ A}\cdot\text{m}^2\text{kg}^{-1}$), la que es similar a la magnetización de saturación del níquel común: $55,4 \text{ A}\cdot\text{m}^2\text{kg}^{-1}$ (O'Reilly et al., 2006). Luego, el torque magnético generado en los nanocilindros (correspondiente al torque inducido en un nanocilindro de níquel de $1 \mu\text{m}$) es de

$$\tau = 4,2 \cdot 10^{-15} \text{ Nm.}$$

Este torque produce una fuerza máxima en los extremos de los nanocilindros de $2,1 \cdot 10^{-9} \text{ N}$ y $8,4 \cdot 10^{-10} \text{ N}$ en los nanocilindros de $2 \mu\text{m}$ y $5 \mu\text{m}$, respectivamente. Estos valores son comparables a la fuerza necesaria para deformar una célula completa ($10^{-7} - 10^{-9} \text{ N}$) (Caille et al., 2002). Utilizando un modelo sólido del citoplasma se estimó que un nanocilindro era capaz de generar esfuerzos de entre 1-50 kPa, suponiendo diferentes áreas de contacto.

Nanocilindros y las propiedades mecánicas de las células

Se han realizado numerosas investigaciones sobre las características mecánicas que tienen las células y las estructuras celulares. En relación a fibroblastos, las publicaciones sobre su módulo elástico (módulo de Young) entregan mediciones que varían entre 0,1 a 100 kPa, debido tanto a la variedad de métodos utilizados como a las variaciones de rigidez que muestran las distintas células de un mismo tipo. El grueso de la estructura celular está formado principalmente por el citoesqueleto, en donde la actina tiene un rol predominante en la determinación de sus características visco-elásticas. La actina tiene un módulo elástico de alrededor de 1 kPa, lo que indica que nanocilindros de níquel podrían ser capaces de deformarla. Esto es consistente con la deformación encontrada en el citoplasma debido a los nanocilindros, sin embargo, la deformación observada fue parcial, lo que puede deberse a la presencia de varios filamentos de actina a medida que el nanocilindro se

desplaza, lo que causaría un efecto aditivo de resistencia. Además, los filamentos de actina pueden entrelazarse formando complejas matrices (Gardel et al., 2004) las que aumentan la rigidez.

El desplazamiento de los nanocilindros se vio notoriamente restringido al acercarse a sectores próximos al núcleo o a la membrana plasmática. El núcleo y la membrana plasmática son ambos más rígidos que el citoplasma. Un completo análisis de la elasticidad de fibroblastos fue realizado por Plotnec et al. (2011) utilizando microscopía de fuerza atómica (AFM) indicando a la membrana celular como la parte más rígida de la célula, con un módulo elástico superior a 10 kPa. Además, el módulo elástico del núcleo es cercano a 5-8 kPa, unas 10 veces mayor que el citoplasma (Caille et al., 2002). Estas magnitudes son del mismo orden de magnitud que el máximo esfuerzo que pueden generar los nanocilindros. Por lo tanto, es de esperarse que la mayoría de los nanocilindros no puedan deformar estas estructuras y su movimiento sea completamente anulado al acercarse a ellas.

Las perturbaciones generadas por el movimiento de los nanocilindros inducen situaciones estresantes que pueden comprometer la supervivencia de las células. De esta manera, la muerte celular evidenciada en investigaciones anteriores podría ser atribuida a la deformación y perturbación de las estructuras celulares, generadas por los nanocilindros. Además del potencial que tienen los nanocilindros de generar muerte celular, ensayos de toxicidad han mostrado que su implantación al interior de fibroblastos no compromete la vitalidad de esas células (Safi et al., 2011), probando la biocompatibilidad de los nanocilindros para utilizarlos en aplicaciones médicas.

Por otro lado, esta investigación prueba la posibilidad de manipular nanocilindros insertados en células “a distancia”. Esta característica, sumado a que su implantación no compromete la vitalidad celular, hace de los nanocilindros una posible herramienta para realizar análisis “in vivo” de las propiedades mecánicas de las estructuras celulares. En general, los estudios “in vivo” e “in vitro” de las propiedades que tienen las células son desarrollados desde el exterior de ellas (principalmente por medio de microscopía de fuerza atómica, AFM) en donde la manipulación experimental puede inducir errores en los resultados. En un análisis utilizando nanocilindros, estos interactuarían directamente con

las estructuras celulares en su ambiente intracelular, lo que permitiría conocer con mayor precisión las características mecánicas de ellas.

1.9 Conclusiones y perspectivas a futuro

Como principal conclusión de este trabajo, se probó que nanocilindros de Pt-Ni tienen la capacidad de generar perturbación y deformación celular, demostrando la hipótesis inicialmente propuesta. Además, se estimó que nanocilindros de estas dimensiones pueden generar tensiones de intensidades similares al módulo elástico que tienen ciertas estructuras celulares, dando posibilidad a la generación de deformación permanente en algunos sectores celulares.

No se observó daño celular, ni rompimiento de estructuras. Sin embargo, la inducción de muerte celular ha sido probada utilizando nanocilindros similares en condiciones equivalentes, por lo tanto, es probable que esta perturbación celular leve, pero constante, sea causa de necrosis celular.

Analizando el movimiento inducido en los nanocilindros bajo campos de distintas intensidades, se concluye que a medida que aumenta la intensidad de campo, el desplazamiento de los nanocilindros también aumenta. Por lo tanto, si se desea maximizar el daño celular hay que maximizar la intensidad de campo magnético que reciben los nanocilindros.

Como trabajo a futuro, es necesario confirmar que estas deformaciones celulares causan la muerte celular. En caso contrario, se debe aumentar la intensidad del campo aplicado, dentro de los niveles de seguridad del cuerpo humano (lo que puede ser incluso a intensidades sobre 2T por cortos períodos), para aumentar el daño y, posiblemente, la capacidad de destrucción celular. Una vez que esté totalmente confirmada la inducción de muerte celular, es necesario evaluar el grado de muerte que se genera según las distintas intensidades de campo y tiempos de aplicación, y así poder definir un procedimiento óptimo para una futura prueba de éste en tumores reales. De esta manera, el uso de nanocilindros para la ablación tumoral puede llegar a ser una alternativa real a la hipertermia como tratamiento alternativo de enfermedades cancerígenas.

2. CAPITULO DE PUBLICACIÓN

Local microrheological response of cells to the controlled rotation of magnetic nanorods

Matias Castillo¹, Roberto Ebersperger², Denis Wirtz^{3,4,5}, Daniel E. Hurtado⁶, Magdalena Walczak¹, Alfredo Celedon^{1,7}

¹ Department of Mechanical and Metallurgical Engineering, Pontificia Universidad Católica de Chile, Vicuña Mackenna 4860, Macul, Santiago, Chile

² Department of Pharmacy, Pontificia Universidad Católica de Chile, Vicuña Mackenna 4860, Macul, Santiago, Chile

³ Department of Chemical and Biomolecular Engineering, The Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland 21218, USA

⁴ Johns Hopkins Physical Sciences - Oncology Center, The Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland 21218, USA

⁵ Departments of Oncology and Pathology and Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland 21205, USA

⁶ Department of Structural and Geotechnical Engineering, Pontificia Universidad Católica de Chile, Vicuña Mackenna 4860, Macul, Santiago, Chile

⁷ Institute for NanoBiotechnology, The Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland 21218, USA

The mechanical response of magnetic nanorods implanted intracellularly and exposed to a low frequency rotational magnetic field was analyzed as a potential method for tumor ablation. Nanorods (Pt-Ni, ~200 nm diameter) fabricated by electrodeposition in templates of porous alumina with lengths of ~2 μm or ~5 μm were inserted into NIH/3T3 fibroblasts and manipulated with the rotational field. Nanorod rotation was observed only for magnetic fields greater than 20 mT, suggesting a Bingham-type behavior of the cytoplasm. Higher fields produced displacement and deformation of the intracellular material. The cell nucleus and cell membrane were significantly deformed by nanorods actuated by 300 mT fields. However, no permanent structural damage or cell death was observed even after repeated deformation. Our results demonstrate that nanorods are an effective tool to probe the intracellular environment and that NIH/3T3 cells are resilient to large and repeated internal mechanical perturbations.

Keywords: magnetic nanoparticles, nanorods, rotational magnetic field, cellular damage.

INTRODUCTION

Magnetic nanoparticles are a promising tool for biological and therapeutic applications. Their low dimensions allow facile penetration into cells,¹ and controlled interaction with cellular proteins,^{2,3} whereas the magnetic properties enable non-invasive localized treatments using external magnetic fields without significant damage to the surrounding tissues. Recently, magnetic particles have been used in a number of biomedical applications, such as tumor ablation,^{4,5,6} drug delivery⁷ and magnetic resonance diagnostics.⁸

In magnetic tumor ablation, magnetic nanoparticles are used to produce localized cellular destruction,^{9,10} most commonly by thermally exciting the implanted nanoparticles which generates hyperthermia in the malignant tissue. Thermal energy is provided by a high-frequency magnetic field (kHz to MHz), which induces fluctuations of the particle's magnetic moments and in response, they release heat to the surrounding tissue.¹¹ The frequency at which maximum power is thermally dissipated is specific to each nanoparticle-medium environment,¹² and the process typically occurs with no movement of the nanoparticles so that no mechanical damage is involved.

An alternative method for cellular destruction consists in inducing both thermal and mechanical damage by forcing displacement of magnetic particles within the tissue. In this approach, a low-frequency magnetic field (1-10 Hz) rotates the nanoparticle, producing frictional energy and mechanically perturbing the cellular environment, possibly causing cell death as shown for Ni nanowires.¹³ However, to the best of our knowledge, the extent

to which magnetic nanoparticles are capable of breaking and deforming cellular structures has not been thoroughly studied.

In this work, we analyze the mechanical response of individual platinum-nickel nanorods implanted into NIH/3T3 mouse fibroblasts – a model system extensively used in cell biology – exposed to a low-frequency magnetic field.

MATERIALS AND METHODS

Nanorod fabrication

Pt-Ni nanorods (Fig. 1(a)) were fabricated by electrochemical deposition in the pores of anodized aluminum oxide (AAO) membranes (Whatman, Springfield Mill, Kent, UK).¹⁴ AAO templates were sputtered with a 150 nm copper layer to block the nanopores and to act as the cathode in subsequent electrodeposition. Negative potential sequences were used to generate the current required to deposit the different metal electrolyte solutions. The first deposition was a sacrificial segment of Cu obtained from a copper sulfate solution (0.5 M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, pH = 1.0). Then, the Pt segment (non-magnetic) was deposited from an ammonium hexachloroplatinate solution (17 mM $(\text{NH}_4)_2\text{PtCl}_6$ and 250 mM Na_2HPO_4 , pH = 7.8). The Ni deposition from a Ni sulfate solution (0.5 M $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and 0.67 M H_3BO_3 , pH = 3.8) determined the strength of the magnetic dipole of the nanorods. The length of each metallic segment was determined by the total current passed per unit surface during each deposition. To remove the copper layer, the templates were submerged in a copper etchant bath, BTP (Transene, Danvers, MA, USA), for 13 h at 40°C. Similarly, the oxide membranes were removed in an 11 h bath of 2 M KOH at 65°C.

The released nanorods were finally sonicated to ensure dispersion and subsequently suspended in ethanol for storage.

Two types of nanorods were fabricated: 5 μm -long nanorods with a Pt/Ni ratio of 4:1 and 2 μm -long nanorods with a Pt/Ni ratio of 1:1. Both types of nanorods had a 1 μm -long nickel segment. The diameter of the nanorods was defined by the nominal diameter of the templates pores (~ 200 nm) (Fig. 1(a)). The two different sizes of the platinum segment allowed us to study the effect of size on the mobility of the nanorods inside the cells. It also helped avoid nanorod agglomeration and facilitate quantitative analysis of their movements with high temporal and spatial resolutions.

Cell culture and insertion of nanorods

NIH/3T3 mouse fibroblasts were cultured in polystyrene Petri dishes in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with high glucose, complemented with 1% antibiotics and 10% fetal bovine serum (FBS). The cells were maintained in a 5% CO_2 humidified atmosphere at 37°C . The cells were passaged and the growth medium was renewed every three days.

Cells were deposited onto 9 mm-diameter silicon wells (60 μl -volume each) with an initial density of 4000 cells per well. The samples were incubated for 24 h in the growth environment to obtain firm cell-cell and cell-matrix adhesion and high confluence. Groups of 5 μm and 3 μm length nanorods were separated from ethanol and suspended in DMEM. The resulting magnetic fluid was sonicated and deposited immediately in the wells containing the cells to avoid rod agglomeration. The samples were incubated for another 24 h to allow the insertion of nanorods into the cells.

The internalization of nanorods of similar dimensions in NIH/3T3 cells has been demonstrated by cross-sectional reconstruction of fibroblast,¹³ and by analyzing their Brownian motions.¹⁵

Generation and operation of rotational magnetic field

A uniform magnetic field was generated above the cells using two neodymium-iron-boron (NdFeB) permanent magnets. The magnets had a 25×25×10 mm cubic shape and were located above the samples with a 3 mm gap between them to allow illumination of the specimen (Fig.1(b)). To maximize the field intensity at the experimental probes location, a vertical antiparallel orientation of the magnets was used, with two iron blocks connecting the upper faces of the magnets to suppress and guide the magnetic flux (Fig. 1(b)). This configuration generates a steady horizontal magnetic field in the central vertical axis below the magnets (Fig. 1(c)). To produce a rotational horizontal field, the magnets were fixed on an angular contact ball-bearing system, and connected by gears to a D.C. generator for speed control.

The magnetic field intensity generated by this magnetic configuration was measured using a 4048 Gauss/Tesla Meter (F.W.Bell) (Fig. 1(d)). The central vertical axis measurements were drawn from the center of the magnets downwards (direction x in Fig. 1(b)), obtaining a maximum of 890 mT.

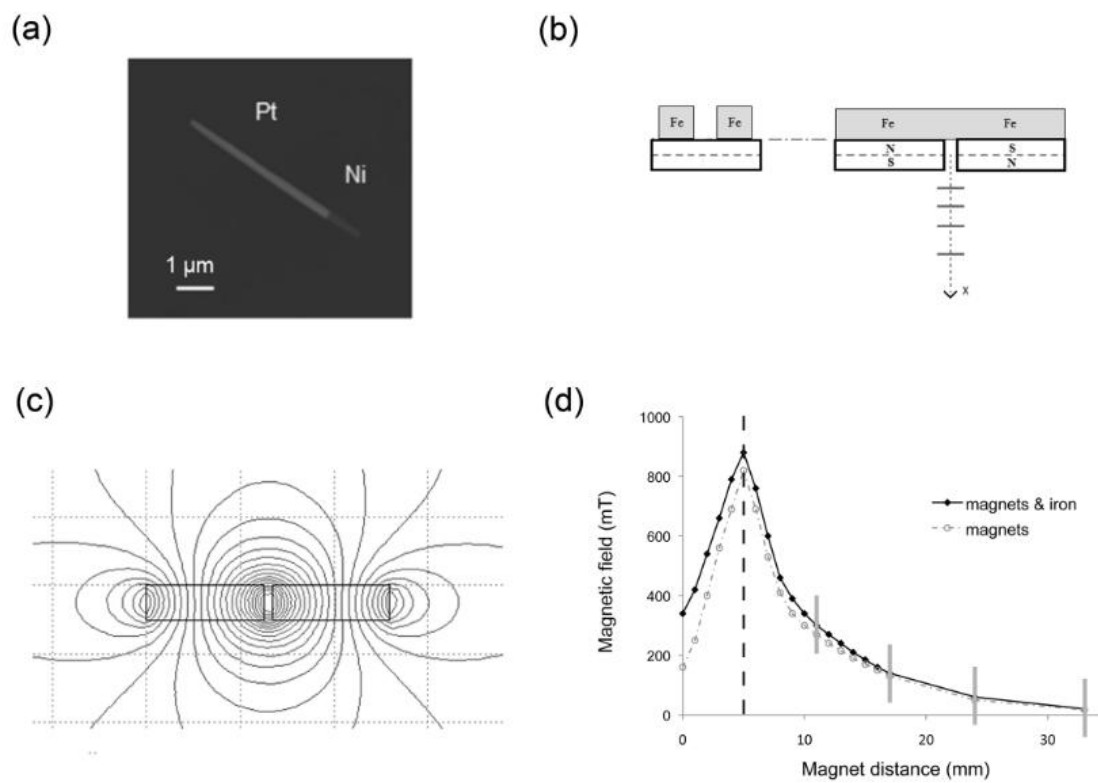


Figure 1 Magnetic nanorods and magnetic manipulators. (a) Scanning electron microscopy image of a 5 μm -long magnetic nanorod. (b) Side and front view of the pair of magnets with the iron yokes above. The horizontal lines below the magnets represent the different positions at which the samples were located. (c) Computer simulation of the magnetic field contours produced by the magnets. (d) Intensity of the magnetic field measured along the central axis (x-axis in Fig. 1(b)). Vertical lines correspond to the positions where the samples were located.

Application of controlled torque on nanorods

Two types of tests using different magnetic fields were applied. In the first test, a single revolution of magnetic field (which lasted 20 s) while the mechanical response of a

nanorod implanted in the cytoplasm of a cell was analyzed for different field strengths. The field strength was regulated by variation of the distance between the magnets and the samples. In the second test, a 300 mT rotating magnetic field was applied for 40 min with frequency of 10 Hz. Images of the samples were collected using an inverted optical microscope (Motic, AE2000). The mechanical response of the cells and the nanorods was analyzed in both bright field and phase contrast modes, using 10×, 20× and 40× objective lenses. The rotation attained by the nanorods was measured by quantitative image analysis.

RESULTS

Subcellular location of magnetic nanorods

Analysis of the movements of the nanorods following magnetic-field-induced rotation discriminated the nanorods that had been internalized by the cells from those that remained in the extracellular milieu. Two-micron nanorods were fully implanted in the cytoplasm of cells at a rate of ~70%, corresponding to an average concentration of 1 rod per cell (ranged from 0 to 8). Five-micron nanorods were implanted in the cytoplasm of cell at a rate of ~30%, with an average concentration of 1 rod per cell (ranged from 0 to 4).

The nanorods were mostly found in the cytoplasm, usually around the perinuclear region with no preferred orientation inside the cell. This observation is to be expected, because endocytic vesicles are driven by dynein towards the minus end of microtubules, located in the perinuclear region of the cell.

Rotation of nanorods subjected to a single revolution of magnetic field

Nanorods inside the cytoplasm of cells were capable of deforming internal structures and cellular membranes. Deformation of the nucleus and plasma membrane were readily visible (Fig. 2). In order to study the ability of nanorods to generate intracellular perturbation, their response to magnetic field was quantified in terms of total displacement angle, θ . The angle θ is defined as the maximum angle obtained between the extreme orientations that the long axis of an individual nanorod acquires in one revolution of the magnetic field (Fig. 3(a)). The total displacement angle of 20 nanorods with a length of 2 μm and 5 μm for magnetic fields between 20 and 300 mT is shown in Fig. 3(b). We found that rods remained immobile for a magnetic-field intensity as high as 20 mT, and progressively rotated increasing the field intensity from 60 to 300 mT. For both lengths of nanorods, the angle θ increases with increasing intensity of the magnetic field; however the shorter rods tend to attain larger angles than longer rods for a fixed magnetic-field intensity. These results suggest that the cytoplasm of a living cell behaves like a Bingham fluid, where a minimum threshold stress needs to be reached in order for the cytoplasm to undergo deformation. To the best of our knowledge this is the first demonstration of such a behavior.

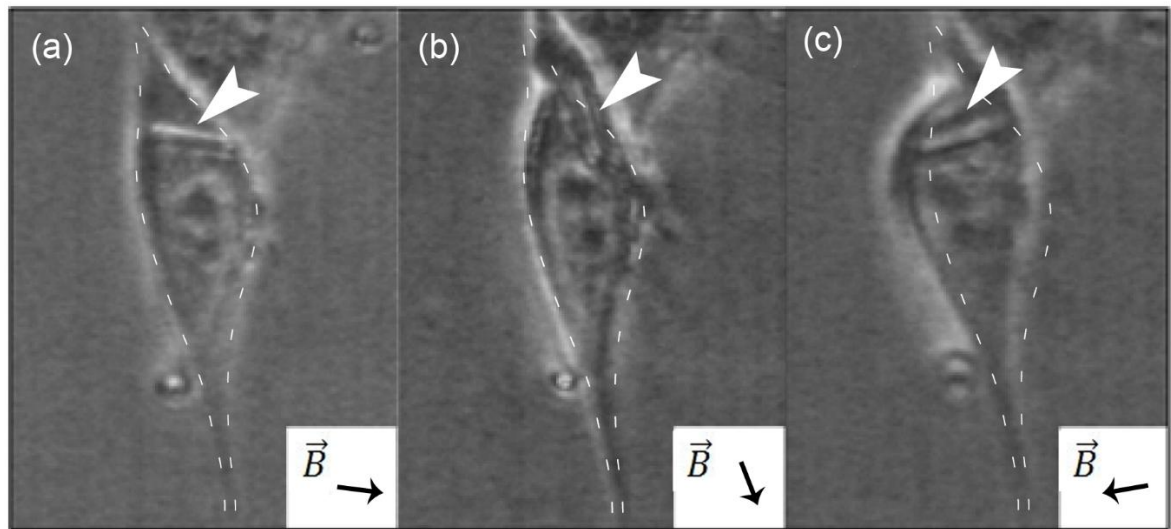


Figure 2 Cell deformation by an externally controlled magnetic nanorod. Deformation of the cell membrane that a single internalized rod is able to generate.

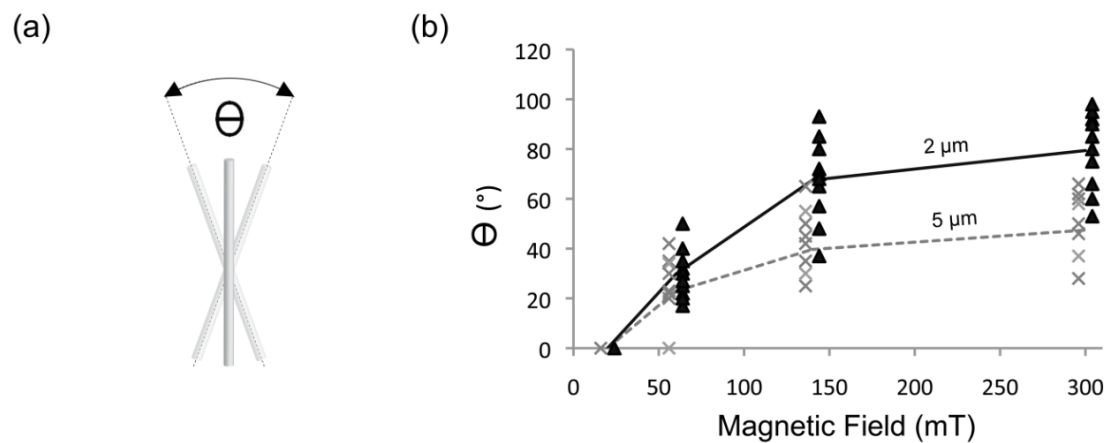


Figure 3. Rotational movement of magnetic nanorods in a live cell. (a) Definition of the total displacement angle θ for an individual nanorod in response to single revolution of magnetic field (b) Total displacement angles of 2 μm (black) and 5 μm (gray) nanorods under different magnetic field strengths.

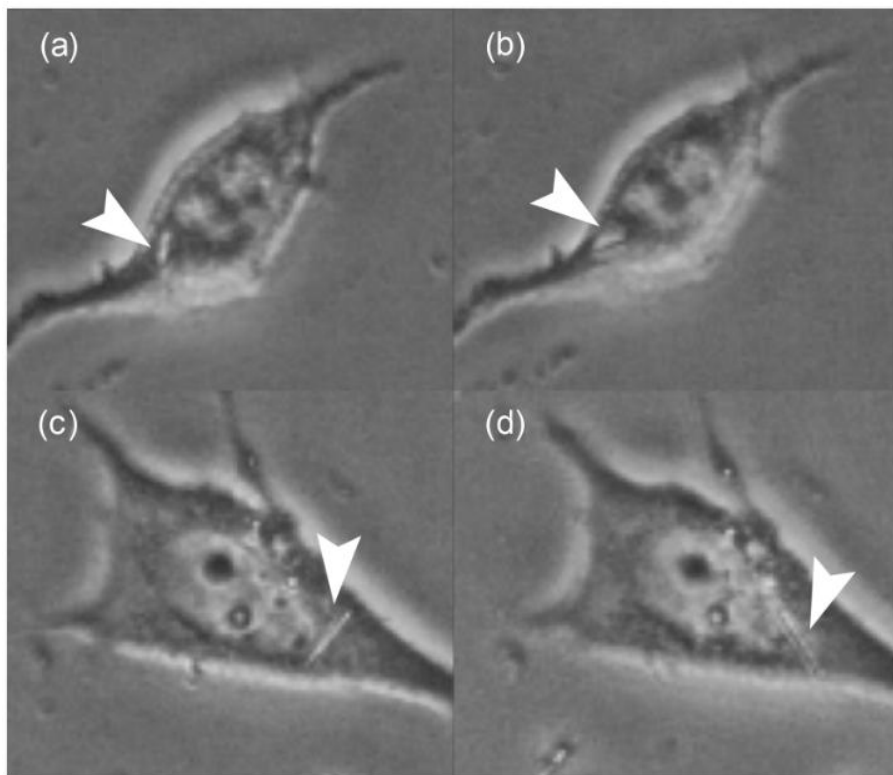


Figure 4. Restricted movement of the nanorods during a single magnetic field revolution. Nanorods rotation is restricted by the nucleus and cytoplasmic membrane surroundings. (a) and (b) show a 2 μm nanorod while (c) and (d) show a 5 μm nanorod.

Rotation of nanorods subjected to a rotating magnetic field

In order to study the effect of repeated deformation of the intracellular material, nanorods were subjected to a magnetic field with an intensity of 300 mT that rotated at 10 Hz for

several minutes. The 2 μm nanorods showed an initial mean displacement angle of around 90° and an increment of 135% in their mean displacement angle after 20 min of magnetic field application (Fig. 5(a)). A subset of the 2 μm nanorods (40%) underwent full rotation after 10-20 min. Fig. 6 shows an example of such nanorods. The remaining 2 μm -long

nanorods, also achieve maximum displacement angle in about 20 min, but did not experience full rotation. In case of the 5 μm -long nanorods, no complete rotation was observed within the 40 min. The displacement angle of 5 μm -long experienced basically no change over time and the angles presented less dispersion in comparison to the shorter rods (Fig. 5(b)).

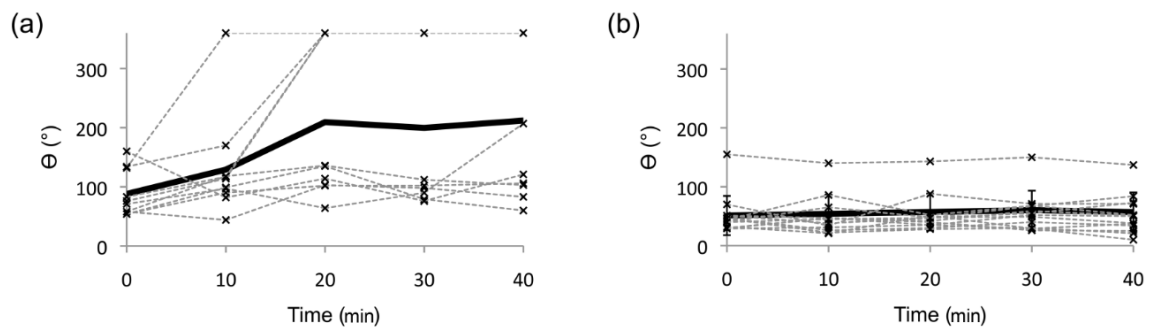


Figure 5. Change of displacement angle during application of 10 Hz magnetic field to (a) 2 μm nanorods and (b) 5 μm nanorods. The bold line represents the mean value of all measurements (dashed lines).

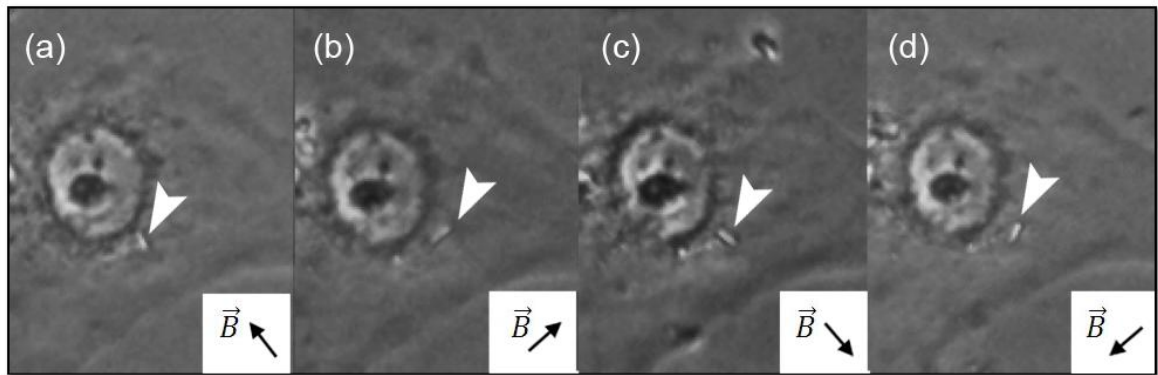


Figure 6. Complete rotation of a 2 μm nanorod following the external magnetic field orientation.

DISCUSSION

Magnetic nanorods, when free to move in a viscoelastic fluid, follow the orientation of externally applied magnetic field.^{16,17} However, when placed inside the cytoplasm of the cell, we observed that the nanoparticles were unable to follow the orientation of the magnetic field and this restriction is interpreted as interference with firmly anchored cell structures. The movement of nanorods was restricted by both visible cellular structures, such as cytoplasmic membrane or nucleus, as well as non-visible cellular structures, such as actin filaments. These structures exerted mechanical resistance to nanorods and became deformed when sufficient magnetic torque was applied.

The torque applied by a magnetic nanorod is a consequence of a difference in the orientations of the nanorod magnetic moment and the magnetic field. In nickel nanorods, shape anisotropy predominates over magnetocrystalline anisotropy, rendering their long axis energetically favorable direction of magnetization due to high aspect ratio of the particles (length/width). Therefore, the direction of magnetic moment of an individual nanorod can be defined by the orientation of its long axis.

The magnetic torque $\vec{\tau}$ generated by an external magnetic field $\vec{B}$ on a magnetic nanorod is given by the relation

$$\vec{\tau} = \vec{\mu} \times \vec{B},$$

where the magnetic dipole moment $\vec{\mu} = \vec{M} \cdot V \cdot \rho$ is the product of the magnetization $\vec{M}$ ($\text{A} \cdot \text{m}^2 \text{kg}^{-1}$), volume V (m^3) and density ρ ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$) of the material. The magnetization of electrodeposited nickel is usually similar to the magnetization of bulk nickel at room-

temperature, i.e. $55.4 \text{ A}\cdot\text{m}^2\text{kg}^{-1}$.¹⁸ Based on the magnetization curve for nickel nanowires measured by Prina-Mello *et al.*,¹⁹ the 300 mT field should generate a magnetization of about $50 \text{ A}\cdot\text{m}^2\text{kg}^{-1}$. Thus, the magnitude of the magnetic torque generated by the nickel segment of our nanorods is $\|\vec{\tau}\| = 4.2 \cdot 10^{-15} \text{ Nm}$. This torque induces a maximum force of $2.1 \cdot 10^{-9} \text{ N}$ at the edge of a $2 \text{ }\mu\text{m}$ Pt-Ni nanorod and $8.4 \cdot 10^{-10} \text{ N}$ for a $5 \text{ }\mu\text{m}$ nanorod. These values are similar to the force necessary for the compression or deformation of a complete cell (up to $10^{-7} - 10^{-9} \text{ N}$).²⁰ We estimate the stress exerted by an individual nanorod to be in the range of 1 to 50 kPa, depending on the actual contact surface area. The actin cytoskeleton, which plays a predominant role in the cellular structural strength and cell viscoelastic behavior, has an elastic modulus of around 1 kPa,²¹ thus, it is very likely to be deformed by the obtained level of stress. This result is consistent with the observation that nanorods presented restricted motion even when they were not obstructed by cellular and nuclear membranes. Presumably, nanorods can deform actin filaments, but cannot follow the magnetic field around a complete rotation (restricted movement), due to actin bundling and cross-linking by actin-binding proteins (ABPs),²² which increases their stiffness. Also, the presence of stiffer filaments, such as intermediate filaments, may contribute to the restraining of nanorods.

The null displacement showed by the rods under a 20 mT field strength indicates the existence of a minimal torque threshold to rotate inside the cytoplasm (Fig. 3). This behavior indicated that the cytoplasm of living cells behaves like a Bingham-type of fluid. Such fluids are characterized by a yield stress below which no deformation by viscous flow occurs. This behavior has been previously observed in F-actin solutions extracted from a tissue,²³ but to our knowledge, never inside living cells.

The variety of single cell mechanical responses evidenced in different studies due to cellular heterogeneity and differences between the experimental techniques have promoted a wide variety of cell mechanical models. Cytoplasm models usually incorporate the cell membrane in attempt to simulate experimental measurements obtained by external techniques as showed in cortical shell-liquid core models such as Newtonian,²⁴ Maxwell²⁵ and shear thinning models.²⁶ Each model fixes better depending on the cells type and the strain conditions analyzed. Thus, no model represents correctly the cytoplasm behavior and intracellular techniques must be developed for subcellular components analysis. Our results suggest a Bingham fluid model, for further study of cytoplasm behavior as an individual structure. Also, magnetic nanorods could be used as an intracellular tool for subcellular regional analysis.

Nanorods displacements were also observed to be restricted by the plasma membrane/cortex and the nucleus. It is well known that those structures are stiffer than the cytoplasm.²⁷ A complete mapping of fibroblast stiffness was developed by Plodinec et al.²⁷ indicating that the cell membrane is the stiffest part of a cell with elastic modulus >10 kPa. The elastic modulus of the nucleus was found to be 5-8 kPa, about ten times greater than that of the cytoplasm. **Error! Marcador no definido.** These values are of the same order of magnitude as our estimated maximum stresses exerted by the nanorods. It is important to note that permanent deformation of the plasma membrane/cortex and the nucleus was not evidenced: nucleus and plasma membrane recovered their initial shape after rotational displacement of the rods.

The mechanical response of the two types of nanorods (2 μm and 5 μm) presented important differences when subjected to a rotating magnetic field for several minutes (Fig.

5). Between 0 and 40 min of rotational field application, the shorter nanorods showed a significantly changed mean displacement angle (Welch's t test, 10.5 f.d., $p < 0.025$), whereas the same treatment did not change significantly the displacement angle of the longer nanorods (Welch's t test, 24 f.d., $p >> 0.025$). Rotation of the 2 μm nanorods is less likely to be limited by the cell membrane or the nucleus because of their shorter length (Fig. 4(c), 4(d) and Fig. 6). Therefore, the behavior of these nanorods may be attributed to the interaction with cytoplasmic filaments and other non-visible structures. The local rotational movements of the 2 μm nanorods occurred probably by compressing, pushing and displacing nearby filaments. The displacement angle of most 2 μm nanorods increased over time and some of them were able to rotate full turns after ~ 20 minutes (Fig. 6). On the contrary, rotation of the longer nanorods, was normally restricted by the cell membrane and the nucleus, structures that are stiffer and more difficult to displace than the cytoplasmic filaments (Figs. 2, 4(c) and 4(d)).

Rods of same length generate forces of similar magnitude because of the homogeneity of their nickel content, as well as their similar shape and dimensions. Nevertheless, we observed significant variability in the displacement angles of nanorods of the same size (Figs. 3 and 5). We attribute this variability to the heterogeneity of the cytoplasm and the different positions and orientations that the nanorods acquired within the cells as they are heterogeneous and highly anisotropic systems, with a complex and variable cytoskeleton structure.²⁷

We did not observe death of cells containing nanorods after being subjected to rotating magnetic fields. Our experiments showed that cells were resilient to repeated deformation of their internal cellular structures for at least 1 hour. Fung et al.,**Error!**

Marcador no definido. previously showed that 1 Hz rotation of nickel nanorods incubated within cells can induce cell death in 20 min. This study used nickel rods at high concentration (0.25 mg/ml) which agglomerated and formed clumps. Perhaps, these clumps were larger and applied higher torques than our individual nanorods to cause permanent structural damage, or non-internalized clumps activated membrane receptors that started programmed cell death.²⁸ The potential of magnetic nanorods for tumor ablation needs to be further studied because the high nanorod concentration used by Fung et al. is unlikely in animal models. Future experiments should study the effect of internalized nanorods acting for longer than 1 hour, as well as the effect of antibody coated nanorods attached to specific cellular structures.

Our results demonstrate that distant external manipulation of nanorods inserted in cells is possible. A magnetic field of about 100 mT is sufficient to produce significant nanorod rotation and cell deformation. The implantation and manipulation of nanorods did not compromise cellular wellness, which makes nanorods an ideal method for in vivo analysis of mechanical properties of cellular structures. In vivo and in vitro studies of cell structures and mechanical properties are usually developed from outside of the cells, mainly by atomic force microscopy. Thus, magnetic nanorods are a novel tool to understand and measure intracellular mechanical properties by interacting directly with their internal structures.

CONCLUSIONS

In this study, Pt-Ni magnetic nanorods were fabricated to analyze their interaction with NIH/3T3 fibroblast while influenced by an external low-frequency rotational magnetic field. The response of nanorods inside the cells was observed, evidencing their restricted rotational displacement synchronic with the field frequency. The cytoplasm behaved like a Bingham-type of fluid with magnetic fields below 20 mT unable to produce nanorod displacement. Higher-intensity magnetic fields produced displacements that disturbed the intracellular environment, generating significant local deformation and in some cases whole cell deformation. However, no permanent damage or cell death was observed even after repeated deformation.

The properties of elongated nanoparticles such as nanorods allows for the generation of significant magnetic torque and controlled movement inside living cells using low-frequency weak external fields, which can be further exploited to study cell mechanical properties and to develop new biomedical treatments.

ACKNOWLEDGMENT

D.H and D.W gratefully acknowledge support from the National Institutes of Health grant R03TW008718 from the Fogarty International Center.

References

- ¹. Hultgren A, Tanase M, Felton EJ, Bhadriraju K, Salem AK, Chen CS, Reich DH. Optimization of Yield in Magnetic Cell Separations Using Nickel Nanowires of Different Lengths. *Biotechnol Prog* 2005;21:509–515.

2. Lee IS, Lee N, Park J, Kim BH, Yi YW, Kim T, Kim TK, Lee IH, Paik SR, Hyeon T. Ni/NiO core/shell nanoparticles for selective binding and magnetic separation of histidine-tagged proteins. *J Am Chem Soc* 2006;128(33):10658-10659.
3. Bao J, Chen W, Liu T, Zhu Y, Jin P, Wang L, Liu J, Wei Y, Li Y. Bifunctional Au-Fe₃O₄ nanoparticles for protein separation. *ACS Nano* 2007;1(4):293-298.
4. Laurent S, Dutz S, Häfeli UO, Mahmoudi M. Magnetic fluid hyperthermia: focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Adv Colloid Interface Sci* 2011;166(1):8-23.
5. Sharma R, Chen CJ. Newer nanoparticles in hyperthermia treatment and thermometry. *J Nanopart Res* 2009;11(3):671-689.
6. Thiesen B, Jordan A. Clinical applications of magnetic nanoparticles for hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 2008;24(6):467-474.
7. Bárcena C, Sra AK, Gao J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. In: Liu JP, Fullerton E, Gutfleisch O, Sellmyer DJ, editors. *Nanoscale magnetic materials and applications*. US: Springer ;2009. p 591-626.
8. Pankhurst QA, Connolly J, Jones SK, Dobson J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J Phys D Appl Phys* 2003;36(13):R167-R181.
9. Maier-Hauff K, Rothe R, Scholz R, Gneveckow U, Wust P, Thiesen B, Feussner A, von Deimling A, Waldoefner N, Felix R, Jordan A. Intracranial thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external beam radiotherapy: results of a feasibility study on patients with glioblastoma multiforme. *J Neuro-Oncol* 2007;81(1):53-60.
10. Maier-Hauff K, Ulrich F, Nestle D, Niehoff H, Wust P, Thiesen B, Orawa H, Budach V, Jordan A. Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide

nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. *J Neuro-Oncol* 2011;103(2):317-324.

11. Fortin JP, Gazeau F, Wilhelm C. Intracellular heating of living cells through Néel relaxation of magnetic nanoparticles. *Eur Biophys J* 2008;37(2):223-228.

12. Ahsen OO, Yilmaz U, Deniz Aksoy M, Ertas G, Atalar E. Heating of magnetic fluid systems driven by circularly polarized magnetic field. *J Magn Magn Mater* 2010;322(20):3053-3059.

13. Fung AO, Kapadia V, Pierstorff E, Ho D, Chen Y. Induction of cell death by magnetic actuation of nickel nanowires internalized by fibroblasts. *J Phys Chem C*, 2008;112(39):15085-15088.

14. Celedon A, Nodelman IM, Wildt B, Dewan R, Searson P, Wirtz D, Bowman GD, Sun SX. Magnetic tweezers measurement of single molecule torque. *Nano Lett* 2009;9(4):1720-1725.

15. Safi M, Clowez S, Galimard A, Berret JF. In vitro toxicity and uptake of magnetic nanorods. *J Phys Conf Ser* 2011;304(1):012033. **DOI:**10.1088/1742-6596/304/1/012033.

16. Chen M, Sun L, Bonevich JE, Reich DH, Chien CL, Searson PC. Tuning the response of magnetic suspensions. *Appl Phys Lett* 2003;82(19):3310-3312.

17. Celedon A, Hale CM, Wirtz D. Magnetic manipulation of nanorods in the nucleus of living cells. *Biophys J* 2011;101(8):1880-1886.

18. O'Reilly C, Sanvito S, Rhen FM, Stamenov P, Coey JMD. Magnetization of electrodeposited nickel: Role of interstitial carbon. *J Appl Phys* 2006;99(8):08J301-08J301.

19. Prina-Mello A, Diao Z, Coey JMD. Internalization of ferromagnetic nanowires by different living cells. *J Nanobiotechnol* 2006;4(9). **DOI:** 10.1186/1477-3155-4-9

20. Caille N, Thoumine O, Tardy Y, Meister JJ. Contribution of the nucleus to the mechanical properties of endothelial cells. *J of Biomech* 2002;35(2):177-187.

21. Ananthakrishnan R, Guck J, Wottawah F, Schinkinger S, Lincoln B, Romeyke M, Käs J. (2006). Quantifying the contribution of actin networks to the elastic strength of fibroblasts. *J Theor Biol* 2006;242(2):502-516.

22. Gardel ML, Shin JH, MacKintosh FC, Mahadevan L, Matsudaira P, Weitz DA. Elastic behavior of cross-linked and bundled actin networks. *Science* 2004;304(5675):1301-1305.

23. Maruyama K, Kaibara M, Fukada E. Rheology of F-actin I. Network of F-actin in solution. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure* 1974;371(1):20-29.

24. Yeung A, Evans E. Cortical shell-liquid core model for passive flow of liquid-like spherical cells into micropipets. *Biophys J* 1989;56(1):139-149.

25. Dong C, Skalak R, Sung KL, Schmid-Schönbein GW, Chien S. Passive deformation analysis of human leukocytes. *J Biomech Eng* 1988;110(1):27.

26. Lim CT, Zhou EH, Quek ST. Mechanical models for living cells—a review. *J Biomech* 2006;39(2):195-216.

27. Plodinec M, Loparic M, Suetterlin R, Herrmann H, Aebi U, Schoenenberger CA. The nanomechanical properties of rat fibroblasts are modulated by interfering with the vimentin intermediate filament system. *J Struct Biol* 2011;174(3):476-484.

28. Kim DH, Rozhkova EA, Ulasov IV, Bader SD, Rajh T, Lesniak MS, Novosad V. Biofunctionalized magnetic-vortex microdiscs for targeted cancer-cell destruction. *Nat Mater* 2009;9(2):165-171.

REFERENCIAS

Bárcena, C., Sra, A. K., & Gao, J. (2009). Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. In *Nanoscale magnetic materials and applications*(pp. 591-626). Springer US.

Caille, N., Thoumine, O., Tardy, Y., & Meister, J. J. (2002). Contribution of the nucleus to the mechanical properties of endothelial cells. *Journal of biomechanics*, 35(2), 177-187.

Celedon, A., Nodelman, I. M., Wildt, B., Dewan, R., Searson, P., Wirtz, D., ... & Sun, S. X. (2009). Magnetic tweezers measurement of single molecule torque. *Nano letters*, 9(4), 1720-1725.

Das, G. K., Chan, P. P., Teo, A., Loo, J. S. C., Anderson, J. M., & Tan, T. T. Y. (2010). In vitro cytotoxicity evaluation of biomedical nanoparticles and their extracts. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 93(1), 337-346.

De Jong, W.H. y Borm, P.J. (2008). Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *International Journal of Nanomedicine*, 3(2), 133 – 149.

Fung, A. O., Kapadia, V., Pierstorff, E., Ho, D., & Chen, Y. (2008). Induction of cell death by magnetic actuation of nickel nanowires internalized by fibroblasts. *The Journal of Physical Chemistry C*, 112(39), 15085-15088.

Ito, A., Shinkai, M., Honda, H., Kobayashi, T. (2005). Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *Journal of bioscience and bioengineering*, 100(1), 1-11.

Lin, J., Naskar, J., Giannelis, E. (2005). Drug delivery using nanoparticles. *Cornell Center for Materials Research*.

Maier-Hauff, K., Rothe, R., Scholz, R., Gneveckow, U., Wust, P., Thiesen, B., ... & Jordan, A. (2007). Intracranial thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external beam radiotherapy: results of a feasibility study on patients with glioblastoma multiforme. *Journal of neuro-oncology*, 81(1), 53-60.

Maier-Hauff, K., Ulrich, F., Nestler, D., Niehoff, H., Wust, P., Thiesen, B., ... & Jordan, A. (2011). Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. *Journal of neuro-oncology*, 103(2), 317-324.

Moskowitz, B. M. (1991, June). Hitchhiker's guide to magnetism. In *Environmental Magnetism Workshop (IRM)* Vol. 279, No. 1, p. 48.

O'Reilly, C., Sanvito, S., Rhen, F. M., Stamenov, P., & Coey, J. M. D. (2006). Magnetization of electrodeposited nickel: Role of interstitial carbon. *Journal of applied physics*, 99(8), 08J301-08J301.

Pankhurst, Q. A., Connolly, J., Jones, S. K., & Dobson, J. (2003). Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of physics D: Applied physics*, 36(13), R167.

Plodinec, M., Loparic, M., Suetterlin, R., Herrmann, H., Aebi, U., & Schoenenberger, C. A. (2011). The nanomechanical properties of rat fibroblasts are modulated by interfering with the vimentin intermediate filament system. *Journal of structural biology*, 174(3), 476-484.

Prina-Mello, A., Diao, Z., & Coey, J. M. D. (2006). Internalization of ferromagnetic nanowires by different living cells. *J Nanobiotechnology*, 4(9).

Safi, M., Clowez, S., Galimard, A., & Berret, J. F. (2011, July). In vitro toxicity and uptake of magnetic nanorods. In *Journal of Physics: Conference Series*(Vol. 304, No. 1, p. 012033). IOP Publishing.

ANEXOS

ANEXO A1: PARÁMETROS UTILIZADOS PARA LA ELECTRODEPOSICIÓN DE LOS NANOCILINDROS

A1.1 Nanocilindros de 2 μm :

Deposición de Cobre

Parámetros:

- Potencial inicial: -0.16 V (v/s potencial de referencia)
- Potencial final: -0.16 V (v/s potencial de referencia)
- Tiempo de aplicación: 900 s

Valores obtenidos:

- Corriente promedio: $\square$ 7.7 mA
- Carga eléctrica total: $\square$ 7 C

Deposición de Platino

Parámetros:

- Potencial inicial: -0.35 V (v/s potencial de referencia)
- Potencial final: -0.35 V (v/s potencial de referencia)
- Tiempo de aplicación: 3500 s

Valores obtenidos:

- Corriente promedio: $\square$ 0.65 mA
- Carga eléctrica total: $\square$ 3.7 C
- Tasa de formación: 0.53 $\mu\text{m}/\text{C}$
- Largo: $\square$ 1,2 μm

Deposición de Níquel

Parámetros:

- Potencial inicial: -0.8 V (v/s potencial de referencia)
- Potencial final: -0.8 V (v/s potencial de referencia)
- Tiempo de aplicación: 6500 s

Valores obtenidos:

- Corriente promedio: $\square$ 0.45 mA
- Carga eléctrica total: $\square$ 2.9 C
- Tasa de formación: 0.35 μ m/C
- Largo: $\square$ 1 μ m

A1.2 Nanocilindros de 5 μ m:

Deposición de Cobre

Parámetros:

- Potencial inicial: -0.16 V (v/s potencial de referencia)
- Potencial final: -0.16 V (v/s potencial de referencia)
- Tiempo de aplicación: 685 s

Valores obtenidos:

- Corriente promedio: $\square$ 10.1 mA
- Carga eléctrica total: $\square$ 7 C

Deposición de Platino

Parámetros:

- Potencial inicial: -0.35 V (v/s potencial de referencia)
- Potencial final: -0.35 V (v/s potencial de referencia)
- Tiempo de aplicación: 11000 s

Valores obtenidos:

- Corriente promedio: $\square$ 0.7 mA
- Carga eléctrica total: $\square$ 7.6 C

- Tasa de formación: $0.53\mu\text{m}/\text{C}$
- Largo: $\square 4\mu\text{m}$

Deposición de Niquel

Parámetros:

- Potencial inicial: -0.8 V (v/s potencial de referencia)
- Potencial final: -0.8 V (v/s potencial de referencia)
- Tiempo de aplicación: 8500 s

Valores obtenidos:

- Corriente promedio: $\square 0.35\text{ mA}$
- Carga eléctrica total: $\square 3\text{ C}$
- Tasa de formación: $0.35\mu\text{m}/\text{C}$
- Largo: $\square 1\mu\text{m}$

ANEXO A2: MÉTODO PARA PASAR CÉLULAS: TRIPSINIZACIÓN

Materiales:

- PBS (Phosphate buffered saline) con 0.004% EDTA. (PBS/EDTA)
- Tripsina 0.05% en EDTA. (Trip/EDTA)

Procedimiento:

- Retirar el medio de cultivo.
- Lavar 2 veces con PBS/EDTA.
- Agregar 2 ml de Trip/EDTA e incubar a 37°C durante 3-5 minutos, para despegar las células del fondo de la placa.
- Diluir la Trip/EDTA con 4 ml de medio de cultivo en la placa, el que actúa como agente inhibidor de la tripsina.
- Pipetear arriba y abajo los 6 ml para asegurar el despegue de las células.
- Centrifugar la solución en un tubo estéril a 1400 rpm durante 5 minutos. De esta manera queda un pellet de células en el fondo del tubo.
- Quitar el sobrenadante para asegurar la eliminación de la Trip/EDTA.
- Agregar medio de cultivo al pellet de células y agitar para obtener una correcta dispersión de las células en todo el medio.
- Volver a sembrar las células en la fracción deseada. Para hacer un pase 1/5, un quinto de la solución final es sembrada en una nueva placa. El resto puede ser descartado o sembrado en otras placas.