



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Determinación *in vitro* de la biocompatibilidad de un péptido marcador acoplado a nanopartículas USPIO en un modelo de neuroinflamación inducida**

Laura Camila Rojas Hernández

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Departamento de Ciencias Fisiológicas

Bogotá, Colombia

2023

# **Determinación *in vitro* de la biocompatibilidad de un péptido marcador acoplado a nanopartículas USPIO en un modelo de neuroinflamación inducida**

Laura Camila Rojas Hernández

Trabajo de investigación presentada como requisito para optar al título de:  
Magíster en Bioquímica

Director (a):

PhD. Carlos Arturo Guerrero Fonseca

Grupo de Investigación:

Biología celular y funcional e ingeniería de biomoléculas

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Medicina,  
Departamento de Ciencias Fisiológicas  
Bogotá, Colombia  
2023

## Agradecimientos

En primer lugar a Dios, mi familia y mi novio por su inquebrantable apoyo durante todo el proceso de esta investigación.

A Dios, especialmente, le agradezco por brindarme las fuerzas y las oportunidades necesarias para culminar de manera satisfactoria este proyecto académico.

A mi familia; mis padres, mis hermanos y mi novio, les agradezco su constante aliento, comprensión y paciencia, que fueron pilares fundamentales para superar los desafíos y alcanzar este logro significativo. Su amor y apoyo incondicional que fueron fundamentales en la culminación de esta etapa.

## Resumen

Los trastornos neurológicos son enfermedades degenerativas del sistema nervioso central (SNC) y constituyen una causa frecuente de morbilidad y mortalidad en el mundo, y han incrementado en los últimos años. Las nanopartículas USPIO (*Ultra-small Superparamagnetic Iron Oxide*) son una categoría novedosa de agentes de contraste en resonancia magnética de imagen (RMI) que pueden acoplarse a diversas moléculas y dirigirse de manera específica hacia marcadores moleculares que reflejen alteraciones específicas. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue caracterizar el efecto de las nanopartículas de USPIO conjugadas con el péptido marcador P88 en un modelo de neuroinflamación inducida *in vitro* con potencial aplicabilidad en RMI. Para lograr este objetivo, las líneas celulares HCMEC/D3 (células endoteliales de microvasculatura de cerebro) y T98G (astrocitos) se incubaron USPIO conjugadas con el péptido marcador y se determinó su efecto sobre la viabilidad celular por el método de LDH. Posteriormente, se identificó el perfil inflamatorio por medio de citometría de flujo y ensayos de PCR en tiempo real. Finalmente, se determinó el perfil de estrés oxidativo mediante la medición de los niveles de superóxido producidos. En general, los resultados de este estudio sugieren que NP88 es biocompatible con las líneas celulares HCMEC/D3 y T98G; y se podría utilizar potencialmente como biomarcador en modelos de neuroinflamación.

**Palabras clave:** Enfermedades neurodegenerativas - Imágenes de resonancia magnética – nanopartículas de USPIO – Biomarcador.

## Abstract

**In vitro determination of the biocompatibility of a marker peptide coupled to USPIO nanoparticles in an induced neuroinflammation model.**

Neurological disorders are degenerative diseases of the central nervous system (CNS) and constitute a frequent cause of morbidity and mortality in the world, and have increased in recent years. USPIO (Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide) nanoparticles are a novel category of magnetic resonance imaging (MRI) contrast agents that can couple to various molecules and specifically target molecular markers that reflect specific abnormalities. Therefore, the objective of this study was to characterize the effect of USPIO nanoparticles conjugated with the marker peptide P88 in an *in vitro* induced neuroinflammation model with potential applicability in MRI. To achieve this goal, the cell lines HCMEC/D3 (brain microvasculature endothelial cells) and T98G (astrocytes) were incubated USPIO conjugated with the marker peptide and their effect on cell capacity was amplified by the LDH method. Subsequently, the inflammatory profile was identified by means of flow cytometry and real-time PCR assays. Finally, the oxidative stress profile was reduced by measuring the levels of superoxides produced. Overall, the results of this study suggest that NP88 is biocompatible with the HCMEC/D3 and T98G cell lines; and could potentially be used as a biomarker in models of neuroinflammation.

**Keywords:** Neurodegenerative Diseases - Magnetic resonance imaging – USPIO nanoparticles – Biomarker

# Contenido

<b>Agradecimientos</b> .....	<b>3</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>4</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>5</b>
<b>Contenido</b> .....	<b>6</b>
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	<b>7</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>8</b>
<b>2. Marco teórico</b> .....	<b>10</b>
2.2 Neuroinflamación .....	10
2.2 Astrocitos .....	13
2.3 Células endoteliales .....	14
2.4 Interleucina 8 (IL-8) .....	15
2.5 Proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) .....	16
2.6 TNF- $\alpha$ .....	16
2.7 Diagnóstico de la neuroinflamación .....	17
2.8 Péptido 88 - Acoplado a nanopartículas de USPIO (NP88).....	22
<b>3. Objetivos</b> .....	<b>25</b>
<b>3.2 Objetivo General</b> .....	<b>25</b>
<b>3.3 Objetivos específicos</b> .....	<b>25</b>
<b>4. Materiales y métodos</b> .....	<b>26</b>
4.1 Obtención de nanopartículas .....	26
4.2 Cultivo celular .....	26
4.3 Ensayo de Lactato deshidrogenasa (LDH) .....	27
4.4 Citometría de flujo .....	28
4.5 Extracción de RNA .....	29
4.6 Transcripción reversa .....	30
4.7 Análisis de expresión génica .....	31
4.8 Determinación de la producción de Superóxido.....	32
<b>5. Resultados</b> .....	<b>34</b>
5.1 Ensayo de citotoxicidad .....	34
5.2 Cuantificación de moléculas proinflamatorias y antiinflamatorias. ....	37
5.3 Producción de IL1 $\beta$ y Laminina $\beta$ 1.....	45
<b>6 Producción de superóxido</b> .....	<b>52</b>
<b>6. Discusión de resultados</b> .....	<b>53</b>
<b>7. Conclusiones y recomendaciones</b> .....	<b>60</b>
<b>Recomendaciones</b> .....	<b>60</b>
<b>8. Bibliografía</b> .....	<b>61</b>

# Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>USPIO</b>	Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide
<b>RMI</b>	Resonancia magnética de imagen
<b>BHE</b>	Barrera hematoencefálica
<b>LDH</b>	Lactato deshidrogenasa
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>NP88</b>	Péptido 88 acoplado a nanopartículas de USPIO
<b>MEC</b>	Matriz extracelular

# 1.Introducción

Los trastornos neurológicos son enfermedades del sistema nervioso que involucran diversos cambios fisiológicos y bioquímicos que afectan su funcionamiento normal. La prevalencia de estos trastornos aumenta progresivamente a nivel mundial, representando el 6% de todas las enfermedades y de acuerdo con las proyecciones de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) estas podrían duplicarse cada 20 años.

Las herramientas de diagnóstico de enfermedades neurológicas son limitadas y generalmente brindan un diagnóstico tardío, luego de que han aparecido signos visibles de la enfermedad y la condición médica es irreversible (Hermann & Zerr, 2022). Uno de los mayores retos de la medicina actual es intentar predecir o estimar el riesgo de sufrir un evento patológico en una persona sana. Por esta razón, ha aumentado el interés en el estudio de biomarcadores diagnósticos y de pronóstico que permitan identificar condiciones patológicas de manera oportuna.

Dentro de las categorías novedosas de agentes de contraste para RMI, las nanopartículas de óxido de hierro, con un tamaño que oscila entre 20 – 60 nm, son de particular interés debido a sus propiedades superparamagnéticas y una alta estabilidad coloidal (Issa & M. Obaidat, 2019; Iv et al., 2015). Estas nanopartículas, a su vez, pueden ser acopladas a diferentes moléculas de interés con el objetivo de dirigir las a receptores específicos y presentan una mayor sensibilidad para detectar cierto tipo de lesiones inflamatorias generando señales visibles por medio de RMI, con una precisión lo suficientemente alta para poder caracterizar lesiones, aún en un número pequeño de células.



Estudios previos describieron un péptido con alto potencial como biomarcador de neuroinflamación en un modelo *in vitro* y con capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE).

Por lo tanto, en este estudio se planteó la caracterización de la biocompatibilidad del péptido marcador acoplado a USPIO en un modelo de neuroinflamación inducida *in vitro* con potencial aplicabilidad en IRM. Para esto, se trataron las células endoteliales de microvasculatura de cerebro HCMEC/D3 y de astrocitoma T98G con rhIL1 $\beta$  y se incubaron con el péptido marcador conjugado a las nanopartículas USPIO para determinar sus efectos en la viabilidad celular por el método de LDH. Adicionalmente, se identificó el perfil inflamatorio por medio de citometría de flujo y mediante ensayos de PCR en tiempo real. Finalmente, se determinó el estrés oxidativo mediante la medición de iones superóxido. Este trabajo permitió determinar la biocompatibilidad del péptido marcador conjugado a nanopartículas USPIO en condiciones neuro inflamatorias con la finalidad emplear NP88 en el diagnóstico y seguimiento por IRM.

## 2. Marco teórico

### 2.2 Neuroinflamación

La neuroinflamación se define como la activación del sistema inmunológico innato del cerebro en respuesta a un desafío inflamatorio que se caracteriza por una serie de cambios celulares y moleculares dentro del cerebro. Además, la neuroinflamación es un factor importante de muchas enfermedades del SNC y su disminución mejora el resultado clínico del paciente (Milatovic et al., 2017).

La neuroinflamación se localiza en el tejido nervioso y puede desencadenarse en respuesta a una variedad de señales que pueden incluir infección, lesión cerebral traumática, hemorragias, metabolitos tóxicos o autoinmunidad, comprendiendo múltiples respuestas bioquímicas a nivel celular (Chen et al., 2016). En condiciones normales, la microglía y las células del sistema inmune residentes en el SNC responden ante modificaciones en su entorno que pueden conducir a alterar su homeostasis regulando a la alza la señalización inflamatoria, conllevando a una respuesta que puede ser tanto beneficiosa como perjudicial en diversos contextos clínicos (Vargas, 2019). La neuroinflamación es una condición que prevalece en muchas enfermedades, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, lesión cerebral traumática, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Parkinson, Huntington, entre otras (Elaine K et al., 2018). La neuroinflamación es caracterizada por la activación de las células gliales residentes, la liberación de citocinas y quimiocinas específicas y el reclutamiento e infiltración de células sanguíneas periféricas en el parénquima cerebral (Vargas, 2019) (Elaine K et al., 2018).

El aumento en el estado de neuroinflamación hace que el cerebro del adulto mayor sea más propenso a los efectos adversos que traen consigo las enfermedades, lesiones,

infecciones, sustancias tóxicas, estrés, entre otros (Farida S et al., 2016). El patrón exacto de los cambios fisiológicos y moleculares no han sido definidos y varían dependiendo del tipo y la duración de la inflamación (Farida S et al., 2016).

La respuesta inmunológica en el cerebro también se asocia con mayores niveles de prostaglandinas, mediada por la interacción de diferentes receptores acoplados a proteína G que alteran la señalización (Elaine K et al., 2018). Adicionalmente, diversas lesiones neuronales causan inflamación al activar la microglía, los astrocitos con la inducción y el aumento de citocinas proinflamatorias como IL8, IL1 $\beta$ , y TNF- $\alpha$  en el hipocampo (Farida S et al., 2016). Se ha descrito que en trastornos convulsivos, este reclutamiento de citocinas sucede en las regiones cerebrales que son susceptibles de sufrir daño neuronal causando inflamación cerebral y alterando la permeabilidad de la BHE y a su vez, la prolongación de este estado inflamatorio se asocia con la progresión de la enfermedad (Farida S et al., 2016).

Los procesos de neuroinflamación se refieren a un aumento en la activación de moléculas del sistema inmunológico. Durante la activación de la cascada neuroinflamatoria se produce una desregulación de estos complejos moleculares, lo que a su vez permite la entrada progresiva de células inmunitarias en el entorno del SNC. La señalización de células inflamatorias e inmunitarias y los mecanismos moleculares que se originan de forma innata dentro del SNC o a nivel sistémico dando como resultado modificaciones en la integridad y organización de estas moléculas de unión y la permeabilidad de la BHE, lo que contribuye a la etiogénesis y a la progresión de enfermedades neurodegenerativas, otros desencadenantes de inflamación agudo como los eventos cerebrales isquémicos o hemorrágicos generan la activación de estos complejos moleculares. (Xie et al., 2019)

La activación microglial suele ir acompañada de la liberación de mediadores inflamatorios, como citocinas y quimiocinas proinflamatorias, que también son producidas

por las células endoteliales. Las quimiocinas en las células endoteliales interactúan con los leucocitos transportados por la sangre para mejorar la afinidad por sus ligandos endoteliales (Oestreich & O'Sullivan, 2022). La inducción de la expresión de TNF- $\alpha$  similar a las citocinas proinflamatorias y la interleucina (IL), aparecen astrocitos y microglía activada después de la isquemia cerebral (Yang et al., 2013) se ha informado que la inflamación en la región isquémica primaria después de la isquemia cerebral focal es muy fuerte en la etapa subaguda y la microglía cambia dentro de los 3 a 4 días y los infiltrados de macrófagos mononucleares hematógenos aparecen más tarde. (Yang et al., 2013) La microglía activada y los astrocitos emiten citocinas proinflamatorias, como TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$ . Las citocinas proinflamatorias inducen una ósmosis excesiva de agua intracelular hacia el espacio extraneuronal, donde las moléculas neurotóxicas como las ROS inducen la ruptura de la BHE. Esto permite la entrada de células T al cerebro, lo que promueve aún más la expresión de citocinas proinflamatorias como IFN $\gamma$  y la activación de la microglía, lo que provoca un refuerzo recíproco de los procesos neuroinflamatorios y neurodegenerativos (Oestreich & O'Sullivan, 2022)

La citocina IL1 $\beta$  es producida principalmente por células inmunitarias, incluida la microglía (las células inmunitarias residentes del SNC), los astrocitos y las células inmunitarias infiltrantes en respuesta a diversos estímulos, como infecciones, lesiones o estrés celular. Esta citocina como un potente mediador de la neuroinflamación al promover el reclutamiento y la activación de células inmunitarias, inducir la producción de otras citocinas proinflamatorias y mejorar la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales, lo que facilita la infiltración de células inmunitarias en el SNC. La IL1 $\beta$  también contribuye a la activación de las células gliales, como la microglía y los astrocitos, lo que induce a la liberación de moléculas inflamatorias adicionales y factores neurotóxicos, lo que exacerba la neuroinflamación.

Las citocinas de la familia de la IL1 $\beta$ , son moléculas de señalización clave tanto en el sistema inmunitario innato como en el adaptativo, y median la inflamación en respuesta a una amplia gama de estímulos. (Fields et al., 2019). Dentro de la familia IL-1, el mecanismo de iniciación de la señal está muy conservado. Adicionalmente, el aumento de IL1, hace parte integral de la reacción del tejido local a la lesión del SNC, formando parte de un proceso denominado neuroinflamación en el que se diversan moléculas modifican su expresión en respuesta a la lesión. De igual manera, TNF $\alpha$  influye en la señalización inflamatoria, participa en el reclutamiento de las moléculas inflamatorias y contribuye al estrés oxidativo. (Parameswaran & Patial, 2010)

En un estudio realizado por M. Yamato et al., se reveló que los eventos neuroinflamatorios se caracterizan por un aumento significativo en la producción de IL1 $\beta$ . Este hallazgo resalta el papel crucial de la IL-1 en la consolidación de la respuesta inflamatoria dentro del sistema nervioso central. Los niveles elevados de IL-1 no solo contribuyen directamente al inicio y la progresión de la neuroinflamación, sino que también desempeñan un papel fundamental en el reclutamiento de otras moléculas inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). La presencia de TNF- $\alpha$  amplifica aún más la cascada inflamatoria, lo que da lugar a una red compleja de respuestas inmunitarias y a la exacerbación de los procesos neuroinflamatorios. (Tamura et al., 2014).

## 2.2 Astrocitos

Los astrocitos comprenden la clase más grande de células gliales en el SNC de los mamíferos. Tienen funciones clave en el mantenimiento de la BHE y la regulación del flujo sanguíneo regional, el suministro de apoyo trófico, antioxidante y metabólico a las neuronas, el reciclaje de neurotransmisores, la regulación de la sinaptogénesis y la transmisión sináptica (Ben Haim & Rowitch, 2016). Los astrocitos se han considerado

tradicionalmente como una población celular homogénea, y se asumió que los astrocitos de diferentes regiones del SNC eran funcionalmente intercambiables; sin embargo, los biólogos gliales ahora tienen una apreciación de las formas importantes en que los astrocitos son funcionalmente diversos, un concepto que altera fundamentalmente la forma en que consideramos la regulación de la unidad de células neurogliales locales y la organización del SNC(González-Reyes et al., 2017).

Debido a la importancia de los astrocitos en la homeostasis cerebral, se han convertido en dianas interesantes para el estudio de las enfermedades inflamatorias. Se han observado cambios en la función de los astrocitos en cerebros de personas con enfermedad de alzheimer, tanto *in vivo* como *in vitro*, así como su participación en la respuesta inflamatoria del SNC y la producción de proteínas de la MEC(Fuster et al., 2020).

T98G es una célula similar a un fibroblasto que se aisló del cerebro de un paciente masculino de 61 años de edad con glioblastoma multiforme, ampliamente utilizada en neurociencia como modelo astrocitario(T98G [T98-G]-CRL-1690 | ATCC, n.d.).

## **2.3Células endoteliales**

Las propiedades de la BHE se manifiestan en las células endoteliales; las interacciones que en ella ocurren son inducidas por células murales, células inmunes, células gliales y células neuronales, que interactúan en la unidad neurovascular.(Gaona et al., 2021a; Gojova et al., 2007; Weksler et al., 2013)

Las lesiones neuroinflamatorias se caracterizan por la ruptura de las uniones estrechas en la BHE y activación de las células de la glía. Siendo estas células las primeras que participan en el proceso neuroinflamatorio. Las células gliales detectan la presencia de daño tisular mediante la activación en un patrón de reconocimiento inmunológico para la

detección de agentes moleculares extraños y nocivos (Balistreri et al., 2009; Di Virgilio et al., 2009; Husemann et al., 2002).

La línea celular HCMEC/D3 es una línea celular endotelial de la BHE humana ampliamente utilizada y caracterizada (Choublier et al., 2022; Peng et al., 2021; Stephan et al., 2013; Weksler et al., 2013). Exhibe las principales características de la BHE, como la expresión de proteínas de unión, transportadores de captación y salida; y otros marcadores de la BHE. (Choublier et al., 2022; Weksler et al., 2013). Se ha estudiado la respuesta de las células HCMEC/D3 a los mediadores inflamatorios y secretan quimiocinas de manera similar al endotelio primario del cerebro humano tanto en condiciones basales como después de la estimulación por citocinas (Weksler et al., 2013)

En resumen, la línea celular HCMEC/D3 es un modelo útil para estudiar las interacciones entre el endotelio del cerebro humano y las células inmunitarias activadas, y se ha estudiado su respuesta a los mediadores inflamatorios. Los estudios también han demostrado que la exposición de las células HCMEC/D3 al estrés fisiológico laminar se acompaña de una inflamación reducida, y que pueden inducir un perfil inflamatorio en las HCMEC. (Choublier et al., 2022; Stephan et al., 2013; Weksler et al., 2013)

## **2.4 Interleucina 8 (IL-8)**

IL-8 es sintetizada y liberada principalmente por la microglía y los astrocitos (Ehrlich et al., 1998). La IL-8 se produce temprano en la respuesta inflamatoria, posiblemente persistiendo durante días o semanas, a diferencia de la mayoría de las otras citocinas inflamatorias que se producen y eliminan en unas pocas horas (Remick, 2005). Por lo tanto, la IL-8 podría ser específica para cambios inflamatorios más crónicos en alteraciones neurodegenerativas y neuropsicológicas en el cerebro.

De igual manera, IL-8 actúa como un quimioatrayente de macrófagos, se libera de la microglía en respuesta a estímulos proinflamatorios y es producida principalmente por células inmunitarias, como macrófagos y células epiteliales, en respuesta a diversos estímulos, como infecciones, lesiones tisulares o señales inflamatorias. IL-8 juega un papel importante en el reclutamiento y la activación de neutrófilos, y está relacionada con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y otros mediadores inflamatorios, por lo que el aumento significativo en IL-8, reflejaría la respuesta inflamatoria.

## **2.5 Proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1)**

MCP-1, es una quimiocina secretada principalmente por varios tipos de células, incluidos monocitos, macrófagos y células endoteliales, en respuesta a la inflamación. MCP-1 es un quimioatrayente para los monocitos y tiene un papel crucial en su reclutamiento a los sitios de inflamación. También regula la migración y activación de otras células inmunitarias, como las células T. MCP-1 está involucrada en el desarrollo de la inflamación crónica y su desregulación se ha asociado con varias enfermedades inflamatorias, como la aterosclerosis, la artritis reumatoide y ciertos tipos de cáncer (Sawyer et al., 2014)

## **2.6 Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )**

El TNF- $\alpha$  es producido por células de la microglía, los macrófagos y las células T. Se libera en respuesta a estímulos similares a los de la IL1 $\beta$  y desempeña un papel fundamental en el inicio y mantenimiento de la neuroinflamación. TNF- $\alpha$  promueve el reclutamiento y la activación de células inmunitarias en el SNC, induce la producción de otros mediadores proinflamatorios y mejora la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales, lo que facilita el tráfico de células inmunitarias a través de la BHE



TNF- $\alpha$  también puede activar las células gliales y promover la liberación de sustancias neurotóxicas, lo que contribuye al daño neuronal y la neurodegeneración.

Tanto IL1 $\beta$  como TNF- $\alpha$  están involucrados en una red compleja de vías de señalización inflamatoria dentro del SNC. Su producción sostenida y excesiva puede conducir a una neuroinflamación crónica, que está implicada en varios trastornos neurológicos, incluidas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, la esclerosis múltiple y los accidentes cerebrovasculares (Wu et al., 2013).

## **2.7 Diagnóstico de la neuroinflamación**

La evaluación y el diagnóstico de la neuroinflamación en el contexto clínico sigue patrones y síntomas que manifiesta el paciente y que reflejan la alteración neurológica (Mayo Clinic, 2019). En la actualidad los principales métodos empleados para el diagnóstico son el psicológico y psiquiátrico (Mayo Clinic, 2019). La neuroimagen ha transformado la comprensión de los sustratos neurológicos en individuos vivos, estas herramientas permiten diferenciar la estructura y función del cerebro lo que facilitaría la obtención de diagnósticos de diferentes condiciones neurológicas (Merenstein & Bennett, 2022).

Las pruebas basadas en imágenes brindan un soporte al diagnóstico inicial y permiten hacer correlaciones (Merenstein & Bennett, 2022). Sin embargo, el diagnóstico basado en imágenes de cerebro es limitado, debido a que muchos cambios morfológicos que se observan en la alteración neurológica siguen patrones similares a lo que sucede durante el proceso normal del envejecimiento. Por esta razón, no reflejan una condición específica (Mayo Clinic, 2019) (JB Savitz et al., 2018).

IRM se ha convertido en la principal herramienta para obtención de imágenes en medicina (James W, et al., 2000). Esta tecnología utiliza las propiedades magnéticas de

los núcleos atómicos que ocurren de manera natural en el cuerpo; principalmente hidrógeno, en el agua. La IRM realiza mediciones sincronizando las señales nucleares atómicas presentes en el tejido, representando la técnica de visualización de imágenes corporales menos invasiva dentro de las disponibles actualmente (James W, et al., 2018). Debido a que puede distinguir entre señales de varias moléculas bioquímicas, la tecnología de IRM tiene una especificidad química inherente (National Institutes of Health, 2012) (James W, et al., 2000). Dichas características hacen que los métodos de IRM sean la fuente más importante de información sobre el tejido vivo disponible de cualquier tecnología de imagen, además de ser una modalidad de imagen no invasiva (Pollatou et al., 2022).

Para mejorar el contraste y observar estructuras de manera diferencial, se emplean compuestos con propiedades magnéticas que generan una mejor visualización de los objetivos de interés (National Institutes of Health, 2012). Dentro de los agentes de contraste empleados en esta técnica se encuentran el ácido gadopentético (Gd-DTPA) y las nanopartículas USPIO, caracterizados por poseer propiedades magnéticas y una alta biocompatibilidad (Mariagrazia M. et al., 2007). Las USPIO se caracterizan por presentar un comportamiento superparamagnético al poseer un núcleo de óxido de hierro recubierto (magnetita, maghemita u otras ferritas insolubles) que en presencia de un campo magnético externo estático se convierte en un agente de contraste muy preciso para uso en diagnóstico por IRM (Cortajarena et al., 2014; Li et al., 2017) (MariagraziaM. et al., 2007). El uso de USPIO en la práctica clínica permite obtener información relevante sobre la presencia de procesos patológicos en el SNC, utilizando moléculas marcadoras dirigidas a ligandos de interés. A su vez, estas sustancias permiten diagnosticar de manera oportuna y orientar sobre el manejo clínico y control terapéutico. De tal manera que, es posible utilizar esta técnica con fines de diagnóstico y con la mayor seguridad para el paciente.

La tecnología de IRM ha contribuido a mejorar el diagnóstico precoz de enfermedades neurodegenerativas, proporcionando información sobre los mecanismos de la disfunción neurológica, así como el daño axonal y la implicación de la interrupción de la BHE como un evento temprano en el desarrollo de la lesión (Organización Mundial de la Salud (OMS), 2020; Pollatou et al., 2022) Las lesiones inflamatorias focales se pueden visualizar y medir mediante IRM, después de la inyección intravenosa de agentes de contraste, como USPIO y Gd-DTPA (Gkagkanasiou et al., 2016). En este caso, las USPIO son una categoría novedosa de agentes que desempeñan un papel crucial en la obtención de imágenes del SNC. Lo anterior se debe a las propiedades físicas de las USPIO dado que actúan como agentes de acumulación de sangre y mejoran la visualización de la vasculatura (Gkagkanasiou et al., 2016).

Los agentes de contraste basados en Gd-DTPA en imágenes de IRM se usan a menudo en la práctica clínica diaria, pero no son seguros para todos los pacientes (Edward A. et al., 2008). La fibrosis sistémica nefrogénica es una complicación grave recientemente asociada con Gd-DTPA. Afecta principalmente a pacientes con enfermedad renal, como enfermedad renal crónica en estadio 4 o 5, lesión renal aguda o receptores de trasplante de riñón e hígado con disfunción renal (Edward A. et al., 2008). Sin embargo, han surgido reportes sobre la acumulación de gadolinio en varios tejidos de pacientes que no tienen insuficiencia renal, incluidos los huesos, el cerebro y los riñones (Rogosnitzky & Branch, 2016). Los efectos acumulativos y a largo plazo del gadolinio retenido en el cerebro y en otros lugares aún no se comprenden (Strijkers, 2021)(Ratajczak et al., 2006)

Las nanopartículas de óxido de hierro son un agente alternativo de contraste de IRM marcador de BHE al Gd-DTPA. Estos son compuestos prometedores debido a su efecto de acortamiento del tiempo de relajación T1 y T2 y su biodistribución en el tejido, más específica que la de Gd-DTPA de bajo peso molecular, esto permite obtener mejor resolución en las imágenes (Edward A. et al., 2008). Las nanopartículas de hierro

superparamagnéticas (SPIO) con diámetro menor de 50 nanómetros (nm) tienen una vida media plasmática corta y son menos óptimos para las imágenes del SNC con una capacidad disminuida de atravesar la BHE (Gkagkanasiou et al., 2016) (Edward A. et al., 2008). Las nanopartículas USPIO tienen un diámetro menor de 50 nanómetros (nm), pueden usarse para obtener imágenes de RMI con contraste (Edward A. et al., 2008). Adicionalmente, el hierro es biodegradable, biocompatible y puede ser reciclado por las células. La capa de dextrano que recubre la nanopartícula permite una fácil unión química del ligando y una fácil detección por microscopía de luz y electrónica (Zaharchuk et al., 2007). Adicionalmente, las nanopartículas USPIO, permiten su acoplamiento con biomoléculas marcadoras que pueden dirigirse de manera específica a un receptor diana de interés. La visualización de estas moléculas dirigidas representa un alto potencial en herramientas de diagnóstico altamente específicas por imagen como IRM.

En estudios previos, la estrategia phage display permitió realizar una selección de péptidos biomarcadores específicos en condiciones de neuroinflamación (Vargas, 2019). Se utilizó una biblioteca de péptidos de 12 aminoácidos en fagos para seleccionar ligandos que se unen a los vasos sanguíneos en el parénquima del SNC de ratas con encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) (Vargas, 2019). La EAE es un modelo de neuroinflamación que imita aspectos neuropatológicos significativos de la esclerosis múltiple (Vargas, 2019). Entre varios péptidos exhibidos en fagos seleccionados en el modelo animal, se identificaron ligandos específicos capaces de marcar la BHE humana en condiciones neuroinflamatorias *in vitro*. Uno de estos ligandos seleccionados, fue el clon fago 88 que mostró una alta afinidad con la BHE en condiciones inflamatorias (Pamela J. et al., 2016).

El péptido 88 muestra una interacción específica con la subunidad  $\beta$ -1 de laminina, lo que destaca su importancia como biomarcador potencial de los cambios de laminina que pueden ocurrir en las células endoteliales de la BHE en condiciones neuroinflamatorias.

---

Estudios previos identificaron la subunidad  $\beta$ -1 de laminina como el posible receptor diana del péptido 88 expresado en condiciones inflamatorias y se utilizó una prueba de entrecruzamiento entre el fago-péptido-88 con células HCMEC estimuladas con IL1 $\beta$ , seguida de un análisis de espectrometría de masas, para identificar el objetivo del péptido 88, encontrando que la subunidad  $\beta$ -1 de laminina presentó una interacción medible con el péptido 88.(Vargas-Sanchez et al., 2021)

A partir de este estudio, se desarrolló un nanoconjugado compuesto del peptido-88 (péptido seleccionado del fago 88) y una nanopartícula USPIO, denominado NP88; y mediante este trabajo se estudió su biocompatibilidad en dos modelos celulares, con el fin de obtener información sobre la seguridad del mismo *in vitro* en un modelo de neuroinflamación inducida.

Diversos estudios han demostrado que las nanopartículas tienen la capacidad de atravesar la BHE y generar neurotoxicidad, se han desarrollado diversos modelos que permiten mejorar la viabilidad, tales como el desarrollo nanopartículas magnéticas de hierro cerovalente con recubrimientos como el sílice en cuya seguridad mejora significativamente (Gaona et al., 2021b). NP88 exhibe propiedades fisicoquímicas, mecánicas, magnéticas y biológicas que podrían permitir su aplicación exitosa en ensayos clínicos y modelos *in vivo* e *in vitro*. Luego de su administración las nanopartículas pueden distribuirse. Los principales factores que pueden generar la pérdida de viabilidad celular son el estrés oxidativo, la inflamación, el daño al DNA y la muerte celular (Islam et al., 2021).

## 2.8 Péptido 88 – Acoplado a nanopartículas de USPIO (NP88)

El péptido 88, es un ligando peptídico que se identificó en un estudio previo de cribado de ligandos con el fin de detectar alteraciones moleculares de la BHE en la neuroinflamación mediante exhibición de fagos (Vargas-Sanchez et al., 2021a). Se ha descrito que el péptido 88 presenta afinidad de unión específica a las células endoteliales en condiciones inflamatorias *in vivo* e *in vitro* (Vargas-Sanchez et al., 2021b). Y se identificó la unión específica del péptido en condiciones inflamatorias utilizando una prueba de entrecruzamiento entre el fago-péptido-88 con células HCMEC humanas estimuladas con IL1 $\beta$ , seguida de un análisis de espectrometría de masas, para identificar el objetivo del péptido 88.

Posteriormente, Se descubrió que el péptido-88 se une específicamente a la laminina  $\beta$ 1, una proteína en la matriz extracelular de la BHE, lo que la convierte en un biomarcador prometedor para la neuroinflamación (Gaona et al., 2021b). Finalmente, el péptido-88 se conjugó con éxito con nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas, lo que creó una herramienta potencial para el diagnóstico de afecciones neuroinflamatorias mediante resonancia magnética (Gaona et al., 2021b).

Las nanopartículas de óxido de hierro, se han descrito ampliamente en la afinidad de unión con células HCMEC/D3 y T98G, con el fin de determinar su potencial en la administración de fármacos al cerebro y uso como agentes de contraste en RMI dirigiéndolas hacia objetivos moleculares específicos, (Dan et al., 2013) La captación y la transcitosis de nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas funcionalizadas se han estudiado en un modelo de BHE *in vitro* utilizando células HCMEC/D3 y modelos

---

de astrocitoma en células T98G con el fin de caracterizar sus efectos *in vitro* con el fin de emplearlo como herramienta biomédica (Coccini et al., 2017; Dan et al., 2013; Ge et al., 2019)

La investigación de la afinidad de unión de las nanopartículas de óxido de hierro con las células HCMEC/D3 es importante para desarrollar estrategias para la administración de fármacos dirigidos al cerebro.

Se han investigado las nanopartículas de óxido de hierro por su potencial para administrar fármacos al cerebro. La afinidad de unión de estas nanopartículas se investigó utilizando células endoteliales microvasculares corticales humanas (HCMEC/D3)

Respecto a las nanopartículas de óxido de hierro, no representan un efecto citotóxico medible en dosis bajas (1–50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Keenan et al., 2009; Lourenço et al., 2019; Mirzaei et al., 2018), mostrando un efecto significativo en concentraciones superiores (100 - 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

Se ha descrito previamente el péptido 88, el cual exhibe una afinidad por la neuroinflamación al unirse específicamente, y probablemente, a la laminina. Este péptido tiene la capacidad de acoplarse a USPIO y dirigirse de manera selectiva a su receptor específico, por lo que podría ser un biomarcador potencial. Por lo tanto, teniendo en cuenta los hallazgos anteriores, se planteó determinar y caracterizar la biocompatibilidad de NP88 utilizando los modelos celulares HCMECD3, que es un modelo adecuado del endotelio cerebral, y T98G, que es un modelo de astrocitoma cerebral. Esto permitió evaluar su seguridad en términos de citotoxicidad, aumento en la producción de moléculas inflamatorias y generación de superóxido bajo condiciones de neuroinflamación. Por lo tanto, el estudio actual caracterizó la respuesta inflamatoria generada por el nanoconjugado NP88, en los modelos celulares HCMEC/D3 y T98G con

el objetivo de determinar su seguridad *in vitro* y establecer su potencial uso como biomarcador.



## 3. Objetivos

### 3.2 Objetivo General

- Determinar la toxicidad *in vitro* de un péptido biomarcador conjugado a nanopartículas de USPIO en un modelo de neuroinflamación inducida en las líneas celulares HCMEC/D3 y T98G.

### 3.3 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de NP88 sobre la citotoxicidad de las líneas celulares HCMEC/D3 y T98G.
- Determinar la variación en el perfil de moléculas inflamatorias secretadas por células HCMEC/D3 y T98G posterior a la administración de NP88 en condiciones de neuroinflamación *in vitro*.
- Establecer los niveles en la expresión de IL1 $\beta$  y TNF $\alpha$  en células HCMEC/D3 y T98G, posterior a la administración de NP88 *in vitro*.
- Determinar la variación en la producción de superóxido *in vitro* luego de la administración de NP88 sobre las líneas celulares HCMEC/D3 y T98G.

## 4. Materiales y métodos

### 4.1 Obtención de nanopartículas

Previamente, se identificó al péptido-88 como un agente biomarcador de condiciones de neuroinflamación con capacidad de acoplarse a nanopartículas superparamagnéticas y capacidad de dirigirse hacia receptores específicos, con potencial uso biomédico en aplicaciones como IRM (Gaona et al., 2021).

El péptido-88 fue sintetizado por GenScript con una modificación N-terminal conjugada con biotina y posteriormente solubilizado previo a su uso. Las nanopartículas fueron sintetizadas y conjugadas en el Laboratorio de Nanomateriales de la Universidad Antonio Nariño de acuerdo con lo reportado previamente (Gaona et al., 2021).

El presente proyecto es un estudio básico en el que se utilizaron las líneas celulares HCMEC/D3 y T98G para evaluar el efecto de NP88 sobre estas células.

Para desarrollar el primer objetivo: *Evaluar el efecto del péptido-88 acoplado a nanopartículas de USPIO sobre la viabilidad de las líneas celulares HCMEC/D3 y T98G* se utilizó la siguiente metodología:

### 4.2 Cultivo celular.

Se utilizó la línea celular HCMEC/D3, la cual es un modelo de células inmortalizadas de microvasculatura de cerebro humano (CELLutions BIOSYSTEMS INC). Esta línea expresa una variedad de marcadores endoteliales cerebrales, proteínas de unión de adherencia y unión estrecha, así como transportadores ABC funcionales típicos del epitelio cerebral, por lo que HCMEC/D3 representa una línea celular modelo de BHE.

Aproximadamente 10.000 células HCMEC/D3 se cultivaron en monocapa confluyente en placas pre-recubiertas con colágeno I de cola de rata (Life Technologies) a 37 °C, 5% de

CO<sub>2</sub> en medio basal EBM-2 (Lonza) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB, GIBCO), HEPES 10 mM (Dutscher), 1 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (Sigma-Aldrich), hidrocortisona (1,4 µM), ácido ascórbico (5 µg/ml), concentrado lipídico químicamente definido (CONC, Life Technologies) y antibióticos al 1% (penicilina-estreptomicina). Todos los ensayos se realizaron utilizando los pases entre 26 y 32.

La línea celular T98G (ATCC), es un modelo de células inmortalizadas de glioblastoma empleada ampliamente como modelo celular astrocitario. Debido a la importancia de los astrocitos en la homeostasis cerebral, se han convertido en dianas interesantes para el estudio de la neuroinflamación. Aproximadamente 10.000 células T98G, se cultivaron en monocapa confluyente a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>, en medio DMEM suplementado al 5% SFB, y antibiótico al 1% (penicilina-estreptomicina). Para inducir el proceso inflamatorio las células fueron estimuladas añadiendo 20 ng/ml de rhIL1β recombinante humana durante 24 h. NP-P88 se administró a una concentración final de 0,4 µg/mL por pozo.

### **4.3 Ensayo de Lactato deshidrogenasa (LDH)**

El ensayo de LDH está basado en que ésta es una enzima que interviene en reacciones metabólicas que conducen a la obtención de energía y se encuentra en casi todas las células del organismo. Este ensayo cuantifica la actividad de la LDH, la cual reduce NAD a NADH, que luego interactúa con una sonda específica para producir un compuesto coloreado. Para determinar la producción de LDH en las células tratadas se empleó el kit comercial CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay Kit siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Brevemente, se sembraron 20.000 células/pozo en placas de 12 pozos y se incubaron a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Luego, una vez adheridas, se adicionó una suspensión de nanopartículas de óxido de hierro conjugadas con el péptido-88 a una concentración de 4 uM y/o rhIL1β (20 ng/ml) de acuerdo con cada grupo experimental. Para llevar a cabo la reacción de LDH, 45 minutos

antes de completadas las 24 horas, se agregaron 10 uL de agua MILIQ a un conjunto de pozos por triplicado y luego, se agregaron 10uL de buffer lisis 10X. Una vez pasado el tiempo de incubación se transfirieron 50 uL de cada medio de muestra a una placa de 96 pozos manteniendo el mismo orden y se colocaron 50 uL de mezcla de reacción en cada pozo de muestra. Posteriormente, se mezcló e incubó durante 30 minutos en agitación protegido de la luz. Luego, se agregaron 50 uL de solución stop a cada pocillo de muestra y se mezcló nuevamente. Finalmente, la lectura de densidad óptica (DO) se realizó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm y 620 nm. Cada una de las condiciones experimentales fue evaluada por triplicado. La actividad de LDH, se calculó utilizando la siguiente formula:

$$\%Citotoxicidad = \left[ \frac{\text{Actividad de LDH en células tratadas} - \text{Actividad espontánea de LDH}}{\text{Actividad máxima de LDH} - \text{Actividad espontánea de LDH}} \right] \times 100$$

Para desarrollar el segundo objetivo: *Determinar la variación en el perfil de moléculas inflamatorias secretadas por células HCMEC/D3 y T98G posterior a la administración de NP88 en condiciones de neuroinflamación in vitro*, se utilizó la siguiente metodología:

#### **4.4 Citometría de flujo**

Para determinar la variación en el perfil de moléculas inflamatorias se realizó un ensayo multiplex con el panel prediseñado Human Adipokine Panel (Cat. No. 740196, Multi-Analyte Flow Assay Kit - LEGENDplex de la casa comercial BioLegend). Este es un ensayo basado en microesferas codificadas para fluorescencia adecuadas para uso en citometría de flujo y permite la cuantificación simultanea de 13 analitos humanos, de cuales se analizarán solo aquellos relacionados con la respuesta inflamatoria: RBP4, MCP-1, IL1 $\beta$ , IP-10, IL-10, IL-8, IL-6, IFN- $\gamma$ , y TNF- $\alpha$ .

El fundamento de esta técnica está basado en el tamaño e intensidad interna de fluorescencia en cada una de las perlas, las cuales están conjugadas con un anticuerpo

específico y sirven para capturar un analito específico. Para esto, se recolectó el sobrenadante de células derivadas de cada una de las condiciones experimentales. Brevemente, se mezclaron las perlas e incubaron con la muestra a analizar, por lo que cada analito presente se unió a sus respectivas perlas. Posteriormente, se adicionó una mezcla de anticuerpos de detección biotinilados. Cada anticuerpo de detección en la mezcla se une a cada analito previamente unido a las perlas. Por último, se agregó estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE), que se une a los anticuerpos de detección biotinilados. El análisis se realizó en el LEGENDplex™ data analysis software (versión 8.0), y los datos se expresaron como la Intensidad media de fluorescencia del reportero PE (MFI) en función de la concentración (pg/mL), teniendo en cuenta los límites de la curva estándar.

Para desarrollar el tercer objetivo: *Establecer los niveles en la expresión de IL1 $\beta$  y TNF $\alpha$  en células HCMEC/D3 y T98G, posterior a la administración de NP88 in vitro* se desarrolló la siguiente metodología:

Mediante ensayos de PCR en tiempo real se evaluó la expresión de genes asociados a condiciones de neuroinflamación *in vitro* (IL1 $\beta$  y TNF $\alpha$ ) en las líneas celulares HCMEC/D3 y T98G en un modelo de neuroinflamación inducida.

## 4.5 Extracción de RNA

Las células derivadas cada uno de los grupos experimentales fueron homogeneizadas con TRIzol (Invitrogen) e incubadas a temperatura ambiente. Posterior a esto, se adicionó cloroformo frío y se incubaron a temperatura ambiente. La muestra fue centrifugada para obtener 3 fases: fase inferior de fenol cloroformo, fase intermedia blanca de ADN y una fase superior incolora de RNA. La fase superior fue recolectada y precipitada mediante la adición de isopropanol e incubación a temperatura ambiente. La muestra fue centrifugada a temperatura ambiente para obtener RNA en forma de pellet. A

continuación, el pellet fue lavado dos veces con etanol al 75% y resuspendido en agua libre de RNAsas. Luego de este tiempo, se dividió en pequeñas alícuotas de 20  $\mu$ L mantenidas a -70 °C

## 4.6 Transcripción reversa

Las células derivadas cada uno de los grupos experimentales fueron homogeneizadas con TRIzol (Invitrogen) e incubadas a temperatura ambiente. Posterior a esto, se adicionó cloroformo frío y se incubaron a temperatura ambiente. La muestra fue centrifugada para obtener 3 fases: fase inferior de fenol cloroformo, fase intermedia blanca de ADN y una fase superior incolora de RNA. La fase superior fue recolectada y precipitada mediante la adición de isopropanol e incubación a temperatura ambiente. La muestra fue centrifugada a temperatura ambiente para obtener RNA en forma de pellet. A continuación, el pellet fue lavado dos veces con etanol al 75% y resuspendido en agua libre de RNAsas. Luego de este tiempo, se dividió en pequeñas alícuotas de 20  $\mu$ L mantenidas a -70 °C.

El RNA fue cuantificado con espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 teniendo en cuenta la absorbancia de la muestra en una relación de longitud de onda 260/280 nm (la relación A260/A280 para una muestra pura de RNA es 2.0) y 260/230. En adición, la calidad también fue evaluada por medio de electroforesis del RNA mediante el uso de un gel de agarosa 1.2%, en buffer MOPS 1X y formaldehído al 2.2%. La corrida se realizó durante 40 minutos aproximadamente a un voltaje de 100 V para observar los fragmentos obtenidos.

Para la preparación de la muestra se empleó el kit transcriptasa reversa MultiScribe (No. 4368813, Applied biosystems), de acuerdo con las instrucciones del fabricante

Brevemente, se pipetearon 10  $\mu$ L de master mix 2X RT y 10  $\mu$ L de la muestra de RNA (1  $\mu$ g) en tubos individuales. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 25 °C durante 10 minutos, 37 °C durante 120 minutos, 85 °C durante 5 minutos y finalmente 4 °C para almacenar. El volumen final fue de 20  $\mu$ L por tubo.

## 4.7 Análisis de expresión génica

Para evaluar la expresión génica, se realizó PCR en tiempo real para los genes blanco. Para esto, se utilizó el termociclador QuantStudio3 y la mezcla de reacción PowerUp SYBR GREEN (Applied biosystems). Se analizaron como genes constitutivos YWHAZ y PGK, y como genes blanco IL1 $\beta$  y Laminina  $\beta$ 1. Se realizaron 40 ciclos que bajo las siguientes condiciones: iniciación (95 °C durante 10 segundos), desnaturalización (95 °C durante 10 segundos), anillamiento (el tiempo de anillamiento fue estandarizado para cada uno de los primers a emplear), y elongación (70 °C durante 30 segundos). Para finalizar, se determinó la curva Melting con estas temperaturas y una velocidad específica de 0.1 °C/s.

Para cada ensayo de PCR se utilizó un control negativo que consistió en pozos donde el DNAC se reemplaza por agua libre de RNAsas y un control positivo donde el gen esté siendo expresado. La cuantificación relativa de la expresión de mRNA se realizó teniendo en cuenta los niveles de RNA de control interno, por medio del método del  $\Delta\Delta$ Ct (Livak & Schmittgen, 2001).

Finalmente, para desarrollar el cuarto objetivo: *Determinar la variación en la producción de superóxido in vitro luego de la administración de NP88, sobre las líneas celulares HCMEC/D3 y T98G*, se desarrolló la siguiente metodología:

## 4.8 Determinación de la producción de Superóxido.

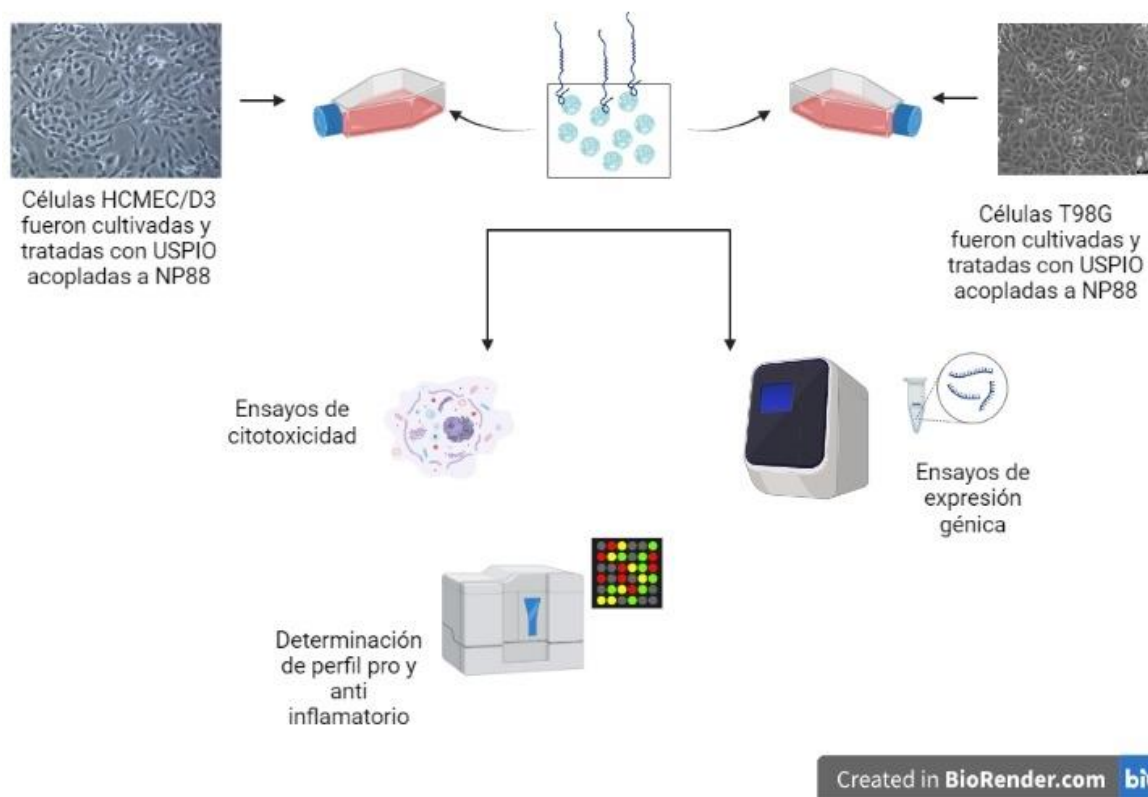
La medición de superóxido se realizó empleando el kit comercial Cellular Superoxid Detection Assay Kit (Abcam). Inicialmente, se sembraron las células sobre placas de cultivo a una confluencia entre 50-70%. Posterior a la adherencia de las células, se incubaron con la solución de tinción de superóxido durante 1 hora. A continuación, se removió la solución y se incubó con las diferentes condiciones experimentales a evaluar. Se utilizó como control positivo piocianina que es una molécula inductora de ROS, este es un alcaloide fenazínico que constituye una de las toxinas producidas y secretadas por *Pseudomonas aeruginosa* (Hall et al., 2016; Tunca Koyun et al., 2022). Como control negativo se utilizó un inhibidor de ROS, N-acetilcisteína (Halasi et al., 2013; Shi et al., 2017). Luego, las células se lavaron con tampón de lavado 1X. Finalmente, la producción del anión superóxido se analizó en un fluorímetro utilizando filtros de emisión/excitación estándar compatibles con rodamina (Ex/Em: 550/620 nm).

La producción de superóxido se encuentra relacionada con estrés oxidativo, el cual se encuentra asociado a procesos inflamatorios y progresión de las enfermedades neurodegenerativas. La reacción catalizada por SOD es extremadamente rápida, y la presencia de cantidades suficientes de enzimas en las células de los tejidos típicamente mantiene la concentración de superóxido muy baja. Por lo tanto la cuantificación de la actividad SOD es esencial para determinar el estrés oxidativo con el kit (Kit de Ensayo SOD de Superóxido Dismutasa, Cayman Chemical – Probiotek, n.d.)

La medición de superóxido se realizó empleando el kit comercial Cellular Superoxid Detection Assay Kit (Abcam). Células HCMEC/D3 y T98G, se incubaron con NPs y NP88. Se utilizó como control positivo piocianina, molécula inductora de ROS, y como control negativo se utilizará un inhibidor de ROS, N-acetilcisteína y la producción del anión superóxido se determinó utilizando el equipo fluorímetro (ACCURI – C-SAMPLER)



El análisis de producción de superóxido permitirá determinar si la administración de NPs y NP88a células HCMEC/D3 y T98G genera o no un aumento en los niveles de superóxido en comparación con el control.

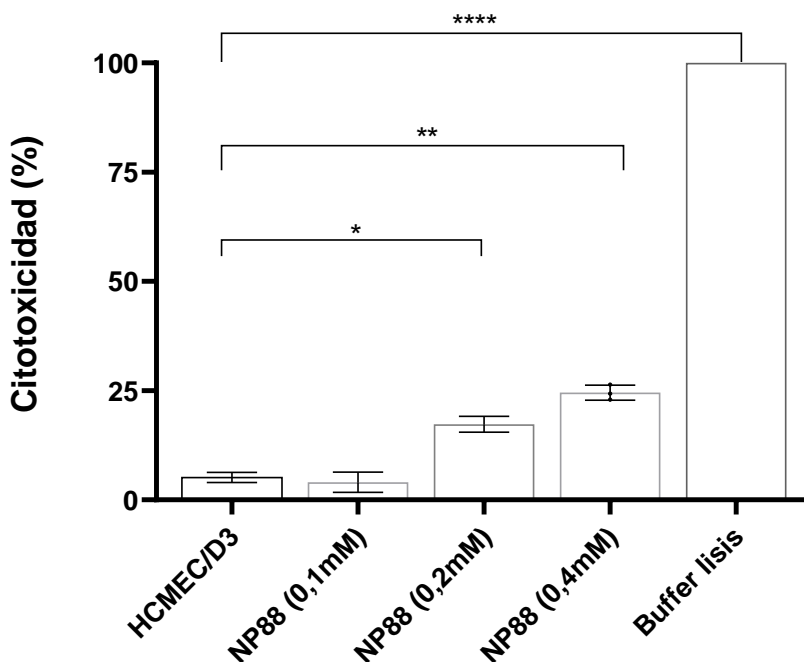


### Metodología abreviada

## 5. Resultados

### 5.1 Ensayo de citotoxicidad

Para evaluar los efectos citotóxicos de NP88, se realizó un ensayo de viabilidad utilizando el kit LDH (lactato deshidrogenasa) en células HCMEC/D3, dado que el ensayo LDH es un método confiable y ampliamente utilizado para evaluar la citotoxicidad celular al medir la liberación de la enzima LDH en el medio de cultivo celular (Gu et al., 2019; F. D. Zhu et al., 2021), permitiendo determinar la integridad de la membrana celular. El objetivo de este ensayo fue determinar el efecto biológico de NP88 sobre la viabilidad celular y determinar la concentración para experimentos posteriores, además de proporcionar información relevante sobre la biocompatibilidad del compuesto. Aproximadamente 10.000 células se incubaron con tres concentraciones diferentes de NP88; 1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M y 4  $\mu$ M por 24 horas (Figura 1).



**Figura 1.** Evaluación de la viabilidad en células HCMEC/D3 mediante el ensayo de LDH. Las células HCMEC fueron incubadas con NP88 en tres concentraciones 1uM, 2uM y 4uM durante 24 horas. Como control positivo se lisaron las células con 10 µL de buffer de lisis 10X y se midieron a 490nm. Los datos presentados como media  $\pm$  desviación estándar ( $n = 3$ )  $\pm$  SEM; SEM: media del error estándar; se realizó un análisis de ANOVA de una vía\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*\*  $p < 0,005$

El ensayo LDH se ha utilizado como un método confiable y ampliamente utilizado para evaluar la citotoxicidad celular al medir la liberación de la enzima LDH en el medio de cultivo celular. Para el presente estudio se emplearon diferentes concentraciones con el fin de determinar si existía un efecto dependiente de la concentración y a su vez, establecer una concentración de trabajo.

Este ensayo, permitió determinar que células HCMEC/D3, incubadas con NP88 durante 24 horas en concentración de 1 uM no aumentaron la mortalidad celular, mientras que las concentraciones de 2 uM y 4 uM mostraron un aumento significativo en relación con pérdida de viabilidad, respecto al grupo control. Estos resultados sugieren que NP88 no estaría generando un efecto citotóxico en la línea celular HCMEC/D3 en concentración de 1 uM, por lo que mediante este ensayo se estableció esta concentración para desarrollar los ensayos posteriores.

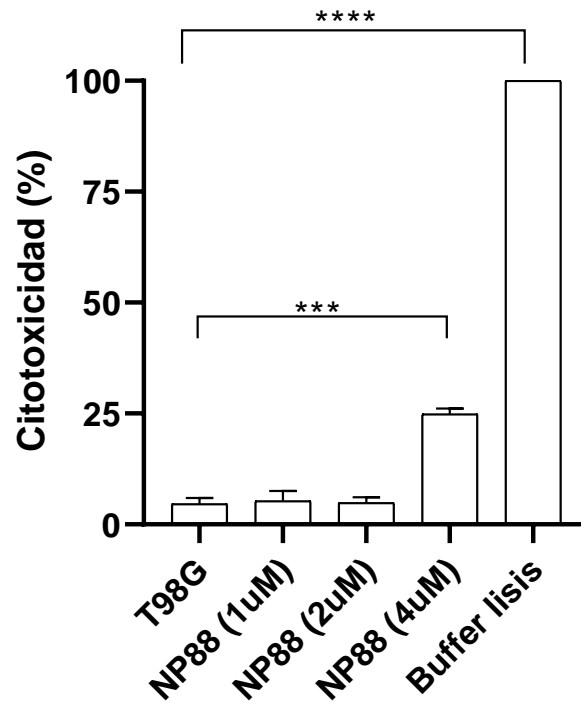


Figura 2. Evaluación de la viabilidad en células T98G mediante el ensayo de LDH. Las células T98G fueron incubadas con NP88 en tres concentraciones 1uM, 2uM y 4uM durante 24 horas. Como control positivo se lisaron las células con 10  $\mu$ L de buffer de lisis 10X y se midieron a 490nm. Los datos presentados como media  $\pm$  desviación estándar ( $n = 3$ )  $\pm$  SEM; SEM: media del error estándar; se realizó un análisis de ANOVA de una vía\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*\*  $p < 0,005$

Posteriormente se realizó este ensayo en células T98G, incubadas con NP88 durante 24 horas en concentración de 1 uM y 2 uM no aumentaron la mortalidad celular, mientras que la concentración de 4 uM mostró un aumento significativo en la mortalidad, respecto al grupo control (Figura 2). Lo que sugiere que NP88 no estaría generando un efecto citotóxico en la línea celular T98G en concentraciones inferiores a 4 uM, permitiendo así definir la concentración de 1 uM como concentración de trabajo. Además, pueden contribuir a una evaluación de la biocompatibilidad de esta sustancia en investigaciones futuras y posibles aplicaciones clínicas.

---

## 5.2 Cuantificación de moléculas proinflamatorias y antiinflamatorias.

Teniendo en cuenta los hallazgos anteriores y con el objetivo de determinar el efecto de NP88 sobre el perfil de moléculas inflamatorias se realizó un experimento utilizando el ensayo multiplex con el panel prediseñado Human Adipokine Panel (Cat. No. 740196, Multi-Analyte Flow Assay Kit - LEGENDplex de la casa comercial BioLegend).

Teniendo en cuenta que las moléculas de la familia IL-1, son moduladores de la inflamación extremadamente potentes, las células T98G y HCMEC/D3 fueron estimuladas con rhIL1 $\beta$  a una concentración de 20 ng/mL durante 5 h, con el fin de inducir un ambiente celular proinflamatorio.

Posteriormente, las células fueron incubadas o no con NP88 durante 24 horas y se cuantificaron las moléculas inflamatorias secretadas mediante citometría de flujo.

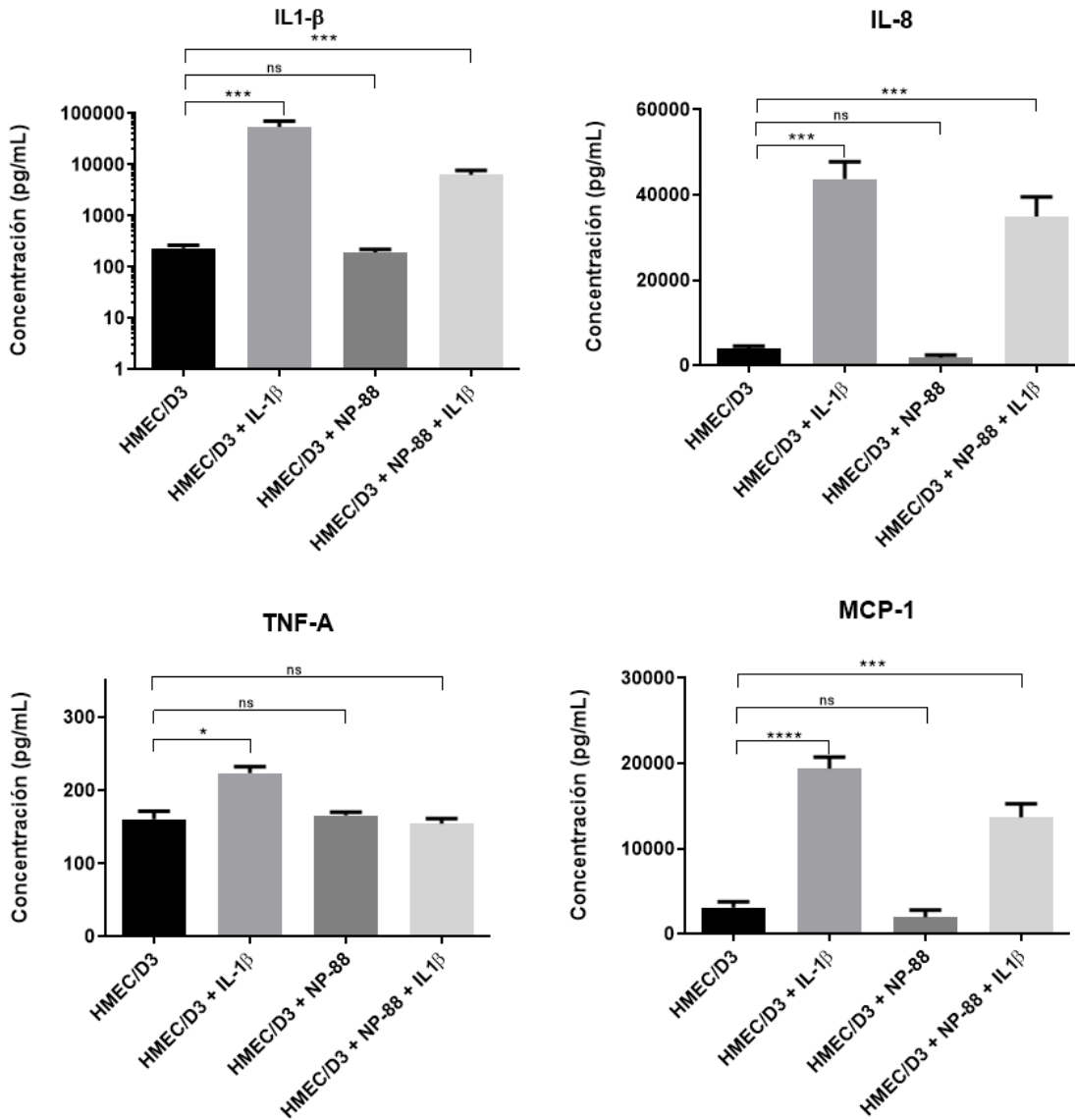


Figura 3. Moléculas pro-inflamatorias secretadas por células HCMEC/D3 estimuladas durante 24 horas con IL1β en presencia o no de NP88. Células HCMEC/D3 estimuladas con rhIL1β durante 24 horas, sin incubación con NP88. Las células HCMEC/D3 fueron estimuladas con rhIL1β a una concentración de 20 ng/mL durante 5 horas y posteriormente, fueron expuestas a NP88 hasta completar las 24 horas de tratamiento. La expresión de moléculas inflamatorias se midió mediante citometría de flujo usando el Human Adipokine Panel (13-plex). Datos presentados como porcentaje de control (n = 3) ± SEM; SEM: media del error estándar; se realizó un análisis de ANOVA de una vía \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,005.

Respecto a la cuantificación de las moléculas proinflamatorias en los diferentes grupos experimentales, se encontró un aumento significativo en la producción de IL1 $\beta$ , IL8, TNF $\alpha$  y MCP-1 luego de la administración de rhIL1 $\beta$  (20 ng/mL), lo que reflejaría la inducción de una respuesta proinflamatoria generada por el estímulo inflamatorio.

La incubación de células HCMEC/D3, con NP88, sin el estímulo inflamatorio, no produjo un aumento significativo en la cuantificación de moléculas proinflamatorias IL1 $\beta$ , IL8, TNF $\alpha$  y MCP-1; lo que sugiere que NP88, por sí mismo, no genera cambios significativos en la respuesta proinflamatoria en estas líneas celulares.

A continuación, células HCMEC/D3 fueron estimuladas con rhIL1 $\beta$  (20 ng/mL) durante 5 horas y posteriormente incubadas con NP88 por 24 horas, en donde se encontró un aumento significativo en la cuantificación de las moléculas proinflamatorias IL1 $\beta$ , IL8, TNF $\alpha$  y MCP-1, bajo estas condiciones experimentales, sin embargo, fue menor respecto a la incubación únicamente con rhIL1 $\beta$ , lo que sugiere que NP88, no genera un aumento en la respuesta proinflamatoria, determinada por la cuantificación de IL1 $\beta$ , IL8, TNF $\alpha$  y MCP-1 y podría atenuar la respuesta inducida por rhIL1 $\beta$ .

Posteriormente, con el fin de identificar la variación en el perfil de moléculas antiinflamatorias, células HCMEC/D3 fueron estimuladas con IL-1 $\beta$  a una concentración de 20 ng/mL durante 5h, simulando un ambiente celular proinflamatorio. A continuación las células fueron incubadas o no con las NP88 hasta completar las 24 horas de tratamiento y se cuantificaron las moléculas antiinflamatorias secretadas luego de la administración del nanoconjugado mediante citometría de flujo utilizando un kit comercial (Human Adipokine Panel Cat. No. 740196, Multi-Analyte Flow Assay Kit - LEGENDplex de la casa comercial BioLegend)

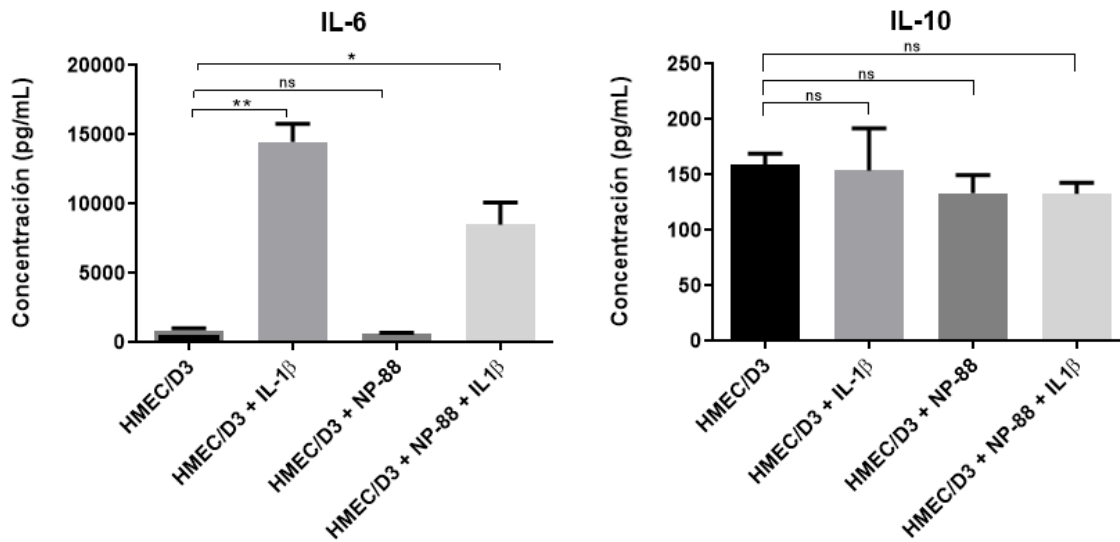


Figura 4. Moléculas antiinflamatorias secretadas por células HCMEC/D3 estimuladas durante 24 horas con IL1β en presencia o no de NP88. Células HCMEC/D3 fueron estimuladas con rhIL1β durante 24 horas, sin incubación con NP88. Las células HCMEC/D3 fueron estimuladas con rhIL1β a una concentración de 20 ng/mL durante 5 horas y posteriormente, fueron expuestas a NP88 hasta completar las 24 horas de tratamiento. La expresión de moléculas inflamatorias se midió mediante citometría de flujo usando el kit Cat. No. 740196 Human Adipokine Panel (13-plex). Datos presentados como porcentaje de control (n = 3) ± SEM; SEM: media del error estándar; se realizó un análisis de ANOVA de una vía \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,005.

Respecto a la cuantificación de las moléculas antiinflamatorias en los diferentes grupos experimentales, se encontró que hubo un aumento significativo en la producción de las moléculas antiinflamatorias IL-10 e IL-6, luego de la administración de rhIL1β (20 ng/mL). Mientras que, la incubación de células HCMEC/D3 con NP88, sin el estímulo inflamatorio, no produjo un aumento significativo en la cuantificación de moléculas antiinflamatorias IL-10 y IL-6; lo que sugiere que NP88, por sí mismo, no genera cambios significativos en la respuesta antiinflamatoria.

A continuación, células HCMEC/D3 fueron estimuladas con rhIL1β (20 ng/mL) durante 5 horas y posteriormente incubadas con NP88 por 24 horas y se encontró que hubo un aumento significativo en la cuantificación de las moléculas antiinflamatorias IL-10 y IL-6



---

bajo estas condiciones experimentales, sin embargo, fue menor respecto a la incubación únicamente con rhIL1 $\beta$ , lo cual, en relación con los hallazgos previos, sugiere que NP88, no genera un aumento en la respuesta antiinflamatoria, determinada por la cuantificación de IL-10 y IL-6 y podría estar atenuando la respuesta inducida por rhIL1 $\beta$ .

Posteriormente, células T98G fueron estimuladas con rhIL1 $\beta$  a una concentración de 20 ng/mL durante 5h, con el fin de inducir un ambiente celular proinflamatorio y posteriormente, las células fueron incubadas o no con NP88 durante 24 horas y se cuantifican las moléculas inflamatorias secretadas luego de la administración del nanoconjugado mediante citometría de flujo utilizando un kit comercial (Human Adipokine Panel Cat. No. 740196, Multi-Analyte Flow Assay Kit - LEGENDplex de la casa comercial BioLegend).

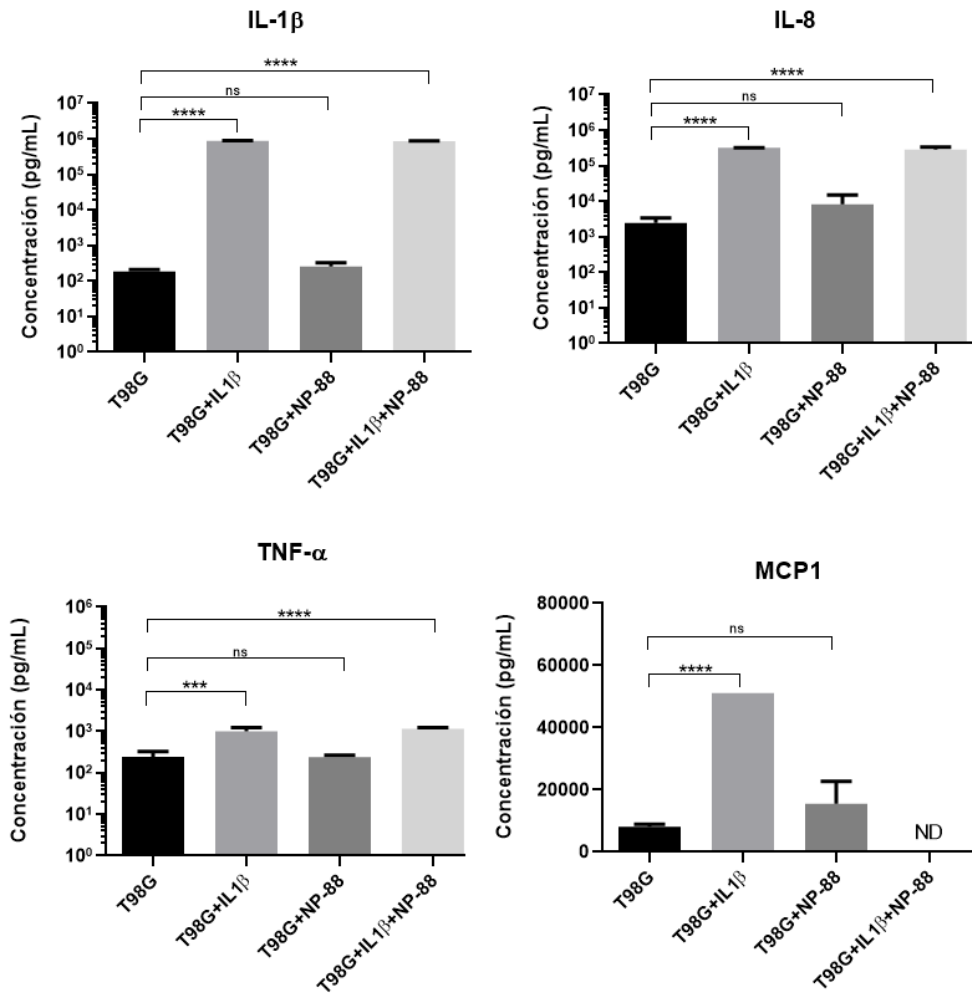


Figura 5. Moléculas proinflamatorias secretadas por células T98G estimuladas durante 24 horas con IL1β en presencia o no de NP88. Células T98G estimuladas con rhIL1β durante 24 horas, sin incubación con NP88. Las células T98G fueron estimuladas con rhIL1β a una concentración de 20 ng/mL durante 5 horas y posteriormente, fueron expuestas a NP88 hasta completar las 24 horas de tratamiento. La expresión de moléculas inflamatorias se midió mediante citometría de flujo usando el kit Cat. No. 740196 Human Adipokine Panel (13-plex). Datos presentados como porcentaje de control (n = 3) ± SEM; SEM: media del error estándar; se realizó un análisis de ANOVA de una vía \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,005.

En la línea celular T98G, la exposición a nanopartículas de óxido de hierro produjo resultados comparables a la línea HCMEC/D3. De tal manera que, NP88 en las concentraciones utilizadas no genera un aumento en la producción de citocinas

proinflamatorias ni antiinflamatorias. Lo anterior sugiere que NP88 no estaría incidiendo sobre la respuesta inflamatoria en los dos grupos celulares a esta concentración. De igual forma, luego de inducir la respuesta inflamatoria con el estímulo, se evidencia que NP88 al administrarse de forma conjunta no aumenta la respuesta inflamatoria.

Respecto a la cuantificación de las moléculas proinflamatorias en los diferentes grupos experimentales, se encontró que hubo un aumento significativo en la producción de IL1 $\beta$ , IL-8, TNF $\alpha$  y MCP-1 luego de la administración de rhIL1 $\beta$  (20 ng/mL), lo que reflejaría la respuesta proinflamatoria generada por el estímulo inflamatorio.

Mientras que, la incubación de células T98G con NP88, sin el estímulo inflamatorio, no produjo un aumento significativo en la cuantificación de moléculas proinflamatorias IL1 $\beta$ , IL-8, TNF $\alpha$  y MCP-1; lo que sugiere que NP88, por sí mismo, no genera cambios significativos en la respuesta proinflamatoria.

A continuación, células T98G fueron estimuladas con rhIL1 $\beta$  (20 ng/mL) durante 5 horas y posteriormente incubadas con NP88 por 24 horas, en donde se encontró que hubo un aumento significativo en la cuantificación de las moléculas proinflamatorias IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF $\alpha$  y MCP-1, bajo estas condiciones experimentales, sin embargo, fue menor respecto a la incubación únicamente con rhIL1 $\beta$ , sugiriendo que NP88, no genera un aumento en la respuesta proinflamatoria, determinada por la cuantificación de IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF $\alpha$  y MCP-1 y podría estar atenuando la respuesta inducida por rhIL1 $\beta$ .

No se determinó MCP-1 en células T98G, estimuladas con rhIL1 $\beta$  (20ng/mL) durante 5 horas y posteriormente incubadas con NP88 por 24 horas.

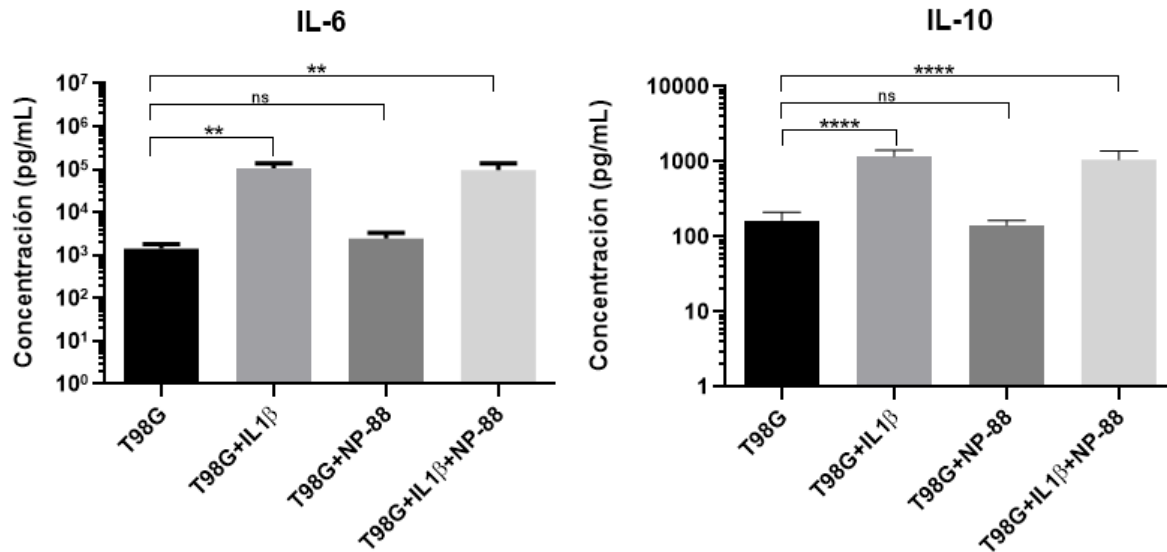


Figura 6. Moléculas antiinflamatorias secretadas por células T98G estimuladas durante 5 horas con IL1 $\beta$  en presencia o no de NP88. Células T98G estimuladas con rhIL1 $\beta$  durante 24 horas, sin incubación con NP88. Las células T98G fueron estimuladas con rhIL1 $\beta$  a una concentración de 20 ng/mL durante 5 horas y posteriormente, fueron expuestas a NP88 hasta completar las 24 horas de tratamiento. La expresión de moléculas inflamatorias se midió mediante citometría de flujo usando el kit Cat. No. 740196 Human Adipokine Panel (13-plex). Datos presentados como porcentaje de control ( n = 3)  $\pm$  SEM; SEM: media del error estándar; ; se realizó un análisis de ANOVA de una vía \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,005.

Los resultados, mostraron un aumento significativo en la producción de IL-6, luego de la administración de rhIL1 $\beta$ , lo que reflejaría la respuesta antiinflamatoria generada por el estímulo empleado. La incubación de células HCMEC/D3 con NP88 no produce un aumento significativo en IL-6; mientras que la incubación simultánea de IL-1 $\beta$  y NP88, si bien muestra un aumento significativo en la producción de IL-6, la concentración es menor en comparación con la administración de IL-6 únicamente.

Respecto a las moléculas antiinflamatorias analizadas, tienen un comportamiento similar en los dos grupos celulares, de tal manera que, se puede concluir que en la concentración empleada, NP88 no genera cambios significativos en la respuesta inflamatoria de los grupos celulares HCMEC/D3 y T98G, en las condiciones

experimentales utilizadas. Datos observados luego de 24 horas de exposición, reflejarían que durante este intervalo de tiempo no hay alteraciones significativas en la respuesta inflamatoria inducidas por la presencia de NP88 en las diferentes condiciones experimentales.

### **5.3 Producción de IL1 $\beta$ y Laminina $\beta$ 1**

Posteriormente, teniendo en cuenta los hallazgos anteriores y conociendo que IL-1 $\beta$  desempeña funciones clave en el proceso inflamatorio, se evaluó la expresión génica de IL-1 $\beta$  en las diferentes condiciones experimentales utilizando el termociclador QuantStudio3 y la mezcla de reacción PowerUp SYBR GREEN (Applied biosystems).

Teniendo en cuenta que en estudios previos, se identificó que el péptido88 interactuaba con Laminina- $\beta$ 1 en condiciones de neuroinflamación, se evaluó si la expresión relativa de esta proteína se modificaba bajo las condiciones experimentales descrita en las dos líneas celulares empleadas (Gaona et al., 2021b).

Por lo tanto, células HCMEC/D3 fueron estimuladas con rhIL1 $\beta$  a una concentración de 20 ng/mL durante 5h, con el fin de inducir un ambiente celular proinflamatorio y posteriormente, las células fueron incubadas o no con NP88 hasta completar las 24 horas de tratamiento.

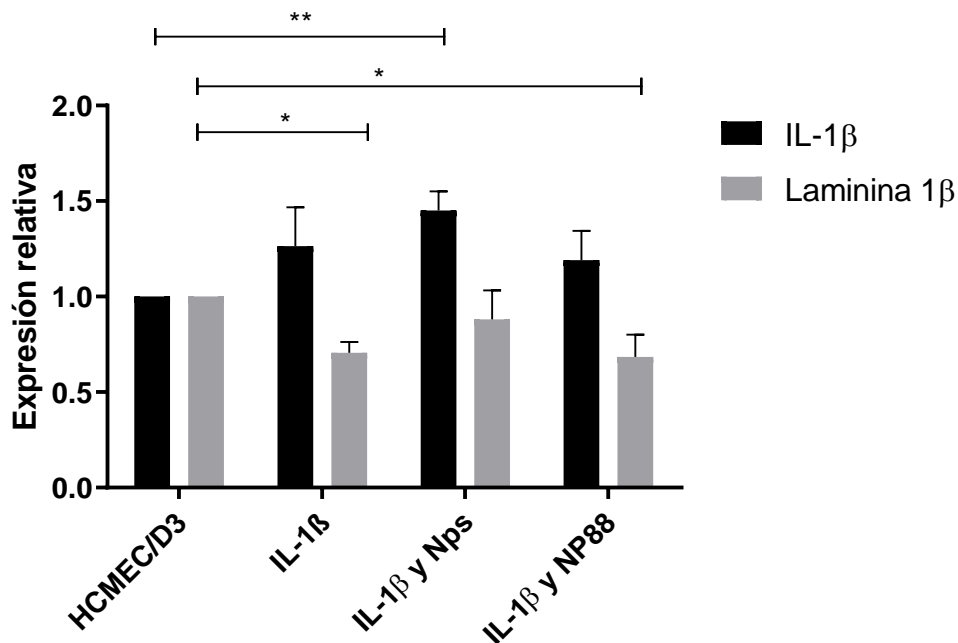


Figura 7. Expresión relativa de IL1 $\beta$  y laminina  $\beta$ 1 en células HCMEC/D3 estimuladas durante 5 horas con IL1 $\beta$  en presencia o no de NP88. . Células HCMEC/D3 fueron estimuladas con rhIL1 $\beta$  durante 24 horas, sin incubación con NP88. Las células HCMEC/D3 fueron estimuladas con rhIL1 $\beta$  a una concentración de 20 ng/mL durante 5 horas y posteriormente, fueron expuestas a NP88 hasta completar las 24 horas de tratamiento. Los datos fueron obtenidos utilizando el termociclador QuantStudio3 y la mezcla de reacción PowerUp SYBR GREEN (Applied biosystems). Datos presentados como porcentaje de control ( n = 3)  $\pm$  SEM; SEM: media del error estándar; ; se realizó un análisis de ANOVA de una vía \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,005.

Los resultados en la línea celular HCMEC/D3, mostraron un aumento significativo en la expresión relativa de IL1 $\beta$ , luego de la estimulación con 50 mg/mL durante 5 horas de rhIL1 $\beta$ , lo que refleja la respuesta generada por el estímulo inflamatorio.

Las células HCMEC/D3 fueron tratadas con 50 mg/mL durante 5 horas y posteriormente incubadas con 0,1  $\mu$ M de NPs hasta completar las 24 horas. Se determinó un aumento significativo en la expresión relativa de IL1 $\beta$ , mayor a la evidenciada únicamente con el estímulo inflamatorio.

Células HCMEC/D3 tratadas con 50 mg/mL durante 5 horas y posteriormente incubadas con 0,1 uM de NP88 hasta completar las 24 horas, mostraron un aumento significativo en la expresión relativa de IL1 $\beta$ , similar a la evidenciada con el tratamiento únicamente con IL1  $\beta$ , lo que sugiere que NP88 no genera un aumento significativo en la expresión relativa de IL1  $\beta$  bajo las condiciones experimentales descritas.

Respecto a la expresión relativa de Laminina1 $\beta$  en células HCMEC/D3, se evidenció que luego del tratamiento con 50 mg/mL de IL-1 $\beta$  durante 24 horas, no hay cambios significativos en la expresión. Células HCMEC/D3 tratadas con IL-1 $\beta$  y NP88 tampoco mostraron diferencias significativas luego del tratamiento descrito previamente.

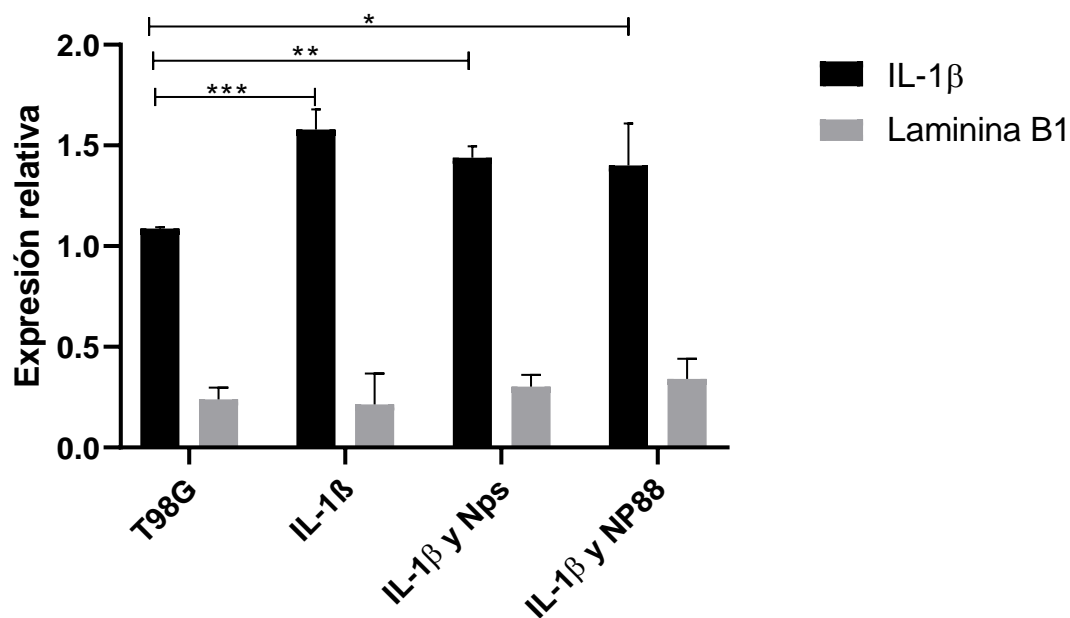


Figura 8. Expresión relativa de IL1 $\beta$  y laminina  $\beta$ 1 en células T98G estimuladas durante 5 horas con IL1 $\beta$  en presencia o no de NP88. Células T98G fueron estimuladas con rhIL1 $\beta$  durante 24 horas, sin incubación con NP88. Las células T98G fueron estimuladas con rhIL1 $\beta$  a una concentración de 20 ng/mL durante 5 horas y posteriormente, fueron expuestas a NP88 hasta completar las 24 horas de tratamiento. Los datos fueron obtenidos utilizando el termociclador QuantStudio3 y la mezcla de reacción PowerUp SYBR GREEN (Applied biosystems). Datos

presentados como porcentaje de control ( $n = 3$ )  $\pm$  SEM; SEM: media del error estándar; se realizó un análisis de ANOVA de una vía \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,005$ .

Los resultados en la línea celular T98G mostraron un aumento significativo en la expresión relativa de IL1 $\beta$ , luego de la estimulación con 50 mg/mL durante 5 horas de rhIL1 $\beta$ , lo que refleja la respuesta generada por el estímulo inflamatorio.

Las células T98G fueron tratadas con 50 mg/mL durante 5 horas y posteriormente incubadas con 0,1  $\mu$ M de NPs hasta completar las 24 horas, mostraron un aumento significativo en la expresión relativa de IL-1 $\beta$  respecto al grupo control similar a la evidenciada con el tratamiento únicamente con IL-1 $\beta$ , lo que sugiere que NP88 no genera un aumento significativo diferencial en la expresión relativa de IL-1 $\beta$  las condiciones experimentales descritas.

Respecto a la expresión relativa de Laminina-1 $\beta$  en células T98G, se evidenció que luego del tratamiento con 50 mg/mL de IL-1 $\beta$  durante 24 horas, no hay cambios significativos en la expresión. Células T98G tratadas con IL1 $\beta$  y NP88 tampoco mostraron diferencias significativas luego del tratamiento descrito previamente.

Con base a los resultados obtenidos, se puede determinar que en la línea celular HCMEC/D3 y T98G, el tratamiento con NPs o NP88 no genera un aumento significativo en la expresión relativa de IL-1 $\beta$ , ni de Laminina  $\beta$ 1.



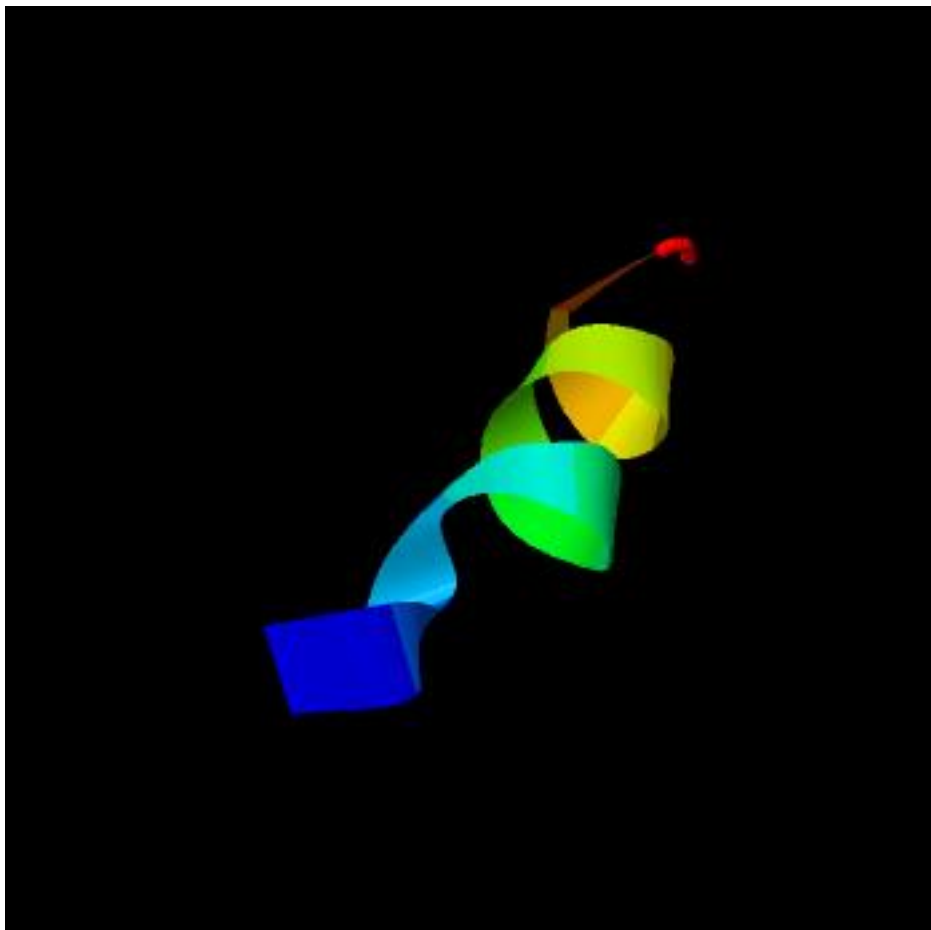


Figura 9. Modelo predictivo del péptido-88 generado por el software I-TASSER.

Mediante la predicción de la estructura del péptido88, mediante la herramienta bioinformática I-TASSER, con una puntuación C = -0.84 en donde se representa la secuencia del péptido de 12 aminoácidos (TPMMPETSQRFK), con una modificación N-Terminal conjugada a biotina. Este análisis determinó 10 proteínas principales del PDB (Protein Data Bank) que tienen la similitud estructural más cercana, es decir, la puntuación TM más alta, con el modelo I-TASSER predicho.

Teniendo en cuenta las tres proteínas principales con similitud al péptido-88, la proteína 3BZW (lipasa de *Bacteroides thetaiotaomicron*), 3GKQ (Oxigenasa terminal de carbazol 1,9a-dioxigenasa de *Novosphingobium*) y 2KP7 (Solución Estructura de RMN del Mus81 N-terminal HhH)

La línea celular HCMEC/D3 expresa la mayoría de los transportadores y receptores expresados *in vivo* en la BHE humana, incluidos MDR1, BCRP, MRP4, receptor de transferrina, receptor de insulina, Glut-1 Y enzimas metabolizadoras.

De igual manera, se realizó un Docking Molecular para determinar si el péptido-88 podría interactuar con el receptor de IL-1 $\beta$  y la proteína laminina. El péptido se modeló utilizando el software Avogadro, en el cual se introdujo la secuencia peptídica y se optimizó la estructura utilizando el campo de fuerza UFF. Posteriormente, utilizando el software libre SwissModel, se realizó el docking molecular utilizando las estructuras extraídas del PDB. Para el caso del receptor de IL-1 $\beta$  se obtuvo la estructura (3O4O - Crystal structure of an Interleukin-1 receptor complex) y para la Laminina (1H30 C-terminal LG domain pair of human Gas6). Se determinó que este péptido puede interactuar con estos dos target, sugiriendo, al menos en la evaluación *in silico*, una interacción que podría explicar los fenómenos observados.

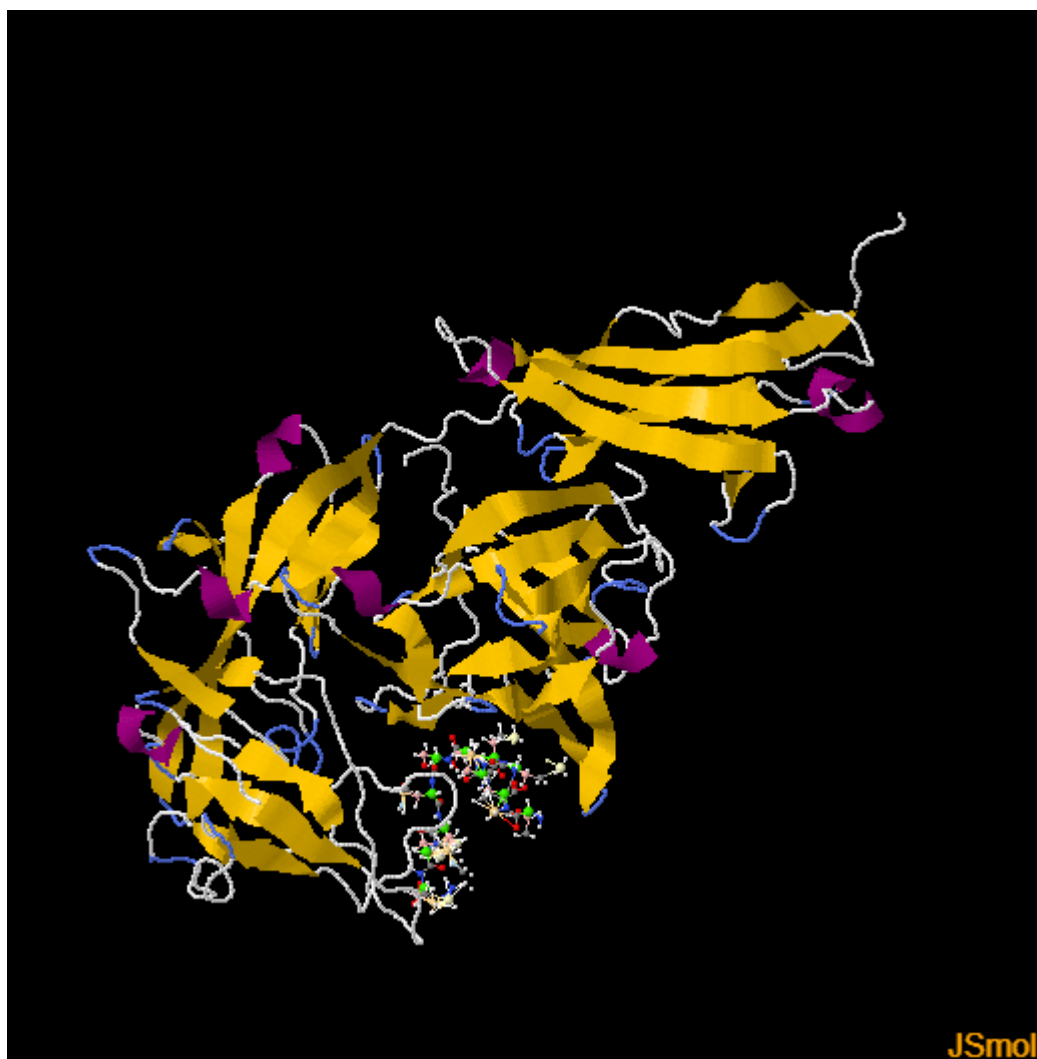


Figura 10. Interacción del péptido 88 con el receptor de IL-1 $\beta$

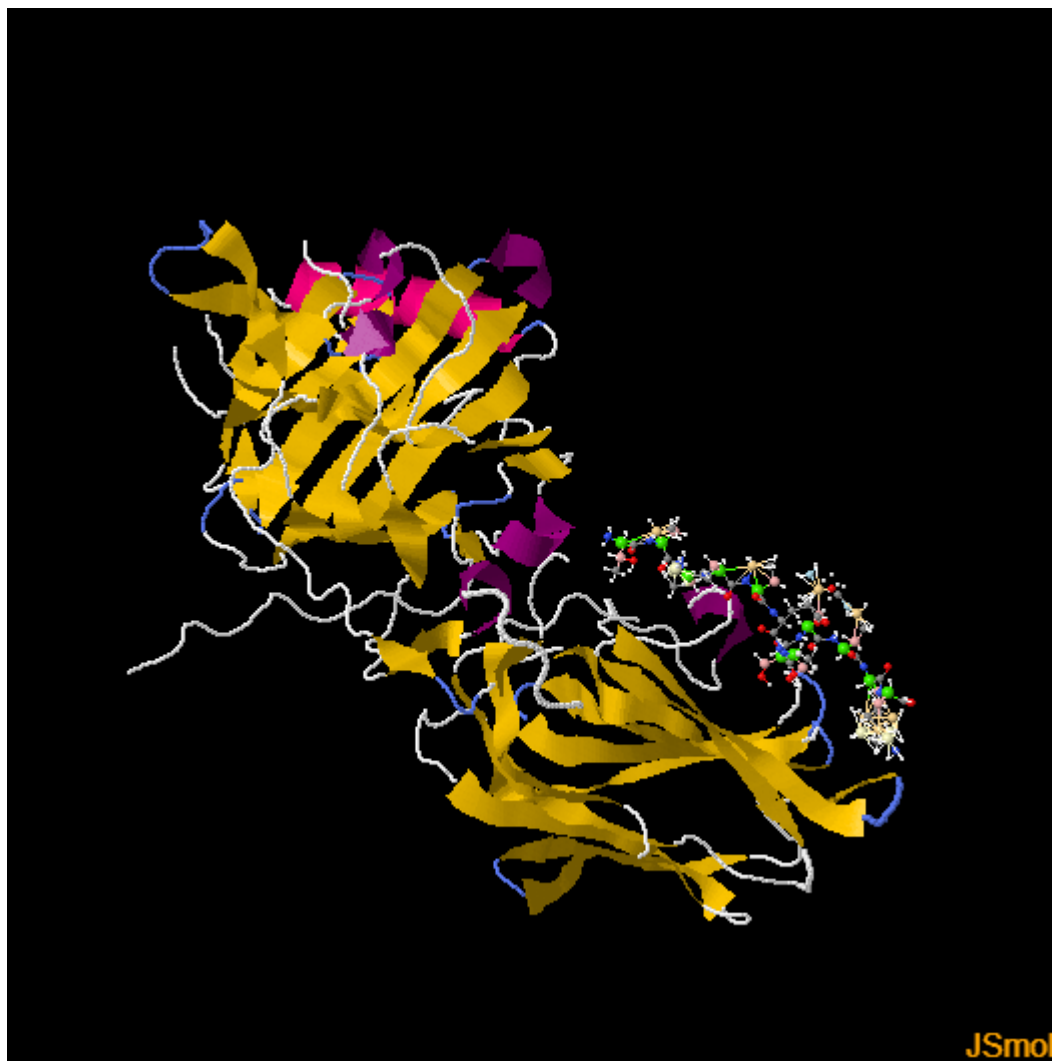


Figura 11. Interacción del péptido-88 con la laminina

## 6 Producción de superóxido

No fue posible desarrollar el ensayo de superóxido en esta investigación ya que, en la citometría de flujo, las nanopartículas dispersaron la lectura del ensayo, provocando una imagen distorsionada. Ante esta situación, se planteó la realización de un ensayo posterior utilizando inmunofluorescencia. Sin embargo, no fue posible llevar a cabo este ensayo, por no tener acceso a las instalaciones del laboratorio, ni al material de trabajo.

## 6. Discusión de resultados

Los péptidos acoplados a nanopartículas han sido sugeridos como herramientas con aplicaciones biomédicas en lo relacionado con tratamiento, prevención y diagnóstico de enfermedades neurológicas (Duan et al., 2023; Kang et al., 2018). Sin embargo, aún no se ha descrito completamente como facilitar que las nanopartículas lleguen al sitio de interés, disminuir el efecto citotóxico de estas nanopartículas y favorecer el efecto terapéutico esperado (Dan et al., 2013; Duan et al., 2023; Kang et al., 2018).

Con base en lo anterior, el presente estudio evaluó el efecto de las nanopartículas sobre la viabilidad, la evaluación del perfil inflamatorio y cambios en la expresión de genes asociados a inflamación, en dos líneas celulares: HCMEC/D3, con el propósito de modelar la BHE y la línea celular T98G para modelar células cerebrales siendo una línea celular de astrocitos, dado que, estas células secretan altas cantidades de laminina en un contexto de lesión cerebral. (Biswas et al., 2017; Chiu et al., 1991; Coccini et al., 2017)

Inicialmente, se evaluó el efecto citotóxico de NP88, sobre la viabilidad de las dos líneas celulares mencionadas anteriormente, encontrando que el tratamiento con NP88 a una concentración de 0,1 $\mu$ M no induce una pérdida de viabilidad. Lo anterior, está en concordancia con estudios realizados por Keenan et al, en donde establecieron que las nanopartículas de óxido de hierro no generan efectos citotóxicos a dosis bajas de 1-50ng/mL (Keenan et al., 2009). Hao Wei et al, demostró que las nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético (SPION) con diferentes características físico-químicas son tóxicas para las células en una concentración superior a 50 ng/mL. (Wei et al., 2021). Carla Costa et al, evaluó la citotoxicidad de dos nanopartículas de óxido de hierro recubiertas con sílice y ácido oleico y encontró que no inducían una muerte celular significativa en concentraciones de hasta 100  $\mu$ g/mL (Costa et al., 2016)

Los resultados encontrados también son consistentes con lo descrito por Gojova et al, en donde los investigadores examinaron la citotoxicidad de las nanopartículas compuestas de óxido de hierro en la línea celular HUVEC y se evidenció un efecto citotóxico en concentraciones superiores a 100 µg/ml, mientras que las concentraciones por debajo de este umbral no indujeron ningún impacto negativo en las células.

Otros estudios evaluaron citotoxicidad de nanopartículas de óxido de hierro en diferentes líneas celulares en donde no se evidenció pérdida de viabilidad. Diferentes estudios han sugerido que una de las principales limitantes del uso de nanopartículas es que pueden generar una ruptura de la membrana celular en concentraciones altas, alterando las propiedades fisicoquímicas del microambiente celular, aumento del estrés oxidativo, la inflamación, el daño al DNA y la muerte celular, estos efectos se observan dependiendo de la composición de la nanopartícula, del recubrimiento de la misma, del tiempo de exposición y de la concentración. (Islam et al., 2021). Sin embargo, dichos efectos no se observan en concentraciones menores a 50ng/mL (Fuster et al., 2020) (Gojova et al., 2007; Patil et al., 2018). Sugiriendo que estas nanopartículas no tienen un efecto deletéreo sobre las células bajo las condiciones experimentales descritas.

Es importante resaltar que muchas secuencias de péptidos, pueden inducir la ruptura de la membrana celular al promover la absorción de las nanopartículas, sin embargo, dados los resultados obtenidos con LDH se puede sugerir que NP88 no induce una ruptura de la membrana celular(Gunay et al., 2022; Weksler et al., 2013). Además, dada la similitud con otras proteínas descritas las cuales se ha reportado que no generan daños en la membrana celular(Gunay et al., 2022).

Estudios realizados por Wu et al, determinaron que Las nanopartículas de óxido de hierro inducen la permeabilidad de las células endoteliales microvasculares humanas a través de la producción de especies reactivas de oxígeno y el aumento en la permeabilidad de las células endoteliales, por lo que se conoce que las nanopartículas pueden atravesar la

monocapa endotelial por este mecanismo (Wu et al., 2013). Asimismo, Angela et al, investigaron la captación y la transcitosis de nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas funcionalizadas en un modelo de BHE *in vitro* utilizando células HCMEC/D3. Los resultados mostraron que las células absorbieron las nanopartículas y las atravesaron la membrana celular (Ivask et al., 2017). Otros autores, han descrito la endocitosis de las nanopartículas por medio de la interacción con otras proteínas de adhesión celular como caveolina-1 y CDC42.

Es probable que las células HCMEC y T98G pueden someter a endocitosis a las nanopartículas de óxido de hierro, pero el alcance y el mecanismo de la endocitosis no se ha descrito detalladamente (y no se realizó en este trabajo) ya que dependen de otros factores específicos del nanoconjugado, así como sus propiedades fisicoquímicas.

Respecto a la fagocitosis de nanopartículas por parte de los monocitos también puede conducir a la activación de respuestas de estrés oxidativo, particularmente en concentraciones superiores a 100 µg/mL, lo que estaría en concordancia con los hallazgos del presente estudio (M. T. Zhu et al., 2011).

Otro aspecto que podría incidir sobre la citotoxicidad de NP88, es el aumento de la hidrofobicidad de la estructura peptídica, lo que podría disminuir el tiempo de agregación e incidir sobre la integridad de la membrana celular (Annarapu & Nanda, 2009; Fujiwara et al., 2012; Lhor et al., 2014; C. Zhu et al., 2016) La hidrofobicidad de la estructura de un péptido está determinada por la presencia de ciertos aminoácidos y la conformación general del péptido. Los aminoácidos fenilalanina y tirosina, de naturaleza hidrofóbica, podría incidir sobre la integridad de la membrana, sin embargo, teniendo en cuenta la secuencia de aminoácidos y las predicciones de la estructura del péptido mediante bioinformática, en general se podría sugerir que el péptido posee un comportamiento hidrofílico, explicando los hallazgos en el presente trabajo (Annarapu & Nanda, 2009; Fujiwara et al., 2012; Lhor et al., 2014)

Se ha descrito la neuroinflamación en diversas enfermedades neurológicas, por lo que, con el objetivo de simular un ambiente inflamatorio, células HCMEC/D3 y T98G, fueron estimuladas con IL1 $\beta$ , siendo esta una potente citoquina proinflamatoria producida por diferentes líneas celulares y desempeñan un papel fundamental en la progresión de la inflamación (Gunay et al., 2022; Lopez-Castejon & Brough, 2011). IL1 $\beta$  es un mediador inflamatorio, genera cambios que pueden ser medidos mediante la expresión de proteínas diferenciales en contextos neuroinflamatorios, dado que durante las muchas enfermedades neurodegenerativas ocurren procesos inflamatorios asociados, se utilizó IL1 $\beta$  como un inductor de inflamación en las dos líneas celulares ((Lopez-Castejon & Brough, 2011; Vargas-Sanchez et al., 2016)

Los resultados mostraron que para la línea celular HCMEC/D3, el tratamiento con IL1 $\beta$ , como se espera, incrementó la secreción de las moléculas inflamatorias TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$ , MCP1 Y IL8, siendo este resultado similar para las dos líneas celulares. Por lo que se sugiere que en efecto, se logró simular un fenotipo inflamatorio, teniendo en cuenta lo anterior, se procedió a evaluar el efecto de NP88 sobre el perfil inflamatorio bajo dos condiciones, en primer lugar, en un modelo libre de estímulo inflamatorio y segundo con un estímulo inflamatorio. Con respecto al primer escenario, se determinó que NP88 no induce cambios con respecto al control en la liberación de moléculas inflamatorias y bajo condiciones de inflamación (previo tratamiento de las células con IL1 $\beta$ ) y posterior tratamiento con NP88 se encontró una disminución en las moléculas evaluadas. Con base en los anteriores resultados, se sugiere que el nanoconjugado tiene la capacidad de reducir la secreción de estas moléculas bajo condiciones inflamatorias sin exacerbar dicha respuesta. Estos resultados están en concordancia con estudios previos (Huang et al., 2015; Liu et al., 2022; Wu et al., 2013; F. D. Zhu et al., 2021). Estos resultados sugieren que la composición específica de las nanopartículas de óxido de hierro tienen un papel importante en la determinación de su potencial citotóxico, destacando su potencial para aplicaciones biomédicas con una cuidadosa consideración de la dosis (Gojova et al., 2007).



Posteriormente, se cuantificó la secreción de moléculas proinflamatorias, en las líneas celulares HCMEC/D3 y T98G, en donde se obtuvo como resultado, un aumento en la producción de TNF- $\alpha$ , MCP1, IL8 e IL1 $\beta$ , posterior a la estimulación con IL1 $\beta$  y en presencia o no de NP88, en donde se pudo observar que NP88 no generó cambios en la respuesta inflamatoria desencadenada por IL1 $\beta$ , lo que sugiere que NP88 se podría administrar de forma segura bajo las condiciones experimentales descritas en esta investigación.

Un estudio mostró que las nanopartículas de óxido de hierro suprimen la producción de TNF- $\alpha$  por la microglía bajo un estímulo inflamatorio, otro estudio demostró que las nanopartículas de óxido de hierro inhiben el crecimiento tumoral al inducir la polarización de macrófagos proinflamatorios en los tejidos tumorales (Wu et al., 2013). Sin embargo, estos estudios no investigaron específicamente los efectos de las nanopartículas de óxido de hierro sobre el TNF $\alpha$  en células HCMEC o T98G. Un estudio evaluó la captación y el transporte de nanopartículas de óxido de hierro de superficie modificada por células endoteliales derivadas de humanos, pero no se observó flujo de nanopartículas a través de las células (Guigou et al., 2021; Kenzaoui et al., 2012; Wu et al., 2013). Por lo tanto, se puede sugerir que NP88 no generaría un aumento en TNF $\alpha$ , aunque sus efectos específicos sobre las líneas celulares no se han descrito específicamente.

En cuanto a la producción de IL-8, los resultados, mostraron un aumento significativo en su producción luego de la administración de IL1 $\beta$ , lo que reflejaría la inducción de la neuroinflamación simulada y el posterior aumento de IL-8. La incubación de células HCMEC/D3 y NP88 no produce un aumento significativo en IL-8 en concordancia con lo descrito en la literatura (Saafane & Girard, 2022), mientras que la incubación simultánea de IL1 $\beta$  y NP88, si bien muestran un aumento significativo en la producción de IL1 $\beta$ , la concentración es menor en comparación con la administración de IL1 $\beta$ .

Diversos estudios sugieren que las nanopartículas de óxido de hierro, podrían inducir un aumento al favorecer la polarización de macrófagos presentes en la respuesta inflamatoria. Si bien, estos estudios no relacionan directamente el efecto que causan las nanopartículas, si podría incidir de forma indirecta sobre el aumento en MCP1 (Israel et al., 2020; Zanganeh et al., 2016). Janik Olchawa et al, en un estudio sobre la influencia del tamaño del núcleo de las nanopartículas de óxido de hierro, en su biocompatibilidad y actividad en modelos celulares *in vitro* encontró que la eficiencia de movimiento a través de la membrana celular de las células T98G aumentó en presencia de nanopartículas de óxido de hierro (Janik-Olchawa et al., 2013 C.E.).

Según estudios previos, se ha descrito que las nanopartículas de óxido de hierro, inducen la secreción de citocinas de manera dependiente de la dosis. La secreción de IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-8 se correlacionó con la activación de la respuesta inflamatoria inducida por nanopartículas, en concentraciones superiores a 50  $\mu$ g/ml. Adicionalmente, las nanopartículas de óxido de hierro también inciden sobre la producción de moléculas antiinflamatorias como IL6; por lo que el efecto observado en la disminución de la cuantificación de moléculas inflamatorias en células HCMEC/D3 y T98G en presencia de nanopartículas presenten valores menores a los observados únicamente con el estímulo inflamatorio con IL1 $\beta$ .

Previamente, se ha descrito que il6 incide sobre Laminina $\beta$ 1, dado que regula la producción de laminina y proteínas inflamatorias en células endoteliales vasculares, estos hallazgos sugieren que il6 pueden aumentar la producción de laminina afectando la respuesta inflamatoria (Wolf-Grosse et al., 2017). Teniendo en cuenta, que ya se ha descrito que la inflamación modula la expresión de laminina en el sistema nervioso central después de una lesión isquémica (Ji & Tsirka, 2012).

Otro estudio mostró que las citocinas regulan la adhesión microglial a la laminina y la matriz extracelular de astrocitos. Sin embargo, no existe evidencia directa que relacione

el aumento de citocinas proinflamatorias con cambios en la expresión de laminina. Si bien algunos estudios han implicado que las citocinas proinflamatorias ejercen efectos importantes con respecto a diversas enfermedades neuroinflamatorias, la evidencia científica no es consistente sobre estos hallazgos(Ji & Tsirka, 2012; Wolf-Grosse et al., 2017)(Ghasempour et al., 2015).

Con base a lo anterior, el estudio realizado por Jeong et al. Muestra resultados relacionados con el fenómeno descrito previamente, en el cual proponen un mecanismo a través del cual, las nanopartículas de hierro inciden sobre la activación de moléculas de adhesión celular. Esta activación puede ser responsable de la disminución observada en la citotoxicidad. Además, los ensayos realizados por Jeong et al. demostraron que las nanopartículas de óxido de hierro inducen la expresión de proteínas marcadoras neuronales específicas tales como, laminina $\beta$ 1 y proteínas de adhesión celular en comparación con las células no tratadas (Kim et al., 2011)

## 7. Conclusiones y recomendaciones

- Los resultados de esta investigación demuestran que el péptido evaluado no presenta citotoxicidad ni desencadena una respuesta inflamatoria significativa a una dosis de 0,1ug/mL
- Estos hallazgos de esta investigación sugieren que NP88 es biocompatible en las líneas celulares HCMEC/D3 y T98G; y se podría utilizar potencialmente como biomarcador en modelos de neuroinflamación.

### Recomendaciones

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se considera que futuros ensayos deberían desarrollar ensayos *in vivo*, con el fin de caracterizar y definir su biocompatibilidad y la viabilidad de uso como biomarcador y posteriormente, empleando la técnica de resonancia magnética de imagen determinar que NP88 refleje neuroinflamación, que es el objetivo de interés.

## 8. Bibliografía

- Afonina, I. S., Müller, C., Martin, S. J., & Beyaert, R. (2015). Proteolytic Processing of Interleukin-1. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1352, 1–12. <https://doi.org/10.1111/nyas.12711>
- Annarapu, S., & Nanda, V. (2009). Mirrors in the PDB: Left-handed  $\alpha$ -turns guide design with D-amino acids. *BMC Structural Biology*, 9. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-9-61>
- Ben Haim, L., & Rowitch, D. H. (2016). Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. *Nature Reviews Neuroscience* 2016 18:1, 18(1), 31–41. <https://doi.org/10.1038/NRN.2016.159>
- Biswas, S., Bachay, G., Chu, J., Hunter, D. D., & Brunken, W. J. (2017). Laminin-Dependent Interaction between Astrocytes and Microglia: A Role in Retinal Angiogenesis. *The American Journal of Pathology*, 187(9), 2112. <https://doi.org/10.1016/J.AJP.2017.05.016>
- Chiu, A. Y., Espinosa De Los Monteros, A., Cole, R. A., Loera, S., & De Vellis, J. (1991). Laminin and s-laminin are produced and released by astrocytes, schwann cells, and schwannomas in culture. *Glia*, 4(1), 11–24. <https://doi.org/10.1002/GLIA.440040103>
- Choublier, N., Taghi, M., Menet, M. C., Le Gall, M., Bruce, J., Chafey, P., Guillonnet, F., Moreau, A., Denizot, C., Parmentier, Y., Nakib, S., Borderie, D., Bouzinba-Segard, H., Couraud, P. O., Bourdoulous, S., & Declèves, X. (2022). Exposure of human cerebral microvascular endothelial cells hCMEC/D3 to laminar shear stress induces vascular protective responses. *Fluids and Barriers of the CNS*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/S12987-022-00344-W>
- Coccini, T., Caloni, F., Ramírez Cando, L. J., & De Simone, U. (2017). Cytotoxicity and proliferative capacity impairment induced on human brain cell cultures after short- and long-term exposure to magnetite nanoparticles. *Journal of Applied Toxicology*, 37(3), 361–373. <https://doi.org/10.1002/JAT.3367>
- Costa, C., Brandão, F., Bessa, M. J., Costa, S., Valdiglesias, V., Kiliç, G., Fernández-Bertólez, N., Quaresma, P., Pereira, E., Pásaro, E., Laffon, B., & Teixeira, J. P. (2016). In vitro cytotoxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles on neuronal and glial cells. Evaluation of nanoparticle interference with viability tests. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 36(3), 361–372. <https://doi.org/10.1002/JAT.3213>
- Dan, M., Cochran, D. B., Yokel, R. A., & Dziubla, T. D. (2013). Binding, Transcytosis and Biodistribution of Anti-PECAM-1 Iron Oxide Nanoparticles for Brain-Targeted Delivery. *PLoS ONE*, 8(11), 81051. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0081051>
- Duan, L., Li, X., Ji, R., Hao, Z., Kong, M., Wen, X., Guan, F., & Ma, S. (2023). Nanoparticle-Based Drug Delivery Systems: An Inspiring Therapeutic Strategy for Neurodegenerative Diseases. *Polymers* 2023, Vol. 15, Page 2196, 15(9), 2196. <https://doi.org/10.3390/POLYM15092196>
- Fujiwara, K., Toda, H., & Ikeguchi, M. (2012). Dependence of  $\alpha$ -helical and  $\beta$ -sheet amino acid propensities on the overall protein fold type. *BMC Structural Biology*, 12. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-12-18>
- Fuster, E., Candela, H., Estévez, J., Arias, A. J., Vilanova, E., & Sogorb, M. A. (2020). Effects of silver nanoparticles on T98G human glioblastoma cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 404(July), 115178. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.115178>
- Gaona, I. M. S., Castillo, Y. M., Losada-Barragán, M., Sanchez, K. V., Rincón, J., Vargas, C. A. P., & Pérez, D. L. (2021a). Characterization of Zero-Valent Iron Nanoparticles Functionalized with a Biomarker Peptide. *Materials Research*, 24(5), e20200599. <https://doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2020-0599>

2020-0599

- Gaona, I. M. S., Castillo, Y. M., Losada-Barragán, M., Sanchez, K. V., Rincón, J., Vargas, C. A. P., & Pérez, D. L. (2021b). Characterization of Zero-Valent Iron Nanoparticles Functionalized with a Biomarker Peptide. *Materials Research*, 24(5), 20200599. <https://doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2020-0599>
- Ge, D., Du, Q., Ran, B., Liu, X., Wang, X., Ma, X., Cheng, F., & Sun, B. (2019). The neurotoxicity induced by engineered nanomaterials. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 4167. <https://doi.org/10.2147/IJN.S203352>
- Ghasempour, S., Shokrgozar, M. A., Ghasempour, R., & Alipour, M. (2015). Investigating the cytotoxicity of iron oxide nanoparticles in in vivo and in vitro studies. *Experimental and Toxicologic Pathology: Official Journal of the Gesellschaft Fur Toxikologische Pathologie*, 67(10), 509–515. <https://doi.org/10.1016/J.ETP.2015.07.005>
- Gojova, A., Guo, B., Kota, R. S., Rutledge, J. C., Kennedy, I. M., & Barakat, A. I. (2007). Induction of inflammation in vascular endothelial cells by metal oxide nanoparticles: effect of particle composition. *Environmental Health Perspectives*, 115(3), 403–409. <https://doi.org/10.1289/EHP.8497>
- 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. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2017.00427>
- Gu, Q., Cuevas, E., Ali, S. F., Paule, M. G., Krauthamer, V., Jones, Y., & Zhang, Y. (2019). An Alternative In Vitro Method for Examining Nanoparticle-Induced Cytotoxicity. *International Journal of Toxicology*, 38(5), 385–394. [https://doi.org/10.1177/1091581819859267/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177\\_1091581819859267-FIG6.JPG](https://doi.org/10.1177/1091581819859267/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_1091581819859267-FIG6.JPG)
- Guigou, C., Lalande, A., Millot, N., Belharet, K., & Grayeli, A. B. (2021). Use of Super Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles as Drug Carriers in Brain and Ear: State of the Art and Challenges. *Brain Sciences* 2021, Vol. 11, Page 358, 11(3), 358. <https://doi.org/10.3390/BRAINSCI11030358>
- Gunay, G., Hamsici, S., Lang, G. A., Lang, M. L., Kovats, S., & Acar, H. (2022). Peptide Aggregation Induced Immunogenic Rupture (PAIR). *Advanced Science*, 9(21), 2105868. <https://doi.org/10.1002/ADVS.202105868>
- Halasi, M., Wang, M., Chavan, T. S., Gaponenko, V., Hay, N., & Gartel, A. L. (2013). ROS inhibitor N-acetyl-l-cysteine antagonizes the activity of proteasome inhibitors. *The Biochemical Journal*, 454(2), 201. <https://doi.org/10.1042/BJ20130282>
- Hall, S., McDermott, C., Anoopkumar-Dukie, S., McFarland, A. J., Forbes, A., Perkins, A. V., Davey, A. K., Chess-Williams, R., Kiefel, M. J., Arora, D., & Grant, G. D. (2016). Cellular Effects of Pyocyanin, a Secreted Virulence Factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins* 2016, Vol. 8, Page 236, 8(8), 236. <https://doi.org/10.3390/TOXINS8080236>
- Hermann, P., & Zerr, I. (2022). Rapidly progressive dementias — aetiologies, diagnosis and management. *Nature Reviews Neurology* 2022 18:6, 18(6), 363–376. <https://doi.org/10.1038/s41582-022-00659-0>
- Huang, C. L., Hsiao, I. L., Lin, H. C., Wang, C. F., Huang, Y. J., & Chuang, C. Y. (2015). Silver nanoparticles affect on gene expression of inflammatory and neurodegenerative responses in

mouse brain neural cells. *Environmental Research*, 136, 253–263. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2014.11.006>

- Islam, Y., Leach, A. G., Smith, J., Pluchino, S., Coxon, C. R., Sivakumaran, M., Downing, J., Fatokun, A. A., Teixidò, M., & Ehtezazi, T. (2021). Physiological and Pathological Factors Affecting Drug Delivery to the Brain by Nanoparticles. *Advanced Science*, 8(11). <https://doi.org/10.1002/advs.202002085>
- Israel, L. L., Galstyan, A., Holler, E., & Ljubimova, J. Y. (2020). Magnetic iron oxide nanoparticles for imaging, targeting and treatment of primary and metastatic tumors of the brain. *Journal of Controlled Release*, 320, 45–62. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2020.01.009>
- Ivask, A., Pilkington, E. H., Blin, T., Käkinen, A., Vija, H., Visnapuu, M., Quinn, J. F., Whittaker, M. R., Qiao, R., Davis, T. P., Ke, C., & Voelcker, N. H. (2017). *Supporting Information for Uptake and transcytosis of functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles in an in vitro blood brain barrier model.*
- Janik-Olchawa, N., Drozd, A., Ryszawy, D., Pudelek, M., Planeta, K., Setkowicz, Z., Sniegocki, M., Wyrwal-Sarna, M., Gajewska, M., & Chwiej, J. (2023). The influence of IONPs core size on their biocompatibility and activity in in vitro cellular models. *Scientific Reports*, 11, 21808. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01237-y>
- Ji, K., & Tsirka, S. E. (2012). Inflammation modulates expression of laminin in the central nervous system following ischemic injury. *Journal of Neuroinflammation*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-159/FIGURES/6>
- Kang, Y. J., Cutler, E. G., & Cho, H. (2018). Therapeutic nanoplatfoms and delivery strategies for neurological disorders. *Nano Convergence* 2018 5:1, 5(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/S40580-018-0168-8>
- Keenan, C. R., Goth-Goldstein, R., Lucas, D., & Sedlak, D. L. (2009). Oxidative stress induced by zero-valent iron nanoparticles and Fe(II) in human bronchial epithelial cells. *Environmental Science & Technology*, 43(12), 4555–4560. <https://doi.org/10.1021/ES9006383>
- Kenzaoui, B. H., Bernasconi, C. C., Hofmann, H., & Juillerat-Jeanneret, L. (2012). Evaluation of uptake and transport of ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles by human brain-derived endothelial cells. *Nanomedicine*, 7(1), 39–53. <https://doi.org/10.2217/NNM.11.85>
- Kim, J. A., Lee, N., Kim, B. H., Rhee, W. J., Yoon, S., Hyeon, T., & Park, T. H. (2011). Enhancement of neurite outgrowth in PC12 cells by iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*, 32(11), 2871–2877. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2011.01.019>
- Lhor, M., Bernier, S. C., Horchani, H., Bussières, S., Cantin, L., Desbat, B., & Salesse, C. (2014). Comparison between the behavior of different hydrophobic peptides allowing membrane anchoring of proteins. *Advances in Colloid and Interface Science*, 207(1), 223. <https://doi.org/10.1016/J.CIS.2014.01.015>
- Liu, J., Liu, Z., Pang, Y., & Zhou, H. (2022). The interaction between nanoparticles and immune system: application in the treatment of inflammatory diseases. *Journal of Nanobiotechnology*, 20(1), 1–25. <https://doi.org/10.1186/S12951-022-01343-7/FIGURES/8>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/METH.2001.1262>

- Lopez-Castejon, G., & Brough, D. (2011). Understanding the mechanism of IL-1 $\beta$  secretion. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 22(4), 189. <https://doi.org/10.1016/J.CYTOGFR.2011.10.001>
- Oestreich, L. K. L., & O'Sullivan, M. J. (2022). Transdiagnostic In Vivo Magnetic Resonance Imaging Markers of Neuroinflammation. *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging*, 7(7), 638–658. <https://doi.org/10.1016/J.BPSC.2022.01.003>
- Patil, R. M., Thorat, N. D., Shete, P. B., Bedge, P. A., Gavde, S., Joshi, M. G., Tofail, S. A. M., & Bohara, R. A. (2018). Comprehensive cytotoxicity studies of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 13, 63–72. <https://doi.org/10.1016/J.BBREP.2017.12.002>
- Peng, Y., Chu, S., Yang, Y., Zhang, Z., Pang, Z., & Chen, N. (2021). Neuroinflammatory In Vitro Cell Culture Models and the Potential Applications for Neurological Disorders. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 671734. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2021.671734/BIBTEX>
- Saafane, A., & Girard, D. (2022). Interaction between iron oxide nanoparticles (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs) and human neutrophils: Evidence that Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs possess some pro-inflammatory activities. *Chemico-Biological Interactions*, 365, 110053. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2022.110053>
- Sawyer, A. J., Tian, W., Saucier-Sawyer, J. K., Rizk, P. J., Saltzman, W. M., Bellamkonda, R. V., & Kyriakides, T. R. (2014). The effect of inflammatory cell-derived MCP-1 loss on neuronal survival during chronic neuroinflammation. *Biomaterials*, 35(25), 6698–6706. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2014.05.008>
- Shi, H., Gu, Y., Xie, Z., Zhou, Q., Mao, G., Lin, X., Liu, K., Liu, Y., Zou, B., & Zhao, J. (2017). Mechanism of N-acetyl-cysteine inhibition on the cytotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in JB6 cells transfected with activator protein-1. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 13(6), 3549. <https://doi.org/10.3892/ETM.2017.4415>
- Stephan, D., Sbai, O., Wen, J., Couraud, P. O., Putterman, C., Khrestchatisky, M., & Desplat-Jégo, S. (2013). TWEAK/Fn14 pathway modulates properties of a human microvascular endothelial cell model of blood brain barrier. *Journal of Neuroinflammation*, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-10-9/FIGURES/6>
- T98G [T98-G]-CRL-1690 | ATCC. (n.d.). Retrieved July 5, 2023, from <https://www.atcc.org/products/crl-1690>
- Tunca Koyun, M., Sirin, S., Erdem, S. A., Aslim, B., & Farago, P. V. (2022). Pyocyanin Isolated from *Pseudomonas aeruginosa*: Characterization, Biological Activity and Its Role in Cancer and Neurodegenerative Diseases Editor-in-Chief. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 65, 2022. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2022210651>
- Vargas-Sanchez, K., Losada-Barragán, M., Mogilevskaya, M., Novoa-Herrán, S., Medina, Y., Buendía-Atencio, C., Lorett-Velásquez, V., Martínez-Bernal, J., Gonzalez-Reyes, R. E., Ramírez, D., & Petry, K. G. (2021a). Screening for interacting proteins with peptide biomarker of blood–brain barrier alteration under inflammatory conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9). <https://doi.org/10.3390/IJMS22094725/S1>
- Vargas-Sanchez, K., Losada-Barragán, M., Mogilevskaya, M., Novoa-Herrán, S., Medina, Y., Buendía-Atencio, C., Lorett-Velásquez, V., Martínez-Bernal, J., Gonzalez-Reyes, R. E., Ramírez, D., & Petry, K. G. (2021b). Screening for interacting proteins with peptide biomarker of blood–brain barrier alteration under inflammatory conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9). <https://doi.org/10.3390/IJMS22094725/S1>
- Vargas-Sanchez, K., Vekris, A., & Petry, K. G. (2016). DNA Subtraction of In Vivo Selected Phage



Repertoires for Efficient Peptide Pathology Biomarker Identification in Neuroinflammation Multiple Sclerosis Model. *Biomarker Insights*, 11, 19. <https://doi.org/10.4137/BMI.S32188>

Wei, H., Hu, Y., Wang, J., Gao, X., Qian, X., & Tang, M. (2021). Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Cytotoxicity, Metabolism, and Cellular Behavior in Biomedicine Applications. *International Journal of Nanomedicine*, 16, 6097–6113. <https://doi.org/10.2147/IJN.S321984>

Weksler, B., Romero, I. A., & Couraud, P. O. (2013). The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier. *Fluids and Barriers of the CNS*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/2045-8118-10-16/TABLES/1>

Wolf-Grosse, S., Rokstad, A. M., Ali, S., Lambris, J. D., Mollnes, T. E., Nilsen, A. M., & Stenvik, J. (2017). Iron oxide nanoparticles induce cytokine secretion in a complement-dependent manner in a human whole blood model. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 3927. <https://doi.org/10.2147/IJN.S136453>

Wu, H. Y., Chung, M. C., Wang, C. C., Huang, C. H., Liang, H. J., & Jan, T. R. (2013). Iron oxide nanoparticles suppress the production of IL-1beta via the secretory lysosomal pathway in murine microglial cells. *Particle and Fibre Toxicology*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-46/FIGURES/5>

Xie, J., Shen, Z., Anraku, Y., Kataoka, K., & Chen, X. (2019). Nanomaterial-based blood-brain-barrier (BBB) crossing strategies. *Biomaterials*, 224, 119491. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2019.119491>

Yang, Y. M., Feng, X. Y., Yin, L. K., Li, C. C., Li, A. N., Jia, J., Wang, X. Lou, Du, Z. G., & Jin, L. X. (2013). In vivo USPIO-enhanced MR signal characteristics of secondary degeneration in the ipsilateral substantia nigra after middle cerebral artery occlusion at 3T. *Journal of Neuroradiology*, 40(3), 198–203. <https://doi.org/10.1016/J.NEURAD.2012.11.002>

Zanganeh, S., Hutter, G., Spitler, R., Lenkov, O., Mahmoudi, M., Shaw, A., Pajarinen, J. S., Nejadnik, H., Goodman, S., Moseley, M., Coussens, L. M., & Daldrup-Link, H. E. (2016). Iron oxide nanoparticles inhibit tumour growth by inducing pro-inflammatory macrophage polarization in tumour tissues. *Nature Nanotechnology*, 11(11), 986. <https://doi.org/10.1038/NNANO.2016.168>

Zhu, C., Gao, Y., Li, H., Meng, S., Li, L., Francisco, J. S., & Zeng, X. C. (2016). Characterizing hydrophobicity of amino acid side chains in a protein environment via measuring contact angle of a water nanodroplet on planar peptide network. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(46), 12946–12951. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1616138113/-DCSUPPLEMENTAL>

Zhu, F. D., Hu, Y. J., Yu, L., Zhou, X. G., Wu, J. M., Tang, Y., Qin, D. L., Fan, Q. Z., & Wu, A. G. (2021). Nanoparticles: A Hope for the Treatment of Inflammation in CNS. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2021.683935>

Zhu, M. T., Wang, B., Wang, Y., Yuan, L., Wang, H. J., Wang, M., Ouyang, H., Chai, Z. F., Feng, W. Y., & Zhao, Y. L. (2011). Endothelial dysfunction and inflammation induced by iron oxide nanoparticle exposure: Risk factors for early atherosclerosis. *Toxicology Letters*, 203(2), 162–171. <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2011.03.021>

Annavarapu, S., & Nanda, V. (2009). Mirrors in the PDB: Left-handed  $\alpha$ -turns guide design with D-amino acids. *BMC Structural Biology*, 9. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-9-61>

Ben Haim, L., & Rowitch, D. H. (2016). Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. *Nature Reviews Neuroscience* 2016 18:1, 18(1), 31–41. <https://doi.org/10.1038/NRN.2016.159>

- Biswas, S., Bachay, G., Chu, J., Hunter, D. D., & Brunken, W. J. (2017). Laminin-Dependent Interaction between Astrocytes and Microglia: A Role in Retinal Angiogenesis. *The American Journal of Pathology*, 187(9), 2112. <https://doi.org/10.1016/J.AJPATH.2017.05.016>
- Chiu, A. Y., Espinosa De Los Monteros, A., Cole, R. A., Loera, S., & De Vellis, J. (1991). Laminin and s-laminin are produced and released by astrocytes, schwann cells, and schwannomas in culture. *Glia*, 4(1), 11–24. <https://doi.org/10.1002/GLIA.440040103>
- Choublier, N., Taghi, M., Menet, M. C., Le Gall, M., Bruce, J., Chafey, P., Guillonneau, F., Moreau, A., Denizot, C., Parmentier, Y., Nakib, S., Borderie, D., Bouzinba-Segard, H., Couraud, P. O., Bourdoulous, S., & Declèves, X. (2022). Exposure of human cerebral microvascular endothelial cells hCMEC/D3 to laminar shear stress induces vascular protective responses. *Fluids and Barriers of the CNS*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/S12987-022-00344-W>
- Coccini, T., Caloni, F., Ramírez Cando, L. J., & De Simone, U. (2017). Cytotoxicity and proliferative capacity impairment induced on human brain cell cultures after short- and long-term exposure to magnetite nanoparticles. *Journal of Applied Toxicology*, 37(3), 361–373. <https://doi.org/10.1002/JAT.3367>
- Costa, C., Brandão, F., Bessa, M. J., Costa, S., Valdiglesias, V., Kiliç, G., Fernández-Bertólez, N., Quaresma, P., Pereira, E., Pásaro, E., Laffon, B., & Teixeira, J. P. (2016). In vitro cytotoxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles on neuronal and glial cells. Evaluation of nanoparticle interference with viability tests. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 36(3), 361–372. <https://doi.org/10.1002/JAT.3213>
- Dan, M., Cochran, D. B., Yokel, R. A., & Dziubla, T. D. (2013). Binding, Transcytosis and Biodistribution of Anti-PECAM-1 Iron Oxide Nanoparticles for Brain-Targeted Delivery. *PLoS ONE*, 8(11), 81051. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0081051>
- Duan, L., Li, X., Ji, R., Hao, Z., Kong, M., Wen, X., Guan, F., & Ma, S. (2023). Nanoparticle-Based Drug Delivery Systems: An Inspiring Therapeutic Strategy for Neurodegenerative Diseases. *Polymers* 2023, Vol. 15, Page 2196, 15(9), 2196. <https://doi.org/10.3390/POLYM15092196>
- Erkkinen, M. G., Kim, M. O., & Geschwind, M. D. (2018). Clinical neurology and epidemiology of the major neurodegenerative diseases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(4). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A033118>
- Fujiwara, K., Toda, H., & Ikeguchi, M. (2012). Dependence of  $\alpha$ -helical and  $\beta$ -sheet amino acid propensities on the overall protein fold type. *BMC Structural Biology*, 12. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-12-18>
- Fuster, E., Candela, H., Estévez, J., Arias, A. J., Vilanova, E., & Sogorb, M. A. (2020). Effects of silver nanoparticles on T98G human glioblastoma cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 404(July), 115178. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.115178>
- Gaona, I. M. S., Castillo, Y. M., Losada-Barragán, M., Sanchez, K. V., Rincón, J., Vargas, C. A. P., & Pérez, D. L. (2021a). Characterization of Zero-Valent Iron Nanoparticles Functionalized with a Biomarker Peptide. *Materials Research*, 24(5), e20200599. <https://doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2020-0599>
- Gaona, I. M. S., Castillo, Y. M., Losada-Barragán, M., Sanchez, K. V., Rincón, J., Vargas, C. A. P., & Pérez, D. L. (2021b). Characterization of Zero-Valent Iron Nanoparticles Functionalized with a Biomarker Peptide. *Materials Research*, 24(5), 20200599. <https://doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2020-0599>

- Ge, D., Du, Q., Ran, B., Liu, X., Wang, X., Ma, X., Cheng, F., & Sun, B. (2019). The neurotoxicity induced by engineered nanomaterials. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 4167. <https://doi.org/10.2147/IJN.S203352>
- Ghasempour, S., Shokrgozar, M. A., Ghasempour, R., & Alipour, M. (2015). Investigating the cytotoxicity of iron oxide nanoparticles in in vivo and in vitro studies. *Experimental and Toxicologic Pathology: Official Journal of the Gesellschaft Fur Toxikologische Pathologie*, 67(10), 509–515. <https://doi.org/10.1016/J.ETP.2015.07.005>
- Gkagkanasiou, M., Ploussi, A., Gazouli, M., & Efstathopoulos, E. P. (2016). USPIO-Enhanced MRI Neuroimaging: A Review. *Journal of Neuroimaging: Official Journal of the American Society of Neuroimaging*, 26(2), 161–168. <https://doi.org/10.1111/JON.12318>
- Gojova, A., Guo, B., Kota, R. S., Rutledge, J. C., Kennedy, I. M., & Barakat, A. I. (2007). Induction of inflammation in vascular endothelial cells by metal oxide nanoparticles: effect of particle composition. *Environmental Health Perspectives*, 115(3), 403–409. <https://doi.org/10.1289/EHP.8497>
- 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. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2017.00427>
- Gu, Q., Cuevas, E., Ali, S. F., Paule, M. G., Krauthamer, V., Jones, Y., & Zhang, Y. (2019). An Alternative In Vitro Method for Examining Nanoparticle-Induced Cytotoxicity. *International Journal of Toxicology*, 38(5), 385–394. [https://doi.org/10.1177/1091581819859267/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177\\_1091581819859267-FIG6.JPG](https://doi.org/10.1177/1091581819859267/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_1091581819859267-FIG6.JPG)
- Guccione, C., Oufir, M., Piazzini, V., Eigenmann, D. E., Jähne, E. A., Zabela, V., Faleschini, M. T., Bergonzi, M. C., Smiesko, M., Hamburger, M., & Bilia, A. R. (2017). Andrographolide-loaded nanoparticles for brain delivery: Formulation, characterisation and in vitro permeability using hCMEC/D3 cell line. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 119, 253–263. <https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2017.06.018>
- Guigou, C., Lalande, A., Millot, N., Belharet, K., & Grayeli, A. B. (2021). Use of Super Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles as Drug Carriers in Brain and Ear: State of the Art and Challenges. *Brain Sciences* 2021, Vol. 11, Page 358, 11(3), 358. <https://doi.org/10.3390/BRAINSCI11030358>
- Gunay, G., Hamsici, S., Lang, G. A., Lang, M. L., Kovats, S., & Acar, H. (2022). Peptide Aggregation Induced Immunogenic Rupture (PAIR). *Advanced Science*, 9(21), 2105868. <https://doi.org/10.1002/ADVS.202105868>
- Halasi, M., Wang, M., Chavan, T. S., Gaponenko, V., Hay, N., & Gartel, A. L. (2013). ROS inhibitor N-acetyl-l-cysteine antagonizes the activity of proteasome inhibitors. *The Biochemical Journal*, 454(2), 201. <https://doi.org/10.1042/BJ20130282>
- Hall, S., McDermott, C., Anoopkumar-Dukie, S., McFarland, A. J., Forbes, A., Perkins, A. V., Davey, A. K., Chess-Williams, R., Kiefel, M. J., Arora, D., & Grant, G. D. (2016). Cellular Effects of Pyocyanin, a Secreted Virulence Factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins* 2016, Vol. 8, Page 236, 8(8), 236. <https://doi.org/10.3390/TOXINS8080236>
- Hermann, P., & Zerr, I. (2022). Rapidly progressive dementias — aetiologies, diagnosis and management. *Nature Reviews Neurology* 2022 18:6, 18(6), 363–376. <https://doi.org/10.1038/s41582-022-00659-0>

- Huang, C. L., Hsiao, I. L., Lin, H. C., Wang, C. F., Huang, Y. J., & Chuang, C. Y. (2015). Silver nanoparticles affect on gene expression of inflammatory and neurodegenerative responses in mouse brain neural cells. *Environmental Research*, 136, 253–263. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2014.11.006>
- Islam, Y., Leach, A. G., Smith, J., Pluchino, S., Coxon, C. R., Sivakumaran, M., Downing, J., Fatokun, A. A., Teixidò, M., & Ehtezazi, T. (2021). Physiological and Pathological Factors Affecting Drug Delivery to the Brain by Nanoparticles. *Advanced Science*, 8(11). <https://doi.org/10.1002/advs.202002085>
- Israel, L. L., Galstyan, A., Holler, E., & Ljubimova, J. Y. (2020). Magnetic iron oxide nanoparticles for imaging, targeting and treatment of primary and metastatic tumors of the brain. *Journal of Controlled Release*, 320, 45–62. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2020.01.009>
- Ivask, A., Pilkington, E. H., Blin, T., Käkinen, A., Vija, H., Visnapuu, M., Quinn, J. F., Whittaker, M. R., Qiao, R., Davis, T. P., Ke, C., & Voelcker, N. H. (2017). Supporting Information for Uptake and transcytosis of functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles in an in vitro blood brain barrier model.
- Janik-Olchawa, N., Drozd, A., Ryszawy, D., Pudelek, M., Planeta, K., Setkiewicz, Z., Sniegocki, M., Wyrwal-Sarna, M., Gajewska, M., & Chwiej, J. (2021). The influence of IONPs core size on their biocompatibility and activity in in vitro cellular models. *Scientific Reports* |, 11, 21808. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01237-y>
- Ji, K., & Tsirka, S. E. (2012). Inflammation modulates expression of laminin in the central nervous system following ischemic injury. *Journal of Neuroinflammation*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-159/FIGURES/6>
- Kang, Y. J., Cutler, E. G., & Cho, H. (2018). Therapeutic nanoplatfoms and delivery strategies for neurological disorders. *Nano Convergence* 2018 5:1, 5(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/S40580-018-0168-8>
- Keenan, C. R., Goth-Goldstein, R., Lucas, D., & Sedlak, D. L. (2009). Oxidative stress induced by zero-valent iron nanoparticles and Fe(II) in human bronchial epithelial cells. *Environmental Science & Technology*, 43(12), 4555–4560. <https://doi.org/10.1021/ES9006383>
- Kenzaoui, B. H., Bernasconi, C. C., Hofmann, H., & Juillerat-Jeanneret, L. (2012). Evaluation of uptake and transport of ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles by human brain-derived endothelial cells. *Nanomedicine*, 7(1), 39–53. <https://doi.org/10.2217/NNM.11.85>
- Kim, J. A., Lee, N., Kim, B. H., Rhee, W. J., Yoon, S., Hyeon, T., & Park, T. H. (2011). Enhancement of neurite outgrowth in PC12 cells by iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*, 32(11), 2871–2877. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2011.01.019>
- Lhor, M., Bernier, S. C., Horchani, H., Bussièrès, S., Cantin, L., Desbat, B., & Salesse, C. (2014). Comparison between the behavior of different hydrophobic peptides allowing membrane anchoring of proteins. *Advances in Colloid and Interface Science*, 207(1), 223. <https://doi.org/10.1016/J.CIS.2014.01.015>
- Liu, J., Liu, Z., Pang, Y., & Zhou, H. (2022). The interaction between nanoparticles and immune system: application in the treatment of inflammatory diseases. *Journal of Nanobiotechnology*, 20(1), 1–25. <https://doi.org/10.1186/S12951-022-01343-7/FIGURES/8>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25(4), 402–408.

<https://doi.org/10.1006/METH.2001.1262>

- Lopez-Castejon, G., & Brough, D. (2011). Understanding the mechanism of IL-1 $\beta$  secretion. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 22(4), 189. <https://doi.org/10.1016/J.CYTOGFR.2011.10.001>
- Oestreich, L. K. L., & O'Sullivan, M. J. (2022). Transdiagnostic In Vivo Magnetic Resonance Imaging Markers of Neuroinflammation. *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging*, 7(7), 638–658. <https://doi.org/10.1016/J.BPSC.2022.01.003>
- Patil, R. M., Thorat, N. D., Shete, P. B., Bedge, P. A., Gavde, S., Joshi, M. G., Tofail, S. A. M., & Bohara, R. A. (2018). Comprehensive cytotoxicity studies of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 13, 63–72. <https://doi.org/10.1016/J.BBREP.2017.12.002>
- Peng, Y., Chu, S., Yang, Y., Zhang, Z., Pang, Z., & Chen, N. (2021). Neuroinflammatory In Vitro Cell Culture Models and the Potential Applications for Neurological Disorders. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 671734. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2021.671734/BIBTEX>
- Rueda-O., A. del P., Enríquez-S., L. F., Rueda-O., A. del P., & Enríquez-S., L. F. (2018). UNA REVISIÓN DE TÉCNICAS BÁSICAS DE NEUROIMAGEN PARA EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS. *Biosalud*, 17(2), 59–90. <https://doi.org/10.17151/BIOSA.2018.17.2.5>
- Saafane, A., & Girard, D. (2022). Interaction between iron oxide nanoparticles (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs) and human neutrophils: Evidence that Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs possess some pro-inflammatory activities. *Chemico-Biological Interactions*, 365, 110053. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2022.110053>
- Sawyer, A. J., Tian, W., Saucier-Sawyer, J. K., Rizk, P. J., Saltzman, W. M., Bellamkonda, R. V., & Kyriakides, T. R. (2014). The effect of inflammatory cell-derived MCP-1 loss on neuronal survival during chronic neuroinflammation. *Biomaterials*, 35(25), 6698–6706. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2014.05.008>
- Shi, H., Gu, Y., Xie, Z., Zhou, Q., Mao, G., Lin, X., Liu, K., Liu, Y., Zou, B., & Zhao, J. (2017). Mechanism of N-acetyl-cysteine inhibition on the cytotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in JB6 cells transfected with activator protein-1. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 13(6), 3549. <https://doi.org/10.3892/ETM.2017.4415>
- Stephan, D., Sbai, O., Wen, J., Couraud, P. O., Putterman, C., Khrestchatisky, M., & Desplat-Jégo, S. (2013). TWEAK/Fn14 pathway modulates properties of a human microvascular endothelial cell model of blood brain barrier. *Journal of Neuroinflammation*, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-10-9/FIGURES/6>
- T98G [T98-G]-CRL-1690 | ATCC. (n.d.). Retrieved July 5, 2023, from <https://www.atcc.org/products/crl-1690>
- Tunca Koyun, M., Sirin, S., Erdem, S. A., Aslim, B., & Farago, P. V. (2022). Pyocyanin Isolated from *Pseudomonas aeruginosa*: Characterization, Biological Activity and Its Role in Cancer and Neurodegenerative Diseases Editor-in-Chief. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 65, 2022. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2022210651>
- Vargas-Sanchez, K., Losada-Barragán, M., Mogilevskaya, M., Novoa-Herrán, S., Medina, Y., Buendía-Atencio, C., Lorett-Velásquez, V., Martínez-Bernal, J., Gonzalez-Reyes, R. E., Ramírez, D., & Petry, K. G. (2021a). Screening for interacting proteins with peptide biomarker of blood–brain barrier alteration under inflammatory conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9). <https://doi.org/10.3390/IJMS22094725/S1>

- Vargas-Sanchez, K., Losada-Barragán, M., Mogilevskaya, M., Novoa-Herrán, S., Medina, Y., Buendía-Atencio, C., Lorett-Velásquez, V., Martínez-Bernal, J., Gonzalez-Reyes, R. E., Ramírez, D., & Petry, K. G. (2021b). Screening for interacting proteins with peptide biomarker of blood–brain barrier alteration under inflammatory conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9). <https://doi.org/10.3390/IJMS22094725/S1>
- Vargas-Sanchez, K., Vekris, A., & Petry, K. G. (2016). DNA Subtraction of In Vivo Selected Phage Repertoires for Efficient Peptide Pathology Biomarker Identification in Neuroinflammation Multiple Sclerosis Model. *Biomarker Insights*, 11, 19. <https://doi.org/10.4137/BMI.S32188>
- Wei, H., Hu, Y., Wang, J., Gao, X., Qian, X., & Tang, M. (2021). <p>Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Cytotoxicity, Metabolism, and Cellular Behavior in Biomedicine Applications</p>. *International Journal of Nanomedicine*, 16, 6097–6113. <https://doi.org/10.2147/IJN.S321984>
- Weksler, B., Romero, I. A., & Couraud, P. O. (2013). The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier. *Fluids and Barriers of the CNS*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/2045-8118-10-16/TABLES/1>
- Wolf-Grosse, S., Rokstad, A. M., Ali, S., Lambris, J. D., Mollnes, T. E., Nilsen, A. M., & Stenvik, J. (2017). Iron oxide nanoparticles induce cytokine secretion in a complement-dependent manner in a human whole blood model. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 3927. <https://doi.org/10.2147/IJN.S136453>
- Wu, H. Y., Chung, M. C., Wang, C. C., Huang, C. H., Liang, H. J., & Jan, T. R. (2013). Iron oxide nanoparticles suppress the production of IL-1beta via the secretory lysosomal pathway in murine microglial cells. *Particle and Fibre Toxicology*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-46/FIGURES/5>
- Xie, J., Shen, Z., Anraku, Y., Kataoka, K., & Chen, X. (2019). Nanomaterial-based blood-brain-barrier (BBB) crossing strategies. *Biomaterials*, 224, 119491. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2019.119491>
- Yang, Y. M., Feng, X. Y., Yin, L. K., Li, C. C., Li, A. N., Jia, J., Wang, X. Lou, Du, Z. G., & Jin, L. X. (2013). In vivo USPIO-enhanced MR signal characteristics of secondary degeneration in the ipsilateral substantia nigra after middle cerebral artery occlusion at 3T. *Journal of Neuroradiology*, 40(3), 198–203. <https://doi.org/10.1016/J.NEURAD.2012.11.002>
- Zanganeh, S., Hutter, G., Spitler, R., Lenkov, O., Mahmoudi, M., Shaw, A., Pajarinen, J. S., Nejadnik, H., Goodman, S., Moseley, M., Coussens, L. M., & Daldrup-Link, H. E. (2016). Iron oxide nanoparticles inhibit tumour growth by inducing pro-inflammatory macrophage polarization in tumour tissues. *Nature Nanotechnology*, 11(11), 986. <https://doi.org/10.1038/NNANO.2016.168>
- Zhu, C., Gao, Y., Li, H., Meng, S., Li, L., Francisco, J. S., & Zeng, X. C. (2016). Characterizing hydrophobicity of amino acid side chains in a protein environment via measuring contact angle of a water nanodroplet on planar peptide network. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(46), 12946–12951. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1616138113/-DCSUPPLEMENTAL>
- Zhu, F. D., Hu, Y. J., Yu, L., Zhou, X. G., Wu, J. M., Tang, Y., Qin, D. L., Fan, Q. Z., & Wu, A. G. (2021). Nanoparticles: A Hope for the Treatment of Inflammation in CNS. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2021.683935>
- Zhu, M. T., Wang, B., Wang, Y., Yuan, L., Wang, H. J., Wang, M., Ouyang, H., Chai, Z. F., Feng, W. Y., & Zhao, Y. L. (2011). Endothelial dysfunction and inflammation induced by iron oxide nanoparticle exposure: Risk factors for early atherosclerosis. *Toxicology Letters*, 203(2), 162–171.

<https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2011.03.021>

{Bibliography}n-1 Family Cytokines: Variations on a Common Theme. *Immunity*, 42(6), 991–1004. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2015.06.003>

Ensayo de citotoxicidad CyQUANTTM LDH. (n.d.). Retrieved May 1, 2022, from [https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C20300?gclid=Cj0KCQjw37iTbHcWARIsACBt1lwX2Q2-j1ewi1ITyXbW-d4FB2bAz7P-4ny4in35p460cz0VR3vqiK8aAmwAEALw\\_wcB&ef\\_id=Cj0KCQjw37iTbHcWARIsACBt1lwX2Q2-j1ewi1ITyXbW-d4FB2bAz7P-4ny4in35p460cz0VR3vqiK8aAmwAEALw\\_wcB:G:s&s\\_kwid=AL!3652!3!447292198751!!!g!!&cid=bid\\_pca\\_iva\\_r01\\_co\\_cp1359\\_pjt0000\\_bid00000\\_0se\\_ga\\_w\\_dy\\_pur\\_con](https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C20300?gclid=Cj0KCQjw37iTbHcWARIsACBt1lwX2Q2-j1ewi1ITyXbW-d4FB2bAz7P-4ny4in35p460cz0VR3vqiK8aAmwAEALw_wcB&ef_id=Cj0KCQjw37iTbHcWARIsACBt1lwX2Q2-j1ewi1ITyXbW-d4FB2bAz7P-4ny4in35p460cz0VR3vqiK8aAmwAEALw_wcB:G:s&s_kwid=AL!3652!3!447292198751!!!g!!&cid=bid_pca_iva_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_ga_w_dy_pur_con)

Erkkinen, M. G., Kim, M.-O., & Geschwind, M. D. (n.d.). Clinical Neurology and Epidemiology of the Major Neurodegenerative Diseases. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033118>

Fields, J. K., Günther, S., & Sundberg, E. J. (2019). Structural basis of IL-1 family cytokine signaling. *Frontiers in Immunology*, 10(JUN), 1412. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.01412/BIBTEX>

Gaona, I. M. S., Castillo, Y. M., Losada-Barragán, M., Sanchez, K. V., Rincón, J., Vargas, C. A. P., & Pérez, D. L. (2021). Characterization of Zero-Valent Iron Nanoparticles Functionalized with a Biomarker Peptide. *Materials Research*

24(5), 20200599. <https://doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2020-0599>

Gkagkanasiou, M., Ploussi, A., Gazouli, M., & Efstathopoulos, E. P. (2016).

USPIO-Enhanced MRI Neuroimaging: A Review. *Journal of Neuroimaging: Official Journal of the American Society of Neuroimaging*, 26(2), 161–168. <https://doi.org/10.1111/JON.12318>

Kit de ensayo SOD de superóxido dismutasa, Cayman Chemical – Probiotek. (n.d.). Retrieved May 1, 2022, from <https://www.probiotek.com/productos/reactivos/superoxide-dismutase-assay-kit/>

Merenstein, J. L., & Bennett, I. J. (2022). Neuroimaging studies of mental disorders. Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91497-0.00030-8>

Milatovic, D., Zaja-Milatovic, S., Breyer, R. M., Aschner, M., & Montine, T. J. (2017). Neuroinflammation and oxidative injury in developmental neurotoxicity. *Reproductive and Developmental Toxicology*, 1051–1061. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804239-7.00055-X>

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2020, September 21). Demencia. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>

Parameswaran, N., & Patial, S. (2010). Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Signaling in Macrophages. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 20(2), 87. <https://doi.org/10.1615/CRITREVEUKARGENEEXPR.V20.I2.10>

Pollatou, A., Filippi, C. A., Aydin, E., Vaughn, K., Thompson, D., Korom, M.,

Dufford, A. J., Howell, B., Zöllei, L., Martino, A. Di, Graham, A., Scheinost, D., & Spann, M. N. (2022). An ode to fetal, infant, and toddler neuroimaging: Chronicling early clinical to research applications with MRI, and an introduction to an academic society connecting the field. *Developmental Cognitive Neuroscience*, 54, 101083. <https://doi.org/10.1016/J.DCN.2022.101083>

Raghavan, A., & Shah, Z. A. (2014). Neurodegenerative disease. Diet, Exercise, and Chronic Disease:

- The Biological Basis of Prevention, 339–390. <https://doi.org/10.1201/b16783>
- Ratajczak, J., Miekus, K., Kucia, M., Zhang, J., Reca, R., Dvorak, P., & Ratajczak, M. Z. (2006). Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*, 20(5), 847–856. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404132>
- Rueda-O., A. del P., Enríquez-S., L. F., Rueda-O., A. del P., & Enríquez-S., L. F. (2018). UNA REVISIÓN DE TÉCNICAS BÁSICAS DE NEUROIMAGEN PARA EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS. *Biosalud*, 17(2), 59–90. <https://doi.org/10.17151/BIOSA.2018.17.2.5>
- Vargas-Sanchez, K., Vekris, A., & Petry, K. G. (2016). DNA Subtraction of In vivo Selected Phage Repertoires for Efficient Peptide Pathology Biomarker Identification in Neuroinflammation Multiple Sclerosis Model. *Biomarker Insights*, 11, 19. <https://doi.org/10.4137/BMI.S32188>
- Zhang, J. M., & An, J. (2007). Cytokines, Inflammation and Pain. *International Anesthesiology Clinics*, 45(2), 27. <https://doi.org/10.1097/AIA.0B013E318034194E>
- Afonina, I. S., Müller, C., Martin, S. J., & Beyaert, R. (2015). Proteolytic Processing of Interleukin-1 Family Cytokines: Variations on a Common Theme. *Immunity*, 42(6), 991–1004. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2015.06.003>
- Ensayo de citotoxicidad CyQUANTTM LDH. (n.d.). Retrieved May 1, 2022, from [https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C20300?gclid=Cj0KCQjw37iTBhCWARIsACBt1lwX2Q2-j1ewi1ITyXbW-d4FB2bAz7P-4ny4in35p460cz0VR3vqiK8aAmwAEALw\\_wcB&ef\\_id=Cj0KCQjw37iTBhCWARIsACBt1lwX2Q2-j1ewi1ITyXbW-d4FB2bAz7P-4ny4in35p460cz0VR3vqiK8aAmwAEALw\\_wcB:G:s&s\\_kwcid=AL!3652!3!447292198751!!!g!!&cid=bid\\_pca\\_iva\\_r01\\_co\\_cp1359\\_pjt0000\\_bid00000\\_0se\\_ga\\_w\\_dy\\_pur\\_con](https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C20300?gclid=Cj0KCQjw37iTBhCWARIsACBt1lwX2Q2-j1ewi1ITyXbW-d4FB2bAz7P-4ny4in35p460cz0VR3vqiK8aAmwAEALw_wcB&ef_id=Cj0KCQjw37iTBhCWARIsACBt1lwX2Q2-j1ewi1ITyXbW-d4FB2bAz7P-4ny4in35p460cz0VR3vqiK8aAmwAEALw_wcB:G:s&s_kwcid=AL!3652!3!447292198751!!!g!!&cid=bid_pca_iva_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_ga_w_dy_pur_con)
- Erkkinen, M. G., Kim, M.-O., & Geschwind, M. D. (n.d.). Clinical Neurology and Epidemiology of the Major Neurodegenerative Diseases. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033118>
- Fields, J. K., Günther, S., & Sundberg, E. J. (2019). Structural basis of IL-1 family cytokine signaling. *Frontiers in Immunology*, 10(JUN), 1412. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.01412/BIBTEX>
- Gaona, I. M. S., Castillo, Y. M., Losada-Barragán, M., Sanchez, K. V., Rincón, J., Vargas, C. A. P., & Pérez, D. L. (2021). Characterization of Zero-Valent Iron Nanoparticles Functionalized with a Biomarker Peptide. *Materials Research*, 24(5), 20200599. <https://doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2020-0599>
- Gkagkanasiou, M., Ploussi, A., Gazouli, M., & Efstathopoulos, E. P. (2016). USPIO-Enhanced MRI Neuroimaging: A Review. *Journal of Neuroimaging: Official Journal of the American Society of Neuroimaging*, 26(2), 161–168. <https://doi.org/10.1111/JON.12318>
- Kit de ensayo SOD de superóxido dismutasa, Cayman Chemical – Probiotek. (n.d.). Retrieved May 1, 2022, from <https://www.probiotek.com/productos/reactivos/superoxide-dismutase-assay-kit/>
- Merenstein, J. L., & Bennett, I. J. (2022). Neuroimaging studies of mental disorders. Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91497->



0.00030-8

- Milatovic, D., Zaja-Milatovic, S., Breyer, R. M., Aschner, M., & Montine, T. J. (2017). Neuroinflammation and oxidative injury in developmental neurotoxicity. *Reproductive and Developmental Toxicology*, 1051–1061. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804239-7.00055-X>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2020, September 21). Demencia. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
- Parameswaran, N., & Patial, S. (2010). Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Signaling in Macrophages. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 20(2), 87. <https://doi.org/10.1615/CRITREVEUKARGENEEXPR.V20.I2.10>
- Pollatou, A., Filippi, C. A., Aydin, E., Vaughn, K., Thompson, D., Korom, M.
- Dufford, A. J., Howell, B., Zöllei, L., Martino, A. Di, Graham, A., Scheinost, D., & Spann, M. N. (2022). An ode to fetal, infant, and toddler neuroimaging: Chronicling early clinical to research applications with MRI, and an introduction to an academic society connecting the field. *Developmental Cognitive Neuroscience*, 54, 101083. <https://doi.org/10.1016/J.DCN.2022.101083>
- Raghavan, A., & Shah, Z. A. (2014). Neurodegenerative disease. Diet, Exercise, and Chronic Disease: The Biological Basis of Prevention, 339–390. <https://doi.org/10.1201/b16783>
- Ratajczak, J., Miekus, K., Kucia, M., Zhang, J., Reca, R., Dvorak, P., & Ratajczak, M. Z. (2006). Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*, 20(5), 847–856. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404132>
- Rueda-O., A. del P., Enríquez-S., L. F., Rueda-O., A. del P., & Enríquez-S., L. F. (2018). UNA REVISIÓN DE TÉCNICAS BÁSICAS DE NEUROIMAGEN PARA EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS. *Biosalud*, 17(2), 59–90. <https://doi.org/10.17151/BIOSA.2018.17.2.5>
- Vargas-Sanchez, K., Vekris, A., & Petry, K. G. (2016). DNA Subtraction of In vivo Selected Phage Repertoires for Efficient Peptide Pathology Biomarker Identification in Neuroinflammation Multiple Sclerosis Model. *Biomarker Insights*, 11, 19. <https://doi.org/10.4137/BMI.S32188>
- Zhang, J. M., & An, J. (2007). Cytokines, Inflammation and Pain. *International Anesthesiology Clinics*, 45(2), 27. <https://doi.org/10.1097/AIA.0B013E318034194E>
- Afonina, I. S., Müller, C., Martin, S. J., & Beyaert, R. (2015). Proteolytic Processing of Interleukin-1 Family Cytokines: Variations on a Common Theme. *Immunity*, 42(6), 991–1004. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2015.06.003>
- Ensayo de citotoxicidad CyQUANTTM LDH. (n.d.). Retrieved May 1, 2022, from [https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C20300?gclid=Cj0KCQjw37iTbhcWARIsACBt1lwX2Q2-j1ewi1ITyXbW-d4FB2bAz7P-4ny4in35p460cz0VR3vqiK8aAmwAEALw\\_wcB&ef\\_id=Cj0KCQjw37iTbhcWARIsACBt1lwX2Q2-j1ewi1ITyXbW-d4FB2bAz7P-4ny4in35p460cz0VR3vqiK8aAmwAEALw\\_wcB:G:s&s\\_kwid=AL!3652!3!447292198751!!!g!!&cid=bid\\_pca\\_iva\\_r01\\_co\\_cp1359\\_pjt0000\\_bid00000\\_0se\\_ga\\_w\\_dy\\_pur\\_con](https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C20300?gclid=Cj0KCQjw37iTbhcWARIsACBt1lwX2Q2-j1ewi1ITyXbW-d4FB2bAz7P-4ny4in35p460cz0VR3vqiK8aAmwAEALw_wcB&ef_id=Cj0KCQjw37iTbhcWARIsACBt1lwX2Q2-j1ewi1ITyXbW-d4FB2bAz7P-4ny4in35p460cz0VR3vqiK8aAmwAEALw_wcB:G:s&s_kwid=AL!3652!3!447292198751!!!g!!&cid=bid_pca_iva_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_ga_w_dy_pur_con)
- Erkkinen, M. G., Kim, M.-O., & Geschwind, M. D. (n.d.). Clinical Neurology and Epidemiology of the Major Neurodegenerative Diseases. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033118>

- Fields, J. K., Günther, S., & Sundberg, E. J. (2019). Structural basis of IL-1 family cytokine signaling. *Frontiers in Immunology*, 10(JUN), 1412. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.01412/BIBTEX>
- Gaona, I. M. S., Castillo, Y. M., Losada-Barragán, M., Sanchez, K. V., Rincón, J., Vargas, C. A. P., & Pérez, D. L. (2021). Characterization of Zero-Valent Iron Nanoparticles Functionalized with a Biomarker Peptide. *Materials Research*, 24(5), 20200599. <https://doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2020-0599>
- Gkagkanasiou, M., Ploussi, A., Gazouli, M., & Efstathopoulos, E. P. (2016). USPIO-Enhanced MRI Neuroimaging: A Review. *Journal of Neuroimaging: Official Journal of the American Society of Neuroimaging*, 26(2), 161–168. <https://doi.org/10.1111/JON.12318>
- Kit de ensayo SOD de superóxido dismutasa, Cayman Chemical – Probiotek. (n.d.). Retrieved May 1, 2022, from <https://www.probiotek.com/productos/reactivos/superoxide-dismutase-assay-kit/>
- Merenstein, J. L., & Bennett, I. J. (2022). Neuroimaging studies of mental disorders. Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91497-0.00030-8>
- Milatovic, D., Zaja-Milatovic, S., Breyer, R. M., Aschner, M., & Montine, T. J. (2017). Neuroinflammation and oxidative injury in developmental neurotoxicity. *Reproductive and Developmental Toxicology*, 1051–1061. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804239-7.00055-X>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2020, September 21). Demencia. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
- Parameswaran, N., & Patial, S. (2010). Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Signaling in Macrophages. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 20(2), 87. <https://doi.org/10.1615/CRITREVEUKARGENEEXPR.V20.I2.10>
- Pollatou, A., Filippi, C. A., Aydin, E., Vaughn, K., Thompson, D., Korom, M., Dufford, A. J., Howell, B., Zöllei, L., Martino, A. Di, Graham, A., Scheinost, D., & Spann, M. N. (2022). An ode to fetal, infant, and toddler neuroimaging: Chronicling early clinical to research applications with MRI, and an introduction to an academic society connecting the field. *Developmental Cognitive Neuroscience*, 54, 101083. <https://doi.org/10.1016/J.DCN.2022.101083>
- Raghavan, A., & Shah, Z. A. (2014). Neurodegenerative disease. Diet, Exercise, and Chronic Disease: The Biological Basis of Prevention, 339–390. <https://doi.org/10.1201/b16783>
- Ratajczak, J., Miekus, K., Kucia, M., Zhang, J., Reca, R., Dvorak, P., & Ratajczak, M. Z. (2006). Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*, 20(5), 847–856. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404132>
- Rueda-O., A. del P., Enríquez-S., L. F., Rueda-O., A. del P., & Enríquez-S., L. F. (2018). UNA REVISIÓN DE TÉCNICAS BÁSICAS DE NEUROIMAGEN PARA EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS. *Biosalud*, 17(2), 59–90. <https://doi.org/10.17151/BIOSA.2018.17.2.5>
- Vargas-Sanchez, K., Vekris, A., & Petry, K. G. (2016). DNA Subtraction of In vivo Selected Phage Repertoires for Efficient Peptide Pathology Biomarker Identification in Neuroinflammation Multiple Sclerosis Model. *Biomarker Insights*, 11, 19. <https://doi.org/10.4137/BMI.S32188>

- Zhang, J. M., & An, J. (2007). Cytokines, Inflammation and Pain. *International Anesthesiology Clinics*, 45(2), 27. <https://doi.org/10.1097/AIA.0B013E318034194E>
- Afonina, I. S., Müller, C., Martin, S. J., & Beyaert, R. (2015). Proteolytic Processing of Interleukin-1 Family Cytokines: Variations on a Common Theme. *Immunity*, 42(6), 991–1004. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2015.06.003>
- Ensayo de citotoxicidad CyQUANTTM LDH. (n.d.). Retrieved May 1, 2022, from [https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C20300?gclid=Cj0KCQjw37iTBhCWARIsACBt1lwX2Q2-j1ewi1ITyXbW-d4FB2bAz7P-4ny4in35p460cz0VR3vqiK8aAmwAEALw\\_wcB&ef\\_id=Cj0KCQjw37iTBhCWARIsACBt1lwX2Q2-j1ewi1ITyXbW-d4FB2bAz7P-4ny4in35p460cz0VR3vqiK8aAmwAEALw\\_wcB:G:s&s\\_kwid=AL3652!3!447292198751!!!g!!&cid=bid\\_pca\\_iva\\_r01\\_co\\_cp1359\\_pjt0000\\_bid00000\\_0se\\_ga\\_w\\_dy\\_pur\\_con](https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C20300?gclid=Cj0KCQjw37iTBhCWARIsACBt1lwX2Q2-j1ewi1ITyXbW-d4FB2bAz7P-4ny4in35p460cz0VR3vqiK8aAmwAEALw_wcB&ef_id=Cj0KCQjw37iTBhCWARIsACBt1lwX2Q2-j1ewi1ITyXbW-d4FB2bAz7P-4ny4in35p460cz0VR3vqiK8aAmwAEALw_wcB:G:s&s_kwid=AL3652!3!447292198751!!!g!!&cid=bid_pca_iva_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_ga_w_dy_pur_con)
- Erkkinen, M. G., Kim, M.-O., & Geschwind, M. D. (n.d.). Clinical Neurology and Epidemiology of the Major Neurodegenerative Diseases. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033118>
- Fields, J. K., Günther, S., & Sundberg, E. J. (2019). Structural basis of IL-1 family cytokine signaling. *Frontiers in Immunology*, 10(JUN), 1412. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.01412/BIBTEX>
- Gaona, I. M. S., Castillo, Y. M., Losada-Barragán, M., Sanchez, K. V., Rincón, J.,
- Vargas, C. A. P., & Pérez, D. L. (2021). Characterization of Zero-Valent Iron Nanoparticles Functionalized with a Biomarker Peptide. *Materials Research*, 24(5), 20200599. <https://doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2020-0599>
- Gkakganasiou, M., Ploussi, A., Gazouli, M., & Efstathopoulos, E. P. (2016).
- USPIO-Enhanced MRI Neuroimaging: A Review. *Journal of Neuroimaging: Official Journal of the American Society of Neuroimaging*, 26(2), 161–168. <https://doi.org/10.1111/JON.12318>
- Kit de ensayo SOD de superóxido dismutasa, Cayman Chemical – Probiotek. (n.d.). Retrieved May 1, 2022, from <https://www.probiotek.com/productos/reactivos/superoxide-dismutase-assay-kit/>
- Merenstein, J. L., & Bennett, I. J. (2022). Neuroimaging studies of mental disorders. Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91497-0.00030-8>
- Milatovic, D., Zaja-Milatovic, S., Breyer, R. M., Aschner, M., & Montine, T. J. (2017). Neuroinflammation and oxidative injury in developmental neurotoxicity. *Reproductive and Developmental Toxicology*, 1051–1061. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804239-7.00055-X>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2020, September 21). Demencia. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
- Parameswaran, N., & Patial, S. (2010). Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Signaling in Macrophages. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 20(2), 87. <https://doi.org/10.1615/CRITREVEUKARGENEEXPR.V20.I2.10>
- Pollatou, A., Filippi, C. A., Aydin, E., Vaughn, K., Thompson, D., Korom, M., Dufford, A. J., Howell, B., Zöllei, L., Martino, A. Di, Graham, A., Scheinost, D., & Spann, M. N. (2022). An ode to fetal, infant, and toddler neuroimaging: Chronicling early clinical to research applications with MRI, and an introduction to an academic society connecting the field. *Developmental Cognitive Neuroscience*, 54, 101083. <https://doi.org/10.1016/J.DCN.2022.101083>

- Raghavan, A., & Shah, Z. A. (2014). Neurodegenerative disease. Diet, Exercise, and Chronic Disease: The Biological Basis of Prevention, 339–390. <https://doi.org/10.1201/b16783>
- Ratajczak, J., Miekus, K., Kucia, M., Zhang, J., Reca, R., Dvorak, P., & Ratajczak, M. Z. (2006). Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*, 20(5), 847–856. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404132>
- Rueda-O., A. del P., Enríquez-S., L. F., Rueda-O., A. del P., & Enríquez-S., L. F. (2018). UNA REVISIÓN DE TÉCNICAS BÁSICAS DE NEUROIMAGEN PARA EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS. *Biosalud*, 17(2), 59–90. <https://doi.org/10.17151/BIOSA.2018.17.2.5>
- Vargas-Sanchez, K., Vekris, A., & Petry, K. G. (2016). DNA Subtraction of In vivo Selected Phage Repertoires for Efficient Peptide Pathology Biomarker Identification in Neuroinflammation Multiple Sclerosis Model. *Biomarker Insights*, 11, 19. <https://doi.org/10.4137/BMI.S32188>
- Zhang, J. M., & An, J. (2007). Cytokines, Inflammation and Pain. *International Anesthesiology Clinics*, 45(2), 27. <https://doi.org/10.1097/AIA.0B013E318034194E>
- Afonina, I. S., Müller, C., Martin, S. J., & Beyaert, R. (2015). Proteolytic Processing of Interleukin-1 Family Cytokines: Variations on a Common Theme. *Immunity*, 42(6), 991–1004. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2015.06.003>
- Ensayo de citotoxicidad CyQUANT™ LDH. (n.d.). Retrieved May 1, 2022, from [https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C20300?gclid=Cj0KCQjw37iTBhCWARIsACBt1lwX2Q2-j1ewi1ITyXbW-d4FB2bAz7P-4ny4in35p460cz0VR3vqiK8aAmwAEALw\\_wcB&ef\\_id=Cj0KCQjw37iTBhCWARIsACBt1lwX2Q2-j1ewi1ITyXbW-d4FB2bAz7P-4ny4in35p460cz0VR3vqiK8aAmwAEALw\\_wcB:G:s&s\\_kwcid=AL!3652!3!447292198751!!!g!!&cid=bid\\_pca\\_iva\\_r01\\_co\\_cp1359\\_pjt0000\\_bid00000\\_0se\\_ga\\_w\\_dy\\_pur\\_con](https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C20300?gclid=Cj0KCQjw37iTBhCWARIsACBt1lwX2Q2-j1ewi1ITyXbW-d4FB2bAz7P-4ny4in35p460cz0VR3vqiK8aAmwAEALw_wcB&ef_id=Cj0KCQjw37iTBhCWARIsACBt1lwX2Q2-j1ewi1ITyXbW-d4FB2bAz7P-4ny4in35p460cz0VR3vqiK8aAmwAEALw_wcB:G:s&s_kwcid=AL!3652!3!447292198751!!!g!!&cid=bid_pca_iva_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_ga_w_dy_pur_con)
- Erkkinen, M. G., Kim, M.-O., & Geschwind, M. D. (n.d.). Clinical Neurology and Epidemiology of the Major Neurodegenerative Diseases. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033118>
- Fields, J. K., Günther, S., & Sundberg, E. J. (2019). Structural basis of IL-1 family cytokine signaling. *Frontiers in Immunology*, 10(JUN), 1412. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.01412/BIBTEX>
- Gaona, I. M. S., Castillo, Y. M., Losada-Barragán, M., Sanchez, K. V., Rincón, J.
- Vargas, C. A. P., & Pérez, D. L. (2021). Characterization of Zero-Valent Iron Nanoparticles Functionalized with a Biomarker Peptide. *Materials Research*, 24(5), 20200599. <https://doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2020-0599>
- Gkagkanasiou, M., Ploussi, A., Gazouli, M., & Efstathopoulos, E. P. (2016).
- USPIO-Enhanced MRI Neuroimaging: A Review. *Journal of Neuroimaging: Official Journal of the American Society of Neuroimaging*, 26(2), 161–168. <https://doi.org/10.1111/JON.12318>
- Kit de ensayo SOD de superóxido dismutasa, Cayman Chemical – Probiotek. (n.d.). Retrieved May 1, 2022, from <https://www.probiotek.com/productos/reactivos/superoxide-dismutase-assay-kit/>

- Merenstein, J. L., & Bennett, I. J. (2022). Neuroimaging studies of mental disorders. Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91497-0.00030-8>
- Milatovic, D., Zaja-Milatovic, S., Breyer, R. M., Aschner, M., & Montine, T. J. (2017). Neuroinflammation and oxidative injury in developmental neurotoxicity. *Reproductive and Developmental Toxicology*, 1051–1061. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804239-7.00055-X>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2020, September 21). Demencia. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
- Parameswaran, N., & Patial, S. (2010). Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Signaling in Macrophages. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 20(2), 87. <https://doi.org/10.1615/CRITREVEUKARGENEEXPR.V20.I2.10>
- Pollatou, A., Filippi, C. A., Aydin, E., Vaughn, K., Thompson, D., Korom, M., Dufford, A. J., Howell, B., Zöllei, L., Martino, A. Di, Graham, A., Scheinost, D., & Spann, M. N. (2022). An ode to fetal, infant, and toddler neuroimaging: Chronicling early clinical to research applications with MRI, and an introduction to an academic society connecting the field. *Developmental Cognitive Neuroscience*, 54, 101083. <https://doi.org/10.1016/J.DCN.2022.101083>
- Raghavan, A., & Shah, Z. A. (2014). Neurodegenerative disease. Diet, Exercise, and Chronic Disease: The Biological Basis of Prevention, 339–390. <https://doi.org/10.1201/b16783>
- Ratajczak, J., Miekus, K., Kucia, M., Zhang, J., Reca, R., Dvorak, P., & Ratajczak, M. Z. (2006). Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*, 20(5), 847–856. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404132>
- Rueda-O., A. del P., Enríquez-S., L. F., Rueda-O., A. del P., & Enríquez-S., L. F. (2018). UNA REVISIÓN DE TÉCNICAS BÁSICAS DE NEUROIMAGEN PARA EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS. *Biosalud*, 17(2), 59–90. <https://doi.org/10.17151/BIOSA.2018.17.2.5>
- Vargas-Sanchez, K., Vekris, A., & Petry, K. G. (2016). DNA Subtraction of In vivo Selected Phage Repertoires for Efficient Peptide Pathology Biomarker Identification in Neuroinflammation Multiple Sclerosis Model. *Biomarkersights*, 11, 19. <https://doi.org/10.4137/BMI.S32188>
- Zhang, J. M., & An, J. (2007). Cytokines, Inflammation and Pain. *International Anesthesiology Clinics*, 45(2), 27. <https://doi.org/10.1097/AIA.0B013E318034194E>
- Afonina, I. S., Müller, C., Martin, S. J., & Beyaert, R. (2015). Proteolytic Processing of Interleukin-1 Family Cytokines: Variations on a Common Theme. *Immunity*, 42(6), 991–1004. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2015.06.003>
- Ensayo de citotoxicidad CyQUANTTM LDH. (n.d.). Retrieved May 1, 2022, from [https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C20300?gclid=Cj0KCQjw37iTbhCWARIsACBt1lwX2Q2-j1ewi1ITyXbW-d4FB2bAz7P-4ny4in35p460cz0VR3vqiK8aAmwAEALw\\_wcB&ef\\_id=Cj0KCQjw37iTbhCWA\\_RIsACBt1lwX2Q2-j1ewi1ITyXbW-d4FB2bAz7P-4ny4in35p460cz0VR3vqiK8aAmwAEALw\\_wcB:G:s&s\\_kwid=AL!3652!3!447292198751!!!g!!&cid=bid\\_pca\\_iva\\_r01\\_co\\_cp1359\\_pjt0000\\_bid00000\\_0se\\_ga\\_w\\_dy\\_pur\\_con](https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C20300?gclid=Cj0KCQjw37iTbhCWARIsACBt1lwX2Q2-j1ewi1ITyXbW-d4FB2bAz7P-4ny4in35p460cz0VR3vqiK8aAmwAEALw_wcB&ef_id=Cj0KCQjw37iTbhCWA_RIsACBt1lwX2Q2-j1ewi1ITyXbW-d4FB2bAz7P-4ny4in35p460cz0VR3vqiK8aAmwAEALw_wcB:G:s&s_kwid=AL!3652!3!447292198751!!!g!!&cid=bid_pca_iva_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_ga_w_dy_pur_con)
- Erkkinen, M. G., Kim, M.-O., & Geschwind, M. D. (n.d.). Clinical Neurology and Epidemiology of the

Major Neurodegenerative Diseases. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033118>

Fields, J. K., Günther, S., & Sundberg, E. J. (2019). Structural basis of IL-1 family cytokine signaling. *Frontiers in Immunology*, 10(JUN), 1412. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.01412/BIBTEX>

Gkagkanasiou, M., Ploussi, A., Gazouli, M., & Efstathopoulos, E. P. (2016).

USPIO-Enhanced MRI Neuroimaging: A Review. *Journal of Neuroimaging: Official Journal of the American Society of Neuroimaging*, 26(2), 161–168. <https://doi.org/10.1111/JON.12318>

Kit de ensayo SOD de superóxido dismutasa, Cayman Chemical – Probiotek. (n.d.). Retrieved May 1, 2022, from <https://www.probiotek.com/productos/reactivos/superoxide-dismutase-assay-kit/>

Merenstein, J. L., & Bennett, I. J. (2022). Neuroimaging studies of mental disorders. Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91497-0.00030-8>

Milatovic, D., Zaja-Milatovic, S., Breyer, R. M., Aschner, M., & Montine, T. J. (2017). Neuroinflammation and oxidative injury in developmental neurotoxicity. *Reproductive and Developmental Toxicology*, 1051–1061. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804239-7.00055-X>

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2020, September 21). Demencia. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>

Parameswaran, N., & Patial, S. (2010). Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Signaling in Macrophages. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 20(2), 87. <https://doi.org/10.1615/CRITREVEUKARGENEEXPR.V20.I2.10>

Pollatou, A., Filippi, C. A., Aydin, E., Vaughn, K., Thompson, D., Korom, M., Dufford, A. J., Howell, B., Zöllei, L., Martino, A. Di, Graham, A., Scheinost, D., & Spann, M. N. (2022). An ode to fetal, infant, and toddler neuroimaging:

- Chronicling early clinical to research applications with MRI, and an introduction to an academic society connecting the field. *Developmental Cognitive Neuroscience*, 54, 101083. <https://doi.org/10.1016/J.DCN.2022.101083>
- Raghavan, A., & Shah, Z. A. (2014). Neurodegenerative disease. Diet, Exercise, and Chronic Disease: The Biological Basis of Prevention, 339–390. <https://doi.org/10.1201/b16783>
- Ratajczak, J., Miekus, K., Kucia, M., Zhang, J., Reza, R., Dvorak, P., & Ratajczak, M. Z. (2006). Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*, 20(5), 847–856. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404132>
- Rueda-O., A. del P., Enríquez-S., L. F., Rueda-O., A. del P., & Enríquez-S., L. F. (2018). UNA REVISIÓN DE TÉCNICAS BÁSICAS DE NEUROIMAGEN PARA EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS. *Biosalud*, 17(2), 59–90. <https://doi.org/10.17151/BIOSA.2018.17.2.5>
- Vargas-Sanchez, K., Vekris, A., & Petry, K. G. (2016). DNA Subtraction of In vivo Selected Phage Repertoires for Efficient Peptide Pathology Biomarker Identification in Neuroinflammation Multiple Sclerosis Model. *Biomarker Insights*, 11, 19. <https://doi.org/10.4137/BMI.S32188>
- Zhang, J. M., & An, J. (2007). Cytokines, Inflammation and Pain. *International Anesthesiology Clinics*, 45(2), 27. <https://doi.org/10.1097/AIA.0B013E318034194E>
- Afonina, I. S., Müller, C., Martin, S. J., & Beyaert, R. (2015). Proteolytic Processing of Interleukin-1 Family Cytokines: Variations on a Common Theme. *Immunity*, 42(6), 991–1004. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2015.06.003>
- Ensayo de citotoxicidad CyQUANTTM LDH. (n.d.). Retrieved May 1, 2022, from [https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C20300?gclid=Cj0KCQjw37iTbHcWARIsACBt1lwX2Q2-j1ewi1ITyXbW-d4FB2bAz7P-4ny4in35p460cz0VR3vqiK8aAmwAEALw\\_wcB&ef\\_id=Cj0KCQjw37iTbHcWARIsACBt1lwX2Q2-j1ewi1ITyXbW-d4FB2bAz7P-4ny4in35p460cz0VR3vqiK8aAmwAEALw\\_wcB:G:s&s\\_kwid=AL!3652!3!447292198751!!!g!!&cid=bid\\_pca\\_iva\\_r01\\_co\\_cp1359\\_pjt0000\\_bid00000\\_0se\\_ga\\_w\\_dy\\_pur\\_con](https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C20300?gclid=Cj0KCQjw37iTbHcWARIsACBt1lwX2Q2-j1ewi1ITyXbW-d4FB2bAz7P-4ny4in35p460cz0VR3vqiK8aAmwAEALw_wcB&ef_id=Cj0KCQjw37iTbHcWARIsACBt1lwX2Q2-j1ewi1ITyXbW-d4FB2bAz7P-4ny4in35p460cz0VR3vqiK8aAmwAEALw_wcB:G:s&s_kwid=AL!3652!3!447292198751!!!g!!&cid=bid_pca_iva_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_ga_w_dy_pur_con)
- Erkkinen, M. G., Kim, M.-O., & Geschwind, M. D. (n.d.). Clinical Neurology and Epidemiology of the Major Neurodegenerative Diseases. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033118>
- Fields, J. K., Günther, S., & Sundberg, E. J. (2019). Structural basis of IL-1 family cytokine signaling. *Frontiers in Immunology*, 10(JUN), 1412. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.01412/BIBTEX>
- Gkagkanasiou, M., Ploussi, A., Gazouli, M., & Efstathopoulos, E. P. (2016).
- USPIO-Enhanced MRI Neuroimaging: A Review. *Journal of Neuroimaging: Official Journal of the American Society of Neuroimaging*, 26(2), 161–168. <https://doi.org/10.1111/JON.12318>
- Kit de ensayo SOD de superóxido dismutasa, Cayman Chemical – Probiotek. (n.d.). Retrieved May 1, 2022, from <https://www.probiotek.com/productos/reactivos/superoxide-dismutase-assay-kit/>
- Merenstein, J. L., & Bennett, I. J. (2022). Neuroimaging studies of mental disorders. Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91497-0.00030-8>

- Milatovic, D., Zaja-Milatovic, S., Breyer, R. M., Aschner, M., & Montine, T. J. (2017). Neuroinflammation and oxidative injury in developmental neurotoxicity. *Reproductive and Developmental Toxicology*, 1051–1061. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804239-7.00055-X>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2020, September 21). Demencia. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
- Parameswaran, N., & Patial, S. (2010). Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Signaling in Macrophages. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 20(2), 87. <https://doi.org/10.1615/CRITREVEUKARGENEEXPR.V20.I2.10>
- Pollatou, A., Filippi, C. A., Aydin, E., Vaughn, K., Thompson, D., Korom, M., Dufford, A. J., Howell, B., Zöllei, L., Martino, A. Di, Graham, A., Scheinost, D., & Spann, M. N. (2022). An ode to fetal, infant, and toddler neuroimaging: Chronicling early clinical to research applications with MRI, and an introduction to an academic society connecting the field. *Developmental Cognitive Neuroscience*, 54, 101083. <https://doi.org/10.1016/J.DCN.2022.101083>
- Raghavan, A., & Shah, Z. A. (2014). Neurodegenerative disease. Diet, Exercise, and Chronic Disease: The Biological Basis of Prevention, 339–390. <https://doi.org/10.1201/b16783>
- Ratajczak, J., Miekus, K., Kucia, M., Zhang, J., Reca, R., Dvorak, P., & Ratajczak, M. Z. (2006). Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*, 20(5), 847–856. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404132>
- Rueda-O., A. del P., Enríquez-S., L. F., Rueda-O., A. del P., & Enríquez-S., L. F. (2018). UNA REVISIÓN DE TÉCNICAS BÁSICAS DE NEUROIMAGEN PARA EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS. *Biosalud*, 17(2), 59–90. <https://doi.org/10.17151/BIOSA.2018.17.2.5>
- Vargas-Sanchez, K., Vekris, A., & Petry, K. G. (2016). DNA Subtraction of In vivo Selected Phage Repertoires for Efficient Peptide Pathology Biomarker Identification in Neuroinflammation Multiple Sclerosis Model. *Biomarker Insights*, 11, 19. <https://doi.org/10.4137/BMI.S32188>
- Zhang, J. M., & An, J. (2007). Cytokines, Inflammation and Pain. *International Anesthesiology Clinics*, 45(2), 27. <https://doi.org/10.1097/AIA.0B013E318034194E>
- Afonina, I. S., Müller, C., Martin, S. J., & Beyaert, R. (2015). Proteolytic Processing of Interleukin-1 Family Cytokines: Variations on a Common Theme. *Immunity*, 42(6), 991–1004. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2015.06.003>
- Ensayo de citotoxicidad CyQUANTTM LDH. (n.d.). Retrieved May 1, 2022, from [https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C20300?gclid=Cj0KCQjw37iTBhCWARlSACBt1lwX2Q2-j1ewi1ITyXbW-d4FB2bAz7P-4ny4in35p460cz0VR3vqiK8aAmwAEALw\\_wcB&ef\\_id=Cj0KCQjw37iTBhCWARlSACBt1lwX2Q2-j1ewi1ITyXbW-d4FB2bAz7P-4ny4in35p460cz0VR3vqiK8aAmwAEALw\\_wcB:G:s&s\\_kwid=AL!3652!3!447292198751!!!g!!&cid=bid\\_pca\\_iva\\_r01\\_co\\_cp1359\\_pjt0000\\_bid00000\\_0s\\_e\\_gaw\\_dy\\_pur\\_con](https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C20300?gclid=Cj0KCQjw37iTBhCWARlSACBt1lwX2Q2-j1ewi1ITyXbW-d4FB2bAz7P-4ny4in35p460cz0VR3vqiK8aAmwAEALw_wcB&ef_id=Cj0KCQjw37iTBhCWARlSACBt1lwX2Q2-j1ewi1ITyXbW-d4FB2bAz7P-4ny4in35p460cz0VR3vqiK8aAmwAEALw_wcB:G:s&s_kwid=AL!3652!3!447292198751!!!g!!&cid=bid_pca_iva_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0s_e_gaw_dy_pur_con)
- Erkkinen, M. G., Kim, M.-O., & Geschwind, M. D. (n.d.). Clinical Neurology and Epidemiology of the Major Neurodegenerative Diseases. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033118>
- Fields, J. K., Günther, S., & Sundberg, E. J. (2019). Structural basis of IL-1 family cytokine signaling. *Frontiers in Immunology*, 10(JUN), 1412. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.01412/BIBTEX>



- Gao, F. (2021). Integrated Positron Emission Tomography/Magnetic Resonance Imaging in clinical diagnosis of Alzheimer's disease. *European Journal of Radiology*, 145, 110017.  
<https://doi.org/10.1016/J.EJRAD.2021.110017>
- Gaona, I. M. S., Castillo, Y. M., Losada-Barragán, M., Sanchez, K. V., Rincón, J., Vargas, C. A. P., & Pérez, D. L. (2021). Characterization of Zero-Valent Iron Nanoparticles Functionalized with a Biomarker Peptide. *Materials Research*, 24(5), 20200599. <https://doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2020-0599>
- Gkagkanasiou, M., Ploussi, A., Gazouli, M., & Efstathopoulos, E. P. (2016).
- USPIO-Enhanced MRI Neuroimaging: A Review. *Journal of Neuroimaging: Official Journal of the American Society of Neuroimaging*, 26(2), 161–168. <https://doi.org/10.1111/JON.12318>
- Kit de ensayo SOD de superóxido dismutasa, Cayman Chemical – Probiotek. (n.d.). Retrieved May 1, 2022, from <https://www.probiotek.com/productos/reactivos/superoxide-dismutase-assay-kit/>
- Merenstein, J. L., & Bennett, I. J. (2022). Neuroimaging studies of mental disorders. Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91497-0.00030-8>
- Milatovic, D., Zaja-Milatovic, S., Breyer, R. M., Aschner, M., & Montine, T.
- J. (2017). Neuroinflammation and oxidative injury in developmental neurotoxicity. *Reproductive and Developmental Toxicology*, 1051–1061. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804239-7.00055-X>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2020, September 21).  
 Demencia. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
- Parameswaran, N., & Patial, S. (2010). Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Signaling in Macrophages. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 20(2), <https://doi.org/10.1615/CRITREVEUKARGENEEXPR.V20.I2.10>
- Pollatou, A., Filippi, C. A., Aydin, E., Vaughn, K., Thompson, D., Korom, M., Dufford, A. J., Howell, B., Zöllei, L., Martino, A. Di, Graham, A., Scheinost, D., & Spann, M. N. (2022). An ode to fetal, infant, and toddler neuroimaging: Chronicling early clinical to research applications with MRI, and an introduction to an academic society connecting the field. *Developmental Cognitive Neuroscience*, 54, 101083.  
<https://doi.org/10.1016/J.DCN.2022.101083>
- Raghavan, A., & Shah, Z. A. (2014). Neurodegenerative disease. Diet, Exercise, and Chronic Disease: The Biological Basis of Prevention, 339–390. <https://doi.org/10.1201/b16783>
- Ratajczak, J., Miekus, K., Kucia, M., Zhang, J., Reca, R., Dvorak, P., & Ratajczak, M. Z. (2006). Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*, 20(5), 847–856. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404132>
- Rueda-O., A. del P., Enríquez-S., L. F., Rueda-O., A. del P., & Enríquez-S.,  
 L. F. (2018). UNA REVISIÓN DE TÉCNICAS BÁSICAS DE NEUROIMAGEN PARA EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS. *Biosalud*, 17(2), 59–90.  
<https://doi.org/10.17151/BIOSA.2018.17.2.5>

- Vargas-Sanchez, K., Vekris, A., & Petry, K. G. (2016). DNA Subtraction of In vivo Selected Phage Repertoires for Efficient Peptide Pathology
- Biomarker Identification in Neuroinflammation Multiple Sclerosis Model. *Biomarker Insights*, 11, 19. <https://doi.org/10.4137/BMI.S32188>
- Zhang, J. M., & An, J. (2007). Cytokines, Inflammation and Pain. *International Anesthesiology Clinics*, 45(2), <https://doi.org/10.1097/AIA.0B013E318034194E>
- OPS/OMS, (2019). Trastornos neurológicos: un serio desafío para la salud pública en las Américas y en todo el mundo. Sitio Web. Pan American Health Organization / World Health Organization. Available at: [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=240:2008-trastornos-neuologicos-un-serio-desafio-salud-publica-americas-todo-mundo&Itemid=40595&lang=es](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=240:2008-trastornos-neuologicos-un-serio-desafio-salud-publica-americas-todo-mundo&Itemid=40595&lang=es)
- Torres Courchoud, I. and Pérez Calvo, J. (2019). Biomarcadores y práctica clínica. Sitio Web. Scielo.isciii.es. Available at: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1137-66272016000100001](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272016000100001)
- Elaine K. Gallin, Maryrose Franko, Enriqueta Bond. (2018). Chapter 35 - Philanthropy's Role in Advancing Biomedical Research. Academic Press, 4, 611-630.
- Farida Sohrabji, C. Jane Welsh, Doodipala Samba Reddy. (2016). Sex Differences in the Central Nervous System. *Science Direct*, 1, 297-323.
- Omar Chiquisana. (2018). El papel de las membranas basales en la integridad de los vasos sanguíneos del SNC. 13 de diciembre 2019, de neuroinflammation Sitio web: <http://www.neuroinflammation.eu/en/The-role-of-basement-membranes-in-CNS-blood-vessel-integrity>
- Tam, W., Au, N. & Ma, C. The association between laminin and microglial morphology in vitro. *Sci Rep* 6, 28580 (2016) doi:10.1038/srep28580
- Pamela J, Leina Gary A, Banker b, Dennis Higginsa. (2010). Laminin selectively enhances axonal growth and accelerates the development of polarity by hippocampal neurons in culture. *Developmental Brain Research*, 69, 191-197.
- Omar Herrera-Vázquez, Andrea Toledo Rojas, Agnès Fleury. (27 Noviembre 2015). Neuroinflamación y epilepsia. *Revista especializada en ciencias Químico-Biológicas*, 19, 1.
- Mayo Clinic. (2019). Enfermedad de Alzheimer. 13 de Diciembre 2019, de Mayo Clinic Sitio web: <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/alzheimers-disease/diagnosis-treatment/drc-20350453>
- Mayo Clinic. (2019). Exploración por tomografía por emisión de positrones. 13 de Diciembre 2019, de Mayo Clinic Sitio web: <https://www.mayoclinic.org/es-es/tests-procedures/pet-scan/about/pac-20385078>
- National Institutes of Health. (2012). Tomografía Computarizada. 13 de diciembre 2019, de National Institute on Biomedical Imaging and Bioengineering Sitio web: <https://www.nibib.nih.gov/espanol/temas-cientificos/tomograf%C3%ADa-computarizada-tc>
- James W Prichard , Jeffry R Alger. (2000). La revolución de RMN en imágenes cerebrales. *thebmj*, 319, 1302.
- Ministerio de Salud. (2017). Boletín de salud mental. Demencia. Bogotá: Subdirección de enfermedades no transmisibles.

- OMS. (2016). ¿Qué son los trastornos neurológicos?.de Organización Mundial de la Salud Sitio web: <https://www.who.int/features/qa/55/es/>
- Edward A. Neuwelt, Bronwyn E, Hamilton, Csanad G. Varallyay, William R. Rooney , Robert D. Edelman, Paula M. Jacobs, Suzanne G. Watnick.. (2008). Ultrasmall superparamagnetic iron oxides (USPIOs): a future alternative magnetic resonance (MR) contrast agent for patients at risk for nephrogenic systemic fibrosis (NSF)?
- Gustavo Fermin, Sefhra Rampersad, PaulaTennant. (2018). Viruses as Tools of Biotechnology: Therapeutic Agents, Carriers of Therapeutic Agents and Genes, Nanomaterials, and More. Viruses, Chapter 12, 291- 316.
- Justyna Bazan, Ireneusz Całkosiński, Andrzej Gamian. (2012). Phage display—A powerful technique for immunotherapy. Human Vaccines and immunotherapeutics, 12, 1817–1828.
- Mariagrazia Di Marco, Claudia Sadun, Marc Port, Irene Guilbert, Patrick Couvreur, Catherine Dubernet. (2007). Physicochemical characterization of ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles (USPIO) for biomedical application as MRI contrast agents. International Journal of Nanomedicine, 2, 609 - 622.
- Berger C, Hiestand P, Kindler-Baumann D, Rudin M, Rausch M. Analysis of lesion development during acute inflammation and remission in a rat model of experimental autoimmune encephalomyelitis by visualization of macrophage infiltration, demyelination and blood-brain barrier damage. NMR Biomed. 2006 Feb; 19(1):101–7.
- Floris S, Blezer ELA, Schreibelt G, Döpp E, van der Pol SMA, Schadee- Eestermans IL, et al. Blood-brain barrier permeability and monocyte infiltration in experimental allergic encephalomyelitis: a quantitative MRI study. Brain J Neurol. 2004 Mar;127(Pt 3):616–27
- Baggiolini, M., et al. (1992). Interleucina-8: una citocina quimiotáctica e inflamatoria. Cartas FEBS, 307(1), 97-101
- Waugh, DJ y Wilson, C. (2008). La vía de la interleucina-8 en el cáncer. Investigación clínica del cáncer, 14(21), 6735-6741
- Standiford, TJ, et al. (1993). La proteína inflamatoria de macrófagos-1 alfa media el reclutamiento de leucocitos pulmonares, la fuga capilar pulmonar y la mortalidad temprana en la endotoxemia murina. Revista de Inmunología, 150(12), 4990-4999
- Carr, MW, et al. (1994). La proteína 1 quimioatrayente de monocitos actúa como un quimioatrayente de linfocitos T. Actas de la Academia Nacional de Ciencias, 91(9), 3652-3656
- Ransohoff, RM, et al. (2007). Quimiocinas y receptores de quimiocinas: de pie en la encrucijada de la inmunobiología y la neurobiología. Inmunidad, 26(6), 677-686.
- Deshmane, SL, et al. (2009). Proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1): una descripción general. Revista de investigación de interferón y citocinas, 29(6), 313-326.