

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Nanociencias**

**Efecto de nanopartículas híbridas cargadas con compuestos
antioxidantes en astrocitos de rata en enfermedad de
Alzheimer**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

José Horacio Silvestre Martínez

Ensenada, Baja California, México
2024

Tesis defendida por

José Horacio Silvestre Martínez

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Ana Bertha Castro Ceseña
Codirectora de tesis

Dra. Karina del Carmen Lugo Ibarra
Codirectora de tesis

Dr. Gustavo Alonso Hirata Flores

Dr. José Enrique Iñiguez Pacheco

Dra. Kanchan Chauhan



Dra. Catalina López Bastidas
Coordinadora del Posgrado en nanociencias

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **José Horacio Silvestre Martínez** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Nanociencias.

Efecto de nanopartículas híbridas cargadas con compuestos antioxidantes en astrocitos de rata en enfermedad de Alzheimer

Resumen aprobado por:

Dra. Ana Bertha Castro Ceseña
Codirectora de tesis

Dra. Karina del Carmen Lugo Ibarra
Codirectora de tesis

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa crónica caracterizada por la acumulación de proteínas como la beta amiloide (β A) y Tau en el cerebro. Puede comenzar hasta 20 años antes de los síntomas, como pérdida de memoria, problemas de lenguaje, cambios de personalidad y demencia. Actualmente no tiene cura y los tratamientos disponibles solo reducen los síntomas, lo que hace que la EA sea una prioridad en salud mundial. Desarrollar terapias innovadoras es crucial, en este campo, la nanomedicina puede superar limitaciones como la barrera hematoencefálica (BHE) mediante el uso de sistemas de entrega controlada de fármacos. En este trabajo se estudió el efecto antiinflamatorio de nanopartículas híbridas polímero-lípido (NPs) conjugadas con transferrina (Tf) para llegar a la BHE, cargadas con puntos de carbono (CD) y fucoxantina (Fx), estos compuestos poseen actividad antiinflamatoria, antioxidante y potencial para su uso en enfermedades neurodegenerativas. La encapsulación conjunta de CD y Fx en nanopartículas (NPs CDFx) mostró una eficiencia de encapsulación de 45% para Fx y 10% para CD y un tamaño de 88.74 ± 27.4 nm. Se evaluó la citocompatibilidad de las NPs en un modelo de neuroinflamación empleando astrocitos de rata estimulados con lipopolisacárido (LPS), las NPs CDFx presentaban una viabilidad celular del 92.18%. Mediante qPCR se encontró que las NPs CDFx redujeron la expresión relativa de los genes de proteína precursora amiloide (APP), proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y la proteína de unión al Ca^{2+} (S100 β), los cuales codifican para proteínas relacionadas con la neuroinflamación y el desarrollo de la enfermedad. Se microinyectaron NPs en larvas de pez cebra (*Danio rerio*) de 5 días post fertilización (dpf) y mediante microscopia confocal de barrido se verificó que llegan a la BHE, al observar la fluorescencia de los CD en el cerebro. Se sugiere que las NPs entregan los compuestos en el cerebro del pez, generando un efecto terapéutico positivo al reducir la expresión de genes. Estos resultados contribuyen a dilucidar las características y requisitos fisicoquímicos de las NPs híbridas polímero-lípido para la entrega de fármacos en el cerebro, ayudando al desarrollo de un tratamiento efectivo para la EA.

Palabras clave: enfermedad de Alzheimer, fucoxantina, puntos de carbono, *Danio rerio*, transferrina

Abstract of the thesis presented by **José Horacio Silvestre Martínez** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Nanoscience.

Effect of hybrid nanoparticles loaded with antioxidant compounds on rat astrocytes in Alzheimer's disease

Abstract approved by:

Dra. Ana Bertha Castro Ceseña
Thesis Codirector

Dra. Karina del Carmen Lugo Ibarra
Thesis Codirector

Alzheimer's disease (AD) is a chronic neurodegenerative disease characterized by the accumulation of proteins such as amyloid beta (β A) and Tau in the brain. It can begin up to 20 years before symptoms such as memory loss, language problems, personality changes, and dementia. There is currently no cure and available treatments only reduce symptoms, making AD a global health priority. Developing innovative therapies is crucial, in this field, nanomedicine can overcome limitations such as the blood-brain barrier (BBB) by using controlled drug delivery systems. In this work, the anti-inflammatory effect of polymer-lipid hybrid nanoparticles (NPs) conjugated with transferrin (Tf) to reach the BBB, loaded with carbon dots (CD) and fucoxanthin (Fx), these compounds have anti-inflammatory, antioxidant activity and potential for use in neurodegenerative diseases, was studied. The encapsulation of both CD and Fx in nanoparticles (NPs CDFx) showed an encapsulation efficiency of 45% for Fx and 10% for CD and a size of 88.74 ± 27.4 nm. The cytocompatibility of the NPs was evaluated in a neuroinflammation model using lipopolysaccharide (LPS)-stimulated rat astrocytes. CDFx NPs showed a cell viability of 92.18%. Using qPCR, it was found that NPs CDFx reduced the relative expression of the genes for amyloid precursor protein (APP), glial fibrillary acidic protein (GFAP), and Ca^{2+} binding protein (S100 β), which encode proteins related to neuroinflammation and disease development. NPs were microinjected into 5-day post-fertilization (dpf) zebrafish (*Danio rerio*) larvae, and through scanning confocal microscopy, it was verified that NPs reached the BBB by observing fluorescence from CD in the fish brain. It is suggested that NPs deliver the compounds into the fish brain, generating a positive therapeutic effect by reducing gene expression. These results contribute to elucidating the physicochemical characteristics and requirements of polymer-lipid hybrid NPs for drug delivery into the brain, helping to develop an effective treatment for AD.

Keywords: Alzheimer's disease, fucoxanthin, carbon dots, *Danio rerio*, transferrin

Dedicatoria

A mi esposa Marlene Trinidad

A mi familia y amigos

A la Dra. Ana Bertha y la Dra. Karina del Carmen

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE), y al Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNYN-UNAM), por permitirme realizar mis estudios de posgrado en sus instalaciones y obtener el grado de Maestro en Ciencias.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por brindarme la oportunidad de cursar un posgrado otorgándome beca de manutención.

Este proyecto fue financiado por la Royal Society of Chemistry (R23-9536845047), CONAHCYT (CF-2023-I-2458) y CICESE (685112).

Agradezco a mis codirectoras de tesis, la Dra. Ana Bertha Castro Ceseña y la Dra. Karina del Carmen Lugo Ibarra, por su apoyo y asesoría a lo largo del proyecto, por creer en mí desde el inicio y permitirme estudiar un tema que me apasiona. A los miembros de mi comité de tesis, el Dr. Gustavo Alonso Hirata Flores, el Dr. José Enrique Iñiguez Pacheco y la Dra. Kanchan Chauhan, por brindarme su tiempo y comentarios, enriqueciendo el trabajo con cada una de sus aportaciones.

A la Dra. Norma Cortez del Centro de Graduados e Investigación en Química del Instituto Tecnológico de Tijuana, por permitirme caracterizar mis NPs mediante DLS. Al Dr. Prakhar Sengar del Departamento de Físicoquímica de materiales por su tiempo y apoyo en la medición de los espectros de fotoluminiscencia de mis muestras. A la Dra. Johanna Bernáldez Sarabia, por su paciencia y capacitación en técnicas de cultivo celular. A la Dra. Karla Cervantes Luévano, por su apoyo en la técnica de qPCR, siempre a la disposición para resolver dudas. Al Dr. Omar Aguillón por el asesoramiento en el correcto manejo para los cuidados y reproducción del pez cebrá.

A mi esposa Marlene Trinidad Moncada Vázquez por su amor incondicional, paciencia y esfuerzos para darme ánimo, por acompañarme en cada paso de esta etapa, por aligerar el peso de los días y hacer más llevadera la vida.

A mi familia, especialmente a mis padres Idalia Martínez Romero y Horacio Silvestre Duran, a mis hermanos José Fernando y Azael Giovanni, que sin ellos jamás habría logrado llegar tan lejos, por ser la inspiración y motor de mejorar día con día.

A mis amigos, especialmente a Marco Olguin e Isaac Herrera, así como a los amigos que hice aquí, especialmente a Gabriel Cosio, Alejandra Mena y Rodrigo Castelo, a ellos que siempre me apoyaron y creyeron que lo lograría.

Al grupo de biomateriales al cual pertenezco, por adoptarme y hacerme sentir parte ellos, a mis amigos y compañeros de laboratorio especialmente a Marco Uriostegui y Gabriela Carballo, por todo el apoyo, consejos y orientación que me brindaron.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas	xiii
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes	2
1.1.1 Enfermedad de Alzheimer.....	2
1.1.2 Fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer.....	4
1.1.3 Hipótesis de la cascada amiloide.....	4
1.1.4 Neuroinflamación y astrocitos en la enfermedad de Alzheimer	6
1.2 Barrera hematoencefálica.....	9
1.3 Tratamientos actuales para la enfermedad de Alzheimer	11
1.3.1 Inhibidores de acetilcolinesterasa.....	11
1.3.2 Inhibición de β -Secretasa (BACE1)	11
1.4 Compuestos antioxidantes.....	12
1.4.1 Puntos de carbono en la enfermedad de Alzheimer.....	13
1.4.2 El carotenoide marino: fucoxantina.....	15
1.5 Transferrina.....	17
1.6 Sistema de entrega de fármacos.....	17
1.7 Justificación	19
1.8 Hipótesis.....	20
1.9 Objetivos	20

1.9.1	Objetivo general	20
1.9.2	Objetivos específicos	20
Capítulo 2. Metodología.....		21
2.1	Materiales	21
2.2	Conjugación de colesterol PEG-COOH y transferrina.....	22
2.3	Síntesis de puntos de carbono mediante termólisis de ácido cítrico	23
2.4	Síntesis de nanopartículas híbridas PLGA	24
2.5	Caracterización morfológica y química de las nanopartículas	25
2.5.1	Dispersión dinámica de luz (DLS)	25
2.5.2	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier	26
2.5.3	Morfología de las NPs mediante Microscopia electrónica de transmisión (TEM)	26
2.5.4	Fotoluminiscencia de los CD y nanopartículas híbridas	26
2.6	Encapsulamiento de fucoxantina y CD en las nanopartículas híbridas.....	27
2.6.1	Fucoxantina	27
2.6.2	Puntos de carbono	27
2.7	Cultivo celular.....	28
2.7.1	Pruebas preliminares con CCD1112Sk y estimulación con LPS.....	28
2.7.2	Ensayo de citocompatibilidad mediante MTT.....	28
2.7.3	Cultivo de astrocitos de rata estimulados con LPS.....	29
2.8	Expresión de genes proinflamatorios en astrocitos de rata	30
2.8.1	Diseño de cebadores	30
2.8.2	Extracción de ácido ribonucleico (ARN) de los astrocitos RA-005	32
2.8.3	Análisis de la expresión de genes proinflamatorios mediante qPCR	33
2.9	Cruce de la barrera hematoencefálica en un modelo de <i>Danio rerio</i>	34
2.9.1	Cría del pez cebra	35
2.9.2	Reproducción del pez cebra	35
2.9.3	La barrera hematoencefálica: microinyección del pez cebra	35

Capítulo 3. Resultados y discusión	37
3.1 Conjugación Col-PEG-Tf.....	37
3.2 Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas.....	38
3.3 Citocompatibilidad del LPS y compuestos libres.....	39
3.4 Encapsulación de los compuestos bioactivos	40
3.5 Tamaño y morfología de las NPs.....	43
3.5.1 Tamaño de las NPs por TEM.....	44
3.6 Citocompatibilidad de las NPs en astrocitos de rata.....	45
3.7 Diseño de cebadores	47
3.7.1 Evaluación de la neuroinflamación mediante qPCR.....	47
3.8 Microinyección de nanopartículas en un modelo de <i>Danio rerio</i>	50
Capítulo 4. Conclusiones	53
Literatura citada	54

Lista de figuras

Figura	Página
Figura 1. BACE1 y el ciclo de producción de las diferentes formas de los agregados de β A. Los dímeros, oligómeros, protofibrillas y placas β A siguen siendo objetivos atractivos para tratar la enfermedad de Alzheimer. Tomada y modificada de Hampel et al., 2021.	5
Figura 2. Factores asociados con la acumulación de péptido β A, mutaciones en genes como APP, PSEN1 y PSEN2, el alelo APOE4 entre otros factores incrementan la síntesis o limitan la eliminación de β A, ocurre la hiperfosforilación de Tau, llevando a la disfunción sináptica, muerte neuronal y deterioro cognitivo. Tomada y modificada de Matos y Souza-Talarico, 2019.	6
Figura 3. La activación de microglía y astrocitos se ve inducida por depósitos de la proteína β A, así como la generación de marcadores proinflamatorios. La producción aguda de moléculas del sistema complemento (C1q, C3 y C5), citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, TNF- α), quimiocinas (CCL2, MIP-1 α , MIP-1 β e IL -8) regulan la eliminación de la proteína β A. Sin embargo, la inflamación crónica podría promover una mayor expresión y alteración del procesamiento de APP, depósito de β A, fosforilación de Tau y neurodegeneración. Las células gliales generan óxido nítrico (NO) que promueve el estrés oxidativo. Este ambiente favorece la producción de COX-2 en las neuronas conduciendo a la apoptosis. Se ha propuesto que las células gliales podrían modular la supervivencia neuronal mediante la producción de TGF- β y factores neurotróficos (BDNF y NGF), la progresión de la enfermedad da como resultado una falla en la reparación de las neuronas. Abreviaciones: interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), factor de crecimiento transformante β (TGF- β), ciclooxigenasa-2 (COX-2), proteína inflamatoria de macrófagos 1 α (MIP-1 α) y proteína inflamatoria de macrófagos 1 β (MIP-1 β). Modificada de Meraz-Ríos et al., 2013.	8
Figura 4. Barrera hematoencefálica a) estructura y composición y b) mecanismos para atravesar la BHE: 1. Transcitosis mediante transportadores, 2. Transcitosis mediante receptores, 3. Transcitosis mediada por células, 4. Vía lipofílica, 5. Bombas de Eflujo, 6. Transcitosis absorbente y 7. Vía paracelular, tomada y adaptada de Wu et al., 2023.	9
Figura 5. Las uniones estrechas están formadas por 3 proteínas integrales de membrana: claudina, ocludina y cingulina. Las uniones adherentes se componen del complejo de caderina, catenina y vinculina. Ambos tipos de unión se unen al citoesqueleto vía cingulina mediante ZO-1, ZO-2 y ZO-3. Tomada y modificada de Kadry et al., 2020.	10
Figura 6. Efecto de los puntos de carbono en la enfermedad de Alzheimer: a) retraso en la formación de las fibrillas de β A40 y β A42, b) los puntos de carbono son capaces de inhibir la enzima BACE1 y c) la fluorescencia de los CD conjugados con transferrina permite constatar la presencia de estos en el cerebro del pez (Han et al., 2017).	14
Figura 7. La fucoxantina es un carotenoide obtenido de las algas pardas, el cual es de color naranja con un PM: 658.91 g/mol, su estructura química presenta un enlace aleno (C=C=C) característico de este carotenoide. Abreviaciones: Peso molecular (PM).	15
Figura 8. Ruta del factor nuclear κ B (NF- κ B) para la expresión de marcadores pro inflamatorios, la respuesta inflamatoria se ve inducida por una variedad de compuestos o estímulos	

- fisicoquímicos, dando como resultado la secreción de marcadores pro inflamatorios. Adaptada de Mirzaei et al., 2021. 16
- Figura 9. Esquema de la metodología general de este trabajo. 1) Síntesis de CD a partir de ácido cítrico, 2) conjugación de PEG-CHO con holo-transferrina y síntesis de NPs, 3) caracterización de las NPs mediante TEM, DLS, FTIR y PL, 4) determinación de la capacidad de carga, 5) evaluación en células, citocompatibilidad en CCD112SK y expresión de marcadores pro inflamatorios en RA005 (astrocitos de rata), 6) evaluación de las NPs en el modelo de BHE animal *Danio rerio*..... 21
- Figura 10. Metodología para la conjugación de Col-PEG-COOH con transferrina. Se agregan NHS y EDC a 100mM a la solución de Col-PEG-COOH a 1mM. Se homogeneiza la mezcla por baño ultrasónico durante 10 min, después se agrega la solución de Tf (2mg/mL) mientras se encuentra en agitación (200 rpm) durante 24h. El conjugado se recupera mediante centrifugación, para después congelar a -80 °C (24h), liofilizar (24 h) y analizar el polvo resultante mediante espectroscopia FTIR. Creado en: BioRender.com. 23
- Figura 11. Metodología para la síntesis de puntos de carbono mediante la termólisis de ácido cítrico a 180 °C durante 40 h, se neutralizaron los CD con NaOH 5 M durante 40 min, 700 rpm a 50°C en baño maría, para después congelar a -80 °C (24 h), liofilizar (31 h) y finalmente analizar mediante espectroscopia de fotoluminiscencia. Creado en: BioRender.com. 24
- Figura 12. Metodología para la síntesis de NPs híbridas polímero-lípido. La preparación de las soluciones se lleva a cabo previo a la síntesis de las NPs. El PLGA se disolvió en acetonitrilo, los lípidos en etanol al 4% y los compuestos bioactivos en PBS. La fase orgánica con los compuestos bioactivos se agrega en forma de goteo lento a la solución acuosa, se agrega agua MilliQ y se sónica durante 7 min, se realizan los lavados por centrifugación y se obtienen las NPs. Creado en: BioRender.com..... 25
- Figura 13. Astrocitos de rata (RA-005) estimulados con 100 ng/mL de LPS durante 24 h, y los tratamientos utilizados para el ensayo de MTT. Abreviaciones: fucoxantina (Fx), puntos de carbono (CD), nanopartículas (NPs)..... 29
- Figura 14. Primer3web versión 4.1.0 utilizado para la generación de secuencias de oligonucleótidos a partir de: 1. La secuencia del gen de interés en formato FASTA. 2. Selección de la especie. 3. Seleccionar las opciones de “Pick Primers Left/Right” y 4. Seleccionar Pick Primers. 31
- Figura 15. Protocolo para la extracción de ARN con TRIzol®. 1. Lisis y homogenización de células en placa. 2. Separación de fases con 1-bromo-3-cloropropano. 3. Aislamiento de la fase acuosa con 2-propanol. 4. Lavado del precipitado de ARN con EtOH al 75% y posterior secado. 5. Resuspensión del precipitado de ARN con agua DEPC. Abreviaciones: Ácido ribonucleico (ARN), Etanol (EtOH), Dietilpirocarbonato (DEPC). Modificado de: BioRender.com..... 32
- Figura 16. Proceso de la microinyección de las larvas de *Danio rerio*, a) limpieza de los embriones al momento de recuperarlos, b) crecimiento de larvas a 1, 25, 72 hpf y c) microinyección de la larva sobre el molde después de aplicar anestesia durante 1 min. 36
- Figura 17. Espectros FTIR de 4000 a 600 cm^{-1} de los compuestos a) Col-PEG-Tf, b) Transferrina y c) Col-PEG..... 37
- Figura 18. Espectros FTIR de 4000 a 600 cm^{-1} de los compuestos a) CD, b) Fx, c) NPs, d) PLGA, e) HSPC y f) Col-PEG-Tf. 38

- Figura 19. Porcentajes de viabilidad celular en fibroblastos humanos CCD-1112Sk a) estimulados con LPS a 10, 100 y 1000 ng/mL por 24 h, b) estimulados con LPS a 100 ng/mL durante 24 horas y posteriormente tratados con los compuestos libres durante 24 horas. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (\pm), n = 3 por grupo. ANOVA de una vía utilizando el análisis a posteriori de Turkey con $p < 0.05$ 40
- Figura 20. Ensayo de liberación de los compuestos encapsulados, a) curva estándar de Fx obtenida mediante el lector de placas EPOCH, b) curva estándar de CD obtenida a partir de espectroscopía de fotoluminiscencia y c) porcentajes de encapsulación de los compuestos bioactivos. 41
- Figura 21. Espectros de fotoluminiscencia de CD (línea negra), NPs Fx (línea naranja), NPs CD (línea azul) y NPs CDFx (línea morada) a una longitud de onda de excitación de 370 nm, se observa el efecto sinérgico en el aumento de encapsulación de CD. 42
- Figura 22. Micrografías obtenidas mediante TEM, se observa la morfología esférica de las NPs a) Vacías y b) CDFx, teñidas con acetato de uranilo al 2% para contrastar la capa lipídica (zona externa oscura de la NP), a una amplificación de 40 x (barra de escala: 200nm). 44
- Figura 23. Astrocitos de rata (IXCells Biotechnologies) sembradas a una densidad de 7500 cel/mL, a) a 24 horas, b) 3 días, c) 7 días y d) 10 días. Amplificación 4x, barra de escala: 1000 μ m. 45
- Figura 24. Porcentajes de viabilidad celular en astrocitos de rata estimulados con LPS a 100 ng/mL por 24 h y tratados con los compuestos bioactivos libres y las NPs cargadas durante 24 horas. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (\pm), n = 3 por grupo. ANOVA de una vía utilizando el análisis a posteriori de Turkey con $p < 0.05$ 46
- Figura 25. Niveles de expresión de genes relacionados a neuroinflamación en astrocitos de rata estimulados con 100ng/mL de LPS por 24 h. Las barras verticales representan el error estándar de la media (\pm), n=3 por grupo. Análisis t de Student de dos colas con $p < 0.05$ 48
- Figura 26. Niveles de expresión de genes relacionados a neuroinflamación en astrocitos de rata con estimulación de 100 ng/mL LPS por 24 h, tratadas con las distintas formulaciones de compuestos libres y NPs. Las barras verticales representan el error estándar de la media (\pm), n=3 por grupo. Análisis t de Student de dos colas con $p < 0.05$ 49
- Figura 27. Larvas de *Danio rerio* a los 5 días post fertilización a) sin inyectar, b) inyectada con NPs vacías, c) inyectada con NPs Fx, d) inyectada con NPs CD, e) inyectada con NPs CDFx sin contraste y f) inyectada con NPs CDFx con contraste en azul (filtro 430-460 nm) en la cual se muestra fluorescencia de las NPs..... 51

Lista de tablas

Tabla	Página
Tabla 1. Genes implicados en el proceso de neuroinflamación en la EA.....	30
Tabla 2. Componentes del kit GoTaq® 1-Step RT-qPCR y su volumen por reacción adaptado a 10 µL, la concentración final de los cebadores se estableció a 100 nM y se consideraron 100 ng totales de ARN.....	34
Tabla 3. Diámetro hidrodinámico, PDI y potencial ζ obtenido del análisis de DLS de las diferentes NPs.	44
Tabla 4. Secuencias y características de los cebadores a evaluar mediante qPCR en astrocitos de rata. Abreviaciones: temperatura de fusión (TF), pares de bases (Pb), guanina (G) y citosina (C).	47

Capítulo 1. Introducción

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad crónica neurodegenerativa caracterizada por pérdida progresiva de memoria, cambios de personalidad y deterioro cognitivo (Haes et al., 2005). Es la causa más común de demencia y afecta principalmente a personas mayores de 65 años (Leng & Edison, 2021). La EA se caracteriza por la acumulación del péptido amiloide (β A) y de la proteína tau, seguido de neurodegeneración. Estos cambios en el cerebro ocurren gradualmente y a menudo se desarrollan hasta 20 años antes de que se manifiesten los síntomas (Alzheimer's Association, 2023). La mayoría de los agentes farmacológicos de la EA se centran en el tratamiento sintomático de la enfermedad, lo que hace que el diagnóstico y el tratamiento tempranos desempeñen un papel vital para mejorar la calidad de vida de los pacientes con EA (Alzheimer's Association, 2023; Mead & Fox, 2023).

Avances recientes en la terapia de la EA incluyen la aprobación de Lecanemab, un anticuerpo monoclonal dirigido a los agregados de proteína A β , que ralentiza la progresión de la EA (Mead & Fox, 2023). Sin embargo, muchos aspectos de la enfermedad siguen sin comprenderse por completo. Varias hipótesis sobre la patogénesis de la EA proponen que una estrategia ideal para la prevención o el tratamiento debería dirigirse a la agregación de A β , la neuroinflamación y el estrés oxidativo al mismo tiempo (Mangialasche et al., 2010; Yang et al., 2021). Atravesar la barrera hematoencefálica (BHE), la baja solubilidad de los fármacos y el tiempo de circulación de estos en el cuerpo, son los principales retos al desarrollar tratamientos para enfermedades neurodegenerativas, por lo que se han propuesto estrategias innovadoras para desarrollar fármacos, uno de estos enfoques es el uso de la nanotecnología y los sistemas de entrega de fármacos, dentro de los cuales destacan el uso de nanopartículas poliméricas o lipídicas, debido a su biocompatibilidad y facilidad de síntesis (Fang et al., 2010). Se ha demostrado que los compuestos provenientes de algas marinas tienen propiedades antiinflamatorias, protegiendo al cerebro de la neuroinflamación, el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial (Oliyaei et al., 2023).

El objetivo de este trabajo fue investigar el efecto antiinflamatorio de las nanopartículas híbridas polímero-lípido funcionalizadas con transferrina (Tf) cargadas con puntos de carbono (CD) y fucoxantina (Fx), un carotenoide marino con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y

neuroprotectoras, que inhibe la activación del factor nuclear kappa beta (NF- κ B) (Lee et al., 2021). Se evaluaron 4 genes importantes implicados en la neuroinflamación como lo son la proteína precursora amiloide (APP, por sus siglas en inglés), proteína ácida fibrilar glial (GFAP, por sus siglas en inglés), interleucina 6 (IL-6) y la proteína de unión al Ca^{2+} (S100 β), usando un modelo de astrocitos de rata estimulados con lipopolisacárido (LPS). El uso de Tf permite dirigir la formulación de NPs al cerebro, utilizando microscopía confocal de barrido se detectó la fluorescencia proveniente de los CD en un modelo de pez cebra (*Danio rerio*).

1.1 Antecedentes

1.1.1 Enfermedad de Alzheimer

En 1906 Alois Alzheimer reportaba durante un congreso en Tübingen, Alemania, se reportaba el primer caso de la enfermedad, una mujer de 51 años con un caso muy particular de demencia, como causas una lesión en el cerebro causado por “focos” formados por estructuras con forma de semillas y cambios en las propiedades de las fibrillas (Stelzmann et al., 1995). La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad crónica neurodegenerativa, caracterizada por la pérdida progresiva de la memoria, cambios de personalidad y deterioro cognitivo (Haes et al., 2005), enfermedad para la cual no existe un diagnóstico preciso o cura, y termina con el desarrollo de demencia y posterior muerte, usualmente en personas mayores a 65 años (Leng & Edison, 2021). Esta enfermedad no solo afecta al paciente debido al deterioro cognitivo, sino que también disminuye la calidad de vida, lo que repercute en las relaciones personales, familiares e incluso en los aspectos profesionales; es decir, tiene un impacto social, emocional y económico. (Ghanemi, 2015; Tahami Monfared et al., 2022).

La EA es la principal causa de demencia, contribuye con un 60 a 70 % de todos los casos, se estima que para el año 2023, más de 55 millones de personas a nivel mundial padecían demencia (World Health Organization, 2023), y se proyecta que para el año 2050 sean más de 153 millones de personas con este padecimiento (Alzheimer’s Disease International, 2022).

La EA puede ser clasificada de acuerdo con el tiempo de inicio, siendo denominada EA de inicio temprano (EOAD, por sus siglas en inglés) y EA de inicio tardío (LOAD, por sus siglas en inglés). La EOAD contribuye del 3-5% de los casos, afectando a personas menores de 65 años, esto atribuido a mutaciones en genes como APP, presenilina 1 y 2, que afectan el procesamiento y acumulación de la proteína beta amiloide. Mientras que a la LOAD se le atribuye el restante 95 – 97 % de los casos, afectando en su mayoría a personas mayores a los 65 años, esta clasificación se debe a factores riesgo como la edad, mutaciones en APOE4 e historial familiar (Pradhan & Jana, 2024).

Independientemente de la clasificación anterior, existe otra clasificación de acuerdo con la progresión de la enfermedad, desde la aparición de cambios en el cerebro hasta el desarrollo de la demencia y sus diferentes fases, denominándose como el “continuo” de la EA, se puede clasificar en:

- La fase preclínica, se caracteriza por la ausencia de síntomas a pesar de que pueda existir cambios en el cerebro, como la acumulación de proteína β A o Tau.
- La fase de deterioro cognitivo leve, se tiene evidencia de la acumulación anormal de biomarcadores en el cerebro, además de la aparición de síntomas relacionados con la pérdida de memoria, lenguaje y pensamiento, sin afectar la ejecución de tareas diarias.

Demencia debido a la EA: En esta etapa ya son notables los problemas con la memoria, el lenguaje, pensamiento y también aparecen problemas conductuales, afectando la calidad de vida e impidiendo el desarrollo de las tareas diarias. También se clasifica de acuerdo con su gravedad:

- Demencia leve: La persona afectada puede ser independiente y llevar a cabo su vida diaria sin mucho problema, sin embargo, para desarrollar plenamente sus actividades es necesario la ayuda de otra persona.
- Demencia moderada: Se presentan problemas más graves con la memoria y lenguaje, aparece la confusión, reconocimiento de personas cercana y se complica la realización de tareas diarias como el aseo personal, se comienza la etapa de incontinencia y cambios en el comportamiento.

- Demencia severa: Se disminuye la habilidad del lenguaje y se requiere asistencia las 24 h del día debido a la restricción de movimiento causada por la neurodegeneración, el paciente se encuentra en silla de ruedas o cama (Alzheimer's Association, 2024a) .

1.1.2 Fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer

Dentro de las principales características asociadas a esta patología se encuentran la agregación de proteína β amiloide (β A) en placas amiloides, la hiperfosforilación de la proteína Tau que resulta en la formación de los ovillos neurofibrilares intracelulares (NFT) (Blennow et al., 2010), la glicoproteína ApoE4, la cual actúa como una molécula de unión favoreciendo la agregación de β A e impidiendo su eliminación (Holtzman et al., 2011); y mutaciones en los genes de la proteína precursora amiloide (APP) y presenilina (PSEN1 y PSEN2) que se relacionan con el incremento de producción de proteína β amiloide (Goate et al., 1991).

1.1.3 Hipótesis de la cascada amiloide

Un aumento en la producción de péptidos insolubles β A se relaciona a mutaciones en genes como APP, PSEN1, PSEN2 y el alelo APOE4 (Weggen & Beher, 2012). La producción de los péptidos β A se debe a la proteólisis de la proteína transmembranal amiloide precursora (APP), llevada a cabo por la enzima BACE1 (β -site APP cleaving enzyme 1). El desequilibrio en la generación o eliminación de los péptidos β A resulta en la agregación de las diferentes formas fisiopatológicas de β A, tales como oligómeros β Ao, protofibrillas, fibrillas (β Af) y por último placas amiloides (Figura 1). Los oligómeros de la proteína β amiloide (β Ao) denominados también como ADDLs (Lambert et al., 1998), se consideran como la principal causa de los desórdenes neurodegenerativos debido a su carácter tóxico (Lacor et al., 2007). Se ha encontrado que la toxicidad de β A se relaciona con la capacidad de la proteína de atravesar la bicapa lipídica de las neuronas, lo cual induce la despolarización de las membranas neuronales debido a la entrada de iones Ca^{2+} , produciendo neurodegeneración y disfunción sináptica (Chakroborty & Stutzmann, 2014; Disterhoft et al., 2006).

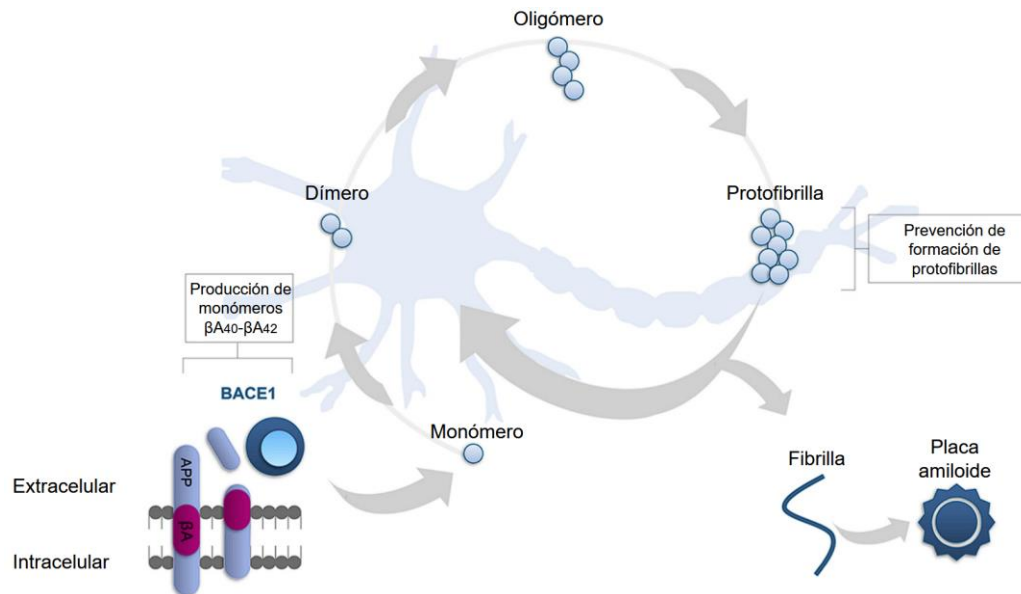


Figura 1. BACE1 y el ciclo de producción de las diferentes formas de los agregados de βA . Los dímeros, oligómeros, protofibrillas y placas βA siguen siendo objetivos atractivos para tratar la enfermedad de Alzheimer. Tomada y modificada de Hampel et al., 2021.

Las placas amiloides promueven la formación de ovillos neurofibrilares, activación de microglía y astrocitos (produciendo una respuesta inflamatoria), la homeostasis iónica, el estrés oxidativo (EO), niveles reducidos de neurotransmisores, neuroinflamación y neurodegeneración (Oddo et al., 2008), lo que resulta en daño neuronal, atrofia de la corteza cerebral, pérdida de la memoria, y finalmente, demencia (Alzheimer's Association Report, 2020).

Se ha reportado que algunas mutaciones en los genes de la proteína Tau, inducen la agregación en ovillos neurofibrilares de forma independiente, sin embargo, existe cierta relación entre la formación temprana de las placas amiloides y la agregación de Tau. Otros efectos derivados de la formación de placas amiloides incluyen: homeostasis iónica, estrés oxidativo, niveles reducidos de neurotransmisores, neuroinflamación y neurodegeneración (Selkoe & Hardy, 2016), derivando en el deterioro de la memoria y cognición (Figura 3).

A este suceso de eventos que parten de la agregación de la proteína βA se le conoce como la hipótesis de la cascada amiloide y presenta una vía de tratamiento centrada en la disminución de los niveles de proteína βA y así prevenir la pérdida sináptica, con el fin de evitar el desarrollo de los biomarcadores característicos de la enfermedad de Alzheimer (Min et al., 2019).

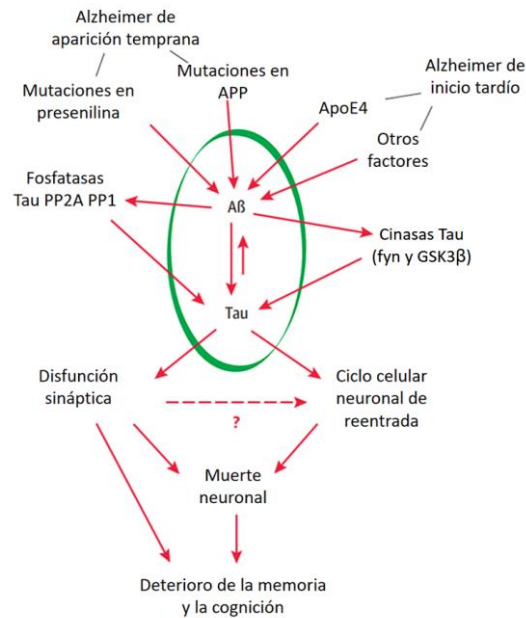


Figura 2. Factores asociados con la acumulación de péptido β A, mutaciones en genes como APP, PSEN 1 y PSEN2, el alelo APOE4 entre otros factores incrementan la síntesis o limitan la eliminación de β A, ocurre la hiperfosforilación de Tau, llevando a la disfunción sináptica, muerte neuronal y deterioro cognitivo. Tomada y modificada de Matos y Souza-Talarico, 2019.

1.1.4 Neuroinflamación y astrocitos en la enfermedad de Alzheimer

La neuroinflamación se define como una respuesta inflamatoria en el sistema nervioso central que puede ser causado por múltiples factores como lo son: estímulos o daños. El proceso está marcado por la producción de citocinas, como IL-1 β , IL-6, IL-18, TNF; quimiocinas como CCL1, CCL5 y CXCL1, moléculas mensajeras pequeñas (prostaglandina y óxido nítrico) y especies de oxígeno reactivas (ROS, por sus siglas en inglés). Estos marcadores están producidos principalmente por microglía, astrocitos, células endoteliales y sangre que se ha infiltrado debido a un daño bioquímico o mecánico en la BHE (DiSabato et al., 2016; Ferrucci & Fabbri, 2018; Leng & Edison, 2021).

El equilibrio de oxidación-reducción es un componente clave en todos los procesos biológicos, la oxidación puede causar daño a las biomoléculas, interrumpiendo la señalización celular redox fisiológica y conduciendo a un estado transitorio conocido como estrés oxidativo. El estrés oxidativo se define como un desequilibrio agudo entre la producción de ROS y los sistemas de defensa antioxidantes. El cerebro, que es un órgano metabólicamente muy activo, tiene una baja capacidad de regeneración celular y, por tanto, es vulnerable a los efectos nocivos de la sobreproducción de

ROS (Llanos-González et al., 2020). Particularmente en la EA, el cerebro está marcado por un exceso de ROS y metales bioactivos como cobre, hierro, zinc y magnesio, que pueden promover la agregación de β A en placas y Tau hiperfosforilado en ovillos neurofibrilares (Ionescu-Tucker & Cotman, 2021), esto promueve el depósito de placas seniles en una etapa pre sintomática de la enfermedad promueve la activación de la microglía, posteriormente, los astrocitos adquieren un fenotipo proinflamatorio que amplifica el daño neuronal (Cao et al., 2018).

Los astrocitos son células gliales especializadas que forman el andamiaje de todo el sistema nervioso central (SNC) y se pueden encontrar en forma protoplásmica encontradas en la sustancia gris o en forma fibrosa en la sustancia blanca (Sofroniew & Vinters, 2010). Los procesos de los astrocitos contribuyen a la integridad de la BHE junto con las células endoteliales y las uniones estrechas, estas funciones de los astrocitos incluyen la regulación del flujo sanguíneo cerebral, el mantenimiento de la homeostasis de fluidos y neurotransmisores, la inducción de la formación de sinapsis, el soporte metabólico y neurotrófico para las sinapsis (Pekny et al., 2016). Los astrocitos también forman canales perivasculares únicos en el SNC, conocidos como sistema glinfático, que eliminan productos de desecho potencialmente neurotóxicos, incluidas la proteína β A y tau (Jessen et al., 2015). Se reconoce que los astrocitos responden a las agresiones patológicas (incluidas las lesiones mecánicas, la isquemia y los agregados anormales de proteínas) a través de la gliosis reactiva, que forma parte del proceso neuroinflamatorio (Figura 3) (Cao et al., 2018; Leng & Edison, 2021). A este cambio de los astrocitos se denominan como "astrocitos reactivos", este término se ha utilizado para describir los astrocitos activados que exhiben procesos hipertróficos y regulación positiva de la proteína GFAP, secretando algunos marcadores proinflamatorios importantes en la EA como IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX-2, TGF- β , IK-1 β y INF γ ; quimiocinas como MIP-1 α , CXCL10, CCL5, además de especies reactivas de oxígeno mediante la activación de rutas como NF- κ β , además de factores asociados a la inflamación como S100 β (Meraz-Ríos et al., 2013; Price et al., 2021) . Se ha propuesto que se pueden expresar los fenotipos A1 y A2 de astrocitos reactivos, dependiendo del tipo de daño la respuesta es diferente, los astrocitos A1 tienen una respuesta inflamatoria y responden a la propia neuroinflamación a través de la vía NF- κ B (Figura 9); mientras que la isquemia induce el fenotipo A2 a través de la vía de transductores de señal y activadores de STAT3, que están marcadas por la expresión de factores neurotróficos, promoviendo la supervivencia y el crecimiento de las neuronas (Liddel and Barres, 2017; Leng and Edison, 2021).

Por lo tanto, restaurar la función fisiológica de la microglía y los astrocitos podría ser una nueva modalidad de tratamiento para la terapia de la EA. Se pueden desarrollar diferentes estrategias para modular la función del sistema inmunitario de las células en la neuroinflamación, como reducir la expresión de citocinas, inhibir la liberación de citocinas y evitar que las citocinas se unan a sus receptores (Ozben & Ozben, 2019). Además, el estrés oxidativo junto con la neuroinflamación pueden inducir aún más la secreción y la agregación de βA , lo que sugiere que la estrategia ideal de prevención o tratamiento contra la EA debe apuntar a la agregación de βA , la neuroinflamación y el estrés oxidativo, al mismo tiempo (Mangialasche et al., 2010).

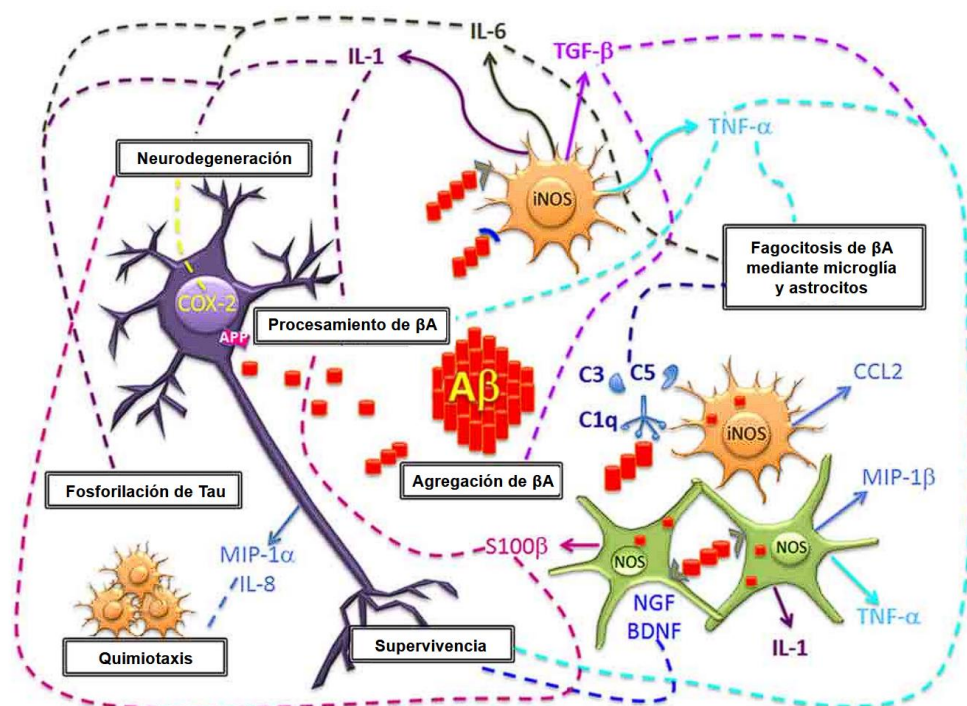


Figura 3. La activación de microglía y astrocitos se ve inducida por depósitos de la proteína βA , así como la generación de marcadores proinflamatorios. La producción aguda de moléculas del sistema complemento (C1q, C3 y C5), citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, TNF- α), quimiocinas (CCL2, MIP-1 α , MIP-1 β e IL-8) regulan la eliminación de la proteína βA . Sin embargo, la inflamación crónica podría promover una mayor expresión y alteración del procesamiento de APP, depósito de βA , fosforilación de Tau y neurodegeneración. Las células gliales generan óxido nítrico (NO) que promueve el estrés oxidativo. Este ambiente favorece la producción de COX-2 en las neuronas conduciendo a la apoptosis. Se ha propuesto que las células gliales podrían modular la supervivencia neuronal mediante la producción de TGF- β y factores neurotróficos (BDNF y NGF), la progresión de la enfermedad da como resultado una falla en la reparación de las neuronas. Abreviaciones: interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), factor de crecimiento transformante β (TGF- β), ciclooxygenasa-2 (COX-2), proteína inflamatoria de macrófagos 1 α (MIP-1 α) y proteína inflamatoria de macrófagos 1 β (MIP-1 β). Modificada de Meraz-Ríos et al., 2013.

1.2 Barrera hematoencefálica

La BHE está compuesta por un endotelio microvascular, astrocitos, membrana basal, pericitos y neuronas que se encuentran físicamente cerca del endotelio (Figura 4 a). Todos estos elementos forman parte de la unidad neurovascular funcional. En condiciones fisiológicas, la BHE garantiza un suministro constante de nutrientes (oxígeno, glucosa y otras sustancias) para las células cerebrales y guía a las células inflamatorias para que respondan a los cambios del entorno local. Las células gliales y las neuronas pueden regular la función de los vasos sanguíneos en respuesta a los requisitos metabólicos (Persidsky et al., 2006). Las rutas de transporte de fármacos a través de la BHE se producen a través de vías que incluyen la vía paracelular y transcelular, la transcitosis mediada por receptores, la transcitosis mediada por células, la transcitosis mediada por transportadores y la transcitosis mediada por adsorción (Figura 4 b) (Choudhari et al., 2021).

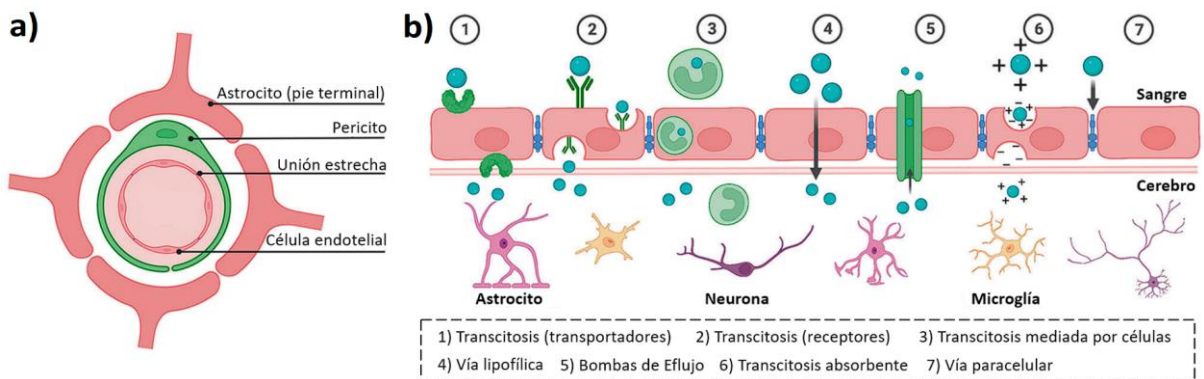


Figura 4. Barrera hematoencefálica a) estructura y composición y b) mecanismos para atravesar la BHE: 1. Transcitosis mediante transportadores, 2. Transcitosis mediante receptores, 3. Transcitosis mediada por células, 4. Vía lipofílica, 5. Bombas de Eflujo, 6. Transcitosis absorbente y 7. Vía paracelular, tomada y adaptada de Wu et al., 2023.

Las células endoteliales microvasculares cerebrales (BMVEC), situadas en la interfaz entre la sangre y el cerebro, realizan funciones biológicas esenciales, como la barrera, el transporte de micronutrientes y macronutrientes, la señalización mediada por receptores, el tráfico de leucocitos y la osmorregulación. Los sitios de contacto entre las células endoteliales se componen de: uniones estrechas, compuestas de proteínas como la ocludina, claudina, zonula occludens (ZO)-1, ZO-2, ZO-3, y cingulina; uniones adherentes (AJ) compuestas de caderinas, cateninas, vinculina y actinina; y moléculas de adhesión de unión (JAMs) (Figura 5) (Doolittle et al., 2005; Kurz et al., 2022).

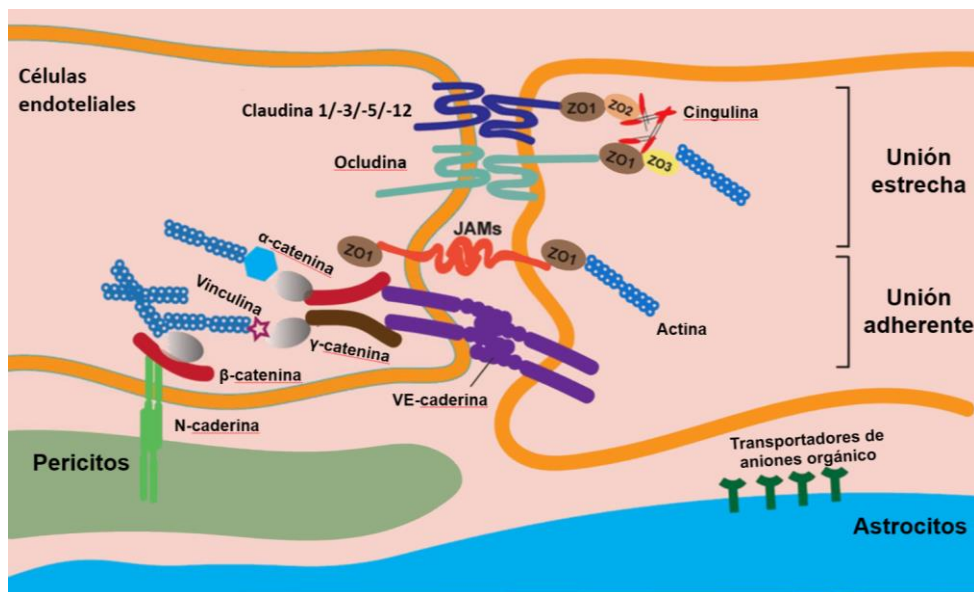


Figura 5. Las uniones estrechas están formadas por 3 proteínas integrales de membrana: claudina, ocludina y cingulina. Las uniones adherentes se componen del complejo de caderina, catenina y vinculina. Ambos tipos de unión se unen al citoesqueleto vía cingulina mediante ZO-1, ZO-2 y ZO-3. Tomada y modificada de Kadry et al., 2020.

Entre las uniones estrechas de las células endoteliales, existe una brecha de solo 4 a 6 nm (Yang et al., 2023). Aproximadamente un 98 % de los medicamentos de molécula pequeña y el 100 % de los medicamentos macromoleculares son “rechazados” por la BHE debido a esta razón (Wang et al., 2021). Por ello, el desarrollo de elementos diagnósticos y (o) terapéuticos que necesiten atravesar la BHE es uno de los grandes retos.

Dada la complejidad funcional y estructural de la barrera hematoencefálica, es necesario el uso de un modelo de BHE *in vivo*, para evaluar la permeabilidad de fármacos de forma eficaz y precisa. Estudios previos sobre el desarrollo y la maduración de la barrera hematoencefálica en peces cebra han demostrado que la BHE se desarrolla gradualmente a las 72 h de vida del embrión (Jeong et al., 2008). Es estructuralmente similar a vertebrados superiores, con proteínas de unión estrecha y sistemas de transporte activo. Estos estudios sugieren que el pez cebra podría utilizarse como organismo modelo experimental para el análisis de fármacos que penetren la barrera hematoencefálica (Xie et al., 2010; Zeng et al., 2017)

1.3 Tratamientos actuales para la enfermedad de Alzheimer

1.3.1 Inhibidores de acetilcolinesterasa

Hoy en día los únicos fármacos que demuestran una reducción en los síntomas de la enfermedad de Alzheimer son los inhibidores de acetilcolinesterasa (encargada de degradar el neurotransmisor acetilcolina), este tipo de fármaco actúa mejorando la función colinérgica de sinapsis neuronal (Da Silva et al., 2011). Algunos de estos fármacos aprobados para el tratamiento sintomático de la EA son la tacrina, rivastigmina, galantamina, carbalatina y donepezilo. También se encuentra la memantina un antagonista del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) que puede reducir la neurotoxicidad de los aminoácidos excitatorios en la escisión sináptica y reducir la apoptosis neuronal. Estos medicamentos presentan ciertas contraindicaciones entre ellos náuseas, vómitos, pérdida de apetito y aumento de la frecuencia de las deposiciones. (Alzheimer's Association, 2024; Peng et al., 2023) .

1.3.2 Inhibición de β -Secretasa (BACE1)

Los inhibidores de secretasas actúan bloqueando la enzima encargada de escindir la APP, evitando la formación de los péptidos β A y su posterior agregación. Estos inhibidores pueden ayudar a reducir la progresión de Alzheimer, siendo el objetivo principal en la búsqueda de un tratamiento para combatir la enfermedad de Alzheimer (Yan & Vassar, 2014). Al inhibir completamente la proteína BACE1, se observó que BACE2 no producía péptidos β A, siendo BACE1 la secretasa responsable de la generación esta proteína y posteriormente de las placas amiloides, haciendo viable la inhibición de esta enzima (Fluhrer et al., 2002; Portelius et al., 2011). Algunos inhibidores que se han probado para reducir los niveles de β A, son: LY2886721[®], Verubecestat[®], Lanabecestat[®] y Elenbecestat[®].

Entre los efectos adversos que presentan este tipo de inhibidores destacan: daño en la plasticidad sináptica y memoria, cambios relacionados a la ansiedad, neurodegeneración, hipopigmentación del pelaje, aumento de la masa de células b pancreáticas, disminución de la glucosa en sangre y hepatotoxicidad en animales o humanos, náuseas, mareo, dolor de cabeza, herpes labial, pesadillas,

erupciones cutáneas, pérdida de peso y eventos adversos neuropsiquiátricos, sin presentar una mejora cognitiva (Cebers et al., 2016; Harrison et al., 2003; Hsiao et al., 2019; Kennedy et al., 2016; May et al., 2015; Wessels et al., 2020; Yan & Vassar, 2014). No obstante, es posible que estos efectos se presenten debido a la administración de dosis inadecuadas (Wessels et al., 2020), se ha demostrado que la proteína β A tiene funciones fisiológicas positivas relacionadas con la plasticidad sináptica y la memoria, los monómeros de β A tienen una función protectora para neuronas en desarrollo y maduras, por lo cual la producción de esta proteína no puede ser totalmente inhibida (Giuffrida et al., 2009; Puzzo et al., 2008).

Recientemente la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) ha impulsado la aprobación de fármacos para la EA, entre ellos se encuentra aducanumab el cual fue discontinuado debido a efectos secundarios, y lecanemab. Actualmente este último es el único fármaco aprobado para tratar la EA, lecanemab se une a las protofibrillas solubles de β A, reduciendo los niveles de la proteína, como resultado se obtuvo una mejoría del deterioro cognitivo en un 27 % en comparación con el grupo placebo (Knopman, 2023). A pesar de este gran avance en la terapia basada en la reducción de la proteína β A, aún quedan muchos aspectos de la enfermedad que no se consiguen entender completamente, por lo que se sugiere que el uso de modelos con alto valor translacional, la terapia combinada y personalizada, es la dirección a seguir para formular la terapia adecuada para esta enfermedad (Zhang et al., 2023).

1.4 Compuestos antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias que reducen el daño provocado por las ROS y pueden retrasar o prevenir la aparición de reacciones antioxidantes de los radicales libres. Los antioxidantes se pueden clasificar en: carotenoides, enzimas, tripéptidos, hormonas, sustancias químicas asociadas a lípidos, minerales, compuestos fenólicos, saponinas, esteroides y vitaminas. Estos antioxidantes son capaces de contrarrestar los efectos dañinos de la oxidación. Los antioxidantes son las sustancias que inhiben el proceso de oxidación de otras moléculas, suprimen la reacción oxidativa al eliminar los intermediarios de radicales libres (Singh et al., 2017).

1.4.1 Puntos de carbono en la enfermedad de Alzheimer

El carbono, un elemento presente en todas las formas de vida orgánica, desempeña un papel crucial en los avances recientes en el campo de los nanomateriales. Desde el grafito tridimensional y el grafeno bidimensional hasta el óxido de grafeno y los nanotubos de carbono unidimensionales, los materiales basados en carbono siguen generando gran entusiasmo en la comunidad científica debido a sus propiedades excepcionales y su amplio potencial en diversas aplicaciones. La investigación en áreas como la química, la ingeniería y la ciencia biomédica se ha centrado en el desarrollo y la aplicación de nuevos nanomateriales funcionales (Peng et al., 2017).

En 2004, mediante la purificación de nanotubos de carbono de pared simple (SWCNT por sus siglas en inglés) a partir del hollín, se aislaron dos nuevas clases de nanomateriales por electroforesis: carbono tubular corto y una mezcla de nanopartículas fluorescentes derivadas de los SWCNT, con un tamaño promedio de 18 nm (Xu et al., 2004). Los puntos de carbono (CD) han atraído considerable atención debido a su fotoluminiscencia (PL), alto rendimiento cuántico (QY), baja toxicidad, tamaño reducido, buena biocompatibilidad y bajo costo, lo que les confiere aplicaciones significativas en áreas como la catálisis, los dispositivos optoelectrónicos, la lucha contra la falsificación, y la biomedicina, incluidos los sistemas de liberación de fármacos (Liu et al., 2020; Magesh et al., 2022; Maiti et al., 2019)

Se ha encontrado que los puntos de carbono inhiben la fibrilación de los péptidos β A40 y β A42 (Figura 6 a), mediante el ensayo de fluorescencia Tioflavina T (ThT); a partir de los resultados de dicroísmo circular se determinó un retraso en la formación de las fibrillas, al observar el cambio de la estructura de la proteína. También se descubrió que los CD eran eficaces para inhibir la actividad de BACE1 (Figura 6 b) y retrasar la formación de especies tóxicas de β A 42 *in vitro*. Además, estos CD se funcionalizaron con transferrina (Tf) y se evaluaron en un modelo de *Danio rerio*, logrando atravesar la BHE y observando mediante microscopia de fluorescencia confocal (Figura 6 c); resaltando un excelente potencial efecto terapéutico para el tratamiento de la EA (Han et al., 2017).

Por otro lado, los CD sintetizados a partir del método de ablación láser han demostrado tener un efecto en la enfermedad de Alzheimer al retrasar la fibrilación de los péptidos β A, a través de los análisis de fluorescencia ThT y microscopia electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés).

Los experimentos de viabilidad celular revelaron que la presencia de los CD podría reducir en gran medida la citotoxicidad de β A42. Además, también se observó la disminución de los depósitos de β A42 y el aumento de la actividad biológica en un modelo EA de *Caenorhabditis elegans* (CL2006) (H. Li et al., 2022).

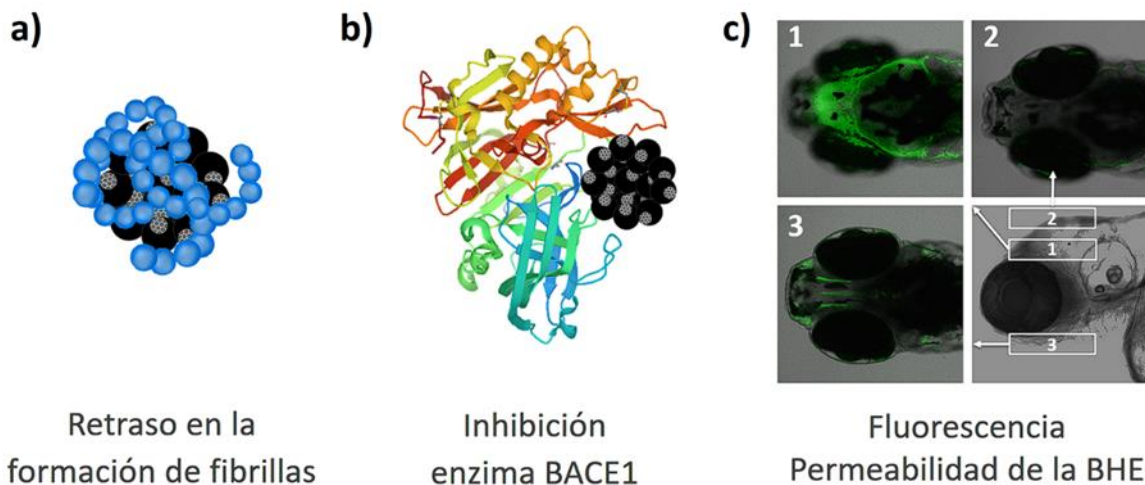


Figura 6. Efecto de los puntos de carbono en la enfermedad de Alzheimer: a) retraso en la formación de las fibrillas de β A40 y β A42, b) los puntos de carbono son capaces de inhibir la enzima BACE1 y c) la fluorescencia de los CD conjugados con transferrina permite constatar la presencia de estos en el cerebro del pez (Han et al., 2017).

Se ha demostrado que los CD catalizan la oxidación de un sustrato de peroxidasa (TMB) en presencia de H_2O_2 produciendo un color azul. Estos CD se utilizaron con éxito para la detección de glucosa y peróxido de hidrógeno en función de la reacción de TMB (Shi et al., 2011), a partir de este trabajo, los CD con actividad catalítica han ganado considerable interés. Una de las propiedades que se ha reconocido de los CD es su actividad antioxidante, como eliminador de radicales libres (Innocenzi & Stagi, 2023). Además, los CD exhiben una excelente actividad depuradora contra los radicales libres *in vitro*: OH (86.8%), O_2^- (89.8%) y ABTS (75.8%). Así mismo, disminuyen los niveles de citocinas proinflamatorias: TNF- α , IL1 β e IL-6. Este estudio muestra que los CD inhiben eficazmente el daño por estrés oxidativo a través de una actividad similar a la de una enzima para la terapia antiinflamatoria (Dong et al., 2022). Los CD sintetizados través de la oxidación de carbón activado, presentaron los grupos funcionales: carboxilo, hidroxilo y carbonilo; los cuales le conferían una actividad antioxidante similar a la enzima SOD (Gao et al., 2023). Otra propiedad de los CD que se

ha reconocido recientemente es su actividad antioxidante, es decir, la capacidad de actuar como eliminador de radicales libres.

Además, los CD se han propuesto como agentes nanotransportadores de medicamentos contra enfermedades neurodegenerativas o tumores cerebrales, debido a que, por su tamaño y capacidad de funcionalizarse con transferrina, cruzan fácilmente la BHE, no producen nanotoxicidad y pueden liberar medicamentos en su sitio de acción (Ashrafizadeh et al., 2020).

1.4.2 El carotenoide marino: fucoxantina

Como se mencionó anteriormente, los compuestos antioxidantes están presentes en distintas fuentes naturales. En este campo las algas han comenzado a ganar interés gracias a los compuestos que contienen y la gran disponibilidad para obtenerlas, las microalgas pardas como: *Undaria*, *Laminaria*, *Eisenia*, *Sargassum*, *Dictyota*, *Fucus* y *Myagropsis*; y las microalgas: *Phaeodactylum*, *Cylindrotheca*, *Isochrysis*, *Cyclotella sp.*, *Nitzschia sp.*, *Prymnesium*, *Chaetoceros*, *Odontella*, contienen un compuesto antioxidante llamado fucoxantina (Fx) (Oliyaei et al., 2023).

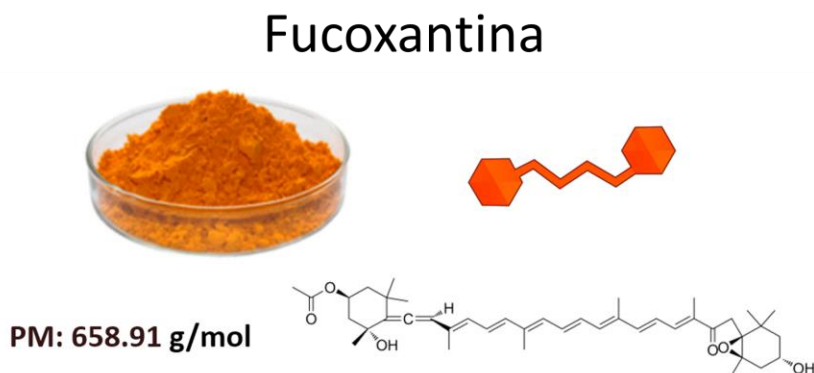


Figura 7. La fucoxantina es un carotenoide obtenido de las algas pardas, el cual es de color naranja con un PM: 658.91 g/mol, su estructura química presenta un enlace aleno (C=C=C) característico de este carotenoide. Abreviaciones: Peso molecular (PM).

La Fx tiene un peso molecular de 658.91 g/mol, posee un enlace alénico, un grupo 5,6-monoepóxido y grupos carbonilo conjugados en la cadena de polienos (Oliyaei et al., 2023). Es un carotenoide de color naranja presente en algas pardas y puede considerarse el carotenoide marino más abundante

(Figura 7); usado como suplemento alimenticio y como pigmento en la industria cosmética (Lourenço-Lopes et al., 2021). La Fx tiene gran potencial farmacéutico puesto que presenta distintos tipos de actividades como: anti-oxidante, anti-tumor, anti-obesidad, anti-diabética, antialérgica, anti-hipertensiva, pro-apoptótica, anti-inflamatoria, elimina de radicales, hepato y neuro-protectora (Jung et al., 2016; Leong et al., 2022).

La Fx inhibe la actividad del NF- κ B y la fosforilación de MAPK en macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS, NF- κ B es un factor de transcripción de mamíferos que controla varios genes, incluidos iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β e IL-6, los cuales son relevantes para la inmunidad y la inflamación (Figura 8), estos genes han sido regulados al añadir Fx en macrófagos RAW264.7 estimulados mediante LPS (Kim et al., 2010). Se ha evaluado el efecto de la Fx extraída del alga *Phaeodactylum tricornutum* en diferentes tipos de células (macrófagos derivados de la médula ósea, células dendríticas y astrocitos) con inflamación inducida por LPS/ATP. Se encontró que el nivel de citocinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF- α se redujeron en presencia de 40 μ g de Fx, además, se redujo la expresión de genes de respuesta inflamatoria y citocinas (Lee et al., 2021). Mediante el análisis de acoplamiento molecular utilizando herramientas computacionales y la evaluación de IC₅₀ (la mitad de la concentración inhibitoria máxima) se ha logrado inhibir la enzima BACE1 con Fx (Jung et al., 2016).

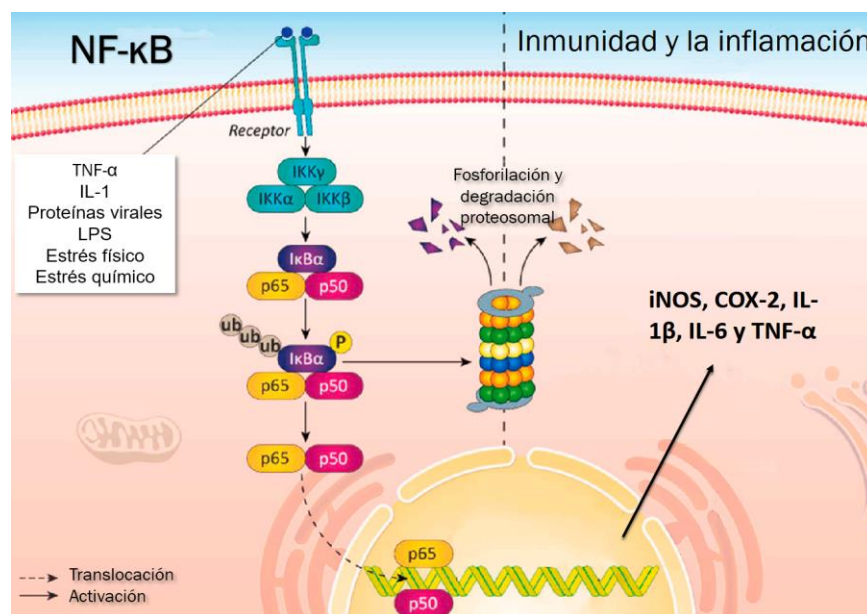


Figura 8. Ruta del factor nuclear κ B (NF- κ B) para la expresión de marcadores pro inflamatorios, la respuesta inflamatoria se ve inducida por una variedad de compuestos o estímulos fisicoquímicos, dando como resultado la secreción de marcadores pro inflamatorios. Adaptada de Mirzaei et al., 2021.

Se ha demostrado que la Fx produce efectos neuroprotectores en la enfermedad de Alzheimer al prevenir la agregación de β A, inhibir el estrés oxidativo y reducir la neuroinflamación (Chen et al., 2023; Cho et al., 2018).

La Fx se degrada rápidamente durante la digestión intestinal y el flujo intestinal reduce aún más su biodisponibilidad, además, la permeabilidad de la BHE de la Fx no es ideal, lo que lleva a que el su efecto en el cerebro sea limitado (Chen et al., 2023).

1.5 Transferrina

Debido a la BHE, la entrega de fármacos en cerebro sigue siendo uno de los mayores retos para tener un tratamiento efectivo, a pesar del desarrollo de numerosos compuestos farmacológicos y nanomedicina diseñadas para este propósito. Una de las estrategias ampliamente utilizadas en la literatura es el uso del transporte mediante receptores, en este caso, basados en la acumulación de los agentes terapéuticos en el cerebro mediante el uso del receptor de transferrina.

El receptor de transferrina es responsable del transporte de hierro al parénquima cerebral para mantener la homeostasis del hierro, que es de gran importancia para el metabolismo, la conductividad neuronal y por lo tanto, la función cerebral adecuada (Leitner & Connor, 2012). Así mismo, el receptor de transferrina tiene una alta expresión en células endoteliales del cerebro, eritrocitos y en varios tipos de células tumorales; mientras que la expresión en otras células es baja, lo cual lo hace un receptor muy importante y único para la entrega de fármacos en el cerebro (Mo et al., 2019).

1.6 Sistema de entrega de fármacos

Como se mencionó anteriormente, la actividad de los CD en la enfermedad de Alzheimer es bastante prometedora; sin embargo, la conjugación con moléculas diana, como la transferrina, reduce su actividad debido a la modificación de los grupos funcionales en la superficie (Han et al., 2017). Es fundamental que los CD se administren sin modificar su superficie para aprovechar su potencial

terapéutico en la EA. Por otro lado, la Fx presenta baja solubilidad y limitada permeabilidad a la BHE (Chen et al., 2023; Yang et al., 2021), lo que hace necesario desarrollar sistemas de entrega de fármacos, particularmente dirigidos a superar la BHE.

Dentro de las estrategias que se han utilizado para mejorar el transporte de fármacos al parénquima cerebral, se incluyen: la modificación química de fármacos, la apertura química u osmótica de las uniones estrechas, la interrupción física de la BHE y el uso de portadores/transportadores específicos. Las NP modulan la biodistribución, prolongan la circulación sanguínea, disminuyen la toxicidad y mejoran el perfil de seguridad de los fármacos (Kumar et al., 2017). Además, es posible modular el tamaño, potencial zeta, polidispersidad, composición y realizar modificaciones de la superficie, lo cual puede aprovecharse para modificar las NPs con un receptor específico como la Tf, de esta forma se disminuye la interacción no específica del fármaco/transportador en el cuerpo y se asegura la captación específica en el cerebro (Sethi et al., 2022).

Anteriormente, se ha estudiado el uso NPs híbridas polímero-lípido para la encapsulación de compuestos con actividad antioxidante. Este sistema se conforma de tres componentes funcionales distintos: un núcleo polimérico hidrofóbico de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) que encapsula fármacos poco solubles en agua con altos rendimientos de carga; una capa lipídica de lecitina de soya (HSPC) que rodea el núcleo para proporcionar una cubierta altamente biocompatible y promover la retención del fármaco dentro del núcleo polimérico; y una capa de polietilenglicol (Col-PEG), este polímero hidrofílico fuera de la cubierta lipídica mejora la estabilidad de las NPs y la vida útil de la circulación sistémica (Chan et al., 2009; Fang et al., 2010). Debido a los grupos carboxilo presentes en la capa externa de las NPs, es posible conjugar la molécula de Tf y formar un sistema para la entrega de fármacos a través de la BHE utilizando la transcitosis mediada por receptores.

Se ha encapsulado Fx en NPs de PLGA-PEG, se sugiere que la adición de PEG incrementa la penetración de la BHE y podrían inducir la liberación sostenida de fucoxantina cargada en la solución, lo que podría disminuir en gran medida la degradación o el metabolismo y, por lo tanto, mejorar la concentración y/o biodisponibilidad de Fx *in vitro* (Yang et al., 2021). Sin embargo, no se ha demostrado la permeabilidad de este tipo de NPs para atravesar la BHE en un sistema *in vivo*, a la fecha no hay algún estudio que profundice en los sistemas de liberación híbridos polímero-lípido

para el caso de la Fx, por esta razón es importante continuar la investigación en este tema (Oliyaei et al., 2023).

Por lo tanto, en este trabajo se propone un sistema de entrega de fármacos basado en NPs de PLGA-Col-PEG-2000-HSPC conjugadas con Tf, el cual presenta características químicas adecuadas para conservar las propiedades de los CDs y de la Fx. Este sistema permite encapsular los compuestos en el núcleo de PLGA, mientras que el recubrimiento con Col-PEG-2000 puede aumentar la circulación y biodisponibilidad. Además, los CD pueden utilizarse de forma teranóstica debido a su fotoluminiscencia y actividad en la EA, junto con el encapsulamiento de la Fx, un carotenoide antioxidante con capacidad antiinflamatoria. Hasta la fecha de este escrito el efecto combinado antiinflamatorio de Fx y CD aún no ha sido investigado.

1.7 Justificación

En la actualidad, no existe cura o tratamiento para prevenir la enfermedad de Alzheimer, es la principal causa de demencia y afecta a más de 55 millones de personas en todo el mundo, causando estragos a nivel personal, económico, social y profesional, esta enfermedad se caracteriza por disminuir la calidad de vida de los pacientes hasta necesitar de ayuda las 24 horas del día. Los tratamientos actuales se enfrentan a una gran variedad de retos, dentro de los cuales se encuentran el cruce de la BHE, la baja biodisponibilidad del fármaco y generalmente no obtienen el efecto esperado, generando que los resultados de un tratamiento en contra de la enfermedad presenten más efectos adversos que una mejoría de los síntomas.

Los avances recientes en el tratamiento de la EA incluyen la aprobación de Lecanemab, un anticuerpo monoclonal que se dirige a los agregados de proteína A β , lo que ralentiza la progresión de la EA. Sin embargo, muchos aspectos de la enfermedad siguen sin comprenderse por completo. Varias hipótesis sobre la patogénesis de la EA proponen que una estrategia ideal para la prevención o el tratamiento debería dirigirse simultáneamente a la agregación de A β , la neuroinflamación y el estrés oxidativo. En este contexto, se han sugerido numerosos enfoques, dentro de ellos los compuestos de algas marinas se muestran prometedores debido a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias para tratar las enfermedades neurodegenerativas, protegiendo al cerebro de la

neuroinflamación, el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial. La investigación presentada aquí tiene como objetivo investigar más a fondo los efectos antiinflamatorios de la Fx, un carotenoide marino con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y neuroprotectoras, que inhibe la activación de NF- κ B. Incorporando CD en las NPs podremos inhibir la fibrilación y toxicidad de A β , y rastrear la permeabilidad de las nanopartículas a través de la BHE en un modelo de pez cebra (*Danio rerio*) debido a sus propiedades fluorescentes.

1.8 Hipótesis

Las nanopartículas híbridas cargadas con puntos cuánticos de carbono (CD) y fucoxantina, tendrán un efecto antiinflamatorio en astrocitos de rata.

1.9 Objetivos

1.9.1 Objetivo general

Estudiar el efecto antiinflamatorio de puntos de carbono y fucoxantina, provenientes de nanopartículas híbridas en astrocitos de rata.

1.9.2 Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas híbridas cargadas con puntos de carbono y fucoxantina, para evaluar su efecto antiinflamatorio en astrocitos de rata.
- Determinar la respuesta antiinflamatoria de los puntos de carbono y fucoxantina, en astrocitos de rata.
- Constatar que las nanopartículas híbridas conjugadas con transferrina, atraviesan la barrera hematoencefálica en un modelo de *Danio rerio* (pez cebra).

Capítulo 2. Metodología

La metodología para la síntesis y caracterización de las NPs se observa en la Figura 9, la síntesis de puntos de carbono se llevó a cabo mediante termólisis del ácido cítrico, los cuales se mezclaron con fucoxantina y se añadieron a la solución de PLGA, se conjugó el PEG con transferrina y se agregó a la solución de lecitina de soja, para después mezclar ambas soluciones lentamente. Se caracterizó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), dispersión dinámica de luz (DLS), espectroscopia de fluorescencia (PL), espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se evaluó la eficiencia de encapsulación de los puntos cuánticos y de la fucoxantina en las NPs. Así como la expresión de genes relacionados a marcadores proinflamatorios en astrocitos de rata, los cuales se estimularon con LPS para tener un modelo de la enfermedad de Alzheimer. Finalmente, la funcionalización de las NPs con transferrina permitió observar fluorescencia proveniente de los CD en el cerebro del pez cebra (*Danio rerio*).

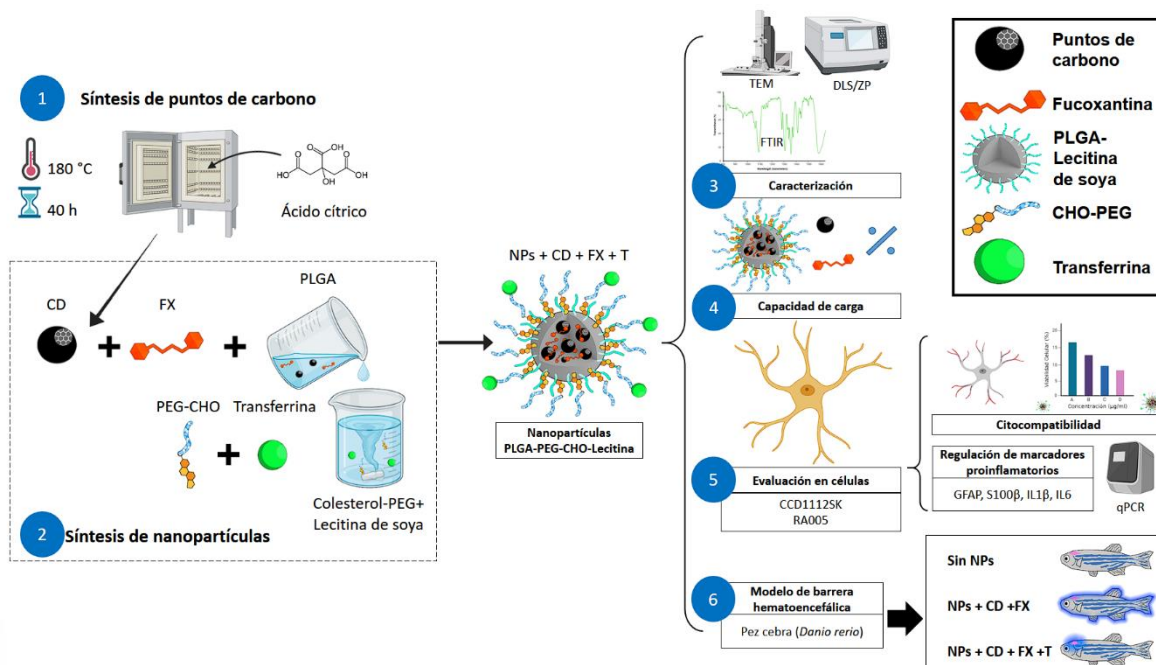


Figura 9. Esquema de la metodología general de este trabajo. 1) Síntesis de CD a partir de ácido cítrico, 2) conjugación de PEG-CHO con holo-transferrina y síntesis de NPs, 3) caracterización de las NPs mediante TEM, DLS, FTIR y PL, 4) determinación de la capacidad de carga, 5) evaluación en células, citocompatibilidad en CCD112SK y expresión de marcadores pro inflamatorios en RA005 (astrocitos de rata), 6) evaluación de las NPs en el modelo de BHE animal *Danio rerio*.

2.1 Materiales

Se utilizaron los siguientes reactivos para la reacción de conjugación de la transferrina: CHO-PEG2000-COOH (Col-PEG-COOH) (Nanosoft Polymers, EUA; 3042-2000), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropilo) carbodiimida (EDC) (Sigma-Aldrich, EUA; E7750), N-hidroxisuccinimida (NHS) (Sigma-Aldrich, EUA; 130672), holo-transferrina (TF) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos de America (EUA); T0665), filtros Microsep™ Advance (Cytiva/Pall Life Sciences, EUA; MCP010C46). Para la síntesis de las NPs se utilizaron los siguientes reactivos: ácido cítrico monohidratado (C1909, Sigma Aldrich), fucoxantina (HY-N2302, MedChemExpress), hidróxido de sodio (NaOH, Fermont, 36902), ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA, Nanosoft Polymers, EUA;11088-20-50K), lecitina de soya (HSPC) (Nanosoft Polymers, EUA; 26372), Tampón fosfato salino 1X (PBS, por sus siglas en inglés). TRIzol® (Sigma-Aldrich, EUA; 93289) para la extracción de ARN y tricaína (HY-W011777, MedChemExpress) para anestesiar los peces.

2.2 Conjugación de colesterol PEG-COOH y transferrina

Se llevó a cabo la conjugación del Col-PEG y la Tf mediante el método acoplamiento de carbodiimida. Se agregó EDC y NHS a la solución de Col-PEG-COOH para activar los grupos carboxilo y formar un éster NHS, el cual reacciona con la amina primaria de la Tf, dando lugar al compuesto conjugado mediante la formación de un enlace amida, en una reacción química click (Liu et al., 2015; Ramalho et al., 2023; Vargas-Barona et al., 2024).

Se añaden las soluciones de EDC (100mM, 100 μ L) y NHS (100 mM, 200 μ L) a la solución de Col-PEG-COOH (1mM, 600 μ L) para sonicar durante 10 min. Después se agregó transferrina (2 mg/mL, 600 μ L) a la solución anterior y se dejó en agitación de 200 rpm por 24 h a una temperatura de 22 °C. Pasado este tiempo, se utilizaron filtros Microsep™ Advance con un tope de peso molecular (MWCO, por sus siglas en inglés) de 10 kDa, para realizar lavados mediante centrifugación (9000 rpm por 12 minutos), con la finalidad de concentrar la solución, retirar el exceso de agua y eliminar las moléculas libres. La solución resultante se resuspendió en agua y se almacenó durante 24 h a -80 °C, finalmente se liofilizó durante otras 24 h, a una presión de vacío de 0.011 mbar y -56 °C, en un liofilizador FreeZone 1 (Labconco, EUA). Para confirmar la conjugación se analizó el compuesto conjugado Col-PEG-Tf, mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés), en el espectrofotómetro Cary 630 (Agilent Technologies, EUA) en modo de reflectancia total

atenuada (ATR, por sus siglas en inglés) con un rango espectral de 4000 a 500 cm^{-1} , una resolución de 2 cm^{-1} y 16 escaneos (Figura 10).

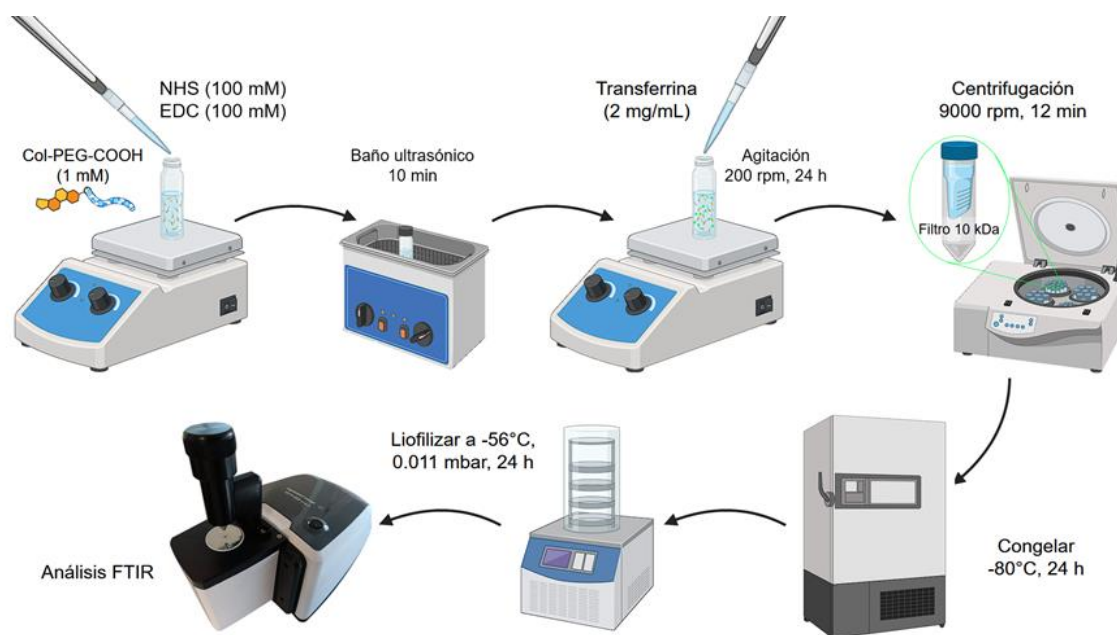


Figura 10. Metodología para la conjugación de Col-PEG-COOH con transferrina. Se agregan NHS y EDC a 100mM a la solución de Col-PEG-COOH a 1mM . Se homogeneiza la mezcla por baño ultrasónico durante 10 min , después se agrega la solución de Tf (2mg/mL) mientras se encuentra en agitación (200 rpm) durante 24 h . El conjugado se recupera mediante centrifugación, para después congelar a -80 °C (24 h), liofilizar (24 h) y analizar el polvo resultante mediante espectroscopia FTIR. Creado en: BioRender.com.

2.3 Síntesis de puntos de carbono mediante termólisis de ácido cítrico

La síntesis de los CD se llevó a cabo mediante la termólisis de ácido cítrico monohidratado. Se distribuyeron 25 g de ácido cítrico en un recipiente de vidrio, y se colocó en el horno Lindberg/Blue M (Thermo Fisher Scientific) a 180 °C durante 40 h , en presencia de aire atmosférico (Amato et al., 2021). El producto obtenido se caracteriza por tener un color café-naranja, después de enfriarse se pulverizó al mortero para conseguir un polvo naranja (Guo et al., 2014). Se obtuvo una solución de $\text{pH } 4$ al mezclar 3 g de CD con 6.6 mL de agua desionizada, para neutralizar la solución se utilizaron 5 mL de $\text{NaOH } 5\text{ M}$, la reacción se realizó a 50 °C en baño María, con agitación constante a 700 rpm durante 40 min , este proceso modula el tamaño de los CD (Martindale et al., 2015). La solución de CD neutralizados se congeló a -80 °C por 24 h y luego se liofilizó durante 31 h (Guzmán Uribe, 2022). Finalmente se corroboró la fotoluminiscencia en un espectrofotómetro de fluorescencia (Figura 11).

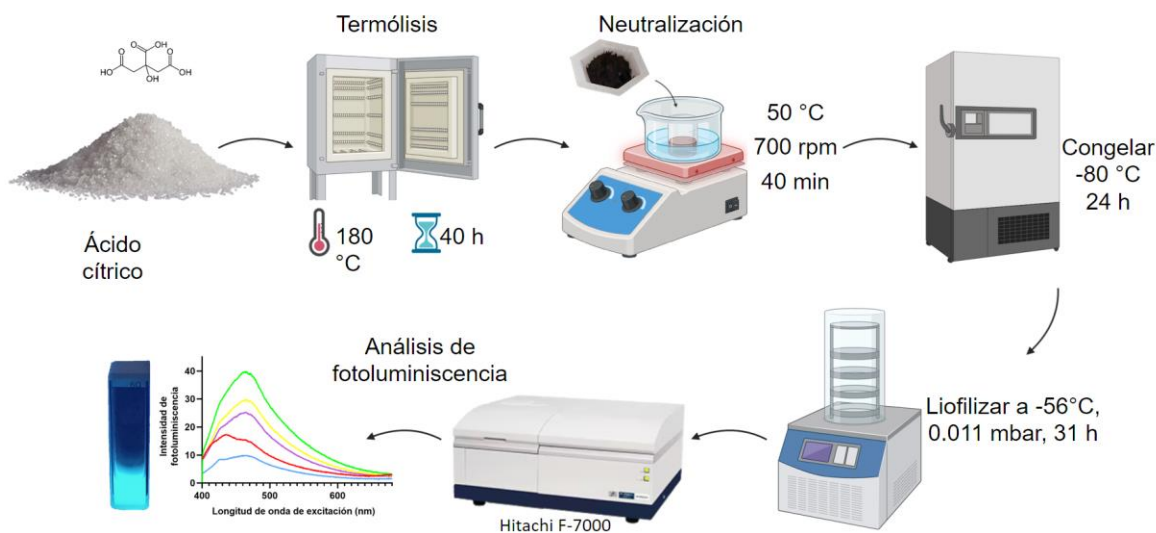


Figura 11. Metodología para la síntesis de puntos de carbono mediante la termólisis de ácido cítrico a $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 40 h , se neutralizaron los CD con NaOH 5 M durante 40 min , 700 rpm a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ en baño maría, para después congelar a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (24 h), liofilizar (31 h) y finalmente analizar mediante espectroscopia de fotoluminiscencia. Creado en: BioRender.com.

2.4 Síntesis de nanopartículas híbridas PLGA

Las NPs híbridas polímero lípido de PLGA-HSPC-Col-PEG-Tf (NPs) se sintetizaron a partir de una metodología de nanoprecipitación y autoensamblaje modificada (Ahmaditabar et al., 2017; Fang et al., 2010). Las soluciones stock se describen a continuación: PLGA disuelto en acetonitrilo a una concentración de 2.5 mg/mL , HSPC a 1 mg/mL y Col-PEG-Tf 1 mg/mL disueltos en una solución de EtOH al 4%, CD 5 mg/mL y Fx 1 mg/mL disueltos en PBS.

Para formar la solución orgánica se agregan $20\text{ }\mu\text{L}$ de la solución de CD y $2\text{ }\mu\text{L}$ de Fx a la solución de $400\text{ }\mu\text{L}$ de PLGA (solas o combinadas). La fase acuosa se compone de $12.5\text{ }\mu\text{L}$ de HSPC y $200\text{ }\mu\text{L}$ de Col-PEG-Tf añadidos a $1500\text{ }\mu\text{L}$ de EtOH al 4% en un vial ámbar con tapa, mientras se encontraba en agitación y calentamiento a 200 rpm y $65\text{ }^{\circ}\text{C}$, para asegurar el estado líquido de los lípidos. La solución orgánica se agregó a la solución acuosa lipídica a modo de goteo lento (1 mL/min) bajo agitación a 200 rpm . Posteriormente se agregaron $2400\text{ }\mu\text{L}$ de agua MiliQ, para después sonicar durante 5 min en un baño ultrasónico serie MH 2800 (Branson Ultrasonics, EUA).

Finalmente, se realizaron lavados para eliminar las moléculas libres y concentrar la solución, utilizando filtros Microsep™ Advance de 10 kDa y centrifugación a 12000 xg durante 3, 6, 12 y 18 min. Se resuspendió la solución resultante en 1 ml de PBS y se congela por 24 horas a -80 °C, antes de llevar a liofilizar durante 24 horas (Figura 12). En caso de resaltar que se utilizaron NPs frescas, estas no pasan por el proceso de congelación ni liofilización.

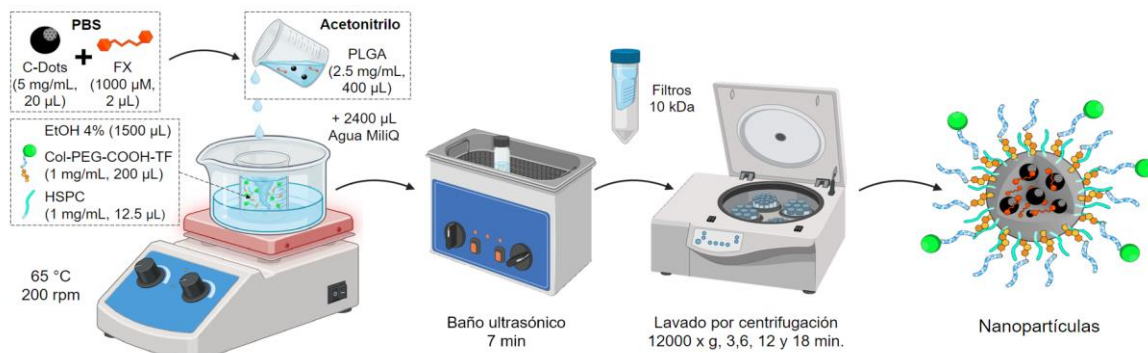


Figura 12. Metodología para la síntesis de NPs híbridas polímero-lípido. La preparación de las soluciones se lleva a cabo previo a la síntesis de las NPs. El PLGA se disolvió en acetonitrilo, los lípidos en etanol al 4% y los compuestos bioactivos en PBS. La fase orgánica con los compuestos bioactivos se agrega en forma de goteo lento a la solución acuosa, se agrega agua MilliQ y se sónica durante 7 min, se realizan los lavados por centrifugación y se obtienen las NPs. Creado en: BioRender.com.

2.5 Caracterización morfológica y química de las nanopartículas

2.5.1 Dispersión dinámica de luz (DLS)

Se estudió el diámetro hidrodinámico, índice de polidispersidad (PDI, por sus siglas en inglés) y potencial Zeta (ζ) de las NPs mediante el método de DLS utilizando un Zetasizer Nano-Zs (Malvern Instruments, Reino Unido). Para obtener el diámetro hidrodinámico y PDI se utilizaron NPs frescas a una concentración de 100 µg/mL, considerando un índice de refracción de 0.142, PBS como dispersante y una temperatura de 25 °C. Se realizaron 3 mediciones, cada una con 10 corridas de 10 segundos. Para el análisis de potencial zeta se utilizó una celda DTS1070, se realizaron 3 mediciones, cada una con 100 corridas.

2.5.2 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier

Para analizar la composición química y determinar los grupos funcionales de los materiales sintetizados, se utilizó un espectrofotómetro Cary 630 (Agilent Technologies, EUA) en modo de ATR con un rango espectral de 4000 a 500 cm^{-1} , una resolución de 2 cm^{-1} y 16 escaneos. Se analizaron las NPs liofilizadas, los precursores en polvo (HSPC, Col-PEG, Tf, Col-PEG-Tf, PLGA y CD) y la Fx en líquido.

2.5.3 Morfología de las NPs mediante Microscopia electrónica de transmisión (TEM)

Se prepararon las NPs depositando 10 μL de la solución a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sobre una rejilla de cobre con tamaño de malla 400 y membrana de Formvar/carbono durante 1 min, después de la incubación se absorbió el excedente con papel filtro para posteriormente realizar una tinción negativa con una solución de acetato de uranilo al 2%, colocando 10 μL e incubando durante 1 min. Pasado este tiempo, se eliminó el exceso de con un papel filtro y se secó al aire a 25 °C durante 2 h.

El análisis se realizó en un microscopio electrónico de transmisión Hitachi H-7500 (Hitachi, Ltd., Japón) a un voltaje de aceleración de 80 kV. Se obtuvo un grupo representativo de micrografías de las de NPs, se midió un grupo representativo de NPs seleccionadas al azar para determinar el tamaño promedio de la muestra con el software ImageJ (National Institutes of Health & Laboratory for Optical and Computational Instrumentation, EUA).

2.5.4 Fotoluminiscencia de los CD y nanopartículas híbridas

Para determinar la fotoluminiscencia de los CD y de las NPs, se utilizó un espectrofotómetro de fluorescencia Hitachi F-7000 modelo 5J1-0003. Las NPs se prepararon a una concentración de 1 mg/mL en agua Mili-Q, mientras que los CD se prepararon a 5 mg/mL y se sonicaron por 30 min antes de medir sus espectros de excitación y emisión. Los espectros de excitación se obtuvieron en un rango de 280-500 nm con longitudes de onda de emisión de 400, 450, 500, 550 y 600 nm. Los

espectros de emisión se midieron en un rango de 350-700 nm con longitudes de onda de excitación de 330, 350, 380, 400 y 450 nm.

2.6 Encapsulamiento de fucoxantina y CD en las nanopartículas híbridas

2.6.1 Fucoxantina

Se determinó la cantidad de Fx cargada en las NPs híbridas, mediante el uso de una curva estándar de calibración la cual se realizó de 1 a 10 μM de Fx libre, obtenida a partir de la lectura de la densidad óptica (D.O.) a 450 nm en un lector de placas Epoch (BioTek, EUA) (Yang et al., 2021). Para obtener la Fx a partir de las NPs, se agregaron 800 μl de metanol al 95% por gramo de NPs liofilizadas con la finalidad de romper las NPs y liberar el compuesto, se dejó incubar durante 1 h en la oscuridad. Pasado el tiempo se centrifugó la solución a 12000 xg durante 1 min, para colocar un triplicado de 200 μl en una placa de 96 pozos y llevar a medir la absorbancia.

2.6.2 Puntos de carbono

Al igual que la fucoxantina, se realizó una curva de calibración de 10 a 100 μg , mediante la medición de la fotoluminiscencia de los CD en el espectrofotómetro de fluorescencia. Se recolectaron los 600 μL utilizados para medir la concentración de la fucoxantina, la muestra se protegió de la luz y se midió la concentración de CD en el espectrofotómetro de fotoluminiscencia a una longitud de onda de excitación de 370 nm.

Para ambos casos, la concentración de los compuestos se obtuvo de acuerdo con la fórmula:

$$D.O._{encapsulado} = D.O._{muestra} - D.O._{control} \quad (1)$$

donde $D.O._{encapsulado}$ corresponde a la lectura de la muestra ($D.O._{muestra}$) menos la lectura proveniente del metanol usado como muestra control ($D.O._{control}$).

2.7 Cultivo celular

2.7.1 Pruebas preliminares con CCD1112Sk y estimulación con LPS

Para evaluar los distintos tratamientos, se emplearon fibroblastos dérmicos de prepucio de neonato humano, CCD-1112Sk (American Type Culture Collection, EUA; CRL-2429), las cuales crecieron con el medio de mantenimiento Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de antibiótico-antimicótico (AA) en incubación con atmosfera húmeda, 5% de CO₂ a 37 °C. Además, se implementó un modelo de inflamación *in vitro* agregando lipopolisacárido (LPS) al cultivo celular para tener una inducción genes proinflamatorios y de esta forma hacer un acercamiento a las condiciones que genera la enfermedad de Alzheimer.

2.7.2 Ensayo de citocompatibilidad mediante MTT

Se sembraron 7500 células por pozo en una placa de 96 pozos, dejando incubar durante 24 hrs a 37 °C, 5% CO₂, para dejar adherir las células a la placa. Pasado el tiempo se remueve el medio de cada pozo, para ser reemplazado con medio preparado con los tratamientos y compuestos libres, para incubar durante otras 24 hrs. En este ensayo se evaluó 300, 200 y 100 µg de CD; 40, 20 y 10 µM de Fx, así como la combinación de las distintas concentraciones de CD y Fx. Además, se evaluaron las concentraciones de 1, 10, 100 y 1000 ng/mL de LPS en las células CCD1112SK siguiendo el mismo protocolo de incubación durante 24 hrs.

Después de cumplir el tiempo de incubación, se retiró el medio con el tratamiento y se realizó un lavado con 100 µL de PBS 1X (pH 7.4) para evitar la contribución de color del tratamiento a la lectura de absorbancia posterior, una vez realizado el lavado se añadieron 90 µL de medio y 10 µL de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolio (MTT) a una concentración de 5 mg/mL, para incubar a 37 °C, 5% CO₂ durante cuatro horas con la finalidad de formar cristales de formazán en presencia de células metabólicamente activas. Finalmente, se añadieron 100 µL de ácido clorhídrico (HCl) 0.01 M con dodecilsulfato sódico (SDS) al 10% como solución solubilizadora

y se incubó durante 18 h, tras lo cual, se leyó la placa a 570 nm en un espectrofotómetro Epoch (BioTek, EUA). El porcentaje de viabilidad celular se calculó mediante la siguiente Ecuación 2:

$$Viabilidad (\%) = \frac{D.O_{\text{muestra}} - D.O_{\text{blanco}}}{D.O_{\text{control}} - D.O_{\text{blanco}}} \times 100 \quad (2)$$

donde: D.O._{muestra} es el valor de los pozos con tratamiento, D.O._{blanco} es el valor de los pozos que contienen la solución de MTT sin células, a las 24. D.O._{control} corresponde a los pozos sin tratamiento.

2.7.3 Cultivo de astrocitos de rata estimulados con LPS

La línea celular de astrocitos de rata RA-005 (IXCells Biotechnologies) se cultivó hasta obtener el 80% de confluencia, utilizando el medio basal de astrocitos suplementado con SFB, AA al 1% y el suplemento de crecimiento de astrocitos (MD-0039, IXCells Biotechnologies).

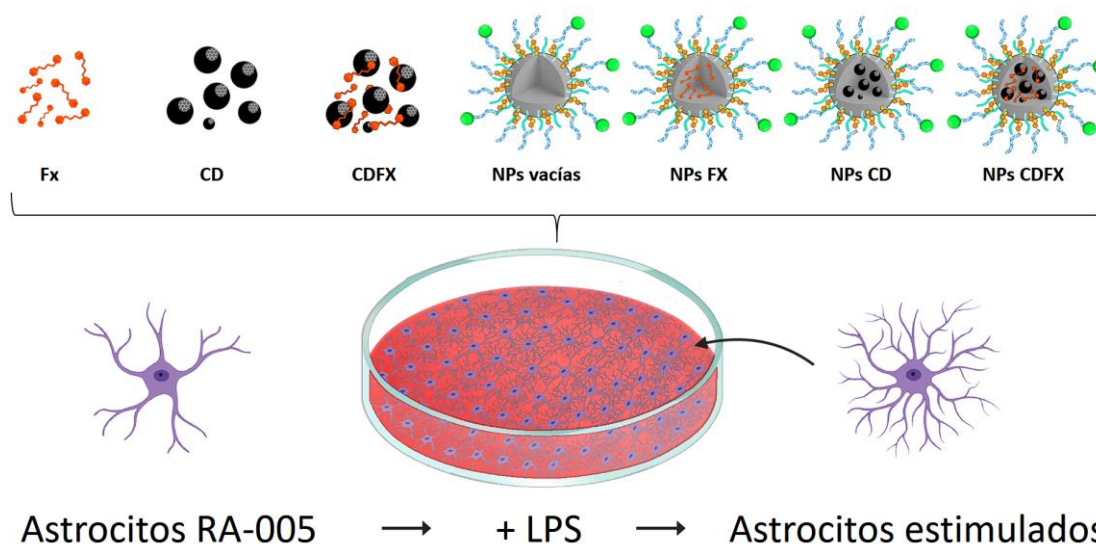


Figura 13. Astrocitos de rata (RA-005) estimulados con 100 ng/mL de LPS durante 24 h, y los tratamientos utilizados para el ensayo de MTT. Abreviaciones: fucoxantina (Fx), puntos de carbono (CD), nanopartículas (NPs).

Se estimuló con LPS a una concentración de 100 ng/mL durante 24 hrs, además se utilizaron las concentraciones seleccionadas de los compuestos bioactivos para encapsularlas en las NPs, siendo así que se evaluaron en los astrocitos estimulados con LPS: 100 µg de CD, 10 µM de fucoxantina,

100 µg de CD combinados con 10 µM de fucoxantina, NPs vacías, NPs Fx, NPs CD y NPs CDFx, todas a 1 mg/mL (Figura 13), este tratamiento se realizó durante 24 hrs. Se llevó a cabo el procedimiento para MTT descrito en el anterior párrafo.

2.8 Expresión de genes proinflamatorios en astrocitos de rata

Se realizó una búsqueda de secuencias de oligonucleótidos de los genes seleccionados (Tabla 1), para su uso posterior en los ensayos de expresión de genes por medio de qPCR.

Tabla 1. Genes implicados en el proceso de neuroinflamación en la EA.

Gen	Relación con la EA	Referencia
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa es utilizado como gen de referencia, se expresa consistentemente al mismo nivel en todas las muestras bajo investigación	Coulson et al., 2008
IL-6	La interleucina 6 es un componente de la formación de placas amiloide en la EA. Sus niveles se ven aumentados en el líquido cefalorraquídeo y en el plasma de pacientes con deterioro cognitivo leve.	Lyra E Silva et al., 2021
S100β	Proteína de unión al Ca ²⁺ que expresan los astrocitos reactivos, resultado de la neuroinflamación, se relaciona con el procesamiento de la APP y BACE1.	Cristóvão y Gomes, 2019
APP	El procesamiento de la proteína precursora amiloide genera la proteína βA, uno de los marcadores más importantes para la EA. La presencia de diferentes formas de βA en el cerebro promueve la inflamación.	Hampel et al., 2021
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial, es uno de los principales componentes de los filamentos intermedios de los astrocitos, y es considerado como uno de los marcadores de los astrocitos reactivos, se relaciona con daños en el cerebro.	Lawrence et al., 2023

2.8.1 Diseño de cebadores

Posteriormente se realizó un estudio bioinformático de las secuencias obtenidas mediante:

1. Primer-BLAST (Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés), EUA) para el diseño de nuevos cebadores o comprobar la especificidad de los ya existentes por medio de Standard Nucleotide BLAST, en donde se puede realizar un análisis de E-value o verificar la especificidad por especie.

2. Thermo Fisher Multiple Primer Analyzer (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA) y OligoAnalyzer Tool (Integrated DNA Technologies, Inc., EUA) para conocer la temperatura de alineamiento (Tm), el porcentaje de citosinas y guaninas (% CG) y la longitud de los cebadores.
3. SnapGene (Dotmatics, Reino Unido), para la revisión de la secuencia completa del gen y verificación del alineamiento de cebadores, además de poder conocer el tamaño del amplicón.
4. Primer3, para el diseño de secuencias faltantes en la literatura (Figura 14)

PRIMER3:

1. Se introdujo la secuencia en formato FASTA en el apartado solicitado
2. Se seleccionó la especie
3. Se verificó que las opciones “Pick primers left/right” se encontraran activas
4. Seleccionar la opción “Pick Primers”

Primer3web version 4.1.0 - Pick primers from a DNA sequence. [disclaimer](#) [code](#)
[cautions](#)

Select the [Task](#) for primer selection

[Template masking](#) before primer design ([available species](#))

[Select species](#) [Nucleotides to mask in 5' direction](#)
[Primer failure rate cutoff](#) [Nucleotides to mask in 3' direction](#)

Paste source sequence below (5'->3', string of ACGTNacgtn -- other letters treated as N -- numbers and blanks ignored). FASTA format ok. Please N-out undesirable sequence (vector, ALUs, LINES, etc.) or use a [Mispriming Library \(repeat library\)](#) 2)

1)

3)

Pick left primer, or use left primer below Pick hybridization probe (internal oligo), or use oligo below Pick right primer, or use right primer below (5' to 3' on opposite strand)

4)

[Sequence Id](#) A string to identify your output.

Figura 14. Primer3web versión 4.1.0 utilizado para la generación de secuencias de oligonucleótidos a partir de: 1. La secuencia del gen de interés en formato FASTA. 2. Selección de la especie. 3. Seleccionar las opciones de “Pick Primers Left/Right” y 4. Seleccionar Pick Primers.

2.8.2 Extracción de ácido ribonucleico (ARN) de los astrocitos RA-005

Para llevar a cabo la extracción de ARN de las células estimuladas con LPS y posteriormente tratadas, se utilizó el reactivo TRIzol® (Sigma-Aldrich, EUA; 93289), siguiendo el protocolo establecido en el equipo de trabajo. Para la preparación de las muestras, las células se lisaron y homogenizaron directamente en la placa de cultivo utilizando 600 µL del reactivo TRIzol® por cada pozo. Este reactivo inhibe la actividad de las ARNasas, lo cual asegura la obtención de ARN intacto. Después de la homogenización de las muestras, se procedió a separar las fases utilizando 1-bromo-3-cloropropano (60 µL por cada 600 µL de TRIzol utilizado), precipitando mediante centrifugación a 12,000 × g durante 10 min a 4 °C, logrando así separar la muestra en 3 fases: una fase orgánica roja (que contiene las proteínas), una interfase (que contiene el ácido desoxirribonucleico, ADN) y una fase acuosa superior incolora (que contiene el ARN). Posteriormente, se aisló el ARN mediante la recuperación de la fase acuosa en un tubo nuevo. Con ayuda de 2-propanol (300 µL por cada 600 µL de TRIzol), la muestra de ARN se precipitó al fondo del tubo por centrifugación a 12,000 × g durante 10 min a 4 °C. El pellet de ARN se lavó con EtOH al 75% (600 µL por cada 600 µL de TRIzol) mediante agitación por vórtex, y después se precipitó el ARN por centrifugación a 10000 × g durante 10 min a 4 °C. Luego, se retiró el EtOH utilizado y el pellet de ARN se dejó secar durante 5-10 min al aire libre, evitando que se seque por completo para mantener su solubilidad, finalmente se resuspendió en 30 µL de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC), sustancia química que elimina ribonucleasas, enzimas capaces de degradar el ARN, para preservar la calidad de la muestra obtenida (Figura 15).

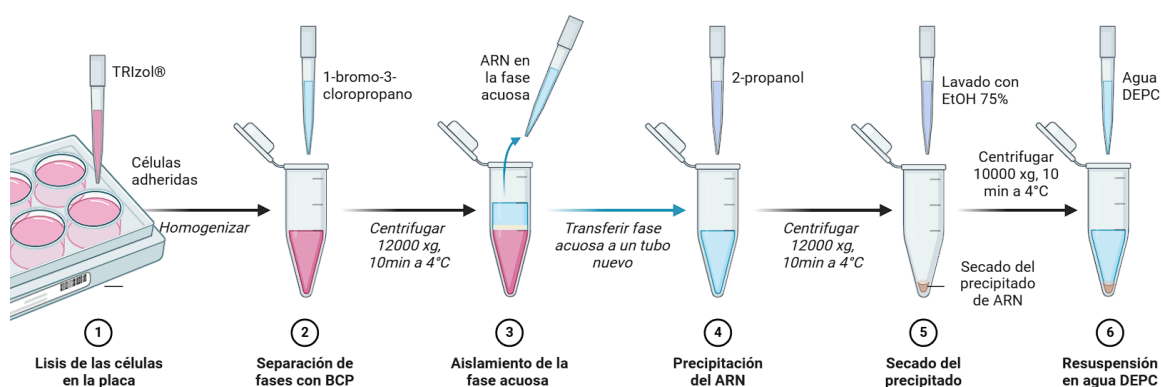


Figura 15. Protocolo para la extracción de ARN con TRIzol®. 1. Lisis y homogenización de células en placa. 2. Separación de fases con 1-bromo-3-cloropropano. 3. Aislamiento de la fase acuosa con 2-propanol. 4. Lavado del precipitado de ARN con EtOH al 75% y posterior secado. 5. Resuspensión del precipitado de ARN con agua DEPC. Abreviaciones: Ácido ribonucleico (ARN), Etanol (EtOH), Dietilpirocarbonato (DEPC). Modificado de: BioRender.com.

Se analizó el ARN obtenido mediante el análisis de D.O. en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA) para evaluar su calidad y cantidad. Los ácidos nucleicos absorben la luz a una D.O. de 260 nm, las proteínas a 280 nm y los componentes fenólicos (TRIzol®) a 230 nm, para posteriormente determinar la pureza de los ácidos nucleicos mediante la relación de la D.O. a 260/280 y 260/230 (Thermo Scientific, 2019). Se consideró lo siguiente:

1. Para 260/280: un valor > 1.8 se considera de pureza aceptable, mientras que un valor de 2.0 se considera de pureza.
2. Para 260/230: un valor entre 2.0 a 2.2 se considera una muestra pura de ácido nucleico.

Finalmente se ajustó la concentración de cada muestra de ARN, se almacenaron a -20°C para utilizarse al día siguiente, o en caso de no utilizarse inmediatamente se almacenaron a -80°C .

2.8.3 Análisis de la expresión de genes proinflamatorios mediante qPCR

Se evaluaron los genes GAPDH, GFAP, IL1, S00 β y APP utilizando el Kit GoTaq® 1-Step RT-qPCR System (A6020, PROMEGA), el cual realiza la síntesis de ADN complementario (ADNc) y una posterior detección por qPCR en una sola reacción.

Se ajustó el protocolo del proveedor para trabajar con un volumen de reacción final de 10 μL , la concentración de ARN obtenido de cada muestra se preparó a 25 $\text{ng}/\mu\text{L}$ y, posteriormente, se ajustaron las concentraciones de cada par de cebadores de los genes GAPDH, GFAP, IL1, S00 β y APP a 100 nM.

1. Se descongeló en hielo el agua libre de nucleasas y el GoTaq qPCR Master Mix
2. Se agitó el GoTaq qPCR Master Mix, evitando la formación de burbujas
3. Se determinan el número de reacciones (triplicado + el control negativo)
4. Se prepara la mezcla de reacción (sin ARN) (Tabla 1)

5. Se agregan 6 μL de la mezcla de reacción a cada uno de los pozos
6. Se agregan los 4 μL de ARN (agua para el control negativo)
7. Se coloca el film MicroAmp™ (Thermo Fisher Inc., EUA) y se centrifugó unos segundos para precipitar la mezcla y evitar la formación de burbujas.

Tabla 2. Componentes del kit GoTaq® 1-Step RT-qPCR y su volumen por reacción adaptado a 10 μL , la concentración final de los cebadores se estableció a 100 nM y se consideraron 100 ng totales de ARN.

Componente	Volumen \times reacción
GoTaq qPCR Master Mix	5 μL
GoScript RT Mix for 1-step RT-qPCR	0.2 μL
Primer F (10 μM)	0.1 μL
Primer R (10 μM)	0.1 μL
Agua libre de nucleasas	0.6 μL
ARN (25 ng/ μL)	4 μL

Las reacciones se llevaron a cabo en un sistema de qPCR 7500 (Applied Biosystems, EUA), realizadas por triplicado en una placa de reacción óptica de 96 pozos MicroAmp™ (Thermo Fisher Inc., EUA), debido a que ayudan a garantizar la mayor uniformidad de temperatura y amplificación de las muestras. La placa fue cubierta con una película adhesiva óptica MicroAmp™ (Thermo Fisher Inc., EUA), la cual reduce la posibilidad de contaminación entre el contenido de cada pozo y la evaporación de las muestras.

2.9 Cruce de la barrera hematoencefálica en un modelo de *Danio rerio*

Todos los experimentos con animales fueron aprobados por el Comité de bioética del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. Los ensayos se realizaron de acuerdo con el protocolo aprobado (ORGA_ACUA_2023_10) sin modificaciones.

2.9.1 Cría del pez cebra

Se obtuvieron 10 peces cebra (wild type) a través de un proveedor local, se mantuvieron en una pecera rectangular de 20 L con sistema de recirculación de agua, a 27 °C y pH de 7.4, $NH_3/NH_4^+ \sim 0$ ppm (mg/L), $NO_2^- \sim 0$ ppm (mg/L) y $NO_3^- \sim 0$ ppm (mg/L). Con un ciclo de 14 hrs de luz comenzando a las 7:00 am seguido de 10 h de oscuridad. Se revisó la salud de los peces diario y se realizó mantenimiento cada 2 días cambiando el 50% del agua y revisando parámetros cada semana.

2.9.2 Reproducción del pez cebra

Para el proceso de reproducción del pez cebra, se colocaron 2 machos y 1 hembra en una pecera con 2 L de agua, colocando canicas en el fondo para asegurar la supervivencia de los embriones. Al día siguiente se retiraron los peces, dejándolos en peceras para descanso, se retiraron las canicas y se sifoneó el fondo para recuperar los embriones. Los embriones recolectados se someten a una limpieza manual y se incubaron en agua del sistema a 27 °C (Figura 16 a), en este punto se comienza a medir la edad de los huevos de pez cebra en horas post fertilización (hpf) o días post fertilización (dpf). Cada 24 hrs se realiza el cambio del 50% de agua y limpieza del fondo hasta llegar a los 5 dpf para realizar la microinyección (Figura 16 b).

2.9.3 La barrera hematoencefálica: microinyección del pez cebra

Para facilitar el manejo de las larvas se utilizó un gel de agarosa al 2% y un molde de surcos (Z-Molds, World Precision Instruments), se colocaron 25 mL del agua del sistema y 0.5 g de agarosa, calentando la solución en microondas en intervalos de 10 s hasta obtener una solución cristalina, posteriormente se deja enfriar en una placa de Petri de 100 mm y se coloca el molde, finalmente, se retira el molde una vez solidificado.

Se preparó el equipo de microinyección Manual Microsyringe Pump (MMP, World Precision Instruments) de acuerdo con el manual de usuario, cargando 1 mL de solución de las NPs (Vacías, Fx, CD y CDFx) antes de anestésiar a los peces. Se anestésiaron 12 larvas de 5 dpf con triclaína (0.168 mg/mL) durante 1 minuto, se microinyectaron las larvas sobre el molde de agarosa con 16.6 nL de

solución de las diferentes NPs a 1 mg/mL (Figura 16 c), después de la inyección, las larvas se transfirieron a una placa de reposo, dejando incubar durante 5 h para su posterior análisis mediante microscopia confocal (FV1000 Fluoview, filtro 430-460 nm, Olympus). Se microinyectaron 3 larvas por cada condición, como control se eligieron 3 larvas, las cuales no fueron inyectadas.

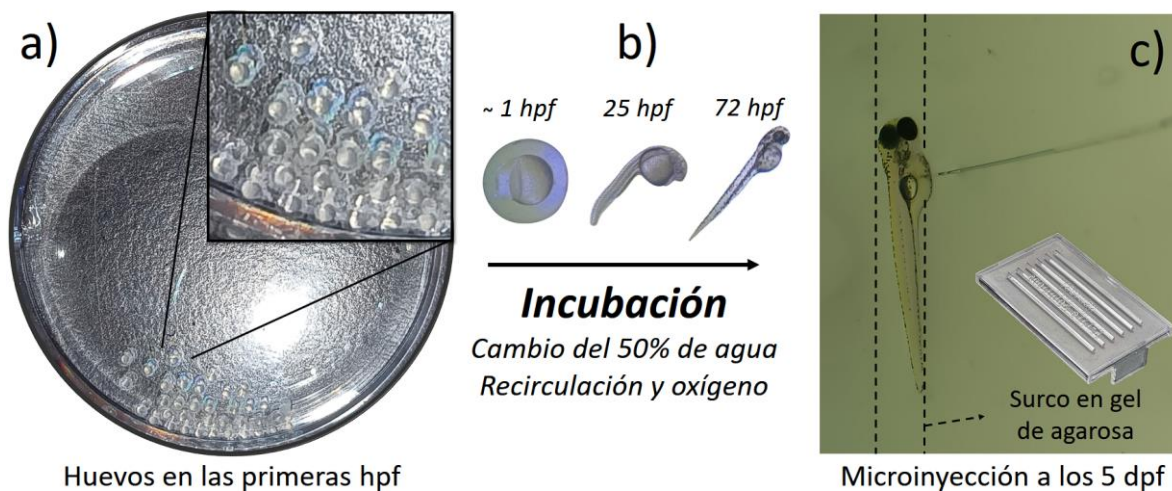


Figura 16. Proceso de la microinyección de las larvas de *Danio rerio*, a) limpieza de los embriones al momento de recuperarlos, b) crecimiento de larvas a 1, 25, 72 hpf y c) microinyección de la larva sobre el molde después de aplicar anestesia durante 1 min.

Capítulo 3. Resultados y discusión

3.1 Conjugación Col-PEG-Tf

En este trabajo se llevó a cabo la síntesis de NPs cargadas con CD y Fx, cuya composición involucra el uso de transferrina para lograr la entrega dirigida de fármacos en el cerebro, dado que el receptor de transferrina se encuentra sobreexpresado en las células endoteliales de los capilares cerebrales (Koneru et al., 2021). Los espectros de FTIR de los compuestos libres muestran los picos característicos de cada uno de los precursores, para la transferrina los picos se encuentran en 1540 cm^{-1} para la amina II, 1653 cm^{-1} para la amina I, y el enlace amina en 3294 cm^{-1} (Ramalho et al., 2023). Para el Col-PEG se encuentran los picos atribuidos a la vibración de estiramiento de los enlaces C-H en 2880 cm^{-1} y un pico en 1100 cm^{-1} correspondiente a la vibración de estiramiento de los enlaces -C-O-C- (Asadi et al., 2011; Yang et al., 2008).

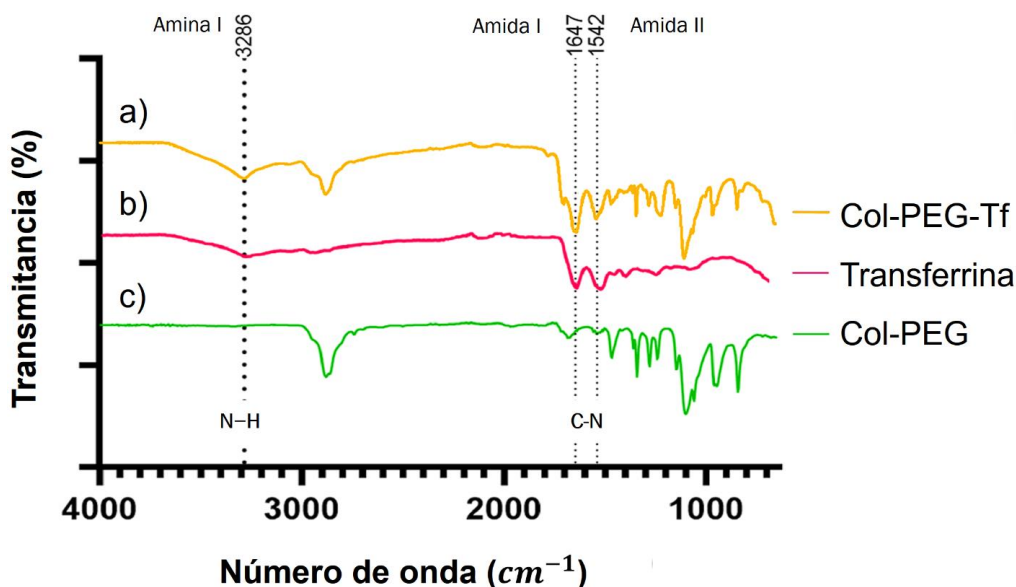


Figura 17. Espectros FTIR de 4000 a 600 cm^{-1} de los compuestos a) Col-PEG-Tf, b) Transferrina y c) Col-PEG.

A partir de la síntesis y liofilización del compuesto conjugado se obtuvo un polvo de color naranja tenue, cuyo análisis en FTIR muestra los picos característicos de la transferrina y Col-PEG con un ligero desplazamiento, la amina II en 1541 cm^{-1} y la amina I en 1637 cm^{-1} y un pico resultante de la

vibración de estiramiento del enlace N-H en 3283 cm^{-1} ; los picos del Col-PEG se encontraron en 2884 cm^{-1} para el enlace C-H y en 1105 cm^{-1} para los enlaces -C-O-C- (Figura 17), esta diferencia entre los picos sugiere que la conjugación del Col-PEG y la Tf se ha llevado a cabo (Ramalho et al., 2023).

3.2 Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas

Se obtuvieron los espectros de los compuestos individuales que componen las NPs, siendo así que para HSPC se encontraron los picos característicos de la vibración de estiramiento C-H y la vibración de flexión de C-H de las cadenas de ácidos grasos en 2917 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} y 1468 cm^{-1} (X. Zhao et al., 2019); para el espectro del PLGA se encontraron los picos correspondientes al estiramiento de los grupos carbonilo (C=O) en 1740 cm^{-1} , y los picos correspondientes al estiramiento del enlace éster (C-O) en 1084 cm^{-1} (Ramalho et al., 2023; Wang et al., 2013). Para los CD se obtuvieron los picos correspondientes al grupo carbonilo (C=O) en 1701 cm^{-1} , además se encontró un pico en 1555 cm^{-1} correspondiente al enlace C=C (Kung et al., 2020). Para la fucoxantina se encontraron los picos a 3000 cm^{-1} y 2918 cm^{-1} correspondientes al grupo -CH, 1440 cm^{-1} para el grupo -CH₂, el grupo C=C en 1020 cm^{-1} y un pico amplio correspondiente al grupo -OH en 3435 cm^{-1} (Arunkumar et al., 2023).

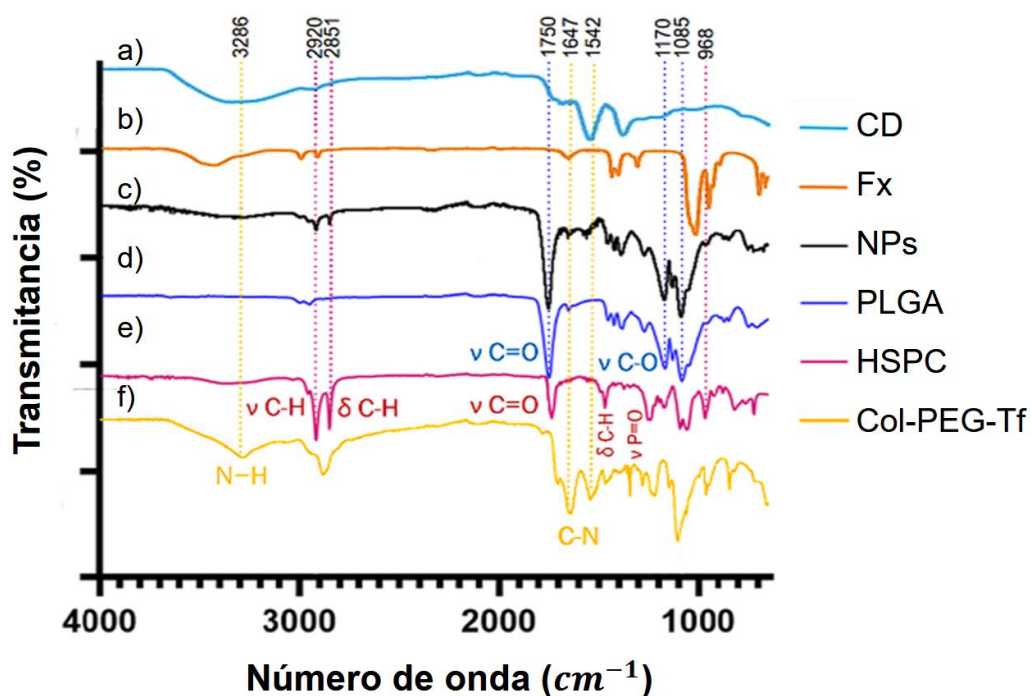


Figura 18. Espectros FTIR de 4000 a 600 cm^{-1} de los compuestos a) CD, b) Fx, c) NPs, d) PLGA, e) HSPC y f) Col-PEG-Tf.

Se determinó la composición química de las NPS cargadas mediante análisis de FTIR, el espectro de FTIR obtenido de las NPs contiene los picos característicos de cada uno de los reactivos utilizados en la síntesis (Figura 18); dentro de ellos se encuentran los picos característicos en 1540 cm^{-1} para la amina II, 1653 cm^{-1} para la amina I, y el enlace amina en 3294 cm^{-1} del conjugado Col-PEG-Tf, los grupos carbonilo del PLGA en 1701 cm^{-1} , los ácidos grasos de la HSPC en 2917 cm^{-1} y 2850 cm^{-1} y no se encuentra ningún pico característico de los CD ni de la Fx, esto sugiere que la concentración encapsulada y la presencia de estos compuestos bioactivos en el centro del núcleo polimérico dificulta la detección aún más.

3.3 Citocompatibilidad del LPS y compuestos libres

Primero se realizó la prueba preliminar para determinar la concentración adecuada para la inducción de la inflamación en células CCD112Sk partiendo de las concentraciones de 10, 100 y 1000 ng/mL (Blank et al., 2022; Dong et al., 2022). A partir de este ensayo de MTT se encontró que una concentración de 100 ng/mL de LPS era la adecuada (Figura 19 a), ya que, esta no interfería con la viabilidad celular del cultivo, considerando la norma ISO 10993-5, la cual establece que un material evaluado mediante MTT por debajo del 70% se considera citotóxico (International Organization for Standardization, 2009).

Para los CD no se encontró ningún efecto citotóxico en ninguna de las 3 condiciones evaluadas (100, 200 y 300 $\mu\text{g/mL}$), se seleccionó la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ de CD. Las concentraciones de 10, 20 y 40 μM de Fx, presentan una citocompatibilidad de 93.4%, 57.5 % y 25.3 %, respectivamente, eligiendo la de concentración a 10 μM debido a su porcentaje de viabilidad. Se evaluó la combinación de ambos compuestos en diferentes formulaciones, siendo más favorable la de 100 μg de CD y 10 μM de Fx, debido al aumento en la viabilidad celular (Figura 19 b).

A partir de los resultados obtenidos del ensayo de citocompatibilidad en fibroblastos CCD112SK, se observó el efecto citotóxico de la Fx al utilizar las concentraciones más altas de 40 μM y 20 μM libres, por lo cual se escogió la concentración de 10 μM , anteriormente se ha reportado que esta concentración no disminuye la viabilidad a menos de 70% (Almeida et al., 2018; Suwanmanee et al., 2023). Por otro lado, los CD mostraron citocompatibilidad en todas las condiciones evaluadas,

además, los CD aumentan la citocompatibilidad en los tratamientos combinando ambos compuestos, por lo que se seleccionó la combinación de 100 μg de CD y 10 μM de Fx la cual presentó un aumento en la viabilidad, este efecto de aumento en la viabilidad ya se ha reportado anteriormente al agregar CD a células HEK-293 (Liu et al., 2021). A partir de estos resultados, se optó por encapsular estas concentraciones en los ensayos siguientes, se propone que el efecto de aumento de viabilidad se debe a la inhibición del daño causado por especies reactivas de oxígeno de los CD y la inhibición de la NF- κB por parte de la fucoxantina (Dong et al., 2022; Kim et al., 2010).

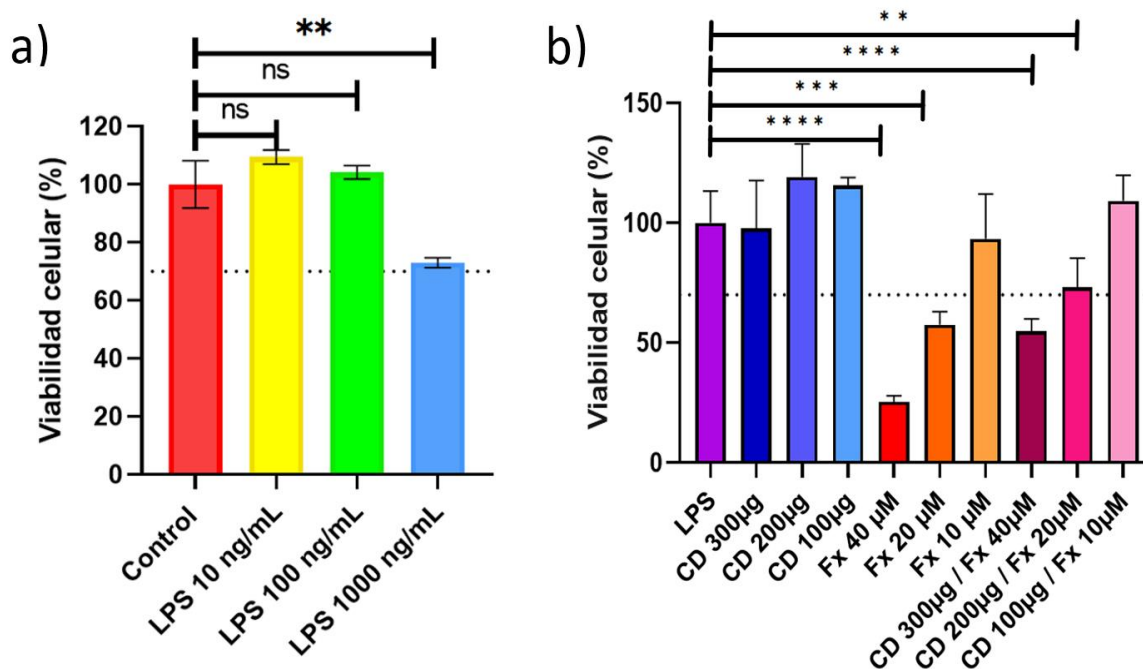


Figura 19. Porcentajes de viabilidad celular en fibroblastos humanos CCD-1112Sk a) estimulados con LPS a 10, 100 y 1000 ng/mL por 24 h, b) estimulados con LPS a 100 ng/mL durante 24 horas y posteriormente tratados con los compuestos libres durante 24 horas. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (\pm), $n = 3$ por grupo. ANOVA de una vía utilizando el análisis a posteriori de Turkey con $p < 0.05$.

3.4 Encapsulación de los compuestos bioactivos

A partir de los resultados obtenidos del ensayo de citocompatibilidad, se utilizaron 100 μg de CD y 10 μM de Fx para encapsular en las NPs. Primero, se realizó la curva estándar a partir de la intensidad de la absorbancia obtenida en un lector de placas a 450 nm para la Fx (Figura 20a), para los CD se realizó a partir de la intensidad obtenida mediante espectroscopia de fotoluminiscencia a una

longitud de onda de 370 nm (Figura 20b). Para determinar la concentración de la Fx se utilizó la ecuación 3:

$$\text{Concentración Fx} = \frac{\text{intensidad de absorbancia} + 0.1208}{0.9955} \quad (3)$$

mientras que para los CD se utilizó la ecuación 4:

$$\text{Concentración CD} = \frac{\text{intensidad de absorbancia} - 4.1919}{1.0263} \quad (4)$$

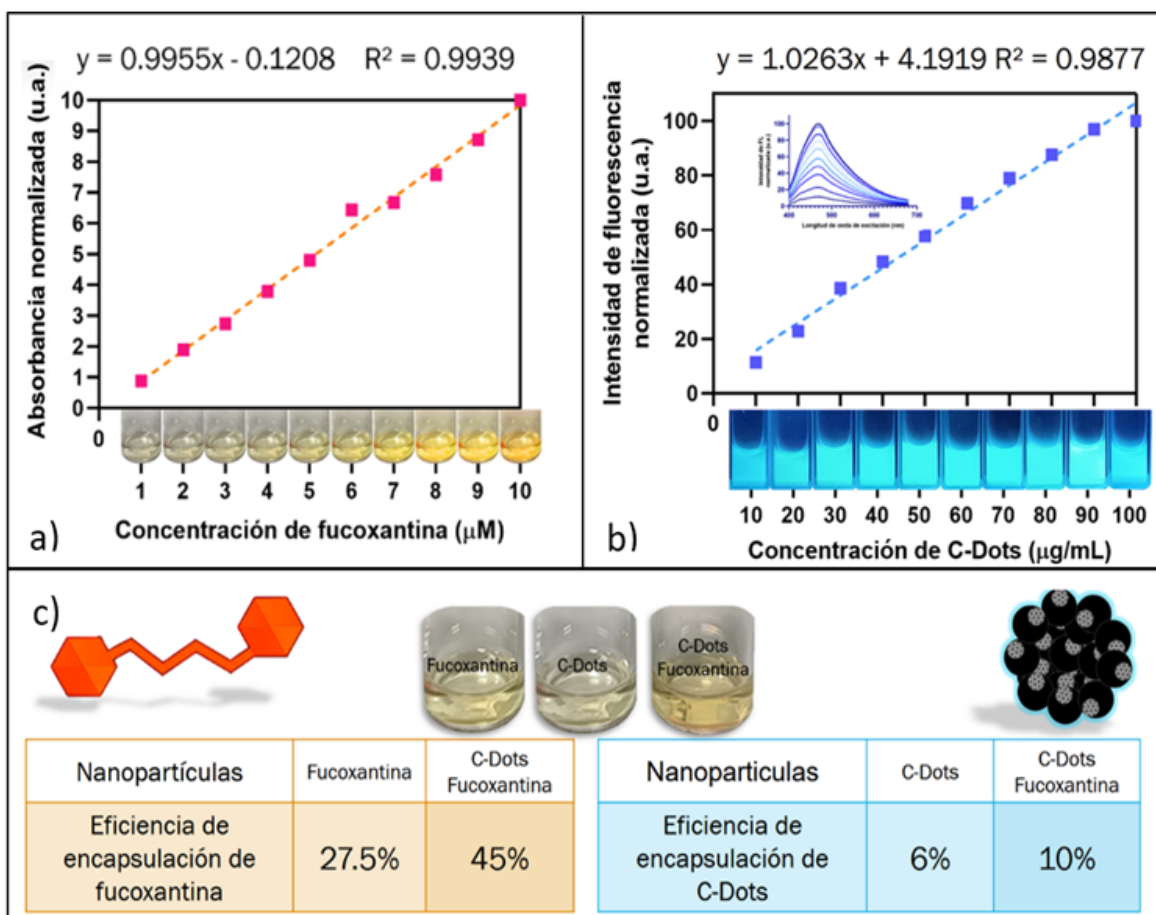


Figura 20. Ensayo de liberación de los compuestos encapsulados, a) curva estándar de Fx obtenida mediante el lector de placas EPOCH, b) curva estándar de CD obtenida a partir de espectroscopía de fotoluminiscencia y c) porcentajes de encapsulación de los compuestos bioactivos.

Para la Fx encapsulada en las NPs Fx se obtuvo un 27.5% o 2.75 μM ; mientras que para las NPs que encapsulan Fx y CD se obtuvo una encapsulación del 45% de la Fx inicial, es decir, encapsulamos 4.5 μM (Figura 20c), se han sintetizado NPs de PLGA-PEG cargadas con Fx mediante el método de evaporación de solvente, con una eficiencia de encapsulación 48.44 % (Yang et al., 2021). Nuestro sistema de NPs CDFx se acerca un poco más a la eficiencia reportada anteriormente, sin embargo, para ello es necesario la adición de CD, mientras que no es directamente comparable, si nos da una idea de la cantidad de Fx que se encapsula actualmente, además esta variación del porcentaje de encapsulación se puede atribuir principalmente al método de síntesis de las NPs.

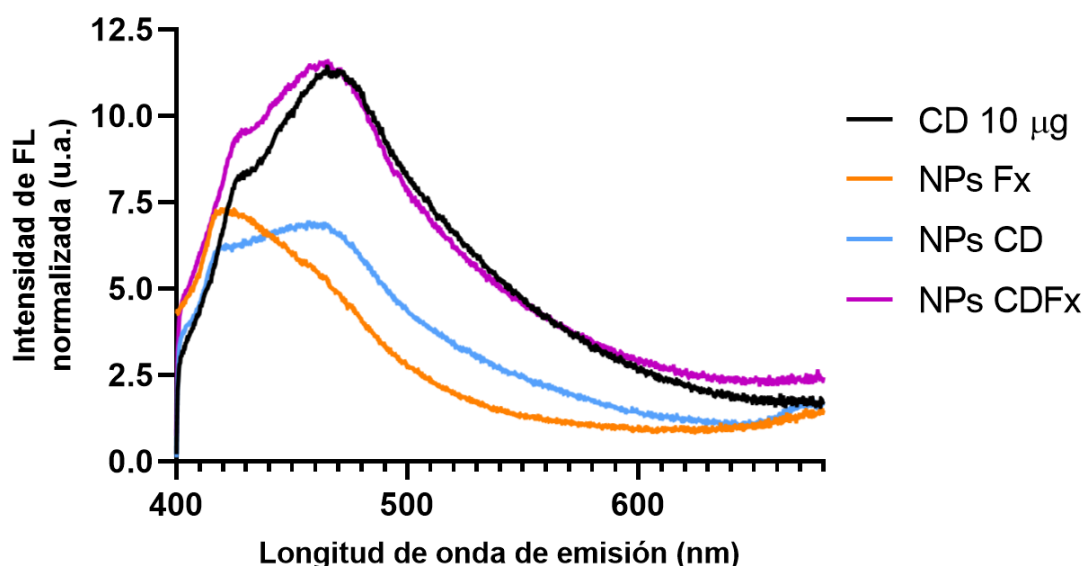


Figura 21. Espectros de fotoluminiscencia de CD (línea negra), NPs Fx (línea naranja), NPs CD (línea azul) y NPs CDFx (línea morada) a una longitud de onda de excitación de 370 nm, se observa el efecto sinérgico en el aumento de encapsulación de CD.

Los resultados obtenidos mediante fotoluminiscencia presentan el mismo comportamiento para las NPs cargadas con CD, la encapsulación de CD solos tiene un rendimiento del 6%, y la encapsulación de CD junto con la Fx aumentan la concentración a un 10%, correspondiente a 10 μg de CD (Figura 20 c y 21), de forma similar, se han sintetizado NPs de PLGA cargadas con CD, las cuales tienen una eficiencia de encapsulación del 11.2% (Latronico et al., 2021). Este incremento de la concentración al momento de encapsular ambos compuestos en una sola NPs, sugiere que el sistema necesita de la encapsulación de un compuesto para mantenerse estable, esto debido a las interacciones electrostáticas de los compuestos y el núcleo polimérico (Jaiswal et al., 2022; Rosiuk et al., 2019).

3.5 Tamaño y morfología de las NPs

Se obtuvieron NPs vacías con un diámetro hidrodinámico de 543.8 ± 45.5 nm, el cual se reduce a 185.6 ± 7.9 nm al encapsular Fx. Los CD reducen aún más el diámetro hidrodinámico, siendo de 123.8 ± 3.73 nm, y al encapsular ambos compuestos se obtiene un diámetro de 126.3 ± 7.8 nm. Se observó el efecto de la incorporación de los compuestos bioactivos, el cual causó una disminución de tamaño que puede atribuirse a las propiedades de los compuestos, siendo que el núcleo polimérico de las NPs interactúa con los CD y Fx para formar NPs más pequeñas y con una encapsulación mayor. La Fx por sí sola tiene baja biodisponibilidad debido a su carácter hidrofóbico (Jaiswal et al., 2022), siendo que existe una relación entre el aumento de componentes hidrofóbicos y la obtención de NPs de menor tamaño (Tahir et al., 2019); mientras que los CD poseen grupos carboxilo en su superficie, esta presencia de grupos hidrofílicos contribuye a la estabilización de las NPs (Rosiuk et al., 2019). Se propone que estos resultados muestran que la disminución de tamaño es producto de las propiedades del compuesto encapsulado, siendo predominante el efecto de los CD, es decir, en este trabajo se obtuvo un tamaño menor al encapsular un compuesto con superficie hidrofílica.

El PDI indica la distribución de tamaño de las NPs, se han establecido valores < 0.05 para muestras monodispersas, mientras que valores > 0.7 se atribuyen a muestras polidispersas (Mudalige et al., 2019), en este caso se tiene un PDI de 0.679 para las NPs vacías, 0.166 para las NPs cargadas con Fx, 0.301 para las NPs de CD y 0.387 para las NPs CDFx, estos resultados son esperados para sistemas poliméricos y/o lipídicos (Vargas-Barona et al., 2024). Se observó un efecto de reducción de polidispersidad al momento de encapsular los compuestos, como se discute anteriormente, la adición de compuestos en las NPs ayuda a regular el tamaño y también la distribución de tamaño.

El potencial ζ obtenido para las distintas NPs sintetizadas en este trabajo se encuentra en -9.57 mV para las NPs vacías, -8.86 mV para NPs Fx, -9.44 mV para las NPs CD y -11.9 mV para las NPs CDFx. El valor del potencial ζ varía de acuerdo a la química de la superficie, concentración de la muestra o tamaño de las NPs, pH de la solución y solvente (Mudalige et al., 2019). Este ligero incremento en el potencial ζ , nos confiere mayor estabilidad de las NPs, además, esta carga negativa sugiere que las NPs podrían evitar interacciones no específicas con la membrana celular debido a interacciones electrostáticas (Lin & Liu, 2012).

Tabla 3. Diámetro hidrodinámico, PDI y potencial ζ obtenido del análisis de DLS de las diferentes NPs.

NP	Vacías	Fx	CD	CDFx
Diámetro hidrodinámico (d.nm)	543.8 \pm 45.57	185.6 \pm 7.9	123.8 \pm 3.73	126.3 \pm 7.8
PDI	0.679	0.166	0.301	0.387
Potencial ζ (mV)	-9.57 \pm 0.242	-8.86 \pm 0.864	-9.44 \pm 1.33	-11.9 \pm 0.624

3.5.1 Tamaño de las NPs por TEM

Se obtuvieron las micrografías mediante TEM, a partir de las cuales podemos estudiar su morfología, para las NPs Vacías se observa una morfología esférica, siendo distinguible la capa lipídica (zona oscura) y el núcleo polimérico (zona clara) (Figura 24 a).

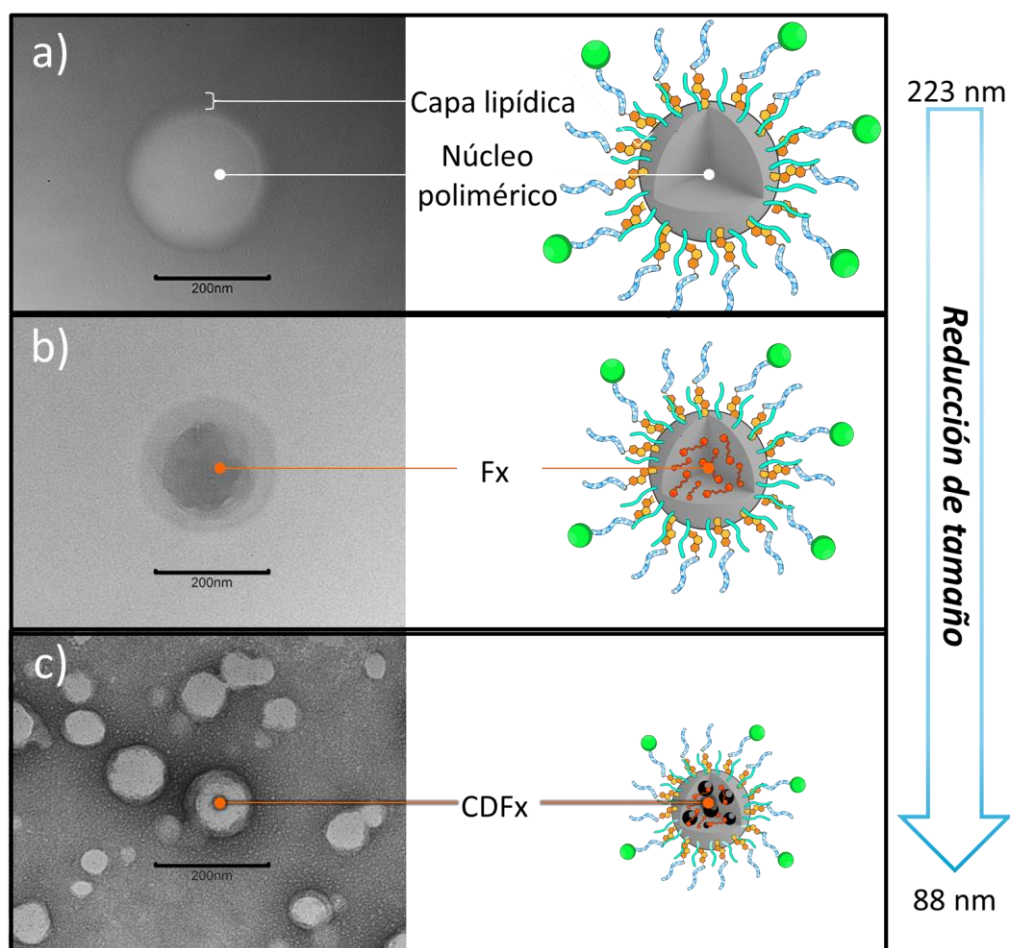


Figura 22. Micrografías obtenidas mediante TEM, se observa la morfología esférica de las NPs a) Vacías y b) CDFx, teñidas con acetato de uranilo al 2% para contrastar la capa lipídica (zona externa oscura de la NP), a una amplificación de 40 x (barra de escala: 200nm).

Las NPs Vacías tienen un tamaño de $223.5 \text{ nm} \pm 68.1 \text{ nm}$ y se encuentran dispersas, para las NPs Fx se obtuvo un tamaño de $208 \text{ nm} \pm 15.04 \text{ nm}$ (Figura 24 b), mientras que para las NPs CDFx se observa la misma forma esférica polímero-lípido característica, con un tamaño de $88.74 \text{ nm} \pm 27.4 \text{ nm}$, sin embargo, se alcanzan a distinguir aglomeraciones o cúmulos de NPs (Figura 24 c).

3.6 Citocompatibilidad de las NPs en astrocitos de rata

Antes de trabajar con el ensayo de citocompatibilidad es necesario llevar el cultivo de astrocitos de rata a una confluencia (densidad celular) del 80% de la placa sembrada, para lograr esto con los astrocitos de rata se requiere un tiempo de 10 días al sembrar 7500 cel/mL (Figura 22). Una vez se tiene la densidad celular deseada, se procede a estimular con 100 ng/mL de LPS durante 24 horas, para después agregar los tratamientos durante 24 horas más.

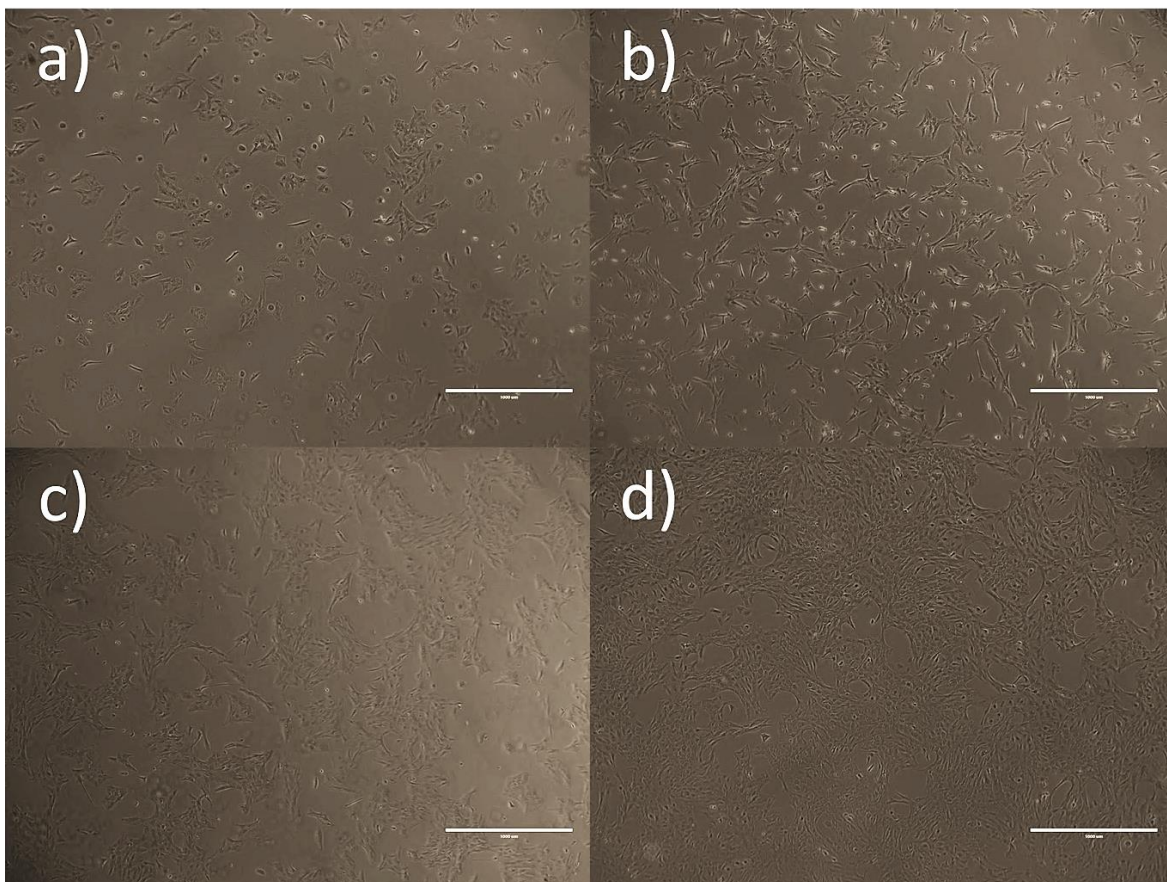


Figura 23. Astrocitos de rata (IXCells Biotechnologies) sembradas a una densidad de 7500 cel/mL , a) a 24 horas, b) 3 días, c) 7 días y d) 10 días. Amplificación 4x, barra de escala: $1000 \mu\text{m}$.

Los CD aumentaron la viabilidad celular a un 130%, mientras para la Fx y la combinación CD y Fx no se presentó ningún cambio significativo en la viabilidad. Para las NPs vacías se observó un efecto en la reducción de la viabilidad celular de 74.75 %, las NPs con Fx tuvieron una viabilidad del 70.22%, las NPs con CD tuvieron un 69.13% y las NPs encapsulado ambos compuestos tuvieron una viabilidad del 92.18% (Figura 23).

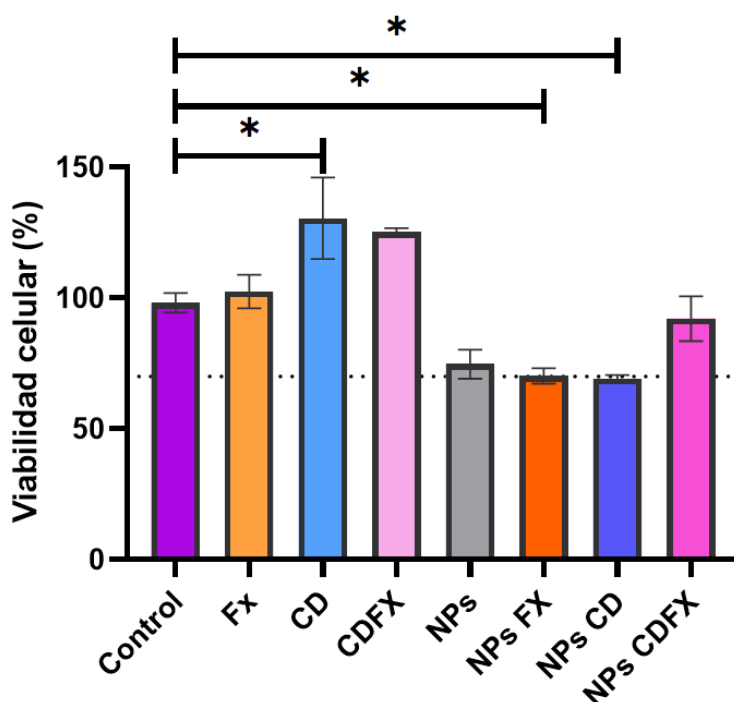


Figura 24. Porcentajes de viabilidad celular en astrocitos de rata estimulados con LPS a 100 ng/mL por 24 h y tratados con los compuestos bioactivos libres y las NPs cargadas durante 24 horas. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (\pm), $n = 3$ por grupo. ANOVA de una vía utilizando el análisis a posteriori de Turkey con $p < 0.05$.

La evaluación de la viabilidad celular en astrocitos muestra el efecto al momento de agregar NPs vacías la viabilidad decae a 74.7%, al evaluar las NPs con Fx se obtuvo una viabilidad del 70.22%, mientras que las NPs con CD tuvieron un 69.13%, esta viabilidad tan baja se atribuye al porcentaje de encapsulamiento de los compuestos en estos sistemas de NPs, que eran del 27.5% y 6% para la Fx y CD respectivamente, por lo cual prevalece el efecto de reducción de viabilidad las NPs vacías, además de que los compuestos no se liberan inmediatamente. Esto se refuerza aún más al momento de evaluar las NPs cargadas con CD y Fx juntos, se consigue aumentar la viabilidad celular al 92.18%, esto se atribuye tanto a la citocompatibilidad de los CD, como también a la liberación retardada de

los compuestos bioactivos desde las NPs, además de una mayor concentración encapsulada de ambos compuestos en estas NPs (45% Fx y 10% CD). También se puede atribuir este efecto al tamaño de las NPs, dado que las NPs CDFx son más pequeñas.

3.7 Diseño de cebadores

En la tabla 4 se muestran las secuencias recopiladas de la literatura y/o diseñados, cada secuencia se muestra con su temperatura de fusión (Tm), número de pares de bases, porcentaje G/C y el tamaño del amplicón resultante. Estas secuencias se sintetizaron para usarse posteriormente en ensayos de qPCR. Para el caso de los cebadores del gen APP se utilizó el software PRIMER3 para generar las secuencias de los cebadores.

Tabla 4. Secuencias y características de los cebadores a evaluar mediante qPCR en astrocitos de rata. Abreviaciones: temperatura de fusión (TF), pares de bases (Pb), guanina (G) y citosina (C).

Gen	Gen ID	Secuencia	TF	Pb	G/C%	Tamaño amplicón (Pb)	Referencia
GAPDH	2597	F: GCATCTTCTTGTCAGTGCC	58	20	55	105	Obaid et al., 2023
		R: GAGAAGGCAGCCCTGGTAAC	59	20	60		
IL-6	3569	F: GCCCTTCAGGAACAGCTATGA	59	21	52	80	Wang et al., 2010
		R: TGTCACAACATCAGTCCAAGA	58	23	43		
S100B	6285	F: GGAGAGAGGGTGACAAGCAC	58	20	60	142	Obaid et al., 2023
		R: CCATCCCCATCTTCGTCCAG	59	20	60		
APP	351	F: CCTGCTCTACAACGTCCCTG	60	20	60	237	PRIMER3
		R: CCAAAGGATGCCACGGTTG	60	20	55		
GFAP	2670	F: GCGAAGAAAACCGCATCACC	59	20	55	77	VanRyzin et al., 2021
		R: TTTGGTGTCCAGGCTGTTT	59	20	50		

3.7.1 Evaluación de la neuroinflamación mediante qPCR

Se evaluó el efecto de las NPs en los astrocitos de rata estimulados con LPS, de esta forma se observará si hay una disminución o aumento en la expresión relativa de los genes APP, GFAP, S100β

e IL-6, los cuales están implicados en la EA (Tabla 1). Primero se realizó la comparación entre un grupo con células control (sin tratamiento) y el grupo de células estimulados con 100 ng/mL LPS durante 24 hrs. Para APP y GFAP se observa una tendencia a aumentar la expresión relativa en el grupo de astrocitos de rata estimulados, mientras que para los genes de IL-6 y S100 β , la expresión relativa aumentó significativamente al compararse con la expresión del grupo control (Figura 25).

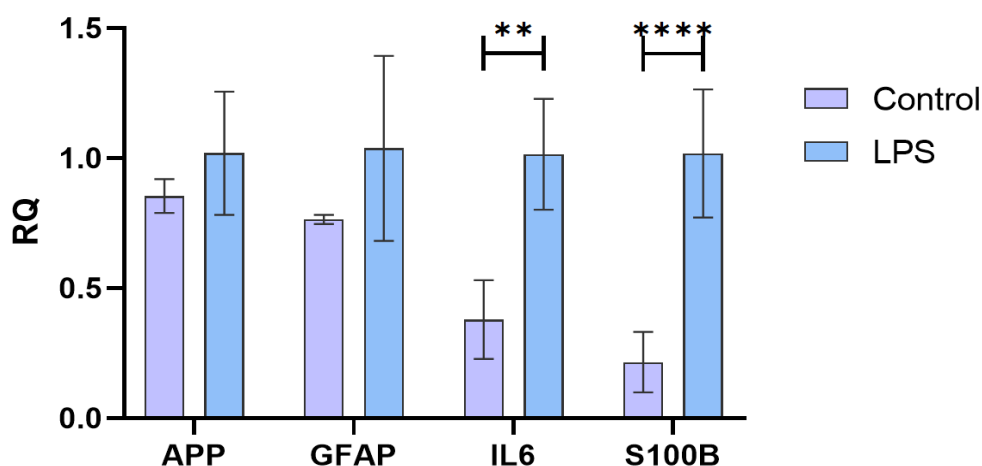


Figura 25. Niveles de expresión de genes relacionados a neuroinflamación en astrocitos de rata estimulados con 100ng/mL de LPS por 24 h. Las barras verticales representan el error estándar de la media (\pm), n=3 por grupo. Análisis t de Student de dos colas con $p < 0.05$.

El aumento de expresión de genes proinflamatorios al agregar LPS en células gliales ha sido ampliamente revisado, esta inducción está dada por la activación de la NF-Kb a través del TLR4 al agregar LPS (Kim et al., 2010; Mirzaei et al., 2021). Los resultados obtenidos mediante qPCR en astrocitos de rata estimulados con LPS muestran un aumento en la expresión de los genes APP (1.17x), GFAP (1.308x), IL-6 (2.638x) y S100 β (4.65x) al inducir inflamación con 100 ng/mL de LPS, estos resultados concuerdan con lo reportado para IL-6 (Lee et al., 2021), S100B, GFAP (Seady et al., 2025) y APP (Zheng et al., 2020).

Así mismo, se obtuvieron los resultados de las células evaluadas con cada uno de los tratamientos. Para el gen de APP se observa un efecto inhibitor al agregar Fx (1000x), NPs Fx (250x) y también en las NPs CDFx (9.17x), hasta la fecha de la escritura de esta tesis no se ha reportado una reducción en el gen de APP al usar Fx, solamente se ha reportado que la Fx inhibe la enzima BACE1 (Jung et al., 2016). Para los CD (1.045x) y la combinación de CDFx (1.12) no se observa ningún efecto

significativo, por último, se determinó un aumento significativo de 1.5x para las NPs Vacías y de 1.42x para NPs CD.

Para GFAP se observa que los compuestos libres no redujeron la expresión, mientras que, si se redujo la expresión en las células tratadas con NPs Vacías (1.675x), NPs Fx (2.118x), NPs CD (14.97x) y las NPs CDFx (45.45x), siendo en este último tratamiento en donde se presentó la mayor reducción de expresión relativa, en este caso el efecto de reducción se atribuye a la adición de NPs y la liberación progresiva de los tratamientos.

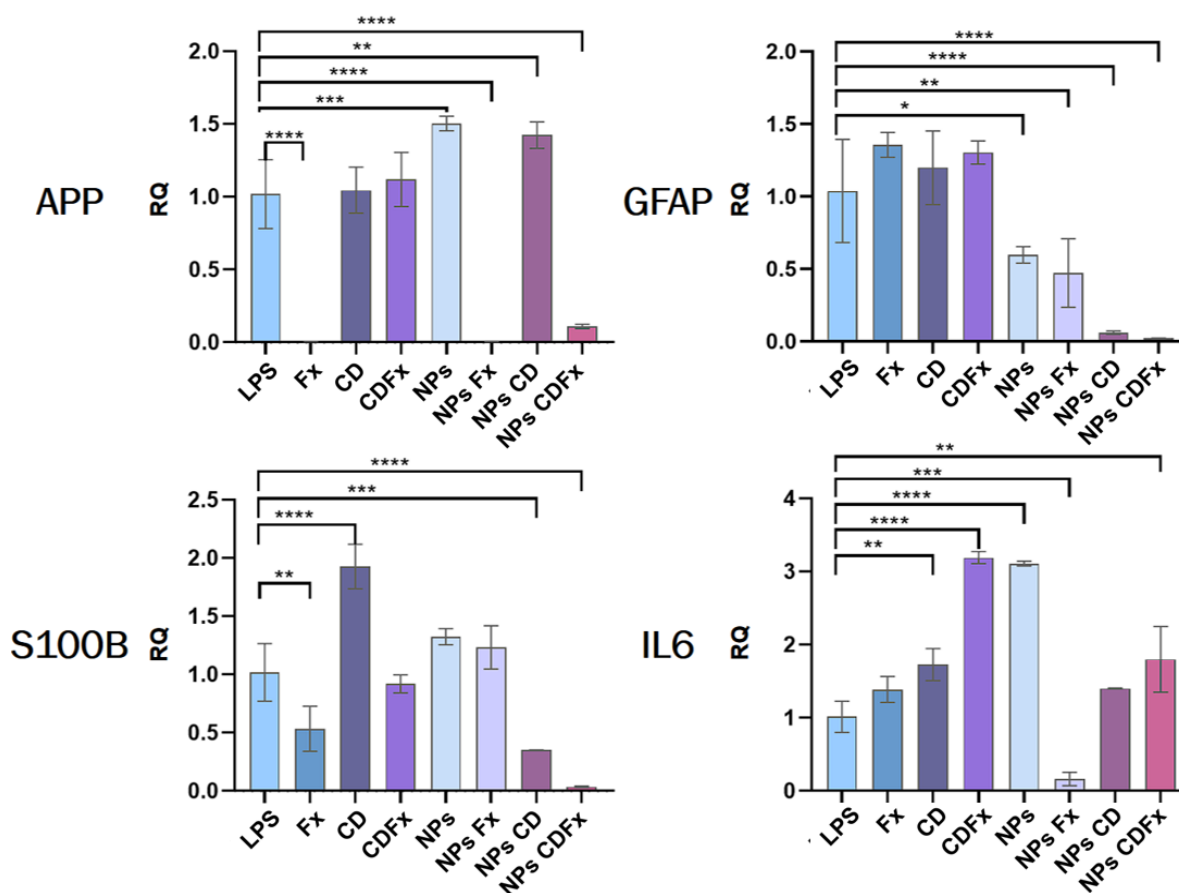


Figura 26. Niveles de expresión de genes relacionados a neuroinflamación en astrocitos de rata con estimulación de 100 ng/mL LPS por 24 h, tratadas con las distintas formulaciones de compuestos libres y NPs. Las barras verticales representan el error estándar de la media (\pm), n=3 por grupo. Análisis t de Student de dos colas con $p < 0.05$.

Para el gen de S100 β , para los CD se notó un aumento significativo en la expresión de 1.92x. Los tratamientos de CDFx, NPs vacías y NPs Fx no tuvieron efecto alguno, al contrario, se observa una

reducción significativa al agregar Fx (1.88x), NPs CD (2.857) y las NPs CDFx, las cuales tuvieron la mayor reducción de 28.57 veces.

Por último, en el caso de la IL-6, se puede observar que no hay efecto al agregar Fx (1.38x) y NPs CD (1.40x), mientras que, si se observa un aumento en la expresión relativa para los tratamientos de CD (1.72x), CDFx (3.19), NPs vacías (3.11) y NPs CDFx (1.8x), siendo las NPs Fx las únicas en reducir 6.13 veces la expresión de IL-6.

La estimulación con LPS fue evidente en los genes de IL-6 y S100 β , mientras que para APP y GFAP solo se observó una tendencia al aumento. La Fx libre mostró un efecto reductor en los genes de APP y S100 β , mientras que las NPs vacías tienen un efecto en la reducción de GFAP, esta respuesta se conservó en las NPs CDFx las cuales redujeron significativamente la expresión de APP, GFAP y S100 β (Figura 26).

3.8 Microinyección de nanopartículas en un modelo de *Danio rerio*

Las NPs sintetizadas se evaluaron en un modelo de *Danio rerio* para comprobar si las NPs tienen la capacidad de llegar a la BHE. Este modelo se ha utilizado para entregar CD conjugados con Tf a través de la BHE, mediante transitosis mediada por receptores (Li et al., 2016), además de múltiples estudios para evaluar la neurotoxicidad de diferentes NPs (Saleem & Kannan, 2021; Y. Zhao et al., 2022). Para el análisis se obtuvieron 150 huevos, los cuales se limpiaron de restos y se dejaron en incubación a 27 °C con recirculación de agua, se realizó limpieza diaria y 50% de recambio del agua hasta llegar al quinto día para realizar la microinyección. Para ello, se realizó el molde de agarosa, se anestesió la larva sumergiéndola en la solución de triclaína (0.168 mg/mL) durante 1 minuto y se procedió a microinyectar la larva, colocándola de lado en el surco generado en el molde.

Después de la incubación durante 5 h, se procedió a analizar las muestras mediante microscopia confocal de barrido, en las micrografías se observan las larvas de 5 días post-fertilización y las diferentes condiciones evaluadas, se puede ver que las larvas que no presentan fluorescencia correspondiente a la larva no inyectada (Figura 27 a), la larva inyectada con NPs vacías (Figura 27 b) y la larva inyectada con NPs Fx (Figura 27 c). En la micrografía de la larva inyectada con NPs CD se puede observar fluorescencia en la parte correspondiente a la cabeza del pez (Figura 27 d) y en

las NPs CDFx se observa la fluorescencia desde el ángulo frontal, y la comparación entre el campo claro y contraste (Figura 27 e y f), la cual presenta una estructura correspondiente al cerebro y parte del sistema nervioso central del pez resaltado en color azul, debido a la fluorescencia de las NPs CDFx (filtro de 430 a 460 nm), por lo cual podemos comprobar que las NPs CDFx llegan al cerebro.

Este efecto se debe a la incorporación de los CD en las NPs, dado que la ausencia de CD en las demás formulaciones no presenta fluorescencia, anteriormente se había reportado el cruce de la BHE del pez cebra utilizando CD conjugados con transferrina (Han et al., 2017), estos resultados resaltan la entrega exitosa de las NPs CDFx conjugadas con transferrina en el cerebro del pez cebra.

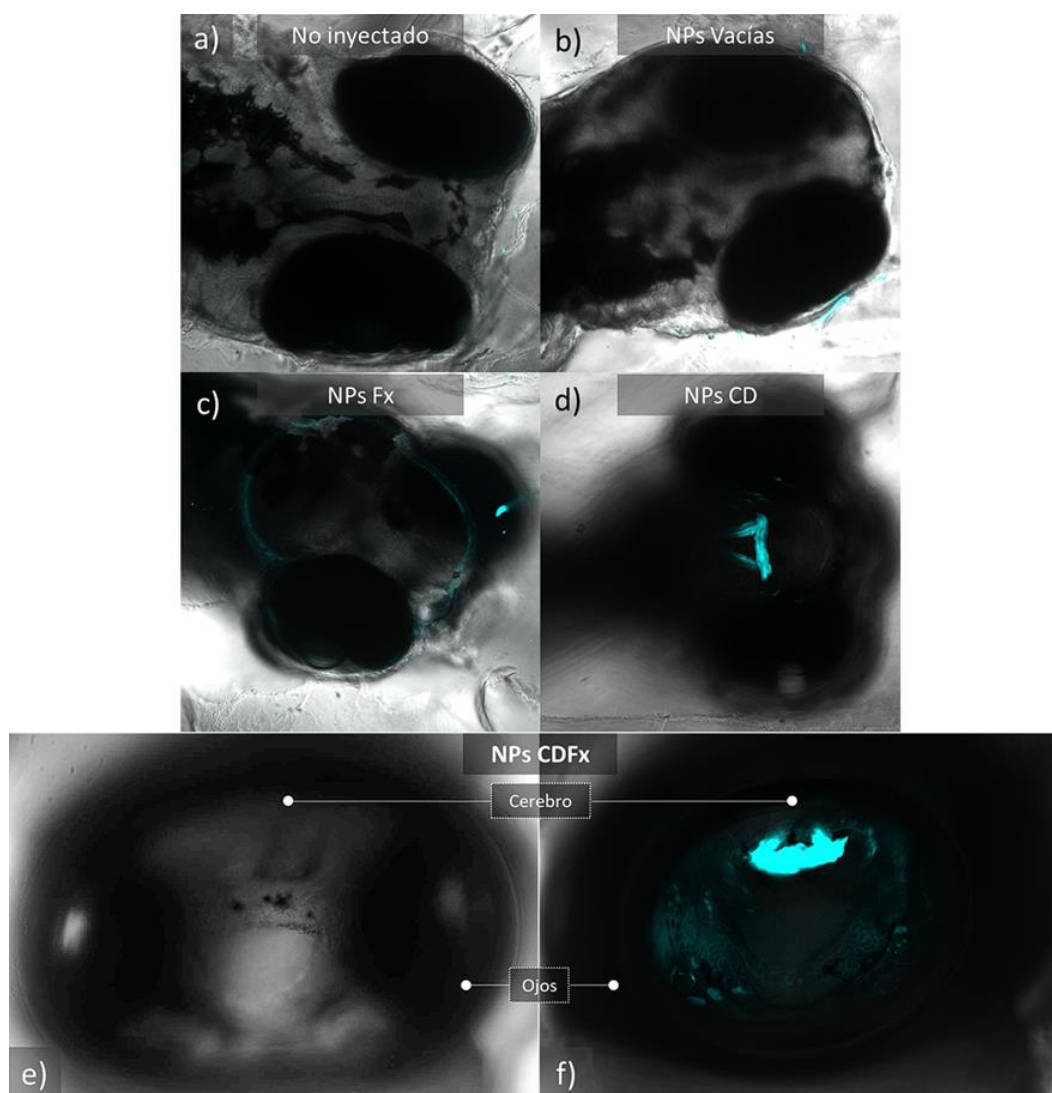


Figura 27. Larvas de *Danio rerio* a los 5 días post fertilización a) sin inyectar, b) inyectada con NPs vacías, c) inyectada con NPs Fx, d) inyectada con NPs CD, e) inyectada con NPs CDFx sin contraste y f) inyectada con NPs CDFx con contraste en azul (filtro 430-460 nm) en la cual se muestra fluorescencia de las NPs.

Como se ha observado, la encapsulación de ambos compuestos en una sola NP ha obtenido un efecto sinérgico obteniendo los mejores resultados, particularmente se atribuye que los CD modulan el diámetro hidrodinámico de las NPs, pasando de 543 nm (NPs Vacías) a 123 nm (NPs CD), este efecto se conserva al agregar CD y Fx juntos, con un tamaño de 126 nm (NPs CDFx). Este efecto también se presentó en las mediciones de tamaño por TEM, pasando de 223.5 nm (NPs Vacías) a 88.74 nm (NPs CDFx) (Figura 22 c), Además, se obtiene un aumento de la citocompatibilidad con un 92.18 % para las NPs CDFx (Figura 24).

Mientras que para los ensayos de expresión de genes mediante qPCR, en el gen de APP, las NPs CDFx presentan una reducción de la expresión relativa de 9.17 veces, para el gen de GFAP se presenta una reducción de 45.45 veces. Mientras que en S100 β se observa una reducción de la expresión de 28.57 veces, por último, en el gen de IL-6 se observa un aumento de 0.8 veces, comparado con el grupo estimulado con LPS. En este caso se destaca la reducción de la expresión relativa causada por la Fx en los genes como APP, S100 β e IL-6, el cual se mantiene al evaluar el sistema completo de NPs CDFx. Por otro lado, las NPs vacías mostraron un efecto en la reducción de la expresión de GFAP, el cual puede atribuirse al núcleo de PLGA, el cual ayudó a reducir la expresión cuando se incorporaron ambos compuestos en las NPs.

Finalmente, se comprobó que las NPs CD y NPs CDFx cruzan la BHE (Figura 27 d, e, f) mediante mediciones de fluorescencia proveniente de los CD, en este caso se detectó una mejor respuesta al microinyectar NPs CDFx, puesto que encapsulan un 10% de CD comparado con el 6% que encapsulan las NPs CD. Para las formulaciones de NPs Vacías y NPs Fx, no se obtuvo fluorescencia, lo cual es esperado debido a que no contenían CD, no podemos asegurar la presencia de estas NPs en el cerebro, debido a que poseen un tamaño mayor pudiendo afectar su paso por la BHE.

La formulación de las NPs CDFx se muestra prometedora, con un porcentaje de citocompatibilidad adecuado, buen porcentaje de encapsulación, reducción de la expresión de los genes más importantes de la EA y un buen tamaño para esta aplicación, estas NPs poseen la capacidad de un material terapéutico, sirviendo para la detección de las NPs y tratamiento a la vez.

Capítulo 4. Conclusiones

En este trabajo se estudió el efecto antiinflamatorio de las nanopartículas híbridas polímero-lípido cargadas con puntos de carbono y fucoxantina, las cuales se evaluaron en un modelo de astrocitos de rata estimulados con LPS.

Se obtuvieron 4 tipos diferentes de nanopartículas, las cuales son: vacías, cargadas con puntos de carbono, cargadas con fucoxantina y cargadas con ambos compuestos.

Se observó un efecto sinérgico al encapsular puntos de carbono y fucoxantina en conjunto. Este efecto resultó en un aumento de la citocompatibilidad de las nanopartículas, atribuido a los puntos de carbono. Se aumentó el porcentaje de encapsulación de 27.5% a 45% para la fucoxantina y de 6% a 10% para los puntos de carbono. Se obtuvieron nanopartículas cargadas con ambos compuestos con un diámetro hidrodinámico de 126 ± 7.8 nm, al medir el tamaño de estas en TEM se obtuvieron nanopartículas de 88 nm.

Las NPs CDFx (1 mg/mL) modularon favorablemente la expresión de los genes APP, GFAP y S100 β reduciendo la inflamación inducida en los astrocitos de rata estimulados con LPS. Bajo estas condiciones se obtuvo una sobreexpresión del gen de IL-6.

Se comprobó que las nanopartículas que contienen puntos de carbono son capaces de llegar al cerebro en un modelo de *Danio rerio*, estos resultados sugieren que las nanopartículas logran acumularse en esta área, liberando los puntos de carbono y la fucoxantina para llevar a cabo la reducción de marcadores proinflamatorios *in vivo*.

Este trabajo contribuye a la generación de nuevo conocimiento al estudiar, por primera vez, el efecto sinérgico de la encapsulación conjunta de la fucoxantina y los puntos de carbono. Además, se hace una aportación en uno de los principales desafíos de las enfermedades neurodegenerativas y la terapia dirigida: la barrera hematoencefálica. El entendimiento de esta información y el uso de este tipo de nanopartículas, junto con sus características fisicoquímicas, proporciona nuevas herramientas para avanzar en la investigación de las enfermedades neurodegenerativas.

Literatura citada

- Ahmaditabar, P., Momtazi-Borojeni, A. A., Rezayan, A. H., Mahmoodi, M., Sahebkar, A., & Mellat, M. (2017). Enhanced Entrapment and Improved in Vitro Controlled Release of N-Acetyl Cysteine in Hybrid PLGA/Lecithin Nanoparticles Prepared Using a Nanoprecipitation/Self-Assembly Method. *Journal of Cellular Biochemistry*, 118(12), 4203–4209. <https://doi.org/10.1002/jcb.26070>
- Almeida, T. P., Ferreira, J., Vettorazzi, A., Azqueta, A., Rocha, E., & Ramos, A. A. (2018). Cytotoxic activity of fucoxanthin, alone and in combination with the cancer drugs imatinib and doxorubicin, in CML cell lines. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 59, 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.02.006>
- Alzheimer's Association. (2023). 2023 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 19(4), 1598–1695. <https://doi.org/10.1002/alz.13016>
- Alzheimer's Association. (2024a). 2024 Alzheimer's disease facts and figures. <https://www.alz.org/media/Documents/alzheimers-facts-and-figures.pdf>
- Alzheimer's Association. (2024b). *Medications for Memory, Cognition and Dementia-Related Behaviors*. <https://www.alz.org/alzheimers-dementia/treatments/medications-for-memory>
- Alzheimer's Association Report. (2020). 2020 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 16(3), 391–460. <https://doi.org/10.1002/alz.12068>
- Alzheimer's Disease International. (2022). New study predicts the number of people living with Alzheimer's disease to triple by 2050. <https://www.alzint.org/news-events/news/new-data-predicts-the-number-of-people-living-with-alzheimers-disease-to-triple-by-2050/>
- Amato, F., Soares, M. C. P., Cabral, T. D., Fujiwara, E., Cordeiro, C. M. D. B., Criado, A., Prato, M., & Bartoli, J. R. (2021). Agarose-Based Fluorescent Waveguide with Embedded Silica Nanoparticle–Carbon Nanodot Hybrids for pH Sensing. *ACS Applied Nano Materials*, 4(9), 9738–9751. <https://doi.org/10.1021/acsnm.1c02127>
- Arunkumar, K., Nalluri, M., Anjana, K., Mohan, G., & Raja, R. (2023). Fucoxanthin as antioxidant, anti-hyaluronidase and cytotoxic agent: Potential of brown seaweeds decoction for tea supplement. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 17(4), 3980–3989. <https://doi.org/10.1007/s11694-023-01911-x>
- Asadi, H., Rostamizadeh, K., Salari, D., & Hamidi, M. (2011). Preparation of biodegradable nanoparticles of tri-block PLA–PEG–PLA copolymer and determination of factors controlling the particle size using artificial neural network. *Journal of Microencapsulation*, 28(5), 406–416. <https://doi.org/10.3109/02652048.2011.576784>
- Ashrafizadeh, M., Mohammadinejad, R., Kailasa, S. K., Ahmadi, Z., Afshar, E. G., & Pardakhty, A. (2020). Carbon dots as versatile nanoarchitectures for the treatment of neurological

- disorders and their theranostic applications: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 278, 102123. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102123>
- Blank, M., Enzlein, T., & Hopf, C. (2022). LPS-induced lipid alterations in microglia revealed by MALDI mass spectrometry-based cell fingerprinting in neuroinflammation studies. *Scientific Reports*, 12(1), 2908. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06894-1>
- Blennow, K., Hampel, H., Weiner, M., & Zetterberg, H. (2010). Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*, 6(3), 131–144. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2010.4>
- Cao, J., Hou, J., Ping, J., & Cai, D. (2018). Advances in developing novel therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 13(1), 64. <https://doi.org/10.1186/s13024-018-0299-8>
- Cebers, G., Alexander, R. C., Haeberlein, S. B., Han, D., Goldwater, R., Ereshefsky, L., Olsson, T., Ye, N., Rosen, L., Russell, M., Maltby, J., Eketjäll, S., & Kugler, A. R. (2016). AZD3293: Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Effects in Healthy Subjects and Patients with Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 55(3), 1039–1053. <https://doi.org/10.3233/JAD-160701>
- Chakroborty, S., & Stutzmann, G. E. (2014). Calcium channelopathies and Alzheimer's disease: Insight into therapeutic success and failures. *European Journal of Pharmacology*, 739, 83–95. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.11.012>
- Chan, J. M., Zhang, L., Yuet, K. P., Liao, G., Rhee, J.-W., Langer, R., & Farokhzad, O. C. (2009). PLGA–lecithin–PEG core–shell nanoparticles for controlled drug delivery. *Biomaterials*, 30(8), 1627–1634. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.12.013>
- Chen, Y., Lu, H., Ding, Y., Liu, S., Ding, Y., Lu, B., Xiao, J., & Zhou, X. (2023). Dietary Protective Potential of Fucoxanthin as an Active Food Component on Neurological Disorders. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(8), 3599–3619. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c08249>
- Cho, K. S., Shin, M., Kim, S., & Lee, S. B. (2018). Recent Advances in Studies on the Therapeutic Potential of Dietary Carotenoids in Neurodegenerative Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2018/4120458>
- Choudhari, M., Hejmady, S., Narayan Saha, R., Damle, S., Singhvi, G., Alexander, A., Kesharwani, P., & Kumar Dubey, S. (2021). Evolving new-age strategies to transport therapeutics across the blood-brain-barrier. *International Journal of Pharmaceutics*, 599, 120351. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120351>
- Coulson, D. T., Brockbank, S., Quinn, J. G., Murphy, S., Ravid, R., Irvine, G. B., & Johnston, J. A. (2008). Identification of valid reference genes for the normalization of RT qPCR gene expression data in human brain tissue. *BMC Molecular Biology*, 9(1), 46. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-9-46>

- Cristóvão, J. S., & Gomes, C. M. (2019). S100 Proteins in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 463. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00463>
- Da Silva, V. B., De Andrade, P., Kawano, D. F., Morais, P. A. B., De Almeida, J. R., Carvalho, I., Taft, C. A., & Da Silva, C. H. T. D. P. (2011). *In silico* design and search for acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease with a suitable pharmacokinetic profile and low toxicity. *Future Medicinal Chemistry*, 3(8), 947–960. <https://doi.org/10.4155/fmc.11.67>
- DiSabato, D. J., Quan, N., & Godbout, J. P. (2016). Neuroinflammation: The devil is in the details. *Journal of Neurochemistry*, 139(S2), 136–153. <https://doi.org/10.1111/jnc.13607>
- Disterhoft, J. F., Moyer, J. R., & Thompson, L. T. (2006). The Calcium Rationale in Aging and Alzheimer's Disease: Evidence from an Animal Model of Normal Aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 747(1), 382–406. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1994.tb44424.x>
- Dong, C., Ma, X., Huang, Y., Zhang, Y., & Gao, X. (2022). Carbon dots nanozyme for anti-inflammatory therapy via scavenging intracellular reactive oxygen species. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 943399. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.943399>
- Doolittle, N. D., Abrey, L. E., Bleyer, W. A., Brem, S., Davis, T. P., Dore-Duffy, P., Drewes, L. R., Hall, W. A., Hoffman, J. M., Korfel, A., Martuza, R., Muldoon, L. L., Peereboom, D., Peterson, D. R., Rabkin, S. D., Smith, Q., Stevens, G. H. J., & Neuwelt, E. A. (2005). New Frontiers in Translational Research in Neuro-oncology and the Blood-Brain Barrier: Report of the Tenth Annual Blood-Brain Barrier Disruption Consortium Meeting. *Clinical Cancer Research*, 11(2), 421–428. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.421.11.2>
- Fang, R. H., Aryal, S., Hu, C.-M. J., & Zhang, L. (2010). Quick Synthesis of Lipid-Polymer Hybrid Nanoparticles with Low Polydispersity Using a Single-Step Sonication Method. *Langmuir*, 26(22), 16958–16962. <https://doi.org/10.1021/la103576a>
- Ferrucci, L., & Fabbri, E. (2018). Inflammageing: Chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. *Nature Reviews Cardiology*, 15(9), 505–522. <https://doi.org/10.1038/s41569-018-0064-2>
- Fluhrer, R., Capell, A., Westmeyer, G., Willem, M., Hartung, B., Condrón, M. M., Teplow, D. B., Haass, C., & Walter, J. (2002). A non-amyloidogenic function of BACE-2 in the secretory pathway: Distinct β APP cleavage by BACE-1 and BACE-2. *Journal of Neurochemistry*, 81(5), 1011–1020. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00908.x>
- Gao, W., He, J., Chen, L., Meng, X., Ma, Y., Cheng, L., Tu, K., Gao, X., Liu, C., Zhang, M., Fan, K., Pang, D.-W., & Yan, X. (2023). Deciphering the catalytic mechanism of superoxide dismutase activity of carbon dot nanozyme. *Nature Communications*, 14(1), 160. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-35828-2>
- Ghanemi, A. (2015). Alzheimer's disease therapies: Selected advances and future perspectives. *Alexandria Journal of Medicine*, 51(1), 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2014.09.006>

- Giuffrida, M. L., Caraci, F., Pignataro, B., Cataldo, S., De Bona, P., Bruno, V., Molinaro, G., Pappalardo, G., Messina, A., Palmigiano, A., Garozzo, D., Nicoletti, F., Rizzarelli, E., & Copani, A. (2009). β -Amyloid Monomers Are Neuroprotective. *The Journal of Neuroscience*, 29(34), 10582–10587. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1736-09.2009>
- Goate, A., Chartier-Harlin, M.-C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., Mant, R., Newton, P., Rooke, K., Roques, P., Talbot, C., Pericak-Vance, M., Roses, A., Williamson, R., Rossor, M., ... Hardy, J. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, 349(6311), 704–706. <https://doi.org/10.1038/349704a0>
- Guo, C. X., Zhao, D., Zhao, Q., Wang, P., & Lu, X. (2014). Na⁺-functionalized carbon quantum dots: A new draw solute in forward osmosis for seawater desalination. *Chemical Communications*, 50(55), 7318. <https://doi.org/10.1039/c4cc01603c>
- Guzmán Uribe, C. (2022). *Diseño y evaluación de un hidrogel cargado con puntos cuánticos de carbono conjugados con un inhibidor de beta secretasa, en un modelo de Alzheimer*. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/3778>
- Haes, A. J., Chang, L., Klein, W. L., & Van Duyne, R. P. (2005). Detection of a Biomarker for Alzheimer's Disease from Synthetic and Clinical Samples Using a Nanoscale Optical Biosensor. *Journal of the American Chemical Society*, 127(7), 2264–2271. <https://doi.org/10.1021/ja044087q>
- Hampel, H., Vassar, R., De Strooper, B., Hardy, J., Willem, M., Singh, N., Zhou, J., Yan, R., Vanmechelen, E., De Vos, A., Nisticò, R., Corbo, M., Imbimbo, B. P., Streffer, J., Voytyuk, I., Timmers, M., Tahami Monfared, A. A., Irizarry, M., Albala, B., ... Vergallo, A. (2021). The β -Secretase BACE1 in Alzheimer's Disease. *Biological Psychiatry*, 89(8), 745–756. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2020.02.001>
- Han, X., Jing, Z., Wu, W., Zou, B., Peng, Z., Ren, P., Wikramanayake, A., Lu, Z., & Leblanc, R. M. (2017). Biocompatible and blood–brain barrier permeable carbon dots for inhibition of A β fibrillation and toxicity, and BACE1 activity. *Nanoscale*, 9(35), 12862–12866. <https://doi.org/10.1039/C7NR04352J>
- Harrison, S. M., Harper, A. J., Hawkins, J., Duddy, G., Grau, E., Pugh, P. L., Winter, P. H., Shilliam, C. S., Hughes, Z. A., Dawson, L. A., Gonzalez, M. I., Upton, N., Pangalos, M. N., & Dingwall, C. (2003). BACE1 (β -secretase) transgenic and knockout mice: Identification of neurochemical deficits and behavioral changes. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 24(3), 646–655. [https://doi.org/10.1016/S1044-7431\(03\)00227-6](https://doi.org/10.1016/S1044-7431(03)00227-6)
- Holtzman, D. M., Morris, J. C., & Goate, A. M. (2011). Alzheimer's Disease: The Challenge of the Second Century. *Science Translational Medicine*, 3(77). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002369>
- Hsiao, C.-C., Rombouts, F., & Gijsen, H. J. M. (2019). New evolutions in the BACE1 inhibitor field from 2014 to 2018. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 29(6), 761–777. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.12.049>

- Innocenzi, P., & Stagi, L. (2023). Carbon dots as oxidant-antioxidant nanomaterials, understanding the structure-properties relationship. A critical review. *Nano Today*, *50*, 101837. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2023.101837>
- International Organization for Standardization. (2009). *ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity* (3. ^a ed.). <https://nhiso.com/wp-content/uploads/2018/05/ISO-10993-5-2009.pdf>
- Ionescu-Tucker, A., & Cotman, C. W. (2021). Emerging roles of oxidative stress in brain aging and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, *107*, 86–95. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2021.07.014>
- Jaiswal, J., Srivastav, A. K., Patel, R., & Kumar, U. (2022). Synthesis and physicochemical characterization of rhamnolipid fabricated fucoxanthin loaded bovine serum albumin nanoparticles supported by simulation studies. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *102*(12), 5468–5477. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11901>
- Jeong, J.-Y., Kwon, H.-B., Ahn, J.-C., Kang, D., Kwon, S.-H., Park, J. A., & Kim, K.-W. (2008). Functional and developmental analysis of the blood–brain barrier in zebrafish. *Brain Research Bulletin*, *75*(5), 619–628. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2007.10.043>
- Jessen, N. A., Munk, A. S. F., Lundgaard, I., & Nedergaard, M. (2015). The Glymphatic System: A Beginner's Guide. *Neurochemical Research*, *40*(12), 2583–2599. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1581-6>
- Jung, H. A., Ali, M. Y., Choi, R. J., Jeong, H. O., Chung, H. Y., & Choi, J. S. (2016). Kinetics and molecular docking studies of fucosterol and fucoxanthin, BACE1 inhibitors from brown algae *Undaria pinnatifida* and *Ecklonia stolonifera*. *Food and Chemical Toxicology*, *89*, 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.01.014>
- Kadry, H., Noorani, B., & Cucullo, L. (2020). A blood–brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity. *Fluids and Barriers of the CNS*, *17*(1), 69. <https://doi.org/10.1186/s12987-020-00230-3>
- Kennedy, M. E., Stamford, A. W., Chen, X., Cox, K., Cumming, J. N., Dockendorf, M. F., Egan, M., Ereshefsky, L., Hodgson, R. A., Hyde, L. A., Jhee, S., Kleijn, H. J., Kuvelkar, R., Li, W., Mattson, B. A., Mei, H., Palcza, J., Scott, J. D., Tanen, M., ... Forman, M. S. (2016). The BACE1 inhibitor verubecestat (MK-8931) reduces CNS β -amyloid in animal models and in Alzheimer's disease patients. *Science Translational Medicine*, *8*(363). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad9704>
- Kim, K.-N., Heo, S.-J., Yoon, W.-J., Kang, S.-M., Ahn, G., Yi, T.-H., & Jeon, Y.-J. (2010). Fucoxanthin inhibits the inflammatory response by suppressing the activation of NF- κ B and MAPKs in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *European Journal of Pharmacology*, *649*(1–3), 369–375. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.09.032>
- Knopman, D. S. (2023). Lecanemab reduces brain amyloid- β and delays cognitive worsening. *Cell Reports Medicine*, *4*(3), 100982. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2023.100982>

- Koneru, T., McCord, E., Pawar, S., Tatiparti, K., Sau, S., & Iyer, A. K. (2021). Transferrin: Biology and Use in Receptor-Targeted Nanotherapy of Gliomas. *ACS Omega*, 6(13), 8727–8733. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c05848>
- Kumar, V., Kumar, V., McGuire, T., Coulter, D. W., Sharp, J. G., & Mahato, R. I. (2017). Challenges and Recent Advances in Medulloblastoma Therapy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38(12), 1061–1084. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.09.002>
- Kung, J.-C., Tseng, I.-T., Chien, C.-S., Lin, S.-H., Wang, C.-C., & Shih, C.-J. (2020). Microwave assisted synthesis of negative-charge carbon dots with potential antibacterial activity against multi-drug resistant bacteria. *RSC Advances*, 10(67), 41202–41208. <https://doi.org/10.1039/D0RA07106D>
- Kurz, C., Walker, L., Rauchmann, B., & Pernecky, R. (2022). Dysfunction of the blood–brain barrier in Alzheimer’s disease: Evidence from human studies. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 48(3), e12782. <https://doi.org/10.1111/nan.12782>
- Lacor, P. N., Buniel, M. C., Furlow, P. W., Sanz Clemente, A., Velasco, P. T., Wood, M., Viola, K. L., & Klein, W. L. (2007). A β Oligomer-Induced Aberrations in Synapse Composition, Shape, and Density Provide a Molecular Basis for Loss of Connectivity in Alzheimer’s Disease. *The Journal of Neuroscience*, 27(4), 796–807. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3501-06.2007>
- Lambert, M. P., Barlow, A. K., Chromy, B. A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T. E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K. L., Wals, P., Zhang, C., Finch, C. E., Krafft, G. A., & Klein, W. L. (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β _{1–42} are potent central nervous system neurotoxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(11), 6448–6453. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.6448>
- Latronico, T., Rizzi, F., Panniello, A., Laquintana, V., Arduino, I., Denora, N., Fanizza, E., Milella, S., Mastroianni, C. M., Striccoli, M., Curri, M. L., Liuzzi, G. M., & Depalo, N. (2021). Luminescent PLGA Nanoparticles for Delivery of Darunavir to the Brain and Inhibition of Matrix Metalloproteinase-9, a Relevant Therapeutic Target of HIV-Associated Neurological Disorders. *ACS Chemical Neuroscience*, 12(22), 4286–4301. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.1c00436>
- Lawrence, J. M., Schardien, K., Wigdahl, B., & Nonnemacher, M. R. (2023). Roles of neuropathology-associated reactive astrocytes: A systematic review. *Acta Neuropathologica Communications*, 11(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s40478-023-01526-9>
- Lee, A.-H., Shin, H.-Y., Park, J.-H., Koo, S. Y., Kim, S. M., & Yang, S.-H. (2021). Fucoxanthin from microalgae *Phaeodactylum tricornutum* inhibits pro-inflammatory cytokines by regulating both NF- κ B and NLRP3 inflammasome activation. 11(1), 543. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80748-6>
- Leitner, D. F., & Connor, J. R. (2012). Functional roles of transferrin in the brain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1820(3), 393–402. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.10.016>

- Leng, F., & Edison, P. (2021). Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: Where do we go from here? *Nature Reviews Neurology*, 17(3), 157–172. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-00435-y>
- Leong, Y. K., Chen, C.-Y., Varjani, S., & Chang, J.-S. (2022). Producing fucoxanthin from algae – Recent advances in cultivation strategies and downstream processing. *Bioresource Technology*, 344, 126170. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126170>
- Li, H., Zhang, Y., Ding, J., Wu, T., Cai, S., Zhang, W., Cai, R., Chen, C., & Yang, R. (2022). Synthesis of carbon quantum dots for application of alleviating amyloid- β mediated neurotoxicity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 212, 112373. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112373>
- Li, S., Peng, Z., Dallman, J., Baker, J., Othman, A. M., Blackwelder, P. L., & Leblanc, R. M. (2016). Crossing the blood–brain–barrier with transferrin conjugated carbon dots: A zebrafish model study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 145, 251–256. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.05.007>
- Liddel, S. A., & Barres, B. A. (2017). Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity*, 46(6), 957–967. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.006>
- Lin, W. J. & Liu. (2012). Polymeric nanoparticles conjugate a novel heptapeptide as an epidermal growth factor receptor-active targeting ligand for doxorubicin. *International Journal of Nanomedicine*, 4749. <https://doi.org/10.2147/IJN.S32830>
- Liu, J., Li, R., & Yang, B. (2020). Carbon Dots: A New Type of Carbon-Based Nanomaterial with Wide Applications. *ACS Central Science*, 6(12), 2179–2195. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c01306>
- Liu, L., Wei, Y., Zhai, S., Chen, Q., & Xing, D. (2015). Dihydroartemisinin and transferrin dual-dressed nano-graphene oxide for a pH-triggered chemotherapy. *Biomaterials*, 62, 35–46. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.05.036>
- Liu, Y.-Y., Yu, N.-Y., Fang, W.-D., Tan, Q.-G., Ji, R., Yang, L.-Y., Wei, S., Zhang, X.-W., & Miao, A.-J. (2021). Photodegradation of carbon dots cause cytotoxicity. *Nature Communications*, 12(1), 812. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21080-z>
- Llanos-González, E., Henares-Chavarino, Á. A., Pedrero-Prieto, C. M., García-Carpintero, S., Frontiñán-Rubio, J., Sancho-Bielsa, F. J., Alcain, F. J., Peinado, J. R., Rabanal-Ruiz, Y., & Durán-Prado, M. (2020). Interplay Between Mitochondrial Oxidative Disorders and Proteostasis in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 1444. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01444>
- Lourenço-Lopes, C., Fraga-Corral, M., Jimenez-Lopez, C., Carpena, M., Pereira, A. G., Garcia-Oliveira, P., Prieto, M. A., & Simal-Gandara, J. (2021). Biological action mechanisms of fucoxanthin extracted from algae for application in food and cosmetic industries. *Trends in Food Science & Technology*, 117, 163–181. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.012>

- Lyra E Silva, N. M., Gonçalves, R. A., Pascoal, T. A., Lima-Filho, R. A. S., Resende, E. D. P. F., Vieira, E. L. M., Teixeira, A. L., De Souza, L. C., Peny, J. A., Fortuna, J. T. S., Furigo, I. C., Hashiguchi, D., Miya-Coreixas, V. S., Clarke, J. R., Abisambra, J. F., Longo, B. M., Donato, J., Fraser, P. E., Rosa-Neto, P., ... De Felice, F. G. (2021). Pro-inflammatory interleukin-6 signaling links cognitive impairments and peripheral metabolic alterations in Alzheimer's disease. *Translational Psychiatry*, 11(1), 251. <https://doi.org/10.1038/s41398-021-01349-z>
- Magesh, V., Sundramoorthy, A. K., & Ganapathy, D. (2022). Recent Advances on Synthesis and Potential Applications of Carbon Quantum Dots. *Frontiers in Materials*, 9, 906838. <https://doi.org/10.3389/fmats.2022.906838>
- Maiti, D., Tong, X., Mou, X., & Yang, K. (2019). Carbon-Based Nanomaterials for Biomedical Applications: A Recent Study. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1401. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01401>
- Mangialasche, F., Solomon, A., Winblad, B., Mecocci, P., & Kivipelto, M. (2010). Alzheimer's disease: Clinical trials and drug development. *The Lancet Neurology*, 9(7), 702–716. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70119-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70119-8)
- Martindale, B. C. M., Hutton, G. A. M., Caputo, C. A., & Reisner, E. (2015). Solar Hydrogen Production Using Carbon Quantum Dots and a Molecular Nickel Catalyst. *Journal of the American Chemical Society*, 137(18), 6018–6025. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b01650>
- Matos, T. M., & Souza-Talarico, J. N. D. (2019). How stress mediators can cumulatively contribute to Alzheimer's disease An allostatic load approach. *Dementia & Neuropsychologia*, 13(1), 11–21. <https://doi.org/10.1590/1980-57642018dn13-010002>
- May, P. C., Willis, B. A., Lowe, S. L., Dean, R. A., Monk, S. A., Cocke, P. J., Audia, J. E., Boggs, L. N., Borders, A. R., Brier, R. A., Calligaro, D. O., Day, T. A., Ereshefsky, L., Erickson, J. A., Gevorkyan, H., Gonzales, C. R., James, D. E., Jhee, S. S., Komjathy, S. F., ... Mergott, D. J. (2015). The Potent BACE1 Inhibitor LY2886721 Elicits Robust Central A β Pharmacodynamic Responses in Mice, Dogs, and Humans. *The Journal of Neuroscience*, 35(3), 1199–1210. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4129-14.2015>
- Mead, S., & Fox, N. C. (2023). Lecanemab slows Alzheimer's disease: Hope and challenges. *The Lancet Neurology*, 22(2), 106–108. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(22\)00529-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(22)00529-4)
- Meraz-Ríos, M. A., Toral-Rios, D., Franco-Bocanegra, D., Villeda-Hernández, J., & Campos-Peña, V. (2013). Inflammatory process in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 7. <https://doi.org/10.3389/fnint.2013.00059>
- Min, C. K., Dockendorf, M. F., Palcza, J., Tseng, J., Ma, L., Stone, J. A., Kleijn, H. J., Hodzman, P., Masuo, K., Tanen, M., Troyer, M. D., Van Vugt, M., & Forman, M. S. (2019). Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of the BACE 1 Inhibitor Verubecestat (MK -8931) in Healthy Japanese Adults: A Randomized, Placebo-Controlled Study. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 105(5), 1234–1243. <https://doi.org/10.1002/cpt.1258>
- Mirzaei, S., Zarrabi, A., Hashemi, F., Zabolian, A., Saleki, H., Ranjbar, A., Seyed Saleh, S. H., Bagherian, M., Sharifzadeh, S. O., Hushmandi, K., Liskova, A., Kubatka, P., Makvandi, P., Tergaonkar, V.,

- Kumar, A. P., Ashrafizadeh, M., & Sethi, G. (2021). Regulation of Nuclear Factor-KappaB (NF- κ B) signaling pathway by non-coding RNAs in cancer: Inhibiting or promoting carcinogenesis? *Cancer Letters*, 509, 63–80. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.03.025>
- Mo, X., Liu, E., & Huang, Y. (2019). The intra-brain distribution of brain targeting delivery systems. En *Brain Targeted Drug Delivery System* (pp. 409–438). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814001-7.00016-0>
- Mudalige, T., Qu, H., Van Haute, D., Ansar, S. M., Paredes, A., & Ingle, T. (2019). Characterization of Nanomaterials. En *Nanomaterials for Food Applications* (pp. 313–353). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814130-4.00011-7>
- Obaid, A. A., Almasmoum, H., Almainani, R. A., El-Boshy, M., Aslam, A., Idris, S., Ghaith, M. M., El-Readi, M. Z., Ahmad, J., Farrash, W. F., Mujalli, A., Eid, S. Y., Elzubier, M. E., & Refaat, B. (2023). Vitamin D and calcium co-therapy mitigates pre-established cadmium nephropathy by regulating renal calcium homeostatic molecules and improving anti-oxidative and anti-inflammatory activities in rat. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 79, 127221. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2023.127221>
- Oddo, S., Caccamo, A., Tseng, B., Cheng, D., Vasilevko, V., Cribbs, D. H., & LaFerla, F. M. (2008). Blocking A β ₄₂ Accumulation Delays the Onset and Progression of Tau Pathology via the C Terminus of Heat Shock Protein70-Interacting Protein: A Mechanistic Link between A β and Tau Pathology. *The Journal of Neuroscience*, 28(47), 12163–12175. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2464-08.2008>
- Oliyaei, N., Moosavi-Nasab, M., Tanideh, N., & Iraj, A. (2023). Multiple roles of fucoxanthin and astaxanthin against Alzheimer's disease: Their pharmacological potential and therapeutic insights. *Brain Research Bulletin*, 193, 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2022.11.018>
- Ozben, T., & Ozben, S. (2019). Neuro-inflammation and anti-inflammatory treatment options for Alzheimer's disease. *Clinical Biochemistry*, 72, 87–89. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2019.04.001>
- Pekny, M., Pekna, M., Messing, A., Steinhäuser, C., Lee, J.-M., Parpura, V., Hol, E. M., Sofroniew, M. V., & Verkhratsky, A. (2016). Astrocytes: A central element in neurological diseases. *Acta Neuropathologica*, 131(3), 323–345. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1513-1>
- Peng, Y., Jin, H., Xue, Y., Chen, Q., Yao, S., Du, M., & Liu, S. (2023). Current and future therapeutic strategies for Alzheimer's disease: An overview of drug development bottlenecks. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 15, 1206572. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2023.1206572>
- Peng, Z., Han, X., Li, S., Al-Youbi, A. O., Bashammakh, A. S., El-Shahawi, M. S., & Leblanc, R. M. (2017). Carbon dots: Biomacromolecule interaction, bioimaging and nanomedicine. *Coordination Chemistry Reviews*, 343, 256–277. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.06.001>
- Persidsky, Y., Ramirez, S. H., Haorah, J., & Kanmogne, G. D. (2006). Blood–brain Barrier: Structural Components and Function Under Physiologic and Pathologic Conditions. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 1(3), 223–236. <https://doi.org/10.1007/s11481-006-9025-3>

- Portelius, E., Price, E., Brinkmalm, G., Stiteler, M., Olsson, M., Persson, R., Westman-Brinkmalm, A., Zetterberg, H., Simon, A. J., & Blennow, K. (2011). A novel pathway for amyloid precursor protein processing. *Neurobiology of Aging*, 32(6), 1090–1098. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.06.002>
- Pradhan, N., & Jana, N. R. (2024). Nanomodulators That Target Alzheimer's Disease: A Review. *ACS Applied Nano Materials*, 7(4), 3515–3545. <https://doi.org/10.1021/acsanm.3c04846>
- Price, B. R., Johnson, L. A., & Norris, C. M. (2021). Reactive astrocytes: The nexus of pathological and clinical hallmarks of Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews*, 68, 101335. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101335>
- Puzzo, D., Privitera, L., Leznik, E., Fà, M., Staniszewski, A., Palmeri, A., & Arancio, O. (2008). Picomolar Amyloid- β Positively Modulates Synaptic Plasticity and Memory in Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 28(53), 14537–14545. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2692-08.2008>
- Ramalho, M. J., Torres, I. D., Loureiro, J. A., Lima, J., & Pereira, M. C. (2023). Transferrin-Conjugated PLGA Nanoparticles for Co-Delivery of Temozolomide and Bortezomib to Glioblastoma Cells. *ACS Applied Nano Materials*, 6(15), 14191–14203. <https://doi.org/10.1021/acsanm.3c02122>
- Rosiuk, V., Runser, A., Klymchenko, A., & Reisch, A. (2019). Controlling Size and Fluorescence of Dye-Loaded Polymer Nanoparticles through Polymer Design. *Langmuir*, 35(21), 7009–7017. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b00721>
- Saleem, S., & Kannan, R. R. (2021). Zebrafish: A Promising Real-Time Model System for Nanotechnology-Mediated Neurospecific Drug Delivery. *Nanoscale Research Letters*, 16(1), 135. <https://doi.org/10.1186/s11671-021-03592-1>
- Seady, M., Schirmbeck, G., Taday, J., Fróes, F. T., Baú, J. V., Jantsch, J., Guedes, R. P., Gonçalves, C.-A., & Leite, M. C. (2025). Curcumin attenuates neuroinflammatory damage induced by LPS: Implications for the role of S100B. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 135, 109768. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2024.109768>
- Selkoe, D. J., & Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Molecular Medicine*, 8(6), 595–608. <https://doi.org/10.15252/emmm.201606210>
- Sethi, B., Kumar, V., Mahato, K., Coulter, D. W., & Mahato, R. I. (2022). Recent advances in drug delivery and targeting to the brain. *Journal of Controlled Release*, 350, 668–687. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.08.051>
- Shi, W., Wang, Q., Long, Y., Cheng, Z., Chen, S., Zheng, H., & Huang, Y. (2011). Carbon nanodots as peroxidase mimetics and their applications to glucose detection. *Chemical Communications*, 47(23), 6695. <https://doi.org/10.1039/c1cc11943e>
- Singh, S. K., Srikrishna, S., Castellani, R. J., & Perry, G. (2017). Antioxidants in the Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease. En K. H. Al-Gubory & I. Laher (Eds.), *Nutritional*

- Antioxidant Therapies: Treatments and Perspectives* (pp. 523–553). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-67625-8_20
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1), 7–35. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
- Stelzmann, R. A., Norman Schnitzlein, H., & Reed Murtagh, F. (1995). An english translation of alzheimer's 1907 paper, Über eine eigenartige erkankung der hirnrinde? *Clinical Anatomy*, 8(6), 429–431. <https://doi.org/10.1002/ca.980080612>
- Suwanmanee, G., Tantrawatpan, C., Kheolamai, P., Paraoan, L., & Manochantr, S. (2023). Fucoxanthin diminishes oxidative stress damage in human placenta-derived mesenchymal stem cells through the PI3K/Akt/Nrf-2 pathway. *Scientific Reports*, 13(1), 22974. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-49751-5>
- Tahami Monfared, A. A., Byrnes, M. J., White, L. A., & Zhang, Q. (2022). The Humanistic and Economic Burden of Alzheimer's Disease. *Neurology and Therapy*, 11(2), 525–551. <https://doi.org/10.1007/s40120-022-00335-x>
- Tahir, N., Madni, A., Correia, A., Rehman, M., Balasubramanian, V., Khan, M. M., & Santos, H. A. (2019). Lipid-polymer hybrid nanoparticles for controlled delivery of hydrophilic and lipophilic doxorubicin for breast cancer therapy. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 14, 4961–4974. <https://doi.org/10.2147/IJN.S209325>
- Thermo Scientific. (2019). 260/280 and 260/230 Ratios. https://dna.uga.edu/wp-content/uploads/sites/51/2019/02/Note-on-the-260_280-and-260_230-Ratios.pdf
- VanRyzin, J. W., Arambula, S. E., Ashton, S. E., Blanchard, A. C., Burzinski, M. D., Davis, K. T., Edwards, S., Graham, E. L., Holley, A., Kight, K. E., Marquardt, A. E., Perez-Pouchoulen, M., Pickett, L. A., Reinl, E. L., & McCarthy, M. M. (2021). Generation of an Iba1-EGFP Transgenic Rat for the Study of Microglia in an Outbred Rodent Strain. *Eneuro*, 8(5). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0026-21.2021>
- Vargas-Barona, A., Bernáldez-Sarabia, J., & Castro-Ceseña, A. B. (2024). Lipid–polymer hybrid nanoparticles loaded with N -acetylcysteine for the modulation of neuroinflammatory biomarkers in human iPSC-derived PSEN2 (N141I) astrocytes as a model of Alzheimer's disease. *Journal of Materials Chemistry B*. <https://doi.org/10.1039/D4TB00521J>
- Wang, K. (2010). Expression of interleukin 6 in brain and colon of rats with TNBS-induced colitis. *World Journal of Gastroenterology*, 16(18), 2252. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i18.2252>
- Wang, Y., Li, P., & Kong, L. (2013). Chitosan-Modified PLGA Nanoparticles with Versatile Surface for Improved Drug Delivery. *AAPS PharmSciTech*, 14(2), 585–592. <https://doi.org/10.1208/s12249-013-9943-3>
- Wang, Z.-G., Wang, L., Lamb, D. C., Chen, H.-J., Hu, Y., Wang, H.-P., Pang, D.-W., & Liu, S.-L. (2021). Real-Time Dissecting the Dynamics of Drug Transportation in the Live Brain. *Nano Letters*, 21(1), 642–650. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c04216>

- Weggen, S., & Beher, D. (2012). Molecular consequences of amyloid precursor protein and presenilin mutations causing autosomal-dominant Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy*, 4(2), 9. <https://doi.org/10.1186/alzrt107>
- Wessels, A. M., Lines, C., Stern, R. A., Kost, J., Voss, T., Mozley, L. H., Furtek, C., Mukai, Y., Aisen, P. S., Cummings, J. L., Tariot, P. N., Vellas, B., Dupre, N., Randolph, C., Michelson, D., Andersen, S. W., Shering, C., Sims, J. R., & Egan, M. F. (2020). Cognitive outcomes in trials of two BACE inhibitors in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 16(11), 1483–1492. <https://doi.org/10.1002/alz.12164>
- World Health Organization. (2023). *Dementia*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
- Wu, D., Chen, Q., Chen, X., Han, F., Chen, Z., & Wang, Y. (2023). The blood–brain barrier: Structure, regulation, and drug delivery. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 217. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01481-w>
- Xie, J., Farage, E., Sugimoto, M., & Anand-Apte, B. (2010). A novel transgenic zebrafish model for blood-brain and blood-retinal barrier development. *BMC Developmental Biology*, 10(1), 76. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-10-76>
- Xu, X., Ray, R., Gu, Y., Ploehn, H. J., Gearheart, L., Raker, K., & Scrivens, W. A. (2004). Electrophoretic Analysis and Purification of Fluorescent Single-Walled Carbon Nanotube Fragments. *Journal of the American Chemical Society*, 126(40), 12736–12737. <https://doi.org/10.1021/ja040082h>
- Yan, R., & Vassar, R. (2014). Targeting the β secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy. *The Lancet Neurology*, 13(3), 319–329. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70276-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70276-X)
- Yang, D., Zhu, J., Huang, Z., Ren, H., & Zheng, Z. (2008). Synthesis and application of poly(ethylene glycol)–cholesterol (Chol–PEGm) conjugates in physicochemical characterization of nonionic surfactant vesicles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 63(2), 192–199. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.11.019>
- Yang, M., Jin, L., Wu, Z., Xie, Y., Zhang, P., Wang, Q., Yan, S., Chen, B., Liang, H., Naman, C. B., Zhang, J., He, S., Yan, X., Zhao, L., & Cui, W. (2021). PLGA-PEG Nanoparticles Facilitate In Vivo Anti-Alzheimer's Effects of Fucoxanthin, a Marine Carotenoid Derived from Edible Brown Algae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(34), 9764–9777. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c00569>
- Yang, S., Chen, Z., Zhou, P., Xia, J., Deng, T., & Yu, C. (2023). Carbon dots based on endogenous nutrients with visible and NIR fluorescence to penetrate blood-brain barrier. *Carbon*, 202, 130–140. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2022.10.067>
- Zeng, A., Ye, T., Cao, D., Huang, X., Yang, Y., Chen, X., Xie, Y., Yao, S., & Zhao, C. (2017). Identify a Blood-Brain Barrier Penetrating Drug-TNB using Zebrafish Orthotopic Glioblastoma Xenograft Model. *Scientific Reports*, 7(1), 14372. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14766-2>

- Zhang, Y., Chen, H., Li, R., Sterling, K., & Song, W. (2023). Amyloid β -based therapy for Alzheimer's disease: Challenges, successes and future. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 248. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01484-7>
- Zhao, X., Shi, C., Zhou, X., Lin, T., Gong, Y., Yin, M., Fan, L., Wang, W., & Fang, J. (2019). Preparation of a nanoscale dihydromyricetin-phospholipid complex to improve the bioavailability: In vitro and in vivo evaluations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 138, 104994. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.104994>
- Zhao, Y., Yang, Q., Liu, D., Liu, T., & Xing, L. (2022). Neurotoxicity of nanoparticles: Insight from studies in zebrafish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 242, 113896. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113896>
- Zheng, Y., Deng, Y., Gao, J., Lv, C., Lang, L., Shi, J., Yu, C., & Gong, Q. (2020). Icariside II inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation and amyloid production in rat astrocytes by regulating IKK/I κ B/NF- κ B/BACE1 signaling pathway. *Acta Pharmacologica Sinica*, 41(2), 154–162. <https://doi.org/10.1038/s41401-019-0300-2>