

Índice General

Página

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	viii
SUMMARY	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 NpO para el desarrollo de estrategias terapéuticas y de diagnóstico de enfermedades del sistema nervioso central	3
1.2 NpO con potencialidades biomédicas y su posible aplicación en la terapia para la enfermedad de Alzheimer	4
1.3 Factores que influyen en la estabilidad de NpO	5
1.4 Biodistribución de las NpO	6
1.5 Ingreso de NpO al cerebro	8
1.6 Neurotoxicidad de NpO <i>in vitro</i>	10
1.7 Neurotoxicidad de NpO <i>in vivo</i>	12
2. HIPÓTESIS	15
3. OBJETIVOS	15
3.1 Objetivo general	15
3.2 Objetivos específicos	15
4. MATERIALES Y MÉTODOS	16
4.1 Preparación del material de síntesis	16
4.2 Síntesis y caracterización de NpO y sus conjugados	16
4.2.1 Síntesis de NpO	16
4.2.2 Determinación de la concentración de NpO	17
4.2.3 Funcionalización de NpO al CLPFFD	17

4.2.4 Marcación de NpO-CLPFFD con los fluoróforos Alexa	17
4.2.5 Caracterización por "Espectrofotometría de absorción molecular"	20
4.2.6 Cálculo del diámetro hidrodinámico por "Dispersión dinámica de la luz"	20
4.2.7 Determinación de la carga superficial por "Potencial Z"	21
4.2.8 Espectro de fluorescencia del conjugado NpO-CLPFFD-Alexa 750	21
4.2.9 Determinación de la intensidad de fluorescencia del fluoróforo Alexa respecto de las NpO-CLPFFD incubadas con Alexa 750	21
4.2.10 Microscopía electrónica de transmisión	22
4.2.11 Electroforesis en gel de agarosa	22
4.3 Estudios <i>in vivo</i>	23
4.3.1 Animales de experimentación	23
4.3.2 Inyección estereotáxica	23
4.3.3 Biodistribución de las NpO-CLPFFD-Alexa 750	24
4.3.4 Obtención de tejidos para estudios <i>ex vivo</i>	25
4.3.5 Cuantificación de oro asociado a las NpO mediante activación neutrónica	25
4.3.6 Obtención de cortes de tejido para estudios histológicos	26
4.3.7 Detección de cambios en la morfología nuclear mediante Tinción con Hoechst	26
4.3.8 Inmunohistoquímica de la proteína GFAP, marcador de astrocitos, en cortes de cerebro de rata	26
4.3.9 Microscopía confocal	27
5. RESULTADOS	28
5.1 Sintetizar y caracterizar fisicoquímicamente el conjugado NpO-CLPFFD-Alexa 750	28
5.1.1 Síntesis de NpO	28
5.1.2 Funcionalización de NpO con el péptido CLPFFD	30
5.1.3 Síntesis y caracterización del conjugado fluorescente y eficiencia de la conjugación fluoróforo/NpO	32
5.2 Estudiar cambios en la intensidad de fluorescencia de NpO-CLPFFD-Alexa 750 inyectadas estereotáxicamente en cerebro de rata, y asociar dicha disminución de fluorescencia con cambios en los niveles de oro	38

5.2.1 Implementación de la técnica cirugía estereotáxica y distribución <i>in vivo</i> del conjugado fluorescente	38
5.2.2 Variación de la fluorescencia de Alexa 750 <i>in vivo</i> en el tiempo	40
5.2.3 Inyección estereotáxica del conjugado NpO-CLPFFD-Alexa 750 en la región del ventrículo lateral	42
5.2.4 Inyección estereotáxica del conjugado NpO-CLPFFD-Alexa 750 en la región hipocámpal	45
5.2.5 Cuantificación de oro asociado a las NpO-CLPFFD-Alexa 750 en cerebros de ratas 24 h post inyección	46
5.3 Evaluar apoptosis y reactividad glial posterior a la inyección de NpO-CLPFFD Alexa 647 en cerebros de rata como indicadores de daño tisular.....	48
5.3.1 Síntesis y caracterización de NpO-CLPFFD-Alexa 647	48
5.3.2 Inyección estereotáxica del conjugado NpO-CLPFFD-Alexa 647	51
5.3.3 Detección de cambios en la condensación nuclear mediante Tinción Hoechst, como indicador de apoptosis	53
5.3.4 Inmunohistoquímica de GFAP como indicador de activación de astrocitos	56
6. DISCUSIÓN	59
6.1 Obtención y caracterización de las nanopartículas y sus conjugados	59
6.2 Consecuencias de la inyección estereotáxica de las nanopartículas de oro....	62
7. CONCLUSIONES	68
8. BIBLIOGRAFÍA	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1	Potenciales aplicaciones de las NpO	2
Figura 2	Desagregación <i>in vitro</i> de fibras amiloide incubadas con NpO posterior a irradiación de baja potencia	5
Figura 3	Esquema teórico de la entrada de NpO-THR-CLPFFD al cerebro a través de la barrera hematoencefálica	9
Figura 4	Espectro de absorción y emisión del fluoróforo Alexa 750	18
Figura 5	Estrategia de conjugación de las NpO-CLPFFD con el fluoróforo Alexa 750	19
Figura 6	Espectro de absorción y emisión del fluoróforo Alexa 647	20
Figura 7	Espectro de absorción UV-Visible de las NpO	28
Figura 8	Distribución de tamaño de las NpO por DLS	29
Figura 9	Potencial Z de las NpO	30
Figura 10	Espectro de absorción UV-visible de las NpO-CLPFFD	31
Figura 11	Distribución de tamaños de las NpO-CLPFFD obtenida por DLS	31
Figura 12	Potencial Z de las NpO-CLPFFD	32
Figura 13	Espectro de absorción UV-visible de las NpO-CLPFFD-Alexa 750	33
Figura 14	Distribución de tamaños de NpO-CLPFFD-Alexa 750 obtenida por DLS	33
Figura 15	Potencial Z de las NpO-CLPFFD-Alexa 750	34
Figura 16	TEM e histograma de distribución de tamaños de NpO-CLPFFD-Alexa 750	34
Figura 17	Espectro de fluorescencia de NpO-CLPFFD-Alexa 750	35
Figura 18	Intensidad de fluorescencia de Alexa 750	35
Figura 19	Curvas de fluorescencia entre Alexa 750 y Alexa 750 incubado por 2 h con NpO-CLPFFD	37
Figura 20	Esquema de los sitios a inyectar estereotáxicamente	38
Figura 21	Cerebro inyectado con azul de tripán y montado en el criostato	39
Figura 22	Imágenes de rata y su cerebro tras 16 h post inyección de Alexa 750 en la región de los ventrículos laterales	40
Figura 23	Imágenes de rata y disminución de la intensidad de fluorescencia en el tiempo tras ser inyectado con Alexa 750 en la región de los ventrículos laterales	41
Figura 24	Imagen de una rata posterior a la inyección intracraneal de citrato ...	41
Figura 25	Imagen indicando la zona de inyección	42
Figura 26	Imágenes obtenidas en el equipo "in vivo FX PRO" a distintos tiempos post inyección de NpO-CLPFFD-Alexa 750 con su gráfica de disminución de la intensidad de fluorescencia en el tiempo	43
Figura 27	Imágenes obtenidas en el equipo "in vivo FX PRO" a distintos tiempos post inyección estereotáxica y la disminución de la intensidad de fluorescencia en el tiempo	44

Figura 28	Fotografía del sitio de inyección de NpO-CLPFFD-Alexa 750	45
Figura 29	Imágenes obtenidas en el equipo "in-vivo FX PRO" de una rata inyectada con NpO-CLPFFD- Alexa 750 en hipocampo junto con su disminución de fluorescencia	46
Figura 30	Distribución de oro en el tiempo post inyección estereotáxica en hipocampo y ventrículo lateral	47
Figura 31	Electroforesis en gel de NpO, NpO-CLPFFD, NpO-CLPFFD-Alexa 750 y NpO-CLPFFD-Alexa 647	49
Figura 32	Espectro UV visible de NpO-CLPFFD-Alexa 647	49
Figura 33	Distribución de tamaños por DLS de NpO-CLPFFD-Alexa 647	50
Figura 34	Potencial Z de NpO-CLPFFD-Alexa 647	50
Figura 35	Intensidad de fluorescencia del Alexa 647	50
Figura 36	Corte de cerebro montado en criostato de rata control inyectada con buffer Krebs	51
Figura 37	Detección de fluorescencia roja a t=0 h en cortes de rata	52
Figura 38	Imágenes de tinción nuclear a t=0 y t=24 h para evidenciar muerte celular	52
Figura 39	Corte de cerebro indicando las zonas del giro dentado a analizar muerte celular y reactividad astrocítica	53
Figura 40	Tinción nuclear en la región suprapiramidal del giro dentado en ratas control y experimental	54
Figura 41	Tinción nuclear en la región infrapiramidal del giro dentado en ratas control y experimental	55
Figura 42	Control negativo de inmunohistoquímica contra la proteína GFAP	56
Figura 43	Inmunohistoquímica en la región suprapiramidal del giro dentado en cortes de ratas control y experimental	57
Figura 44	Inmunohistoquímica en la región infrapiramidal del giro dentado en cortes de ratas control y experimental	58
Figura 45	Formación teórica de las NpO	59
Figura 46	Esquema teórico de la marcación de NpO-CLPFFD con Alexa 750	60

ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1	Valores de intensidad de fluorescencia obtenidos para Alexa 750 y Alexa 750 incubado por 2 h con NpO-CLPFFD	36
Tabla 2	Cuantificación de oro en distintos órganos posterior a una inyección intracraneal en los ventrículos laterales e hipocampo a ratas adultas	47