

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 SECIHTI (Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación).

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**

**Encapsulación de Sonlicromanol: un potencial agente
terapéutico para la enfermedad de Alzheimer**

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

Presenta:

Lorna Georgina Yañez Algandar

Ensenada, Baja California, México
2025

Tesis defendida por
Lorna Georgina Yañez Algandar

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Ana Bertha Castro Ceseña
Codirectora de tesis

Dra. Karina del Carmen Lugo Ibarra
Codirectora de tesis

Dr. Efraín Gómez Arias

Dr. Gustavo Alonso Hirata Flores



Dr. Alejandro Huerta Saquero
Coordinador del Posgrado en nanociencias

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Lorna Georgina Yañez Alandar** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Nanociencias

Encapsulación de Sonlicromanol: un potencial agente terapéutico para la 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 que empeora gradualmente con el paso del tiempo, ocasionando un deterioro en las funciones cognitivas. Su fisiopatología se asocia con la acumulación de placas β -amiloide y ovillos neurofibrilares, lo que desencadena procesos de neuroinflamación crónica. La Administración de Alimentos y Medicamentos ha aprobado algunos fármacos capaces de reducir algunos síntomas o ralentizar la progresión de la EA, sin embargo, actualmente no existe una cura. Ante este panorama, es fundamental el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas más eficientes. En este contexto, la nanotecnología ha emergido como una herramienta innovadora, mediante el desarrollo de nanopartículas capaces de transportar distintos agentes bioactivos y atravesar diferentes barreras biológicas, lo que facilita una administración localizada del tratamiento y mejorar su eficacia terapéutica. En este estudio, se sintetizaron nanopartículas híbridas polímero-lípido conjugadas con transferrina (Tf) para la encapsulación de Sonlicromanol y de puntos de carbono (NPs CD-S). El Sonlicromanol es un agente con propiedades antiinflamatorias, trata la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo, asociados a la EA. Mientras que los CD se emplearon por sus propiedades fluorescentes para obtener un material teranóstico. La Tf tiene el propósito de facilitar el cruce de las NPs CD-S a través de la barrera hematoencefálica. En la caracterización fisicoquímica de las NPs CD-S se obtuvo un tamaño hidrodinámico de 106.2 ± 7.1 nm y una carga superficial de -36.7 ± 1.1 mV, atribuida al atrapamiento del Sonlicromanol en la capa lipídica. Mostraron tener una capacidad de encapsulamiento de 34.07 ± 2.44 % para el Sonlicromanol y de 3.02 ± 0.33 % para los CD. Ambos componentes en NPs CD-S se liberaron progresivamente y completamente a las 8 horas bajo condiciones *in vitro*. Las NPs CD-S mostraron ser citocompatibles a concentraciones de 0.05, 0.1 y 0.25 mg/mL, manteniendo la viabilidad de los astrocitos de rata estimulados con lipopolisacárido en $86.66 \pm 2.64\%$, $79.83 \pm 3.37\%$ y 71.12 ± 3.14 %, respectivamente. Estos resultados sugieren que las NPs CD-S representan una formulación prometedora para su posterior evaluación como tratamiento de la EA y posible nanomaterial como sistema teranóstico.

Palabras clave: enfermedad de Alzheimer, nanopartículas híbridas, Sonlicromanol, puntos de carbono, astrocitos

Abstract of the thesis presented by **Lorna Georgina Yañez Algandar** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Nanoscience

Encapsulation of Sonlicromanol: a potential therapeutic agent for 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 neurodegenerative disease that gradually worsens over time, causing a deterioration in cognitive functions. Its pathophysiology is associated with the accumulation of β -amyloid plaques and neurofibrillary tangles, which triggers chronic neuroinflammation processes. The Food and Drug Administration has approved some drugs capable of reducing some symptoms or slowing the progression of AD, however, there is currently no cure. Given this scenario, the development of new and more efficient therapeutic strategies is essential. In this context, nanotechnology has emerged as an innovating tool, through the development of nanoparticles capable of transporting different bioactive agents and crossing different biological barriers, which facilitates a localized administration of the treatment and improves its therapeutic efficacy. In this study, polymer-lipid hybrid nanoparticles conjugated with transferrin (Tf) were synthesized for the encapsulation of Sonlicromanol and carbon dots (NPs CD-S). Sonlicromanol is an agent with anti-inflammatory properties, treats mitochondrial dysfunction and oxidative stress, which are associated with AD. CD were used for their fluorescent properties to obtain a theranostic material. The purpose of Tf is to facilitate the crossing of NPs CD-S through the blood-brain barrier. The physicochemical characterization of NPs CD-S showed a hydrodynamic size of 106.2 ± 7.1 nm and a surface charge of -36.7 ± 1.1 mV, attributed to the encapsulation of Sonlicromanol in the lipid layer. The encapsulation capacity was $34.07 \pm 2.44\%$ for Sonlicromanol and $3.02 \pm 0.33\%$ for CD. Both components in NPs CD-S were progressively and completely released after 8 hours under *in vitro* conditions. The NPs CD-S were shown to be cytocompatible at concentrations of 0.05, 0.1, and 0.25 mg/mL, maintaining the viability of lipopolysaccharide stimulated rat astrocytes at $86.66 \pm 2.64\%$, $79.83 \pm 3.37\%$, and $71.12 \pm 3.14\%$, respectively. These results suggest that NPs CD-S represent a promising formulation for further evaluation as a treatment for AD and a possible nanomaterial as a theranostic system.

Keywords: Alzheimer's disease, hybrid nanoparticles, Sonlicromanol, carbon dots, astrocytes

Dedicatoria

A mis padres, Luis Yañez Ruiz y Bertha Leticia Algandar Moreno, quienes me han acompañado en cada paso y han sido parte fundamental de mi vida.

A mi nana, Bertha Moreno Vega, la cual siempre ha sido y será una inspiración para mí.

A la Dra. Ana Bertha Castro Ceseña y la Dra. Karina del Carmen Lugo Ibarra, por su guía y confianza.

Agradecimientos

Agradezco al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) y al Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNyN-UNAM), por brindarme la oportunidad de estudiar el posgrado en sus instalaciones, haberme aceptado en su programa de estudios y proporcionarme los recursos necesarios para alcanzar el grado de Maestro en Ciencias. A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI), por otorgarme una beca que me permitió avanzar en mis estudios. Y al proyecto interno CICESE 685-112 por financiar mi investigación.

Agradezco profundamente a mis codirectoras de tesis, Dra. Ana Bertha Castro Ceseña y la Dra. Karina del Carmen Lugo Ibarra, por darme la oportunidad de realizar esta investigación y por su apoyo incondicional, que me ha permitido crecer y mejorar. Su dedicación y compromiso han sido fundamentales para el éxito de este trabajo. A mi comité de tesis, el Dr. Gustavo Alonso Hirata Flores y el Dr. Efraín Gómez Arias, por su tiempo, sus observaciones y sus sugerencias, que ayudaron a enriquecer este trabajo.

Doy gracias a mi equipo de laboratorio de biomateriales, que siempre estaban dispuestos a compartir sus conocimientos conmigo y por acogerme como parte de esta familia. Muchas gracias, Ximena Cesati, Ricardo Colin, Gabriela Carballo y Shaula Castro por su disponibilidad y amabilidad. Pero, en especial quiero agradecerles a Lizeth Tello, quien ha sido una gran compañera y amiga durante nuestro desarrollo profesional, ya que juntas nos atrevimos a iniciar esta nueva aventura; espero que sigamos creciendo juntas y verte lograr alcanzar tus sueños. Y, por último, al hermanito que me mandó Dios y muy querido amigo Horacio Silvestre, agradezco mucho a la vida por haberme topado contigo y con tu esposa Marlene. Eres un grandioso maestro e investigador, y te esperan grandes cosas.

A mis amigos de toda la vida, quienes han estado a mi lado en cada paso, su amistad y apoyo ha sido fundamental en mi camino. A mis compañeros de generación, ya que me hicieron este camino más ameno, de los cuales guardaré muchos recuerdos de convivencia, algunas muy divertidas y otras muy estresantes, pero al final salimos adelante, y lo mejor es que algunos de ellos serán amigos para siempre.

A mi familia, por compartir conmigo momentos de alegría, amor, apoyo y por enseñarme el valor de la unidad. No me pudo haber tocado una mejor familia que ellos. Pero sobre todo quiero agradecer a mis dos grandes confidentes, mi papá y mamá, Luis Yañez y Leticia Algandar. Gracias por regalarme

unas alas tan grandes y tejidas con tanto amor, por todo lo que han hecho por mí y por lo que siguen haciendo, por el apoyo incondicional que me han dado desde muy pequeña y, sobre todo, por siempre creer en mí, incluso más de lo que yo lo hago. Todo eso me ha permitido alcanzar muchas metas y superar distintos obstáculos. Por eso nunca me cansaré de decirles que mis logros son también suyos. Y no existen las palabras suficientes para expresar toda mi admiración y amor que tengo hacia ustedes. Solo me queda agradecer la gran fortuna de poder compartir mi vida con los dos.

Y, por último, pero el más importante, a Dios, por haberme dado la vida, estoy convencida de que estuvo a mi lado en cada momento, y pude reconocer sus incontables bendiciones en muchos aspectos de mi vida. Lo sentí en los abrazos de mis padres, en el apoyo de las personas que han estado a mi lado, en las nuevas amistades, en las risas con las personas que más quiero y admiro, en todos los consejos que me dieron distintos maestros, doctores y asesores que he tenido durante mi desarrollo profesional, en cada nuevo día que me ofrecía una nueva oportunidad y en cada detalle que me guio hasta llegar este momento.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas	xv
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes	2
1.1.1 Enfermedad del Alzheimer.....	2
1.1.2 Hipótesis de la cascada amiloide.....	5
1.1.3 Neuroinflamación y su relación con la enfermedad de Alzheimer	6
1.1.3.1 Función de los astrocitos en la neuroinflamación y su estudio en modelos celulares para la enfermedad de Alzheimer.....	7
1.1.4 Mitocondrias y su relación con la enfermedad del Alzheimer.....	9
1.1.5 Sonlicromanol.....	10
1.1.6 Barrera hematoencefálica.....	12
1.1.6.1 Transferrina	14
1.1.7 Nanoacarreadores.....	15
1.1.7.1 Nanopartículas híbridas polímero-lípido.....	16
1.1.8 Puntos de carbono como agentes teranóstico	18
1.1.8.1 Puntos de carbono y nanopartículas híbridas polímero-lípido para la enfermedad de Alzheimer	20
1.2 Hipótesis.....	21
1.3 Objetivos	22
1.3.1 Objetivo general.....	22

1.3.2	Objetivos específicos.....	22
Capítulo 2. Metodología.....		23
2.1	Conjugación de colesterol-PEG-COOH con transferrina	24
2.2	Síntesis de puntos de carbono	25
2.3	Síntesis de nanopartículas híbridas polímero-lípido	25
2.4	Caracterización de las nanopartículas híbridas polímero-lípido.....	27
2.4.1	Espectroscopia por transformada de Fourier (FTIR)	27
2.4.2	Dispersión dinámica de luz (DLS)	27
2.4.3	Intensidad de fluorescencia de los CD	27
2.5	Encapsulamiento de Sonlicromanol y CD en las nanopartículas híbridas.....	27
2.6	Perfil de liberación de Sonlicromanol y CD en las nanopartículas híbridas	29
2.7	Cultivo celular y estudios de viabilidad celular	29
2.7.1	Cultivo de células hepáticas humanas (HepG2)	29
2.7.2	Prueba preliminar de viabilidad celular por MTT con HepG2.....	30
2.7.3	Cultivo de astrocitos de rata	31
2.7.4	Ensayo de viabilidad celular por MTT con astrocitos de rata	31
Capítulo 3. Resultados y discusión		32
3.1	Pruebas preliminares en células HepG2 expuestas a distintas concentraciones de Sonlicromanol	32
3.2	Conjugación de CLS-PEG-COOH y Tf.....	33
3.3	Caracterización de nanopartículas híbridas polímero-lípido	34
3.3.1	Composición química por medio de Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).....	34
3.3.2	Diámetro hidrodinámico, índice de polidispersión (PDI) y potencial zeta (ζ) mediante dispersión dinámica de luz (DLS)	36
3.3.3	Encapsulación de los compuestos bioactivos	37
3.3.4	Perfil de liberación de Sonlicromanol	40
3.4	Pruebas de viabilidad celular por MTT en astrocitos de rata.....	41

3.4.1	Citocompatibilidad con LPS y compuestos libres.....	42
3.4.2	Citocompatibilidad de nanopartículas híbridas polímero-lípido.....	45
Capítulo 4.	Conclusiones	48
Literatura citada		50

Lista de figuras

Figura	Página
1. La formación del péptido β -amiloide ($A\beta$). La proteína precursora de amiloide (APP), que se encuentra atravesando la membrana celular, al ser cortada por la β -secretasa (BACE1) y la γ -secretasa generan diferentes variantes del péptido $A\beta$. Entre ellas, la forma $A\beta_{42}$ tiende a ensamblarse inicialmente en oligómeros, los cuales alteran la función sináptica; posteriormente, estos oligómeros se agregan en placas amiloides, desencadenando la patología tau, neuroinflamación y al deterioro cognitivo característico de la enfermedad de Alzheimer. Tomada y modificada de Citron, 2010.....	5
2. Neuroinflamación en la EA. Los astrocitos y las microglías al estar en contacto con las placas β -amiloide ($A\beta$), provoca un estado reactivo de estas células, generando que se liberen distintas moléculas proinflamatorias y a su vez activan cascadas de señalización como el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B), las cinasas N-terminales c-Jun (JNK) y la proteína quinasas activada por mitógeno p38 (MAPK), aumentando la producción de placas amiloides y conduciendo a la hiperfosforilación de tau (P-tau) y a la formación de ovillos neurofibrilares (NFT). Tomada y modificada de Dias-Carvalho et al. 2024.	8
3. La disfunción mitocondrial conduce al estrés oxidativo, al agotamiento de ATP y la neuroinflamación, lo que contribuye al desarrollo de la enfermedad del Alzheimer. Tomada y modificada de Rai et al., 2020.....	10
4. Estructura química del Sonlicromanol. Creado en ChemDraw.....	11
5. Composición estructural y vías de transporte a través de la barrera hematoencefálica. a) Representación de la distribución de los componentes de la unidad neurovascular. b) Complejo de unión de las células endoteliales: (I) Uniones estrechas: compuestas por moléculas de adhesión de unión (JAMS), claudinas y ocludinas. Las proteínas zónula occludens (ZO) están representadas en amarillo (ZO-1), verde (ZO-2) y azul (ZO-3); (II) Uniones adherentes: compuestas de caderinas, representadas en verde y cateninas en gris; (III) Uniones GAP: se componen de miembros de la familia de las conexinas. c) Representación esquemática de las vías de transporte a través de la barrera hematoencefálica. Tomada y modificada de Bernardo-Castro et al., 2020.	13
6. Transporte de nanopartículas conjugados con transferrina (Tf) a través de la barrera hematoencefálica mediante la transcitosis mediada por receptores, permitiendo su entrega al cerebro, mientras que las nanopartículas no conjugadas con Tf permanecen restringidas, destacando la importancia de la unión a receptores específicos para cruzar la barrera. SNC: sistema nervioso central. BHE: barrera hematoencefálica. Tomada y modificada de S. Li et al., 2016.....	14
7. Tipos de nanoestructuras de nanoacarreadores. Tomada y modificada de H. Xu et al., 2022.	15
8. Estructura de nanopartícula híbrida polímero-lípido. Tomada y modificada de Vargas-Barona et al., 2024.....	16

9. Mecanismos de fotoluminiscencia en puntos de carbono (CD). El aumento del tamaño de los CD genera en una disminución gradual de sus bandas prohibidas, lo que resulta en un corrimiento al rojo de la emisión de fotoluminiscencia (izquierda). Tomada y modificada de Alafeef et al., 2024. 19
10. Imágenes de fluorescencia confocal de a) cerebro, b) dorsal, c) ventral y d) lateral de pez cebra 5 h después de la administración de puntos cuánticos conjugados con transferrina. Tomada de Han et al., 2017. 20
11. Larva de *Danio rerio* a los 5 días post fertilización a) inyectada con NPs CDFx sin señal fluorescente visible y b) inyectada con NPs CDFx, observándose fluorescencia en color azul bajo un filtro de 430-460 nm, lo que indica presencia de las NPs en el en el cerebro del organismo. Tomada y modificada de Silvestre Martínez, 2024..... 21
12. Metodología general del trabajo. 1) Conjugación de CLS-PEG-COOH con Tf. 2) Síntesis de CD a partir de ácido cítrico. 3) Síntesis de NPs. 4) Caracterización de las NPs mediante DLS, FTIR, determinación de la capacidad de carga y perfil de liberación. 5) Evaluación de citocompatibilidad en astrocitos de rata estimulados con lipopolisacárido. PLGA: poli (ácido láctico-co-glicólico). HSPC: lecitina de soya hidrogenada. CD: puntos de carbono. Tf: transferrina. CLS-PEG-COOH: colesterol pegilado con grupos carboxílicos. CLS-PEG-Tf: colesterol pegilado conjugado con transferrina. NPs: nanopartículas híbridas polímero-lípido. NPs S: nanopartículas cargadas con Sonlicromanol. NPs CD-S: nanopartículas cargadas con puntos de carbono y Sonlicromanol. DLS: dispersión dinámica de luz. FTIR: espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier. MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio. Creado en Biorender. 23
13. Metodología para la conjugación de CLS-PEG-COOH con Tf. Se agrega NHS y EDC a la solución de Col-PEG-COOH. Se sónica la mezcla resultante durante 10 min, para luego agregar Tf y se deja en agitación por 24 h. La solución se centrifuga, se congela a -80 °C y se liofiliza por 24 h. NHS: N-hidroxisuccinimida. EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropilo) carbodiimida. CLS-PEG-COOH: colesterol conjugado con polietilenglicol con grupos carboxilos. Tf: transferrina. CLS-PEG-Tf: colesterol conjugado con polietilenglicol y funcionalizado con transferrina. Creado en Biorender..... 24
14. Metodología de la síntesis de puntos de carbono (CD). Los CD se obtuvieron a partir de la termólisis de ácido cítrico a 180 °C durante 40 h, la muestra se pulveriza y después se neutraliza con NaOH 5 M durante 40 min, para después congelar a -80 °C por 24 h y liofilizar por 31 h los CD. NaOH: hidróxido de sodio. Creado en Biorender. 25
15. Metodología utilizada para la síntesis de nanopartículas híbridas polímero-lípido (NPs). La fase orgánica se agrega en forma de goteo a la fase inorgánica a 65°C a una agitación constante, posteriormente se agrega agua Mili Q. La solución es sonicada por 5 min y se realizan lavados por centrifugación para obtener las NPs. PLGA: poli (ácido láctico-co-glicólico). HSPC: lecitina de soya hidrogenada. CD: puntos de carbono. Tf: transferrina. CLS-PEG-Tf: colesterol pegilado conjugado con transferrina. EtOH: etanol. Creado en Biorender..... 26
16. Metodología utilizada para eficiencia de encapsulación y perfil de liberación de las nanopartículas híbridas polímero-lípido (NPs). Las NPs recién sintetizadas son colocadas dentro de la membrana de diálisis y son incubadas en un agitador orbital durante 24 h en el caso del ensayo de encapsulación, mientras que en el perfil de liberación se dejó 0.5 h, 1 h, 2

- h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h y 24 h a 37 °C. Se recolectan las muestras y son analizadas para detectar la concentración de los compuestos. Creado en Biorender..... 29
17. Porcentajes viabilidad celular en células hepáticas HepG2 a diferentes concentraciones de Sonlicromanol durante 24 h. La línea punteada señala el valor límite de viabilidad celular definido por la ISO 10993-5 para clasificar una muestra como no citotóxica. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (\pm), $n = 3$ por grupo. Datos analizados estadísticamente mediante ANOVA de una vía utilizando el análisis a posteriori de Tukey, con $p < 0.05$. Las diferencias significativas están representadas como: ns (no significativo), * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$. Sonlicromanol es citocompatible en concentraciones de 0.02 y 2 μM . CTRL: células sin tratamiento..... 32
18. Espectros de FTIR de 4000 a 500 cm^{-1} de los compuestos de: a) Transferrina (Tf), b) CLS-PEG-COOH y c) CLS-PEG-Tf. La conjugación de CLS-PEG-COOH y Tf se confirmó mediante FTIR, ya que el espectro de CLS-PEG-Tf se observaron tres señales correspondientes de Tf (1542 cm^{-1} , 1647 cm^{-1} y 3226 cm^{-1}), lo cual indica la unión covalente de ambos compuestos. Tf: transferrina. CLS-PEG-COOH: colesterol pegilado con grupos carboxílicos. CLS-PEG-Tf: colesterol pegilado conjugado con transferrina. 33
19. Espectros de FTIR de 4000 a 500 cm^{-1} de los compuestos de: a) NPs vacías, b) NPs S, c) NPs CD-S, d) PLGA, e) CLS-PEG-Tf, f) HSPC y g) CD. A partir de FTIR se pudo confirmar que las NPs contaban con picos característicos de PLGA (1085 cm^{-1} y 1750 cm^{-1}), CLS-PEG-Tf (1542 cm^{-1} , 1647 cm^{-1} y 3226 cm^{-1}) y HSPC (2920 cm^{-1} y 2851 cm^{-1}). NPs S: nanopartículas cargadas con Sonlicromanol. NPs CD-S: nanopartículas cargadas con puntos de carbono y Sonlicromanol. PLGA: poli (ácido láctico-co-glicólico). CLS-PEG-Tf: colesterol pegilado conjugado con transferrina. Tf: transferrina. HSPC: lecitina de soya hidrogenada. CD: puntos de carbono... 35
20. a) Curva de calibración de Sonlicromanol obtenida mediante el lector de placas EPOCH ($n=3$). El recuadro muestra el espectro UV-Vis del Sonlicromanol, en el cual presentó absorción a una longitud de onda de 280 nm y también se presenta la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración como su valor de R^2 . b) Curva de calibración de CD obtenida a partir de espectroscopía de fotoluminiscencia. El recuadro muestra el espectro de fotoluminiscencia de distintas concentraciones de CD y también se presenta su ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración, así como su valor de R^2 . CD: puntos de carbono. 38
21. Espectros de fotoluminiscencia de a) NPs CD, b) NPs CD-S y b) NPs vacías. Las NPs cargadas con CD muestran una emisión a 470 nm al ser excitadas a 370 nm. NPs CD: nanopartículas cargadas con puntos de carbono. NPs CD-S: nanopartículas cargadas con puntos de carbono y Sonlicromanol. 39
22. Absorbancia a 288 nm como indicador de la liberación de los compuestos ($n=3$). El recuadro muestra el perfil de liberación del Sonlicromanol expresado en porcentaje de las NPs S. Las absorbancias obtenidas de las tres formulaciones mostraron diferentes tendencias: siendo las NPs CD y NPs CD-S donde no tuvieron un cambio de absorbancia después de las 8 h, sugiriendo la liberación total de los compuestos, mientras que el perfil de liberación expresado en porcentaje muestra que las NPs S presentaron una liberación tipo estallido, ya que la liberación total fue a las 2 h. NPs S: nanopartículas cargadas con Sonlicromanol. NPs CD: nanopartículas cargadas con puntos de carbono. NPs CD-S: nanopartículas cargadas puntos de carbono y Sonlicromanol. 41

23. Cultivo de astrocitos de rata (IXCells Biotechnologies 10RA-005): a) Astrocitos de rata 24 h después de la siembra, con baja densidad celular. Amplificación 4x; barra de escala: 1000 μm . El recuadro es un acercamiento de las células mostrando morfología característica de los astrocitos con prolongaciones. Amplificación 10x; barra de escala: 400 μm . b) Cultivo de astrocitos con una confluencia aproximada del 80%. Amplificación 4x; barra de escala: 1000 μm 42
24. Porcentajes de viabilidad celular en astrocitos de rata estimuladas con LPS a 100 y 500 ng/mL incubados por 24 h. La línea punteada señala el valor límite de viabilidad celular definido por la ISO 10993-5 para clasificar una muestra como no citotóxica. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (\pm), $n = 3$ por grupo. Datos analizados estadísticamente mediante ANOVA de una vía utilizando el análisis a posteriori de Tukey con $p < 0.05$. Las diferencias significativas están representadas como: ns (no significativo). Las concentraciones de LPS (100 y 500 ng/mL) no disminuyeron la viabilidad celular. CTRL: células sin tratamiento. LPS: lipopolisacárido..... 43
25. Porcentajes de viabilidad celular en astrocitos de rata estimuladas con LPS a 500 ng/mL, posteriormente tratados con diferentes concentraciones de Sonlicromanol y CD durante 24 h. La línea punteada señala el valor límite de viabilidad celular definido por la ISO 10993-5 para clasificar una muestra como no citotóxica. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (\pm), $n = 3$ por grupo. Datos analizados estadísticamente mediante ANOVA de una vía utilizando el análisis a posteriori de Tukey con $p < 0.05$. Las diferencias significativas están representadas como: ns (no significativo), $***p < 0.001$ y $****p < 0.0001$. Las concentraciones de Sonlicromanol a 0.1 y 1 μM y CD a 100, 200 y 300 $\mu\text{g/mL}$ no se consideran citotóxicas. LPS: células estimuladas con lipopolisacárido a 500 ng/mL. CD: puntos de carbono. 44
26. Porcentaje de viabilidad en astrocitos de rata estimulados con LPS a 500 ng/mL por 24 h y posteriormente tratados a diferentes concentraciones de Sonlicromanol con una combinación de 200 $\mu\text{g/mL}$ por 24 h. Los signos (+) señalan donde se agregó la concentración de CD, mientras que (-) es donde no se agregó. La línea punteada señala el valor límite de viabilidad celular definido por la ISO 10993-5 para clasificar una muestra como no citotóxica. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (\pm), $n = 3$ por grupo. Datos analizados estadísticamente mediante ANOVA de una vía utilizando el análisis a posteriori de Tukey con $p < 0.05$. Las diferencias significativas están representadas como: ns (no significativo) y $****p < 0.0001$. Las combinaciones de 0.1, 1 y 10 μM con CD (200 $\mu\text{g/mL}$) presentan una mayor viabilidad celular. LPS: células estimuladas con lipopolisacárido a 500 ng/mL. CD: puntos de carbono. 45
27. Porcentaje de viabilidad en astrocitos de rata estimulados con LPS a 500 ng/mL por 24 h y posteriormente tratados con: a) con los compuestos libres a las concentraciones que se encapsula en las NPs, b) NPs a 1 mg/mL, c) NPs a 0.5 mg/mL, d) NPs a 0.25 mg/mL, e) NPs a 0.1 mg/mL y f) NPs a 0.05 mg/mL, todos tratadas por 24 h. La línea punteada señala el valor límite de viabilidad celular definido por la ISO 10993-5 para clasificar una muestra como no citotóxica. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (\pm), $n = 3$ por grupo. Datos analizados estadísticamente mediante ANOVA de una vía utilizando el análisis a posteriori de Tukey con $p < 0.05$. Las diferencias significativas están representadas como: ns (no significativo), $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$. Las concentraciones de 0.1 y 0.05 mg/mL, en todas las formulaciones se consideran citocompatibles. LPS: células estimuladas con lipopolisacárido 500 ng/mL. NPs S: nanopartículas cargadas con

Sonlicromanol. NPs CD: nanopartículas cargadas con puntos de carbono. NPs CD-S: nanopartículas cargadas puntos de carbono y Sonlicromanol.	46
---	----

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Diámetro hidrodinámico, PDI y potencial ζ obtenido del análisis de DLS de las distintas formulaciones, todas suspendidas con agua Mili Q. La incorporación del Sonlicromanol y CD, reducen el tamaño de las NPs. NPs S: nanopartículas cargadas con Sonlicromanol. NPs CD: nanopartículas cargadas con puntos de carbono. NPs CD-S: nanopartículas cargadas con puntos de carbono y Sonlicromanol.	37

Capítulo 1. Introducción

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo progresivo que ocasiona pérdida de memoria y otras alteraciones cognitivas, como el deterioro del lenguaje, el aprendizaje, la memoria, el razonamiento y cambios en el comportamiento. Dicho deterioro puede llegar a ser lo suficientemente grave como para interferir en las actividades cotidianas (Safiri et al., 2024). Las dos principales características patológicas de la EA son la acumulación de placas de β -amiloide ($A\beta$) y de ovillos neurofibrilares (NFT) compuestos de la proteína tau hiperfosforilada (P-tau). La acumulación de estas proteínas y sus interacciones desencadenan procesos patológicos como la neuroinflamación, el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial (Kamatham et al., 2024; Schöll et al., 2025)

La terapia actual de la EA se dirige principalmente en aliviar los síntomas y retrasar la progresión de la enfermedad; sin embargo, aún no existe una cura. Varios fármacos se encuentran en fase de ensayo clínico, pero muchos de ellos han sido interrumpidos debido a la baja eficacia o a los efectos adversos asociados (Peng et al., 2023). En este contexto, la implementación de estrategias terapéuticas eficaces e innovadoras resulta crucial para mejorar la calidad de vida de los afectados. Dichas estrategias deben orientarse a prevenir la agregación de $A\beta$ y P-tau, suprimir la neuroinflamación, mejorar la función mitocondrial, estimular la neurogénesis y la función sináptica, así como desarrollar herramientas diagnósticas más precisas (Kamatham et al., 2024). Los avances en la nanotecnología ofrecen nuevas oportunidades para el diseño de terapias innovadoras dirigidas a la EA. Las nanopartículas, en particular, constituyen vehículos potenciales para una amplia gama de fármacos, al permitir su administración dirigida. Una de sus principales ventajas es la posibilidad de funcionalizar su superficie con ligandos específicos, lo que facilita el cruce de barreras biológicas como la barrera hematoencefálica (BHE), logrando una administración localizada, mejores resultados terapéuticos, y una reducción de los efectos adversos en células y tejidos sanos. De este modo, las nanopartículas son cada vez más reconocidas como candidatas prometedoras tanto para el tratamiento de la EA como para el diagnóstico (Hajipour et al., 2017; Panghal & Flora, 2024). Dentro de estas plataformas, las nanopartículas híbridas polímero-lípido destacan por combinar las propiedades de los sistemas poliméricos y lipídicos, mejorando así la entrega de fármacos y su tolerancia en el organismo.

Diversos estudios han demostrado que los astrocitos activados desempeñan un papel clave en la creación de un ambiente neurotóxico en la EA, ya que, en este estado, sufren cambios morfológicos y producen factores neurotóxicos que favorecen la neuroinflamación y disfunción mitocondrial. En consecuencia, las

investigaciones actuales se han centrado en las vías neuroinflamatorias mediadas por astrocitos como punto de intervención para frenar la progresión de la EA (Singh, 2022). En este panorama, el Sonlicromanol surge como una alternativa terapéutica relevante, ya que posee propiedades antiinflamatorias, modula el estrés oxidativo y mejora la función mitocondrial, lo que podría contrarrestar diversos mecanismos implicados en la EA.

En esta investigación se propuso la utilización de nanopartículas híbridas de polímero-lípido (NPs), conjugadas con transferrina (Tf), como vehículo de entrega para el Sonlicromanol. Asimismo, se planteó la coencapsulación de puntos de carbono (CD), cuyas propiedades fluorescentes permiten desarrollar un sistema teranóstico. Además, estos nanomateriales presentan propiedades antioxidantes, lo que los convierte en una herramienta útil tanto para potenciar el efecto terapéutico del Sonlicromanol como para monitorear las NPs. Los nanoacarreadores desarrollados fueron caracterizados para determinar sus propiedades fisicoquímicas y se evaluó su citocompatibilidad en un cultivo de astrocitos de rata estimulados con lipopolisacárido (LPS), con el fin de explorar su posible efecto de contraatacar mecanismos clave implicados en la EA.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Enfermedad del Alzheimer

En noviembre de 1901, Alois Alzheimer documentó detalladamente los síntomas y el progreso de la degeneración mental en una mujer de 51 años, Auguste Deter, paciente del Hospital de Frankfurt. Los principales síntomas clínicos que presentó incluían alteraciones cognitivas graves, sufría de pérdida de memoria, desorientación, afasia, alucinaciones, delirios y comportamiento impredecible. Con el tiempo, su estado general se deterioró aún más y, el 8 de abril de 1906, Auguste D. falleció a causa de una septicemia. Tras su muerte, Alzheimer solicitó el historial clínico y el cerebro de la paciente, los examinó cuidadosamente y presentó oralmente sus conclusiones en la 37ª reunión de psiquiatras del sur de Alemania, el 3 de noviembre de 1906. En dicho informe describió hallazgos histopatológicos en el cerebro de Auguste D., como hidrocefalia moderada, atrofia cerebral, arteriosclerosis, fibrillas anormales y de pequeños focos miliares. Con la terminología actual, Alzheimer reconocía los ovillos neurofibrilares (NFT) y las placas amiloides. Posteriormente, en la octava edición del libro *Psychiatry*, publicada en 1910 por

Emil Kraepelin, esta condición fue nombrada “enfermedad de Alzheimer” (EA) (Burns et al., 2002; Cipriani et al., 2011; Möller & Graeber, 1998).

La EA es un tipo de enfermedad cerebral considerada degenerativa, lo que significa que empeora con el tiempo. Se cree que comienza años antes de la manifestación de los primeros síntomas. A medida que avanzan los cambios metabólicos en el cerebro, se hacen evidentes los síntomas como dificultades en la memoria, el lenguaje, la resolución de problemas y otras funciones cognitivas que afectan la capacidad de la persona para realizar actividades cotidianas. También pueden presentar alteraciones en el estado de ánimo, la personalidad y el comportamiento. La progresión y las capacidades afectadas varían de una persona a otra (Alzheimer’s Association Report, 2020, 2024).

Esta enfermedad es la principal causa de demencia, representando entre el 60% al 80% de los casos, y se ha convertido en una de las patologías más costosas, letales y desafiantes de este siglo (Abubakar et al., 2022; Scheltens et al., 2021). En 2020 se estimó que 50 millones de personas padecían de demencia, y se calcula que para 2050 la cifra aumentará a 152 millones a nivel mundial (Livingston et al., 2020).

Un rasgo muy distintivo entre los cerebros de los pacientes con EA es la acumulación del péptido A β insoluble en forma de placas fuera de las neuronas, así como la formación de NFT de la proteína P-tau en su interior. Ambas proteínas se han asociado al deterioro cognitivo progresivo de la enfermedad (Abubakar et al., 2022; Alzheimer’s Association Report, 2020; Silva et al., 2019). La edad avanzada, especialmente a partir de los 65 años, constituye el principal factor de riesgo, aunque no es una cifra absoluta. Además, las mujeres tienen mayor probabilidad de desarrollar EA que los hombres, en particular después de los 80 años (Scheltens et al., 2021).

Se ha identificado también la influencia de factores genéticos. El gen de la apolipoproteína (APOE) presenta tres variantes: alelo $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$. Portar el alelo $\epsilon 4$ constituye un factor de riesgo importante, ya que favorece la agregación de A β (Husain et al., 2021). Asimismo, mutaciones en genes como el de la proteína precursora de amiloide (APP) en el cromosoma 21, Presenilina 1 (PSEN1) en el cromosoma 14 y Presenilina 2 (PSEN2) en el cromosoma 1, promueven la aparición temprana de la EA al incrementar la producción del péptido A β (Miller et al., 2021; Tcw & Goate, 2017). Otros factores de riesgo reportados incluyen diabetes, hipertensión, dislipidemia, obesidad, enfermedades cardiovasculares, tabaquismo, y consumo excesivo de alcohol (X.-X. Zhang et al., 2021).

La progresión de la EA se clasifica en 3 fases:

- **EA preclínica:** en esta fase ocurren cambios a nivel cerebral, sin manifestaciones clínicas perceptibles para el paciente ni para sus allegados.
- **Deterioro cognitivo leve debido a EA:** en esta etapa se observan marcadores biológicos más evidentes (A β y P-tau), junto con problemas cognitivos sutiles, que pueden no interferir en la rutina diaria.
- **Demencia debida a EA:** los problemas cognitivos son notorios y afectan la autonomía del paciente. Esta fase se subdivide en:
 - a) Demencia leve: Los pacientes requieren apoyo ocasional para algunas actividades, aunque conservan cierta independencia.
 - b) Demencia moderada: Las dificultades para realizar tareas cotidianas aumentan, con problemas de memoria, comunicación y orientación
 - c) Demencia severa: los pacientes requieren cuidados constantes, pudiendo ser incapaces de caminar, comunicarse o alimentarse por sí mismos; son altamente vulnerables a complicaciones físicas e infecciones (Alzheimer's Association Report, 2024).

En la actualidad, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) ha aprobado algunos fármacos que contribuyen a reducir algunos síntomas o ralentizar la progresión de la EA. Entre ellos se encuentran los anticuerpos monoclonales aducanumab y lecanemab, dirigidos contra el péptido A β , los cuales retrasan la evolución de la enfermedad (Cummings et al., 2024).

También se emplean donepezilo, rivastigmina, galantamina, memantina y la combinación de memantina con donepezilo, los cuales actúan sobre los síntomas cognitivos. Estos medicamentos incrementan la disponibilidad de neurotransmisores en el cerebro, favoreciendo la comunicación neuronal. La memantina, en particular, protege a las neuronas del exceso de glutamato, previniendo su sobreestimulación y daño (Alzheimer's Association Report, 2024).

Sin embargo, persiste la necesidad de desarrollar terapias más efectivas para esta patología, lo que ha motivado la búsqueda de tratamientos innovadores capaces de modificar los mecanismos de la enfermedad, mejorar el pronóstico y la calidad de vida de los pacientes.

1.1.2 Hipótesis de la cascada amiloide

En 1984, Glenner y Wong descubrieron que la proteína A β es el componente principal de las placas amiloides. A partir de este hallazgo, en 1992, Hardy y Higgins propusieron entonces la denominada “hipótesis de la cascada amiloide”, según la cual los depósitos de A β en el cerebro constituyen el evento inicial en la patogénesis de la EA. Este proceso desencadena la formación de agregados de P-tau, la disfunción y pérdida neuronal, así como el deterioro cognitivo (Y. Zhang et al., 2023).

Aunque existen múltiples teorías e hipótesis sobre la patogénesis de la EA, la hipótesis de la cascada amiloide se considera la más influyente y fundamental, ya que plantea el inicio de una secuencia de eventos patológicos perjudiciales para las neuronas (Kung, 2012).

El principio de esta hipótesis es el procesamiento anómalo de la APP (**Figura 1**). La APP es una proteína transmembrana de tipo I, compuesta por un gran dominio extracelular y una región citoplasmática corta. En las neuronas, presenta 695 aminoácidos y es procesada por diversas secretasas que determinan la vía amiloidogénica (Tcw & Goate, 2017). En esta vía, la APP es escindida secuencialmente por dos enzimas: la β -secretasa (también conocida como β -site APP cleaving enzyme 1, BACE1) y la γ -secretasa. Este procesamiento da lugar a la liberación de varias isoformas del péptido A β , siendo las más comunes A β_{40} y A β_{42} (Citron, 2010; Miller et al., 2021; Tcw & Goate, 2017).

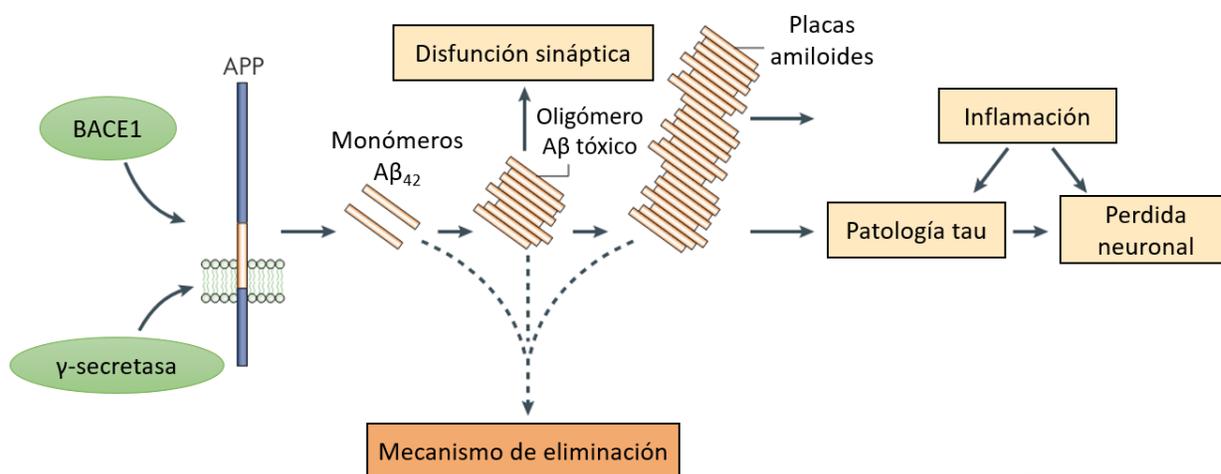


Figura 1. La formación del péptido β -amiloide (A β). La proteína precursora de amiloide (APP), que se encuentra atravesando la membrana celular, al ser cortada por la β -secretasa (BACE1) y la γ -secretasa generan diferentes variantes del péptido A β . Entre ellas, la forma A β_{42} tiende a ensamblarse inicialmente en oligómeros, los cuales alteran la función sináptica; posteriormente, estos oligómeros se agregan en placas amiloides, desencadenando la patología tau, neuroinflamación y al deterioro cognitivo característico de la enfermedad de Alzheimer. Tomada y modificada de Citron, 2010.

En condiciones fisiológicas normales, $A\beta_{40}$ es la isoforma más predominante mientras que $A\beta_{42}$ representa aproximadamente el 10% del total. Sin embargo, $A\beta_{42}$ es considerado el péptido dañino, ya que presenta mayor propensión a la agregación, formando oligómeros tóxicos que posteriormente se depositan en placas amiloides (**Figura 1**) (Tcw & Goate, 2017). Los oligómeros $A\beta$ ejercen efectos sinaptotóxicos agudos, mientras que las placas amiloides generan una respuesta inflamatoria que agrava la neurodegeneración (Citron, 2010).

En personas sanas, los péptidos $A\beta$ escindidos de la APP por la β - y γ -secretasa son rápidamente degradados y/o eliminados. Sin embargo, en personas mayores o en condiciones patológicas, la capacidad metabólica para degradar $A\beta$ disminuye, permitiendo su acumulación. Esto puede contribuir a otras características patológicas de la EA, como la neuroinflamación, el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial e interferencia con la plasticidad sináptica (Kametani & Hasegawa, 2018; Y. Zhang et al., 2023).

1.1.3 Neuroinflamación y su relación con la enfermedad de Alzheimer

La inflamación es un mecanismo inmunológico fundamental que protege y defiende al organismo frente a estímulos dañinos, contribuyendo posteriormente a la homeóstasis tisular (L. Chen et al., 2018). Cuando este proceso ocurre en el sistema nervioso central (SNC) se define como neuroinflamación, y puede ser desencadenada por infecciones, traumatismo, acumulación de toxinas u otras lesiones patológicas. Aunque constituye un mecanismo protector, cuando la respuesta inflamatoria es excesiva o prolongada puede provocar daño tisular y contribuir al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (M. Lin et al., 2022).

En pacientes con EA se ha observado una marcada neuroinflamación, principalmente asociada a la activación de células gliales, como la microglía y astrocitos. Estas células producen factores inflamatorios como citocinas y quimiocinas, que rodean tanto a las placas amiloides como a las neuronas afectadas. Además, generan moléculas como óxido nítrico (NO), prostaglandinas y especies reactivas de oxígeno (ROS), que amplifican las respuestas inmunitarias e inducen neurotoxicidad. Otras células del SNC, incluidas neuronas, oligodendrocitos, células endoteliales vasculares y pericitos, también contribuyen al mantenimiento de este microambiente inflamatorio (DiSabato et al., 2016; Sobue et al., 2023; W. Zhang et al., 2023).

1.1.3.1 Función de los astrocitos en la neuroinflamación y su estudio en modelos celulares para la enfermedad de Alzheimer

Los astrocitos son células gliales más abundantes del SNC, representando entre el 20 y el 40% de las células cerebrales. Desempeñan múltiples funciones en condiciones de salud y de enfermedad. Inicialmente fueron descritas como “células estrelladas”, aunque hoy se reconoce que esta denominación es simplista, ya que presentan morfologías notablemente complejas (Baldwin et al., 2024; Lee et al., 2022). Se distinguen dos subtipos morfológicos principales: astrocitos protoplásmicos y astrocitos fibrosos. Los primeros se localizan principalmente en la sustancia gris, son de mayor tamaño y poseen una red densa de ramificaciones; mientras que los astrocitos fibrosos predominan en la sustancia blanca, presentan menor tamaño y menos ramificada (Lee et al., 2022; Stogsdill et al., 2023).

Estas células cumplen funciones esenciales, tales como: mantenimiento y soporte neuronal, modulación de la actividad y plasticidad sináptica, regulación del metabolismo neuronal, eliminación de células muertas, contribución a la barrera hematoencefálica (BHE), regulación del flujo sanguíneo cerebral, control del equilibrio extracelular de iones, fluidos y neurotransmisores, secreción de neurotrofinas, regulación del volumen del espacio extracelular y participación en el sistema glinfático del SNC, promoviendo la eliminación de productos nocivos como agregados A β y proteína P-tau (Kim et al., 2024; Kwon & Koh, 2020; Leng & Edison, 2021; Vasile et al., 2017).

Ante estímulos inflamatorios, los astrocitos pueden entrar en un proceso denominado astrogliosis reactiva, el cual ocurre en diversas condiciones patológicas, como lesiones agudas, tumores o enfermedades neurodegenerativas, incluida la EA (Monterey et al., 2021). Durante este proceso, los astrocitos experimentan cambios morfológicos y funcionales caracterizados por hipertrofia celular y liberación excesiva de factores neurotóxicos. Además, se asocia a una mayor expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), un marcador prominente de estado reactivo (Singh, 2022; Siracusa et al., 2019). La activación astrocitaria ha sido evidenciada tanto en tejidos post mortem de pacientes con EA como en modelos murinos particularmente en proximidad de las placas amiloides (Frost & Li, 2017).

Los astrocitos reactivos pueden ejercer funciones neuroprotectoras, ya que diversos estudios *in vitro* e *in situ* han demostrado su capacidad para fagocitar y reducir depósitos de A β , limitando el daño ocasionado por especies neurotóxicas (Singh, 2022). No obstante, cuando la activación de astrocitos y microglías es persistente, su papel puede volverse neurotóxico (Block et al., 2007; Bouvier et al., 2022). Ambas células detectan agregados de A β mediante receptores tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés) y receptores para

productos finales de glucosilación avanzada (RAGE, por sus siglas en inglés) lo que activa vías inflamatorias como las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B), las quinasas N-terminales c-Jun (JNK) y la proteína quinasa activada por mitógeno p38 (MAPK). Estas vías regulan la transcripción de múltiples mediadores proinflamatorios, entre ellos citocinas (L-1 β , IL-6, IL-18, TNF- α , IFN- α) factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, quimiocinas (MCP-1, MIP1- α , CCL2, CCL4, CXCL1, IL-8 y IFN- γ) así como ROS, NO y especies reactivas de nitrógeno (RNS) (**Figura 2**) (Botella Lucena & Heneka, 2024; Dias-Carvalho et al., 2024; González-Reyes et al., 2017).

La interacción persistente entre A β y la producción excesiva de factores proinflamatorios sobrepasa la capacidad de depuración de astrocitos y microglías, lo que favorece un procesamiento anormal de la APP por la β -secretasa. Esto incrementa la carga de A β y su acumulación en un entorno proinflamatorio, promoviendo a su vez la P-tau y la formación de NFT (**Figura 2**) (Dias-Carvalho et al., 2024; Kwon & Koh, 2020; Peteri et al., 2019; Singh, 2022).

Por estas razones, el cultivo de astrocitos constituye una herramienta valiosa para el estudio de enfermedades neurodegenerativas en condiciones experimentales controladas, como la EA (Galland et al., 2019). Diversos modelos han empleado la inducción de inflamación en astrocitos de ratón o humano mediante A β_{42} , A β_{40} o lipopolisacárido (LPS), lo que ha abierto nuevas perspectivas para el desarrollo de terapias innovadoras (Joshi et al., 2024; Vargas-Barona et al., 2024; Wasilewski et al., 2022).

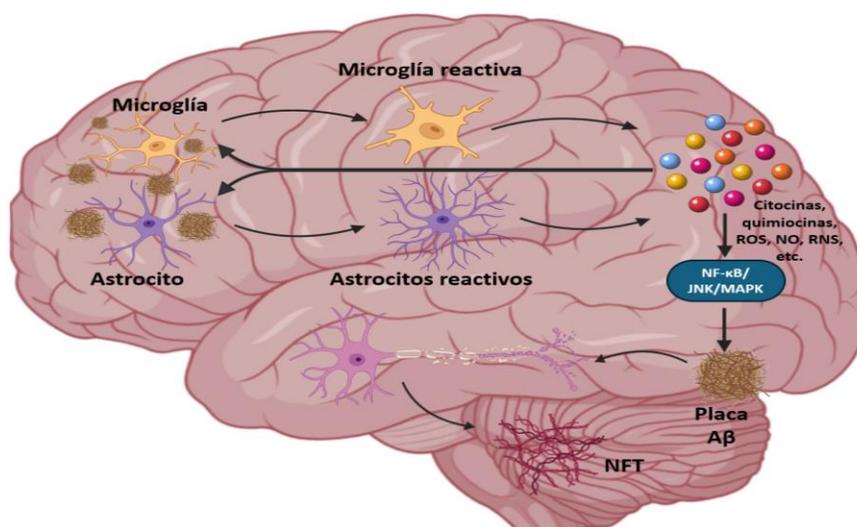


Figura 2. Neuroinflamación en la EA. Los astrocitos y las microglías al estar en contacto con las placas β -amiloides (A β), provoca un estado reactivo de estas células, generando que se liberen distintas moléculas proinflamatorias y a su vez activan cascadas de señalización como el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B), las cinasas N-terminales c-Jun (JNK) y la proteína quinasas activada por mitógeno p38 (MAPK), aumentando la producción de placas amiloides y conduciendo a la hiperfosforilación de tau (P-tau) y a la formación de ovillos neurofibrilares (NFT). Tomada y modificada de Dias-Carvalho et al. 2024.

1.1.4 Mitocondrias y su relación con la enfermedad del Alzheimer

Las mitocondrias son organelos que desempeñan múltiples funciones esenciales en los procesos celulares. Su papel más importante es actuar como la principal fuente de energía, ya que producen ATP mediante la fosforilación oxidativa. Gracias a esta función las mitocondrias mantienen la homeostasis y el funcionamiento neuronal en el sistema nervioso, dado que las neuronas requieren grandes cantidades de energía (W. Wang et al., 2020). Mantener la salud de este organelo resulta esencial, pues constituye un componente clave para conservar la integridad de distintos tejidos; en consecuencia, su disfunción se ha asociado con diversas enfermedades (Casanova et al., 2023).

La principal evidencia de que el mal funcionamiento mitocondrial contribuye a la progresión de la EA proviene del hipometabolismo cerebral, que se produce como resultado de una microvasculatura alterada y condiciones isquémicas. La reducción en el suministro de sangre y oxígeno a las neuronas disminuye la formación de ATP (**Figura 3**), lo que conduce a un incremento del estrés oxidativo (Bhatia et al., 2022). Además, la reducción en la producción de ATP mitocondrial puede afectar la mitofagia, proceso encargado de eliminar mitocondrias dañadas, favoreciendo así la acumulación de mitocondrias disfuncionales (Rai et al., 2020).

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre la producción de ROS y los mecanismos antioxidantes. Una sobreproducción de ROS supera la capacidad protectora de los antioxidantes, provocando daño celular (Bhatti et al., 2017). El cerebro es especialmente vulnerable al daño oxidativo debido a la alta tasa de consumo de oxígeno, la abundancia de ácidos grasos susceptibles a la peroxidación lipídica y bajos niveles de antioxidantes (Misrani et al., 2021). Numerosos estudios respaldan que el daño oxidativo es un factor central en la patogénesis de la EA, ya que compromete gravemente la función mitocondrial y aumenta la producción de ROS (**Figura 3**) (Llanos-González et al., 2020).

Las mitocondrias son la principal fuente de ROS, contribuyendo aproximadamente al 90% de su producción. Esto se debe a que en su membrana interna se encuentra la cadena de transporte de electrones (ETC, por sus siglas en inglés), responsable de la producción de ATP. Durante este proceso, algunos electrones pueden escapar, reduciendo oxígeno y generando ROS. En niveles controlados, estas moléculas actúan como señales celulares; sin embargo, su sobreproducción daña lípidos, azúcares, proteínas, ADN e incluso a la propia mitocondria. Así el aumento del estrés oxidativo podría ser tanto causa como consecuencia de la disfunción mitocondrial (Alqahtani et al., 2023; W. Wang et al., 2020). La aplicación de antioxidantes dirigidos específicamente a las mitocondrias constituye una estrategia

prometedora y eficaz para preservar su funcionalidad en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Cada vez existe mayor evidencia de que la disfunción mitocondrial y la inflamación son procesos interdependientes (**Figura 3**) (Wilkins & Swerdlow, 2015). En particular, las mitocondrias disfuncionales en las células gliales especialmente en astrocitos han cobrado gran relevancia en la investigación, debido a su estrecha participación en la neuroinflamación y neurodegeneración. Se ha reportado que las alteraciones en el metabolismo energético mitocondrial de los astrocitos modulan la morfología y la actividad, además de inducir la liberación de diversos mediadores proinflamatorios (Rahman & Suk, 2020). Así mismo, la disfunción mitocondrial puede activar múltiples rutas inflamatorias, ya que la pérdida de integridad de este organelo desencadena efectos como la activación de NF- κ B, entre otros mecanismos (Guilbaud & Galluzzi, 2024).

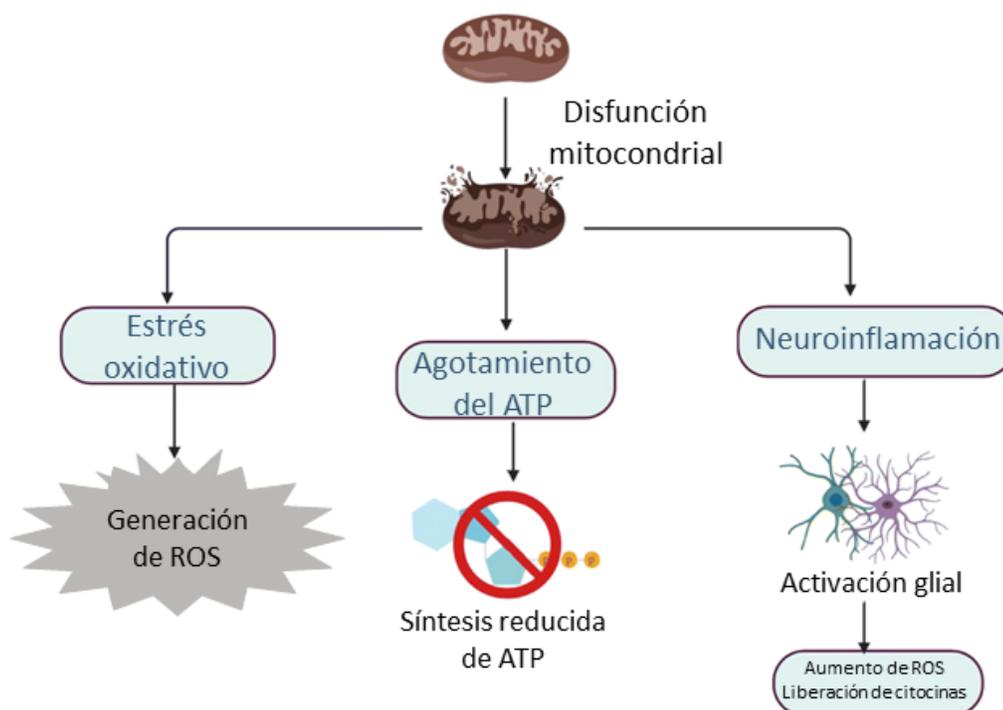


Figura 3. La disfunción mitocondrial conduce al estrés oxidativo, al agotamiento de ATP y la neuroinflamación, lo que contribuye al desarrollo de la enfermedad del Alzheimer. Tomada y modificada de Rai et al., 2020.

1.1.5 Sonlicromanol

El Sonlicromanol (también conocido como KH176) es una piperidina de cromanol (**Figura 4**), diseñada como una molécula de bajo peso molecular, administrable por vía oral, con actividad protectora frente al

daño oxidativo mitocondrial. Actúa como un potente atrapador de radicales, reduciendo eficazmente los niveles elevados de ROS. Asimismo, preserva la actividad del glutatión, un antioxidante esencial en la célula, y protege a las células con deficiencia en la fosforilación oxidativa mitocondrial (OXPHOS, por sus siglas en inglés) frente a la muerte celular inducida por ROS. De manera adicional, contribuye a restablecer el equilibrio celular al disminuir el estrés oxidativo general y activar el sistema antioxidante tiorredoxina/peroxirredoxina, lo que atenúa la peroxidación lipídica (Jiang et al., 2021; Smeitink et al., 2022; Zong et al., 2024).

Además de sus propiedades antioxidantes, el Sonlicromanol exhibe efectos antiinflamatorios, ya que inhibe a la enzima microsomal Prostaglandina E Sintasa-1 (m-PGES1), regulada positivamente en respuesta a estímulos inflamatorios y fundamental en la biosíntesis de prostaglandina E2 (PGE₂), un mediador clave en procesos de dolor e inflamación. Por ello, este compuesto puede ser beneficioso en pacientes con enfermedades asociadas con disfunción mitocondrial, dolor inflamatorio y patologías neurológicas de carácter inflamatorio (Jiang et al., 2021). Se ha descrito una regulación al alza de mPGES-1 en tejidos de pacientes con EA (Chaudhry et al., 2008), lo que refuerza el potencial de este fármaco como candidato para el tratamiento de la enfermedad, al combinar propiedades antioxidantes y antiinflamatorias.

En un estudio, se emplearon neuronas derivadas de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) de pacientes con encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios similares a accidentes cerebrovasculares (MELAS), caracterizadas por una función mitocondrial alterada. Tras el tratamiento con Sonlicromanol, se observó una mejora tanto en la función de la red neuronal, así como cambios en la expresión génica, con un incremento en la expresión de genes implicados en la función mitocondrial y sináptica (Klein Gunnewiek et al., 2021). Estos hallazgos aportan evidencia funcional y molecular del efecto neuroprotector del Sonlicromanol en la restauración del funcionamiento celular.

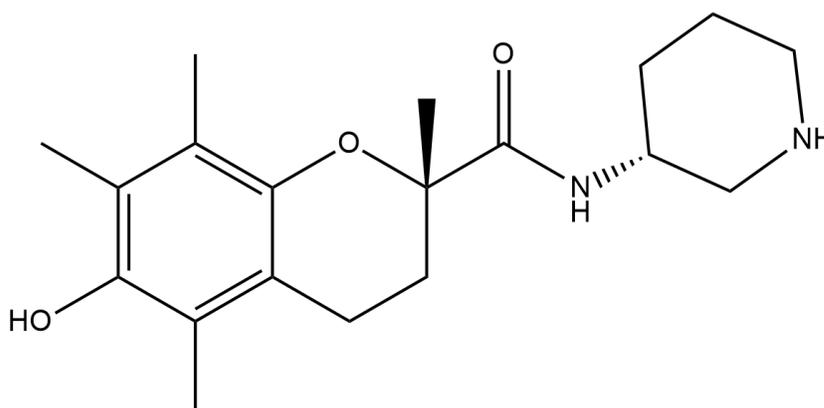


Figura 4. Estructura química del Sonlicromanol. Creado en ChemDraw.

1.1.6 Barrera hematoencefálica

La barrera hematoencefálica (BHE) es una interfaz altamente especializada que separa el sistema vascular del cerebro y cumple un papel esencial en la protección y el equilibrio del sistema SNC. Sin la presencia de esta barrera, el SNC estaría expuesto a la invasión de toxinas, patógenos, células inmunes y a la desregulación iónica, lo que conduciría a la disfunción y degeneración neuronal (Knox et al., 2022).

Además de su función protectora, la BHE regula procesos como el flujo sanguíneo cerebral, la angiogénesis, el desarrollo neuronal y la actividad sináptica (Bernardo-Castro et al., 2020). También desempeña un papel clave en el control de la entrada y salida de sustancias biológicas esenciales para el metabolismo cerebral y la función neuronal (Kadry et al., 2020).

Estructuralmente, la BHE está compuesta por células endoteliales, pericitos, astrocitos, microglías, neuronas y un componente no celular, la lámina basal (**Figura 5(a)**) (Liebner et al., 2018; L. Xu et al., 2019). Los pies terminales de los astrocitos cubren aproximadamente el 90% y 98% de la microvasculatura cerebral, rodeando externamente a las células endoteliales. Por su parte, los pericitos se encuentran incrustados en la lámina basal, y en conjunto, estas células contribuyen a mantener la integridad estructural y funcional de la BHE. La lámina basal, además de brindar soporte físico, facilita la señalización celular y proporciona una barrera adicional (Anthony et al., 2021).

Las células endoteliales que conforman esta estructura presentan uniones especializadas que regulan la permeabilidad, coordinadas por astrocitos, pericitos y demás células asociadas (Anthony et al., 2021). Estas incluyen; uniones estrechas (TJ): son los componentes principales que restringen el paso de iones y moléculas pequeñas hidrosolubles. Uniones adherentes (AJ): cumplen un papel importante en la adhesión y comunicación celular. Unión tipo GAP (GJ): regulan el intercambio de señales eléctricas y metabólicas entre células (**Figura 5(b)**) (Naser et al., 2023; Stamatovic et al., 2016).

En conjunto, esta barrera biológica actúa como un filtro selectivo, permitiendo el paso regulado de solutos y factores entre la sangre y el cerebro mediante rutas estrictamente controladas. Dichas rutas se dividen en dos vías principales: paracelular, que ocurre por difusión pasiva a través de las TJ y, transcelular, que ocurre a través de las células endoteliales (**Figura 5(c)**). En el caso de las rutas transcelulares se distinguen varios mecanismos: difusión transcelular, transporte mediado por transportadores, transcitosis mediada por receptores, bombas de eflujos y transcitosis absorbentes (Bernardo-Castro et al., 2020). Estas vías muestran cómo la barrera equilibra de manera precisa la protección y regulación del entorno cerebral.

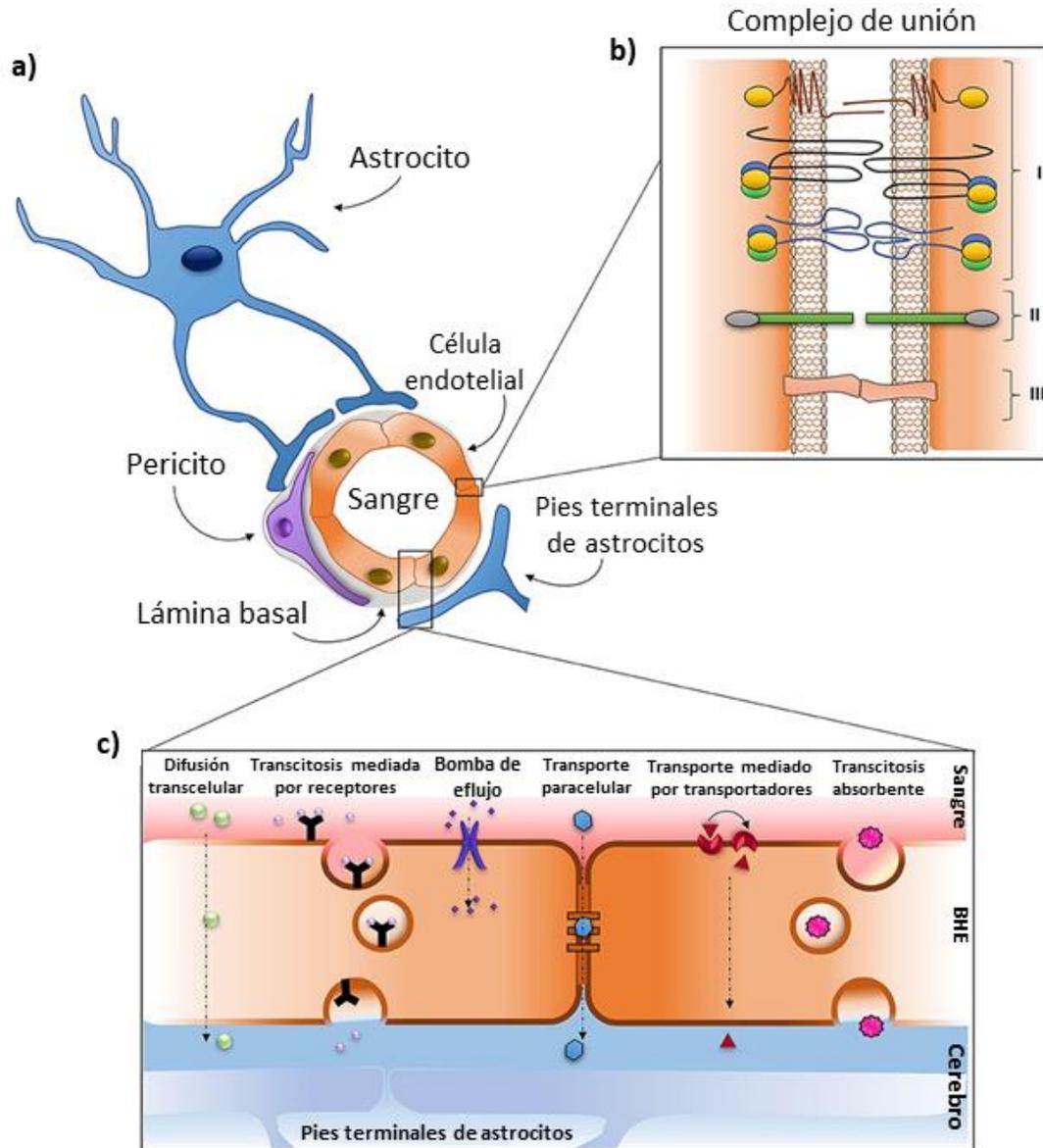


Figura 5. Composición estructural y vías de transporte a través de la barrera hematoencefálica. a) Representación de la distribución de los componentes de la unidad neurovascular. b) Complejo de unión de las células endoteliales: (I) Uniones estrechas: compuestas por moléculas de adhesión de unión (JAMS), claudinas y ocludinas. Las proteínas zónula occludens (ZO) están representadas en amarillo (ZO-1), verde (ZO-2) y azul (ZO-3); (II) Uniones adherentes: compuestas de caderinas, representadas en verde y cateninas en gris; (III) Uniones GAP: se componen de miembros de la familia de las conexinas. c) Representación esquemática de las vías de transporte a través de la barrera hematoencefálica. Tomada y modificada de Bernardo-Castro et al., 2020.

Dada la complejidad que presenta esta estructura, es fundamental considerarla en el diseño de nuevas estrategias terapéuticas para enfermedades del SNC. Las opciones actuales siguen siendo limitadas, debido a la falta de métodos eficaces que permitan superar las barreras naturales de protección (Wu et al., 2023). En particular, la BHE restringe la entrada de compuestos neuroterapéuticos y reduce la eficiencia de los tratamientos (Alajangi et al., 2022).

En años recientes, distintos métodos de administración mínimamente invasiva han recibido gran atención y se han convertido como una de las estrategias terapéuticas más prometedoras para las patologías del SNC, entre ellas, el uso de nanomateriales. No obstante, cualquier intervención debe de ser capaz de superar de forma segura y eficiente las barreras anatómicas y fisiológicas del SNC (Zha et al., 2024). En este contexto, los vectores de transporte molecular con afinidad cerebral han demostrado ser herramientas valiosas para atravesar la BHE ya que facilitan el transporte de moléculas y sistemas terapéuticos al cerebro mediante la transcitosis mediada por receptores (S. Li et al., 2016; Zhou et al., 2021).

1.1.6.1 Transferrina

La transferrina (Tf) es una glucoproteína secretada principalmente por el hígado, cuya producción depende de las necesidades de hierro del organismo y de las reservas disponibles (Rusch et al., 2023). Se ha documentado que las células endoteliales de los capilares cerebrales expresan altos niveles de receptores de transferrina (TfR), los cuales facilitan la transcitosis mediada por receptores a través de la BHE (Yan et al., 2013).

La transferrina no solo tiene la capacidad de atravesar la BHE, sino que además desempeña un papel esencial en el transporte y almacenamiento de hierro en el organismo. Como proteína natural, ha despertado un gran interés en el desarrollo de sistemas de administración dirigida de fármacos (**Figura 6**), gracias a sus características no tóxicas, no inmunogénicas y biodegradables (C. Li et al., 2024).

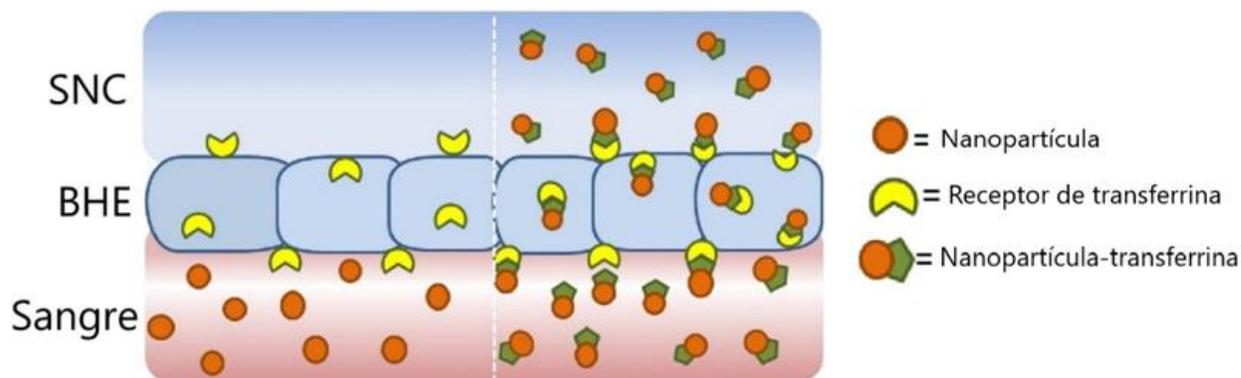


Figura 6. Transporte de nanopartículas conjugados con transferrina (Tf) a través de la barrera hematoencefálica mediante la transcitosis mediada por receptores, permitiendo su entrega al cerebro, mientras que las nanopartículas no conjugadas con Tf permanecen restringidas, destacando la importancia de la unión a receptores específicos para cruzar la barrera. SNC: sistema nervioso central. BHE: barrera hematoencefálica. Tomada y modificada de S. Li et al., 2016.

1.1.7 Nanoacarreadores

Un nanoacarreador es un nanomaterial diseñado para funcionar como vehículo de transporte de una o más sustancias, incluyendo fármacos, genes, proteínas, enzimas o incluso otras nanopartículas, con el propósito de facilitar su administración dirigida y lograr una liberación controlada en el sitio de acción (Chamundeeswari et al., 2019; Gressler et al., 2025; Luque-Michel et al., 2019; Namdari et al., 2017).

En el campo de la nanotecnología, se considera nanomaterial a toda estructura cuyo tamaño se encuentre en el rango de 1 a 100 nm. No obstante, desde la perspectiva farmacéutica, el término *nano* se aplica de manera más amplia para describir partículas o estructuras con tamaños inferiores a 1000 nm (Aminu et al., 2020). Entre ellas, los nanoacarreadores esféricos y no esféricos con un diámetro hidrodinámico de 10 a 200 nm son los más utilizados en la administración de sustancias bioactivas, ya que presentan un balance óptimo entre la estabilidad, biodistribución y capacidad de penetración celular (Dhanasekaran et al., 2018).

Los nanoacarreadores pueden contar con nanoestructuras inorgánicas (nanopartículas de oro, nanopartículas de óxido de hierro, puntos cuánticos, etc.), a base de carbono (grafeno, fullereno, nanotubos de carbono), lipídicas (emulsiones, micelas, liposomas, etc.), poliméricas (polimerosomas, nanoesferas, dendrímeros, etc.) (Figura 7) (H. Xu et al., 2022).



Figura 7. Tipos de nanoestructuras de nanoacarreadores. Tomada y modificada de H. Xu et al., 2022.

Se ha observado que la administración que emplea nanomateriales presenta ventajas muy grandes sobre los sistemas de administración convencionales. Entre ellas se destacan: la capacidad de superar diversas barreras biológicas clave, aumentar la penetración intracelular y el tiempo de retención, aumenta la estabilidad y solubilidad de las cargas encapsuladas, prolongar los tiempos de circulación sistemática, incrementa la biodisponibilidad de los fármacos, reduce su dosis necesaria, evita su degradación, reduce el riesgo de efectos secundarios debidos a la agregación y puede acelera la curación de enfermedades. (Mitchell et al., 2021; Song et al., 2024; Sultana et al., 2022).

1.1.7.1 Nanopartículas híbridas polímero-lípido

Las nanopartículas híbridas se definen como sistemas conformados por al menos dos tipos de nanopartículas diferentes, cuyo objetivo es superar las limitaciones de aquellas formadas por un único componente, optimizar sus propiedades y dotarlas de múltiples funcionalidades (Ma, 2019).

En particular, las nanopartículas híbridas polímero-lípido (NPs) corresponden a nanoestructuras de tipo núcleo-coraza (**Figura 8**). Están constituidas por una región central polimérica, encargada de encapsular sustancias bioactivas, y recubiertas por una monocapa o bicapa lipídica que mejora su estabilidad y biocompatibilidad. Conceptualmente, estas nanopartículas se consideran derivados de los liposomas y de nanopartículas poliméricas, combinando ventajas de ambos sistemas (Mukherjee et al., 2019; Rahat et al., 2024).

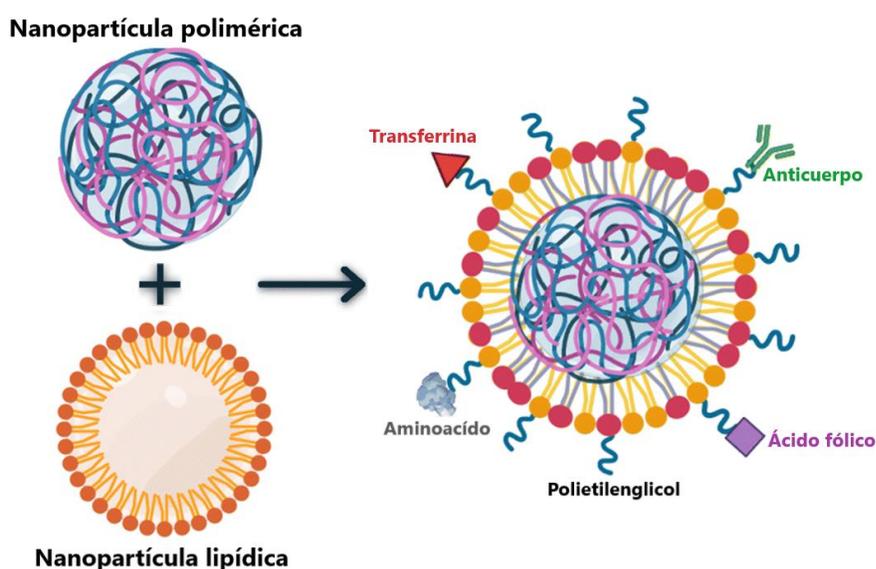


Figura 8. Estructura de nanopartícula híbrida polímero-lípido. Tomada y modificada de Vargas-Barona et al., 2024.

El núcleo polimérico proporciona estabilidad estructural y protege la carga durante el almacenamiento. Para la elaboración de las NPs se han empleado diversos polímeros, como polietilenglicol (PEG), policaprolactona (PCL), poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), ácido poliláctico (PLA), alginatos y quitosano entre otros. Estos polímeros se encuentran disponibles en diversas formulaciones comerciales que se consideran seguras para uso humano (Parveen et al., 2023).

Por su parte, la capa lipídica funciona como una barrera molecular que disminuye la fuga de fármacos encapsulados y protege el núcleo frente a la degradación, al limitar la infiltración de agua. Entre los lípidos más utilizados destacan los esteroides, como el colesterol (CLS); los fosfolípidos, como la lecitina de soya hidrogenada (HSPC); y los lípidos pegilados. Este diseño híbrido combina las ventajas de las nanopartículas lipídicas y poliméricas, lo que se traduce en una mayor estabilidad, biocompatibilidad y captación celular (González-García et al., 2025; Parveen et al., 2023). Tanto fármacos hidrofóbicos como hidrofílicos, así como otras moléculas bioactivas; péptidos, proteínas, vacunas y agentes de diagnóstico, han sido exitosamente incorporados en estos nanoacarreadores (Parveen et al., 2023; Shah et al., 2022).

Una ventaja adicional de las NPs radica en su coraza lipídica, que permite realizar diversas modificaciones superficiales, como la funcionalización con ligandos para mejorar la dirección hacia un blanco específico, o la incorporación de segmentos sensibles a estímulos que posibilitan una liberación controlada e “inteligente”. Asimismo, la incorporación de PEG en la capa externa contribuye a prolongar el tiempo de circulación sistemática al reducir el reconocimiento por el sistema inmunológico y permite el acoplamiento de fracciones orientadas (Gajbhiye et al., 2023).

Un ejemplo de ello es el desarrollo de NPs con un núcleo de PLGA recubierto con lecitina de soya y dipalmitoilfosfatidilcolina, además de una capa externa pegilada, diseñadas para la encapsulación de ergotamina y cafeína con fines terapéuticos en el tratamiento de la migraña en un modelo murino. Estas nanopartículas demostraron biocompatibilidad, buena estabilidad, alta absorción cerebral y efecto antimigraña (Dali & Shende, 2022). De forma similar, se han reportado plataformas híbridas de PLGA-lipídicas, recubiertas con PEG y conjugadas con un aptámero con afinidad hacia células de cáncer de próstata empleadas para encapsulación y liberación de docetaxel. Dichos sistemas presentaron alta eficiencia de encapsulación, un perfil de liberación más controlado y una mejor capacidad de direccionamiento celular en estudios *in vitro*, en comparación con las nanopartículas PLGA desnudas y las nanopartículas copoliméricas de PLGA-PEG (L. Zhang et al., 2008). Estos resultados evidencian el gran potencial de las NPs, particularmente cuando se combinan con estrategias de modificación superficial,

como la pegilación y la incorporación de ligandos específicos, ya que mejoran la eficiencia terapéutica, la especificidad y la seguridad de los tratamientos farmacológicos.

En el caso del tratamiento de la EA, se han empleado NPs basadas en un núcleo PLGA recubierto con una capa lipídica conformada por lecitina de soya y CLS-PEG, conjugadas con Tf, para la encapsulación de N-acetilcisteína (NAC), un potente agente antioxidante con potencial terapéutico frente a la neuroinflamación. En su caracterización, estas NPs mostraron ser estables, libres de aglomeraciones y con una adecuada distribución de tamaño. Posteriormente, se evaluaron en un modelo *in vitro* con astrocitos humanos derivados iPSC de un paciente con EA, llevados a un estado reactivo mediante estimulación con LPS. El cultivo celular fue tratado con nanoacarreadores cargados, vacíos y con NAC libre. Los resultados mostraron que las nanopartículas funcionalizadas con transferrina y cargadas con NAC lograron modular la expresión de varios factores relacionados con la neurotoxicidad durante la neuroinflamación, en mayor medida que las formulaciones sin carga activa o con NAC libre (Vargas-Barona et al., 2024).

1.1.8 Puntos de carbono como agentes teranóstico

Los nanomateriales teranóstico son nanosistemas que integran en una misma plataforma capacidades terapéuticas y diagnósticas. Estos sistemas permiten la administración dirigida de diversos componentes bioactivos, así como la obtención de imágenes *in vivo*, contribuyendo al desarrollo de tratamientos para enfermedades como el cáncer, los trastornos del SNC, las enfermedades inmunológicas y los trastornos genéticos (F. Chen et al., 2014; Ramanathan et al., 2018). Un elemento clave de los nanomateriales teranósticos es la incorporación de agentes de contraste en técnicas de imagen diagnóstica, con el fin de mejorar la visualización de la anatomía del tejido o proporcionar información sobre procesos patológicos específicos (Hsu et al., 2023). En los últimos años, los nanomateriales han emergido como una estrategia innovadora en el ámbito del diagnóstico por imagen, al incrementar la resolución y sensibilidad en la detección de enfermedades. En particular, las técnicas de imagen molecular permiten observar procesos biológicos en tiempo real, lo cual resulta crucial para el diagnóstico temprano, la evaluación del estado patológico y el monitoreo de la respuesta terapéutica (Mhlanga et al., 2024).

Entre los distintos nanomateriales desarrollados, los nanomateriales de carbono han despertado interés en diversos campos, incluida la biomedicina. Ejemplos destacados son los nanotubos de carbono (CNT), los derivados del grafeno y los puntos de carbono (CD), los cuales presentan notables propiedades ópticas, como la fluorescencia, que los hace útiles como agentes de contraste en la formación de imágenes y en la

detección óptica (Bayda et al., 2021). Dentro de estos, los CD se consideran especialmente prometedores para aplicaciones biológicas y biomédicas, particularmente en el área de imagen y terapéutica (B. Wang et al., 2022). Estos nanomateriales, con tamaños en el rango de 1 nm a 10 nm, presentan atributos sobresalientes, tales como fluorescencia ajustable, alto rendimiento cuántico, facilidad de síntesis y bajo costo, elevada estabilidad química, térmica y óptica, alta solubilidad en agua, sencilla funcionalización química, así como mínima citotoxicidad y buena biocompatibilidad. Estas propiedades los hacen adecuados para aplicaciones en bioimagen, administración de fármacos y biosensores (Bayda et al., 2021; Jayaprakash et al., 2024).

En cuanto a su mecanismo de fotoluminiscencia (PL, por sus siglas en inglés), se ha propuesto que durante la síntesis se generan dominios de carbonos con hibridación sp^2 , conformando estructuras π conjugadas. La emisión radiativa asociada a las transiciones de brecha de banda en la región π interna se denomina "emisión del núcleo de carbono". Estudios recientes indican que las características de PL derivadas de estas transiciones están determinadas por el tamaño de los CD, lo cual responde al efecto de confinamiento cuántico (QCE, por sus siglas en inglés). Este fenómeno ocurre cuando los CD son menores que el radio de Bohr del excitón. Cuanto mayor es el tamaño del dominio π conjugado, menor es la brecha energética, mientras que los dominios confinados generan una mayor separación entre los niveles energéticos ocupados y desocupados (HOMO y LUMO) (**Figura 9**). En otras palabras, a medida que aumenta el tamaño de los CD sintetizados y, con ello el dominio π conjugado, se produce un corrimiento al rojo en el pico de emisión debido al QCE (Alafeef et al., 2024; Yan et al., 2019).

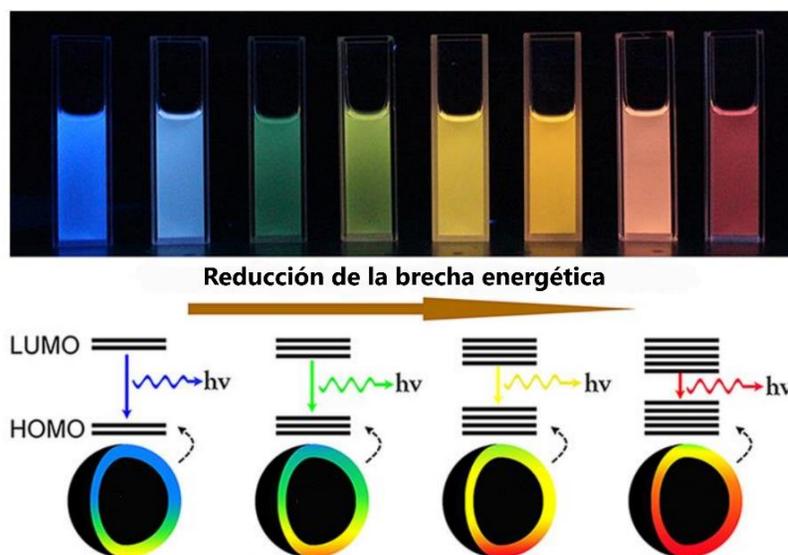


Figura 9. Mecanismos de fotoluminiscencia en puntos de carbono (CD). El aumento del tamaño de los CD genera en una disminución gradual de sus bandas prohibidas, lo que resulta en un corrimiento al rojo de la emisión de fotoluminiscencia (izquierda). Tomada y modificada de Alafeef et al., 2024.

Además de sus propiedades ópticas, los CD han demostrado la capacidad de inhibir la agregación tanto de la P-tau como el péptido A β , lo que sugiere su potencial como inhibidores duales (Smith et al., 2024). Asimismo, presentan efectos protectores al reducir los niveles de ROS y el estrés oxidativo, actuando como agentes antioxidantes. También se ha reportado que los CD pueden modular indicadores inflamatorios y regular vías de señalización celular NF- κ B (Sharma et al., 2023). Gracias a esta combinación de funciones, los CD no sólo contribuyen a reducir biomarcadores asociados con la EA, sino que también ayudan a mitigar procesos inflamatorios relacionados. Además, su capacidad de permitir el monitoreo en tiempo real lo posiciona como herramienta prometedora para el tratamiento y diagnóstico. Esto se ha demostrado, por ejemplo, en un modelo de *Danio rerio* donde CD conjugados con Tf lograron atravesar la BHE y alcanzar el SNC (**Figura 10**) (Han et al., 2017).

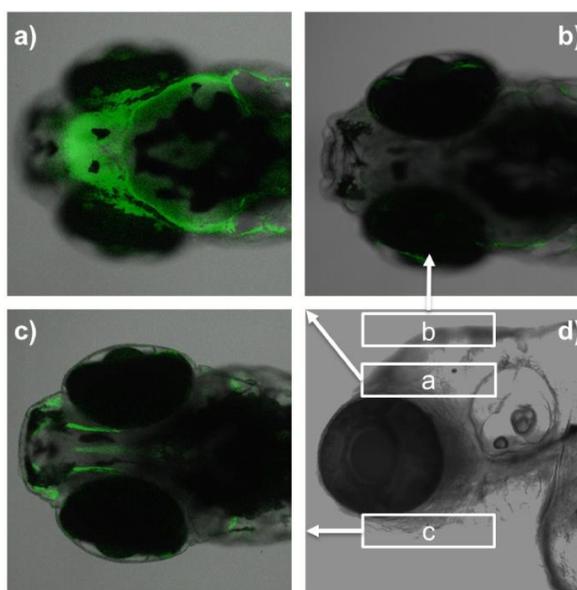


Figura 10. Imágenes de fluorescencia confocal de a) cerebro, b) dorsal, c) ventral y d) lateral de pez cebra 5 h después de la administración de puntos cuánticos conjugados con transferrina. Tomada de Han et al., 2017.

1.1.8.1 Puntos de carbono y nanopartículas híbridas polímero-lípido para la enfermedad de Alzheimer

Silvestre Martínez (2024) estudió el efecto sinérgico de la coencapsulación de fucoxantina (Fx), un compuesto con propiedades antioxidantes, y CD, en NPs formuladas con un núcleo de PLGA y una capa lipídica compuesta por HSPC y CLS-PEG conjugada con Tf. En este trabajo se demostró que dicho nanoacarreador moduló favorablemente la expresión de los genes asociados de la EA, como APP, GFAP y S100 β , lo que condujo a una reducción de la inflamación inducida en astrocitos de rata estimulados con

LPS. Asimismo, mediante microscopía confocal en un modelo de larvas de *Danio rerio*, se observó que las NPs que contenían Fx y CDs (NPs CDFx) fueron capaces de atravesar la BHE y acumularse en el cerebro (Figura 11). Estos hallazgos abren la posibilidad de que dicha acumulación permita una liberación local controlada, con el potencial de reducir marcadores proinflamatorios *in vivo*.

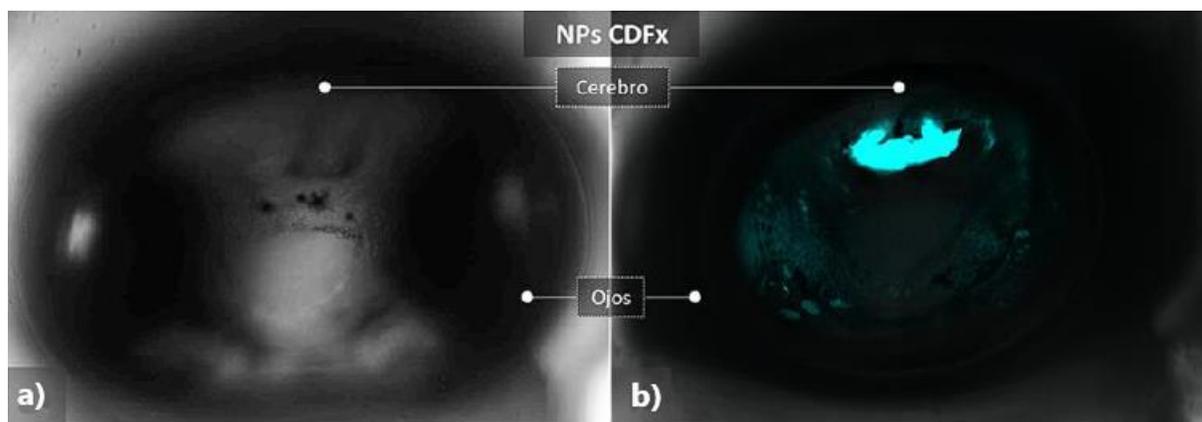


Figura 11. Larva de *Danio rerio* a los 5 días post fertilización a) inyectada con NPs CDFx sin señal fluorescente visible y b) inyectada con NPs CDFx, observándose fluorescencia en color azul bajo un filtro de 430-460 nm, lo que indica presencia de las NPs en el en el cerebro del organismo. Tomada y modificada de Silvestre Martínez, 2024.

Asimismo, este enfoque podría extenderse a otros compuestos bioactivos combinados con CD, como el Sonlicromanol, cuya encapsulación en un nanoacarreador aún no ha sido reportada. La incorporación de este compuesto bioactivo en NPs conjugadas con Tf representa una oportunidad para atravesar la BHE y lograr una entrega dirigida al cerebro, lo que podría maximizar los beneficios terapéuticos del Sonlicromanol. Además, la fluorescencia de los CD puede aprovecharse tanto para confirmar su distribución como para apoyar el diagnóstico, mientras que sus propiedades biológicas podrían potenciar el efecto terapéutico. Sin embargo, resulta fundamental evaluar la citocompatibilidad de estos sistemas para garantizar el desarrollo de terapias seguras y eficientes, y evitando respuestas adversas en aplicaciones biomédicas como el tratamiento de la EA. Por lo anterior, la hipótesis y los objetivos de este trabajo son expuestos a continuación.

1.2 Hipótesis

Las nanopartículas híbridas polímero lípido cargadas con Sonlicromanol serán citocompatibles en astrocitos de rata.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Sintetizar y caracterizar un sistema de nanopartículas polímero-lípido cargadas con Sonlicromanol para determinar el intervalo de concentraciones citocompatibles en cultivos de astrocitos de rata.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Sintetizar y caracterizar nanopartículas cargadas con Sonlicromanol para su posterior evaluación *in vitro* en cultivo de astrocitos de rata.
2. Determinar el intervalo de concentración de Sonlicromanol libre que no genere una citotoxicidad en un modelo de cultivo *in vitro* de astrocitos.
3. Determinar el intervalo de concentraciones de las nanopartículas cargadas con Sonlicromanol que mantienen los astrocitos de rata metabólicamente viables.

Capítulo 2. Metodología

A continuación, se describe la metodología empleada para la síntesis y caracterización de las NPs (**Figura 12**). En primer lugar, se llevó a cabo la conjugación de CLS-PEG-COOH con Tf para obtener el CLS-PEG-Tf. Por otra parte, los CD se sintetizaron mediante termólisis del ácido cítrico. Una vez obtenidos ambos componentes, se procedió a la formulación de las nanopartículas mediante procesos de autoensamblaje y precipitación, encapsulando simultáneamente el agente bioactivo Sonlicromanol.

Posteriormente, se realizaron estudios de caracterización que incluyeron; dispersión dinámica de luz (DLS), espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia de fluorescencia, determinación de la eficiencia de encapsulación y análisis perfil de liberación. Finalmente, se evaluó la citocompatibilidad de las NPs y de los componentes libres utilizando un modelo de astrocitos de rata estimulados con LPS.

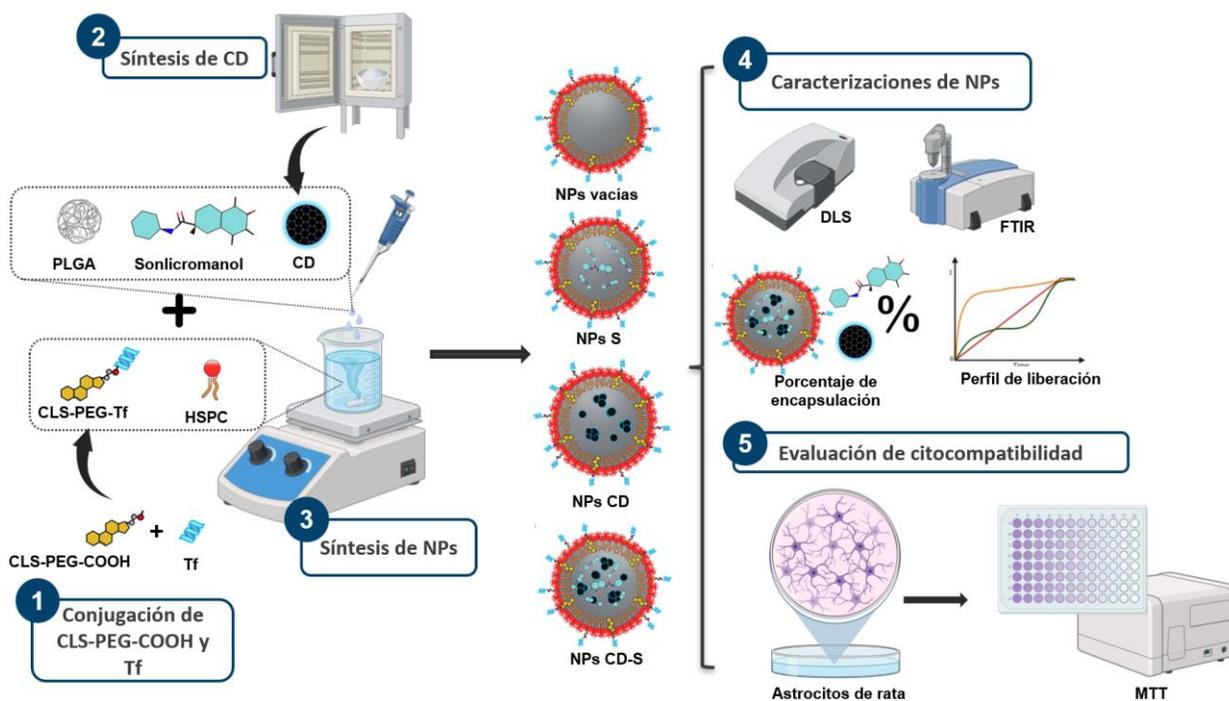


Figura 12. Metodología general del trabajo. 1) Conjugación de CLS-PEG-COOH con Tf. 2) Síntesis de CD a partir de ácido cítrico. 3) Síntesis de NPs. 4) Caracterización de las NPs mediante DLS, FTIR, determinación de la capacidad de carga y perfil de liberación. 5) Evaluación de citocompatibilidad en astrocitos de rata estimulados con lipopolisacárido. PLGA: poli (ácido láctico-co-glicólico). HSPC: lecitina de soja hidrogenada. CD: puntos de carbono. Tf: transferrina. CLS-PEG-COOH: colesterol pegilado con grupos carboxílicos. CLS-PEG-Tf: colesterol pegilado conjugado con transferrina. NPs: nanopartículas híbridas polímero-lípido. NPs S: nanopartículas cargadas con Sonlicromanol. NPs CD-S: nanopartículas cargadas con puntos de carbono y Sonlicromanol. DLS: dispersión dinámica de luz. FTIR: espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier. MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio. Creado en Biorender.

2.1 Conjugación de colesterol-PEG-COOH con transferrina

El CLS-PEG-COOH (Nanosoft Polymers, EUA; 3042-2000) fue conjugado con la holo-transferrina (Tf) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos de América (EUA); T0665) mediante una reacción de activación con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropilo) carbodiimida (EDC) (Sigma-Aldrich, EUA; E7750) y N-hidroxisuccinimida (NHS) (Sigma-Aldrich, EUA; 130672). Esta reacción permitió la activación de los grupos carboxilo del CLS-PEG-COOH, los cuales reaccionaron con las aminas primarias de la Tf mediante enlaces tipo amida (L. Liu et al., 2015; Silvestre Martínez, 2024; Vargas-Barona et al., 2024).

La síntesis del conjugado CLS-PEG-Tf se llevó a cabo disolviendo CLS-PEG-COOH junto con EDC (100 mM) y NHS (100 mM) en agua Mili-Q, sometiendo la mezcla a sonicación durante 10 minutos. Posteriormente, se agregó la Tf (2 mg/mL) y la reacción se mantuvo bajo agitación constante a 200 RPM durante 24 h a 22 °C. Finalizado el tiempo de reacción, la solución se transfirió a un filtro Microsep™ Advance (Cytiva/Pall Life Sciences, EUA; MCP010C46) con un límite de peso molecular (MWCO, por sus siglas en inglés) y se sometió a lavados por centrifugación (9000 RPM durante 12 min), con el fin de eliminar reactivos no conjugados y retirar exceso de agua. El producto obtenido se resuspendió en agua Mili-Q, se congeló durante 24 h a -80 °C y posteriormente se liofilizó en un equipo FreeZone 1 (Labconco, EUA) durante 24 h, bajo una presión de vacío de 0.011 mbar y -56 °C. Finalmente, la conjugación del CLS-PEG-COOH y Tf se verificó empleando FTIR (**Figura 13**).

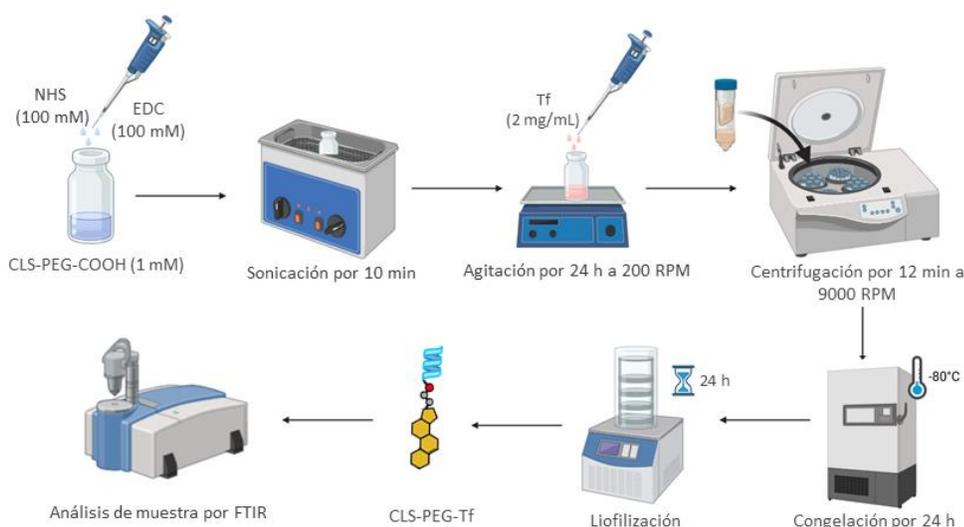


Figura 13. Metodología para la conjugación de CLS-PEG-COOH con Tf. Se agrega NHS y EDC a la solución de Col-PEG-COOH. Se sónica la mezcla resultante durante 10 min, para luego agregar Tf y se deja en agitación por 24 h. La solución se centrifuga, se congela a -80 °C y se liofiliza por 24 h. NHS: N-hidroxisuccinimida. EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropilo) carbodiimida. CLS-PEG-COOH: colesterol conjugado con polietilenglicol con grupos carboxilos. Tf: transferrina. CLS-PEG-Tf: colesterol conjugado con polietilenglicol y funcionalizado con transferrina. Creado en Biorender.

2.2 Síntesis de puntos de carbono

Los CD se sintetizaron mediante la termólisis de ácido cítrico monohidratado (SIGMA, C1909). Para ello, se pesaron 25 g de ácido cítrico, y se distribuyeron homogéneamente en un recipiente de vidrio. Posteriormente, el material se calentó en un horno Lindberg/Blue M (Thermo Fisher Scientific) a 180 °C durante 40 h, en presencia de aire atmosférico (Amato et al., 2021). Una vez concluido el proceso de calentamiento, el material se dejó enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se pulverizó en un mortero hasta obtener un polvo de color anaranjado. De este polvo, se pesaron 3 g, que fueron disueltos en 6.6 mL de agua Mili-Q. El pH de la solución se ajustó de 4 a 7 mediante la adición de 5 mL de hidróxido de sodio 5M (NaOH) (Fermont, 36902). La mezcla resultante se mantuvo en un baño María a 50 °C, con agitación constante (700 RPM) durante 40 min. Finalmente, la solución se congeló a -80 °C durante 24 h y fue sometida a liofilización durante 31 h, bajo una presión de vacío de 0.011 mbar y a -56 °C (Figura 14) (Guzmán Uribe, 2022).



Figura 14. Metodología de la síntesis de puntos de carbono (CD). Los CD se obtuvieron a partir de la termólisis de ácido cítrico a 180 °C durante 40 h, la muestra se pulveriza y después se neutraliza con NaOH 5 M durante 40 min, para después congelar a -80 °C por 24 h y liofilizar por 31 h los CD. NaOH: hidróxido de sodio. Creado en Biorender.

2.3 Síntesis de nanopartículas híbridas polímero-lípido

La síntesis de las NPs se llevó a cabo mediante una metodología de nanoprecipitación y autoensamblaje modificada (Ahmaditabar et al., 2017; Fang et al., 2010). En primer lugar, se prepararon las soluciones stock de los distintos componentes: PLGA (Nanosoft Polymers, EUA; 11088-20-50K) a una concentración

de 20 mg/mL en acetonitrilo; CLS-PEG-Tf y HSPC a 1 mg/mL, ambos en etanol (EtOH) al 4%, en el caso de la HSPC se calentó a 65 °C durante 1 h para asegurar la disolución completa; Sonlicromanol (MedChemExpress, HY-120332) a 200 µM, CD a 5 mg/mL en tampón buffer fosfato salino 1X (PBS, por sus siglas en inglés).

En un vial de vidrio se preparó la fase orgánica, mezclando 100 µL de PLGA, 80 µL de Sonlicromanol y 32 µL de CD en 588 µL de acetonitrilo, con el objetivo de obtener concentraciones finales de 2.5 mg/mL de PLGA, 20 µM de Sonlicromanol y 200 µg/mL de CD. Para la formación de NPs vacías, NPs cargadas con CD (NPs CD) o con ambos compuestos (NPs CD-S), se mantuvieron constantes los volúmenes de PLGA y solvente. En los casos donde no se incluyó algún componente (CD o Sonlicromanol), el volumen correspondiente se reemplazó por PBS. Para el caso de las nanopartículas cargadas únicamente con Sonlicromanol (NPs-S), se utilizaban 620 µL de acetonitrilo, junto con las mismas cantidades de PLGA y Sonlicromanol que en la formulación original. En todos los casos, el volumen total de la mezcla se ajustó a 800 µL, manteniendo constantes las concentraciones finales de los compuestos añadidos. Por otro lado, en un vial ámbar se preparó la fase inorgánica, añadiendo 25 µL de HSPC y 400 µL de CLS-PEG-Tf en 3000 µL de EtOH al 4%, manteniendo la mezcla bajo agitación constante (200 RPM) y a 65 °C. Una vez listas ambas fases, la fase orgánica se incorporó gota a gota sobre la fase inorgánica. Posteriormente, se añadieron 4800 µL de agua Mili-Q. La solución resultante se sometió a sonicación durante 5 min en un baño ultrasónico (serie MH 2800, Branson Ultrasonics, EUA). Finalmente, las suspensiones de NPs se sometieron a lavados con filtros Microsep™ Advance de 10 kDa y se centrifugaron a 12,000 x g, con el objetivo de eliminar moléculas libres y concentrar las NPs en un volumen final de 800 µL, el cual fue recuperando para su posterior caracterización y aplicación en experimentos correspondientes (**Figura 15**).

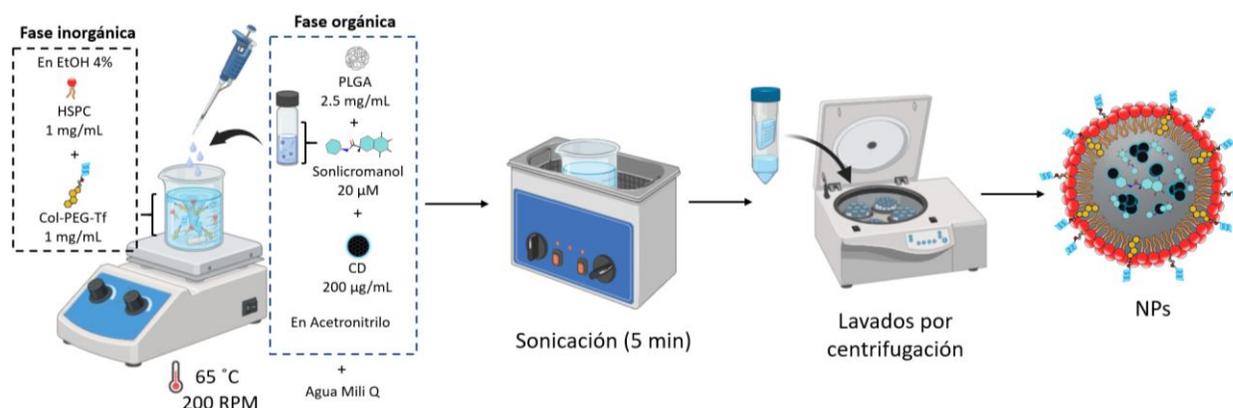


Figura 15. Metodología utilizada para la síntesis de nanopartículas híbridas polímero-lípido (NPs). La fase orgánica se agrega en forma de goteo a la fase inorgánica a 65 °C a una agitación constante, posteriormente se agrega agua Mili Q. La solución es sonicada por 5 min y se realizan lavados por centrifugación para obtener las NPs. PLGA: poli (ácido láctico-co-glicólico). HSPC: lecitina de soya hidrogenada. CD: puntos de carbono. Tf: transferrina. CLS-PEG-Tf: colesterol pegilado conjugado con transferrina. EtOH: etanol. Creado en Biorender.

2.4 Caracterización de las nanopartículas híbridas polímero-lípido

2.4.1 Espectroscopia por transformada de Fourier (FTIR)

Se empleó espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés) para analizar la composición química de las NPs. El análisis se llevó a cabo utilizando 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. Las NPs se evaluaron en su forma liofilizada, mientras que la Tf, el CLS-PEG-COOH, el CLS-PEG-Tf, la HSPC, el PLGA y los CD fueron analizados en forma de polvo.

2.4.2 Dispersión dinámica de luz (DLS)

El diámetro hidrodinámico, el índice de polidispersidad (PDI, por sus siglas en inglés) y el potencial Zeta (ζ) de las NPs se determinaron mediante el DLS en un Zetasizer Nano-Zs (Malvern Instruments, Reino Unido). Para el análisis de tamaño hidrodinámico y potencial ζ , se empleó una celda DTS1070, considerando un índice de refracción de 0.142 y agua como medio dispersante. Se cargaron 200 μL de cada formulación de NPs, y por muestra se realizaron tres mediciones independientes, cada una con 10 corridas de 10 segundos. Se reportó el promedio de cada parámetro.

2.4.3 Intensidad de fluorescencia de los CD

La emisión fluorescente de los CD se evaluó en un espectrofluorómetro Hitachi F-7000 (modelo 5J1-0003). Los CD se disolvieron en PBS (5 mg/mL). El espectro de excitación se obtuvo a una longitud de emisión de 470 nm, mientras que el espectro de emisión se registró en el rango de 400-700 nm, con una longitud de excitación de 370 nm.

2.5 Encapsulamiento de Sonlicromanol y CD en las nanopartículas híbridas

La absorbancia del Sonlicromanol se determinó en un espectrofotómetro UV-Vis Cary 60 (Agilent Technologies, EUA). Para la cuantificación, se generó una curva de calibración en un rango de 2 a 20 μM ,

disolviendo el compuesto en PBS, y midiendo la densidad óptica (D.O.) a 288 nm en un lector de placas Epoch (BioTek, EUA).

De forma análoga, se realizó una curva de calibración de los CD en un rango de 2 a 20 $\mu\text{g/mL}$, registrando la intensidad de emisión del espectrofluorómetro, con una longitud de onda de excitación de 370 nm.

Para determinar la concentración encapsulada de Sonlicromanol y CD en las NPs, se empleó un kit de mini diálisis de 8 kDa de MWCO (Cytiva, EUA; 80648432). Se recuperaron los 800 μL de NPs recién sintetizadas dentro de la membrana de diálisis, la cual se sumergió en un vaso precipitado con 1600 μL de PBS como medio externo de liberación, asegurando que la membrana no tuviera contacto directo con el vaso. Posteriormente, el sistema se incubó a 37 °C, con agitación constante (120 RPM) para simular condiciones fisiológicas.

Tras 24 h de incubación, se recolectaron muestras del medio externo para cuantificar la liberación de compuestos liberados. La concentración de Sonlicromanol se midió en el lector de placas Epoch a 288 nm, mientras que la cuantificación de CD encapsulados se realizó mediante el espectrofluorómetro, con una excitación a 370 nm (**Figura 16**). Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

La concentración de los compuestos se obtuvo a partir de la siguiente fórmula:

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

donde $D.O._{muestra}$ es lo que se obtuvo en la lectura de la muestra menos la lectura de las NPs vacías el cual se utilizó como control ($D.O._{control}$), para posteriormente aplicar la ecuación obtenida de la curva de calibración, y determinar la fracción de Sonlicromanol y de CD que fue incorporados exitosamente en las nanopartículas.

Para obtener el porcentaje encapsulado de Sonlicromanol y CD se utilizó la siguiente ecuación:

$$Eficiencia\ de\ encapsulamiento\ (\%) = \left(\frac{C_D}{C_T} \right) \times 100 \quad (2)$$

donde C_D es la concentración detectada del Sonlicromanol y de los CD, y C_T es la concentración total de cada compuesto utilizado para la síntesis.

2.6 Perfil de liberación de Sonlicromanol y CD en las nanopartículas híbridas

El perfil de liberación se evaluó utilizando el kit de mini diálisis de 8 kDa de MWCO, bajo las mismas condiciones descritas en el ensayo de encapsulamiento. Se recolectaron muestras del medio externo en diferentes intervalos de tiempo: 0.5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h y 24 h. La cuantificación se realizó en un lector de placas Epoch, registrando la absorbancia a 288 nm (**Figura 16**). Cada ensayo se llevó a cabo por triplicado. Posteriormente, se aplicó la ecuación (1) para cada formulación que contenía uno o ambos compuestos. En el caso específico de las NPs S, se utilizó adicionalmente la ecuación (3):

$$\text{Liberación de Sonlicromanol (\%)} = \left(\frac{C_n}{C_T} \right) \times 100 \quad (3)$$

donde C_n es la concentración liberada del Sonlicromanol (μM) a un tiempo determinado.

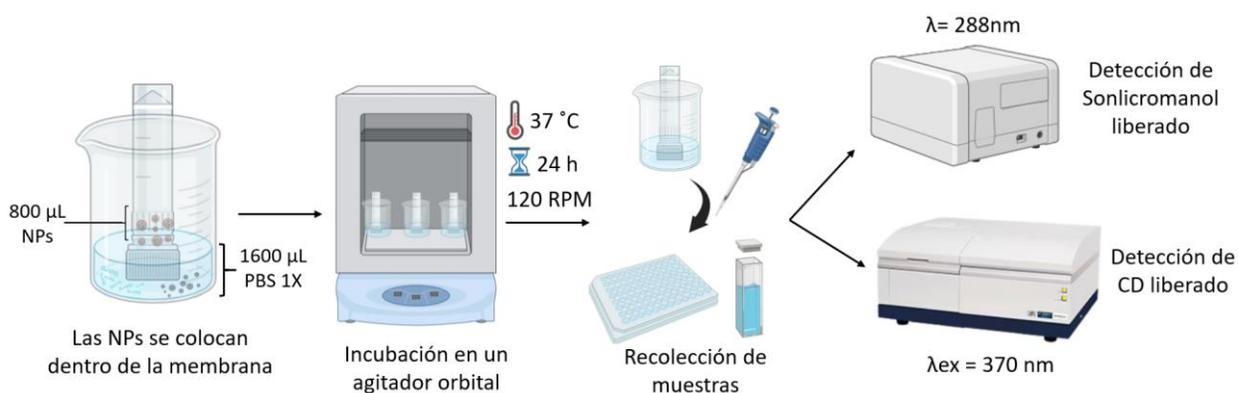


Figura 16. Metodología utilizada para eficiencia de encapsulación y perfil de liberación de las nanopartículas híbridas polímero-lípido (NPs). Las NPs recién sintetizadas son colocadas dentro de la membrana de diálisis y son incubadas en un agitador orbital durante 24 h en el caso del ensayo de encapsulación, mientras que en el perfil de liberación se dejó 0.5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h y 24 h a 37 °C. Se recolectan las muestras y son analizadas para detectar la concentración de los compuestos. Creado en Biorender.

2.7 Cultivo celular y estudios de viabilidad celular

2.7.1 Cultivo de células hepáticas humanas (HepG2)

Se realizaron pruebas preliminares con diferentes concentraciones de Sonlicromanol empleando hepatocitos humanos de carcinoma HepG2 (Addexbio Technologies, EUA; C0015002), derivados de un

joven caucásico de 15 años. Las células se cultivaron en placas de 100 mm utilizando medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés) (Gibco, EUA; 10569010), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de antibiótico-antimicótico (A/A). Las placas se mantuvieron en incubación a 37 °C con una atmósfera controlada de 5% de CO₂, reemplazando el medio cada dos días hasta alcanzar una confluencia del 80%. Una vez alcanzada dicha confluencia, las células fueron tratadas con 0.25% de tripsina-EDTA para su desprendimiento y posteriormente sembradas en una placa de 96 pozos, a una densidad de 2x10⁴ cel/pozo. Finalmente, se dejaron en incubación durante 24 h para permitir la adecuada adhesión de las células antes de iniciar los experimentos.

2.7.2 Prueba preliminar de viabilidad celular por MTT con HepG2

El ensayo de viabilidad celular con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) permite estimar la actividad metabólica de las células vivas. Este método se basa en la reducción enzimática de la sal de tetrazolio a cristales de formazán de color azul púrpura, lo cual constituye una herramienta útil para evaluar la citotoxicidad inducida por distintos tratamientos en cultivos celulares *in vitro* (Grela et al., 2018).

En este estudio, el ensayo MTT se utilizó como prueba preliminar para evaluar la citocompatibilidad del Sonlicromanol en células HepG2. Una vez sembradas e incubadas durante 24 h en la placa de 96 pozos, las células fueron tratadas con distintas concentraciones del compuesto bioactivo libre. Para ello, se retiró el medio a cada pozo y se reemplazó por 100 µL de medio fresco que contenía Sonlicromanol a concentraciones de 0.02, 2, 20 y 200 µM. Posteriormente, la placa se incubó durante 24 h.

Transcurrido este tiempo, se retiró el medio y se realizaron lavados con 100 µL de PBS 1X para eliminar cualquier residuo. Después, se añadieron 90 µL de medio fresco y 10 µL de solución MTT (Sigma-Aldrich, EUA; M5655) a una concentración de 5 mg/mL a cada pozo. La placa se incubó durante 4 h a 37 °C y 5% de CO₂. Posteriormente, se agregaron 100 µL de ácido clorhídrico (HCl) 0.01 M con dodecilsulfato sódico (SDS) al 10%, y se incubó por 18 h para permitir la solubilización de los cristales de formazán. Finalmente, la absorbancia se midió a 570 nm en el espectrofotómetro de placas Epoch. El porcentaje de viabilidad celular se calculó utilizando la ecuación (4):

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = \left(\frac{D.O_{\text{muestra}} - D.O_{\text{blanco}}}{D.O_{\text{control}} - D.O_{\text{blanco}}} \right) \times 100 \quad (4)$$

donde $D.O_{\text{muestra}}$ es el valor de la absorbancia de los pozos con células tratadas, $D.O_{\text{control}}$ es el valor de la absorbancia de las células sin tratar y $D.O_{\text{blanco}}$ es el valor de la absorbancia de los pozos sin células y que contiene medio y la solución de MTT.

2.7.3 Cultivo de astrocitos de rata

Los astrocitos de rata (IXCells Biotechnologies; RA-005) se cultivaron en medio basal de astrocitos suplementado con 10% de SFB, 1% de A/A y el suplemento de crecimiento de astrocitos (IXCells Biotechnologies, MD-0039). Las células fueron cultivadas en una placa 100 mm e incubadas a 37 °C y 5% de CO₂, y el medio se reemplazó periódicamente hasta alcanzar una confluencia deseada (80-90%). Una vez alcanzada la confluencia, las células se desprendieron con 0.25% tripsina-EDTA y se sembraron en una placa de 96 pozos a una densidad de 1×10^4 cel/pozo. Posteriormente, se incubaron durante 24 h para permitir su adecuada adhesión a la placa.

2.7.4 Ensayo de viabilidad celular por MTT con astrocitos de rata

En este ensayo se evaluaron las concentraciones de 100 y 500 ng/mL de LPS, siguiendo el procedimiento de MTT descrito en la sección 2.7.2.

Tras determinar la concentración óptima de LPS para la activación de los astrocitos de rata y una vez que las células fueron sembradas en una placa de 96 pozos, se estimuló 500 ng/mL de LPS en 100 µL de medio durante 24 h. Transcurrido este periodo, el medio se retiró y se realizaron lavados con 100 µL de PBS 1X. Posteriormente, se evaluaron diferentes condiciones de tratamiento que incluyeron compuestos libres (Sonlicromanol a 0.1, 1, 10 y 100 µM, y CD a 100, 200 y 300 µg/mL), combinaciones de Sonlicromanol en las concentraciones mencionadas con CD a 200 µg/mL, concentraciones encapsuladas en NPs (6.81 µM de Sonlicromanol y 6 y 9 µg/mL de CD), así como distintas formulaciones de NPs (NPs vacías, NPs S, NPs CD y NPs CD-S) en concentraciones de 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 y 1 mg/mL. Cada tratamiento se incubó durante 24 h y, posteriormente, se siguió el mismo procedimiento de viabilidad celular descrito en la sección 2.7.2.

Capítulo 3. Resultados y discusión

3.1 Pruebas preliminares en células HepG2 expuestas a distintas concentraciones de Sonlicromanol

Se llevaron a cabo pruebas preliminares en hepatocitos con el objetivo de determinar el intervalo de concentraciones seguras del Sonlicromanol (**Figura 17**). La línea celular HepG2 fue seleccionada por su relevancia en el metabolismo hepático y el efecto de primer paso, ya que los compuestos administrados por vía oral son absorbidos en el intestino y transportados directamente al hígado, donde pueden ser metabolizado o eliminados antes de alcanzar la circulación sistémica (S. Lin & Smith, 2010). Por ello, resulta adecuado evaluar la citotoxicidad del compuesto con estas células, ya que el hígado es el primer órgano en recibir concentraciones del fármaco tras su absorción y sigue siendo clave para su eliminación, incluso cuando se administra por vía parenteral. Después 24 h de incubación con las concentraciones de 0.02, 2, 20 y 200 μM de Sonlicromanol en HepG2, se demostró que el rango de 0.02 a 2 μM resultó citocompatible, con porcentajes de viabilidad celular mayor al 70%. De acuerdo con la ISO 10993-5, un material se considera citotóxico cuando la viabilidad celular del cultivo desciende por debajo del 70% (International Organization for Standardization, 2009). Por lo tanto, los resultados sugieren que, dentro de este rango de concentración, el Sonlicromanol no interfiere con la viabilidad de los cultivos celulares HepG2.

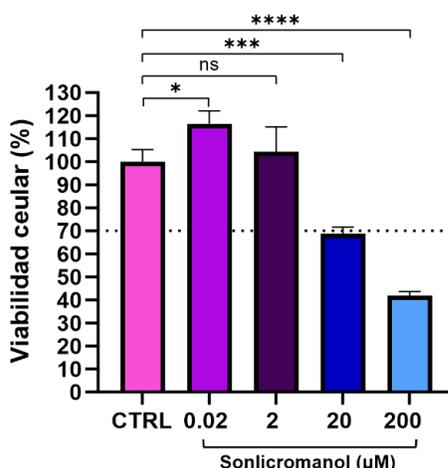


Figura 17. Porcentajes viabilidad celular en células hepáticas HepG2 a diferentes concentraciones de Sonlicromanol durante 24 h. La línea punteada señala el valor límite de viabilidad celular definido por la ISO 10993-5 para clasificar una muestra como no citotóxica. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (\pm), $n = 3$ por grupo. Datos analizados estadísticamente mediante ANOVA de una vía utilizando el análisis a posteriori de Tukey, con $p < 0.05$. Las diferencias significativas están representadas como: ns (no significativo), * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$. Sonlicromanol es citocompatible en concentraciones de 0.02 y 2 μM . CTRL: células sin tratamiento.

Aunque la concentración de 20 μM de Sonlicromanol mostró una viabilidad celular promedio de $68.69 \pm 3.02\%$, ligeramente inferior al umbral del 70%, se seleccionó para los ensayos de encapsulación y posteriores experimentos. Esta decisión se basó en la consideración de que la eficiencia de encapsulación no sería del 100% y, en consecuencia, la liberación progresiva del fármaco desde las nanopartículas podría atenuar la citotoxicidad, al limitar la exposición del compuesto libre a las células.

3.2 Conjugación de CLS-PEG-COOH y Tf

La conjugación del CLS-PEG-COOH con Tf se confirmó mediante análisis FTIR, obteniéndose los espectros de los materiales individuales y del conjugado (**Figura 18**). El CLS-PEG-COOH presentó picos de estiramiento correspondientes a los enlaces carbonilo (C=O) en 2882 cm^{-1} y 1110 cm^{-1} (Asadi et al., 2011; Yang et al., 2008). En el caso de la Tf, se identificaron tres picos característicos: uno a 1547 cm^{-1} , asociado a la amida II; otro a 1647 cm^{-1} , correspondiente a la amida I; y, por último a 3226 cm^{-1} , atribuido al estiramiento del enlace amina (N-H) (Ramalho et al., 2023). Estas señales también se observaron en el espectro del CLS-PEG-Tf, mientras que estuvieron ausentes en el CLS-PEG-COOH, confirmando así la conjugación (Silvestre Martínez, 2024; Vargas-Barona et al., 2024).

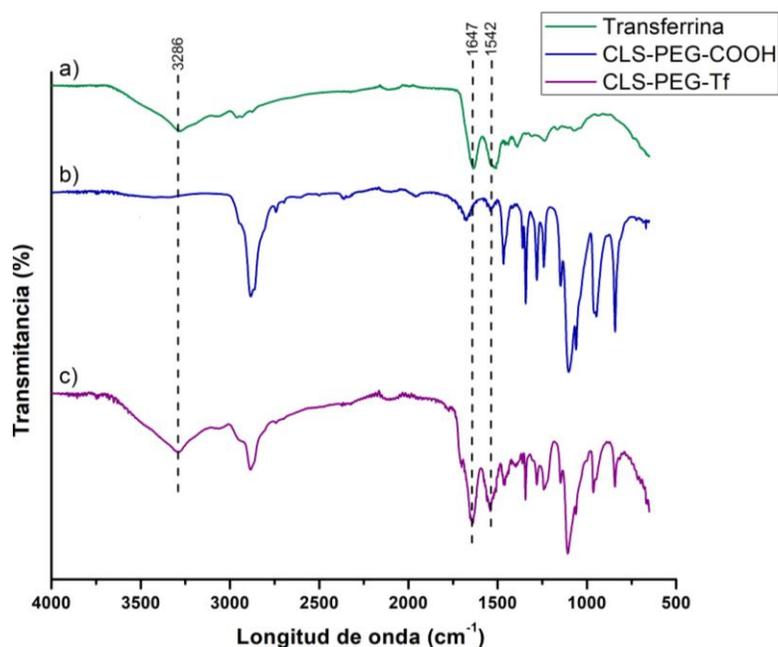


Figura 18. Espectros de FTIR de 4000 a 500 cm^{-1} de los compuestos de: a) Transferrina (Tf), b) CLS-PEG-COOH y c) CLS-PEG-Tf. La conjugación de CLS-PEG-COOH y Tf se confirmó mediante FTIR, ya que en el espectro de CLS-PEG-Tf se observaron tres señales correspondientes de Tf (1542 cm^{-1} , 1647 cm^{-1} y 3226 cm^{-1}), lo cual indica la unión covalente de ambos compuestos. Tf: transferrina. CLS-PEG-COOH: colesterol pegilado con grupos carboxílicos. CLS-PEG-Tf: colesterol pegilado conjugado con transferrina.

Con base en estos resultados, se confirma la formación del conjugado CLS-PEG-Tf, evidenciada por la aparición de bandas características atribuibles a la Tf en el espectro del compuesto final. Esta conjugación fue posible mediante la activación de grupos carboxilo terminal del CLS-PEG-COOH, que posteriormente reaccionaron con los grupos amina primarios presentes en la Tf mediante la formación de un enlace amida. Esta modificación es particularmente relevante, ya que la presencia Tf permitirá dirigir a la NPs hacia el TfR, uno de los blancos más utilizados en la BHE para favorecer la entrega eficiente de compuestos terapéuticos al cerebro mediante transcitosis mediada por receptores (Johnsen et al., 2019).

3.3 Caracterización de nanopartículas híbridas polímero-lípido

3.3.1 Composición química por medio de Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

Se realizó un análisis por FTIR con el fin de identificar los grupos funcionales presentes en las NPs obtenidas. Para ello, se obtuvieron los espectros de referencia de los compuestos individuales (PLGA, CLS-PEG-Tf, HSPC y CD) y de los nanoacarreadores desarrollados (**Figura 19**)

En el espectro de PLGA se identificaron bandas características asociadas a su estructura química. Se observó una señal a 1085 cm^{-1} , correspondiente al estiramiento del éster (C-O-C), así como picos atribuidos a los grupos metilo (C-H) en 1383 y 1420 cm^{-1} . Además, se registró una señal intensa en 1750 cm^{-1} , relacionada con el estiramiento del grupo carbonilo (C=O), y bandas asociadas a los estiramientos de los grupos CH, CH₂ y CH₃ entre 2900 y 3000 cm^{-1} (Saka et al., 2020).

En el espectro HSPC se detectaron bandas características relacionadas con las vibraciones de estiramiento y flexión de los enlaces C-H de las cadenas largas de los ácidos grasos, observadas a 2920 cm^{-1} , 2851 cm^{-1} y 1468 cm^{-1} . También se encontraron señales del grupo fosfato, como las vibraciones de estiramiento del enlace P=O a 1241 cm^{-1} y la vibración del enlace P-O-C a 1065 cm^{-1} . Finalmente, se identificó una banda a 722 cm^{-1} , atribuida a la vibración del grupo colina N⁺(CH₃)₃ (Miatmoko et al., 2023; Zhao et al., 2019).

En el espectro de los CD se observaron señales en 1549 y 1384 cm^{-1} , asociadas a vibraciones características de grupos carbonilo (C-O-H). Estas señales son consistentes con la presencia de grupos carboxilos en la superficie de los CD (Guzmán Uribe, 2022).

Finalmente, en las formulaciones de NPs (NPs vacías, NPs S y NPs CD-S) se identificaron las señales correspondientes de cada uno de sus componentes. Las NPs mostraron picos característicos de PLGA a 1085 cm^{-1} y 1750 cm^{-1} , asociados al grupo éster y al carbonilo, respectivamente. En el caso del HSPC, se observaron las bandas de 2920 cm^{-1} y 2851 cm^{-1} , relacionadas con las cadenas de ácidos grasos; mientras que para el CLS-PEG-Tf se detectaron las señales en 1542 cm^{-1} , 1647 cm^{-1} y 3226 cm^{-1} , asignadas a las vibraciones de la amida II, amida I y el grupo amina, respectivamente. Estos resultados confirman la presencia de los componentes estructurales en las formulaciones de NPs, lo que respalda la correcta incorporación de los materiales base durante la síntesis. Cabe señalar que no se observaron bandas atribuibles de los CD en los espectros de las formulaciones de NPs, lo que sugiere que sus señales no fueron tan predominantes debido a que se encuentran traslapados con las señales de los componentes mayoritarios como son el PLGA, HSPC y CLS-PEG-Tf. Esto podría indicar que los CD permanecen retenidos en el sistema, aunque en menor proporción relativa del espectro global.

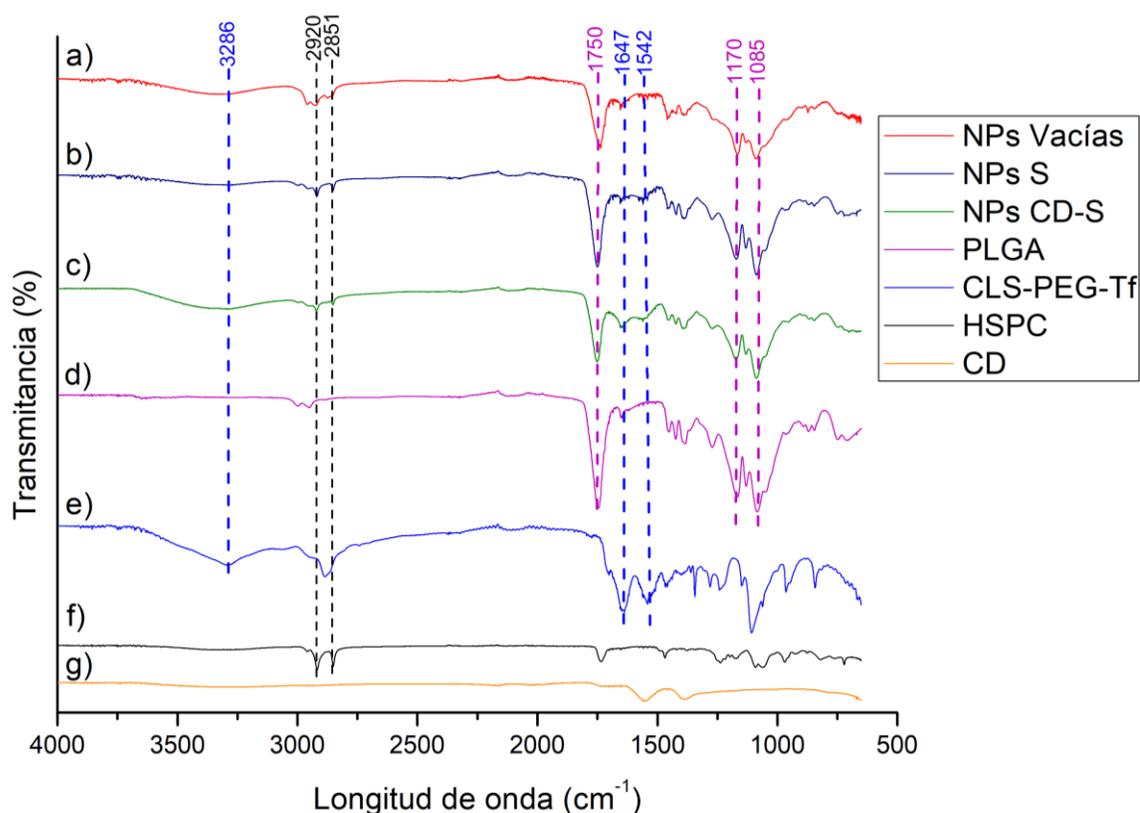


Figura 19. Espectros de FTIR de 4000 a 500 cm^{-1} de los compuestos de: a) NPs vacías, b) NPs S, c) NPs CD-S, d) PLGA, e) CLS-PEG-Tf, f) HSPC y g) CD. A partir de FTIR se pudo confirmar que las NPs contaban con picos característicos de PLGA (1085 cm^{-1} y 1750 cm^{-1}), CLS-PEG-Tf (1542 cm^{-1} , 1647 cm^{-1} y 3226 cm^{-1}) y HSPC (2920 cm^{-1} y 2851 cm^{-1}). NPs S: nanopartículas cargadas con Sonlicromanol. NPs CD-S: nanopartículas cargadas con puntos de carbono y Sonlicromanol. PLGA: poli (ácido láctico-co-glicólico). CLS-PEG-Tf: colesterol pegilado conjugado con transferrina. Tf: transferrina. HSPC: lecitina de soya hidrogenada. CD: puntos de carbono.

3.3.2 Diámetro hidrodinámico, índice de polidispersión (PDI) y potencial zeta (ζ) mediante dispersión dinámica de luz (DLS)

Con el fin de evaluar las propiedades fisicoquímicas de las NPs, se llevó a cabo un análisis mediante DLS, que permitió medir el diámetro hidrodinámico, el PDI y el potencial ζ (**Tabla 1**), parámetros fundamentales para caracterizar la estabilidad y la uniformidad de las NPs. Además, el conocimiento de estas propiedades ayuda a garantizar que las NPs cumplan con los requisitos necesarios para aplicaciones terapéuticas seguras y eficaces.

El diámetro hidrodinámico obtenido de NPs S, NPs CD y NPs CD-S fue de 124.6 ± 0.3 nm, 103.6 ± 0.7 nm y 106.2 ± 4.1 nm, respectivamente, evidenciando una reducción de tamaño en comparación de las NPs vacías (168.2 ± 2.6 nm). Se ha reportado que un aumento de hidrofobicidad de los compuestos encapsulados en las NPs puede favorecer la formación de diámetros hidrodinámicos reducidos (Silvestre Martínez, 2024; Tahir et al., 2019). En este sentido, el Sonlicromanol, al presentar una estructura con dominios aromáticos, puede considerarse predominantemente hidrofóbico, lo que explicaría la reducción de tamaño observada en las NPs S. Por otro lado, los CD, al poseer grupos carboxílicos que desprotonan a pH de 7.4 en PBS, adquieren carga negativa y aumentan su hidrofiliidad, actuando como estabilizantes. Se ha demostrado que los grupos cargados e hidrofílicos contribuyen a mantener diámetros reducidos en nanopartículas poliméricas (Rosiuk et al., 2019; Silvestre Martínez, 2024). Este efecto justificaría el menor tamaño de las NPs CD y NPs CD-S, probablemente debido a repulsiones electrostáticas entre partículas durante el proceso de autoensamblaje, lo cual favorece la formación de núcleos más pequeños. En conjunto, estos hallazgos sugieren que la reducción del diámetro hidrodinámico de las NPs está directamente relacionada con la afinidad química de los compuestos encapsulados y los materiales de la matriz. Cabe destacar que todos los sistemas desarrollados cumplen con el rango óptimo de 10 a 200 nm para la administración de compuestos bioactivos (Dhanasekaran et al., 2018).

El índice de polidispersidad (PDI) es un parámetro que refleja la homogeneidad de la distribución de tamaños. Valores iguales o inferiores a 0.1 indican una distribución altamente uniforme y estrecha, mientras que un PDI igual o menor 0.3 son considerados óptimos, ya que indica una población homogénea del nanoacarreador. Adicionalmente, valores menores a 0.5 están dentro de los límites aceptables (Onugwu et al., 2022; S. Zhang & Wang, 2023). En este estudio, se obtuvieron valores de PDI de 0.240 para las NPs vacías, 0.265 para las NPs S, 0.224 para las NPs CD y 0.306 para las NPs CD-S. Estos resultados indican que las NPs poseen una distribución de tamaño uniforme y dentro de los rangos adecuados, lo que respalda su potencial para su aplicación como sistema de entrega.

El potencial ζ es un parámetro que refleja la carga superficial de la nanopartícula, dependiendo del material de composición de las nanopartículas, estas tienen naturalmente una carga superficial, que puede modificarse por factores que se encuentren en su superficie (Öztürk et al., 2024). Se obtuvieron valores de potencial ζ para las NPs vacías de -23.2 ± 0.8 , para las NPs S de -32.1 ± 0.9 , NPs CD de -25.3 ± 1.1 y NPs CD-S de -36.7 ± 1.1 . Se observó un cambio significativo en las formulaciones que contienen Sonlicromanol, sugiriendo que este fármaco, al ser mayoritariamente hidrofóbico, se localiza principalmente en la capa lipídica, modificando la carga superficial (Tahir et al., 2019). De manera general, valores de potencial ζ mayores a $+25$ mV o menores a -25 mV se asocian con una estabilidad coloidal, ya que las repulsiones electrostáticas reducen la tendencia de aglomeración (Y. Wang et al., 2025). Además, entre las características fisicoquímicas de los nanoacarreadores, la carga superficial es uno de los factores clave para la toxicidad. Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que nanopartículas con un potencial ζ positivo suelen ser más tóxicas que aquellas con carga negativa, lo cual se atribuye a su mayor capacidad de interacción con la membrana celular. Estas interacciones, mediadas por fuerzas electrostáticas atractivas con fosfolípidos o proteínas de membrana cargadas negativamente, favorecen una captación celular elevada lo que puede inducir lisis, fuga de componentes intracelulares y, eventualmente, muerte celular. En contraste, los nanomateriales con carga negativa, al compartir la misma polaridad que la membrana, presentan una menor afinidad electrostática, lo que los hace menos citotóxicos (Augustine et al., 2020; Herdiana et al., 2022; Weiss et al., 2021).

Tabla 1. Diámetro hidrodinámico, PDI y potencial ζ obtenido del análisis de DLS de las distintas formulaciones, todas suspendidas con agua Mili Q. La incorporación del Sonlicromanol y CD, reducen el tamaño de las NPs. NPs S: nanopartículas cargadas con Sonlicromanol. NPs CD: nanopartículas cargadas con puntos de carbono. NPs CD-S: nanopartículas cargadas con puntos de carbono y Sonlicromanol.

Nanopartículas	Diámetro hidrodinámico (nm)	PDI	Potencial ζ (mV)
NPs vacías	168.2 ± 2.6	0.240	-23.2 ± 0.8
NPs S	124.6 ± 0.3	0.265	-32.1 ± 0.9
NPs CD	103.6 ± 3.7	0.224	-25.3 ± 1.1
NPs CD-S	106.2 ± 7.1	0.306	-36.7 ± 1.1

3.3.3 Encapsulación de los compuestos bioactivos

La absorbancia del Sonlicromanol se determinó mediante espectroscopia de UV-vis, identificando un pico de máxima intensidad de 288 nm, a partir del cual se elaboró su curva de calibración (**Figura 20 (a)**). En el caso de los CD, la curva de calibración se realizó con base en la intensidad de fluorescencia obtenida

mediante espectroscopia de fotoluminiscencia, utilizando una longitud de onda de excitación de 370 nm (Figura 20 (b)).

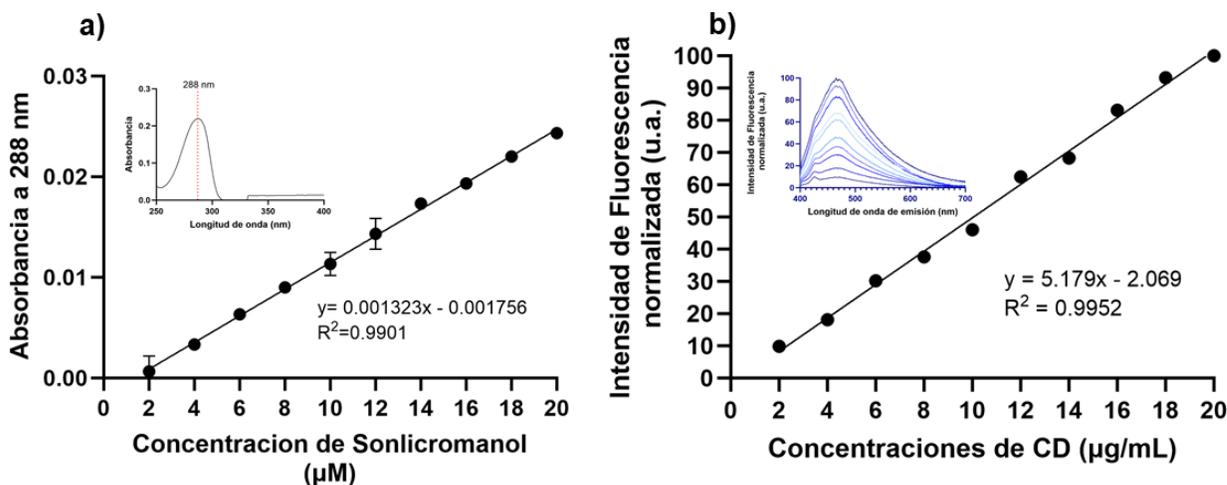


Figura 20. a) Curva de calibración de Sonlicromanol obtenida mediante el lector de placas EPOCH (n=3). El recuadro muestra el espectro UV-Vis del Sonlicromanol, en el cual presentó absorción a una longitud de onda de 280 nm y también se presenta la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración como su valor de R^2 . b) Curva de calibración de CD obtenida a partir de espectroscopia de fotoluminiscencia. El recuadro muestra el espectro de fotoluminiscencia de distintas concentraciones de CD y también se presenta su ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración, así como su valor de R^2 . CD: puntos de carbono.

De lo anterior se obtuvo la ecuación (5) para la cuantificación del Sonlicromanol:

$$\text{Concentración de Sonlicrimanol } (\mu\text{M}) = \frac{\text{Absorbancia}_{280 \text{ nm}} + 0.001756}{0.001323} \quad (5)$$

Y además que se estableció la ecuación (6) para determinar la concentración de los CD:

$$\text{Concentración de CD } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{Intensidad de fluorescencia} + 2.069}{5.179} \quad (6)$$

La encapsulación del Sonlicromanol en las NPs S alcanzó un valor de $6.81 \pm 0.29 \mu\text{M}$, correspondiente a un porcentaje de encapsulación de $34.07 \pm 2.44\%$. En el caso de la coencapsulación (NPs CD-S), no fue posible detectar el Sonlicromanol mediante espectrofotometría UV-Vis debido a la interferencia generada por los CD. Cabe destacar que los CD, dependiendo de su fuente de carbono y del método de síntesis empleado, pueden presentar diferentes respuestas de absorción; sin embargo, tienden a presentar una fuerte absorción en la región ultravioleta (200-400 nm), que coincide con la zona espectral en la que también

absorbe el Sonlicromanol (288 nm) (J. Liu et al., 2020). A pesar de esta superposición espectral, la presencia de Sonlicromanol en las NPs CD-S se infiere a partir del aumento en la negatividad del potencial ζ , en comparación con las formulaciones que no contienen el fármaco (NPs vacías y NPs-CD), lo que constituye evidencia indirecta de su encapsulación.

En cuanto a la encapsulación de CD, las NPs CD alcanzaron un valor de $9.08 \pm 0.69 \mu\text{g/mL}$, correspondiente a un $4.54 \pm 0.35\%$ de deficiencia de encapsulación. Por otro lado, en las NPs CD-S se obtuvo una carga de $6.03 \pm 0.65 \mu\text{g/mL}$, equivalente a un $3.02 \pm 0.33\%$ de encapsulación.

En general, el Sonlicromanol mostró una mayor eficiencia de encapsulación en comparación de los CD, lo cual se puede atribuir a su carácter hidrofóbico. Una de las principales ventajas de las NPs es que los fármacos hidrófobos se pueden cargar fácilmente, mientras que la encapsulación de fármacos hidrófilos resulta desafiante (Gajbhiye et al., 2023). Esto se debe, en parte, a que el método de nanoprecipitación y autoensamblaje empleado implica la mezcla de una solución de PLGA y de los agentes a encapsular en un solvente orgánico que se dispersa en un medio acuoso. Dicho método es más eficiente para encapsular moléculas hidrofóbicas; sin embargo, en el caso de compuestos hidrófilicos suelen requerirse estrategias adicionales, como el uso de codisolventes, emulsiones dobles o técnicas de doble emulsificación- evaporación de disolventes (Mukherjee et al., 2019; Tangkatitham et al., 2024).

En la **Figura 21** se presenta el espectro de fotoluminiscencia correspondiente a los CD encapsulados en las distintas formulaciones de las NPs.

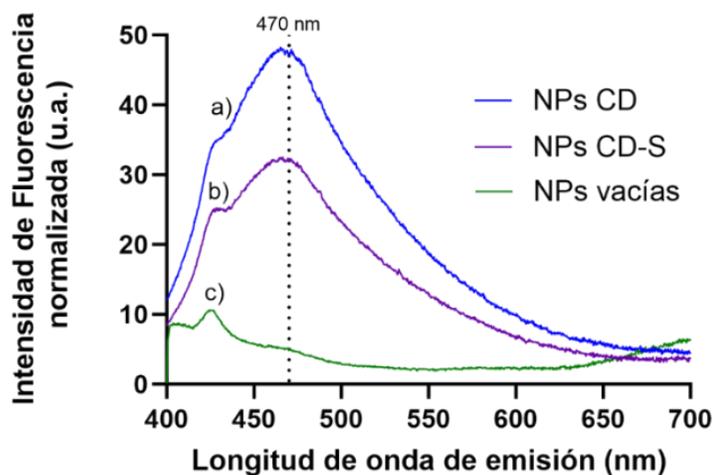


Figura 21. Espectros de fotoluminiscencia de a) NPs CD, b) NPs CD-S y b) NPs vacías. Las NPs cargadas con CD muestran una emisión a 470 nm al ser excitadas a 370 nm. NPs CD: nanopartículas cargadas con puntos de carbono. NPs CD-S: nanopartículas cargadas con puntos de carbono y Sonlicromanol.

Todas las muestras presentaron una emisión característica de 470 nm a una longitud de excitación de 370 nm, confirmando la presencia de los CD tras el proceso de encapsulación (Guzmán Uribe, 2022; Silvestre Martínez, 2024). Aunque las formulaciones conservaron dicha emisión característica, se observaron diferencias en la intensidad de fluorescencia, atribuibles a variaciones en la eficiencia de encapsulación. Además, la conservación de la señal de emisión indica que la fluorescencia intrínseca de los CD no se ve afectada por el proceso de encapsulación

3.3.4 Perfil de liberación de Sonlicromanol

Se midió la absorbancia a 288 nm de las tres formulaciones (NPs S, NPs CD y NPs CD-S) para evaluar su perfil de liberación (**Figura 22**). Aunque la curva de calibración permitió cuantificar el Sonlicromanol en las NPs S, en las formulaciones que contenían CD (NPs CD y NPs CD-S) la absorbancia también incluyó contribuciones adicionales de estos nanomateriales, lo que impidió una cuantificación exacta del Sonlicromanol. No obstante, las diferencias registradas en la absorbancia permitieron identificar tendencias relativas de liberación entre las formulaciones.

Los resultados obtenidos mostraron que las NPs CD presentaron la absorbancia más alta durante todo el ensayo, atribuible a su mayor carga de CD en comparación de NPs CD-S. Su curva alcanzó una meseta a las 8 h, lo que podría representar la liberación completa de los CD. En el caso de las NPs CD-S, la curva mostró una intensidad intermedia, con una detección tardía a partir de la primera hora, en contraste con las NPs CD y de NPs S, que mostraron liberación detectable desde la media hora. Esta diferencia podría deberse a interacciones entre el Sonlicromanol y CD, las cuales modificarían la cinética de liberación y contribuirían a la estabilización de la formulación. Al igual que las NPs CD, esta formulación alcanza su meseta a las 8 h, la liberación total de su contenido. El hecho de que esta curva no alcanzará los mismos niveles de las NPs CD se justifica por la menor concentración de los CD encapsulados. Finalmente, las NPs S presentaron valores bajos de absorbancia a lo largo del análisis, debido a la ausencia de los CD, sin embargo, su incremento progresivo evidenció la liberación del Sonlicromanol.

Adicionalmente, se elaboró un perfil de liberación de Sonlicromanol expresado en porcentaje, que permitió describir con mayor detalle el comportamiento de liberación del fármaco por las NPs S. Se observó una liberación rápida durante las primeras 2 h, alcanzado en promedio el 80%. Posteriormente, la liberación se aproxima al 100% a las 6 h; no obstante, entre las 2 h y 6 h no se registraron diferencias estadísticamente significativas, lo que sugiere que el contenido total del Sonlicromanol se libera

principalmente en las primeras 2 horas. Este comportamiento podría atribuirse a una alta carga superficial del compuesto en la superficie de las NPs, lo que favorece una liberación inicial acelerada, conocida como liberación estallido. Este tipo de liberación se caracteriza por la liberación rápida de una fracción considerable del principio activo en un periodo corto de tiempo (Bhattacharjee, 2021). Este estallido inicial del fármaco es generalmente indeseable, ya que acorta la duración total del efecto terapéutico del fármaco, y una liberación excesiva del estallido puede incluso causar toxicidad y plantear así un problema de seguridad, especialmente en sistemas que buscan una liberación controlada del principio activo (Yoo & Won, 2020).

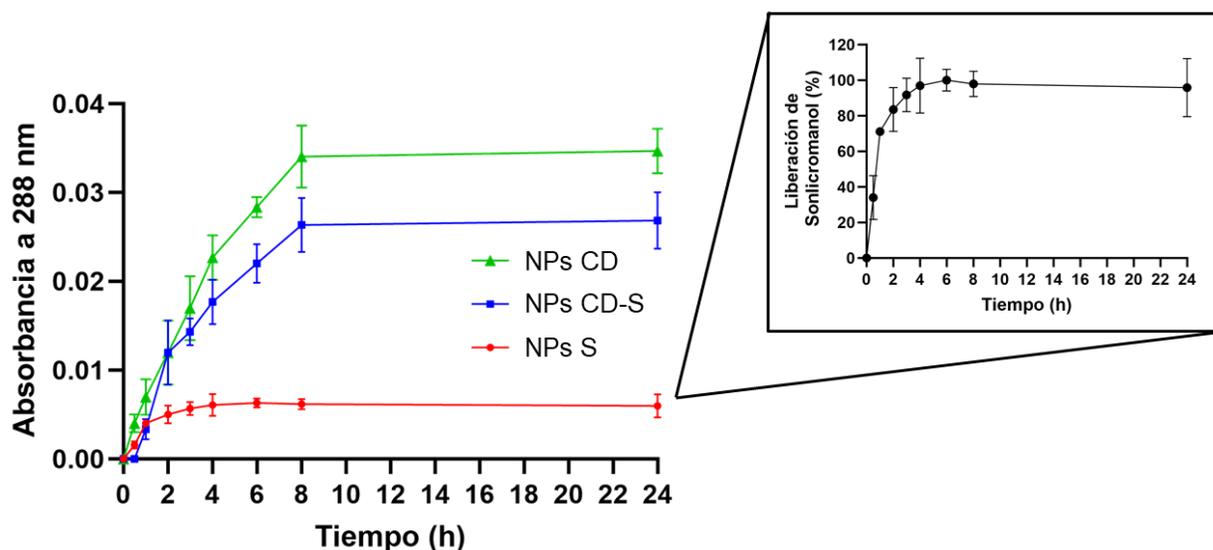


Figura 22. Absorbancia a 288 nm como indicador de la liberación de los compuestos (n=3). El recuadro muestra el perfil de liberación del Sonlicromanol expresado en porcentaje de las NPs S. Las absorbancias obtenidas de las tres formulaciones mostraron diferentes tendencias: siendo las NPs CD y NPs CD-S donde no tuvieron un cambio de absorbancia después de las 8 h, sugiriendo la liberación total de los compuestos, mientras que el perfil de liberación expresado en porcentaje muestra que las NPs S presentaron una liberación tipo estallido, ya que la liberación total fue a las 2 h. NPs S: nanopartículas cargadas con Sonlicromanol. NPs CD: nanopartículas cargadas con puntos de carbono. NPs CD-S: nanopartículas cargadas puntos de carbono y Sonlicromanol.

3.4 Pruebas de viabilidad celular por MTT en astrocitos de rata

Los astrocitos de rata fueron adquiridos en IXCells Biotechnologies (10RA-005). Tras 24 h de activación, las células alcanzaron una confluencia aproximada del 35%, presentaron una adecuada adherencia a la superficie de la placa y comenzaron a desarrollar su morfología característica: una forma estrellada compuesta por un cuerpo celular con prolongaciones alargadas que facilitan el contacto con otros

astrocitos (**Figura 23 (a)**). Estas características morfológicas son consistentes con lo esperado en esta etapa y representan un indicador positivo en el estado del estado del cultivo.

Conforme avanzaron los días, la densidad celular aumentó progresivamente. Para la realización del ensayo de viabilidad, se trabajó con astrocitos en una confluencia de 80-90% (**Figura 23 (b)**), alcanzada aproximadamente a los 14 días, con cambios de medio cada 2 días. Una vez lograda esta confluencia, las células son tripsinizadas y sembradas en placa de 96 pozos, donde se llevaron a cabo los ensayos de viabilidad mediante la técnica de MTT.

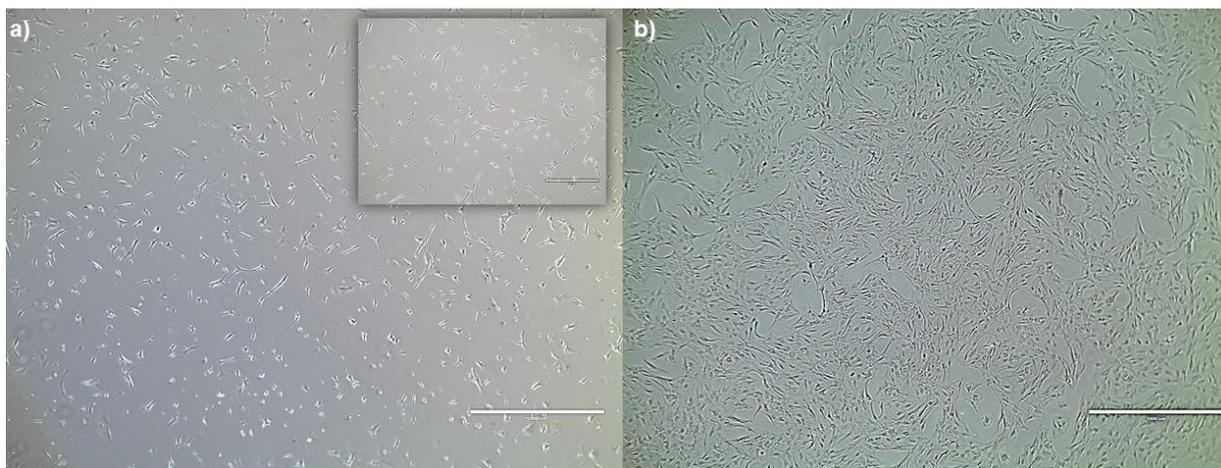


Figura 23. Cultivo de astrocitos de rata (IXCells Biotechnologies 10RA-005): a) Astrocitos de rata 24 h después de la siembra, con baja densidad celular. Amplificación 4x; barra de escala: 1000 µm. El recuadro es un acercamiento de las células mostrando morfología característica de los astrocitos con prolongaciones. Amplificación 10x; barra de escala: 400 µm. b) Cultivo de astrocitos con una confluencia aproximada del 80%. Amplificación 4x; barra de escala: 1000 µm.

3.4.1 Citocompatibilidad con LPS y compuestos libres

La activación de astrocitos mediante LPS puede inducir con una amplio rango de concentraciones, generalmente entre 10 ng/mL a 1000 ng/mL (Hansson et al., 2016; Ling et al., 2021; H. Liu et al., 2017; Tang et al., 2021). Con el fin de seleccionar una concentración adecuada que no genere citotoxicidad, se realizó un ensayo preliminar de viabilidad celular para determinar la dosis adecuada para inducir inflamación en los astrocitos de rata. Estudios previos han demostrado que, si bien concentraciones de 10 ng/mL y 100 ng/mL no generan efectos citotóxicos, dosis elevadas de 1000 ng/mL, pueden reducir la viabilidad celular (Silvestre Martínez, 2024; Vargas-Barona et al., 2024). Por ello, en este trabajo se evaluaron 100 y 500 ng/mL (**Figura 24**), con el objetivo de asegurar la activación de los astrocitos de rata sin inducir toxicidad.

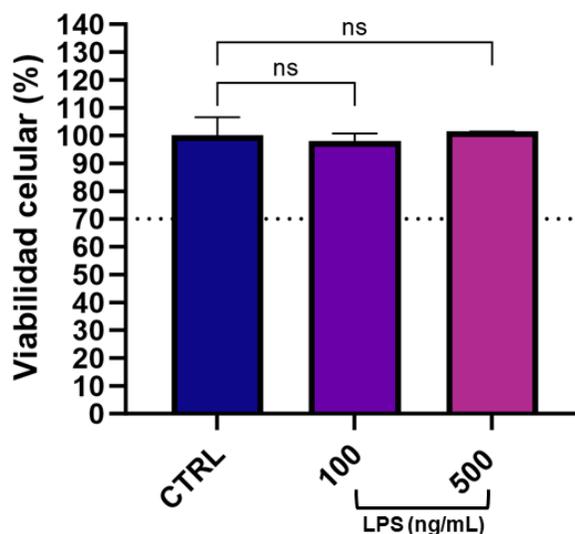


Figura 24. Porcentajes de viabilidad celular en astrocitos de rata estimuladas con LPS a 100 y 500 ng/mL incubados por 24 h. La línea punteada señala el valor límite de viabilidad celular definido por la ISO 10993-5 para clasificar una muestra como no citotóxica. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (\pm), $n = 3$ por grupo. Datos analizados estadísticamente mediante ANOVA de una vía utilizando el análisis a posteriori de Tukey con $p < 0.05$. Las diferencias significativas están representadas como: ns (no significativo). Las concentraciones de LPS (100 y 500 ng/mL) no disminuyeron la viabilidad celular. CTRL: células sin tratamiento. LPS: lipopolisacárido.

Los resultados del ensayo de MTT mostraron que ninguna de las concentraciones probadas redujo la viabilidad celular por debajo del 70%, ni presentó diferencias significativas respecto al control (células sin tratar con LPS). Con base en ello, se seleccionó la concentración de 500 ng/mL para los experimentos posteriores, ya que se ha reportado que esta dosis promueve mayor expresión de factores proinflamatorios liberados por estas células como la IL-1 β , IL-6, IL-10, y TNF- α , además de inducir cambios en la morfología de los astrocitos compatibles con un estado de reactividad (Acáz-Fonseca et al., 2019; Ling et al., 2021).

Una vez establecida la concentración de LPS, se evaluaron diferentes concentraciones de Sonlicromanol (0.1, 1, 10 y 100 μ M) y de CD (100, 200 y 300 μ g/mL) en células estimuladas con LPS a 500 ng/mL (**Figura 25**). Las concentraciones de Sonlicromanol se seleccionaron considerando el rango cercano a la cantidad encapsulada en las NPs, mientras que las CD se definieron a partir de la concentración inicial propuesta para la encapsulación (200 μ g/mL). Dado que la eficiencia de la encapsulación fue menor (6 y 9 μ g/mL en NPs CD y NPs CD-S, respectivamente), se evaluó un intervalo más amplio para analizar su posible efecto biológico, partiendo del supuesto de que, si concentraciones elevadas no resultaban citotóxicas, las más bajas serían seguras. El ensayo demostró que las concentraciones 0.1 y 1 μ M de Sonlicromanol mantuvieron la viabilidad celular por encima del 70%, mientras que a 10 μ M se registró un valor de 68.25

$\pm 4.52\%$ y a $100 \mu\text{M}$ una disminución significativa hasta $52.51 \pm 1.26\%$ lo que confirma un efecto dosis-dependiente. En el caso de los CD, ninguna de las concentraciones probadas fue citotóxica; siendo las concentraciones de 100 y $200 \mu\text{g/mL}$ las que no mostraron diferencias significativas respecto al control (células tratadas con LPS).

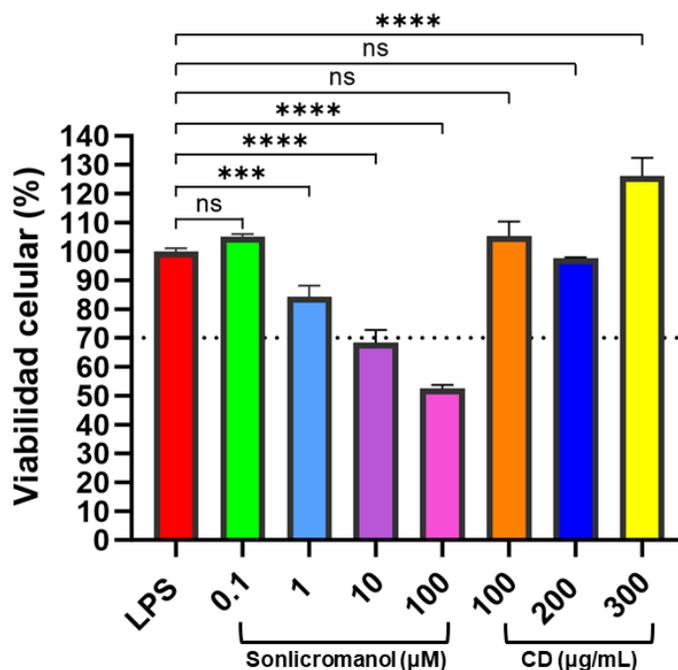


Figura 25. Porcentajes de viabilidad celular en astrocitos de rata estimuladas con LPS a 500 ng/mL , posteriormente tratadas con diferentes concentraciones de Sonlicromanol y CD durante 24 h. La línea punteada señala el valor límite de viabilidad celular definido por la ISO 10993-5 para clasificar una muestra como no citotóxica. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (\pm), $n = 3$ por grupo. Datos analizados estadísticamente mediante ANOVA de una vía utilizando el análisis a posteriori de Tukey con $p < 0.05$. Las diferencias significativas están representadas como: ns (no significativo), $***p < 0.001$ y $****p < 0.0001$. Las concentraciones de Sonlicromanol a 0.1 y $1 \mu\text{M}$ y CD a 100 , 200 y $300 \mu\text{g/mL}$ no se consideran citotóxicas. LPS: células estimuladas con lipopolisacárido a 500 ng/mL . CD: puntos de carbono.

Tras realizar el ensayo de MTT con compuestos libres, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de Sonlicromanol en combinación de una concentración de CD ($200 \mu\text{g/mL}$) (**Figura 26**). Los resultados obtenidos fueron que las combinaciones de 0.1 , 1 y $10 \mu\text{M}$ de Sonlicromanol con CD, fueron citocompatibles, sin diferencia significativa respecto al control. En contraste, la concentración de $100 \mu\text{M}$ de Sonlicromanol y CD redujo significativamente la viabilidad celular. Diversos estudios de citotoxicidad han demostrado que los CD presentan una toxicidad muy baja a concentraciones igual o menores de 1 mg/mL , además que los CD sintetizados a partir de ácido cítrico generalmente se consideran biocompatibles, lo que lo convierte en un precursor adecuado para sintetizar CD (Esfandiari et al., 2019;

Perikala et al., 2023). Por lo tanto, su combinación con Sonlicromanol favorece la citocompatibilidad a concentraciones moderadas, contribuyendo a mitigar los efectos tóxicos del compuesto y, posiblemente favoreciendo su mecanismo de acción al preservar la viabilidad celular.

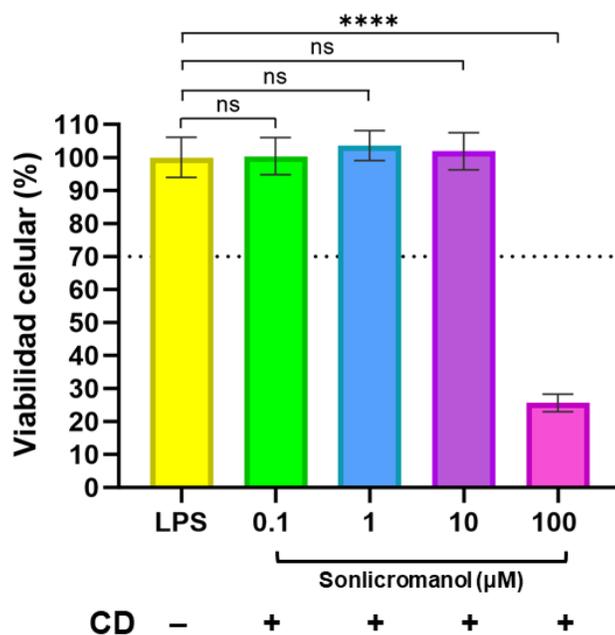


Figura 26. Porcentaje de viabilidad en astrocitos de rata estimulados con LPS a 500 ng/mL por 24 h y posteriormente tratados a diferentes concentraciones de Sonlicromanol con una combinación de 200 μg/mL por 24 h. Los signos (+) señalan donde se agregó la concentración de CD, mientras que (-) es donde no se agregó. La línea punteada señala el valor límite de viabilidad celular definido por la ISO 10993-5 para clasificar una muestra como no citotóxica. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (\pm), $n = 3$ por grupo. Datos analizados estadísticamente mediante ANOVA de una vía utilizando el análisis a posteriori de Tukey con $p < 0.05$. Las diferencias significativas están representadas como: ns (no significativo) y **** $p < 0.0001$. Las combinaciones de 0.1, 1 y 10 μM con CD (200 μg/mL) presentan una mayor viabilidad celular. LPS: células estimuladas con lipopolisacárido a 500 ng/mL. CD: puntos de carbono.

3.4.2 Citocompatibilidad de nanopartículas híbridas polímero-lípido

Posteriormente, se llevó a cabo las pruebas de MTT las concentraciones de los compuestos encapsulados de las NPs, así como distintas concentraciones diferentes de NPs (**Figura 27**).

En el caso de los compuestos libres a las concentraciones encapsuladas (**Figura 27 (a)**), el Sonlicromanol de 6.81 μM presentó una viabilidad celular de $70.82 \pm 0.66\%$. De acuerdo con la ISO 10993-5, esta concentración se considera citocompatible (International Organization for Standardization, 2009). Por su parte, los CD no presentaron ningún cambio significativo en la viabilidad en comparación con el control, lo que indica una adecuada citocompatibilidad para los astrocitos a estos compuestos en su forma libre.

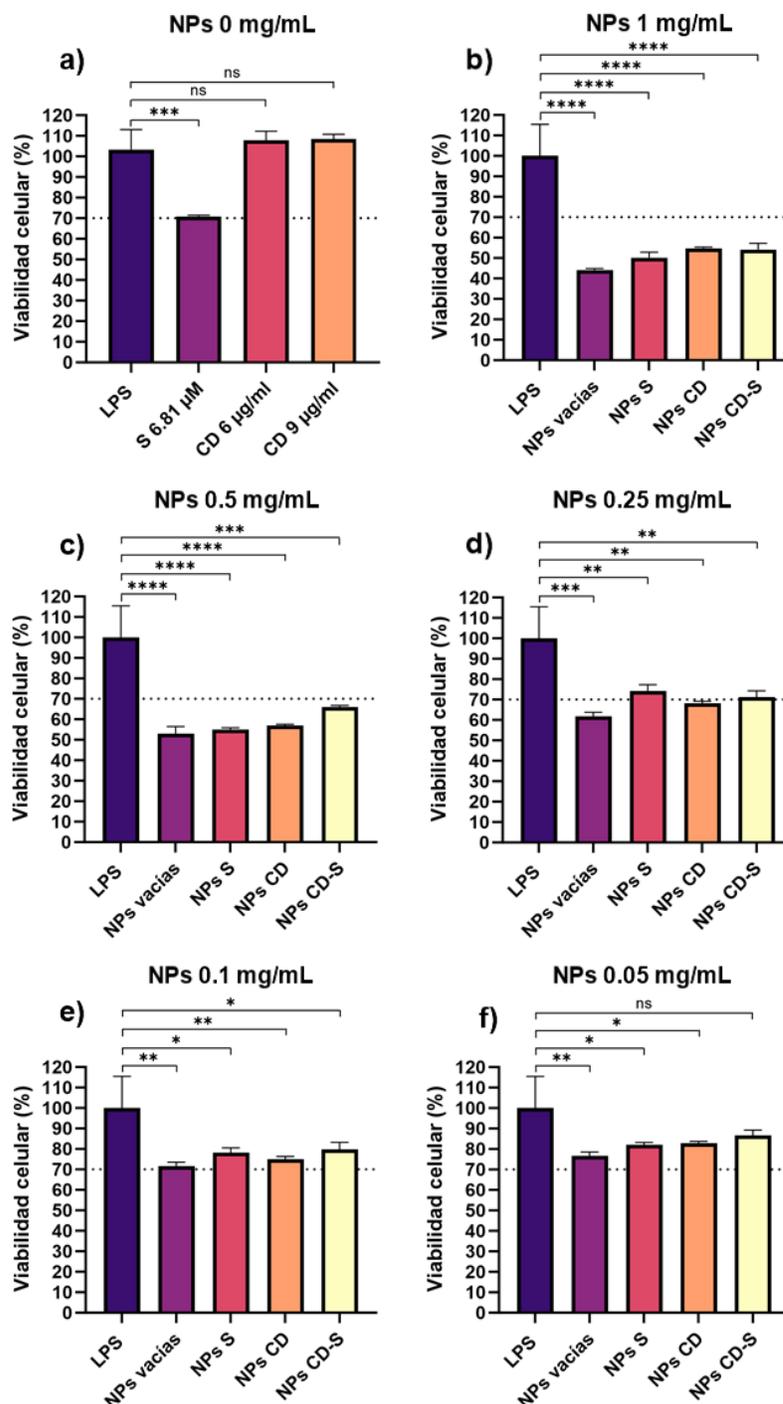


Figura 27. Porcentaje de viabilidad en astrocitos de rata estimulados con LPS a 500 ng/mL por 24 h y posteriormente tratados con: a) con los compuestos libres a las concentraciones que se encapsula en las NPs, b) NPs a 1 mg/mL, c) NPs a 0.5 mg/mL, d) NPs a 0.25 mg/mL, e) NPs a 0.1 mg/mL y f) NPs a 0.05 mg/mL, todos tratadas por 24 h. La línea punteada señala el valor límite de viabilidad celular definido por la ISO 10993-5 para clasificar una muestra como no citotóxica. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (\pm), $n = 3$ por grupo. Datos analizados estadísticamente mediante ANOVA de una vía utilizando el análisis a posteriori de Tukey con $p < 0.05$. Las diferencias significativas están representadas como: ns (no significativo), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Las concentraciones de 0.1 y 0.05 mg/mL, en todas las formulaciones se consideran citocompatibles. LPS: células estimuladas con lipopolisacárido a 500 ng/mL. NPs S: nanopartículas cargadas con Sonlicromanol. NPs CD: nanopartículas cargadas con puntos de carbono. NPs CD-S: nanopartículas cargadas con puntos de carbono y Sonlicromanol.

En las formulaciones de NPs, las concentraciones de 1 y 0.5 mg/mL (**Figura 27 (b) y (c)**) mostraron valores de viabilidad celular inferiores al 70%, por lo cual se consideran no citocompatibles. A 0.25 mg/mL (**Figura 27 (d)**), se observó una mejora en la viabilidad de las NPs S y NPs CD-S; sin embargo, las NPs vacías y NPs CD permanecieron citotóxicas. Aun así, se evidenció una tendencia de incremento progresivo en la viabilidad celular conforme disminuye la concentración de NPs.

En concentraciones de 0.1 mg/mL (**Figura 27 (e)**), todas las formulaciones mostraron un aumento en la viabilidad respecto a las concentraciones superiores, destacando NPs CD-S, que alcanzó el valor más alto ($79.83 \pm 3.37\%$), aunque aún con diferencias estadísticas en comparación con el control. Finalmente, a 0.05 mg/mL (**Figura 27 (f)**), todas las NPs evidenciaron un aumento significativo en la viabilidad: las NPs vacías de $76.65 \pm 1.90\%$, NPs S de $82.04 \pm 1.17\%$, NPs de CD $82.89 \pm 0.81\%$ y NPs CD-S $86.66 \pm 2.64\%$. En el caso de NPs CD-S, no se observaron diferencias estadísticas significativas con respecto al control, lo que indica una adecuada citocompatibilidad y sugiere que está formulación es bien tolerada por los astrocitos a dicha concentración.

La citocompatibilidad observada a bajas concentraciones de NPs podría explicarse por una menor exposición celular tanto al fármaco como al nanoacarreador, posiblemente debido a un efecto sinérgico entre la reducción de dosis y la presencia de los CD. En este trabajo se observó que la combinación de 200 $\mu\text{g/mL}$ de CD con Sonlicromanol libre favoreció la viabilidad celular, probablemente gracias a la acción inmediata de las CD en el medio de cultivo. En contraste, en las formulaciones encapsuladas, la cantidad de CD encapsulada en las NPs es menor y su liberación más gradual, lo que limitaría su efecto protector directo sobre las células. Estos resultados demuestran la importancia de ajustar la concentración para garantizar biocompatibilidad y garantizar su interacción con las células sin causar daños en aplicaciones terapéuticas.

Capítulo 4. Conclusiones

En este trabajo se desarrollaron y caracterizaron nanopartículas híbridas polímero-lípido (NPs) con distintas formulaciones: nanopartículas vacías, cargadas con Sonlicromanol (NPs S), con puntos de carbono (NPs CD) y con ambos componentes (NPs CD-S). Todas las formulaciones estuvieron conformadas por PLGA, HSPC y el conjugado CLS-PEG-Tf.

La incorporación de los compuestos encapsulados permitió obtener NPs cargadas con un tamaño hidrodinámico menor (NPs S: 124.6 ± 0.3 nm; NPs CD: 103.6 ± 3.7 nm; NPs CD-S: 106.2 ± 7.1 nm), en comparación con las NPs vacías (168.2 ± 2.6 nm). Todas las formulaciones presentaron una distribución homogénea de tamaño, con un índice de polidispersidad (PDI) menor a 0.5, y un potencial ζ negativo siendo para las NPs vacías de -23.2 ± 0.8 mV, NPs S de -32.1 ± 0.9 mV, NPs CD de -25.3 ± 1.1 mV y de NPs CD-S de -36.7 ± 1.1 mV. El aumento en la carga superficial observado en las NPs S y NPs CD-S, en comparación con las otras formulaciones, se atribuye a la presencia del Sonlicromanol en la capa lipídica.

El porcentaje de encapsulación de Sonlicromanol en las NPs S fue de $34.07 \pm 2.44\%$, mientras que el porcentaje de encapsulación de CD en las NPs CD y NPs CD-S fue de $4.54 \pm 0.35\%$ y $3.02 \pm 0.33\%$, respectivamente. En las NPs S, la liberación del Sonlicromanol alcanzó el 100% a las 2 h. En la formulación con coencapsulación de CD y Sonlicromanol (NPs CD-S), la liberación total se registró a las 8 h, evidenciando un tiempo de liberación más prolongado.

En los ensayos de viabilidad celular, el Sonlicromanol libre fue citocompatible en el intervalo de 0.1 a 1 μM en astrocitos de rata estimulados con LPS, manteniendo la viabilidad celular por encima del 70%, mientras que las concentraciones mayores a 10 μM fueron citotóxicas. La incorporación de CD a 200 $\mu\text{g/mL}$ permitió mejorar la viabilidad celular hasta el 100% a 1 y 10 μM , ampliando así el rango de citocompatibilidad de 0.1 hasta 10 μM .

Respecto a las NPs, dentro del intervalo evaluado de 0.05 a 1 mg/mL de NPs, las formulaciones de NPs S y NPs CD-S demostraron ser citocompatibles en astrocitos de rata estimulados con LPS, particularmente en las concentraciones de 0.05, 0.1 y 0.25 mg/mL. En este rango, las NPs S mantuvieron la viabilidad celular en $82.04 \pm 1.17\%$, $78.16 \pm 2.36\%$ y $74.24 \pm 3.03\%$, respectivamente, mientras que las NPs CD-S presentaron valores de $86.66 \pm 2.64\%$, $79.83 \pm 3.37\%$ y $71.12 \pm 3.14\%$, respectivamente.

En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo representan una base para el desarrollo de un nanomaterial teranóstico para la enfermedad de Alzheimer. En la siguiente etapa de investigación de este trabajo, se podría considerar otro método de detección más sensible para el Sonlicromanol como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Asimismo, sería relevante evaluar el efecto antiinflamatorio de las nanopartículas desarrolladas, con genes relacionados con la neuroinflamación en la enfermedad del Alzheimer, como GFAP, APP y S100 β .

Literatura citada

- Abubakar, M. B., Sanusi, K. O., Ugusman, A., Mohamed, W., Kamal, H., Ibrahim, N. H., Khoo, C. S., & Kumar, J. (2022). Alzheimer's Disease: An Update and Insights Into Pathophysiology. *Frontiers in Aging Neuroscience, 14*, 1-16. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.742408>
- Acaz-Fonseca, E., Ortiz-Rodriguez, A., Azcoitia, I., Garcia-Segura, L. M., & Arevalo, M.-A. (2019). Notch signaling in astrocytes mediates their morphological response to an inflammatory challenge. *Cell Death Discovery, 5*(1), 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41420-019-0166-6>
- 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>
- Alafeef, M., Srivastava, I., Aditya, T., & Pan, D. (2024). Carbon Dots: From Synthesis to Unraveling the Fluorescence Mechanism. *Small, 20*(4), 1-13. <https://doi.org/10.1002/sml.202303937>
- Alajangi, H. K., Kaur, M., Sharma, A., Rana, S., Thakur, S., Chatterjee, M., Singla, N., Jaiswal, P. K., Singh, G., & Barnwal, R. P. (2022). Blood–brain barrier: Emerging trends on transport models and new-age strategies for therapeutics intervention against neurological disorders. *Molecular Brain, 15*(1), 1-28. <https://doi.org/10.1186/s13041-022-00937-4>
- Alqahtani, T., Deore, S. L., Kide, A. A., Shende, B. A., Sharma, R., Dadarao Chakole, R., Nemade, L. S., Kishor Kale, N., Borah, S., Shrikant Deokar, S., Behera, A., Dhawal Bhandari, D., Gaikwad, N., Kalam Azad, A., & Ghosh, A. (2023). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Alzheimer's disease, and Parkinson's disease, Huntington's disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis -An updated review. *Mitochondrion, 71*, 83-92. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2023.05.007>
- 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 Association Report. (2024). 2024 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia, 20*(5), 3708-3821. <https://doi.org/10.1002/alz.13809>
- 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/acsanm.1c02127>
- Aminu, N., Bello, I., Umar, N. M., Tanko, N., Aminu, A., & Audu, M. M. (2020). The influence of nanoparticulate drug delivery systems in drug therapy. *Journal of Drug Delivery Science and Technology, 60*, 1-19. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101961>
- Anthony, D. P., Hegde, M., Shetty, S. S., Rafic, T., Mutalik, S., & Rao, B. S. S. (2021). Targeting receptor-ligand chemistry for drug delivery across blood-brain barrier in brain diseases. *Life Sciences, 274*, 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119326>
- 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>
- Augustine, R., Hasan, A., Primavera, R., Wilson, R. J., Thakor, A. S., & Kevadiya, B. D. (2020). Cellular uptake and retention of nanoparticles: Insights on particle properties and interaction with cellular components. *Materials Today Communications*, 25, 1-19. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2020.101692>
- Baldwin, K. T., Murai, K. K., & Khakh, B. S. (2024). Astrocyte morphology. *Trends in Cell Biology*, 34(7), 547-565. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2023.09.006>
- Bayda, S., Amadio, E., Cailotto, S., Frión-Herrera, Y., Perosa, A., & Rizzolio, F. (2021). Carbon dots for cancer nanomedicine: A bright future. *Nanoscale Advances*, 3(18), 5183-5221. <https://doi.org/10.1039/d1na00036e>
- Bernardo-Castro, S., Sousa, J. A., Brás, A., Cecília, C., Rodrigues, B., Almendra, L., Machado, C., Santo, G., Silva, F., Ferreira, L., Santana, I., & Sargento-Freitas, J. (2020). Pathophysiology of Blood–Brain Barrier Permeability Throughout the Different Stages of Ischemic Stroke and Its Implication on Hemorrhagic Transformation and Recovery. *Frontiers in Neurology*, 11, 1-24. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.594672>
- Bhatia, S., Rawal, R., Sharma, P., Singh, T., Singh, M., & Singh, V. (2022). Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease: Opportunities for Drug Development. *Current Neuropharmacology*, 20(4), 675-692. <https://doi.org/10.2174/1570159X19666210517114016>
- Bhattacharjee, S. (2021). Understanding the Burst Release Phenomenon: Toward Designing Effective Nanoparticulate Drug-Delivery Systems. *Therapeutic Delivery*, 12(1), 21-36. <https://doi.org/10.4155/tde-2020-0099>
- Bhatti, J. S., Bhatti, G. K., & Reddy, P. H. (2017). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders—A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1863(5), 1066-1077. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.010>
- Block, M. L., Zecca, L., & Hong, J.-S. (2007). Microglia-mediated neurotoxicity: Uncovering the molecular mechanisms. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(1), 57-69. <https://doi.org/10.1038/nrn2038>
- Botella Lucena, P., & Heneka, M. T. (2024). Inflammatory aspects of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 148(1), 1-21. <https://doi.org/10.1007/s00401-024-02790-2>
- Bouvier, D. S., Fixemer, S., Heurtaux, T., Jeannelle, F., Frauenknecht, K. B. M., & Mittelbronn, M. (2022). The Multifaceted Neurotoxicity of Astrocytes in Ageing and Age-Related Neurodegenerative Diseases: A Translational Perspective. *Frontiers in Physiology*, 13, 1-23. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.814889>
- Burns, A., Byrne, E. J., & Maurer, K. (2002). Alzheimer's disease. *The Lancet*, 360(9327), 163-165. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)09420-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)09420-5)
- Casanova, A., Wevers, A., Navarro-Ledesma, S., & Pruijboom, L. (2023). Mitochondria: It is all about energy. *Frontiers in Physiology*, 14, 1-37. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1114231>

- Chamundeeswari, M., Jeslin, J., & Verma, M. L. (2019). Nanocarriers for drug delivery applications. *Environmental Chemistry Letters*, 17(2), 849-865. <https://doi.org/10.1007/s10311-018-00841-1>
- Chaudhry, U. A., Zhuang, H., Crain, B. J., & Doré, S. (2008). Elevated microsomal prostaglandin-E synthase-1 in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 4(1), 6-13. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2007.10.015>
- Chen, F., Ehlerding, E. B., & Cai, W. (2014). Theranostic Nanoparticles. *Journal of Nuclear Medicine*, 55(12), 1919-1922. <https://doi.org/10.2967/jnumed.114.146019>
- Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., & Zhao, L. (2018). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, 9(6), 7204-7218. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23208>
- Cipriani, G., Dolciotti, C., Picchi, L., & Bonuccelli, U. (2011). Alzheimer and his disease: A brief history. *Neurological Sciences*, 32(2), 275-279. <https://doi.org/10.1007/s10072-010-0454-7>
- Citron, M. (2010). Alzheimer's disease: Strategies for disease modification. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(5), 387-398. <https://doi.org/10.1038/nrd2896>
- Cummings, J., Osse, A. M. L., Cammann, D., Powell, J., & Chen, J. (2024). Anti-Amyloid Monoclonal Antibodies for the Treatment of Alzheimer's Disease. *BioDrugs*, 38(1), 5-22. <https://doi.org/10.1007/s40259-023-00633-2>
- Dali, P., & Shende, P. (2022). Self-Assembled Lipid Polymer Hybrid Nanoparticles Using Combinational Drugs for Migraine Via Intranasal Route. *AAPS PharmSciTech*, 24(1), 1-17. <https://doi.org/10.1208/s12249-022-02479-3>
- Dhanasekaran, H. R., Sharma, C. P., & Haridoss, P. (2018). Drug delivery nanosystems—An introduction. In *Drug Delivery Nanosystems for Biomedical Applications* (pp. 1-12). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-50922-0.00001-8>
- Dias-Carvalho, A., Sá, S. I., Carvalho, F., Fernandes, E., & Costa, V. M. (2024). Inflammation as common link to progressive neurological diseases. *Archives of Toxicology*, 98(1), 95-119. <https://doi.org/10.1007/s00204-023-03628-8>
- 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>
- Esfandiari, N., Bagheri, Z., Ehtesabi, H., Fatahi, Z., Tavana, H., & Latifi, H. (2019). Effect of carbonization degree of carbon dots on cytotoxicity and photo-induced toxicity to cells. *Heliyon*, 5(12), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02940>
- 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>
- Frost, G. R., & Li, Y.-M. (2017). The role of astrocytes in amyloid production and Alzheimer's disease. *Open Biology*, 7(12), 1-14. <https://doi.org/10.1098/rsob.170228>

- Gajbhiye, K. R., Salve, R., Narwade, M., Sheikh, A., Kesharwani, P., & Gajbhiye, V. (2023). Lipid polymer hybrid nanoparticles: A custom-tailored next-generation approach for cancer therapeutics. *Molecular Cancer*, 22(1), 1-44. <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01849-0>
- Galland, F., Seady, M., Taday, J., Smaili, S. S., Gonçalves, C. A., & Leite, M. C. (2019). Astrocyte culture models: Molecular and function characterization of primary culture, immortalized astrocytes and C6 glioma cells. *Neurochemistry International*, 131, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.104538>
- González-García, D., Tapia, O., Évora, C., García-García, P., & Delgado, A. (2025). Conventional and microfluidic methods: Design and optimization of lipid-polymeric hybrid nanoparticles for gene therapy. *Drug Delivery and Translational Research*, 15(3), 908-924. <https://doi.org/10.1007/s13346-024-01644-4>
- González-Reyes, R. E., Nava-Mesa, M. O., Vargas-Sánchez, K., Ariza-Salamanca, D., & Mora-Muñoz, L. (2017). Involvement of Astrocytes in Alzheimer's Disease from a Neuroinflammatory and Oxidative Stress Perspective. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10, 1-20. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00427>
- Grela, E., Kozłowska, J., & Grabowiecka, A. (2018). Current methodology of MTT assay in bacteria – A review. *Acta Histochemica*, 120(4), 303-311. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.03.007>
- Gressler, S., Hipfinger, C., Part, F., Pavlicek, A., Zafiu, C., & Giese, B. (2025). A systematic review of nanocarriers used in medicine and beyond—Definition and categorization framework. *Journal of Nanobiotechnology*, 23(1), 1-21. <https://doi.org/10.1186/s12951-025-03113-7>
- Guilbaud, E., & Galluzzi, L. (2024). A mitochondrial checkpoint to NF-κB signaling. *Cell Death & Disease*, 15(7), 1-3. <https://doi.org/10.1038/s41419-024-06868-3>
- 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* [Tesis de maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California]. Repositorio Institucional <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/3778>
- Hajipour, M. J., Santoso, M. R., Rezaee, F., Aghaverdi, H., Mahmoudi, M., & Perry, G. (2017). Advances in Alzheimer's Diagnosis and Therapy: The Implications of Nanotechnology. *Trends in Biotechnology*, 35(10), 937-953. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.06.002>
- 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 Aβ fibrillation and toxicity, and BACE1 activity. *Nanoscale*, 9(35), 12862-12866. <https://doi.org/10.1039/c7nr04352j>
- Hansson, E., Werner, T., Björklund, U., & Skiöldebrand, E. (2016). Therapeutic innovation: Inflammatory-reactive astrocytes as targets of inflammation. *IBRO Reports*, 1, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.ibror.2016.06.001>
- Herdiana, Y., Wathoni, N., Shamsuddin, S., & Muchtaridi, M. (2022). Scale-up polymeric-based nanoparticles drug delivery systems: Development and challenges. *OpenNano*, 7, 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.onano.2022.100048>

- Hsu, J. C., Tang, Z., Eremina, O. E., Sofias, A. M., Lammers, T., Lovell, J. F., Zavaleta, C., Cai, W., & Cormode, D. P. (2023). Nanomaterial-based contrast agents. *Nature Reviews Methods Primers*, 3(1), 1-45. <https://doi.org/10.1038/s43586-023-00211-4>
- Husain, M. A., Laurent, B., & Plourde, M. (2021). APOE and Alzheimer's Disease: From Lipid Transport to Physiopathology and Therapeutics. *Frontiers in Neuroscience*, 15, 1-15. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.630502>
- International Organization for Standardization. (2009). *ISO 10993-5:2009 – Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity* (No. ISO 10993-5:2009). <https://nhiso.com/wp-content/uploads/2018/05/ISO-10993-5-2009.pdf>
- Jayaprakash, N., Elumalai, K., Manickam, S., Bakthavatchalam, G., & Tamilselvan, P. (2024). Carbon nanomaterials: Revolutionizing biomedical applications with promising potential. *Nano Materials Science, Article in Press*. <https://doi.org/10.1016/j.nanoms.2024.11.004>
- Jiang, X., Renkema, H., Pennings, B., Pecheritsyna, S., Schoeman, J. C., Hankemeier, T., Smeitink, J., & Beyrath, J. (2021). Mechanism of action and potential applications of selective inhibition of microsomal prostaglandin E synthase-1-mediated PGE2 biosynthesis by sonlicromanol's metabolite KH176m. *Scientific Reports*, 11(1), 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79466-w>
- Johnsen, K. B., Burkhart, A., Thomsen, L. B., Andresen, T. L., & Moos, T. (2019). Targeting the transferrin receptor for brain drug delivery. *Progress in Neurobiology*, 181, 1-91. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2019.101665>
- Joshi, R., Brezani, V., Mey, G. M., Guixé-Muntet, S., Ortega-Ribera, M., Zhuang, Y., Zivny, A., Werneburg, S., Gracia-Sancho, J., & Szabo, G. (2024). IRF3 regulates neuroinflammatory responses and the expression of genes associated with Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*, 21(1), 1-22. <https://doi.org/10.1186/s12974-024-03203-7>
- 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), 1-24. <https://doi.org/10.1186/s12987-020-00230-3>
- Kamatham, P. T., Shukla, R., Khatri, D. K., & Vora, L. K. (2024). Pathogenesis, diagnostics, and therapeutics for Alzheimer's disease: Breaking the memory barrier. *Ageing Research Reviews*, 101, 1-23. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2024.102481>
- Kametani, F., & Hasegawa, M. (2018). Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience*, 12, 1-11. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00025>
- Kim, J., Yoo, I. D., Lim, J., & Moon, J.-S. (2024). Pathological phenotypes of astrocytes in Alzheimer's disease. *Experimental & Molecular Medicine*, 56(1), 95-99. <https://doi.org/10.1038/s12276-023-01148-0>
- Klein Gunnewiek, T. M., Verboven, A. H. A., Pelgrim, I., Hogeweg, M., Schoenmaker, C., Renkema, H., Beyrath, J., Smeitink, J., De Vries, B. B. A., Hoen, P.-B. A. C. 'T, Kozicz, T., & Nadif Kasri, N. (2021). Sonlicromanol improves neuronal network dysfunction and transcriptome changes linked to m.3243A>G heteroplasmy in iPSC-derived neurons. *Stem Cell Reports*, 16(9), 2197-2212. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.07.002>

- Knox, E. G., Aburto, M. R., Clarke, G., Cryan, J. F., & O'Driscoll, C. M. (2022). The blood-brain barrier in aging and neurodegeneration. *Molecular Psychiatry*, 27(6), 2659-2673. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01511-z>
- Kung, H. F. (2012). The β -Amyloid Hypothesis in Alzheimer's Disease: Seeing Is Believing. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 3(4), 265-267. <https://doi.org/10.1021/ml300058m>
- Kwon, H. S., & Koh, S.-H. (2020). Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: The roles of microglia and astrocytes. *Translational Neurodegeneration*, 9(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s40035-020-00221-2>
- Lee, H.-G., Wheeler, M. A., & Quintana, F. J. (2022). Function and therapeutic value of astrocytes in neurological diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 21(5), 339-358. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00390-x>
- 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>
- Li, C., Zhou, L., & Yin, X. (2024). Pathophysiological aspects of transferrin-A potential nano-based drug delivery signaling molecule in therapeutic target for varied diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1-17. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1342181>
- 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>
- Liebner, S., Dijkhuizen, R. M., Reiss, Y., Plate, K. H., Agalliu, D., & Constantin, G. (2018). Functional morphology of the blood-brain barrier in health and disease. *Acta Neuropathologica*, 135(3), 311-336. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1815-1>
- Lin, M., Liu, N., Qin, Z., & Wang, Y. (2022). Mitochondrial-derived damage-associated molecular patterns amplify neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*, 43(10), 2439-2447. <https://doi.org/10.1038/s41401-022-00879-6>
- Lin, S., & Smith, B. S. (2010). Drug Dosing Considerations for the Critically Ill Patient with Liver Disease. *Critical Care Nursing Clinics of North America*, 22(3), 335-340. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2010.04.006>
- Ling, Z.-M., Wang, Q., Ma, Y., Xue, P., Gu, Y., Cao, M.-H., & Wei, Z.-Y. (2021). Astrocyte Pannexin 1 Suppresses LPS-Induced Inflammatory Responses to Protect Neuronal SH-SY5Y Cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 15, 1-13. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.710820>
- Liu, H., Davis, J. R. J., Wu, Z.-L., & Faez Abdelgawad, A. (2017). Dexmedetomidine Attenuates Lipopolysaccharide Induced MCP-1 Expression in Primary Astrocyte. *BioMed Research International*, 2017, 1-6. <https://doi.org/10.1155/2017/6352159>
- 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 nanographene oxide for a pH-triggered chemotherapy. *Biomaterials*, *62*, 35-46. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.05.036>
- Livingston, G., Huntley, J., Sommerlad, A., Ames, D., Ballard, C., Banerjee, S., Brayne, C., Burns, A., Cohen-Mansfield, J., Cooper, C., Costafreda, S. G., Dias, A., Fox, N., Gitlin, L. N., Howard, R., Kales, H. C., Kivimäki, M., Larson, E. B., Ogunniyi, A., ... Mukadam, N. (2020). Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. *The Lancet*, *396*(10248), 413-446. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30367-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30367-6)
- 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*, 1-10. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01444>
- Luque-Michel, E., Sebastian, V., Larrea, A., Marquina, C., & Blanco-Prieto, M. J. (2019). Co-encapsulation of superparamagnetic nanoparticles and doxorubicin in PLGA nanocarriers: Development, characterization and in vitro antitumor efficacy in glioma cells. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *145*, 65-75. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.10.004>
- Ma, D. (2019). Hybrid Nanoparticles. In *Noble Metal-Metal Oxide Hybrid Nanoparticles* (pp. 3-6). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814134-2.00001-2>
- Mhlanga, N., Mphuthi, N., Van Der Walt, H., Nyembe, S., Mokhena, T., & Sikhwivhilu, L. (2024). Nanostructures and nanoparticles as medical diagnostic imaging contrast agents: A review. *Materials Today Chemistry*, *40*, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2024.102233>
- Miatmoko, A., Asmoro, F. H., Azhari, A. A., Rosita, N., & Huang, C.-S. (2023). The effect of 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium propane (DOTAP) Addition on the physical characteristics of β -ionone liposomes. *Scientific Reports*, *13*(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31560-5>
- Miller, M. B., Reed, H. C., & Walsh, C. A. (2021). Brain Somatic Mutation in Aging and Alzheimer's Disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, *22*(1), 239-256. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-121520-081242>
- Misrani, A., Tabassum, S., & Yang, L. (2021). Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *13*, 1-20. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.617588>
- Mitchell, M. J., Billingsley, M. M., Haley, R. M., Wechsler, M. E., Peppas, N. A., & Langer, R. (2021). Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, *20*(2), 101-124. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>
- Möller, H.-J., & Graeber, M. B. (1998). The case described by Alois Alzheimer in 1911. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, *248*(3), 111-122. <https://doi.org/10.1007/s004060050027>
- Monterey, M. D., Wei, H., Wu, X., & Wu, J. Q. (2021). The Many Faces of Astrocytes in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neurology*, *12*, 1-12. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.619626>
- Mukherjee, A., Waters, A. K., Kalyan, P., Achrol, A. S., Kesari, S., & Yenugonda, V. M. (2019). Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a next-generation drug delivery platform: State of the art, emerging

- technologies, and perspectives. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 1937-1952. <https://doi.org/10.2147/IJN.S198353>
- Namdari, M., Eatemadi, A., Soleimaninejad, M., & Hamed, A. T. (2017). A brief review on the application of nanoparticle enclosed herbal medicine for the treatment of infective endocarditis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 87, 321-331. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.099>
- Naser, A. N., Lu, Q., & Chen, Y.-H. (2023). Trans-Compartmental Regulation of Tight Junction Barrier Function. *Tissue Barriers*, 11(4), 380-387. <https://doi.org/10.1080/21688370.2022.2133880>
- Onugwu, A. L., Attama, A. A., Nnamani, P. O., Onugwu, S. O., Onuigbo, E. B., & Khutoryanskiy, V. V. (2022). Development and optimization of solid lipid nanoparticles coated with chitosan and poly(2-ethyl-2-oxazoline) for ocular drug delivery of ciprofloxacin. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 74, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103527>
- Öztürk, K., Kaplan, M., & Çalış, S. (2024). Effects of nanoparticle size, shape, and zeta potential on drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 666, 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2024.124799>
- Panghal, A., & Flora, S. J. S. (2024). Nanotechnology in the diagnostic and therapy for Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1868(3), 1-19. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2024.130559>
- Parveen, S., Gupta, P., Kumar, S., & Banerjee, M. (2023). Lipid polymer hybrid nanoparticles as potent vehicles for drug delivery in cancer therapeutics. *Medicine in Drug Discovery*, 20, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.medidd.2023.100165>
- 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, 1-16. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2023.1206572>
- Perikala, M., Valoor, R., Bhaskar, N., Bhardwaj, A., & Basu, B. (2023). One-Step Colloidal Synthesis of Non-Toxic Electroactive Carbon Dots with a Better Threshold Cytotoxicity and Cytocompatibility. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 15(1), 281-291. <https://doi.org/10.1021/acsami.2c16046>
- Peteri, U.-K., Niukkanen, M., & Castrén, M. L. (2019). Astrocytes in Neuropathologies Affecting the Frontal Cortex. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13, 1-9. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00044>
- Rahat, I., Yadav, P., Singhal, A., Fareed, M., Purushothaman, J. R., Aslam, M., Balaji, R., Patil-Shinde, S., & Rizwanullah, M. (2024). Polymer lipid hybrid nanoparticles for phytochemical delivery: Challenges, progress, and future prospects. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 15, 1473-1497. <https://doi.org/10.3762/bjnano.15.118>
- Rahman, M. H., & Suk, K. (2020). Mitochondrial Dynamics and Bioenergetic Alteration During Inflammatory Activation of Astrocytes. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 12, 1-8. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.614410>
- Rai, S. N., Singh, C., Singh, A., Singh, M. P., & Singh, B. K. (2020). Mitochondrial Dysfunction: A Potential Therapeutic Target to Treat Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology*, 57(7), 3075-3088. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-01945-y>

- 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>
- Ramanathan, S., Archunan, G., Sivakumar, M., Tamil Selvan, S., Fred, A. L., Kumar, S., Gulyás, B., & Padmanabhan, P. (2018). Theranostic applications of nanoparticles in neurodegenerative disorders. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 5561-5576. <https://doi.org/10.2147/ijn.s149022>
- 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>
- Rusch, J. A., Van Der Westhuizen, D. J., Gill, R. S., & Louw, V. J. (2023). Diagnosing iron deficiency: Controversies and novel metrics. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, 37(4), 451-467. <https://doi.org/10.1016/j.bpa.2023.11.001>
- Safiri, S., Ghaffari Jolfayi, A., Fazlollahi, A., Morsali, S., Sarkesh, A., Daei Sorkhabi, A., Golabi, B., Aletaha, R., Motlagh Asghari, K., Hamidi, S., Mousavi, S. E., Jamalkhani, S., Karamzad, N., Shamekh, A., Mohammadinasab, R., Sullman, M. J. M., Şahin, F., & Kolahi, A.-A. (2024). Alzheimer's disease: A comprehensive review of epidemiology, risk factors, symptoms diagnosis, management, caregiving, advanced treatments and associated challenges. *Frontiers in Medicine*, 11, 1-39. <https://doi.org/10.3389/fmed.2024.1474043>
- Saka, O. M., Öz, U. C., Küçüktürkmen, B., Devrim, B., & Bozkır, A. (2020). Central Composite Design for Optimization of Zoledronic Acid Loaded PLGA Nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Innovation*, 15(1), 3-14. <https://doi.org/10.1007/s12247-018-9365-6>
- Scheltens, P., De Strooper, B., Kivipelto, M., Holstege, H., Chételat, G., Teunissen, C. E., Cummings, J., & Van Der Flier, W. M. (2021). Alzheimer's disease. *The Lancet*, 397(10284), 1577-1590. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32205-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32205-4)
- Schöll, M., Vrillon, A., Ikeuchi, T., Quevenco, F. C., Iaccarino, L., Vasileva-Metodiev, S. Z., Burnham, S. C., Hendrix, J., Epelbaum, S., Zetterberg, H., & Palmqvist, S. (2025). Cutting through the noise: A narrative review of Alzheimer's disease plasma biomarkers for routine clinical use. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*, 12(4), 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.tjpad.2024.100056>
- Shah, S., Famta, P., Raghuvanshi, R. S., Singh, S. B., & Srivastava, S. (2022). Lipid polymer hybrid nanocarriers: Insights into synthesis aspects, characterization, release mechanisms, surface functionalization and potential implications. *Colloid and Interface Science Communications*, 46, 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.colcom.2021.100570>
- Sharma, A., Choi, H.-K., & Lee, H.-J. (2023). Carbon Dots for the Treatment of Inflammatory Diseases: An Appraisal of In Vitro and In Vivo Studies. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2023, 1-17. <https://doi.org/10.1155/2023/3076119>
- Silva, M. V. F., Loures, C. D. M. G., Alves, L. C. V., De Souza, L. C., Borges, K. B. G., & Carvalho, M. D. G. (2019). Alzheimer's disease: Risk factors and potentially protective measures. *Journal of Biomedical Science*, 26(1), 1-33. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0524-y>

- Silvestre Martínez, J. H. (2024). *Efecto de nanopartículas híbridas cargadas con compuestos antioxidantes en astrocitos de rata en enfermedad de Alzheimer*. [Tesis de maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California]. Repositorio Institucional <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/4221>
- Singh, D. (2022). Astrocytic and microglial cells as the modulators of neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*, 19(1), 1-15. <https://doi.org/10.1186/s12974-022-02565-0>
- Siracusa, R., Fusco, R., & Cuzzocrea, S. (2019). Astrocytes: Role and Functions in Brain Pathologies. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1-10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01114>
- Smeitink, J., Van Maanen, R., De Boer, L., Ruitkamp, G., & Renkema, H. (2022). A randomised placebo-controlled, double-blind phase II study to explore the safety, efficacy, and pharmacokinetics of sonlicromanol in children with genetically confirmed mitochondrial disease and motor symptoms ("KHENERGYC"). *BMC Neurology*, 22(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12883-022-02685-3>
- Smith, N. S., Burr, H. J., Zhang, W., & Wang, C. (2024). Development of Diverse Carbon Dots to Inhibit Protein Aggregation in Alzheimer's Disease. *Alzheimer's & Dementia*, 20(S6), 1-3. <https://doi.org/10.1002/alz.087705>
- Sobue, A., Komine, O., & Yamanaka, K. (2023). Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Microglial signature and their relevance to disease. *Inflammation and Regeneration*, 43(1), 1-6. <https://doi.org/10.1186/s41232-023-00277-3>
- Song, X., Zhang, Y., Tang, Z., & Du, L. (2024). Advantages of nanocarriers for basic research in the field of traumatic brain injury. *Neural Regeneration Research*, 19(2), 237-245. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.379041>
- Stamatovic, S. M., Johnson, A. M., Keep, R. F., & Andjelkovic, A. V. (2016). Junctional proteins of the blood-brain barrier: New insights into function and dysfunction. *Tissue Barriers*, 4(1), 1-12. <https://doi.org/10.1080/21688370.2016.1154641>
- Stogsdill, J. A., Harwell, C. C., & Goldman, S. A. (2023). Astrocytes as master modulators of neural networks: Synaptic functions and disease-associated dysfunction of astrocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1525(1), 41-60. <https://doi.org/10.1111/nyas.15004>
- Sultana, A., Zare, M., Thomas, V., Kumar, T. S. S., & Ramakrishna, S. (2022). Nano-based drug delivery systems: Conventional drug delivery routes, recent developments and future prospects. *Medicine in Drug Discovery*, 15, 1-21. <https://doi.org/10.1016/j.medidd.2022.100134>
- 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*, 14, 4961-4974. <https://doi.org/10.2147/IJN.S209325>
- Tang, Y., Zhou, M., Huang, R., Shen, L., Yang, L., Zhou, Z., Ren, H., & Bai, Y. (2021). Involvement of HECTD1 in LPS-induced astrocyte activation via σ -1R-JNK/p38-FOXJ2 axis. *Cell & Bioscience*, 11(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s13578-021-00572-x>
- Tangkatitham, T., Thongcumsuk, B., Sripumkhai, W., Kamnerdsook, A., Jamsaksiri, W., Cheunkar, S., & Oaew, S. (2024). Hydrophilic phycocyanin encapsulation in PLGA nanoparticles using benchtop

- microfluidic device. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 701, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2024.134894>
- Tcw, J., & Goate, A. M. (2017). Genetics of β -Amyloid Precursor Protein in Alzheimer's Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(6), 1-11. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a024539>
- 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*, 12(21), 5085-5097. <https://doi.org/10.1039/D4TB00521J>
- Vasile, F., Dossi, E., & Rouach, N. (2017). Human astrocytes: Structure and functions in the healthy brain. *Brain Structure and Function*, 222(5), 2017-2029. <https://doi.org/10.1007/s00429-017-1383-5>
- Wang, B., Cai, H., Waterhouse, G. I. N., Qu, X., Yang, B., & Lu, S. (2022). Carbon Dots in Bioimaging, Biosensing and Therapeutics: A Comprehensive Review. *Small Science*, 2(6), 1-26. <https://doi.org/10.1002/smssc.202200012>
- Wang, W., Zhao, F., Ma, X., Perry, G., & Zhu, X. (2020). Mitochondria dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease: Recent advances. *Molecular Neurodegeneration*, 15(1), 1-22. <https://doi.org/10.1186/s13024-020-00376-6>
- Wang, Y., Tariq, T., Mahmood, F., Ghorbanpour, M., Mustafa, G., & Hasan, M. (2025). A nano-bioengineered cobalt oxide biostimulant mediated regulation of physiological, biochemical, and antioxidant mechanisms in Zea mays. *Scientific Reports*, 15(1), 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-01020-3>
- Wasilewski, D., Villalba-Moreno, N. D., Stange, I., Glatzel, M., Sepulveda-Falla, D., & Krasemann, S. (2022). Reactive Astrocytes Contribute to Alzheimer's Disease-Related Neurotoxicity and Synaptotoxicity in a Neuron-Astrocyte Co-culture Assay. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 15, 1-20. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.739411>
- Weiss, M., Fan, J., Claudel, M., Sonntag, T., Didier, P., Ronzani, C., Lebeau, L., & Pons, F. (2021). Density of surface charge is a more predictive factor of the toxicity of cationic carbon nanoparticles than zeta potential. *Journal of Nanobiotechnology*, 19(1), 1-18. <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00747-7>
- Wilkins, H. M., & Swerdlow, R. H. (2015). Relationships Between Mitochondria and Neuroinflammation: Implications for Alzheimer's Disease. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16(8), 849-857. <https://doi.org/10.2174/1568026615666150827095102>
- 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), 1-27. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01481-w>
- Xu, H., Li, S., & Liu, Y.-S. (2022). Nanoparticles in the diagnosis and treatment of vascular aging and related diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 1-36. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01082-z>
- Xu, L., Nirwane, A., & Yao, Y. (2019). Basement membrane and blood-brain barrier. *Stroke and Vascular Neurology*, 4(2), 78-82. <https://doi.org/10.1136/svn-2018-000198>

- Yan, F., Sun, Z., Zhang, H., Sun, X., Jiang, Y., & Bai, Z. (2019). The fluorescence mechanism of carbon dots, and methods for tuning their emission color: A review. *Microchimica Acta*, 186(8), 1-37. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3688-y>
- Yan, F., Wang, Y., He, S., Ku, S., Gu, W., & Ye, L. (2013). Transferrin-conjugated, fluorescein-loaded magnetic nanoparticles for targeted delivery across the blood–brain barrier. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 24(10), 2371-2379. <https://doi.org/10.1007/s10856-013-4993-3>
- 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>
- Yoo, J., & Won, Y.-Y. (2020). Phenomenology of the Initial Burst Release of Drugs from PLGA Microparticles. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 6(11), 6053-6062. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.0c01228>
- Zha, S., Liu, H., Li, H., Li, H., Wong, K.-L., & All, A. H. (2024). Functionalized Nanomaterials Capable of Crossing the Blood–Brain Barrier. *ACS Nano*, 18(3), 1820-1845. <https://doi.org/10.1021/acsnano.3c10674>
- Zhang, L., Chan, J. M., Gu, F. X., Rhee, J.-W., Wang, A. Z., Radovic-Moreno, A. F., Alexis, F., Langer, R., & Farokhzad, O. C. (2008). Self-Assembled Lipid–Polymer Hybrid Nanoparticles: A Robust Drug Delivery Platform. *ACS Nano*, 2(8), 1696-1702. <https://doi.org/10.1021/nn800275r>
- Zhang, S., & Wang, C. (2023). Effect of stirring speed on particle dispersion in silica synthesis. *Nano-Structures & Nano-Objects*, 35, 1-3. <https://doi.org/10.1016/j.nanoso.2023.100994>
- Zhang, W., Xiao, D., Mao, Q., & Xia, H. (2023). Role of neuroinflammation in neurodegeneration development. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 1-32. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01486-5>
- Zhang, X.-X., Tian, Y., Wang, Z.-T., Ma, Y.-H., Tan, L., & Yu, J.-T. (2021). The Epidemiology of Alzheimer’s Disease Modifiable Risk Factors and Prevention. *The Journal of Prevention of Alzheimer’s Disease*, 8(3), 313-321. <https://doi.org/10.14283/jpad.2021.15>
- 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), 1-26. <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, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.104994>
- Zhou, X., Smith, Q. R., & Liu, X. (2021). Brain penetrating peptides and peptide–drug conjugates to overcome the blood–brain barrier and target CNS diseases. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 13(4), 1-34. <https://doi.org/10.1002/wnan.1695>

Zong, Y., Li, H., Liao, P., Chen, L., Pan, Y., Zheng, Y., Zhang, C., Liu, D., Zheng, M., & Gao, J. (2024). Mitochondrial dysfunction: Mechanisms and advances in therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), 1-29. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01839-8>