



Universidad de Oviedo  
*Universidá d'Uviéu*  
*University of Oviedo*

## **MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS**

### **Trabajo Fin de Máster**

# **BIOIMAGING DE PROTEÍNAS RELACIONADOS CON PATOLOGÍAS NEURODEGENERATIVAS EN SECCIONES DE TEJIDO DE UN MODELO ANIMAL EMPLEANDO ABLACIÓN LÁSER ICP-MS**

**PAULA MENERO VALDÉS**

**Oviedo, Julio 2020**



**Beatriz Fernández García**, Contratada Ramón y Cajal del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo y **Ana María Navarro Incio**, Catedrática del Departamento de Morfología y Biología Celular de la Universidad de Oviedo,

CERTIFICAN:

Que el presente Trabajo, titulado “Bioimaging de proteínas relacionados con patologías neurodegenerativas en secciones de tejido de un modelo animal empleando ablación láser ICP-MS”.

ha sido realizado por el alumno Paula Menero Valdés bajo nuestra dirección, constituyendo su Trabajo Fin de Máster del Máster Internacional en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas de la Universidad de Oviedo en el curso académico 2019-20, y cuya presentación autorizamos.

Oviedo, 10 de Julio de 2020

Fdo: Beatriz Fernández García

Fdo: Ana María Navarro Incio

## Acrónimos

A $\beta$ : Proteína  $\beta$  amiloide

APP: Proteína precursora amiloide

CFN: Capa de fibras nerviosas de la retina

CGR: Células ganglionares de la retina

CNE: Capa nuclear externa de la retina

CNI: Capa nuclear interna de la retina

CPE: Capa plexiforme externa de la retina

CPI: Capa plexiforme interna de la retina

DAB: Diaminobenzidina

DAPI: 4',6-Diamidino-2-fenilindol

DHLA: Ácido dihidrolipoico

DLS: Dispersión dinámica de la luz

DMAE: Degeneración macular asociada a la edad

DOTA: Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético

EC: Estroma ciliar

ECNP: Epitelio ciliar no pigmentado

ECP: Epitelio ciliar pigmentado

EDX: Espectroscopía de rayos X

EPR: Epitelio pigmentario de la retina

ESI: Ionización por electroespray

FPN: Ferroportina

FR: Fotorreceptores de la retina

FTIR: Espectroscopía Infrarroja de Transformada de Fourier

HPC: Hepcidina

HR-TEM: Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución

ICP-MS: plasma de acoplamiento inductivo con detección por espectrometría de masas

ISO: Organización internacional de normalización

IHC: Inmunohistoquímica

LA: Ácido lipoico

LA-ICP-MS: ablación láser - plasma de acoplamiento inductivo con detección por espectrometría de masas

MALDI: Ionización por láser asistida por matriz

MT: Metalotioneína

NC: Nanoclúster

NP: Nanopartícula

NMR: Resonancia magnética nuclear

OCT: Optimal cutting temperature compound

PFA: Paraformaldehído

QD: Quantum dot

ROS: Reactive oxygen species

SOD: Superóxido dismutasa

VIS-UV: Visible-ultravioleta

XPS: Espectroscopía de dispersión de rayos X

# Índice

I.	Introducción .....	1
1.	Enfermedades neurodegenerativas .....	1
2.	<i>Bioimaging</i> de heteroátomos y proteínas en tejidos mediante LA-ICP-MS.....	4
2.1.	Estudio de proteínas y otras biomoléculas mediante LA-ICP-MS .....	5
2.2.	Preparación de tejidos biológicos para ser analizados mediante LA-ICP-MS	7
3.	Nanoclústeres metálicos .....	8
3.1.	Propiedades de los nanoclústeres metálicos .....	9
3.2.	Síntesis de nanoclústeres metálicos.....	10
3.3.	Caracterización de nanoclústeres metálicos.....	11
3.4.	Aplicaciones de los nanoclústeres metálicos .....	12
4.	Nanoclústeres de iridio .....	14
II.	Objetivos .....	16
III.	Experimental .....	17
1.	Material .....	17
2.	Instrumentación .....	17
3.	Reactivos .....	17
4.	Muestras.....	18
5.	Procedimientos experimentales .....	19
5.1.	Síntesis y caracterización de IrNPs .....	19
5.1.1.	Optimizaciones previas a la síntesis de IrNPs.....	19
5.1.2.	Síntesis de IrNPs .....	20
5.1.3.	Caracterización de las IrNPs .....	21
5.2.	Estudio de la distribución de proteínas en tejidos biológicos.....	22
5.2.1.	Ensayos de inmunofluorescencia .....	22
5.2.2.	Obtención de imágenes mediante microscopía de fluorescencia .....	24
IV.	Resultados y discusión .....	25

1. Síntesis de IrNPs .....	25
1.1. Optimizaciones previas a la síntesis de IrNPs .....	25
1.2. Síntesis y caracterización de las IrNPs.....	27
1.2.1. Síntesis de IrNPs empleando DHLA como ligando y una relación molar sal:ligando 1:5 (DHLA-A).....	27
1.2.2. Síntesis de IrNPs empleando DHLA como ligando y una relación molar sal: ligando 1:15 (DHLA-B) .....	30
1.2.3. Síntesis de IrNPs empleando citrato como ligando (DHLA citrato).....	32
1.2.4. Determinación del rendimiento de las síntesis de IrNPs por ICP-MS .....	34
2. Estudio de la localización de proteínas en tejidos biológicos .....	36
2.1. Localización de metalotioneínas en tejidos oculares.....	36
2.2. Localización de Ferroportina y Hefcidina en tejidos de encéfalo.....	41
V. Conclusiones.....	44
VI. Trabajos futuros .....	45
Bibliografía.....	46

# I. Introducción

## 1. Enfermedades neurodegenerativas

Bajo el término de enfermedades neurodegenerativas se engloban aquellas patologías de origen desconocido relacionadas con el deterioro progresivo del sistema nervioso, que afectan sobremanera a los individuos envejecidos y suponen el tercer problema de salud más importante en nuestro país<sup>1</sup>. Las más comunes son el Alzheimer y el Parkinson. La enfermedad del Alzheimer es responsable del 60-70% de los casos de demencia senil en España. El Parkinson, por su parte, provoca trastornos de la movilidad y la postura<sup>1</sup>.

También existen enfermedades neurodegenerativas oculares, asociadas con daños en la retina, como el glaucoma y la degeneración macular asociada a la edad (DMAE)<sup>2</sup>. Estudios recientes señalan que las enfermedades neurodegenerativas oculares están también relacionadas con las enfermedades del sistema neurológico central: pacientes de Alzheimer y Parkinson suelen padecer también glaucoma y DMAE<sup>3,4</sup>. Además se ha observado que el 25,9% de los enfermos de Alzheimer presentan glaucoma, frente al 1-5,2% del resto de población<sup>5</sup>. El ojo es una ventana del cerebro, ya que la retina forma parte del sistema neurológico, y el deterioro neurodegenerativo del cerebro va acompañado de cambios en la estructura y funcionalidad de la retina<sup>3</sup>.

El Alzheimer y el Parkinson están caracterizados por la formación de placas seniles en el cerebro, unos depósitos anormales constituidos mayoritariamente por proteína  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ )<sup>3,6</sup>. La  $A\beta$  es un péptido de 39 a 43 aminoácidos que se forma debido a la rotura proteolítica de la proteína precursora amiloide (APP)<sup>7</sup>. Además de en estas patologías del cerebro, también se produce una acumulación de proteína  $A\beta$  en la retina, formando parte de unos depósitos denominados drusas. Las drusas aparecen, así mismo, en pacientes de DMAE y glaucoma<sup>8</sup>.

En la Figura 1 se representa esquemáticamente la formación de las placas de proteína  $A\beta$ . Esta proteína se forma debido a la rotura secuencial de la APP por la acción de dos proteasas, la  $\beta$ -secretasa que rompe la cadena de aminoácidos por el extremo N-terminal y la  $\gamma$ -secretasa que corta por el extremo C-terminal. De este modo se producen monómeros de  $A\beta$  que se agregan hasta formar fibrillas<sup>9</sup>. El origen de las enfermedades neurodegenerativas es todavía incierto, aunque algunos autores señalan que el estrés oxidativo y la dishomeostasis de metales como el Fe, Cu y Zn promueve la acumulación de proteína  $A\beta$ <sup>7,10</sup> y, por tanto, el desarrollo de estas enfermedades.

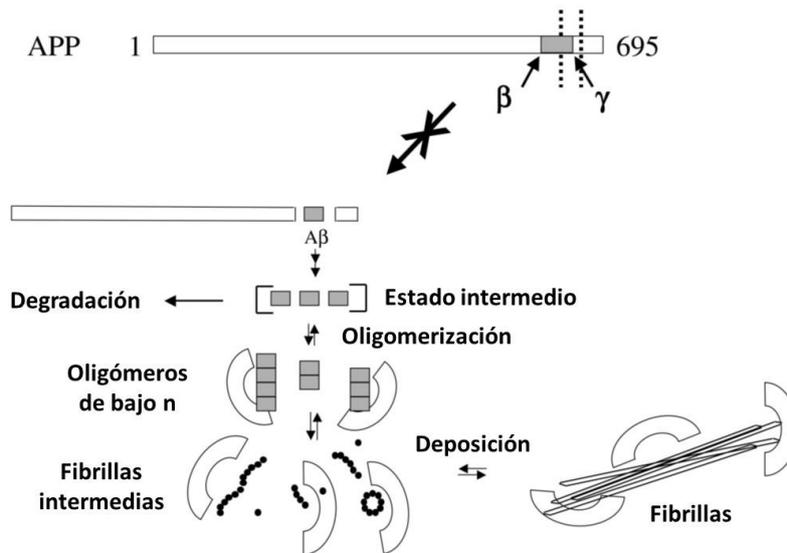


Figura 1: Esquema en el que se muestra la formación de los depósitos de proteína Aβ. Imagen modificada de Ref.<sup>9</sup>

En la Figura 2 se observa la acumulación de proteína Aβ en un individuo con la patología de Alzheimer. En la Figura 2A se puede ver un tejido cerebral en el que se distingue la presencia de placas seniles (marcadas con círculos en rojo). En la Figura 2B se puede apreciar la acumulación de proteína Aβ en la retina. Ambas imágenes fueron obtenidas mediante inmunohistoquímica (IHC) convencional, empleando como anticuerpo primario anti-Aβ y un anticuerpo secundario marcado con DAB.

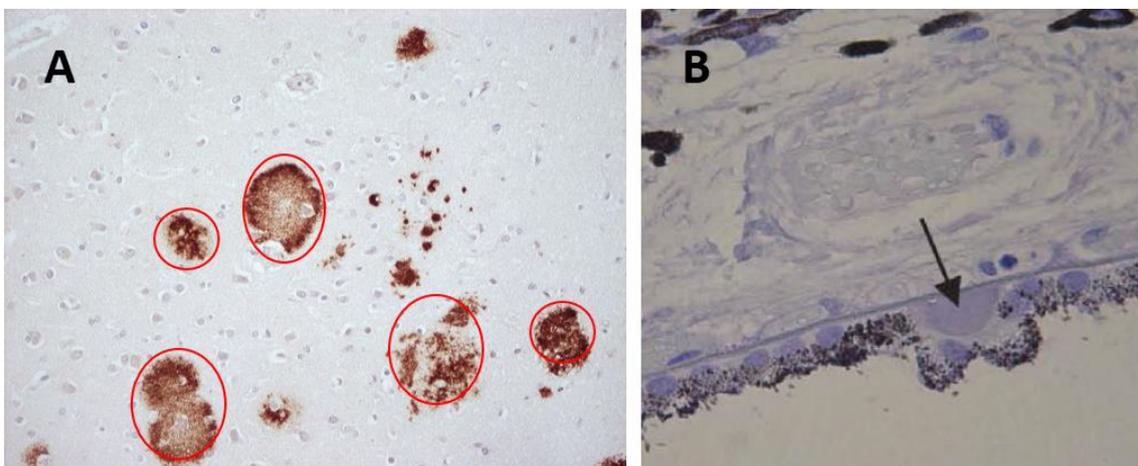


Figura 2: Microfotografías obtenidas de tejidos de cerebro y ojo humano de pacientes con Alzheimer tras IHC convencional. A) Corte de cerebro humano con Alzheimer en el que se observa la presencia de placas seniles. B) Acumulación de proteína Aβ en el epitelio pigmentario de la retina de un paciente de Alzheimer (Ref<sup>11</sup>).

El estrés oxidativo se debe a la presencia en el organismo de especies reactivas de oxígeno conocidas comúnmente por sus siglas en inglés, ROS (*reactive oxygen species*). Estas especies se generan debido a la actividad enzimática y el metabolismo oxidativo mitocondrial normal<sup>22</sup>. El organismo produce enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), la

catalasa, la glutatión peroxidasa y cuenta con la presencia de otras moléculas no enzimáticas como el  $\beta$ -caroteno, la vitamina C y la vitamina E que compensan la actividad de las ROS<sup>13</sup>. El estrés oxidativo se produce cuando se altera el equilibrio entre las ROS y los antioxidantes, que puede ser debido a un aumento de las especies ROS, a una disminución de la actividad antioxidante o a una combinación de ambos<sup>12</sup>. El estrés oxidativo causa disfunciones celulares y la muerte de células postmitóticas como las neuronas<sup>12</sup>. Algunos estímulos que promueven la aparición del estrés oxidativo son el envejecimiento, la exposición a radiación ultravioleta, el tabaco y algunos contaminantes atmosféricos como el ozono y los óxidos de nitrógeno<sup>14</sup>.

El cerebro en condiciones normales contiene metales como el Fe, Cu y Zn los cuales participan en la actividad neuronal durante las sinapsis y actúan como cofactores de varias metaloenzimas (p.e., citocromo C oxidasa, y Cu/Zn SOD)<sup>7</sup>. Una alteración de la homeostasis de Fe, Cu y Zn puede resultar en desórdenes neurodegenerativos<sup>15</sup>. En el caso del Alzheimer, estos metales presentan dos papeles en el desarrollo de la enfermedad: contribuyen a la agregación de la proteína A $\beta$  y a la formación de especies ROS<sup>7,16</sup>. Se han encontrado evidencias de un aumento de la concentración de Cu extracelular en pacientes de Alzheimer<sup>7</sup>. Este metal favorece la agregación de la proteína A $\beta$ . Los cationes de Cu<sup>2+</sup> se unen a los péptidos de A $\beta$  reduciéndose a Cu<sup>+</sup> y, como consecuencia de este proceso, se produce peróxido de hidrógeno que contribuye a la formación de radicales libres<sup>16</sup>.

En el caso del Fe, un estudio realizado por Ding *et al.* mostró una acumulación de Fe en el hipocampo de pacientes con Alzheimer<sup>17</sup>. La presencia de Fe provoca la formación del radical hidroxilo a través de la reacción de Fenton<sup>7,16</sup>. La formación de radicales libres como el hidroxilo aumenta el estrés oxidativo y provoca daño neuronal. Por otro lado, se ha encontrado un aumento de la concentración de Zn en el neuropilo en pacientes con Alzheimer en relación con pacientes control. Algunos estudios *in vitro* han comprobado que el Zn<sup>2+</sup> se agrega con los péptidos A $\beta$  formando un complejo de estequiometría 1:1<sup>18,19</sup>. El Zn tiene un efecto neuroprotector y se ha demostrado que disminuye la toxicidad de la proteína A $\beta$  en tejidos cerebrales<sup>20</sup>, compitiendo con el Cu por la unión a A $\beta$  y previniendo la formación de radicales libres.

De este modo, conocer la distribución espacial y la concentración de dichos metales y de las proteínas que regulan su homeostasis en tejidos con patologías neurodegenerativas es de vital importancia para comprender la patogénesis de enfermedades como el Alzheimer, Parkinson y DMAE.

## 2. Bioimaging de heteroátomos y proteínas en tejidos mediante LA-ICP-MS

La ablación láser acoplada a espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (LA-ICP-MS) es una técnica de análisis elemental e isotópico que permite el análisis directo de muestras sólidas con una resolución lateral en el orden de las micras y una resolución en profundidad de centenas de nanómetros. El límite de detección se encuentra en el rango de las ppm-ppb dependiendo del analizador de masas empleado.

En la Figura 3 se muestra un esquema de cómo debería ser un proceso ideal de medida de muestras sólidas empleando LA-ICP-MS. En primer lugar, el haz láser interactúa con la muestra arrancando pequeñas partículas que son transportadas por un flujo de gas inerte (He o Ar) desde la celda de ablación hasta la antorcha del ICP. En el plasma, las partículas se vaporizan, atomizan e ionizan. Los iones generados entran en el analizador de masas y son separados y detectados en función de su relación masa/carga ( $m/z$ ).

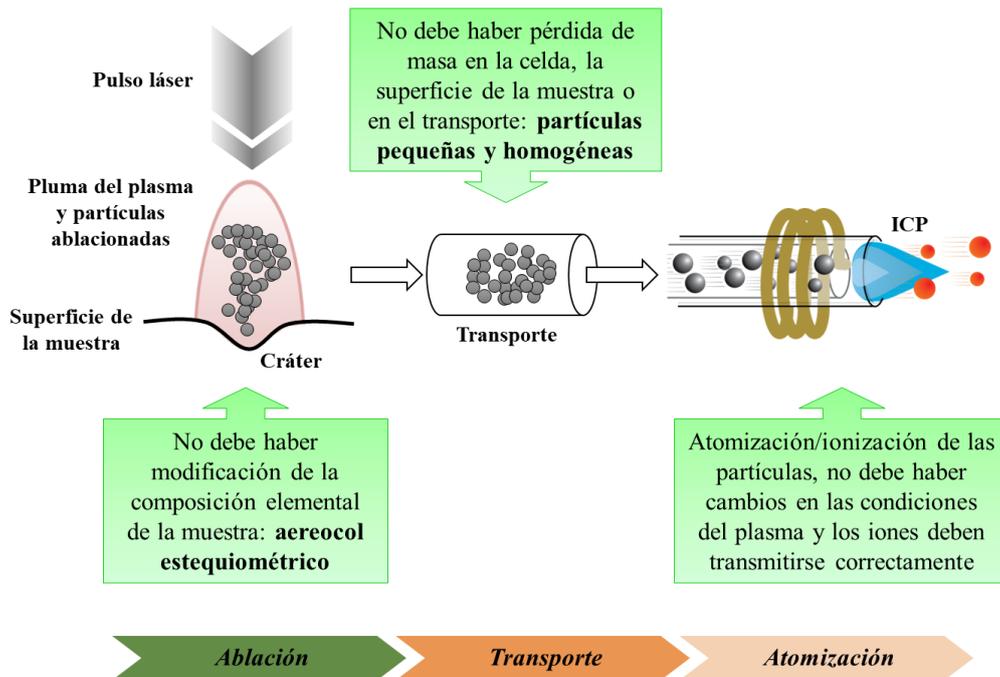


Figura 3: Representación esquemática de la técnica LA-ICP-MS. Imagen modificada de Ref. <sup>21</sup>

Las características analíticas de la medida dependen del proceso de ablación de la muestra, así como de la estequiometría del aerosol generado, el grado de vaporización, atomización e ionización en la fuente del ICP y el transporte de iones en la interfase y la óptica del analizador de masas. Otros factores que pueden tener influencia en el análisis son la energía del haz láser, el diámetro del haz y la duración del pulso<sup>22</sup>.

Las mayores limitaciones de la técnica LA-ICP-MS son los efectos de fraccionamiento (efectos no estequiométricos en los procesos de ablación, transporte e ionización en el ICP) y

los efectos de matriz<sup>23</sup>. Algunos autores señalan que el uso de láseres con longitudes de onda más cortas (en el rango UV) y pulsos cortos (del orden de los femtosegundos, fs) reducen los efectos de fraccionamiento<sup>24,25</sup>. Así mismo, es recomendable emplear estrategias de cuantificación donde haya coincidencia de matrices entre las muestras y los patrones para que los efectos de ablación, transporte e ionización sean similares en ambos casos.

En las últimas dos décadas se han desarrollado numerosas aplicaciones en el campo de la biomedicina para obtener información no solo cualitativa, si no también cuantitativa acerca de la distribución elemental en tejidos biológicos mediante LA-ICP-MS<sup>23,24,26</sup>. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para el análisis de metales, semimetales y no metales en tejidos debido a su alta resolución espacial, bajo límite de detección, alto rango de linealidad, especificidad elemental y la posibilidad de obtener información isotópica<sup>27</sup> y realizar análisis multiparamétricos. Además, el acoplamiento a analizadores de masas de tipo triple cuadrupolo o doble enfoque permite la resolución de interferencias isobáricas<sup>28</sup>.

### 2.1. Estudio de proteínas y otras biomoléculas mediante LA-ICP-MS

La técnica LA-ICP-MS también ha sido empleado en estudios de metaloproteómica combinando esta técnica con espectrometría de masas molecular (ionización por electroespray (ESI) y desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI)) para elucidar la secuencia y/o estructura de proteínas unidas a metales<sup>23,25,28</sup>. En este tipo de trabajos, en primer lugar, se estudia la distribución del metal de interés en el tejido intacto mediante LA-ICP-MS. A continuación, se extraen las proteínas de la muestra empleando electroforesis en gel y se localizan las metaloproteínas en el gel mediante LA-ICP-MS. Finalmente, las metaloproteínas encontradas se digieren tripticamente y se analizan empleando MALDI o ESI-MS para determinar su secuencia<sup>28</sup>.

Por otro lado, en los últimos años se ha combinado la IHC con la técnica LA-ICP-MS para estudiar la distribución espacial de biomoléculas específicas (mayoritariamente proteínas) en secciones de tejidos o cultivos celulares empleando anticuerpos marcados. Se pueden emplear distintas marcas metálicas para etiquetar anticuerpos que reconocen específicamente a la molécula de interés. Esta metodología permite realizar estudios multiparamétricos simultáneos marcando varias proteínas con distintos metales, lo que supone una alternativa muy interesante a las marcas fluorescentes. Tradicionalmente se han empleado marcas fluorescentes para estudiar la distribución de proteínas en tejidos. Sin embargo, la posibilidad de llevar a cabo estudios multiparamétricos está limitada por el solapamiento de las bandas de emisión, la dificultad de cuantificar analitos con abundancias que difieren un orden de magnitud o más, así como por la pérdida de la fluorescencia de las marcas y la autofluorescencia de los tejidos<sup>29</sup>.

En general, la estrategia llevada a cabo para estudiar la distribución espacial de las proteínas específicas combinando la IHC y LA-ICP-MS consta de dos etapas: en primer lugar, debe realizarse un inmunoensayo sobre el tejido para que los anticuerpos marcados reconozcan la proteína de interés y, a continuación, se analiza el tejido mediante LA-ICP-MS siguiendo la señal de la marca metálica. En este sentido, se pueden emplear dos procedimientos generales de IHC para hacer el *bioimaging* de proteínas mediante LA-ICP-MS en tejidos biológicos. El primer procedimiento consiste en incubar la muestra con un anticuerpo primario que contenga la marca a detectar empleando ICP-MS. La segunda posibilidad añade un paso extra: primero se incuba el tejido con un anticuerpo primario y, a continuación, se hace una segunda incubación con un anticuerpo secundario que contiene la marca. La primera opción ofrece mayor especificidad y mayor potencial para realizar estudios multiparamétricos, mientras que la segunda opción es óptima para la cuantificación al ofrecer una mayor sensibilidad<sup>30</sup>.

En un artículo de revisión publicado por Cruz-Alonso *et al.*, se señalan las “10 reglas de oro” que deben tenerse en cuenta para obtener resultados cuantitativos en el estudio de la distribución espacial de proteínas específicas en tejidos biológicos combinando IHC y LA-ICP-MS<sup>29</sup>:

1. Los elementos o isótopos usados para el marcaje de las proteínas no deben encontrarse en los tejidos a estudiar en concentraciones detectables.
2. Deben emplearse marcas de pequeño tamaño para evitar bloquear los sitios de reconocimiento del anticuerpo o que el bioconjugado sea muy voluminoso y no penetre en el tejido. No obstante, la marca debe tener un gran número de átomos del metal cuya señal va a seguirse en el ICP-MS, para obtener una buena amplificación de la señal. Por lo tanto, debe haber un compromiso entre el tamaño y la amplificación requerida.
3. Debe conocerse con exactitud el número de átomos metálicos por marca y la concentración de la marca en la disolución empleada para etiquetar el anticuerpo.
4. Las condiciones de la bioconjugación de la etiqueta al anticuerpo deben ser lo más suaves posibles para evitar la degradación de este último y para no alterar sus propiedades de reconocimiento.
5. La eficiencia del etiquetado debe ser conocida y reproducible.
6. No debe haber anticuerpos sin marcar en la disolución de incubación.
7. Se debe evitar la formación de agregados de anticuerpo marcado.
8. Se debe conocer el número de marcas por anticuerpo.

9. El proceso IHC debe ser cuantitativo. Para ello se debe añadir anticuerpo marcado en exceso y la interacción con el tejido debe mantenerse un tiempo suficiente para que el anticuerpo penetre en su totalidad.
10. Para la detección debe emplearse una técnica que ofrezca alta sensibilidad, respuesta independiente de la estructura y un alto rango dinámico de linealidad (p.e., LA-ICP-MS).

Hasta la fecha, las marcas empleadas para la detección de biomoléculas por LA-ICP-MS se pueden dividir en dos categorías: aquellas que contienen un único átomo detectable y aquellas que cuentan con un gran número de átomos detectables. Estas últimas ofrecen una mayor capacidad de amplificación. Dentro de las marcas que contienen un único átomo detectable se encuentran los quelatos metálicos. El más habitual es el ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA) coordinado con lantánidos<sup>31</sup> (los lantánidos tienen gran afinidad por DOTA y no están presentes en los tejidos biológicos). Este quelato se modifica, añadiéndole distintos grupos funcionales para poder bioconjugarlo al anticuerpo deseado<sup>32</sup>.

En la segunda categoría se encuentran marcas poliméricas que contienen varios quelatos metálicos. Estas marcas están disponibles comercialmente y suponen una amplificación de la señal frente a los de la primera categoría. Sin embargo, son muy voluminosos y pueden dar lugar a interacciones inespecíficas con los anticuerpos<sup>29</sup>. Otras marcas que contienen un gran número de átomos detectables son las nanopartículas metálicas, que cuentan con un tamaño mucho menor que los quelatos metálicos. Entre otras aplicaciones, se han empleado nanopartículas de oro para el *bioimaging* de marcadores en tejidos de cáncer de mama<sup>33</sup> y proteínas en encéfalo de ratón<sup>34,35</sup>.

## 2.2. Preparación de tejidos biológicos para ser analizados mediante LA-ICP-MS

Para ser analizados mediante LA-ICP-MS, los tejidos biológicos deben estar previamente fijados con el fin de conservar las estructuras en su estado nativo. Las muestras pueden embeberse en parafina o criogenizarse para después cortarse en secciones de unas decenas de  $\mu\text{m}$  y depositarse sobre un portaobjetos de vidrio<sup>23</sup>.

Un estudio realizado por *Hare et al.* señalan que algunos elementos solubles en agua como el Fe, Cu y Zn pueden perderse en las etapas de fijación y además, el grado de lixiviación es dependiente de la especie<sup>36</sup>. Otros estudios reportan que la inmersión en formaldehído que suele realizarse para fijar un tejido antes de ser embebido en parafina, provoca también pérdida de metales<sup>37</sup>. En el caso de los análisis de proteínas, *Bishop et al.* discuten que el fijado con formaldehído provoca entrecruzamiento entre los aminoácidos que conforman las proteínas y

provoca que estas se anclen a las membranas celulares. También señalan que los lavados con disolventes orgánicos necesarios para el fijado del tejido y posteriormente para retirar la parafina previo al protocolo de IHC provoca la desnaturalización de las proteínas y la formación de agregados<sup>30</sup>.

### 3. Nanoclústeres metálicos

Los nanomateriales han alcanzado un gran grado de desarrollo desde mediados del siglo XX. La definición de nanomaterial dada por la Organización Internacional de Normalización (ISO) es la siguiente: “material que tenga cualquier dimensión externa en la nanoescala o una estructura interna o superficial en la nanoescala”<sup>38</sup>. Se entiende como nanoescala al intervalo comprendido entre 1 y 100 nm.

El interés de la nanociencia y la nanotecnología reside en que al sintetizar los materiales en la escala nanométrica sus características fisicoquímicas cambian<sup>22</sup>. Las propiedades de los nanomateriales están regidas por la mecánica cuántica y son diferentes a las de la macroescala y a las de sus átomos y moléculas constituyentes. Los nanomateriales constituyen un grupo muy amplio de estructuras, en ellos se pueden englobar: liposomas, dendrímeros, nanotubos de carbono, fullerenos, derivados del grafeno, puntos cuánticos, nanopartículas (NPs), etc.

Dentro de los nanomateriales, una de las clases que se pueden encontrar con un gran número de aplicaciones son las NPs metálicas. Al reducir el tamaño de las partículas se produce una cuantización de los niveles energéticos del material, tal y como se muestra en la Figura 4, y las propiedades del material cambian respecto a las del metal macroscópico. Cuando el tamaño de las NPs es próximo al camino libre medio de los electrones ocurre el fenómeno de resonancia de plasmón de superficie (SPR)<sup>39</sup>. Las NPs metálicas presentan una fuerte absorción de la radiación electromagnética y no son luminiscentes.

Si se reduce el tamaño de las NPs, el grado de cuantización de los niveles electrónicos del material se incrementa. Cuando el tamaño de la NP es comparable a la longitud de onda de Fermi, se puede hablar de nanoclústeres (NCs) metálicos<sup>39</sup>. Los NCs metálicos están formados por unos pocos hasta cientos de átomos, tienen un tamaño comprendido entre los 0,2 y los 3 nm y presentan niveles electrónicos discretos (Figura 4). El confinamiento cuántico de los electrones hace que las propiedades de los NCs cambien drásticamente y tengan un comportamiento más cercano al molecular<sup>22</sup>. Además, los NCs metálicos presentan nuevas propiedades ópticas, eléctricas y magnéticas con respecto a los metales macroscópicos.

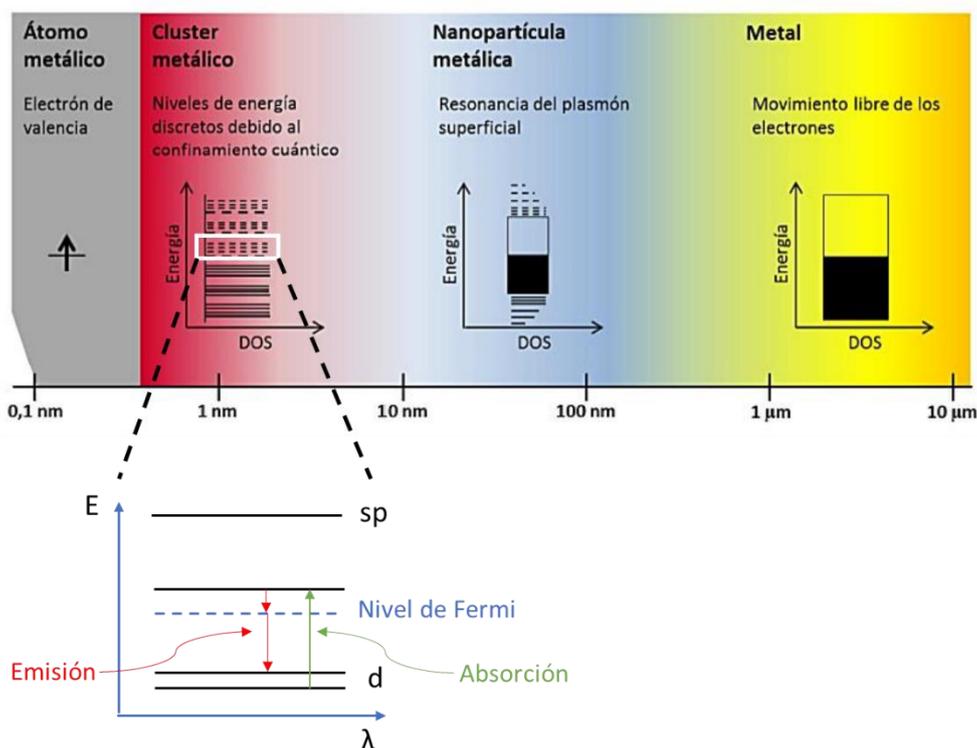


Figura 4: Transformación de las bandas de energía al reducir el tamaño de las partículas metálicas. Figura modificada de Ref. <sup>40</sup>

### 3.1. Propiedades de los nanoclústeres metálicos

Los NCs presentan estructuras geométricas definidas, transiciones electrónicas discretas, carga cuantizada, quiralidad molecular, magnetismo, y fotoluminiscencia<sup>39,41,42</sup>. Además, debido a la separación de los niveles electrónicos los NCs dejan de ser conductores. Por otro lado, cabe destacar que una de las principales características de los NCs (que los diferencia de las NPs) es la alta emisión fluorescente que es dependiente del tamaño, geometría y superficie <sup>41</sup>. El origen de la fluorescencia de los NCs presenta cierta controversia: algunos autores como Lin *et al.* postulan que se debe a las transiciones HOMO-LUMO, explicando así por qué la fluorescencia es dependiente del tamaño de los NCs<sup>43</sup>. La absorción de fotones permite que los electrones se exciten desde la banda d hasta la banda sp localizada por encima del nivel de Fermi. La recombinación entre los huecos y los electrones situados por debajo del nivel de Fermi produce la emisión en el visible<sup>43</sup>. Sin embargo, otros autores señalan que la fluorescencia se debe a las transiciones electrónicas entre el núcleo metálico y los ligandos<sup>44</sup>.

Desde el punto de vista analítico, las propiedades más llamativas de los NCs metálicos son las propiedades ópticas. Como ya se ha mencionado, estas partículas son fluorescentes y presentan un rendimiento cuántico elevado, una fotoestabilidad superior a la de los fluoróforos convencionales, absorción de dos fotones y un largo desplazamiento de Stokes<sup>43</sup>. La emisión fluorescente de los NCs varía con la naturaleza del metal, su tamaño, el tipo de ligando que

recubre su superficie, el medio y la ruta sintética escogida. A modo de ejemplo, en la Figura 5 se muestra la excitación y emisión fluorescente de NCs de oro de distintos tamaños. Al aumentar el tamaño de la partícula, los máximos se desplazan a longitudes de onda mayores.

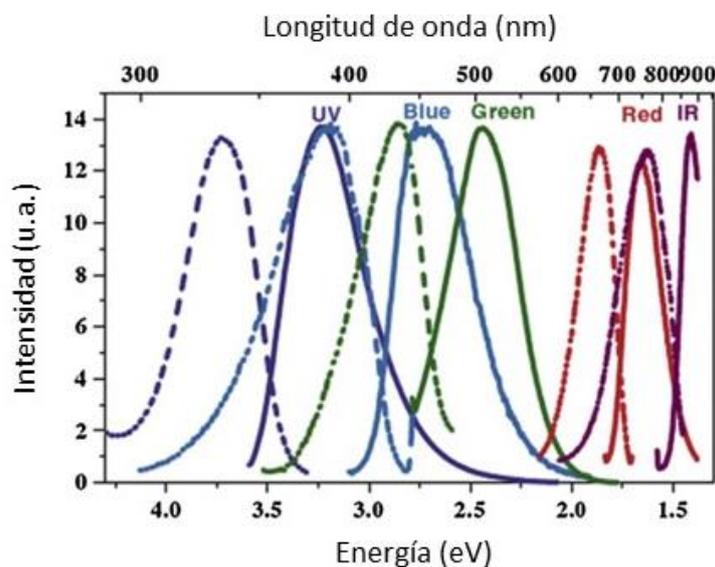


Figura 5: Excitación (línea discontinua) y emisión (línea sólida) de diferentes NCs de oro. Los máximos de excitación y emisión se desplazan a longitudes de onda mayores al aumentar el tamaño del NC. Figura modificada de Ref. <sup>45</sup>.

### 3.2. Síntesis de nanoclústeres metálicos

Dado que las propiedades de los NCs dependen de su tamaño, los ligandos que recubran su superficie y del medio en el que se encuentren, la búsqueda de rutas sintéticas que permitan obtener NCs con un rendimiento cuántico elevado, monodispersión de tamaños y una geometría definida es de gran interés actualmente. En los últimos años se ha prestado especial atención a los NCs de Au y Ag debido a su intensa fotoluminiscencia, baja toxicidad, baja reactividad y la posibilidad de recubrirlos con ligandos biocompatibles y solubles (p.e., tioles, fosfinas y selenoles)<sup>41</sup>.

Existen dos estrategias generales para la síntesis de NCs:

- **Bottom-up:** Es la estrategia más utilizada. Consiste en reducir un precursor del metal en presencia del ligando. Normalmente se emplean reductores borados como el  $\text{NaBH}_4$ , aunque también se pueden emplear otros más suaves (p.e., ácido fórmico). Cabe destacar que la cinética de la reacción es crítica: la reducción debe producirse lentamente para obtener NCs de un tamaño homogéneo. La velocidad de la reacción puede disminuirse reduciendo la temperatura, empleando disolventes orgánicos, aumentando el ratio ligando:precursor, disminuyendo el ratio reductor:precursor o aumentando el pH del medio<sup>42</sup>.

- **Top-down:** Consiste en partir de NPs de un tamaño superior al deseado y someterlas a decapado químico empleando ligandos tiolados, NaBH<sub>4</sub> o biomoléculas como agentes de decapado<sup>46</sup>. El decapado puede asistirse mediante sonicación para favorecer la reacción y debe controlarse el pH y la temperatura para asegurar la obtención de NCs monodispersos. Este método consume más tiempo que los métodos *bottom-up* y tiene rendimientos menores, se puede emplear como un segundo paso en rutas *bottom-up* para homogenizar el tamaño de las partículas<sup>42</sup>.

En el caso de que los NCs sintetizados vayan a ser empleados en aplicaciones biomédicas, debe prestarse especial atención al ligando seleccionado. La interacción entre el NCs y el medio biológico viene dada por las propiedades del ligando escogido (p.e., solubilidad, carga superficial, grupos funcionales, y tamaño)<sup>41</sup>. Una opción para asegurar la biocompatibilidad es el empleo de proteínas, péptidos y ácidos nucleicos como ligandos, asegurando así la estabilidad de los NCs en los medios biológicos y reduciendo las posibles interacciones inespecíficas.

### 3.3. Caracterización de nanoclústeres metálicos

Una vez que se ha llevado a cabo la síntesis de los NCs metálicos, es necesario realizar una correcta caracterización de estos para conocer sus propiedades y poder así emplearlos en diferentes tipos de aplicaciones. En la Tabla 1 se recogen las técnicas más habitualmente empleadas para la caracterización de este tipo de NPs, así como las propiedades medidas con cada una de ellas y algunos ejemplos de publicaciones en las que las emplean dichas técnicas.

Tabla 1: Técnicas empleadas para la caracterización de NCs

Caracterización de:	Técnicas	Ref
Tamaño y distribución de tamaños	DLS (Dispersión dinámica de la luz)	47
	HR-TEM (Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución)	39
Análisis morfológico	HR-TEM	39
Determinación de la carga superficial	Medidas de Potencial-Z	48
Composición química y estructural	EDX (Espectroscopía de rayos X)	42
	Espectroscopía de masas elemental (ICP-MS)	49
	Espectroscopía de masas molecular (MALDI/ESI-MS)	41
	Resonancia Magnética Nuclear (NMR)	42
	XPS (Espectroscopía de dispersión de rayos X)	50
Propiedades ópticas	FTIR (Espectroscopía Infrarroja de Transformada de Fourier)	42
	Espectroscopía VIS-UV (Visible-Ultravioleta)	41
	Fluorescencia	41

### 3.4. Aplicaciones de los nanoclústeres metálicos

Actualmente los NCs metálicos son una alternativa muy atractiva a los fluoróforos convencionales y han sido empleados especialmente en aplicaciones biomédicas sustituyendo a marcadores luminiscentes<sup>50,51</sup>. La interacción de la superficie de los NCs con distintas moléculas provoca cambios en sus propiedades luminiscentes y, por lo tanto, se pueden emplear como sensores químicos ópticos. También pueden emplearse como marcadores fluorescentes en bioensayos si se bioconjugan con anticuerpos específicos. A continuación, se describen algunas de las aplicaciones recientes de los NCs metálicos:

- **Detección de metales.** Se han empleado NCs de Au y Ag para la detección de metales tóxicos ( $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ , y  $\text{Cr}^{6+}$ ) en muestras biológicas y muestras de interés medioambiental con una buena selectividad y sensibilidad<sup>41,46,50</sup>. El mecanismo de detección se basa en la desactivación de la luminiscencia del NCs. Por ejemplo, se han empleado AuNCs recubiertos de BSA para la detección de  $\text{Hg}^{2+}$  con un límite de detección de 5 nM. En este caso, la pérdida de la fluorescencia se atribuye a la interacción del  $\text{Hg}^{2+}$  con el núcleo metálico del NC<sup>41</sup>.
- **Detección de pequeñas moléculas orgánicas.** Los NCs se pueden emplear como sensores ópticos para la detección de pequeñas biomoléculas tioladas como el glutatión, la cisteína y la homocisteína. Se ha demostrado que los AgNCs recubiertos de oligonucleótidos como ligandos experimentan desactivación de la fluorescencia en presencia de biotioles debido a la formación de complejos no fluorescentes<sup>46,51</sup>.
- **Detección de proteínas.** Se pueden emplear los NCs metálicos como marcas fluorescentes en bioensayos para la detección de proteínas si se bioconjugan con anticuerpos específicos. La primera aplicación de NCs fluorescentes para la detección de proteínas fue publicada por Leblanc *et al.*<sup>52</sup>. En dicho trabajo se diseñó un inmunoensayo para la detección de IgG humana mediante la bioconjugación de AuNCs recubiertos del polímero PAMAM a un anticuerpo anti-IgG<sup>52</sup>. La combinación de las propiedades luminiscentes de los NCs con la especificidad del anticuerpo permitió llevar a cabo el diseño de un sensor sensible y selectivo.
- **Bioimaging.** Los NCs metálicos pueden emplearse como marcas fluorescentes para el mapeo de biomoléculas de interés en tejidos biológicos sustituyendo a los fluoróforos convencionales. Tradicionalmente se emplean colorantes orgánicos o proteínas fluorescentes pero estos tienen una fotoestabilidad limitada<sup>41</sup>. Los quantum dots (QDs) se han presentado también como una alternativa a los fluoróforos convencionales dada su alta

emisión fluorescente y estabilidad, sin embargo, no se pueden emplear en aplicaciones *in vivo* dada su toxicidad. Su gran tamaño puede causar impedimentos estéricos en el reconocimiento de los analitos de interés<sup>46</sup>. Por su parte, los NCs metálicos tienen un tamaño menor al de los QDs, presentan una intensa fluorescencia, son fotoestables y biocompatibles y los grandes desplazamientos de Stokes evitan la autoabsorbancia. Además, el uso de NCs diferentes para marcar distintos analitos permite realizar análisis multiparamétricos.

Además, los NCs metálicos pueden emplearse en experimentos *in vivo* ya que dado su pequeño tamaño, estos pueden ser eliminados fácilmente en los riñones<sup>41</sup>. En la Figura 6, se muestra un estudio de *bioimaging in vivo* con detección fluorescente. Se administró de forma intravenosa un anticuerpo que reconoce selectivamente células tumorales bioconjugado con AuNCs y un colorante orgánico. Empleando AuNCs como marca se observa un tiempo de retención mayor en el tumor (señalado con una flecha en las imágenes) y una menor acumulación en el tejido no tumoral<sup>53</sup>.

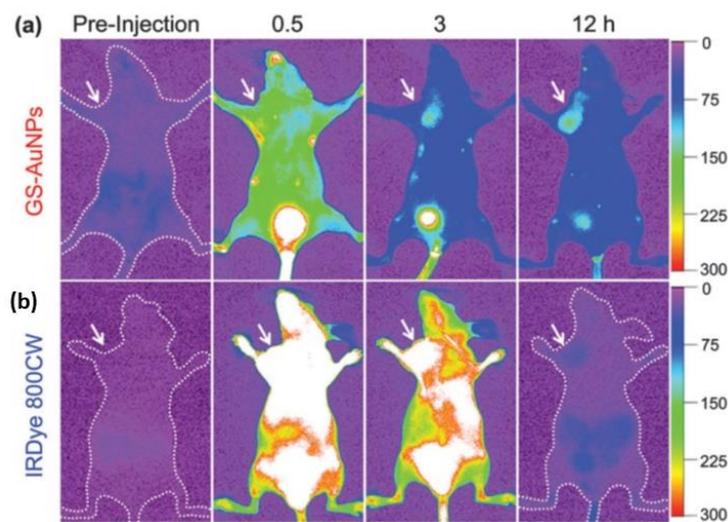


Figura 6: *Bioimaging in vivo* de un tumor (señalado con una flecha) en un ratón MCF-7 usando como marca AuNCs (a) y un colorante orgánico (b), administrados ambos de forma intravenosa y detección fluorescente. Imagen modificada de Ref. <sup>53</sup>.

- **Marcas para LA-ICP-MS.** Los NCs metálicos pueden emplearse como marcas elementales para realizar estudios de *bioimaging* de proteínas específicas mediante LA-ICP-MS. Los NCs se bioconjugan a un anticuerpo específico de la biomolécula de interés, se incuban el tejido con el bioconjugado y la detección se lleva a cabo siguiendo la señal del metal que constituye el núcleo del NC. El número de heteroátomos presentes en un NC es mucho mayor que en el caso de otras marcas empleadas en LA-ICP-MS para el mapeo de proteínas (p. e., los quelatos metálicos) y por tanto presentan una mayor capacidad de amplificación<sup>29</sup>. Su

pequeño tamaño minimiza las alteraciones en la capacidad de reconocimiento del anticuerpo, una de las desventajas del empleo de marcas poliméricas. Además, dadas las propiedades luminiscentes de los NCs metálicos se pueden llevar a cabo estudios bimodales: el mismo tejido puede analizarse mediante fluorescencia y LA-ICP-MS<sup>54</sup>.

El empleo de NCs metálicos como marca en LA-ICP-MS permite obtener resultados cuantitativos si se cumplen las “10 reglas de oro” indicadas en el apartado 2 que deben seguirse para combinar la IHC y LA-ICP-MS. Cruz-Alonso *et al* han empleado con éxito AuNCs para el mapeo cuantitativo de metalotoneínas (MTs) en tejidos de la retina humana bioconjugando los NCs con anti-MT 1/2 (límite de detección de MT  $\frac{1}{2}$  de  $0,5 \text{ ng g}^{-1}$ )<sup>32</sup> así como de ferroportina en tejidos de cerebro humano de pacientes control y con la patología de Alzheimer<sup>55</sup>. Por otro lado, una de las ventajas que pueden ofrecer los NCs metálicos es la posibilidad de realizar análisis multiparamétricos si se marca cada proteína de interés con NCs de un metal diferente<sup>54</sup> e incluso con NCs del mismo metal empleando isótopos estables enriquecidos<sup>49</sup>. Valencia-Agudo *et al.* han empleado AgNCs de abundancia natural y enriquecidos isotópicamente (<sup>109</sup>AgNCs) para el estudio de MTs y SOD en tejidos oculares humanos<sup>49</sup>.

#### 4. Nanoclústeres de iridio

El estudio de rutas sintéticas para la obtención de NCs de iridio (IrNCs) es limitado y las publicaciones realizadas hasta el momento están enfocadas a su aplicación con fines catalíticos<sup>47,56,57</sup>. Anjali *et al* proponen la síntesis de IrNCs partiendo de  $\text{IrCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  como precursor y empleando metanol como reductor en medio básico y polivinilpirrolidona como ligando<sup>56</sup>. El tamaño medio de los NCs caracterizados mediante TEM es de 4 nm y se estudió su actividad catalítica en la oxidación de naranja de metilo por iones hexacianoferrato (III) en medio acuoso alcalino.

Alternativamente, los IrNCs también se pueden sintetizar en estado sólido. Bhat *et al* sintetizaron IrNCs con un tamaño promedio de 2 nm a partir de  $\text{IrCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 2-feniletanotiol como ligando y  $\text{NaBH}_4$  como agente reductor<sup>57</sup>. Los NCs obtenidos con esta síntesis en fase sólida pueden ser dispersados posteriormente en tolueno, tetrahidrofurano o dimetilformilamida. En la Figura 7 se observa una fotografía tomada mediante HR-TEM de los IrNCs sintetizados con este método.

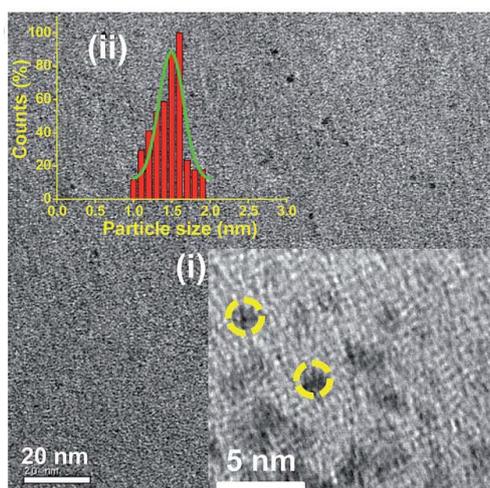


Figura 7: Imágenes obtenidas mediante HR-TEM de los IrNCs sintetizados por Bhat et al. i) Ampliación de una zona seleccionada en la que se observa el tamaño de los NCs. ii) Distribución de tamaños obtenida a partir las medidas de 50 partículas. (Ref.<sup>57</sup>)

Por otro lado, también se han sintetizado IrNCs para ser empleados como marcas fluorescentes en *bioimaging*. Vankayala *et al* sintetizaron IrNCs recubiertos de 2,2' naftol con un tamaño promedio de 2 nm, una alta emisión fluorescente y biocompatibles<sup>58</sup>. Sin embargo, el procedimiento empleado es largo, conlleva numerosos pasos y requiere disolventes orgánicos. Por tanto, la búsqueda de nuevas rutas sintéticas sencillas, que puedan realizarse en medio acuoso y permitan obtener IrNCs biocompatibles y con una alta fluorescencia es de gran interés actualmente. En este trabajo, se emplearon los IrNCs como marcas fluorescentes intracelulares. Se realizaron estudios de internalización en células HeLa y se monitorizaron mediante microscopía láser confocal de barrido. Se observó que los IrNCs se localizaban en el citoplasma, sin penetrar en el núcleo celular. En la Figura 8A, se muestra el núcleo de las células HeLa que ha sido teñido con DAPI, en la Figura 8B, se observa la fluorescencia de los IrNCs tras haber realizado la incubación. En la Figura 8C se muestra la superposición de las imágenes A y B, se puede apreciar que los IrNCs se localizan en el citoplasma celular y no atraviesan la membrana nuclear.

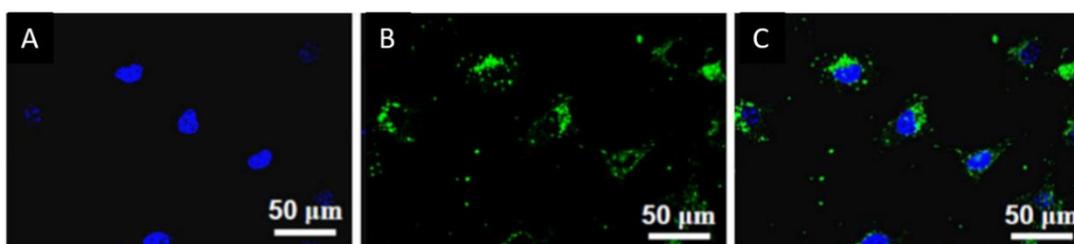


Figura 8: Imágenes obtenidas mediante microscopía láser confocal de barrido de células HeLa incubadas con IrNCs. A) Emisión del DAPI ( $\lambda_{em}=450\text{ nm}$ ,  $\lambda_{ex}=405\text{ nm}$ ). B) Emisión de los IrNCs ( $\lambda_{em}=525\text{ nm}$ ,  $\lambda_{ex}=488\text{ nm}$ ). C) Superposición de A y B. Ref.<sup>58</sup>.

## II. Objetivos

El presente TFM se enmarca en un proyecto de colaboración del grupo de Espectrometría y Electroquímica BioNanoAnalíticas y el Grupo de Envejecimiento Cerebral y Enfermedades Neurodegenerativas (ambos de la Universidad de Oviedo) con el Instituto Oftalmológico Fernández-Vega. El objetivo global del proyecto es el desarrollo de una metodología analítica para el *bioimaging* de metales y proteínas relacionadas con enfermedades neurodegenerativas en tejidos de oculares y de encéfalo de un modelo animal de ratón con envejecimiento. En el presente TFM dicho objetivo general se ha llevado a cabo a través de dos objetivos específicos:

1. **Síntesis y caracterización de nanoclústeres de iridio.** Uno de los objetivos del presente TFM es la síntesis de IrNCs en medio acuoso y su caracterización para que puedan ser empleados como marcas bimodales (detección fluorescente y por LA-ICP-MS) para el análisis de proteínas en tejidos biológicos. Se optimizarán las condiciones de la síntesis (p.e., temperatura, pH, relaciones molares entre el precursor metálico y el reductor/ligando, etc.) con el fin de obtener IrNCs de tamaño reducido y monodispersos además de con una alta emisión fluorescente. Las propiedades ópticas de los IrNCs sintetizados se determinarán mediante estudios de fluorescencia y absorción. Además, se estudiará su tamaño mediante medidas de DLS y se determinará el rendimiento de la síntesis por ICP-MS.
2. **Estudio de proteínas relacionadas con enfermedades neurodegenerativas en tejidos oculares y cerebrales de un ratón control.** Se estudiará la distribución espacial de proteínas que regulan la homeostasis de algunos metales implicados en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas en diferentes tejidos biológicos. Se localizarán metalotioneínas (MTs) en tejidos oculares y ferroportina (FPN) y hepcidina (HPC) en tejidos cerebrales de un ratón control mediante ensayos de inmunofluorescencia. Se emplearán dos tipos de preparación de muestra distintos: tejidos embebidos en parafina y conservados criogénicamente. Se evaluará si la preparación de la muestra afecta a los resultados de la distribución de las proteínas en los tejidos.

### III. Experimental

#### 1. Material

- Micropipetas de volumen comprendido entre 10  $\mu$ L y 1 mL.
- Tubos Eppendorf con volumen de 1,5 y 2 mL.
- Filtros de membrana con tamaño de poro de 3 y 10 kDa (Amicon Ultra-0,5 mL Millipore).
- Tubos Falcon (VWR)
- Tubos de centrifugado
- Material de vidrio.
- Cubeta de fluorescencia de cuarzo SUPRASIL de Hellma, modelo 114F-QS de 10 mm de paso óptico y 3 mL de volumen de celda.
- Portaobjetos de microscopio recubiertos de poly-L-lisina (Electron Microscopy Sciences).

#### 2. Instrumentación

- Balanza analítica NewClassic MF (precisión hasta  $\pm 0,01$  mg), Mettler Toledo.
- Granatario SCALTEC (precisión hasta  $\pm 0,01$  g).
- Baño de Ultrasonidos, J.P. Selecta.
- pHmetro Crisol microPH 2000, Crisol Instruments S.A.
- Placa calefactora.
- Espectrófotometro de Fluorescencia Cary Eclipse, Agilent
- Espectrofotómetro UV-VIS Cary 60, Agilent
- Placa termoagitadora Eppendorf Thermomixer confort.
- Microtomo HM340E y Criotomo Microm HMSSO (Thermo Fischer Scientific).
- Espectrómetro de Masas ICP-MS de tipo cuadrupolo (modelo 7700 de Agilent).
- Microscopio óptico Leica DM6000B, equipado con epifluorescencia y cámara DFC 310 Fx Leica. Filtro RGB.
- Equipo DLS Zetasizer Nano ZS, Malvern Panalytical.

#### 3. Reactivos

##### **Síntesis de IrNPs**

- $\text{IrCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  (99,9% pureza, Ref.: 203491, Sigma Aldrich)
- $\alpha$  ( $\pm$ ) lipoic acid (99% pureza, Ref.: T1395, Sigma Aldrich)

- NaOH (98% pureza, Ref: S8045, Sigma Aldrich)
- NaBH<sub>4</sub> (98% pureza, Ref.: 452882, Sigma Aldrich)
- Citrato de sodio dihidratado (99% pureza, Ref: A385148 305, Merck)

#### **Ensayos de inmunofluorescencia**

- Xileno (99% pureza, Ref: 296325, Sigma Aldrich)
- Etanol (Ref: 02483, Supelco)
- Tampón de citrato 0,1 M pH 6
- Tampón de fosfato pH 7,4, BSA (Ref: 10010023, Thermo Fischer Scientific)
- Tritón X-100 (Ref: X100, Sigma Aldrich)
- Albúmina de suero bovino, BSA (98% pureza, Ref: A7030, Sigma Aldrich)
- Suero normal de cabra (Ref: G9023, Sigma Aldrich)
- 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, DAPI (Ref: D9542, Sigma Aldrich)
- Alexa Fluor 594 (Ref: A10474, Thermo Fischer Scientific)
- Anticuerpo policlonal anti metalotioneína 1 (Ref: PAB119Hu01, USCN)
- Anticuerpo policlonal anti metalotioneína 2 (Ref: PAB868Hu01, Cloud-Clone Corp.)
- Anticuerpo policlonal anti ferroportina SLC40A1 (Ref: ab78066, Abcam)
- Anticuerpo policlonal anti hepcidina (Ref: ab30760, Abcam)
- Anticuerpo Alexa Fluor 594 Goat anti-Rabbit (Ref. a11037, Invitrogen)
- Medio de montaje permanente acuoso (Ref: S1964, Dako)

#### 4. Muestras

Se obtuvieron muestras de un ratón control (cepa C57BL/6 y 5 meses de edad) a través de la Fundación de Investigación Oftalmológica (FIO) del Instituto Oftalmológico Fernández-Vega (Oviedo). El ratón se fija por perfusión con paraformaldehído al 4% antes de ser sacrificado para conservar intactas las estructuras de los tejidos. El ojo izquierdo y la mitad izquierda del encéfalo se criogenizan en nitrógeno líquido, mientras que el ojo derecho y la mitad derecha del encéfalo se incluyen en parafina. Los tejidos incluidos en parafina se cortan con un microtomo de seccionamiento y los tejidos criogenizados se cortan con un criotomo. Se obtienen secciones de 7 µm de espesor en ambos casos y se inmovilizan sobre portaobjetos recubiertos de poli-L-Lisina. La poli-L-Lisina permite que el tejido se adhiera mejor al portaobjetos y evita que se desprenda del vidrio con los sucesivos tratamientos del protocolo de IHC. Los cortes criogénicos se conservan en el congelador a -20°C y los cortes embebidos en parafina se mantienen a temperatura ambiente hasta su posterior uso.

## 5. Procedimientos experimentales

### 5.1. Síntesis y caracterización de IrNPs

#### 5.1.1. Optimizaciones previas a la síntesis de IrNPs

##### **Reducción del ácido lipoico a ácido dihidrolipoico**

Se estudia mediante medidas de absorbancia la reducción del ácido lipoico (LA) a ácido dihidrolipoico (DHLA) empleando  $\text{NaBH}_4$  como reductor. Los resultados obtenidos de este estudio serán útiles para seleccionar la relación molar de  $\text{LA}:\text{NaBH}_4$  necesaria para preparar el DHLA que se empleará como ligando para la síntesis de IrNPs. En la Tabla 2 se muestran las distintas disoluciones que se prepararan para llevar a cabo el estudio. Después de 2 h de agitación se mide la absorbancia de cada disolución.

*Tabla 2: Estudio de la reducción de LA a DHLA empleando  $\text{NaBH}_4$  como reductor*

Tubo	Milli-Q (mL)	LA (mmol)	$\text{NaBH}_4$	Relación molar $\text{LA}:\text{NaBH}_4$
1	5	15	-	Blanco
2	5	15	500 $\mu\text{L}$ (75 mM)	2:1
3	5	15	500 $\mu\text{L}$ (150 mM)	1:1
4	5	15	500 $\mu\text{L}$ (300 mM)	1:2
5	5	15	500 $\mu\text{L}$ (750 mM)	1:5
6	5	15	500 $\mu\text{L}$ (1,5 M)	1:10

##### **Reducción de la sal precursora de iridio**

Se estudia mediante medidas de absorbancia la reducción de la sal  $\text{IrCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  a iridio metálico empleando diferentes concentraciones de  $\text{NaBH}_4$  como reductor. Esta sal se utilizará como precursor para sintetizar IrNPs. En la Tabla 3 se muestran las distintas disoluciones preparadas para la realización de este estudio.

*Tabla 3: Reducción de la sal de Ir (III) a Ir (0) empleando  $\text{NaBH}_4$  como reductor*

Tubo	Milli-Q (mL)	$\text{IrCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$	$\text{NaBH}_4$	Relación molar $\text{Ir}:\text{NaBH}_4$	pH
1	5	100 $\mu\text{L}$ (50mM)	-	Blanco	7,93
2	5	100 $\mu\text{L}$ (50mM)	500 $\mu\text{L}$ (50mM)	1:5	10,07
3	5	100 $\mu\text{L}$ (50mM)	500 $\mu\text{L}$ (100 mM)	1:10	10,18
4	5	100 $\mu\text{L}$ (50mM)	500 $\mu\text{L}$ (150 mM)	1:15	10,23
5	5	100 $\mu\text{L}$ (50mM)	500 $\mu\text{L}$ (200 mM)	1:20	10,35
6	5	100 $\mu\text{L}$ (50mM)	500 $\mu\text{L}$ (300 mM)	1:30	10,40
7	5	100 $\mu\text{L}$ (50mM)	500 $\mu\text{L}$ (500 mM)	1:50	10,49
8	5	100 $\mu\text{L}$ (50mM)	500 ( $\mu\text{L}$ 1 M)	1:100	10,65

Se registran los espectros de absorbancia después de 15 h de agitación. Así mismo, se toman fotografías para observar el cambio de color de las disoluciones a lo largo del tiempo.

### 5.1.2. Síntesis de IrNPs

Con el objetivo de obtener nanoclústeres de iridio, se siguen tres protocolos de síntesis diferentes, empleando en todos los casos  $\text{IrCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  como sal precursora. Todas las estrategias llevadas a cabo se clasifican como bottom-up; el precursor se reduce por acción de un agente reductor formando un núcleo metálico que crece de tamaño en el transcurso de la reacción hasta formar la nanopartícula.

#### *Síntesis de IrNPs empleando DHLA como ligando*

Se llevan a cabo dos síntesis de IrNPs empleando DHLA como ligando (preparado *in situ* a partir de LA) y  $\text{NaBH}_4$  como agente reductor. En este trabajo nos referiremos a las nanopartículas de Ir sintetizadas con estos protocolos como: IrNPs DHLA-A e IrNPs DHLA-B. El protocolo de síntesis de los IrNPs DHLA A y B varía en la relación molar de sal:ligando. A continuación, se muestran los pasos que se llevan a cabo para ambas síntesis y en la Tabla 4 se muestran las cantidades de LA que se añaden a cada muestra, la concentración de la disolución de  $\text{NaBH}_4$  para la reducción del LA, la relación molar de los reactivos en la síntesis y el pH final de las disoluciones.

Para la síntesis de las IrNPs, en un vial ámbar se añaden 10 mL de agua Milli-Q, la cantidad de LA requerida y una disolución de  $\text{NaBH}_4$ . Se agita durante 2 h para que se reduzca el LA a DHLA. Después se añaden 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{IrCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  (50 Mm) y se agita durante 30 min. A continuación, se añade gota a gota 400  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaBH}_4$  (50 mM). Se agita durante 15 h y se purifica por ultracentrifugación con un filtro de 3 kDa y se lleva a volumen de partida con agua Milli-Q. Se almacena en la nevera protegido de la luz hasta su posterior uso.

Tabla 4: Condiciones de las síntesis IrNPs DHLA-A e IrNPs DHLA-B

Síntesis	LA ( $\mu\text{mol}$ )	$\text{NaBH}_4$ (para reducir el LA)	Relaciones molares sal:ligando:reductor	pH final
IrNPs DHLA-A	5	1 mL (250 mM)	1:5:2	10,15
IrNPs DHLA-B	15	1 mL (750 mM)	1:15:2	10,02

#### *Síntesis de IrNPs empleando citrato de sodio como ligando*

Alternativamente a las síntesis empleando ácido lipoico como ligando, se emplea una metodología propuesta por Cui *et al*<sup>48</sup> para la síntesis de IrNPs utilizando  $\text{IrCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  como sal precursora, citrato de sodio como agente ligando y  $\text{NaBH}_4$  como agente reductor. En este trabajo nos referiremos a las nanopartículas sintetizadas mediante este protocolo como IrNPs citrato.

En este caso para la síntesis, en un matraz aforado de dos bocas se coloca un septum de teflón en una de las bocas y un condensador en la otra boca. Se vacía la atmósfera del matraz con una aguja a través del septum y se coloca un globo hinchado con nitrógeno (se adapta el globo a una aguja, que se pincha en el septum) para tener una atmósfera inerte dentro del matraz (ver montaje en el Anexo **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). A continuación, se añade a través del septum una disolución de citrato de sodio (3 mL, 1% m/v) y una disolución de  $\text{IrCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  (20 mL, 0,03% m/v). Se ajusta el pH entre 7 y 9 con NaOH y se mantiene en reflujo a 130 °C durante 20 min con agitación constante. Después de este tiempo, se añade 1 mL de borohidruro de sodio (0,1M) y enfría gradualmente hasta temperatura ambiente. Se deja agitar durante 30 min.

En este caso las IrNPs sintetizadas se purifican por precipitación. Para ello, en un tubo de centrifugado se añade un volumen de la síntesis y tres volúmenes de etanol. Se centrifuga durante dos ciclos de 10 min a máximas revoluciones. El precipitado se redissuelve en agua Milli-Q. El pH final de la síntesis es 9,93. Las relaciones molares de sal:ligando reductor en esta síntesis son 1:6:5. Se almacena en la nevera protegido de la luz hasta su posterior uso.

### 5.1.3. Caracterización de las IrNPs

#### *Caracterización de la absorbancia*

Se caracteriza la absorbancia de las distintas síntesis empleando el espectrofotómetro VIS-UV, con una velocidad de barrido de 4800 nm/min y se recogen los espectros de absorbancia desde 200 a 800 nm. Dado que todas las disoluciones eran acuosas, se corrige la línea de base midiendo la absorbancia del agua Milli-Q. Se realizan diluciones 1:5 respecto de la concentración de las disoluciones finales de las síntesis para llevar a cabo las medidas de absorbancia.

#### *Caracterización de la fluorescencia*

El objetivo del presente TFM es la síntesis de IrNCs luminiscentes. Para cada síntesis se realiza una secuencia de espectros de emisión con el fluorímetro excitando desde 300 a 600 nm (con un incremento de 10 nm entre espectros sucesivos y una velocidad de barrido de 1200 nm/min y con rendijas de excitación/emisión de 20 nm). El objetivo de dichas medidas es determinar si se han sintetizado IrNCs fluorescentes y si así fuera, determinar el par de excitación/emisión que presenta la máxima intensidad fluorescente.

#### *Determinación del tamaño mediante DLS*

Se realizan medidas de DLS para determinar el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas sintetizadas, que corresponde con el diámetro de una esfera rígida que se dispersa a la misma velocidad que la partícula que se mide. El valor del diámetro hidrodinámico

considera por tanto el núcleo metálico, los ligandos que recubren el núcleo y la capa de hidratación que rodea la molécula.

Para cada una de las síntesis se obtiene la distribución en número de las partículas y la curva de correlación que es una representación del coeficiente de correlación frente al tiempo. La Tabla 5 recoge las condiciones empleadas para las diferentes síntesis.

Tabla 5: Parámetros para las medidas por DLS

<b>Tiempo de equilibrio</b>	120 s
<b>Índice de refracción del iridio</b>	1,42
<b>Número de réplicas por medida</b>	12
<b>Número de medidas por muestra</b>	3

#### *Determinación del rendimiento de la síntesis por ICP-MS*

Se mide la concentración de iridio en las disoluciones finales de síntesis purificadas y sin purificar, así como en los desechos mediante ICP-MS con nebulización convencional para determinar el rendimiento de las distintas síntesis. Para ello se digieren las distintas disoluciones siguiendo el siguiente protocolo: en un tubo de plástico se añaden 50  $\mu\text{L}$  de muestra y 200  $\mu\text{L}$  de agua regia ( $\text{HNO}_3$ :  $\text{HCl}$  relación molar 1:3). Se introduce en un baño de ultrasonidos durante 20 min y después se lleva a 10 mL con  $\text{HNO}_3$  al 3%.

Se preparan disoluciones de iridio (a partir de un patrón de iridio certificado de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en un rango de concentración entre 0-30  $\text{ng}/\text{mL}$  para construir una recta de calibrado (se añade también oro a cada disolución como patrón interno con una concentración de 5  $\text{ng}/\text{mL}$ ). Se añade a las muestras digeridas el patrón interno y se diluyen para que entren en el rango de concentraciones del calibrado. Para realizar las medidas se emplea un ICP-MS de tipo cuadrupolo (sin presurizar la celda de colisión) y se monitorizan los isótopos  $^{193}\text{Ir}$  y  $^{197}\text{Au}$ .

## 5.2. Estudio de la distribución de proteínas en tejidos biológicos

### 5.2.1. Ensayos de inmunofluorescencia

A continuación, se indican los protocolos llevados a cabo para la realización de los inmunoensayos en los tejidos biológicos. En la Figura 9 se muestra un esquema con las proteínas que se estudiarán en cada tipo de tejido (ojo y encéfalo) y preparación (parafina y criogénico).

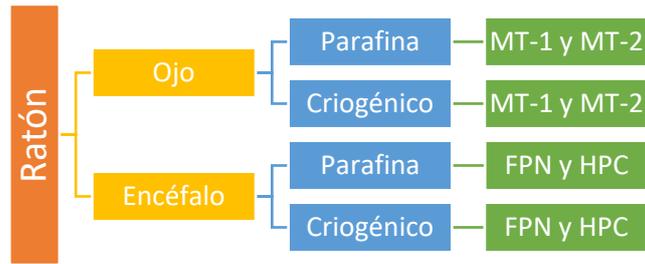


Figura 9: Esquema en el que se muestran las distintas proteínas que se localizarán mediante ensayos de inmunofluorescencia en cada tipo de tejido y preparación de muestra.

Además, para cada tipo de tejido y preparación se realiza un control negativo (se hace el inmunoensayo añadiendo anticuerpo secundario con la marca fluorescente, pero no anticuerpo primario). De esta forma se puede comprobar si el anticuerpo secundario presenta interacciones inespecíficas con el tejido.

#### *Desparafinación y recuperación antigénica de los cortes en parafina*

Los tejidos incluidos en parafina deben desparafinarse, hidratarse y tratarse con un protocolo de recuperación antigénica antes de proceder con la tinción inmunohistoquímica. Para la desparafinación e hidratación de los tejidos se introducen los cortes en disoluciones de xileno y en una sucesión de disoluciones alcohólicas decrecientes.

Para la desparafinación de los tejidos se introducen los cortes en disoluciones de xileno y en una sucesión de disoluciones alcohólicas decrecientes: 5 min en xileno, 5 min en xileno, 2 min en etanol 100%, 2 min en etanol 96%, 2 min en etanol 80%, 2 min en etanol 70% y 2 min en agua destilada.

La recuperación antigénica se lleva a cabo introduciendo los cortes en una disolución tampón de citrato 0,1 M y pH 6,0 (calentado previamente hasta ebullición) durante 20 min.

#### *Protocolo de técnica inmunohistoquímica*

En la Tabla 6 se indican las distintas etapas llevadas a cabo para la técnica inmunohistoquímica de los tejidos de los tejidos en parafina y criogénicos.

Tabla 6: Etapas para la técnica inmunohistoquímica

Procedimiento	Tratamiento	Tiempo y condiciones
Lavado	PBS	3 x 5 min
Permeabilización	PBS, 0,1% de Triton X-100	30 min
Lavado	PBS	3 x 5 min
Bloqueo	PBS, 10% suero de cabra, 1% BSA	1 h
Lavado	PBS	3 x 5 min
Incubación anticuerpo 1°	Anticuerpo primario; PBS, 5% de suero de cabra y 1% de BSA	Toda la noche, 4°C, cámara húmeda
Lavado	PBS	3 x 5 min
Incubación anticuerpo 2°	Anticuerpo secundario fluorescente, PBS al 1% de suero de cabra	2 h, cámara húmeda, protegido de la luz
Lavado	PBS	3 x 5 min
Tinción de los núcleos	DAPI 0,2 µg/ml	10 min, cámara húmeda, protegido de la luz
Lavado	PBS	5 min

Una vez realizada la IHC los cortes, se añaden unas gotas de medio de montaje y se pone el portaobjetos. Se sella con laca de uñas y se almacena a -20 °C en oscuridad.

Los anticuerpos primarios, específicos de cada proteína, se añaden empleando diferentes diluciones para cada uno de ellos dependiendo de las indicaciones del fabricante: Anti-MT-1 con una dilución 1:40; Anti-MT-2 con una dilución 1:40; Anti-FPN con una dilución 1:25; y Anti-HPC con una dilución 1:300. En el caso del anticuerpo secundario marcado con Alexa 594, se añade en todos los inmunoensayos con una dilución 1:500. Adicionalmente se emplea DAPI como tinción de contraste (marcaje de los núcleos).

#### 5.2.2. Obtención de imágenes mediante microscopía de fluorescencia

Para observar las muestras se emplea un microscopio de fluorescencia equipado con sistemas de luz transmitida para observar el marcaje del inmunoensayo fluorescente. En este caso, los fluoróforos detectados son: DAPI (marcador nuclear, con  $\lambda_{excitación} = 358 \text{ nm}$  y  $\lambda_{emisión} = 461 \text{ nm}$ ) y Alexa 594 (marca fluorescente del anticuerpo secundario, con  $\lambda_{excitación} = 590 \text{ nm}$  y  $\lambda_{emisión} = 617 \text{ nm}$ ). Se toman imágenes bajo el objetivo de 20 aumentos utilizando la herramienta Tile Scan del software LASX de Leica, combinada con la adquisición en Z de todo el espesor de la muestra.

## IV. Resultados y discusión

### 1. Síntesis de IrNPs

#### 1.1. Optimizaciones previas a la síntesis de IrNPs

##### Reducción del ácido lipoico a ácido dihidrolipoico

Se estudia mediante absorbancia la reducción del LA a DHLA con distintas concentraciones de  $\text{NaBH}_4$  como reductor. Se mide la absorbancia después de 2 h de agitación de varias disoluciones de ácido lipoico a las que se añaden distintas cantidades de  $\text{NaBH}_4$  (Tabla 2). En la Figura 10 se observa que al aumentar la relación molar de  $\text{NaBH}_4$ , el pico de absorbancia del LA a 330 nm disminuye. La desaparición de esta banda de absorción se debe a la reducción del LA a DHLA según lo indicado por Avellini *et al*<sup>59</sup>. También se ha observado que al reducir el LA a DHLA aumenta la absorbancia entre 250 y 270 nm. Según los resultados experimentales, una relación molar de LA: $\text{NaBH}_4$  de 1:5 es suficiente para reducir todo el LA después de 2 h de agitación (el pico a 330 nm ha desaparecido por completo). Por lo tanto, se empleará una relación molar de ácido lipoico: $\text{NaBH}_4$  1:5 para sintetizar el DHLA necesario para la síntesis de los IrNPs (se agitará la disolución durante 2 h para asegurar la reducción total del LA).

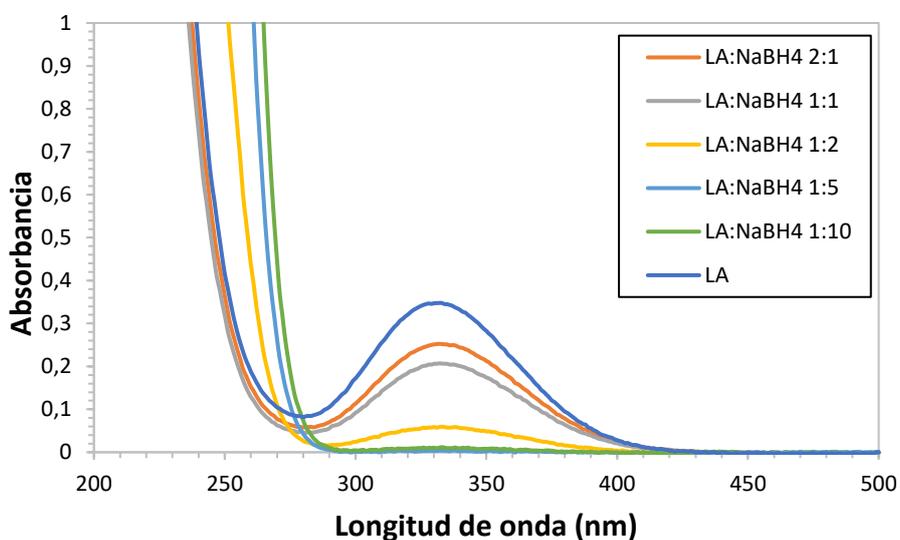


Figura 10: Absorbancia de las disoluciones de ácido lipoico y ácido lipoico- $\text{NaBH}_4$  después de 2 h de agitación. La cantidad de  $\text{NaBH}_4$  que se añade a cada disolución de LA se indica en relaciones molares.

##### Reducción de la sal precursora de iridio

Se estudia mediante absorbancia la reducción de la sal de iridio ( $\text{IrCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ) a iridio metálico empleando  $\text{NaBH}_4$  como reductor (en la Tabla 3 se indican las diferentes condiciones ensayadas). No se registraron los espectros de absorbancia de las relaciones sal: $\text{NaBH}_4$  1:30, 1:50, y 1:100 ya que dichas disoluciones presentaban partículas sedimentadas. Se observa que

la sal precursora presenta absorbancia a 275 nm (Figura 11. Después de 15 h de agitación, desaparece la banda de absorción a 275 nm y aparece un pico a 330 nm. Para la relación molar sal:NaBH<sub>4</sub> 1:20 aparece también un pico de absorbancia a 260 nm. Además, después de 15 h de agitación, el color de las disoluciones cambia de amarillo pálido a gris (Figura 11), indicando también visualmente la reducción del iridio.

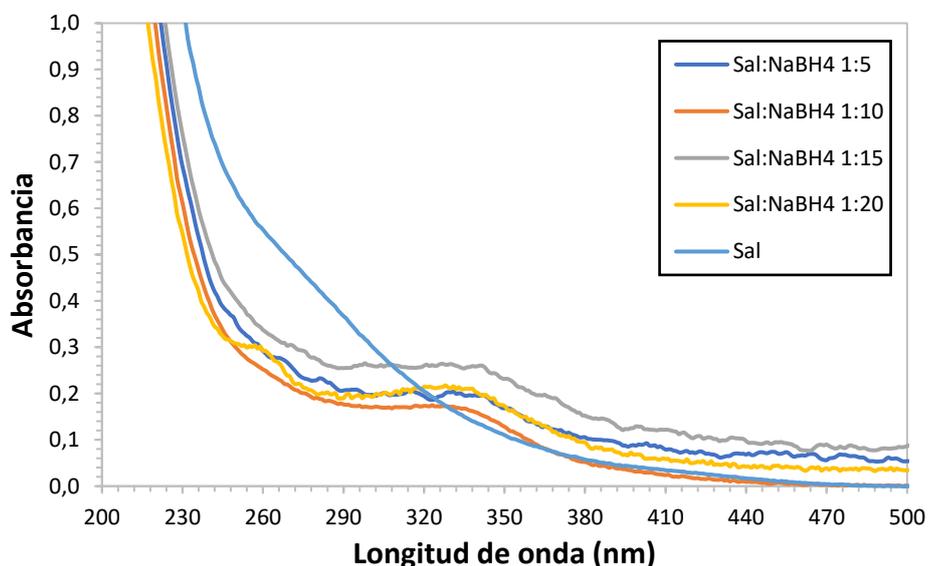


Figura 11: Absorbancia de las disoluciones de IrCl<sub>3</sub> y NaBH<sub>4</sub> después de 15 h de agitación. La cantidad de NaBH<sub>4</sub> que se añade a cada disolución de IrCl<sub>3</sub> se indica en relaciones molares.

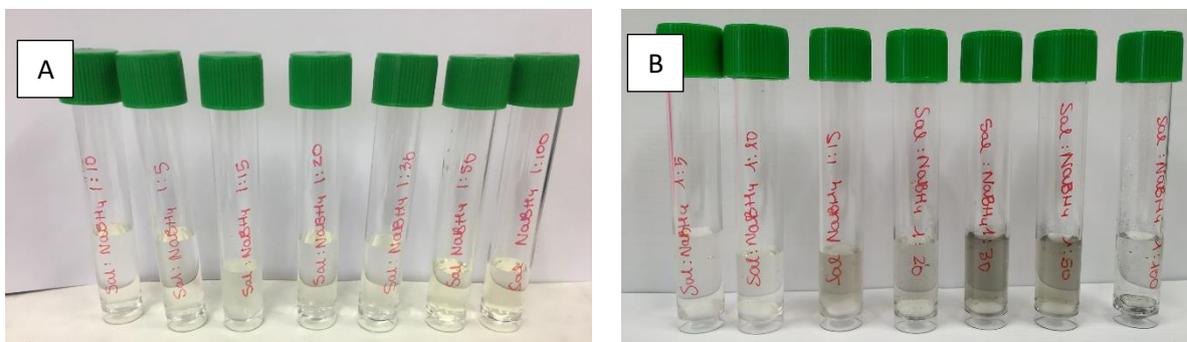


Figura 12: Reducción de la sal precursora de iridio a iridio metálico. A) A tiempo = 0. B) Después de 15 h de agitación.

Según los resultados obtenidos, una relación molar de sal:NaBH<sub>4</sub> 1:5 es suficiente para reducir la sal de iridio que se emplea como precursora de las nanopartículas. Aunque para escoger el ratio sal:NaBH<sub>4</sub> para la síntesis de NPs debe tenerse en cuenta que: cuando se emplea DHLA como ligando hay un exceso de NaBH<sub>4</sub>, que se añade con anterioridad al vial de síntesis para reducir el LA a DHLA y cuando se emplea citrato de sodio como ligando, este también tiene poder reductor por lo que la cantidad de NaBH<sub>4</sub> necesaria para reducir la sal de iridio es menor. En las síntesis llevadas a cabo por tanto, se emplea una relación molar sal:NaBH<sub>4</sub> 1:2.

## 1.2. Síntesis y caracterización de las IrNPs

Con el objetivo de sintetizar IrNCs se siguen los protocolos indicados en el apartado Experimental 5.1.2, dos protocolos diferentes empleando DHLA como ligando y un tercer protocolo empleando citrato de sodio como ligando. La caracterización de las distintas síntesis se realiza en distintas etapas. A continuación, se recogen los pasos llevados a cabo para las diferentes síntesis:

- a) En primer lugar, se registran los espectros de absorbancia de cada una de las síntesis y de la sal precursora.
- b) A continuación, se realizan medidas en el DLS para obtener un valor aproximado del tamaño de las partículas sintetizadas (diámetro hidrodinámico).
- c) Posteriormente se llevan a cabo medidas de fluorescencia con el fin de caracterizar la emisión fluorescente de cada síntesis.
- d) Finalmente, se lleva a cabo la medida de la concentración de iridio por ICP-MS en las disoluciones de síntesis purificadas, las disoluciones de síntesis sin purificar, los desechos y la sal precursora con el objetivo de determinar el rendimiento de las distintas síntesis.

### 1.2.1. Síntesis de IrNPs empleando DHLA como ligando y una relación molar sal:ligando 1:5 (DHLA-A)

Se sigue el protocolo indicado en el apartado Experimental 5.1.2 para la síntesis de IrNPs empleando DHLA como ligando y  $\text{NaBH}_4$  como reductor, con relaciones molares de sal:ligando:reductor 1:5:2. El color inicial y final de la síntesis no varía (amarillo pálido).

#### *Absorbancia de la síntesis*

Tal y como se puede observar en la Figura 13, la síntesis purificada presenta una banda de absorción ancha a longitudes de onda cortas, aproximadamente hasta los 300 nm y a 320 nm aparece un pequeño hombro de absorbancia. Este perfil de absorbancia concuerda con el espectro de absorbancia teórico para IrNPs en medio acuoso calculado por Creighton *et al*<sup>60</sup> a partir de las constantes ópticas del metal.

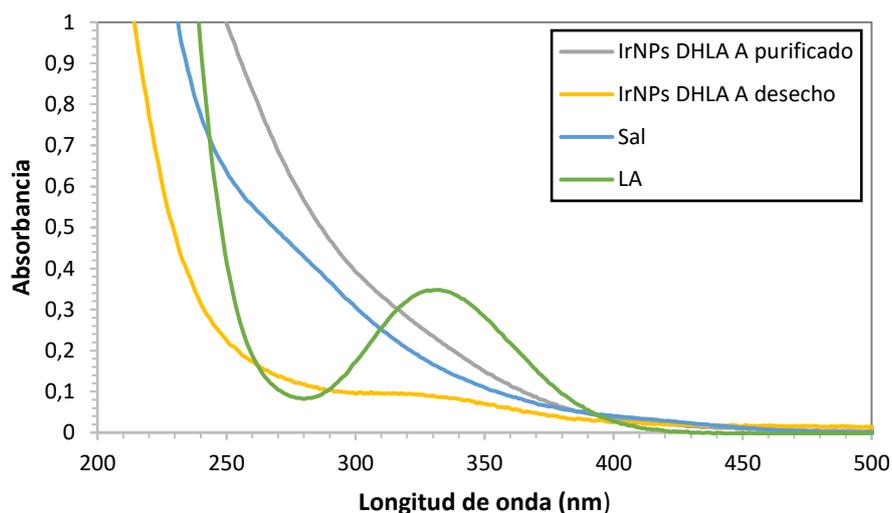


Figura 13: Espectros de absorción de la síntesis de IrNPs empleando DHLA como ligando y una relación molar sal:ligando 1:5. Se mide la síntesis purificada, el desecho de la síntesis, la sal precursora y el ácido lipoico.

#### Caracterización mediante DLS

En la Figura 14 aparece representada la distribución de tamaños medida por DLS para las partículas sintetizadas, obteniendo un tamaño promedio en número de 45 nm. Este valor medido corresponde con el diámetro hidrodinámico de la partícula, que considera también los ligandos y la capa de hidratación que recubre el núcleo metálico. Para determinar el diámetro del núcleo metálico deben caracterizarse las partículas por HR-TEM (microscopio electrónico de transmisión de alta resolución).

Los IrNCs sintetizados por Feng *et al*<sup>61</sup> empleando ácido ascórbico y NaBH<sub>4</sub> como reductores y glutatión como ligando presentan un diámetro de 3,3 nm, determinado mediante HR-TEM. Las mismas partículas presentan un radio hidrodinámico de 10 nm en las medidas de DLS. Teniendo en cuenta estos datos, las partículas sintetizadas empleando DHLA como ligando y una relación molar sal:ligando 1:5 son demasiado grandes para considerarse NCs y se podría decir que se han sintetizado IrNPs. Además, analizando la curva de correlación de la síntesis que aparece en la Figura 15 parece que hay agregados de gran tamaño en la síntesis. La gráfica de correlación para una síntesis de partículas monodispersas comienza como una línea recta horizontal que llegado a un punto decae exponencialmente hasta el 0. En este caso, aparece un pico ancho a tiempos de decaimiento grandes que indica la presencia de partículas de gran tamaño.

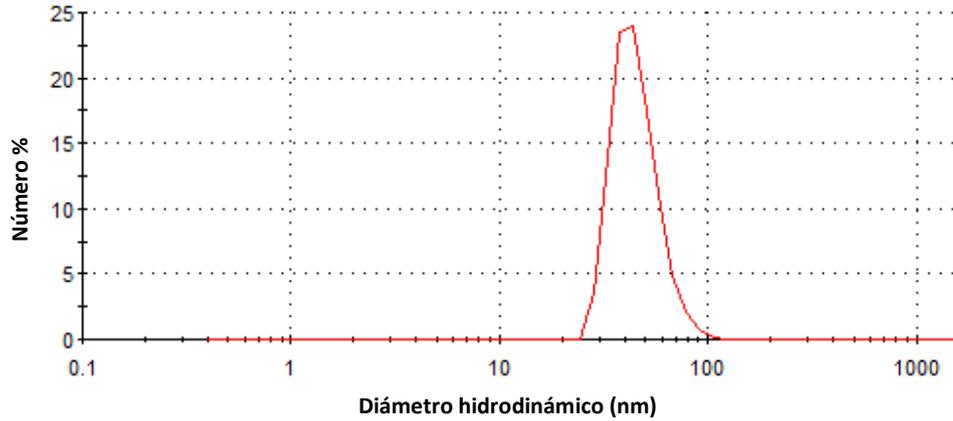


Figura 14: Distribución de tamaños de las partículas obtenida mediante medidas de DLS para la síntesis de IrNPs empleando DHLA como ligando y una relación molar sal:ligando 1:5

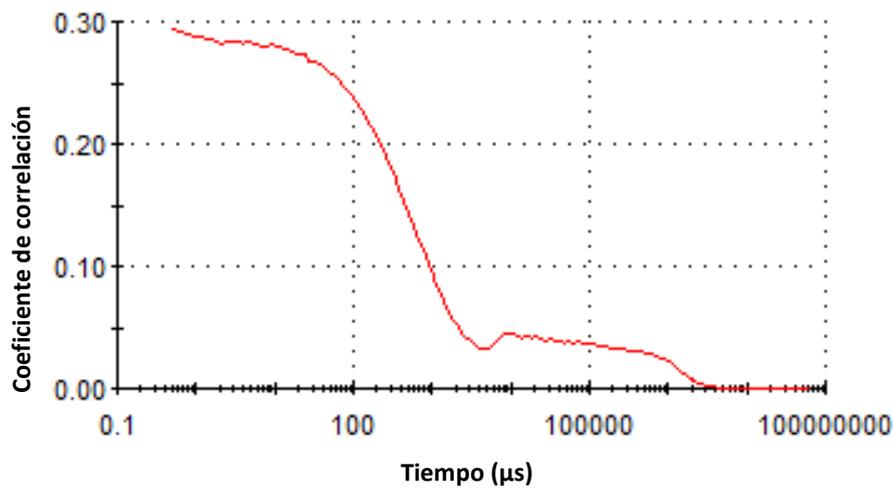


Figura 15: Curva de correlación obtenida mediante medidas de DLS para la síntesis de IrNPs empleando DHLA como ligando y una relación molar sal:ligando 1:5.

#### Caracterización de la emisión fluorescente

Para estudiar la emisión fluorescente de las IrNPs sintetizadas, se registra una secuencia de espectros de emisión excitando la disolución purificada desde 300 nm a 600 nm, con un incremento de 10 nm entre espectros sucesivos. Sin embargo, no se encuentra ninguna longitud de onda de excitación a la que las partículas emitan fluorescencia. Puede que se deba al tamaño de las partículas sintetizadas, ya que las partículas comienzan a ser fluorescentes cuando su diámetro está por debajo de los 3 nm. En ese régimen de tamaños, el confinamiento cuántico es tal que los NCs presentan niveles electrónicos similares a los moleculares.

### 1.2.2. Síntesis de IrNPs empleando DHLA como ligando y una relación molar sal: ligando 1:15 (DHLA-B)

Se sigue el protocolo indicado en el apartado Experimental 5.1.2 para la síntesis de IrNPs empleando DHLA como ligando y  $\text{NaBH}_4$  como reductor, con relaciones molares de sal:ligando:reductor 1:15:2. El color inicial y final de la síntesis no varía (amarillo pálido).

#### *Absorbancia de la síntesis*

Como se puede observar en la Figura 16, al aumentar la relación molar de DHLA:sal, aumenta la intensidad de la absorbancia de la síntesis purificada si se compara con la absorbancia de la síntesis empleando una relación molar sal:DHLA 1:5 (Figura 13). Además, la banda de absorbancia a 320 nm está mucho mejor definida. Esto podría indicar que, aumentando la relación molar de ligando, aumenta el número de IrNPs que se forman. Observando la absorbancia del desecho, podría decirse que una parte del LA empleado para la síntesis del ligando (DHLA) no se redujo y fue eliminado al purificar la síntesis, puesto que el desecho presenta un pequeño pico de absorbancia a 330 nm.

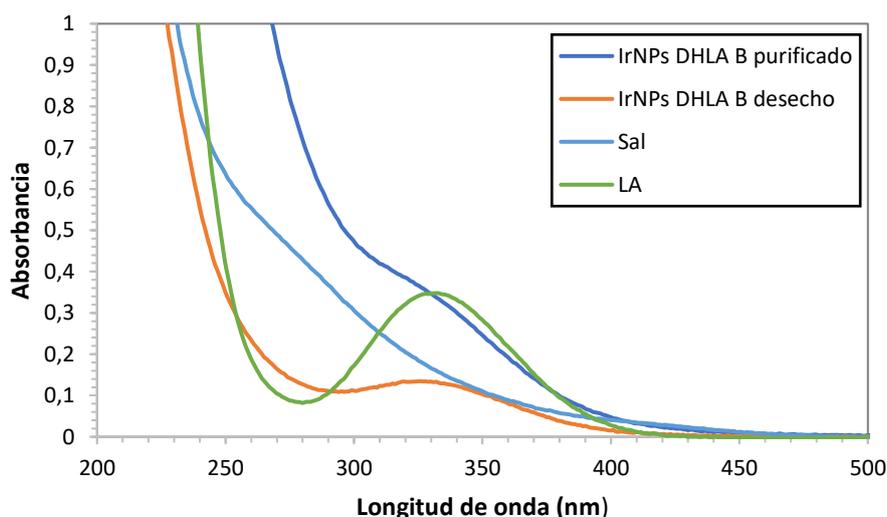


Figura 16: Espectros de absorbancia de la síntesis de IrNPs empleando DHLA como ligando y una relación molar sal:ligando 1:15. Se mide la síntesis purificada, el desecho de la síntesis, la sal precursora y el ácido lipoico.

#### *Caracterización de la síntesis mediante DLS*

Como se muestra en la Figura 17, se determina el diámetro hidrodinámico de las partículas sintetizadas hallándose un valor de 20 nm. Comparando el tamaño de las IrNPs con una relación molar sal:DHLA 1:5 y las IrNPs con una relación molar sal:DHLA 1:15 cuyo protocolo de síntesis únicamente se diferencia en la relación molar sal:ligando, puede afirmarse que al aumentar la relación molar sal:ligando el tamaño de las partículas sintetizadas disminuye. No

obstante, el tamaño de las IrNPs empleando DHLA como ligando y una relación molar sal:ligando 1:15 es todavía mayor al deseado y no pueden incluirse dentro de la categoría de NCs.

En esta síntesis también aparecen agregados de gran tamaño, como se observa en la curva de correlación de la Figura 18. Quizás el protocolo de purificación de estas partículas no sea el más adecuado, ya que al filtrarlas por amicones de 3 kDa los aglomerados no pasan por el filtro y no son eliminados de la disolución purificada. Una posible alternativa sería filtrar la síntesis primero por un amicón con un tamaño de poro mayor (p.e., 20 kDa o 50 kDa), de forma que los aglomerados se queden en el filtro y las NPs tengan un tamaño suficientemente pequeño como para atravesar el filtro. La disolución filtrada podría volver a filtrarse en un amicón de 3 kDa para eliminar el exceso de reactivos.

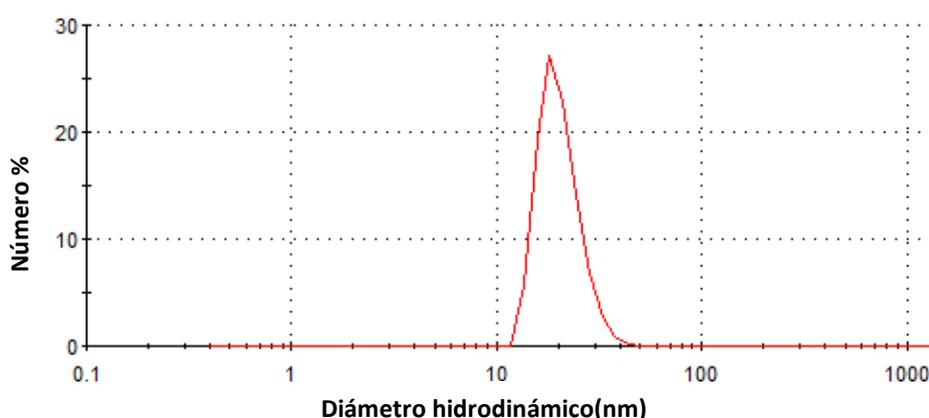


Figura 17: Distribución de tamaños de las partículas obtenida mediante medidas de DLS para la síntesis de IrNPs empleando DHLA como ligando y una relación molar sal:ligando 1:15.

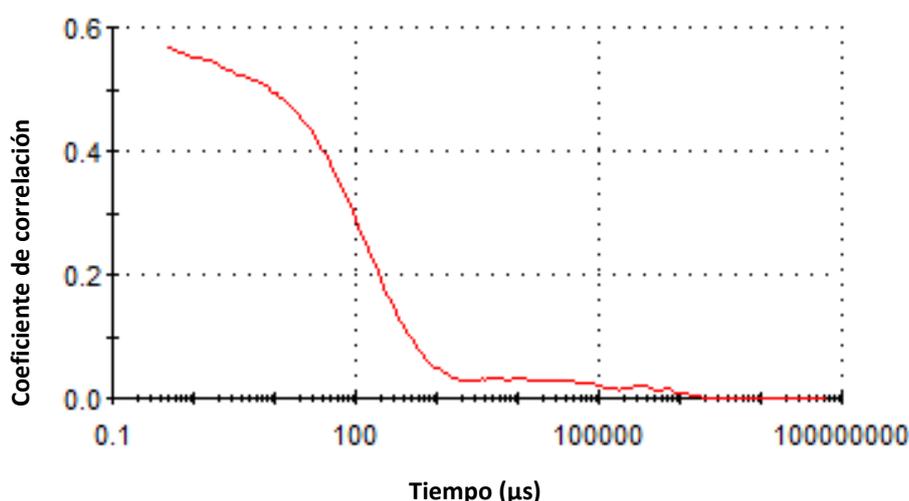


Figura 18: Curva de correlación obtenida mediante medidas de DLS para la síntesis de IrNPs empleando DHLA como ligando y una relación molar sal:ligando 1:15.

#### Caracterización de la emisión fluorescente

Se registra una secuencia de espectros de emisión excitando la disolución purificada desde 300 nm a 600 nm, con un incremento de 10 nm entre espectros sucesivos. Al igual que se

observó para la síntesis de IrNPs empleando una relación molar de sal:DHLA 1:5, no se encontró ninguna longitud de onda de excitación a la que las partículas emitiesen fluorescencia. De nuevo, este hecho puede atribuirse a que tamaño de las partículas sintetizadas es superior a 3 nm.

### 1.2.3. Síntesis de IrNPs empleando citrato como ligando (DHLA citrato)

Se sigue el protocolo indicado en el apartado Experimental 5.1.2 para la síntesis de IrNPs empleando citrato como ligando y  $\text{NaBH}_4$  como reductor, con relaciones molares de sal:ligando:reductor 1:6:2. La reacción se llevó a cabo bajo atmósfera inerte. El color inicial de la síntesis es amarillo pálido (Figura 19A) y tras la reacción el color final de la síntesis es un azul-violeta pálido (Figura 19B).

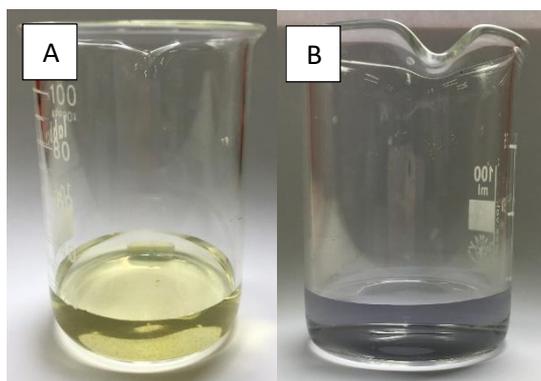


Figura 19: A) Disolución de la sal precursora de iridio a la concentración de la síntesis, y B) Disolución final de la síntesis tras 2h.

#### Absorbancia de la síntesis

Las IrNPs empleando citrato como ligando presentan una menor absorbancia en la región 260-460 nm comparado con la absorbancia de la sal precursora. Además, aparece un pico de absorbancia a 580 nm, como se puede observar en la Figura 20.

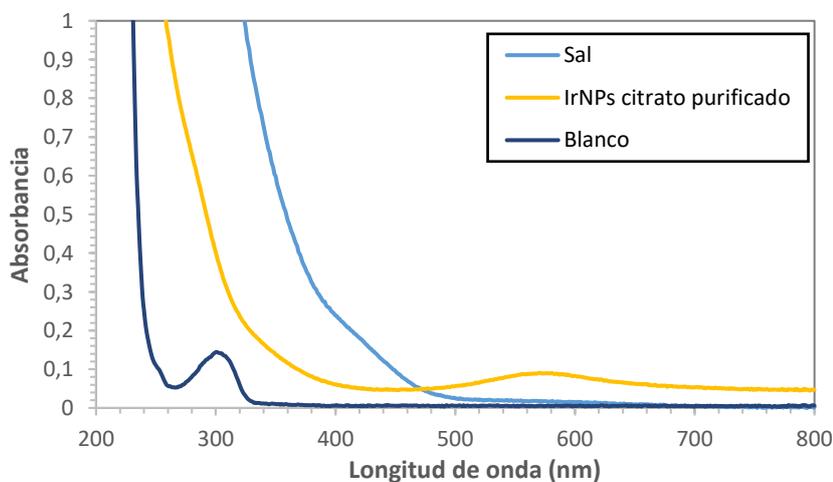


Figura 20: Espectros de absorbancia de la síntesis de IrNPs empleando citrato como ligando. Se mide la disolución purificada, la sal precursora y un blanco de reacción.

### Caracterización mediante DLS

En la Figura 21 se puede ver la distribución de tamaños en número que se ha obtenido para la síntesis: el diámetro hidrodinámico de las partículas sintetizadas determinado por DLS es de 39 nm. Al igual que en las síntesis empleando DHLA como ligando, este tamaño es superior al deseado y no puede considerarse que las partículas sintetizadas sean NCs si no que entran dentro del régimen de tamaños de las NPs. Sin embargo, en este caso la curva de correlación (Figura 22) de las partículas no muestra la presencia de agregados como ocurría en las síntesis anteriores. De este modo se podría decir que la síntesis de IrNPs empleando citrato como ligando parece dar lugar a partículas menos polidispersas que empleando DHLA.

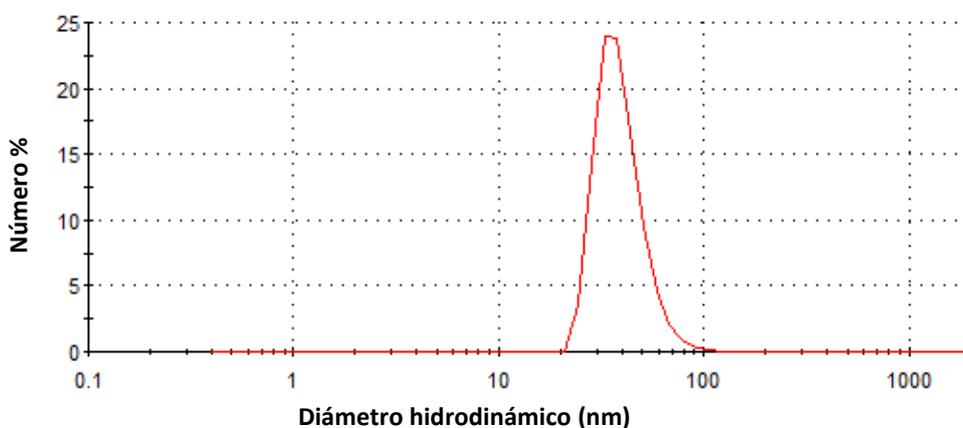


Figura 21: Distribución de tamaños obtenida mediante medidas de DLS para la síntesis de IrNPs empleando citrato como ligando.

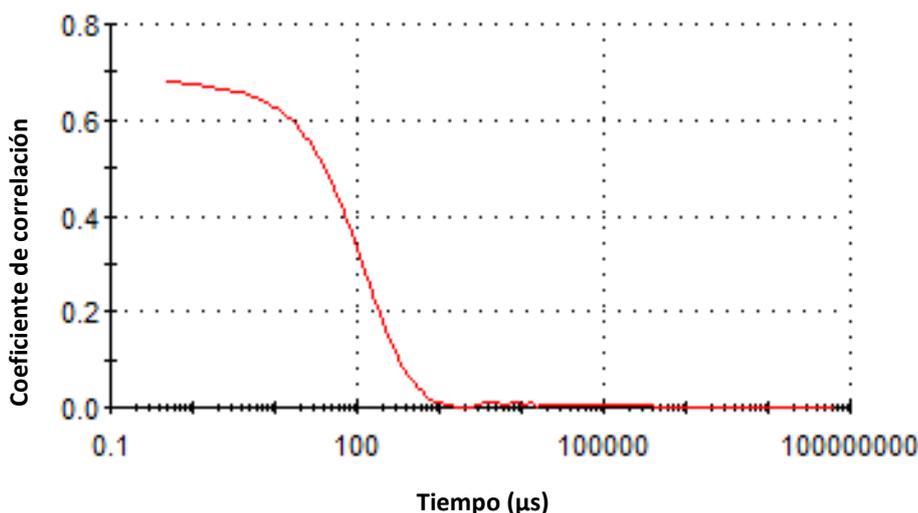


Figura 22: Curva de correlación obtenida mediante medidas de DLS para la síntesis de IrNPs empleando citrato como ligando.

### Caracterización de la emisión fluorescente

Se registra una secuencia de espectros de emisión excitando la disolución purificada desde 300 nm a 600 nm, con un incremento de 10 nm entre espectros sucesivos. Se observa

que, al excitar con una longitud de onda de 400 nm, se producía emisión fluorescente a 600 nm y a 680 nm. Para corroborar que dicha fluorescencia se debiera a las partículas sintetizadas y no a algún producto secundario que pueda formarse en las condiciones de la síntesis, se registra la fluorescencia de un blanco de reacción excitando a la misma longitud de onda (400 nm). Como se observa en la Figura 23, el blanco de reacción no emite fluorescencia. De acuerdo con los resultados obtenidos por DLS, esta síntesis da lugar a NPs con un tamaño superior a 3 nm y que por tanto no deberían ser fluorescentes. Sin embargo, puede que se haya formado un pequeño número de NCs al que se pueda atribuir la emisión fluorescente a 600 y 680 nm.

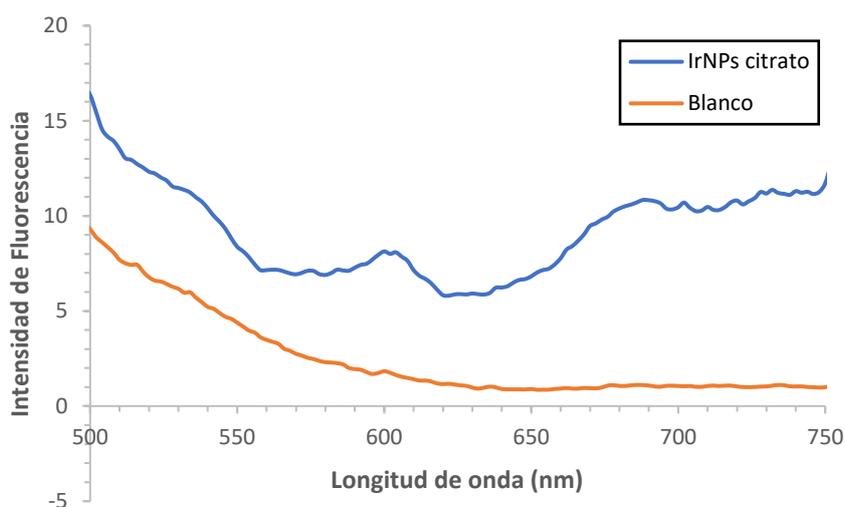


Figura 23: Espectros de emisión fluorescente, excitando a 400 nm de la síntesis IrNPs citrato y de un blanco de dicha síntesis.

#### 1.2.4. Determinación del rendimiento de las síntesis de IrNPs por ICP-MS

Se caracterizan las síntesis de IrNPs mediante ICP-MS para determinar el rendimiento de las distintas vías sintéticas. Con este fin, se determina la concentración de iridio por ICP-MS empleando nebulización convencional en tres tipos de disoluciones: (a) las disoluciones de IrNPs purificadas; (b) las disoluciones de IrNPs sin purificar; (c) los desechos recogidos tras las purificaciones, y (d) una disolución de la sal de iridio empleada para la síntesis ( $\text{IrCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ).

La recta de calibrado construida para el cálculo de la concentración de iridio en las diferentes disoluciones aparece recogida en la Figura 24. Como se puede observar, en el rango de concentraciones de la recta 0-30 ng/mL, se obtiene una relación lineal con un buen coeficiente de correlación lineal.

Se calcula la concentración de iridio en cada una de las disoluciones medidas a partir de la recta de calibrado. Sabiendo las diluciones que se realizaron a las muestras, se determina la concentración de Ir en ppb en las disoluciones de las síntesis sin purificar, en las disoluciones de síntesis purificadas y en los desechos. Conocida la concentración de las disoluciones, puede

determinarse la cantidad de iridio en cada disolución en mg. Tanto las disoluciones de síntesis purificadas como los desechos se llevan al volumen de partida de la síntesis en el proceso de purificación. Por ello, se puede determinar el rendimiento de la reacción realizando un balance de masa entre los mg de Ir en las síntesis purificadas y los mg de iridio en las síntesis sin purificar.

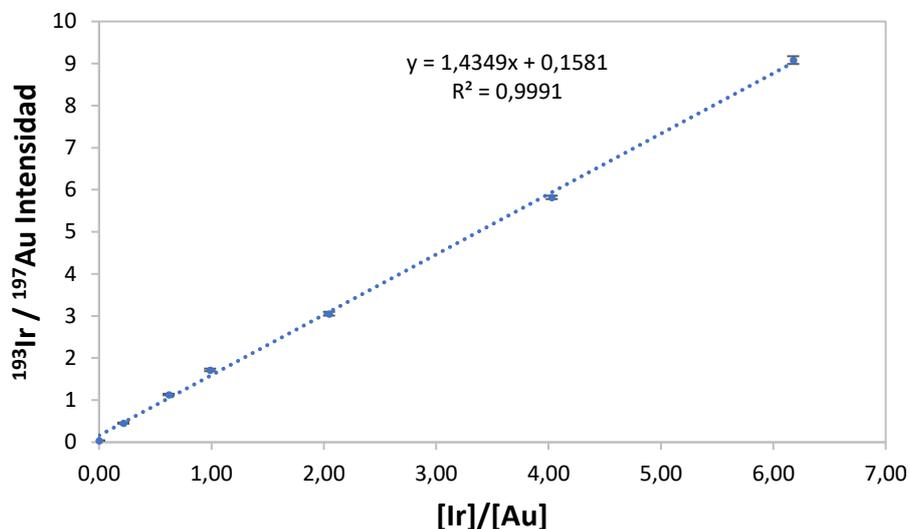


Figura 24: Recta de calibrado obtenida mediante ICP-MS para determinar la concentración de iridio en las distintas disoluciones. La incertidumbre se calculó como la desviación estándar de cinco replicas de cada medida

Los rendimientos calculados para cada síntesis se recogen en la Tabla 7. Se obtiene un rendimiento del 85% y del 89% para las síntesis IrNPs empleando DHLA como ligando y una relación molar sal:ligando 1:5 e IrNPs empleando DHLA como ligando y una relación molar sal:ligando 1:15, respectivamente. Sin embargo, se cree que este rendimiento tan elevado puede no ser real. En las disoluciones purificadas de estas dos síntesis hay partículas agregadas, tal y como se muestra en las curvas de correlación obtenidas en las medidas de DLS (Figura 14 y Figura 17). Estos agregados probablemente contengan Ir en su composición y, por tanto, el valor calculado para el rendimiento está sobreestimado.

El valor obtenido para el rendimiento de la síntesis de IrNPs empleando citrato como ligando es del 53%. Esta síntesis no presentaba la formación de agregados por lo que el valor obtenido puede aproximarse más al real. Este valor podría indicar que no todo el iridio de la sal precursora ha participado en la formación de las partículas y ha sido eliminado en el proceso de purificación.

Tabla 7: Cantidad de iridio expresada en mg en las disoluciones de IrNPs purificadas, en los desechos y en las disoluciones de IrNPs sin purificar. La incertidumbre se calculó como la desviación estándar de cinco replicas de cada medida.

Síntesis	Ir (mg)			
	Síntesis purificada	Desecho	Síntesis sin purificar	Rendimiento (%)
IrNPs DHLA-A	1,261 ± 0,005	0,083 ± 0,001	1,49 ± 0,01	85
IrNPs DHLA-B	1,220 ± 0.008	0.0306 ± 0.0009	1,37 ± 0,01	89
IrNPs citrato	0,746 ± 0,006		1,410 ± 0.004	53

## 2. Estudio de la localización de proteínas en tejidos biológicos

Una vez realizados los inmunoensayos con los tejidos oculares y de encéfalo según los protocolos indicados en el apartado Experimental 5.2.1, se llevó a cabo la localización de las proteínas de interés (MT-1, MT-2, FNP y HPC) visualizando los tejidos con un microscopio de fluorescencia.

### 2.1. Localización de metalotioneínas en tejidos oculares

Las metalotioneínas (MTs) son una familia de proteínas de bajo peso molecular, entre 6 y 7 kDa que están formadas por una cadena de 61 a 68 aminoácidos. Esta familia presenta múltiples isoformas y se pueden encontrar en animales, hongos, plantas y cianobacterias<sup>62</sup>. En ratones, hay cuatro subfamilias de MTs conocidas como MT-1, MT-2, MT-3 y MT-4. Para esta especie solo se conoce una isoforma dentro de cada subfamilia<sup>63</sup>. La MT-1 y la MT-2 se expresan en casi todos los tejidos, mientras que la MT-3 se expresa mayoritariamente en el sistema nervioso central (también en la retina) y la MT-4 en tejidos estratificados.

Las MTs son proteínas de unión a metales donde los átomos metálicos se unen a su cadena por los residuos de cisteína. Suelen unirse a Zn y/o Cu en condiciones fisiológicas, aunque una elevada concentración de metales pesados (Hg o Cd) puede desplazar a los anteriores<sup>63</sup>. Estas proteínas participan en numerosos procesos biológicos: controlan la homeostasis y transporte del Cu y el Zn, eliminan metales tóxicos como el Cd y el Hg y participan en procesos de neuroprotección<sup>62</sup>. Se ha observado además que los pacientes de enfermedades neurodegenerativas presentan una mayor expresión de MTs en el sistema nervioso central<sup>63</sup>.

En el presente TFM se seleccionaron tres zonas de interés para la localización de la MT-1 y la MT-2 en los tejidos oculares: córnea, cuerpos ciliares y retina. Tras los ensayos por inmunofluorescencia se recogen imágenes en estas tres regiones del tejido para cada proteína (MT-1 y MT-2) y para cada tipo de preparación (criogénico y parafina). En la Figura 25 se observa la localización de la MT-1 en la región de la córnea para los tejidos embebidos en parafina y

criogénicos (Figuras 25A-C y 25D-F, respectivamente). En el caso del tejido en parafina, se localiza MT-1 en el epitelio y endotelio, con mayor intensidad en la monocapa de células del endotelio corneal. No se observa MT-1 en el estroma. En el tejido criogenizado también se observa la localización de MT-1 en el epitelio y ligeramente en el endotelio. La intensidad de la fluorescencia es mayor en el epitelio si se compara con la sección en parafina, puede que se hayan conservado más proteínas en la sección criogenizada o que debido al tratamiento haya más interacciones inespecíficas. No se observa tinción por todo el endotelio, lo que puede ser debido a un corte no homogéneo (i.e. diferentes espesores a lo largo del corte). Al igual que en el tejido en parafina, no se observa fluorescencia en el estroma.

La distribución de la MT-2 en esta misma región ocular se observa en la Figura 26. En la sección en parafina (Figuras 26A-C) se localiza la proteína en el epitelio, con poca intensidad y ampliamente distribuida por el citoplasma celular y perinuclear. No se observa proteína en el endotelio ni en el estroma. En la sección criogenizada (Figuras 26D-E) se observa una distribución similar al corte en parafina, pero con una intensidad mayor. Este hecho podría atribuirse a que las proteínas se conserven mejor en el tejido criogénico. Comparando la Figura 25 y la Figura 26 se observa que la MT-2 se expresa menos que la MT-1 en la córnea, ya que la intensidad de la fluorescencia es menor para la MT-2. Además, la MT-2 no se localiza en el endotelio, mientras que la MT-1 sí. La distribución de MT-1 y 2 encontrada en la córnea coincide con la localización de MTs en la córnea de rata según un estudio realizado por Nishimura *et al*<sup>64</sup>. En ese estudio, observan la distribución de MTs en el epitelio y endotelio de la córnea mediante inmunohistoquímica y tinción con hematoxilina.

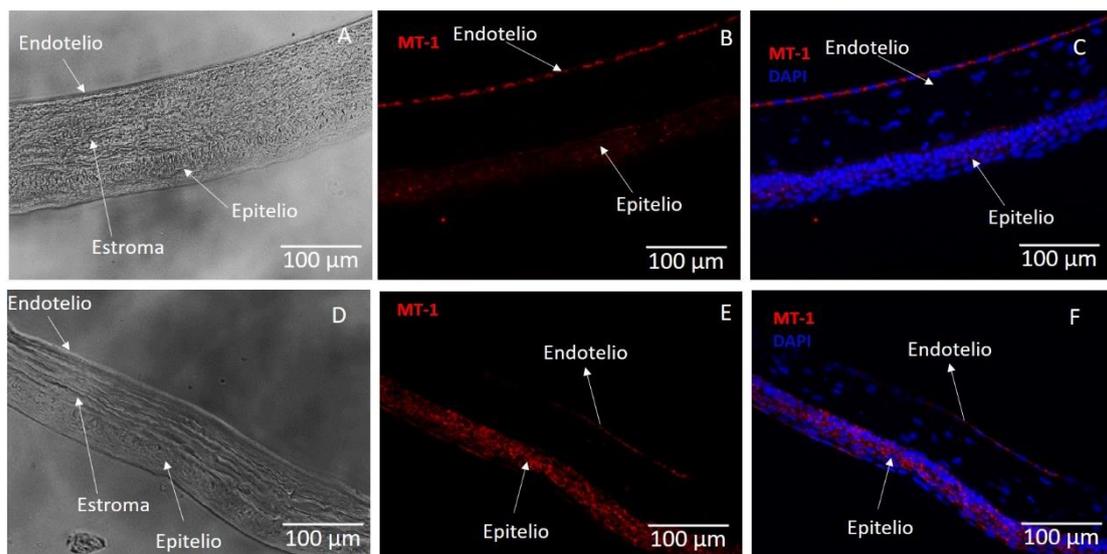


Figura 25: Distribución de MT-1 en la córnea de ratón después de un protocolo de inmunohistoquímica. Las imágenes A, B y C corresponden a la sección embebida en parafina. Las imágenes D, E y F corresponden a la sección criogénica. A) y D) Imágenes de transmisión, B) y E) Marcaje de MT-1 en rojo, C) y F) Marcaje de MT-1 en rojo y marcaje de los núcleos con DAPI en azul.

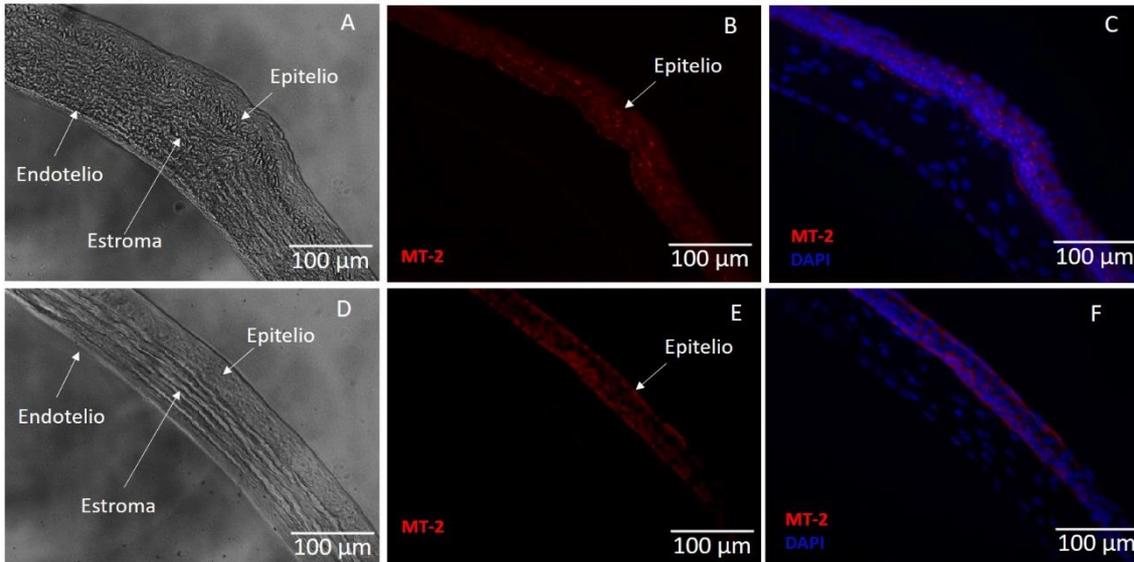


Figura 26: Distribución de MT-2 en la córnea de ratón después de un protocolo de inmunohistoquímica. Las imágenes A, B y C corresponden a la sección embebida en parafina. Las imágenes D, E y F corresponden a la sección criogénica. A) y D) Imágenes de transmisión, B) y E) Marcaje de MT-2 en rojo, C) y F) Marcaje de MT-2 en rojo y marcaje de los núcleos con DAPI en azul.

En la Figura 27 se observa la distribución de la MT-1 en los cuerpos ciliares. En la sección en parafina casi no se observa tinción (Figuras 27A-C), ligeramente en el epitelio ciliar no pigmentado. En el caso del corte criogenizado (Figuras 27D-F), parece que también hay una localización preferencial en el epitelio ciliar no pigmentado. Sin embargo, la intensidad de la fluorescencia es mucho más elevada en el tejido criogénico: puede que se hayan conservado mejor las proteínas o que haya más interacciones inespecíficas. En este caso la concentración del Ab primario parece ser demasiado elevada para la sección criogenizada por lo que debería realizarse otra prueba con una menor cantidad de Ab para comprobar si se trata de interacciones inespecíficas del Ab o si realmente la fluorescencia se debe a la presencia de las proteínas.

Por otro lado, en la Figura 28 se muestra la distribución espacial de la MT-2 en los cuerpos ciliares. Se observa una localización de MT-2 similar a la MT-1 con una localización preferencial en el epitelio ciliar no pigmentado. Comparando la Figura 27 con la Figura 28, se observa que la MT-2 presenta una mayor intensidad que la MT-1 en las secciones en parafina (Figuras 28A-C). En el caso del corte criogénico (Figuras 28D-F), ocurre como en la MT-1, la concentración de Ab primario podría ser demasiado elevada y el tejido presenta mucha fluorescencia. Como se comentó para el caso de la MT-1, debe optimizarse la cantidad de Ab añadida para evaluar si dicha fluorescencia se debe a las proteínas o a interacciones inespecíficas.

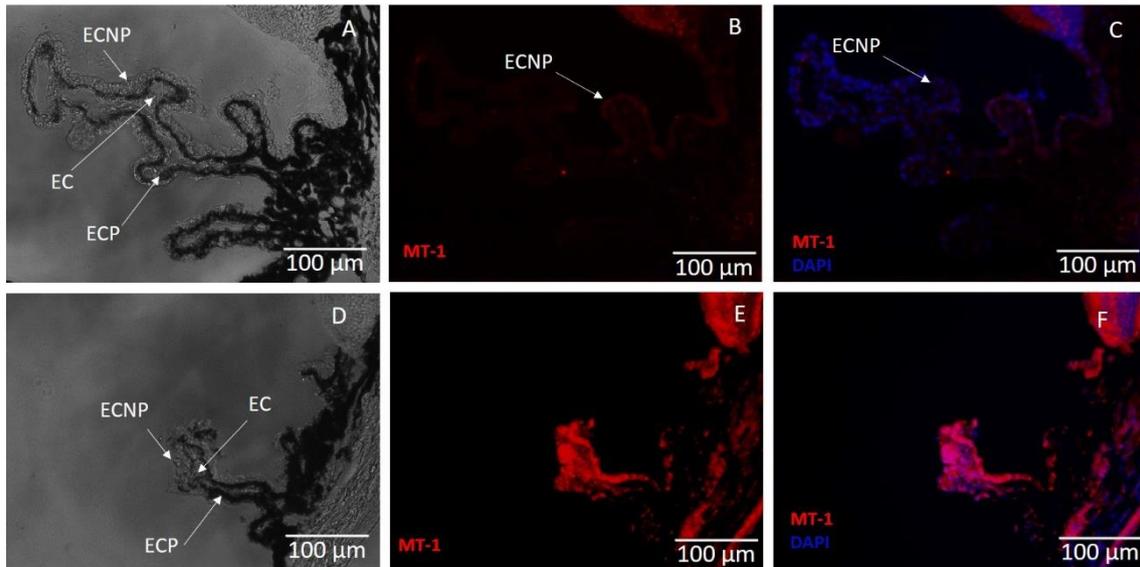


Figura 27: Distribución de MT-1 en la córnea de ratón después de un protocolo de inmunohistoquímica. Las imágenes A, B y C corresponden a la sección embebida en parafina. Las imágenes D, E y F corresponden a la sección criogénica. A) y D) Imágenes de transmisión, B) y E) Marcaje de MT-1 en rojo, C) y F) Marcaje de MT-1 en rojo y marcaje de los núcleos con DAPI en azul. EC: Estroma ciliar, ECNP: Epitelio ciliar no pigmentado, ECP: Epitelio ciliar pigmentado

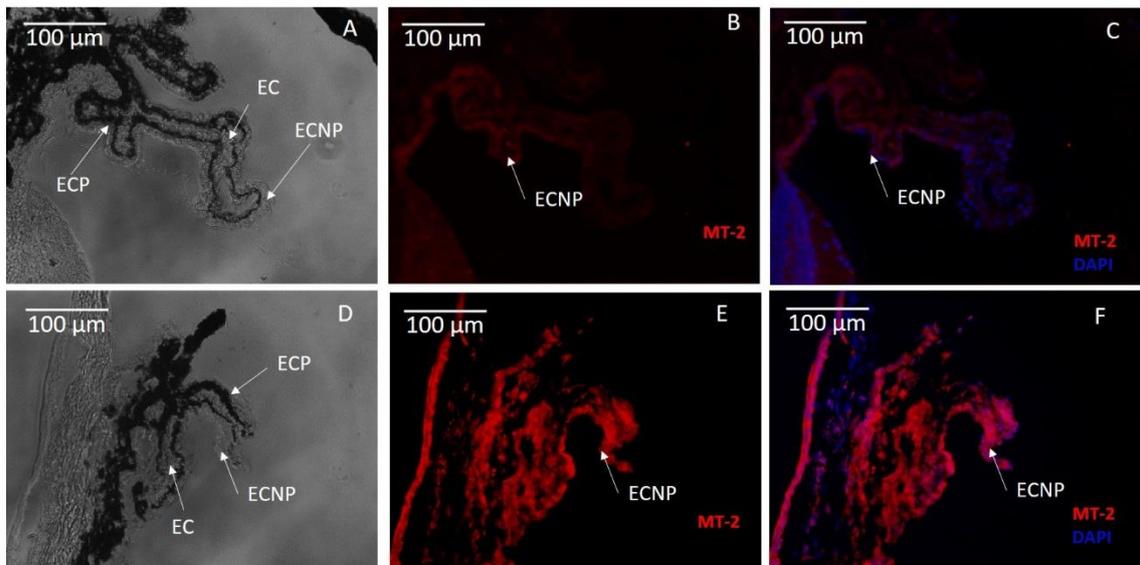


Figura 28: Distribución de MT-2 en la córnea de ratón después de un protocolo de inmunohistoquímica. Las imágenes A, B y C corresponden a la sección embebida en parafina. Las imágenes D, E y F corresponden a la sección criogénica. A) y D) Imágenes de transmisión, B) y E) Marcaje de MT-2 en rojo, C) y F) Marcaje de MT-2 en rojo y marcaje de los núcleos con DAPI en azul. EC: Estroma ciliar, ECNP: Epitelio ciliar no pigmentado, ECP: Epitelio ciliar pigmentado

Finalmente, la distribución de la MT-1 en la retina se muestra en la Figura 29. En el caso del corte en parafina (Figura 29A-C), se observa una localización preferencial de la MT-1 en las capas plexiformes externa e interna y levemente en las células ganglionares, en su capa de fibras nerviosas y en los fotorreceptores. En el caso del tejido criogénico (Figura 29D-F), se localiza en las mismas zonas. La intensidad de la emisión fluorescente es mucho mayor que en la sección

en parafina, lo que sugiere que la cantidad de Ab es demasiado elevada. Es necesario optimizar la cantidad de Ab para eliminar posibles interacciones inespecíficas.

Como se puede observar en la Figura 30, se observa la misma distribución de la MT-2 que de la MT-1 en la retina (capas plexiformes externa e interna, fotorreceptores, células ganglionares y su capa de fibras nerviosas), aunque en el caso de la MT-2 la intensidad de la fluorescencia es menor. Comentar además que la localización de las MT-1 y MT-2 observada en la retina de ratón que coincide con lo indicado por Nishimura *et al*<sup>64</sup> para la distribución de MTs en la retina de rata. Sin embargo, difiere de la distribución de estas proteínas en la retina humana. En humanos, estas proteínas se localizan en las capas nucleares externa e interna y en las células ganglionares<sup>54</sup>. La fluorescencia en el epitelio pigmentario de la retina que se puede apreciar en la Figura 29 y Figura 30 no se puede atribuir a la presencia de proteína, si no a la autofluorescencia del tejido debido al pigmento natural de esta estructura.

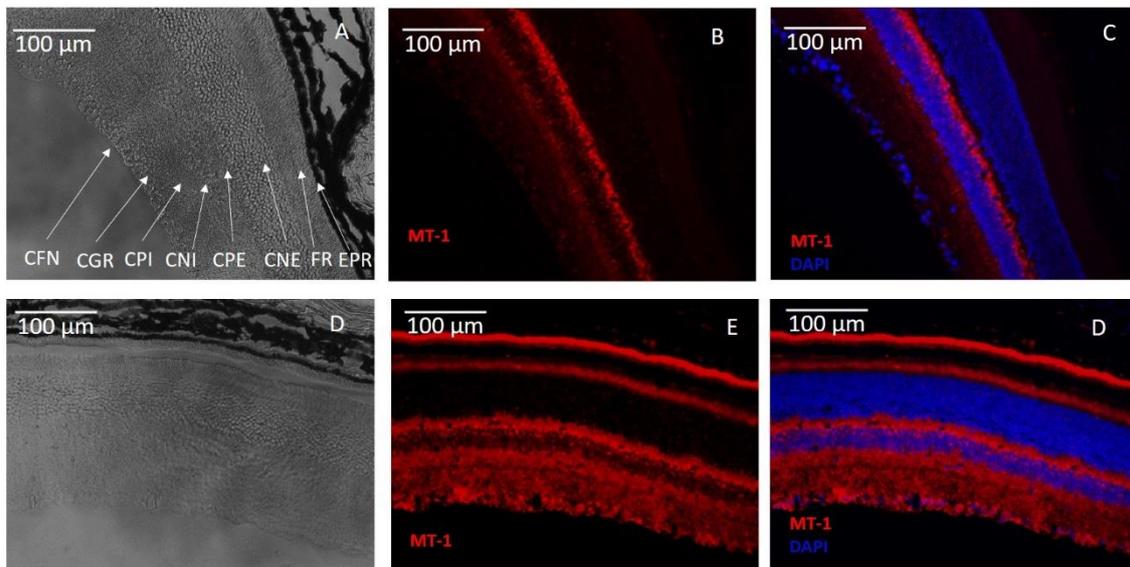


Figura 29: Distribución de MT-1 en la córnea de ratón después de un protocolo de inmunohistoquímica.

Las imágenes A, B y C corresponden a la sección embebida en parafina. Las imágenes D, E y F corresponden a la sección criogénica. A) y D) Imágenes de transmisión, B) y E) Marcaje de MT-1 en rojo, C) y F) Marcaje de MT-1 en rojo y marcaje de los núcleos con DAPI en azul. CFN: capa de fibras nerviosas, CGR: Células ganglionares, CPI: capa plexiforme interna, CNI: capa nuclear interna, CPE: Capa plexiforme externa, CNE: capa nuclear externa, FR: fotorreceptores, EPR: Epitelio pigmentario de la retina.

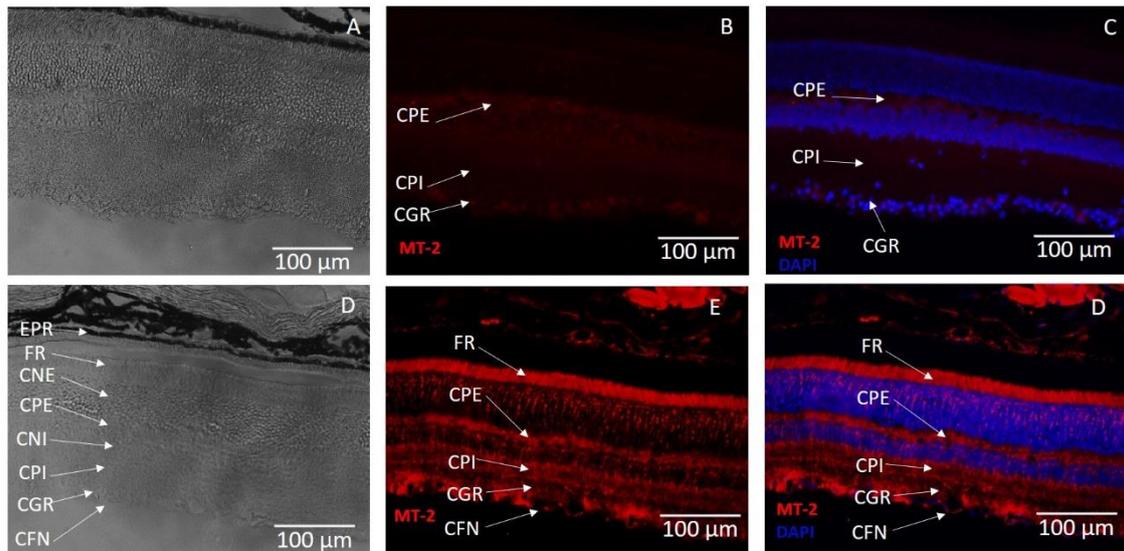


Figura 30: Distribución de MT-2 en la córnea de ratón después de un protocolo de inmunohistoquímica. Las imágenes A, B y C corresponden a la sección embebida en parafina. Las imágenes D, E y F corresponden a la sección criogénica. A) y D) Imágenes de transmisión, B) y E) Marcaje de MT-2 en rojo, C) y F) Marcaje de MT-2 en rojo y marcaje de los núcleos con DAPI en azul. CFN: capa de fibras nerviosas, CGR: Células ganglionares, CPI: capa plexiforme interna, CNI: capa nuclear interna, CPE: Capa plexiforme externa, CNE: capa nuclear externa, FR: fotorreceptores, EPR: Epitelio pigmentario de la retina.

Si se comparan los resultados obtenidos de los inmunoensayos en los cortes criogénicos y los cortes en parafina, los cortes en parafina muestran unos resultados más fiables. La cantidad de Ab primario añadida es óptima para los ensayos en secciones en parafina, se aprecia en los tejidos zonas con más intensidad de fluorescencia que se puede atribuir a una mayor concentración de proteína. En el caso de las secciones criogénicas, al no someter al tejido a las etapas de parafinado y desparafinado, puede que se hayan conservado más proteínas o que haya menos impedimentos para que el Ab reconozca los epítomos y la cantidad de Ab añadida resulta excesiva. La fluorescencia en los tejidos criogénicos está saturada en algunas de las zonas y resulta difícil distinguir si la tinción se debe a la presencia de las proteínas o a interacciones inespecíficas. Cabe mencionar también que el epitelio pigmentario de la retina es una estructura que debido a su pigmento presenta autofluorescencia y por tanto la fluorescencia localizada en esta zona no puede atribuirse únicamente a la presencia de proteína.

## 2.2. Localización de Ferroportina y Hecpidina en tejidos de encéfalo

El sistema ferroportina-hepcidina regula el transporte de hierro entre células y tejidos. La ferroportina (FPN) es una proteína transmembrana que exporta hierro desde el interior celular al torrente circulatorio, permitiendo que el hierro esté disponible para las distintas funciones fisiológicas que lo requieran. La hepcidina (HPC) es una hormona que se une a la ferroportina impidiendo la salida de hierro al exterior celular<sup>22</sup>. En los tejidos de encéfalo, la proteína precursora amiloide se une a la FPN para exportar el hierro neuronal. Alteraciones en

estos procesos pueden estar relacionados con enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer<sup>65</sup>. De este modo, es importante estudiar el sistema FPN-HPC en el encéfalo para entender sus implicaciones en las enfermedades neurodegenerativas.

Al igual que se hizo con los tejidos oculares, una vez realizados los inmunoensayos se obtuvieron imágenes en la región del hipocampo para las dos proteínas (FPN y HPC) y empleando las dos preparaciones (criogénico y parafina). Si se observa la fluorescencia del Ab secundario en los ensayos de inmunofluorescencia para la FPN (Figura 31A y Figura 31C) parece que se aprecia la expresión de la proteína. Sin embargo, si se recoge la fluorescencia de una longitud de onda a la cual el Ab secundario no emite (luz verde), se observa la misma distribución. De este modo la emisión fluorescente observada en las imágenes se puede atribuir a la presencia de lipofuscina en el encéfalo. La lipofuscina es un pigmento autofluorescente formado por lípidos y fosfolípidos que se acumula en las células postmitóticas con la edad. Existen tratamientos para enmascarar la emisión fluorescente de la lipofuscina (p.e. Negro Sudán), sin embargo, dichos tratamientos también bloquean la fluorescencia del marcaje y pueden emplearse únicamente cuando el antígeno se expresa en grandes concentraciones. En el caso de las proteínas de interés en los tejidos de ratón no se espera que el contenido en FPN y HPC sea demasiado elevado.

No parece, por tanto, que haya habido marcaje debido a la presencia de FPN. Puede que la expresión de esta proteína en el hipocampo de ratón sea limitada y que sea necesario emplear cortes más gruesos para poder visualizarla mediante inmunofluorescencia. Otra posibilidad es que el anticuerpo no haya penetrado bien en el tejido. El encéfalo es un tejido que contiene muchos lípidos y puede que se necesite un protocolo de desenmascaramiento antigénico más exhaustivo al empleado (en el caso de los tejidos criogénicos no se empleó ninguno).

En el caso de la HPC ocurre algo similar: la presencia de lipofuscina enmascara la fluorescencia del Ab secundario como se observa en la Figura 32. Además, la HPC es citoplasmática por lo que en el caso de observar tinción debido a la presencia de esta proteína debería de verse difuminada en el citoplasma celular. En la Figura 32A y la Figura 32C se observa la fluorescencia como un fondo.

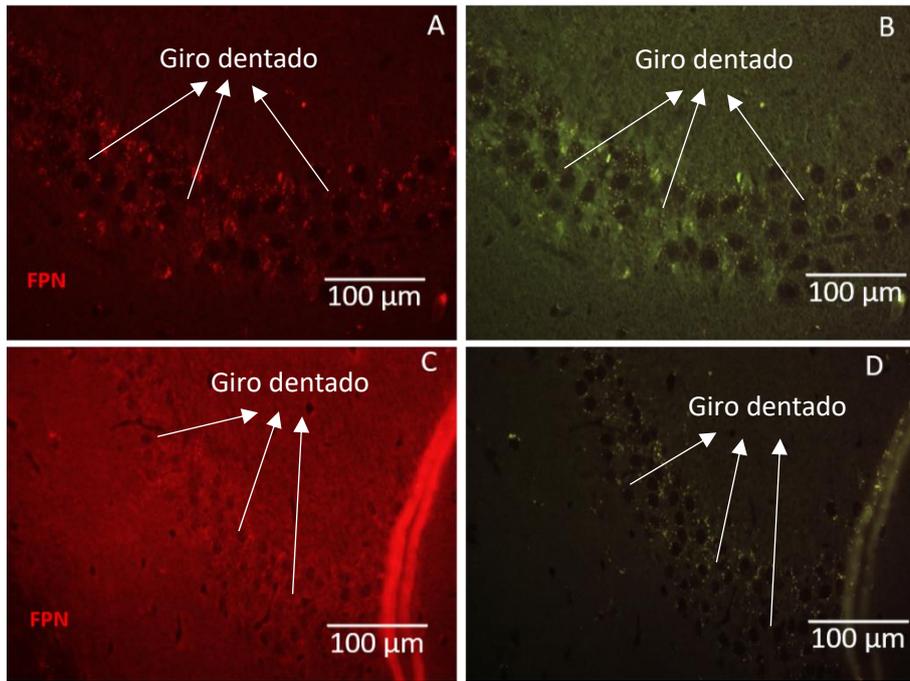


Figura 31: Distribución de la FPN en las células del giro dentado en la zona del cuerno de Amón en el hipocampo de ratón después de un protocolo de inmunohistoquímica. Las imágenes A y B corresponden a la sección embebida en parafina. Las imágenes C y D corresponden a la sección criogénica. A) y C) Marcaje de FPN en rojo, B) y D) Autofluorescencia del tejido en verde.

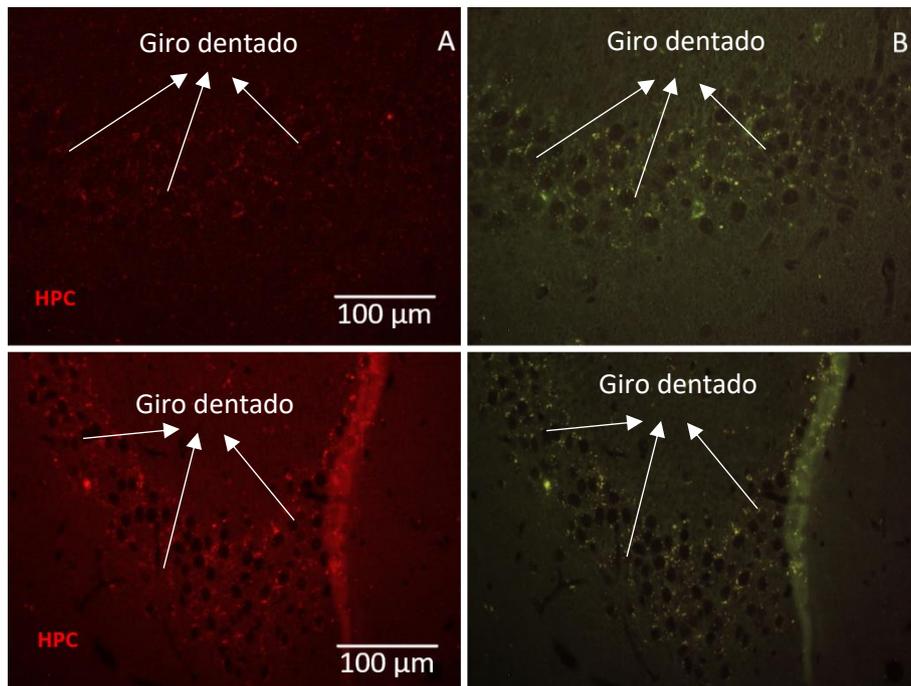


Figura 32: Distribución de la HPC en las células del giro dentado en la zona del cuerno de Amón en el hipocampo de ratón después de un protocolo de inmunohistoquímica. Las imágenes A y B corresponden a la sección embebida en parafina. Las imágenes C y D corresponden a la sección criogénica. A) y C) Marcaje de FPN en rojo, B) y D) Autofluorescencia del tejido en verde.

## V. Conclusiones

Uno de los objetivos del presente TFM era la síntesis de IrNCs fluorescentes en medio acuoso. Para lograr dicho objetivo se llevaron a cabo distintos protocolos de síntesis empleando  $\text{NaBH}_4$  como reductor y DHLA o citrato de sodio como ligandos.

- Los tres protocolos de síntesis empleados dan lugar a la formación de IrNPs. Su tamaño (45-20 nm), estimado mediante medidas por DLS, es demasiado grande para considerarse NCs.
- Al aumentar la relación molar de DHLA:sal de iridio, decrece el tamaño de las NPs sintetizadas empleando DHLA como ligando.
- La vía sintética que emplea DHLA como ligando da lugar a la formación de NPs agregadas, lo cual proporciona un valor del rendimiento de la reacción sobreestimado. Debe evaluarse un protocolo de purificación alternativo que permita eliminar o reducir dichos aglomerados.
- Las IrNPs sintetizadas empleando citrato de sodio como ligando son menos polidispersas que aquellas sintetizadas con DHLA como ligando. Además, parecen presentar emisión fluorescente que puede ser debida a la formación de algún NC en las condiciones de la síntesis.

En cuanto al estudio de la distribución de proteínas relacionadas con enfermedades neurodegenerativas en tejidos oculares y de encéfalo de ratón mediante ensayos de inmunofluorescencia, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- La distribución espacial de la MT-1 y MT-2 en los tejidos oculares puede determinarse mediante ensayos por inmunofluorescencia. Pueden identificarse zonas de mayor expresión de dichas proteínas dentro de la retina, los cuerpos ciliares y la córnea. Comparando los resultados obtenidos en las secciones embebidas en parafina y criogenizadas, la inclusión en parafina da lugar a resultados más fiables ya que en el caso de los tejidos criogénicos la cantidad de Ab primario añadida resulta excesiva y la fluorescencia tiene niveles de fondo elevados. Debe llevarse a cabo una optimización de la concentración de los Ab primarios (anti-MT-1 y anti-MT-2) añadida a los cortes criogénicos.
- En el caso de los tejidos de encéfalo, mediante los protocolos empleados no es posible determinar la localización de FPN y HPC. La posible fluorescencia debida a la presencia de los analitos queda enmascarada por la presencia de lipofuscina en los tejidos.

## VI. Trabajos futuros

A la vista de los resultados obtenidos en el desarrollo del presente TFM, y debido al tiempo limitado que se ha tenido para el trabajo de laboratorio derivado de la situación de alarma generada por el COVID-19, se propone una serie de trabajos futuros:

- Con el fin de obtener IrNPs de menor tamaño (dentro del régimen de los NCs), monodispersos y con una alta emisión fluorescente, se pueden optimizar los protocolos propuestos en este TFM. Se propone realizar estudios donde se varíe la temperatura y el pH de la síntesis, la relación molar sal:ligando y la relación molar sal:reductor. Además, puede resultar interesante evaluar el efecto del pH de la disolución en la emisión fluorescente<sup>66</sup>. Por otro lado, en el caso de la síntesis de IrNPs empleando citrato como ligando se podría realizar un decapado químico con DHLA una vez se hayan sintetizado las partículas. En un estudio realizado por Feng *et al*<sup>67</sup> parten de AgNPs con citrato como ligando y las someten a un decapado químico con DHLA para dar lugar a AgNCs fluorescentes.
- Una vez optimizada la síntesis de los IrNCs se deber realizar su caracterización mediante HR-TEM para determinar su tamaño y morfología. Además, empleando medidas de ICP-MS se podrá determinar la concentración de NCs en la síntesis.
- Una vez optimizados y caracterizados los IrNCs se pueden emplear como marcas metálicas para la determinación de proteínas en muestras de interés biológico empleando el ICP-MS como detección. En este sentido, se plantea realizar la bioconjugación de los IrNCs con el Ab que reconozca a la proteína de interés (p.e. MT-1, MT-2, FPN y HPC) y utilizarse como marcas metálicas para hacer el *bioimaging* de proteínas en tejidos biológicos mediante LA-ICP-MS. La técnica LA-ICP-MS es más sensible que la inmunohistoquímica tradicional y además permite obtener información cuantitativa.
- Respecto al estudio de las proteínas de interés en tejidos oculares y de encéfalo mediante inmunofluorescencia, en el caso de los tejidos oculares se debe optimizar la concentración de Ab añadida a los cortes criogénicos. Para los tejidos de encéfalo, se debe optimizar el protocolo de desenmascaramiento antigénico para mejorar el reconocimiento del antígeno por parte de los Ab primarios.
- Por otro lado, se valorará el empleo de la inmunohistoquímica convencional con una tinción con el cromógeno diaminobenzidina (DAB) como alternativa a los ensayos de inmunofluorescencia (ya que la presencia de lipofuscina en el encéfalo enmascara la fluorescencia de los analitos en este tipo de medidas) para validar la distribución de proteínas en los tejidos oculares y de encéfalo encontrada por LA-ICP-MS.

## Bibliografía

1. Sáenz De Pipaón, I. & Larumbe, R. Programa de enfermedades neurodegenerativas. *An. Sist. Sanit. Navar.* **24**, 49–76 (2001).
2. Schmidt, K.-G., Bergert, H. & Funk, R. Neurodegenerative Diseases of the Retina and Potential for Protection and Recovery. *Curr. Neuropharmacol.* **6**, 164–178 (2008).
3. Colligris, P., Perez De Lara, M. J., Colligris, B. & Pintor, J. Ocular Manifestations of Alzheimer's and Other Neurodegenerative Diseases: The Prospect of the Eye as a Tool for the Early Diagnosis of Alzheimer's Disease. *J. Ophthalmol.* **2018**, 1–12 (2018).
4. Bayer, A. U., Keller, O. N., Ferrari, F. & Maag, K. P. Association of glaucoma with neurodegenerative diseases with apoptotic cell death: Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Am. J. Ophthalmol.* **133**, 135–137 (2002).
5. Garzón P, S. J., Camacho M, M., Tapiero L, J. A. & Reina, K. D. Características cognitivas y oculares en enfermedad de Alzheimer. *Nova* **16**, 101–114 (2018).
6. Loffler, K. U., Edward, D. P. & Tso, M. O. M. Immunoreactivity against tau, amyloid precursor protein, and beta-amyloid in the human retina. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **36**, 24–31 (1995).
7. Budimir, A. Metal ions, Alzheimer's disease and chelation therapy. *Acta Pharm.* **61**, 1–14 (2011).
8. Masuzzo, A., Dinet, V., Cavanagh, C., Mascarelli, F. & Krantic, S. Amyloidosis in retinal neurodegenerative diseases. *Front. Neurol.* **7**, 1–17 (2016).
9. Irvine, G. B., El-agnaf, O. M., Shankar, G. M. & Walsh, D. M. Protein Aggregation in the Brain: The Molecular Basis for Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Mol. Med.* **14**, 451–464 (2008).
10. Parnell, M., Guo, L., Abdi, M. & Cordeiro, M. F. Ocular manifestations of Alzheimer's disease in animal models. *Int. J. Alzheimers. Dis.* **2012**, 1–13 (2012).
11. Leger, F., Fernagut, P. O., Canron, M. H., Léoni, S. & Vital, C. Protein aggregation in the aging retina. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **70**, 63–68 (2011).
12. Simonian, N. A. & Coyle, J. T. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **36**, 86–103 (1996).
13. Martínez-Lazcano, J. C., Boll-Woehrlen, M. C., Hernández-Melesio, M. de la P. A., Rubio-Osornio, M. & Sánchez-Mendoza, M. A. Radicales libres y estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas. *Mensaje bioquímico XXXIV*, 43–59 (2010).
14. Beatty, S., Koh, H. H., Phil, M., Henson, D. & Boulton, M. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv. Ophthalmol.* **45**, 115–134 (2000).
15. Perry, G., Sayre, L. M., Atwood, C. S. & Castellani, R. J. The role of iron and copper in the aetiology of neurodegenerative disorders: Therapeutic implications. *CNS Drugs* **16**, 339–352 (2002).
16. Rivera-Mancía, S., Pérez-Neri, I., Ríos, C., Tristán-López, L. & Rivera-Espinosa, L. The transition metals copper and iron in neurodegenerative diseases. *Chem. Biol. Interact.* **186**, 184–199 (2010).
17. Ding, B., Chen, K. M., Ling, H. W., Sun, F. & Li, X. Correlation of iron in the hippocampus with MMSE in patients with alzheimer's disease. *J. Magn. Reson. Imaging* **4**, 793–798 (2009).
18. Bush, A. I., Pettingell, W. H., Multhaup, G., Paradis, M. D. & Vonsattel, J. P. Rapid induction of Alzheimer A $\beta$  amyloid formation by zinc. *Science*. **265**, 1464–1467 (1994).
19. Kwang, H. L., Yun, K. K. & Chang, Y. T. Investigations of the molecular mechanism of

- metal-induced A $\beta$  (1-40) amyloidogenesis. *Biochemistry* **46**, 13523–13532 (2007).
20. Cuajungco, M. P. & Fagét, K. Y. Zinc takes the center stage: Its paradoxical role in Alzheimer's disease. *Brain Res. Rev.* **41**, 44–56 (2003).
  21. Garcia, C. C., Lindner, H. & Niemax, K. Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry - Current shortcomings, practical suggestions for improving performance, and experiments to guide future development. *J. Anal. At. Spectrom.* **24**, 14–26 (2009).
  22. Cruz-Alonso, M. Nanoclústeres de oro como marcadores para el análisis bimodal de proteínas en muestras biológicas mediante fluorescencia y espectrometría de masas. *Tesis Doctoral* (Universidad de Oviedo, 2019).
  23. Pozebon, D., Scheffler, G. L., Dressler, V. L. & Nunes, M. A. G. Review of the applications of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) to the analysis of biological samples. *J. Anal. At. Spectrom.* **29**, 2204–2228 (2014).
  24. Limbeck, A., Galler, P., Bonta, M., Bauer, G. & Nischkauer, W. Recent advances in quantitative LA-ICP-MS analysis: Challenges and solutions in the life sciences and environmental chemistry ABC Highlights: Authored by Rising Stars and Top Experts. *Anal. Bioanal. Chem.* **407**, 6593–6617 (2015).
  25. Sabine Becker, J. Imaging of metals in biological tissue by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS): state of the art and future developments. *J. Mass Spectrom.* **48**, 255–268 (2013).
  26. Sussulini, A., Becker, J. S. & Becker, J. S. Laser ablation ICP-MS: Application in biomedical research. *Mass Spectrom. Rev.* **36**, 47–57 (2017).
  27. Lobo, L., Pereiro, R. & Fernández, B. Opportunities and challenges of isotopic analysis by laser ablation ICP-MS in biological studies. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **105**, 380–390 (2018).
  28. Becker, J. S., Zoriy, M., Matusch, A., Wu, B. & Salber, D. Bioimaging of metals by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). *Mass Spectrom. Rev.* **29**, 156–175 (2010).
  29. Cruz-Alonso, M., Lores-Padín, A., Valencia, E., González-Iglesias, H. & Fernández, B. Quantitative mapping of specific proteins in biological tissues by laser ablation-ICP-MS using exogenous labels: aspects to be considered. *Anal. Bioanal. Chem.* **411**, 549–558 (2019).
  30. Bishop, D. P., Cole, N., Zhang, T., Doble, P. A. & Hare, D. J. A guide to integrating immunohistochemistry and chemical imaging. *Chem. Soc. Rev.* **47**, 3770–3787 (2018).
  31. Schwarz, G., Mueller, L., Beck, S. & Linscheid, M. W. DOTA based metal labels for protein quantification: A review. *J. Anal. At. Spectrom.* **29**, 221–233 (2014).
  32. Cruz-Alonso, M., Fernandez, B., García, M., González-Iglesias, H. & Pereiro, R. Quantitative Imaging of Specific Proteins in the Human Retina by Laser Ablation ICPMS using Bioconjugated Metal Nanoclusters as Labels. *Anal. Chem.* **90**, 12145–12151 (2018).
  33. Seuma, J., Bunch, J., Cox, A., McLeod, C. & Bell, J. Combination of immunohistochemistry and laser ablation ICP mass spectrometry for imaging of cancer biomarkers. *Proteomics* **18**, 3775–3784 (2008).
  34. Hare, D. J., Lei, P., Ayton, S., Roberts, B. R. & Grimm, R. An iron-dopamine index predicts risk of parkinsonian neurodegeneration in the substantia nigra pars compacta. *Chem. Sci.* **5**, 2160–2169 (2014).
  35. Paul, B., Hare, D. J., Bishop, D. P., Paton, C. & Nguyen, V. T. Visualising mouse neuroanatomy and function by metal distribution using laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry imaging. *Chem. Sci.* **6**, 5383–5393 (2015).
  36. Hare, D. J., George, J. L., Bray, L., Volitakis, I. & Vais, A. The effect of paraformaldehyde fixation and sucrose cryoprotection on metal concentration in murine neurological

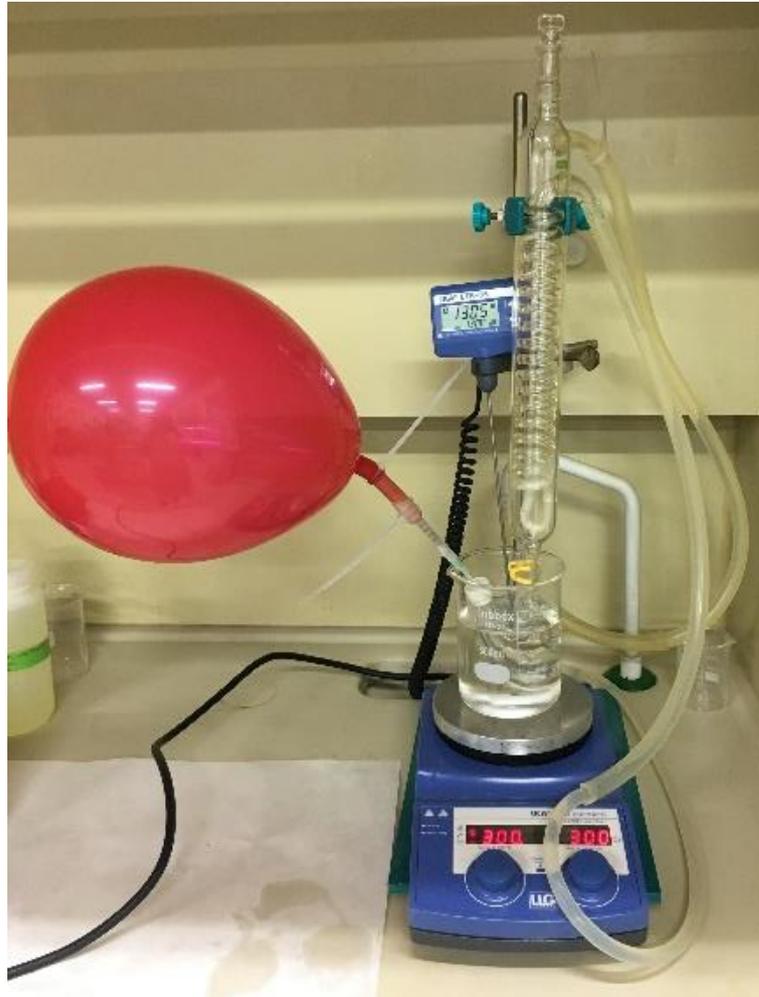
- tissue. *J. Anal. At. Spectrom.* **29**, 565–570 (2014).
37. Konz, I., Fernández, B., Fernández, M. L., Pereiro, R. & Sanz-Medel, A. Laser ablation ICP-MS for quantitative biomedical applications. *Anal. Bioanal. Chem.* **403**, 2113–2125 (2012).
  38. ISO/TR 18401:2017: Nanotechnologies — Plain language explanation of selected terms from the ISO/IEC 80004 series.
  39. Zhang, Q., Xie, J., Yu, Y. & Lee, J. Y. Monodispersity control in the synthesis of monometallic and bimetallic quasi-spherical gold and silver nanoparticles. *Nanoscale* **2**, 1962–1975 (2010).
  40. Díez, I. & Ras, R. H. A. Fluorescent silver nanoclusters. *Nanoscale* **6**, 1963–1970 (2011).
  41. Luo, Z., Zheng, K. & Xie, J. Engineering ultrasmall water-soluble gold and silver nanoclusters for biomedical applications. *Chem. Commun.* **50**, 5143–5155 (2014).
  42. Zheng, K., Yuan, X., Goswami, N., Zhang, Q. & Xie, J. Recent advances in the synthesis, characterization, and biomedical applications of ultrasmall thiolated silver nanoclusters. *RSC Adv.* **4**, 60581–60596 (2014).
  43. Lin, C. A. J., Lee, C. H., Hsieh, J. T., Wang, H. H. & Li, J. K. Synthesis of fluorescent metallic nanoclusters toward biomedical application: Recent progress and present challenges. *J. Med. Biol. Eng.* **29**, 276–283 (2009).
  44. Huang, C. C., Hung, Y. L., Shiang, Y. C., Lin, T. Y. & Lin, Y. S. Photoassisted synthesis of luminescent mannose-au nanodots for the detection of thyroglobulin in serum. *Chem. - An Asian J.* **5**, 334–341 (2010).
  45. Zheng, J., Zhang, C. & Dickson, R. M. Highly fluorescent, water-soluble, size-tunable gold quantum dots. *Phys. Rev. Lett.* **93**, 077402 (2004).
  46. Shang, L., Dong, S. & Nienhaus, G. U. Ultra-small fluorescent metal nanoclusters: Synthesis and biological applications. *Nano Today* **6**, 401–418 (2011).
  47. Oikawa, K., Itoh, S., Yano, H., Kawasaki, H. & Obora, Y. Preparation and use of DMF-stabilized iridium nanoclusters as methylation catalysts using methanol as the C1 source. *Chem. Commun.* **53**, 1080–1083 (2017).
  48. Cui, M., Zhao, Y., Wang, C. & Song, Q. Synthesis of 2.5 nm colloidal iridium nanoparticles with strong surface enhanced Raman scattering activity. *Microchim. Acta* **183**, 2047–2053 (2016).
  49. Valencia, E., Fernández, B., Cruz-Alonso, M., García, M. & González-Iglesias, H. Imaging of proteins in biological tissues by fluorescence microscopy and laser ablation-ICP-MS using natural and isotopically enriched silver nanoclusters. *J. Anal. At. Spectrom. Advanced A*, (2020).
  50. Zhang, L. & Wang, E. Metal nanoclusters: New fluorescent probes for sensors and bioimaging. *Nano Today* **9**, 132–157 (2014).
  51. Li, J., Zhu, J. J. & Xu, K. Fluorescent metal nanoclusters: From synthesis to applications. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **58**, 90–98 (2014).
  52. Triulzi, R. C., Giordani, S., Serry, M., Chiou, W. A. & Leblanc, R. M. Immunoassay based on the antibody-conjugated PAMAM-dendrimer-gold quantum dot complex. *Chem. Commun.* **48**, 5068–5070 (2006).
  53. Liu, J., Yu, M., Zhou, C., Yang, S. & Ning, X. Passive tumor targeting of renal-clearable luminescent gold nanoparticles: Long tumor retention and fast normal tissue clearance. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 4978–4981 (2013).
  54. Cruz-Alonso, M., Fernandez, B., Álvarez, L., González-Iglesias, H. & Traub, H. Bioimaging of metallothioneins in ocular tissue sections by laser ablation-ICP-MS using bioconjugated gold nanoclusters as specific tags. *Microchim. Acta* **185**, 1–9 (2018).
  55. Cruz-Alonso, M., Fernandez, B., Navarro, A., Junceda, S. & Astudillo, A. Laser ablation ICP-

- MS for simultaneous quantitative imaging of iron and ferroportin in hippocampus of human brain tissues with Alzheimer's disease. *Talanta* **197**, 413–421 (2019).
56. Anjali, G. & Ranjana, B. Kinetic Studies on Nanocatalysis by Iridium Nanoclusters in Some Oxidation Reactions. *Int. J. Res. Chem. Environ.* **2**, 210–217 (2012).
  57. Bhat, S., Chakraborty, I., Maark, T. A., Mitra, A. & De, G. Atomically precise and monolayer protected iridium clusters in solution. *RSC Adv.* **6**, 26679–26688 (2016).
  58. Vankayala, R., Gollavelli, G. & Mandal, B. K. Highly fluorescent and biocompatible iridium nanoclusters for cellular imaging. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **24**, 1993–2000 (2013).
  59. Avellini, T., Lincheneau, C., La Rosa, M., Pertegás, A. & Bolink, H. J. Modulation of the solubility of luminescent semiconductor nanocrystals through facile surface functionalization. *Chem. Commun.* **50**, 11020–11022 (2014).
  60. Creighton, J. A. & Eadon, D. G. Ultraviolet-visible absorption spectra of the colloidal metallic elements. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **87**, 3881–3891 (1991).
  61. Feng, L., Dong, Z., Liang, C., Chen, M. & Tao, D. Iridium nanocrystals encapsulated liposomes as near-infrared light controllable nanozymes for enhanced cancer radiotherapy. *Biomaterials* **181**, 81–91 (2018).
  62. Rodríguez Menéndez, S. Estudio de la función del sistema zinc-metalotioneína en el ojo humano empleando metodologías bioanalíticas basadas en espectrometría de masas y biología celular. *Tesis Doctoral* (Universidad de Oviedo, 2019).
  63. Hidalgo, J. & Carrasco, J. Regulation of the synthesis of brain metallothioneins. *Neurotoxicology* **19**, 661–666 (1998).
  64. Nishimura, H., Nishimura, N. & Tohyama, C. Immunohistochemical localization of metallothionein in developing rat tissues. *J. Histochem. Cytochem.* **37**, 715–722 (1989).
  65. Duce, J. A., Tsatsanis, A., Cater, M. A., James, S. A. & Robb, E. Iron-Export Ferroxidase Activity of  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein is Inhibited by Zinc in Alzheimer's Disease. *Cell* **142**, 857–867 (2010).
  66. Lores-Padín, A., Cruz-Alonso, M., González-Iglesias, H., Fernández, B. & Pereiro, R. Bimodal determination of immunoglobulin E by fluorometry and ICP-MS by using platinum nanoclusters as a label in an immunoassay. *Microchim. Acta* **186**, 705 (2019).
  67. Zhang, C., Sun, X., Li, J. & Liu, Y. N. Synthesis of Ag nanoclusters by a pH-dependent etching method in aqueous solution. *Nanoscale* **5**, 6261–6264 (2013).

## Anexos

### 1. Montaje para la síntesis de IrNPs empleando citrato como ligando

En la Figura Apéndice 1 se muestra cómo se coloca el material de vidrio y el globo de nitrógeno para la síntesis de las IrNPs empleando citrato como ligando.



*Figura Apéndice 1: Montaje para la síntesis de IrNPs empleando citrato como ligando*

### 2. Extracción y procesamiento de los tejidos de ratón

A continuación, se describen los protocolos empleados para extraer y procesar los cortes cerebrales y oculares de ratón. Para mantener las estructuras del encéfalo y poder localizar correctamente en los mismos tanto los metales de interés como las proteínas es necesario fijar los tejidos del ratón mediante perfusión antes de proceder a la extracción de los órganos. Dichos procedimientos han sido llevados a cabo en los laboratorios de la Fundación de Investigación Oftalmológica del Instituto Oftalmológico Fernández-Vega por personal cualificado para el tratamiento de animales.

### 2.1. Fijación del ratón por perfusión

Se prepara el equipo de perfusión haciendo pasar fijador, paraformaldehído (PFA) al 4%, y solución salina por los tubos y se retiran todas las burbujas que se puedan haber formado. Se anestesia al ratón mediante una inyección intraperitoneal de una mezcla de ketamina y xilacina (la cantidad necesaria para que esté profundamente anestesiado y no tenga respuesta refleja). Se pone al ratón en decúbito supino (boca arriba) en una base de corcho y se le sujetan las patas con alfileres. Se abre el abdomen con unas tijeras a la altura del diafragma y se sigue cortando hasta retirar la caja torácica y dejar el corazón a la vista. Con unas tijeras pequeñas se hace una incisión en el ventrículo izquierdo del ratón, se le introduce la cánula de perfusión hasta que se vea que asciende por la aorta, se pellizca con unas pinzas pequeñas y se hace un corte en la aurícula derecha para abrir el circuito. Se abre el flujo de perfusión y se hace pasar la solución salina durante 1-2 min para que no se formen coágulos que perjudiquen la fijación. Se cierra el paso de la solución salina y se abre el paso del fijador. El ratón, aunque esté muerto, se empezará a mover por la acción del fijador. Cuando cese el movimiento se fija durante 15 min. Se retira al ratón de la plataforma de perfusión y se procede a la extracción de los órganos de interés (ojos y encéfalo).

### 2.2. Extracción y procesamiento del encéfalo

Se decapita al ratón y por la parte posterior del cráneo se retira la piel para dejar los huesos superiores del cráneo al descubierto, se hace un corte en la sutura sagital con unas tijeras pequeñas y se retiran los huesos cuidadosamente dejando el encéfalo al descubierto. Se retira con pinzas curvas y se corta en parte rostral (a la altura del quiasma óptico) medial (corte altura puente) y caudal. Se introduce el encéfalo en PFA al 4% en la nevera durante la noche y al día siguiente se hacen dos lavados con PB (buffer de fosfato) 0,1 M. Se procede a la inclusión de los cortes.

### 2.3. Extracción de ojos

Se enuclean los ojos con unas pinzas. Una vez extraídos de la órbita, se pinchan con una aguja para favorecer la penetración del fijador y se introducen en PFA al 4% durante 1 h.

### 2.4. Inclusión de cortes criogénicos

Se introduce la muestra en una disolución de sacarosa al 30% y se deja una noche en la nevera. Al día siguiente, se introduce la muestra en un molde criogénico rotulado y se rellena con solución de OCT (del inglés Optimal Cutting Temperature Compound). Se sumerge la parte inferior del molde en nitrógeno líquido. Cuando se congele la totalidad de la muestra, se sumerge completamente unos segundos.

## 2.5. Inclusión de cortes en parafina

Se coloca la muestra en un casete de plástico que se introduce en el inductor de parafina. Se inicia el programa del inductor que dura aproximadamente 16 h y va cambiando automáticamente baños de alcoholes y xiloles hasta acabar en parafina. Se sumerge el casete con la muestra en el baño de parafina de la estación de parafinado hasta su inclusión. A continuación, se saca la muestra del casete y se coloca en el molde metálico para parafina. Se rellena de parafina líquida, se pone el casete sobre el molde y se coloca en la superficie de la estación a 4°C. Cuando la parafina solidifica, se puede separar con facilidad del molde.