

IN VIVO NEAR-INFRARED TWO-PHOTON IMAGING OF AMYLOID PLAQUES IN DEEP BRAIN OF ALZHEIMER'S DISEASE MOUSE MODEL

PRESENTADO POR: L. CHEN¹, M. HERMOSILLA TRESPADERNE¹

ESTUDIOS:¹ . CARRERA DE BIOMEDICINA, UNIVERSIDAD FRANCISCO DE VITORIA, MADRID

AUTORES: C. CHEN † ||, Z. LIANG ‡, B. ZHOU ‡, X. LI †, C. LUI ‡, N. Y. IP ‡, J. QU † ||

†BIOPHOTONICS RESEARCH LABORATORY, DEPARTMENT OF ELECTRONIC AND COMPUTER ENGINEERING, HONG KONG UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, CLEAR WATER BAY, KOWLOON, HONG KONG, P. R. CHINA

||CENTER OF SYSTEMS BIOLOGY AND HUMAN HEALTH, SCHOOL OF SCIENCE AND INSTITUTE FOR ADVANCED STUDY, HONG KONG UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, CLEAR WATER BAY, KOWLOON, HONG KONG, P. R. CHINA

‡DIVISION OF LIFE SCIENCE AND STATE KEY LABORATORY OF MOLECULAR NEUROSCIENCE, HONG KONG UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, CLEAR WATER BAY, KOWLOON, HONG KONG, P. R. CHINA

OBJETIVOS

- Propiedades de Cranad-3 en TPEF
- Estudio comparativo de CRAND-3 con MeO-X04
- Separación espectral de la sonda NIR y lipofuscina
- Comparación de la sonda CRAND-3 y MeO-X04 en TPEF
- Respuestas microgliales a CRANAD-3
- Estudio de las ventajas de CRAND-3 compara imágenes de tejido profundo de dos fotones in vivo de placas amiloides en la enfermedad del Alzheimer de cerebro de ratón.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Microscopio de dos fotones (TPEF)
- NIR, espectroscopia del infrarrojo cercano
- Reactivos
 - MeO-X04
 - CRANAD-3
- Ratones con ventana craneal
 - Ratones con sobreexpresión de microglía (CX3CR1-EYFP)
 - Ratones modificados para tener exceso de depósito de amiloide (APP/PS1)
 - Cruce de CX3CR1-EYFP y APP/PS1

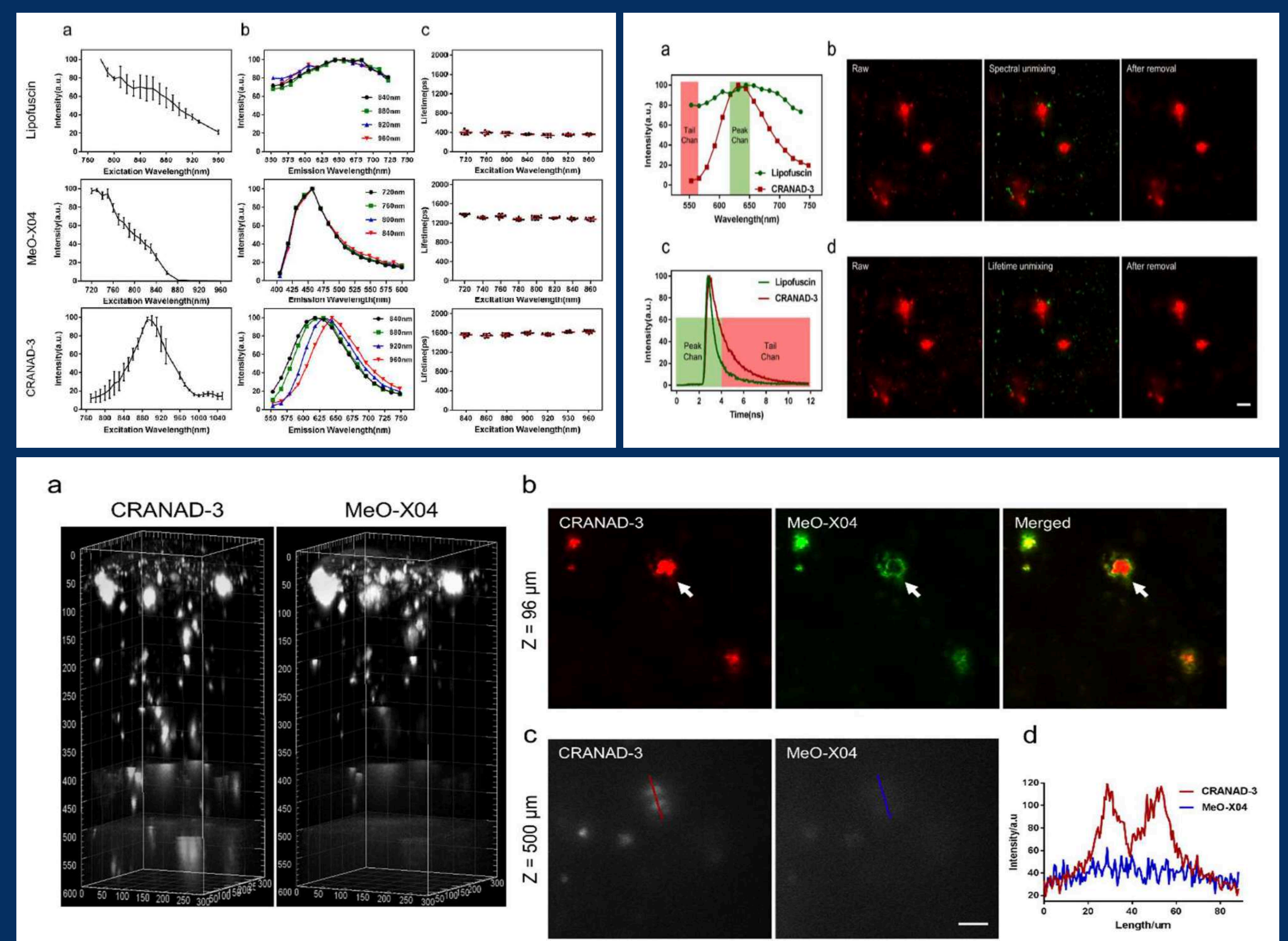
RESULTADOS

■ En comparación con MeO-X04, CRANAD-3 es una sonda más apropiada para observar en el microscopio de dos fotones imágenes cerebrales profundas de las placas amiloides. CRANAD-3 posee un rango de onda de excitación y de emisión más amplio que MeO-X04, además de poseer una vida útil mayor (+0.3ns).

■ Estrategia efectiva para separar la fluorescencia procedente de la lipofuscina que interfería en la fluorescencia de CRANAD-3.

■ Las imágenes de TPEF con sonda CRANAD-3 proporcionan una penetración más profunda que el MeO-X04 Y QUE ADEMÁS Es más adecuado para observaciones de las placas amiloides de two-photon Deep brain. La distribución de las placas amiloides son altamente heterogéneas en la corteza.

■ En el cerebro de ratones con Alzheimer, la microglía la microglía tiene una distribución heterogénea dependiente de la placa, puede ser más vulnerable al estímulo inflamatorio que en condiciones normales. CRANAD-3 alterará la estabilidad microglial que rodea las placas. Casi todas las microglías adyacentes a una placa amiloide eran estacionarias durante todo el periodo. La conclusión de que CRANAD-3 a la dosis de imagen no induce respuestas inflamatorias microgliales en Alzheimer ratones cerebro.



CONCLUSIONES

- ◆ Este estudio presenta una sonda NIR de proteína Aβ, con el reactivo CRANAD-3, para obtener imágenes a partir del microscopio de dos fotones de placas amiloides en las capas más profundas del cerebro en el modelo de ratón con Alzheimer. Esta molécula presenta las características de emitir longitudes de onda largas de excitación y emisión con picos a 900 nm y 650 nm, respectivamente. Debido a su menor absorción y dispersión en el tejido cerebral permite reflejar las placas amiloides en las capas corticales profundas.
- ◆ La enfermedad del Alzheimer tiene como sello distintivo: una maraña intracelular neurofibrilar (formado por microtúbulos asociados a proteínas mal plegados) y placas amiloides extracelulares (depósitos y agregados beta amiloides). Existen distintas hipótesis para explicar esta enfermedad, pero la que más importancia tiene es la cascada de amiloides. Las proteínas neurotóxicas A son consideradas como los agentes causantes que pueden liderar la disfunción sináptica y la degeneración neuronal.
- ◆ En las últimas décadas se han encontrado muchas formas de estudiar los depósitos de amiloides de una forma no invasiva o mínimamente invasiva. A espectroscopia del infrarrojo cercano por fluorescencia (NIRF) nos permite la detección de una forma no invasiva con una velocidad de adquisición rápida aunque tiene defectos: no tiene una buena resolución espacial y no es capaz de resolver una única placa individual.
- ◆ En el caso del microscopio de dos fotones (TPEF) nos permite una alta resolución espacial y temporal gracias al uso de una ventana craneal. Esto nos permite realizar repetidas visualizaciones de una placa amiloide y de sus estructuras circundantes en largos periodos de tiempo.
- ◆ El reactivo MeO-X04 se utiliza en este tipo de investigaciones debido a su capacidad de unirse al amiloide y traspasar la barrera hematoencefálica, aunque está muy restringido a una superficie craneal (la onda emite una fluorescencia de 460nm). Debido a esta restricción, se están estudiando distintas formas para llegar a zonas más profundas, una de ellas es utilizar marcadores con excitación y emisión en infrarrojo.
- ◆ Para aplicar estas técnicas por fluorescencia es necesario eliminar las interferencias que producen las lipofuscinas por su autofluorescencia. Estas son desechos celulares procedentes de una degradación lisosómica incompleta de mitocondrias dañadas (también se le conoce como pigmento de envejecimiento). Además, aumentan con la edad de una forma heterogénea, lo cual complica la obtención de la imagen en TPEF fluorescente debido a su fuerte emisión autofluorescente. Por tanto, es necesario discriminar esta autofluorescencia ya que influye en la obtención de imágenes TPEF de placas amiloides marcadas por CRANAD-3 y otras células marcadas por proteínas de fluorescencia. Para quitar esta fluorescencia decidimos caracterizarlo con espectroscopia de imagen donde se obtuvo un espectro de 200nm y un tiempo de vida de 0.4ns, estas propiedades nos permite separar esta interferencia con el uso de un espectro basado en ratio o mediante la separación por la duración de las distintas ondas.
- ◆ Finalmente evaluamos la respuesta inmune microglial ante la inyección de CRANAD-3 en la dosis de imagen en CX3CR1-EYFP y ratones APP / PS1 × CX3CR1-EYFP utilizando un microscopio de dos fotones con cámara rápida para obtener imágenes a través de la ventana craneal, y los resultados demuestran que CRANAD-3 a una dosis de imagen no conducirá a la inflamación microglial en ratones normales ni a los que tienen Alzheimer. Actualmente, la sonda CRANAD-3 tiene una eficiencia de excitación relativamente baja, por tanto, no está diseñado para las aplicaciones baja excitación de dos fotones. Esto sirve como un buen ejemplo para seguir trabajando en mejorar la optimización de la forma de actuar de estos fotones en sondas NIR Aβ.