



UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI



UNIVERSITAT
JAUME I

**EVALUACIÓN EN CULTIVOS CELULARES DE LA
BIODISPONIBILIDAD DE ÁCIDO ABSCÍSICO MEDIADO POR
NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO**

Esther Fernández Salisa

TRABAJO FINAL DE GRADO BIOTECNOLOGÍA

Mención: Biotecnología biomédica

Tutor académico: Ricardo Román Cordero Otero, Biotecnología Microbiana de alimentos, ricardo.cordero@urv.cat

Supervisores: Ana María Sánchez Pérez, Unidad pre-departamental de Medicina, sanchean@med.uji.es, Universitat Jaume I

Fecha de convocatoria, septiembre 2024

Yo, Esther Fernández Salisa, con DNI 53792482-J, soy conocedora de la guía de prevención de plagio en la URV Prevención, detección y tratamiento del plagio en la docencia: guía para estudiantes (aprobada el julio 2017)

(https://www.urv.cat/media/upload/arxius/crai/plagi/Castellà/060418_es_guiaestudiants_web.pdf) y afirmo que este TFG no constituye ninguna de las conductas consideradas como plagio por la URV.

Tarragona, 30 de agosto de 2024

ÍNDICE DE CONTENIDO

<i>DATOS DEL CENTRO</i>	4
<i>RESUMEN</i>	5
<i>1.INTRODUCCIÓN</i>	6
<i>2.HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS</i>	14
<i>3.MATERIALES Y MÉTODOS</i>	14
3.1 Nanopartículas de quitosano	14
3.2 Cultivos celulares	15
3.3 Solución de ABA libre	17
3.4 Cuantificación de las CNPs en microscopía confocal	17
3.5 Cuantificación por HPLC de ABA intra y extracelular	17
<i>4.RESULTADOS</i>	18
4.1 La entrada de CNPs es dependiente de la dosis de nanopartículas y más eficiente en la línea celular de macrófagos	18
4.2 El uso de CNPs no aumenta la entrada de ABA en las células	22
<i>5.DISCUSIÓN</i>	26
<i>6.CONCLUSIÓN</i>	28
<i>7.BIBLIOGRAFÍA</i>	29
<i>8.AUTOEVALUACIÓN</i>	31
<i>9.ANEXOS</i>	32

DATOS DEL CENTRO

De abril a julio de 2024 realicé mi estancia de prácticas curriculares con el grupo de Neurobiotecnología de la Univeristat Jaume I (UJI). El grupo está liderado por Ana María Sánchez Pérez y conformado por otras estudiantes del programa Phd que están desarrollando su tesis doctoral en dicho grupo. La UJI (<https://www.uji.es>) es un centro universitario público situado en la ciudad de Castellón de la Plana y fundado en 1991. Esta universidad está conformada por la Facultad de Ciencias Jurídicas y Económicas, la Facultad de Ciencias Humanas y Sociales, la Escuela Superior de Tecnología y Ciencias Experimentales y por la Facultad de Ciencias de la Salud, a esta última corresponde el grupo en el que he trabajado los últimos meses.

El grupo de Neurobiotecnología de la UJI (<http://www.neurobiotecnologia.uji.es>) fue creado en 2013 para descifrar la fisiopatología del sistema nervioso mediante herramientas biotecnológicas. En este grupo se enfocan en estudiar como la neuroinflamación y la resistencia a la insulina se asocian; como éstas afectan a la señalización y supervivencia neuronal, además de descubrir cómo estos procesos provocan la transición de la salud a la enfermedad en el inicio de trastornos neurológicos y psiquiátricos. Por otra parte, otro de sus objetivos es el de desarrollar y testar nuevas formulaciones que presenten un potencial terapéutico mejorado para tratar estas enfermedades.

Además de las herramientas biotecnológicas, el grupo de Neurobiotecnología ha desarrollado una plataforma *in vitro* e *in vivo* para poder evaluar los efectos neuroprotectores de moléculas naturales y sintéticas. De esta manera, se ha demostrado que el tratamiento con ácido abscísico presenta propiedades beneficiosas para la enfermedad de Alzheimer. En estos momentos, y como parte de mi trabajo final de grado, se está desarrollando ácido abscísico encapsulado para mejorar tanto su biodisponibilidad como su potencial terapéutico.

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer está relacionada de manera directa con la edad avanzada, por lo que supone una problemática en una sociedad en la que la esperanza de vida cada vez es más elevada, aumentando así su incidencia. Aunque no existe la cura de la enfermedad, se están estudiando diversas aproximaciones para poder prevenir el Alzheimer, un ejemplo es desde el punto de vista de la neuroinflamación, que se produce décadas antes de la aparición de los primeros síntomas clínicos.

Mediante el estudio de diferentes moléculas se intenta prevenir esta neuroinflamación y por lo tanto el desarrollo de la enfermedad, una de ellas es el ácido abscísico. Esta molécula ha demostrado reducir tanto la neuroinflamación como el síndrome metabólico en modelos animales de Alzheimer, presentando un efecto periférico en diferentes partes del organismo. Con el propósito de mejorar su biodisponibilidad y su potencial terapéutico, el grupo de Neurobiotecnología de la UJI está trabajando en el desarrollo de ácido abscísico encapsulado en unas nanopartículas de quitosano para su entrega y liberación en el cerebro. En este estudio se recopilan los primeros pasos de este proyecto, realizando ensayos piloto para conocer la naturaleza y las propiedades que presentan las nanopartículas sintetizadas en los laboratorios de la UJI, evaluando así la capacidad de internalización y liberación de dichas partículas.

Palabras clave: Alzheimer, neuroinflamación, ácido abscísico, nanopartícula, quitosano, neuroblastoma, macrófago, liberación e internalización.

1.INTRODUCCIÓN

Debido a un aumento en la esperanza de vida de la población mundial, aparecen anualmente más casos de enfermedades relacionadas con la edad avanzada, como es el caso de la enfermedad de Alzheimer (EA). El Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa que provoca demencia a quien la padece, por lo que las personas con diagnóstico de Alzheimer presentan una pérdida de memoria progresiva, un deterioro cognitivo y también muestran cambios en su personalidad. No se conoce una única causa de esta enfermedad, sino que el desarrollo de ésta se debe a la combinación de diferentes factores genéticos, ambientales y también depende del estilo de vida del paciente. La ciencia investiga los daños cerebrales asociados a la longevidad como causas principales, pues el 15% de casos se asocian a pacientes de 65 años y el 50% corresponde a mayores de 85 años. Algunas de estas investigaciones se centran en la neuroinflamación, producida por diversos causantes como es el estrés oxidativo, la acumulación de placas beta amiloides (Morales G. *et al.*, 2010) y muy influenciada por la resistencia a la insulina, derivada de un estilo de vida poco saludable.

El estrés oxidativo se debe a una proporción de radicales libres superior a los de antioxidantes, provocando una acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que causan daños y muerte celular, ya que se altera la estructura de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Algunos de los pacientes diagnosticados con EA han mostrado tener en el plasma sanguíneo altos niveles de hierro y cobre, metales relacionados directamente con la producción de ROS, dando lugar a unos radicales muy reactivos que acaban dañando las células. En el caso del Alzheimer, estas especies se acumulan en el cerebro y dañan las neuronas, provocando la neurodegeneración del paciente y por tanto la progresión de dicha enfermedad.

Las placas beta-amiloides o placas seniles se forman cuando hay una agregación de oligómeros de proteína beta-amiloide (Ab) en el cerebro, éstas se acumulan en regiones importantes para la memoria y el aprendizaje, por lo que se cree que es una de las principales causas de la enfermedad de Alzheimer. Estas placas seniles representan una reserva de oligómeros Ab solubles, a los que se les asocia el efecto neurotóxico que provoca la neuroinflamación y que acabará desarrollando EA en el paciente (Carvajal-Carvajal, 2016).

Además, el síndrome metabólico, produce entre otros síntomas, la resistencia a la insulina, que se ve traducida en una acumulación de glucosa en sangre. Esta resistencia a la insulina es uno de los factores influyentes en el estado de neuroinflamación por provocar la acumulación de péptidos Ab (Kellar & Craft., 2020).

Como ya se ha comentado al inicio del trabajo, cada año son más los pacientes diagnosticados de EA, a pesar de esto, los fármacos y terapias enfocadas en el Alzheimer son más bien escasos, pues se sigue trabajando desde los laboratorios para poder frenar el desarrollo de esta enfermedad desde diferentes enfoques. Está comprobado que la degeneración de las neuronas tiene lugar décadas antes de que se muestren los primeros síntomas clínicos de la enfermedad, por lo que gran parte de estas investigaciones se centran en buscar diferentes moléculas que prevengan el daño neuronal causado por las ROS, las Ab solubles e influenciado por la resistencia a la insulina, conduciendo al desarrollo de una enfermedad neurodegenerativa como lo es el Alzheimer. Una de estas moléculas candidatas como posible tratamiento para evitar el desarrollo del Alzheimer es el ácido abscísico (ABA). El ABA es un isoterpeno (ver figura 1) que fue considerado anteriormente una fitohormona bastante conservada en plantas, pues está presente hasta en especies tan primitivas como lo es el musgo. A esta molécula se le asoció una función relacionada con el crecimiento de las plantas, aunque también es secretada en respuesta a cualquier tipo de estrés y se asocia a la biosíntesis de algunas biomoléculas, por lo que es un compuesto muy versátil en el mundo vegetal. En las últimas décadas se ha demostrado que ABA también se sintetiza en animales, bacterias y algunos hongos, y desde entonces se considera una hormona endógena en humanos.

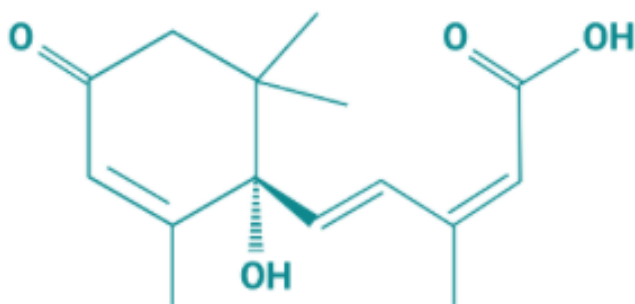


Figura 1. Estructura química del ácido abscísico. Contiene 3 unidades de isopreno y 1 anillo de lactona que es crucial para la actividad biológica de la molécula

Al inicio, en mamíferos, se descubrió la secreción de ABA en tejidos cerebrales de rata, pero se ha detectado también esta hormona en el plasma sanguíneo y diferentes tipos celulares, células hematopoyéticas inmunitarias, pancreáticas, adipocitos o células madre mesenquimales pueden secretar ABA. No se conoce la ruta de síntesis de ABA en mamíferos, pero debido a la similitud estructural que mantiene con el ácido retinoico, se relaciona con la síntesis de dicha molécula, que sucede a partir de un precursor de naturaleza carotenoide. Aun no conociéndose la biosíntesis de ABA, su producción está ligada a una respuesta contra determinados tipos de estímulos estresantes, siendo ésta secretada tanto por células con acción paracrina, como endocrina y sistemática. Cabe destacar el papel de esta hormona en la respuesta inflamatoria, además de tener actividades inmunoregulatoras, propiedades antioxidantes y también poder mantener el control glicémico, estabilizando así los niveles de glucosa en sangre, por lo que ABA es una molécula interesante para llevar a cabo estudios y tratamientos terapéuticos de algunas enfermedades (Sánchez-Sarasua *et al.*, 2016).

En varios estudios se ha demostrado que el ABA tiene la capacidad de reducir esta pérdida de memoria característica de la EA en modelos murinos, además, se le han atribuido propiedades tanto antiinflamatorias como antioxidantes, dos de las principales causas del Alzheimer. En un ensayo realizado con modelos murinos de neuroinflamación (Sánchez-Sarasua *et al.*, 2016) se demostró que la administración de ABA en el agua de los animales mejoró la tolerancia de éstos a la glucosa, su rendimiento cognitivo y además se vio que los niveles de marcadores inflamatorios disminuían en las áreas hipotalámicas, con esos resultados se observó por primera vez los beneficios del ácido absísico en las enfermedades neurodegenerativas, pues además de mejorar esta resistencia a la glucosa, ABA también producía una mejora en el estado neuroinflamatorio de los ratones. En otro estudio llevado a cabo con modelos murinos de Alzheimer (Espinosa-Fernández *et al.*, 2019), se constató que el efecto principal de ABA es la prevención de la enfermedad más que su tratamiento; al tratar ratones modelos de Alzheimer jóvenes con ABA, se observó una mejora en sus capacidades cognitivas. Estos resultados no se obtuvieron en todos los modelos de ratón, pues en aquellos que eran más viejos, este efecto de ABA no fue observado, en este caso, los ratones estudiados presentaban un estado más avanzado de la EA, donde la neuroinflamación ya era evidente.

En la figura 2 se representan los diferentes efectos que se han asociado al ABA en estudios realizados por el grupo de Neurobiotecnología de la UJI en modelos animales de distintas

enfermedades. Es observable que, además de las propiedades relacionadas con las enfermedades neurodegenerativas ya mencionadas, ABA tuvo efectos beneficiosos en los otros modelos murinos, siendo una hormona clave para tratar diferentes patologías. En el caso de las enfermedades neurodegenerativas, la administración de ABA ha mostrado una mejora en las alteraciones en la memoria y una reducción en la neuroinflamación en modelos animales de Alzheimer y en el caso de la enfermedad de Parkinson, una mejora en los síntomas motores.

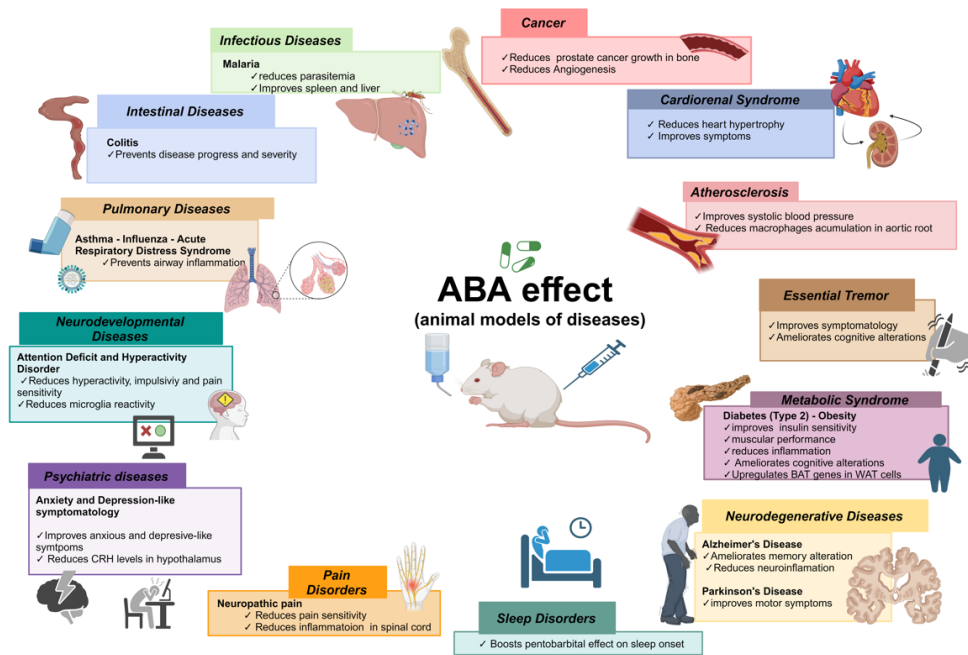


Figura 2. Efectos terapéuticos asociados a ABA en modelos murinos (Imagen cedida por el grupo de Neurobiotecnología de la UJI).

En un estudio desarrollado en el año 2016 en la UJI (Sánchez-Sarasúa *et al.*, 2016) se demostró que la molécula de ABA puede traspasar la barrera hematoencefálica, pero no se descubrió si los efectos de esta hormona en las capacidades cognitivas del animal se debían a la acción directa de ABA en el cerebro o a la acción periférica de la molécula en el organismo, ya que llega a diferentes órganos y tejidos, donde produce diferentes efectos beneficiosos. Para comprobar si los beneficios de ABA en la neuroinflamación que provoca las enfermedades neurodegenerativas se pueden conseguir o incluso aumentar con una administración de esta hormona directa al cerebro, el grupo de Neurobiotecnología de la UJI en colaboración con el Departamento de Química de dicha universidad, ha diseñado unas nanopartículas de quitosano cargadas de ácido abscísico que se dirigen al cerebro, donde liberen el ABA para ejercer su función, previniendo así la neuroinflamación.

La nanomedicina es un campo de investigación emergente, en el que se recurre a la nanotecnología para el desarrollo de terapias médicas innovadoras. Para llevar a cabo estos avances médicos se utilizan nanomateriales, éstos son materiales con dimensiones muy reducidas (a escala nanométrica) y que por tanto presentan unas propiedades físicas, químicas y biológicas específicas, siendo unos materiales idóneos para desarrollar nuevas terapias, por ejemplo, para la síntesis de nanoportadores, que transportan y liberan moléculas con acción terapéutica. En la industria farmacéutica estos nanoportadores mejoran algunos procesos farmacéuticos, como la biodisponibilidad, la vida media del fármaco, el perfil farmacocinético o disminuyendo también la frecuencia de administración del fármaco. Entre los nanomateriales utilizados en esta rama de la medicina destaca el quitosano, el quitosano es un polisacárido lineal que se encuentra en la naturaleza; lo podemos encontrar en las paredes celulares de algunos hongos, en el cascarón de los crustáceos y en el exoesqueleto de los insectos. Este material se usa en diferentes industrias, como la farmacéutica o la cosmética, ya que es un material no tóxico. Además, algunas características, como su alta biodegradabilidad y biocompatibilidad, hacen que la respuesta inmunitaria contra este material sea muy baja, convirtiendo al quitosano en un nanomaterial perfecto para el desarrollo de terapias médicas.

El quitosano tiene naturaleza policationica, por lo que su estructura presenta diferentes cargas positivas(ver figura 3), estas cargas positivas hacen que el material sea mucho más bioadhesivo y soluble, uniéndose a las superficies cargadas negativamente, como son las membranas celulares; además de sus cargas positivas, el elevado peso molecular de este biopolímero provoca una permeabilidad en el epitelio celular, permitiendo así el transporte de fármacos a través de superficies epiteliales. Estas características permiten al quitosano usarse como principal material en los sistemas de liberación de fármacos, enviándolos a una zona específica y controlada. Aunque el quitosano presenta propiedades beneficiosas para su utilización en terapias médicas, como son un aumento de la biodisponibilidad y una no toxicidad, también hay contras en el uso de este nanomaterial, ya que su tasa de degradación es muy elevada y sus propiedades mecánicas son muy bajas; estos puntos críticos pretenden ser superados al combinar el quitosano con otros polímeros naturales (Jaferník *et al.*, 2023).

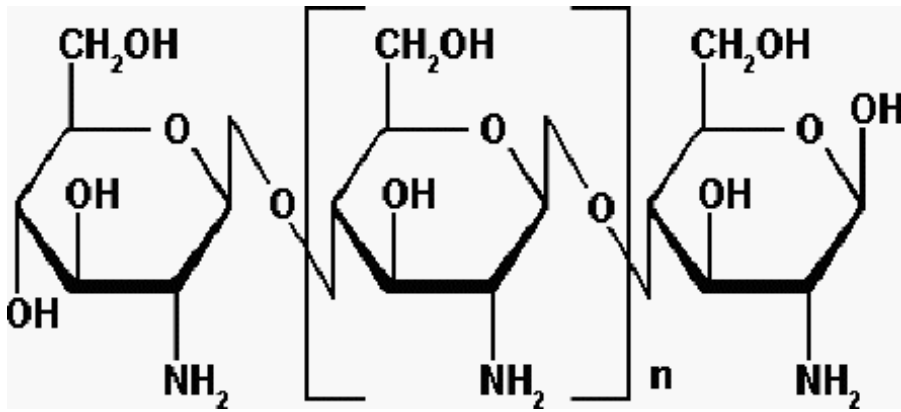


Figura 3. Estructura del quitosano, es evidente la alta presencia de grupos amino(-NH₂) y grupos hidroxilo (-OH) que le confieren propiedades como la biocompatibilidad o la capacidad de formar películas y geles para dar lugar a biomateriales. En los grupos amino se encuentran las cargas positivas que hacen de ésta una molécula policationica. (Producción de quitosano, Universidad de Granada).

Aunque para el sistema de liberación de fármacos se ha utilizado el quitosano tanto en forma de nanopartículas, como de hidrogeles y membranas poliméricas de hidrogel, las nanopartículas (NPs) han resultado ser la estructura más beneficiosa para estos usos terapéuticos. El tamaño reducido de estas NPs, entre 10 y 100 nm, proporciona múltiples beneficios en la absorción, liberación y acumulación de éstas en el organismo, aunque también es un factor que determina el mecanismo endocítico, la eficiencia de la internalización y el procesamiento de la ruta endocítica de dichas nanopartículas (Rejman *et al.*, 2004).

Varios son los estudios en los que se hace uso de partículas de distintos biopolímeros cargadas con diferentes moléculas con el propósito de liberarlas en el cerebro, produciendo efectos en la neuroinflamación característica de la enfermedad de Alzheimer. En un estudio realizado en 2023 con nanopartículas de polietilenglicol (PEG) y ácido poliláctico (PLA) cargadas con dos péptidos, se evidenció que estas NPs sintetizadas con biopolímeros se liberan de manera controlada y dirigida en las neuronas (ver figura 4), siendo capaces de traspasar la barrera hematoencefálica y acumularse en las zonas dañadas, para llevar a cabo así el efecto terapéutico deseado, que en este caso era reducir la acumulación de péptidos Ab y la hiperfosforilación de la proteína tau, ambos relacionados con el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (Guo *et al.*, 2023). Con este estudio se hace evidente la capacidad que tienen las nanopartículas de dirigirse de manera específica al cerebro y, además, es un estudio que tiene un objetivo similar al del Grupo de Neurobiotecnología de la UJI: prevenir el desarrollo de la EA.

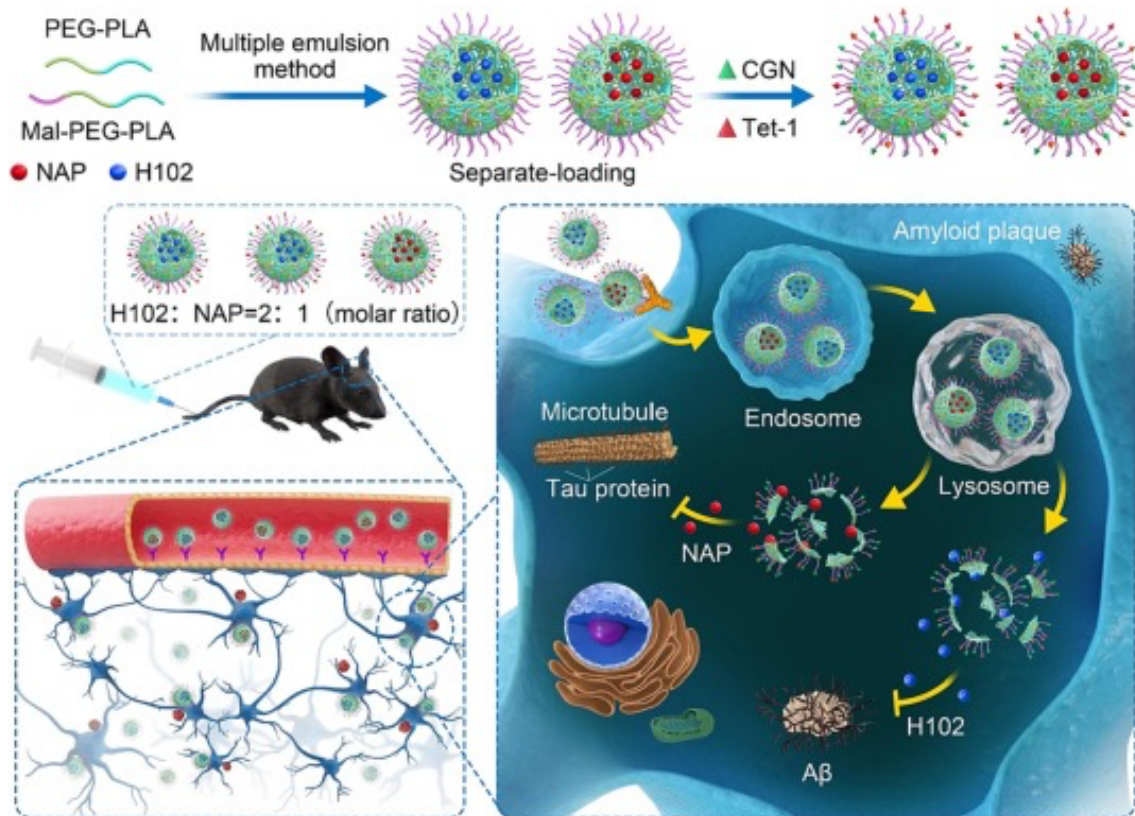


Figura 4. Esquema que muestra la síntesis de las nanopartículas de PEG-PLA así como la vía de administración del fármaco y la liberación de los péptidos de los que están cargadas (Guo *et al.*, 2023)

En 2021, Abbas *et al* desarrollaron bilosomas, una especie de liposomas recubiertos con quitosano y cargados con resveratrol, molécula con alto potencial terapéutico en el campo de las enfermedades neurodegenerativas pero muy limitada a la hora de cruzar la barrera hematoencefálica, por lo que se diseñan estos bilosomas para aumentar la eficiencia de esta molécula en la terapia contra el Alzheimer. Los resultados demostraron que el tratamiento del resveratrol conjugado con estas partículas es más efectivo que el resveratrol libre, por la capacidad de los bilosomas de dirigirse específicamente a las neuronas y por la protección que estas partículas proporcionaban al resveratrol, evitando su degradación temprana (Abbas *et al.*, 2021).

Como ya se ha comentado con anterioridad, el grupo de Neurobiotecnología de la UJI coordinado por Ana María Sánchez Pérez, ha diseñado unas nanopartículas de quitosano cargadas de ABA, el propósito de estos experimentos es testar si estas nanopartículas pueden entrar al interior de las células y liberar su contenido. El objetivo final del grupo en las fases más avanzadas de la investigación es lograr el desarrollo de unas nanopartículas de quitosano que se dirijan al cerebro, donde liberarán ABA como tratamiento de prevención de la EA. Los experimentos piloto de esta investigación empezaron en febrero

de 2024, estos se llevaron a cabo con ensayos *in vitro* con dos líneas celulares diferentes, una correspondiente a células fagocíticas como los macrófagos (RAW 264.7) y la otra a neuroblastomas (SH-SY5Y), al proliferar en cultivo, esas células adquieren una disposición tipo neurona, simulando la entrada de las nanopartículas al interior de éstas (ver figuras 5 y 6). En este trabajo, las células SH-SY5Y utilizadas han sido aquellas que no están diferenciadas, dónde la morfología neuronal es mucho más primitiva que en aquellas SH-SY5Y que están diferenciadas. A estas alturas de la investigación, los experimentos realizados, considerados todavía pilotos, se basaban en cuantificar la entrada de nanopartículas al interior de los dos tipos celulares y medir mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) la cantidad de ABA intra y extracelular, comprobando si se liberaba el contenido de las nanopartículas de quitosano.

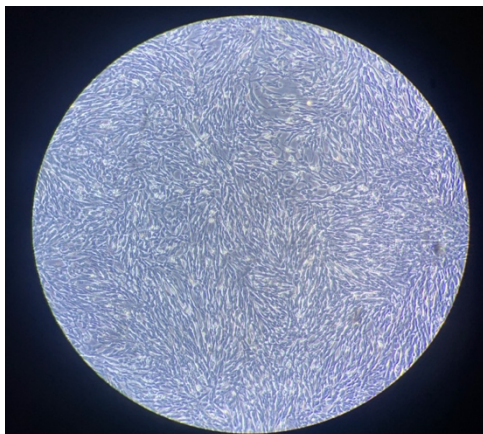


Figura 5. Fotografía tomada el 21 de mayo de 2024 a las células SH-SY5Y (pase 13) con las que se realizaría el experimento HPLC 2, la confluencia del cultivo era muy elevada, por lo que se realizó un pase celular.

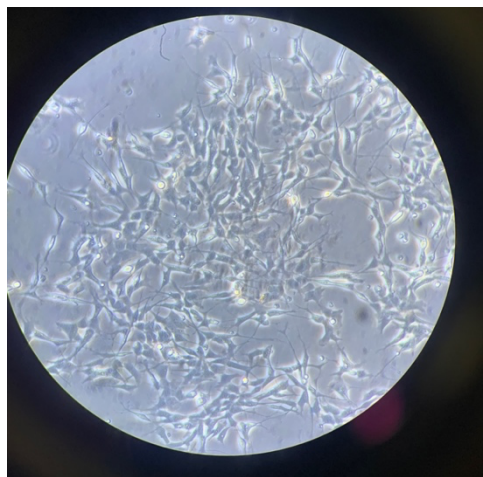


Figura 6. Fotografía tomada el 23 de mayo de 2024 a las células SH-SY5Y (pase 14) con las que se realizó el experimento HPLC 2. Es observable la disposición neuronal que estos neuroblastomas han adquirido al crecer en placa.

2.HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

-El ABA intracelular de neuronas o macrófagos se puede incrementar mejorando su biodisponibilidad por su encapsulamiento en nanopartículas de quitosano.

El trabajo tiene diversos objetivos:

- Encapsular ABA en nanopartículas de quitosano
- Evaluar la biodisponibilidad en neuronas y macrófagos de ABA encapsulado *in vitro*

3.MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Nanopartículas de quitosano

Las nanopartículas de quitosano (CNPs) fueron sintetizadas en los laboratorios del Departamento de Química de la UJI, en una colaboración interdisciplinaria con nuestro laboratorio. En los diferentes experimentos las CNPs tenían unas características de diámetro diferentes y en algunos, fueron sintetizadas de manera diferente, dando lugar a CNPs que presentan diámetros dispares o que están entrecruzadas con varios tipos de moléculas, bien TPP (tiamina pirofosfato) o ADN de salmón. En el experimento HPLC 1, con fecha 15/4/2024, las CNPs-ABA utilizadas fueron entrecruzadas únicamente con TPP, su diámetro medio era de 250 nm y se estimó una carga del 1% de ABA en cada CNP. En el experimento HPLC 2, con fecha 23/5/2024, se utilizaron dos tipos de CNPs-ABA que diferían en el tipo de síntesis. Unas CNPs-ABA fueron entrecruzadas con TPP, el tamaño medio del diámetro de éstas era de 288nm, aunque el diámetro del 90% de las CNPs-ABA se encontraba dentro del rango 12-79nm.

El diámetro medio de las CNPs entrecruzadas con ADN de salmón fue de 389,9 nm, y el rango en el que viraban el 90% de las CNPs fue de 37-91nm, en este experimento la carga estimada de ABA en las nanopartículas era del 13%.

Para el seguimiento de las nanopartículas en el interior celular, se utiliza FITC-CS, partículas de sílice carboxilada (CS) etiquetadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC), que es un fluorocromo visible en diferentes tipos de microscopía, como es la de fluorescencia o la microscopía confocal. Aunque la investigación pretende desarrollar unas CNPs que se dirijan de manera específica al cerebro, las CNPs utilizadas en estos experimentos son simples nanopartículas de quitosano unidas al fluorocromo, no se ha utilizado ninguna estrategia para este direccionamiento todavía.

3.2 Cultivos celulares

Las líneas celulares utilizadas para llevar a cabo los diferentes experimentos fueron SH-SY5Y y RAW 264.7

SH-SY5Y es una línea celular de neuroblastoma derivada de una biopsia de tumor óseo metastásico, las células utilizadas fueron SH-SY5Y sin diferenciar, por lo que la morfología neuronal es mucho más primitiva que en aquellas SH-SY5Y que están diferenciadas. El uso de células diferenciadas supone una inversión de tiempo y dinero, ya que conseguir esta condición obliga a utilizar un medio especial y a mantenerlas en la incubadora durante más días hasta obtener la diferenciación de los neuroblastomas. Por ahora, ya que los experimentos realizados se consideran experimentos pilotos, prefieren trabajar con las células en un estado más primitivo; cuando la investigación esté más avanzada y los resultados sean positivos, se realizarán a cabo los experimentos con neuroblastomas diferenciados. La línea celular RAW 264.7 en cambio, corresponde a macrófagos transformados aislados de la ascitis de ratones infectados con el virus de la leucemia murina de Albelson.

Ambas líneas celulares se cultivaron en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) completo, suplementado con 10% FBS, glutamina 100x y P/S 100 x. En el experimento 2 con fecha 26/4/2024, se utiliza medio DMEM suplementado con glutamina 100x y P/S 100x, el porcentaje de FBS en este caso fue de 0%. Para mantener estas células, se incubaron a una temperatura de 37°C en una atmosfera al 5% de CO₂ y una humedad relativa del 95%. Para hacer crecer las células se cultivaron en placas de 100 ml (P100), en cambio para realizar los estudios con CNPs y ABA se gastaron placas de cultivo de 6 pocillos (P6).

Las células estuvieron criopreservadas en nitrógeno líquido, para poder recuperarlas y utilizarlas en la investigación, se descongelaron en un baño de agua a 37°C y se les añadió medio DMEM completo que también se encontraba en el baño de agua, luego de resuspender con DMEM completo el pellet celular que se forma al centrifugarlas, se cultivan en una placa y se incuban en la estufa.

Para realizar el pase de las células SH-SY5Y, éstas se limpian con PBS-EDTA y al descartarlo se añaden 5ml de tripsina, que consigue disgregar aquellas células adheridas

en las placas de cultivo para así sembrar en nuevas placas, la placa con tripsina se incubó 5 minutos a 37°C. Pasado este tiempo se añadió DMEM completo para inhibir la tripsina y se centrifugó, al descartar el sobrenadante se obtiene un pellet celular que se resuspende en DMEM completo. Los pases realizados eran del tipo 1:4, por lo que agregamos 1ml de suspensión celular y 4 ml de DMEM completo a cada plato. En el caso del pasaje de las células RAW 264.7, después del lavado con PBS-EDTA, éstas se despegaban de la placa utilizando un raspador celular estéril en vez de utilizar tripsina y después se seguía el mismo procedimiento que con los neuroblastomas.

Para criopreservar las células y poderlas utilizar en otros experimentos, se realizan dos lavados con PBS-EDTA, posteriormente se añade 2ml de tripsina que se incuba durante 5 minutos a 37°C, pasado este tiempo inhibimos la tripsina con 5ml DMEM completo. Al centrifugar y descartar el sobrenadante se añaden 0,9 ml de DMEM completo. Una vez en un criotubo, se añade 0,1 ml de DMSO (dimetilsulfóxido) que evitará la formación de cristales de hielo durante la congelación, rápidamente se llevan a una cámara a una temperatura de -80°C, los tubos los introducimos en un contenedor para congelar que contiene isopropanol, consiguiendo así que la temperatura descienda constantemente, 1°C/minuto. Después de 24-48h a -80°C se pasan a un tanque que contiene nitrógeno líquido para su criopreservación.

En el experimento HPLC 2, se diluyeron 125 μ l de la solución de ABA libre (stock 20 mM) en 10 ml de medio DMEM, obteniendo una concentración final de 65 μ g/ml. Para la solución de las nanopartículas entrecruzadas con TPP se diluyeron 2 ml del tampón tris (stock 1,65 mg/ml) que contenía las CNPs con 6 ml de DMEM, obteniendo una concentración final de 0,41 mg/ml y en el caso de la solución de nanopartículas entrecruzadas con ADN de salmón, se diluyó 4,5 ml del tampón tris con las CNPs (stock 1,22 mg/ml) en 5,5 ml de medio DMEM, en este caso la concentración final fue de 0,540 mg/ml.

Para realizar la cuantificación del ABA intra y extracelular mediante HPLC, primero se recogió el medio de cultivo de las placas que corresponden a diferentes condiciones (control, solución ABA, CNPs-ABA + TPP y CNPs-ABA+ADN salmón). Las células que quedaron en placa se lavaron 2 veces con 1ml de PBS-EDTA y con ayuda de un raspador celular se despegaron de la placa de cultivo.

El pellet que obtenemos después de la centrifugación se resuspende en 200 μ l de tampón de extracción y lisis RIPA y se mantienen en hielo hasta que se pasa unos segundos por

el sonicador; en este momento se vuelve a centrifugar 13 minutos a potencia máxima (130000 rpm).

En la cuantificación por HPLC tenemos dos tipos de muestras, aquellas que pertenecen a las células resuspendidas en RIPA y el sobrenadante que corresponde al medio DMEM completo.

3.3 Solución de ABA libre

La solución de ABA libre (S-ABA) fue comprada en la empresa Duchefa Biochemie (con sede en Países Bajos), a partir de ésta se hizo un stock de 20mM con DMSO y con esta solución se prepararon las diferentes diluciones utilizadas en los experimentos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación.

3.4 Cuantificación de las CNPs en microscopía confocal

Para comprobar si ha tenido lugar la entrada de las CNPs al interior de las células se recurre a la microscopía confocal. Este tipo de microscopía además de localizar las nanopartículas marcadas con FITC, permite crear imágenes tridimensionales de las muestras observadas, pudiendo ver así las diferentes secciones celulares. Sumado a lo anterior, el uso de un microscopio confocal es interesante, ya que, al usar de manera coordinada un software como es el Image J, se puede medir la fluorescencia celular, cuantificando así la entrada de nanopartículas a diferentes concentraciones de éstas.

Mediante Image J se pueden medir diferentes parámetros de una imagen, estos parámetros son Area, IntDen y RawInt. Area hace referencia a la superficie seleccionada de la imagen para cuantificar, RawInt (Densidad Integrada Bruta) es un parámetro que se refiere a la señal total que aparece en el área seleccionada e IntDen (Densidad Integrada) sirve para poder comparar la intensidad de señal entre áreas o condiciones distintas, este parámetro a diferencia de RawInt tiene en cuenta el tamaño del área seleccionada. Para normalizar los resultados de la cuantificación realizada, se ha dividido IntDen por Area, de esta manera se puede eliminar el efecto del tamaño de las áreas a cuantificar.

3.5 Cuantificación por HPLC de ABA intra y extracelular

En la cuantificación del ABA intra y extracelular, se realizó una HPLC midiendo el sobrenadante y el lisado de las células que han sido incubadas con las CNPs, el protocolo a seguir fue el detallado en el apartado “Cultivos celulares”. Esta técnica se llevó a cabo desde el Servicio Central de Instrumentación Científica de la UJI.

Una matriz es el tampón o el medio de las muestras donde queremos detectar ABA, en este caso es el tampón RIPA y el medio DMEM. Para evitar el efecto matriz, que sucede cuando el analito interactúa con el tampón o el medio y se obtienen resultados imprecisos en la detección de éste, se enviaron junto a las muestras de lisado y de sobrenadante cantidades conocidas de tampón RIPA y medio DMEM fresco y se pasaron por el HPLC. A partir de las dos muestras se construye una recta de calibrado para corregir la matriz y que no se produzca el ya nombrado efecto matriz.

4.RESULTADOS

4.1 La entrada de CNPs es dependiente de la dosis de nanopartículas y más eficiente en la línea celular de macrófagos

En primer lugar, para conocer la cantidad de CNPs que entran al interior celular, se realizó una cuantificación de la fluorescencia de las nanopartículas mediante microscopia confocal y el software Image J. Para realizar esta cuantificación, se toman fotos con un microscopio confocal de tres muestras, tenemos diferentes muestras de células RAW 264.7 y células SH-SY5Y que han estado en contacto con diferentes concentraciones de CNPs (1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml y 50 mg/ml), además, como las células tienen fluorescencia propia, utilizamos una tercera muestra de células que no han estado en contacto con las nanopartículas, y por tanto con el fluorocromo, para utilizarlas como muestras control, a partir de estas muestras control se mide la autofluorescencia de las células. Sabiendo el valor de la autofluorescencia celular, podemos ajustar las herramientas de medición de la fluorescencia, obteniendo unos resultados más fiables y precisos.

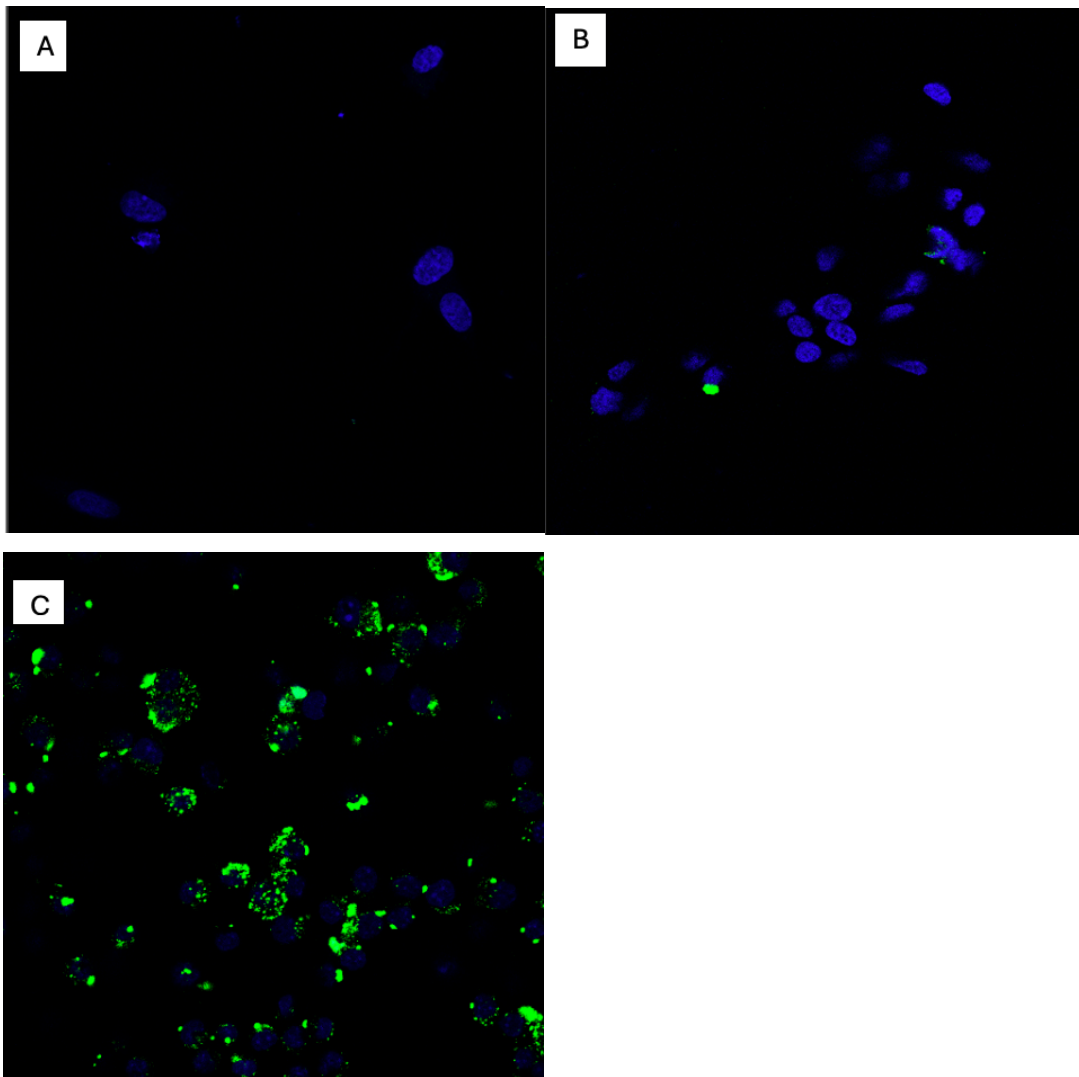


Figura 7. Imágenes de microscopía confocal de la fluorescencia celular a una concentración de CNPs de 20 mg/ml. (A) Muestra control (B) Línea celular SH-SY5Y(C) Línea células RAW 264.7

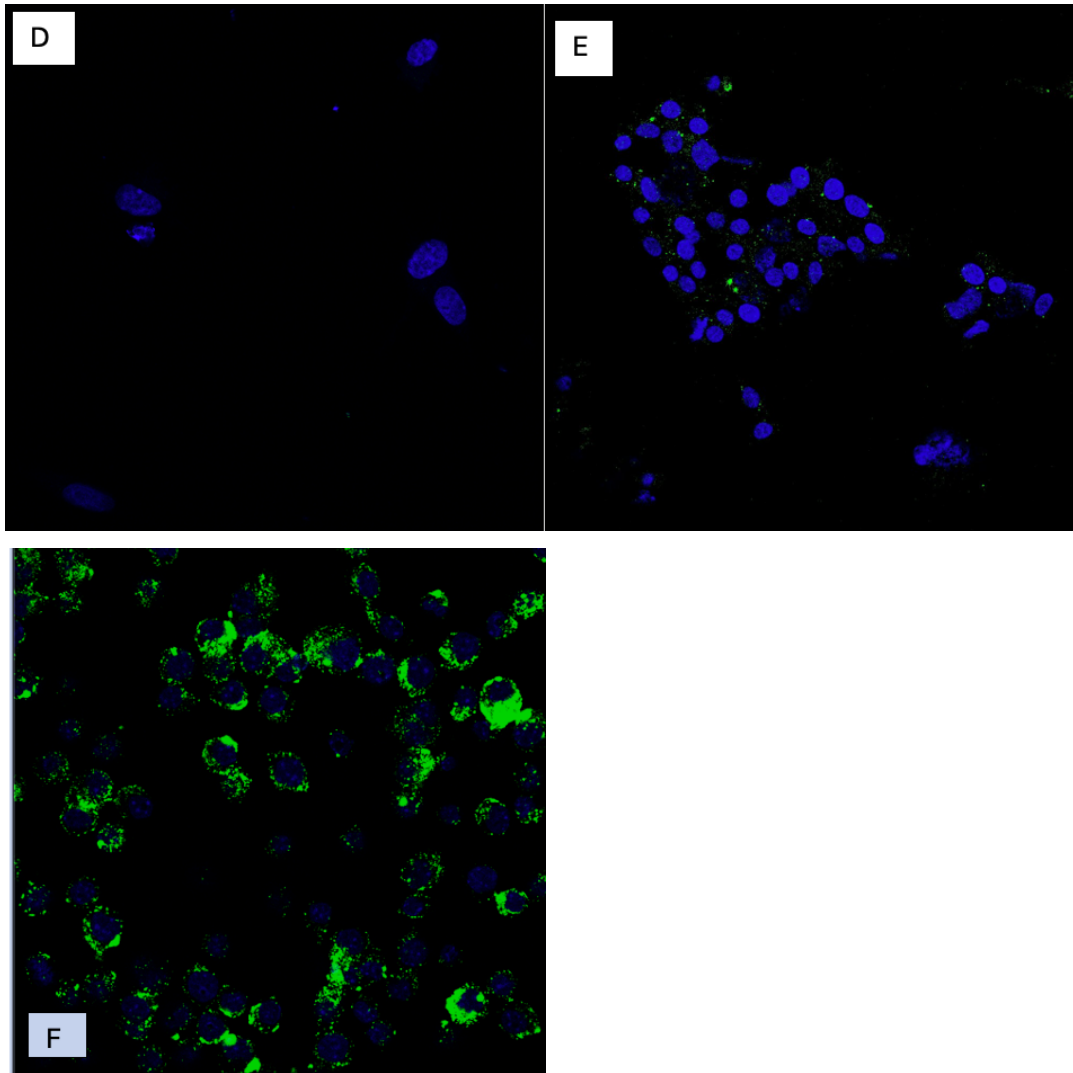


Figura 8. Imágenes de microscopia confocal de la fluorescencia celular a una concentración de CNPs de 50 mg/ml. (D) Muestra control (E) Línea celular SH-SY5Y (F) Línea celular RAW 264.7

Después de medir la fluorescencia con el Image J de diferentes imágenes, se realizó un análisis ANOVA de una variante de la media de la IntDen/ Area con el software PSPP, para así realizar la cuantificación de la fluorescencia. Los resultados siguientes (ver figura 9) corresponden al primer experimento que se realizó en febrero de 2024, estos hacen evidente que, al aumentar la concentración de nanopartículas, la entrada de éstas en las dos líneas celulares utilizadas aumenta también.

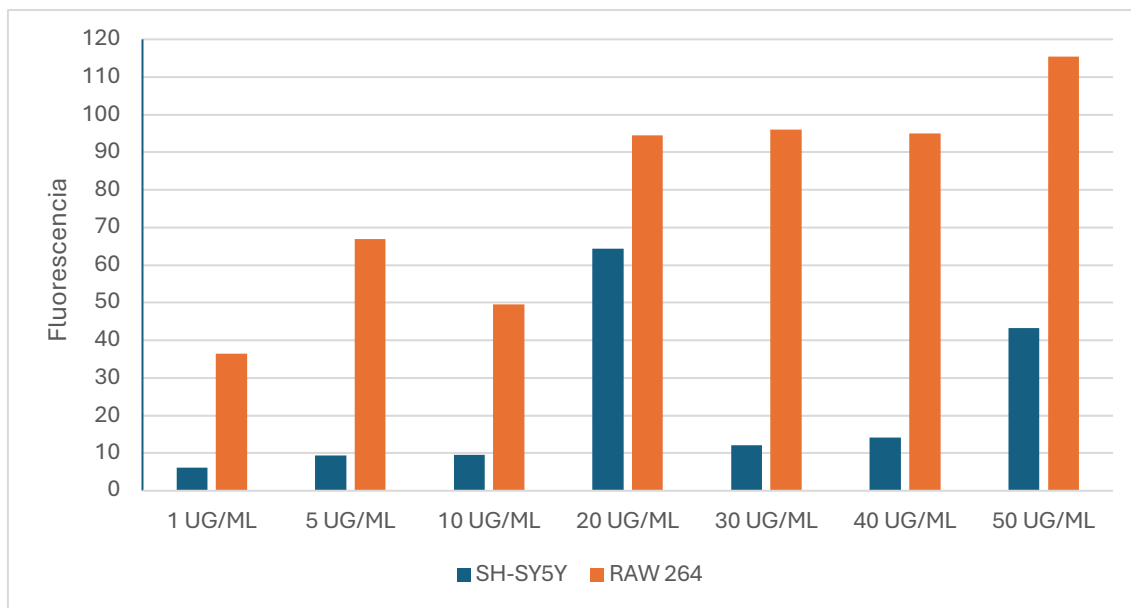


Figura 9. Valores de la fluorescencia celular respecto a la concentración de CNPs con la que estuvieron en contacto diferentes muestras celulares de RAW 264.7 y SH-SY5Y

En la figura 10 se observa en un gráfico lineal como la entrada de CNPs es más eficiente en la línea celular RAW 264.7 que en las células SH-SY5Y, correspondiente a neuroblastomas, pues en una concentración de 50 mg/ml la fluorescencia en RAW 264.7 es el triple que en SH-SY5Y. Como ya se ha mencionado, las células RAW 264.7 son macrófagos, de naturaleza fagocítica, por lo que están especializadas en la ingesta de material extraño para llevar a cabo su destrucción.

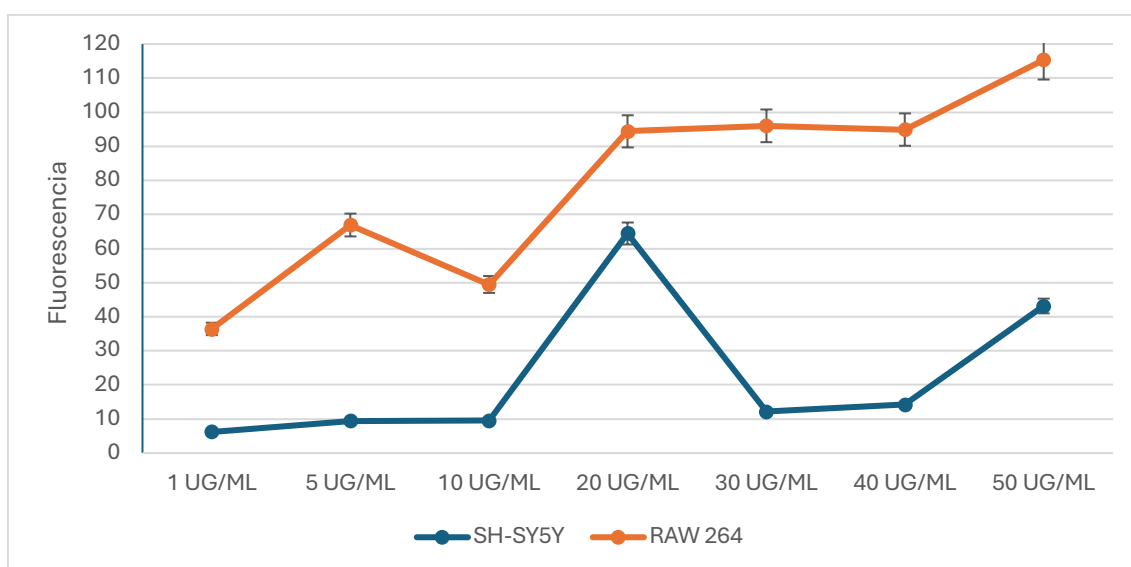


Figura 10. Valores de la fluorescencia celular respecto a la concentración de CNPs con la que estuvieron en contacto diferentes muestras celulares de RAW 264.7 y SH-SY5Y.

Por otro lado, la internalización se ha visto aumentada conforme se utilizaba una concentración de nanopartículas mayor, excepto cuando se utilizaba una concentración de 20 mg/ml en ambas líneas celulares. Como se observa en la figura 10, al llegar a una concentración de CNPs de 20 mg/ml, se observan dos picos muy elevados tanto en SH-SHY5Y como en RAW 264.7, aunque en los macrófagos se sigue esta tendencia, pues la fluorescencia sigue siendo elevada y alcanza el pico máximo cuando la concentración es máxima, 50 mg/ml. En el caso de los neuroblastomas, la concentración de 20 mg/ml supone el pico máximo de fluorescencia, siendo 64,43 la intensidad de la fluorescencia detectada frente a los 43,16 en la concentración máxima de 50 mg/ml, no se conoce el motivo de estos resultados, pero se descarta la toxicidad de las nanopartículas a una elevada concentración, ya que aunque a concentraciones de 30 mg/ml y 40 mg/ml la intensidad de la fluorescencia se reduzca a más de la mitad que a 20 mg/ml, cuando la concentración es de 50 mg/ml la fluorescencia aumenta nuevamente su intensidad. Los próximos experimentos relacionados con la fluorescencia y la detección de la internalización de las nanopartículas están encaminados en descubrir si se puede aumentar la concentración máxima de 50 mg/ml seleccionada en los experimentos de febrero de 2024; de esta manera se pretende averiguar a que concentración las CNPs pueden saturar las células o incluso ejercer un efecto tóxico sobre éstas, de la misma manera se quiere comprobar si al aumentar la concentración de CNPs sigue aumentando la intensidad de la fluorescencia.

4.2 El uso de CNPs no aumenta la entrada de ABA en las células

Para comprobar que las CNPs tienen la capacidad de liberar su contenido en el interior celular, se lleva a cabo un análisis por HPLC, que mide el ABA que se encuentra en el lisado y en el sobrenadante celular, para esto se incuban las células tanto en concentraciones diferentes de la solución que contiene las nanopartículas como en diferentes concentraciones de la solución de ABA libre. Se realizaron 2 ensayos de HPLC, uno de los experimentos fue llevado a cabo en abril de 2024 (HPLC 1) y el otro experimento fue realizado en mayo de 2024 (HPLC 2), en ambas ocasiones las células fueron incubadas durante 15-16 horas con una de las soluciones mencionadas anteriormente. Tanto en el experimento HPLC 1 como en el HPLC 2, la línea celular con la que se trabajó fue con las células SH-SY5Y, la densidad celular era de $0,5 \times 10^6$

células/cm²; en el caso del experimento HPLC 2 no se pudo trabajar con RAW 264.7 por un error en el cultivo de esta línea en el laboratorio; para evitar errores experimentales se hizo un replicado de cada una de las condiciones en las que se incubaron las células(ver figura 11).

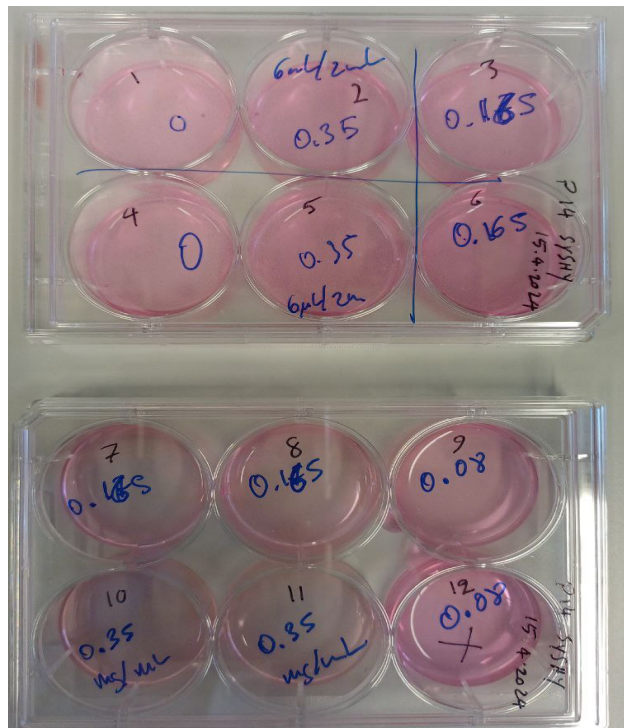


Figura 11. Disposición de los pocillos en el tratamiento con la solución de CNPs y ABA libre, parte del experimento HPLC 2. Los pocillos 1-6 contiene solución ABA libre, los pocillos 7-12 contienen la solución con nanopartículas a diferentes concentraciones
(1)0 mg/ml **(2)** 0.35 mg/ml **(3)** 0.165 mg/ml
(4) 0 mg/ml **(5)** 0.35 mg/ml **(6)** 0.165 mg/ml **(7)** 0.165 mg/ml **(8)** 0.165 mg/ml **(9)** 0.08 mg/ml **(10)** 0.35mg/ml **(11)** 0.35 mg/ml **(12)** 0.08 mg/ml

Después de lisar las células y recoger tanto el lisado como el sobrenadante celular, estas muestras, junto con las matrices, se trasladaron al Servicio Central de Instrumentación de la UJI, donde se realizó la técnica analítica por parte de los trabajadores de dicho servicio. En el HPLC 1, debido a la baja carga de ABA de las CNPs utilizadas y la baja concentración de las soluciones con las que se incubaron las células, los únicos resultados representativos fueron de aquellas muestras incubadas con 0,35 mg/ml de solución de CNPs y de 0,35 mg/ml de solución de ABA libre. En la figura 12 se aprecia la falta de ABA en el interior celular, tanto de las células tratadas con CNPs como de aquellas tratadas con ABA libre.

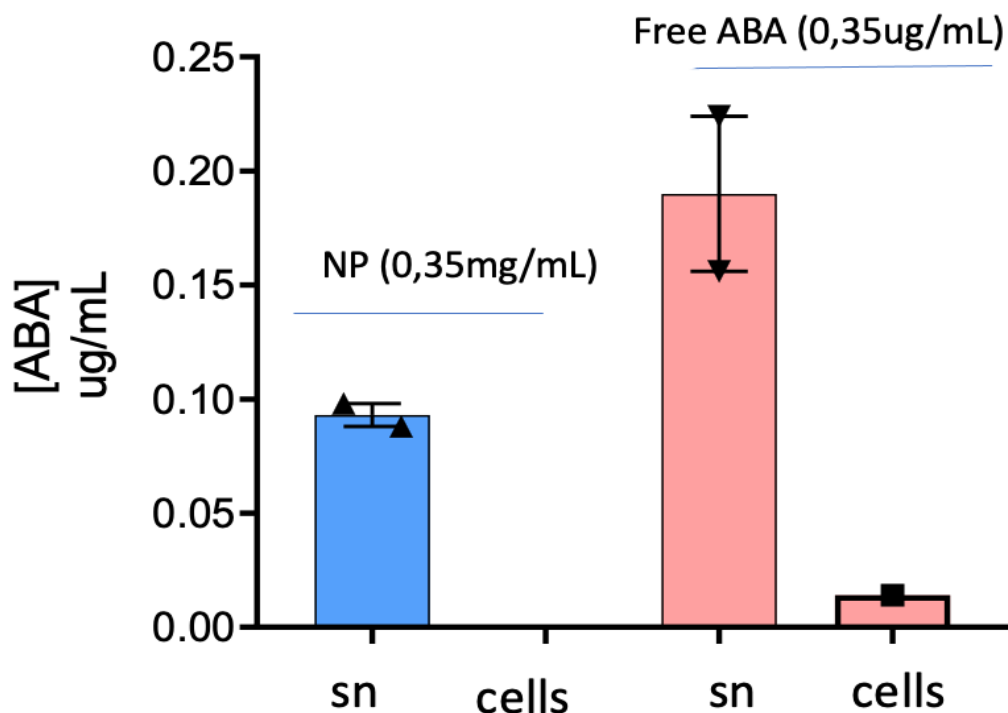


Figura 12. Valores de ABA intra y extracelular evaluados mediante HPLC en células SH-SY5Y en el experimento HPLC 1. Se representa la concentración de ABA en el sobrenadante (sn) y en el lisado celular (cells) de las muestras de SH-SY5Y incubadas con una concentración de nanopartículas de 0,35 mg/ml (azul) y con una concentración de la solución de ABA libre de 35 mg/ml(rojo).

En el experimento HPLC 2, se utilizaron 4 placas de P100 donde habían células SH-SY5Y cultivadas hasta el pase 14 (Figura 6), fueron incubadas durante 15-16 horas en diferentes condiciones: únicamente con medio DMEM, por lo que serviría de muestra control (concentración de ABA 0 ug/ml), con solución de ABA libre (concentración final de 0,65 ug/mL) y el tampón tris que contenía unas nanopartículas entrecruzadas con TPP (concentración final 0,41mg/ml) y otras entrecruzadas con ADN de salmón(concentración final 0,549 mg/ml). Las células tratadas con las nanopartículas entrecruzadas con el ADN de salmón murieron durante el periodo de incubación, por lo que no se pudo realizar el HPLC en esta condición. Desde el grupo de investigación se plantearon dos hipótesis para explicar la muerte de estas células, se pensó que este tipo de partícula puede afectar a la viabilidad de nuestras células o que las células sólo pueden soportar hasta un 25% de tampón tris, pues es lo que contiene la solución de CNPs-TPP, y en el caso de la solución de CNPs entrecruzadas con ADN de salmón la proporción del tampón tris es más elevada.

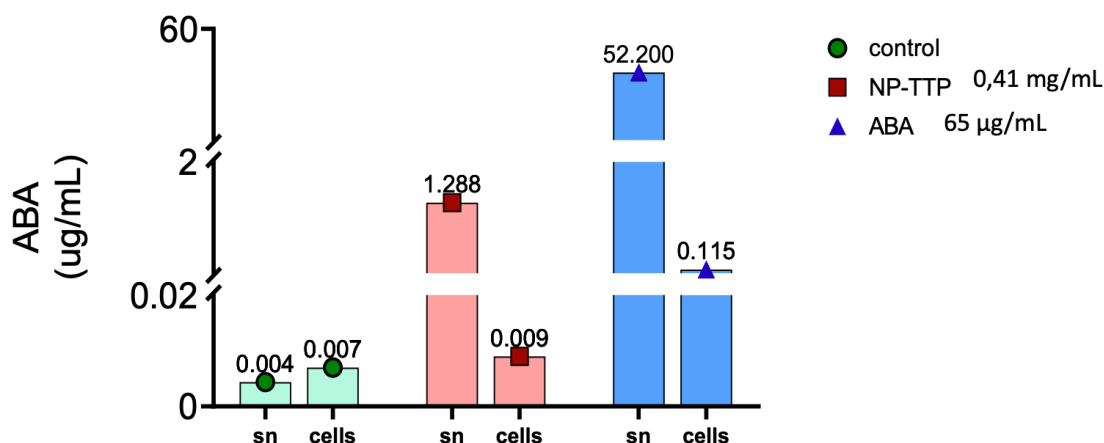


Figura 13. Valores de ABA intra y extracelular evaluados mediante HPLC en células SH-SHY5Y en el experimento HPLC 2. El color verde representa la muestra control, el rojo la muestra con la solución de nanopartículas entrecruzadas con TPP a una concentración de 0,41mg/ml y el azul la muestra con la solución de ABA libre a una concentración de 65 ug/ml. Se representa la concentración de ABA en el sobrenadante (sn) y en el lisado celular (cells).

Gracias a la muestra control, sabemos que los neuroblastomas tienen la capacidad de sintetizar ABA y que las nanopartículas de quitosano no liberan el ABA en el interior de las células, pues la concentración de la hormona en las células incubadas con las nanopartículas es prácticamente la misma que la muestra control (ver figura 13). Por otro lado, si observamos el gráfico anterior, es evidente que la mayor parte de la hormona de la solución de ABA libre se queda en el sobrenadante y no se interioriza en las células.

En fluorescencia, hasta usando una dosis diez veces más baja de CNPs, se observa entrada de éstas tanto en SH-SHY5Y como en RAW 264.7 (pues se ven resultados tanto en 5 mg/ml como en 50 mg/ml de CNPs), por lo que tanto el grupo de Neurobiotecnología como el Departamento de Química plantearon nuevas hipótesis y se propusieron distintos experimentos para conocer la causa de esta falta de ABA intracelular. Las hipótesis planteadas fueron que la CNP no se degrada ni el interior ni el exterior celular y que además, tampoco se libera ABA por difusión ni dentro ni fuera de la célula durante el periodo de incubación. Para intentar dar una explicación a la no detección de ABA en las células tratadas con nanopartículas se proponen nuevos experimentos para conocer mejor como se libera ABA de las CNPs; que puede ser bien por biodegradación del quitosano por enzimas como las lisozimas y/o por la difusión del ABA fuera de la CNP. Si en el experimento se comprueba que las CNPs son sensibles a las lisozimas, es decir, que las

lisozimas son capaces de degradar la nanopartícula y liberar la hormona, podríamos hablar de dos planteamientos diferentes para explicar los malos resultados del HPLC; se podría pensar que en el interior celular no se degradan las CNPs por falta de lisozimas o bien por la acumulación de las nanopartículas en un compartimento celular en el que no se encuentra dicha enzima. Se quiere conocer cómo se pueden degradar las nanopartículas y además conocer cuánto tiempo transcurre hasta que las CNPs liberan ABA, ya que tal vez, en ambos experimentos de HPLC han sido incubadas menos tiempo del que se necesita para que éstas comiencen a liberar la hormona, que fueron entre 15 y 16 horas. Además, se proponen realizar pruebas tanto con las células SH-SY5Y como con RAW 264.7, ya que los resultados de HPLC corresponden únicamente a los neuroblastomas y puede que al gastar los macrófagos en un nuevo experimento sí que tenga lugar la degradación de las CNPs y por tanto la liberación de ABA en la célula.

5.DISCUSIÓN

La idea de conjugar el ácido abscísico con nanopartículas de quitosano se basa en estudios realizados con anterioridad, en éstos se utiliza el quitosano u otros biopolímeros en forma de nanopartículas para dirigir de manera específica una molécula al cerebro y prevenir así la neuroinflamación que causa la EA u otras enfermedades neurodegenerativas. Los buenos resultados obtenidos en estos ensayos hacen creer que las nanopartículas de quitosano cargadas de ABA son una opción prometedora para prevenir esta condición.

Como se ha comentado en la introducción, en 2021, Abbas *et al* desarrollaron unos biopolímeros recubiertos de quitosano cargados de resveratrol para aumentar la biodisponibilidad de esta molécula en el cerebro. A diferencia de nuestro estudio, este grupo de investigación pudo demostrar en ensayos *in vitro*, que tras 1 hora y durante las 8 horas siguientes a la administración de las partículas, éstas liberaban resveratrol, el cual se iba acumulando en el interior de las células en cultivo. Por otro lado, demostraron que esta liberación dependía del diámetro de la nanopartícula, pues la formulación de partículas con el mayor diámetro produjo una menor liberación de resveratrol, además, se cercioraron de que ésta se veía condicionada inicialmente por la densidad de la bicapa vesicular, ya que en aquellos bilosomas recubiertos con quitosano el inicio de la liberación de resveratrol se veía retardado unas horas (ver figura 14).

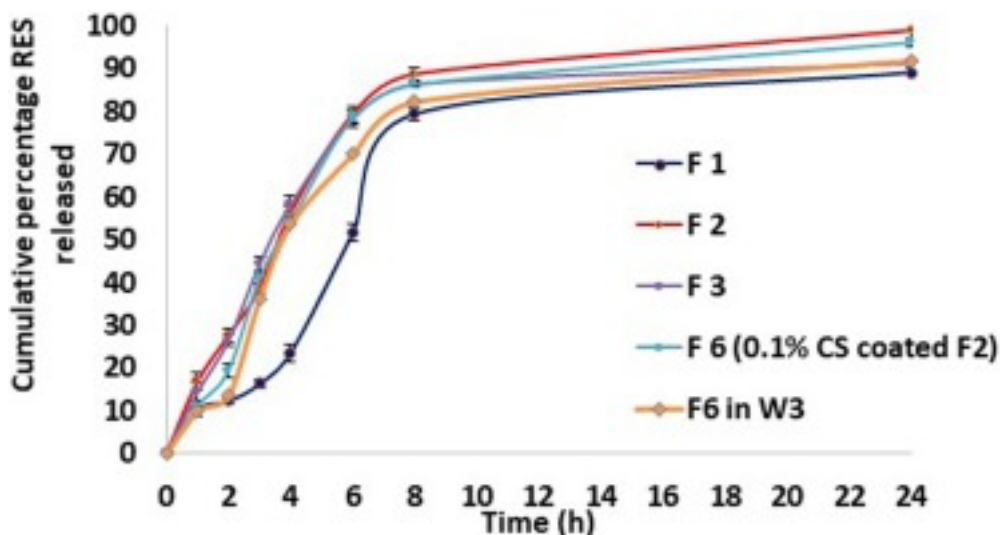


Figura 14. Liberación de resveratrol *in vitro* de diferentes síntesis de bilosomas. F1-F3 presentaban diferentes diámetros, donde el diámetro mayor lo presentaba F1. Al cubrir la partícula tipo F2 con quitosano obtenemos F6.(Abbas *et al.*, 2021)

También en 2021, se testó la eficiencia de la liberación sostenida del ácido fólico (FA) en estudios *in vitro*, testando la liberación de la molécula de manera libre, encapsulada en nanopartículas sólidas lipídicas (SLNs) y encapsulada en SLNs cubiertas con quitosano para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. En este estudio se observó la liberación de la molécula durante 12 horas, los resultados mostraron que apenas 19% del FA libre se liberó durante este tiempo; en cambio, al encapsular la molécula en SLNs y al recubrir éstas de quitosano, la acumulación de FA se vio aumentada al 70-80%, siendo más elevada en aquellas sin recubrir, por lo que la liberación era mucho más controlada en las nanopartículas recubiertas de quitosano. En ensayos *in vitro*, también se vio que la tasa, y a su vez el grado, de disolución de estas SLNs era superior al no estar recubiertas, ya que, al recubrirlas con una capa de quitosano, dicho material forma una barrera alrededor de la nanopartícula y dificulta la disolución de la partícula. (Saini *et al.*, 2021).

Con estos estudios observamos que el recubrimiento con quitosano retrasa la liberación de las moléculas encapsuladas. En ambos estudios las partículas únicamente están recubiertas con este material, puede ser que, en nuestro estudio, al tratarse de nanopartículas íntegras de quitosano y no recubiertas de este material como sucede en los ensayos nombrados anteriormente, las 15-16 horas de incubación de las CNPs no han sido suficientes para que la partícula se llegue a degradar de manera total, empezando así la liberación del ácido abscísico en el interior celular. Aunque se haya comprobado que la

liberación de las moléculas anteriores se reduzca al recubrir las partículas de quitosano, mediante la utilización de nanopartículas de este material se puede conseguir una liberación de la molécula más controlada y sostenida, pudiendo obtener así unos resultados más concretos y exactos, siendo más apropiados para su uso en terapias médicas.

6.CONCLUSIÓN

Aunque los resultados obtenidos en los primeros meses de esta investigación son escasos para poder discutirlos y tampoco son muy concluyentes, se ha podido demostrar que las nanopartículas de quitosano que contienen ABA diseñadas y sintetizadas en los laboratorios de la UJI logran entrar en el interior de las células en cultivo. Cabe remarcar que todos estos experimentos, considerados todavía pilotos, se han llevado a cabo *in vitro*, por lo que muchos de los resultados pueden cambiar una vez que se testen *in vivo* con modelos de animales. Esto es debido tanto al control total que se tiene de las condiciones de los cultivos celulares, como a las interacciones entre diferentes sistemas biológicos que tienen lugar en los experimentos *in vivo*, además las dosis a administrar en el caso de la experimentación animal serán distintas a las que se administra en los ensayos *in vitro*. Por otro lado, al ser resultados pertenecientes a las primeras fases de la investigación no tienen la importancia que tendrían unos resultados finales, pero éstos son clave para el desarrollo del estudio, ya que aparecen problemas a resolver que no se habían planteado en un inicio o se ha evidenciado que algunos fenómenos que se habían dado por hecho no lo son.

Los proyectos de futuro de esta investigación, una vez que los resultados de los experimentos piloto lo permitan, se basan en utilizar estas nanopartículas modificadas para su entrega específica al cerebro en ensayos *in vivo* con modelos animales de Alzheimer, estudiando el efecto local del ácido abscísico en la neuroinflamación. Cabe destacar que el uso de estas nanopartículas cargadas de ácido abscísico puede resultar útil en terapias aplicadas hacia otras patologías, pues ABA tiene un efecto beneficioso tanto en enfermedades cardiorrenales, como pulmonares e intestinales, por lo que se podrían diseñar estas nanopartículas para su liberación dirigida y controlada hacia otras zonas del organismo.

7.BIBLIOGRAFÍA

- Abbas H., Refai H., El Sayed N., Rashed L.A., Mousa M.R & Zewail M. (2021) Superparamagnetic iron oxide loaded chitosan coated bilosomes for magnetic nose brain targeting of resveratrol. *International Journal of Pharmaceutics*; 610. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121244>
- Carvajal Carvajal, C (2016) Biología molecular de la enfermedad de Alzheimer. *Medicina Legal de Costa Rica*; 33(2):109-128 https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152016000200104
- Espinosa-Fernández V., Mañas-Ojeda A., Pacheco-Herrero M., Catro-Salazar E., Ros-Bernal F. & Sánchez-Pérez A.M. (2019). Early intervention with ABA prevents neuroinflammation and memory impairment in a triple transgenic mice model of Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research*; 374: 21-28. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112106>
- Guo Q., Li Y., Xu S., Wang P., Qian K., Yang P., Sheng D., Wang L., Cheng Y., Meng R., Cao J., Luo H., Wei Y., Zhang Q. (2023) Brain-neuron targeted nanoparticles for peptide synergy therapy at dual-target of Alzheimer's disease. *Journal of Controlled Release*; 355: 604-621. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2023.01.074>
- Jaferník K., Ładniak A., Blicharska E., Czarnek K., Ekiert H., Wiącek A.E. & Szopa A. (2023) Chitosan-Based Nanoparticles as Effective Drug Delivery Systems-A review. *Molecules*; 28(4):1963. <https://doi.org/10.3390/molecules28041963>
- Kellar D.& Craft S. (2020) Brain insulin resistance in Alzheimer's disease and related disorders: mechanisms and therapeutic approaches. *Lancet Neurology*; 19(9):758-766. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(20\)30231-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30231-3)
- Kovalevich, J., & Langford, D. (2013) Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology. *Methods in Molecular Biology*; 1078:9-21. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-640-5_2
- Morales G. I., Farías G.G y Maccioni B. R. B. (2010) La neuroinflamación como factor detonante del desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. *Revista chilena de neuro-psiquiatría*; 48(1):49-57. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-92272010000200007>
- Rejman J., Oberle V., Zuhorn I. S. & Hoekstra D. (2004) Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae- mediated endocytosis. *Biochemical Journal*; 377(1): 159-169. <https://doi.org/10.1042/BJ20031253>
- Saini S., Sharma T., Jain A., Kaur H., Katare O.P. & Singh B. (2021) Systematically designed chitosan-coated solid lipid nanoparticles of ferulic acid for effective management of Alzheimer's disease: A Preclinical evidence. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*; 205. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111838>

-Sánchez-Pérez A.M. (2019) Abscisic acid, a promising therapeutic molecule to prevent Alzheimer's and neurodegenerative diseases. *Neural Regeneration Research*; 15(6): 1035-1036. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.270307>

-Sánchez-Sarasúa, S., Moustafa, S., García-Avilés, Á., López-Climent, M.F., Gómez-Cárdenas, A., Olucha-Bordonau, F.E. & Sánchez-Pérez, A. M. (2016) The effect of abscisic acid chronic treatment on neuroinflammatory markers and memory in a rat model of high-fat diet induced neuroinflammation. *Nutrition & Metabolism*; 13:73. <https://doi.org/10.1186/s12986-016-0137-3>

-Yang L., Wang Y., Zheng G., Li Z. & Mei J. (2023) Resveratrol-loaded selenium/chitosan nano-flowers alleviate glucolipid metabolism disorder-associated cognitive impairment in Alzheimer's disease. *International Journal of Biological Macromolecules*; 239. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124316>

-Zhang Q., Jin K., Chen B., Liu R., Cheng S., Zhang Y. & Lu J. (2022) Overnutrition Induced Cognitive Impairment: Insulin Resistance, Gut-Brain Axis, and Neuroinflammation. *Frontiers in Neuroscience*; 16. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.884579>

8.AUTOEVALUACIÓN

La valoración de mi estancia en prácticas en el grupo de Neurobiotecnología de la UJI es positiva, ya que gracias a estos meses en sus laboratorios he podido conocer como es la ciencia desde la perspectiva de una biotecnóloga y no como la de una estudiante.

A parte del aprendizaje en el laboratorio, pues he empezado a desenvolverme con facilidad en sus instalaciones y a familiarizarme con instrumentos o con técnicas que antes de llegar allí desconocía, he podido saber cómo es una investigación desde dentro. Gracias a Ana María, la responsable del grupo, he conocido como se desarrolla esta investigación, desde el planteamiento de los experimentos hasta la discusión de los resultados, aprendiendo también que no siempre son positivos y que pueden aparecer problemas no planteados con anterioridad.

A pesar de que los resultados obtenidos durante mi estancia de prácticas sean escasos y con muy poca relevancia, ya que son experimentos piloto, reflejan a la perfección lo que supone el inicio de una investigación. De estos malos resultados es de donde más he llegado a aprender en estos meses, pues te hace tener una visión un poco más crítica de la ciencia y a buscar otras alternativas en tus experimentos para poder obtener los resultados deseados.

Por otro lado, trabajar en esta rama de la biotecnología me ha sorprendido bastante, ya que durante los 4 años de carrera nunca había entrado en este campo, y gracias a la estancia en prácticas me he dado cuenta de la importancia de la biotecnología en él.

9.ANEXOS

Compound name: aba
 Coefficient of Determination: $R^2 = 0.999537$
 Calibration curve: $-55.7722 * x^2 + 13975.3 * x + 9523.02$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

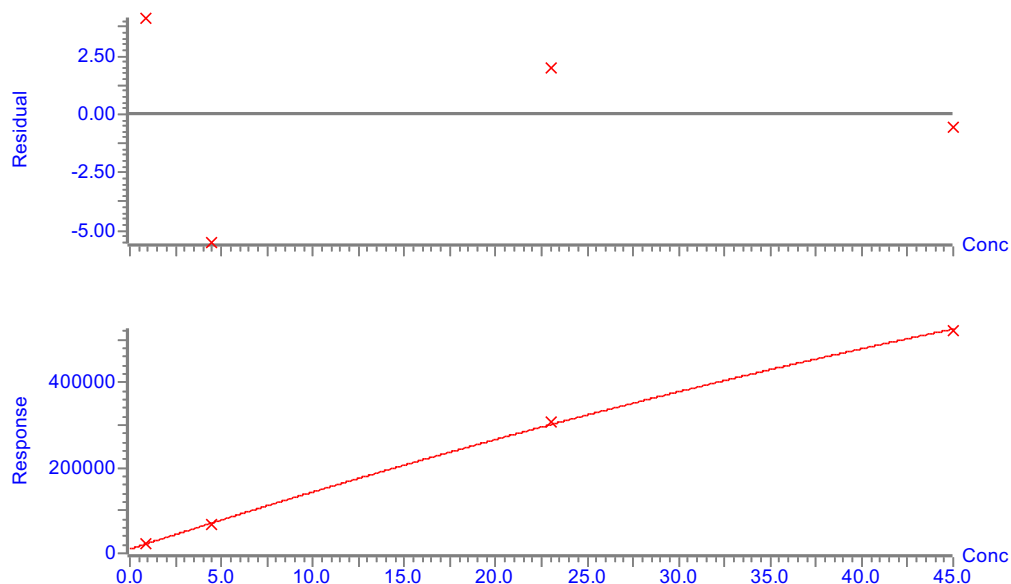
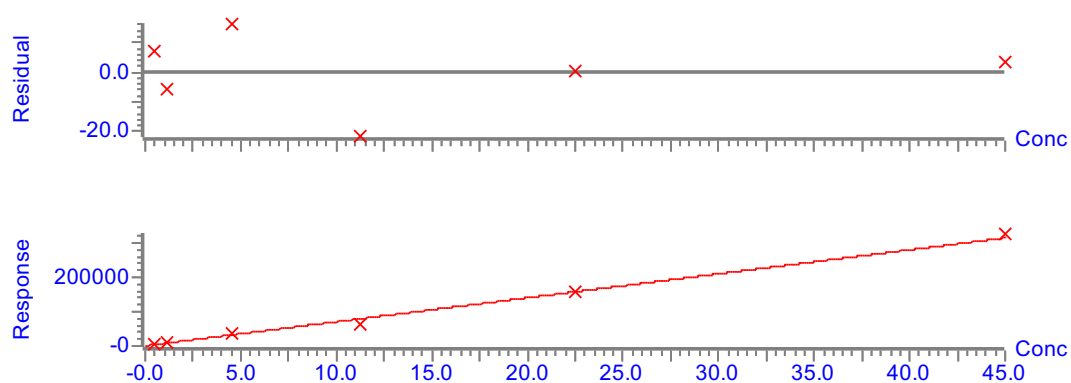
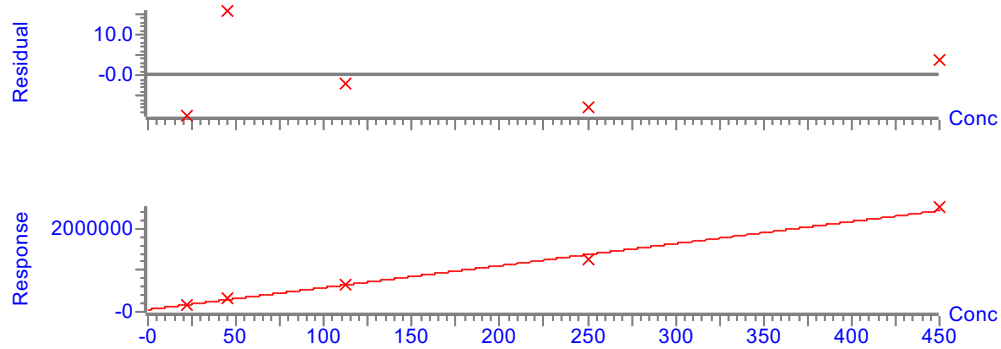


Figura suplementaria 1. Curva de calibrado del experimento HPLC 1

Compound name: aba
 Correlation coefficient: $r = 0.995282$, $r^2 = 0.990587$
 Calibration curve: $6971.29 * x + 957.861$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Compound name: aba
 Correlation coefficient: $r = 0.996957$, $r^2 = 0.993922$
 Calibration curve: $5284.2 * x + 50988.1$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x$, Axis trans: None



Figuras suplementarias 2 y 3. Curvas de calibrado del HPLC 2. La muestra 3 (segunda imagen) correspondiente al sobrenadante de las células incubadas con solución de ABA libre se tuvo que analizar por separado diluyendo x100 ppm ya que saturaba el detector, la curva de la derecha es la correspondiente a dicha muestra.