

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE VITORIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO



Universidad
Francisco de Vitoria
UFV Madrid

**Programa de doctorado en Biotecnología, Medicina y Ciencias
Biosanitarias**

TESIS DOCTORAL

**SÍNTESIS Y ACTIVIDAD ANTI-NEUROINFLAMATORIA DE DERIVADOS DE
ISATINA Y NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA EL TRANSPORTE DE
FÁRMACOS**

Autor:

Alejandro Cenalmor Molina

Directora:

Isabel García Álvarez

Pozuelo de Alarcón (Madrid) 2023

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi directora de tesis, la Dra. Isabel García Álvarez, haberme dado la oportunidad de formar parte del grupo de investigación de Química Biológica y haber confiado en mí tanto cuando las cosas han ido bien y como cuando no han resultado como se esperaba. Gracias por tu enorme atención y apoyo a lo largo de la tesis, sin ti, no habría llegado hasta donde estoy ahora. Me siento muy orgulloso de decir que he tenido la inmensa suerte de elegir bien. Me has permitido una libertad total para proponer ideas y asumir los errores como parte del proceso de mi formación como investigador.

De la misma forma, también me gustaría agradecer a los miembros del grupo de investigación su apoyo. A la Dra. Gracia García por su inestimable ayuda con la obtención y caracterización de las nanopartículas. Por ser una gran científica y tomarse su tiempo para aconsejarme en cualquier duda, uno no deja de aprender trabajando contigo. También a la Dra. Elena Pascual porque, aunque no hemos compartido tantas horas de laboratorio, siempre has estado ahí cuando te he necesitado para echar una mano con los cultivos y los ensayos de las BV2. A la Dra. Bárbara Rodríguez por ayudarme a hacerme con el HPLC y al análisis de los datos. Le doy las gracias a la Dra. Susana Martín, por haberme dedicado tiempo para ayudarme a repasar lo que vimos en las lecciones de Química, algo oxidadas en mi mente al inicio de esta tesis. Gracias por estar siempre dispuesta a ayudar ante cualquier cuestión, y su buen humor al ver que estaba tan perdido como al principio de la carrera.

Al Dr. José María Bueno, por ayudarme a comprender los fundamentos de muchas reacciones y por sus consejos para optimizar las purificaciones de los compuestos. Gracias a ti conseguí comprender la forma de optimizar las purificaciones en el Isolera. Haces que los que te escuchan disfruten tanto de la química como tú.

Gracias a la Dra. Rosa María Tolón, por su ayuda en las primeras fases de cultivos celulares y para entender el cuidado especial que estas necesitan.

A las Dras Ana María Martínez y María Teresa Grande por avisarme de los pedidos cuando estoy ausente y por indicarme los fundamentos de la reacción de Griess.

A la Dra María Posada, por las largas conversaciones junto al masas o la campana de gases a las tantas de la mañana cuando ni había salido el sol y la sala de investigación parecía más una cueva.

A mis compañeros más cercanos que se han recorrido el mismo camino que yo durante estos años; al Dr Daniel García, por escucharme y darme siempre tantos ánimos. Por los cafés en el colegio mayor y las tertulias durante la comida. Las coincidencias en el HPLC son más amenas hablando contigo. A la ya Dra María Portela, por su apoyo y sus consejos en el cultivo de células neuronales, y por recomendarme las casas comerciales más asequibles para pedir material en mis primeros momentos en la sala de cultivos. Al Dr Gonzalo Ruiz por recogerme los paquetes cuando me atrapaba la campana de gases. Al Dr Marc Ten, un excelente vecino de mesa y de poyata, el material nunca se pierde cuando andas cerca. Al Dr Tomás Duraj por compartir todas sus ideas conmigo en los ratos de ordenador.

También gracias a todos los que habéis compartido estos años conmigo, Ana, Pepa, Irina y Álvaro de los que he aprendido mucho trabajando a su lado. También a Sandra y a Marta, por llenar el laboratorio de alegría con su presencia por las mañanas, aunque solo sea para ir a cultivos. A Rubén por compartir conmigo los “momentos frikis” a las tantas de la tarde cuando ya no queda casi nadie. Y a Cristina, la persona más enérgica que he conocido, no cambies nunca.

A todos los técnicos de laboratorio con los que he coincidido, que siempre ayudan al funcionamiento diario del laboratorio y me abren la puerta del armario de reactivos todas las veces que sea necesario para que pueda seguir trabajando.

Gracias a todos por los momentos de laboratorio, sin excepción todos me habéis aportado cosas buenas, y realmente espero que lo hayáis sentido así también por mi parte. Es una verdadera suerte haber coincidido con todos vosotros. No podría haber pedido una mejor experiencia.

Agradezco mi estancia a la Universidad Francisco de Vitoria, por la proporcionarme la beca FPI que me permitió realizar mis estudios de Doctorado.

Por último, quiero dirigir mi mayor agradecimiento a mi padre, mi madre y a mi hermana por tener que aguantar todas mis taras, y por haberme apoyado en la decisión de continuar en la ciencia.

Me gustaría agradecer a mi grupo de amigos más cercano, Francisco y Jorge, que llevamos juntos desde que terminamos la ESO y os considero también mis hermanos. A Paco, Carlos, Rubén y Alberto con los que terminé la carrera en la UFV y que ahora la vida nos pone a cada uno en una esquina. Gracias por compartir los logros y escuchar mis penas, espero seguir viendo hasta dónde nos lleva la vida.

Esta tesis doctoral se ha desarrollado en el grupo de Química Biológica, perteneciente al Instituto de Investigaciones Biosanitarias (IIB) de la Universidad Francisco de Vitoria, dentro del programa de Doctorado en Biotecnología, Medicina y Ciencias Biosanitarias.

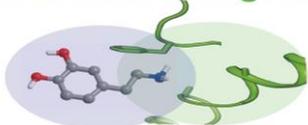
Ha sido financiada por la Universidad Francisco de Vitoria mediante una beca de Formación de Personal Investigador FPI y los siguientes proyectos de investigación:

1. Diseño, preparación y caracterización de nanosondas para el estudio de la neuroquímica fundamental del cerebro (UFV2019).
2. Terapia combinada basada en el uso de nuevos agentes neuro-antiinflamatorios y nanopartículas magnéticas fotomodulables (UFV2022-11).
3. Diseño y preparación de biosensores para estudiar actividad redox en cerebro como herramientas para imagen por resonancia magnética (Fundación Banco Sabadell).

Además, se han establecido colaboraciones con investigadores externos que han contribuido al desarrollo de este trabajo:

- Dr. Rafael Correa Rocha, del Laboratorio de Inmunoregulación, Instituto Gregorio Marañón, donde se ha realizado la cuantificación de citoquinas.
- Dr. Jose Luis Arias, del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Granada, donde se ha realizado la última etapa de preparación de nanopartículas y su caracterización.

QuímicaBiológica



Universidad
Francisco de Vitoria
UFV Madrid
Vicerrectorado de
Investigación y Postgrado

B Sabadell
Fundación

Índice

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
1. Introducción	3
1.1. La respuesta inmune en el sistema nervioso central	3
1.2. Células del sistema nervioso central. Microglía	4
1.3. Proceso de neuroinflamación: mediadores pro-inflamatorios.....	9
1.4. Neuroinflamación y enfermedades neurodegenerativas: Alzheimer	16
1.5. Fármacos antiinflamatorios.....	23
1.5.1. Nuevos fármacos con potencial en neuroinflamación: Estatinas	29
1.5.2. Indoles como precursores sintéticos en la obtención de nuevos fármacos.	32
1.5.3. Derivados de isatina como potenciales fármacos en la neuroinflamación ..	34
1.6. Sistemas de transporte de fármacos	40
1.6.1. Uso de nanopartículas en terapias dirigidas.....	41
1.6.2. Nanopartículas magnéticas.....	45
1.6.3. Diseño y funcionalización de nanopartículas magnéticas.....	47
2. Objetivos.....	53
3. Resultados y Discusión.....	54
3.1. Actividad biológica de isatinas halogenadas en células de microglia de ratón BV2	54
3.1.1. Evaluación del efecto de isatinas halogenadas sobre la viabilidad en BV2	56
3.1.2. Evaluación del efecto de isatinas halogenadas en la liberación del óxido nitríco en un modelo de neuroinflamación.....	59
3.2. Diseño y síntesis de derivados de isatina y estudio de su actividad en BV2.....	62
3.2.1. Síntesis de derivados de isatina	63
3.2.2. Efecto de los derivados sintéticos sobre la viabilidad en BV2	64
3.2.3. Actividad de los derivados de isatina en la liberación de óxido nítrico en un modelo celular de neuroinflamación.....	65
3.2.4. Efecto de los derivados de isatina en la producción de citoquinas pro- inflamatorias IL-6 y TNF- α	69
3.3. Evaluación del efecto de los derivados de isatina sobre la viabilidad en células humanas SH-SY5Y	73
3.4. Predicción de las propiedades farmacológicas de los derivados de isatina.....	75

3.5. Preparación de nanopartículas magnéticas <i>core/shell</i> como sistema de transporte de fármacos	79
3.5.1. Obtención de nanopartículas <i>core/shell</i> ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$)/CS	80
3.5.2. Liofilización de las nanopartículas de ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$)/CS para su conservación	83
3.5.3. Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas	84
3.5.4. Efecto de las nanopartículas sobre la viabilidad celular en BV2	96
3.5.5. Adsorción del fármaco fluvastatina en las nanopartículas <i>core/shell</i>	99
4. Conclusiones	102
5. Materiales y Métodos	104
5.1. Materiales y métodos generales	104
5.2. Síntesis de los derivados de isatina	106
5.2.1. Método general de síntesis de <i>N</i> -derivados	106
5.2.2. Método general de síntesis de 1-(Hidroximetil)-Isatinas	106
5.2.3. Método general de síntesis de isatin hidrazonas	107
5.2.4. Derivados de isatina sintetizados	107
5.3. Cultivos celulares	113
5.3.1. Ensayos de viabilidad celular <i>in vitro</i>	113
5.3.2. Inducción de inflamación en BV2	116
5.3.3. Determinación de la producción de óxido nítrico	117
5.3.4. Determinación de los niveles de citoquinas IL-6 y TNF- α	118
5.4. Análisis estadístico	119
5.5. Caracterización fisicoquímica de derivados de isatina <i>in silico</i>	120
5.6. Formulación y caracterización de nanopartículas	120
5.6.1. Síntesis de núcleos de magnetita y tratamiento con citrato sódico ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$)	120
5.6.2. Incorporación de nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$ en una matriz polimérica de quitosano (($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$)/CS)	122
5.6.3. Liofilización de nanopartículas <i>core/shell</i> ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$)/CS	122
5.6.4. Caracterización fisicoquímica y magnética	123
5.6.5. Método de carga de fluvastatina en las nanopartículas por adsorción superficial	125
Anexos	126
Anexo I: Abreviaturas	126
Anexo II: Espectros de NMR de ^1H y ^{13}C	130

RESUMEN

La neuroinflamación juega un papel crucial en la progresión de la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas. En el Sistema Nervioso Central, una excesiva activación de la microglía causa neurotoxicidad y prolonga la respuesta inflamatoria en muchas neuropatologías, lo que conduce a la pérdida progresiva del tejido neuronal. Por lo tanto, la regulación de la activación microglial representa un objetivo terapéutico importante para el tratamiento de enfermedades del SNC.

En la presente tesis doctoral, se han sintetizado una serie de derivados de isatina y se ha evaluado su actividad anti-neuroinflamatoria empleando microglía activada por lipopolisacárido como modelo celular de neuroinflamación. La isatina (indol 2,3-diona) es una molécula de interés como precursora de compuestos farmacológicamente activos. Aquí se han explorado cuatro sustituciones diferentes en la estructura de la isatina, y se ha determinado la citotoxicidad y actividad anti-neuroinflamatoria de los derivados en la línea celular de microglia murina BV2. En base a su actividad reduciendo la producción de los factores proinflamatorios óxido nítrico (NO), interleucina 6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en microglia activada, los compuestos 1-(3-cloropropil)isatina (**10**) y 5-cloro-1-(hidroximetil)isatina (**20**) han mostrado los mejores resultados anti-neuroinflamatorios sin afectar a la viabilidad celular en BV2 ni en la línea celular humana SH-SY5Y, por lo que son moléculas prometedoras para continuar el desarrollo de futuros agentes neuroprotectores.

Con vistas a una futura administración *in vivo*, se ha desarrollado un sistema para el transporte de fármacos basado en nanopartículas magnéticas embebidas en una matriz de quitosano. Se ha evaluado la citotoxicidad del sistema en células de microglia BV2 y su capacidad para cargar el fármaco fluvastatina como modelo de compuesto activo.

ABSTRACT

Neuroinflammation plays a crucial role in the progression of Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. In the Central Nervous System (CNS), excessive microglial activation causes neurotoxicity and prolongs the inflammatory response in many neuropathologies, leading to progressive loss of neuronal tissue. Therefore, the regulation of microglial activation represents an important therapeutic target for the treatment of CNS diseases.

In this work, a series of isatin derivatives have been synthesized and their anti-neuroinflammatory activity has been evaluated using lipopolysaccharide-activated microglia as a cellular model of neuroinflammation. Isatin (indole 2,3-dione) has significant importance in medicinal chemistry as a precursor of pharmacologically active compounds. Here we have explored four different substitutions in the isatin structure, and determined the cytotoxicity and anti-neuroinflammatory activity of the derivatives in the murine microglia cell line BV2. Based on their activity reducing the production of the proinflammatory factors nitric oxide (NO), interleukin 6 (IL-6) and tumor necrosis factor α (TNF- α) in activated microglia, 1-(3-chloropropyl)isatin (**10**) and 5-chloro-1-(hydroxymethyl)isatin (**20**) compounds have shown the best anti-neuroinflammatory results with low cytotoxicity in BV2 and human cell line SH-SY5Y, making them promising lead compounds for developing new neuroprotective agents.

For future *in vivo* administration, a drug delivery system based on magnetic nanoparticles embedded in a chitosan matrix has been developed. The cytotoxicity of the system has been evaluated in BV2 microglia cells and also its capability to load the drug fluvastatin as a model of active compound.

1. Introducción

1.1. La respuesta inmune en el sistema nervioso central

La inflamación es un mecanismo de defensa del sistema inmune, que se desencadena en respuesta al daño, ya sea ocasionado por patógenos o células dañadas. La inflamación suele producirse como un proceso agudo controlado y una vez que se elimina el estímulo que la produce, se inicia el proceso de reparación y cicatrización del tejido.¹ Sin embargo, cuando la inflamación no se controla adecuadamente, puede desencadenar un amplio número de condiciones patológicas. Esta activación persistente de la respuesta inflamatoria inicial puede deberse tanto a factores endógenos como ambientales.² Se puede definir la inflamación crónica como una forma desregulada de inflamación, mientras que la inflamación aguda, se define como una forma regulada.³

Cuando la inflamación se produce en el sistema nervioso central (SNC), constituido por el cerebro y la médula espinal,⁴ se denomina neuroinflamación y está mediada por la producción de citoquinas proinflamatorias, mensajeros secundarios como el óxido nítrico (NO), prostaglandinas, y especies reactivas de oxígeno (ROS).⁵ Muchos de estos mediadores son producidos por las células residentes en el SNC. De la misma forma, las células del endotelio y los macrófagos perivasculares también son importantes para interpretar y propagar estas señales inflamatorias dentro del SNC.⁴

La neuroinflamación se puede dividir en aguda y crónica. El proceso agudo se inicia de forma rápida, y se resuelve en un período breve durante la lesión. Las células inmunes migran rápidamente al sitio de la lesión y reparan el daño. La neuroinflamación crónica es un proceso prolongado y persistente que puede durar desde varios meses hasta años, provocando un daño sostenido que dará lugar a neurodegeneración.⁶

¹ Chen, L.; Deng, H.; Cui, H.; Fang, J.; Zuo, Z.; Deng, J.; Li, Y.; Wang, X.; Zhao, L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*. **2018**, 9 (6), 7204-7218.

² Nathan, C.; Ding, A. Nonresolving inflammation. *Cell*. **2010**, 140 (6), 871-82.

³ Murakami, M.; Hirano, T. The molecular mechanisms of chronic inflammation development. *Front Immunol*. **2012**, 3, 323.

⁴ DiSabato, D. J.; Quan, N.; Godbout, J. P. Neuroinflammation: the devil is in the details. *J. Neurochem*. **2016**, 139 Suppl 2 (Suppl 2), 136-153.

⁵ Moyse, E.; Krantic, S.; Djellouli, N.; Roger, S.; Angoulvant, D.; Debacq, C.; Leroy, V.; Fougere, B.; Aidoud, A. Neuroinflammation: A Possible Link Between Chronic Vascular Disorders and Neurodegenerative Diseases. *Front. Aging Neurosci*. **2022**, 14, 827263.

⁶ Gorji, A. Neuroinflammation: The Pathogenic Mechanism of Neurological Disorders. *Int. J. Mol. Sci*. **2022**, 23 (10), 5744.

1.2. Células del sistema nervioso central. Microglía

En el SNC, existen dos tipos celulares principales; las neuronas y las células gliales,⁷ y entre las células gliales están los astrocitos, los oligodendrocitos y la microglía.⁸ Las células de la microglía se describieron por Franz Nissl en 1899, constituyen aproximadamente entre el 10 y el 15% de la población de células gliales en el parénquima del cerebro adulto y están involucradas en la respuesta inmune innata.^{9,10}

A diferencia de las neuronas y otras células gliales que se derivan del neuroectodermo, durante el desarrollo las células de microglía se originan como macrófagos primitivos en el saco vitelino embrionario para posteriormente alojarse en el SNC a través del sistema circulatorio donde permanecen toda la vida adulta del individuo. Es durante el desarrollo posnatal cuando estas comienzan a adquirir una morfología ramificada en el cerebro adulto. Esta morfología tan característica de la microglía las diferencia de los macrófagos y las células dendríticas.¹¹

Cuando no se encuentran activadas, las células de la microglía tienen un fenotipo ramificado. En esta etapa de reposo, la microglía examina el microambiente con sus ramificaciones (Figura 1).¹² Este es el estado principal de la microglía en ausencia de señales patológicas en el entorno circundante. Además, las células de la microglía, al igual que ocurre con los macrófagos, presentan capacidad fagocítica expresando de forma constitutiva varias familias de receptores que les facilitan la detección y eliminación de tejidos envejecidos, necróticos y moléculas tóxicas de la circulación y su entorno.^{13,14}

⁷ Fields, R. D.; Araque, A.; Johansen-Berg, H.; Lim, S. S.; Lynch, G.; Nave, K. A.; Nedergaard, M.; Perez, R.; Sejnowski, T.; Wake, H. Glial biology in learning and cognition. *Neurosci.* **2014**, *20* (5), 426-431.

⁸ Kwon, H. S.; Koh, S.-H. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Transl. Neurodegener.* **2020**, *9* (1), 42.

⁹ Lawson, L. J.; Perry, V. H.; Dri, P.; Gordon, S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neurosci.* **1990**, *39* (1), 151-170.

¹⁰ Cherry, J. D.; Olschowka, J. A.; O'Banion, M. K. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J. Neuroinflammation.* **2014**, *11*, 98.

¹¹ Subhramanyam, C. S.; Wang, C.; Hu, Q.; Dheen, S. T. Microglia-mediated neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2019**, *94*, 112-120.

¹² West, P. K.; Viengkhou, B.; Campbell, I. L.; Hofer, M. J. Microglia responses to interleukin-6 and type I interferons in neuroinflammatory disease. *Glia.* **2019**, *67* (10), 1821-1841.

¹³ Yin, J.; Valin, K. L.; Dixon, M. L.; Leavenworth, J. W. The Role of Microglia and Macrophages in CNS Homeostasis, Autoimmunity, and Cancer. *J. Immunol. Res.* **2017**, *2017*, 5150678.

¹⁴ Jurga, A. M.; Paleczna, M.; Kuter, K. Z. Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. *Front. Cell. Neurosci.* **2020**, *14*, 198.

Durante la activación, las células ramificadas (Figura 1, azul) cambian de fenotipo al de células reactivas ameboides (Figura 1, rojo). En estado activado, las células de microglía se caracterizan por una rápida proliferación, producción y secreción de citoquinas, quimiocinas y otros mediadores inflamatorios en respuesta a daño¹². Debido a la activación, la microglía muestra un amplio espectro de fenotipos que van desde el llamado M1 (activación clásica) con efecto proinflamatorio y potencialmente citotóxico, hasta el fenotipo M2 (activación alternativa) con efecto antiinflamatorio y neuroprotector (Figura 1, verde). Estos fenotipos difieren en los estímulos que desencadenan, la expresión de marcadores fenotípicos y mediadores secretados.¹⁵

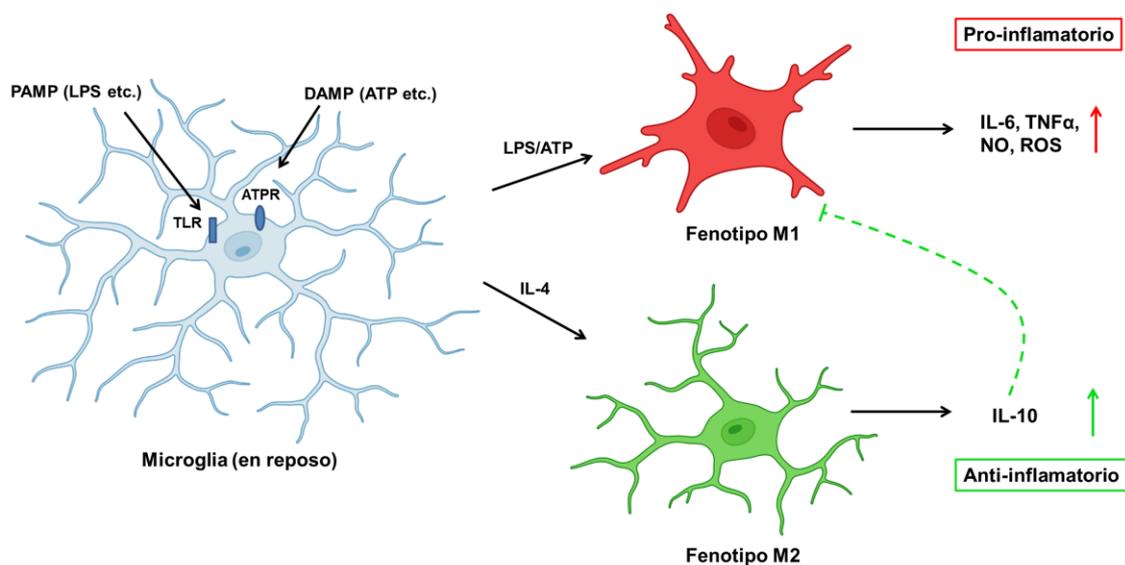


Figura 1. Principales fenotipos de microglía y sus funciones inmunorreguladoras. Las células de microglía ramificadas en su estado de reposo (azul) son estimuladas al detectar la presencia de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o daño (DAMPs) a través de los receptores de tipo *toll* (TLR) o adenosina trifosfato (ATPR) respectivamente. Esto polariza a las células al fenotipo M1 (rojo) que produce citoquinas y mediadores proinflamatorios como IL-6, TNF- α , ROS y NO. La acción de IL-4 induce el fenotipo M2 (verde) que desregula las funciones del fenotipo M1 mediante la citocina antiinflamatoria IL-10. Figura adaptada de Nakagawa *et al.*¹⁶

Para comprender el papel que desempeña la microglía en el desarrollo de enfermedades cerebrales y la neurodegeneración, es necesario conocer las características específicas que presentan sus distintos fenotipos y las diferentes vías

¹⁵ Wendimu, M. Y.; Hooks, S. B. Microglia Phenotypes in Aging and Neurodegenerative Diseases. *Cells*. **2022**, *11* (13), 2091.

¹⁶ Nakagawa, Y.; Chiba, K. Role of Microglial M1/M2 Polarization in Relapse and Remission of Psychiatric Disorders and Diseases. *Pharm.* **2014**, *7*(12), 1028-1048.

de activación, lo que permitirá desarrollar estrategias terapéuticas para modular la activación de la microglia.¹⁵

Los fenotipos M1 y M2 son reversibles y dinámicos, por tanto hay diferentes marcadores fenotípicos coexistiendo juntos, lo que sugiere varios fenotipos intermedios.¹⁷ Como parte de la respuesta inmune innata del SNC, la microglía es la primera línea de defensa contra el daño tisular, activándose a través de los receptores de reconocimiento de patrones moleculares (PRR) que están presentes en las células del sistema inmunitario innato y les permiten a estas la detección de patrones moleculares asociados a patógenos o a daño (PAMP y DAMP respectivamente) como interferón- γ (IFN- γ) o lipopolisacárido (LPS). La vía de activación clásica, o de fenotipo M1 (Figura 1), se estimula a través de PAMPs o DAMPs que se unen a sus respectivos receptores de tipo *toll* (TLRs), TLR4 en el caso de los receptores de LPS que inducen la expresión de factores de transcripción.¹⁵

Las células de microglia presentan diferentes TLRs en sus membranas celulares para poder detectar estos cambios en su entorno, los cuales son PRRs transmembrana caracterizados por un dominio extracelular capaz de unirse de forma específica a los PAMPs o DAMPs.¹⁸ La microglía expresa constitutivamente varios tipos de receptores TLR, y la activación *downstream* de las vías de TLR conducen a la producción de citoquinas, quimiocinas, especies reactivas de oxígeno (ROS) y mensajeros secundarios. Esta liberación de mediadores inflamatorios contribuye tanto a una función protectora del tejido como a una respuesta neurotóxica perjudicial en caso de prolongarse más de lo necesario.⁴

En presencia de LPS, este se une al TLR4, iniciando una cascada de señalización proinflamatoria (Figura 2A). Una vez activado, TLR4 se asocia en el citosol con la proteína adaptadora factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88). MyD88 induce posteriormente la autofosforilación de la quinasa 4 asociada al receptor de interleucina-1 (IRAK4). IRAK4 fosforila y activa a IRAK1, que activa al factor 6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (TRAF6).¹⁹ A continuación, TRAF6 activa el complejo inhibidor de la quinasa kappa B (IKK). El complejo IKK fosforila el inhibidor de kappa B (I κ B), lo que conduce a su degradación y la posterior liberación

¹⁷ Song, G. J.; Suk, K. Pharmacological Modulation of Functional Phenotypes of Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Front. Aging Neurosci.* **2017**, *9*, 139.

¹⁸ Muzio, L.; Viotti, A.; Martino, G. Microglia in Neuroinflammation and Neurodegeneration: From Understanding to Therapy. *Front Neurosci.* **2021**, *15*, 742065.

¹⁹ Guo, S.; Wang, H.; Yin, Y. Microglia Polarization From M1 to M2 in Neurodegenerative Diseases. *Front. Aging Neurosci.* **2022**, *14*, 815347.

del factor nuclear kappa B (NF- κ B) secuestrado en el citosol en su estado de reposo.²⁰ El NF- κ B liberado se transloca al núcleo, donde se une a secuencias de ADN específicas e induce la transcripción de los genes proinflamatorios (Figura 2A).¹¹

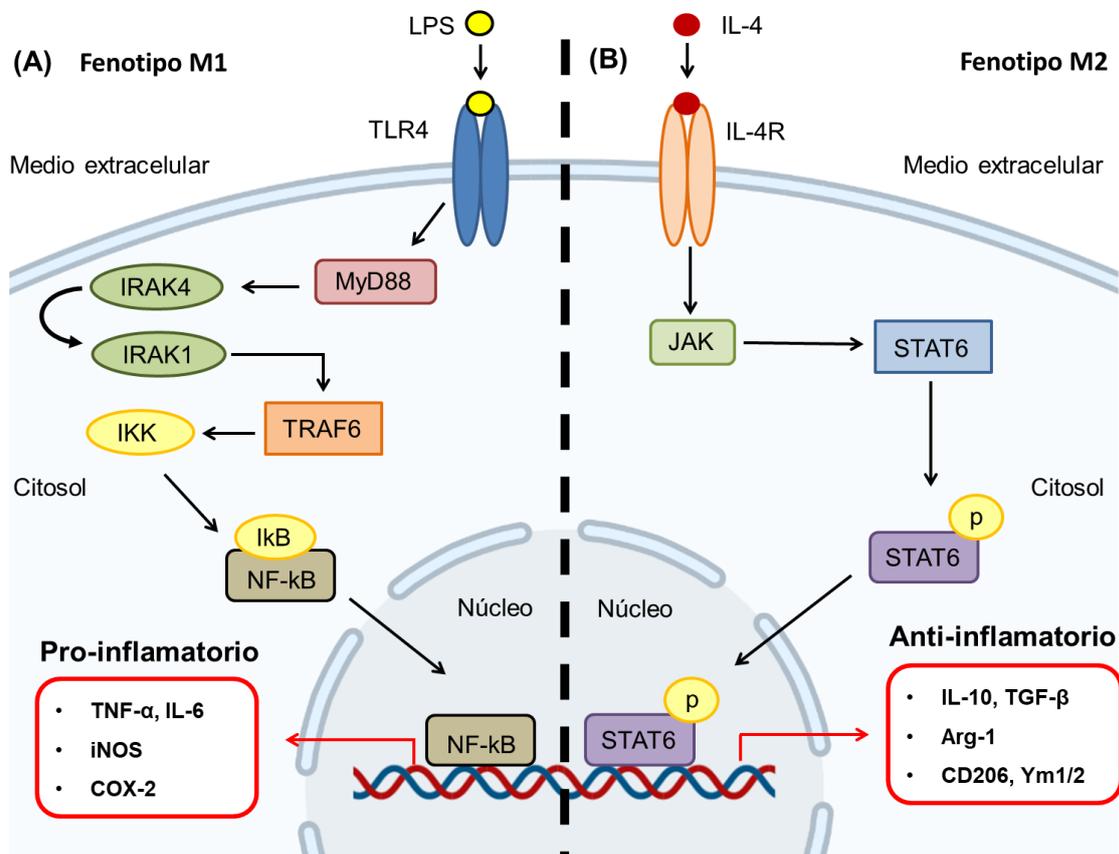


Figura 2. Rutas de inducción de los fenotipos proinflamatorio M1 (A) y antiinflamatorio M2 (B). Las flechas rojas indican la transcripción de los genes; p: grupos fosfato. Figura adaptada de Nheu *et al.*²¹

Esta vía da como resultado la producción de citoquinas relacionadas con el interferón y puede potenciar la transcripción del gen NF- κ B. En última instancia, la transcripción de genes conduce a la producción de interleucinas (IL) IL-1 β , IL-6 o IL-8, factor de necrosis tumoral (TNF) TNF- α y TNF- β , las enzimas óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y ciclooxigenasa 2 (COX-2).^{22,23} Una característica del fenotipo M1 es

²⁰ Castro, L. V. G.; Gonçalves-de-Albuquerque, C. F.; Silva, A. R. Polarization of Microglia and Its Therapeutic Potential in Sepsis. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 4925.

²¹ Nheu, D.; Ellen, O.; Ye, S.; Ozturk, E.; Pagnin, M.; Kertadajaja, S.; Theotokis, P.; Grigoriadis, N.; McLean, C.; Petratos, S. Modulation of the Microglial Nogo-A/NgR Signaling Pathway as a Therapeutic Target for Multiple Sclerosis. *Cells.* **2022**, *11*, 3768.

²² Tu, H.; Chu, H.; Guan, S.; Hao, F.; Xu, N.; Zhao, Z.; Liang, Y. The role of the M1/M2 microglia in the process from cancer pain to morphine tolerance. *Tissue Cell.* **2021**, *68*, 101438.

²³ Stojanovska, V.; Miller, S.; Hooper, S.; Polglase, G. The Consequences of Preterm Birth and Chorioamnionitis on Brainstem Respiratory Centers: Implications for Neurochemical Development and Altered Functions by Inflammation and Prostaglandins. *Front. Cell. Neurosci.* **2018**, *12*, 26.

su capacidad para producir especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS), como el óxido nítrico (NO),¹⁰ mediante la activación de la enzima iNOS, que utiliza la L-arginina como sustrato para producir NO mientras que la enzima implicada en la producción de ROS en microglía es la COX-2.¹⁵

El fenotipo M2 está asociado con la respuesta inmune y la reparación de tejidos a través de la secreción de factores antiinflamatorios y neurotróficos. El estado M2 de la microglía se induce por la producción de las citoquinas antiinflamatorias principales: IL-4, IL-13 y/o IL-10 (Figura 1). Las respuestas proinflamatorias de M1, como la producción de TNF α , IL-6 e iNOS son antagonizadas generalmente por IL-4 e IL-13. De la misma forma, la IL-10 induce el estado de desactivación de la microglía.¹⁵

La unión de IL-4 al receptor de membrana activa la Janus quinasa asociada al receptor (JAK), que fosforila y activa el transductor de señal y activador de la transcripción 6 (STAT6). Una vez activado este factor de transcripción STAT6 se transloca al núcleo donde se une al ADN e induce la expresión de genes asociados con el fenotipo M2 (Figura 2B). Entre los genes inducidos por la señalización de STAT6 en la microglia está la enzima Arginasa-1 (Arg1), la cual es capaz de convertir la L-arginina en poliaminas, prolina y ornitinas, que contribuyen a la cicatrización de heridas y al depósito de matriz extracelular. Además, al utilizar L-arginina como sustrato, impide que iNOS acceda al mismo, regulando así la producción de NO. Por lo tanto, iNOS y Arg1 representan un conjunto de marcadores de los fenotipos proinflamatorio y antiinflamatorio.¹⁰

Otros genes afectados por esta ruta son el receptor de manosa C tipo 1 (Mrc1) o CD206, y Ym1/2, ambos involucrados en respuestas antiinflamatorias.²¹ CD206 es un receptor transmembrana que reconoce y elimina patógenos y desechos extracelulares, además de inducir la producción de citoquinas antiinflamatorias.²⁴ Por su parte, Ym1 e Ym2 bloquean la activación de TLR4, e inducen la producción de citoquinas antiinflamatorias.²⁵

²⁴ Tanaka, S.; Ohgidani, M.; Hata, N.; Inamine, S.; Sagata, N.; Shirouzu, N.; Mukae, N.; Suzuki, S. O.; Hamasaki, H.; Hatae, R.; Sangatsuda, Y.; Fujioka, Y.; Takigawa, K.; Funakoshi, Y.; Iwaki, T.; Hosoi, M.; Iihara, K.; Mizoguchi, M.; Kato, T. A. CD206 Expression in Induced Microglia-Like Cells From Peripheral Blood as a Surrogate Biomarker for the Specific Immune Microenvironment of Neurosurgical Diseases Including Glioma. *Front Immunol.* **2021**, *12*, 670131.

²⁵ Collmann, F. M.; Pijnenburg, R.; Hamzei-Taj, S.; Minassian, A.; Folz-Donahue, K.; Kukat, C.; Aswendt, M.; Hoehn, M. Individual in vivo Profiles of Microglia Polarization After Stroke, Represented by the Genes iNOS and Ym1. *Front Immunol.* **2019**, *10*, 1236.

Tras una respuesta inflamatoria, se espera que una vez desaparezca el estímulo original, esta se resuelva sin mayores consecuencias para el organismo. Sin embargo, cuando la inflamación persiste, la polarización microglial se sesga hacia el fenotipo proinflamatorio M1, que a su vez, induce la producción de citoquinas inflamatorias, generando un ciclo de retroalimentación positiva que induce aún más la inflamación y mantiene el estado M1. Por ello, en el contexto de las enfermedades neurodegenerativas, la neuroinflamación se considera un promotor de la enfermedad.

1.3. Proceso de neuroinflamación: mediadores pro-inflamatorios.

La neuroinflamación es una característica común en muchas enfermedades neurodegenerativas. Como se ha comentado, la microglia libera mediadores inflamatorios que desempeñan un papel importante en la patogénesis de la neurodegeneración y las lesiones asociadas.¹⁹ Por ello, recientemente se ha reconocido a la microglía como una diana terapéutica importante para el tratamiento de enfermedades del SNC.¹⁵

Citoquinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-6.

Entre los mediadores pro-inflamatorios más importantes liberados por la microglía están las citoquinas TNF- α e IL-6. Estas citoquinas son capaces de activar a otras células inmunitarias y reclutar microglía adicional en el sitio donde se produce la lesión o inflamación.²⁶ TNF- α se identificó originalmente en 1975 como un factor que conduce a la necrosis rápida en tumores.²⁷ Actualmente, se considera una citoquina proinflamatoria involucrada en el inicio y desarrollo de la respuesta inmune innata. Durante la neuroinflamación, la microglía es la principal encargada de la producción de TNF- α , aunque los astrocitos y las neuronas también presentan esta capacidad.²⁸

El TNF- α se sintetiza como una proteína transmembrana (tm-TNF- α), cuya escisión del dominio extracelular libera el homotrímero de TNF- α soluble (s-TNF- α). Es importante destacar que tanto el tm-TNF- α como el s-TNF- α son biológicamente activos, por lo que tienen la capacidad de llegar a unirse a sus receptores específicos, los cuales llevarán a cabo la transducción de sus señales. Los dos receptores de

²⁶ Wang, W. Y.; Tan, M. S.; Yu, J. T.; Tan, L. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. *Ann. Transl. Med.* **2015**, 3 (10), 136.

²⁷ Carswell, E. A.; Old, L. J.; Kassel, R. L.; Green, S.; Fiore, N.; Williamson, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1975**, 72(9), 3666–3670.

²⁸ Olmos, G.; Lladó, J. Tumor Necrosis Factor Alpha: A Link between Neuroinflammation and Excitotoxicity. *Mediators Inflamm.* **2014**, 2014, 861231.

superficie de TNF- α son el receptor 1 de TNF- α (TNFR1) y el receptor 2 (TNFR2) (Figura 3). Ambos receptores difieren en su patrón de expresión, cascadas de transducción de señales *downstream* y su afinidad de unión a TNF- α .²⁹

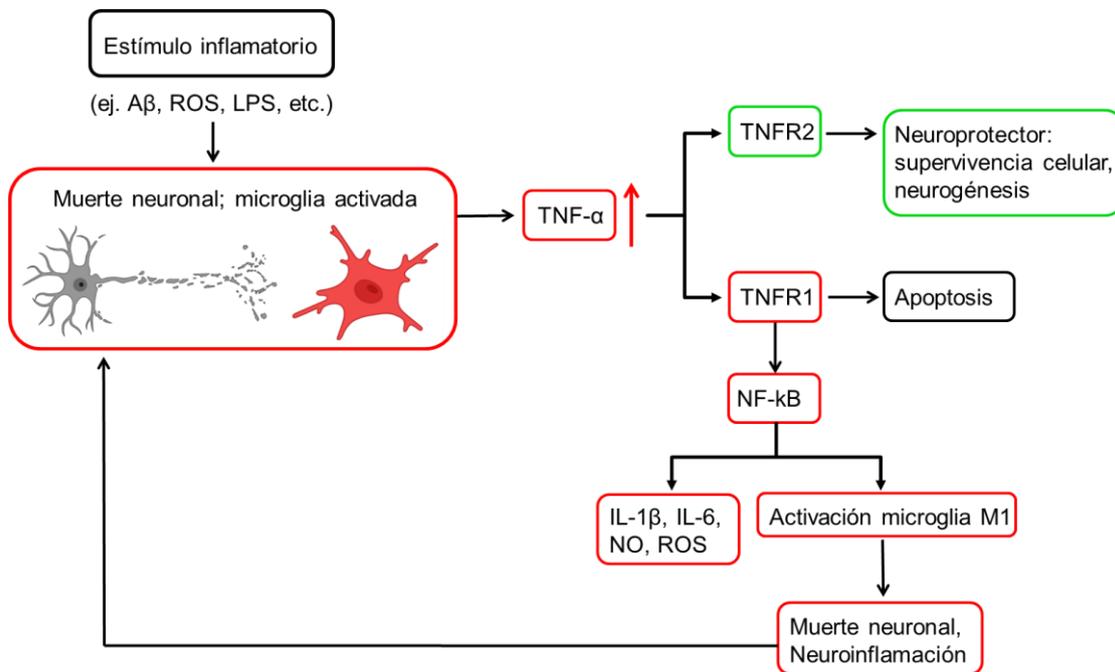


Figura 3. Ruta de producción de TNF- α y efectos en células del SNC. Los estímulos inflamatorios provocan daño neuronal y la activación de la microglía, lo que conduce a la liberación de TNF- α , que se une a los receptores TNFR1 y TNFR2. Color rojo: neuroinflamación; color verde: neuroprotección. Figura adaptada de Jung *et al.*³⁰

TNFR1 se expresa de manera ubicua en todos los tipos celulares y es activado por las dos formas de TNF- α (Figura 3). TNFR2, se expresa de manera más específica en algunas células, como las células endoteliales, la microglía y las neuronas, activándose por la tm-TNF- α .²⁶ TNFR1 induce apoptosis y la respuesta neuroinflamatoria activando la vía de NF- κ B, lo que conduce a la producción de citoquinas proinflamatorias y la activación glial, induciendo neuroinflamación y muerte neuronal junto a la síntesis de más TNF- α . En respuesta a esta primera vía, se produce una mayor activación de las células gliales, que a su vez conduce a un aumento de la muerte celular y viceversa.

²⁹ Sedger, L. M.; McDermott, M. F. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants—past, present and future. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2014**, *25* (4), 453-472.

³⁰ Jung, Y. J.; Tweedie, D.; Scerba, M. T.; Greig, N. H. Neuroinflammation as a Factor of Neurodegenerative Disease: Thalidomide Analogs as Treatments. *Front. Cell Dev. Biol.* **2019**, *7*, 313.

A diferencia de TNFR1, las respuestas biológicas de la señalización de TNF mediada por TNFR2 están relacionadas con la supervivencia y proliferación celular (Figura 3).²⁸ De esta forma, bajos niveles de TNF- α pueden tener efecto neuroprotector y antiapoptótico, mientras que niveles altos asociados a neuroinflamación prolongada resultan perjudiciales para el SNC.^{30,31}

La IL-6 es otra citoquina proinflamatoria originalmente identificada y aislada por el grupo de Kishimoto en 1986.³² Es una citocina inflamatoria pleiotrópica producida principalmente por microglía activada y astrocitos en diferentes regiones del cerebro. La IL-6 se produce en altas concentraciones en respuesta a ciertos estímulos y lesiones cerebrales y es uno de los mediadores proinflamatorios más importantes que se secreta después del tratamiento de microglía con lipopolisacárido (LPS), siendo este un patrón molecular asociado a patógenos o PAMP, extensamente utilizado en investigación.³³

El receptor de IL-6 (IL-6R) se expresa al comienzo de la fase aguda de la inflamación en diferentes tipos celulares, entre los que se incluyen astrocitos, microglia, células epiteliales y neuronas, pero no se encuentra en los oligodendrocitos ni en los astrocitos.^{34,35} Sin embargo, el IL-6R no puede llevar a cabo la transducción de la señal de forma intrínseca, por lo que el proceso de señalización es inducido a través de la unión del complejo IL-6/IL-6R a su receptor β gp130, lo que evita una activación celular inespecífica. La unión de este complejo provoca una respuesta celular, a través de la fosforilación de objetivos posteriores que llevarán a distintos resultados.³⁵

La IL-6 presenta diferentes funciones en la respuesta inmune del SNC, estando involucrada en la regulación del paso a través de la barrera hematoencefálica (BBB) y el reclutamiento de células inmunitarias en el SNC. De la misma forma también promueve la producción de otras citoquinas proinflamatorias por parte de los astrocitos

³¹ Lee, Y.-J.; Han, S. B.; Nam, S.-Y.; Oh, K.-W.; Hong, J. T. Inflammation and Alzheimer's disease. *Arch. Pharm. Res.* **2010**, *33* (10), 1539-1556.

³² Kishimoto, T. Factors affecting B-cell growth and differentiation. *Annu. Rev. Immunol.* **1985**, *3*, 133-157.

³³ Minogue, A.; Barrett, J.; Lynch, M. LPS-induced release of IL-6 from glia modulates production of IL-1 β in a JAK2-dependent manner. *J. Neuroinflammation.* **2012**, *9*, 126.

³⁴ Aniszewska, A.; Chłodzińska, N.; Bartkowska, K.; Winnicka, M.; Turlejski, K.; Djavadian, R. The expression of interleukin-6 and its receptor in various brain regions and their roles in exploratory behavior and stress responses. *J. Neuroimmunol.* **2015**, *284*, 1-9.

³⁵ Rothaug, M.; Becker-Pauly, C.; Rose-John, S. The role of interleukin-6 signaling in nervous tissue. *Biochim Biophys Acta.* **2016**, *1863*(6 Pt A), 1218–1227.

y la microglía.³⁶ La producción de prostaglandinas en el hipotálamo también está regulada por la acción de la IL-6, provocando un aumento de la temperatura corporal. Así mismo, la IL-6 es importante para llevar a cabo la activación de células T y promueve su diferenciación a células T helper 17, que producen otras citoquinas proinflamatorias como el TNF- α .³⁷

Se ha descrito que los niveles de IL-6 se elevan significativamente en el cerebro en enfermedades neurodegenerativas debido a la neuroinflamación descontrolada.²⁶ Además, se observa que la exposición crónica de las neuronas a IL-6 aumenta la entrada de calcio en respuesta al *N*-metil-D-aspartato (NMDA) y provoca neurodegeneración. Por tanto, se considera que la IL-6 está implicada en la etiopatología de las enfermedades neurodegenerativas.³⁸

Estrés Oxidativo

Además de las citoquinas, la microglía también puede liberar ROS y RNS. En el organismo, la producción de estos radicales está inevitablemente ligada al metabolismo celular y a procesos enzimáticos, siendo generados principalmente por las mitocondrias (intracelulares) y debido a la inflamación (extracelulares).³⁹ En condiciones fisiológicas estos no deben suponer un riesgo para la salud, sin embargo, cuando se produce un desequilibrio de los mecanismos antioxidantes, estas moléculas reactivas pueden causar daños en el ADN, la oxidación de proteínas y la peroxidación de lípidos, lo que en última instancia puede provocar la muerte celular y la neurodegeneración.⁴⁰ Estos ROS y RNS incluyen al anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el óxido nítrico (NO) y el peroxinitrito ($ONOO^-$).^{41,42} El superóxido O_2^- es el ROS más importante en el SNC. Intracelularmente, se genera como un

³⁶ Erta, M.; Quintana, A.; Hidalgo, J. Interleukin-6, a Major Cytokine in the Central Nervous System. *Int. J. Biol. Sci.* **2012**, *8* (9), 1254-1266.

³⁷ Gabay, C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res. Ther.* **2006**, *8 Suppl 2* (Suppl 2), S3.

³⁸ Recasens, M.; Almolda, B.; Pérez-Clausell, J.; Campbell, I. L.; González, B.; Castellano, B. Chronic exposure to IL-6 induces a desensitized phenotype of the microglia. *J. Neuroinflammation.* **2021**, *18* (1), 31.

³⁹ Gandhi, S.; Abramov, A. Y. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2012**, *2012*, 428010.

⁴⁰ Pizzino, G.; Irrera, N.; Cucinotta, M.; Pallio, G.; Mannino, F.; Arcoraci, V.; Squadrito, F.; Altavilla, D.; Bitto, A. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, 8416763.

⁴¹ Barnham, K. J.; Masters, C. L.; Bush, A. I. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3* (3), 205-214.

⁴² Jelinek, M.; Jurajda, M.; Duris, K. Oxidative Stress in the Brain: Basic Concepts and Treatment Strategies in Stroke. *Antioxidants.* **2021**, *10* (12), 1886.

subproducto del metabolismo, principalmente de la cadena de transporte de electrones (ETC) mitocondrial (Figura 4) durante el proceso de fosforilación oxidativa.⁴³

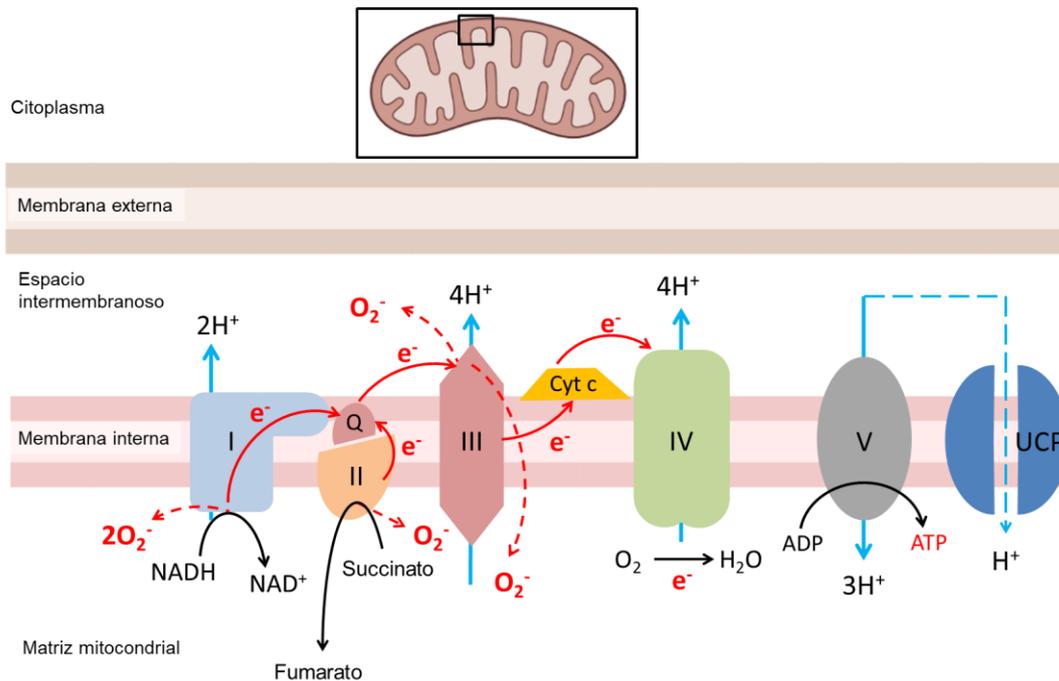


Figura 4. Vía de producción de ROS en la cadena de transporte de electrones mitocondrial. La cadena de transporte de electrones consta de cinco complejos enzimáticos (I-V) integrados en la membrana mitocondrial interna junto con dos intermediarios, la coenzima Q (Q) y citocromo C (Cyt c). Flechas rojas: rutas de electrones; flechas rojas discontinuas: puntos de generación de superóxido; flechas negras: reacciones de sustrato; flechas azules discontinuas: circuito de protones a través del espacio intermembranoso y de las proteínas desacoplantes UCP. Figura adaptada de Zhao *et al.*⁴⁴

Extracelularmente, el superóxido se genera como parte de la respuesta inmune, principalmente por acción de las nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasas (NOX), la xantina oxidasa (XO), la óxido nítrico sintasa (NOS) y la ciclooxigenasa (COX) entre otras. Las NOX constituyen un complejo enzimático de múltiples subunidades unido a la membrana, y generan O₂⁻ al transferir electrones al oxígeno a través de la membrana plasmática desde el NADPH. Existen siete isoformas de NOX, pero solo cuatro (NOX1 a 4) se han detectado en microglía, neuronas y astrocitos. De todas ellas, es NOX2 la principal fuente de superóxido extracelular en la

⁴³ Kim, G. H.; Kim, J. E.; Rhie, S. J.; Yoon, S. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Exp. Neurobiol.* **2015**, *24* (4), 325-340.

⁴⁴ Zhao, R. Z.; Jiang, S.; Zhang, L.; Yu, Z. B. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *Int. J. Mol. Med.* **2019**, *44* (1), 3-15.

microglía, cuyo incremento de expresión está relacionado al aumento del daño neuronal en modelos de enfermedades neurodegenerativas (Tabla 1).^{45,46}

Tabla 1. Principales vías de generación de ROS extracelulares.

Nombre	Isoformas patogénicas	Enfermedades asociadas	Tratamientos estudiados	Ref.
NOX	NOX2	Alzheimer, Parkinson y Huntington	Apocinina	46,47
XO	No establecido	Alzheimer, Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica	Alopurinol	48,49
NOS	iNOS	Alzheimer, Parkinson, Huntington y esclerosis	L-NMMA	50,51
COX	COX-2	Parkinson, Alzheimer y esclerosis lateral amiotrófica	Celecoxib	52,53

La XO está implicada en la generación de radicales de oxígeno en el cerebro, que catalizan la oxidación de la hipoxantina y la xantina a ácido úrico generando superóxido tras donar electrones al oxígeno. El ácido úrico, considerado como un patrón molecular asociado a daño o DAMP, también puede desencadenar respuestas inflamatorias al activar la ruta del NF- κ B dentro de las células e inducir la liberación de

⁴⁵ Simpson, D. S. A.; Oliver, P. L. ROS Generation in Microglia: Understanding Oxidative Stress and Inflammation in Neurodegenerative Disease. *Antioxidants*. **2020**, *9* (8), 743.

⁴⁶ Tarafdar, A.; Pula, G. The Role of NADPH Oxidases and Oxidative Stress in Neurodegenerative Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19* (12), 3824.

⁴⁷ Barua, S.; Kim, J. Y.; Yenari, M. A.; Lee, J. E. The role of NOX inhibitors in neurodegenerative diseases. *IBRO Reports*. **2019**, *7*, 59-69.

⁴⁸ Liu, Z.; Zhou, T.; Ziegler, A. C.; Dimitrion, P.; Zuo, L. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, 2525967.

⁴⁹ Pál, P.; Alex, N.; Csaba, S. Therapeutic Effects of Xanthine Oxidase Inhibitors: Renaissance Half a Century after the Discovery of Allopurinol. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58* (1), 87.

⁵⁰ Behl, T.; Rana, T.; Sehgal, A.; Makeen, H. A.; Albratty, M.; Alhazmi, H. A.; Meraya, A. M.; Bhatia, S.; Sachdeva, M. Phytochemicals targeting nitric oxide signaling in neurodegenerative diseases. *Nitric Oxide*. **2023**, *130*, 1-11.

⁵¹ Granados-Principal, S.; Liu, Y.; Guevara, M. L.; Blanco, E.; Choi, D. S.; Qian, W.; Patel, T.; Rodriguez, A. A.; Cusimano, J.; Weiss, H. L.; Zhao, H.; Landis, M. D.; Dave, B.; Gross, S. S.; Chang, J. C. Inhibition of iNOS as a novel effective targeted therapy against triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res.* **2015**, *17* (1), 25.

⁵² Minghetti, L. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Inflammatory and Degenerative Brain Diseases. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2004**, *63* (9), 901-910.

⁵³ Dey, R.; Sultana, S.; Bishayi, B. Combination treatment of celecoxib and ciprofloxacin attenuates live *S. aureus* induced oxidative damage and inflammation in murine microglia via regulation of cytokine balance. *J. Neuroimmunol.* **2018**, *316*, 23-39.

citoquinas proinflamatorias. Al mismo tiempo, XO también convierte los radicales superóxido en radicales hidroxilo que inducen aún más la respuesta inflamatoria.^{54,55}

La NOS en humanos tiene tres isoformas; NOS endotelial (eNOS), NOS neuronal (nNOS) y NOS inducible (iNOS). En la microglia, la activación inflamatoria a través de NF- κ B resulta en la expresión de la proteína iNOS (Tabla 1).⁴² Cuando iNOS se expresa, produce altos niveles de NO, cuya producción se realiza a partir del nitrógeno de la proteína L-arginina. El NO desempeña un papel importante en la respuesta inmunitaria, pero en presencia de superóxido se puede formar OONO⁻ el cual es altamente oxidante y puede inducir la peroxidación de lípidos y el daño oxidativo de proteínas.^{42,56}

La COX es una enzima que cataliza la conversión de ácido araquidónico en prostaglandinas, importantes mediadores de la inflamación. Se conocen dos tipos principales de COX en el organismo; la COX-1, que se expresa en la mayoría de las células, y la COX-2, que se expresa en células del sistema nervioso central, incluidas las neuronas, los astrocitos y la microglía.⁵⁷ Cuando se activa, la COX-2 produce la prostaglandina E2 (PGE2), que puede actuar como mensajero y activar la producción de radicales libres. Además, la PGE2 también puede aumentar la actividad de la NOX en la microglía, aumentando la generación de más radicales libres. Por lo tanto, la COX-2 y la PGE2 pueden desempeñar un papel importante en el estrés oxidativo causado por la microglía y la neurodegeneración (Tabla 1).⁵⁸

El cerebro es uno de los órganos metabólicamente más activos del cuerpo, por lo que depende en gran medida del metabolismo oxidativo para obtener energía.⁴⁰ El elevado consumo de oxígeno, el hecho de presentar una fosforilación oxidativa casi exclusiva, su completa ausencia de reservas de energía, los altos niveles de hierro y las altas concentraciones de lípidos propensos a la peroxidación son factores que

⁵⁴ Pratomo, I. P.; Noor, D. R.; Kusmardi, K.; Rukmana, A.; Paramita, R. I.; Erlina, L.; Fadilah, F.; Gayatri, A.; Fitriani, M.; Purnomo, T. T. H.; Ariane, A.; Heryanto, R.; Tedjo, A. Xanthine Oxidase-Induced Inflammatory Responses in Respiratory Epithelial Cells: A Review in Immunopathology of COVID-19. *Int. J. Inflam.* **2021**, *2021*, 1653392.

⁵⁵ Casas, A.; Dao, V.; Daiber, A.; Maghzal, G.; Di Lisa, F.; Kaludercic, N.; Leach Ingram, S.; Cuadrado, A.; Jaquet, V.; Seredenina, T.; Krause, K.-H.; López, M.; Stocker, R.; Ghezzi, P.; Schmidt, H. Reactive Oxygen-Related Diseases: Therapeutic Targets and Emerging Clinical Indications. *Antioxid. Redox Signal.* **2015**, *23*, 1171-1185.

⁵⁶ Szabo, C.; Ischiropoulos, H.; Radi, R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6* (8), 662-680.

⁵⁷ Bartels, A.; Leenders, K. Cyclooxygenase and Neuroinflammation in Parkinson's Disease Neurodegeneration. *Curr. Neuropharmacol.* **2010**, *8*, 62-68.

⁵⁸ Ghazanfari, N.; van Waarde, A.; Dierckx, R. A. J. O.; Doorduyn, J.; de Vries, E. F. J. Is cyclooxygenase-1 involved in neuroinflammation? *J. Neurosci. Res.* **2021**, *99*(11), 2976-2998.

actúan como prooxidantes, es decir, que son susceptibles al estrés oxidativo, ya sea generando especies reactivas de oxígeno o inhibiendo los mecanismos antioxidantes.³⁹ Las células neuronales son, por lo tanto, muy susceptibles al daño metabólico y al estrés oxidativo asociado, siendo la peroxidación lipídica el principal mecanismo de daño oxidativo por ROS. Además, el inicio de la peroxidación lipídica desarrolla un ciclo de retroalimentación positiva.⁵⁹

De esta forma, la neuroinflamación está caracterizada no sólo por el aumento de citoquinas, también por estrés oxidativo que está presente en procesos neurodegenerativos crónicos⁶⁰ Por lo tanto, el empleo de tratamientos contra la neuroinflamación puede disminuir el estrés oxidativo y viceversa.⁶¹

1.4. Neuroinflamación y enfermedades neurodegenerativas: Alzheimer

La pérdida progresiva de neuronas, de su estructura y/o funciones se denomina neurodegeneración,⁶² y se asocia directamente con la disfunción de la sinapsis y la red neuronal, y con el depósito de proteínas alteradas fisicoquímicamente en el cerebro. Este proceso de neurodegeneración es característico de muchos trastornos cerebrales y supone un importante problema de salud.⁶³

La neuroinflamación juega un papel crucial en enfermedades neurodegenerativas del SNC. Las respuestas inmunitarias que involucran el sistema inmunitario adaptativo frente al innato se observan en varias etapas de las enfermedades neurodegenerativas y se han considerado como objetivos terapéuticos.⁶² Las enfermedades neurodegenerativas más comunes son la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad priónica, la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de la motoneurona, la enfermedad de Huntington, la atrofia muscular espinal y la ataxia espinocerebelosa.⁶³

⁵⁹ Orellana-Urzúa, S.; Claps, G.; Rodrigo, R. Improvement of a Novel Proposal for Antioxidant Treatment Against Brain Damage Occurring in Ischemic Stroke Patients. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*. **2021**, *20*, 3–21.

⁶⁰ Teleanu, D. M.; Niculescu, A.-G.; Lungu, I. I.; Radu, C. I.; Vladâncenco, O.; Roza, E.; Costăchescu, B.; Grumezescu, A. M.; Teleanu, R. I. An Overview of Oxidative Stress, Neuroinflammation, and Neurodegenerative Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 5938.

⁶¹ Peterson, P. K.; Toborek, M.; Eds. *Neuroinflammation and Neurodegeneration*. Peterson, P. K.; Toborek, M., Springer: Minneapolis; USA. **2014**, p 600.

⁶² Chitnis, T.; Weiner, H. L. CNS inflammation and neurodegeneration. *J. Clin. Investig.* **2017**, *127*(10), 3577-3587.

⁶³ Lamptey, R. N. L.; Chaulagain, B.; Trivedi, R.; Gothwal, A.; Layek, B.; Singh, J. A Review of the Common Neurodegenerative Disorders: Current Therapeutic Approaches and the Potential Role of Nanotherapeutics. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 1851.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más común de demencia en todo el mundo, afectando a alrededor de 50 millones de personas, y representa aproximadamente el 60-70% de los casos de demencia en todo el mundo. Se cree que alrededor del 10% de las personas mayores de 65 años tienen EA.⁶⁴ Los pacientes que padecen esta enfermedad muestran una disminución de sus funciones cognitivas, así como cambios en la personalidad, comportamiento y emociones por lo que tratar la EA representa un desafío global de gran importancia para la salud pública. En los cerebros de los pacientes con EA se observan cambios neuropatológicos, que incluyen la acumulación extracelular de placas de amiloide- β ($A\beta$) y la acumulación intracelular de proteína tau hiperfosforilada, lo que se denominan ovillos neurofibrilares.⁶⁵

Las placas $A\beta$ se generan a partir de la proteína precursora amiloide (APP) y su presencia en el cerebro forma parte del proceso de transducción de señales.⁶⁶ Se considera que esta acumulación de péptidos $A\beta$ es el resultado de un desequilibrio entre su producción y eliminación en el cerebro.⁶⁷ La hipótesis de la cascada amiloide sugiere que los niveles elevados de las placas $A\beta$ inician la cascada patológica que lleva a la EA (Figura 5).⁶⁸ Sin embargo, los tratamientos dirigidos a eliminar las placas $A\beta$ no han llegado a mejorar la función cognitiva de los pacientes.⁶⁹ Por otro lado, la patología neurofibrilar es otra característica distintiva de la EA, que incluye la agregación de la proteína tau (p-tau) en placas neuríticas, ovillos neurofibrilares y hebras neuropilares. La ubicación principal de la p-tau se encuentra en los axones de las neuronas del cerebro, donde interactúa con los microtúbulos para mantener su estructura y facilitar el transporte citoplasmático. Además, p-tau tiene un papel crucial

⁶⁴ Leng, F.; Edison, P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? *Nat. Rev. Neurol.* **2021**, *17* (3), 157-172.

⁶⁵ Fu, W.-Y.; Wang, X.; Ip, N. Y. Targeting Neuroinflammation as a Therapeutic Strategy for Alzheimer's Disease: Mechanisms, Drug Candidates, and New Opportunities. *ACS Chem. Neurosci.* **2019**, *10* (2), 872-879.

⁶⁶ Sehar, U.; Rawat, P.; Reddy, A. P.; Kopel, J.; Reddy, P. H. Amyloid Beta in Aging and Alzheimer's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23* (21), 12924.

⁶⁷ Gu, L.; Guo, Z. Alzheimer's $A\beta_{42}$ and $A\beta_{40}$ peptides form interlaced amyloid fibrils. *J. Neurochem.* **2013**, *126*, 305-311.

⁶⁸ Hardy, J.; Allsop, D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol. Sci.* **1991**, *12*, 383-388.

⁶⁹ Lannfelt, L.; Relkin, N.; Siemers, E. Amyloid- β -directed immunotherapy for Alzheimer's disease. *J. Intern. Med.* **2014**, *275*, 284-295.

en el mantenimiento de la función y la estructura sináptica, así como en la regulación de la señalización neuronal.⁷⁰

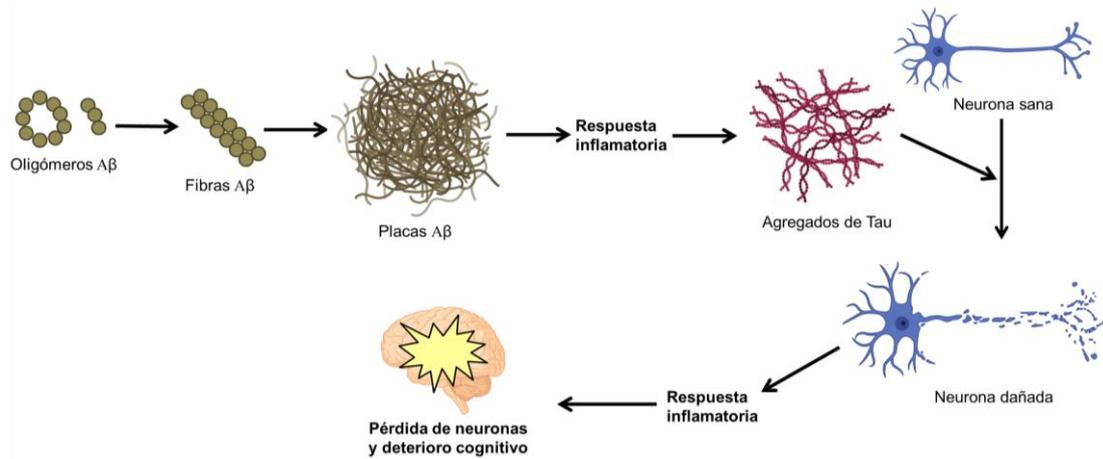


Figura 5. Proceso de deterioro cognitivo causado por acumulación de placas Aβ y p-tau. Inicialmente, los monómeros Aβ se agrupan para formar oligómeros, que se agregan para formar fibras de Aβ, dando lugar a las placas Aβ. Esto produce una respuesta inflamatoria, que forma agregados de p-tau, dañando a su vez las neuronas sanas. La presencia de más daño neuronal desencadena una mayor respuesta inflamatoria que en última instancia, resulta en una pérdida de la función cerebral. Figura adaptada de Lamptey *et al.*⁶³

Se considera que la patología de p-tau ocurre más tarde que la acumulación de Aβ pero se correlaciona más estrechamente con el deterioro cognitivo (Figura 5). En condiciones fisiológicas, p-tau estabiliza los microtúbulos, regula el transporte axonal y mantiene la estructura del ADN. Sin embargo, la modificación patológica de p-tau y su consecuente agregación puede provocar la pérdida sináptica y la disfunción neuronal.⁶³ El grupo de Bilousova realizó un estudio para determinar la secuencia de patologías provocadas por la acumulación de Aβ y p-tau en las sinapsis. Tras medir Aβ y p-tau en humanos y modelos animales murinos en todas las etapas de la EA, sus hallazgos sugieren que Aβ induce la acumulación de p-tau, ya que esta aumenta con las fracciones de Aβ en las sinapsis (Figura 5).⁷¹

Actualmente no existe una cura para la EA y las estrategias para su tratamiento se centran en bloquear las principales vías de progresión de la enfermedad. Aunque, no hay un tratamiento único para eliminar completamente las placas Aβ en el cerebro, existen varias estrategias prometedoras que se están investigando a fin de retrasar la

⁷⁰ Fan, L.; Mao, C.; Hu, X.; Zhang, S.; Yang, Z.; Hu, Z.; Sun, H.; Fan, Y.; Dong, Y.; Yang, J.; Shi, C.; Xu, Y. New Insights Into the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Front. Neurol.* **2020**, *10*, 1312.

⁷¹ Bilousova, T.; Miller, C. A.; Poon, W. W.; Vinters, H. V.; Corrada, M.; Kawas, C.; Hayden, E. Y.; Teplow, D. B.; Glabe, C.; Albay, R.; Cole, G. M.; Teng, E.; Gylys, K. H. Synaptic Amyloid-β Oligomers Precede p-Tau and Differentiate High Pathology Control Cases. *Am. J. Clin. Pathol.* **2016**, *186* (1), 185-198.

progresión de la enfermedad. Algunas de estas estrategias son: inmunoterapia dirigida contra placas A β , empleo de inhibidores de la colinesterasa y empleo de reguladores de glutamato,⁶³ que se comentan a continuación.

En cuanto a la inmunoterapia dirigida, Aducanumab es un anticuerpo monoclonal IgG1 específico contra las placas extracelulares de A β en el cerebro que actúa uniéndose a estas y favoreciendo su eliminación. Aducanumab (Aduhelm™, Biogen) es desde 2021 el primer fármaco de inmunoterapia aprobado para el tratamiento de la EA. A pesar de que este anticuerpo ralentiza la progresión de la enfermedad, no se ha demostrado que mejore la función cognitiva en los pacientes.⁷² Existen otros medicamentos dirigidos basados en anticuerpos que se están probando en ensayos clínicos, y algunos han completado la fase I, como los anticuerpos AAB-003, MEDI1814, RO7126209, y SAR228810 o fase II, como gosuranemab.^{63,73}

Los tratamientos basados en inhibidores de la colinesterasa, como el donepezil, la rivastigmina y la galantamina, se han utilizado extensamente para tratar la EA al limitar la degradación de la acetilcolina y aumentar la actividad colinérgica en pacientes con un grado de patología de moderado a grave.⁷⁴ Sin embargo, los inhibidores de la colinesterasa tienen una eficacia limitada, ya que no está claro su paso a través de la barrera hematoencefálica en dosis significativas,⁷⁵ por lo que se consideran opciones de tratamiento sintomático.

Respecto al empleo de reguladores de glutamato, éste es el neurotransmisor excitador más abundante en el cerebro y su desregulación puede causar daño neuronal y neurodegeneración al activarse de forma exacerbada los receptores de glutamato. La memantina es un antagonista no competitivo del receptor de *N*-metil-D-aspartato (NMDA) que se aprobó en 2003 para pacientes con EA y ha demostrado mejorar la cognición en comparación con el grupo placebo. Sin embargo, la

⁷² Dunn, B.; Stein, P.; Cavazzoni, P. Approval of Aducanumab for Alzheimer Disease—The FDA's Perspective. *JAMA Intern. Med.* **2021**, *181* (10), 1276-1278.

⁷³ Wu, K.-M.; Zhang, Y.-R.; Huang, Y.-Y.; Dong, Q.; Tan, L.; Yu, J.-T. The role of the immune system in Alzheimer's disease. *Ageing Res. Rev.* **2021**, *70*, 101409.

⁷⁴ Hampel, H.; Mesulam, M. M.; Cuello, A. C.; Khachaturian, A. S.; Vergallo, A.; Farlow, M. R.; Snyder, P. J.; Giacobini, E.; Khachaturian, Z. S.; Cholinergic System Working, G.; for the Alzheimer Precision Medicine, I. Revisiting the Cholinergic Hypothesis in Alzheimer's Disease: Emerging Evidence from Translational and Clinical Research. *J. Prev. Alzheimer's Dis.* **2019**, *6* (1), 2-15.

⁷⁵ Liu, P.-P.; Xie, Y.; Meng, X.-Y.; Kang, J.-S. History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2019**, *4* (1), 29.

memantina y esta clase de fármacos no tratan forma directa la patología de la EA, puesto que es un tratamiento meramente sintomático.⁷⁶

A pesar de estas estrategias, hasta el momento no se ha conseguido una solución eficaz contra la patogénesis de la EA por lo que se hace necesario buscar nuevos tratamientos. Recientemente, se están desarrollando estrategias dirigidas a controlar la neuroinflamación producida como resultado de la formación de las placas A β endógenas. En este contexto, las células de microglía actúan como principal mediador celular en la respuesta neuroinflamatoria⁶⁴ planteándose como diana terapéutica para tratar la EA.

El papel de la microglía en la EA es muy complejo debido a sus variados fenotipos y vías de activación. Como se comentó anteriormente, la microglía puede cambiar de su forma ramificada a su forma ameboides (fenotipo M1) con estimulación patológica (DAMPs o PAMPs), lo que afecta a sus funciones homeostáticas. La morfología de la microglía en los cerebros de los pacientes de EA varía según la ubicación espacial y el estadio de la enfermedad, así como la intensidad y duración de la patología.⁶⁴

En la etapa temprana de la enfermedad, antes de la formación de la placa, la microglía ya participa de forma activa en funciones protectoras como la eliminación de A β , la supresión de la hiperfosforilación de p-tau y la liberación de factores neurotróficos que previenen la aparición de los síntomas clásicos de la EA. Esta microglía activada se caracteriza por la regulación positiva de varios marcadores como CD11b, CD45 y CD68.⁷⁷ Concretamente, CD11b participa en la adhesión y migración celular, se regula positivamente en respuesta a la inflamación o lesión. CD45 participa en la regulación de la señalización y activación de las células inmunitarias, se regula positivamente en respuesta a una lesión o inflamación en la microglía. CD68 participa en el proceso de fagocitosis y se expresa en la superficie de macrófagos y microglia.^{14,78} Sin embargo, a medida que la enfermedad progresa, las respuestas

⁷⁶ Folch, J.; Busquets, O.; Ettcheto, M.; Sánchez-López, E.; Castro-Torres, R. D.; Verdaguer, E.; Garcia, M. L.; Olloquequi, J.; Casadesús, G.; Beas-Zarate, C.; Pelegri, C.; Vilaplana, J.; Auladell, C.; Camins, A. Memantine for the Treatment of Dementia: A Review on its Current and Future Applications. *J. Alzheimer's Dis.* **2018**, *62*, 1223-1240.

⁷⁷ Mandrekar-Colucci, S., & Landreth, G. E. Microglia and inflammation in Alzheimer's disease. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* **2010**, *9*(2), 156–167.

⁷⁸ Hopperton, K. E.; Mohammad, D.; Trépanier, M. O.; Giuliano, V.; Bazinet, R. P. Markers of microglia in post-mortem brain samples from patients with Alzheimer's disease: a systematic review. *Mol. Psychiatry.* **2018**, *23* (2), 177-198.

microgliales se alteran y la activación prolongada de la microglía contribuye a la neurodegeneración.^{64,79}

Por ejemplo, las citoquinas proinflamatorias producidas por la microglía, como TNF α e IFN γ , pueden disminuir la capacidad de la microglía para degradar A β al suprimir la expresión de proteasas, lo que contribuye a la formación de las placas.¹⁵ En pacientes con deterioro cognitivo leve en riesgo de desarrollar EA, Tarkowski *et al.* describen un aumento de la citoquina proinflamatoria TNF α , junto con una reducción de la citoquina antiinflamatoria denominada factor de crecimiento transformante beta (TGF β), lo que sugiere que la inflamación del SNC precede al desarrollo de la EA.⁸⁰

Las citoquinas proinflamatorias también aumentan la expresión de la enzima iNOS microglial en el cerebro de paciente con EA, lo que lleva a la producción de NO. Una alta concentración de NO en el cerebro puede alterar la función mitocondrial, inducir neurotoxicidad y desencadenar la nitrificación de las partículas A β , lo que promueve la agregación de la placa.⁸¹ Como respuesta al A β fibrilar, la microglía en este estado reactivo también genera radicales libres, en particular superóxido a través de la NOX cuya actividad aumenta en pacientes con un deterioro cognitivo leve.^{82,83} Es por ello que la aparición del estrés oxidativo puede emplearse como un marcador importante de la reacción temprana de la microglía en la EA. De esta forma, interferir con la actividad de NOX empleando compuestos específicos es una estrategia terapéutica para retrasar la progresión de la EA.

Los hallazgos tanto *in vitro* como *in vivo* del grupo de Wang *et al.* mostraron que la polarización de la microglia hacia un fenotipo M2 alivia los procesos de neuroinflamación y neurotoxicidad mediados por el fenotipo M1, lo cual se traduce en

⁷⁹ Baufeld, C.; O'Loughlin, E.; Calcagno, N.; Madore, C.; Butovsky, O. Differential contribution of microglia and monocytes in neurodegenerative diseases. *J. Neural Transm.* **2018**, *125* (5), 809-826.

⁸⁰ Tarkowski, E.; Andreasen, N.; Tarkowski, A.; Blennow, K. Intrathecal inflammation precedes development of Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* **2003**, *74* (9), 1200-1205.

⁸¹ Kummer, Markus P.; Hermes, M.; Delekarte, A.; Hammerschmidt, T.; Kumar, S.; Terwel, D.; Walter, J.; Pape, H.-C.; König, S.; Roeber, S.; Jessen, F.; Klockgether, T.; Korte, M.; Heneka, Michael T. Nitration of Tyrosine 10 Critically Enhances Amyloid β Aggregation and Plaque Formation. *Neuron.* **2011**, *71* (5), 833-844.

⁸² Hemonnot, A.-L.; Hua, J.; Ulmann, L.; Hirbec, H. Microglia in Alzheimer Disease: Well-Known Targets and New Opportunities. *Front. Aging Neurosci.* **2019**, *11*, 233.

⁸³ Bruce-Keller, A. J.; Gupta, S.; Parrino, T. E.; Knight, A. G.; Ebenezer, P. J.; Weidner, A. M.; LeVine, H.; Keller, J. N.; Markesbery, W. R. NOX Activity Is Increased in Mild Cognitive Impairment. *Antioxid. Redox Signal.* **2009**, *12* (12), 1371-1382.

una reducción de la patogénesis de la EA.⁸⁴ A diferencia del fenotipo proinflamatorio M1 con una función de fagocitosis alterada, la microglía de tipo M2 mostró una mayor capacidad de fagocitosis y aclaramiento de las placas A β , siendo beneficioso en la patología de la EA.⁸⁴ Por lo tanto, el desarrollo de terapias que induzcan la activación del fenotipo M2 de la microglia puede reducir la reactividad microglial, y limitar la toxicidad de las placas de A β , planteándose como una estrategia para el tratamiento de la EA.

En resumen, existen diversos estudios dirigidos a desarrollar terapias basadas en controlar la actividad de la microglía, siendo el objetivo principal actuar al inicio de la enfermedad. Esto implica iniciar el tratamiento en pacientes con un diagnóstico de deterioro cognitivo leve, que aún no hayan manifestado síntomas que puedan clasificarse como demencia. Un ejemplo es la administración subcutánea de IFN β 1a, modulando la neuroinflamación en pacientes con EA temprana. Este tratamiento fue bien tolerado y los resultados mostraron una tendencia hacia la ralentización de la progresión de la enfermedad.⁸⁵

También se han empleado otras citoquinas antiinflamatorias, como IL-2, IL-4 e IL-33, las cuales han demostrado cierto potencial para modular la activación microglial y aliviar la patología de la EA en estudios preclínicos.⁸⁶ Por todo ello, es de gran interés desarrollar nuevos tratamientos capaces de modular tanto la producción de citoquinas proinflamatorias como el estrés oxidativo intrínseco a la neurodegeneración.

⁸⁴ Wang, Q.; Yao, H.; Liu, W.; Ya, B.; Cheng, H.; Xing, Z.; Wu, Y. Microglia Polarization in Alzheimer's Disease: Mechanisms and a Potential Therapeutic Target. *Front. Aging Neurosci.* **2021**, *13*, 772717.

⁸⁵ Grimaldi, L. M. E.; Zappalà, G.; Iemolo, F.; Castellano, A. E.; Ruggieri, S.; Bruno, G.; Paolillo, A. A pilot study on the use of interferon beta-1a in early Alzheimer's disease subjects. *J. Neuroinflammation.* **2014**, *11* (1), 30.

⁸⁶ Zheng, C.; Zhou, X.-W.; Wang, J.-Z. The dual roles of cytokines in Alzheimer's disease: update on interleukins, TNF- α , TGF- β and IFN- γ . *Transl. Neurodegener.* **2016**, *5* (1), 7.

1.5. Fármacos antiinflamatorios

Teniendo en cuenta que la neuroinflamación puede producirse de forma previa a la pérdida significativa de neuronas, es de gran importancia tratar las enfermedades neurodegenerativas en un estadio temprano para evitar recurrir a tratamientos paliativos cuando los síntomas son más severos (Figura 6A).⁸⁷ Como se ha comentado, la inflamación en el SNC puede producir un estado de activación crónica de las células inmunitarias.⁸⁸ Normalmente, se diagnostica la enfermedad cuando existe ya un deterioro cognitivo significativo, situándonos en una etapa más intermedia o incluso tardía de la enfermedad en la cual la respuesta inflamatoria desencadenada podría ya no ser reversible (Figura 6B) debido a la presencia de un microambiente mayoritariamente neurotóxico en el SNC. En el caso de un diagnóstico temprano de la enfermedad (Figura 6C), es fundamental detener la neuroinflamación lo antes posible mediante terapias dirigidas para frenar el curso de la enfermedad. Lo ideal sería la detección de los marcadores de neuroinflamación incluso antes del inicio del proceso neurodegenerativo (Figura 6D).⁸⁹

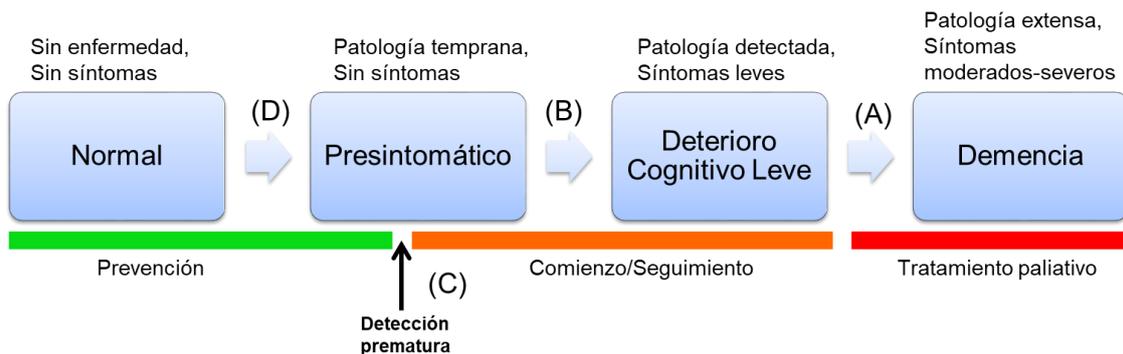


Figura 6. Posibles ventanas terapéuticas existentes frente a la neuroinflamación durante el desarrollo de la demencia. Tratamiento tardío (A, rojo); tratamiento al comienzo del deterioro cognitivo (B, naranja), tratamiento dirigido a la población con alto riesgo pero sin sintomatología (C), tratamiento con agentes antineuroinflamatorios (D, verde). Figura adaptada de Craft *et al.*⁸⁹

Actualmente, los objetivos principales para el tratamiento de la neuroinflamación se basan en controlar la activación de las células de microglía y los astrocitos, así como de las células inmunitarias periféricas que se infiltran en el SNC

⁸⁷ Baekelandt, V.; Lobbestael, E.; Eds. *Disease-Modifying Targets in Neurodegenerative Disorders, Chapter 3: Neuroinflammation as a therapeutic target in neurodegenerative diseases*. Gordon, R.; Woodruff, T. M., Academic Press: London, United Kingdom. **2017**, pp 49-80.

⁸⁸ Heneka, M. T.; Kummer, M. P.; Latz, E. Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nature reviews. Immunology*. **2014**, *14* (7), 463-477.

⁸⁹ Craft, J. M.; Watterson, D. M.; Van Eldik, L. J. Neuroinflammation: a potential therapeutic target. *Expert Opin. Ther. Targets*. **2005**, *9* (5), 887-900.

en las etapas más avanzadas, como por ejemplo los linfocitos y los macrófagos.⁴ Un ejemplo de una terapia anti-neuroinflamatoria es el uso de antioxidantes que eliminen los radicales libres bloqueando así una fuente importante del estrés oxidativo. Una forma de lograrlo es afectar a la regulación de NOX2 e iNOS en la microglía crónicamente activada en la microglia, pues contribuyen de forma significativa a la acumulación excesiva de ROS en el SNC.⁴¹ Además, dado que la iNOS está asociada con un fenotipo microglial M1, el uso de estos enfoques terapéuticos pueden favorecer que la microglía pase a un fenotipo M2 antiinflamatorio, lo que plantea la posibilidad de detener o revertir el fenotipo proinflamatorio microglial crónico en el SNC como un enfoque terapéutico.^{55,87}

Otra estrategia para regular la neuroinflamación es controlar la producción de mediadores inflamatorios que impulsan la propagación de la respuesta inmune y la consecuente disfunción neuronal. Un ejemplo es el uso de inhibidores de la señalización del TNF- α , o de la IL1 β , la cual al inhibirse tiene una función beneficiosa en modelos transgénicos de EA al remitir el proceso inflamatorio.⁸⁷

Un reto en la investigación actual es la obtención de moléculas pequeñas y permeables a la barrera hematoencefálica (BBB) para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Es importante el empleo de fármacos con el menor número de efectos secundarios, como daño renal, gastrointestinal y/o hepático ya que estos efectos no deseados limitan su uso a largo plazo y aumentan significativamente el riesgo de complicaciones.⁹⁰

Fármacos antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos

Los fármacos antiinflamatorios de tipo esteroideos (SAID, *steroidal anti-inflammatory drugs* en inglés), son también conocidos por el nombre de glucocorticoides y tienen propiedades antiinflamatorias e inmunosupresoras. Se caracterizan por su estructura tipo esteroide, con tres anillos de ciclohexano y un anillo de ciclopentano (Figura 7). La cortisona es el primer esteroide aislado en 1935 por Philip Hench, y su descubrimiento revolucionó el tratamiento de enfermedades inflamatorias como la artritis,⁹¹ por lo que posteriormente se obtuvo sintéticamente, al igual que otros derivados como el cortisol. Estos fármacos son similares a las hormonas producidas por las glándulas suprarrenales y actúan reduciendo la

⁹⁰ Cacciatore, I.; Marinelli, L.; Fornasari, E.; Cerasa, L. S.; Eusepi, P.; Türkez, H.; Pomilio, C.; Reale, M.; D'Angelo, C.; Costantini, E.; Di Stefano, A. Novel NSAID-Derived Drugs for the Potential Treatment of Alzheimer's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1035.

⁹¹ Glyn, J. H. The discovery of cortisone: a personal memory. *Bmj.* **1998**, *317* (7161), 822.

inflamación y la respuesta inmunitaria del cuerpo. Un ejemplo de SAID natural es el cortisol, el cual es sintetizado de forma natural en el riñón, en la corteza suprarrenal. Entre los efectos del cortisol, está su función como una potente hormona antiinflamatoria, siendo capaz de prevenir los daños a los tejidos asociados con los procesos inflamatorios, por lo que es un medicamento ampliamente utilizado (Figura 7).⁹²

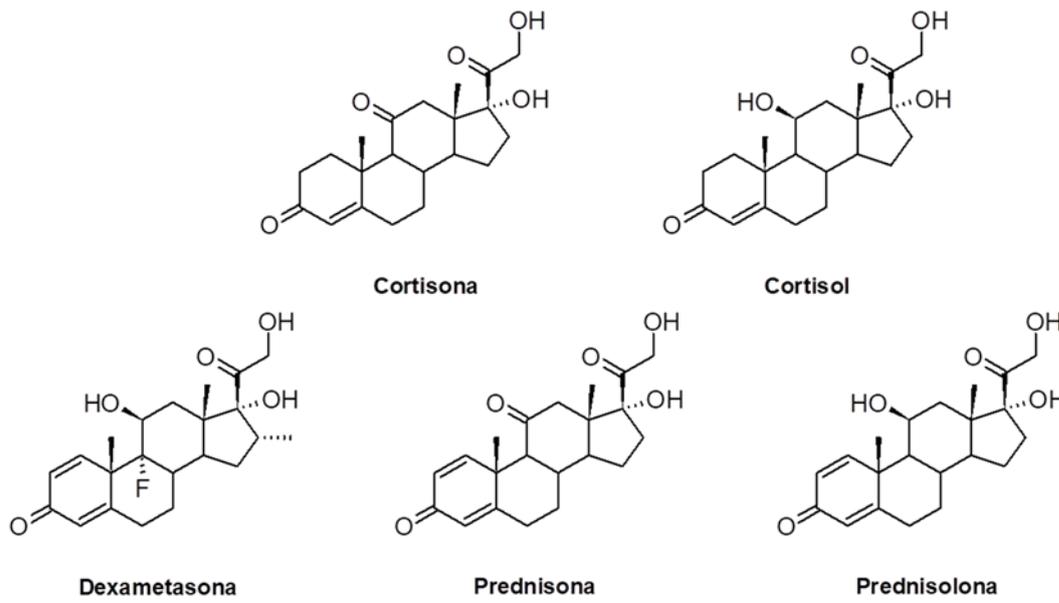


Figura 7. Estructura de fármacos antiinflamatorios esteroideos.

Sin embargo, existen desventajas asociadas con los esteroides naturales, principalmente su corta vida media, su rápido metabolismo y su reducida biodisponibilidad oral. Por lo tanto, las modificaciones sintéticas de los esteroides naturales han sido un enfoque atractivo para producir agentes neuroprotectores potentes para el tratamiento de la neuroinflamación.⁹³ Entre los fármacos corticosteroides, o derivados del cortisol, cabe mencionar a la dexametasona (Figura 7), cuya acción neuroprotectora puede atribuirse a la inhibición de las vías NF- κ B relacionadas con la inflamación.⁹⁴ Otros SAIDs comúnmente empleados son la

⁹² Hannibal, K. E.; Bishop, M. D. Chronic stress, cortisol dysfunction, and pain: a psychoneuroendocrine rationale for stress management in pain rehabilitation. *Phys. Ther.* **2014**, *94* (12), 1816-1825.

⁹³ Bansal, R.; Singh, R. Exploring the potential of natural and synthetic neuroprotective steroids against neurodegenerative disorders: A literature review. *Med. Res. Rev.* **2018**, *38*(4), 1126–1158.

⁹⁴ Sun, W.-H.; He, F.; Zhang, N.-N.; Zhao, Z.-A.; Chen, H.-S. Time dependent neuroprotection of dexamethasone in experimental focal cerebral ischemia: The involvement of NF- κ B pathways. *Brain Res.* **2018**, *1701*, 237-245.

prednisona y la prednisolona (Figura 7). Ambos se administran generalmente por vía oral y la prednisona se convierte en prednisolona en el hígado, por lo que el efecto de los dos fármacos suele ser el mismo.⁹⁵ Al unirse al receptor de la superficie celular, la prednisona entra en la célula y llega hasta el núcleo, activando receptores nucleares específicos, lo que da como resultado una expresión génica alterada y la inhibición de la producción de citoquinas proinflamatorias. La prednisona actúa disminuyendo la inflamación a través de la supresión de la migración de leucocitos y revierte el aumento de la permeabilidad capilar.⁹⁶

A pesar de que los SAIDs pueden ser efectivos para reducir la inflamación, tienen múltiples efectos secundarios en el organismo como el aumento de peso, hipertensión arterial, osteoporosis, e incluso problemas cutáneos, por mencionar algunos.⁹³

En cuanto a los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs), son una de las clases de fármacos más utilizados contra el dolor y la inflamación. Son más efectivos que los SAIDs a la hora de tratar los síntomas de la inflamación aunque presentan también un número importante de efectos adversos en los pacientes.⁹⁷ Los primeros fármacos no esteroideos, como la aspirina, se desarrollaron a finales del siglo XIX y principios del siglo XX, aunque se llevaban empleando desde antes.^{98,99} Los avances químicos promovieron el desarrollo de los NSAIDs, la mayoría de los cuales fueron inicialmente ácidos orgánicos, y más tarde, se descubrieron compuestos no ácidos.^{100,101}

Los NSAIDs inhiben la biosíntesis de prostaglandinas mediante el bloqueo de la enzima COX, la cual presenta dos formas: COX-1 y COX-2, lo que conduce a una

⁹⁵ Hughes, R. A.; Mehndiratta, M. M.; Rajabally, Y. A. Corticosteroids for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Cochrane Database Syst Rev.* **2017**, 11(11), CD002062.

⁹⁶ Bergmann, T. K.; Barraclough, K. A.; Lee, K. J.; Staatz, C. E. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of prednisolone and prednisone in solid organ transplantation. *Clin. Pharmacokinet.* **2012**, 51 (11), 711-741.

⁹⁷ Ajmone-Cat, M. A.; Bernardo, A.; Greco, A.; Minghetti, L. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs and Brain Inflammation: Effects on Microglial Functions. *Pharmaceuticals.* **2010**, 3, 1949-1965.

⁹⁸ Wood, J. N. From plant extract to molecular panacea: a commentary on Stone (1763) 'An account of the success of the bark of the willow in the cure of the agues'. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. Series B.* **2015**, 370 (1666), 20140317.

⁹⁹ Sneader, W. The discovery of aspirin: a reappraisal. *Bmj.* **2000**, 321 (7276), 1591-1594.

¹⁰⁰ Rao, P.; Knaus, E. E. Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2008**, 11 (2), 81s-110s.

¹⁰¹ Kaduševičius, E. Novel Applications of NSAIDs: Insight and Future Perspectives in Cardiovascular, Neurodegenerative, Diabetes and Cancer Disease Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22, 6637.

consecuente disminución del proceso inflamatorio. Sin embargo, los diferentes NSAIDs presentan variaciones en su selectividad por las diferentes isoformas de COX, siendo un ejemplo el ibuprofeno, el naproxeno o la aspirina entre otros, los cuales no distinguen entre COX-2 y COX-1.⁸⁹ Celecoxib, es uno de los pocos inhibidores que afectan a COX-2 de forma selectiva (Figura 8).⁵²

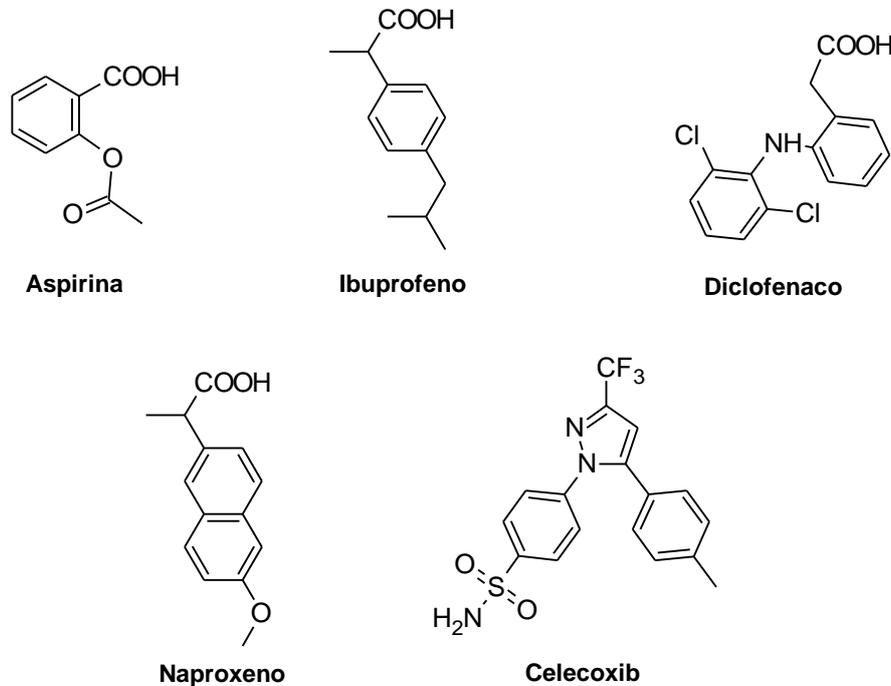


Figura 8. Estructura química de los NSAIDs empleados en neuroinflamación.

Recientemente se han empleado NSAIDs con el objetivo de reducir la neuroinflamación. En el caso de la EA, se ha estudiado su efecto en la inhibición de la producción y agregación de A β , eliminando ROS y modulando las propiedades específicas de células microgliales, astrocíticas, neuronales y endoteliales.¹⁰² Un estudio publicado en el año 2000 muestra que la administración de ibuprofeno en el modelo murino de EA Tg2576, reduce significativamente los niveles totales de A β en el cerebro.¹⁰³ Más tarde, en 2004, el grupo de Sung mostró que el tratamiento con indometacina, otro NSAID no selectivo de COX, en el mismo modelo murino, reduce

¹⁰² Lleo, A.; Galea, E.; Sastre, M. Molecular targets of non-steroidal anti-inflammatory drugs in neurodegenerative diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64* (11), 1403-1418.

¹⁰³ Lim, G. P.; Yang, F.; Chu, T.; Chen, P.; Beech, W.; Teter, B.; Tran, T.; Ubeda, O.; Ashe, K. H.; Frautschy, S. A.; Cole, G. M. Ibuprofen suppresses plaque pathology and inflammation in a mouse model for Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **2000**, *20* (15), 5709-5714.

los niveles de A β (1–40) y A β (1–42) hipocampal y cortical y retrasa la aparición de los primeros síntomas.¹⁰⁴

En el SNC, los efectos protectores de los NSAIDs contra las enfermedades neurodegenerativas no solo afectan a COX, sino que también pueden afectar a otras dianas como los macrófagos y linfocitos, regulando respuestas inmunitarias como la liberación de TNF- α y la producción de NO, la adhesión celular, la captación fagocítica y la proliferación de linfocitos.⁹⁷ A pesar de que estos resultados son prometedores, los ensayos llevados a cabo a nivel clínico son cuestionables y sus efectos a largo plazo en pacientes no son concluyentes.¹⁰¹

Así, en el año 2020 se probó la eficacia de diferentes NSAIDs en un grupo de pacientes de EA con el objetivo de reducir el progreso de la enfermedad.¹⁰⁵ Los resultados mostraron que la mayoría de los NSAIDs, entre los que incluyen al celecoxib, aspirina, ibuprofeno y naproxeno, no estaban asociados con ningún cambio en el deterioro cognitivo. Por otro lado, encontraron evidencias de que los pacientes tratados con diclofenaco sí que mostraron un deterioro cognitivo más lento. La particularidad que tiene esta molécula respecto a los demás NSAIDs es que es independiente de la inhibición de la COX. El diclofecano presenta la capacidad de inhibir la acción de la IL-1 β , TNF- α así como el procesamiento de APP y la consecuente formación de placa de A β .¹⁰⁶ También se ha considerado la capacidad inhibitoria del diclofenaco sobre la producción de la enzima fosfolipasa A2, la cual es responsable de la liberación de ácido araquidónico y otros ácidos grasos, que son precursores de las prostaglandinas y otros mediadores inflamatorios. Estas acciones adicionales explican su alta efectividad frente a otros NSAIDs.¹⁰⁷

Por todo ello, se puede concluir que la protección que de los NSAIDs en la EA es más efectiva en estadios tempranos de la enfermedad, antes de que aparezcan

¹⁰⁴ Sung, S.; Yang, H.; Uryu, K.; Lee, E. B.; Zhao, L.; Shineman, D.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M.; Pratico, D. Modulation of nuclear factor-kappa B activity by indomethacin influences A beta levels but not A beta precursor protein metabolism in a model of Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* **2004**, *165* (6), 2197-2206.

¹⁰⁵ Rivers-Auty, J.; Mather, A. E.; Peters, R.; Lawrence, C. B.; Brough, D.; Initiative, A. s. D. N. Anti-inflammatories in Alzheimer's disease—potential therapy or spurious correlate? *Brain Commun.* **2020**, *2* (2), 109.

¹⁰⁶ Stopschinski, B. E.; Weideman, R. A.; McMahan, D.; Jacob, D. A.; Little, B. B.; Chiang, H.-S.; Saez Calveras, N.; Stuve, O. Microglia as a cellular target of diclofenac therapy in Alzheimer's disease. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* **2023**, *16*, 17562864231156674.

¹⁰⁷ Ebrahimi, M.; Firuzi, O.; Miri, R.; Razzaghi-Asl, N.; Ebadi, A. Structural Insight into Binding Mode of 9-Hydroxy Aristolochic Acid, Diclofenac and Indomethacin to PLA2. *Interdiscip. Sci. Comput. Life Sci.* **2018**, *10* (2), 400-410.

síntomas, ya que en estadios más avanzados estos fármacos, salvo algunas excepciones, no ayudan a frenar el proceso neurodegenerativo.¹⁰⁵

Una estrategia utilizada para desarrollar nuevos tratamientos es el reposicionamiento de fármacos, un enfoque centrado en el descubrimiento de nuevas indicaciones terapéuticas para medicamentos ya existentes y aprobados por los organismos reguladores a fin de tratar diferentes enfermedades.¹⁰⁸ Esto ahorra tiempo y recursos, debido a que los fármacos en cuestión ya han sido sometidos a ensayos clínicos, por lo que el riesgo de desarrollar efectos adversos desconocidos a largo plazo. Este enfoque ha demostrado ser efectivo en el tratamiento de enfermedades como la EA junto a otras enfermedades neurodegenerativas.¹⁰⁹

1.5.1. Nuevos fármacos con potencial en neuroinflamación: Estatinas

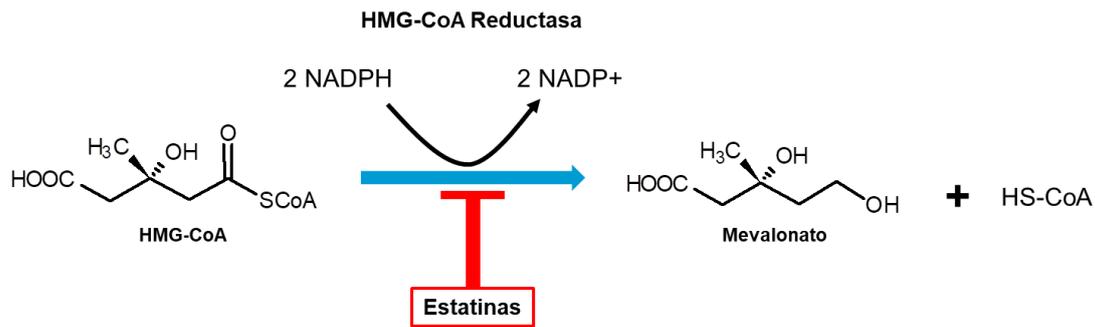
Las estatinas, son un grupo de moléculas ampliamente conocidas como inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa, la cual es la enzima encargada de la conversión de HMG-CoA a mevalonato (Esquema 1), etapa inicial en la síntesis del colesterol.¹¹⁰ El descubrimiento de las estatinas lo realizó el microbiólogo Akira Endo en la década de 1970 buscando nuevos agentes antimicrobianos, cuando descubrió que estos productos naturales desempeñaban un importante efecto inhibitor sobre la HMG-CoA reductasa. Entre ellos, destacó la lovastatina, entonces conocida como ML236B, aislada de un cultivo de *Penicillium citrinum*.¹¹¹

¹⁰⁸ Sisignano, M.; Gribbon, P.; Geisslinger, G. Drug Repurposing to Target Neuroinflammation and Sensory Neuron-Dependent Pain. *Drugs*. **2022**, *82* (4), 357-373.

¹⁰⁹ Jourdan, J. P.; Bureau, R.; Rochais, C.; Dallemagne, P. Drug repositioning: a brief overview. *J. Pharm. Pharmacol.* **2020**, *72* (9), 1145-1151.

¹¹⁰ Endo, A. Discovery and Development of Statins. *Nat. Prod. Commun.* **2017**, *12* (8), 1934578X1701200801.

¹¹¹ Endo, A.; Kuroda, M.; Tsujita, Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. *J. Antibiot.* **1976**, *29* (12), 1346-1348.



Esquema 1. Inhibición competitiva de las estatinas. Esquema adaptado de Morofuji *et al.*¹¹²

Merck comenzó los ensayos clínicos de lovastatina en voluntarios sanos en 1980. La lovastatina demostró ser altamente eficaz para reducir el colesterol en voluntarios sanos, y en 1987 se aprobó como fármaco en EE.UU.¹¹³ La lovastatina fue la primera estatina empleada para inhibir la biosíntesis de colesterol en pacientes con enfermedades cardiovasculares. Actualmente hay varias estatinas disponibles para el tratamiento de la hipercolesterolemia (Figura 9).¹¹⁴

Sin embargo, este no es el único efecto conocido de las estatinas, pues desde su empleo como fármaco se ha sugerido que las estatinas tienen efectos secundarios sobre la inflamación en enfermedades neurodegenerativas. Estos efectos llamados *off-target* de las estatinas, o efectos pleiotrópicos, incluyen la supresión de la inflamación y la reducción del estrés oxidativo, entre otros. Por ello, se propone el reposicionamiento de estos fármacos para nuevos tratamientos.¹¹⁵

¹¹² Morofuji, Y.; Nakagawa, S.; Ujifuku, K.; Fujimoto, T.; Otsuka, K.; Niwa, M.; Tsutsumi, K. Beyond Lipid-Lowering: Effects of Statins on Cardiovascular and Cerebrovascular Diseases and Cancer. *Pharmaceuticals*. **2022**, *15*, 151.

¹¹³ Hajar, R. Statins: past and present. *Heart views*. **2011**, *12* (3), 121-127.

¹¹⁴ Bagheri, H.; Ghasemi, F.; Barreto, G. E.; Sathyapalan, T.; Jamialahmadi, T.; Sahebkar, A. The effects of statins on microglial cells to protect against neurodegenerative disorders: A mechanistic review. *BioFactors*. **2020**, *46* (3), 309-325.

¹¹⁵ Fracassi, A.; Marangoni, M.; Rosso, P.; Pallottini, V.; Fioramonti, M.; Siteni, S.; Segatto, M. Statins and the Brain: More than Lipid Lowering Agents? *Curr. Neuropharmacol*. **2019**, *17*(1), 59–83.

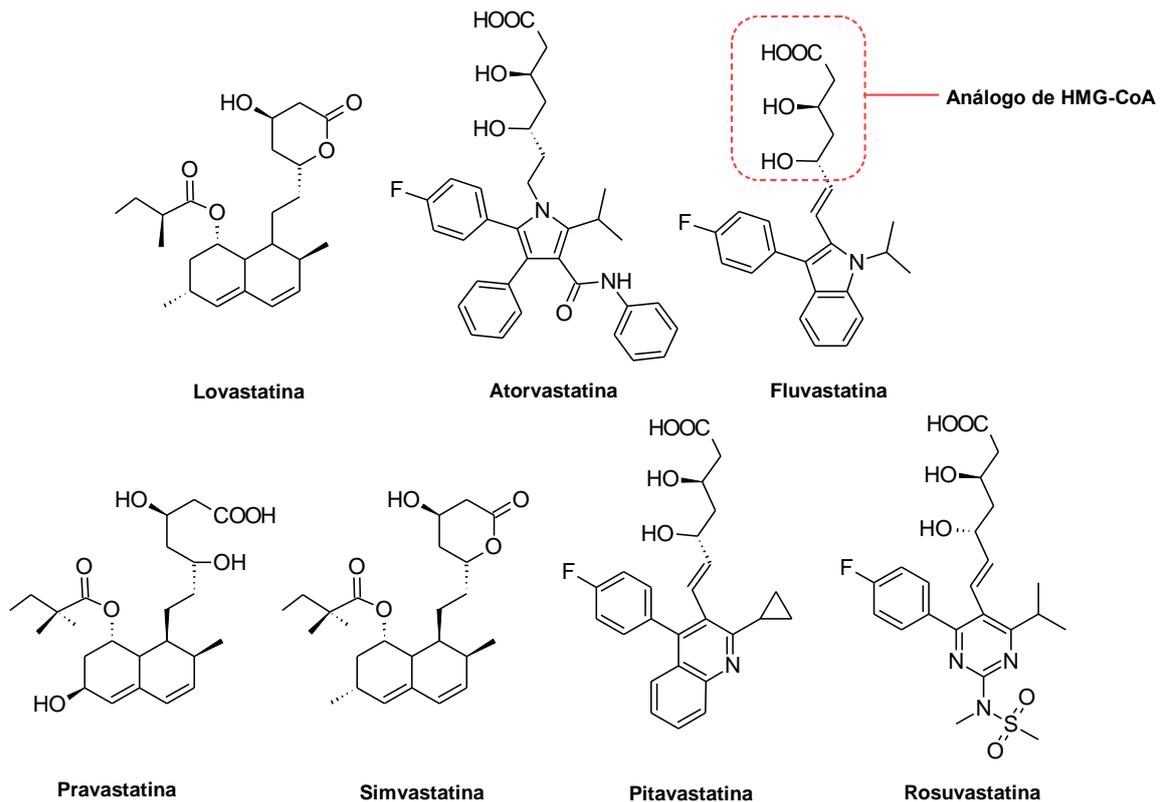


Figura 9. Estructura química de las estatinas.

Como consecuencia de su actividad inhibidora de la síntesis del mevalonato se produce la inhibición de la síntesis de isoprenoides, lo que produce una serie de efectos antiinflamatorios entre los que se incluyen la regulación de factores de transcripción (NF- κ B), supresión de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF α , IL-6), inhibición de la activación de células T y monocitos. Por otro lado, las propias estatinas actúan regulando la producción de NO, aumentando la captación de ROS y disminuyendo la infiltración de células inflamatorias.¹¹⁶ Además, es importante señalar la capacidad de las estatinas para poder cruzar la BBB¹¹⁵ debido principalmente a la lipofilia de las moléculas, siendo la lovastatina y la simvastatina más lipofilas que el resto.¹¹⁷

Sin embargo, las estatinas presentan ciertas limitaciones que reducen su efectividad en el tratamiento de la neuroinflamación. Una alta dosis de estatinas,

¹¹⁶ Kim, S. W.; Kang, H. J.; Jhon, M.; Kim, J. W.; Lee, J. Y.; Walker, A. J.; Agustini, B.; Kim, J. M.; Berk, M. Statins and Inflammation: New Therapeutic Opportunities in Psychiatry. *Front. Psychiatry*. **2019**, *10*, 103.

¹¹⁷ Shepardonson, N. E.; Shankar, G. M.; Selkoe, D. J. Cholesterol Level and Statin Use in Alzheimer Disease: II. Review of Human Trials and Recommendations. *Arch. Neurol*. **2011**, *68* (11), 1385-1392.

puede aumentar el riesgo de la aparición de diferentes efectos adversos, como daños en el músculo esquelético o disfunción hepática.^{118,119}

Actualmente es necesario el diseño de nuevos fármacos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, que presenten efectividad y efectos secundarios reducidos.¹²⁰ Muchas investigaciones se centran en el uso de productos naturales¹²¹ y desarrollan compuestos activos basados en moléculas con actividad biológica, como el indol.^{122,123}

1.5.2. Indoles como precursores sintéticos en la obtención de nuevos fármacos

La molécula indol (Esquema 2A) fue descubierta y caracterizada por Adolf von Baeyer durante la década de 1860 en un intento de elaborar tintes con índigo.¹²⁴ El indol es una base débil y puede participar en diversas reacciones químicas como la sustitución electrófila, formación de complejos organometálicos de aniones de indol y reacciones de oxidación, entre otras.¹²² El indol es reactivo en cuatro posiciones principales; en el carbono 3 (C³), en el átomo de nitrógeno 1 (N¹), en el doble enlace C²-C³ y en el enlace C²-N¹, y se ha utilizado como estructura básica o *scaffold* en la obtención de librerías de compuestos con potencial actividad farmacológica.^{125,126,127}

¹¹⁸ Trapani, L.; Melli, L.; Segatto, M.; Trezza, V.; Campolongo, P.; Jozwiak, A.; Swiezewska, E.; Pucillo, L. P.; Moreno, S.; Fanelli, F.; Linari, M.; Pallottini, V. Effects of myosin heavy chain (MHC) plasticity induced by HMGCoA-reductase inhibition on skeletal muscle functions. *FASEB*. **2011**, 25 (11), 4037-4047.

¹¹⁹ Preiss, D.; Tikkanen, M. J.; Welsh, P.; Ford, I.; Lovato, L. C.; Elam, M. B.; LaRosa, J. C.; DeMicco, D. A.; Colhoun, H. M.; Goldenberg, I.; Murphy, M. J.; MacDonald, T. M.; Pedersen, T. R.; Keech, A. C.; Ridker, P. M.; Kjekshus, J.; Sattar, N.; McMurray, J. J. Lipid-modifying therapies and risk of pancreatitis: a meta-analysis. *Jama*. **2012**, 308 (8), 804-811.

¹²⁰ Shusharina, N.; Yukhnenko, D.; Botman, S.; Sapunov, V.; Savinov, V.; Kamyshev, G.; Sayapin, D.; Voznyuk, I. Modern Methods of Diagnostics and Treatment of Neurodegenerative Diseases and Depression. *Diagnostics*. **2023**, 13 (3), 573.

¹²¹ Di Paolo, M.; Papi, L.; Gori, F.; Turillazzi, E. Natural Products in Neurodegenerative Diseases: A Great Promise but an Ethical Challenge. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, 20 (20), 5170.

¹²² Pappolla, M. A.; Perry, G.; Fang, X.; Zagorski, M.; Sambamurti, K.; Poeggeler, B. Indoles as essential mediators in the gut-brain axis. Their role in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* **2021**, 156, 105403.

¹²³ Kumari, A.; Singh, R. K. Medicinal chemistry of indole derivatives: Current to future therapeutic prospectives. *Bioorg. Chem.* **2019**, 89, 103021.

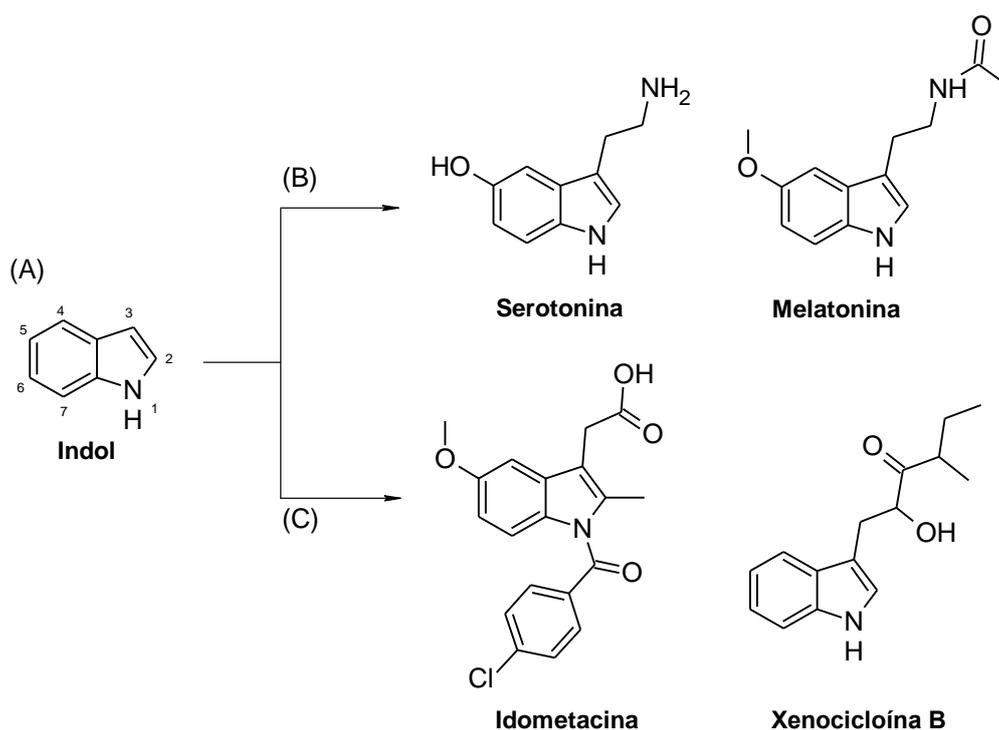
¹²⁴ Van Order, R. B.; Lindwall, H. G. Indole. *Chem. Rev.* **1942**, 30 (1), 69-96.

¹²⁵ Saha, P. K.; Mallick, A.; Turley, A. T.; Bismillah, A. N.; Danos, A.; Monkman, A. P.; Avestro, A.-J.; Yufit, D. S.; McGonigal, P. R. Rupturing aromaticity by periphery overcrowding. *Nat. Chem.* **2023**, 15 (4), 516-525.

¹²⁶ Tajima, N.; Nakatsuka, S.-i. Reactivity of indole as an electrophile and its application for the synthesis of 2-phenylindole and 3-phenylindole. *Heterocycl. Comm.* **2000**, 6, 59-62.

El heterociclo de indol forma parte de muchas moléculas, tanto naturales como sintéticas, con funciones muy diversas. Los indoles están ampliamente distribuidos en la naturaleza y se ha estudiado su actividad biológica, que depende de las modificaciones de su estructura.¹²¹

En humanos, el triptófano obtenido en la dieta se emplea como precursor bioquímico del indol que da lugar a otros derivados con importantes actividades biológicas, como el neurotransmisor serotonina o la neurohormona melatonina, que actúan sobre el sistema nervioso central y periférico¹²⁸ (Esquema 2B).



Esquema 2. Estructura del indol y derivados con actividad biológica.

Entre las diferentes actividades de los indoles cabe mencionar la actividad antiinflamatoria de la indometacina (Esquema 2C), un derivado de indol considerado como uno de los fármacos antiinflamatorios y analgésicos más prometedores.¹²⁹ Recientemente se ha descrito que la xenocicloína B (Esquema 2C), aislada de

¹²⁷ DeSimone, R. W.; Currie, K. S.; Mitchell, S. A.; Darrow, J. W.; Pippin, D. A. Privileged structures: applications in drug discovery. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2004**, 7 (5), 473-494.

¹²⁸ Murch, S. J.; KrishnaRaj, S.; Saxena, P. K. Tryptophan is a precursor for melatonin and serotonin biosynthesis in in vitro regenerated St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv. Anthos) plants. *Plant Cell Rep.* **2000**, 19 (7), 698-704.

¹²⁹ Karkhah, A.; Saadi, M.; Pourabdolhossein, F.; Saleki, K.; Nouri, H. R., Indomethacin attenuates neuroinflammation and memory impairment in an STZ-induced model of Alzheimer's like disease. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **2021**, 43 (6), 758-766.

Streptomyces sp., inhibe significativamente la expresión de la iNOS en la línea celular de macrófago RAW264.7 por lo que se considera un potencial fármaco antiinflamatorio derivado de indol.¹³⁰ En cuanto a tratamientos neurológicos, se han empleado derivados de indol el tratamiento de la depresión en modelos murinos.¹³¹ La forma oxidada del indol, la isatina, se ha empleado más extensamente en el desarrollo de fármacos y recientemente ha cobrado importancia en el desarrollo de fármacos antiinflamatorios.¹³²

1.5.3. Derivados de isatina como potenciales fármacos en la neuroinflamación

La isatina (1H-indol-2,3-diona) fue obtenida por primera vez por Erdman y Laurent en 1841 como un producto de la oxidación del índigo por los ácidos nítrico y crómico.¹³³ Durante casi 140 años se consideró un producto sintético, hasta que fue aislada de plantas del género *Isatis* cuando se confirmó que era un producto de origen natural. Desde entonces se ha encontrado en multitud de especies de plantas y animales.¹³⁴

En el caso de los de los mamíferos la podemos encontrar en el cerebro, tejidos y fluidos corporales. Tanto en humanos como en ratas, se genera mayoritariamente a partir del indol, producido por el catabolismo del triptófano de la dieta en el intestino por acción de la microbiota, donde es posteriormente oxidado por el organismo. También existen rutas de síntesis de isatina exclusivas de bacterias, pero ambos parten del indol como sustrato (Esquema 3).^{135,136}

¹³⁰ Jiang, L.; Pu, H.; Qin, X.; Liu, J.; Wen, Z.; Huang, Y.; Xiang, J.; Xiang, Y.; Ju, J.; Duan, Y.; Huang, Y. Syn-2, 3-diols and anti-inflammatory indole derivatives from *Streptomyces sp.* CB09001. *Nat. Prod. Res.* **2021**, *35* (1), 144-151.

¹³¹ Bampi, S. R.; Casaril, A. M.; Fronza, M. G.; Domingues, M.; Vieira, B.; Begnini, K. R.; Seixas, F. K.; Collares, T. V.; Lenardão, E. J.; Savegnago, L. The selenocompound 1-methyl-3-(phenylselanyl)-1H-indole attenuates depression-like behavior, oxidative stress, and neuroinflammation in streptozotocin-treated mice. *Brain Res. Bull.* **2020**, *161*, 158-165.

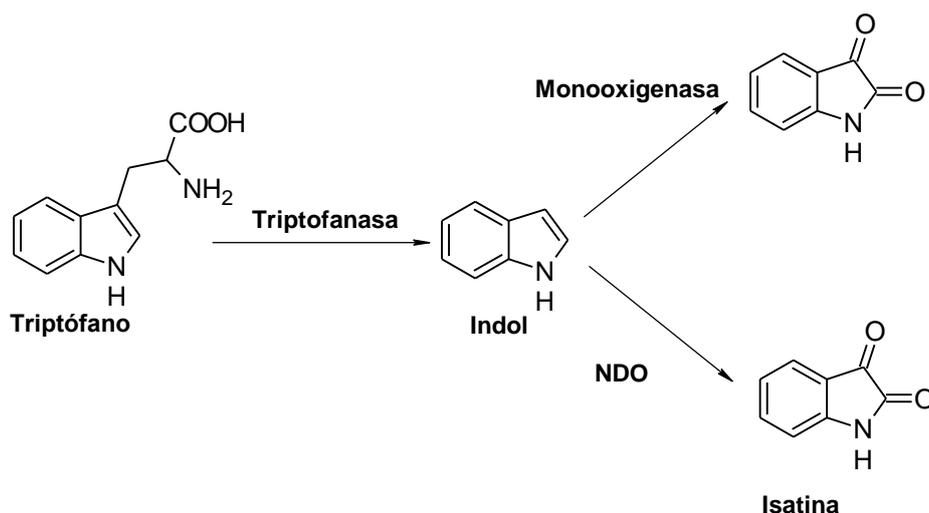
¹³² Dantas, L.; Fonseca, A. G.; Pereira, J. R.; Furtado, A. A.; Gomes, P.; Fernandes-Pedrosa, M. F.; Leite, A. C. L.; Rego, M.; Pitta, M. G. R.; Lemos, T. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of the isatin derivative (Z)-2-(5-chloro-2-oxoindolin-3-ylidene)-N-phenylhydrazinecarbothioamide in mice. *Braz. J. Med. Biol.* **2020**, *53* (10), e10204.

¹³³ Silva, J. F. M.; Garden, S. J.; Pinto, A. The Chemistry of Isatins: A Review from 1975 to 1999. *J. Braz. Chem. Soc.* **2001**, *12*, 273-324.

¹³⁴ Chowdhary, S.; Shalini; Arora, A.; Kumar, V. A Mini Review on Isatin, an Anticancer Scaffold with Potential Activities against Neglected Tropical Diseases(NTDs). *Pharmaceuticals.* **2022**, *15*, 536.

¹³⁵ Medvedev, A.; Igosheva, N.; Crumeyrolle-Arias, M.; Glover, V. Isatin: role in stress and anxiety. *Stress.* **2005**, *8* (3), 175-183.

¹³⁶ Medvedev, A.; Buneeva, O. Tryptophan Metabolites as Mediators of Microbiota-Gut-Brain Communication: Focus on Isatin. *Front. Behav. Neurosci.* **2022**, *16*, 922274.



Esquema 3. Síntesis de isatina a partir de triptófano en humanos. La ruta comienza con la escisión de la cadena lateral del triptófano por la triptofanasa bacteriana (gen TnaA). Las bacterias de la microbiota oxidan el indol empleando la naftaleno dioxigenasa bacteriana (NDO), formando isatina, así como otros metabolitos. En humanos, el indol libre es absorbido por las células huésped y es metabolizado por los sistemas de monooxigenasa del citocromo P450 del huésped, sintetizando isatina. Esquema adaptado de Medvedev *et al.*¹³⁶

La isatina es un heterociclo con dos anillos, un anillo aromático de seis carbonos y un anillo de cinco átomos con carácter antiaromático¹³⁷ (Figura 10). La isatina reacciona con nucleófilos, como aminas primarias, hidrazinas y/o tioles de forma preferente en el C³ antes que en C², debido a la presencia de un enlace amida en posición 1.^{133,138} Por otra parte, la presencia del enlace amida hace que la isatina sea mejor nucleófilo que el indol. En las últimas décadas la isatina ha despertado interés para el desarrollo de nuevos fármacos.¹³⁹

¹³⁷ Varun; Sonam; Kakkar, R. Isatin and its derivatives: a survey of recent syntheses, reactions, and applications. *MedChemComm.* **2019**, *10* (3), 351-368.

¹³⁸ Ali, A. Q.; Teoh, S. G.; Salhin, A.; Eltayeb, N. E.; Khadeer Ahamed, M. B.; Abdul Majid, A. M. Synthesis of isatin thiosemicarbazones derivatives: in vitro anti-cancer, DNA binding and cleavage activities. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2014**, *125*, 440-448.

¹³⁹ MiShra, P.; MiShra, A.; Bahe, A.; Roy, A.; Das, R. Synthesis of Isatin and its derivatives containing heterocyclic compounds. *J. Turk. Chem. Soc. A: Chem.* **2021**, *8*, 1089-1098.

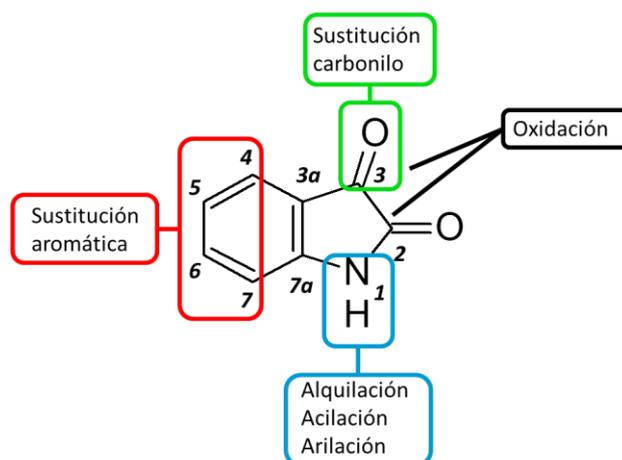


Figura 10. Posiciones reactivas en la estructura de la isatina.¹⁴⁰

Las principales modificaciones en la isatina se producen en N^1 , en el carbonilo C^3 y en el anillo aromático ($C^4/C^5/C^6/C^7$, Figura 10), aunque en este último caso, no todas las sustituciones del anillo son igual de probables.¹³⁸ Además, la estructura de la isatina también puede ser susceptible de ser oxidada lo que le permite actuar como un aceptor de radicales libres (Figura 10).^{141,142} Por lo tanto, la isatina es una molécula que participa en diferentes reacciones gracias a la presencia de varios centros reactivos en su estructura,¹³⁴ y se ha utilizado ampliamente en el desarrollo de nuevos fármacos.¹⁴³

Respecto a su actividad biológica, cabe destacar que tanto a la isatina como a sus derivados se les han atribuido una serie de actividades farmacológicas, tales como anticancerígenas,¹⁴³ antivirales,¹⁴⁴ anti-tuberculosas,¹⁴⁵ antimicrobianas,¹⁴⁶ antioxidantes¹⁴⁷ o antiinflamatorias entre otras.^{148,149}

¹⁴⁰ Kumar, S.; Nair, A. S.; Abdelgawad, M. A.; Mathew, B. Exploration of the Detailed Structure–Activity Relationships of Isatin and Their Isomers As Monoamine Oxidase Inhibitors. *ACS omega*. **2022**, 7 (19), 16244-16259.

¹⁴¹ Yu, L.; Ye, J.; Zhang, X.; Ding, Y.; Xu, Q. Recyclable (PhSe)₂-catalyzed selective oxidation of isatin by H₂O₂: a practical and waste-free access to isatoic anhydride under mild and neutral conditions. *Catal. Sci. Technol.* **2015**, 5 (10), 4830-4838.

¹⁴² Pakravan, P.; Kashanian, S.; Khodaei, M. M.; Harding, F. J. Biochemical and pharmacological characterization of isatin and its derivatives: from structure to activity. *Pharmacol. Rep.* **2013**, 65 (2), 313-35.

¹⁴³ Ferraz de Paiva, R. E.; Vieira, E. G.; Rodrigues da Silva, D.; Wegermann, C. A.; Costa Ferreira, A. M. Anticancer Compounds Based on Isatin-Derivatives: Strategies to Ameliorate Selectivity and Efficiency. *Front. Mol. Biosci.* **2021**, 7, 627272.

¹⁴⁴ Elsaman, T.; Mohamed, M. S.; Eltayib, E. M.; Abdel-aziz, H. A.; Abdalla, A. E.; Munir, M. U.; Mohamed, M. A. Isatin derivatives as broad-spectrum antiviral agents: the current landscape. *Med Chem Res.* **2022**, 31 (2), 244-273.

¹⁴⁵ Xu, Z.; Zhang, S.; Gao, C.; Fan, J.; Zhao, F.; Lv, Z.-S.; Feng, L.-S. Isatin hybrids and their anti-tuberculosis activity. *Chin Chem Lett.* **2017**, 28 (2), 159-167.

Su efecto antiinflamatorio se ha relacionado con la capacidad de la isatina para inhibir a COX-2, una enzima también involucrada en el desarrollo de procesos inflamatorios.¹⁵⁰ El mecanismo de inhibición de la COX-2 por la isatina no se ha dilucidado por completo, pero se cree que la isatina puede unirse al sitio activo de la COX-2, impidiendo que se llegue a producir la formación de PGE2.¹⁵¹

Además, la isatina y sus derivados también tienen la capacidad de inhibir a otras enzimas inflamatorias, como la iNOS, encargada de la producción de NO.¹⁵² El mecanismo de inhibición de la iNOS por la isatina tampoco está completamente caracterizado, pero se considera que la isatina puede afectar a los niveles de la iNOS al inhibir su expresión.

Recientemente, en 2019 Zeeshan *et al.*, observaron efectos antiinflamatorios y analgésicos de una serie de derivados de isatina inyectados en ratones, bloqueando significativamente la activación de las vías de señalización de NF- κ B.¹⁵³ Además, estos derivados impedían la progresión de la ruta de NF- κ B al proteger notablemente la degradación de I κ B en el citosol, algo que podría suponer una gran ventaja para el presente estudio de demostrarse el mismo efecto en las células de la microglia (Figura 2A). Apoyando estos resultados, se describe una menor translocación de NF- κ B en el núcleo como consecuencia del tratamiento con los derivados. De esta forma, al inhibir

¹⁴⁶ Guo, H. Isatin derivatives and their anti-bacterial activities. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *164*, 678-688.

¹⁴⁷ Gupta, A. K.; Kalpana, S.; Malik, J. K. Synthesis and in vitro antioxidant activity of new 3-substituted-2-oxindole derivatives. *Indian J. Pharm. Sci.* **2012**, *74* (5), 481-486.

¹⁴⁸ Jarapula, R.; Gangarapu, K.; Manda, S.; Rekulapally, S. Synthesis, In Vivo Anti-Inflammatory Activity, and Molecular Docking Studies of New Isatin Derivatives. *Int. J. Med. Chem.* **2016**, *2016*, 2181027.

¹⁴⁹ Cheke, R. S.; Patil, V. M.; Firke, S. D.; Ambhore, J. P.; Ansari, I. A.; Patel, H. M.; Shinde, S. D.; Pasupuleti, V. R.; Hassan, M. I.; Adnan, M.; Kadri, A.; Snoussi, M. Therapeutic Outcomes of Isatin and Its Derivatives against Multiple Diseases: Recent Developments in Drug Discovery. *Pharmaceuticals*. **2022**, *15* (3), 272.

¹⁵⁰ Matheus, M. E.; Violante Fde, A.; Garden, S. J.; Pinto, A. C.; Fernandes, P. D. Isatins inhibit cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in a mouse macrophage cell line. *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, *556* (1-3), 200-206.

¹⁵¹ Socca, E. A.; Luiz-Ferreira, A.; de Faria, F. M.; de Almeida, A. C.; Dunder, R. J.; Manzo, L. P.; Souza Brito, A. R. M. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha and cyclooxygenase-2 by Isatin: A molecular mechanism of protection against TNBS-induced colitis in rats. *Chem. Biol. Interact.* **2014**, *209*, 48-55.

¹⁵² Naglah, A. M.; Ahmed, A. F.; Wen, Z.-H.; Al-Omar, M. A.; Amr, A. E.-G. E.; Kalmouch, A. New Inducible Nitric Oxide Synthase and Cyclooxygenase-2 Inhibitors, Nalidixic Acid Linked to Isatin Schiff Bases via Certain I-Amino Acid Bridges. *Molecules*. **2016**, *21* (4), 498.

¹⁵³ Zeeshan, S.; Naveed, M.; Khan, A.; Atiq, A.; Arif, M.; Ahmed, M. N.; Kim, Y. S.; Khan, S. N-Pyrazoloyl and N-thiopheneacetyl hydrazone of isatin exhibited potent anti-inflammatory and anti-nociceptive properties through suppression of NF- κ B, MAPK and oxidative stress signaling in animal models of inflammation. *Inflamm. Res.* **2019**, *68* (7), 613-632.

la ruta de NF- κ B se le atribuye también la supresión de la producción de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IL-6).

Este trabajo se centra en explorar la actividad anti-neuroinflamatoria de derivados de isatina, como tratamiento potencial para regular la respuesta inflamatoria en enfermedades neurodegenerativas. Es necesario que las moléculas lleguen al cerebro atravesando la BBB, una barrera física formada por células endoteliales unidas por uniones estrechas y sin fenestraciones que restringen el paso de sustancias. Estas células endoteliales están rodeadas en primer lugar por una capa discontinua de pericitos, y en segundo lugar, por la lámina basal, adyacente a los pies de los astrocitos (Figura 11).¹⁵⁴

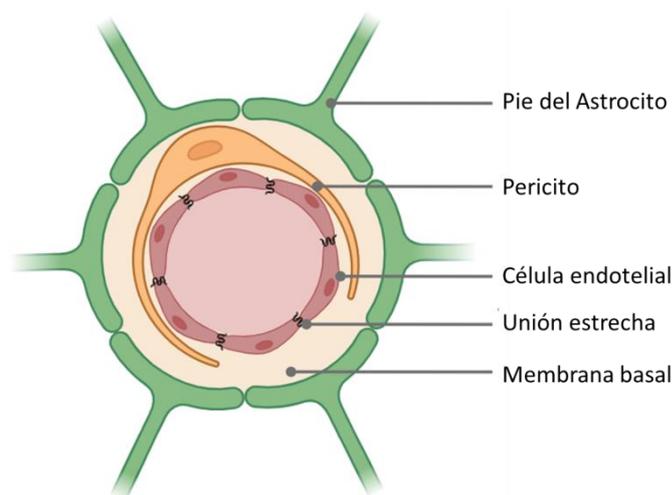


Figura 11. Anatomía de la barrera hematoencefálica (BBB). Figura adaptada de Jiang et al.¹⁵⁴

Debido a la alta selectividad de la BBB, no todos los fármacos pueden acceder al SNC. La isatina puede cruzar la BBB mediante difusión simple gracias a su pequeño tamaño molecular y lipofilia, que le permite atravesar las uniones estrechas entre las células endoteliales que forman la barrera hematoencefálica.¹⁵⁵ La isatina cumple la "regla de cinco" de Lipinski¹⁵⁶, que permite predecir la permeabilidad por difusión pasiva de moléculas a través de la BBB. Además, se ha descrito experimentalmente

¹⁵⁴ Jiang, X.; A.V. Andjelkovic; L. Zhu; T. Yang; M.V.L. Bennett; J. Chen; R.F. Keep; Y. Shi. Blood-brain barrier dysfunction and recovery after ischemic stroke. *Prog Neurobiol.* **2018**. 163-164,144-171.

¹⁵⁵ Mosquera J.; García I.; Liz-Marzán L.M. Cellular Uptake of Nanoparticles versus Small Molecules: A Matter of Size. *Acc. Chem. Res.* **2018**, 51, 2305–2313.

¹⁵⁶ Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney, P.J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, 46, 3–26.

que derivados de isatina cruzan la BBB gracias a su naturaleza hidrofóbica¹⁵⁷ y que la isatina administrada de forma exógena en ratas cruza la BBB, pues se observa un incremento del nivel de isatina cerebral.¹⁵⁸

También se conoce la distribución de la isatina endógena en el cerebro de ratas, siendo su concentración mayor en hipotálamo > corteza, hipocampo > cerebelo, cuerpo estriado > tálamo > tronco cerebral¹⁵⁹ y se ha descrito que su síntesis se induce durante períodos de estrés. La concentración de isatina se incrementa de 2 a 3 veces en el cerebro de modelos de ratas con estrés respecto a los controles, siendo los puntos de mayor concentración el hipocampo y el cerebelo.¹⁵⁸ En humanos, este incremento de los niveles de isatina en los fluidos corporales se puede relacionar con trastornos neurológicos. Concretamente, en la enfermedad de Parkinson (EP) se ha observado que el progreso de la enfermedad está asociado a un aumento significativo de la isatina urinaria.¹⁶⁰

Por consiguiente, en el marco de esta Tesis Doctoral se plantea la obtención de derivados de isatina para el tratamiento de la neuroinflamación. Teniendo en cuenta que la isatina tiene diferentes actividades,^{141,159} y que es necesario que alcance el cerebro en una concentración óptima, se propone el uso de un sistema de transporte de fármacos para su futura administración *in vivo*. El desarrollo de un sistema de transporte que favorezca la liberación de los compuestos de interés en el cerebro evitando que se acumulen en otros órganos permitirá un tratamiento focalizado de la neuroinflamación afectando lo menos posible al resto del organismo.

¹⁵⁷ Jabbar, S. S.; Najim, S. M.; Fadhil, A. A. Evaluation of Anti-Inflammatory Activities of Newly Synthesized Isatin Derivatives in Rats. *Int. Res. J. Pharm.* **2019**, *10* (2), 75-80.

¹⁵⁸ Medvedev, A.; Buneeva, O.; Gnedenko, O.; Ershov, P.; Ivanov, A. Isatin, an endogenous nonpeptide biofactor: A review of its molecular targets, mechanisms of actions, and their biomedical implications. *BioFactors*. **2018**, *44* (2), 95-108.

¹⁵⁹ Crumeyrolle-Arias, M.; Buneeva, O.; Zgoda, V.; Kopylov, A.; Cardona, A.; Tournaire, M. C.; Pozdnev, V.; Glover, V.; Medvedev, A. Isatin binding proteins in rat brain: in situ imaging, quantitative characterization of specific [3H]isatin binding, and proteomic profiling. *J. Neurosci. Res.* **2009**, *87* (12), 2763-2772.

¹⁶⁰ Hamaue, N.; Yamazaki, N.; Terado, M.; Minami, M.; Ohno, K.; Ide, H.; Ogata, A.; Honma, S.; Tashiro, K. Urinary isatin concentrations in patients with Parkinson's disease determined by a newly developed HPLC-UV method. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* **2000**, *108* (1-2), 63-73.

1.6. Sistemas de transporte de fármacos

El tratamiento de patologías asociadas con la neuroinflamación es complejo y tiene múltiples limitaciones debido a las características únicas de cada enfermedad. Con el uso de fármacos, se pueden producir fracasos terapéuticos, atribuidos a una menor absorción en las membranas de las células neuronales, a la inestabilidad del propio fármaco en el entorno celular, e incluso a la toxicidad cerebral entre otros parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos.^{161,162} Por ello, es necesaria una administración dirigida de los fármacos, o al menos, una forma de limitar la difusión de los mismos por áreas externas a la diana terapéutica.

Una forma de lograr este objetivo es mediante el uso de sistemas de transporte que vehiculicen los fármacos a órganos, tejidos y células a través de la circulación sanguínea local o sistémica, lo que permite que el tratamiento actúe directamente sobre los sitios específicos de la enfermedad, acompañados de la generación de los efectos terapéuticos deseados.¹⁶³

Así surgen las terapias dirigidas, cuyo objetivo es conseguir una interacción farmacológica específica entre el fármaco y la diana. Dichos tratamientos utilizan medicamentos diseñados concretamente para atacar de forma específica a las células diana sin afectar a las células circundantes. Este tipo de tratamiento tiene una importancia especial en terapia contra el cáncer. Sin embargo, estas mismas herramientas pueden ser aplicables para el tratamiento de otras enfermedades.¹⁶⁴

La mayoría de las terapias dirigidas se pueden dividir en dos tipos principales, fármacos basados en pequeñas moléculas o anticuerpos monoclonales (mAb). Los mAb son producidos por clones de células B y se unen a antígenos específicos para estimular el sistema inmunitario a fin de combatir enfermedades específicas.¹⁶⁵

¹⁶¹ Sood, R. R.; Taheri, S.; Candelario-Jalil, E.; Estrada, E. Y.; Rosenberg, G. A. Early beneficial effect of matrix metalloproteinase inhibition on blood-brain barrier permeability as measured by magnetic resonance imaging countered by impaired long-term recovery after stroke in rat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2008**, *28* (2), 431-438.

¹⁶² Arias, J. L. Chemical engineering of nanocarrier surfaces for an efficient drug delivery to severe diseases. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19* (19), 3069.

¹⁶³ Patra, J. K.; Das, G.; Fraceto, L. F.; Campos, E. V. R.; Rodriguez-Torres, M. d. P.; Acosta-Torres, L. S.; Diaz-Torres, L. A.; Grillo, R.; Swamy, M. K.; Sharma, S.; Habtemariam, S.; Shin, H.-S. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *J. Nanobiotechnology.* **2018**, *16* (1), 71.

¹⁶⁴ Mozafari, M. R.; Eds. *Bioactive Entrapment and Targeting Using Nanocarrier Technologies: An Introduction*. Mozafari, M. R., Springer Netherlands: Dordrecht. **2006**, pp 1-16.

¹⁶⁵ Zahavi, D.; Weiner, L. Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy. *Antibodies.* **2020**, *9* (3), 34.

Por otro lado, las terapias dirigidas basadas en pequeñas moléculas presentan una ventaja importante respecto a los mAb, pues estas pueden internalizarse fácilmente en las células debido a su reducido tamaño y peso molecular sin tener que unirse a receptores específicos. Al contrario que los mAb, las moléculas pequeñas son generalmente menos costosas de producir a gran escala. Además, las moléculas pequeñas suelen ser más estables y tener una vida útil más larga, lo que facilita su almacenamiento y distribución.¹⁶⁶

Actualmente, el descubrimiento de nuevos fármacos se ha acelerado y aunque el proceso de identificación de nuevos candidatos es sólido, los medicamentos a menudo fallan en etapas más adelantadas de desarrollo. Generalmente esto es debido a problemas de seguridad y eficacia que se asocian con una alta acumulación en órganos no objetivo, o incluso, que lleguen a una concentración deficiente a los órganos objetivo.¹⁶⁷ En estos casos, es habitual utilizar agentes transportadores de tamaño nanométrico para solventar el problema.¹⁶⁸

1.6.1. Uso de nanopartículas en terapias dirigidas

Desde el siglo pasado, la Nanotecnología es un campo de investigación en auge. El premio Nobel Richard P. Feynman presentó la nanotecnología durante su famosa conferencia de 1959 *There's Plenty of Room at the Bottom*, y desde entonces, se han realizado grandes avances en este campo.¹⁶⁹ El prefijo *nano* significa una billonésima parte (1×10^{-9}), por lo que la Nanotecnología trata con estructuras y materiales que poseen dimensiones del orden de una billonésima parte de metro, a escala de nanómetros (nm).¹⁷⁰ La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) establece que el tamaño medio de las NPs está comprendido entre 1 y 100 nm debido a que las propiedades que diferencian a las NPs de otros materiales de mayor tamaño, son muy significativas para tamaños menores de 100 nm. Debido a que se consideran otros fenómenos (transparencia o turbidez, ultrafiltración, dispersión

¹⁶⁶ Adams, G. P.; Weiner, L. M. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23* (9), 1147-1157.

¹⁶⁷ Zhao, Z.; Ukidve, A.; Kim, J.; Mitragotri, S. Targeting Strategies for Tissue-Specific Drug Delivery. *Cell.* **2020**, *181* (1), 151-167.

¹⁶⁸ Park, K. Controlled drug delivery systems: past forward and future back. *J Control Release.* **2014**, *190*, 3-8.

¹⁶⁹ Khan, I.; Saeed, K.; Khan, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arab. J. Chem.* **2019**, *12*, 908-931

¹⁷⁰ Charles P. Poole Jr., F. J. O., *Introduction To Nanotechnology*. Wiley-Interscience: Canada, 2003; Vol. n.p., p 201.

estable, etc.) se amplía este límite y es también aceptado el uso del prefijo *nano* para dimensiones inferiores a 500 nm.¹⁷¹

Debido a esta diferencia de tamaño, las NPs pueden mostrar tanto propiedades físicas como químicas significativamente diferentes a las de sus análogas de mayor tamaño. Esto se debe al aumento de la relación entre el área de la superficie y el volumen, dando como resultado que los átomos de la superficie del material dominen el funcionamiento del mismo. Esto significa que la fracción de átomos en la superficie de los nanomateriales aumenta, y los átomos situados en la superficie de los nanomateriales tienen menos vecinos directos.^{172,173}

El reducido tamaño de las NPs es especialmente ventajoso en el campo de la Medicina; ya que permite que las NPs circulen por todo el cuerpo, y además, gracias a su gran superficie, puede optimizarse la funcionalización con ligandos para favorecer la interacción con receptores determinados, o modificarse el perfil de liberación cuando son cargadas con fármacos, o ser eliminadas del organismo por mecanismos diferentes a los utilizados para la eliminación de sustancias disueltas o partículas de mayor tamaño. Esas propiedades han permitido, entre otras cosas, nuevas formas de mejorar las técnicas de imagen que ayudan a obtener una visualización más detallada de órganos, tumores y otros tejidos que presenten enfermedad en el cuerpo.¹⁷⁴

Una ventaja que presentan las NPs para el tratamiento de la neuroinflamación es su capacidad de transportar de fármacos al cerebro, potenciando así el efecto terapéutico y limitando la aparición de efectos secundarios.¹⁷⁵ En concreto, la Nanotecnología Farmacéutica presenta la posibilidad de diseñar nanosistemas inteligentes, capaces de responder a la presencia de determinadas condiciones

¹⁷¹ Vert, M.; Doi, Y.; Hellwich, K.-H.; Hess, M.; Hodge, P.; Kubisa, P.; Rinaudo, M.; Schué, F. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure Appl. Chem.* **2012**, *84*, 377-410.

¹⁷² Joudeh, N.; Linke, D. Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. *J. Nanobiotechnology.* **2022**, *20* (1), 262.

¹⁷³ Sharma, J. N.; Pattadar, D. K.; Mainali, B. P.; Zamborini, F. P. Size Determination of Metal Nanoparticles Based on Electrochemically Measured Surface-Area-to-Volume Ratios. *Anal. Chem.* **2018**, *90* (15), 9308-9314.

¹⁷⁴ Ghazanfari, M. R.; Kashefi, M.; Shams, S. F.; Jaafari, M. R. Perspective of Fe₃O₄ Nanoparticles Role in Biomedical Applications. *Biochem. Res. Int.* **2016**, *2016*, 7840161.

¹⁷⁵ Li, Y. Q.; Xu, M.; Dhawan, U.; Liu, W. C.; Wu, K. T.; Liu, X. R.; Lin, C.; Zhao, G.; Wu, Y. C.; Chung, R. J. Iron-gold alloy nanoparticles serve as a cornerstone in hyperthermia-mediated controlled drug release for cancer therapy. *Int. J. Nanomedicine.* **2018**, *13*, 5499-5509.

intrínsecas de la región diana o generadas de forma externa afectando específicamente a ésta.¹⁷⁶

Aunque la mayoría de las formulaciones nanotecnológicas están dirigidas al cáncer, se han desarrollado este tipo de formulaciones en otros objetivos terapéuticos. Un ejemplo reciente son las vacunas de Pfizer y Moderna para la profilaxis del virus SARS-CoV-2 constituidas por ARN mensajero encapsulado en NPs de base lipídica.¹⁷⁷

Dependiendo de la estructura y composición de las NPs, tendrán diferente efecto en medios biológicos.¹⁷⁸ Basándonos en su composición, existen dos tipos diferentes de NPs: orgánicas (lipídicas y poliméricas) e inorgánicas (nanotubos de carbono y NPs metálicas) como se muestra en la Figura 12.

Las NPs orgánicas incluyen NPs basadas en carbohidratos, lípidos, proteínas o cualquier otro compuesto orgánico, siendo las micelas o complejos proteicos los ejemplos más destacados (Figura 12 A,B). Las NPs lipídicas están constituidas por, al menos, una bicapa lipídica que rodea a un medio acuoso interno. En función de las bicapas lipídicas que la formen se denominará unilamelar o multilamelar (Figura 12A).¹⁷⁹ Las NPs poliméricas pueden sintetizarse a partir de materiales naturales, como proteínas, o dendrímeros sintéticos, y los productos terapéuticos pueden encapsularse dentro del núcleo de las NPs, quedar atrapados en la matriz polimérica, o unirse a la superficie de las NPs (Figura 12B).^{180,181}

Finalmente, las NPs inorgánicas engloban a todas aquellas NPs no constituidas por materiales orgánicos (Figura 12). Las NPs de carbono son una extensa familia aunque las NPs más utilizadas consisten principalmente en nanotubos de carbono

¹⁷⁶ Mura, S.; Nicolas, J.; Couvreur, P. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. *Nat. Mater.* **2013**, *12* (11), 991-1003.

¹⁷⁷ Oliver, S. E.; Gargano, J. W.; Scobie, H.; Wallace, M.; Hadler, S. C.; Leung, J.; Blain, A. E.; McClung, N.; Campos-Outcalt, D.; Morgan, R. L.; Mbaeyi, S.; MacNeil, J.; Romero, J. R.; Talbot, H. K.; Lee, G. M.; Bell, B. P.; Dooling, K. The Advisory Committee on Immunization Practices' Interim Recommendation for Use of Janssen COVID-19 Vaccine - United States, February 2021. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2021**, *70* (9), 329-332.

¹⁷⁸ Khan, N. H.; Mir, M.; Ngowi, E. E.; Zafar, U.; Khakwani, M.; Khattak, S.; Zhai, Y. K.; Jiang, E. S.; Zheng, M.; Duan, S. F.; Wei, J. S.; Wu, D. D.; Ji, X. Y. Nanomedicine: A Promising Way to Manage Alzheimer's Disease. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2021**, *9*, 630055.

¹⁷⁹ Gradzielski, M. Vesicles and vesicle gels - Structure and dynamics of formation. *J. Condens. Matter Phys.* **2003**, *15*, R655.

¹⁸⁰ Mitchell, M. J.; Billingsley, M. M.; Haley, R. M.; Wechsler, M. E.; Peppas, N. A.; Langer, R. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20* (2), 101-124.

¹⁸¹ Abbasi, E.; Aval, S. F.; Akbarzadeh, A.; Milani, M.; Nasrabadi, H. T.; Joo, S. W.; Hanifehpour, Y.; Nejati-Koshki, K.; Pashaei-Asl, R. Dendrimers: synthesis, applications, and properties. *Nanoscale Res. Lett.* **2014**, *9* (1), 247.

tridimensionales o grafeno bidimensional (Figura 12C).¹⁸² Dentro de las NPs inorgánicas, las NPs de oro y óxido de hierro son unas de las más empleadas por los investigadores (Figura 12D).¹⁸⁰

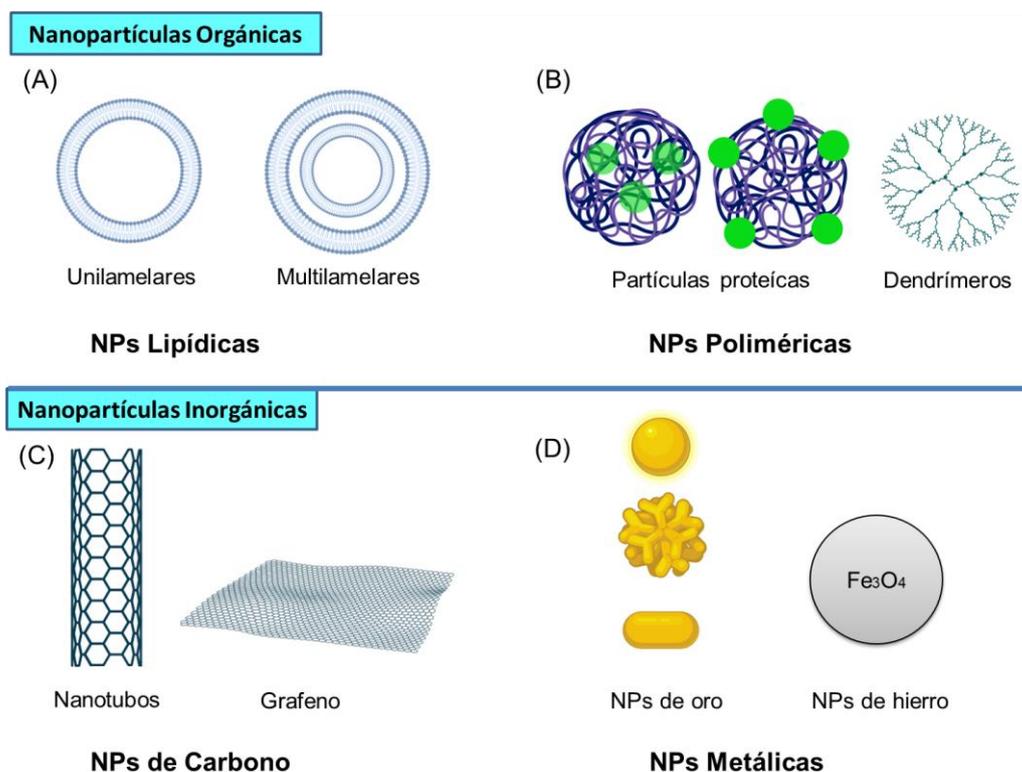


Figura 12. Principales tipos de nanopartículas empleadas en Biomedicina. NPs lipídicas (A), NPs poliméricas (proteínas) o sintéticos (dendrimeros) (B), NPs de carbono (nanotubos de carbono tridimensionales o grafeno bidimensional) (C) y las las NPs metálicas (NPs de oro y óxido de hierro) (D).

Entre los diferentes tipos de NPs con aplicaciones en Biomedicina para la administración dirigida de fármacos, en esta Tesis Doctoral se ha desarrollado un sistema de transporte basado en NPs de óxido de hierro con propiedades superparamagnéticas que permitirán el transporte de fármacos y facilitarán su localización en el cerebro frente a otros órganos, empleando un campo magnético externo.¹⁷²

¹⁸² Maiti, D.; Tong, X.; Mou, X.; Yang, K. Carbon-Based Nanomaterials for Biomedical Applications: A Recent Study. *Front. Pharmacol.* **2019**, *9*, 1401.

1.6.2. Nanopartículas magnéticas

Las NPs magnéticas responden a la aplicación de un campo magnético y constituyen uno de los grupos más prometedores debido a su versatilidad en la aplicación en multitud de áreas, siendo la imagen por resonancia magnética (MRI) o los sistemas de liberación controlada de fármacos los campos de mayor interés actual.¹⁸³ Las NPs magnéticas se clasifican según su respuesta a un campo magnético en diamagnéticas, paramagnéticas, ferromagnéticas y superparamagnéticas (Figura 13).

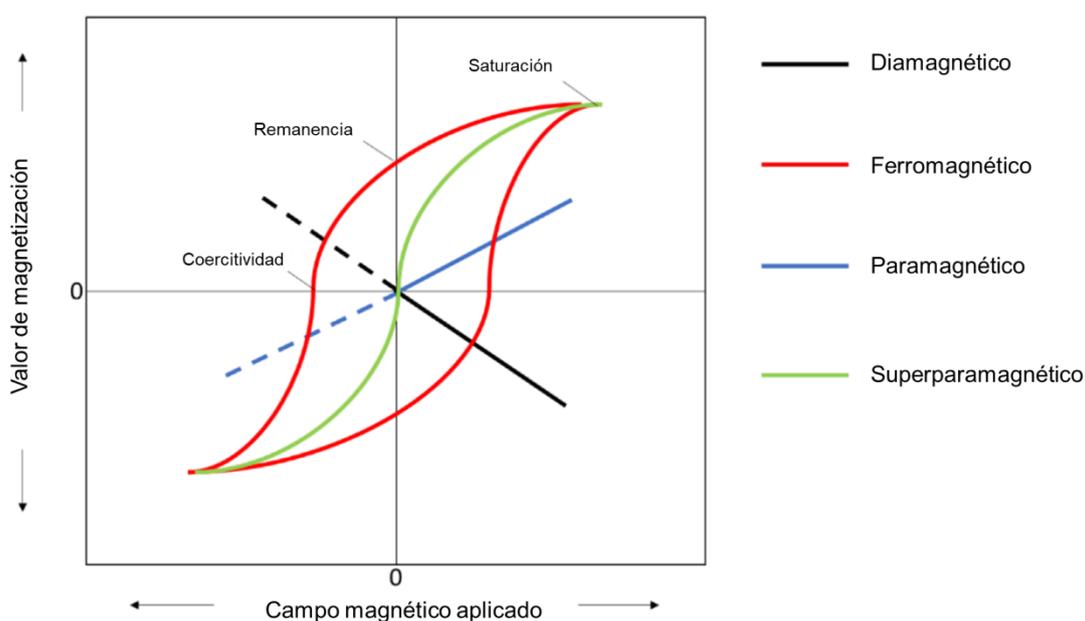


Figura 13. Representación del comportamiento de los diferentes materiales magnéticos. Relación entre el valor de magnetización y el campo magnético aplicado para las partículas diamagnéticas (negro), paramagnéticas (azul), ferromagnéticas (rojo), y superparamagnéticas (verde). Figura adaptada de Nelson *et al.*¹⁸⁴

Los materiales diamagnéticos experimentan una leve repulsión cuando se someten a un campo magnético y no retienen la magnetización una vez que se elimina el campo (Figura 13, negro). Esto se debe a que todos los electrones están apareados, lo que resulta en un momento magnético nulo en cada átomo. El cobre, la plata y el oro son ejemplos de materiales diamagnéticos.¹⁸⁵

¹⁸³ Figuerola, A.; Di Corato, R.; Manna, L.; Pellegrino, T. From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical applications. *Pharmacol. Res.* **2010**, *62* (2), 126-143.

¹⁸⁴ Nelson, N. R.; Port, J. D.; Pandey, M. K. Use of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs) via Multiple Imaging Modalities and Modifications to Reduce Cytotoxicity: An Educational Review. *Nanotheranostics.* **2020**, *1*, 105-135.

¹⁸⁵ Yamato, M.; Kimura, T. Magnetic Processing of Diamagnetic Materials. *Polymers.* **2020**, *12*, 1491.

En el caso del paramagnetismo, los átomos o moléculas tienen momentos magnéticos permanentes orientados aleatoriamente en ausencia de un campo magnético, pero se alinean en la dirección del campo magnético cuando se les somete a uno (Figura 13, azul). Al eliminar el estímulo externo, los dipolos magnéticos internos se vuelven a aleatorizar. El tungsteno, el cesio, el aluminio, el litio y el magnesio son ejemplos de materiales paramagnéticos.¹⁸³

El ferromagnetismo ocurre cuando los momentos magnéticos netos de los átomos se acoplan en la misma dirección y sentido aún en ausencia de un campo magnético aplicado, lo que resulta en una magnetización permanente (Figura 13, rojo). El hierro, el níquel, el cobalto y sus aleaciones son ejemplos de materiales ferromagnéticos.¹⁸⁶ Cuando el tamaño de un material ferromagnético se reduce a menos de un dominio magnético (< 10-20 nm), estos pasan a presentar propiedades superparamagnéticas.¹⁸⁷

Las partículas superparamagnéticas tienen valores de magnetización más altos que las partículas paramagnéticas con la misma intensidad del campo magnético, pero no retienen un comportamiento magnético apreciable cuando el campo magnético cesa (Figura 13, verde). Ejemplos de materiales superparamagnéticos son la magnetita (Fe_3O_4) y maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$).^{188,189} En Biomedicina se utilizan ampliamente las nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas (SPIONPs), ya que presentan bajo coste y juegan un importante papel en numerosos procesos biológicos.¹⁹⁰

Uno de los posibles usos de las SPIONPs es la construcción de nanosistemas para la administración de fármacos, pues no solo permite la vehiculización magnética al punto del tratamiento empleando un campo magnético externo, sino que también ofrece ventajas adicionales como su detección por MRI *in vivo*, con aplicaciones para

¹⁸⁶ Liu, J. P. Ferromagnetic nanoparticles: Synthesis, processing, and characterization. *JOM*. **2010**, 62 (4), 56-61.

¹⁸⁷ Samrot, A. V.; Sahithya, C. S.; Selvarani A, J.; Purayil, S. K.; Ponnaiah, P. A review on synthesis, characterization and potential biological applications of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Curr. Res. Green Sustain. Chem.* **2021**, 4, 100042.

¹⁸⁸ Ha, Y.; Ko, S.; Kim, I.; Huang, Y.; Mohanty, K.; Huh, C.; Maynard, J. A. Recent Advances Incorporating Superparamagnetic Nanoparticles into Immunoassays. *ACS Appl. Nano Mater.* **2018**, 1 (2), 512-521.

¹⁸⁹ Kim, Y.; Kong, S. D.; Chen, L. H.; Pisanic, T. R., 2nd; Jin, S.; Shubayev, V. I. In vivo nanoneurotoxicity screening using oxidative stress and neuroinflammation paradigms. *Nanomed.: Nanotechnol. Biol. Med.* **2013**, 9 (7), 1057-1066.

¹⁹⁰ Flores-Rojas, G. G.; López-Saucedo, F.; Vera-Graziano, R.; Mendizabal, E.; Bucio, E. Magnetic Nanoparticles for Medical Applications: Updated Review. *Macromol.* **2022**, 2, 374-390.

el diagnóstico.¹⁹¹ Sin embargo, para su empleo en Biomedicina deben cumplir una serie de requisitos. Uno de ellos es que las SPIONPs sean estables. Las SPIONPs pueden tener tendencia a agregarse debido a su gran área superficial y a la interacción dipolo-dipolo, lo que resulta poco deseable para aplicaciones *in vivo*. Además, se ha descrito que las nanopartículas de Fe₃O₄ a altas dosis pueden producir citotoxicidad.^{192,193} Por ello, un paso necesario antes de la administración de las NPs es la modificación de su superficie para mejorar sus propiedades de solubilidad, estabilidad y toxicidad en las células.¹⁸⁹

1.6.3. Diseño y funcionalización de nanopartículas magnéticas

La estructura y la composición de las SPIONPs determinan su interacción en medios biológicos. Una de las estrategias más extendidas para conseguir nanomateriales inorgánicos biocompatibles es el uso de recubrimientos orgánicos, desarrollándose así NPs híbridas de tipo *core/shell*.¹⁹⁴

Las NPs magnéticas *core/shell* están constituidas por un núcleo y un recubrimiento. El núcleo (*core*, en inglés) lo forma el metal magnético (SPIONPs en este caso) mientras que el recubrimiento (*shell*) lo forma otro nanomaterial orgánico. El papel que desempeña este recubrimiento no solo es de tipo estabilizador, sino que también aporta propiedades y funciones específicas al núcleo (Figura 14).¹⁹⁵ Un ejemplo de material orgánico empleado para el recubrimiento son los polímeros naturales biocompatibles, como el quitosano o la celulosa, los cuales pueden funcionar además como vectores de carga de agentes terapéuticos.¹⁹⁰ Sin embargo, para que se produzca una interacción entre los núcleos y estos polímeros naturales, es necesaria

¹⁹¹ Popescu, R. C.; Savu, D.; Dorobantu, I.; Vasile, B. S.; Hosser, H.; Boldeiu, A.; Temelie, M.; Straticiu, M.; Iancu, D. A.; Andronescu, E.; Wenz, F.; Giordano, F. A.; Herskind, C.; Veldwijk, M. R. Efficient uptake and retention of iron oxide-based nanoparticles in HeLa cells leads to an effective intracellular delivery of doxorubicin. *Sci. Rep.* **2020**, *10* (1), 10530.

¹⁹² Tomašovičová, N.; Hu, P.-S.; Zeng, C.-L.; Majorošová, J.; Zakutanská, K.; Kopčanský, P. Dual Size-Dependent Effect of Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles Upon Interaction with Lysozyme Amyloid Fibrils: Disintegration and Adsorption. *Nanomaterials.* **2019**, *9*, 37.

¹⁹³ Yarjanli, Z.; Ghaedi, K.; Esmaeili, A.; Rahgozar, S.; Zarrabi, A. Iron oxide nanoparticles may damage to the neural tissue through iron accumulation, oxidative stress, and protein aggregation. *BMC Neurosci.* **2017**, *18* (1), 51.

¹⁹⁴ Fernandez-Alvarez, F.; Caro, C.; Garcia-Garcia, G.; Garcia-Martin, M. L.; Arias, J. L. Engineering of stealth (maghemite/PLGA)/chitosan (core/shell)/shell nanocomposites with potential applications for combined MRI and hyperthermia against cancer. *J. Mater. Chem. B.* **2021**, *9* (24), 4963-4980.

¹⁹⁵ Ghosh Chaudhuri, R.; Paria, S. Core/Shell Nanoparticles: Classes, Properties, Synthesis Mechanisms, Characterization, and Applications. *Chem. Rev.* **2012**, *112* (4), 2373-2433.

la funcionalización de la superficie de las NPs. Este paso tiene una gran importancia debido a su potencial para la administración de fármacos.¹⁹⁶

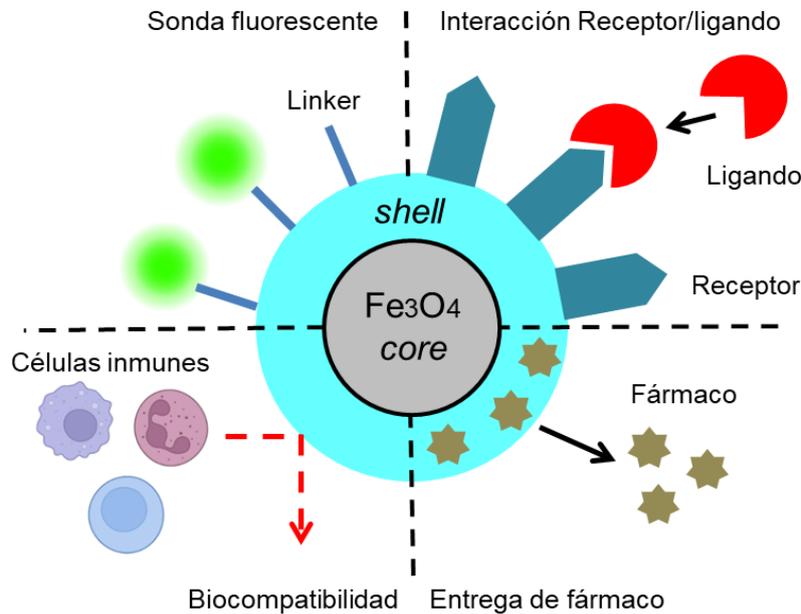


Figura 14. Aplicaciones de las nanopartículas core/shell basadas en SPIONPs. Las NPs core/shell pueden ser modificadas para actuar como una sonda fluorescente, interactuar con un ligando específico, cargar fármaco y/o evadir al sistema inmune.¹⁹⁷

El recubrimiento de las NPs con estos ligandos o polímeros para formar la shell puede producirse durante (recubrimiento *in situ*) o después de la síntesis del core (siendo un recubrimiento post-sintético) de las NPs.¹⁹⁸ Uno de los polímeros más utilizados para funcionalizar NPs es el polietilenglicol (PEG) (Figura 15A). El PEG es un polímero sintético lineal, hidrofílico, de carga neutra que muestra una excelente estabilidad y solubilidad en dispersiones acuosas y en medios fisiológicos. El recubrimiento o conjugación de PEG con las NPs protege la superficie de la agregación, la opsonización y la fagocitosis, lo que prolonga el tiempo de circulación sistémica.^{198,199}

¹⁹⁶ Dheyab, M. A.; Aziz, A. A.; Jameel, M. S.; Noqta, O. A.; Khaniabadi, P. M.; Mehrdel, B. Simple rapid stabilization method through citric acid modification for magnetite nanoparticles. *Sci. Rep.* **2020**, *10* (1), 10793.

¹⁹⁷ Anderson, S.; Gwenin, V.; Gwenin, C. Magnetic Functionalized Nanoparticles for Biomedical, Drug Delivery and Imaging Applications. *Nanoscale Res. Lett.* **2019**, *14*, 188.

¹⁹⁸ Ehi-Eromosele, C.; Ita, B.; Iweala, E. The effect of polyethylene glycol (PEG) coating on the magneto-structural properties and colloidal stability of CO_{0.8}Mg_{0.2}Fe₂O₄ nanoparticles for potential biomedical applications. *Dig. J. Nanomater. Biostructures.* **2016**, *11*, 7-14.

¹⁹⁹ Prego, C.; Torres, D.; Fernandez-Megia, E.; Novoa-Carballal, R.; Quiñoá, E.; Alonso, M. J. Chitosan-PEG nanocapsules as new carriers for oral peptide delivery: Effect of chitosan pegylation degree. *J. Control. Release.* **2006**, *111* (3), 299-308.

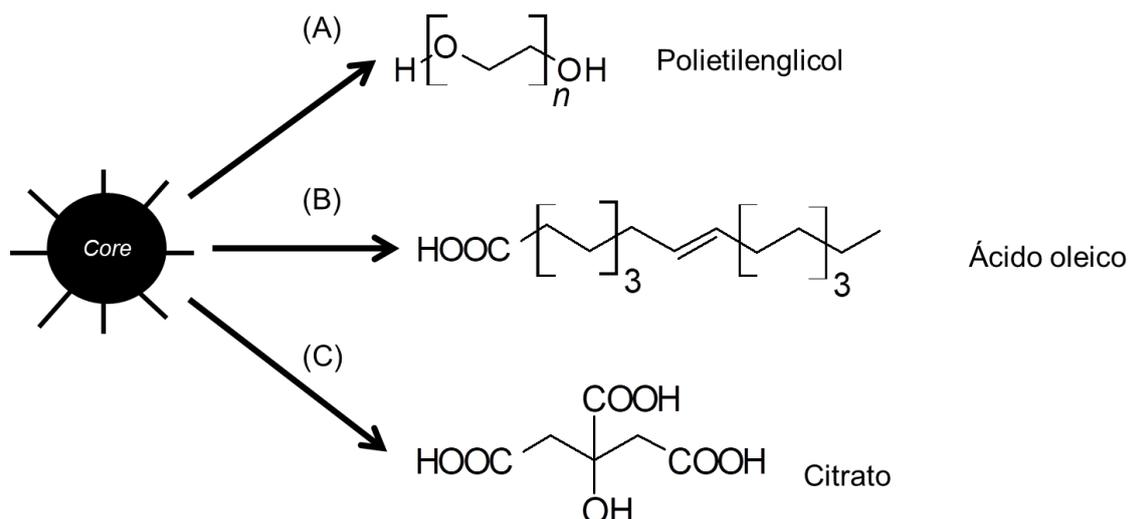


Figura 15. Moléculas empleadas habitualmente para la funcionalización de la superficie de las SPIONPs. La superficie de los núcleos de Fe_3O_4 puede ser funcionalizada por múltiples polímeros en función de las propiedades que se quieran modificar de las NPs. Los más empleados en la bibliografía son el PEG (A) o el citrato (C).

Otra molécula empleada en la funcionalización es el ácido oleico, un ácido graso que puede estabilizar los coloides (Figura 15B). La forma en la que se une a las NPs de Fe_3O_4 es formando una monocapa protectora a través de un enlace fuerte entre su grupo ácido y la superficie de la partícula, dejando la cadena hidrocarbonada hacia el exterior, por lo que aumenta en consecuencia la hidrofobicidad de las NPs. Sin embargo su superficie hidrofóbica puede causar la aglomeración de las NPs. Por lo tanto, para aplicaciones biomédicas en ambientes acuosos, además de la parte del ácido oleico, es imprescindible la presencia de un recubrimiento más hidrofílico.^{200,201}

Por otro lado, a diferencia de los estabilizadores poliméricos previamente mencionados, se ha extendido el uso de ligandos pequeños, como el ion citrato para estabilizar las SPIONPs en dispersiones acuosas (Figura 15C). Estas moléculas permiten la generación de capas estabilizadoras muy delgadas de forma que el tamaño real de la NPs no se ve muy alterado. La forma en la que se produce esta interacción es mediante la coordinación de uno o dos grupos carboxilo del ácido cítrico con la superficie de las NPs. De esta manera, habrá al menos un ácido carboxílico

²⁰⁰ Bloemen, M.; Brullot, W.; Luong, T. T.; Geukens, N.; Gils, A.; Verbiest, T. Improved functionalization of oleic acid-coated iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *J. Nanopart. Res.* **2012**, *14* (9), 1100.

²⁰¹ Tran, T. T.-D.; Van Vo, T.; Tran, P. H.-L. Design of iron oxide nanoparticles decorated oleic acid and bovine serum albumin for drug delivery. *Chem. Eng. Res. Des.* **2015**, *94*, 112-118.

expuesto al disolvente, lo que cambiará la carga superficial de las NPs a negativa.²⁰² El citrato tiene la particularidad de reducir el tamaño de los agregados de NPs primarias debido a la repulsión electrostática existente entre los iones de carga negativa.²⁰³ Además, la presencia de este grupo carboxilo en la superficie permite la unión de otras moléculas, como proteínas, ligandos fluorescentes, polímeros y fármacos para su posterior liberación.^{196,204}

El uso de polímeros naturales para la preparación de partículas *core/shell* está siendo ampliamente investigado. El quitosano (CS) uno de los polisacáridos más utilizados para el transporte de agentes terapéuticos debido a su baja toxicidad y a su alta biocompatibilidad y biodegradabilidad,²⁰⁵ pudiendo administrarse por vía oral, pulmonar, vaginal y parenteral.¹⁹⁴ El CS está constituido por dos tipos de unidades repetitivas, la *N*-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina unidas mediante un enlace (1,4)- β -glicosídico (Figura 16B). Es un polisacárido catiónico procedente de la desacetilación parcial de la molécula de quitina, un elemento estructural del exoesqueleto de moluscos y crustáceos marinos que también se encuentra en algunos microorganismos como hongos y levaduras (Figura 16A).²⁰⁶

El CS es insoluble en agua, pero soluble en soluciones acuosas acidificadas con acético, cítrico y tartárico. Es en dichas soluciones ácidas, que los grupos aminos libres de las unidades de glucosamina que presentan un pK_a aparente de 6.5, se protonan y pasan a tener la forma $R-NH_3^+$, la cual es soluble e ionizable. Una vez protonado, el CS se caracteriza por presentar propiedades de tipo mucoadhesivo.²⁰⁷

²⁰² Nigam, S.; Barick, K. C.; Bahadur, D. Development of citrate-stabilized Fe₃O₄ nanoparticles: Conjugation and release of doxorubicin for therapeutic applications. *J. Magn. Magn. Mater.* **2011**, *323* (2), 237-243.

²⁰³ Kotsmar, C.; Yoon, K. Y.; Yu, H.; Ryoo, S. Y.; Barth, J.; Shao, S.; Prodanović, M.; Milner, T. E.; Bryant, S. L.; Huh, C.; Johnston, K. P. Stable Citrate-Coated Iron Oxide Superparamagnetic Nanoclusters at High Salinity. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2010**, *49* (24), 12435-12443.

²⁰⁴ Sari, R. S.; de Almeida, A. C.; Cangussu, A. S. R.; Jorge, E. V.; Mozzer, O. D.; Santos, H. O.; Quintilio, W.; Brandi, I. V.; Andrade, V. A.; Miguel, A. S. M.; Sobrinho Santos, E. M. Antibotulism single-shot vaccine using chitosan for protein encapsulation by simple coacervation. *Anaerobe.* **2016**, *42*, 182-187.

²⁰⁵ Doh, K. O.; Yeo, Y. Application of polysaccharides for surface modification of nanomedicines. *Ther. Deliv.* **2012**, *3* (12), 1447-1456.

²⁰⁶ Kozma, M.; Acharya, B.; Bissessur, R. Chitin, Chitosan, and Nanochitin: Extraction, Synthesis, and Applications. *Polymers.* **2022**, *14* (19), 3989.

²⁰⁷ Ahmed, T. A.; Aljaeid, B. M. Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery. *Drug. Des. Devel. Ther.* **2016**, *10*, 483-507.

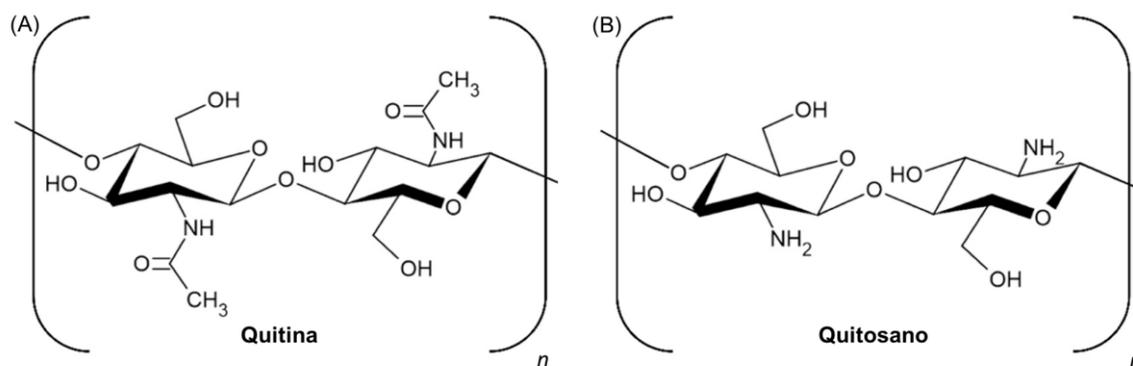


Figura 16. Estructura química de la quitina (A) y el quitosano (B). Figura adaptada de Kozma *et al.*²⁰⁶

Cuando se recubren NPs con CS éstas adquieren carga externa positiva, lo que permite que las NPs sean fagocitadas por las células²⁰⁸. Una forma fisiológica por la que NPs de CS pueden cruzar la BBB es a través de transcitosis mediada por adsorción (AMT), que aunque es una vía no específica, su capacidad de unión es alta. El proceso de AMT tiene lugar gracias a la interacción entre una molécula, proteína o péptido cargado positivamente y la membrana luminal cargada negativamente de las células endoteliales del cerebro. La AMT depende de la energía, el tiempo y la concentración y tiene una duración de minutos.²⁰⁹

Diferentes estudios confirman este mecanismo de transporte de NPs de quitosano a través de membranas, como el trabajo de Trapani *et al.*²¹⁰ sobre el transporte de NPs de quitosano cargadas con dopamina y su internalización en células. Los autores concluyeron que el transporte se producía por un mecanismo de transcitosis mediado por adsorción, siendo las diferentes cargas entre el quitosano y la monocapa celular la interacción principal. De hecho, el tamaño y la carga juegan un papel clave en los procesos de endocitosis de las NPs por parte de las células endoteliales del cerebro, ya que se ha establecido que para que las NPs de quitosano puedan pasar la BBB de forma eficaz, estas deben tener un tamaño aproximado de unos 200 nm y carga positiva²¹¹.

²⁰⁸ Caprifico, A.E.; Foot, P.J.S.; Polycarpou, E.; Calabrese, G. Overcoming the Blood-Brain Barrier: Functionalised Chitosan Nanocarriers. *Pharmaceutics*. **2020**, *12*, 1013.

²⁰⁹ Lombardo, S. M.; Schneider, M.; Türelı, A. E.; Günday; Türelı, N. Key for crossing the BBB with nanoparticles: the rational design. *Beilstein J Nanotechnol.* **2020**, *11*, 866–883.

²¹⁰ Trapani, A.; De Giglio, E.; Cafagna, D.; Denora, N.; Agrimi, G.; Cassano, T.; Gaetani, S.; Cuomo, V.; Trapani, G. Characterization and evaluation of chitosan nanoparticles for dopamine brain delivery. *Int. J. Pharm.* **2011**, *419*, 296–307.

²¹¹ Wang, Z.H.; Wang, Z.Y.; Sun, C.S.; Wang, C.Y.; Jiang, T.Y.; Wang, S.L. Trimethylated chitosan-conjugated PLGA nanoparticles for the delivery of drugs to the brain. *Biomaterials* **2010**, *31*, 908–915.

Las propiedades del quitosano favorecen la unión con el núcleo magnético de Fe_3O_4 para formar NPs de tipo *core/shell*, que pueden utilizarse para transportar fármacos al SNC y liberarlos de forma controlada, lo que mejorará significativamente su perfil farmacocinético.^{204,212}

²¹² Garcia-Garcia, G.; Fernandez-Alvarez, F.; Cabeza, L.; Delgado, A. V.; Melguizo, C.; Prados, J. C.; Arias, J. L. Gemcitabine-Loaded Magnetically Responsive Poly(epsilon-caprolactone) Nanoparticles against Breast Cancer. *Polymers*. **2020**, *12* (12), 2790.

2. Objetivos

La presente Tesis Doctoral tiene como objetivo general desarrollar nuevos agentes anti-neuroinflamatorios basados en isatina como potencial tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Además, se plantea el desarrollo de un sistema de transporte de fármacos basado en nanopartículas magnéticas que permita dirigir el tratamiento de forma específica al cerebro.

Para alcanzar este objetivo general, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Diseñar y sintetizar nuevos derivados de isatina y determinar su citotoxicidad *in vitro* en la línea celular de microglia de ratón BV2. Se plantea explorar cuatro sustituciones diferentes en la isatina y estudiar su efecto sobre la viabilidad celular.
2. Evaluar el efecto antiinflamatorio de los derivados de isatina no citotóxicos en la reducción de la producción de mediadores proinflamatorios en un modelo celular de neuroinflamación y estudiar la relación estructura-actividad (SAR).
3. Comprobar la compatibilidad *in vitro* de los derivados de isatina con potencial anti-neuroinflamatorio en la línea neuronal humana SH-SY5Y.
4. Obtener y caracterizar un nanosistema magnético de tipo *core/shell* con potencial uso en el transporte de fármacos. Se plantea optimizar un método conservación del nanosistema que permita preservar su estabilidad a largo plazo.
5. Determinar la compatibilidad *in vitro* de las nanopartículas magnéticas de tipo *core/shell* en las células de microglía BV2.

3. Resultados y Discusión

El primer objetivo planteado es diseñar y caracterizar nuevos agentes anti-neuroinflamatorios derivados de isatina. Como se ha comentado en la introducción, en los últimos años la molécula de isatina y sus derivados han despertado el interés científico por sus aplicaciones biológicas y terapéuticas. Recientemente se han publicado varias revisiones que confirman el perfil multiobjetivo de análogos de isatina y, por tanto, su importancia en el campo de la química médica como potente agente terapéutico. Sin embargo, hasta la fecha no se ha descrito la actividad anti-neuroinflamatoria de derivados de isatina en células de microglía²¹³ siendo uno de los objetivos de esta tesis doctoral.

3.1. Actividad biológica de las isatinas halogenadas en células de microglia de ratón BV2

Como punto de partida para el diseño de derivados de isatina se realizó un *screening* inicial para evaluar la actividad anti-neuroinflamatoria de una serie de isatinas halogenadas en células de microglía BV2, en base a los resultados de Matheus *et al.* sobre el potencial antiinflamatorio de isatinas halogenadas en la línea celular de macrófago RAW264.7.¹⁵⁰

Teniendo en cuenta análisis previos de la relación estructura-actividad (SAR) de derivados de isatina,¹⁴⁹ adicionalmente empleamos análogos con sustituyentes poco voluminosos, como el grupo metilo, en la posición *N*¹ y en el anillo aromático (Figura 17) para evaluar su actividad anti-neuroinflamatoria en microglía activada con lipopolisacárido (LPS) como modelo celular de neuroinflamación, y se comparó con la actividad de la isatina (**1**, Figura 17) como compuesto de referencia.

²¹³ Mahmoud, E.; Hayallah, A. M.; Kovacic, S.; Abdelhamid, D.; Abdel-Aziz, M. Recent progress in biologically active indole hybrids: a mini review. *Pharmacol. Rep.* **2022**, 74 (4), 570-582.

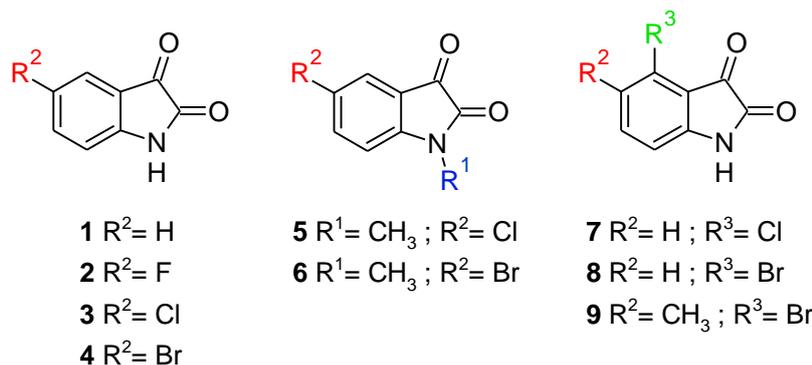


Figura 17. Estructura de las isatinas halogenadas empleadas en el *screening* inicial. Las isatinas seleccionadas tienen un halógeno en C⁵ (compuestos **2**, **3** y **4**), un grupo metilo en N¹ (compuestos **5** y **6**), un halógeno en posición C⁴ (compuestos **7** y **8**) y dos sustituciones, un metilo en C⁵ y un halógeno en C⁴ (compuesto **9**).

En cuanto al modelo de neuroinflamación empleado,²¹⁴ está descrito que el LPS activa las células de microglía BV2, recreando condiciones neuroinflamatorias y aumentando la producción de NO. Se trata de un modelo celular de inflamación ampliamente aceptado, ya que el 90% de los genes inducidos por LPS en las células de microglía BV2 también se inducen en la microglía primaria, y se ha utilizado anteriormente como modelo celular de neuroinflamación murina como alternativa a la experimentación animal.^{215,216,217,218}

Puesto que la activación con LPS incrementa la producción de NO, se evaluó la capacidad de isatinas halogenadas para reducir la liberación de NO en células BV2 estimuladas con LPS. A fin de descartar que la producción de NO esté afectada por la toxicidad de los compuestos, primero se evaluó su citotoxicidad y se calculó la IC₅₀, o concentración de compuesto necesaria para inhibir la actividad biológica en un 50% en comparación con un control sin tratamiento. Esto permitió seleccionar una dosis no citotóxica para los ensayos de actividad anti-neuroinflamatoria.

²¹⁴ Andrade, E. L.; Bento, A. F.; Cavalli, J.; Oliveira, S. K.; Freitas, C. S.; Marcon, R.; Schwanke, R. C.; Siqueira, J. M.; Calixto, J. B. Non-clinical studies required for new drug development - Part I: early in silico and in vitro studies, new target discovery and validation, proof of principles and robustness of animal studies. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2016**, *49* (11), e5644.

²¹⁵ Zhao, X.; Fang, J.; Jia, Y.; Wu, Z.; Zhang, M.; Xia, M.; Dong, J. Synthesis and Anti-Neuroinflammatory Activity of 1,7-diphenyl-1,4-heptadien-3-ones in LPS-Stimulated BV2 Microglia Via Inhibiting NF-κB/MAPK Signaling Pathways. *Molecules.* **2022**, *27*, 3537.

²¹⁶ Gresa-Arribas, N.; Vieitez, C.; Dentesano, G.; Serratos, J.; Saura, J.; Sola, C. Modelling neuroinflammation in vitro: a tool to test the potential neuroprotective effect of anti-inflammatory agents. *PLoS One.* **2012**, *7* (9), e45227.

²¹⁷ Gegunde, S.; Alfonso, A.; Alvarino, R.; Perez-Fuentes, N.; Botana, L. M. Anhydroexfoliamycin, a Streptomyces Secondary Metabolite, Mitigates Microglia-Driven Inflammation. *ACS Chem. Neurosci.* **2021**, *12* (13), 2336-2346.

²¹⁸ Henn, A.; Lund, S.; Hedtjarn, M.; Schratzenholz, A.; Porzgen, P.; Leist, M. The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. *Altx.* **2009**, *26* (2), 83-94.

3.1.1. Evaluación del efecto de isatinas halogenadas sobre la viabilidad en BV2

La viabilidad en células BV2 tratadas con isatinas halogenadas se determinó mediante el ensayo con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio (MTT).²¹⁹ El MTT es un compuesto amarillo soluble en disolventes acuosos con capacidad de atravesar las membranas celulares, tanto la plasmática como la mitocondrial. Es precisamente en las mitocondrias de las células viables, y por lo tanto metabólicamente activas, donde el MTT se reduce por la acción de enzimas deshidrogenasas dependientes de NADH o NADPH y genera cristales de formazán de color púrpura insolubles en el medio celular. De esta forma, la cantidad de formazán generado depende directamente del número de células y de su viabilidad y puede cuantificarse solubilizando los cristales de formazán en dimetilsulfóxido (DMSO) y midiendo la absorbancia a 562 nm.

Se optimizaron las condiciones del ensayo de viabilidad en cuanto a número de células, medio de cultivo y co-solvente. Se sembraron 7.5×10^3 células/pocillo en una placa de 96 pocillos, empleando un medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (FBS). Como es habitual en los ensayos de actividad de compuestos orgánicos, se empleo DMSO para disolver los derivados de isatina, que posteriormente se diluyeron con DMEM sin FBS para realizar los ensayos de viabilidad.²²⁰

Dado que el DMSO puede llegar a ser citotóxico para las células, se comprobó que el porcentaje de DMSO empleado en los tratamientos no afectaba a la viabilidad celular (Figura 18). Los resultados de este ensayo mostraron que porcentajes inferiores al 0.2% de DMSO no afectan a la viabilidad de células BV2.²²¹

²¹⁹ Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* **1983**, 65, 55–63.

²²⁰ Yanguas Casás, N.; Ojalvo-Sanz, A.; Martínez-Vázquez, A.; Goneau, M.-F.; Gilbert, M.; Nieto-Sampedro, M.; Romero-Ramírez, L. Neurostatin and other O-acetylated gangliosides show anti-neuroinflammatory activity involving the NFκB pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2019**, 377, 114627.

²²¹ Timm, M.; Saaby, L.; Moesby, L.; Hansen, E. W. Considerations regarding use of solvents in in vitro cell based assays. *Cytotechnology.* **2013**, 65(5), 887–894.

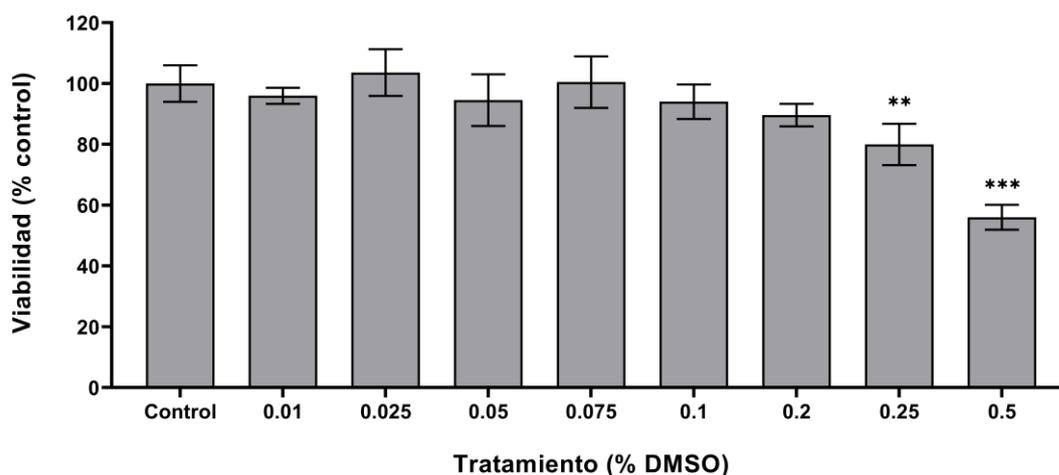
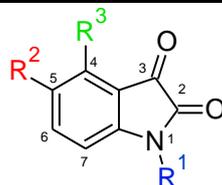


Figura 18. Viabilidad en células BV2 tratadas con diferentes % de DMSO. Las células se incubaron con diferentes % de DMSO durante 24 horas a 37 °C. Los datos de cada columna se presentan como media \pm SEM (error estándar de la media) en comparación con las células control. Cada experimento consiste en tres medidas independientes realizadas por triplicado. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

Tras el tratamiento de células BV2 con las diferentes isatinas halogenadas en las condiciones descritas, los valores de IC_{50} obtenidos para cada compuesto se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Citotoxicidad de derivados de isatina en células de microglía BV2.^a



Compuestos	R ¹	R ²	R ³	IC ₅₀ (μM)	Log P ^b
1	H	H	H	332 ± 25	0.34
2	H	F	H	141 ± 31	0.50
3	H	Cl	H	32 ± 5	0.90
4	H	Br	H	14 ± 4	1.17
5	CH ₃	Cl	H	14 ± 4	1.13
6	CH ₃	Br	H	6 ± 2	1.40
7	H	H	Cl	74 ± 14	0.90
8	H	H	Br	58 ± 11	1.17
9	H	CH ₃	Br	90 ± 28	1.40

^aTodos los valores de IC_{50} se presentan como valor medio \pm SEM de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado y se calcularon con el software GraphPad Prism 9.0. ^bLos valores de Log P se calcularon usando el software ChemDraw 14.0.

La IC_{50} de la isatina (**1**) fue de 332 μ M. La presencia de diferentes halógenos en la posición C^5 de la isatina (compuestos **2**, **3** y **4**) condujo a un aumento de la citotoxicidad que parece estar asociado con valores más altos de Log P. El valor Log P, también conocido como coeficiente de reparto o partición, es una medida que indica cuán hidrófila o hidrófoba es una molécula, lo que se traduce en la facilidad con la que un compuesto se distribuirá entre la fase acuosa y la fase orgánica. Los valores típicos de Log P oscilan entre -3 (polar) y 7 (no polar).²²²

El aumento de la lipofilia por alquilación del nitrógeno con un grupo metilo (compuestos **5** y **6**) dio lugar a un aumento de la citotoxicidad de 2.3 veces en comparación con sus análogos sin el grupo metilo en la posición N^1 . Sin embargo, los compuestos **7** y **8**, sustituidos en la posición C^4 con cloro y bromo respectivamente, fueron menos citotóxicos que sus análogos sustituidos en la posición C^5 (compuestos **3** y **4**) a pesar de tener el mismo valor Log P (Tabla 2).

Estos resultados apuntan a que la citotoxicidad está asociada a un aumento de la lipofilia, aunque la lipofilia no es el único factor que influye en la citotoxicidad, ya que los compuestos **7**, **8** y **9** con un halógeno en posición C^4 son menos citotóxicos que sus análogos **4**, **5** y **6** con un halógeno en posición C^5 a pesar de tener el mismo Log P. Además, la citotoxicidad de estos compuestos con halógenos en C^4 disminuyó al aumentar la lipofilia, siendo el compuesto **9** menos citotóxico que **8** y que **7** (Tabla 2).

Estos datos sugieren que tanto la sustitución en la posición C^5 del anillo aromático como la lipofilia de los derivados de isatina, aumentan su citotoxicidad en células BV2. En base a estos resultados, para los ensayos de liberación de NO se decidió trabajar con concentraciones de 5, 25 y 50 μ M que permitieron comparar la actividad anti-neuroinflamatoria de los diferentes compuestos sin afectar a la viabilidad celular.

²²² <https://www.biotage.com/blog/what-is-the-role-of-logp-in-sample-prep-methods>

3.1.2. Evaluación del efecto de isatinas halogenadas en la liberación de óxido nítrico en un modelo de neuroinflamación

En los ensayos de neuroinflamación la población celular óptima fue de 15×10^3 células/pocillo.²²³ Las células se preincubaron con los compuestos a las concentraciones de 5, 25 y 50 μM durante 1 hora, y a continuación se trataron con 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS para activar las células BV2, ya que esta descrito que esta concentración de LPS induce condiciones inflamatorias y no produce toxicidad.²²⁴

La liberación de NO se determinó de forma indirecta midiendo la concentración de nitrito, el cual es un marcador de la producción de NO formado a consecuencia de su oxidación en los sobrenadantes celulares. La concentración de nitrito se determinó empleando sulfanilamida y naftilendiamina, que actualmente es el ensayo de Griess más utilizado en los análisis cuantitativos de nitrito.²²⁵

Como se esperaba, el tratamiento con LPS incrementó la producción de NO en células BV2. La concentración de nitrito medida en los sobrenadantes celulares fue de $1.53 \pm 0.08 \mu\text{M}$ para las células no estimuladas (control) y de $4.52 \pm 0.12 \mu\text{M}$ para las BV2 activadas con LPS (LPS, Tabla 3) y está de acuerdo con resultados descritos en la literatura.²¹⁷

²²³ Hosseini, N. K.; Jose, S.; Vidyadaran, S.; Amin Nordin, S. Optimization of cell density and LPS concentration for the evaluation of nitric oxide production on BV-2 cells in a Griess assay. *Malaysian J. Med. Health Sci.* **2014**, *10*, 1-8.

²²⁴ Do, H.T.T.; Bui, B.P.; Sim, S.; Jung, J.K.; Lee, H.; Cho, J. Anti-Inflammatory and Anti-Migratory Activities of Isoquino-line-1-Carboxamide Derivatives in LPS-Treated BV2 Microglial Cells via Inhibition of MAPKs/NF- κ B Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2319.

²²⁵ Tsikas, D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction^[1] in the L-arginine/nitric oxide area of research. *J. Chromatogr. B.* **2007**, *851*, 51–70.

Tabla 3. Efecto de las isatinas halogenadas sobre la liberación de NO por células de microglía BV2 activadas con LPS.^a

Compuestos	[Nitrito] ^b (μM)			Viabilidad Celular (%)		
	5 (μM)	25 (μM)	50 (μM)	5 (μM)	25 (μM)	50 (μM)
Control		1.53 ± 0.08		100 ± 2		
LPS		4.52 ± 0.12		100 ± 3		
 1	4.19 ± 0.40	5.61 ± 0.40	5.11 ± 0.40	105 ± 1	106 ± 2	103 ± 3
 2	5.28 ± 0.23	4.25 ± 0.20	4.53 ± 0.20	109 ± 4	107 ± 3	110 ± 4
 3	3.52 ± 0.15	2.33 ± 0.30	N.D. ^c	105 ± 3	90 ± 3	50 ± 3
 4	4.05 ± 0.37	N.D.	N.D.	107 ± 7	68 ± 3	39 ± 1
 5	3.24 ± 0.12	N.D.	N.D.	100 ± 4	68 ± 3	34 ± 3
 6	3.16 ± 0.18	N.D.	N.D.	101 ± 7	55 ± 2	28 ± 2
 7	4.80 ± 0.17	2.92 ± 0.22	3.04 ± 0.11	118 ± 5	115 ± 4	93 ± 5
 8	3.71 ± 1.45	3.52 ± 0.25	3.03 ± 0.18	114 ± 3	120 ± 4	99 ± 4
 9	4.13 ± 0.98	4.36 ± 0.33	3.71 ± 0.40	105 ± 5	115 ± 3	120 ± 3

^aLos datos se presentan como el valor medio ± SEM de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado. ^bLa producción de NO se determinó mediante ensayo de Griess. ^cN.D. valor no determinado debido a baja viabilidad celular. La viabilidad de las células estimuladas con LPS tratadas con vehículo fue 100 ± 3 %.

Para descartar que la reducción de NO sea debida a una baja viabilidad celular, se consideraron tratamientos en los que la viabilidad celular fue superior al 90%. Por ello, no se determinó la liberación de NO con los compuestos **4**, **5** y **6**, a concentraciones de 25 y 50 μM (Tabla 3).

En general, se observó una reducción de los niveles de NO en células BV2 tratadas con isatinas halogenadas a 5 y a 25 μM , siendo esta última la concentración óptima para comparar la actividad de los distintos compuestos (Tabla 3, Figura 19). La isatina (**1**), no mostró inhibición en la liberación de NO, más bien un aumento no significativo. Su análogo 5-fluoroisatina (**2**) mostró una ligera inhibición de la producción de NO en células BV2 (6%), y únicamente los compuestos clorados **3** y **7** mostraron una reducción significativa de 49% y 33% respectivamente.

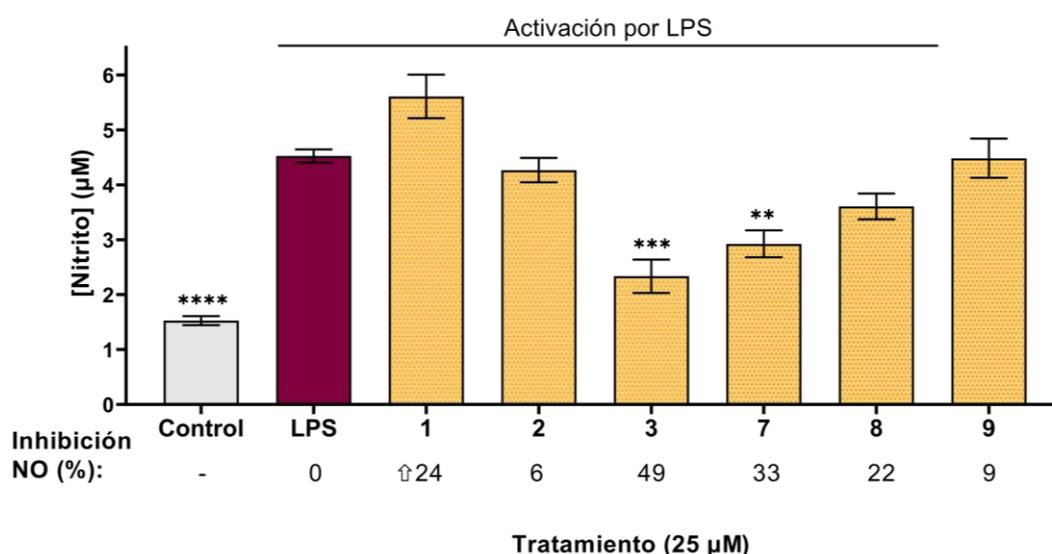


Figura 19. Efecto de isatinas halogenadas no citotóxicas sobre la liberación de NO en BV2 estimuladas con LPS. Las células se pretrataron durante 1 h con isatinas halogenadas (25 μM) o vehículo (DMSO al 0,025 %) seguido de estimulación con LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubaron durante 24 h a 37 °C. Los datos se presentan como valor medio y las barras de error indican \pm SEM de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ en comparación con las células activadas por LPS (LPS) tratadas con vehículo. LPS: lipopolisacárido. El porcentaje de inhibición de NO se realizó en comparación con LPS. $\hat{\uparrow}$: % de aumento de NO.

El compuesto **3** fue el más eficaz reduciendo la producción de NO en un 49%. El compuesto **7** (4-cloroisatina) fue más efectivo reduciendo los niveles de NO (33%) que su análogo **8** (4-bromoisatina, reducción de NO del 22%). Esto permite concluir que el intercambio de Cl por Br en la posición C⁴ de la isatina no mejora la inhibición de producción de NO. Cabe señalar que el compuesto **7**, sustituido en la posición C⁴ de la isatina con cloro, fue menos eficaz para reducir el NO que su análogo sustituido

en la posición C⁵ (**3**), a pesar de tener el mismo valor Log P. Finalmente, se observó una baja reducción de NO para el compuesto **9** con dos sustituciones en anillo aromático (Figura 19).

Esta diferencia en la actividad anti-neuroinflamatoria, se relaciona directamente con la posición del halógeno en el anillo aromático, confirmando un efecto similar al observado en otras líneas celulares.^{148,150} En resumen, tanto la sustitución en la posición C⁵ de la isatina como la lipofilia de los derivados son esenciales para modular su actividad citotóxica y anti-neuroinflamatoria en células de microglía BV2.

En base a estos resultados se planteó la síntesis de compuestos con mayor actividad anti-neuroinflamatoria, concretamente la síntesis de derivados de isatina 5-clorados así como sus análogos sin cloro en esa posición.

3.2. Diseño y síntesis de derivados de isatina y estudio de su actividad en BV2

Una revisión reciente sobre las propiedades farmacológicas de la molécula isatina, apunta a que las sustituciones que presentan el mayor efecto en la actividad antiinflamatoria son: la sustitución con cadenas hidrocarbonadas en la posición N¹, la sustitución en el carbonilo C³ con grupos donadores de electrones y la sustitución de un halógeno en el C⁵ del anillo aromático (Figura 20).¹⁴⁹ Esto último está de acuerdo con los resultados obtenidos y discutidos en el apartado anterior.

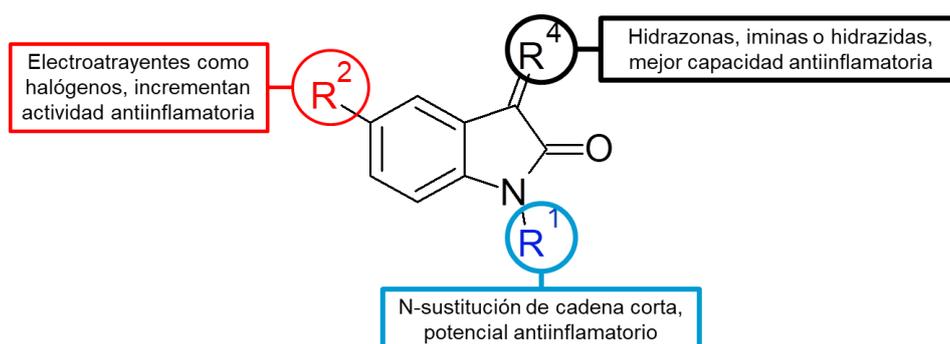
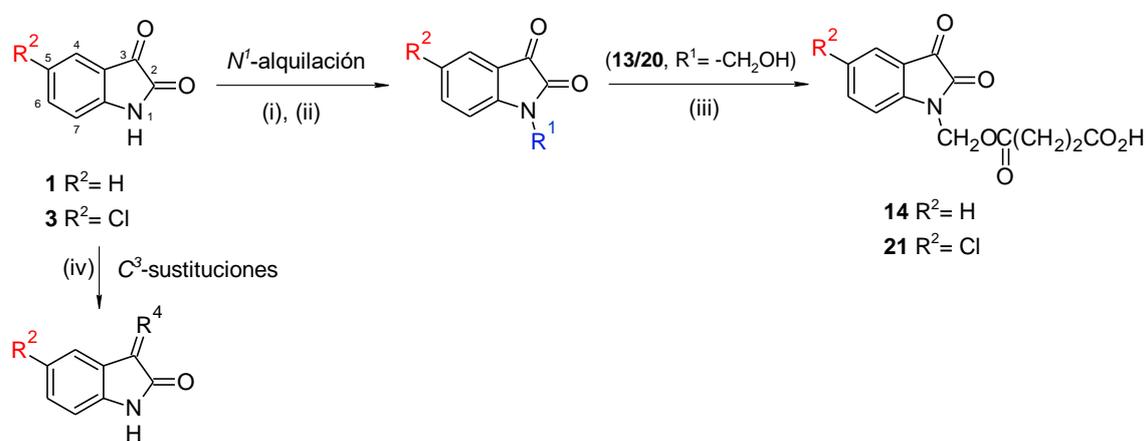


Figura 20. Estructura química de la isatina y efecto de las sustituciones sobre la actividad antiinflamatoria. La presencia de halógenos en C⁵ y N¹-alquilaciones con cadenas carbonadas cortas incrementan la actividad antiinflamatoria. Las sustituciones en C³ afectan a las quinasas celulares y tienen un efecto antiinflamatorio.

Por todo ello, se sintetizó una serie de compuestos con diferentes grupos funcionales en la posición N^1 y en la posición C^3 de la isatina y sus correspondientes análogos 5-clorados como se describe a continuación.

3.2.1. Síntesis de derivados de isatina

Se preparó una serie de derivados de isatina alquilados en N^1 siguiendo tres metodologías diferentes dependiendo del grupo funcional a unir (Esquema 4): (i) alquilación directa de isatina **1** o 5-cloroisatina **3** con el bromoalcano correspondiente en medio básico; (ii) reacción de **1** o **3** con formaldehído a reflujo; y (iii) reacción del derivado **13** o **20** con anhídrido succínico en piridina. Por otra parte, se sintetizaron los derivados de hidrazonas en C^3 por condensación de isatina **1** o 5-cloroisatina **3** con la hidracina correspondiente como se muestra en el Esquema 4 (iv).



Esquema 4. Síntesis de derivados de isatina. Reactivos y condiciones: N^1 -alquilación: (i) **1** o **3**, R^1-X (1.2 eq.), K_2CO_3 , DMF, Rt, 12 h. (ii) **1** o **3**, H_2CO , H_2O , reflujo, 2 h. (iii) **13** o **20**, anhídrido succínico (2.5 eq.), piridina, Rt, 24 h. Sustituciones en C^3 : (iv) **1** o **3**, NH_2-NHR^4 (1.2 eq.), AcOH, EtOH, reflujo, 3,5 h.

El doble enlace $C=N$ en las isatinhidrazonas puede dar lugar a la formación de dos isómeros, sin embargo solo se aisló el isómero Z de la mezcla de reacción, debido a su estabilización mediante enlaces de hidrógeno intramoleculares.²²⁶ Los derivados **14** y **21**, se sintetizaron empleando anhídrido succínico y como base y disolvente se utilizó piridina (Esquema 4, iii).²²⁷ Los compuestos sintetizados se caracterizaron mediante resonancia magnética nuclear (RMN), espectrometría de masas (MS) y

²²⁶ Cigan, M.; Jakusová, K.; Gáplovský, M.; Filo, J.; Donovalová, J.; Gáplovský, A. Isatin phenylhydrazones: anion enhanced photochromic behaviour. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2015**, *14* (11), 2064-2073.

²²⁷ Sassatelli, M.; Bouchikhi, F.; Messaoudi, S.; Anizon, F.; Debiton, E.; Barthomeuf, C.; Prudhomme, M.; Moreau, P. Synthesis and antiproliferative activities of diversely substituted glycosyl-isoidindigo derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2006**, *41* (1), 88-100.

cromatografía líquida de alta presión (HPLC) mostrando un grado de pureza mayor del 95%.

3.2.2. Efecto de los derivados sintéticos sobre la viabilidad en BV2

La viabilidad de células BV2 tratadas con los compuestos sintetizados se determinó mediante el ensayo de MTT y se calcularon los valores de IC₅₀ que se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Citotoxicidad de derivados sintéticos de isatina en células de microglía BV2.^a

Compuestos	Log P ^b	IC ₅₀ (μM)	Compuestos 5-Cl	Log P	IC ₅₀ (μM)
1	0.34	332 ± 25	3	0.90	32 ± 5
10 (CH ₂) ₃ Cl	1.39	54 ± 10	17 (CH ₂) ₃ Cl	1.95	20 ± 3
11 (CH ₂) ₃ CH=CH ₂	1.97	69 ± 7	18 (CH ₂) ₃ CH=CH ₂	2.52	40 ± 5
12 (CH ₂) ₃ CH ₃	1.82	218 ± 24	19 (CH ₂) ₃ CH ₃	2.38	29 ± 5
13 CH ₂ OH	0.33	117 ± 6	20 CH ₂ OH	0.89	57 ± 3
14 CH ₂ OCO(CH ₂) ₂ COOH	0.23	244 ± 22	21 CH ₂ OCO(CH ₂) ₂ COOH	0.79	233 ± 25
15 NNH(CH ₂) ₂ CN	0.35	> 500	22 NNH(CH ₂) ₂ CN	0.91	105 ± 14
16 NNHPh	1.98	27 ± 8	23 NNHPh	2.53	29 ± 8

^aTodos los valores de IC₅₀ se presentan como valor medio ± SEM de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado y se calcularon con el software GraphPad Prism 9.0. ^bLos valores de Log P se calcularon usando el software ChemDraw 14.0.

Todos los derivados con cloro en la posición C⁵ de la isatina (**3**, **17-22**) mostraron mayor citotoxicidad en células BV2 que sus análogos sin cloro en la misma posición (**1**, **10-15**), con la excepción de las fenilhidrazonas **16** y **23**, que mostraron una citotoxicidad similar con valores de IC₅₀ de 27 y 29 μM respectivamente. El aumento de la lipofilia por la introducción de cloro en el anillo aromático parece ser responsable de una mayor citotoxicidad.

En cuanto al efecto de la formación de hidrazonas en C³, las cianoetilhidrazonas **15** y **22** mostraron baja citotoxicidad, siendo **15** el derivado menos citotóxico (IC₅₀ > 500 μM) mientras que, las fenilhidrazonas **16** y **23** tienen valores de IC₅₀ más bajos. Esto puede deberse al aumento de lipofilia debido a los anillos aromáticos.²²⁸

Se puede concluir que la citotoxicidad parece estar asociada con valores más altos de Log P, posiblemente debido a una mayor permeabilidad a través de las membranas celulares.¹⁵⁷ Tampoco se puede descartar un cambio en la conformación de la molécula o la interacción con proteínas a través de enlaces halógeno debido a la presencia de cloro ("*magic chloro effect*").^{149,229}

Teniendo en cuenta los valores de IC₅₀ obtenidos se seleccionaron las concentraciones de 5, 25 y 50 μM para evaluar la actividad anti-neuroinflamatoria de los diferentes compuestos.²³⁰

3.2.3. Actividad de los derivados de isatina en la liberación de óxido nítrico en un modelo celular de neuroinflamación

Se evaluó el efecto de los derivados sintéticos de isatina sobre la liberación de NO por las células microglía BV2 activadas por LPS y la viabilidad celular tras el ensayo (Tabla 5). La mayoría de los compuestos no fueron citotóxicos para las células a concentraciones de 5 y 25 μM. Sin embargo, los compuestos **17**, **18** y **19**, N¹-alquilados y con cloro en C⁵, redujeron la viabilidad celular entre un 85% y un 67%, mientras que sus análogos no clorados (**10**, **11** y **12** respectivamente) no fueron citotóxicos a 25 μM.

²²⁸ Teng, Y. O.; Zhao, H. Y.; Wang, J.; Liu, H.; Gao, M. L.; Zhou, Y.; Han, K. L.; Fan, Z. C.; Zhang, Y. M.; Sun, H.; Yu, P. Synthesis and anti-cancer activity evaluation of 5-(2-carboxyethenyl)-isatin derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *112*, 145-156.

²²⁹ Chiodi, D.; Ishihara, Y. "Magic Chloro": Profound Effects of the Chlorine Atom in Drug Discovery. *J. Med. Chem.* **2023**, *66*, 5305-5331.

²³⁰ Robinson, L.; Delgado, J.; & Kellett, S. The dose-response effect in routinely delivered psychological therapies: A systematic review. *Psychother Res.* **2020**, *30*(1), 79-96.

Tabla 5. Efecto de los derivados de isatina sobre la liberación de NO en células de microglía BV2 activadas con LPS.^a

Compuestos	[Nitrito] (μM) ^b			Viabilidad Celular (%)		
	5 (μM)	25 (μM)	50 (μM)	5 (μM)	25 (μM)	50 (μM)
Control		1.53 \pm 0.08		100 \pm 2		
LPS		4.52 \pm 0.12		100 \pm 3		
1	4.19 \pm 0.40	5.61 \pm 0.40	5.11 \pm 0.40	105 \pm 1	106 \pm 2	103 \pm 3
3	3.52 \pm 0.15	2.33 \pm 0.30	N.D. ^c	105 \pm 3	90 \pm 3	50 \pm 3
10	2.27 \pm 0.17	1.70 \pm 0.15	1.60 \pm 0.14	102 \pm 2	97 \pm 2	80 \pm 3
11	5.49 \pm 0.52	4.24 \pm 0.60	3.00 \pm 0.43	100 \pm 2	100 \pm 3	90 \pm 2
12	4.11 \pm 0.12	2.60 \pm 0.12	1.60 \pm 0.05	90 \pm 3	92 \pm 4	84 \pm 3
13	3.91 \pm 0.13	3.30 \pm 0.20	2.50 \pm 0.21	105 \pm 2	110 \pm 2	114 \pm 2
14	4.43 \pm 0.30	4.71 \pm 0.24	4.05 \pm 0.34	108 \pm 2	92 \pm 1	85 \pm 3
15	4.00 \pm 0.20	3.65 \pm 0.13	3.31 \pm 0.13	106 \pm 1	100 \pm 2	102 \pm 1
16	6.72 \pm 0.81	N.D.	N.D.	97 \pm 2	85 \pm 3	80 \pm 2
17	2.65 \pm 0.30	N.D.	N.D.	100 \pm 2	67 \pm 1	24 \pm 3
18	3.60 \pm 0.30	N.D.	N.D.	100 \pm 3	82 \pm 3	21 \pm 2
19	3.90 \pm 0.23	N.D.	N.D.	100 \pm 2	85 \pm 2	65 \pm 2
20	2.74 \pm 0.12	1.45 \pm 0.12	1.20 \pm 0.20	100 \pm 1	106 \pm 2	93 \pm 2
21	4.72 \pm 0.21	4.41 \pm 0.30	4.73 \pm 0.53	113 \pm 4	110 \pm 3	100 \pm 2
22	3.67 \pm 0.30	2.55 \pm 0.30	1.70 \pm 0.15	100 \pm 2	106 \pm 3	85 \pm 1
23	10.71 \pm 0.74	N.D.	N.D.	95 \pm 4	83 \pm 3	70 \pm 3

^aLos datos se presentan como el valor medio \pm SEM de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado. ^cN.D. valor no determinado debido a la baja viabilidad celular. La viabilidad de las células estimuladas con LPS tratadas con vehículo fue del 100 \pm 3 %.

En general, a 50 μM , se observó una mayor reducción en la viabilidad celular, por lo que se seleccionó el tratamiento a 25 μM para comparar la capacidad de los compuestos de reducir la liberación de NO garantizando una viabilidad celular mayor del 90%. En la Figura 21 se muestran los resultados obtenidos para los derivados de isatina no citotóxicos a una concentración de 25 μM .

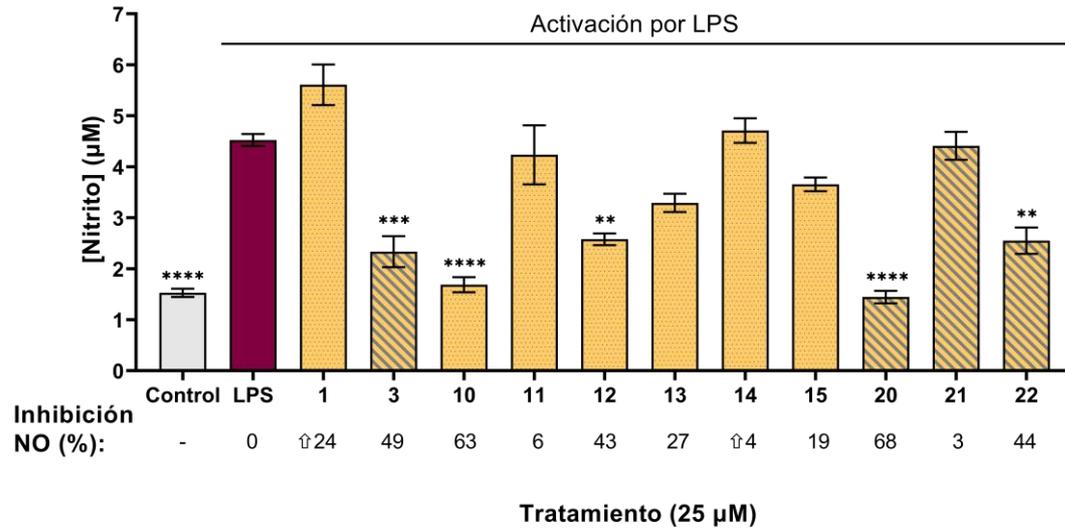


Figura 21. Efecto de derivados de isatina no citotóxicos sobre la liberación de NO en células BV2 estimuladas con LPS. Las células se pretrataron durante 1 h con derivados de isatina (25 µM) o vehículo (0,025 % DMSO) seguido de estimulación con LPS (1 µg/mL) e incubación durante 24 h a 37 °C. Los datos se presentan como el valor medio ± SEM de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado. La producción de NO se determinó mediante la prueba de Griess. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ en comparación con las células activadas por LPS tratadas con vehículo. Columnas rayadas: derivados 5-Cl-isatina. LPS: lipopolisacárido. El porcentaje de inhibición de NO se realizó en comparación con LPS. ↑: % de inducción de NO.

Todos los derivados de isatina 5-clorados (Figura 21, columnas rayadas) reducen significativamente la liberación de NO en células BV2, excepto el compuesto **21**, que mostró una reducción no significativa. Cabe destacar que los compuestos N^1 -alquilados **10**, **11**, **12**, **13** y **20** redujeron notablemente la liberación de NO por las células de microglía BV2 estimuladas con LPS. Entre ellos, **10** y **20** fueron los más eficientes reduciendo la liberación de NO hasta 2.6 y 3 veces respectivamente, en comparación a las BV2 estimuladas con LPS (Tabla 5). Además, los compuestos **10** y **20** también mostraron los mejores resultados a 5 µM en la reducción de NO (Tabla 5), y **20** fue el mejor a 50 µM con una viabilidad celular superior al 90%.

Cabe mencionar que el derivado **10**, a pesar de no tener el cloro en la posición 5, tiene actividad anti-neuroinflamatoria, posiblemente debido a la presencia del cloro en el extremo C-terminal de la cadena hidrocarbonada. A pesar de esto, el compuesto clorado **20** es el que mostró los mejores resultados reduciendo la liberación de NO hasta un 68% ($p < 0,0001$). Por otra parte, no se observó reducción de NO con la introducción de grupos más polares como ácidos carboxílicos (compuestos **14** y **21**, Figura 21), lo que sugiere que sustituciones N^1 con cadenas más largas y grupos polares desfavorecen la actividad anti-neuroinflamatoria. Estos resultados sugieren

que, en base al patrón de sustitución, es posible potenciar la actividad anti-neuroinflamatoria. La presencia de un átomo de cloro en el anillo aromático o en la cadena *N*-alquilo parece ser esencial para la inhibición de la liberación de NO.

El efecto de la formación de hidrazonas en la posición C³ de la isatina requiere más estudios, ya que las fenilhidrazonas redujeron la viabilidad celular, y aunque un menor número de células podría asociarse con una menor concentración de NO en los medios celulares, los derivados de fenilhidrazona aumentaron considerablemente la liberación de NO, en particular el compuesto **23**, que aumentó significativamente la liberación de NO 2.5 veces respecto de las células estimuladas con LPS ($p < 0,0001$, Tabla 2).

En cambio, sí se obtuvieron resultados prometedores con las cianoetilhidrazonas (**15**, **22**), las cuales no son citotóxicas y fueron capaces de reducir la liberación de NO un 19% y 44% respectivamente. En la Figura 22. se muestra el efecto dosis-respuesta para los compuestos con mayor actividad reduciendo los niveles de NO en microglia activada con LPS.

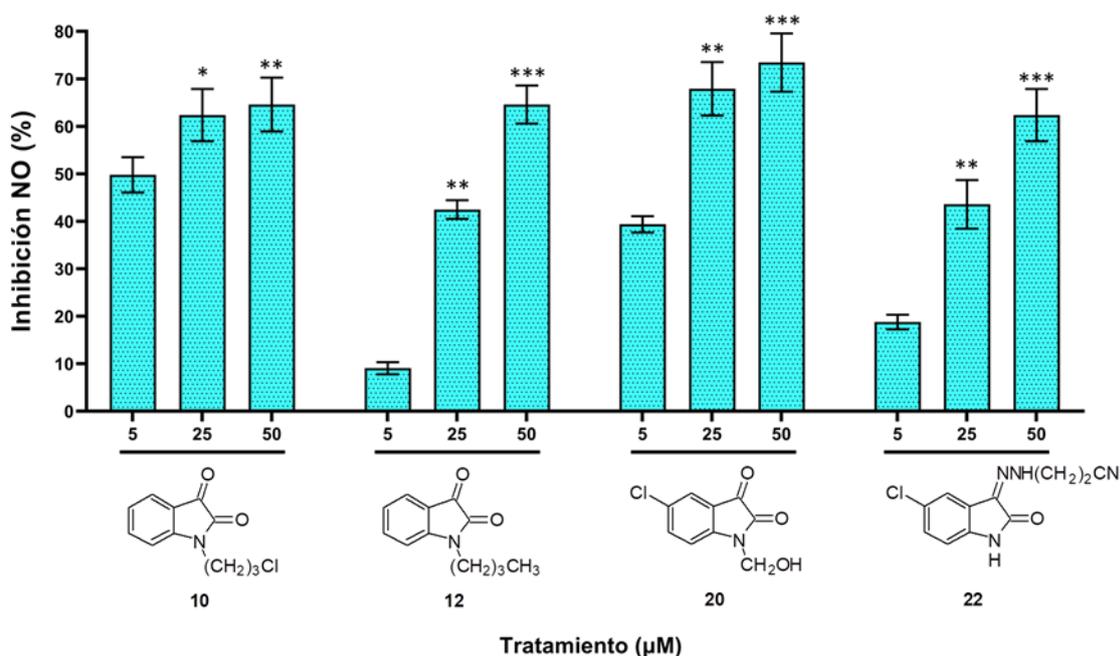


Figura 22. Efecto de los compuestos más efectivos reduciendo la liberación de NO inducida por LPS en células BV2. Los datos se presentan como el valor medio \pm SEM de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Es posible que los derivados de isatina reduzcan la producción de NO inhibiendo la expresión o actividad de la enzima iNOS,⁵⁵ responsable de la síntesis de

NO en respuesta a procesos inflamatorios, o bien interaccionando directamente con el NO, ya sea capturándolo o bloqueando su actividad, aunque son necesarios más estudios para confirmarlo.

3.2.4. Efecto de los derivados de isatina en la producción de citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF- α

Se evaluó el efecto de los derivados sintetizados en la producción de los mediadores inflamatorios IL-6 y TNF- α en microglia.^{231,232} Como se comentó en la introducción, la activación de células BV2 por LPS activa la vía de señalización de NF- κ B, produciendo citoquinas proinflamatorias y mediadores como IL-6 y TNF- α , por lo que una terapia dirigida a inhibir la producción de IL-6 y TNF- α reduciría la neuroinflamación y la muerte neuronal.^{215,217}

Se cuantificó la producción de ambas citoquinas proinflamatorias en células BV2 pretratadas con los derivados de isatina y activadas con LPS empleando un ensayo ELISA automatizado (ELLA) y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6.

Las células no estimuladas liberan una concentración de IL-6 de 260 ± 28 pg/mL al medio celular (Control, Tabla 6), mientras que la activación de las BV2 por LPS produce un aumento de 10 veces en la concentración de IL-6 siendo una producción de 2772 ± 521 pg/mL de IL-6 en el medio de las células BV2 activadas con LPS (LPS, Tabla 6), que está de acuerdo con resultados publicados.²¹⁷

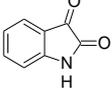
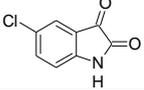
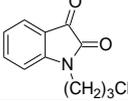
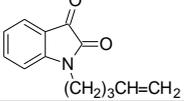
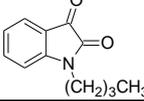
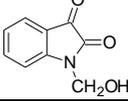
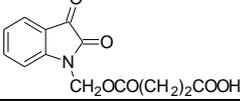
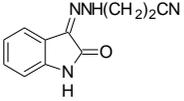
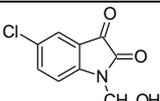
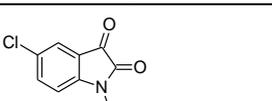
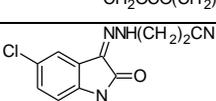
En células BV2 pretratadas con los compuestos de referencia isatina (**1**) y 5-cloroisatina (**3**) y estimuladas con LPS, los niveles de IL-6 resultantes no presentan una diferencia significativa con respecto a las células estimuladas con LPS. En cambio, el tratamiento con 5-cloroisatina (**3**) da lugar a una reducción en la producción de IL-6, que puede ser debido a la presencia de cloro en el C⁵.

Los derivados **10** y **20** son los más efectivos reduciendo significativamente la concentración de IL-6, en un 58 % y un 60 % respectivamente ($p < 0,01$, Figura 23A). En el caso de las hidrazonas, el derivado halogenado **22** reduce la producción de IL-6, aunque dicho efecto no llega a ser significativo.

²³¹ Tang, Y.; Le, W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol. Neurobiol.* **2016**, *53* (2), 1181-1194.

²³² Guzman-Martinez, L.; Maccioni, R. B.; Andrade, V.; Navarrete, L. P.; Pastor, M. G.; Ramos-Escobar, N. Neuroinflammation as a Common Feature of Neurodegenerative Disorders. *Front Pharmacol.* **2019**, *10*, 1008.

Tabla 6. Efecto de los derivados de isatina sobre la liberación de IL-6 y TNF- α por células de microglía BV2 activadas con LPS.^a

Compuestos	[IL-6] ^b (pg/mL)	[TNF- α] ^c (pg/mL)
Control^d	260 \pm 28	206 \pm 22
LPS	2772 \pm 521	728 \pm 60
1 	4504 \pm 1591	514 \pm 110
3 	2197 \pm 980	274 \pm 63
10 	1146 \pm 182	394 \pm 25
11 	3307 \pm 1139	541 \pm 162
12 	2362 \pm 872	580 \pm 83
13 	2333 \pm 343	713 \pm 123
14 	4121 \pm 939	887 \pm 120
15 	2406 \pm 438	781 \pm 62
20 	1121 \pm 374	391 \pm 34
21 	4148 \pm 1040	946 \pm 135
22 	2018 \pm 193	704 \pm 21

^aLas células se pretrataron durante 1 hora con derivados de isatina (25 μ M) o vehículo (DMSO al 0,025 %) seguido de estimulación con LPS (1 μ g/mL) y se incubación durante 24 horas a 37 °C. Los datos se presentan como el valor medio \pm SEM de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado. La producción de ^bIL-6 y ^cTNF- α se determinó mediante ELISA automatizado. ^dCélulas tratadas con vehículo.

En cuanto a la producción de TNF- α en células BV2 estimuladas con LPS, se detectó una concentración de 728 ± 60 pg/mL de TNF- α en el medio celular, del orden de 3.5 veces superior a la concentración basal de 206 ± 22 pg/mL para células BV2 no estimuladas (Tabla 6 y Figura 23B) lo que está de acuerdo con resultados publicados.²¹⁷

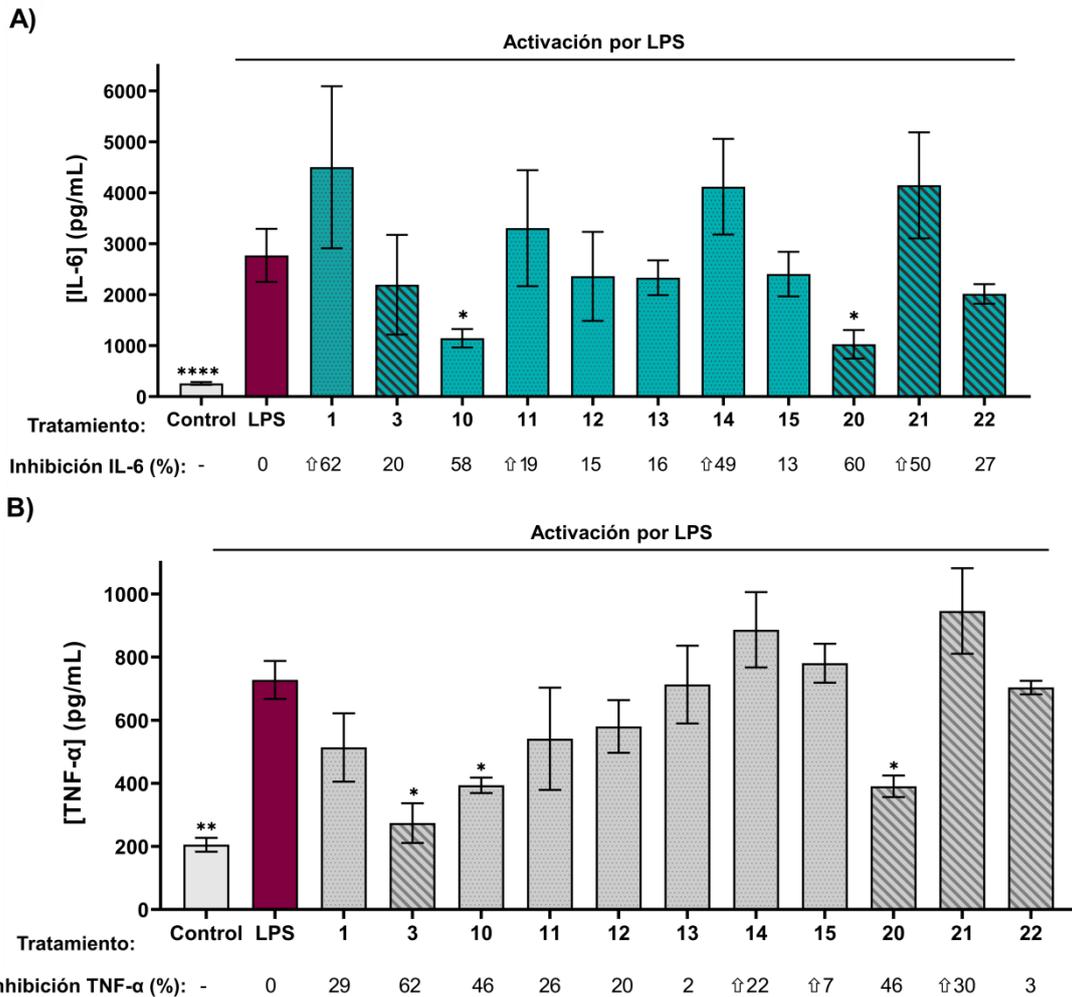


Figura 23. Efecto de derivados de isatina no citotóxicos sobre la liberación de citoquinas IL-6 y TNF- α en BV2 estimuladas con LPS. Pretratamiento durante 1 h con derivados de isatina no citotóxicos (25 μ M) o vehículo (DMSO al 0,025 %) seguido de estimulación con LPS (1 μ g/mL) e incubación durante 24 h a 37 °C. Las concentraciones de IL-6 (A) y TNF- α (B) en medios celulares se determinaron mediante el ensayo ELISA automatizado (ELLA). Los datos se presentan como valor medio (pg/mL) y las barras de error indican la SEM de al menos tres experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0.0001$ en comparación con las células activadas por LPS (LPS) tratadas con vehículo (DMSO al 0,025 %). Columnas rayadas: Derivados de 5-cloro isatina, %: porcentaje de inhibición de IL-6 y TNF- α en comparación con LPS. ↑: % de inducción.

El tratamiento con la isatina de referencia (**1**), no mostró una reducción significativa en la concentración de TNF- α . Fueron las células tratadas con 5-cloroisatina (**3**) y estimuladas con LPS las que mostraron la reducción más significativa en la concentración de TNF- α (disminución del 62 %, $p < 0,01$, Figura 23B).

También se observaron reducciones significativas en la liberación de TNF- α al medio en BV2 pretratadas con los derivados **10** y **20**, que produjeron una reducción del 46 % en la concentración de TNF- α en los medios celulares ($p < 0,01$, Figura 23B). En el caso de los derivados **11** y **12**, estos también mostraron una tendencia similar, aunque la reducción no fue significativa respecto del control con LPS. En el caso de las hidrazonas, ni **15** ni **22** llegan a tener un efecto significativo en los niveles de TNF- α .

Un posible mecanismo de acción de los compuestos es su interacción con la vía de señalización de NF- κ B, ya que la activación de las células microgliales por LPS está asociada con dicha vía de señalización (Figura 2A, ver apartado 1.2. de Introducción).²¹ El complejo proteico NF- κ B está compuesto por varias subunidades, siendo p50 y p65 las que contienen residuos de aminoácidos que pueden actuar como aceptores y donadores de enlaces de hidrógeno y que permiten la unión del NF- κ B a los promotores específicos del genoma.²³³ Es posible que los derivados de isatina puedan unirse a estas subunidades mediante puentes de hidrógeno, inhibiendo como consecuencia la cascada de señalización al secuestrar NF- κ B lo que impediría la síntesis de IL-6 y TNF- α .

No se puede descartar que los derivados de isatina tengan un efecto sobre otros mecanismos de acción, como la inhibición de quinasas dependientes de ciclina (CDKs), el cual es un mecanismo conocido que tiene como consecuencia la reducción en la producción de NO inducida por LPS en macrófagos.²³⁴ Este efecto también conlleva un incremento en la citotoxicidad, y se ha descrito previamente para isatin hidrazonas evaluadas en células de adenocarcinoma humano. Estas células mostraron una inhibición de la CDK2, lo que inhibía su crecimiento. Esta interacción con las CDKs podría representar una posible explicación a la capacidad de los derivados sintetizados en esta Tesis Doctoral.²³⁵ Sin embargo, el estudio del

²³³ Chen, F. E.; Huang, D. B.; Chen, Y. Q.; Ghosh, G. Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF- κ B bound to DNA. *Nature*. **1998**, 391, 410–413.

²³⁴ Du, J.; Wei, N.; Guan, T.; Xu, H.; An, J.; Pritchard, K.A. Jr.; Shi Y. Inhibition of CDKs by roscovitine suppressed LPS-induced *NO production through inhibiting NF- κ B activation and BH4 biosynthesis in macrophages. *Am J Physiol Cell Physiol*. **2009**, 297, 742–749.

²³⁵ Al-Salem, H. S.; Arifuzzaman, M.; Alkahtani, H. M.; Abdalla, A. N.; Issa, I. S.; Alqathama, A.; Albalawi, F. S.; Rahman, A. F. M. M. A Series of Isatin-Hydrazones with Cytotoxic Activity and

mecanismo concreto de acción de los derivados de isatina, tanto por la vía de NF- κ B como su efecto en iNOS o CDKs se plantea para futuros experimentos.

En resumen, en el presente trabajo, se ha llevado a cabo por primera vez la evaluación del efecto de derivados de isatina sobre la reducción de la liberación de mediadores proinflamatorios en células de microglía BV2. Los compuestos **10** y **20** son los que han mostrado los mejores resultados en la reducción de la liberación de NO, IL-6 y TNF- α siendo candidatos para obtener nuevos agentes anti-neuroinflamatorios y neuroprotectores. Para comprobar que estos candidatos no son tóxicos para las neuronas, se evaluó su citotoxicidad en células de tipo neuronal humanas como modelo.

3.3. Evaluación del efecto de los derivados de isatina sobre la viabilidad en células humanas SH-SY5Y

Es necesario confirmar que los derivados **10** y **20**, que mostraron la mejor actividad anti-neuroinflamatoria, no son tóxicos para las neuronas. Se seleccionó la línea de neuroblastoma humana SH-SY5Y que se utiliza en investigación como modelo celular de neuronas,^{236,237,238} y ha sido empleada previamente en estudios de neuroinflamación en co-cultivo con células de microglía BV2.²³⁹ Se evaluó el efecto del DMSO sobre la viabilidad de células SH-SY5Y mediante el ensayo de MTT y se observó que las células SH-SY5Y fueron más sensibles al tratamiento con DMSO que las BV2. La viabilidad de las SH-SY5Y disminuyó significativamente a partir de 0.2% de DMSO (85.6 ± 9 % de viabilidad respecto al control) siendo este el límite de tolerancia de las SH-SY5Y al tratamiento con DMSO (Figura 24), lo cual está de acuerdo con resultados descritos en la literatura.^{240,241,242}

CDK2 Kinase Inhibitory Activity: A Potential Type II ATP Competitive Inhibitor. *Molecules*. **2020**, *25*, 4400.

²³⁶ Martin, E. R.; Gandawijaya, J.; Oguro-Ando, A. A novel method for generating glutamatergic SH-SY5Y neuron-like cells utilizing B-27 supplement. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 943627.

²³⁷ Strother, L.; Miles, G. B.; Holiday, A. R.; Cheng, Y.; Doherty, G. H. Long-term culture of SH-SY5Y neuroblastoma cells in the absence of neurotrophins: A novel model of neuronal ageing. *J. Neurosci. Methods*. **2021**, *362*, 109301.

²³⁸ Kovalevich, J.; Langford, D. Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods Mol Biol.* **2013**, *1078*, 9-21.

²³⁹ Lawrimore, C. J.; Coleman, L. G.; Zou, J.; Crews, F. T. Ethanol Induction of Innate Immune Signals Across BV2 Microglia and SH-SY5Y Neuroblastoma Involves Induction of IL-4 and IL-13. *Brain Sci.* **2019**, *9* (9), 228.

²⁴⁰ Mongelli, F.; J H, I.; Hodges, N. Cytotoxicity of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells to the Antipsychotic Drugs, Chlorpromazine and Trifluoperazine, is via a Ca²⁺-Mediated Apoptosis

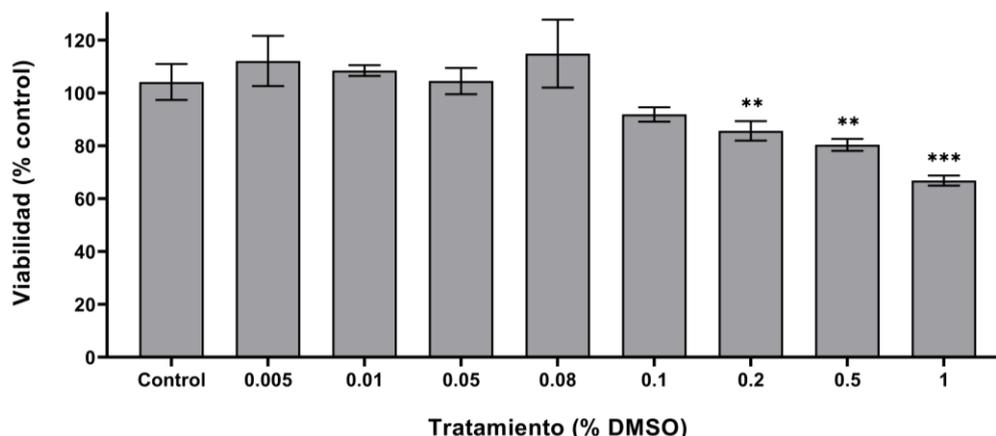
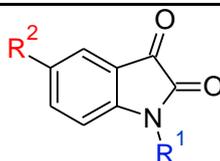


Figura 24. Viabilidad en células SH-SY5Y tratadas con DMSO. Las células se trataron con diferentes % de DMSO durante 24 horas a 37 °C. Los datos de cada columna se presentan como media \pm SEM. Los datos se presentan como el valor medio de tres experimentos independientes realizados por triplicado. **p < 0,01, ***p < 0,001.

En la Tabla 7 se muestran los valores de IC_{50} calculados para los compuestos de referencia **1** y **3**, y para los derivados de isatina **10** y **20**. La IC_{50} de la isatina (**1**) es 200 μ M, mientras que la 5-cloroisatina (**3**) tiene una IC_{50} 10 veces menor (20 μ M). Los compuestos **10** y **20** tienen valores de IC_{50} del orden de 50 μ M, similares a los obtenidos en células BV2 (Figura 25).

Tabla 7. Citotoxicidad de derivados de isatina en células SH-SY5Y.^a



Compuestos	R ¹	R ²	IC ₅₀ (μ M)
1	H	H	200 \pm 29
3	H	Cl	20 \pm 3
10	(CH ₂) ₃ Cl	Cl	56 \pm 11
20	CH ₂ OH	Cl	51 \pm 19

^aTodos los valores de IC_{50} se presentan como valor medio \pm SEM de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado y se calcularon con el software GraphPad Prism 9.0.

Process and Differentiation of These Cells with Retinoic Acid Makes Them More Resistant to Cell Death. *Clin. Oncol. Res.* **2020**, 1-7, 2613-4942

²⁴¹ Mongelli, F.; J H, I.; Hodges, N. Cytotoxicity of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells to the Antipsychotic Drugs, Chlorpromazine and Trifluoperazine, is via a Ca²⁺-Mediated Apoptosis Process and Differentiation of These Cells with Retinoic Acid Makes Them More Resistant to Cell Death. *Clin. Oncol. Res.* **2020**, 1-7, 2613-4942

²⁴² Lin, Y. C.; Uang, H. W.; Lin, R. J.; Chen, I. J.; Lo, Y. C. Neuroprotective effects of glyceryl nonivamide against microglia-like cells and 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y human dopaminergic neuroblastoma cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, 323 (3), 877-87.

Este resultado permite concluir que los derivados sintéticos **10** y **20** no presentan una diferencia significativa respecto a las IC_{50} en BV2 (Figura 25). Esta característica implica que estos derivados **10** y **20** no tienen especificidad celular al afectar a ambas líneas celulares de forma similar.

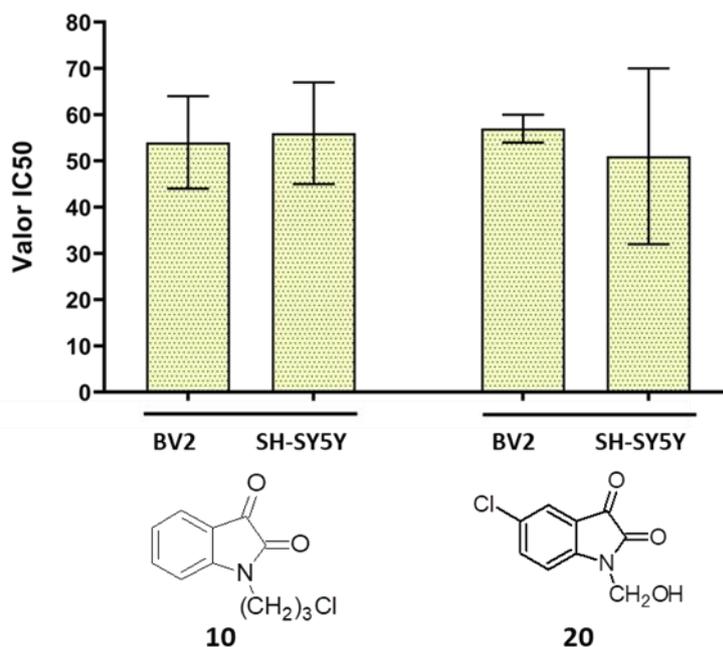


Figura 25. Valores de IC_{50} obtenidos en células BV2 y SH-SY5Y tratadas con los derivados de isatina 10 y 20. Los valores de IC_{50} obtenidos en los ensayos de viabilidad para las BV2 (columna izquierda) comparados con los obtenidos para las SH-SY5Y (columna derecha) \pm su valor SEM. ** $p < 0,01$.

Estos valores de IC_{50} en SH-SY5Y también indican que las SH-SY5Y pueden ser sometidas a las concentraciones de derivado empleadas para los ensayos de inflamación en BV2 sin que esto suponga un riesgo en su viabilidad, lo que permite considerar su uso en futuros ensayos. Estos resultados son importantes, ya que confirman que se puede modular la respuesta inflamatoria de la microglía empleando derivados de isatina sin que éstos afecten a la viabilidad neuronal.

3.4. Predicción de las propiedades farmacológicas de los derivados de isatina

Es importante determinar si los derivados de isatina tienen la capacidad de cruzar la BBB y acceder al SNC. Dado que la BBB es una barrera lipófila, una de las estrategias más comunes en el desarrollo de fármacos es la de aumentar la lipofilia de los compuestos, lo que mejora considerablemente su paso a través de la BBB²⁰⁹.

Existen diferentes aproximaciones para predecir si una molécula puede atravesar membranas lipídicas. La “regla de cinco” de Lipinski¹⁵⁷ recoge algunos parámetros fisicoquímicos clave que permiten predecir la permeabilidad por difusión pasiva de la BBB: el peso molecular, la lipofilia, el área de superficie polar, el número de posibles enlaces de hidrógeno y la carga de la molécula. Lipinski establece que un fármaco debe cumplir los siguientes criterios con una única excepción para considerarse válido: (i) la molécula debe contener menos de cinco enlaces donadores de hidrógeno, (ii) menos de diez enlaces aceptores de hidrógeno, (iii) un peso molecular menor a 500 Da y (iv) un Log *P* calculado inferior a cinco.

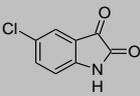
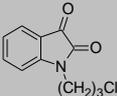
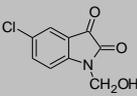
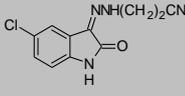
Para evaluar si los derivados cumplen con estos parámetros se utilizó el programa SwissADME.²⁴³ Tanto la isatina como la 5-cloroisatina y los compuestos más efectivos reduciendo la liberación de NO inducida por LPS (compuestos **10**, **20** y **22**), cumplen todos los requisitos de Lipinski sin excepciones, lo que indica de que estas moléculas atravesarían el endotelio (Tabla 8).

La principal limitación de la regla de Lipinski es que no considera la carga de las moléculas, por lo que adicionalmente se utilizaron otros modelos de predicción para complementar estos resultados. SwissADME proporciona diferentes modelos como el filtro de Ghose,²⁴⁴ el cual considera que una la molécula puede atravesar membranas si cumple las siguientes reglas: (i) tener un peso molecular comprendido entre 160 y 480 Da, (ii) un Log *P* entre -0.4 y 5.6, (iii) un número de átomos entre 20 y 70 y (iv) un índice de refracción molar entre 40 y 130. Empleando el programa SwissADME, se comprobó si los derivados cumplían con los criterios establecidos por Ghose. La isatina presenta dos excepciones, un peso molecular inferior a 160 y un número de átomos inferior a 20. La 5-cloroisatina presenta una única excepción del número de átomos. En el caso de los compuestos **10**, **20** y **22**, todos ellos cumplen los requisitos de Ghose sin excepciones, por tanto estos derivados presentan mejores propiedades para atravesar membranas que los compuestos de partida (Tabla 8).

²⁴³ Hassan, A. S.; Morsy, N. M.; Aboulthana, W. M.; Ragab, A., Exploring novel derivatives of isatin-based Schiff bases as multi-target agents: design, synthesis, in vitro biological evaluation, and in silico ADMET analysis with molecular modeling simulations. *RSC Advances*. **2023**, *13* (14), 9281-9303.

²⁴⁴ Ghose, A. K.; Viswanadhan, V. N.; Wendoloski, J. J., A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. 1. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases. *J. Comb. Chem.* **1999**, *1* (1), 55-68.

Tabla 8. Propiedades fisicoquímicas de los derivados de isatina.

Compuestos:	Isatina	5-cloroisatina	10	20	22
Propiedades:					
Estructura					
Peso molecular (Da)	147.13	181.58	223.65	211.60	248.67
Enlaces giratorios	0	0	3	1	3
Enlaces aceptores de H	2	2	2	3	3
Enlaces donadores de H	1	1	0	1	2
Log P	0.34	0.90	1.39	0.89	0.91
Refracción molar	42.16	47.17	61.47	53.23	67.40
Número de átomos	16	16	25	20	30
Superficie polar total (Å ²)	46.17	46.17	37.38	57.61	77.28
Filtro de Lipinski	0	0	0	0	0
Filtro de Ghose	2	1	0	0	0
Filtro de Veber	0	0	0	0	0
Filtro de Egan	0	0	0	0	0
Puntuación de semejanza con fármacos	-0.69	-0.06	-0.36	0.06	0.08
Puntuación BBB	3.64	3.95	4.72	3.71	3.72
Inhibidor de P-gp	0.005	0.017	0.003	0.006	0.063
Sustrato de P-gp	0.005	0.005	0.0	0.001	0.314
Permeabilidad a MDCK	1.7 x 10 ⁻⁵	1.7 x 10 ⁻⁵	3.3 x 10 ⁻⁵	2.4 x 10 ⁻⁵	4.8 x 10 ⁻⁵

De la misma forma, los filtros de Veber²⁴⁵ y Egan²⁴⁶ son muy utilizados para la predicción del paso de compuestos a través de membranas. Según el filtro de Veber, las moléculas deben tener menos de 10 enlaces giratorios y presentar un área de superficie polar total menor a 140 Å². Por otro lado, según el filtro de Egan, las moléculas deben tener un Log P menor a 5.88 y presentar un área de superficie polar total menor a 131.6 Å². En conclusión, tanto la isatina y 5-cloroisatina de partida como a los derivados **10**, **20** y **22** cumplen con los requisitos de Veber y Egan, pudiendo por lo tanto ser considerados como candidatos a fármacos (Tabla 8).

Adicionalmente, se puede predecir la probabilidad de que los derivados sean buenos fármacos y de que crucen la BBB con el programa Molsoft LLC.,²⁴⁶ Este

²⁴⁵ Veber, D.F.; Johnson, S.R.; Cheng, H.-Y.; Smith, B.R.; Ward, K.W.; Kopple, K.D. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2615–2623.

²⁴⁶ Egan, W.J.; Merz, K.M.; Baldwin, J.J. Prediction of Drug Absorption Using Multivariate Statistics. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3867–3877.

programa asigna a cada molécula una puntuación conocida como *drug-likeness score* siendo positiva cuando es un buen candidato como fármaco, o por el contrario negativa para los compuestos que no se consideran buenos fármacos según sus propiedades fisicoquímicas. La isatina, la 5-cloroisatina y el compuesto **10** tienen una puntuación negativa, con un valor de -0.69, -0.06 y -0.36 respectivamente (Tabla 8), y no se consideran buenos candidatos a fármacos según este programa. En cambio, los derivados **20** y **22** tienen puntuaciones de 0.06 y 0.08, respectivamente, por lo que son adecuados para utilizarse como fármacos.

En cuanto a la probabilidad que tienen las moléculas de atravesar la BBB, viene dado por el *BBB score*, donde el valor 6 indica alta probabilidad y 0, baja. La isatina y la 5-cloroisatina presentan una probabilidad intermedia de pasar la BBB con un *BBB score* de 3.64 y 3.95 respectivamente. En el caso de los derivados de isatina, el derivado **10** presenta una permeabilidad mayor con una puntuación de 4.72, y los compuestos **20** y **22**, 3.71 y 3.72 respectivamente, todos ellos mejores que la isatina.

Aunque estos datos indican que los derivados de isatina seleccionados podían llegar a atravesar la BBB, existen otros factores como la selectividad de la propia BBB, que excluye a más del 98% de las macromoléculas y moléculas terapéuticas pequeñas. Esta selectividad está regulada por la presencia de la glicoproteína P (P-gp), que devuelve a muchos fármacos al torrente sanguíneo mediante bombas de reflujo dependientes de ATP. Esta actividad puede estar presente incluso si el fármaco ya ha atravesado el endotelio de la BBB.²⁴⁷ Por tanto, un inhibidor o sustrato adecuado de P-gp permitirá un aumento de la captación celular y predecirá una farmacocinética favorable de los derivados.

El programa ADMETlab 2.0²⁴⁶ predice la capacidad de absorción de las moléculas, considerando a un compuesto como un excelente inhibidor o sustrato de la P-gp cuando tiene un valor entre 0 y 0.3. En caso de que el valor sea de 0.3 a 0.7 se considera medio, y si es 0.7 a 1.0 lo califica como pobre (Tabla 8). Por consiguiente, se puede considerar tanto a la isatina como a la 5-cloroisatina como inhibidores de P-gp con un valor de 0.005 y 0.017 respectivamente. Entre los derivados de isatina, los compuestos **10** y **20** son los inhibidores de P-gp más potentes con un valor de 0.003 y 0.006 respectivamente. En cuanto a la probabilidad de ser sustrato de la P-gp, solo el

²⁴⁷ Cortés, H.; Alcalá-Alcalá, S.; Caballero-Florán, I.H.; Bernal-Chávez, S.A.; Ávalos-Fuentes, A.; González-Torres, M.; González-Del Carmen, M.; Figueroa-González, G.; Reyes-Hernández, O.D.; Floran, B.; et al. A Reevaluation of Chitosan-Decorated Nanoparticles to Cross the Blood-Brain Barrier. *Membranes*. **2020**, *10*, 212.

derivado **22** tiene una probabilidad media con un valor de 0.314, para el resto de compuestos son cercanos a 0.

ADMETlab 2.0 también permite evaluar la absorción de los derivados mediante el coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}). P_{app} es una medida de la integridad de una barrera *in vitro* y se utiliza para predecir la absorción a la membrana. Para evaluar la permeabilidad de los derivados a través de la BBB, utilizamos los valores de P_{app} obtenidos de la línea celular de riñón canino Madin-Darby (MDCK), para la cual se considera que un compuesto tiene una alta permeabilidad pasiva cuando el valor de P_{app} es superior a 20×10^{-6} cm/s. En la Tabla 8 se muestra que tanto la isatina como la 5-cloroisatina no presentan una gran permeabilidad pasiva a MDCK, pues tienen un valor de P_{app} de 1.7×10^{-5} cm/s mientras que los derivados **10**, **20** y **22** sí tienen una alta permeabilidad pasiva a MDCK, siendo **22** el que presenta el valor más elevado al ser 4.8×10^{-5} cm/s.

Como conclusión, gracias a este análisis *in silico* de las propiedades fisicoquímicas y farmacológicas de los derivados de isatina empleando programas de simulación, se confirma que los derivados de isatina **10** y **20** presentan tanto una alta probabilidad de atravesar la BBB y de comportarse como fármacos, siendo estos unos resultados prometedores, y se plantean futuros experimentos *in vivo* para confirmar las predicciones *in silico* realizadas.

3.5. Preparación de nanopartículas magnéticas *core/shell* como sistema de transporte de fármacos

Los fármacos únicamente ejercen los efectos deseados cuando alcanzan su diana en una concentración terapéutica suficiente y esta se mantiene durante un período de tiempo óptimo.^{248,249} En este sentido, el uso de NPs cargadas con fármacos es una estrategia terapéutica muy útil en Medicina.¹⁶³

En el caso de los derivados de isatina, sus propiedades apuntan a que pueden atravesar la BBB por sí solos, pero este tipo de derivados puede presentar otras actividades en el organismo y es necesario dirigirlos y concentrarlos en el cerebro. Por

²⁴⁸ Estes, L. Review of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Antimicrobial Agents. *Mayo Clin. Proc.* **1998**, 73 (11), 1114-1122.

²⁴⁹ Pantaleão, S. Q.; Fernandes, P. O.; Gonçalves, J. E.; Maltarollo, V. G.; Honorio, K. M. Recent Advances in the Prediction of Pharmacokinetics Properties in Drug Design Studies: A Review. *Chem Med Chem.* **2022**, 17 (1), e202100542.

ello, se plantea su administración empleando nanopartículas biocompatibles superparamagnéticas, que permitan la carga de compuestos activos y que gracias a sus propiedades magnéticas se acumulen selectivamente en cerebro frente a otros órganos, empleando un campo magnético externo. Además, otra ventaja que ofrecen las nanopartículas superparamagnéticas es que permiten su detección *in vivo* por MRI para estudios de biodisponibilidad.

Para alcanzar el objetivo propuesto de desarrollar un sistema de administración de fármacos anti-neuroinflamatorios en el cerebro, seleccionamos las SPIONPs de magnetita (Fe_3O_4) como sistema de transporte de los derivados de isatina. Para evitar toxicidad, se empleó la estrategia *stealth* mediante recubrimientos orgánicos de NPs híbridas de tipo *core/shell*,²⁵⁰ seleccionando para ello el polímero natural quitosano (CS), debido a su alta biocompatibilidad, biodegradabilidad y baja toxicidad. Para validar el sistema y comprobar que permite la carga de compuestos activos se utilizó el fármaco fluvastatina, por su analogía estructural con los derivados de isatina y su potencial antiinflamatorio recientemente descrito.

3.5.1. Obtención de nanopartículas *core/shell* (Fe_3O_4 -cit)/CS

El método de síntesis de los núcleos de Fe_3O_4 empleados en este trabajo se basa en la coprecipitación química de Fe^{2+} y Fe^{3+} mediante la adición de una base (Esquema 5A).²¹² Este método se considera una alternativa sencilla, eficiente y económica en comparación con otras metodologías empleadas en la literatura.^{251,252}

Para prevenir la formación de agregados, los núcleos obtenidos por coprecipitación se lavaron con una solución de citrato sódico 0.1 N ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, *cit*) (Esquema 5B).^{198,253} El citrato sódico estabiliza las dispersiones de los núcleos en soluciones acuosas y aporta una carga superficial negativa a los núcleos, obteniendo

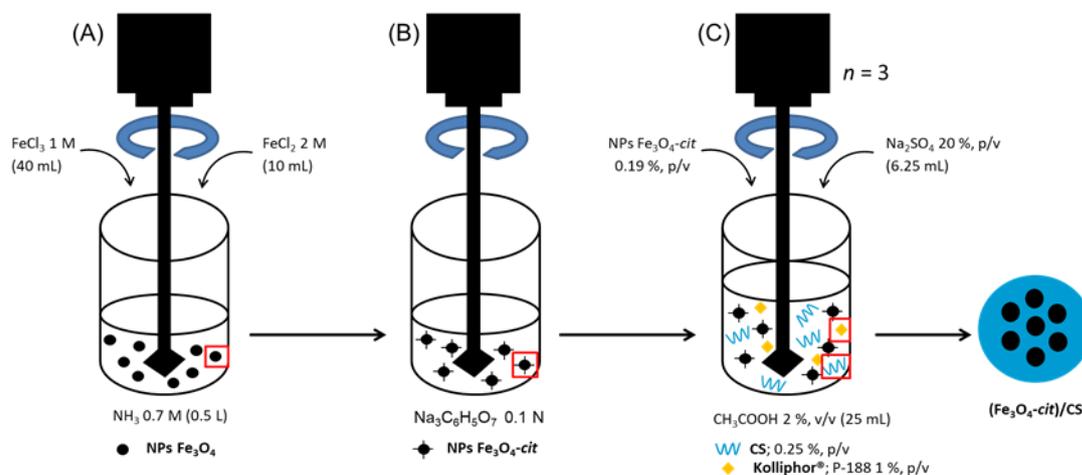
²⁵⁰ Johnston, R. L.; Wilcoxon, J. P.; Eds. *Frontiers of Nanoscience, Vol. 3, Chapter 1: Metal Nanoparticles and Nanoalloys*. Johnston, R. L., Elsevier: USA. **2012**, pp 1-42.

²⁵¹ Ali, A.; Zafar, H.; Zia, M.; Ul Haq, I.; Phull, A. R.; Ali, J. S.; Hussain, A. Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. *Nanotechnol Sci Appl.* **2016**, *9*, 49-67.

²⁵² Ezzaier, H.; Marins, J. A.; Claudet, C.; Hemery, G.; Sandre, O.; Kuzhir, P. Kinetics of Aggregation and Magnetic Separation of Multicore Iron Oxide Nanoparticles: Effect of the Grafted Layer Thickness. *Nanomaterials*, **2018**, *8*, 623.

²⁵³ Megías, R.; Arco, M.; Ciriza, J.; Saenz del Burgo, L.; Puras, G.; López-Viota, M.; Delgado, Á. V.; Dobson, J. P.; Arias, J. L.; Pedraz, J. L. Design and characterization of a magnetite/PEI multifunctional nanohybrid as non-viral vector and cell isolation system. *Int. J. Pharm.* **2017**, *518* (1), 270-280.

los núcleos funcionalizados con citrato ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$), facilitando la interacción posterior con el polisacárido CS que permitirá la formación de la nanoestructura *core/shell*.^{196,254}



Esquema 5. Obtención de las NPs de ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$)/CS. Procedimiento de preparación de NPs de Fe_3O_4 (A); recubrimiento de las mismas con citrato para obtener $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$ (B) e incorporación de las NPs en una matriz polimérica de CS en medio ácido para facilitar su disolución (C). Figura adaptada de Fernández-Álvarez *et al.*¹⁹⁴

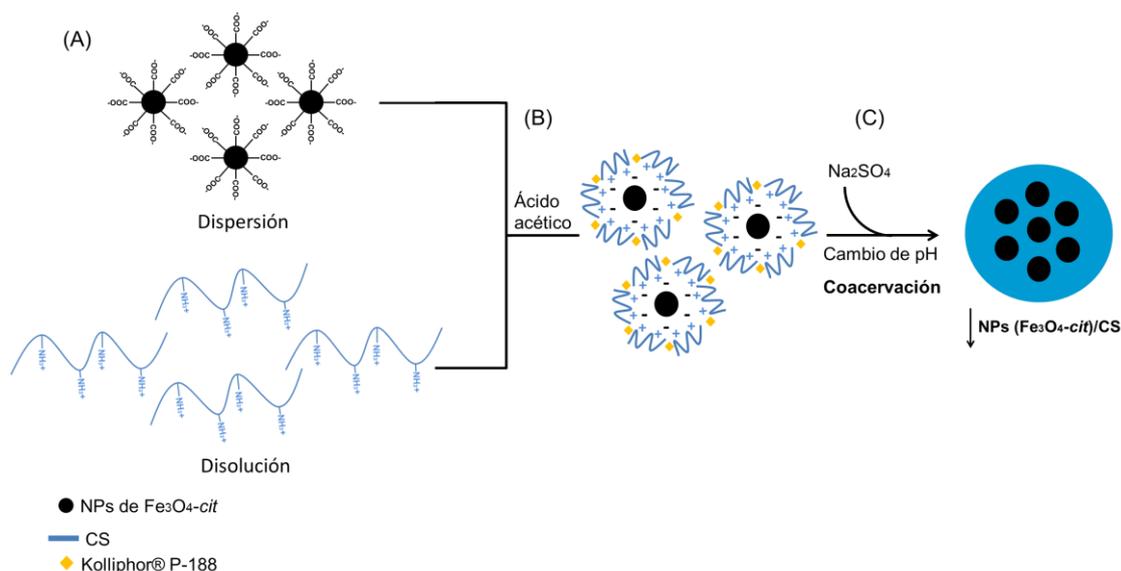
Una vez obtenidos los núcleos funcionalizados $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$, se prepararon las NPs *core/shell* ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$)/CS (Esquema 5C) utilizando la metodología de coacervación iónica que se resume en el Esquema 6.^{194,255}

Durante la coacervación, se añadió el CS para formar la estructura *core/shell* con los núcleos funcionalizados $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$. Durante el procedimiento de obtención, la mezcla de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$ y CS (Esquema 6A) se mantuvo en condiciones ácidas empleando ácido acético (Esquema 6B). En medio ácido, los grupos amino libres de las unidades de glucosamina del CS se protonan y pasan a tener la forma R-NH_3^+ soluble.²⁰⁷ Esta propiedad se utiliza para formar NPs autoensambladas.²⁵⁶ Como consecuencia, la matriz de CS tenderá a concentrarse en las proximidades de la superficie del óxido de hierro. Finalmente, la coacervación del CS se produjo tras añadir una solución de sulfato sódico en condiciones fuertes de sonicación (Esquema 6C). Esto es debido a que al añadir el sulfato de sodio en la solución ácida de CS, este provoca la consecuente disminución de la solubilidad del CS, lo que conlleva la precipitación de las NPs.

²⁵⁴ Shen, L.; Li, B.; Qiao, Y. Fe_3O_4 Nanoparticles in Targeted Drug/Gene Delivery Systems. *Materials*. **2018**, *11* (2), 324.

²⁵⁵ Risch, S. J. Encapsulation: Overview of Uses and Techniques. In *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients*, American Chemical Society: **1995**; Vol. 590, pp 2-7.

²⁵⁶ Sikorski, D.; Gzyra-Jagiela, K.; Draczyński, Z. The Kinetics of Chitosan Degradation in Organic Acid Solutions. *Mar. Drugs*. **2021**, *19*, 236.



Esquema 6. Proceso de coacervación de las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$ y el CS. Una disolución de CS entra en contacto con la suspensión de NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$ cargado negativamente (A). La presencia del ácido acético permite el autoensamblaje de las NPs gracias a la carga positiva del CS, el P-188 facilita que las partículas formadas sean más pequeñas (B). Al cambiar el pH cambia la solubilidad de las NPs y estas precipitan (C).

El poloxámero 188 (Kolliphor[®], p188, Esquema 6) se añadió a la mezcla para favorecer la formación de partículas con tamaños más pequeños, que tienen mejor captación en el SNC.^{257,258} y principalmente porque el p188 induce la apertura de las cadenas poliméricas de quitosano, creando un espacio dentro de la red polimérica donde puede incorporarse el fármaco.²⁵⁹ Una vez conformadas las NPs *core/shell* ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$)/CS el rendimiento total del procedimiento de obtención de las NPs de ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$)/CS fue de un 57 ± 4 %, que es similar al de resultados existentes en bibliografía.¹⁹⁴ En paralelo, se prepararon NPs de quitosano empleando el mismo método de coacervación, pero sin incluir los núcleos de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$. De esta manera, las NPs de CS generadas sirven como control para los procesos de caracterización posteriores.

²⁵⁷ Khan, S. A.; Rehman, S.; Nabi, B.; Iqbal, A.; Nehal, N.; Fahmy, U. A.; Kotta, S.; Baboota, S.; Md, S.; Ali, J. Boosting the Brain Delivery of Atazanavir through Nanostructured Lipid Carrier-Based Approach for Mitigating NeuroAIDS. *Pharmaceutics*. **2020**, *12* (11), 1059.

²⁵⁸ Teixeira, M. I.; Lopes, C. M.; Gonçalves, H.; Catita, J.; Silva, A. M.; Rodrigues, F.; Amaral, M. H.; Costa, P. C. Formulation, Characterization, and Cytotoxicity Evaluation of Lactoferrin Functionalized Lipid Nanoparticles for Riluzole Delivery to the Brain. *Pharmaceutics*. **2022**, *14* (1), 185.

²⁵⁹ Arias, J. L.; López-Viota, M.; Gallardo, V.; Adolfin Ruiz, M., Chitosan nanoparticles as a new delivery system for the chemotherapy agent tegafur. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2010**, *36* (6), 744-750.

3.5.2. Liofilización de las nanopartículas de (Fe₃O₄-cit)/CS para su conservación

Las dispersiones acuosas de sistemas de NPs basadas en CS tienen una vida útil limitada a temperatura ambiente, debido al riesgo de descomposición por la hidrólisis del CS.^{260,261} Por ello, se planteó optimizar las condiciones para la liofilización del nanosistema, lo que permite su almacenamiento y favorece su estabilidad a largo plazo.

El CS es un polímero catiónico que contiene unidades de glucosamina y *N*-acetilglucosamina, y a un pH ligeramente ácido interacciona con moléculas aniónicas y moléculas de agua.²⁶² Las moléculas de agua entran en la matriz de las nanopartículas de quitosano y pueden participar en interacciones intermoleculares con los grupos funcionales del CS, como por ejemplo enlaces de hidrógeno. Estas interacciones pueden afectar la estructura y las propiedades físicas de las nanopartículas, como su tamaño, carga superficial y capacidad de carga de fármacos o moléculas bioactivas.²⁶³ Por ello, uno de los parámetros a tener en cuenta de cara a la estabilidad de las suspensiones de NPs es la eliminación del agua en el sistema.^{264,265}

La técnica de liofilización es ampliamente utilizada para transformar soluciones o dispersiones de fármacos inestables en sólidos estables que pueden ser almacenados y utilizados posteriormente. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la liofilización puede ejercer una fuerte tensión en los materiales, como en el CS que constituye la cubierta de las NPs de (Fe₃O₄-cit)/CS, lo que puede provocar alteraciones en su estructura.²⁶³ Además, el propio proceso de congelación previo a la liofilización puede afectar a la estabilidad.

²⁶⁰ Abdelwahed, W.; Degobert, G.; Stainmesse, S.; Fessi, H. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2006**, *58* (15), 1688-1713.

²⁶¹ Aranaz, I.; Alcántara, A.R.; Civera, M.C.; Arias, C.; Elorza, B.; Heras Caballero, A.; Acosta, N. Chitosan: An Overview of Its Properties and Applications. *Polymers.* **2021**, *13*, 3256.

²⁶² Szymańska, E.; Winnicka, K. Stability of Chitosan—A Challenge for Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 1819-1846.

²⁶³ Sreekumar, S.; Goycoolea, F. M.; Moerschbacher, B. M.; Rivera-Rodriguez, G. R. Parameters influencing the size of chitosan-TPP nano- and microparticles. *Sci. Rep.* **2018**, *8*(1), 4695.

²⁶⁴ Szymanska, E.; Winnicka, K. Stability of chitosan-a challenge for pharmaceutical and biomedical applications. *Mar. Drugs.* **2015**, *13* (4), 1819-46.

²⁶⁵ Eliyahu, S.; Almeida, A.; Macedo, M. H.; das Neves, J.; Sarmiento, B.; Bianco-Peled, H. The effect of freeze-drying on mucoadhesion and transport of acrylated chitosan nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **2020**, *573*, 118739.

La suspensión de NPs se congeló a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en presencia y ausencia de sacarosa al 5% (p/v) como agente crioprotector, siguiendo las condiciones recomendadas en la literatura para este tipo de NPs.^{260,266} Las sustancias crioprotectoras forman una matriz vítrea, en la cual las NPs quedan inmobilizadas, previniendo la agregación de las NPs al interponerse entre ellas y protegiéndolas contra el estrés mecánico de los cristales de hielo.^{267,268} Una vez congeladas, se liofilizaron las suspensiones de NPs para su posterior almacenamiento. En el momento de uso, las NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit})/\text{CS}$ liofilizadas se dispersaron en agua bidestilada a la concentración deseada para su posterior caracterización, comparándose los resultados obtenidos previamente a su liofilización.

3.5.3. Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas

La caracterización fisicoquímica de las NPs es fundamental para poder comprender sus propiedades y confirmar el éxito de los métodos de síntesis. Existen varias técnicas ampliamente empleadas para llevar a cabo esta caracterización: medida del radio hidrodinámico e índice de polidispersión, medida de potencial zeta, microscopía electrónica de alta resolución, espectrometría de infrarrojos por transformada de Fourier, Ciclo de histéresis y respuesta magnética

Radio hidrodinámico e índice de polidispersión

Se midió el radio hidrodinámico (Rh) que se define como el tamaño hidrodinámico de un coloide hipotético que se mueve a través de una solución del mismo modo que la partícula que se mide. Esto se debe a que en la práctica, las NPs en solución no son completamente esféricas, razón por la cual se recurre a la terminología del Rh, también conocido como radio de Stokes.²⁶⁹

La técnica empleada para determinar el Rh de las partículas es la dispersión dinámica de luz (en inglés *Dynamic Light Scattering*, DLS), basada en la medida de las fluctuaciones temporales de la intensidad de la luz debido a los movimientos de las

²⁶⁶ Trenkenschuh, E.; Friess, W. Freeze-drying of nanoparticles: How to overcome colloidal instability by formulation and process optimization. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2021**, *165*, 345-360.

²⁶⁷ Almalik, A.; Alradwan, I.; Kalam, M. A.; Alshamsan, A. Effect of cryoprotection on particle size stability and preservation of chitosan nanoparticles with and without hyaluronate or alginate coating. *Saudi Pharm J.* **2017**, *25* (6), 861-867.

²⁶⁸ Fonte, P.; Soares, S.; Costa, A.; Andrade, J. C.; Seabra, V.; Reis, S.; Sarmiento, B. Effect of cryoprotectants on the porosity and stability of insulin-loaded PLGA nanoparticles after freeze-drying. *Biomater.* **2012**, *2* (4), 329-339.

²⁶⁹ Cammack, R.; Atwood, T.; Campbell, P.; Parish, H.; Smith, A.; Vella, F.; Stirling, J., Stokes' law of viscosity. Oxford University Press: 2008.

partículas dispersas en un disolvente. La rapidez con la que estas fluctuaciones ocurren se describe mediante una función de autocorrelación. Para determinar este parámetro, se utiliza un láser que incide sobre la muestra contenida en una cubeta transparente, a una longitud de onda (λ), y se analiza la forma en que la luz se dispersa. Debido a la presencia de múltiples partículas, se forma un patrón de interferencia característico que fluctúa debido al movimiento constante de las partículas.

Las partículas de mayor tamaño se mueven más lentamente y, por lo tanto, tardan más en perder esta correlación en comparación con las partículas de menor tamaño, que se mueven más rápido y pierden la correlación más rápidamente. Para calcular el R_h de las partículas, se utiliza el coeficiente de difusión D en el líquido, que se puede calcular utilizando la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D = kT / 6\pi\eta R_h$$

Donde k es la constante de Boltzmann, T es la temperatura en grados Kelvin, η es la viscosidad del fluido y R_h es el valor del radio (expresado en nm) de la esfera hipotética, permitiendo determinar el tamaño de las NPs (Tabla 9).²⁷⁰ El R_h de la partícula, está determinado por la propia estructura y también por el conjunto de iones adheridos a su superficie que se mueven junto a ella, por lo tanto, el tamaño que se obtiene con esta técnica nos proporciona información acerca del diámetro del núcleo incluyendo los iones circundantes.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 8. Se observa una reducción en el tamaño de los núcleos de Fe_3O_4 -cit en comparación con los núcleos de Fe_3O_4 no tratados con citrato. Esta diferencia en el tamaño de ambos tipos de núcleos puede explicarse por la tendencia de Fe_3O_4 a la agregación, que se reduce por la presencia de grupos $-COO^-$ del citrato en los núcleos de Fe_3O_4 -cit, generando una densidad de carga negativa que promueve la repulsión entre las partículas (Tabla 9).

²⁷⁰ Bhattacharjee, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *J. Control Release.* **2016**, 235, 337-351.

Tabla 9. Medidas de radio hidrodinámico (Rh), índice de polidispersión (Pdl) y potencial zeta (ZP) de las NPs.

Nanomaterial	Rh (nm)	Pdl	ZP (mV)
Fe_3O_4	68 ± 20	0.30 ± 0.01	51 ± 0.70
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$	42 ± 15	0.38 ± 0.03	-47 ± 0.61
$(\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit})/\text{CS}$	339 ± 66	0.19 ± 0.01	33.1 ± 0.73
Liof. $(\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit})/\text{CS}$ sin sacarosa	482.6 ± 7.7	0.31 ± 0.02	19.1 ± 0.06
Liof. $(\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit})/\text{CS}$ + 5 % sacarosa (p/v)	377.0 ± 4.0	0.13 ± 0.01	25.6 ± 0.53

Por otro lado, en el caso de las NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit})/\text{CS}$, se observa un tamaño significativamente mayor de hasta 5 veces, lo cual coincide con la hipótesis inicial en la que se basa la formación de la estructura *core/shell* de las NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit})/\text{CS}$ y sugiere la formación de una cubierta de CS alrededor de las NPs.²⁰⁷ Debido a que la matriz de CS se concentra en la superficie del óxido de hierro, se produce un incremento del tamaño de la NP, pasando de 42 a 339 nm.

Además, por DLS se obtiene el índice de polidispersión (Pdl), que describe el la falta de uniformidad de una distribución coloidal. Los valores de Pdl adecuados para un sistema coloidal de aplicación en Biomedicina (Tabla 9).²⁷¹ En cuanto a la dispersión de las NPs, el análisis del Pdl indica que las dispersiones de los núcleos de Fe_3O_4 y $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$ presentan valores de dispersión similares y cercanos a los considerados aceptables para este tipo de NPs.²⁷² En el caso de la dispersión de las NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit})/\text{CS}$ el valor de Pdl es menor que el de los núcleos y no alcanza el límite definido para considerarse inadecuado en la técnica. Esta diferencia entre en el valor de Pdl de las NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit})/\text{CS}$ y el de los núcleos, podría deberse a la naturaleza del recubrimiento de CS.

En el caso de las NPs liofilizadas, la dispersión aumentó cuando no se empleó sacarosa como agente crioprotector. Una proporción de sacarosa del 5% p/v de sacarosa fue la óptima para permitir que las NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit})/\text{CS}$ mantengan su tamaño en cierta medida en comparación con las NPs sin liofilizar. Se observó que las partículas no tratadas con crioprotector experimentaron una agregación esperada debido al proceso de congelación y reconstitución, lo que se reflejó en un notable aumento de tamaño en comparación con el Rh de las NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit})/\text{CS}$ tratadas

²⁷¹ López Rubio, A.; Fabra Rovira, M. J.; Martínez Sanz, M.; Gómez-Mascaraque, L. G.; Eds. *Nanomaterials for Food Applications, Chapter 11: Characterization of Nanomaterials: Tools and Challenges*. Mudalige, T.; Qu, H.; Van Haute, D.; Ansar, S. M.; Paredes, A.; Ingle, T., Elsevier: USA. **2019**, pp 313-353.

²⁷² Fernandez, F.; García García, G.; Arias, J. A Tri-Stimuli Responsive (Maghemite/PLGA)/Chitosan Nanostructure with Promising Applications in Lung Cancer. *Pharmaceutics*. **2021**, *13*, 1232.

con el 5% p/v de sacarosa. El aumento en el Rh de las NPs liofilizadas con el 5% de sacarosa puede atribuirse también a la presencia del azúcar, que podría estar interactuando con la superficie de las NPs. Este resultado es significativo porque el tamaño de las NPs magnéticas tiene un impacto importante en sus propiedades y con este método se consigue mantener su tamaño después de resuspenderlas liofilizadas.

Un fenómeno similar se observó en el Pdl de las NPs de (Fe₃O₄-cit)/CS sin crioprotector, pues este valor fue de 0.31 mientras que las NPs de (Fe₃O₄-cit)/CS tratadas con 5% de sacarosa tenían un Pdl de 0.19, similar al de las NPs control de 0.13 (Tabla 9). Esto podría explicarse por la formación de agregados que generan diferencias en los tamaños de las NPs registrados, lo que resulta en una muestra menos uniforme que en el caso de las partículas tratadas con crioprotector. Este cambio observado sugiere que se produjo una alteración en la superficie de las NPs debido a la congelación, siendo las NPs tratadas con el 5% de sacarosa las que no experimentaron este cambio de forma tan pronunciada.

Medida de potencial zeta

El potencial zeta (ZP) se refiere a la carga eléctrica que surge en la interfaz entre una superficie sólida y el medio líquido con el que interactúa. El ZP no puede ser medido directamente, pero se puede deducir a partir de la movilidad electroforética de las partículas bajo la aplicación de un campo eléctrico.

Para comprender mejor cómo se produce este fenómeno, es necesario entender las distintas partes que componen un sistema coloidal, que consta de al menos dos fases. La primera fase es la fase dispersa, que está compuesta por los propios coloides, como es el caso de las NPs. La otra fase es la fase dispersante, que está formada por un líquido, como por ejemplo el agua. El comportamiento del coloide se puede cuantificar con precisión cuando la fase dispersante es agua o agua con electrolitos (Figura 26).²⁷³

El ZP es la diferencia de potencial eléctrico entre el fluido a granel en el que se dispersan las partículas y la capa de fluido que alberga los iones con carga opuesta, los cuales se encuentran asociados con la superficie de las NPs.²⁷⁴ La determinación del ZP de las dispersiones de NPs se realizó utilizando el equipo *Zetasizer Nano-ZS*,

²⁷³ Mohapatra, S. S.; Ranjan, S.; Dasgupta, N.; Mishra, R. K.; Thomas, S.; Eds. *Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery, Chapter 15: Stability Studies on Nanomaterials Used in Drugs*. Selvamani, V., Elsevier: USA. **2019**, pp 425-444.

²⁷⁴ Moore, T. L.; Rodriguez-Lorenzo, L.; Hirsch, V.; Balog, S.; Urban, D.; Jud, C.; Rothen-Rutishauser, B.; Lattuada, M.; Petri-Fink, A. Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (17), 6287-6305.

el cual permite medir la movilidad electroforética de las partículas en suspensión y calcular su ZP.

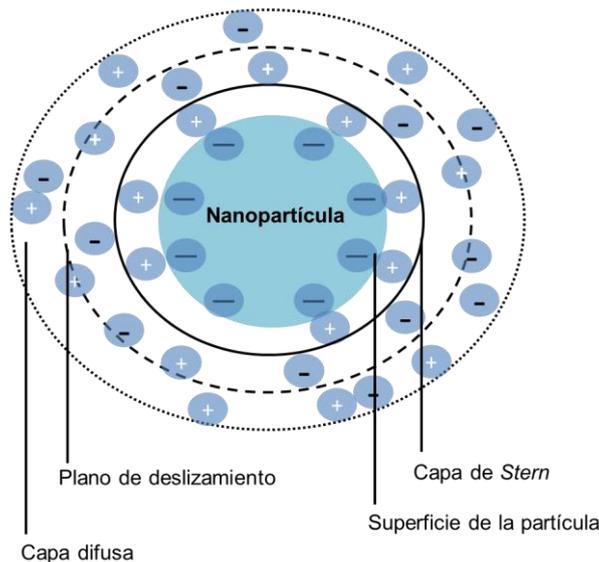


Figura 26. Representación de doble capa eléctrica de las NPs. Representación de una partícula con una superficie cargada negativamente con una capa de iones de carga opuesta fuertemente adherida, línea negra continua, capa de Stern. A continuación, se encuentra la capa difusa, línea de puntos, formada por iones de los dos tipos, tanto positivos como negativos. Entonces, el plano de deslizamiento, línea discontinua, representa la interfaz entre los iones que se mueven con la partícula y los que no. Figura adaptada de Mohapatra *et al.*²⁷³

Para el análisis del ZP, se prepararon diferentes concentraciones de KNO_3 para los núcleos de Fe_3O_4 y $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$, y las NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit})/\text{CS}$ y CS ($n = 9$), debido a que las determinaciones del ZP se basan en la fuerza iónica, la cual se logra mediante las concentraciones de los iones de KNO_3 (Figura 27). El pH es un parámetro crucial que afecta el ZP, especialmente en dispersiones acuosas, ya que el valor de ZP varía según los grupos químicos presentes en la superficie de las NPs y el pH del medio.

La determinación del ZP es una herramienta importante para comprender el estado de la superficie de las NPs y predecir la estabilidad de las dispersiones coloidales a largo plazo. Además, los valores del ZP son característicos de los grupos químicos presentes en la superficie de las NPs, lo que permite conocer la composición de la cubierta de las NPs de tipo *core/shell*.^{212,275}

Las diferentes características electroforéticas entre los núcleos de Fe_3O_4 y las otras NPs se muestran en la Tabla 9 y en la Figura 27. La carga superficial presente

²⁷⁵ Fu, C.-C.; Tran, H. N.; Chen, X.-H.; Juang, R.-S. Preparation of polyaminated Fe_3O_4 @chitosan core-shell magnetic nanoparticles for efficient adsorption of phosphate in aqueous solutions. *J. Ind. Eng. Chem.* **2020**, *83*, 235-246.

en los núcleos de Fe_3O_4 , al igual que en otras NPs basadas en hierro, se define por una delgada capa anfótera de óxido, cuya formación es inevitable en entornos oxidantes.²⁷⁶

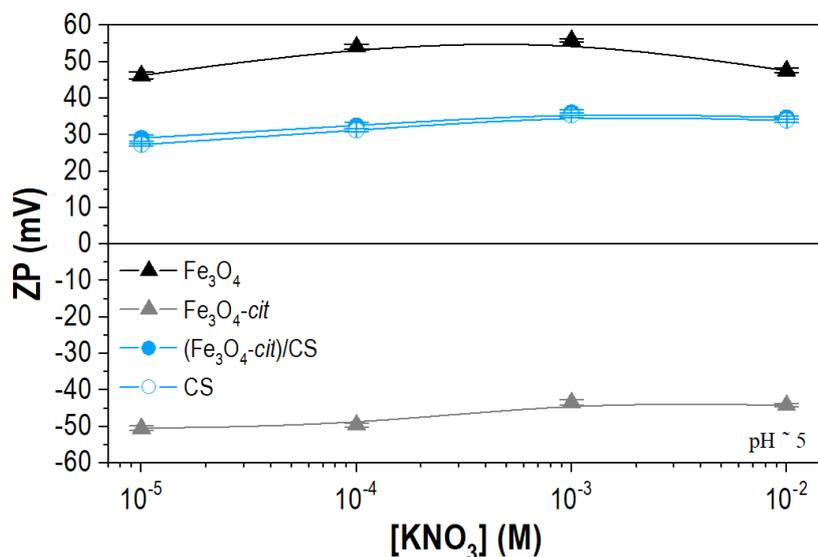


Figura 27. Medidas de ZP de las NPs en función de la fuerza iónica del medio. En la gráfica se pueden apreciar los cambios en el eje y relativos al ZP, eje y, de las NPs respecto a las variaciones de concentración de KNO_3 , eje x. NPs de Fe_3O_4 (negro), Fe_3O_4 -cit (gris), $(\text{Fe}_3\text{O}_4$ -cit)/CS, (azul), y NPs de CS (blanco).

De manera similar, los elevados valores negativos de ZP de los núcleos de Fe_3O_4 -cit confirman la presencia de los grupos carboxilo cargados negativamente en la superficie de las NPs.²⁰² Por otra parte, se encontraron valores similares de ZP para las NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4$ -cit)/CS (33.1 ± 0.73 mV) y las de CS (32 ± 0.70 mV), así como diferencias con los núcleos de Fe_3O_4 libres (51 ± 0.7 mV).

En relación con la validación del proceso de liofilización, se destaca la importancia de evaluar los cambios en el ZP de las NPs. La medida del ZP es un método apropiado para determinar el estado de la superficie de las NPs y detectar cualquier alteración que pueda haber ocurrido tras la liofilización. Además, es comúnmente utilizado para estudiar la interacción entre las moléculas crioprotectoras y la superficie de las NPs.²⁶⁵ Al analizar los valores de ZP obtenidos, se observa una ligera disminución de este valor en las NPs no tratadas, mientras que se conserva en cierta medida en las NPs tratadas en presencia de sacarosa al 5% (Tabla 9). Este resultado indica que el proceso de liofilización afecta la superficie de las NPs, y que la presencia de sacarosa previene dichos cambios. Además, dado que la sacarosa es

²⁷⁶ Santos, D. P.; Ruiz, M. A.; Gallardo, V.; Zanoni, M. V. B.; Arias, J. L. Multifunctional antitumor magnetite/chitosan-l-glutamic acid (core/shell) nanocomposites. *J. Nanoparticle Res.* **2011**, *13* (9), 4311-4323.

una molécula de carga neutra, su efecto sobre el valor de ZP de las NPs es muy limitado.

Observando en conjunto los valores de Rh y ZP, se propone que las NPs recubiertas con CS podrían pasar la BBB mediante transcitosis mediada por adsorción (AMT). El tamaño y el ZP son dos parámetros importantes en los procesos de endocitosis de las NPs por parte de las células endoteliales del cerebro, y para que las NPs crucen la BBB de forma eficaz deben tener un tamaño en torno a 200 nm y un valor de ZP positivo.^{211,277} Dado que las NPs de (Fe₃O₄-cit)/CS tienen un tamaño de unos 339 nm y un valor de ZP de 33.1 ± 0.73 mV, potencialmente podrían cruzar la BBB, sin embargo, es necesario confirmarlo mediante ensayos *in vivo*.

Microscopía electrónica de alta resolución

La microscopía electrónica permite obtener imágenes de alta resolución de las NPs.²⁷⁸ Entre los principales tipos de microscopía electrónica disponibles, se utilizó la microscopía electrónica de transmisión (TEM) de alta resolución (HRTEM) debido a que TEM convencional no sería capaz de diferenciar las NPs de Fe₃O₄ debido a su pequeño tamaño, lo que proporciona información útil para analizar la simetría cristalina, los defectos, el espaciado de la red y la estructura de la superficie de las NPs.^{279,280}

Utilizando esta técnica de HRTEM para visualizar los núcleos de Fe₃O₄-cit y las NPs de (Fe₃O₄-cit)/CS se confirmaron los cambios en la estructura de los núcleos de Fe₃O₄-cit tras el tratamiento con citrato, así como el aumento significativo en su tamaño después del recubrimiento con CS. La diferencia en los tamaños obtenidos por las técnicas de HRTEM (≈ 15 nm) y DLS (42 ± 15 nm, Pdl 0.30 ± 0.01) se deba a la alta carga eléctrica en la superficie de las NPs tratadas con citrato.¹⁹⁶

Los resultados del estudio de HRTEM de los núcleos de Fe₃O₄-cit (Figura 28A,B) en este trabajo están de acuerdo con resultados previos descritos en la

²⁷⁷ Jo, D.H.; Kim, J.H.; Lee, T.G.; Kim, J.H. Size, surface charge, and shape determine therapeutic effects of nanoparticles on brain and retinal diseases. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2015**, *11*, 1603–1611.

²⁷⁸ Franken, L. E.; Grunewald, K.; Boekema, E. J.; Stuart, M. C. A. A Technical Introduction to Transmission Electron Microscopy for Soft-Matter: Imaging, Possibilities, Choices, and Technical Developments. *Small.* **2020**, *16* (14), e1906198.

²⁷⁹ Gordon, R. E. Electron microscopy: a brief history and review of current clinical application. *Methods Mol. Biol.* **2014**, *1180*, 119-35.

²⁸⁰ Lentzen, M. Contrast transfer and resolution limits for sub-angstrom high-resolution transmission electron microscopy. *Microsc. Microanal.* **2008**, *14* (1), 16-26.

literatura, en los que se describe que el tamaño esperado de las NPs oscila alrededor de ≈ 15 nm cuando se obtienen por la misma metodología de síntesis.^{253,281} Por lo tanto, la técnica de HRTEM permite confirmar el tamaño de los núcleos. Además, esta técnica permite verificar la formación de una matriz polimérica en la que se pueden identificar pequeñas partículas que corresponderían con los núcleos.

El fenómeno de agregación de NPs que se aprecia en las imágenes puede deberse más al tratamiento de la muestra en relación a este análisis que a cualquier otra dinámica, tal y como ha sido observado con anterioridad en diversos nanosistemas magnetopoliméricos (Figura 28).^{273,282} Las imágenes obtenidas por HRTEM en la parte inferior izquierda (Figura 28C,D) evidencian la presencia de una estructura *core/shell* en las NPs, con capas de contraste claro de CS en la parte exterior de la estructura *core/shell* y núcleos de contraste oscuro de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$.

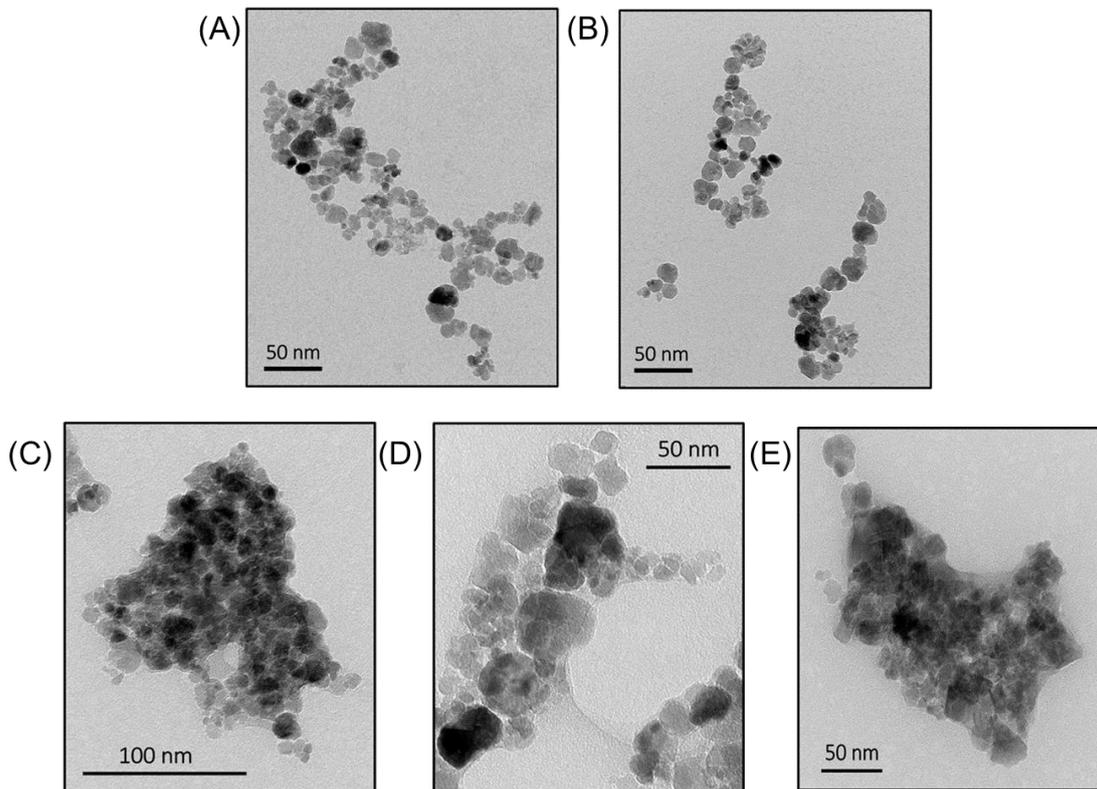


Figura 28. Imágenes de microscopía HRTEM de núcleos de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$ (A,B), NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit})/\text{CS}$ (C,D) y NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit})/\text{CS}$ liofilizadas usando sacarosa como agente crioprotector (5%, p/v) (E). Longitud de barra: 50 nm (A,B,D,E) y 100 nm (C).

²⁸¹ Clares, B.; Biedma-Ortiz, R. A.; Sáez-Fernández, E.; Prados, J. C.; Melguizo, C.; Cabeza, L.; Ortiz, R.; Arias, J. L. Nano-engineering of 5-fluorouracil-loaded magnetoliposomes for combined hyperthermia and chemotherapy against colon cancer. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2013**, *85* (3, Part A), 329-338.

²⁸² Arias, J. L.; Ruiz, M.; Gallardo, V.; Delgado, A. V. Tegafur loading and release properties of magnetite/poly(alkylcyanoacrylate) (core/shell) nanoparticles. *J. Control. Release.* **2008**, *125* (1), 50-8.

Esto sugiere que los núcleos hidrófilos de Fe_3O_4 -cit se recubrieron exitosamente con una capa amorfa de CS ($(\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit})/\text{CS}$), exhibiendo una estructura *core/shell* típica, lo que dio lugar a NPs con un tamaño de alrededor de 200 nm (Figura 28C). Una diferencia fundamental entre la técnica de DLS y la HRTEM es que la primera es un análisis acumulativo que funciona con miles de partículas en solución, mientras que la segunda es un análisis más local, pero complementarias para la caracterización.

De la misma forma, la visualización por HRTEM de las partículas de $(\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit})/\text{CS}$ liofilizadas y tratadas con sacarosa al 5% p/v permitió examinar la microestructura de la matriz liofilizada y confirmar la integridad de las partículas. En particular, se evaluó si se habían producido cambios en la morfología de las partículas (Figura 28E). El análisis de la Figura 28E reveló que la nanoestructura de las NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit})/\text{CS}$ se conservó tras la liofilización, lo que apunta que son estables en estas condiciones. Además, la forma de las partículas es similar a las partículas sin liofilizar (Figura 28C). La aglomeración de las partículas observada en la Figura 28E podría deberse también al tratamiento de la muestra en el proceso de visualización, ya que no se observaron cambios en el tamaño de las partículas por las otras técnicas.

Espectrometría de infrarrojos por transformada de Fourier

La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) permite obtener información valiosa sobre los diferentes grupos funcionales presentes en un sistema al medir las frecuencias vibratorias de los enlaces químicos implicados. FTIR permite el análisis *in situ* de interfaces para investigar la adsorción superficial de grupos funcionales en NPs. El espectro resultante representa la absorción y transmisión molecular, generando una huella digital molecular de la muestra que es única para cada estructura molecular.²⁸³

El análisis de FTIR realizado para los núcleos de Fe_3O_4 -cit y las NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit})/\text{CS}$, y CS ($n = 9$) se realizó con el objetivo de analizar la estructura de las NPs desarrolladas. La caracterización química de las NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit})/\text{CS}$ se presenta respecto a los núcleos de Fe_3O_4 -cit y las NPs de CS (Figura 29) en la cual se identificaron bandas significativas de los nanomateriales por comparación con los datos de estudios previos.

²⁸³ Hilal, N.; Ismail, A. F.; Matsuura, T.; Oatley-Radcliffe, D.; Eds. *Membrane Characterization, Chapter 1: Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy*. Mohamed, M. A.; Jaafar, J.; Ismail, A. F.; Othman, M. H. D.; Rahman, M. A., Elsevier: Malaysia. **2017**, pp 3-29.

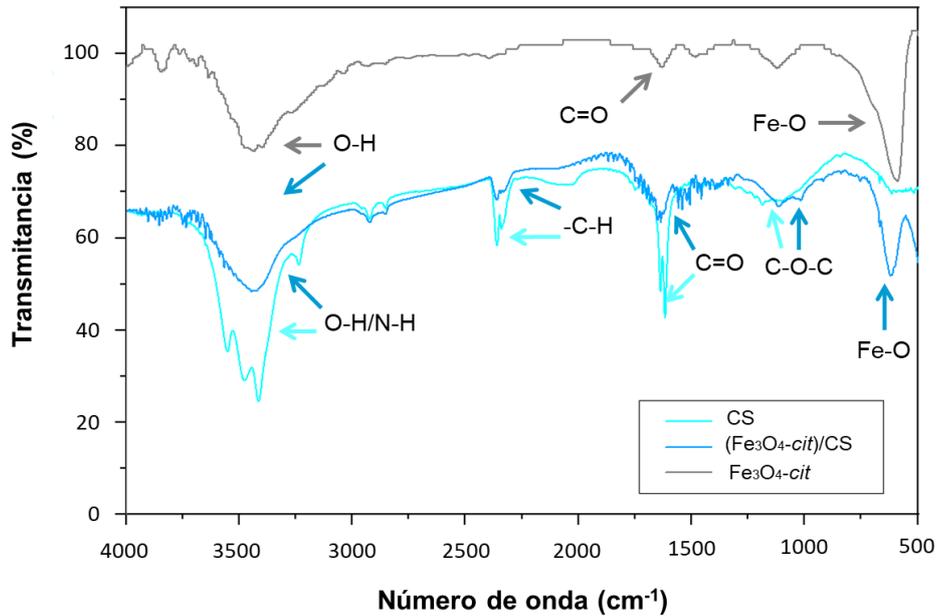


Figura 29. Análisis de IR de las NPs por FTIR. Espectro de las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$ (gris), CS (azul claro) y $(\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit})/\text{CS}$ (azul oscuro).

Los enlaces entre átomos dan lugar a bandas de frecuencia características, independientemente de la estructura del resto de la molécula. La persistencia de estas bandas permite la obtención de información estructural mediante comparación con tablas de referencia que recogen la absorción característica de los grupos funcionales.²⁸⁴

La banda de vibración de estiramiento a 600 cm^{-1} se asigna a los enlaces metal-oxígeno (Fe-O) presentes en la red cristalina de Fe_3O_4 .²⁸⁵ Por otra parte, la banda ancha de 3400 cm^{-1} confirma la presencia de grupos hidroxilo (concretamente, la interacción O-H), mientras que la banda de 1800 cm^{-1} confirma la presencia del citrato, que se asigna al enlace carbonilo (C=O) que corresponde al grupo -COOH (Figura 29).²⁸⁶

En cuanto a las NPs de CS, se observa una banda a 3400 cm^{-1} que corresponde al estiramiento N-H y O-H. Por otro lado, las bandas de absorción a 2400 cm^{-1} se atribuyen al estiramiento del enlace C-H, aunque en la bibliografía se han

²⁸⁴ Kowalczyk, D.; Pitucha, M. Application of FTIR Method for the Assessment of Immobilization of Active Substances in the Matrix of Biomedical Materials. *Materials*. **2019**, *12*, 2972.

²⁸⁵ Nalbandian, L.; Patrikiadou, E.; Zaspalis, V.; Patrikidou, A.; Hatzidaki, E.; Papandreou, C. Magnetic Nanoparticles in Medical Diagnostic Applications: Synthesis, Characterization and Proteins Conjugation. *Curr. Nanosci.* **2015**, *12*, 1-1.

²⁸⁶ Cheraghpour, E.; Javadpour, S.; Mehdizadeh, A. Citrate capped superparamagnetic iron oxide nanoparticles used for hyperthermia therapy. *J. Biomed. Eng.* **2012**, *05*, 715-719.

descrito estas bandas en valores cercanos a los 2800 cm^{-1} características de polisacáridos.²⁸⁷ La banda a 1600 cm^{-1} , se relaciona con grupos C=O, debido a la presencia de *N*-acetilo residuales del CS mientras que la banda de absorción a 1100 cm^{-1} se puede atribuir al estiramiento asimétrico del puente C-O-C correspondiendo a la presencia del enlace C-O (Figura 29).²⁸⁸

Estos datos permiten identificar la estructura de las NPs de CS, y los núcleos de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$ así como confirmar la estructura de las NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit})/\text{CS}$ comparando sus picos con los de las otras NPs en la Figura 29. Se confirma la presencia de interacciones de tipo Fe-O, a 600 cm^{-1} características de las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$ y ausentes en CS.

Las bandas de vibración de estiramiento en las posiciones 1600 y 1800 cm^{-1} se corresponden tanto a la presencia de C=O como con el enlace C-O-C, confirmando tanto la posible presencia del citrato como de un polisacárido. Por otro lado, las bandas de absorción en torno a 2400 cm^{-1} se relacionan con la cubierta de CS al señalar la presencia de los enlaces C-H. Finalmente, los picos a 3400 cm^{-1} , más pronunciados que los observados en las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$, indican la presencia de polímeros de CS. Todos estos resultados confirman la eficacia de la metodología empleada para la síntesis de las nanopartículas de $(\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit})/\text{CS}$.

Ciclo de histéresis y respuesta magnética

Debido a la relevancia de las propiedades magnéticas de las NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit})/\text{CS}$ para aplicaciones biomédicas, se llevó a cabo su caracterización mediante el ciclo de histéresis, que confirma el comportamiento magnético de los materiales. En el presente estudio, se caracterizó el comportamiento magnético de las NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit})/\text{CS}$ mediante el uso de un magnetómetro-susceptibilímetro.

En la figura 30 se muestra la curva M-H, también conocida como ciclo de histéresis, que representa la magnetización (M), medida en unidades de Teslas o Mega Gauss, en el eje vertical, y la fuerza del campo magnético externo aplicado (H), medida en kiloamperios por metro, en el eje horizontal. Los materiales ferromagnéticos no vuelven a una magnetización cero después de ser magnetizados en una dirección,

²⁸⁷ Rozman, N.; Yenn, T.; Leong, C. R.; Anuar, M.; Karim, S.; Ong, S. K.; Md Yusof, F. A.; Tan, W.-N.; Baharuddin, S.; Ooi, M.; Lee, K. C. Homalomena pineodora essential oil nanoparticle inhibits diabetic wound pathogens. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 10.

²⁸⁸ Queiroz, M.; Melo, K.; Sabry, D.; Sasaki, G.; Rocha, H. Does the Use of Chitosan Contribute to Oxalate Kidney Stone Formation? *Mar. Drugs.* **2014**, *13*, 141-158.

sino que deben ser impulsados de vuelta a cero mediante la aplicación de un campo magnético con dirección opuesta.

Cuando se aplica un campo magnético alternativo a estos materiales, su magnetización traza un ciclo de histéresis, que es un bucle cerrado en la curva M-H (Figura 30).²⁸⁹ El ciclo de histéresis de las NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit})/\text{CS}$ indicó un comportamiento superparamagnético, ya que las ramas ascendentes y descendentes del ciclo apenas fueron perceptibles con la sensibilidad del instrumento utilizado (Figura 30).¹⁸⁷ Cuando se hace referencia a materiales con propiedades superparamagnéticas, se observa una curva de histéresis estrecha, tal como ocurre en el caso de las NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit})/\text{CS}$ (Figura 30A).

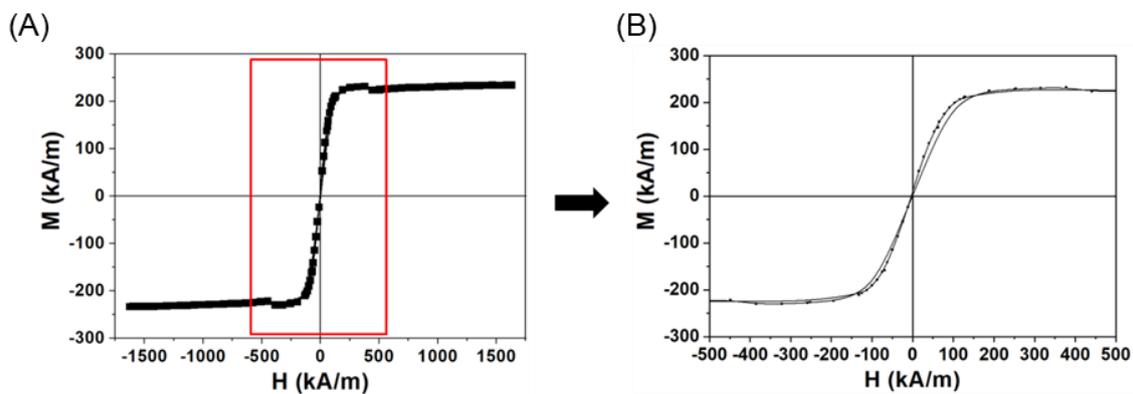


Figura 30. Ciclo de histéresis de las NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit})/\text{CS}$. Gráfica izquierda, todas las medidas de comportamiento magnético de las NPs realizadas en la determinación de la curva del ciclo de histéresis (A). Gráfica derecha, ampliación de la sección correspondiente a la propia curva sigmoidea (B).

Esto indica que las NPs sintetizadas no se atraen entre sí después de recibir la energía del campo magnético, ya que su comportamiento superparamagnético es mayor cuanto más estrecha sea la curva. Por lo tanto, se puede afirmar que las NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit})/\text{CS}$ preparadas presentan un comportamiento superparamagnético similar al observado en otras partículas de estructura core/shell con núcleo de Fe_3O_4 .^{187,212}

Asimismo, se ha evaluado el comportamiento magnético *in vitro* de las dispersiones de NPs de Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$ y $(\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit})/\text{CS}$, como se ilustra en la Figura 31. La aplicación directa de un campo magnético externo ha producido una atracción completa de las NPs (Figura 31).

²⁸⁹ Tanaka, D.; Aketa, N.; Tanaka, H.; Tamaki, T.; Inose, T.; Akai, T.; Toyama, H.; Sakata, O.; Tajiri, H.; Ogawa, T. Thin films of spin-crossover coordination polymers with large thermal hysteresis loops prepared by nanoparticle spin coating. *Chem. Comm.* **2014**, 50 (70), 10074-10077.

En primer lugar, se observó la respuesta magnética *in vitro* a nivel microscópico de las dispersiones de NPs en ausencia de un campo magnético externo ($B_0 = 0$) (Figura 31A), la cual mostró una apariencia homogénea y sin un orden aparente. No obstante, cuando se aplicó un gradiente magnético en los laterales del portaobjetos donde las muestras se habían depositado, se observó la formación de agregados en forma de cadenas paralelas a la dirección de este gradiente magnético (Figura 31B,C).

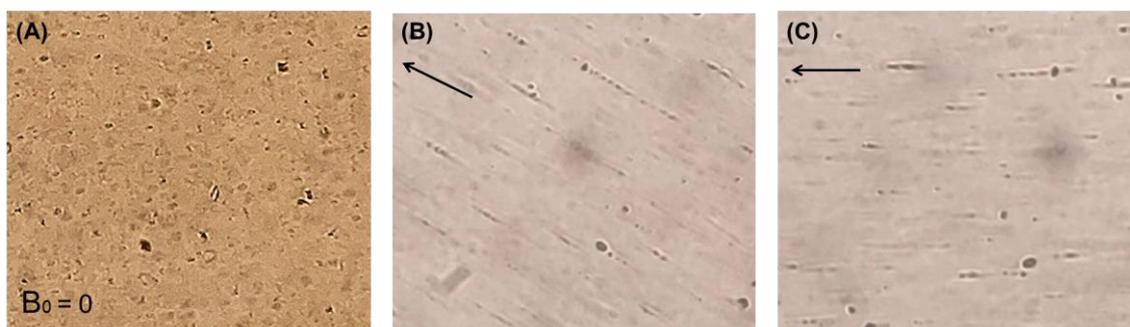


Figura 31. Respuesta magnética *in vitro* de las NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit})/\text{CS}$. Visualización microscópica en aumentos de 20 X de una dispersión de NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit})/\text{CS}$ (4 mg/mL) en ausencia de un campo magnético (B_0) (A) y ante la presencia de un campo magnético (0.32 T) dirigido en la dirección señalada por la flecha (B,C). $n = 3$

Este comportamiento se puede explicar considerando la mayor importancia de las interacciones magnéticas en comparación con las interacciones coloidales que ocurren entre las propias NPs de Fe_3O_4 , a pesar de su recubrimiento con citrato o con CS, lo cual es consistente con los resultados observados en trabajos previos.^{194,290} En vista de los resultados obtenidos, se podría proponer el uso potencial de las NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit})/\text{CS}$ obtenidas como agentes capaces de transportar específicamente a la diana seleccionada mediante la aplicación de un gradiente magnético y su detección *in vivo* por MRI.²⁹¹

3.5.4. Efecto de las nanopartículas sobre la viabilidad celular en BV2

Para emplear las NPs como agentes de transporte de fármacos es necesario evaluar si tienen efecto citotóxico sobre las células. Se realizaron ensayos de citotoxicidad utilizando diferentes concentraciones de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$ y de $(\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit})/\text{CS}$ en células de microglía BV2 ($n = 6$).

²⁹⁰ López-López, M. T.; Gómez-Ramírez, A.; Rodríguez-Arco, L.; Durán, J. D. G.; Iskakova, L.; Zubarev, A. Colloids on the Frontier of Ferrofluids. Rheological Properties. *Langmuir*. **2012**, *28* (15), 6232-6245.

²⁹¹ Arias, J. L.; Reddy, L. H.; Couvreur, P. $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{chitosan}$ nanocomposite for magnetic drug targeting to cancer. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22* (15), 7622-7632.

El intervalo de concentraciones seleccionado fue de 10 a 200 $\mu\text{g/mL}$, que corresponde a una cantidad de NPs administrada comúnmente para ensayos celulares.^{292,293} El efecto de los núcleos de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$ y las NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit})/\text{CS}$ sobre la actividad metabólica se evaluó por MTT y los resultados se muestran en la Figura 32.

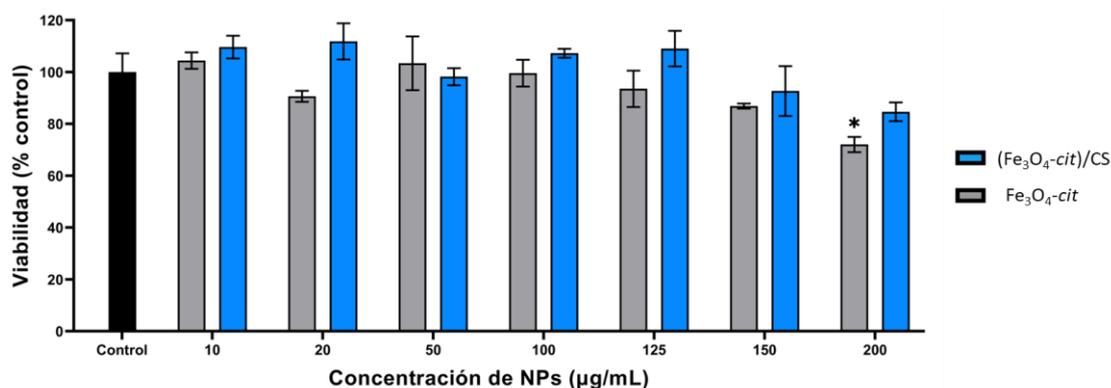


Figura 32. Efectos del tratamiento con las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$ y $(\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit})/\text{CS}$ sobre la viabilidad de las BV2. Las células se trataron con NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$ y $(\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit})/\text{CS}$ a diferentes concentraciones durante 24 h a 37 °C. La gráfica representa la viabilidad de las células BV2 mediante el ensayo de MTT respecto a un control (negro) tratado con vehículo y sin NPs. Los datos se presentan como valor medio \pm SEM ($n=6$). * $p < 0,05$.

Únicamente la presencia de los núcleos de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$ a una concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$ redujo la viabilidad celular (72 ± 3 % de viabilidad respecto al control).²⁹⁴ Por otro lado, las células BV2 tratadas con NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit})/\text{CS}$ no mostraron una toxicidad significativa hasta los 200 $\mu\text{g/mL}$, siendo la concentración a partir de la cual se reducía la viabilidad celular (85% de viabilidad respecto al control), siendo consistente con estudios previos.²⁹⁵

La disminución en la toxicidad celular de $(\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit})/\text{CS}$ comparada con la de los núcleos funcionalizados de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$ se puede deber al uso del CS como recubrimiento superficial de las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$ y a su efecto neuroprotector sobre la

²⁹² Reddy, L. H.; Arias, J. L.; Nicolas, J.; Couvreur, P. Magnetic nanoparticles: design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. *Chem. Rev.* **2012**, *112* (11), 5818-78.

²⁹³ Feng, Q.; Liu, Y.; Huang, J.; Chen, K.; Huang, J.; Xiao, K. Uptake, distribution, clearance, and toxicity of iron oxide nanoparticles with different sizes and coatings. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 2082.

²⁹⁴ Lewis, C. S.; Torres, L.; Miyauchi, J. T.; Rastegar, C.; Patete, J. M.; Smith, J. M.; Wong, S. S.; Tsirka, S. E. Absence of Cytotoxicity towards Microglia of Iron Oxide ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) Nanorhombhedra. *Toxicol. Res.* **2016**, *5* (3), 836-847.

²⁹⁵ Shundo, C.; Zhang, H.; Nakanishi, T.; Osaka, T. Cytotoxicity evaluation of magnetite (Fe_3O_4) nanoparticles in mouse embryonic stem cells. *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* **2012**, *97*, 221-225.

viabilidad de las células BV2.^{174,296} De esta manera, se puede confirmar que el uso de las NPs no supone un riesgo para la viabilidad celular para estas concentraciones dadas, lo que se podría aplicar para futuros ensayos de liberación de fármaco.

Por otro lado, el empleo de sacarosa como agente crioprotector en el proceso de liofilización plantea la necesidad de evaluar su efecto sobre la viabilidad celular. Si bien la presencia de sacarosa en el medio de cultivo no está relacionada directamente con la toxicidad celular, se ha observado que puede afectar la presión osmótica del medio, lo que constituye un factor estresante para las células, comprometiendo su viabilidad.²⁹⁷

En el caso específico de las NPs ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$)/CS liofilizadas en presencia de un 5% de sacarosa se traduce en una concentración máxima de aproximadamente 60 mg/mL de sacarosa en el medio de cultivo al utilizar la cantidad máxima de estas NPs (200 $\mu\text{g/mL}$). Por ello, se realizaron ensayos de viabilidad celular utilizando diferentes concentraciones de sacarosa en células BV2 (Figura 33), y los resultados indican que estas condiciones no afectan a la viabilidad celular, solo a partir de una concentración de 80 mg/mL de sacarosa se produce una reducción significativa de la viabilidad celular.

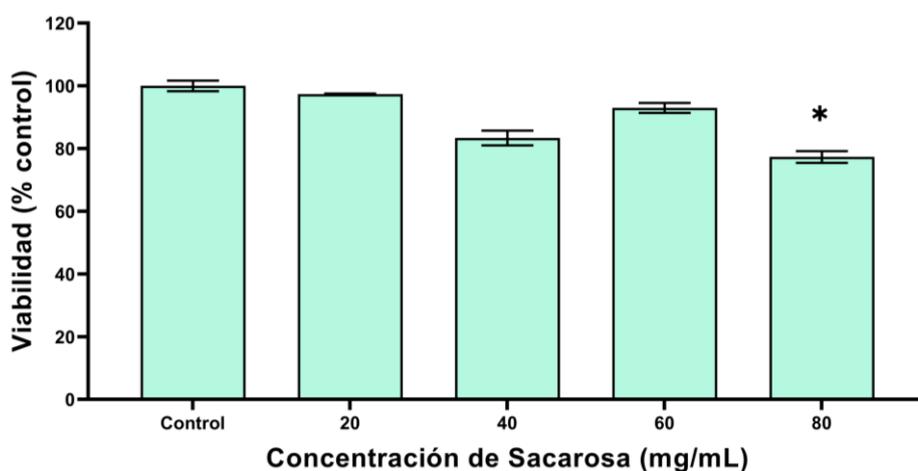


Figura 33. Viabilidad celular de células BV2 tratadas con diferentes concentraciones de sacarosa. Las células BV2 se trataron con diferentes concentraciones de sacarosa durante 24 horas a 37 °C. Los datos de cada columna se presentan como media de la viabilidad relativa \pm SEM. * $p < 0,05$.

²⁹⁶ Chen, B.; Li, J.; Borgens, R. B. Neuroprotection by chitosan nanoparticles in oxidative stress-mediated injury. *BMC Res. Notes*. **2018**, *11* (1), 49.

²⁹⁷ Božič, B.; Zemljič Jokhadar, Š.; Kristanc, L.; Gomišček, G. Cell Volume Changes and Membrane Ruptures Induced by Hypotonic Electrolyte and Sugar Solutions. *Front. Physiol.* **2020**, *11*, 582781.

Estos resultados nos permiten concluir que el uso de una concentración del 5% de sacarosa durante el proceso de liofilización no afecta la estabilidad de las NPs de (Fe₃O₄-cit)/CS ni a la viabilidad celular, y por lo tanto, puede considerarse que el uso de las nanopartículas liofilizadas es seguro en estas condiciones experimentales.

3.5.5. Adsorción del fármaco fluvastatina en las nanopartículas core/shell

Dentro del objetivo de desarrollar un sistema eficaz de transporte de fármacos anti-neuroinflamatorios al cerebro, nos planteamos incorporar fluvastatina como fármaco modelo en las NPs. La incorporación del fármaco puede ocurrir mediante la adición directa del compuesto a la solución que se utiliza para sintetizar las NPs, permitiendo la absorción del fármaco en la matriz, o incubando las NPs formadas en una solución que contenga el fármaco. En este último caso, el fármaco se adsorbe de forma reversible a la superficie de las NPs.^{250,298} La eficacia de las NPs como sistemas de transporte de fármacos se evalúa en función de su capacidad para incorporar moléculas con actividad terapéutica, aplicable a los derivados de la isatina y otras moléculas de interés. Para probar la capacidad la inclusión de fármacos en las NPs y optimizar el método de carga, se seleccionó la estatina fluvastatina, una molécula con potencial actividad antiinflamatoria ya empleada en humanos para otros usos como reducir los niveles de colesterol y triglicéridos en sangre.^{114,299}

La fluvastatina tiene una mayor similitud estructural con los derivados de isatina que otras estatinas (Figura 9). Presenta un anillo de indol *N*-alquilado, un átomo de flúor en el anillo aromático y una cadena hidrocarbonada con grupos hidroxilo, por lo que la seleccionamos como molécula antiinflamatoria de referencia para optimizar el sistema de carga de fármacos en NPs (Fe₃O₄-cit)/CS.²⁵⁷ La carga de la propia fluvastatina plantea también ciertos desafíos, pues se degrada rápidamente cuando se expone a condiciones ácidas.^{300,301} Por ello, se optó por un ensayo de adsorción

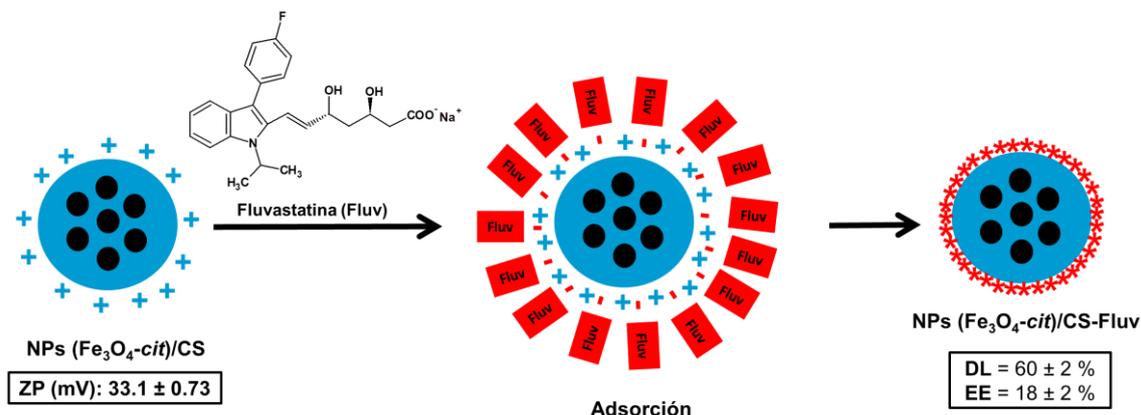
²⁹⁸ Wang, X.; Xu, J.; Xie, X.; Li, X.; Liu, Z. Poly(vinyldiaminotriazine) nanoparticle adsorption of small drug molecules in aqueous phase and the role of synergistic interaction between hydrogen bonding and hydrophobic affinity. *Colloid Polym. Sci.* **2021**, 299 (1), 37-47.

²⁹⁹ Cimino, M.; Gelosa, P.; Gianella, A.; Nobili, E.; Tremoli, E.; Sironi, L. Statins: Multiple Mechanisms of Action in the Ischemic Brain. *The Neuroscientist.* **2007**, 13 (3), 208-213.

³⁰⁰ Akabari, A.; Suhagia, B.; Saralai, M.; Sutariya, V. Development and Validation of Stability Indicating RP-HPLC Method for Estimation of Fluvastatin Sodium in Bulk and Capsule Dosage Form. *Eurasian J. Anal. Chem.* **2017**, 12, 87-105.

³⁰¹ Gomes, F.; García, P.; Alves, J.; Singh, A.; Kedor-Hackmann, E.; Santoro, M. Development and Validation of Stability-Indicating HPLC Methods for Quantitative Determination of Pravastatin, Fluvastatin, Atorvastatin, and Rosuvastatin in Pharmaceuticals. *Anal. Lett.* **2009**, 42, 1784-1804.

superficial del fármaco sobre la superficie de las NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit})/\text{CS}$ (Esquema 7).³⁰²



Esquema 7. Proceso de adsorción de la fluvastatina a la superficie de las NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit})/\text{CS}$. La suspensión de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}/\text{CS}$ presenta una carga superficial ligeramente positiva por los grupos $-\text{NH}_2$ del CS (A). Sobre esta suspensión se añade la fluvastatina sódica (Fluv) (B) que presenta una carga neta negativa gracias al carboxilo libre ($-\text{COO}^-$) y se produce la atracción entre las dos cargas conformando una monocapa (línea roja continua) de fluvastatina alrededor del CS ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}/\text{CS}$ -Fluv) (C).

Los valores de la eficiencia de atrapamiento (EE, %, *entrapment efficiency* en inglés) y la carga del fármaco (DL, %, *drug loading* en inglés) fueron $EE = 18 \pm 1.7\%$ y $DL = 61 \pm 2.2\%$. Es un buen resultado, ya que el porcentaje de carga de fármaco es más elevado que el descrito para la carga de otros fármacos en sistemas similares, por ejemplo, se ha descrito un EE de un 8% y un DL de un 1% para el fármaco anticancerígeno gemcitabina en SPIONPs, recubiertas con CS.²⁹¹ Otro ejemplo similar se puede observar en el trabajo de Ghosh *et al.* quienes emplearon NPs de CS para la carga del fármaco rifampicina, con un valor de DL del 9,5% y una EE del 43%.³⁰²

Esta diferencia existente entre los fármacos puede deberse a una interacción electrostática favorable entre la cubierta de CS, cargada positivamente por la presencia de grupos $-\text{NH}_2$ libres, y la fluvastatina, que presenta una carga neta negativa debida al grupo carboxilo (Esquema 7). Los grupos hidroxilo y carboxilo de la fluvastatina pueden interactuar con el quitosano y formar una monocapa alrededor de las nanopartículas, dando lugar al sistema de nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}/\text{CS}$ -Fluv. Por todo ello, la fluvastatina es un fármaco adecuado para la carga de NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit})/\text{CS}$.²⁹¹ Además, es posible que esta adsorción se complemente con las fuerzas de

³⁰² Ghosh, R.; Mondal, S.; Mukherjee, D.; Adhikari, A.; Ahmed, S. A.; Alsantali, R. I.; Khder, A. S.; Altass, H. M.; Moussa, Z.; Das, R.; Bhattacharyya, M.; Pal, S. K., Oral drug delivery using a polymeric nanocarrier: chitosan nanoparticles in the delivery of rifampicin. *Mater. Adv.* **2022**, 3 (11), 4622-4628.

atracción entre los anillos aromáticos e indol de la fluvastatina y la superficie de las NPs de (Fe₃O₄-cit)/CS.

Los resultados obtenidos hasta el momento señalan que las NPs de Fe₃O₄-cit)/CS desarrolladas permiten una buena adsorción de la fluvastatina en la cubierta de CS. Se está estudiando la capacidad de las NPs de (Fe₃O₄-cit)/CS para incorporar derivados de isatina y el perfil de liberación de los derivados en medio fisiológico empleando HPLC. En paralelo, se están haciendo ensayos para estudiar el efecto de los compuestos como agentes neuroprotectores cuando se administran cargados en las NPs, ya que estudios previos en terapias dirigidas señalan que este tipo de sistema de transporte favorece la internalización, reduce la dosis necesaria y permite su vectorización magnética.¹⁷⁶

4. Conclusiones

En la presente Tesis Doctoral, se ha logrado alcanzar el objetivo general propuesto, ya que se han obtenido derivados de isatina que muestran propiedades anti-neuroinflamatorias sin afectar a la viabilidad en células de microglia. Además, se ha logrado preparar con éxito un sistema de vehiculización de fármacos basado en nanopartículas magnéticas y se ha llevado a cabo la caracterización de las mismas, demostrando su estabilidad y capacidad para la adsorción de un fármaco. Respecto a los objetivos concretos planteados al inicio de la tesis, se pueden extraer las siguientes conclusiones en base a los resultados específicos obtenidos:

1. La presencia de diferentes halógenos en la posición 5 de la isatina conduce a un aumento de la citotoxicidad que parece estar asociado con valores más altos de Log P. Todos los análogos que presentan un átomo de cloro en la posición 5 de la isatina tienen mayor citotoxicidad en células de microglia BV2 respecto a sus análogos sin cloro en esa posición, o con cloro en la posición 4. Los derivados *N*-alquilados y las fenilhidrazonas presentan mayor citotoxicidad.

Se concluye que las sustituciones en las posiciones 1 y 5 de la isatina, así como el aumento de la lipofilia, aumentan la citotoxicidad de los derivados, lo cual se ha aplicado para el diseño de nuevos derivados sintéticos.

2. La evaluación la actividad anti-neuroinflamatoria en base a la reducción de los niveles de óxido nítrico, de interleucina 6 (IL-6) y del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en el modelo de neuroinflamación empleado permite concluir que:

- Las *N*-sustituciones con cadenas grandes y grupos polares desfavorecen la actividad anti-neuroinflamatoria.

- Los derivados 1-(3-cloropropil)isatina (**10**) y 5-cloro-1-(hidroximetil)isatina (**20**) muestran los mejores resultados a 25 μ M reduciendo la producción de óxido nítrico en células de microglia un 63 y 68 % respectivamente sin afectar a la viabilidad celular.

- Los derivados **10** y **20** muestran un efecto dosis respuesta reduciendo los niveles de óxido nítrico en células de microglia.

- Los derivados **10** y **20** reducen significativamente la producción de las citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF- α .

3. Los compuestos **10** y **20** no presentan toxicidad en células neuronales humanas SH-SY5Y a las concentraciones empleadas en los ensayos anti-neuroinflamatorios (5 y 25 μM) por lo que se proponen como candidatos para el desarrollo de nuevos agentes anti-neuroinflamatorios y neuroprotectores.

4. El proceso de obtención de nanopartículas de magnetita funcionalizadas con citrato y embebidas en una matriz de quitosano ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$)/CS es reproducible y de alto rendimiento (57 %) de acuerdo con las medidas del tamaño de estas nanopartículas empleando las técnicas de dispersión dinámica de luz, índice de polidispersión y microscopía de transmisión de electrones de alta resolución.

La formación de la matriz de quitosano alrededor de los núcleos de magnetita se confirmó por espectrometría de infrarrojos por transformada de Fourier y medida del potencial zeta. Además, el ciclo de histéresis permitió validar la retención del carácter superparamagnético en los núcleos de magnetita y esta capacidad de respuesta se comprobó mediante la aplicación de un campo magnético externo.

5. Se ha optimizado y validado el método de liofilización de nanopartículas de ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$)/CS empleando sacarosa al 5% comparando los valores de tamaño hidrodinámico, potencial zeta, índice de polidispersión y tamaño por microscopía electrónica con las nanopartículas sin liofilizar. Dada su similitud, se concluye que la liofilización se puede emplear para conservar y prolongar la estabilidad de estos nanosistemas a largo plazo.

Los altos valores de carga de fluvastatina (61 %) en las nanopartículas de ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$)/CS demuestran de forma preliminar el potencial de estos sistemas para el transporte de fármacos, pudiendo ser aplicados para el transporte dirigido de los derivados de isatina.

6. Tanto las nanopartículas de ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$)/CS como la sacarosa empleada para su liofilización, han mostrado baja citotoxicidad en células de microglia BV2 en las condiciones experimentales estudiadas.

5. Materiales y Métodos

5.1. Materiales y métodos generales

Todos los productos químicos utilizados en el presente trabajo son de grado reactivo o superior y se compraron a proveedores comerciales, empleándose tal y como se recibieron sin purificación adicional, a menos que se indique lo contrario en el método. Los disolventes orgánicos fueron adquiridos en la empresa Scharlau, (Barcelona, España). Se emplearon los siguientes reactivos comerciales: Isatina y 5-bromo-1-penteno 95% (Acros Organics, China); 5-bromo-isatina, 5-cloro-1-metil-isatina, 5-metilo-4-bromo-isatina (TCl, Japón); cloruro de hierro (II) tetrahidratado al 99% (FeCl_2), hidrato de hidrazina (Acros Organics, Alemania); ácido acético glacial (CH_3COOH), cloruro de hierro (III) 6-hidrato (FeCl_3), dimetilsulfóxido (DMSO), sacarosa y nitrato de potasio (KNO_3) (PanReac AppliChem ITW Reagents, Alemania); sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4), dimetilformamida anhidra (DMF) (Acros Organics, España); 1-bromo-cloropropano 99% y anhídrido succínico (Acros Organics, India); 2-cianoetilhidrazina y pirimidina (Acros Organics, Estados Unidos); Kolliphor® (p188) (BASF, Alemania); ácido fórmico al 37% (Merck Millipore, Estados Unidos); amoniaco 30 % (NH_3) y formaldehído 37% (Scharlau, España); 5-cloro-isatina, 5-bromo-1-metil-isatina 98% (Alfa Aesar, Alemania); 1-bromobutano, fluvastatina sódica, reactivo de Griess (modificado, G4410), láminas de aluminio 60 F254 de gel de sílice y gel de sílice 60 (0,040-0,063 nm) (Merck Millipore, Alemania); Imán de Neodimio (0.32 T) F645-N52-10, Imán de ferrita (0.68 T) F505020F-1 (Magnet Expert®, Reino Unido); quitosano (CS) (bajo peso molecular \approx 50.000 – 190.000 Da, grado de acetilación 75-85%, 99% de pureza) (Merck Millipore, Islandia); sal trisódica de ácido cítrico deshidratada al 99% ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) (Acros Organics, Bélgica); fenilhidrazina (Aldrich Chemistry, China); cloruro de amonio (NH_4Cl), carbonato de potasio (K_2CO_3), ácido clorhídrico 37% (HCl), ácido perclórico 70 % (HClO_4), hidróxido de sodio (NaOH), ácido sulfúrico 96% (H_2SO_4), permanganato de potasio (KMnO_4), nitrito de sodio (NaNO_2), molibdato de cerio (Ce_2MoO_4) y ninhidrina (PanReac AppliChem ITW Reagents, España); 5-fluoroisatina, 4-cloro-isatina, 4-bromo-isatina (Merck Millipore, España).

Se empleó 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT, Merck Millipore), solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS), medio de Eagle modificado con alto contenido de glucosa de Dulbecco (DMEM) con y sin rojo fenol, suero fetal bovino (FBS) (Gibco™, España); solución salina de L-glutamina (200 mM), solución de penicilina-(10.000 U/mL)/estreptomina (10.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)/anfotericina B (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (100X, Merck Millipore, España); LPS (isotipo 0111:B4 de Sigma-Aldrich); frascos de cultivo celular de 75 cm^2 (Grynia-Labbox, España); placas de 96 pocillos

(Sarstedt, Alemania); filtros de jeringa, 0.2 y 0.45 μm (FisherBrand, China) y Jeringas Injekt® de 2, 5 y 10 mL (BBraun, Alemania).

La cromatografía en capa fina (TLC) se realizó en láminas de aluminio de gel de sílice, y los compuestos se visualizaron por irradiación con luz ultravioleta (UV) de 254 nm (Spectroline®, Estados Unidos) en una cabina de análisis de fluorescencia CM-10A (Spectroline®, Estados Unidos) y/o por tratamiento con una solución de Ce_2MoO_4 , KMnO_4 o ninhidrina en n-butanol (3% de acético ácido), seguido de calentamiento. Todos los productos sintéticos se purificaron mediante cromatografía en columna de gel de sílice ultrarrápida utilizando columnas empaquetadas a mano o el instrumento de cromatografía ultrarrápida Isolera™ One (Biotage®, Uppsala, Suecia), utilizando columnas de sílice Sfär Duo de 10 g con un caudal de 40 ml/min. Los disolventes se eliminaron mediante rotavapor® R-100 (Buchi, Suiza) o un liofilizador Telstar LyoQuest 55 (Telstar®, Madrid, España). Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se registraron a temperatura ambiente en un espectrómetro Bruker DPX (^1H , 300 MHz y ^{13}C , 75 MHz) utilizando CDCl_3 , CD_3OD , D_2O o $\text{DMSO-}d_6$ como disolventes deuterados. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón en relación con el tetrametilsilano interno. Los valores de la constante de acoplamiento (J) se expresan en hercios (Hz), y las multiplicidades de espín se indican mediante los siguientes símbolos; s (singlete), d (doblete), t (tripleto), q (cuarteto) y m (multiplete). Los espectros se procesaron utilizando el software MestReNova versión 14.0 (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, España). Los espectros de masas (MS) se registraron en el modelo MALDI-TOF/TOF Bruker Ultraflex o en el espectrómetro de masas Bruker HCT Ultra con trampa de iones ESI. Los análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se realizaron utilizando un cromatógrafo de bomba cuaternaria (Agilent 1260 Infinity, Alemania), equipado con un detector ultravioleta-visible de Agilent y un sistema de inyección automática. La adquisición y el procesamiento de datos se realizaron con el software Agilent LC OpenLab CDS (versión 0.1.06). Se usó una columna Kromaphase C18 de fase inversa (5 μm , 4,6 mm x 150 mm) como fase estacionaria, usando un cartucho de protección C18. La separación de los derivados de isatina se realizó con una fase móvil de una mezcla de agua millQ y acetonitrilo con ácido fórmico (0,1 %) por el método isocrático 50 – 50 a 20 °C. El caudal fue de 0,5 ml/min y el volumen de inyección fue de 20 μl . El perfil de elución se controló registrando la absorbancia UV a 254 nm. El tiempo de retención de cada compuesto (R_t) se da en minutos (min). Todos los compuestos sintetizados fueron probados por este método a $\geq 95\%$ de pureza. Se prepararon

soluciones madre de derivados de isatina para ensayos celulares en DMSO y se diluyeron con DMEM a las concentraciones de trabajo.

5.2. Síntesis de los derivados de isatina

5.2.1. Síntesis de los *N*-derivados

La síntesis de los derivados de isatina *N*-alquilo **10**, **11**, **12**, **17**, **18** y **19** se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Chen *et al.*, con ligeras modificaciones: A una solución de **1** o **3** (1 eq.) en DMF (20 mL) y en atmósfera de argón, se añadieron K₂CO₃ (3 eq.) y el haloalcano correspondiente (1.2 eq.).³⁰³ La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente hasta la completa desaparición de **1** o **3** (12 horas), observado por TLC empleando UV y Ce₂MoO₄. A la mezcla de reacción se añade posteriormente una solución de NH₄Cl aq 1M (10 ml) al residuo para neutralizar el medio y facilitar su extracción con el disolvente orgánico acetato de etilo (10 ml x 3). Las fracciones orgánicas se combinaron, se secaron con Na₂SO₄ para eliminar cualquier resto de agua del medio, se filtraron para retirar las sales y se concentraron eliminando el disolvente a vacío. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice, hexano/acetato de etilo = 1:1 a 100 % de EtOAc).

5.2.2. Síntesis de 1-(Hidroximetil)-Isatinas

La síntesis de 1-(hidroximetil)-isatinas **13** y **20** se realizó de acuerdo con el protocolo descrito por Aboul-Fadl *et al.*: A una mezcla de **1** o **3** (1 mmol) y formaldehído (37 wt. % en H₂O, 3 mL) en agua (H₂O MilliQ, 10 mL) se agitó a reflujo (100 °C) durante 2 horas, hasta que se evidenció la desaparición de **1** o **3** por cromatografía TLC empleando UV, Ce₂MoO₄ y ninhidrina.³⁰⁴ La solución resultante se filtró mientras estaba caliente y el filtrado se mantuvo a 4°C durante la noche. El producto cristalino formado se filtró, secó y recristalizó en acetato de etilo.

³⁰³ Chen, G.; Wang, Y.; Hao, X.; Mu, S.; Sun, Q. Simple isatin derivatives as free radical scavengers: Synthesis, biological evaluation and structure-activity relationship. *Chem. Cent. J.* **2011**, *5*, 37.

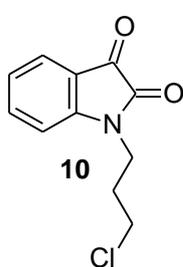
³⁰⁴ Aboul-Fadl, T.; Mohammed, F.A.; Hassan, E.A. Synthesis, antitubercular activity and pharmacokinetic studies of some Schiff bases derived from 1-alkylisatin and isonicotinic acid hydrazide (INH). *Arch. Pharm. Res.* **2003**, *26*, 778-784.

5.2.3. Síntesis de Isatina-Hidrazonas

En el caso de la síntesis de las isatina-hidrazonas **15**, **16**, **22** y **23** se realizó siguiendo el protocolo descrito por Bekircan *et al.*³⁰⁵, modificando los reactivos de partida: A una mezcla de **1** o **3** (1 eq.) con la correspondiente hidracina (1.2 eq.) y ácido acético (200 μ L) en etanol (20 mL) se calentó a reflujo (80 $^{\circ}$ C) durante 3.5 horas hasta que se observó la desaparición de **1** o **3** por TLC empleando UV y ninhidrina.²²⁴ El disolvente se eliminó al vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (hexano/acetona = 3:1 a 0:1).

5.2.4. Derivados de isatina sintetizados

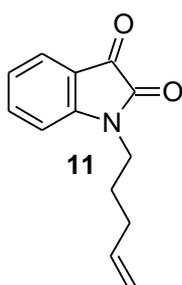
1-(3-cloropropil)-1H-indol-2,3-diona (**10**).



El compuesto **10** se preparó tal y como se describe en 5.2.1 usando **1** (441 mg, 3 mmol) y 1-bromo-3-cloropropano (360 μ L, 3.6 mmol) como haloalcano para obtener el producto deseado (600 mg, 89 % de rendimiento) como un cristal naranja. HPLC Rt: 10.60 min. El espectro de $^1\text{H-NMR}$ está en concordancia con lo reportado en la bibliografía.³⁰⁶

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.64-7.59 (m, 2H), 7.13-7.08 (m, 1H), 6.89 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 3.91 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 3.63 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 2.25-2.16 (m, 2H). MS (ESI+): m/z calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{ClNO}_2$: 223.0; encontrado: 245.6 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

1-(pent-4-en-1-il)-1H-indol-2,3-diona (**11**).



El compuesto **11** se preparó tal y como se describe en 5.2.1 usando **1** (147 mg, 1 mmol) y 5-bromo-1-penteno (141.9 μ L, 1.2 mmol) como haloalcano para obtener el producto deseado (225 mg, 95 % de rendimiento) como un cristal naranja oscuro. HPLC Rt: 15.55 min. El espectro de $^1\text{H-NMR}$ está en concordancia con lo reportado en la bibliografía.³⁰⁷

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.60-7.55 (m, 2H), 7.10 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.88 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 5.87-5.74 (m, 1H), 5.10-4.99 (m, 2H), 3.72 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.19-2.12

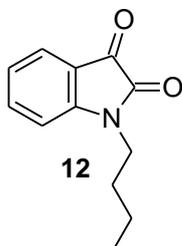
³⁰⁵ Bekircan, O.; Bektas, H. Synthesis of Schiff and Mannich Bases of Isatin Derivatives with 4-Amino-4,5-Dihydro-1H-1,2,4-Triazole-5-Ones. *Molecules*. **2008**, *13* (9), 2126-2135.

³⁰⁶ Shibinskaya, M. O.; Kutuzova, N. A.; Mazepa, A. V.; Lyakhov, S. A.; Andronati, S. A.; Zubritsky, M. J.; Galat, V. F.; Lipkowski, J.; Kravtsov, V. C. Synthesis of 6-aminopropyl-6H-indolo[2,3-b]quinoxaline derivatives. *J. Heterocyclic Chem.* **2012**, *49*, 678-682.

³⁰⁷ Matcha, K.; Antonchick, A. P. Cascade multicomponent synthesis of indoles, pyrazoles, and pyridazinones by functionalization of alkenes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53* (44), 11960-11964.

(m, 2H), 1.85-1.75 (m, 2H). MS (ESI+); m/z calculado para $C_{13}H_{13}NO_2$: 215.1; encontrado: 237.6 $[M+Na]^+$.

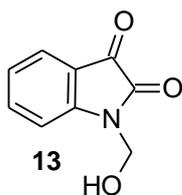
1-butil-1H-indol-2,3-diona (12).



El compuesto **12** se preparó tal y como se describe en 5.2.1 usando isatina (1 g, 6,8 mmol) y 1-bromobutano (876 μ L, 8.16 mmol) para obtener el producto deseado (1.33 g, 96 %) como un cristal naranja. HPLC Rt: 14.26 min. El espectro de 1H -NMR está en concordancia con lo reportado en la bibliografía.³⁰⁸

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.61-7.55 (m, 2H), 7.13-7.08 (m, 1H), 6.91-6.88 (m, 1H), 3.72 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.71-1.63 (m, 2H), 1.45-1.37 (m, 2H), 0.97 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H). MS (ESI+); m/z calculado para $C_{12}H_{13}NO_2$: 203.1; encontrado: 225.6 $[M+Na]^+$.

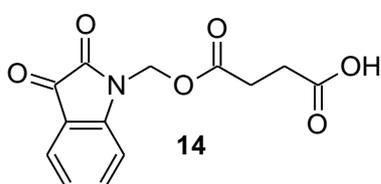
1-(hidroximetil)-1H-indol-2,3-diona (13).



El compuesto **13** se preparó tal y como se describe en 5.2.2 usando **1** (1,47 g, 1,0 mmol) para obtener el producto (1,47 g, 83 % de rendimiento) como un cristal naranja. HPLC Rt: 4.55 min. El espectro de 1H -NMR está en concordancia con lo reportado en la bibliografía.³⁰⁴

1H -NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$) δ 7.70 (ddd, $J = 8.0, 7.5, 1.4$ Hz, 1H), 7.58 (ddd, $J = 7.5, 1.4, 0.6$ Hz, 1H), 7.25 (dt, $J = 8.0, 0.7$ Hz, 1H), 7.17 (td, $J = 7.5, 0.9$ Hz, 1H), 6.41 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H), 5.09 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, $DMSO-d_6$) δ 183.5 (C), 157.6 (C), 150.3 (C), 138.3 (CH), 124.5 (CH), 123.5 (CH), 117.3 (C), 111.7 (CH), 62.9 (CH_2). MS (ESI+); m/z calculado para $C_9H_7NO_3$: 177.0; encontrado: 199.5 $[M+Na]^+$.

Ácido 4-[(2,3-dioxo-2,3-dihidro-1H-indol-1-il)metoxi]-4-oxobutanoico (14).



El compuesto **14** se preparó disolviendo **13** (1.23 mmol, 218 mg) en pirimidina (5 mL). La mezcla se enfrió a 0°C y se le añadió el anhídrido succínico (3.07 mmol, 307 mg). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente por 24 horas. La desaparición de

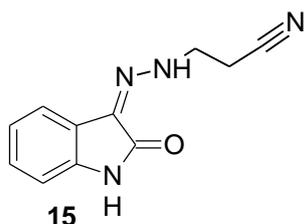
13 quedó evidenciada por TLC empleando UV y $KMnO_4$. La reacción se inactivó añadiendo 5 ml de agua millQ y se extrajo con acetato de etilo (3 x 10 ml), la fase

³⁰⁸ Villangovan, A.; Satish, G. Direct amidation of 2'-aminoacetophenones using I2-TBHP: a unimolecular domino approach toward isatin and iodoisatin. *J. Org. Chem.* **2014**, *79* (11), 4984-4991.

orgánica se lavó con una solución saturada de NaHCO_3 acuoso. Después de secar con MgSO_4 , el disolvente se eliminó al vacío y el residuo se purificó por cromatografía en columna Sfär Duo para eliminar los residuos de piridina (gel de sílice, hexano/acetona = 1:1 a 100 % de acetona) para obtener el compuesto **14** como un sólido naranja (197 mg, 57 % de rendimiento). HPLC Rt: 4.77 min.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7.72–7.68 (m, 1H), 7.63–7.60 (m, 1H), 7.28 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.21 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 5.72 (s, 2H), 2.57–2.41 (m, 4H, se solapa con la señal de DMSO). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 182.0 (C), 173.3 (C), 171.7(C) , 158.0 (C), 149.2 (C), 138.3 (CH), 124.6 (CH), 124,0 (CH), 117.7 (C), 111.5 (CH), 63.3 (CH_2), 28.9 (CH_2), 28.6 (CH_2). MS (ESI+): m/z calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}_6$: 277.05; encontrado: 299.7 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

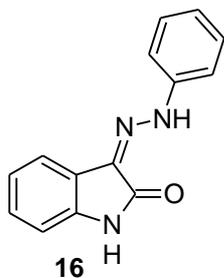
3-[(2Z)-2-(2-oxo-1,2-dihidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil]propanonitrilo (15).



El compuesto **15** se preparó tal y como se describe en 5.2.3 usando **1** (500 mg, 3,39 mmol) y 2-cianoetilhidrazina (305 μL , 3,73 mmol) para obtener el producto deseado (623 mg, 85 % de rendimiento) como un cristal amarillo. HPLC Rt: 6.46 min.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.00 (t, $J = 4.5$ Hz, 1H), 10.77 (s, 1H), 7.36 (dd, $J = 7.5, 1.2$ Hz, 1H), 7.16 (td, $J = 7.7, 1.2$ Hz, 1H), 6.98 (td, $J = 7.5, 0.8$ Hz, 1H), 6.87 (dt, $J = 7.8, 0.8$ Hz, 1H), 3.81–3.75 (m, 2H), 2.88 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 162.8 (C), 138.8 (C), 127.31 (CH), 125.7(C), 121.8 (C), 121.5 (CH), 119.1(C), 117.7 (CH), 110.1 (CH), 46.8 (CH_2), 18.1 (CH_2). MS (MALDI-TOF +): calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}$: 214.09; encontrado: 215,11 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3Z)-3-(2-fenilhidrazinilideno)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona (16).

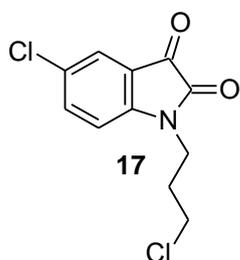


El compuesto **16** se preparó tal y como se describe en 5.2.3 usando **1** (205 mg, 1,3 mmol) y fenilhidrazina (151 μL , 1,4 mmol) para obtener el producto deseado (244 mg, 74 % de rendimiento) como un polvo amarillo. HPLC Rt: 7.36 min. El espectro de $^1\text{H-NMR}$ está en concordancia con lo reportado en la bibliografía.²²⁶

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 12.75 (s, 1H), 11.02 (s, 1H),

7.57-7.54 (m, 1H), 7.45-7.34 (m, 4H), 7.25 (td, $J = 7.7, 1.3$ Hz, 1H), 7.08-7.02 (m, 2H), 6.92 (dt, $J = 7.8, 0.9$ Hz, 1H). MS (ESI+): m/z calculado para $C_{14}H_{11}N_3O$: 237.09; encontrado: 259.7 $[M+Na]^+$.

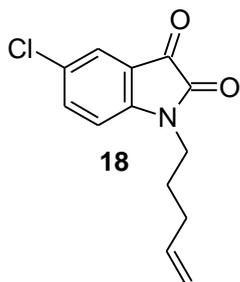
5-cloro-1-(3-cloropropil)-1H-indol-2,3-diona (17).



El compuesto **17** se preparó tal y como se describe en 5.2.1, usando **3** (200 mg, 1,1 mmol) y 1-bromo-3-cloropropano como haloalcano (130 μ L, 1,32 mmol) para obtener el producto deseado (208 mg, 73 % de rendimiento) como un cristal naranja oscuro. HPLC Rt: 18.25 min.

1 H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.58-7.55 (m, 2H), 7.00-6.96 (m, 1H), 3.89 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 3.61 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 2.22-2.13 (m, 2H). 13 C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 182.3 (C), 157.9 (C), 149.1 (C), 138.0 (CH), 129.8 (C), 125.6 (CH), 118.5 (C), 111.5 (CH), 42.0 (CH_2), 38.0 (CH_2), 30.2 (CH_2). MS (ESI+): m/z calculado para $C_{11}H_9Cl_2NO_2$: 257.0; encontrado: 279.6 $[M+Na]^+$.

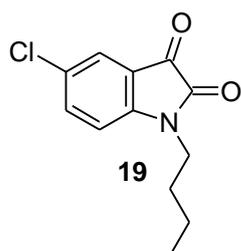
5-cloro-1-(pent-4-en-1-il)-1H-indol-2,3-diona (18).



El compuesto **18** se preparó tal y como se describe en 5.2.1, usando **3** (300 mg, 1,65 mmol) y 5-bromo-1-penteno como haloalcano (234 μ L, 1,98 mmol) para obtener el producto deseado (344 mg, 84 % de rendimiento) como un cristal naranja oscuro. HPLC Rt: 28.02 min.

1 H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.55-7.52 (m, 2H), 6.87-6.84 (m, 1H), 5.85-5.72 (m, 1H), 5.09-4.99 (m, 2H), 3.71 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.18-2.09 (m, 2H), 1.83-1,73 (m, 2H). 13 C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 182.6 (C), 157.7 (C), 149.3 (C), 137.8 (CH), 136.8 (CH), 129.6 (C), 125.4 (CH), 118.5 (C), 116.1 (CH_2), 111.5 (CH), 39.9 (CH_2), 30.9 (CH_2), 26.2 (CH_2). MS (ESI+): m/z calculado para $C_{13}H_{12}ClNO_2$: 249.1; encontrado: 271.6 $[M+Na]^+$.

1-butil-5-cloro-1H-indol-2,3-diona (19).

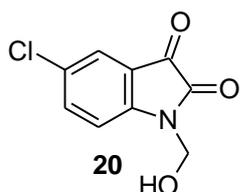


El compuesto **19** se preparó tal y como se describe en 5.2.1, usando **3** (200 mg, 1,1 mmol) y 1-bromobutano como haloalcano (142 μ L, 1,32 mmol) para obtener el producto deseado (251 mg, 96 % de rendimiento) como un cristal naranja. HPLC Rt: 25.90

min. El espectro de $^1\text{H-NMR}$ está en concordancia con lo reportado en la bibliografía.³⁰⁹

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.56-7.52 (m, 2H), 6.88-6.83 (m, 1H), 3.71 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.72-1.62 (m, 2H), 1.46-1.34 (m, 2H), 0.96 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H). MS (ESI+): m/z calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{ClNO}_2$: 237.1; encontrado: 259.6 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

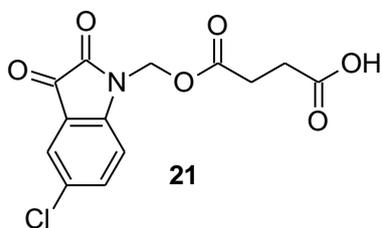
5-cloro-1-(hidroximetil)-1H-indol-2,3-diona (**20**).



El compuesto **20** se preparó tal y como se describe en 5.2.2 usando **3** (190 mg, 1,0 mmol) para obtener el producto deseado (190 mg, 86 % de rendimiento) como un cristal naranja. HPLC Rt: 5.64 min.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7.75 (dd, $J = 8.5, 2.3$ Hz, 1H), 7.63 (dd, $J = 2.3, 0.5$ Hz, 1H), 7.28 (dd, $J = 8.4, 0.5$ Hz, 1H), 6.45 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H), 5.08 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 182.4 (C), 157.4 (C), 148.8 (C), 137.2 (CH), 127.8 (C), 124.0 (CH), 118.7 (C), 113.5 (CH), 63.1 (CH_2). MS (ESI+): m/z calculado para $\text{C}_9\text{H}_6\text{ClNO}_3$: 211.0; encontrado: 233.5 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Ácido 4-[(5-cloro-2,3-dioxo-2,3-dihidro-1H-indol-1-il)metoxi]-4-oxobutanoico (**21**).

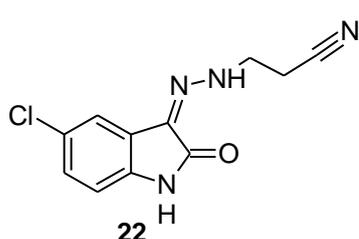


El compuesto **21** se preparó disolviendo **20** (0.84 mmol, 179 mg) en pirimidina (5 mL). La mezcla se enfrió a 0°C y se le añadió el anhídrido succínico (2.12 mmol, 212 mg). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente por 24 horas. La desaparición de **20** quedó evidenciada por TLC empleando UV y KMnO_4 . La reacción se inactivó añadiendo 5 ml de agua millQ y se extrajo con acetato de etilo (3 x 10 ml), la fase orgánica se lavó con una solución saturada de NaHCO_3 acuoso. Después de secar con MgSO_4 , el disolvente se eliminó al vacío y el residuo se purificó por cromatografía en columna Sfär Duo para eliminar los residuos de piridina (gel de sílice, hexano/acetona = 1:1 a 100 % de acetona) para obtener el compuesto **21** como un sólido naranja (237 mg, 91% de rendimiento). HPLC Rt: 6.45 min.

³⁰⁹ Damgaard, M.; Al-Khawaja, A.; Vogensen, S. B.; Jurik, A.; Sijm, M.; Lie, M. E. K.; Bæk, M. I.; Rosenthal, E.; Jensen, A. A.; Ecker, G. F.; Frølund, B.; Wellendorph, P.; Clausen, R. P. Identification of the first highly subtype-selective inhibitor of human GABA transporter GAT3. *ACS Chem. Neurosci.* **2015**, 6 (9), 1591-1599.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7.77 (dd, $J = 8.5, 2.3$ Hz, 1H), 7.68 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 7.33 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 5.72 (s, 2H), 2.58-2.45 (m, 4H, se solapa con la señal de DMSO). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 181.1 (C), 173.5 (C), 171.8 (C), 157.8 (C), 147.8 (C), 137.2 (CH), 128.4 (C), 124.1 (CH), 119.2 (C), 113.5 (CH), 63.2 (CH_2), 28.7 (CH_2), 28.6 (CH_2). MS (ESI+): m/z calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{ClNO}_6$: 311.01; encontrado: 333.7 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 644.7 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

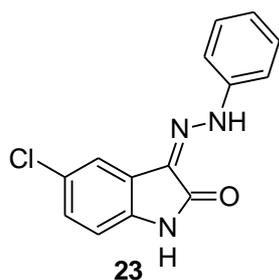
3-[(2Z)-2-(5-cloro-2-oxo-1,2-dihidro-3H-indol-3-ilideno)propanonitrilo (22) hidrazinil]



El compuesto **22** se preparó tal y como se describe en 5.2.3, usando **3** (200 mg, 1,1 mmol) y 2-cianoetilhidrazina (130 μL , 1,6 mmol) para obtener el producto deseado (138 mg, 51 % de rendimiento) como un polvo amarillo. HPLC Rt: 9.79 min.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.10 (t, $J = 4.5$ Hz, 1H), 10.89 (s, 1H), 7.31 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.18 (dd, $J = 8.3, 2.2$ Hz, 1H), 6.87 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 3.81-3.76 (m, 2H), 2.91 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 162.6 (C), 137.3 (C), 126.6 (CH), 125.7 (C), 124.4 (C), 123.56 (C), 119.1 (C), 117.1 (CH), 111.5 (CH), 47.0 (CH_2), 18.0 (CH_2). MS (ESI+): m/z calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{ClN}_4\text{O}$: 248.04; encontrado: 270.6 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

(3Z)-5-cloro-3-(2-fenilhidrazinilideno)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona (23).



El compuesto **23** se preparó como se describe en 5.2.3, usando **3** (200 mg, 1,1 mmol) y fenilhidrazina (108,5 μL , 1,1 mmol) para dar el producto deseado (235 mg, 78 % de rendimiento) como un polvo amarillo. HPLC Rt: 19.11 min. El espectro de $^1\text{H-NMR}$ está en concordancia con lo reportado en la bibliografía.³¹⁰

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 12.75 (s, 1H), 11.13 (s, 1H), 7.57 (dd, $J = 2.2, 0.5$ Hz, 1H), 7.50-7.47 (m, 2H), 7.41-7.35 (m, 2H), 7.26 (dd, $J = 8.3, 2.2$ Hz, 1H), 7.10-7.05 (m, 1H), 6.93 (dd, $J = 8.3, 0.5$ Hz, 1H). MS (ESI+): m/z calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{ClN}_3\text{O}$: 271.05; encontrado: 293.7 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

³¹⁰ Devkota, S.; Mohandoss, S.; Lee, Y. R. Indium(iii)-catalyzed efficient synthesis of 3-arylhydrazonoindolin-2-ones and their fluorescent metal sensing studies. *New J. Chem.* **2022**, 46 (8), 3640-3644.

5.3. Cultivos celulares

Todas las líneas celulares con las que ha trabajado células se incubaron en un incubador Series II *Water Jacketed* (Thermo Scientific, Estados Unidos) bajo las mismas condiciones: a 37 °C de temperatura, 5% de CO₂ y 95% aire. El conteo celular se realizó añadiendo una suspensión de 10 µL de células a un portaobjetos dual de recuento de células para un contador celular automático TC20™ (Bio-Rad, Estados Unidos).

La línea celular de microglia de ratón BV2 se obtuvo de la colección de líneas celulares de Interlab (Interlab Cell Line Collection) (ICLC), número ATL 03001 (Génova, Italia). Para el mantenimiento de las BV2, estas se cultivaron en matraces de 75 cm² con medio DMEM con rojo fenol y alto contenido en glucosa (suplementado con 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina, 0,25 µg/mL de anfotericina B y L-glutamina 2 mM) junto con FBS al 10 % previamente inactivado por calor (30 min, 56 °C).

Las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y se obtuvieron de la colección alemana de microorganismos y cultivos celulares (DSMZ-German Collection of Microorganisms and cell culture GmbH), número ACC 209 (Braunschweig, Alemania) y se cultivaron en placas p100 con medio DMEM con rojo fenol y alto contenido en glucosa suplementado de la misma forma que lo indicado para las BV2, siendo la única excepción que el FBS al 10 % añadido sobre estas células no está inactivado por calor.

Después de alcanzar la confluencia, las ambas líneas celulares se levantaron (tres veces por semana) usando tripsina al 0,025 % y EDTA al 0,01 % en DPBS. El uso de las células se limitó hasta el pase nº 20 para ensayos de viabilidad y hasta el nº 12 para los ensayos inflamatorios.

5.3.1. Ensayos de viabilidad celular *in vitro*

Se evaluó la viabilidad celular utilizando el ensayo MTT para determinar la actividad deshidrogenasa mitocondrial.²¹⁹ Las células BV2 se sembraron en una placa de 96 pocillos a una densidad celular de 7.5×10^3 células/pocillo en DMEM suplementado con FBS al 10 % durante 24 h. En el caso de las células SH-SY5Y se sembraron 6×10^4 células/pocillo (Figura 34, día 1). Pasado ese tiempo, el medio se eliminó y las células se cultivaron junto a los derivados de isatina (desde 1 µM a 500 µM, stock 100mM) o núcleos de Fe₃O₄-cit o NPs de (Fe₃O₄-cit)/CS (desde 10 a 200

$\mu\text{g/mL}$, stock 10 mg/mL) en DMEM suplementado pero sin rojo fenol ni FBS durante 24 h a 37 °C (Figura 34, día 2). Tras la incubación, se retiró el sobrenadante y las células se trataron con MTT (0.5 mg/mL disuelto en DPBS:DMEM 1:10, 100 μL por pocillo) y se incubaron durante 3 h. El exceso de MTT se eliminó y se añadió DMSO (100 μL) para disolver los cristales de formazan obtenidos por acción del metabolismo de las células viables (Figura 34, día 3).

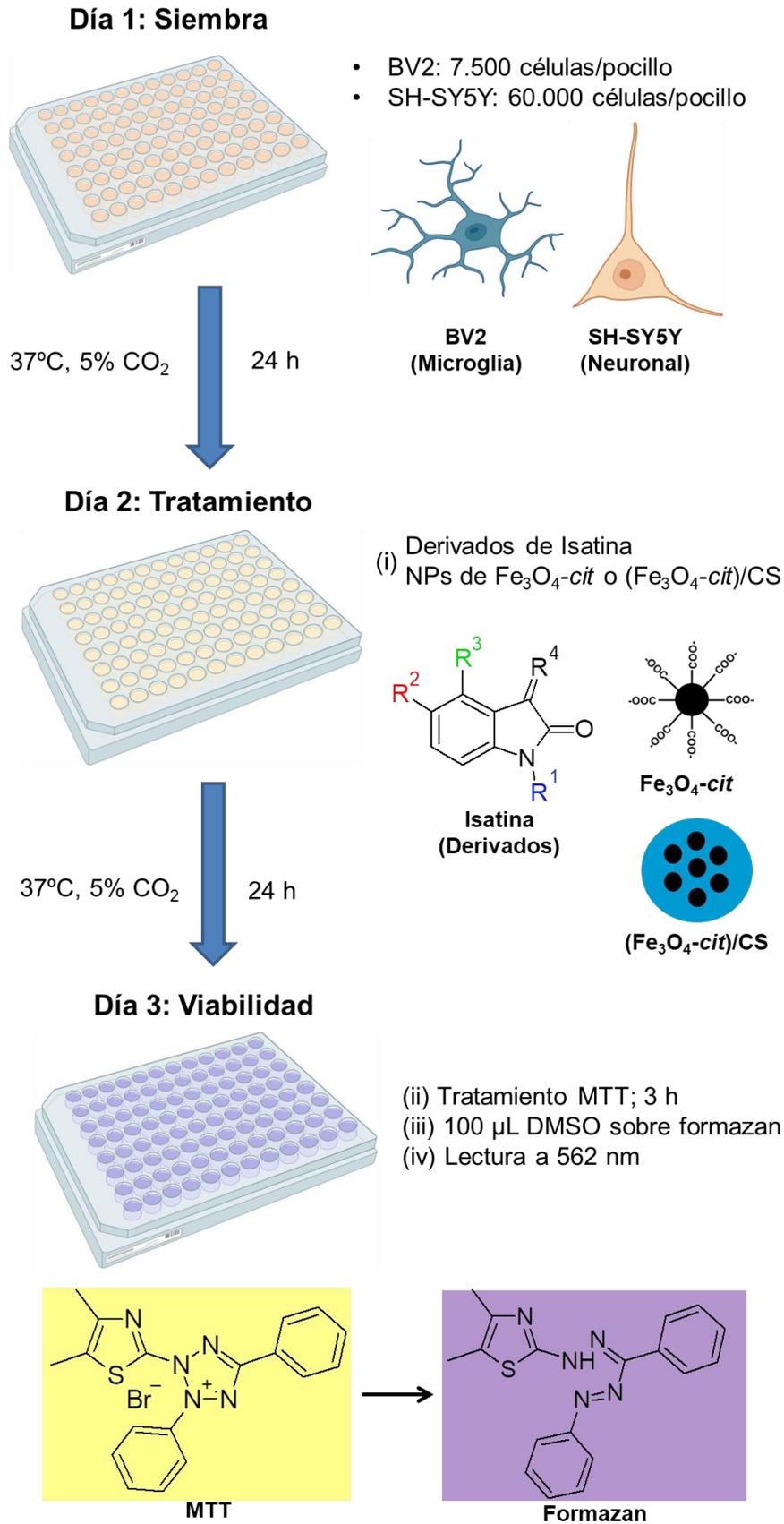


Figura 34. Esquema del ensayos de viabilidad celular por MTT.

En el caso de los ensayos con NPs, tras añadir DMSO y resuspender, se centrifugó la placa a 3100 g durante 10 minutos usando una centrífuga 5804 R (rotor A-4-81) (Eppendorf Ibérica S.L.U., España) para separar las NPs de la disolución. El proceso se repitió dos veces. Finalmente, el sobrenadante se trasvasó a una nueva placa de 96 pocillos y se determinó la absorbancia a 562 nm (Abs) empleando en un lector de placas ELISA Sunrise™ (TECAN, Austria).

La viabilidad de las células tratadas con DMEM se consideró como el 100% (células control). Los porcentajes de viabilidad e inhibición se calcularon siguiendo las siguientes fórmulas (ecuación 1 y 2):

$$\text{(Ecuación 1)} \quad \% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{Abs células tratadas}}{\text{Abs células control}} \times 100$$

$$\text{(Ecuación 2)} \quad \% \text{ Inhibición} = 100 - \% \text{ viabilidad}$$

La IC₅₀ para todos los compuestos se obtuvo ajustando el % de inhibición (y) frente al logaritmo de la concentración del compuesto (x) a una curva dosis-respuesta de tipo sigmoideal (ecuación 3) usando el software GraphPad Prism, versión 9.0 (GraphPad Software, Inc.):

$$\text{(Ecuación 3)} \quad y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + 10^{(\text{LOG}x_0 - x)p}}$$

Donde A₁ es el dato y mínimo, A₂ el dato y máximo, el dato x es el logaritmo de la dosis, y Logx₀ es el centro de la curva, es decir, la concentración para la mitad de la respuesta, y p es la pendiente de la curva.

5.3.2. Inducción de inflamación en BV2

Las células BV2 se sembraron en una placa de 96 pocillos a una densidad celular de 15 x 10³ células/pocillo en DMEM suplementado con FBS al 10 % durante 24 h (Figura 35, día 1). Pasado este tiempo, se eliminó el medio y las células se cultivaron en DMEM suplementado sin rojo fenol ni FBS, pretratándose con derivados de isatina (2x, 75 µL) durante 1 hora. Luego, se añadió LPS (isotipo 0111:B4) (2X, 75 µL) sobre las células se incubaron durante 24 horas (Figura 35, día 2). Las concentraciones finales de los compuestos fueron 5, 25 o 50 µM (la concentración máxima de DMSO fue 0,05 %), y la concentración para la estimulación con LPS fue 1 µg/ml.



Figura 35. Ensayo de inflamación en células de microglía BV2.

Después de la incubación, se tomó una alícuota de sobrenadantes (75 μ L) para la determinación de NO, y otra alícuota de sobrenadantes (75 μ L) se mantuvo a -80 $^{\circ}$ C hasta la realización de los ensayos ELISA automatizados (ELLA). Las células se incubaron con MTT al finalizar el ensayo para determinar su viabilidad después de los tratamientos (Figura 35, día 3).

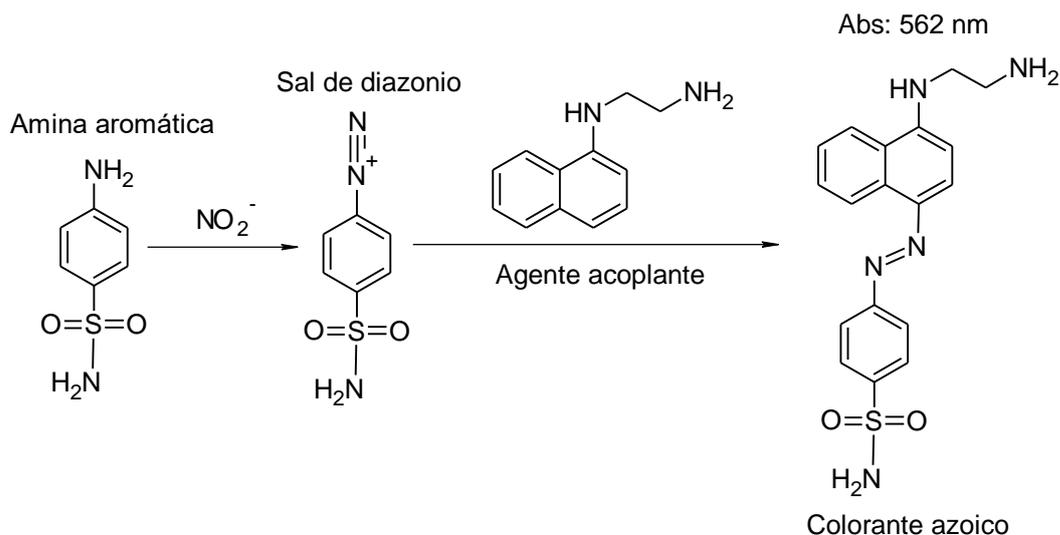
5.3.3. Determinación de la producción de óxido nítrico

La liberación de NO al medio de cultivo por parte de BV2 se determinó de forma indirecta midiendo el nitrito, que se forma en el medio celular por la oxidación de NO, y para ello se utilizó el reactivo de Griess modificado (diclorhidrato de naftilendiamina y sulfanilamida en ácido fosfórico) como está descrito en la bibliografía.^{311,312} De forma breve, el nitrito reacciona con la solución ácida de sulfanilamida para formar una sal de diazonio, que se acopla con naftiletilendiamina para formar un colorante diazo (rosa/púrpura) cuya absorbancia se puede medir a 562 nm (Esquema 8).

Para determinar la concentración de nitrito en el medio de cultivo celular, se preparó una solución madre de reactivo de Griess en agua millQ (40 mg/mL) y se mezcló con medios de cultivo celular (1:1) en una placa de 96 pocillos (150 μ L/pocillo). Se incubó en la oscuridad durante 15 min y se midió la absorbancia a 562 nm en el lector de placas ELISA SunriseTM (TECAN, Austria).

³¹¹ Dirsch, V. M.; Stuppner, H.; Vollmar, A. M. The Griess assay: suitable for a bio-guided fractionation of anti-inflammatory plant extracts? *Planta Med.* **1998**, *64* (05), 423-426.

³¹² Bratton, A. C.; Marshall, E. K.; Hendrickson, A. R. A new coupling component for sulfanilamide determination. *J. Biol. Chem.* **1939**, *128*, 537-550.



Esquema 8. Reacción de nitrito con los reactivos del ensayo de Griess modificado. El nitrito (NO_2^-) presente en el sobrenadante celular tras los ensayos de inflamación reacciona en medio ácido, con sulfanilamida para dar una sal de diazonio, que en presencia de naftilendiamina da lugar a un colorante azoico de color morado. Figura adaptada de Váradi *et al.*³¹³

Para obtener una recta patrón de nitrito se empleó NaNO_2 a diferentes concentraciones, en un rango de 50 a $0,78 \mu\text{M}$. La concentración de nitrito en los medios de cultivo celulares se determinó comparando sus valores de absorbancia con los de la recta patrón generada. Los resultados son la media de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

5.3.4. Determinación de los niveles de IL-6 y TNF- α

Los sobrenadantes de los ensayos de inflamación conservados a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ se analizaron mediante un ensayo de ELISA microfluídico ELLA-*Protein Simple* (Bio-Techne, Estados Unidos). Se midieron las concentraciones de las citoquinas IL-6 y TNF- α liberadas por las células BV2 tanto en presencia como ausencia de LPS (Figura 36). Las muestras de sobrenadante se diluyeron de acuerdo con las instrucciones del fabricante para la determinación de IL-6 y TNF- α . Los límites superior e inferior de cuantificación (ULOQ y LLOQ, respectivamente) se calcularon de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

³¹³ Váradi, L.; Breedon, M.; Chen, F. F.; Trinchi, A.; Cole, I. S.; Wei, G. Evaluation of novel Griess-reagent candidates for nitrite sensing in aqueous media identified via molecular fingerprint searching. *RSC Adv.* **2019**, 9 (7), 3994-4000.

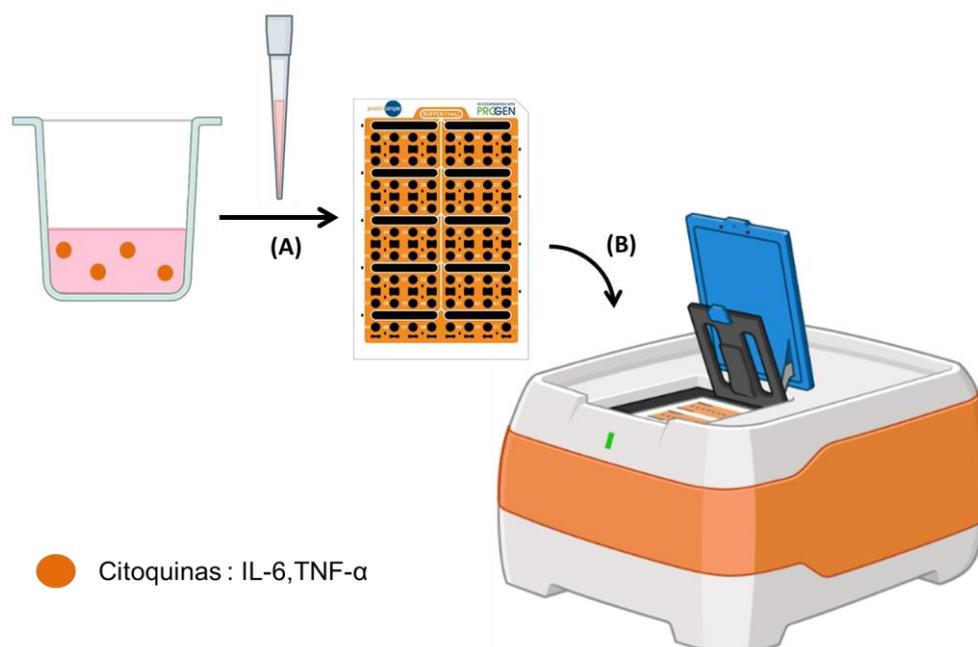


Figura 36. Ensayo ELISA microfluídico (ELLA). Los sobrenadantes se pipetearon en el cartucho (A) y se añadió un tampón de lavado. El cartucho cargado se midió en el equipo ELLA (B).

Los límites de detección para la cuantificación de IL-6 y TNF- α se calcularon a partir del límite establecido por el equipo ELLA, multiplicado por 2 y 100 respectivamente, teniendo en cuenta la dilución de la muestra. Para IL-6, el ULOQ fue de 11.540 pg/ml y el LLOQ fue de 1,2 pg/ml. Para TNF- α , el ULOQ fue de 29.300 pg/mL y el LLOQ fue de 31 pg/mL. Los resultados son la media de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

5.4. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como media \pm error estándar de la media (SEM) de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado. Se utilizó el software OriginPro® 2021 (OriginLab) para representar los resultados del FTIR y del ciclo de histéresis. Por otro lado, se usó el software GraphPad Prism, versión 9.0 (GraphPad Software, Inc.) para el análisis estadístico y para crear los gráficos. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis.^{314,315} Para comparar las concentraciones de IL-6 y TNF- α con el grupo LPS, se utilizó la prueba de relación de dos grupos de Mann-Whitney. Las diferencias

³¹⁴ Moore, D.S.; McCabe, G.P. Introduction to the Practice of Statistics. **1989**, New York: W.H. Freeman & Co.

³¹⁵ Royston, P. Remark AS R94: A Remark on Algorithm AS 181: The W-test for Normality. *J. R. Stat. Soc. Ser C: Appl. Stat.* **1995**, *44*, 547-551.

entre los conjuntos de datos se aceptaron como significativas cuando el valor de $p < 0,05$ y las diferencias significativas se representan de la siguiente manera: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

5.5. Caracterización fisicoquímica de los derivados de isatina *in silico*.

Las propiedades fisicoquímicas y la similitud con los fármacos de los derivados de isatina fueron calculados empleando los programas:

SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php#top>)

Molsoft LLC (<https://www.molsoft.com/mprop/>)

ADMETlab 2.0 (<https://admetmesh.scbdd.com/service/evaluation/index>)

5.6. Formulación y caracterización de nanopartículas

5.6.1. Síntesis de núcleos de magnetita y tratamiento con citrato sódico ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$)

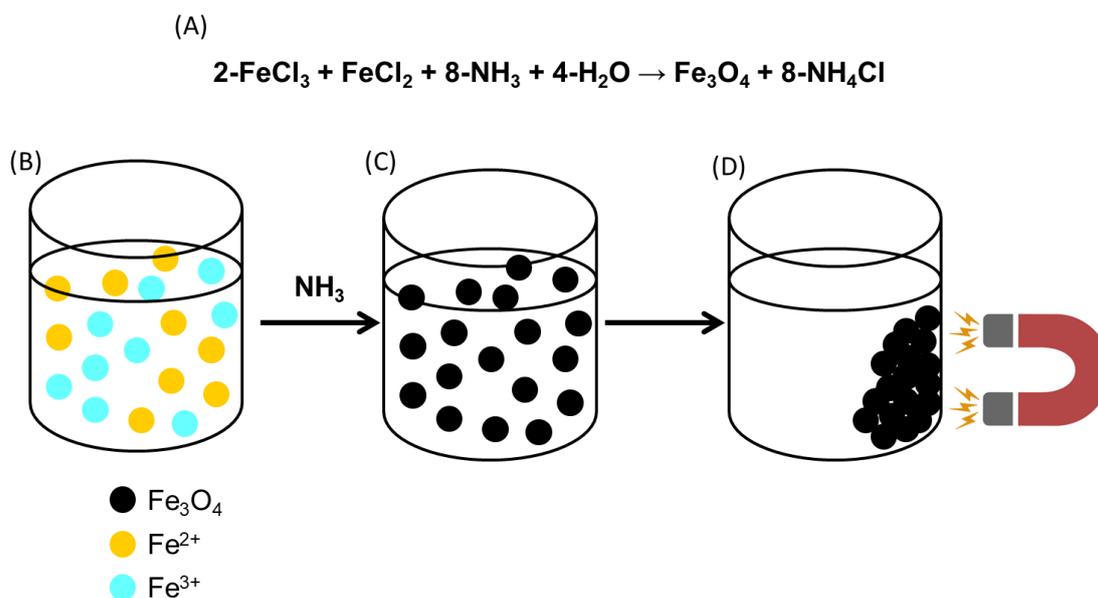
Se realizó siguiendo una de las metodologías más utilizadas para la obtención de coloides superparamagnéticos de aplicación en Biomedicina, la coprecipitación química de Fe^{2+} y Fe^{3+} mediante la adición de una base (Esquema 9A).^{316,317} El proceso inicia con la adición simultánea, gota a gota, de 40 mL de una solución de FeCl_3 1 M y 10 mL de una solución de FeCl_2 2 M (en HCl 2 M), a 0,5 L de una solución de NH_3 0,7 M, a temperatura ambiente y bajo agitación mecánica constante (630 rpm) usando un agitador digital (IKA® Eurostar 60, Alemania) (Esquema 9B). La reacción se mantuvo en estas condiciones durante 30 minutos. La estabilización de estas NPs de Fe_3O_4 obtenidas (Esquema 9C) se completó tras el aislamiento del medio NH_3 por medio de un imán permanente de ferrita (0.68 T) y la redispersión de los núcleos en 0,5 L de una solución de HClO_4 2 M (Esquema 9D).²¹²

³¹⁶ Massart, R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE. Trans Magn.* **1981**, 17 (2), 1247-1248.

³¹⁷ Laurent, S.; Forge, D.; Port, M.; Roch, A.; Robic, C.; Vander Elst, L.; Muller, R. N., Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem. Rev.* **2008**, 108 (6), 2064-2110.

Después de 12 horas de contacto, los núcleos magnéticos se limpiaron mediante varias rondas de centrifugación a 13885 g usando una centrífuga 5804 R (rotor F-34-6-38) (Eppendorf Ibérica S.L.U., España) durante 40 min lavando con agua millQ hasta que la conductividad del sobrenadante fue $\leq 10 \mu\text{S/cm}$.

Los núcleos de Fe_3O_4 obtenidos mediante dicha metodología fueron lavados con $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (*cit*). Los núcleos de Fe_3O_4 se redispersaron en una solución de 100 mL de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ a 0.1 N, se sonicaron durante 40 min en un sonicador Branson® 2510 (frecuencia de sonicación 40 kHz) (Marshall Scientific, Estados Unidos).



Esquema 9. Reacción de formación de magnetita (Fe_3O_4) mediante coprecipitación química. Reacción de formación de núcleos de Fe_3O_4 (A). Formación de coloides a partir de iones Fe^{3+} y Fe^{2+} en solución básica (B, C). Los coloides se aíslan del medio mediante un imán (D). Figura adaptada de Wulandari *et al.*³¹⁸

El volumen de citrato depende de la cantidad de núcleos resultante de la síntesis. Lo importante es la concentración final de los núcleos funcionalizados, que fue de 10 mg/mL. Al igual que con los núcleos magnéticos, la dispersión de núcleos funcionalizados con citrato ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$) se limpió mediante centrifugación a 13885 g usando una centrífuga 5804 R durante 40 min lavando con agua millQ hasta que la conductividad del sobrenadante fue $\leq 10 \mu\text{S/cm}$. La dispersión se ajustó a un pH de 7 con NaOH 0,5 N.²⁵³

³¹⁸ Wulandari, I.; Santjojo, D.; Shobirin, R. A.; Sabarudin, A., Characteristics and Magnetic Properties of Chitosan-coated Fe_3O_4 Nanoparticles prepared by Ex-situ Co-precipitation Method. *Rasayan J. Chem.* **2017**, *10*, 1348-1358.

5.6.2. Incorporación de nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$ en una matriz polimérica de quitosano ($(\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit})/\text{CS}$)

El desarrollo de las NPs *core/shell* ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$)/CS se consiguió siguiendo la metodología de coacervación iónica adicionando los coloides de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$ previamente obtenidos a la fase acuosa de 25 mL con ácido acético (CH_3COOH , 2%; v/v, 0.4 mL) y p188 (1%; p/v, 0.2 g).¹⁹⁴ Es en esta fase donde se disolvió el CS (0.25%; p/v, 50 mg) y se dispersaron los coloides de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$ (0.19%, p/v, 38 mg, 3.8 mL del stock de 10 mg/mL). Entonces, se produjo la coacervación del CS adicionando una solución de 6.25 mL de sulfato sódico (Na_2SO_4 , 20%, p/v, 1g) en condiciones de ultrasonificación empleando una sonda de sonicación Branson® 450 (Branson Ultrasonics Co., Estados Unidos) durante 15 minutos a intensidad 20% en modo pulsado al 40%. El vaso de precipitado utilizado se mantuvo sumergido en un baño de hielo durante todo el proceso de sonicación para evitar incrementos no deseados de temperatura. La dispersión resultante de NPs *core/shell* ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$)/CS se purificaron utilizando ciclos consecutivos de sedimentación magnética (0.68 T) hasta obtener valores de conductividad adecuados ($<10 \mu\text{S/cm}$). Las NPs se dejaron a una concentración stock de 10 mg/mL. El rendimiento (%) del procedimiento completo de obtención desde los núcleos de Fe_3O_4 se calculó utilizando la siguiente ecuación (ecuación 4):

$$\text{(Ecuación 4)} \quad \% \text{ Rendimiento} = \left(\frac{\text{Masa total NPs de } (\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit})/\text{CS (mg)}}{\text{Masa total materiales empleados (mg)}} \right) \times 100$$

Para la correcta caracterización de las NPs de ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$)/CS obtenidas, se compararán con un control de NPs de CS también obtenidas por este procedimiento de coacervación descrito anteriormente, con la principal diferencia de que en este caso no se añadirán los núcleos de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$ a la mezcla. De forma breve, se disolvió poloxámero 188 (1%, p/v) en una disolución acuosa con ácido acético (CH_3COOH , 2%; v/v) 25 mL y CS (0.05%, p/v). La solución de sulfato sódico (Na_2SO_4 , 20%, p/v) se vertió lentamente sobre la solución de CS siendo estas condiciones mantenidas durante 15 minutos adicionales. Por último, la dispersión de NPs de CS, se limpiaron empleando una centrífuga 5804 R durante 40 minutos. La concentración del stock se dejó a 5 mg/mL para su uso.

5.6.3. Liofilización de nanopartículas *core/shell* ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$)/CS

La liofilización se realizó basándose en la metodología descrita para NPs con CS.²⁵³ Desde un stock de 10 mg/mL, las NPs de ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$)/CS recién preparadas se mezclaron en presencia o ausencia del agente crioprotector, sacarosa, a una

concentración fija (5 %, p/v) ($n = 3$).³¹⁹ De forma previa a la adición de las NPs, se preparó la solución de sacarosa en agua destilada MilliQ, pesándose 0.15 g de sacarosa para un volumen final de 3 mL. Una vez disuelta la sacarosa, pipeteamos 75 μ L de la solución stock de NPs de (Fe₃O₄-cit)/CS NPs y se redispersó con la ayuda de la pipeta, dejándolas a una concentración final de 0,25 mg/mL. Esta dispersión acuosa de NPs de (Fe₃O₄-cit)/CS se mantuvo a -80 °C (Eppendorf CryoCube F570h, España) durante 12 h. La liofilización de las NPs se llevó a cabo en un liofilizador Telstar LyoQuest 55 (Telstar®, Spain) durante 48 h.

5.6.4. Caracterización fisicoquímica y magnética

Tamaño hidrodinámico

La determinación del R_H y la polidispersión (Pdl) de las NPs obtenidas se realizó utilizando el *Zetasizer Nano-ZS* (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido). La preparación previa de la muestra consistió en la dispersión de las NPs y núcleos a estudiar (Fe₃O₄, Fe₃O₄-cit, (Fe₃O₄-cit)/CS, (Fe₃O₄-cit)/CS liofilizado con 5% de sacarosa y (Fe₃O₄-cit)/CS liofilizado sin sacarosa) ($\approx 0.1\%$, p/v) y su correcta homogeneización mediante sonicación empleando un sonicador Branson® a una potencia de 100 W (frecuencia de sonicación 42 kHz) (Branson Ultrasonics Co., Estados Unidos). Las medidas fueron realizadas a una temperatura de 25.0 ± 0.2 °C ($n = 9$).

Análisis del potencial zeta

La determinación del ZP de las dispersiones de NPs obtenidas fue realizada usando el *Zetasizer Nano-ZS* (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido). El análisis del ZP bajo la influencia de distintos valores de concentración de KNO₃ se realizó para los núcleos de Fe₃O₄, Fe₃O₄-cit, y las NPs de CS y (Fe₃O₄-cit)/CS. El tratamiento de las muestras se basó, en primer lugar, en la preparación del medio de dispersión. Para ello, se ajustó la fuerza iónica con diferentes concentraciones de KNO₃ ($10^{-5} - 10^{-2}$ M) a un pH = 6 ± 0.2 . Una vez determinada la composición del medio de dispersión, se adicionaron las NPs a analizar hasta alcanzar una concentración de ≈ 0.1 % (p/v), y se dejó que transcurrieran aproximadamente unas 12 horas de contacto bajo condiciones de agitación suave (7 g) en un agitador orbital Universal OS-10 (Boeco, Alemania) a 25.0 ± 0.5 °C para favorecer la formación de una doble capa eléctrica estable.

³¹⁹ Tang, K. S.; Hashmi, S. M.; Shapiro, E. M. The effect of cryoprotection on the use of PLGA encapsulated iron oxide nanoparticles for magnetic cell labeling. *Nanotechnology*. **2013**, *24* (12), 125101.

Inmediatamente antes de realizar la medida del ZP, la dispersión fue sonicada durante 5 minutos en un sonicador Branson® (Branson Ultrasonics Co., Estados Unidos) a una potencia de 100 W (frecuencia de sonicación 42 kHz). Todas las medidas fueron realizadas a una temperatura comprendida entre 25.0 ± 0.2 °C ($n = 9$).

Microscopía electrónica de alta resolución

El análisis de microscopía electrónica de las NPs *core/shell* ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$)/CS y los núcleos de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$ tuvo lugar utilizando las técnicas de HRTEM haciendo uso de un microscopio electrónico de transmisión de alta resolución con un detector acoplado de HRTEM (microscopio Titan G2 60-300 FEI) (Thermofisher Scientific Inc., Estados Unidos) del servicio de microscopía del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. La preparación de la muestra consistió en el depósito de una dispersión de NPs ($\approx 0.1\%$, p/v), previamente homogeneizada mediante sonicación (frecuencia de sonicación 40 kHz), sobre una microrejilla de cobre recubierta con una película de formar. La desecación de la muestra se realizó a 35.0 ± 0.5 °C en un horno de convección.

Espectrometría de infrarrojos por transformada de Fourier

La caracterización química de los núcleos de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$ y los NPs de CS y ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$)/CS se realizó mediante espectrometría de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) empleando un espectrómetro FT/IR-6200 (JASCO, Estados Unidos) (resolución de $0,25\text{ cm}^{-1}$). Las bandas significativas de los nanomateriales se identificaron por comparación con los datos publicados.

Ciclo de histéresis y respuesta magnética *in vitro*

Debido a la importancia de las propiedades magnéticas en la posible aplicación de las NPs ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$)/CS, estas fueron definidas mediante el ciclo de histéresis. La caracterización del comportamiento magnético de las partículas coloidales se llevó a cabo en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada mediante la aplicación de un campo magnético (± 4000 kA/m) usando un magnetómetro-susceptibilímetro (Manics DSM-8, Francia) a 25.0 ± 0.5 °C.

De forma adicional, una dispersión de 4 mg/mL de NPs de Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$ y ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-cit}$)/CS, fue sometida a un campo magnético de un imán de neodimio (0.32 T) a una temperatura de 25.0 ± 0.5 °C. La respuesta magnética resultante fue analizada de forma macroscópica y microscópica empleando un microscopio óptico (Olympus BH-2, Japón) con objetivo de 20X.

5.6.5. Método de carga de fluvastatina en las nanopartículas por adsorción superficial

La carga de las NPs de (Fe₃O₄-cit)/CS con fluvastatina se llevó a cabo mediante la estrategia de adsorción superficial.³⁰² Se diluyeron 300 µL de las NPs de (Fe₃O₄-cit)/CS (partiendo de un stock de 10 mg/mL) en un volumen final de 3 mL de agua millQ (concentración final 1 mg/mL, peso total 3 mg). Las NPs se someten a sonicación en un sonicador Branson® 2510 (frecuencia de sonicación 40 kHz) (Marshall Scientific, Estados Unidos) durante 20 minutos. Por otro lado, se diluyen 26 mg de fluvastatina sódica en DMSO (150 µL) y se añade la mezcla sobre la suspensión de NPs de (Fe₃O₄-cit)/CS resuspendiendo suavemente (concentración final 20 mM, 5% DMSO). Se sonica la mezcla por 20 minutos. Terminada la sonicación, la mezcla se incuba a temperatura ambiente en el agitador orbital SSL4 Stuart™ (Fisher Scientific, España) (30-40 osc/min) durante 2 horas.

Las NPs de (Fe₃O₄-cit)/CS cargadas con fluvastatina se obtuvieron mediante decantación magnética por un imán de neodimio (0.32 T). Esperar 5-10 min hasta que se observa que el sobrenadante está claro. Se retira el sobrenadante y se centrifuga durante 20 min a 15368 g empleando una centrifuga de sobremesa 5415 R (rotor F-45-24-11) (Eppendorf Ibérica S.L.U., España) para retirar los posibles restos de NPs que hubieran sido pipeteadas. La concentración de fluvastatina en el sobrenadante se determinó mediante la recta patrón previamente calculada por HPLC. La diferencia entre los valores de concentración de la fluvastatina inicial y la del sobrenadante permite determinar la masa media de fluvastatina vehiculizada, siendo en este caso de 4,70 ± 0,25 mg. Con este dato, describimos la encapsulación de los sistemas nanotransportadores con la carga del fármaco (*drug loading*, DL, %) (Ecuación 5) y la eficiencia de atrapamiento (*entrapment efficiency*, EE, %) (Ecuación 6) cuyas ecuaciones se describen más adelante ($n = 9$):

$$\text{(Ecuación 5)} \quad \% DL = \left(\frac{\text{Masa de Fluvastatina vehiculizada (mg)}}{\text{Masa total de NPs obtenidas (mg)}} \right) \times 100$$

$$\text{(Ecuación 6)} \quad \% EE = \left(\frac{\text{Masa de Fluvastatina vehiculizada (mg)}}{\text{Masa total de Fluvastatina utilizada (mg)}} \right) \times 100$$

Anexos

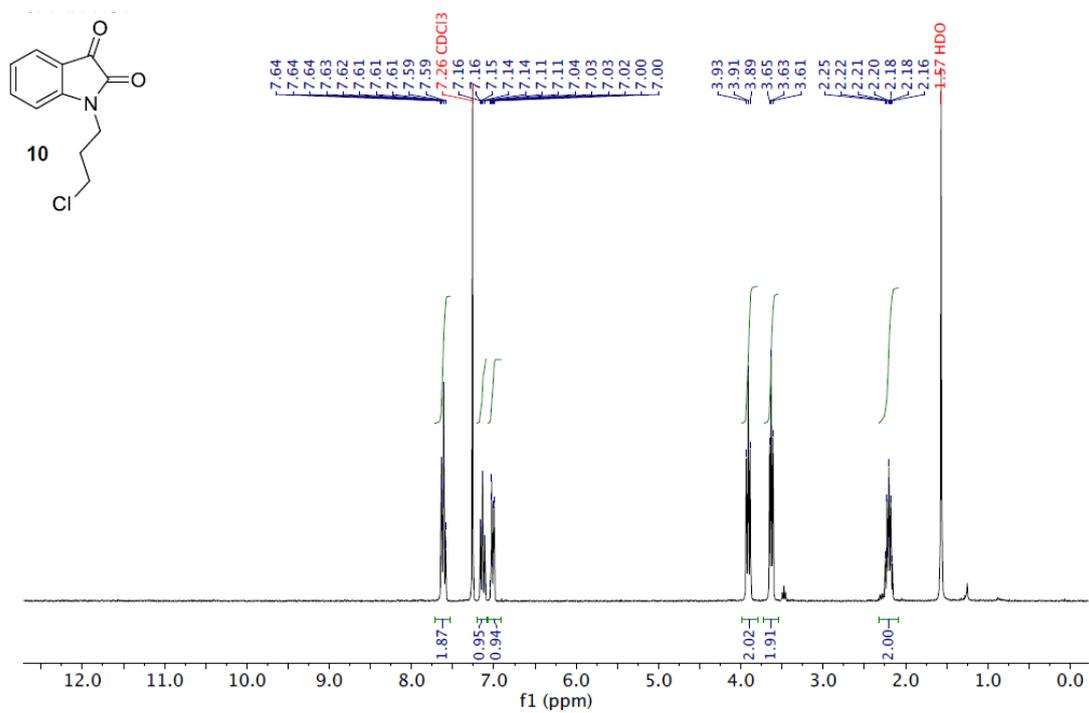
Anexo I: Abreviaturas

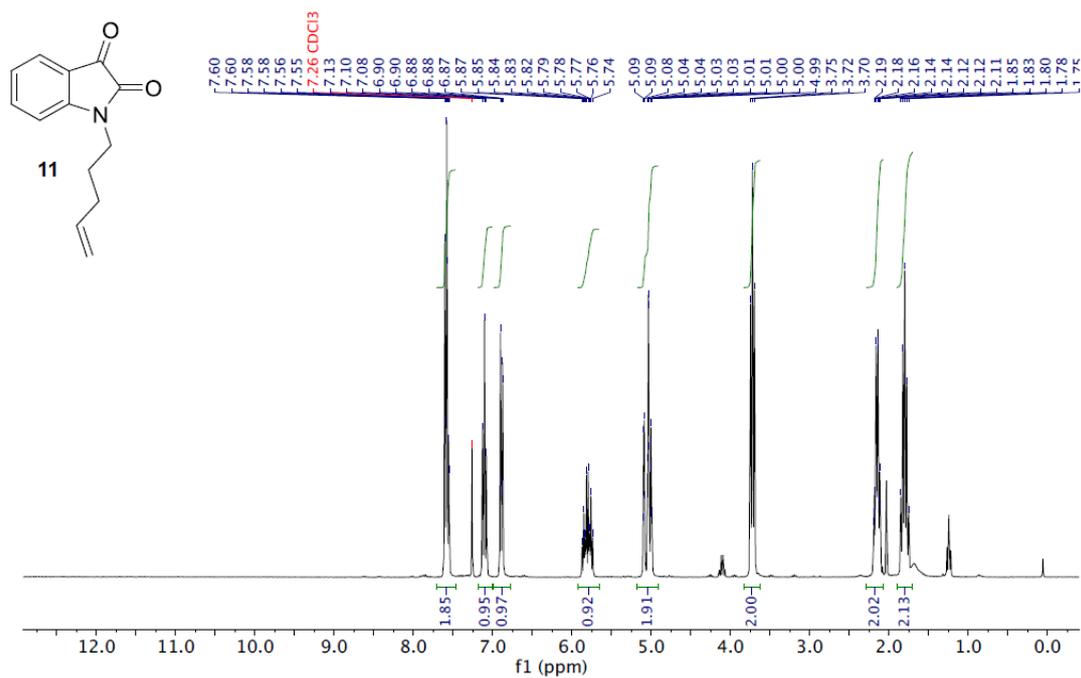
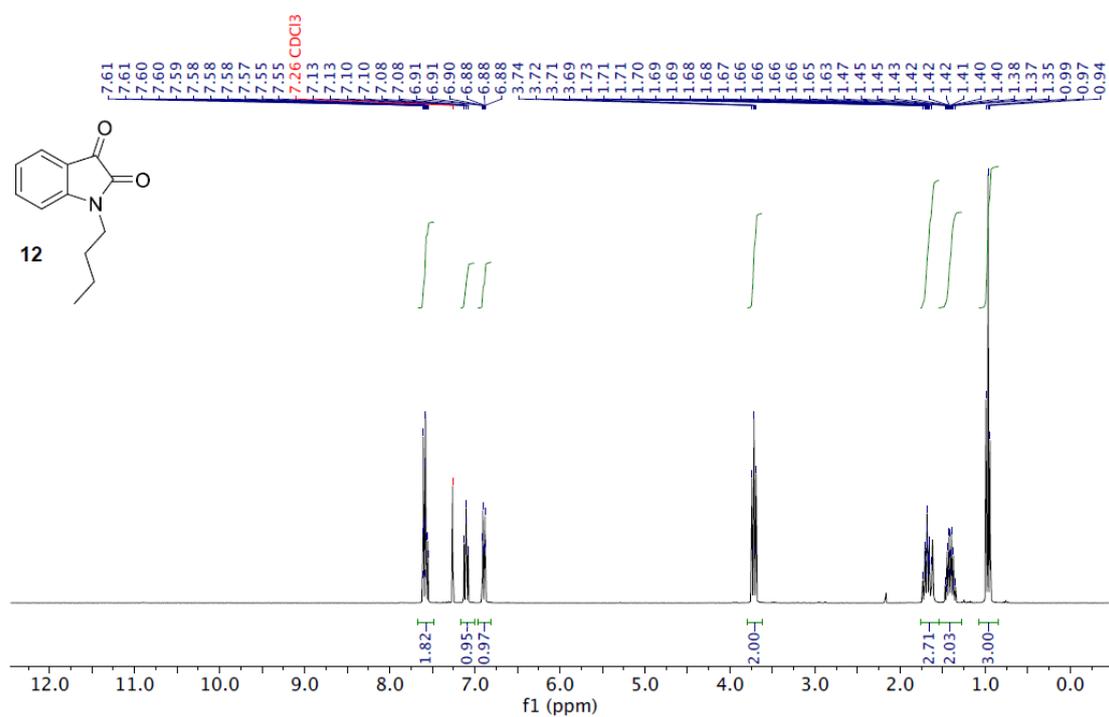
A β	Proteína amiloide-beta
APP	Proteína precursora amiloide
Arg-1	Arginasa-1
AMT	Transcitosis mediada por adsorción
ATP	Adenosina trifosfato
BBB	Barrera hematoencefálica
CDKs	Quinasas dependientes de ciclinas
COX	Ciclooxigenasa
CS	Quitano
DAMP	Patrones moleculares asociados a daño
DL	Carga del fármaco
DLS	Dispersión dinámica de la luz
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
DPBS	Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco
EA	Enfermedad de Alzheimer
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EE	Eficiencia de atrapamiento
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
EP	Enfermedad de Parkinson
ETC	Cadena de transporte de electrones
FBS	Suero fetal bovino
Fe ₃ O ₄	Magnetita

Fluv	Fluvastatina
FTIR	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HRTEM	Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución
IC ₅₀	Mitad de la concentración inhibitoria máxima
IL-6	Interleucina 6
IL-6R	Receptor de IL-6
IκB	Inhibidor de kappa B
IKK	Complejo inhibidor de la quinasa kappa B
IFN	Interferón
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IONPs	Nanopartículas de óxido de hierro
IRAK4	Quinasa 4 asociada al receptor de interleucina-1
JAK	Janus quinasa asociada al receptor
LLOQ	Límite inferior de cuantificación
LPS	Lipopolisacárido
mAb	Anticuerpos monoclonales
MAO	Monoamino oxidasa
MTT	Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio
MS	Espectrometría de masas
NADPH	Nicotiamida-adenina dinucleotido fosfato
NF-κB	Factor nuclear kappa B

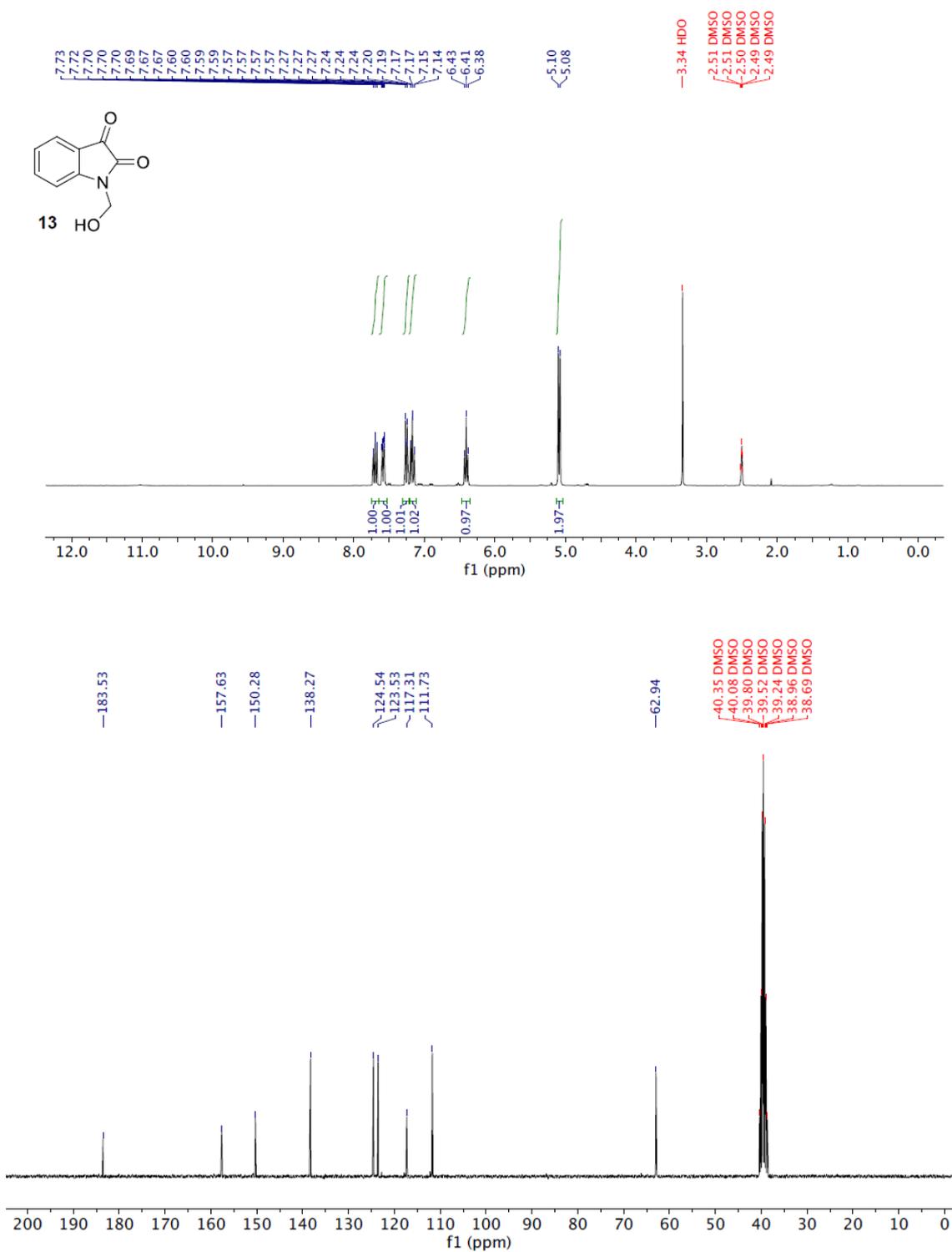
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMR	Resonancia magnética nuclear
NO	Óxido nítrico
NO ₂	Nitrito
NOS	Óxido nítrico sintasa
NOX	NADPH oxidasas
NPs	Nanoparticulas
NSAIDs	Fármacos antiinflamatorios no esteroideos
O ₂ ⁻	Ión superóxido
OH	Radical hidroxilo
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
P _{app}	Coefficiente de permeabilidad aparente
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pdl	Índice de polidispersión
PEG	Polietilenglicol
PGE2	Prostaglandina E2
P-gp	Glicoproteína P
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones moleculares
Rh	Radio hidrodinámico
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
Rt	Tiempo de retención
rtPCR	PCR en tiempo real
SAIDs	Fármacos antiinflamatorios esteroideos

SEM	Error estándar de la media
SNC	Sistema nervioso central
SOD	Superóxido dismutasas
SPIONPs	Nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas
STAT6	Transductor de señal y activador de la transcripción 6
TACE	Enzima convertidora de TNF- α
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TLC	Cromatografía en capa fina
TLR4	Receptor de tipo toll 4 (<i>toll-like</i>)
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
TNFR	Receptor de TNF- α
TRAF6	Factor 6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral
ULOQ	Límite superior de cuantificación
XO	Xantin oxidasas
ZP	Potencial zeta

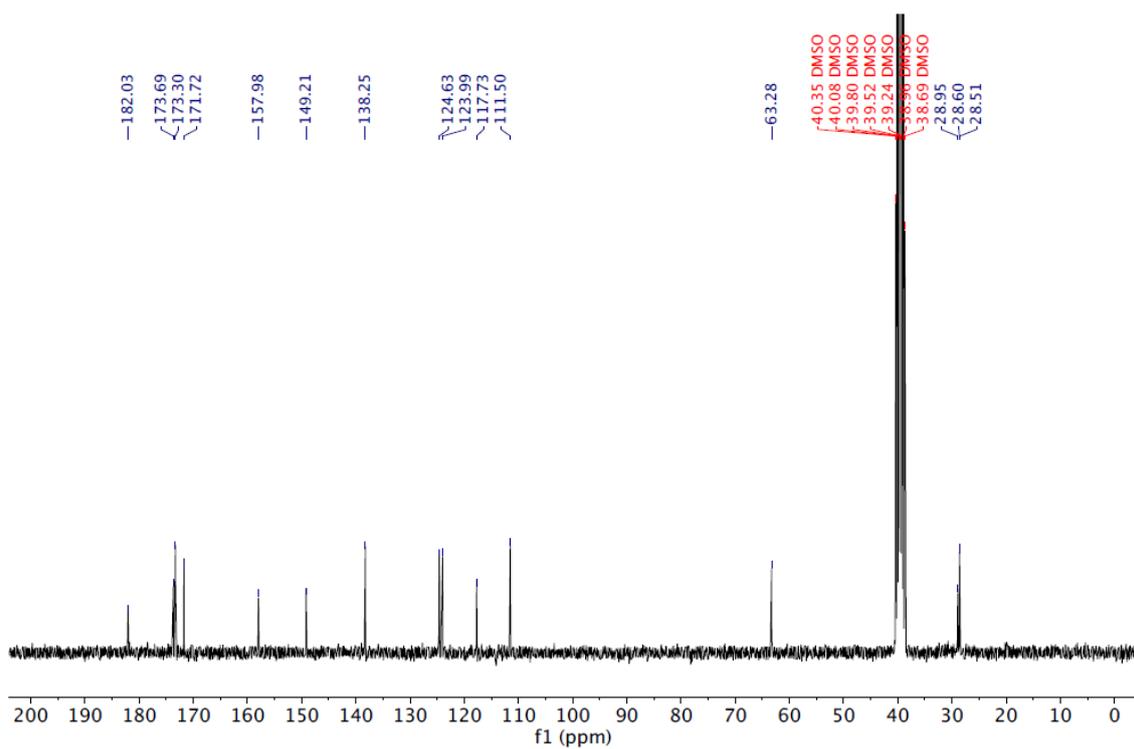
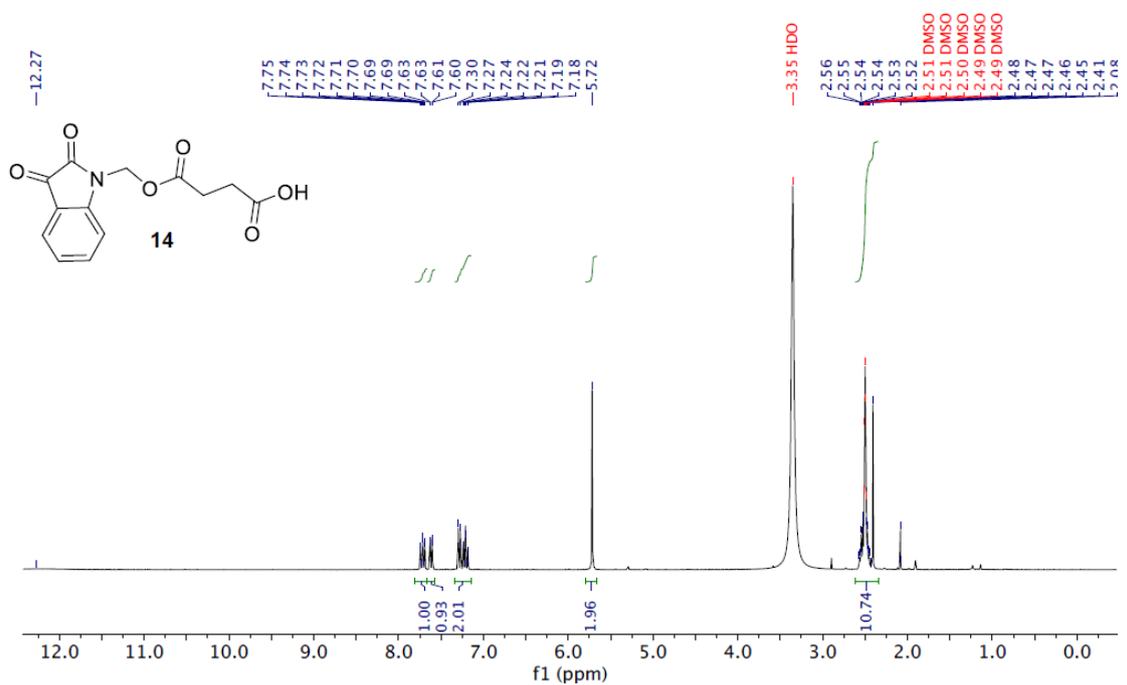
Anexo II: Espectros de NMR de ^1H y ^{13}C Espectro ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3) de **10**:

Espectro $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) de **11**:Espectro $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) de **12**:

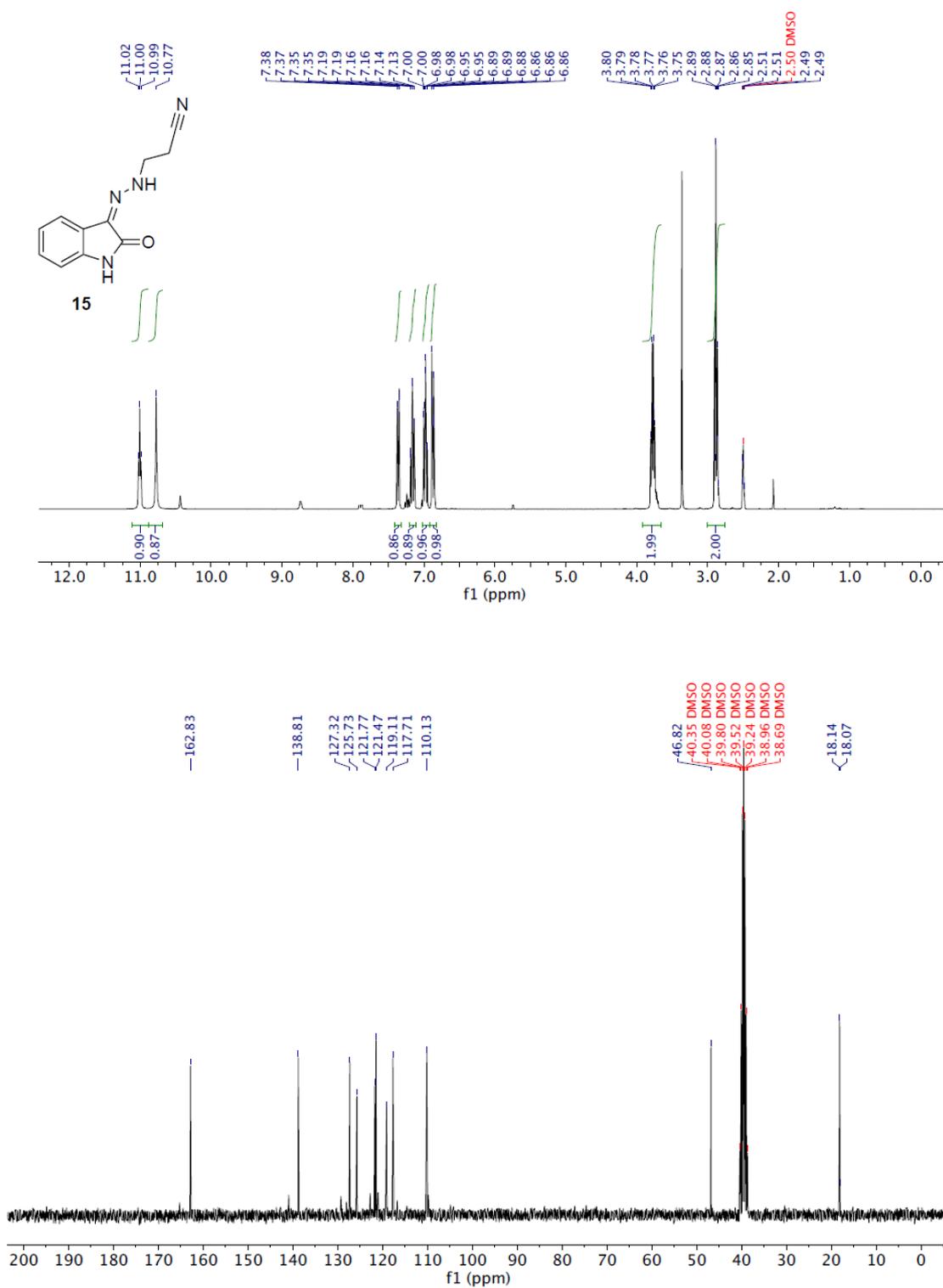
Espectros de NMR ^1H y ^{13}C (300 y 75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **13**:

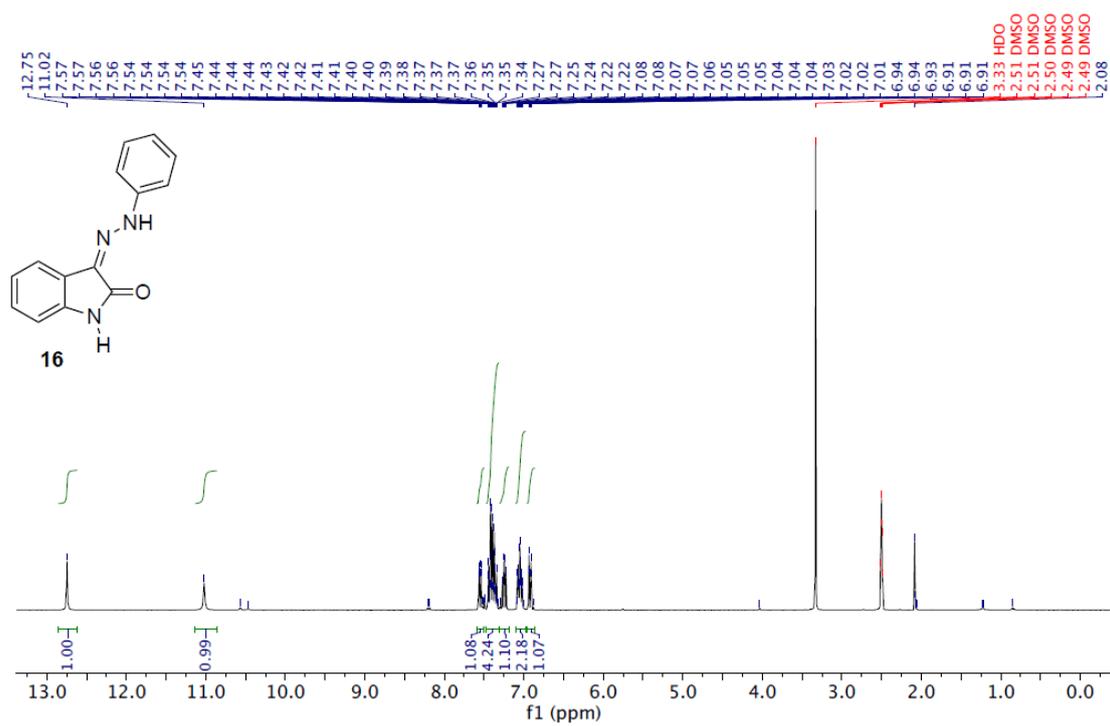


Espectros de NMR ^1H y ^{13}C (300 y 75 MHz, DMSO- d_6) de **14**:

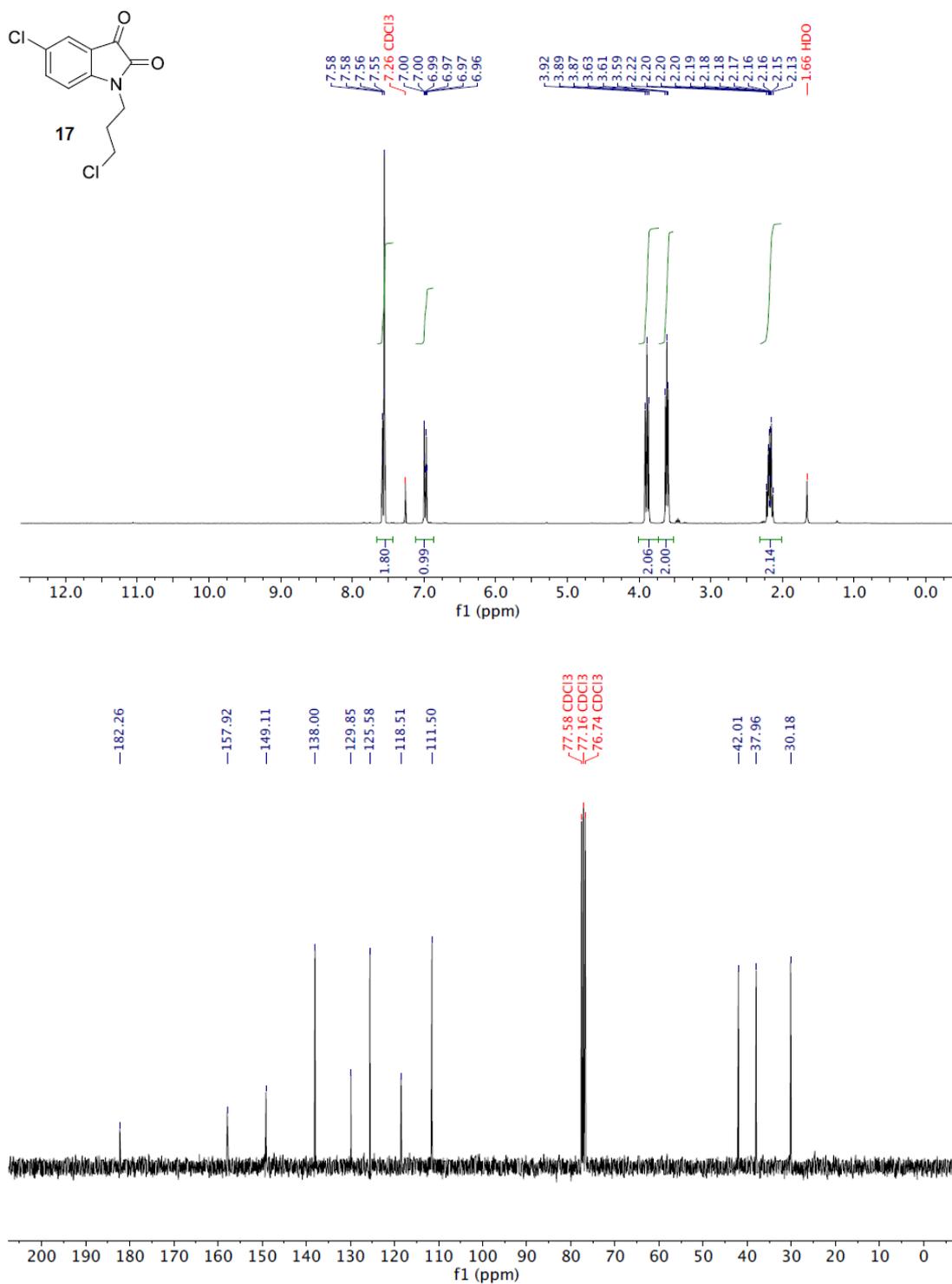


Espectros de NMR ^1H y ^{13}C (300 y 75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de **15**:

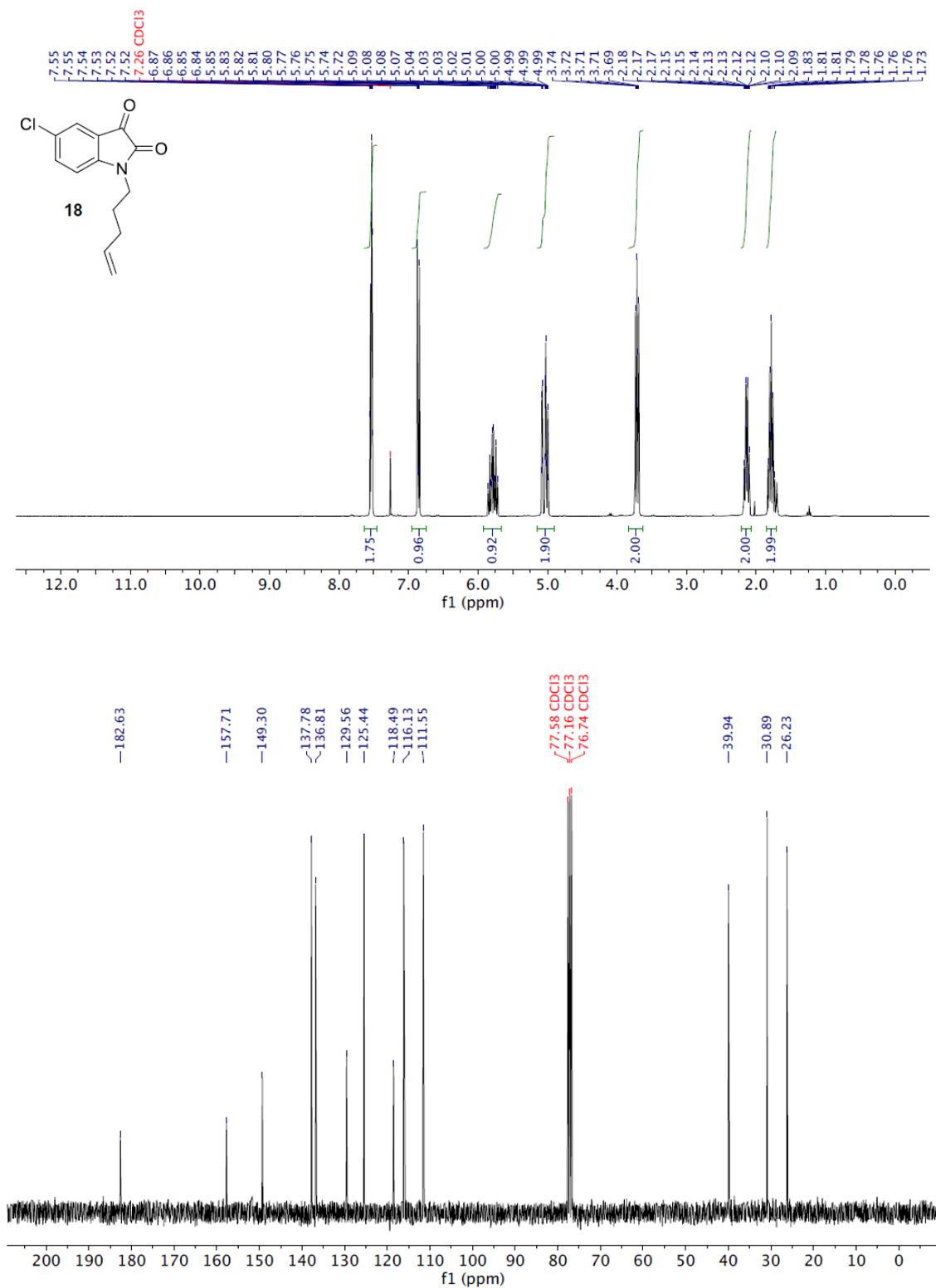


Espectro $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **16**:

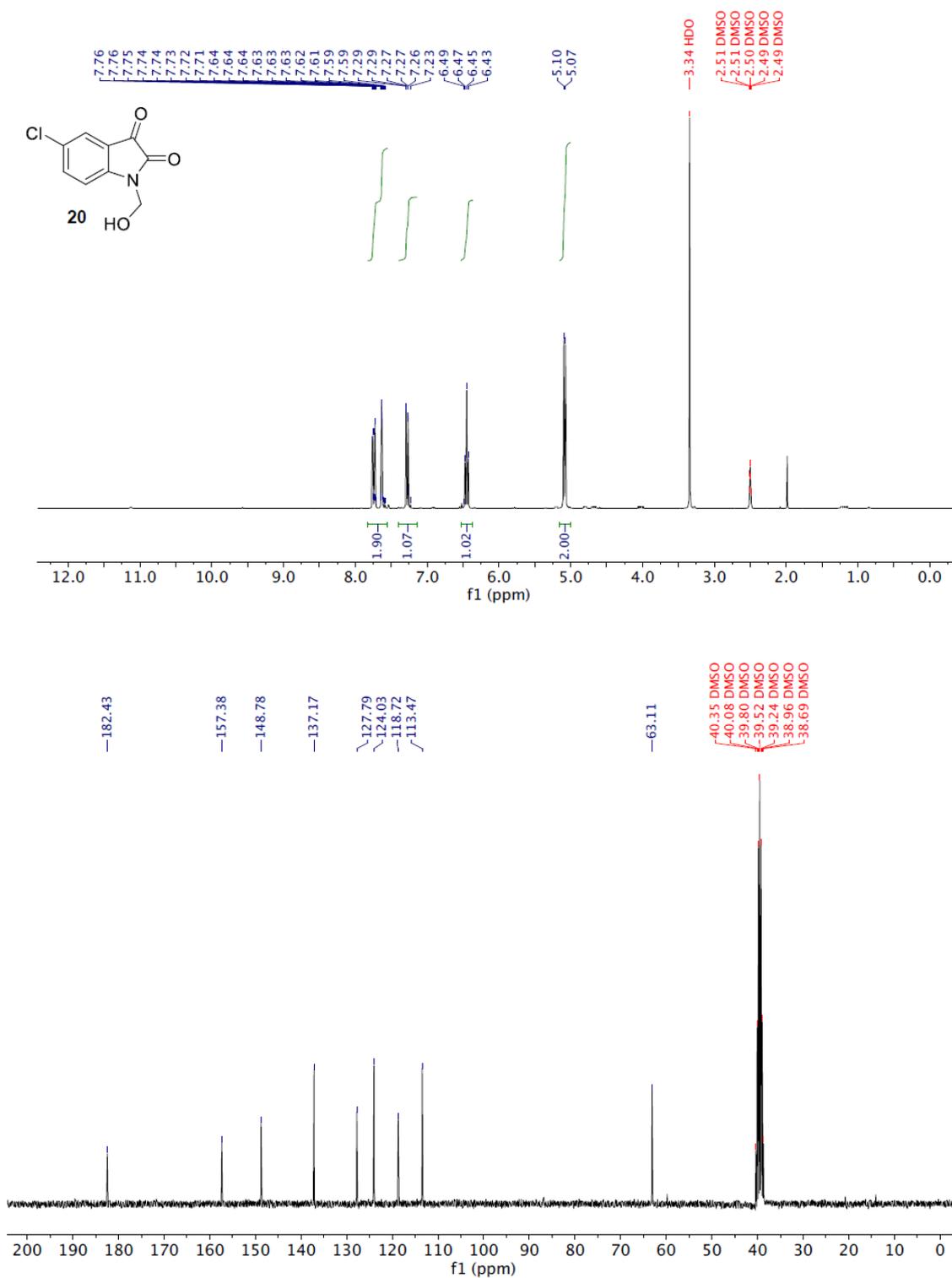
Espectros de NMR ^1H y ^{13}C (300 y 75 MHz, CDCl_3) de **17**:



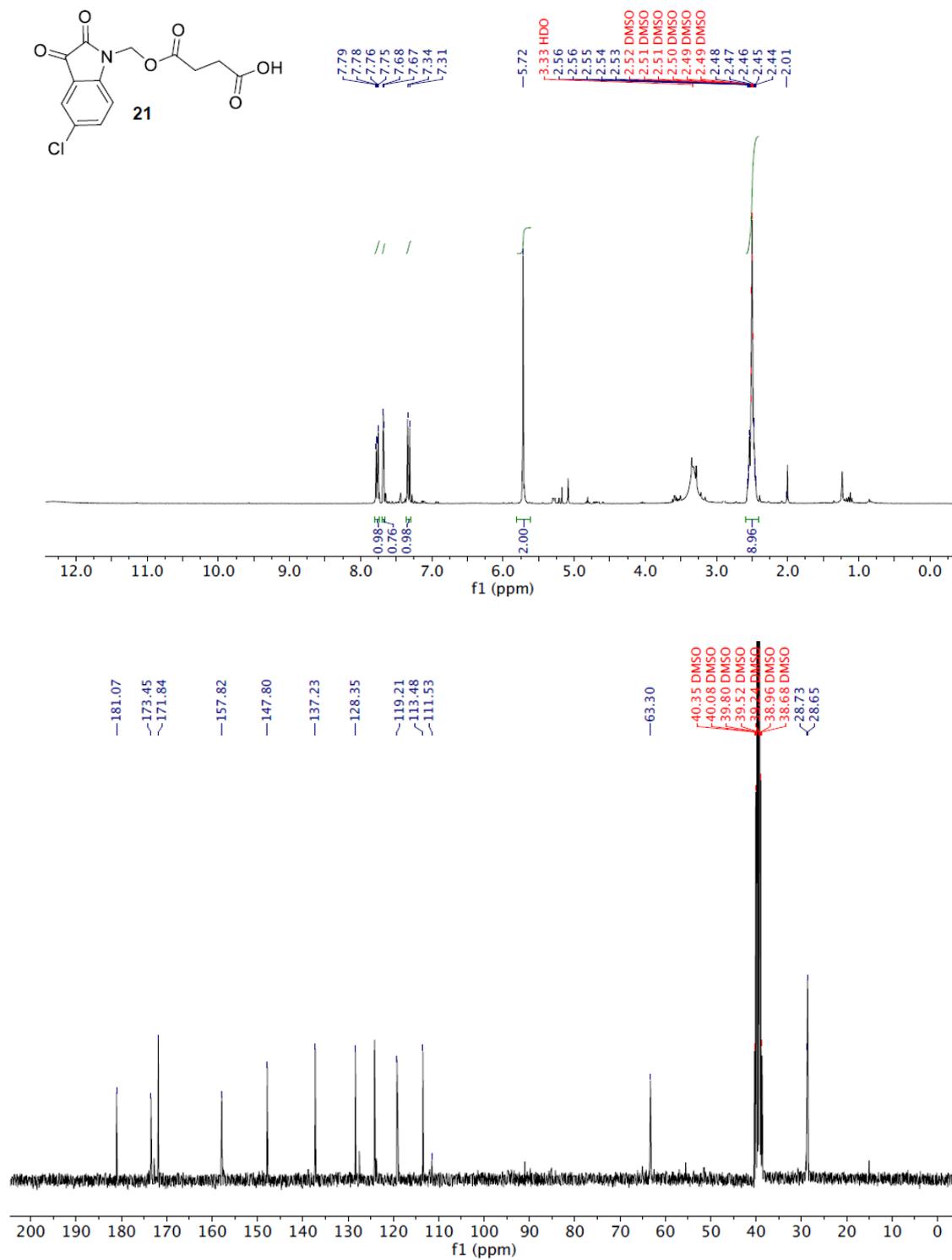
Espectros de NMR ^1H y ^{13}C (300 y 75 MHz, CDCl_3) de **18**:



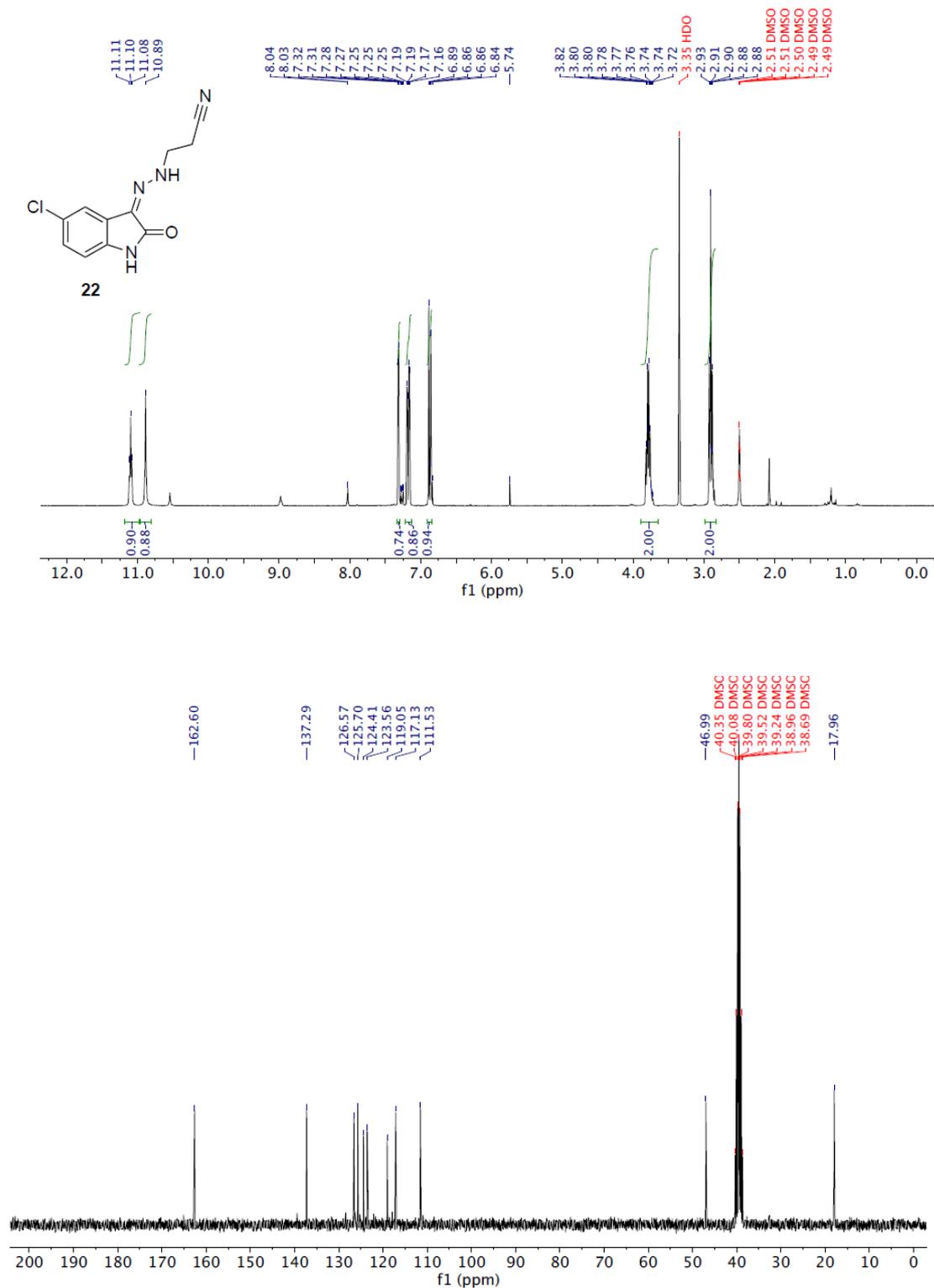
Espectros de NMR ^1H y ^{13}C (300 y 75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **20**:



Espectros de NMR ^1H y ^{13}C (300 y 75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **21**:



Espectros de NMR ^1H y ^{13}C (300 y 75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **22**:



Espectro $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **23**: