

## CAPITULO 6

### DISCUSIÓN

---

Puesto que el tamaño de partícula es un parámetro crucial para conocer las propiedades de las NP, el éxito en sus diversas aplicaciones depende de que este parámetro sea predecible y controlable. En principio, el tamaño de las NP puede ser regulado en forma intuitiva durante el proceso de síntesis, pero alcanzar el tamaño de partícula deseado en el sitio de reacción se ha convertido, a fin de cuentas, en un proceso de prueba y error ante condiciones experimentales variables.

Como se muestra en la figura 9, la distribución de los tamaños de partícula que se obtuvo no es uniforme ni se encuentra al menos en un rango estrecho. Debido a la alta relación área superficial/volumen existe una tendencia a la aglomeración en el momento de la reacción para reducir la energía superficial debida a la fuerte atracción magnética dipolo-dipolo entre las partículas. Sin embargo, se ha descrito que diámetros de partícula desde 6 nm hasta un tamaño crítico de 15 nm mantienen patrones de magnetización uniformes (Gupta, A.K. y Gupta, M., 2005) y son, por lo tanto, aplicables para los fines de migración celular inducida por CME.

Por otro lado, la mayoría de los procesos de internalización de NP modificadas hasta ahora descritos en diversos tipos celulares ocurren principalmente por fagocitosis mediada por receptores. En este proceso pueden formarse vesículas de hasta 120 nm, por lo cual se considera que el diámetro óptimo inicial de la NP (previo al acoplamiento con moléculas de grandes dimensiones como las enzimas) debe ser cercano a los 10 nm para que se permita a la vez un transporte efectivo a través del espacio extracelular. Por lo tanto, el tamaño de las NP sintetizadas no es en este aspecto una limitante para la funcionalización con AF-Fluo ni, en teoría, para la captación por CPN.

Sin embargo, a pesar de que las imágenes de fluorescencia mostradas en la figura 12 sugieren un buen grado de funcionalización (alrededor del 70%), la alta aglomeración que presentan sí es un factor determinante para su incorporación celular y es, por lo tanto, un obstáculo que debe librarse. Se han reportado trabajos en los que el acoplamiento de PEG-AF a la superficie permite una dispersión en monocapa (Kohler, N., 2004; Zhang, Y. y Zhang, J., 2005), manteniendo además la capacidad del AF para dirigirse específicamente al receptor celular y facilitar la endocitosis, lo cual puede ser una alternativa para dichos objetivos. Cabe destacar que, puesto que en el presente trabajo se ha acoplado Fluo al AF, y éste a la NP, la afinidad de la interacción ligando-receptor puede no ser la óptima para favorecer la endocitosis.

En las pruebas de incorporación celular utilizando NP a una concentración de 0.2 mg/mL puede apreciarse un buen número de CPN con NP en su citoplasma. En contraste, a una concentración de 2 mg/mL, el grado de incorporación fue mucho menor. Esto puede

deberse a que a concentraciones mayores la tendencia a aglomerarse se ve favorecida, como ya se ha mencionado con anterioridad. Puesto que el primer objetivo de estas pruebas fue determinar si las CPN pueden internalizar este tipo de NP modificadas, los cultivos de CPN no se realizaron con una densidad celular específica. En cualquier caso, para futuros trabajos en esta línea será necesario estandarizar los cultivos para cuantificar el número de NP incluidas y detectar además posibles cambios en la densidad celular por citotoxicidad.

A este respecto, considerando que ciertos trastornos neurodegenerativos, como lo es la enfermedad de Parkinson, están asociados a un estrés oxidativo importante (Olanow, C.W. y Youdim, M., 1996; Dobson, J., 2001), el exceso de hierro en los tejidos puede resultar contraproducente. Además, se ha encontrado que la manipulación con campos magnéticos altera significativamente la homeostasis del hierro (Mykhaylyk, O. *et al*, 2001; Babincová, M. y Babinec, P., en prensa), por lo que es importante determinar si la presencia de NP de magnetita y los posibles procesos de reducción que sufra son factores determinantes en la viabilidad de los cultivos.

Para mejorar el grado de incorporación celular se han utilizado diversas sustancias, de carácter distinto al AF, como son los copolímeros basados en el PVA (Petri-Fink, A. *et al*, 2005) y los fosfolípidos (Ishii, F. y Ni, T., 2005; Giri, J. *et al*, en prensa). Estas moléculas mantienen a las NP en un sistema de monocapa y brindan además la ventaja de ser biocompatibles con las membranas celulares para su incorporación al citoplasma. Se han descrito otros tipos de NP magnéticas funcionalizadas con actividad específica en el sistema nervioso; su aplicación ha sido dirigida hasta ahora para mejorar las técnicas de

diagnóstico por RMN. Micronutrientes como la tiamina han mostrado favorecer la internalización de las NP a las CPN (Lockman, P.R. *et al*, 2003). De igual manera, diversos polímeros lipoides adheridos a la superficie de NP ferromagnéticas mejoran la incorporación celular al aumentar la estabilidad y dispersión de estos sistemas en el cerebro de rata adulta (Kim, D.K. *et al*, 2002). Otra perspectiva ha sido la utilización de NP superparamagnéticas con marcadores genéticos, como el péptido Tat-VIH, para rastrear precursores neuronales (Lewin, M. *et al*, 2000; Zhao, M. *et al*, 2002). Todas éstas pueden ser alternativas para confinar un número óptimo de NP en las CPN.

Para determinar la capacidad de la migración celular por CME, un primer estudio involucra precisamente conocer la cantidad de NP que deben estar internalizadas para que una fuerza magnética de densidad específica pueda desplazar a la célula en el medio (Ito, A. *et al*, 2004). Las variables que deberán evaluarse *in vitro* en este aspecto son, por lo tanto, la composición del ambiente extracelular, la cantidad de partículas magnéticas contenidas en la célula, la intensidad del campo magnético, y la distancia máxima efectiva de inducción magnética.

Puesto que las características del medio de cultivo pueden adaptarse para simular las condiciones *in vivo*, puede resultar más conveniente extrapolar el modelo experimental anterior simplemente trasplantando las CPN cultivadas con NP al cerebro de la rata. Con este enfoque se eliminaría en primer lugar la inclusión inespecífica de NP en otros tipos celulares cuando éstas se inyectan directamente, además de evitar cualquier factor que pudiera modificar el patrón de incorporación de NP en las CPN. Sin embargo, el trasplante

de células encaminado a la terapéutica en humanos involucra complicaciones técnicas y éticas severas, por lo que no debe descartarse la perspectiva alterna. En dicho caso, la funcionalización de NP con moléculas que discriminen entre las CPN de interés y otras líneas celulares brindaría una gran ventaja en la aplicación clínica.

Conforme ha avanzado la bionanotecnología se han podido explorar nuevas aplicaciones y desarrollar diversos sistemas de NP que permitan su uso en el área neurológica. Por ejemplo, la conjugación de GDNF (factor neurotrófico derivado de líneas celulares gliales) a la superficie de nanopartículas ferromagnéticas para su inyección en el estriado sirve como tratamiento contra procesos adictivos en modelos de rata (Green-Sadan, T. *et al*, 2005). Esto abre la posibilidad para utilizar otros factores neurogénicos, que en general han probado ser muy útiles para inducir la proliferación y diferenciación celulares, y acoplarlos a sistemas de NP que eliminen además la necesidad de una administración transcraneal. Moléculas con actividad farmacológica, como en el caso del fármaco quelante penicilamina, pueden acoplarse a NP con la capacidad de traspasar la barrera hematoencefálica para ser utilizadas como terapia preventiva de enfermedades neurodegenerativas (Cui, Z. *et al*, 2005). Como puede observarse, el campo de acción para el uso de NP en modelos de trasplante de células nerviosas es aún muy extenso.