

PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN 2019

MEMORIA DEL PROYECTO Nº SV-19-GIJÓN-1-22

1. DATOS DEL PROYECTO

Título: Desarrollo de nanopartículas magnéticas funcionalizadas para la detección de biomarcadores relacionados con la enfermedad de Alzheimer

Investigador/a/es responsable/es: José Ángel García Díaz

Tfno: 985182410

E-mail: joseagd@uniovi.es

Otros investigadores: Laura Elbaile Viñuales, Francisco Javier García Alonso, María Teresa Fernández Sánchez, Antonello Novelli Ciotti y Carmen Martínez Rodríguez.

Empresas o instituciones colaboradoras: Hospital de Jove y Nanovex Biotechnologies.

2. MEMORIA DESCRIPTIVA DEL PROYECTO

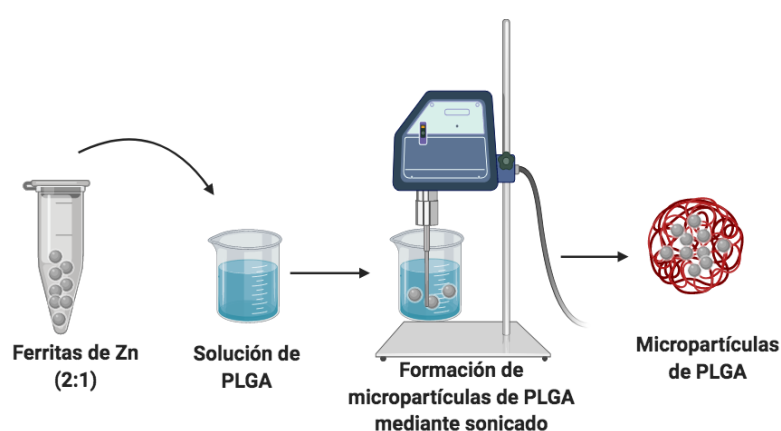
2.1 Resumen ejecutivo

El resumen ejecutivo del Proyecto debe ser una síntesis clara y concisa del trabajo realizado, describiendo brevemente los motivos que justifican su realización, los beneficiarios, los objetivos específicos y su grado de consecución, la metodología aplicada y los resultados obtenidos.

Extensión: un máximo de 4000 caracteres, incluidos espacio.

En este proyecto, se ha trabajado en la síntesis de micropartículas magnéticas constituidas por nanoferritas magnéticas (ZnFe_2O_4) dispersas en poliácido láctico-ácido glicólico (PLGA) como base para la detección de marcadores de Alzheimer. (Figura 1). Esta enfermedad afecta en España a 800.000 personas, pero, la Sociedad Española de Neurología (SEN) estima que el 30 % de los casos está sin diagnosticar.

Figura 1. Esquema del proceso de síntesis de micropartículas magnéticas de PLGA.



Síntesis de Nanoferritas

Para alcanzar este objetivo, se procedió en primer lugar a la síntesis de nanoferritas magnéticas (ZnFe_2O_4).

La síntesis de estas nanoferritas se realizó mediante un método de descomposición térmica de $\text{Fe}(\text{acac})_3$ y $\text{Zn}(\text{acac})_2$ en presencia de ácido oleico y oleilamina como surfactantes y éter bencílico como disolvente.

El análisis de estas nanopartículas por micrografías de TEM reveló un tamaño medio de $13,6 \pm 3$ nm de diámetro.

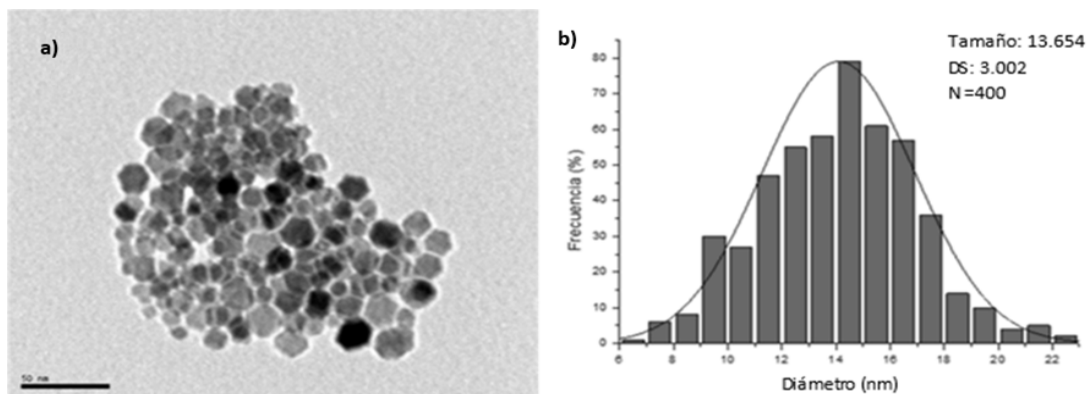


Figura 2. Micrografía de TEM (a)) y distribución de tamaños (b)) de las nanoferritas de Zn.

El análisis por difracción de rayos X de las muestras reveló una estructura cristalina de las ferritas de Zn muy similar a la de la magnetita.

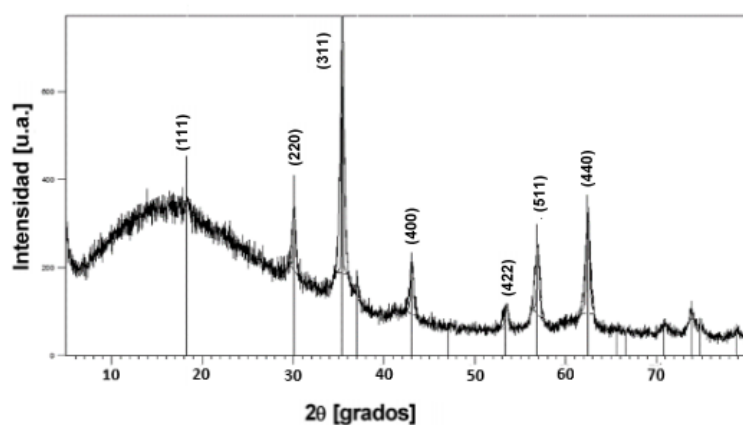


Figura 3. Difractograma de nanoferritas de Zn.

El comportamiento magnético de estas partículas reveló una imanación de saturación de 76 emu/g y un campo coercitivo de 1,6 Oe.

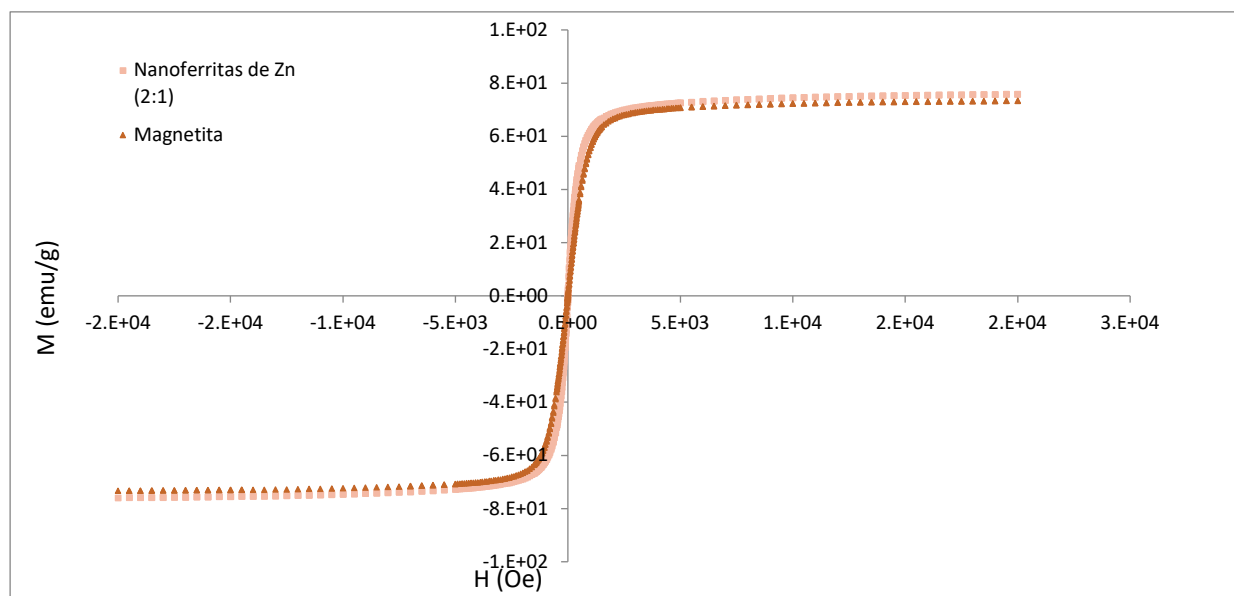


Figura 4. Curva de histéresis de nanopartículas de magnetita comparadas con nanoferritas de Zn.

Síntesis de Micropartículas

Una vez obtenidas y caracterizadas las nanopartículas, se pasó a la síntesis de las micropartículas encapsuladas en PLGA.

El método de síntesis consiste en la sonicación (mediante una sonda de ultrasonidos durante 30 segundos a una amplitud del 65%) de una mezcla de Nanoferritas, PLGA y polivinilalcohol, PVA. Las nanoferritas se añaden dispersas en alcohol isopropílico (25 mg/ml), el PLGA disuelto en diclorometano y alcohol polivinílico (PVA) disuelto en agua al 2%.

Terminada esta etapa se lava por decantación magnética con agua repetidas veces.

Las micropartículas obtenidas se han caracterizado por micrografías de TEM (Figura 5) y por dispersión dinámica de la luz (DLS), obteniéndose tanto el tamaño hidrodinámico de las partículas, su índice de polidispersidad (Pdl) y la carga superficial (Potencial- ζ).

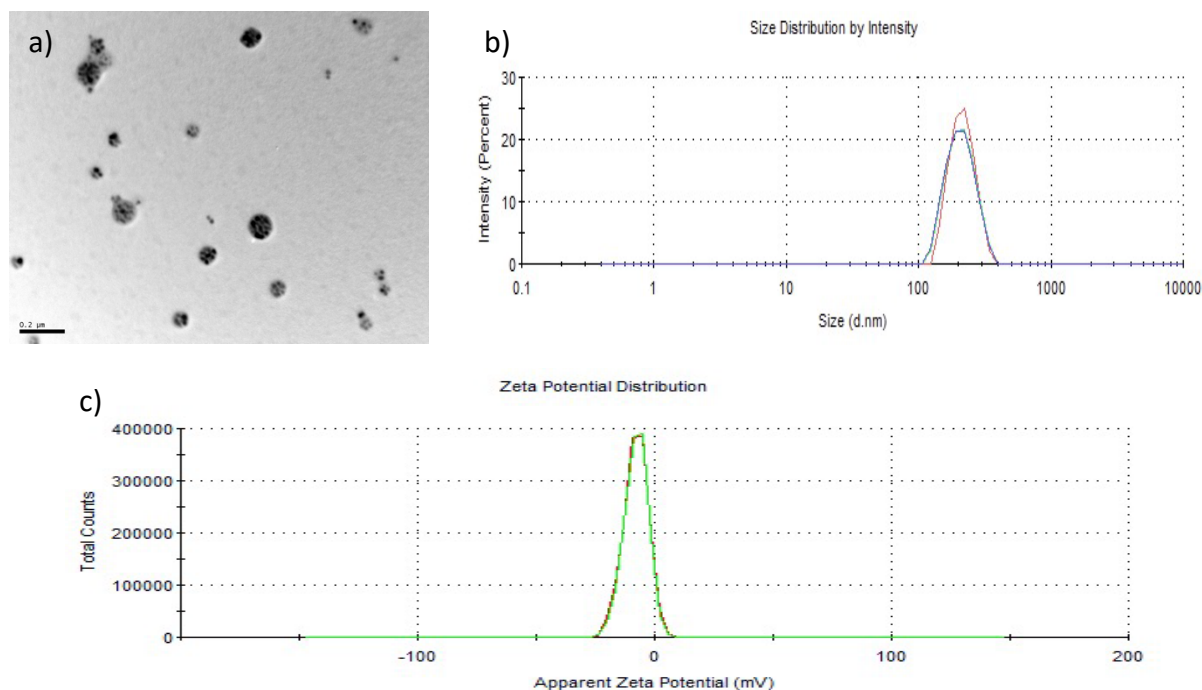


Figura 5. Micrografía de TEM (a)), distribución de tamaño hidrodinámico (b)) y carga superficial (c)) de las micropartículas de PLGA.

Estos resultados muestran un diámetro hidrodinámico medio de las partículas de 217,3 nm, un índice de polidispersidad de 0,003 y un Potencial- ζ de -8 mV.

Con todos estos resultados, se puede concluir que se han obtenido micropartículas magnéticas con un tamaño adecuado para servir como plataformas para la detección de marcadores de Alzheimer, si bien sería necesario continuar trabajando tanto en su caracterización como en su funcionalización.

Se realizaron medidas de la actividad eléctrica en neurona corticales cultivadas en un sistema multi-electrodo (MEA) y expuestas a líquido cefalorraquídeo (LCR) de tres sujetos humanos. Todos los sujetos presentaban alteraciones cognitivas. Las tablas I, II y III muestran la actividad eléctrica y el tiempo de duración.

TABLE1A: Total Spikes/sec			TABLE 1B: Total Burst/min		
Time (h)	Fold Increase	SD	Time (h)	Fold Increase	SD
0	1,00	0,40	0	1,00	0,13
24	1,74	0,49	24	1,54	0,33
48	4,93	0,88	48	4,02	1,0

TABLE 2A: Total Spikes/sec

<i>Time (h)</i>	Fold Increase	SD
0	1,00	0,34
18	0,70	0,29
42	0,93	0,40

TABLE 2B: Total Burst/min

<i>Time (h)</i>	Fold Increase	SD
0	1,00	0,15
18	0,89	0,29
42	1,08	0,23

TABLE 3A: Total Spikes/sec

<i>Time (h)</i>	Fold Increase	SD
0	1,00	0,19
24	0,38	0,08

TABLE 3B: Total Burst/min

<i>Time (h)</i>	Fold Increase	SD
0	1,00	0,13
24	0,80	0,28
48	0,56	0,15

Tablas I, II y III

Los pacientes de las tablas I y II muestran síntomas que son compatibles con la enfermedad de Alzheimer, mientras que el paciente de la tabla III tiene una enfermedad autoinmune. El LCR de todos los pacientes fue analizado por la presencia de marcadores bioquímicos de enfermedades neurodegenerativas.

2.2 Objetivos iniciales del proyecto y grado de consecución

- Obtención de nanopartículas superparamagnéticas y su funcionalización para la detección de marcadores de Alzheimer. El grado de obtención de este objetivo es del 100%.
- Unión de las nanopartículas funcionalizadas con anticuerpos anti β -amiloide (1-42), anti Tau total y anti tau fosforilada-181 biotilados. El grado de ejecución de este apartado fue el 40%
- Aunque no figuraba en los objetivos iniciales del proyecto, pero teniendo en cuenta que el objetivo último de este trabajo es el del desarrollo de un método que permita detectar la enfermedad de Alzheimer en sus primeros estadios, se han realizado medidas de la actividad eléctrica en neuronas corticales de tres sujetos humanos para detectar enfermedades neurodegenerativas. Este estudio se encuentra en su fase inicial y por eso podemos valorar su grado de ejecución en un 40%.

2.3 Tareas realizadas

Las tareas que se han desarrollado a lo largo del proyecto fueron las siguientes:

- ✓ Síntesis de ferritas de Zn con diferentes concentraciones de este metal.
- ✓ Caracterización de ferritas de Zn mediante TEM, magnetismo y difracción de rayos X.
- ✓ Síntesis de micropartículas magnéticas compuestas por ferritas de Zn y una matriz de PLGA.
- ✓ Caracterización de micropartículas de PLGA por TEM y DLS.
- ✓ Medidas de la actividad eléctrica de neuronas cultivadas en un sistema multi-electrodo y expuestas a fluido cefalorraquídeo en muestras de tres sujetos humanos.

2.4 Resultados obtenidos

- Desarrollo de nanoferritas de Zn con un tamaño de $13,6 \pm 3$ nm de diámetro y un magnetismo de saturación de 76 emu/g y un campo coercitivo de 1,6. Estos resultados aseguran el comportamiento superparamagnético de estas partículas.
- Encapsulación de las nanoferritas obtenidas en una micropartícula de PLGA. Esta encapsulación permite obtener partículas de 216 nm de diámetro que, presumiblemente, presentan un comportamiento magnético más favorable que las nanoferritas aisladas.
- Detección de alteraciones en la actividad eléctrica en neuronas corticales en pacientes con alteraciones cognitivas.

2.5 Trabajos o necesidades futuras

Para culminar correctamente este trabajo, sería necesaria la funcionalización de las micropartículas con más anticuerpos específicos para la detección de biomarcadores de Alzheimer, así como la realización de pruebas electroquímicas a este respecto.

Por otro lado sería necesario realizar más medidas MEA y comparar los resultados neurológicos con los electroquímicos.

2.6 Divulgación de los resultados (publicaciones, artículos, ponencias...)

Los resultados obtenidos no han sido publicados por el momento puesto que es necesario seguir trabajando en el proyecto para la obtención de resultados suficientes para su publicación en una revista de alto impacto. Se pretende seguir con la línea de la fabricación de las micropartículas que en un futuro cercano dará lugar a una publicación y con la de detección de los marcadores de la enfermedad de Alzheimer que dará lugar a otra publicación.

3. MEMORIA ECONÓMICA

Financiación		Personal	Inventariable	Fungible	Otros gastos
IUTA	SV-19-GIJÓN-1-22.	4000 €			
Otras fuentes	Referencia proyecto/contrato				
Estudiante con ayuda a la investigación	Nombre	Fernando Abraham Asencio Salazar			
	Tareas	Fabricación de micropartículas magnéticas. Medidas MEA			
	Período	01/09/2019 hasta 31/12/2019			

4. OTROS PROYECTOS Y CONTRATOS CON FINANCIACIÓN EXTERNA

Título del proyecto/contrato	
Referencia	
Investigador/a/es principal/es	
Equipo investigador	
Periodo de vigencia	
Entidad financiadora	
Cantidad subvencionada	