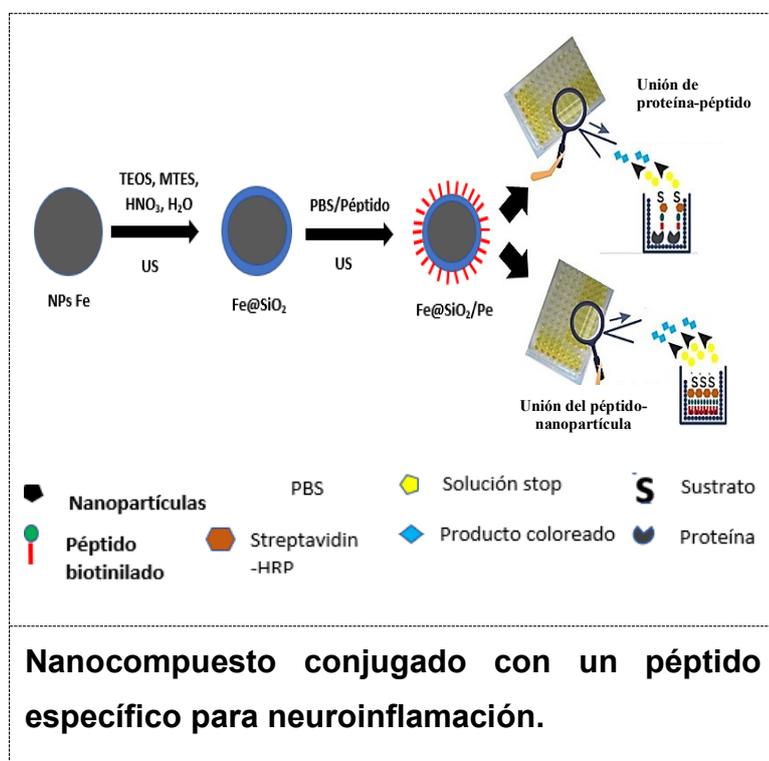


Evaluación de la unión de un péptido marcador de neuroinflamación con diferentes proteínas blanco y su conjugación con nanopartículas superparamagnéticas

Evaluation of the union of a neuroinflammation marker peptide with different target proteins and its conjugation with superparamagnetic nanoparticles

Graphical Abstract (GA)



Evaluación de la unión de un péptido marcador de neuroinflamación con diferentes proteínas blanco y su conjugación con nanopartículas superparamagnéticas

Evaluation of the union of a neuroinflammation marker peptide with different target proteins and its cytotoxicity when conjugated with superparamagnetic nanoparticles

Yehidi Julieth Medina Castillo*

** Programa de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Antonio Nariño.*

*Dirigido por: Dra. Mónica Losada Barragán
Co-dirigido por: Dr. Daniel Llamosa*

Resumen

La neuroinflamación es caracterizada por presentar alteraciones en la barrera hematoencefálica, y activación de las células glía, conduciendo a eventos patológicos, esto ha llevado a la necesidad de mejorar la técnica de imagen por resonancia magnética que permitan comprender el desarrollo y progresión de las alteraciones de la barrera hematoencefálica en tiempo real, bajo condiciones neuroinflamatorias. Como una alternativa a esta solución, se propone establecer la unión de un péptido marcador de neuroinflamación con su proteína blanco y su conjugación con nanopartículas superparamagnéticas. Los resultados muestran que las nanopartículas magnéticas presentan una forma esférica con un tamaño 54 ± 10 nm, la composición química Fe@SiO₂ y una curva de histéresis magnética indicando un comportamiento superparamagnético; la evaluación de la unión del péptido-88 con su posible proteína receptora mostró una mayor unión entre el péptido-88 con laminina β 1, igualmente se estudió la unión del péptido-88

con las nanopartículas demostrando una mayor unión a diferencia del blanco. El presente estudio evidenció que al establecer la funcionalización de nanopartículas superparamagnéticas conjugadas a un péptido biomarcador de neuroinflamación, pueden ser utilizadas para el diagnóstico temprano y evolución en tiempo real de los mecanismos desencadenados bajo condiciones neuroinflamatorias.

Abstract

Neuroinflammation is characterized by presenting alterations in the blood-brain barrier, and activation of glial cells, leading to brain tissue alterations generating a pathology, this has led to the need to improve the magnetic resonance imaging technique that allows understanding the development and progression of alterations of the blood-brain barrier in real time, under neuroinflammatory conditions. As an alternative to this solution, it is proposed to establish the binding of a neuroinflammation marker peptide with its target protein and its conjugation with superparamagnetic nanoparticles. The results show that the magnetic nanoparticles have a spherical shape with a size of 54 ± 10 nm, the chemical composition Fe @ SiO₂ and a magnetic hysteresis curve indicating a superparamagnetic behavior; The evaluation of the binding of peptide-88 with its possible receptor protein showed a greater binding between peptide-88 with laminin β 1, likewise the binding of peptide-88 with the nanoparticles was studied, demonstrating a greater binding unlike the target. The present study showed that by establishing the functionalization of superparamagnetic nanoparticles conjugated to a neuroinflammation biomarker peptide, they can be used for early diagnosis and real-time evolution of the mechanisms triggered under neuroinflammatory conditions.

Palabras claves: Neuroinflamación, barrera hematoencefálica, nanopartículas superparamagnéticas, péptido biomarcador, proteínas blanco, cultivos *in vitro*.

Keywords: Neuroinflammation, blood-brain barrier, superparamagnetic nanoparticles, biomarker peptide, target proteins, *in vitro* cultures.

1. INTRODUCCIÓN

La barrera hematoencefálica (BHE) es un término empleado para describir la barrera física de la microvasculatura del sistema nervioso central (SNC). La BHE regula el movimiento de moléculas, iones y células, entre la sangre y el SNC (Lucchinetti, 2008; Varatharaj & Galea, 2017). A su vez, la BHE coordina diferentes actividades como transporte, metabolismo, propiedades físicas y regulaciones de interacciones celulares; la función de la BHE permite una función neuronal, que consiste en proteger el SNC de toxinas, patógenos, inflamación, lesiones y enfermedades (**Figura 1**).

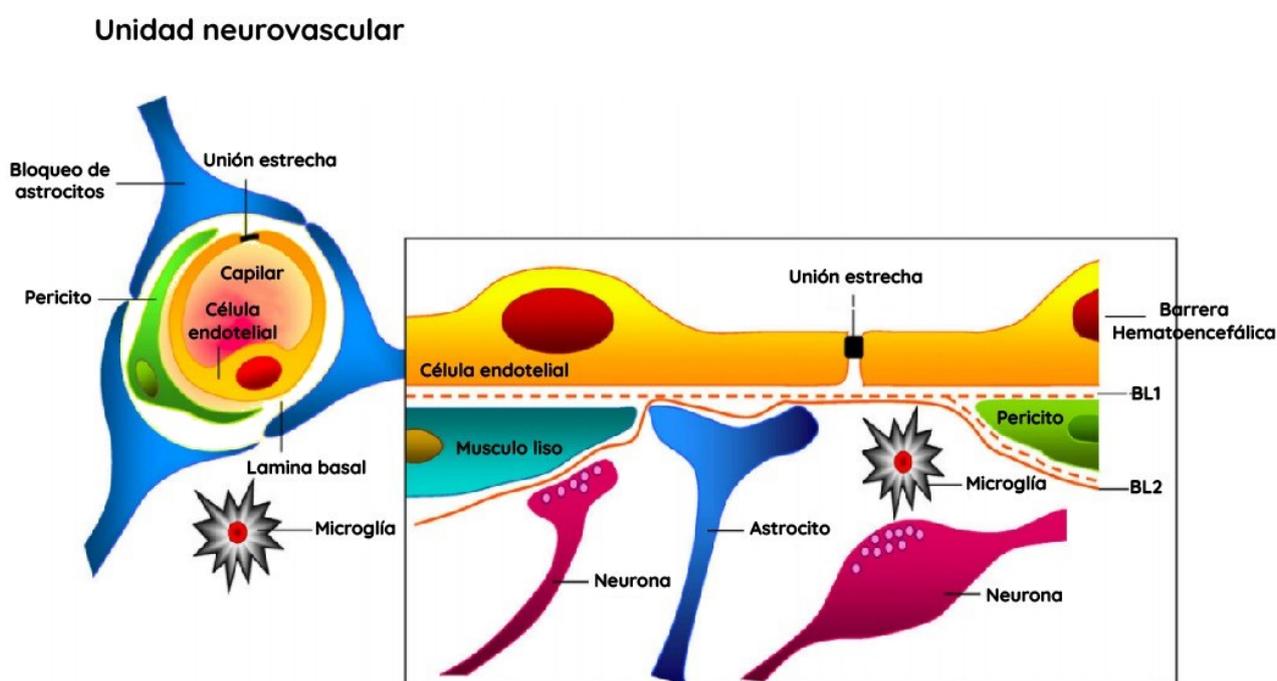


Figura 1. El microambiente de BHE. La BHE es un sistema complejo formado por células endoteliales conectados por uniones estrechas para controlar la difusión celular a través de estos. Tomado de (Abbott et al., 2006).

Las propiedades de la BHE se manifiestan en las células endoteliales, estas son inducidas por interacciones con las células murales, células inmunes, células gliales y células neuronales, que interactúan en la unidad neurovascular (**Figura 1**). La disfunción de la BHE puede producir desregulación iónica, alteración en la homeostasis, permitir la entrada

de células y moléculas que pueden conducir a la difusión y degeneración neuronal (Daneman & Prat, 2015).

Las lesiones neuroinflamatorias se caracterizan por la ruptura de las uniones estrechas en la BHE y activación de las células glía. Siendo estas células las primeras que participan en el proceso neuroinflamatorio. Las células gliales detectan la presencia de daño tisular mediante la activación en un patrón de reconocimiento inmunológico para la detección de agentes moleculares extraños y nocivos (Balistreri et al., 2009; Di Virgilio et al., 2009; Husemann et al., 2002).

Los principales factores que desencadenan procesos de neuroinflamación en los tejidos del sistema nervioso, incluyen infección, autoinmunidad, metabolitos tóxicos, traumas, hemorragias, isquemia, agregación proteica, entre otros (Estrada-rojo et al., 2018; Gendelman, 2002). La neuroinflamación es característica de un gran número de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson (Hirsch et al., 2012), Alzheimer (Heneka et al., 2015), esclerosis múltiple (Naegele & Martin, 2014) y traumas (Kandelaki et al., 2015).

Las anomalías generadas en el tejido cerebral por la neuroinflamación pueden identificarse mediante la técnica de imagen por resonancia magnética (IRM). Esta técnica produce imágenes anatómicas tridimensionales detalladas y no invasivas *in vivo*. La IRM es ampliamente empleada para monitorear la integridad en la BHE y el desarrollo de procesos neuroinflamatorios en relación con la progresión de enfermedades neurodegenerativas (Engelhardt & Ransohoff, 2012; Filippi et al., 2014; Issa & M. Obaidat, 2019).

La resonancia magnética ha contribuido a mejorar el diagnóstico temprano de las enfermedades neurodegenerativas, proporcionando información sobre los mecanismos de disfunción neurológica, como el daño axonal y la implicación en la interrupción de la BHE

como un evento temprano en el desarrollo de la lesión (Dijkhuizen & Nicolay, 2003). Al utilizar la técnica de IRM permite monitorear la integridad de la BHE en relación al progreso de las enfermedades, basándose en la detección de fugas de agente de contraste, administrado por vía intravenosa del flujo sanguíneo al parénquima cerebral (Dijkhuizen, 2011).

El diagnóstico de lesiones neuroinflamatorias presenta dificultades relacionadas con la técnica debido a sus altos costos (Lewczuk et al., 2015). Para mejorar la calidad del diagnóstico de diferentes enfermedades neurodegenerativas, es posible emplear marcadores de procesos moleculares, con la finalidad de medir una interacción entre un sistema biológico, un agente químico y físico. Además, el uso de marcadores permite evaluar una respuesta fisiológica y funcional, que ocurre a nivel celular y molecular, que puede estar relacionada con la probabilidad del desarrollo de la patología (Yi et al., 2013). A un es necesario desarrollar marcadores acoplados a agentes de contraste que permitan comprender el desarrollo y progresión de sus alteraciones en tiempo real (Garre Olmo, 2018; K. Petry et al., 2016; Vellinga et al., 2008).

Como agente de contraste en IRM principalmente se ha empleado gadolinio (Gd) y a su vez, se está implementando el uso de nanopartículas como agentes de contraste como lo son las partículas ultra pequeñas de óxido de hierro (USPIO) (Dousset et al., 2006) (Issa & M. Obaidat, 2019). El Gd, es usado en resonancia magnética para visualizar la descomposición de la BHE en la isquemia cerebral, enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson (EP) y esclerosis múltiple (Vellinga et al., 2008). No obstante, el Gd-IRM presenta limitaciones para brindar información sobre el tráfico de células inmunitarias a través de la BHE dañada, mientras que los agentes de nanopartículas de hierro, tienen mayor sensibilidad al análisis de resonancia magnética que Gd al inducir una intensidad de señal diferente a la de los tejidos y a diferencia del Gd, el hierro es

biodegradable debido a que puede descomponerse por acción de agentes biológicos, biocompatible ya que tiene la capacidad de un material para actuar con una respuesta adecuada de un medio biológico y puede reciclarse mediante células (Stoll & Bendszus, 2009; Zaharchuk, 2007); también al ser metabolizadas, los iones de hierro de estas nanopartículas (NPs) son añadidos a los depósitos de hierro del organismo y eventualmente incorporados por los eritrocitos como parte de la hemoglobina (Weissleder et al., 1990). Debido a esto, se está implementando como agente de contraste en IRM las nanopartículas compuestas hierro (Sicotte, 2011; Zlokovic, 2008).

Las nanopartículas de óxido de hierro (NPsFe), con un tamaño que oscila entre 20 – 60 nm, son de particular interés debido a sus propiedades magnéticas intrínsecas únicas, conocidas como superparamagnéticas y una alta estabilidad coloidal (Issa & M. Obaidat, 2019; Iv et al., 2015). Estas nanopartículas presentan una relajación de resonancia magnética alta necesaria para su empleo en IRM, esta relajación se produce cuando la magnetización se recupera tras un pulso de un campo magnético externo. Además, las NPsFe presentan una mayor sensibilidad para detectar cierto tipo de lesiones inflamatorias. Las características anteriores comparadas con los agentes paramagnéticos de contraste como el gadolinio, hace que las NPsFe generen una señal de IRM lo suficientemente fuerte como para visualizar un pequeño número de células. Por lo tanto, son los nanoconstituyentes con mayor interés para aplicaciones biomédicas (He et al., 2014; Iv et al., 2015).

Las nanopartículas superparamagnéticas pueden generar nuevas estrategias de diagnóstico al conjugarse con marcadores moleculares permitiendo la identificación de receptores específicos, los cuales sufren modificaciones durante el desarrollo de la

neuroinflamación y pueden ser diferenciados desde las regiones sanas del cerebro, sin aparente lesión (K. G. Petry et al., 2007; Wong et al., 2012a). Por tanto, el uso de nanopartículas superparamagnéticas conjugadas con péptidos biomarcadores puede incrementar la penetración y selectividad celular, facilitando el diagnóstico y tratamiento de desórdenes en la BHE, así como la reducción significativa de su neurotoxicidad (K. G. Petry et al., 2007; Wong et al., 2012a).

Las nanopartículas superparamagnéticas (SPMNP) han sido aplicadas *in vitro* e *in vivo* para la obtención de imágenes moleculares (Neuberger et al., 2005; Sharifi et al., 2015). En pacientes con esclerosis múltiple, el uso de resonancia magnética empleando como agente de contraste nanopartículas de hierro (NPs Fe) ha mostrado una sensibilidad mayor que el gadolinio (McConnell et al., 2016). Estas partículas también pueden revelar lesiones del SNC en encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) que no son detectables por los agentes de contraste convencionales en IRM (Kiliç et al., 2016; Millward et al., 2013). También se ha planteado el uso de NPs Fe para visualizar la infiltración en el parénquima cerebral, otro aspecto crucial de la inflamación (Vellinga et al., 2008). Por consiguiente, las nanopartículas superparamagnéticas pueden ayudar a detectar eventos inflamatorios sutiles y tempranos que de otro modo serían imperceptibles (Kiliç et al., 2016; Millward et al., 2013; Xiao, 2019).

Los materiales a nanoescala tienen una actividad científico-tecnológica que involucra el diseño, síntesis, caracterización, aplicación de materiales y dispositivos con al menos una de las dimensiones en nanoescala (1 - 100 nm) (Roco, 2011), son de especial importancia debido a su tamaño compatible con células (10 - 100 μm)(Estelrich et al., 2015). Estos nanomateriales son tan pequeños como para moverse dentro del cuerpo sin interrumpir las funciones normales, penetrando en lugares inaccesibles para otros materiales

microscópicos (Estelrich et al., 2015). Sin embargo, las nanopartículas pueden generar efectos tóxicos manifestados en cambios en la morfología celular, la función mitocondrial y apoptosis (Dresco et al., 1999; Moghimi et al., 2001; Willner & Willner, 2002).

Dentro del espectro de nanopartículas metálicas, aquellas compuestas por hierro (Fe) no presentan un efecto citotóxico medible a dosis bajas (1–50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Keenan et al., 2009; Lourenço et al., 2019; Mirzaei et al., 2018), mostrando un efecto significativo solo a concentraciones altas (100 - 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Costa et al., 2016; Gupta & Wells, 2004; Moura & Houten, 2010; Patil et al., 2018). Además, las nanopartículas de Fe presentan mejores beneficios debido a su estabilidad y propiedades magnéticas que aquellas compuestas de níquel que son altamente tóxicas, cobalto y cadmio presentan una alta hiperreactividad celular (Hilger et al., 2003; Jeng & Swanson, 2006; Mahmoudi et al., 2009) (Berry, 2005).

Se ha empleado como estrategia la selección de marcadores moleculares que puedan ser acoplados a nanopartículas, ha sido el uso de librerías de fagos expresando péptidos biomarcadores (Van Rooy et al., 2010, 2011). Los fagos son seleccionados por propiedades de asociación que tengan los péptidos en cada fago con un blanco celular específico (K. Petry et al., 2016). Esta herramienta permite la identificación de ligandos específicos en tejidos en condiciones patológicas como cáncer y neuroinflamación (Boiziau et al., 2018; Deutscher, 2010; Van Rooy et al., 2010).

En un modelo de ratas Lewis con encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) fue evaluada una librería de fagos con el fin de identificar péptidos con afinidad a vasos sanguíneos en el parénquima del SNC (K. Petry et al., 2016). EAE es un modelo de neuroinflamación que imita importantes aspectos neuropatológicos (Karlik et al., 2012). Por ejemplo, la interrupción de la BHE que se produce debido a la expresión anormal de

proteínas de células endoteliales, lo que da como resultado infiltración perivascular de células inmunitarias periféricas y desarrollo de lesiones inflamatorias (Berger et al., 2006; Floris et al., 2004).

K. Petry et al. reportaron 12 péptidos marcadores de neuroinflamación siendo el péptido número 88, el que mostró la mayor afinidad por la BHE bajo condiciones inflamatorias (K. Petry et al., 2016). Las posibles proteínas diana del péptido-88, con una secuencia de 12 aa (TPMMPETSQRFK), con una modificación N-Terminal conjugada a biotina, que se identificaron mediante el entrecruzamiento del fago-péptido-88 con proteínas expuestas en células endoteliales humanas estimuladas con interleucina-1 β (IL-1 β) (simulando condiciones inflamatorias *in vitro*). Estas proteínas diana se aislaron de las células y fueron identificadas por espectrometría de masas (Karina & Sanchez, 2013). Por lo anterior, uno de los propósitos del presente estudio es evaluar la unión del péptido-88 con sus posibles proteínas dianas expresadas en condiciones inflamatorias.

La aplicación a futuro de nanopartículas para diagnóstico de enfermedades que afecten la permeabilidad de la BHE en el SNC debe centrarse en aumentar el rendimiento y su especificidad del medio de contraste en el tejido cerebral y reducir su neurotoxicidad (Wong et al., 2012b). Teniendo en cuenta que estas NPsFe por sí solas son inespecíficas para el reconocimiento de factores moleculares a nivel celular, este trabajo busca generar nanopartículas superparamagnéticas conjugadas con un péptido biomarcador específico de neuroinflamación, las cuales cuenten con baja citotoxicidad y que puedan ser aplicadas al área de diagnóstico por IRM de enfermedades neuroinflamatorias.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo fue realizado en la línea de investigación nutrición e inmunología del grupo de Investigación Biología Celular y Funcional e Ingeniería de Biomoléculas y el grupo de Investigación Fundamental y Aplicada en Materiales-GIFAM de la Universidad Antonio Nariño.

2.1 Evaluación de la unión del péptido-88 y proteínas blanco

Se realizó un ensayo tipo ELISA con el fin de identificar la proteína con la cual se une el péptido marcador, se seleccionaron y evaluaron las siguientes proteínas: Caveolina-1, Fibronectina, Flotilina-1, Galectina-1 y Laminina β 1. El péptido-88 y el péptido control (péptido-37) con una modificación N-Terminal conjugada con biotina fueron sintetizado por Gen Script y solubilizado previo a su uso. A partir de una placa de 96 pozos, se realizó una hidratación con PBS 1X toda la noche. Posteriormente, se adicionaron 2 μ g/mL de la proteína recombinante en cada pozo a un volumen final de 100 μ L y se permitió su adhesión durante toda la noche a 4 °C. La placa fue lavada tres veces con PBS/0.05% Tween-20 y bloqueada con BSA 5%/ PBS 1X (300 μ l/pozo) durante 2 horas a temperatura ambiente. Nuevamente, los pozos fueron lavados 3 veces. Se adicionó el péptido-88 biotinilado en un rango de concentraciones de 5-500 μ g/mL y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Cada ensayo fue realizado por duplicado e incluyó como control positivo de la reacción un anticuerpo biotinilado específico para la proteína recombinante, un control negativo sin péptido ni anticuerpo, y un control de especificidad con el péptido-37. Posteriormente, la placa fue lavada 3 veces e incubada con streptavidina-HRP durante 30

minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, los pozos fueron lavados 3 veces y se adicionó el sustrato (1:1, H₂O₂: tetrametilbenzidine (TMB)) por 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. La reacción fue detenida con H₂SO₄ 1M colocando 50 µl/pozo. La absorbancia fue determinada a una longitud de onda de 450 nm en un lector de microplacas FC Multiskan TM.

2.2 Preparación del sol de SiO₂

La síntesis se basó en el método de Stöber (Rojas et al., 2014) con algunas modificaciones, en el cual, se describe a continuación. Se adicionó 23,54 ml de etanol absoluto, para calentar la atmosfera por 5 min; pasado este tiempo, se adiciono 26,8 ml de TEOS y 35,9 ml de MTES; seguido se adicionaron 4,30 ml de ácido acético gota a gota; por último, se agregó gota a gota 10,14 ml de agua acidulada (H₂O + HNO₃) relación de 7:1. Posteriormente, se dejó 20 min en ultrasonido (US) sumergido en aceite mineral, finalmente se dejó reposar por 24h; todo el procedimiento se llevó acabo a 75°C.

2.3 Recubrimiento de las nanopartículas

Se mezclo por US 1 g de NPs de Fe Cero Valente de Nanofer 25S, en 14 ml etanol absoluto por 6 min, luego se adiciono 20 ml del sol de SiO₂ en US por 2 min. Al finalizar esta etapa, la mezcla se dejó por 24h en agitación magnética. Finalmente, las Nps recubiertas se secaron en un horno a 50 °C por 30 min y se descartó el sobrenadante, la mezcla resultante se moltura y se almacena en un desecador.

2.4 Funcionalización de Fe@SiO₂/Pe

Se realizaron lavados de la Fe@SiO₂ con PBS para transferir todas las nanopartículas a un beaker, colocando imanes para retener las nanopartículas; para lo cual se utilizó 10 mL de PBS (solución de buffer fosfato); se mezcló por US, se midió el pH y se ajustó con NH₄OH hasta obtener un valor de pH aproximado de 8; de esta mezcla obtenida se pesó en un

ependorf 0,66 mg, se adicionó 150 μ l del pépdido-88 y se agregó 850 μ l de PBS (resultando una concentración del péptido de 500 μ g/mL); se dejó en US por 30s; adicionalmente se preparó el blanco que contiene 0.66 mg de las NPs y 1000 μ l de PBS. Para evaluar la unión de este bioconjugado por ELISA (ver literal 2.7).

2.5 Caracterización del nanocompuesto

- *Microscopia de Fuerza Atómica (AFM)*

Para este análisis se emplearon 30 mg de Fe@SiO₂ suspendida en agua, como sustrato se utilizó láminas de vidrio. La muestra depositada en la lámina fue secada a temperatura ambiente. Se empleó un equipo de marca Asylum Research, modelo MFP-3D-BI, con una punta de silicio, este presenta una resolución lateral de 1,5 nm y una resolución vertical de 0,05nm.

- *Microscopia Electrónica de Barrido (SEM/EDS)*

Para este análisis se empleó un microscopio electrónico de barrido (SEM) de la marca Teascan modelo Lyra 3 con un espectrómetro de energía dispersa (EDS) con energías de excitación desde 0,1 kV hasta 30 kV que produce imágenes de gran aumento con alta resolución (de hasta 3 nm). Se empleó una muestra de 30 mg de Fe@SiO₂ suspendida en agua y como sustrato una cinta de carbono adheridas a los porta muestras metálico. Estas muestras fueron secadas en vacío.

- *Difracción de Rayos X (DRX)*

Se utilizó un equipo de la marca Bruker modelo D2 PHASER dotado de una fuente de rayos X con ánodo de cobre, de alta estabilidad. Este difractor trabaja en geometría Bragg-Brentano. Se analizaron muestras de 30 mg de Fe, Fe@SiO₂ y Fe@SiO₂/Pep en polvo, previamente secadas y molturadas. Las mediciones fueron realizadas con un paso angular

de $0,013^\circ$ e intervalo angular de 15° a 80° en 2θ . La técnica de refinamiento Rietveld se realizó empleando el software GSAS.

- *Magnetometría de Muestra Vibrante (VSM)*

La caracterización magnética de las nanopartículas se realizó por el análisis de la curva de histéresis magnética obtenida mediante magnetometría de muestra vibrante VSM, se empleó un magnetómetro Quantum Design (VersaLab TM), a temperatura 300 K, con un campo aplicado de -3T a 3T. Se empleó 30 mg en polvo por cada muestra de Fe@SiO₂ y Fe@SiO₂/Pe.

2.6 Evaluación de la unión de la NP con el péptido-88

La evaluación de la unión fue realizada mediante el método de ELISA, como se describe a continuación. A partir de una placa de 96 pozos, se realizó una hidratación con PBS 1X durante toda la noche. Posteriormente, los pozos fueron bloqueados con BSA 5%/PBS 1X (300 μ l/pozo) durante 2 horas a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados y se adicionaron 100 μ L de nanopartícula funcionalizada con el péptido-88. El conjugado se incubó a temperatura ambiente en un shaker. Nuevamente, los pozos fueron lavados tres veces y luego, se incubaron con estreptavidina-HRP durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, los pozos se lavaron 3 veces y se añadió el sustrato (1:1 H₂O₂ tetrametilbenzidine (TMB)) por 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. La reacción se detuvo con H₂SO₄ 1M colocando 50 μ l/pozo. Se determinó la unión mediante un lector de microplacas FC Multiskan TM a una longitud de 450 nm.

2.7 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism versión 8.02. Las diferencias entre las muestras y el control se evaluaron mediante la prueba t Student. Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo se planteó como primera medida evaluar la unión del péptido-88 con las proteínas seleccionadas mediante la técnica de ELISA. Se analizaron las proteínas recombinantes galectina-1, caveolina-1, flotilina-1, fibronectina y laminina β 1. Estas proteínas fueron seleccionadas teniendo en cuenta que en investigaciones anteriores han sido reportadas como proteínas diana candidatas de unión al péptido-88, que presentaran función como proteínas estructurales de la membrana celular o de matriz extracelular, e informes publicados sobre el papel de estas proteínas en la neuroinflamación y la BHE.

Se empleó como control positivo un anticuerpo biotinilado específico para cada proteína recombinante, un control negativo sin péptido ni anticuerpo y un control de especificidad con un péptido de secuencia aleatoria. En la **Figura 2A** se observa el incremento de la absorbancia obtenida en la evaluación de la unión para cada una de las proteínas recombinantes y sus respectivos anticuerpos primarios en comparación con el blanco. Este resultado evidencia la unión de cada anticuerpo con su correspondiente proteína recombinante y demuestra la efectividad del ensayo para evaluar la unión positiva entre una proteína recombinante y una proteína de unión mediante la técnica de ELISA.

En la **Figura 2B** se observa la absorbancia obtenida en la evaluación de la unión entre el péptido-88 y cada una de las proteínas recombinantes galectina-1, caveolina-1, flotilina-1, fibronectina y laminina β 1. Los resultados revelaron una unión específica del péptido-88 con la laminina β 1, mientras que no se observó una unión específica para la galectina-1, flotilina-1, caveolina-1 y fibronectina. La unión del péptido marcador con la subunidad β 1 de laminina fue significativamente mayor en comparación con la del control ($p = 0,0059$). Adicionalmente, la absorbancia observada en la evaluación de la unión entre el péptido-37 y la proteína recombinante laminina β 1 fue 0.0925, indicando que la unión entre el péptido-

88 y laminina $\beta 1$ es específica y no se debe a uniones inespecíficas debidas al tamaño del péptido o a las características de la proteína recombinante (**Figura 2B**).

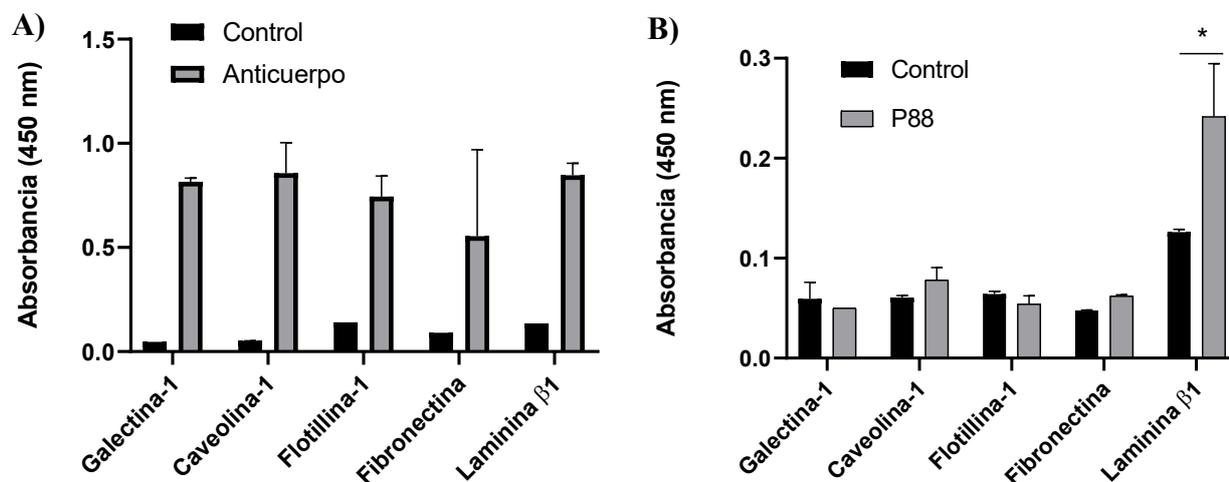


Figura 2. Evaluación de la unión del péptido-88 con los posibles receptores blanco mediante la técnica de ELISA. **A)** Evaluación de la unión de los anticuerpos frente a sus proteínas recombinantes. **B)** Evaluación de la unión del péptido-88 con posibles receptores blanco. $n=2$. Los datos fueron analizados mediante la prueba t-student ($p = 0,0059$).

Estos resultados sugieren que el péptido-88 se une específicamente a la proteína laminina- $\beta 1$, que es expresada en condiciones inflamatorias de la BHE. Entre las proteínas que conforman la matriz extracelular, la laminina es abundante principalmente en las membranas basales y contribuye a la integridad de las células endoteliales de la BHE (Ji & Tsirka, 2012a). Esta proteína juega un papel fundamental en la adhesión, migración, y diferenciación celular, así como en el crecimiento de neuritas, la guía de axones y metabolismo intracelular (Domogatskaya et al., 2012; McQualter & Bernard, 2007; Miner et al., 2004; Nirwane & Yao, 2019; Schéele et al., 2007). En particular, la laminina 511 ($\alpha 5\beta 1\gamma 1$) se expresa en células endoteliales ubicadas en el cerebro, mejorando la integridad de la BHE al estabilizar las uniones estrechas célula-célula y reducir la infiltración de leucocitos bajo condiciones neuroinflamatorias (Di Russo et al., 2017; Song et al., 2017). Se ha informado que los niveles de laminina aumentan en lesiones isquémicas en el SNC (Han et al., 2011; Ji & Tsirka, 2012b). Algunos estudios también reportan que la laminina

511, es regulada positivamente durante la inflamación cerebral en encefalomiелitis alérgica experimental, inhibiendo la extravasación de células T a través de la BHE (Ji & Tsirka, 2012b; Menezes et al., 2014). Por tanto, es posible que la laminina se encuentre incrementada en procesos neuroinflamatorios y que el péptido-88 marque específicamente esta condición.

Diferentes grupos de investigación, han estudiado y desarrollado estrategias para la selección de péptidos biomarcadores que puedan ser utilizados para el estudio de procesos neuroinflamatorios. Boiziau y colaboradores, identificaron un péptido circular denominado Ph48 como un ligando prometedor en las alteraciones inducidas por neuroinflamación localizándose principalmente en el espacio perivascular de las lesiones inflamatorias (Boiziau et al., 2018). Otras investigaciones han empleado micropartículas, como compuestos trazadores, conjugadas con anticuerpos monoclonales para el marcaje de proteínas de adhesión celular que se expresan en el desarrollo de procesos de neuroinflamación, como son, VCAM-1 y selectina-p (Gauberti et al., 2013; McAteer et al., 2007; Quenault et al., 2017). Además, se han empleado compuestos trazadores con ^{11}C y ^{18}F (Zinnhardt et al., 2018). Aunque se han identificado muchos péptidos como biomarcadores mediante la técnica *phage display*, la caracterización de estas proteínas diana es muy escasa, especialmente en la BHE y en la neuroinflamación (K. Petry et al., 2016). Adicionalmente, muchos de los péptidos identificados no han sido estudiados para ser escalados a potenciales aplicaciones biomédicas.

Notablemente, la unión y especificidad de marcación del péptido-88 por la BHE en condiciones de neuroinflamación tiene un relevante potencial para la detección temprana de alteraciones moleculares en la BHE y el desarrollo de condiciones neuroinflamatorias. Por consiguiente, la estrategia planteada en este trabajo es la conjugación del péptido-88, de reconocimiento específico a laminina $\beta 1$, con una nanopartícula superparamagnética,

con la finalidad de ser aplicada para el análisis diagnóstico por resonancia magnética de imagen (Van Rooy et al., 2010, 2011).

A partir de una nanopartícula de hierro se realizó una síntesis de recubrimiento con óxido de silicio (Fe@SiO_2) y la conjugación con el péptido-88 ($\text{Fe@SiO}_2/\text{Pe}$). Como se describió en la parte metodológica se empleó el método de Stöber para hacer el recubrimiento de la nanopartícula con sílice con el fin de evitar la oxidación (Stoll & Bendszus, 2009; Zaharchuk, 2007). Posteriormente, se realizó la funcionalización con el péptido-88 con el fin de obtener la nanopartícula bioconjugada. Las nanopartículas obtenidas luego de los procedimientos se caracterizaron por las técnicas de AFM, SEM/EDS, DRX, y VSM. A continuación, se describe los resultados de caracterización estructural, morfológica, química y magnética obtenida para (Fe@SiO_2) y ($\text{Fe@SiO}_2/\text{Pe}$).

En la **Figura 3**, se observa una imagen de AFM en el cual se puede identificar el perfil de altura de las NPs de Fe@SiO_2 . La **Figura 3A**, muestra la topografía de la superficie para un área de barrido de $5 \times 5 \mu\text{m}$, se observa que las NPs se encuentran dispersadas y no forman agregados, lo cual es conveniente para aplicaciones médicas y en especial para ser funcionalizadas. El contraste similar de las NPs indica que tienen alturas similares entre ellas, lo que es importante para su aplicación, ya que al tener tamaños similares presentarán propiedades magnéticas similares (Krishnan, 2010; Maldonado-Camargo et al., 2017). En la **Figura 3B** se muestra el perfil de altura de las NPs correspondiente con la línea verde en la **Figura 3A**; la cual nos permitió determinar un tamaño promedio de $54 \pm 10 \text{ nm}$. En los perfiles extraídos, se observa que las nanopartículas presentan un ancho a mitad de pico (full width at half maximum, FWHM) en torno a 160 nm (eje x), este fenómeno se conoce como el efecto de convolución lateral en AFM, debido al efecto de convolución de la punta con los rasgos medidos. Este efecto se traduce en la observación de diámetros aparentemente más grandes para cada nanopartícula en las imágenes medidas. El AFM

proporciona información precisa tanto de la distribución como de la altura de las estructuras de una superficie, pero no de sus anchuras cuando los rasgos medidos son del orden del radio de la punta. Por esta razón se emplea Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) que permite obtener información del diámetro de las NPs.

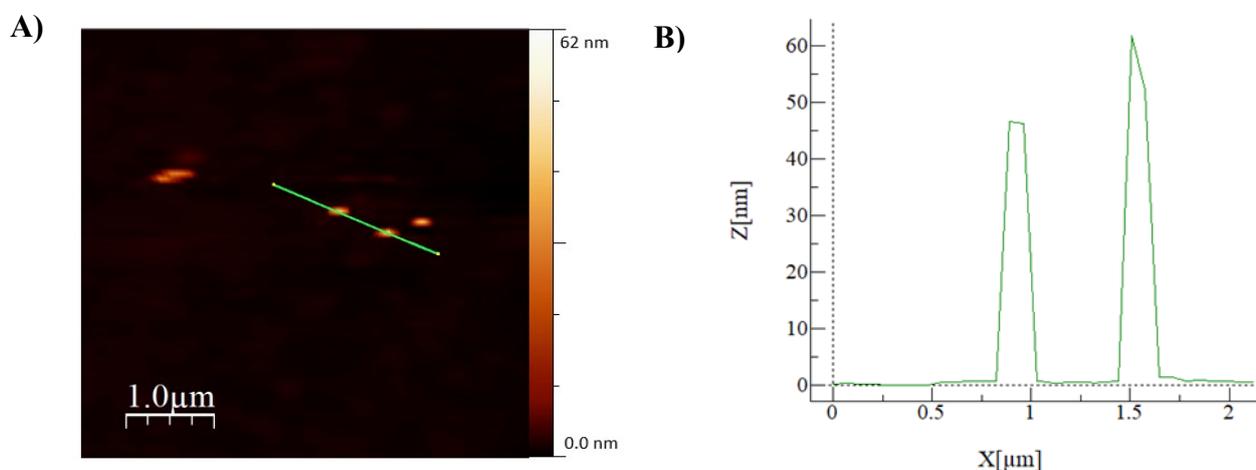


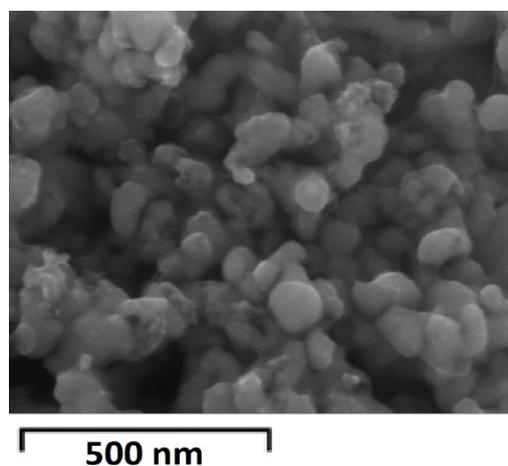
Figura 3.A) La imagen de AFM de $5 \times 5 \mu\text{m}$ de nanopartículas de Fe@SiO_2 . La línea verde en la imagen indica dónde se registró el perfil de altura. **B)** Muestra el perfil del contorno sobre la topografía a lo largo de la línea verde que se muestra en la figura 3A.

A continuación, se analizan unas micrográficas por SEM a diferentes aumentos de la muestra Fe@SiO_2 ; con el fin de observar las características morfológicas y químicas de las NPs obtenidas después del recubrimiento con SiO_2 .

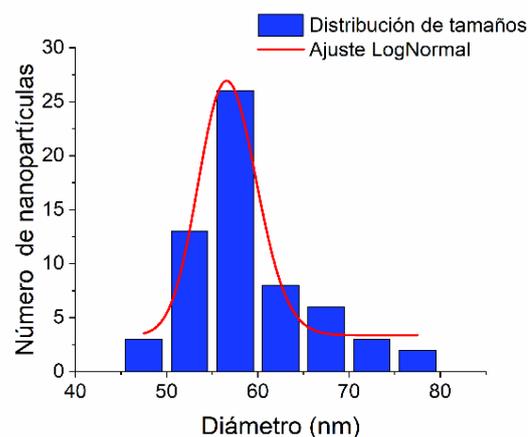
En la **Figura 4A** se observa que algunas nanopartículas de Fe@SiO_2 se encuentran agregadas, posiblemente este efecto se dio por la preparación de la muestra para la medida, donde esta fue secada rápidamente en vacío. Con el programa ImageJ se analizaron estas imágenes obteniendo la distribución de tamaños de las NPs. El ajuste de los datos fue realizado asumiendo una distribución Lognormal, donde se determinó que el diámetro de las NPs es $57 \pm 3.2 \text{ nm}$ (**Figura 4B**). El análisis químico superficial se realizó por EDS el cual indica la composición semicuantitativa de las partículas (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**4C**), indicando la presencia de carbono (30,5 %), hierro

(58,7%), oxígeno (9,8%) y silicio (1,1%); lo que corrobora la composición química de estos sistemas. La presencia de carbono se debe al uso de una cinta de carbono para adherir las partículas al portamuestra.

A)



B)



C)

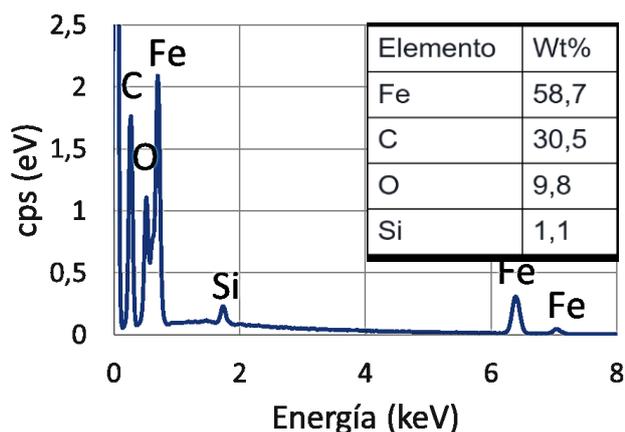
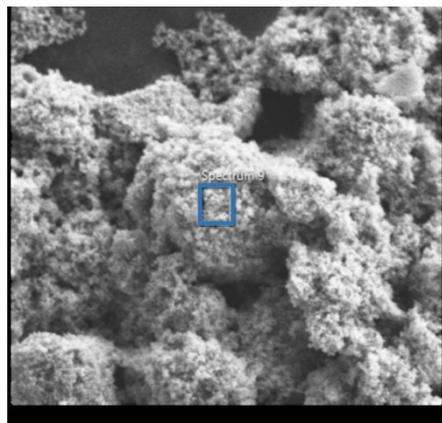


Figura 4. A) Imágenes de SEM de nanopartículas Fe@SiO₂. B) Distribución de tamaños de las NPs C) Espectro EDS y datos cuantitativos elementales representativos de NPs de Fe@SiO₂. El área analizada se indica en el recuadro azul de la figura.

Hasta este punto, el tamaño de las NPs sigue siendo viable ya que diferentes estudios han demostrado que nanopartículas de aproximadamente 200 nm y 300 nm de tamaño son capaces de cruzar la BHE en procesos de inflamación (Ränge et al., 2003). Adicionalmente, influye la carga y concentración; destacando que la carga neutra y positiva,

y las bajas concentración de nanopartículas no afectan la integridad de la barrera, facilitando la entrada de esta (Ghosh et al., 2019; Lombardo et al., 2020).

Además, el tamaño de la NPs es otro punto determinante a la hora de ser transportada y eliminada del cuerpo; en esta última, se considera que las células pueden endocitar más fácilmente NPs de tamaños menores a 100 nm (by Dove Press, 2014; Jo et al., 2015; Lombardo et al., 2020; S. Zhang et al., 2009). Otros estudios consideran que tamaños menores de 10 nm se eliminan principalmente por vía renal, en ambos casos conduce a una disminución de las concentraciones plasmáticas. Sin embargo, las nanopartículas con un tamaño de 10 a 100 nm se consideran óptimas, con tiempos de circulación más largos porque pueden escapar fácilmente del cuerpo (Wahajuddin & Arora, 2012).

Kharisov y colaboradores han reportado Nps de hierro Cero Valente con un diámetro entre 10 a 100 nm y una estructura típica es núcleo-capa (core-shell), en el cual el núcleo se compone de Fe^0 o hierro metálico, mientras que la capa se compone de óxido de hierro de valencia mixta (Fe^{+2} y Fe^{+3}), resultante de la oxidación del hierro metálico (Kharisov et al., 2012). Por lo tanto, para prevenir este tipo de oxidación se emplea diferentes recubrimientos desde inorgánicos a orgánicos, siendo la sílice uno de los más empleados ya que imparten solubilidad en agua a las NPs hidrófobas y estabiliza las soluciones coloidales por mayor tiempo; además, ya ha sido empleada en el desarrollo de agentes contraste (Feng Chen et al., 2009; Ding et al., 2012), sumado a esto, diferentes estudios han demostrado su biocompatibilidad y no toxicidad en medios biológicos ya que su degradación es en forma ácido silícico no toxico (Fang Chen et al., 2018; Mathieu et al., 2019). Sin embargo, en algunos casos pueden generarse aglomeraciones de las nanopartículas producido por fuerzas de Van der Waals (Alvear et al., 2017).

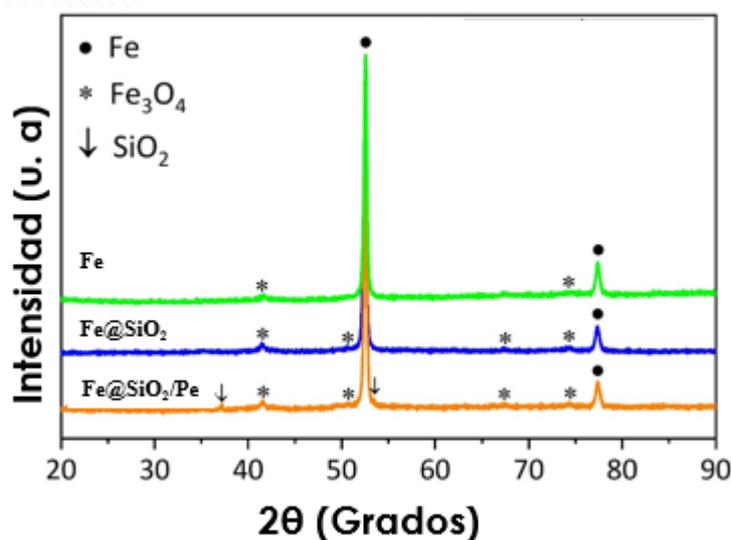


Figura 5. Patrón de DRX de Fe@SiO₂, Fe@SiO₂/Pe. Recuadro: región ampliada de la señal principal.

En la **Figura 5** muestra los resultados de los patrones DRX a temperatura ambiente de las nanopartículas de hierro (Fe), nanopartículas de hierro recubiertas con sílice (Fe@SiO₂) y nanopartículas de hierro recubiertas con sílice conjugada con un péptido-88 (Fe@SiO₂/Pe). Como se observa en la **Figura 5**, se identificaron picos en $2\theta \approx 52.55^\circ$ (110) y 77.47° (200) correspondiente a Fe (JCPDS tarjeta no 65-4899), picos en $2\theta \approx 35.21^\circ$ (220), 41.53° (311), 50.51° (400), 67.34° (511) y 74.25° (440) corresponde a Fe₃O₄ (JCPDS tarjeta no 19-0629) y picos en $2\theta \approx 37.02^\circ$ (620), 35.59° (241) y 53.56° (302) correspondiente a SiO₂ (JCPDS tarjeta no 17-0260).

El análisis detallado de DRX se muestra en la región ampliada de la señal principal corresponde a la orientación en el plano (110) en el rango $2\theta \approx 52 - 53.2^\circ$ en el inset de la **Figura 5** muestra la similitud en cada una de las señales obtenidas y el desplazamiento observado a ángulos menores cuando las nanopartículas recubiertas con sílice son conjugadas con el péptido, revelando la contracción de la celda unitaria en las fases.

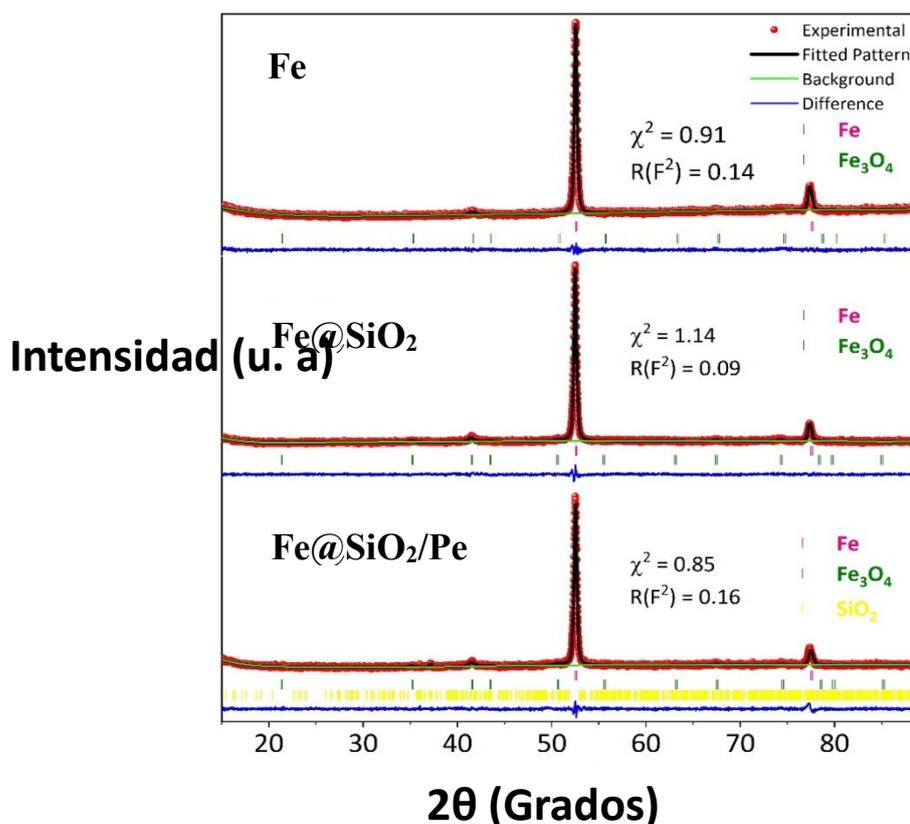


Figura 6. Patrones de DRX de refinamiento de Rietveld de Fe@SiO₂, Fe@SiO₂/Pe y Fe.

En el presente estudio, hemos adoptado la técnica de refinamiento Rietveld utilizando el software GSAS con el fin de confirmar las fases cristalinas identificadas. Los patrones refinados se muestran en la **Figura 6**, los valores pequeños de los parámetros estadísticos de ajuste (χ^2 y $R(F^2)$) obtenidos confirman la estabilidad de las fases. La **Tabla 1** muestra los detalles estructurales obtenidos a partir del refinamiento; se puede observar que el porcentaje de fase y los parámetros de red de Fe y Fe₃O₄, disminuyen y aumentan respectivamente cuando es introducido el péptido. A su vez se muestra la fase cristalina que presenta el Fe (Im-3m) una estructura cristalina cubica centrado en el cuerpo (BCC), el Fe₃O₄ (Fd-3m) presenta una estructura cristalina de cubica centrada en la cara y el SiO₂ (C2/m) es una estructura monoclinica centrada en la base.

El tamaño del cristalito de todas las muestras obtenidas se determinó utilizando la ecuación de Scherrer $L = K\lambda/\beta \cos \theta$; donde λ es la longitud de onda del haz incidente, β es el ancho

de altura promedio, θ es el ángulo de reflexión de la señal más intensa y $K = 0.9$ es un coeficiente. Reemplazando los valores para las señales más intensas, el tamaño cristalito para las partículas de Fe Cero Valente y las de Fe@SiO₂ es de 37,7 nm, en cambio las NPs funcionalizadas presentaron un tamaño de cristalito de 77.4 nm. De acuerdo al tamaño del cristalito, se puede determinar que las Nps son de un dominio único, infiriendo que estas NPs presentan un comportamiento superparamagnético, ya que a estos tamaños es desfavorable energéticamente la formación de paredes de dominio que permitan Nps de múltiples dominios (Maldonado-Camargo et al., 2017) (se tiene en cuenta la existencia de un tamaño crítico menor a 100 nm (Krishnan, 2010)) Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 1**.

La presencia de óxido de hierro mixto se debe a fase de oxidación con el ambiente por este tipo de nanopartículas (Kharisov et al., 2012). Los picos agudos demuestran su naturaleza altamente cristalina lo que favorece a sus propiedades magnéticas (Ali et al., 2016; Li et al., 2017).

Tabla 1. Parámetros estructurales, tamaño de cristalito, magnetización de saturación M_s (emu / g), coercitividad H_c (Oe) y temperatura de bloqueo (T_B) de las muestras.

Muestra	Fase	Contenido de fase W (%)	Grupo espacial	Parámetro de red (Å)	Volumen celular V (Å ³)	Tamaño cristalino (nm)	M_s (emu/g) 300 K	M_r (emu/g) 300 K	H_c (Oe) 300 K	T_B (K)																																				
				a = b = c (Å)																																										
Fe	Fe	99	<i>Im-3m</i> (229)	2.860 (3)	23.235 (5)	37.7	173.134	19.232	302.564	113.909																																				
	Fe ₃ O ₄	1	<i>Fd-3m</i> (227)	8.350 (2)	582.247 (8)						Fe@SiO ₂	Fe	95	<i>Im-3m</i> (229)	2.860 (3)	23.401 (1)	37.7	1235,375	121.308	125.036	116.151	Fe ₃ O ₄	5	<i>Fd-3m</i> (227)	8.379 (2)	588.172 (3)	Fe@SiO ₂ /Pe	Fe	90	<i>Im-3m</i> (229)	2.859 (2)	23.389 (1)	77.4	119.482	17.333	338.573	117.127	Fe ₃ O ₄	8.5	<i>Fd-3m</i> (227)	8.369 (2)	586.192 (5)				a = 18.258 (4)
Fe@SiO ₂	Fe	95	<i>Im-3m</i> (229)	2.860 (3)	23.401 (1)	37.7	1235,375	121.308	125.036	116.151																																				
	Fe ₃ O ₄	5	<i>Fd-3m</i> (227)	8.379 (2)	588.172 (3)						Fe@SiO ₂ /Pe	Fe	90	<i>Im-3m</i> (229)	2.859 (2)	23.389 (1)	77.4	119.482	17.333	338.573	117.127	Fe ₃ O ₄	8.5	<i>Fd-3m</i> (227)	8.369 (2)	586.192 (5)					a = 18.258 (4)							SiO ₂	1.5	<i>C2/m</i> (12)	b = 13.348 (2) c = 7.776 (2)	1894.519 (5)				
Fe@SiO ₂ /Pe	Fe	90	<i>Im-3m</i> (229)	2.859 (2)	23.389 (1)	77.4	119.482	17.333	338.573	117.127																																				
	Fe ₃ O ₄	8.5	<i>Fd-3m</i> (227)	8.369 (2)	586.192 (5)																																									
				a = 18.258 (4)																																										
	SiO ₂	1.5	<i>C2/m</i> (12)	b = 13.348 (2) c = 7.776 (2)	1894.519 (5)																																									

Como ultima técnica de caracterización para las nanopartículas de Fe@SiO₂ y Fe@SiO₂/Pe se empleó VSM. Con esta técnica se estudiaron las propiedades magnéticas de las nanopartículas antes y después de la conjugación del péptido. En la **Figura 7** se registró los bucles de histéresis de las nanopartículas o las curvas de magnetización versus campo magnético aplicado de -30 kOe a 30 kOe a temperatura ambiente, donde se comprueba que las NPs presentan un comportamiento superparamagnético, debido a que los valores del campo coercitivo son cercanos a cero. Este resultado demuestra que estas nanopartículas podrían ser empleadas en IRM como agentes de contraste. En el recuerdo de la **Figura 7** se muestra que la coercitividad y remanencia son diferentes de cero, esto se debe a que unas pocas nanopartículas tienen un comportamiento ferromagnético. Además, a medida que aumenta el campo magnético externo la magnetización primero aumenta rápidamente y luego alcanza la saturación. Las magnetizaciones de saturación (M_s), de remanencia (M_r) y campos coercitivos (H_c) se muestran en la **Tabla 1**. Al recubrir las nanopartículas de hierro con sílice conjugadas con un péptido, se observa que la magnetización de saturación disminuye, esto se debe a que el recubrimiento está apantallando la señal magnética, sin embargo, su disminución no es relevante. En conclusión, las propiedades magnéticas obtenidas, son significativas para aplicaciones biomédicas (L. Zhang et al., 2016).

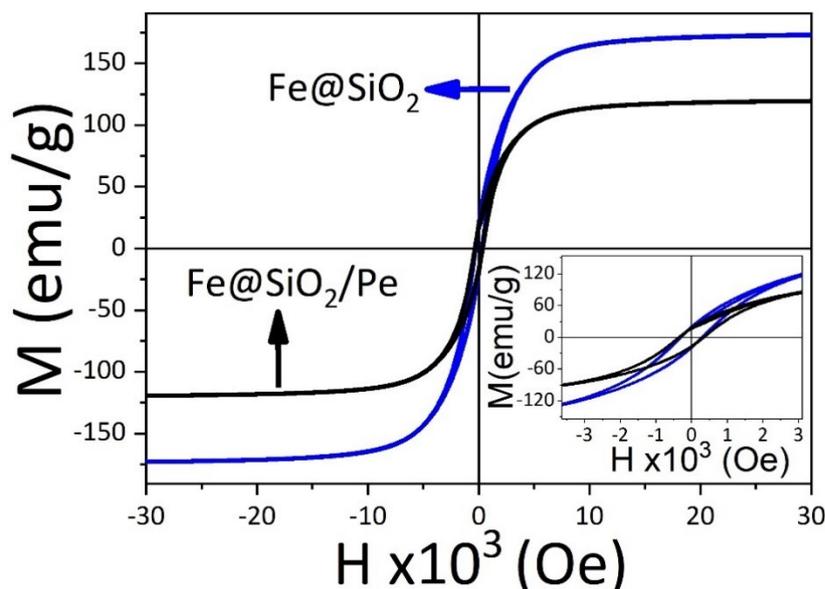


Figura 7. Temperatura ambiente, circuitos de histéresis magnética de Fe@SiO₂ y Fe@SiO₂/Pe. Recuadro: bucles de histéresis extendidos.

Por último, se evaluó la unión de nanopartícula de hierro recubierta con el péptido-88 (Fe@SiO₂/Pe). La unión de la Fe@SiO₂ con el peptido-88 se determinó mediante un ensayo tipo ELISA empleando el péptido-88 biotinilado para la detección de la conjugación. En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** Se observan niveles similares de absorbancia entre el blanco y la nanopartícula sin funcionalizar, indicando que la nanopartícula no estaría contribuyendo significativamente a la absorbancia obtenida en el conjugado. Aunque la absorbancia del péptido indica una unión inespecífica en la superficie de la placa, la absorbancia de la nanopartícula conjugada con el péptido-88 evidencia la unión entre ambos componentes de forma significativa comparando con los blancos nanopartícula/péptido vs péptido ($p = 0,0010$) y nanopartícula/péptido vs nanopartícula ($p = 0,0004$) y nanopartícula/péptido vs blanco ($p = 0,0004$). La unión positiva del conjugado sobrepasa 4 veces el valor observado para la nanopartícula sin funcionalizar. Este resultado abre las puertas para posteriores investigaciones en el uso de nanopartículas conjugadas con el péptido-88 *in vitro* e *in vivo*.

El uso de nanopartículas superparamagnéticas conjugadas con péptidos marcadores permite incrementar la penetración, la selectividad celular y mejorar el contraste de imágenes por IRM, lo cual facilita el diagnóstico y tratamiento de desórdenes de la BHE (Wong et al., 2012a). El desarrollo de nanotecnología de nano-ligandos moleculares derivados de estrategias de selección *in vitro* e *in vivo*, podrían ayudar en la comprensión de muchas enfermedades humanas. Estas nanopartículas, han sido usadas para estudiar la biodistribución de fármacos en el cerebro, gracias a su estabilidad a temperatura ambiente, la carencia de inmunogenicidad de péptidos pequeños y la alta biocompatibilidad y afinidad a receptores específicos (Koffie et al., 2011). Por esta razón, surge ahora la necesidad de evaluar los nanoconjugados producidos, de forma *in vitro* e *in vivo*, para estudiar posibles efectos citotóxicos, su biocompatibilidad y distribución tisular.

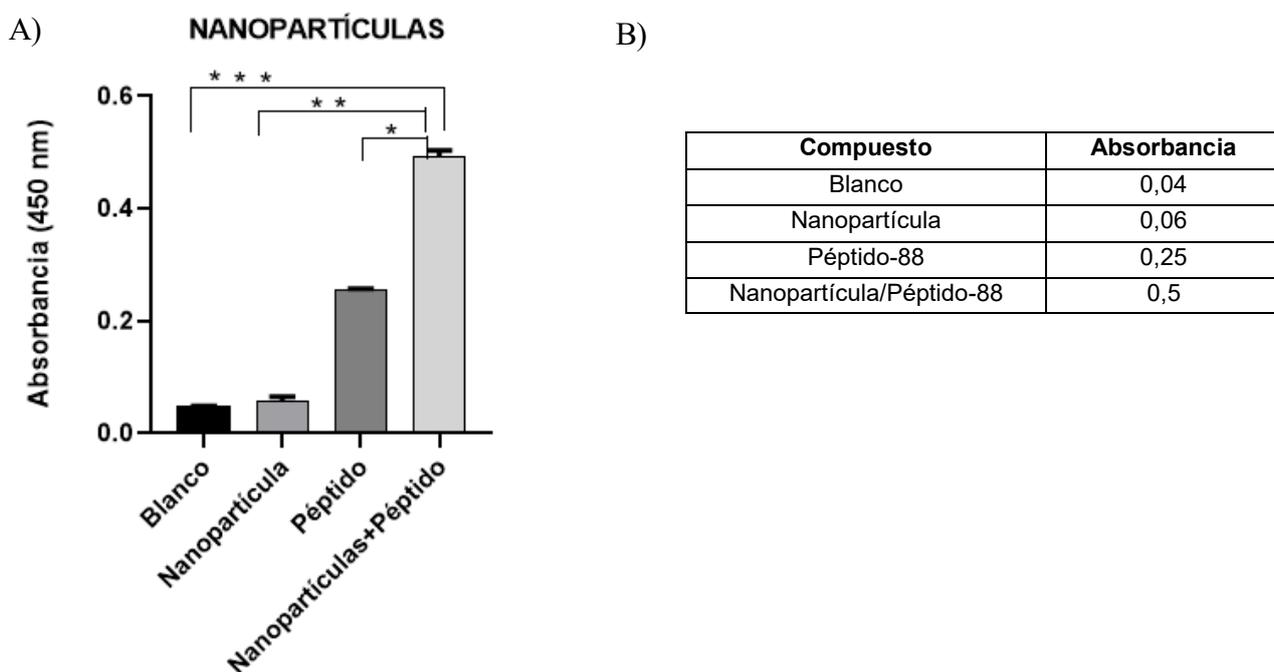


Figura 8. A) Evaluación de la unión del blanco, nanopartícula y péptido de la unión del péptido-88 con las nanopartículas de Fe@SiO₂/Pe. **B)** Se muestran los valores de absorbancia evaluados en cada una de las condiciones, estos datos fueron analizados mediante la prueba de t-student: Nanopartícula/ péptido vs péptido (*p = 0,0010) y nanopartícula/péptido vs nanopartícula (**p = 0,0004) y nanopartícula/péptido vs blanco (**p = 0,0004).

4. Conclusiones

- Se estableció la unión específica del péptido-88 capaz de marcar específicamente la laminina $\beta 1$, proteína de la matriz extracelular de la BHE, como un promisorio biomarcador en condiciones de neuroinflamación.
- La síntesis y caracterización estructural, morfológica, química y magnética de las nanopartículas Fe@SiO₂ y Fe@SiO₂/Pe, permitió determinar un tamaño de 54 ± 10 nm, de forma esférica, con fases cristalinas favoreciendo sus propiedades superparamagnéticas.
- El péptido-88 fue conjugado con nanopartículas de Fe superparamagnéticas permitiendo generar una potencial herramienta a la hora del diagnóstico en patologías de neuroinflamación por IRM.

Agradecimientos

Este proyecto fue financiado por el ministerio de ciencia tecnología e innovación (CT-672-2018, código 123377757091). A los Semilleros de investigación nutrición e inmunología del grupo de Investigación Biología Celular y Funcional e Ingeniería de Biomoléculas y el grupo de Investigación Fundamental y Aplicada en Materiales-GIFAM de la Universidad Antonio Nariño.

Quiero agradecer a la Dra. Mónica Losada Barragán por permitirme trabajar a su lado, su colaboración, paciencia, sabiduría y consejos; al Dr. Daniel Llamosa Pérez por su acompañamiento, paciencia y colaboración en el transcurso del trabajo; a la Dra. Karina Vargas por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo, por darme el voto de confianza de desarrollar este trabajo. A mis compañeros y compañeras por estar siempre

acompañándome en cada instante en el desarrollo de mi vida académica y como persona, gracias.

Referencias

- Abbott, N. J., Rönnbäck, L., & Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(1), 41–53. <https://doi.org/10.1038/nrn1824>
- Ali, A., Zafar, H., Zia, M., Ul Haq, I., Phull, A. R., Ali, J. S., & Hussain, A. (2016). Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. *Nanotechnology, Science and Applications*, 9, 49–67. <https://doi.org/10.2147/NSA.S99986>
- Alvear, D., Galeas, S., & Debut, A. (2017). Síntesis y Caracterización de Nanopartículas de Magnetita. *Revista Politécnica*, 39(2), 61–66. <https://doi.org/10.33333/rp.v39i2.545>
- Balistreri, C. R., Carruba, G., Calabrò, M., Campisi, I., Carlo, D. Di, Lio, D., Colonna-Romano, G., Candore, G., & Caruso, C. (2009). CCR5 proinflammatory allele in prostate cancer risk: A pilot study in patients and centenarians from sicily. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1155, 289–292. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2008.03691.x>
- Barkhof, F., Calabresi, P. A., Miller, D. H., & Reingold, S. C. (2009). Imaging outcomes for neuroprotection and repair in multiple sclerosis trials. *Nature Reviews Neurology*, 5(5), 256–266. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2009.41>
- Berger, C., Hiestand, P., Kindler-Baumann, D., Rudin, M., & Rausch, M. (2006). Analysis of lesion development during acute inflammation and remission in a rat model of experimental autoimmune encephalomyelitis by visualization of macrophage infiltration, demyelination and blood-brain barrier damage. *NMR in Biomedicine*, 19(1), 101–107. <https://doi.org/10.1002/nbm.1007>
- Berry, C. C. (2005). Possible exploitation of magnetic nanoparticle-cell interaction for biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry*, 15(5), 543–547. <https://doi.org/10.1039/b409715g>
- Boiziau, C., Nikolski, M., Mordelet, E., Aussudre, J., Vargas-Sanchez, K., & Petry, K. G. (2018). A Peptide Targeting Inflammatory CNS Lesions in the EAE Rat Model of Multiple Sclerosis. *Inflammation*, 41(3), 932–947. <https://doi.org/10.1007/s10753-018-0748-0>

by Dove Press, published. (2014). *Oh NPark J.* 51–63.

<http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S26592>

Chen, Fang, Hableel, G., Zhao, E. R., & Jokerst, J. V. (2018). Multifunctional nanomedicine with silica: Role of silica in nanoparticles for theranostic, imaging, and drug monitoring. *Journal of Colloid and Interface Science*, 521, 261–279.

<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.02.053>

Chen, Feng, Bu, W., Chen, Y., Fan, Y., He, Q., Zhu, M., Liu, X., Zhou, L., Zhang, S., Peng, W., & Shi, J. (2009). A Sub-50-nm Monosized Superparamagnetic Fe₃O₄@SiO₂ T₂-Weighted MRI Contrast Agent: Highly Reproducible Synthesis of Uniform Single-Loaded Core-Shell Nanostructures. *Chemistry - An Asian Journal*, 4(12), 1809–1816.

<https://doi.org/10.1002/asia.200900276>

Costa, C., Brandão, F., Bessa, M. J., Costa, S., Valdiglesias, V., Kiliç, G., Fernández-Bertólez, N., Quaresma, P., Pereira, E., Pásaro, E., Laffon, B., & Teixeira, J. P. (2016). In vitro cytotoxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles on neuronal and glial cells. Evaluation of nanoparticle interference with viability tests. *Journal of Applied Toxicology*, 36(3), 361–372. <https://doi.org/10.1002/jat.3213>

Daneman, R., & Prat, A. (2015). The Blood–Brain Barrier. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(1), a020412. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020412>

Deutscher, S. L. (2010). Phage display in molecular imaging and diagnosis of cancer. *Chemical Reviews*, 110(5), 3196–3211. <https://doi.org/10.1021/cr900317f>

Di Russo, J., Luik, A., Yousif, L., Budny, S., Oberleithner, H., Hofschroer, V., Klingauf, J., Bavel, E., Bakker, E. N., Hellstrand, P., Bhattachariya, A., Albinsson, S., Pincet, F., Hallmann, R., & Sorokin, L. M. (2017). Endothelial basement membrane laminin 511 is essential for shear stress response. *The EMBO Journal*, 36(2), 183–201.

<https://doi.org/10.15252/emj.201694756>

Di Virgilio, F., Ceruti, S., Bramanti, P., & Abbracchio, M. P. (2009). Purinergic signalling in inflammation of the central nervous system. *Trends in Neurosciences*, 32(2), 79–87.

<https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.11.003>

Dijkhuizen, R. M. (2011). Advances in MRI-Based Detection of Cerebrovascular Changes after Experimental Traumatic Brain Injury. *Translational Stroke Research*, 2(4), 524–532. <https://doi.org/10.1007/s12975-011-0130-0>

Dijkhuizen, R. M., & Nicolay, K. (2003). Magnetic Resonance Imaging in Experimental Models of Brain Disorders. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 23(12),

1383–1402. <https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000100341.78607.EB>

- Ding, H. L., Zhang, Y. X., Wang, S., Xu, J. M., Xu, S. C., & Li, G. H. (2012). Fe₃O₄@SiO₂ Core/Shell Nanoparticles: The Silica Coating Regulations with a Single Core for Different Core Sizes and Shell Thicknesses. *Chemistry of Materials*, 24(23), 4572–4580. <https://doi.org/10.1021/cm302828d>
- Domogatskaya, A., Rodin, S., & Tryggvason, K. (2012). Functional diversity of laminins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28, 523–553. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155750>
- Dousset, V., Brochet, B., Deloire, M. S. A., Lagoarde, L., Barroso, B., Caille, J. M., & Petry, K. G. (2006). MR imaging of relapsing multiple sclerosis patients using ultra-small-particle iron oxide and compared with gadolinium. *American Journal of Neuroradiology*, 27(5), 1000–1005.
- Dresco, P. A., Zaitsev, V. S., Gambino, R. J., & Chu, B. (1999). Preparation and properties of magnetite and polymer magnetite nanoparticles. *Langmuir*, 15(6), 1945–1951. <https://doi.org/10.1021/la980971g>
- Engelhardt, B., & Ransohoff, R. M. (2012). Capture, crawl, cross: The T cell code to breach the blood-brain barriers. *Trends in Immunology*, 33(12), 579–589. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.07.004>
- Estelrich, J., Escribano, E., Queralt, J., & Busquets, M. A. (2015). Iron oxide nanoparticles for magnetically-guided and magnetically-responsive drug delivery. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(4), 8070–8101. <https://doi.org/10.3390/ijms16048070>
- Estrada-rojo, F., Escoto, S. I., & Navarro, L. (2018). *Neuroin amación : el ying-yang de la neuroinmunología*. 44–53. <http://www.scielo.org.mx/pdf/facmed/v61n5/2448-4865-facmed-61-05-44.pdf>
- Filippi, M., Preziosa, P., & Rocca, M. A. (2014). Magnetic resonance outcome measures in multiple sclerosis trials: Time to rethink? *Current Opinion in Neurology*, 27(3), 290–299. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000095>
- Floris, S., Blezer, E. L. A., Schreibelt, G., Do, E., Dijkstra, K. N. C. D., & Vries, H. E. De. (2004). *Blood ± brain barrier permeability and monocyte in ® ltration in experimental allergic encephalomyelitis A quantitative MRI study*. 127(3), 616–627. <https://doi.org/10.1093/brain/awh068>
- Garre Olmo, J. (2018). Epidemiología de la enfermedad de Alzheimer y otras demencias.

- Revista de Neurología*, 66(11), 377. <https://doi.org/10.33588/rn.6611.2017519>
- Gauberti, M., Montagne, A., Marcos-Contreras, O. A., Le Béhot, A., Maubert, E., & Vivien, D. (2013). Ultra-Sensitive Molecular MRI of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Reveals a Dynamic Inflammatory Penumbra After Strokes. *Stroke*, 44(7), 1988–1996. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.000544>
- Gendelman, H. E. (2002). Neural immunity: Friend or foe? *Journal of NeuroVirology*, 8(6), 474–479. <https://doi.org/10.1080/13550280290168631>
- Ghosh, D., Upmanyu, N., Shukla, T., & Shrivastava, T. P. (2019). Cell and organ drug targeting. In *Nanomaterials for Drug Delivery and Therapy*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816505-8.00015-1>
- Gupta, A. K., & Wells, S. (2004). Surface-Modified Superparamagnetic Nanoparticles for Drug Delivery: Preparation, Characterization, and Cytotoxicity Studies. *IEEE Transactions on Nanobioscience*, 3(1), 66–73. <https://doi.org/10.1109/TNB.2003.820277>
- Han, Q., Li, B., Feng, H., Xiao, Z., Chen, B., Zhao, Y., Huang, J., & Dai, J. (2011). The promotion of cerebral ischemia recovery in rats by laminin-binding BDNF. *Biomaterials*, 32(22), 5077–5085. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.03.072>
- He, J., Huang, M., Wang, D., Zhang, Z., & Li, G. (2014). Magnetic separation techniques in sample preparation for biological analysis: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 101, 84–101. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.04.017>
- Heneka, M. T., Carson, M. J., Khoury, J. El, Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G. C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., ... Heneka, M. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's Disease HHS Public Access. *Lancet Neurol*, 14(4), 388–405. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5)
- Hilger, I., Frühauf, S., Linß, W., Hiergeist, R., Andrä, W., Hergt, R., & Kaiser, W. A. (2003). Cytotoxicity of selected magnetic fluids on human adenocarcinoma cells. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 261(1–2), 7–12. [https://doi.org/10.1016/S0304-8853\(01\)00258-X](https://doi.org/10.1016/S0304-8853(01)00258-X)
- Hirsch, E. C., Vyas, S., St, S., & Hunot, S. (2012). *Parkinsonism and Related Disorders* 18S1 (2012) S210-S212. 1, 210–212. [https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(11\)70065-7](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(11)70065-7)
- Husemann, J., Loike, J. D., Anankov, R., Febbraio, M., & Silverstein, S. C. (2002).

Scavenger receptors in neurobiology and neuropathology: Their role on microglia and other cells of the nervous system. *Glia*, 40(2), 195–205.

<https://doi.org/10.1002/glia.10148>

Issa, B., & M. Obaidat, I. (2019). Magnetic Nanoparticles as MRI Contrast Agents.

Magnetic Resonance Imaging, 1–16. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84649>

Iv, M., Telischak, N., Feng, D., Holdsworth, S. J., Yeom, K. W., & Daldrup-Link, H. E.

(2015). Clinical applications of iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging of brain tumors. *Nanomedicine*, 10(6), 993–1008.

<https://doi.org/10.2217/nnm.14.203>

Jeng, H. A., & Swanson, J. (2006). Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian

cells. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 41(12), 2699–2711.

<https://doi.org/10.1080/10934520600966177>

Ji, K., & Tsirka, S. E. (2012a). Inflammation modulates expression of laminin in the central

nervous system following ischemic injury. *Journal of Neuroinflammation*, 9, 1–12.

<https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-159>

Ji, K., & Tsirka, S. E. (2012b). Inflammation modulates expression of laminin in the central

nervous system following ischemic injury. *Journal of Neuroinflammation*, 9(1), 610.

<https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-159>

Jo, D. H., Kim, J. H., Lee, T. G., & Kim, J. H. (2015). Size, surface charge, and shape

determine therapeutic effects of nanoparticles on brain and retinal diseases.

Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, 11(7), 1603–1611.

<https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.04.015>

Kandelaki, E., Kavlashvili, N., Kherkheulidze, M., & Chkhaidze, I. (2015). Prevalence of

Atopic Dermatitis Symptoms in Children With Developmental and Behavioral Problems. *Georgian Medical News*, 6(243), 29–33.

Karina, J., & Sanchez, V. (2013). *IN VIVO PEPTIDE BIOMARKER SCREENING FOR*

MOLECULAR IMAGING IN EAE NEUROINFLAMMATION. the Bordeaux Segalen University.

Karlik, S. J., Roscoe, W. A., Patinote, C., & Contino-pépin, C. (2012). *Targeting Vascular*

Changes in Lesions in Multiple Sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. 7–14.

Keenan, C. R., Goth-Goldstein, R., Lucas, D., & Sedlak, D. L. (2009). Oxidative stress

induced by zero-valent iron nanoparticles and Fe(II) in human bronchial epithelial cells. *Environmental Science and Technology*, 43(12), 4555–4560.

<https://doi.org/10.1021/es9006383>

Kharisov, B. I., Rasika Dias, H. V., Kharissova, O. V., Manuel Jiménez-Pérez, V., Olvera Pérez, B., & Muñoz Flores, B. (2012). Iron-containing nanomaterials: synthesis, properties, and environmental applications. *RSC Advances*, 2(25), 9325.

<https://doi.org/10.1039/c2ra20812a>

Kiliç, G., Fernández-Bertólez, N., Costa, C., Brandão, F., Teixeira, J. P., Pásaro, E., Laffon, B., & Valdíglesias, V. (2016). The Application, Neurotoxicity, and Related Mechanism of Iron Oxide Nanoparticles. In *Neurotoxicity of Nanomaterials and Nanomedicine*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804598-5.00006-4>

Koffie, R. M., Farrar, C. T., Saidi, L. J., William, C. M., Hyman, B. T., & Spires-Jones, T. L. (2011). Nanoparticles enhance brain delivery of blood-brain barrier-impermeable probes for in vivo optical and magnetic resonance imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(46), 18837–18842. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111405108>

Krishnan, K. M. (2010). Biomedical Nanomagnetism: A Spin Through Possibilities in Imaging, Diagnostics, and Therapy. *IEEE Transactions on Magnetics*, 46(7), 2523–2558. <https://doi.org/10.1109/TMAG.2010.2046907>

Lewczuk, P., Mroczko, B., Fagan, A., & Kornhuber, J. (2015). Biomarkers of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: A current perspective. *Advances in Medical Sciences*, 60(1), 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2014.11.002>

Li, Q., Kartikowati, C. W., Horie, S., Ogi, T., Iwaki, T., & Okuyama, K. (2017). Correlation between particle size/domain structure and magnetic properties of highly crystalline Fe₃O₄ nanoparticles. *Scientific Reports*, 7(1), 9894. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09897-5>

Lombardo, S. M., Schneider, M., Türeli, A. E., & Türeli, N. G. (2020). Key for crossing the BBB with nanoparticles: The rational design. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 11(866), 866–883. <https://doi.org/10.3762/BJNANO.11.72>

Lourenço, I. M., Pieretti, J. C., Nascimento, M. H. M., Lombello, C. B., & Seabra, A. B. (2019). Eco-friendly synthesis of iron nanoparticles by green tea extract and cytotoxicity effects on tumoral and non-tumoral cell lines. *Energy, Ecology and Environment*, 4(6), 261–270. <https://doi.org/10.1007/s40974-019-00134-5>

- Lucchinetti, C. F. (2008). Multiple sclerosis and the spectrum of CNS inflammatory demyelinating diseases. *Seminars in Neurology*, 28(1), 3–6. <https://doi.org/10.1055/s-2007-1019123>
- Luo, B., Song, X. J., Zhang, F., Xia, A., Yang, W. L., Hu, J. H., & Wang, C. C. (2010). Multi-functional thermosensitive composite microspheres with high magnetic susceptibility based on magnetite colloidal nanoparticle clusters. In *Langmuir* (Vol. 26, Issue 3, pp. 1674–1679). <https://doi.org/10.1021/la902635k>
- Mahmoudi, M., Simchi, A., & Imani, M. (2009). Cytotoxicity of uncoated and polyvinyl alcohol coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry C*, 113(22), 9573–9580. <https://doi.org/10.1021/jp9001516>
- Maldonado-Camargo, L., Unni, M., & Rinaldi, C. (2017). *Magnetic Characterization of Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications* (pp. 47–71). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6840-4_4
- Mathieu, Coppel, Respaud, Nguyen, Boutry, Laurent, Stanicki, Henoumont, Novio, Lorenzo, Montpeyó, & Amiens. (2019). Silica Coated Iron/Iron Oxide Nanoparticles as a Nano-Platform for T2 Weighted Magnetic Resonance Imaging. *Molecules*, 24(24), 4629. <https://doi.org/10.3390/molecules24244629>
- McAteer, M. A., Sibson, N. R., von zur Muhlen, C., Schneider, J. E., Lowe, A. S., Warrick, N., Channon, K. M., Anthony, D. C., & Choudhury, R. P. (2007). In vivo magnetic resonance imaging of acute brain inflammation using microparticles of iron oxide. *Nature Medicine*, 13(10), 1253–1258. <https://doi.org/10.1038/nm1631>
- McConnell, H. L., Schwartz, D. L., Richardson, B. E., Woltjer, R. L., Muldoon, L. L., & Neuwelt, E. A. (2016). Ferumoxytol nanoparticle uptake in brain during acute neuroinflammation is cell-specific. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 12(6), 1535–1542. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.03.009>
- McQualter, J. L., & Bernard, C. C. A. (2007). Multiple sclerosis: A battle between destruction and repair. *Journal of Neurochemistry*, 100(2), 295–306. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04232.x>
- Menezes, M. J., McClenahan, F. K., Leiton, C. V., Aranmolate, A., Shan, X., & Colognato, H. (2014). The Extracellular Matrix Protein Laminin 2 Regulates the Maturation and Function of the Blood-Brain Barrier. *Journal of Neuroscience*, 34(46), 15260–15280. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3678-13.2014>
- Millward, J. M., Schnorr, J., Taupitz, M., Wagner, S., Wuerfel, J. T., & Infante-Duarte, C.

- (2013). Iron oxide magnetic nanoparticles highlight early involvement of the choroid plexus in central nervous system inflammation. *ASN Neuro*, 5(2), 89–98.
<https://doi.org/10.1042/AN20120081>
- Miner, J. H., Li, C., Mudd, J. L., Go, G., & Sutherland, A. E. (2004). Compositional and structural requirements for laminin and basement membranes during mouse embryo implantation and gastrulation. *Development*, 131(10), 2247–2256.
<https://doi.org/10.1242/dev.01112>
- Mirzaei, S., Hadadi, Z., Attar, F., Mousavi, S. E., Zargar, S. S., Tajik, A., Saboury, A. A., Rezayat, S. M., & Falahati, M. (2018). ROS-mediated heme degradation and cytotoxicity induced by iron nanoparticles: hemoglobin and lymphocyte cells as targets. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 36(16), 4235–4245.
<https://doi.org/10.1080/07391102.2017.1411832>
- Moghimi, S. M., Hunter, A. C., & Murray, J. C. (2001). *Long-Circulating and Target-Specific Nanoparticles : Theory to Practice*. 53(2), 283–318.
- Moura, M. De, & Houten, B. Van. (2010). Review Article. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 405(April), 391–405. <https://doi.org/10.1002/em>
- Naegele, M., & Martin, R. (2014). The good and the bad of neuroinflammation in multiple sclerosis. In *Handbook of Clinical Neurology* (1st ed., Vol. 122, Issue 0). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52001-2.00003-0>
- Neuberger, T., Scho, B., Hofmann, M., & Rechenberg, B. Von. (2005). *Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications : Possibilities and limitations of a new drug delivery system*. 293, 483–496. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2005.01.064>
- Nirwane, A., & Yao, Y. (2019). Laminins and their receptors in the CNS. *Biological Reviews*, 94(1), 283–306. <https://doi.org/10.1111/brv.12454>
- Patil, R. M., Thorat, N. D., Shete, P. B., & Bedge, P. A. (2018). Comprehensive cytotoxicity studies of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 13(December 2017), 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.12.002>
- Petry, K. G., Boiziau, C., Dousset, V., & Brochet, B. (2007). Magnetic Resonance Imaging of Human Brain Macrophage Infiltration. *Neurotherapeutics*, 4(3), 434–442.
<https://doi.org/10.1016/j.nurt.2007.05.005>
- Petry, K., VARGAS-SANCHEZ, K., & VEKRIS, A. (2016). DNA Subtraction of In Vivo Selected Phage Repertoires for Efficient Peptide Pathology Biomarker Identification in Neuroinflammation Multiple Sclerosis Model. *Biomarker Insights*, 19.

<https://doi.org/10.4137/BMI.S32188>

Quenault, A., Martinez de Lizarrondo, S., Etard, O., Gauberti, M., Orset, C., Haelewyn, B., Segal, H. C., Rothwell, P. M., Vivien, D., Touzé, E., & Ali, C. (2017). Molecular magnetic resonance imaging discloses endothelial activation after transient ischaemic attack. *Brain : A Journal of Neurology*, *140*(1), 146–157.

<https://doi.org/10.1093/brain/aww260>

Ramge, P., Petrov, V., Hamm, S., Gelperina, S. E., Engelhardt, B., Alyautdin, R., Von, H., & Begley, D. J. (2003). Direct Evidence that Poly (Butylcyanoacrylate) Nanoparticles Deliver Drugs to the CNS via Specific Mechanisms Requiring Prior Binding of Drug to the Nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, *20*(3), 409–416.

Roco, M. C. (2011). Erratum to: The long view of nanotechnology development: The National Nanotechnology Initiative at 10 years (Journal of Nanoparticle Research (2011) 13, (427-445) DOI: 10.1007/s11051-010-0192-z). *Journal of Nanoparticle Research*, *13*(3), 1335. <https://doi.org/10.1007/s11051-011-0323-1>

Rojas, H. A., Martínez, J. J., & Vargas, A. Y. (2014). Selección de soportes magnéticos para la inmovilización de Ureasa Magnetic supports selection for Urease immobilization. *Ingeniería y Competitividad*, *296*(2), 289–296.

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-30332014000200026

Schéele, S., Nyström, A., Durbeej, M., Talts, J. F., Ekblom, M., & Ekblom, P. (2007). Laminin isoforms in development and disease. *Journal of Molecular Medicine*, *85*(8), 825–836. <https://doi.org/10.1007/s00109-007-0182-5>

Sharifi, S., Seyednejad, H., Laurent, S., Atyabi, F., Saei, A. A., & Mahmoudi, M. (2015). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for in vivo molecular and cellular imaging. *Contrast Media and Molecular Imaging*, *10*(5), 329–355.

<https://doi.org/10.1002/cmml.1638>

Sicotte, N. L. (2011). *Neuroimaging in Multiple Sclerosis : Neurotherapeutic Implications*. *8*(January), 54–62. <https://doi.org/10.1007/s13311-010-0008-y>

Song, J., Zhang, X., Buscher, K., Wang, Y., Wang, H., Di Russo, J., Li, L., Lütke-Enking, S., Zarbock, A., Stadtmann, A., Striewski, P., Wirth, B., Kuzmanov, I., Wiendl, H., Schulte, D., Vestweber, D., & Sorokin, L. (2017). Endothelial Basement Membrane Laminin 511 Contributes to Endothelial Junctional Tightness and Thereby Inhibits Leukocyte Transmigration. *Cell Reports*, *18*(5), 1256–1269.

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.092>

- Stoll, G., & Bendszus, M. (2009). Imaging of inflammation in the peripheral and central nervous system by magnetic resonance imaging. *Neuroscience*, *158*(3), 1151–1160. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.06.045>
- Van Rooy, I., Cakir-Tascioglu, S., Couraud, P. O., Romero, I. A., Weksler, B., Storm, G., Hennink, W. E., Schiffelers, R. M., & Mastrobattista, E. (2010). Identification of peptide ligands for targeting to the blood-brain barrier. *Pharmaceutical Research*, *27*(4), 673–682. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0053-6>
- Van Rooy, I., Cakir-Tascioglu, S., Hennink, W. E., Storm, G., Schiffelers, R. M., & Mastrobattista, E. (2011). In vivo methods to study uptake of nanoparticles into the brain. *Pharmaceutical Research*, *28*(3), 456–471. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0291-7>
- Varatharaj, A., & Galea, I. (2017). The blood-brain barrier in systemic inflammation. *Brain, Behavior, and Immunity*, *60*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.03.010>
- Vellinga, M. M., Oude Engberink, R. D., Seewann, A., Pouwels, P. J. W., Wattjes, M. P., Van Der Pol, S. M. A., Pering, C., Polman, C. H., De Vries, H. E., Geurts, J. J. G., & Barkhof, F. (2008). Pluriformity of inflammation in multiple sclerosis shown by ultra-small iron oxide particle enhancement. *Brain*, *131*(3), 800–807. <https://doi.org/10.1093/brain/awn009>
- Wahajuddin, & Arora. (2012). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers. *International Journal of Nanomedicine*, 3445. <https://doi.org/10.2147/IJN.S30320>
- Weissleder, R., Elizondo, G., Wittenberg, J., Rabito, C. A., Bengel, H. H., & Josephson, L. (1990). Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: Characterization of a new class of contrast agents for MR imaging. *Radiology*, *175*(2), 489–493. <https://doi.org/10.1148/radiology.175.2.2326474>
- Willner, I., & Willner, B. (2002). Functional nanoparticle architectures for sensoric, optoelectronic, and bioelectronic applications. *Pure and Applied Chemistry*, *74*(9), 1773–1783.
- Wong, H. L., Wu, X. Y., & Bendayan, R. (2012a). Nanotechnological advances for the delivery of CNS therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *64*(7), 686–700. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.10.007>
- Wong, H. L., Wu, X. Y., & Bendayan, R. (2012b). Nanotechnological advances for the

delivery of CNS therapeutics. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 64, Issue 7, pp. 686–700). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.10.007>

Xiao, Y. (2019). *Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications*.

<https://doi.org/10.1039/c9tb01955c>

Yi, P., Chen, G., Zhang, H., Tian, F., Tan, B., Dai, J., Wang, Q., & Deng, Z. (2013).

Magnetic resonance imaging of Fe₃O₄@SiO₂-labeled human mesenchymal stem cells in mice at 11.7 T. *Biomaterials*, 34(12), 3010–3019.

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.01.022>

Zaharchuk, G. (2007). Theoretical basis of hemodynamic MR imaging techniques to

measure cerebral blood volume, cerebral blood flow, and permeability. *American Journal of Neuroradiology*, 28(10), 1850–1858. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A0831>

Zhang, L., Shao, H. ping, Zheng, H., Lin, T., & Guo, Z. meng. (2016). Synthesis and characterization of Fe₃O₄@SiO₂ magnetic composite nanoparticles by a one-pot process. *International Journal of Minerals, Metallurgy and Materials*, 23(9), 1112–1118. <https://doi.org/10.1007/s12613-016-1329-6>

Zhang, S., Li, J., Lykotrafitis, G., Bao, G., & Suresh, S. (2009). Size-dependent endocytosis of nanoparticles. *Advanced Materials*, 21(4), 419–424.

<https://doi.org/10.1002/adma.200801393>

Zinnhardt, B., Wiesmann, M., Honold, L., Barca, C., Schäfers, M., Kiliaan, A. J., & Jacobs, A. H. (2018). In vivo imaging biomarkers of neuroinflammation in the development and assessment of stroke therapies - towards clinical translation. *Theranostics*, 8(10), 2603–2620. <https://doi.org/10.7150/thno.24128>

Zlokovic, B. V. (2008). *Review The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders*. 2, 178–201.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.003>

