

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**“EFECTO DE NANOPARTÍCULAS DE ORO SINTETIZADAS CON QUITOSANO
(AuNp’s) EN LA DIFERENCIACIÓN DE MONOCITOS HUMANOS A CÉLULAS
DENDRÍTICAS”**

POR:

Q.B.P. MARGARITA IDALIA HERNÁNDEZ VILLEGAS

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON
ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

**EFFECTO DE NANOPARTÍCULAS DE ORO SINTETIZADAS CON QUITOSANO
(AuNp's) EN LA DIFERENCIACIÓN DE MONOCITOS HUMANOS A CÉLULAS
DENDRÍTICAS**

Comité de Tesis

Dra. Diana Ginette Zárate Triviño
Director de Tesis

Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Secretario

Dr. Pablo Zapata Benavides
Vocal

Dr. Moisés Armides Franco Molina
Vocal

Dra. Diana Elia Caballero Hernández
Vocal

**EFFECTO DE NANOPARTÍCULAS DE ORO SINTETIZADAS CON QUITOSANO
(AuNp's) EN LA DIFERENCIACIÓN DE MONOCITOS HUMANOS A CÉLULAS
DENDRÍTICAS**

Dra. Diana Ginette Zárate Triviño

Director de Tesis

Este trabajo de investigación se llevó a cabo gracias al apoyo económico y de infraestructura del laboratorio de Inmunología y Virología



AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a las doctoras Cristina Rodríguez Padilla y a la doctora Diana Ginette Zárate Triviño por sus grandes contribuciones en la realización de esta tesis.

A los doctores, Moisés Franco Molina, Pablo Zapata Benavides y Diana Elia Caballero Hernández por formar parte del Comité de Tesis, por sus valiosos comentarios y sugerencias en la revisión del presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

Al personal académico, técnico y administrativo de los laboratorios de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León por su ayuda en el desarrollo de este estudio.

DEDICATORIA

A la Dra. Diana Zárate, gracias doc, por su apoyo, confianza y amistad, a lo largo de 5 años
juntas.

A mis padres, hermano y familia.

A Alejandro José Rodríguez García, por tu apoyo cuando me quería dar por vencida.

A mi familia del L-18.

A mis compañeros del posgrado y mis amigos.

Gracias por todo.

INDICE

INDICE DE FIGURAS	10
RESUMEN	12
ABSTRACT	13
INTRODUCCIÓN	14
1. ANTECEDENTES	16
1.1 Monocitos	16
1.2 Células Dendríticas.....	17
1.2.1 Características de células dendríticas.	17
1.2.2 Indolamina 2,3-dioxigenasa.....	20
1.2.3 Galectina.....	22
1.3 Receptores de reconocimiento de patrón.....	24
1.3.1 Receptores Tipo Toll	24
1.3.2 RLRs.....	26
1.3.3 NLRs.....	26
1.3.4 CLR.....	27
1.4 Nanomateriales	27
1.4.1 Nanopartículas.....	28
1.5 Quitosano.....	29
1.6 Terapias con Receptores Tipo Toll.....	30
1.7 Terapias con nanomateriales	31
2. JUSTIFICACIÓN.....	33
3. HIPÓTESIS	34
4. OBJETIVOS.....	35
Objetivo General:	35

Objetivos Específicos:	35
5. MATERIALES Y MÉTODOS	36
5.1 Síntesis de Nanopartículas de oro (AuNp's)	36
5.2 Caracterización de las nanopartículas.....	36
5.3 Detección de endotoxina bacteriana presente en nanopartículas.....	36
5.4 Obtención de cultivo primario de monocitos de sangre periférica	37
5.5 Grupos experimentales.	38
5.6 Análisis de viabilidad con 7-Aminoactinomycin D (7-AAD).....	38
5.7 Análisis fenotípico de monocitos tratados con nanopartículas.....	38
5.8 Capacidad fagocítica de monocitos tratados con nanopartículas.	38
5.9 Obtención de muestras de proteína.....	39
5.9.1 Cuantificación de proteínas por el método de BCA	39
5.10 Análisis de expresión de receptores tipo Toll por <i>Western Blot</i>	40
5.10.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	40
5.10.2 Transferencia a membrana de nitrocelulosa	40
5.10.3 Inmunodetección	41
5.11 Determinación de perfil de citocinas por citometría de flujo	41
5.12 Análisis estadístico	42
6. RESULTADOS	43
6.1 Caracterización de nanopartículas de oro (AuNp's).....	43
6.2 Determinación de endotoxina presente en nanopartículas de oro (AuNp's).....	44
6.3 Viabilidad células de monocitos humanos tratados con nanopartículas de oro (AuNp's). ..	44
6.4 Evaluación de expresión de marcadores de diferenciación celular en monocitos humanos tratados con nanopartículas de oro (AuNp's)	46

6.5 Análisis de la capacidad fagocítica de monocitos humanos.....	48
6.6 Evaluación de la activación de receptores tipo Toll 3, 4, 7, 8 y 9 en células tratadas con AuNp's.....	49
6.7 Determinar la expresión de moléculas inmunomoduladoras de la respuesta inmune de células tratadas con AuNp's.	51
6.10 Análisis del perfil de citocinas de monocitos humanos tratados con AuNp's.....	52
7. DISCUSIÓN.....	57
8. CONCLUSIONES	64
9. PERSPECTIVAS	65
10. BIBLIOGRAFÍA.....	66

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Marcadores de superficie de células dendríticas.....	18
Figura 2. Diferencias en marcadores de superficie entre células dendríticas maduras e inmaduras	19
Figura 3. Inducción deIDO en DC en respuesta al estímulo de IFN.....	21
Figura 4. Factores activados por TLRs	25
Figura 5. Estructura molecular de quitina y quitosano.....	29
Figura 6. Plasmón de resonancia superficial de AuNp's.	43
Figura 7. Determinación de tamaño promedio de AuNp's.	43
Figura 8. Detección de endotoxinas bacterianas en AuNp's.....	44
Figura 9. Viabilidad celular de monocitos humanos tratados con AuNp's.....	45
Figura 10. Análisis de expresión de marcados en monocitos humanos tratados con AuNp's	46
Figura 11. Análisis de expresión de marcados en monocitos humanos tratados con AuNp's	47
Figura 12. Capacidad fagocítica de monocitos tratados con AuNp's	48
Figura 13. Análisis de expresión de receptor tipo Toll mediante <i>Western Blot</i>	50
Figura 14. Análisis de expresión de moléculas inmunomoduladoras por <i>Western Blot</i>	51
Figura 15. Niveles de expresión de IL-1 β encontrados en sobrenadante de cultivo	52
Figura 16. Niveles de expresión de IL-6 encontrados en sobrenadante de cultivo de monocitos tratados con AuNp's, quitosano y LPS.	53
Figura 17. Niveles de expresión de IL-8 encontrados en sobrenadante de cultivo de monocitos tratados con AuNp's, quitosano y LPS.	54
Figura 18. Niveles de expresión de IL-10 encontrados en sobrenadante de cultivo de monocitos tratados con AuNp's, quitosano y LPS.	54
Figura 19. Niveles de expresión de IL-12p70 encontrados en sobrenadante de cultivo de monocitos tratados con AuNp's, quitosano y LPS.	55
Figura 20. Niveles de TNF en sobrenadante de cultivo de monocitos tratados con AuNp's, quitosano y LPS	56

RESUMEN

Los monocitos son los principales actores de la inmunidad innata, además según el estímulo son capaces de diferenciarse en macrófagos, osteoclastos o células dendríticas. Las células dendríticas (DC) son las células presentadoras de antígenos por excelencia, por lo que son catalogadas como centinelas del sistema inmune. Las DC inician la respuesta del sistema inmune al ser estimuladas por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o asociados a daño (DAMPs). En el momento en que se captura algún antígeno, estos son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones (PRR), de los cuales el más estudiado son los receptores tipo Toll (TLR). Los TLR tienen diferentes ligandos que, al unirse a estos receptores, los activan e inducen respuestas inflamatorias, así como el aumento en la producción de moléculas coestimuladoras, como CD80, CD86 y CD40 que son necesarias para la activación de linfocitos T. Por su biocompatibilidad y baja toxicidad, las nanopartículas de oro (AuNp's) son una alternativa terapéutica atractiva en terapias contra el cáncer, antivirales, inmunoestimulantes y de regeneración tisular. El principal uso de las AuNp's, en la estimulación de TLR, es como adyuvantes de ligandos de los TLRs en vacunas contra infecciones y contra cáncer, sin embargo, hay pocos estudios donde analizan el efecto de las nanopartículas por sí solas sobre estos receptores. El presente trabajo tiene como objetivo determinar el efecto de las AuNp's sobre monocitos humanos en la diferenciación a DC.

ABSTRACT

Monocytes are the first actors of innate immunity, additionally, depending on the type and strength of the stimulus received they can differentiate to macrophage, osteoclasts or dendritic cells (DC). DC are professional antigen-presenting cells (APC) for this reason they are known as “immune system sentinels”.

The adaptive immune system response is initiated by DC when they are stimulated by any pathogen-associated molecular pattern (PAMP) or any damage-associated molecular pattern (DAMPs). In the moment DC capture an antigen, this is recognized by pattern-recognition receptors (PRR). The best characterized PRR family is the Toll-Like Receptors (TLR) family. TLR are activated by different ligands, causing an inflammatory response, and the upregulation of costimulatory molecules like CD80, CD86 and CD40, which are needed for T cell activation.

Due to their biocompatibility and low toxicity, gold nanoparticles (AuNp's) represent an attractive therapeutic alternative in cancer, antiviral, immunostimulant and tissue regeneration therapies. The main use of AuNp's, in the stimulation of TLR, is as adjuvants of TLRs ligands in vaccines against infections and against cancer, however, few are the studies where the effect of nanoparticles on these receptors has been analyzed. This paper aims to determine the effect of AuNp's on differentiation of human monocytes to DC.

INTRODUCCIÓN

Células mieloides del sistema inmune innato, como monocitos, macrófagos, y células dendríticas (DC) contribuyen a la primera línea de defensa contra patógenos. Monocitos y DC se originan de un precursor hematopoyético en la médula ósea. Cuando la homeostasis se ve perturbada, los monocitos son reclutados a los sitios de inflamación, dando lugar a los diferentes subtipos de DC que rápidamente estimulan a linfocitos T efectores. Los DC dan lugar a una respuesta específica contra algún patógeno activando el sistema inmune adaptativo.

Las células presentadoras de antígeno más eficientes son las células dendríticas maduras e inmunológicamente competentes. Las DC pasan de un estado inmaduro a un estado maduro con la capacidad de capturar y presentar antígenos, convirtiéndolos en inmunógenos y expresando moléculas como citocinas, quimiocinas, moléculas coestimuladoras para iniciar la respuesta inmune. Los tipos de respuesta mediada por células T (tolerancia o inmunidad) pueden variar dependiendo en el estado de maduración de las DC, de su linaje, así como de las señales de activación recibidas del microambiente que las rodee.

Diversos factores están involucrados en la maduración y la posterior toma y presentación de antígenos por la DC, entre ellos están antígenos derivados de microorganismos como lipopolisacárido (LPS), citocinas proinflamatorias, ligandos para receptores celulares y productos virales como RNA de doble cadena (dsRNA).

En el momento en que se capturan antígenos microbianos, los productos de los microorganismos son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones (PRR) innatos en las células dendríticas, lo que genera respuestas inmunitarias innatas. *In vivo*, la familia principal de receptores juega un papel prominente, los receptores tipo Toll. Por lo que en las últimas décadas se han convertido en un blanco terapéutico atractivo para la modulación del sistema inmune.

Desde su surgimiento a finales del siglo XX, la nanotecnología ha sido considerada como una herramienta poderosa para el desarrollo de nuevas terapias, sin embargo, las vías de acción de los nanomateriales y sus efectos sobre el sistema inmune aún no están completamente comprendidos,

por esta razón este trabajo pretende evaluar el efecto de nanopartículas de oro sintetizadas con quitosano sobre la diferenciación de monocitos hacia DC.

1. ANTECEDENTES

1.1 Monocitos

Los monocitos son células fagocíticas mononucleares derivadas de médula ósea que circulan en el torrente sanguíneo por algunos días antes de ser reclutados hacia tejidos. Los monocitos están presentes en todos los vertebrados, representan aproximadamente entre 4 al 10% in sangre periférica humana. Los monocitos son las células más grandes en sangre periférica (14µm a 20µm de diámetro), tienen una morfología particular que incluye una forma irregular, núcleo oval o arriñonado, vesículas citoplasmáticas y un radio núcleo/citoplasma aproximadamente de 3:1 (Shantsila et al., 2011; Van der Vorst & Weber, 2019).

Existen diferentes tipos de subtipos de monocitos basados en la expresión de los receptores CD14 y CD16, siendo el principal marcado de monocitos humanos el CD14 que es una glicoproteína y antígeno de diferenciación mielomonocítica que funciona como proteína accesoria para el receptor tipo Toll 4 (TLR4). Monocitos clásicos con CD14^{high} CD16⁻, y comprenden el 90% de los monocitos totales; no clásicos CD14^{low}CD16^{high} e intermedios CD14^{high}CD16^{high}. También fue identificado HLA-DR y CD11c como marcadores de superficiales cruciales para la identificación y separación de los diferentes subtipos de monocitos. La función de precursor estás más asociada a los monocitos clásicos (Shantsila et al., 2011; Sprangers, Vries, & Everts, 2016; Van der Vorst & Weber, 2019).

Bajo condiciones específicas, los monocitos pueden estimular o inhibir respuesta de células T ante cáncer o infecciones y enfermedades autoinmunes, además están involucrados en reparación de tejidos y neovascularización. El egreso de los monocitos de la medula ósea está controlado por los receptores de quimiocinas CCR2 y sus ligandos CCL2 (MCP-1) y CCL7 (MCP-3) (Sprangers et al., 2016) .

Los monocitos clásicos son rápidamente reclutados al sitio de inflamación y contribuyen a las respuestas inmunológicas contra infecciones virales, bacterianas, fúngicas y parasitarias al matar los patógenos vía fagocitosis, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), óxido nítrico (NO), mieloperoxidasa y citocinas inflamatorias como IL-1 beta y TNF-alfa. Además, están

equipadas con varios receptores “scavenger” como CD204 y CD36 para la remoción de sustancias biológicas de la circulación y de tejidos

Los monocitos reclutados a los sitios de inflamación se diferencian localmente macrófagos, DC u osteoclastos en respuesta al interferón producido por los linfocitos natural killer (NK). In vitro, los monocitos cultivados en presencia de GM-CSF e IL-4 generan DC inmaduras que más adelante pasan a ser DC maduras por estímulo de TNF-alfa (Sprangers et al., 2016; Wacleche, Tremblay, Routy, & Ancuta, 2018)

1.2 Células Dendríticas.

Las células presentadoras de antígenos (APC) son las encargadas de desencadenar el inicio y desarrollo de la respuesta inmunitaria adaptativa, al captar, procesar y presentar antígenos ante linfocitos efectores. Existen varias células con función de presentadoras de antígenos, sin embargo, de entre todas, las más especializadas son las células dendríticas (DC) (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2015).

1.2.1 Características de células dendríticas.

Las DC se derivan, ya sea, de precursores linfoides o de precursores mieloides; Una vez diferenciadas se encuentran en tejidos linfáticos y periféricos, donde se encargan de la vigilancia inmunológica y control de la reactividad inmune del hospedero (Hargadon, 2013).

Las DC se diferencian de un progenitor hematopoyético CD34⁺ en la médula ósea. Una célula progenitora mieloide puede diferenciarse a CD11c⁺ CD1a⁺ DC inmaduras (iDC) que migran a la epidermis y se convierten en células de Langerhans (LC) o a CD11c⁺CD1a⁻ iDC que migran a la dermis y a otros tejidos y se convierten en DC intersticiales que residen en la dermis, en vías respiratorias, intestinos, espacios intersticiales, tejidos linfáticos y sangre (Figura 1.)

Los monocitos CD14⁺ también son una fuente de precursores de DC durante estrés fisiológico. Otra subclase son las DC plasmocitoides (pDC), que se originan de progenitores linfoides y carecen de marcadores mieloides como CD13, CD14 y CD33, pero expresan altos niveles de CD123, CD4,

CD62 ligando (CD62L). El linaje de las DC determina el carácter de la célula T con la que entra en contacto, ya sea tolerancia o inmunidad. (Cools, Ponsaerts, Tendeloo, & Berneman, 2007).

TABLE 1. Different Subsets of Dendritic Cells

Phenotype	CD34+ hematopoietic stem cell			
	Myeloid progenitor cell			Lymphoid progenitor cell
	Monocyte-derived DC	Langerhans cells	Interstitial DC	Plasmacytoid DC
CD11c	+	+	+	-
CD1a	+/-	++	+/-	+/-
CD123	-/low	-	-/low	++
Birbeck granules	+/-	++	+/-	-
Factor XIIIa	+/-	-	++	-
MHC class II	++	+	+	+

Figura 1. Marcadores de superficie de células dendríticas (Cools et al., 2007).

Las células dendríticas inmaduras (iDC) no son capaces de estimular células T al carecer de señales accesorias para la activación de estas células como CD40, CD54 y CD80, sin embargo, se especializan en capturar y procesar antígenos para formar complejos de péptidos con el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (Banchereau & Steinman, 1998).

Las iDC son altamente fagocíticas para antígenos (Ag) soluble o asociados a células; por otro lado, la estimulación de estas células, por una gran variedad de factores como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), mediadores inflamatorios, CD40L entre muchos otros, inducen la maduración y activación de estas células, convirtiéndoles en potentes estimuladores de la activación del sistema inmune. (Hargadon, 2013)

En el momento en que se capturan antígenos microbianos, los productos de los microorganismos son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones (PRR) innatos en las células dendríticas, lo que genera respuestas inmunitarias innatas. *In vivo*, la familia principal de receptores juega un papel prominente, los receptores tipo Toll (Abbas et al., 2015; Steinman, Hawiger, & Nussenzweig, 2003b).

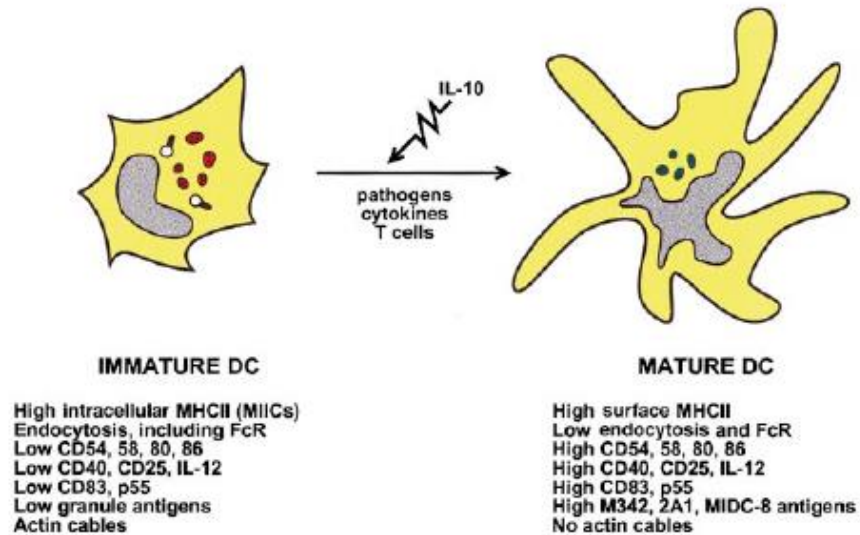


Figura 2. Diferencias en marcadores de superficie entre células dendríticas maduras e inmaduras (Banchereau & Steinman, 1998).

Las células dendríticas maduras (mDC) presentan una morfología caracterizada por procesos membranosos que toman la forma de dendritas, además de contener grandes cantidades de estructuras intracelulares relacionadas con el procesamiento antigénico como endosomas y lisosomas. En cuanto a marcadores se caracterizan por una elevada expresión de moléculas de MHC clase II, moléculas de adhesión como CD 11, CD 50, CD54, CD 58 y CD102 y moléculas coestimuladoras como CD40, CD80 y CD 86. La mayoría de estos marcadores ya están presentes en bajos niveles en las iDC; en cambio, el CD83 está ausente en las iDC y sirve como marcador para distinguir las iDC de las mDC (Begoña Vázquez, Sureda, & Rebollo, 2012).

Las DC procesan y presentan antígenos para activar tanto células T CD4⁺ como CD8⁺. Una vez capturado, el antígeno es procesado por vía exógena o por vía endógena. Para la presentación por MHC de clase I para estimular células T citotóxicas CD8⁺, el antígeno o proteína es tomado por fagocitosis o por endocitosis mediada por receptores en el citosol. El antígeno es posteriormente degradado en el citosol vía proteosoma y entra al retículo endoplásmico donde péptidos se unen a

moléculas de MHC clase I para su presentación en la superficie celular. Para la presentación por MHC clase II para estimular células T cooperadoras CD4⁺, el antígeno es tomado por fagocitosis o por endocitosis mediada por receptores hacia endosomas donde la proteólisis ocurre. Los péptidos entran a vesículas con moléculas de MHC clase II donde se unen y son transportados hacia la superficie celular. Un componente clave en la presentación y procesamiento de antígeno para la activación células T, es la presencia de moléculas coestimuladoras, como miembros de la familia B7, de la familia TNF, moléculas de adhesión intracelulares (Wieder, 2003).

La habilidad de DC de regular la inmunidad depende en su maduración. Diferencias en el estímulo de maduración de las DC lleva a una polarización diferente de las células T o funciones efectoras inmunotolerantes. Tolerancia es la inhabilidad del sistema inmune para responder a antígenos específicos. La tolerancia central, para las células T, ocurre en el timo, y en la médula ósea para las células B (Cools et al., 2007; Wieder, 2003).

Moléculas derivadas de productos bacterianos o virales como lipopolisacárido (LPS), motivos CpG y RNA de doble cadena (dsRNA) así como citocinas proinflamatorias (TNF- α , INF- γ) y señales de células T (CD40L) promueven la producción de citocinas por las DC, como IL-12p70 e IFN- α induciendo respuesta de células T cooperadoras 1 (Th1). Por el contrario, moléculas antiinflamatorias como IL-10, prostaglandina (PG)E₂, corticosteroides, indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), galectinasa y ligando de muerte programada 1 promueven una respuesta de células T cooperadoras 2 (Th2) o de respuesta de células T reguladoras (Treg) (Cools et al., 2007; Lin et al., 2017).

1.2.2 Indolamina 2,3-dioxigenasa

La Indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) es una proteína monomérica de 403 aminoácidos y con una masa molecular de 42-45 kDa aproximadamente y fue identificada y aislada por primera vez del intestino de conejo en 1967. Esta enzima intracelular cataliza la escisión del anillo indol del L-Triptófano (L-Trp) convirtiéndolo a *N*-formil quinurenina (NFK), la primera enzima de la vía de la quinurenina (Kyn) parte del metabolismo del triptófano. (Yeung, Terentis, King, & Thomas, 2015). La expresión de IDO en células presentadoras de antígenos es esencial para la tolerancia

fetal, la tolerancia oral y el mantenimiento de un ambiente inmuno-supresivo en intestino (Harden & Egilmez, 2012).

En humanos hay una expresión constitutiva de IDO en placenta, ojos y páncreas. A nivel celular, el IFN es el principal inductor de la expresión de IDO por medio del factor de transcripción DAP12; bajo estímulo de inflamación o infección, la producción de IFN, induce a una elevada expresión de IDO en células mieloides incluyendo APCs como monocitos, macrófagos, DCs, neutrófilos y eosinófilos, así como en células no hematopoyéticas como células endoteliales, epiteliales, fibroblastos y células de musculo liso. Otros factores que inducen la expresión de IDO son los ligandos del factor de transcripción receptor Aril Hidrocarburos (AhR) y citocinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF- β (Munn & Mellor, 2016; Yeung et al., 2015) (Figura3).

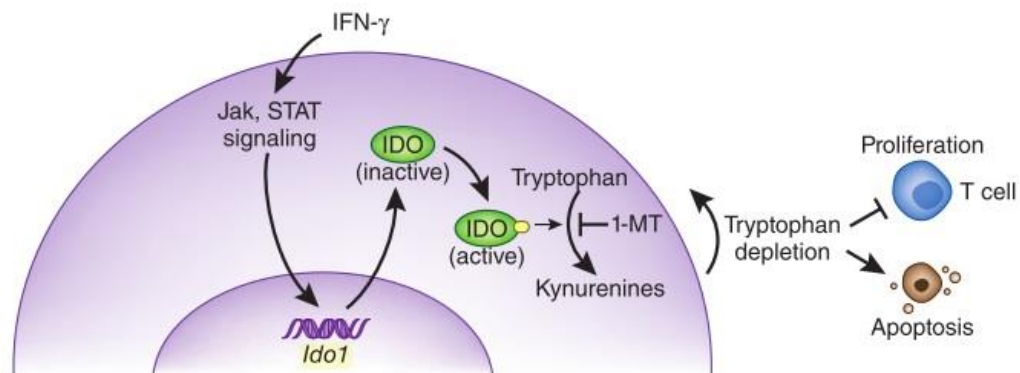


Figura 3. Inducción de IDO en DC en respuesta al estímulo de IFN (W. Chen, 2011).

La actividad de IDO resulta en una reducción local del L-Trp al ser transportado hacia el interior de células desde el ambiente extracelular a través del sistema L de transporte de aminoácidos (LATs), impactando directamente en la tolerancia periférica y en la regulación de la inmunidad (Cools et al., 2007; Steinman, Hawiger, & Nussenzweig, 2003a; Yeung et al., 2015).

Esta baja concentración de triptófano activan una vía en respuesta al estrés mediada por la quinasa de control general no reprimido 2 (GCN2), que se une directamente a los tRNA no cargados, ocasionando un bloqueo en la síntesis de proteínas, por otro lado, causa la regulación negativa de la cadena zeta de CD3 en células T CD8⁺ y una activación deficiente del TCR al interrumpir la señalización de Ca⁺ e inhibición de la diferenciación hacia células TH17, al inhibir el complejo mTORC2 previniendo que fosforile a Akt, que es necesario para la activación de células T efectoras, quienes entran a un procesos de autofagia y anergia (Harden & Egilmez, 2012; Munn & Mellor, 2016; Yeung et al., 2015).

Se ha reportado que la administración sistémica de dosis altas del agonista del TLR 9, CpG induce la expresión deIDO en DCs, mientras que a bajas concentraciones no induce producción deIDO (Harden & Egilmez, 2012).

La activación del factor de transcripción AhR mediada por la Kyn conlleva a la diferenciación de células T CD4⁺ vírgenes a células T reguladoras Foxp3⁺ (Treg) por la estimulación del TGF-β y bloquea al factor de transcripción Eos, necesario para la reprogramación de células Treg a células Th17 (Yeung et al., 2015).

Por otro lado, la quinurenina se une y activan el receptor de aril hidrocarburos (AhR) que promueve la diferenciación a células Treg y puede inducir un fenotipo inmunosupresor en DC y macrófagos (Munn & Mellor, 2016).

1.2.3 Galectina

Galectinas son un grupo de proteínas conocido por su habilidad de unirse azúcares β-galactósidos, ya sea por N-glicosilación o por O-glicosilación. Se han identificado 15 miembros de esta familia de los cuales, galectinas 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 12 y 213 están presentes en humanos. Galectinas (Gal)-1, Gal-3 y Gal-9, son conocidas por tener la capacidad de modular la respuesta inmune adaptativa; y de estas la más estudiada es la Gal-3 (Cedeno-Laurent & Dimitroff, 2012; Ebrahim et al., 2014).

Gal-3 es una lectina multimérica de 30 kDa, descrita con diferentes nombres en varias especies, como CBP-35, RL-29, hL-31 entre otras. Esta proteína es una lectina de tipo quimérico con un

dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) que contiene una secuencia de aminoácidos muy parecida al CRD del factor anti apoptótico mitocondrial BCL-2 (Asp-Trp-Gly-Arg) y una cola amino terminal flexible compuesto de una estructura parecida al colágeno. (Cedeno-Laurent & Dimitroff, 2012)

Tiene numerosos ligandos intracelulares como Bcl-2, Ras y Gemin-4, principalmente regulando el crecimiento celular y apoptosis. Gal-3 se une a CD29 y CD7 en células T activadas, induciendo apoptosis a través de la activación de caspasa-3 y la liberación de citocromo c. (Cedeno-Laurent & Dimitroff, 2012). CD7 se expresa en la mayoría de los timocitos humanos, células T de sangre periférica y en células NK, esta aumenta después de la activación de células T y participa en la adhesión y regulación de activación de células NK y maduración de células T. CD29 es una subunidad de una integrina con amplia distribución en diferentes tejidos, mediando la apoptosis de células de musculo liso, endoteliales y T. También está asociada en la activación e inducción de la muerte de células T (Fukumori et al., 2003).

A través de proteómica se identificó a la Gal-3 como componente de vesículas intracelulares, fagosomas en macrófagos y exosomas en DC. Gal-3 es inducida cuando linfocitos T son activados con un anticuerpo anti-CD3 o con IL-2, IL-4 y IL-7, citocinas que causan proliferación en linfocitos T, también se ha observado que cuando existe un aumento en la producción de Gal-3 se observa una disminución en la capacidad proliferativa y una baja producción de IFN- γ e IL-17 por parte de células CD8+ (Cedeno-Laurent & Dimitroff, 2012; Liu, Patterson, & Wang, 2002a)

Fukumori et al, utilizando microscopia óptica e inhibidores competitivos de carbohidratos, demostraron que Gal-3 se une a células T mediante interacciones específicas de carbohidratos, y se sabe que esta unión juega un papel inhibitorio en la activación de células T al formar complejos con los glicanos del TCR, limitando la dimerización necesaria para la iniciación de la señalización de este receptor (Fukumori et al., 2003; Radosavljevic et al., 2012)

Esto también se ha observado en estudios realizados por Kouo y colaboradores, donde se encontró Gal-3 aumentada en pacientes con adenocarcinoma pancreático ductal, y se observaron diversas propiedades inmunomoduladoras como la reducción de la afinidad del receptor de células T (TCR) al secuestrarlo de su correceptor CD8+, inducción de apoptosis e internalización del TCR. A

demás, encontraron que al inhibir Gal-3 de un modelo *in vivo*, se incrementaba el número de células T CD8+ en un microambiente tumoral. También se ha encontrado que en células dendríticas que no expresaban Gal-3, hay un aumento en células T y producción de citocinas en infecciones helmínticas y promover una mayor respuesta Th17 ante antígenos fúngicos (Kouo et al., 2015).

1.3 Receptores de reconocimiento de patrón

Entre las familias de receptores de reconocimiento de patrón (PRR) que incluyen proteínas transmembranales de superficie que desencadenan la maduración han sido caracterizados: Receptores tipo Toll (TLRs), Receptores tipo RIG-I (RLRs), Receptores tipo NOD (NLRs) y Receptores de lectina tipo C (CLRs) (Takeuchi & Akira, 2010).

1.3.1 Receptores Tipo Toll

La familia de TLR es la mejor caracterizada de entre las familias de los PRR. (Takeuchi & Akira, 2010) Toll se identificó originalmente como un gen de *Drosophila* activo durante la embriogénesis de la mosca de la fruta, después se descubrió que la proteína Toll también mediaba la respuesta antimicrobiana en este organismo (Abbas et al., 2015).

Los TLRs son glicoproteínas transmembranales con una estructura que consta de un ectodominio extracelular N-terminal caracterizados por 16 a 28 repeticiones ricas en leucina (LRRs), una porción transmembranal y una porción intracelular citoplasmática con un dominio receptor Toll/IL-1 (TIR). Actualmente se han identificado 13 TLR, de los cuales del 1 al 9 se encuentran tanto en humanos como en ratones. TLR 10 solo se encuentra en ratones mientras que TLR11, 12 y 13 no se encuentran en el genoma humano.

Los TLRs pueden clasificarse en receptores de superficie celular o intracelulares. TLR1, 2, 4, 5, 6, 10, 11 y 12 se encuentran en la superficie celular y reconocen moléculas como lípidos, lipoproteínas y proteínas. TLR3, 7, 8 y 9 se encuentran en compartimientos intracelulares como retículo endoplásmico (ER), endosomas, lisosomas y endolisosomas donde detectan ácidos nucleicos microbianos (Jin, Sun, Yu, Yang, & Yeo, 2012).

Cada TLR desencadena una respuesta biológica específica. TLR3 y TLR4 generan respuestas con interferón (IFN) de tipo I y citocinas proinflamatorias, mientras que dímeros TLR1/2, TLR2/6 y TLR5 producen principalmente, citocinas proinflamatorias. Estas diferencias se deben a las moléculas adaptadoras MyD88, TIRAP, TRIF y TRAM, encontradas en el dominio TIR y activan distintas vías de señalización. MyD88 es usado por todos los TLR excepto TLR3 y activa el factor de transcripción NF- κ B y las proteínas quinasas activadas por mitógenos para inducir citocinas proinflamatorias. TRIF es usado por TLR3 y TLR4 induciendo la activación de los factores IRF3 y NF- κ B que induce la IFN tipo I y citocinas proinflamatorias. TRAM y TIRAP funcionan como clasificadores de adaptadores que reclutan TRIF a TLR4 y MyD88 a TLR2 y TLR4. De esta manera las vías de señalización de los TLRs pueden clasificarse como vía dependiente de MyD88 que induce citocinas proinflamatorias o como vía dependiente de TRIF que induce IFN tipo I y citocinas proinflamatorias (Kawai & Akira, 2010).

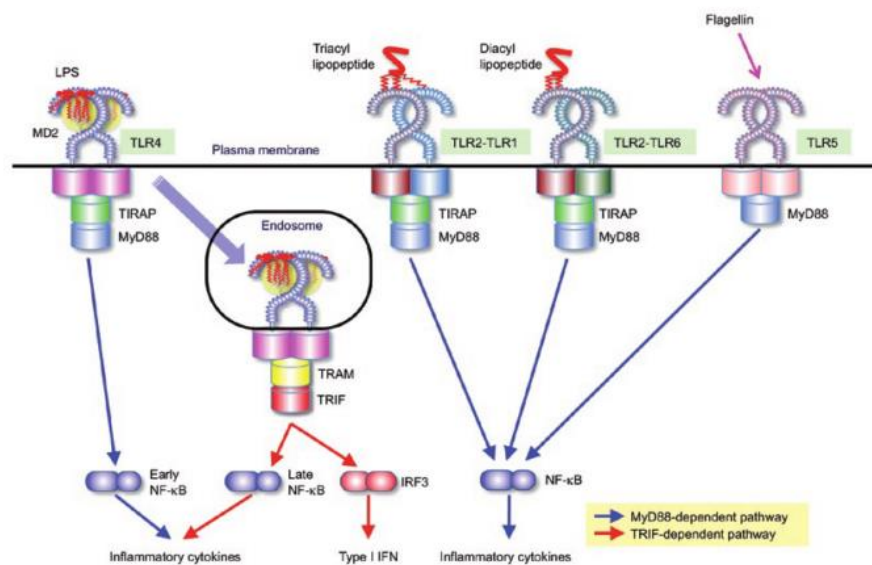


Figura 4. Factores activados por TLRs (Kawai & Akira, 2010).

Los TLR no sólo reconocen productos microbianos, también participan en respuesta a moléculas endógenas cuya expresión o localización indica daño celular, ejemplos de esto son las proteínas de choque térmico (HSP), inducidas en respuesta a varios inductores de estrés celular, y la caja del grupo de movilidad alta 1 (HMGB1), una proteína abundante ligadora de ADN implicada en la transcripción y reparación del ADN, productos de la degradación de la matriz extracelular

(EMC). Además complejos de DNA y cromatina, complejos de ribo nucleoproteínas y complejos inmunes con antígenos propios pueden estimular TLR 7 y TLR9 y provocar el desarrollo de una enfermedad autoinmune sistémica (Abbas et al., 2015; Kawai & Akira, 2010).

1.3.2 RLRs.

La familia de receptores tipo RIG-I (RLR) está compuesta de RIG-I, Gen 5 asociado a la diferenciación de melanoma (MDA5) y LGP2. Esta familia está formada por dos dominios de reclutamiento de caspasas N- terminal (CARDs), un dominio central DEAD box helicasa/ATPasa y un dominio regulador C-terminal. Se localizan en el citoplasma y reconocen RNA y dsRNA viral. La expresión de RLRs es estimulada en respuesta a la estimulación por IFN tipo I o a infecciones virales. RIG-I reconoce dsRNA cortos (de hasta 1kb), por el contrario, MDA5 detecta dsRNA largos (más de 2kb) como poli I:C. LPG2, el tercer miembro de la familia carece del dominio CARD. El dominio regulador C-terminal de los RLRs es responsable de la unión a dsRNA. EL dominio CARDs de los RLRs es responsable de desencadenar las cascadas de señalización al interactuar con el adaptador N-terminal con dominio CARD, IFN-B (IPS-1) (Takeuchi & Akira, 2010).

1.3.3 NLRs.

Receptores tipo NOD (NLRs) es una familia de moléculas que censa un amplio rango de ligandos desde el citoplasma celular. Esta familia está compuesta por 23 miembros en humanos y aproximadamente 34 en ratones. Estos sensores están formados por 3 dominios: el dominio C-terminal involucrado en el reconocimiento de los PAMPs o moléculas endógenas, el dominio N-terminal que consiste en el dominio efector de muerte (DED), el dominio Pyrin (PYD), un CARD, repeticiones inhibitoras de baculovirus (BIRs) y un dominio ácido. Después del reconocimiento de los PAMPs, estos sensores activan el factor NF-kB o las MAP quinasas para inducir la producción de citocinas proinflamatorias o la activación de un complejo multiproteico llamado el Inflamosoma que desencadena la muerte celular (Kumar, Kawai, & Akira, 2011).

NOD 1 y NOD 2 (también conocidos como CARD4 y CARD15, respectivamente), son expresados principalmente en el citosol de varias células y reconocen el peptidoglicano, componente principal de la pared bacteriana. NOD2 también juega un papel importante en la defensa contra protozoarios parásitos como *Toxoplasma gondii*. El reconocimiento de los PAMPS inicia una oligomerización de estos sensores, que subsecuentemente recluta a la proteína RIP2 vía interacción CARD-CARD que activa NF-κB y las MAP quinasas para inducir la transcripción de citocinas proinflamatorias (Kumar et al., 2011).

1.3.4 CLRs.

Análoga a la super familia de las inmunoglobulinas, la familia de lectinas tipo C se compone de más de 1000 miembros con diversas funciones incluyendo adhesión celular, activación de complemento, fagocitosis e inmunidad innata. Receptores de lectinas tipo C reconocen patógenos y en algunos casos inician vías de señalización que conllevan a respuestas inflamatorias y microbicidas. Receptor de manosa, DEC-205 y Langerin son miembros de los CLRs y tienen actividad endocítica, mediando internalización de sus ligandos permitiendo el procesamiento y presentación de éstos (Osorio & Reis e Sousa, 2011).

1.4 Nanomateriales

Desde su surgimiento a finales del siglo XX, la nanotecnología ha sido considerada como una herramienta poderosa para desarrollar nuevas estrategias biomédicas para la terapia celular. Los nanomateriales pueden ser descritos como materiales con dimensiones constitutivas en la escala de un nanómetro, con características únicas que pueden cumplir funciones en la ingeniería celular. La escala subcelular de los nanomateriales asegura la interacción con las células con resolución molecular que conduce a una mayor citocompatibilidad y bioactividad debido a que el comportamiento celular está influenciado significativamente por la superficie nanotopográfica del soporte que promueve la adherencia celular, diferenciación y proliferación al imitar de manera natural la matriz extracelular (Hsu et al., 2013; Yildirimer, Thanh, & Seifalian, 2012).

Los nanomateriales tienen una muy amplia gama de presentaciones como son los nanotubos, nanofibras, nanocables, nanopartículas, nanocristales, nanopelículas etc. (Zhang & Webster, 2009).

1.4.1 Nanopartículas.

Actualmente, la mayoría de los nanomateriales aprobados por la FDA para el uso clínico están en forma de nanopartículas por lo cual son la presentación más empleada, y han causado mucho interés debido a características, dependientes de tamaño como propiedades magnéticas y ópticas, que se creen son resultado de la alta relación superficie-volumen (Colorado Ana Cristina, Agudelo Carlos Andrés, Moncada A, 2013).

Las nanopartículas pueden ser sintetizadas de materiales orgánicos como polímeros y proteínas o de materiales inorgánicos como metales, principalmente Au, Ag y Pt, y suelen ser más estables y económicas de sintetizar (H. Chen, Li, & Du, 2012). A pesar de que estos metales comparten propiedades similares, la plata es considerada muy reactiva y el platino es, significativamente más costoso que el oro (Sugunan, Thanachayanont, Dutta, & Hilborn, 2005). Nanopartículas de oro (AuNp's) están reportadas como bioinertes y no citotóxicas, por esto se han convertido en el nanomaterial más usado para aplicaciones terapéuticas (Tsai 2011).

La mayoría de los agentes químicos utilizados en los métodos químicos tradicionales, tienen la gran desventaja de ser altamente tóxicos por lo que, con la creciente preocupación sobre el medio ambiente, actualmente el encontrar procesos más económicos y sustentables a través de la llamada química verde (Raveendran, Fu, & Wallen, 2003).

Agentes reductores, para la síntesis de nanopartículas, más económicos y amigables con el medio ambiente han sido reportados previamente. Entre los agentes reductores más reportados en síntesis verde incluyen microorganismos como bacterias (Thakkar, Mhatre, & Parikh, 2010), hongos (Mukherjee *et al.*, 2001; Thakkar *et al.*, 2010) actinomicetos, (Ahmad *et al.*, 2003) extractos de plantas (Dubey, Lahtinen, & Sillanpää, 2010; Philip, 2010) y polisacáridos (Huang & Yang, 2004; Philip, 2009; Raveendran *et al.*, 2003; Sámano-Valencia *et al.*, 2013).

1.5 Quitosano

El quitosano es un polisacárido catiónico lineal que deriva de la N-desacetilación de la quitina, que resulta en dos subunidades de D-glucosamina y una N-acetil-D-glucosamina conectados por enlaces 1-4 glucosídicos, donde cada grupo desacetilado posee 3 grupos reactivos funcionales, un grupo amino y dos grupos hidroxil, uno primario y otro secundario. Gracias a sus grupos amino, cargados positivamente, el quitosano puede unirse a moléculas con carga negativa, como ácidos nucleicos y formar complejos nanométricos cargados positivamente (Raftery, O'Brien, & Cryan, 2013).

Es un material biocompatible, interactúa con las células vivas sin ser citotóxico y mantiene su funcionalidad *in vitro* o *in vivo*; presenta baja inmunogenicidad, propiedades antioxidantes, actividad regeneradora, es biodegradable, al ser degradado por quitinasas, quitosanasas y lisozimas en una azúcar común, la N-acetil-glucosamina que entra al ciclo de las glicoproteínas y finalmente es excretada en forma de dióxido de carbono. Además, presenta actividad antibacterial y antifúngica de amplio espectro (Dragostin *et al.*, 2016; Raftery *et al.*, 2013; Xie, Liu, & Chen, 2007).

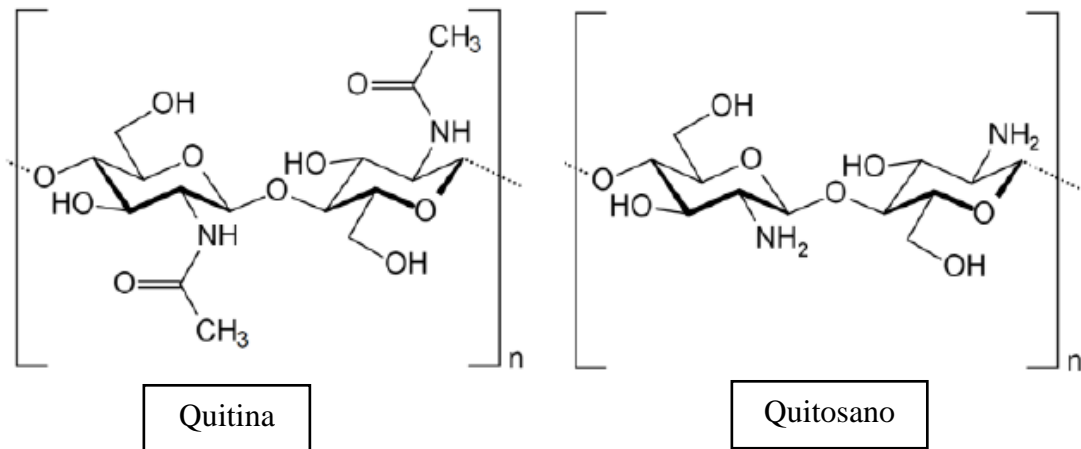


Figura 5. Estructura molecular de quitina y quitosano (Younes & Rinaudo, 2015)

En 2009 Villiers y colaboradores analizaron la capacidad del quitosano de inducir maduración de monocitos a células dendríticas. Analizaron la expresión de señales coestimuladoras como CD80

y CD86, así como el MHC II por citometría de flujo, encontrando un aumento en la expresión de estas en un mecanismo dependiente de TLR4, sin embargo, no se presentó un aumento en la producción de citocinas, ni en la activación de células T, no obstante, al ser estimuladas con otro antígeno se restauraba capacidad de activar células T, concluyendo que el quitosano por sí solo inducía una maduración parcial. (C. Villiers et al., 2009a)

Este resultado es similar a lo obtenido por López et al en 2016, quienes utilizaron nanopartículas de quitosano de 208 nm de tamaño promedio en monocitos humanos y después de 7 días de tratamiento, se observó que las células presentaban marcadores celulares involucrados en señales coestimuladoras (CD80), maduración de DC (CD83), presentación de antígenos (HLA-II), así como moléculas involucradas en la fijación de LPS (CD14). También analizaron la capacidad fagocítica de las células encontrando que esta capacidad no estaba afectada en las células tratadas con las nanopartículas (López Pacheco et al., 2016).

1.6 Terapias con Receptores Tipo Toll

Del interés de entender la inmunidad innata y su regulación, nace el interés de aplicar ese conocimiento en problemas clínicos, siendo los TLRs un centro de atención terapéutico. Una de las aplicaciones más exploradas de los TLRs es su uso como adyuvantes en vacunas. TLRs también figuran como candidatos para terapias contra cáncer, infecciones virales crónicas y enfermedades autoinmunes.

Meina He y colaboradores en 2017 utilizaron una lectina proveniente de *Pleurotus ostreatus* (POL) como adyuvante de una vacuna de DNA contra el virus de la hepatitis B (VHB) en ratones de la cepa C57BL/6. Analizaron la estimulación de células T, así como su perfil de citocinas y observaron un mayor índice de estimulación en el grupo tratado con la vacuna con el adyuvante contra los controles de la vacuna sola. El perfil de citocinas se analizó por citometría, revelando un perfil de tipo de células Th1 (IFN- γ , IL-4, IL-21). Por PCR cuantitativa observaron que el mRNA de TLR6 estaba sobreexpresado y lo confirmaron al encontrar una regulación positiva de las proteínas de la vía de señalización de TLR6 por *Western Blot*, concluyendo que POL puede activar la vía de señalización de TLR6 y estimular la respuesta de células T CD4⁺ para la

producción de anticuerpos específicos contra VHB para el tratamiento de la infección crónica (He, Su, Liu, Gao, & Kang, 2017).

Venezia y colaboradores en 2017 estudiaron el uso de Lípido A monofosforilado (MPLA) como agonista del TLR4 en ratones con agregados de la proteína α -syn, que es señal característica de la enfermedad α -synucleipatia parecida a la enfermedad de Parkinson (PD). Los ratones fueron tratados por 12 semanas con inyecciones intraperitoneales de este agonista. Observaron una mejoría en el sistema motriz, así como una reducción de los agregados de α -syn sin presentar una respuesta inflamatoria sistémica (Venezia et al., 2017).

1.7 Terapias con nanomateriales

Orlowski y colaboradores utilizaron nanopartículas de oro y de plata modificadas con ácido tánico y sintetizadas con citrato y amonio de sodio como inductores de maduración de DC, encontrando que las nanopartículas de oro eran menos tóxicas que las de plata, sin embargo, no encontraron aumento en moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86 ni producción de citocinas. (Orlowski et al., 2018)

Tomić et al en 2014 analizaron la expresión de HLA, CD86 y CD83 así como el perfil de citocinas de DC tratadas con nanopartículas comerciales de oro de 10 y 50 nm, encontrando una disminución en la expresión de estas moléculas, al igual que en la expresión de citocinas como IL-12p70, IL-23, IFN, IL-4 e IL-7 (Tomić et al., 2014)

Démoulins et al. en 2013 analizaron la capacidad inmunomoduladora de un nanogel de quitosano/alginate (Ng), usado como adyuvante para diversos ligandos de TLRs en DC humanas y porcinas. Analizaron la maduración de DC, la producción de citocinas y la migración celular. Observaron un incremento en la producción de IL-1 β por Pam₃Cys-SK4 (agonista de TLR2), una disminución en la producción de IFN- α , IL-6 y TNF α por CpG-oligodeoxinucleotidos (agonista de TLR9) así como disminución de la migración de las células, recalando así la importancia de analizar la interacción entre adyuvantes, vehículos y las moléculas estimuladoras para asegurar una activación apropiada del sistema inmune (Démoulins et al., 2013).

Tsai et al en 2012 analizaron el efecto de las AuNp's en la inmunidad innata mediada por TLRs en macrófagos murinos. Analizaron producción de citocinas y translocación de TLR9, observando una disminución dosis-dependiente, en la producción de TNF- α inducida por CpG-ODN, ya que las AuNp's de 4nm presentaron un efecto mayor que las AuNp's de 11, 19, 35 y 45 nm. Esto sin llegar a ser citotóxicas. También reportan que las AuNp's afectaron la translocación de TLR9 inhibiendo su función al unirse al grupo de alta movilidad box-1, responsable de la regulación de TLR9 dentro de los lisosomas. Por esto los autores proponen a las AuNp's como benéficas en el tratamiento de enfermedades como nefritis lúpica y enfermedades autoinmunes (Tsai et al., 2012).

Hutter et al en 2010 analizaron la respuesta de células de microglía y neuronas hacia diferentes tipos de nanopartículas (esféricas, rods y urchins). Encontraron que ambos tipos de células internalizaban las AuNp's, utilizando microcopia de campo oscuro. Por otro lado, analizaron la activación de TLR2 en un modelo *in vivo* de ratones transgénicos. Después de una administración de forma intranasal, emplearon imagenología bioluminiscente y observaron una activación del receptor por las AuNp's esféricas y los rods después de 24 horas de tratamiento que permaneció por una semana (Hutter et al., 2010).

Castillo et al en 2008 estudiaron el efecto de nanopartículas de plata funcionalizadas con tiopronina, sobre la producción de IL-6, en la línea células Raw 264.7 que corresponde a macrófagos murinos. Utilizaron un kit ELISA para esto y observaron una disminución en la secreción de IL-6 mediada por TLR2, TLR2/6, TLR3 o TLR9, sin embargo, aumentaron la capacidad de los macrófagos de desencadenar inflamación mediada por los ligandos de TLR2/1 y TLR2/6, sin presentar citotoxicidad (Castillo et al., 2008).

2. JUSTIFICACIÓN

Las nanopartículas de oro (AuNp's) por sus propiedades ópticas y biocompatibilidad, han sido reportadas en diversas aplicaciones médicas y biotecnológicas, sin embargo, aún no se comprende completamente su interacción con el sistema inmune. Los monocitos son los principales actores de la inmunidad innata, además según el estímulo son capaces de diferenciarse en macrófagos, osteoclastos o células dendríticas.

Las células dendríticas (DC) son consideradas el enlace entre la inmunidad innata y adaptativa por lo que son un modelo idóneo para el estudio de respuesta inmunológica ante un patógeno, además son un blanco terapéutico atractivo para la modulación del sistema inmune, principalmente a través sus receptores tipo Toll (TLR).

Por lo descrito anteriormente, este trabajo se enfoca al estudio de los efectos de las AuNp's sobre la activación y polarización de monocitos que caracterizan su diferenciación a células dendríticas.

3. HIPÓTESIS

Las nanopartículas de oro sintetizadas con quitosano (AuNp's) no presentan la capacidad de inducir la diferenciación de monocitos a células dendríticas.

4. OBJETIVOS

Objetivo General:

Determinar si las nanopartículas de oro sintetizadas con quitosano (AuNp's) inducen la diferenciación de monocitos humanos a células dendríticas.

Objetivos Específicos:

1. Determinar la concentración de endotoxinas presentes en AuNp's sintetizadas con quitosano como agente reductor.
2. Evaluar el efecto de las AuNp's sobre la expresión de marcadores de diferenciación celular (CD14, CD 80, CD83, CD86, CD11c y HLA) en monocitos.
3. Evaluar el efecto de las AuNp's sobre la capacidad fagocítica de monocitos.
4. Evaluar el efecto de las AuNp's sobre la activación de receptores tipo Toll 3, 4, 7, 8 y 9 en monocitos.
5. Determinar el efecto de las AuNp's sobre la expresión de moléculas inmunomoduladoras de la respuesta inmune en monocitos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Síntesis de Nanopartículas de oro (AuNp's)

Las nanopartículas de oro se obtuvieron por medio de síntesis química, utilizando una solución de Quitosano (Sigma-Aldrich®, MO, US) al 2% (p/v) en medio ácido y ácido tetracloroáurico (HAuCl₄) (Sigma-Aldrich®) a una concentración de 2mM en medio acuoso, con una relación 1:3 respectivamente, en agitación constante, a $95 \pm 5^\circ\text{C}$ en baño de glicerina de 15 a 20 min. Al término de la síntesis se dejó enfriar la solución a temperatura ambiente y se guardó a 4°C para su uso posterior.

5.2 Caracterización de las nanopartículas

Las nanopartículas se caracterizaron por dispersión de luz dinámica (DLS), usando el Nanosizer NS90 (Malvern Instruments®, Malvern, UK), para determinar tamaño de partícula. Se realizaron diluciones seriadas de las nanopartículas con agua ultra pura a 1/10 y 1/100, vertiendo 2 mL de ésta última en una celda cúbica que posteriormente se introduce al equipo para su análisis.

Se utilizó microscopía electrónica de barrido (SEM, Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo, Nova NanoSEM200, FEI®) para corroborar tamaño y observar características morfológicas. Para la preparación de la muestra, se dejó secar una gota de muestra sobre una cintilla de carbono, que posteriormente se recubrió con grafito para su observación al microscopio electrónico empleando 2kV en modo de inmersión.

Se midió la absorbancia máxima en el espectro Ultravioleta-Visible (UV-Vis) por medio de un espectrofotómetro NanoDrop 2000c, (Thermo Scientific®, Waltham, MA, US). Se tomó 2 μL de muestra, y se colocaron sobre el pedestal de medición del equipo para su lectura.

5.3 Detección de endotoxina bacteriana presente en nanopartículas

Se utilizó el kit comercial de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) PYROGENT™ (Lonza). El lisado de amebocitos de *Limulus* es un extracto acuoso de células sanguíneas (amebocitos) del cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*). En presencia de endotoxinas ciertos factores presentes

en el LAL se activan en una casada proteolítica que produce la escisión de un sustrato peptídico y por consecuencia se obtiene el fenómeno de coagulación. Para realizar el ensayo se diluyó 1mL de muestra de AuNp's en agua inyectable en relaciones de 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16. Posteriormente se le añadió a cada dilución 0.25 mL del lisado reconstituido en agua inyectable y se incubaron por 60 min en un baño de agua a 37°C. Al finalizar el tiempo de incubación los tubos se inclinaron 90°; Una prueba positiva se caracteriza por la formación de un gel sólido en cual permanece intacto después de la inversión. Como control positivo se utilizará endotoxina purificada de *E. coli* O111:B4 en diluciones de 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16 en agua inyectable. Como control negativo se empleó agua inyectable.

5.4 Obtención de cultivo primario de monocitos de sangre periférica

Células mononucleares se obtuvieron de sangre periférica utilizando un gradiente de densidad. La sangre se obtuvo de donadores sanos de sexo masculino por punción venosa con tubos de ensayo con EDTA como anticoagulante (Vacutainer, BD®). Para el gradiente de densidad se utilizó una solución comercial de diatrizoato de sodio 13.8% (p/v) y polisacáridos 8.0% (p/v) (Polymorphprep™, Axis-Shield, Noruega). En tubos de 50 mL se colocó una capa de Polymorphprep, seguida de una capa de sangre sin diluir (relación 1:1) y se centrifugó a 1600 rpm por 30 min, sin freno. De esta centrifugación se obtuvieron 3 fases (Plasma, donde se encuentran las plaquetas, dos anillos blancos, uno con células mononucleares y el segundo con polimorfonucleares, Polymorphprep y eritrocitos en el fondo). Con ayuda de una micropipeta se extrajo el anillo blanco con células mononucleares, y se lavaron 2 veces con PBS 1x (1500 rpm por 10 min). El paquete celular se contó por el método de exclusión por azul tripán, en el cual se tomaron 50 µL de células con 50 µL de azul tripán 0.4% (Gibco® by Thermo Scientific®), y se diluyeron en 400 µL de PBS 1x, colocando 10 µL en cámara de Neubauer. Las células se cultivaron en medio RPMI 10% (Sigma®), suplementado con suero bovino fetal (SFB) y antibiótico-antimicótico 1x (Gibco® by Thermo Scientific®) incubadas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂.

5.5 Grupos experimentales.

Los siguientes grupos experimentales se trabajaron: 1) monocitos cultivados sin tratamiento en RPMI-1640 con SFB 10% 2) monocitos tratados con AuNp's, 3) monocitos tratados según la metodología estándar de maduración con IL4, Factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), albumina (1mg/mL) como antígeno, TNF e IL-6.

5.6 Análisis de viabilidad con 7-Aminoactinomycin D (7-AAD)

Después de obtener células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCs) como se describió anteriormente, se cultivaron 1 millón de células por pozo en placas de 24 pozos permitiendo su adherencia por 2 días.

Posterior a los 2 días se tratarán con las concentraciones de 10, 20, 30, 40 y 50 μM de AuNp's por 1, 3 y 5 días. Después del tiempo de incubación con el tratamiento, se disociaron las células de la placa utilizando acutasa (Gibco by Thermo Scientific®, Localización), se centrifugaron a 1600 rpm por 10 minutos, se resuspendieron en 200 μL de PBS 1x y se añadieron 2 μL de 7-AAD dejando incubador por 30 minutos en frío para su posterior análisis en el citómetro de flujo (BD accuri TM C6).

5.7 Análisis fenotípico de monocitos tratados con nanopartículas.

Posterior a 5 días de incubación con el tratamiento, se retiró el medio de cultivo y se colectaron las células adheridas a la placa utilizando acutasa. Las células se centrifugaron por 5 min a 1600 rpm y se resuspendieron en 100 μL de PBS 1X. Posteriormente se añadieron 2 μL de cada anticuerpo (Antihumano CD14 APC-Cy7, Antihumano CD80 FITC, Antihumano CD83 PE, Antihumano HLA-II PE-Cy5, Antihumano CD86 FITC y Antihumano CD11c APC) y se incubaron por 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Después del tiempo de incubación, se realizó un lavado con PBS 1X y albúmina al 1% para su análisis por citometría de flujo (BD AccuriTM C6).

5.8 Capacidad fagocítica de monocitos tratados con nanopartículas.

Seguido de obtener el cultivo primario de monocitos de sangre periférica, se sembraron 2 millones de células por pozo, en placas de 12 pozos, se permitirá la adhesión de las células por 2 días y

posteriormente se trataron con AuNp's y al 3er día de tratamiento, se realizó un lavado y cambio de medio, sin aplicar de nuevo el tratamiento. Al 5to día se despegaron las células con acutasa, se realizó un lavado con RPMI-1640 sin SFB a continuación se les añadió 100 μ L de FITC-Dextran (1mg/mL), y se incubaron por 6 horas. Posterior al tiempo de incubación se lavaron una vez con PBS 1x y se analizó el número de células FITC positivas por citometría de flujo (BD Accuri TM C6).

5.9 Obtención de muestras de proteína

Para proteínas intracelular o de membrana como los TLRs, Gal-3 e IDO, después del tratamiento con AuNp's, se obtuvo la monocapa de células con ayuda de un scrapper y se colocaron en un tubo eppendorf y se centrifugaron a 2000 rpm, 6 min. Posterior a esto se agregó buffer de lisis completo y se incubó en hielo por 30 min. Se centrifugó a 3000rpm por 5 minutos y el sobrenadante se almacenó a -20°C hasta su análisis.

Proteínas en el medio de cultivo como IFN- α , IDO y Gal-3 se colectó el medio de cultivo y se añadió ácido tricloro acético (TCA) al 10% y se incubó por 10 minutos a 4°C . Posterior al tiempo de incubación se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm/5 min, se removió el sobrenadante y se lavó con acetona fría dos veces. Las muestras se resuspendieron en buffer de lisis y se cuantificaron.

5.9.1 Cuantificación de proteínas por el método de BCA

Se utilizó el kit comercial de ensayo de proteína BCA PierceTM (Thermo Scientific®). Se realizó una curva estándar partiendo de una solución stock de 2 mg/mL incluida en el kit.

Para preparar la solución de trabajo, se mezclaron reactivos A y B del kit comercial en una relación 50:1. Para las muestras se tomó 10 μ L de cada una y se colocaron en una placa de 96 pozos, en seguida se añadieron 200 μ L de la solución de trabajo y se permitió incubar por 30 min a 37°C . Después del tiempo de incubación las muestras se leyeron en un NanoDrop 2000c, (Thermo Scientific®) a 562 nm.

5.10 Análisis de expresión de receptores tipo Toll por *Western Blot*

Para determinar expresión de receptores tipo de Toll en células tratadas con AuNp's y los vehículos, se realizó el ensayo de Western Blott.

5.10.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La electroforesis se realizó con 35 µg de proteína total, la cual se desnaturalizó en buffer de carga (4% SDS, 20% Glicerol, 0.2% azul de bromofenol, 200 mM b-mercaptoetanol, 100 mM Tris-HCL pH6.8) a 94°C por 5 min.

Se armó el casete para el gel de la electroforesis vertical. Se preparó la solución del gel separador, con una concentración de 10% y se colocó en el casete, después se cubrió el gel con isopropanol absoluto por 10 min, para después retirar el exceso. La solución del gel concentrador se separó a 5%, y se colocó en el casete hasta el límite del vidrio, seguidamente del peine. El gel se colocó en la cámara de corrimiento y se añadió buffer de corrida 1X. Se retiró el peine para lavar lo pocillos con buffer de corrimiento para eliminar acrilamida no polimerizada. Las muestras se cargaron y corrieron por aproximadamente 2 h a 100 V.

5.10.2 Transferencia a membrana de nitrocelulosa

Se utilizó un bastidor Gibco para la transferencia de proteínas. Se cortó una membrana de nitrocelulosa de 6 cm x 8.5 cm, se lavó con agua destilada por 5 min y se colocó en buffer de transferencia 1X durante 10 min, además de 2 piezas de papel filtro y 2 esponjas. Del gel de la electroforesis se eliminó el gel concentrador y se colocó sobre papel filtro húmedo y se despegó el gel separador del vidrio. Se colocaron dos esponjas, el papel filtro y el gel sobre el set de transferencia. Se armó un "sándwich" colocando sobre el gel la membrana previamente equilibrada. Se colocó sobre la membrana el papel filtro húmedo, eliminando burbujas entre el gel y la membrana. La secuencia de transferencia fue en dirección de polo negativo a positivo. (Esponjas-papel filtro-gel de poliacrilamida-membrana de nitrocelulosa-papel filtro-esponjas). Se colocó en un buffer de transferencia y se corrió en la cámara de transferencia a 100 V por 2 hrs.

5.10.3 Inmunodetección

Se colocó rojo de Ponceau a la membrana para observar si la transferencia fue exitosa. Se lavó con buffer TBS-Tween dos veces por 5 min y se colocó en solución de buffer de bloqueo por 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente se añadió a la membrana el anticuerpo monoclonal (Anti-TLR7, Anti-TLR9, Anti-TLR8, Anti TLR3, Anti-Galectina, Anti-IDO o Anti-IFN, Santa Cruz Biotechnology, CA, US) y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente. Se lavó 2 veces con el buffer de lavado por 5 min a temperatura ambiente para posteriormente incubar por 1 hr con el anticuerpo secundario Antiraton HRP. Después del tiempo de incubación se lavó 2 veces con buffer de lavado por 5 min a temperatura ambiente y retiró el exceso de líquido de la membrana y se agregó en partes iguales el reactivo A y B del kit de quimioluminiscencia (Roche) y se dejó en agitación por 5 min. Eliminando el exceso de solución, se pasó la membrana sobre un trozo de papel plástico que a su vez se colocó sobre el chasis para exponerlo a un filme en total oscuridad.

5.11 Determinación de perfil de citocinas por citometría de flujo

Se realizó un cultivo de monocitos (2 millones de células por pozo) en placas de 6 pozos. A la mitad de las muestras, a los 2 días de incubación, se les añadió el tratamiento de AuNp's 30 μ M, quitosano 30 μ M, LPS (1 μ g/mL) y Np's de oro comerciales adquiridas de Sigma-Aldrich (30 μ M). A la otra mitad, a los 2 días de incubación se trataron con 1 μ g/mL de LPS por 24 horas, posteriormente se retiró el medio, se lavaron las células con PBS 1x y se agregó los tratamientos antes descritos.

Se tomaron muestras de medio a las 72 horas con los tratamientos y se almacenaron a -40°C para su posterior análisis mediante el kit de citocinas inflamatorias humanas (BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines Kit para la determinación de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 y TNF las cuales se analizaron mediante citometría de flujo utilizando el equipo BD Accuri™ C6.

5.12 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se validaron mediante el análisis estadístico ANOVA de una vía, seguido de una prueba de contraste post-hoc Tuckey con una significancia estadística de $p < 0.05$. utilizando el programa Graph Pad 6.

6. RESULTADOS

6.1 Caracterización de nanopartículas de oro (AuNp's)

La obtención de nanopartículas de oro empleando quitosano como agente reductor se comprobó utilizando espectroscopia UV-Vis, donde se determinó el plasmón de resonancia superficial midiendo absorbancia en función de la longitud de onda, encontrando una absorbancia máxima a los 519 nm. (Figura 6).

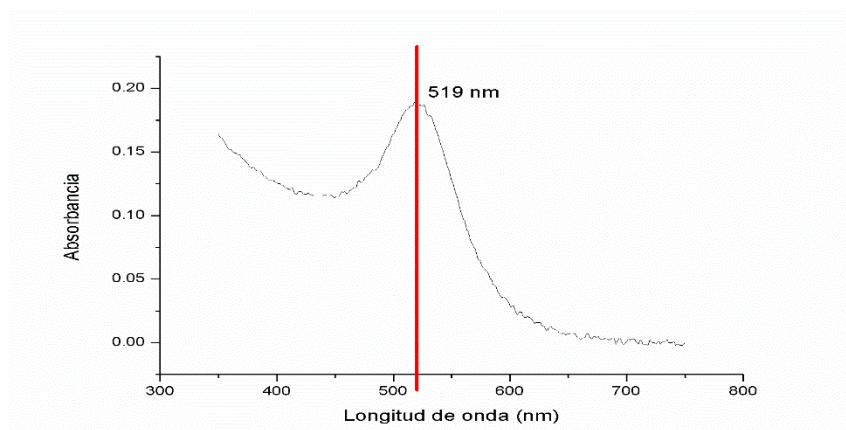


Figura 6. Plasmón de resonancia superficial de AuNp's. Se utilizó 2 μ L de muestras sin diluir de AuNp's, posteriormente se colocaron sobre el pedestal de NanoDrop 2000c para su análisis.

El análisis de tamaño realizado mediante dispersión de luz dinámica demuestra una población de partículas de 3 a 10 nm, con un tamaño promedio de 5.9 nm. EL índice de polidispersidad obtenido fue de 0.189, indicando una homogeneidad en la población de 80% (Figura7).

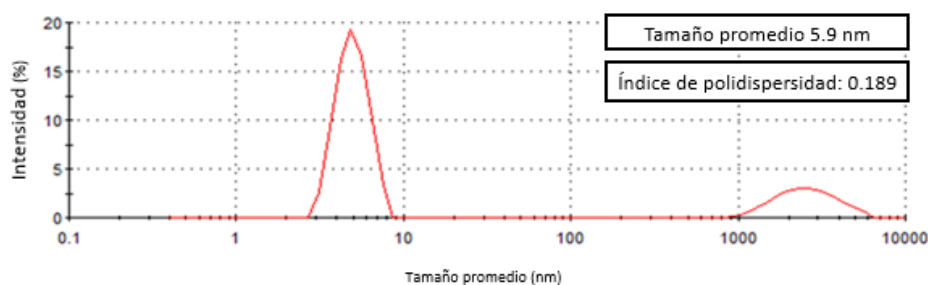


Figura 7. Determinación de tamaño promedio de AuNp's. Se realizó una dilución de 1/1000 en agua destilada y posteriormente se cargaron en una celda de espectrofotometría para su análisis en el equipo Nanosizer NS90.

6.2 Determinación de endotoxina presente en nanopartículas de oro (AuNp's)

Las AuNp's fueron analizadas por contaminación por lipopolisacárido (LPS) durante el proceso de síntesis utilizando el método del lisado de amebocitos de *Limulus polyphemus*. Se encontró que hasta la dilución 1:8 hubo presencia de coágulo al entrar en contacto con el lisado de amebocitos, indicando un resultado positivo para LPS a una concentración de 0.03 UE/mL en la concentración stock de 1 mM y <0.01 UE/mL a partir de la concentración de 300 μ M (Figura 8).

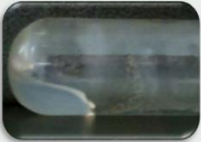




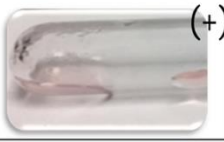






Concentración endotoxina	Control positivo	Control negativo	Nanopartículas
0.5 UE/ml (Dilución 1:2)			 (+)
0.25 UE/ml (Dilución 1:4)			 (+)
0.125 UE/ml (Dilución 1:8)			 (+)
0.06 UE/ml (Dilución 1:16)			 (-)

Figura 8. Detección de endotoxinas bacterianas en AuNp's. Las diluciones de AuNp's fueron realizadas utilizando agua inyectable libre de pirógenos. Control positivo: endotoxina de *E. Coli*, Control negativo: agua inyectable libre de pirógenos. Signos en los paréntesis hacen referencia a presencia (+) o ausencia (-) de coágulo.

6.3 Viabilidad células de monocitos humanos tratados con nanopartículas de oro (AuNp's).

Se realizó una curva dosis respuesta para determinar la concentración ideal de tratamiento que se utilizó en los estudios posteriores. En la Figura 9, se muestra que por debajo de la concentración

de 50 μM , la viabilidad celular de monocitos humanos no se ve afectada hasta el día 5, en comparación con el control de células sin tratamiento.

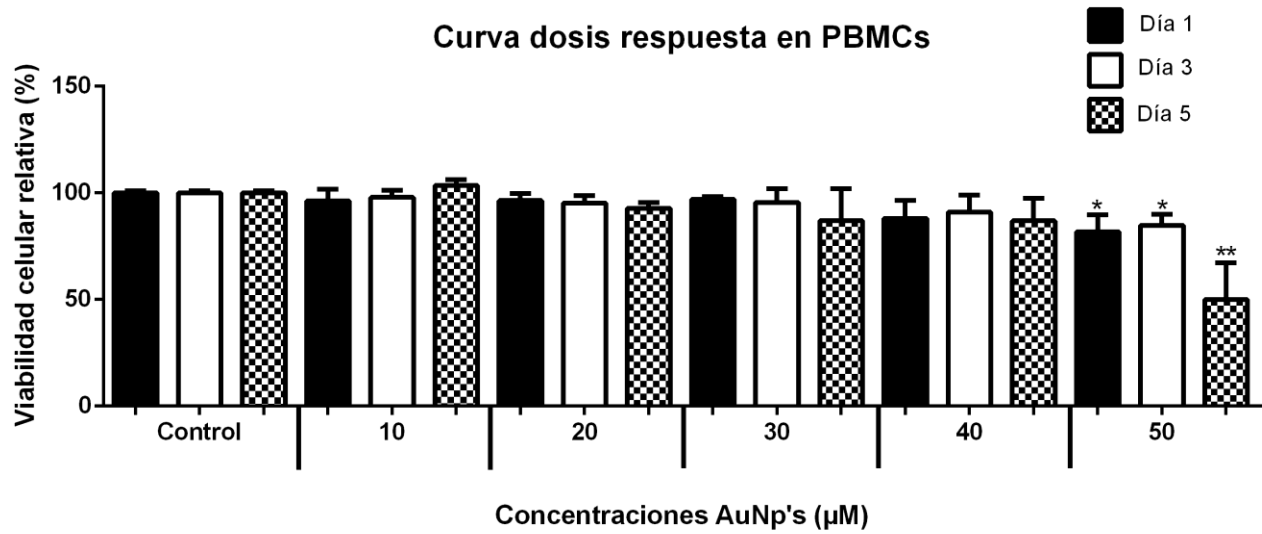


Figura 9. Viabilidad celular de monocitos humanos tratados con AuNp's. Se cultivaron monocitos de sangre periférica humana hasta por 5 días en presencia de nanopartículas de oro sintetizadas con quitosano. Control: células cultivadas con RPMI-1640 con 10% de suero fetal bovino hasta 5 días. La viabilidad se analizó utilizando el marcador 7-Aminoactinomycin D (7-AAD).

6.4 Evaluación de expresión de marcadores de diferenciación celular en monocitos humanos tratados con nanopartículas de oro (AuNp's)

En el análisis fenotípico de monocitos humanos tratados con nanopartículas de oro no se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05\%$) en el porcentaje de expresión de los marcadores analizados (CD11c, CD83, CD86, HLA-DR, CD80 y CD14) en comparación con el control (células cultivados con RPMI-1640 con suero fetal bovino al 10% sin tratamiento) como se muestra en la figura 10.

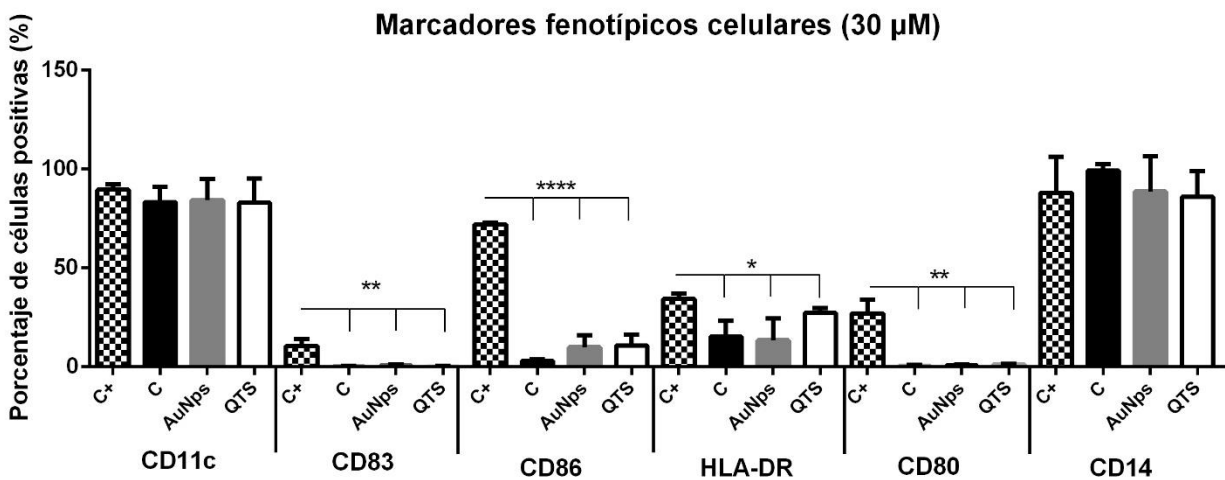


Figura 10. Análisis de expresión de marcados en monocitos humanos tratados con AuNp's. Monocitos extraídos de sangre periférica humano se cultivaron por 5 días en presencia o ausencia de nanopartículas de oro a una concentración de 30 μM . Control positivo (C+): Células tratadas con IL-4, GM-CSF, TNF- α , IL-6 e IL-1 β . Control (C): células cultivados con RPMI-1640 con suero fetal bovino al 10% sin tratamiento. AuNp's: Células tratadas con nanopartículas de oro a 30 μM . Quitosano (QTS): células tratadas quitosano a 30 μM .

Al no obtener cambios significativos en la expresión de los marcadores de maduración, se optó por probar una segunda concentración; Dado que por encima de los 40 μM se observó pérdida de la viabilidad por lo tanto, se decidió probar la concentración de 15 μM , sin encontrar diferencias

significativas en la expresión de los marcadores analizados, comparados contra el control sin tratamiento.

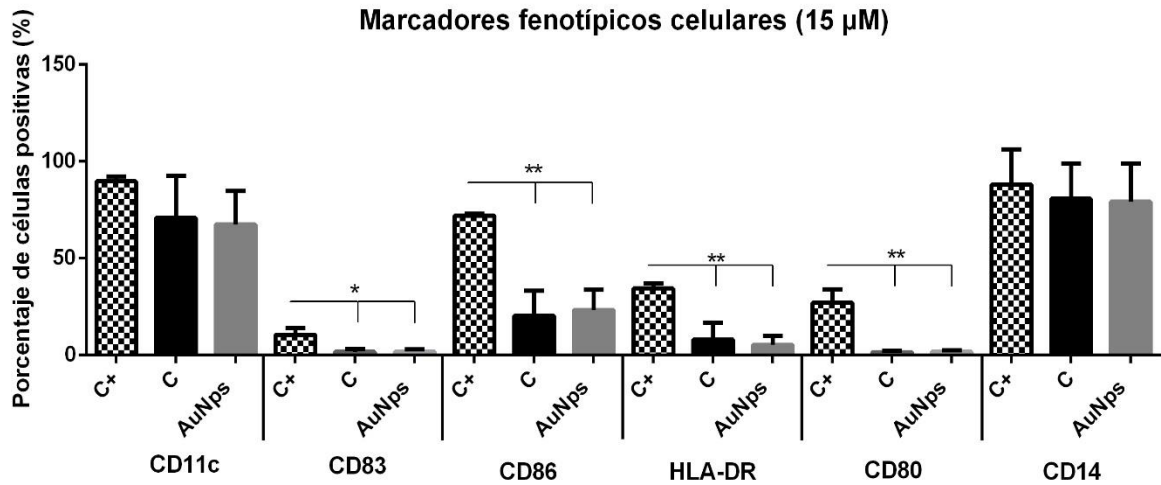


Figura 11. Análisis de expresión de marcados en monocitos humanos tratados con AuNp's. Monocitos extraídos de sangre periférica humano se cultivaron por 5 días en presencia o ausencia de nanopartículas de oro a una concentración de 15 μ M. Control positivo (C+): Células tratadas con IL-4, GM-CSF, TNF- α , IL-6 e IL-1 β . Control (C): células cultivados con RPMI-1640 con suero fetal bovino al 10% sin tratamiento. AuNp's: Células tratadas con nanopartículas de oro a 30 μ M.

6.5 Análisis de la capacidad fagocítica de monocitos humanos.

El tratamiento con nanopartículas de oro a dos diferentes concentraciones no mostró diferencia significativa sobre la capacidad fagocítica de monocitos en comparación al control de células sin tratamiento. De igual manera se analizó quitosano, al ser precursor de la síntesis de las nanopartículas, de nuevo, sin encontrar diferencias significativas en comparación al control.

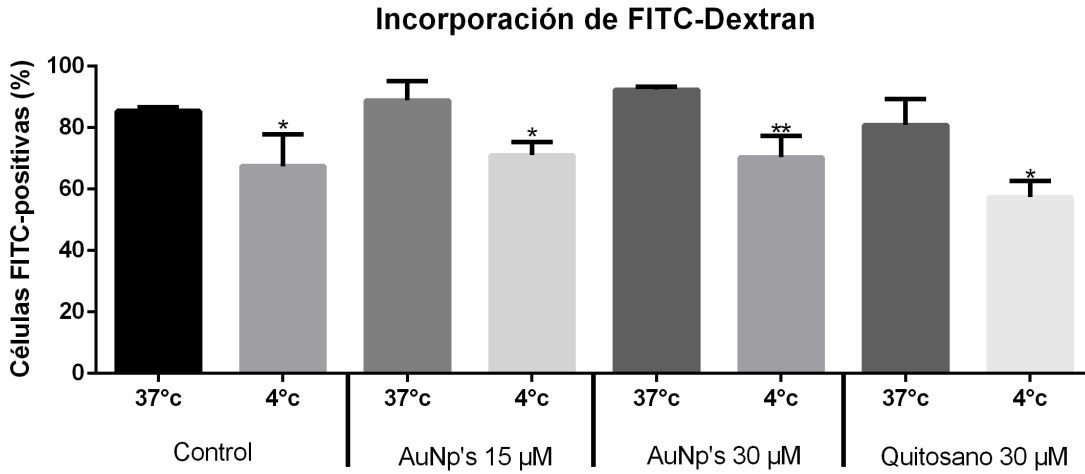
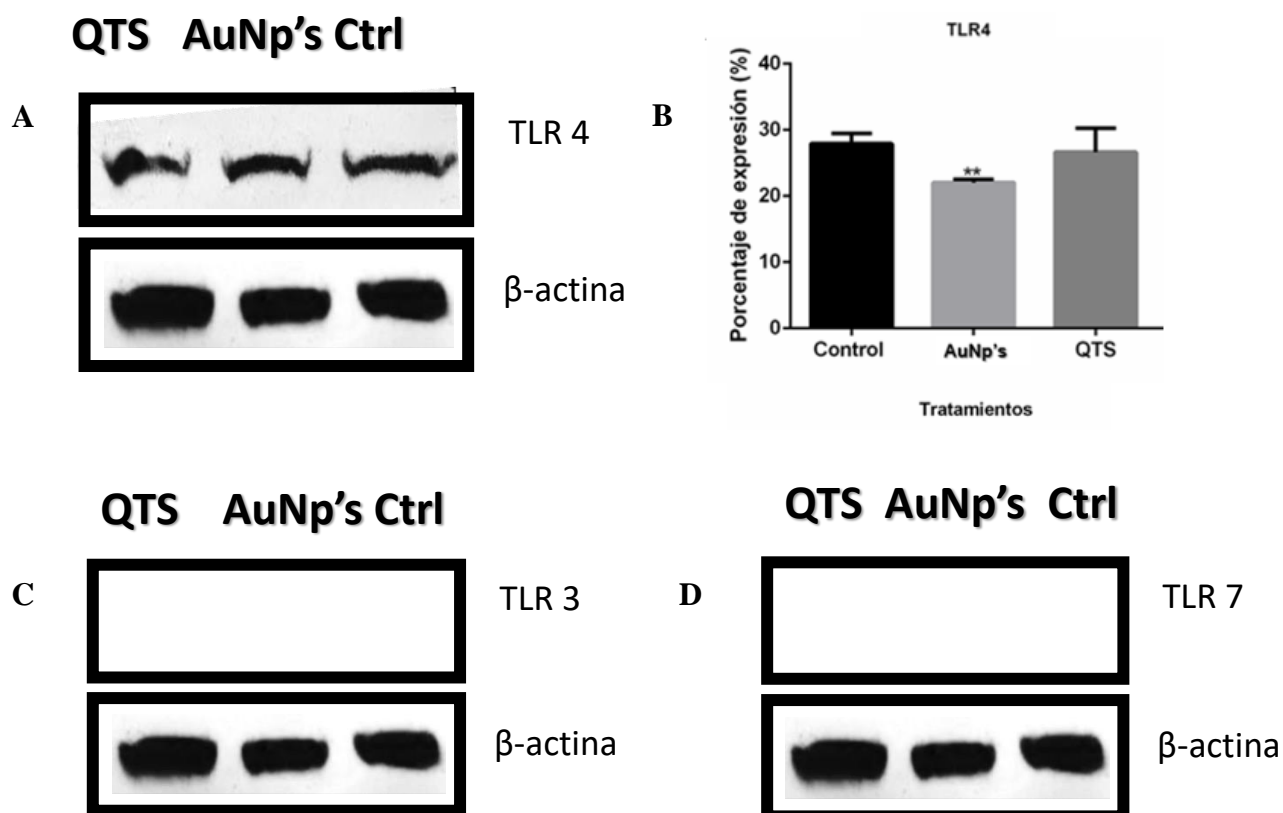


Figura 12. Capacidad fagocítica de monocitos tratados con AuNp's. Monocitos extraídos de sangre periférica humano se cultivaron por 5 días en presencia o ausencia de nanopartículas de oro a una concentración de 15 y 30 µM. Control: células cultivados con RPMI-1640 con suero fetal bovino al 10% sin tratamiento. Como control negativo se utilizaron células a 4°C. AuNp's: Células tratadas con nanopartículas de oro a 15 y 30 µM. Quitosano (QTS): células tratadas quitosano a 30 µM.

6.6 Evaluación de la activación de receptores tipo Toll 3, 4, 7, 8 y 9 en células tratadas con AuNp's.

En la figura 12 se ilustra los resultados obtenidos del análisis de TLRs por Western Blott (WB) en células tratadas con Quitosano a 30 μ M, AuNp's a 30 μ M y el Control sin tratamiento. La figura 12 A ilustra las bandas obtenidas por WB para TLR 4 mientras que en el inciso B se muestra el análisis densimétrico que arroja una disminución estadísticamente significativa entre la expresión del TLR4 en células control y células tratadas con AuNp's. No se encontró diferencia significativa entre el control y el quitosano.

Cabe destacar que los receptores 3 (C), 7 (D), 8 (E) y 9 (F) no se encontraron en cantidades detectables.



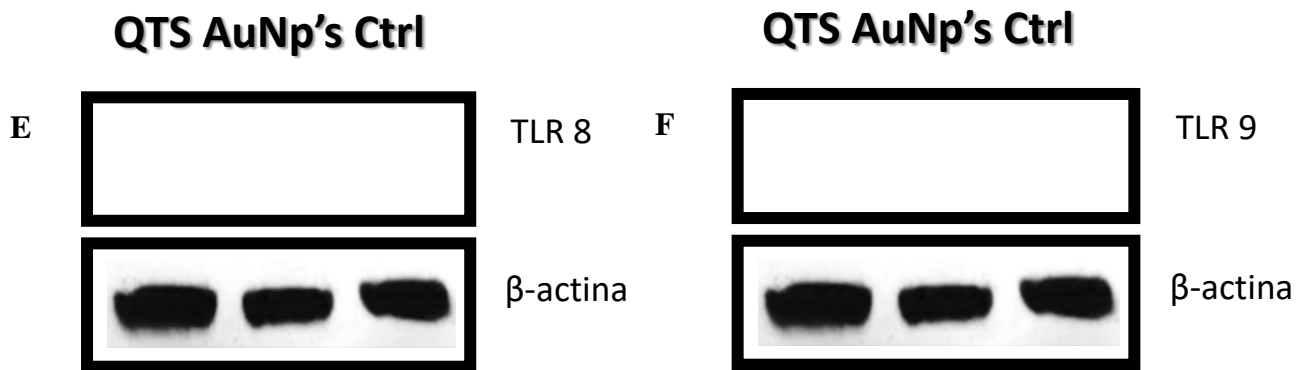


Figura 13. Análisis de expresión de receptor tipo Toll mediante *Western Blot* de monocitos humanos tratados con AuNp's. A Análisis de TLR4. B Densitometría de resultados obtenidos de TLR4. C Análisis de TLR3. D Análisis de TLR 7. E Análisis de TLR8. F Análisis de TLR 9. Todos los cultivos fueron realizados de la siguiente manera: Monocitos extraídos de sangre periférica humano se cultivaron por 5 días en presencia o ausencia de nanopartículas de oro (AuNp's) a 30 μ M y quitosano (QTS) a 30 μ M. Control: células cultivados con RPMI-1640 con suero fetal bovino al 10% sin tratamiento. **: Disminución estadísticamente significativa en comparación al control.

6.7 Determinar la expresión de moléculas inmunomoduladoras de la respuesta inmune de células tratadas con AuNp's.

El análisis de la expresión de moléculas inmunomoduladoras mostró que no existe diferencia significativa en células tratadas con AuNp's ni Quitosano comparadas contra el control en el análisis de Galectina-3, como se ilustra en la figura 12 A y B. Las moléculas IFN (C) e IDO (D) no estaban presentes en cantidades detectables por la técnica Western Blott.

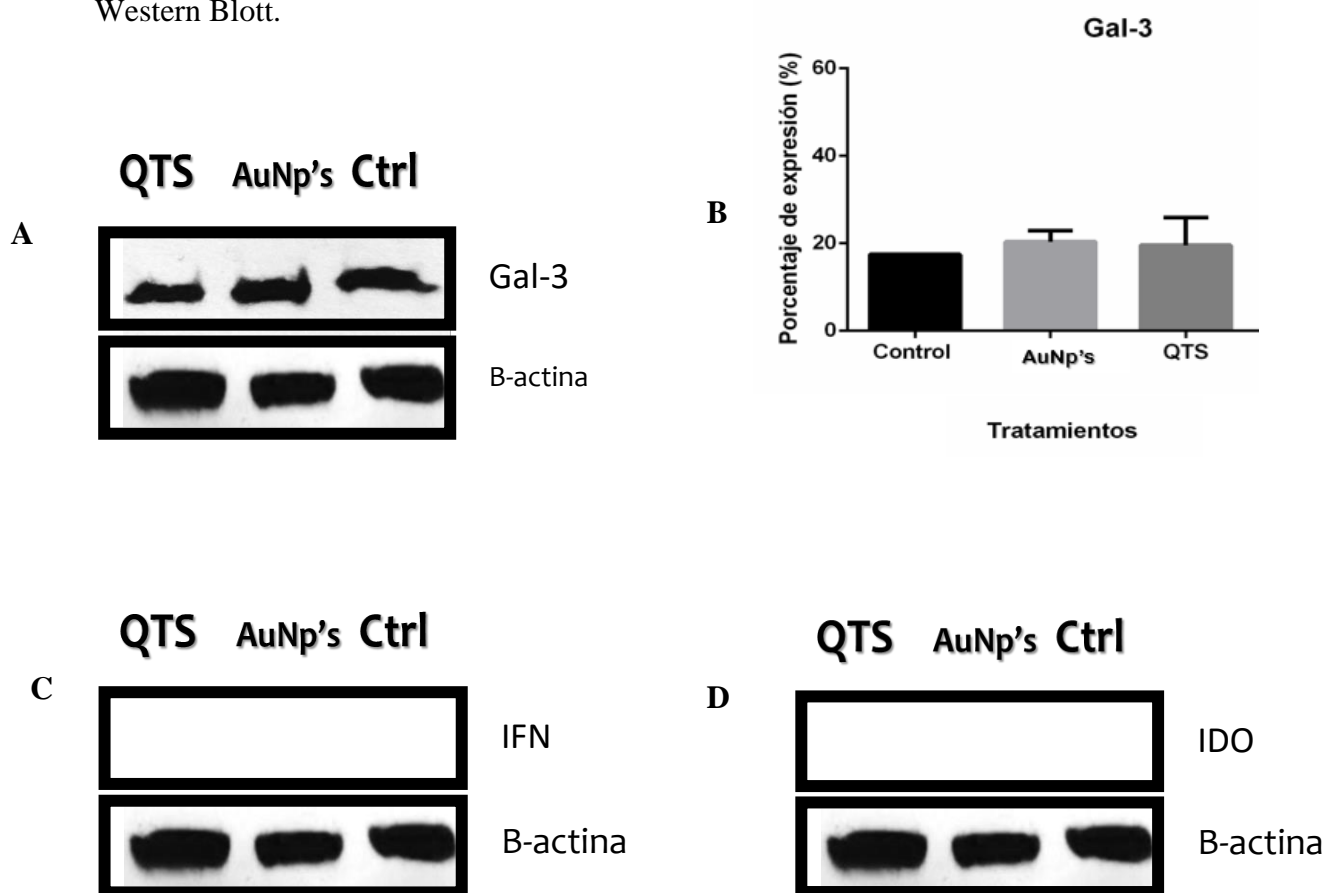


Figura 14. Análisis de expresión de moléculas inmunomoduladoras por *Western Blot* de monocitos humanos tratados con AuNp's. A. Análisis de Galectina-3. B. Densitometría de resultados obtenidos de WB de Galectina-3. C. Análisis de Interferón. D. Análisis de Indolamina 2-3 Dioxigenasa. Todos los cultivos fueron realizados de la siguiente manera: Monocitos extraídos de sangre periférica humano se cultivaron por 5 días en presencia o ausencia de nanopartículas de oro (AuNp's) y quitosano (QTS). Control: células cultivados con RPMI-1640 con suero fetal bovino al 10% sin tratamiento.

6.10 Análisis del perfil de citocinas de monocitos humanos tratados con AuNp's.

Para confirmar el tipo de respuesta obtenida por parte de los monocitos a los diferentes tratamientos, se realizó un análisis de las citocinas inflamatorias IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 y TNF. En la figura 14 se observa el perfil de la interleucina 1 β , donde no se muestra un aumento en los niveles de esta citocina tras los tratamientos con AuNp's a 15 μ M (AuNps15) y 30 μ M (AuNps30) ni quitosano a 30 μ M (Qts30). En cuanto a las muestras que se les adicionó LPS previo al tratamiento, se observa un aumento significativo en los niveles en todos los casos.

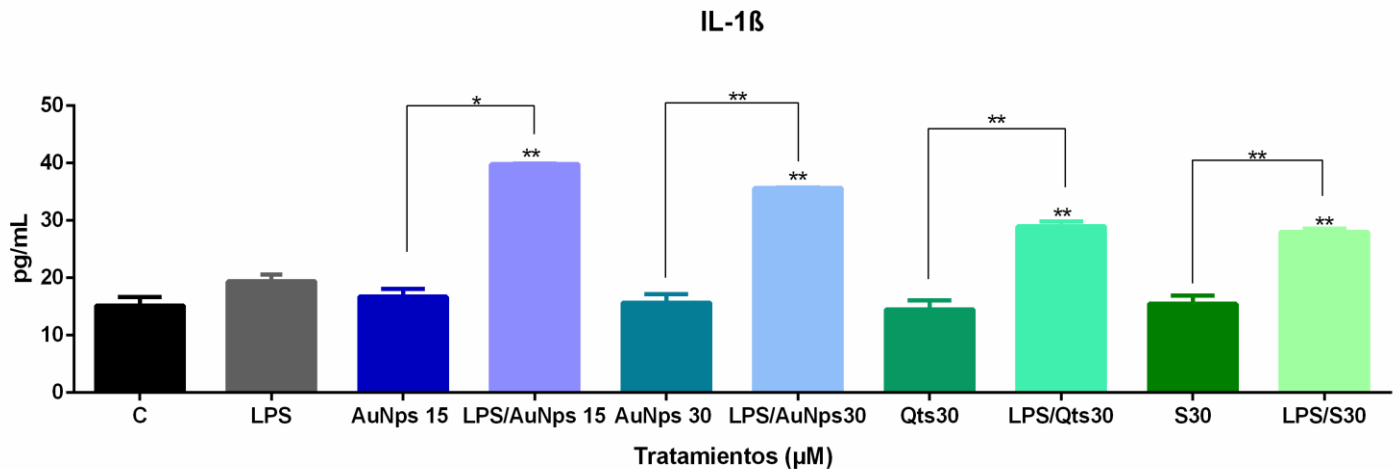


Figura 15. Niveles de expresión de IL-1 β encontrados en sobrenadante de cultivo de monocitos tratados con AuNp's, quitosano y LPS. Monocitos humanos fueron tratados con nanopartículas de oro (AuNps) a 15 y 30 μ M, quitosano (Qts) a 30 μ M, con nanopartículas de oro comerciales a 30 μ M (S30) y LPS a 1 μ g/mL. Muestras LPS/Au15, LPS/AuNps30, LPS/Qts30 Y LPS/S30 fueron tratadas con LPS durante 24 hrs previo a los diferentes tratamientos. Control células cultivadas solo con medio RPMI-1640 y suero fetal bovino al 10%.

En la figura 15 se observa el perfil obtenido de IL-6, donde se aprecia que todos los tratamientos causaron un aumento en los niveles de esta citocina, a excepción del tratamiento AuNps30. Cabe destacar que las nanopartículas de oro comerciales aumentaron significativamente los niveles de la IL-6 a diferencia de las partículas sintetizadas con quitosano, utilizando la misma concentración.

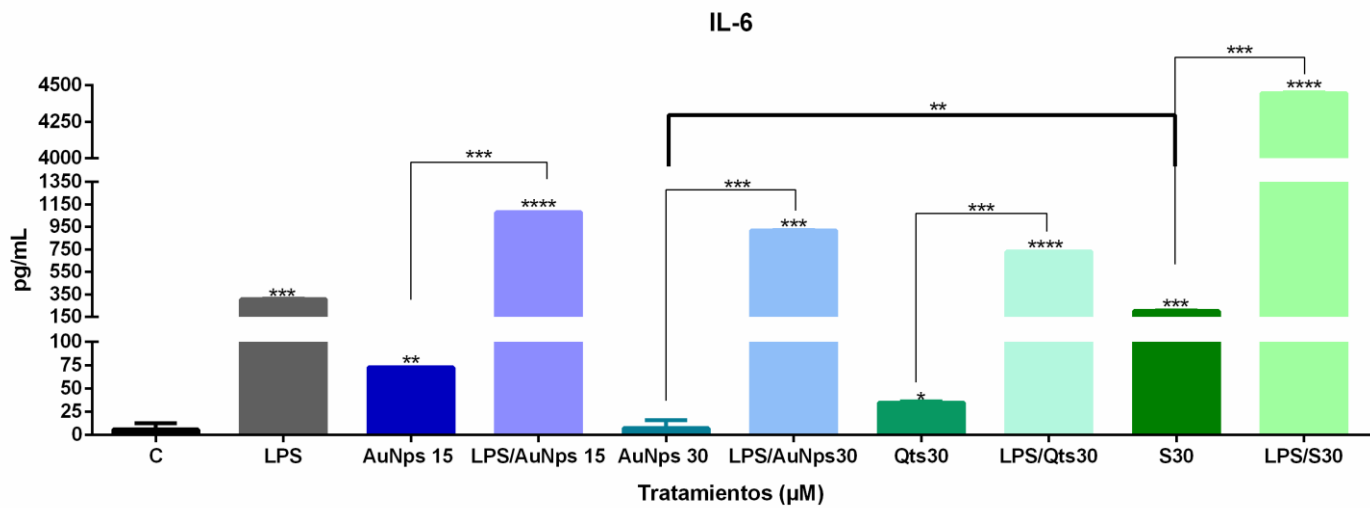


Figura 16. Niveles de expresión de IL-6 encontrados en sobrenadante de cultivo de monocitos tratados con AuNp's, quitosano y LPS. Monocitos humanos fueron tratados con nanopartículas de oro (AuNps) a 15 y 30 µM, quitosano (Qts) a 30 µM, con nanopartículas de oro comerciales a 30 µM (S30) y LPS a 1 µg/mL. Muestras LPS/AuNps15, LPS/AuNps30, LPS/Qts30 Y LPS/S30 fueron tratadas con LPS durante 24 hrs previo a los diferentes tratamientos. Control células cultivadas solo con medio RPMI-1640 y suero fetal bovino al 10%.

El perfil de IL-8 refleja una diferencia significativa en todos los tratamientos en comparación al control de células solo con medio. Además, se encontró una diferencia significativa en los niveles de IL-8 entre las partículas de oro sintetizadas con quitosano y las partículas comerciales, concordando con el perfil de IL-6.

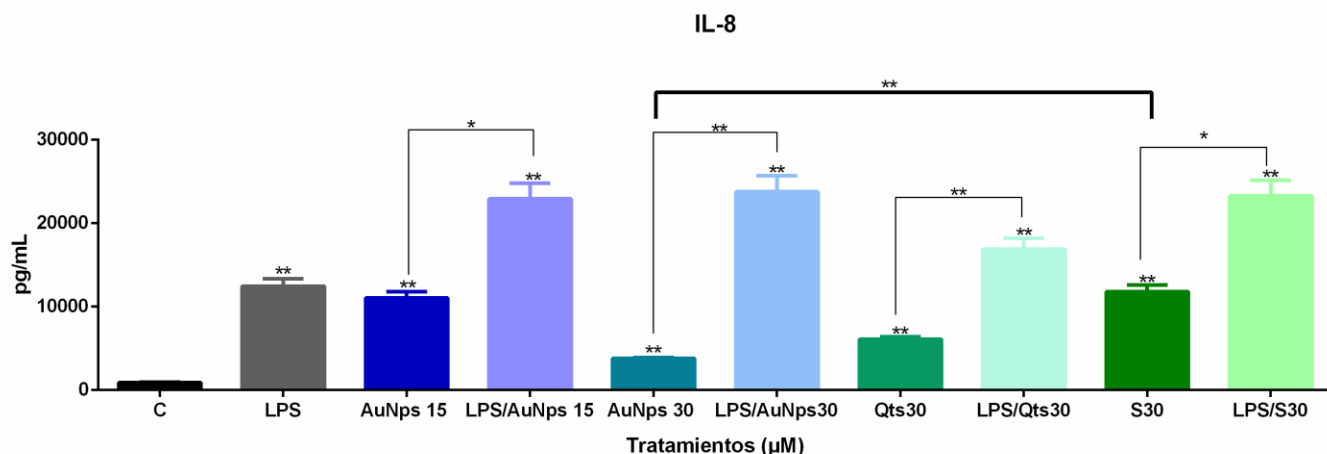


Figura 17. Niveles de expresión de IL-8 encontrados en sobrenadante de cultivo de monocitos tratados con AuNp's, quitosano y LPS. Monocitos humanos fueron tratados con nanopartículas de oro (AuNps) a 15 y 30 μ M, quitosano (Qts) a 30 μ M, con nanopartículas de oro comerciales a 30 μ M (S30) y LPS a 1 μ g/mL. Muestras LPS/AuNps15, LPS/AuNps30, LPS/Qts30 Y LPS/S30 fueron tratadas con LPS durante 24 hrs previo a los diferentes tratamientos. Control células cultivadas solo con medio RPMI-1640 y suero fetal bovino al 10%.

No se encontraron diferencias significativas en los niveles de IL-10 en ninguno de los tratamientos en comparación con el control de células sin tratar, tal como se ejemplifica en la figura 17.

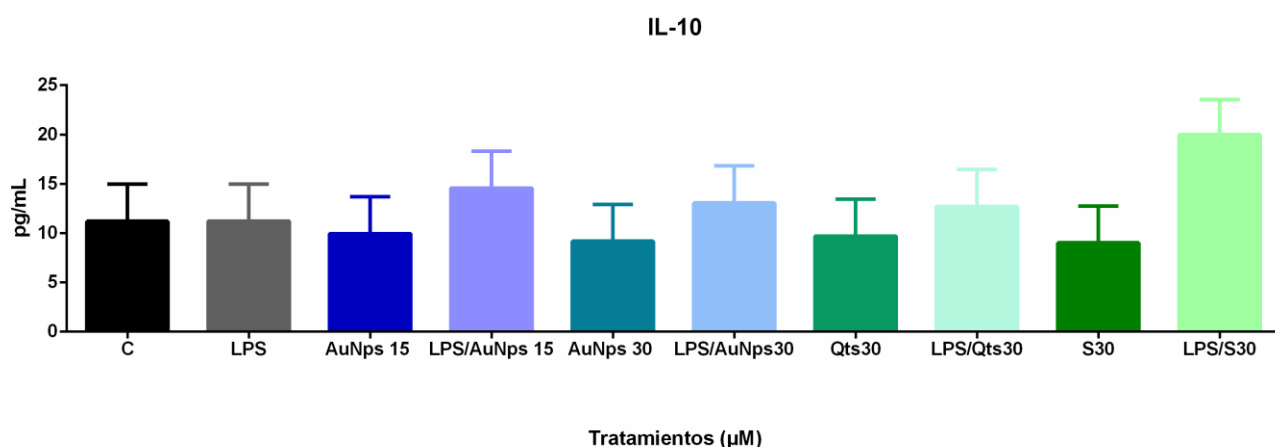


Figura 18. Niveles de expresión de IL-10 encontrados en sobrenadante de cultivo de monocitos tratados con AuNp's, quitosano y LPS. Monocitos humanos fueron tratados con nanopartículas de oro (AuNps) a 15 y 30 μ M, quitosano (Qts) a 30 μ M, con nanopartículas de oro comerciales a 30 μ M (S30) y LPS a 1 μ g/mL. Muestras LPS/AuNps15, LPS/AuNps30, LPS/Qts30 Y LPS/S30 fueron tratadas con LPS durante 24 hrs previo a los diferentes tratamientos. Control células cultivadas solo con medio RPMI-1640 y suero fetal bovino al 10%.

Tal como fue el caso de la IL-10, no se encontró diferencia significativa en la concentración de IL-12p70 en ninguno de los tratamientos, comparando con células solo cultivadas con medio (Figura 18).

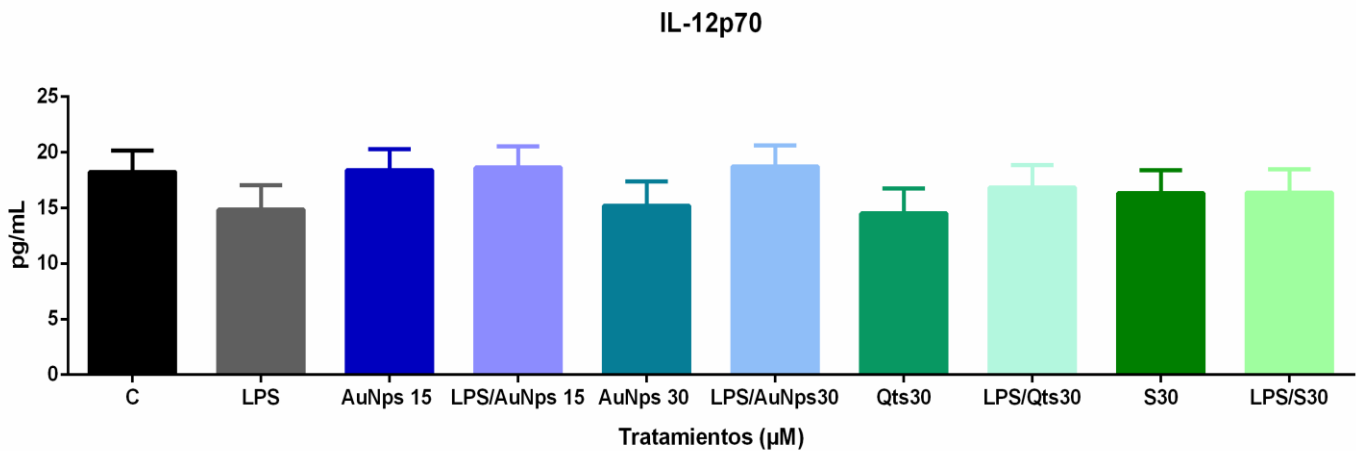


Figura 19. Niveles de expresión de IL-12p70 encontrados en sobrenadante de cultivo de monocitos tratados con AuNp's, quitosano y LPS. Monocitos humanos fueron tratados con nanopartículas de oro (AuNps) a 15 y 30 µM, quitosano (Qts) a 30 µM, con nanopartículas de oro comerciales a 30 µM (S30) y LPS a 1 µg/mL. Muestras LPS/AuNps15, LPS/AuNps30, LPS/Qts30 Y LPS/S30 fueron tratadas con LPS durante 24 hrs previo a los diferentes tratamientos. Control células cultivadas solo con medio RPMI-1640 y suero fetal bovino al 10%.

En la figura 19 se muestra la concentración encontrada del factor de necrosis tumoral (TNF) en el cultivo de monocitos, donde se aprecia una diferencia significativa a excepción de las células tratadas con AuNp's a 30 µM (Au30) y quitosano con previo tratamiento con LPS (LPS/Q30).

Tal como se observó en el perfil de las citocinas 6 y 8, se encontró un aumento significativo en la concentración de TNF en células tratadas con las nanopartículas comerciales en comparación a la concentración obtenida con el tratamiento de nanopartículas de oro sintetizadas con quitosano, utilizando la misma concentración en ambos casos.

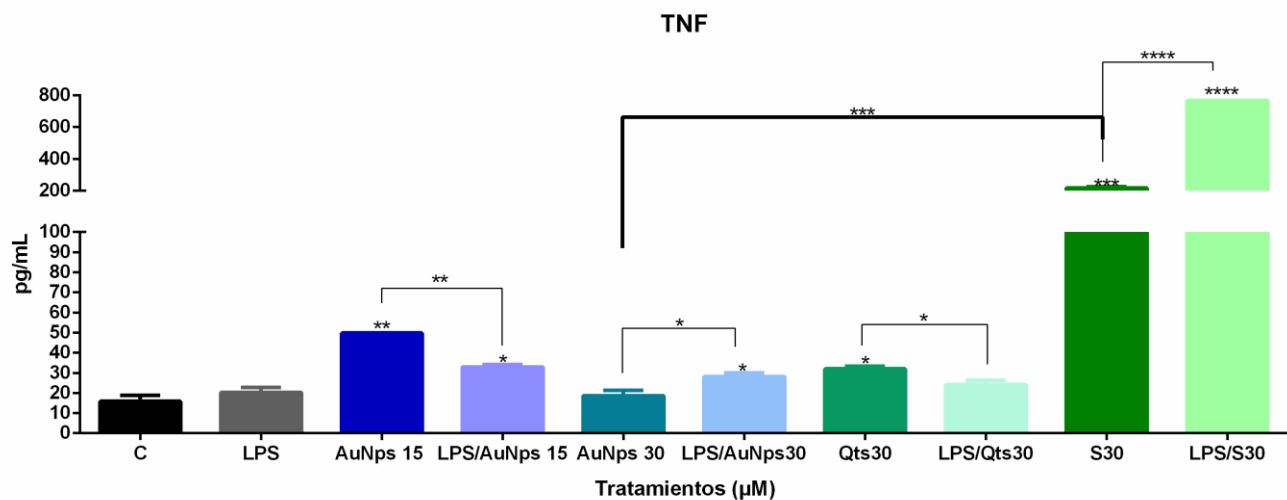


Figura 20. Niveles de TNF en sobrenadante de cultivo de monocitos tratados con AuNp's, quitosano y LPS. Monocitos humanos fueron tratados con nanopartículas de oro (AuNps) a 15 y 30 µM, quitosano (Qts) a 30 µM, con nanopartículas de oro comerciales a 30 µM (S30) y LPS a 1 µg/mL. Muestras LPS/AuNps15, LPS/AuNps30, LPS/Qts30 y LPS/S30 fueron tratadas con LPS durante 24 hrs previo a los diferentes tratamientos. El control constó de células cultivadas solo con medio RPMI-1640 y suero fetal bovino al 10%.

En resumen, se observó un aumento en las citocinas IL-1β, IL-6 y IL-8 al estimular con LPS, sin embargo después del tratamiento con AuNp's no se observó una disminución; además se observó un aumento en las citocinas IL-6 e IL-8 tratadas con AuNp's, principalmente a 15 µM, con Quitosano y las partículas comerciales (S30) pero no para IL-1β; para TNF hubo un aumento en todas las células tratadas, especialmente las células tratadas con S30, a excepción de las tratadas con AuNp's a 30 µM, mientras que la IL-12p70 e IL-10 no mostraron ninguna diferencia entre los tratamientos, ni contra el control sin tratamiento.

7. DISCUSIÓN

Los efectos de las nanopartículas sobre sistemas biológicos están directamente relacionados con las características fisicoquímicas que estas presenten. La teoría de Mie señala que la interacción de luz con nanopartículas metálicas resulta en una oscilación colectiva de los electrones en la última capa de energía de la partícula. Este fenómeno es conocido como resonancia del plasmón de superficie (RPS), por otro lado, Jain et al. señalan que RPS no solo depende del metal, sino también del tamaño, y forma de las partículas, donde un RPS de 520 nm se relaciona con AuNp's menos de 20 nm disueltas en agua, lo cual concuerda con los resultados obtenidos de la caracterización fisicoquímica de las nanopartículas de oro las cuales arrojaron un RPS de 519 nm, con un tamaño de 2 a 10 nm y de promedio 5.9 nm.

Estos resultados concuerdan con lo obtenido por Wang y Zhou quienes en 2008 sintetizaron AuNp's utilizando citrato de sodio como agente estabilizador, con un tamaño promedio de 13 nm y un RPS de 519 nm (Wang & Zhou, 2008).

Un problema importante en estudios preclínicos sobre adyuvancia es la pureza de este adyuvante, por lo que es sorprendente que el análisis de contaminación por endotoxinas no sea un requisito para tales estudios. Por esto, después de la caracterización, se evaluó la concentración de lipopolisacárido (LPS) presentes en las partículas, ya que como lo menciona Moran et al (2018), el patrón molecular asociado a patógenos, LPS es un robusto inductor de la activación de DC, así como de la secreción de citocinas y quimiocinas, todo esto inducido a través del TLR4 (Moran, Turley, Andersson, & Lavelle, 2018).

En el análisis realizado se encontró una concentración de 0.03 EU/mL en la concentración stock de 1mM, sin embargo, por debajo de 300 μ M la concentración de LPS fue <0.01 EU/mL. Ravindranathan et al en 2016 encontraron que concentraciones de LPS <0.01 EU/mg no inducía respuesta en macrófagos y DC humanos y de ratón (Moran et al., 2018; Ravindranathan, Koppolu, Smith, & Zaharoff, 2016). Asimismo, el Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos estipula que los instrumentos médicos que entren en contacto con el sistema cardiovascular y linfático, con fluido cerebroespinal, y agua inyectable para irrigación,

hemodiálisis etc. deben estar por debajo de los 0.06 EU/mL (U.S. Department of Health and Human Services, 2012). Lo anterior indica que es posible descartar alguna interferencia en los resultados por contaminación del tratamiento con endotoxinas.

Las moléculas de superficie estudiadas durante el proceso de maduración de monocitos a células dendríticas incluyen CD11c, CD83, CD86, HLA-DR, CD80 y CD14. CD11c es una molécula de adhesión común presente tanto en monocitos, macrófagos y células dendríticas, mientras que CD80 y CD86 son moléculas coestimuladoras que pertenecen a la familia B7 e incrementan su expresión en la maduración de monocitos a células dendríticas. CD86 es marcador temprano de maduración, mientras que CD80 aparece más tardíamente y se encuentra ausente en monocitos. (Vázquez, Sureda, & Rebollo, 2012; Wieder, 2003)

La molécula coestimuladora CD83 es reconocida como el mejor marcador de células dendríticas maduras (Lechmann, Berchtold, Steinkasserer, & Hauber, 2002). HLA-DR o Antígeno leucocitario humano clásico se expresa constitutivamente en la superficie de las células participantes en la respuesta inmune como fagocitos y linfocitos y participan en la inducción de la respuesta inmune específica a través de la presentación del antígeno a los linfocitos T. (Vega, 2009) Por último, CD14 es una molécula de anclaje encontrada principalmente en monocitos y macrófagos, aunque también es reconocida por participar en el proceso de reconocimiento del LPS por parte del TLR4 (Kawai & Akira, 2007; Triantafilou & Triantafilou, 2002).

En el presente estudio no se encontró un aumento en la expresión de marcadores de maduración como lo son CD80, CD83, CD86 y HLA-DR; sin embargo, marcadores de monocitos y macrófagos como CD11c y CD14 se mantuvieron constantes, indicando que las nanopartículas por sí solas no son capaces de inducir la maduración de monocitos hacia células dendríticas. Resultados similares fueron encontrados por Tomić y colaboradores en 2014, quienes trataron monocitos de sangre periférica humana con nanopartículas de oro en dos diferentes tamaños (10 y 50 nm) y analizaron la expresión de los marcadores de maduración HLA-DR, CD86 y CD83 encontrando diferencias no significativas entre el control de células sin tratamiento y las tratadas con ambos tipos de partículas (Tomić et al., 2014).

Así mismo, Villiers y colaboradores en 2010 utilizaron nanopartículas de oro sintetizadas con citrato de sodio con un tamaño de 10 nm para evaluar sus efectos en células dendríticas encontrando que no eran citotóxicas hasta la concentración de 0.5mM, en contraste con las AuNp's analizadas en este trabajo que se encontró viabilidad por debajo de 60µM. Al mismo tiempo analizaron la expresión de HLA, sin observar diferencia significativa en la expresión de HLA en comparación con el control de células sin nanopartículas de oro.(C. L. Villiers, Freitas, Couderc, Villiers, & Marche, 2010). Este mismo grupo de trabajo en 2009 probó el quitosano solo como inductor de células dendríticas, añadiendo este polímero natural en forma líquida directa al medio de cultivo de las células y encontraron que expresaban moléculas como CD80, CD86 y MHCII, sin embargo, no eran capaces de estimular linfocitos T pues no se produjo producción de citocinas, situación que cambió al estimular las células con derivados microbianos, lo cual indica que el quitosano por sí solo, provoca una estimulación parcial de células dendríticas, es decir, se quedan en estado inmaduro (C. Villiers et al., 2009b).

El quitosano está reportado por su reconocimiento a CD14, receptor de lipopolisacáridos, y las interacciones de sus subunidades N-acetil-glucosamina hacia proteínas de unión a manosa celulares funcionando como opsoninas. Estimulando transitoriamente al sistema inmune innato similar al LPS e induciendo la expresión de moléculas de maduración sin una respuesta completa (Seferian & Martinez, 2001). Por otro lado, las AuNp's utilizadas en este trabajo debido a su tamaño (5 nm en promedio) y a pesar de su recubrimiento de quitosano, dificulta el reconocimiento por parte de receptores extracelulares.

Las células dendríticas son células presentadoras de antígenos que funcionan al fagocitar, procesar y presentar antígenos para activar el sistema inmune adaptativo. Las iDC tienen una mayor capacidad fagocítica y una mayor actividad de procesar antígenos que las mDC. En contraste las mDC muestran una menor actividad endocítica y una mayor actividad de presentación de antígenos (Sheu, Lyu, Lee, & Cheng, 2013).

Por lo tanto, se continuo con el estudio de maduración de monocitos analizando la capacidad fagocítica de las células, donde el ensayo por fagocitosis de FITC-Dextran permitió observar que los monocitos analizados no perdieron su habilidad de captura de antígenos por lo que refleja un

fenotipo de DC inmadura o un fenotipo de macrófago M1 al ser estas células conocidas por poseer una gran capacidad fagocítica (Chávez-galán, Olleros, Vesin, Garcia, & Harris, 2015).

Este ensayo es ampliamente utilizado para evaluar esta característica, hay reportes desde 1995 donde Sallusto et al, determinaron que DC utilizan macropinocitosis y el receptor de manosa para la captura de antígenos para su posterior presentación mediante el MHCII, hasta la actualidad, donde Nguyen et al en 2019 utilizaron esta técnica para caracterizar la maduración de DC (Nguyen et al., 2019; Sallusto, Cella, Danieli, & Lanzavecchia, 1995).

Continuando con el análisis de respuesta de los monocitos a las AuNp's, se analizó la diferencia entre el patrón de expresión de TLR entre células sin tratamiento y células tratadas con AuNp's. De los receptores analizados (3, 4, 7, 8 y 9) solo el TLR 4 fue expresado en niveles detectables observándose una disminución en células tratadas con AuNp's

En 2002 Kadowaki y colaboradores obtuvieron monocitos de sangre periférica y iDC derivadas de estos monocitos y analizaron los niveles de mRNA de TLR expresados por estas células, encontrando que monocitos expresan altos niveles de TLR 1, 2, 4, 5 y 8, mientras que las iDC expresan TLR 1, 2 y 3 y en baja cantidad 5, 6, 8 y 10. (Kadowaki et al., 2002)

Estos patrones encontrados por Kadowaki et al. no concuerdan con los resultados de este proyecto, sugiriendo que las células encontradas no poseían un fenotipo de monocitos ni de iDC, sin embargo este fenotipo celular coincide con lo reportado por Rhee en 2016 quién realiza una comparativa de los fenotipos de macrófagos y describe a los macrófagos de tipo M1, como células que expresan los receptores TLR 2 y 4, posible razón por la cual no se encontraron en niveles detectables los TLR 3, 7, 8 y 9. (Rhee, 2016)

Tsai y colaboradores en 2012 encontraron que AuNp's de 4 nm sintetizadas con Borohidruro de sodio como agente reductor, inhibían la expresión de TLR9 al unirse a HMGB-1 debido a que por su tamaño poseen una mayor superficie relativa y una mayor habilidad de unirse a proteínas ricas en lisina o cisteína. (Tsai et al., 2012)

Por otro lado, Vyas y Goswami en 2019 encontraron que AuNp's sintetizadas con citrato de sodio tienen la capacidad de disminuir la expresión de TLR4 en células A549 de adenocarcinoma pulmonar al intervenir en la vía de señalización de p38MAPK. Lo anterior sugiere que la

disminución en la expresión de TLR4 en células tratadas con AuNp's pudiera deberse a la interacción de las partículas con proteínas en las vías de señalización del TLR4. (Vyas & Goswami, 2019)

Como último objetivo del presente proyecto se analizó por Western Blot, la expresión de las moléculas inmunomoduladoras Gal-3,IDO e IFN. De las 3 moléculas solamente se encontró en niveles detectables, sin cambios estadísticamente significativos entre control y tratamiento a Gal-3; Esto probablemente debido a que esta familia de proteínas está presente en la mayoría de las células; específicamente Gal-3 se encuentra en células epiteliales y macrófagos, (Liu, Patterson, & Wang, 2002b). Lo que sugiere que las células obtenidas poseen un fenotipo de macrófagos concordando con los resultados anteriores.

Por el contrario, IDO tiene una función regulatoria en DC, y es inducida por citocinas proinflamatorias como IFN- γ que a su vez es inducida por diversos PAMPs que son reconocidos por TLRs, principalmente por el TLR4, receptor que mostró una disminución por lo que explica la poco o nula expresión de IFN- γ , y a su vez de IDO (W. Chen, 2011) .

Para complementar los resultados anteriores, se analizó el perfil de citocinas proinflamatorias con el propósito de determinar si las AuNp's inducen un perfil de inmunosupresión en células estimuladas previamente con LPS.

Las AuNp's estimularon la producción de IL-6 e IL-8, pero no la producción de IL-1 β , esto posiblemente a que ambas citocinas son de tipo inflamatorio, producidas principalmente por macrófagos, explicando su aumento en células tratadas con LPS, siendo este un inductor de monocitos a macrófagos. A su vez, IL-1 β se considera de tipo inflamatorio, sin embargo, su activación lleva dos pasos, el primero donde se induce pro-IL- 1 β con el primer estímulo de un antígeno, pero es ineficiente para provocar la secreción de una molécula activa, un segundo estímulo es necesario para la secreción de IL-1 β activa. La secreción de esta citocina está influenciada por el tipo y la fuerza del segundo estímulo; en su mayoría este segundo estímulo viene de PAMPs o DAMPs que provocan la formación de Inflamosoma (Lopez-castejon & Brough, 2011), por lo que esto sugiere que las AuNp's no inducen la formación de Inflamosoma.

Por el contrario, IL-12p70 e IL-10 son citocinas de tipo antiinflamatorio encontradas en células T, de manera que se justifica el que no se encontraran en niveles más altos a 20 pg/mL y sin diferencias significativas entre tratamientos y control (Turner, Nedjai, Hurst, & Pennington, 2014).

Khan et al en 2013 trataron ratas Wistar con partículas comerciales de 10 y 50 nm a 1 y 5 días, para el posterior análisis de citocinas. Encontraron que en el día 1 los niveles de expresión de IL-1 β , IL-6 y TNF- α aumentaron significativamente, principalmente en las AuNp's de 50 nm, pero para el día 5 estos niveles habían vuelto casi a nivel del control sin tratamiento para ambos tamaños de partículas (Khan, Abdelhalim, Alhomida, & Ayed, 2013).

Esto concuerda con lo observado por Vyas y Goswami en 2019 quienes mencionan que el tiempo de estimulación es un parámetro crucial para determinar si existe una atenuación en el perfil de inflamación pues observaron que células A549 pretratadas con AuNp's de 5 nm, al ser estimuladas con LPS por 3 horas, inducía una disminución de IL-1 β , TNF- α , iNOS, NF- κ B y p38, sin embargo, al estimular por 6 horas los niveles de estas citocinas se encontraban sin diferencia significativa con el control (Vyas & Goswami, 2019).

Los resultados encontrados en este trabajo sugieren que las AuNp's no inducen un cambio de perfil proinflamatorio, hacia uno antiinflamatorio, sin embargo, de acuerdo a lo encontrado por autores citados anteriormente, más estudios son necesarios para poder descartar esto por completo, ya que las células analizadas fueron estimuladas por 24h por lo que existe la posibilidad que los niveles de citocinas se hayan restablecido antes de su análisis, principalmente en células tratadas a 30 μ M ya que no presentaron aumento en IL-1 β , TNF, IL-12p70 ni IL-10, aunado a esto, de todos los tratamientos, fueran las que provocaron un menor aumento de IL-6 e IL-8.

La baja respuesta de los monocitos a las nanopartículas nos permite determinar que las AuNp's de estos tamaños no generan un estímulo por sí mismas en células presentadoras al no ser reconocidas como patógenos externos. Así mismo, se observó que los monocitos tratados con LPS y AuNp's aumentaban la producción de citocinas inflamatorias comparadas con células tratadas individualmente con LPS o AuNp's, llevándonos a la conclusión de que las AuNp's al combinarse con una menor cantidad de antígeno podrían elicitar una mayor respuesta, pudiéndose aplicar a

sistemas funcionalizados aprovechables en áreas médicas como tratamientos, diferenciación celular, diagnósticos, envíos dirigidos entre muchas otras.

8. CONCLUSIONES

- Con base en los resultados del análisis de endotoxinas presentes en las AuNp's, se encontró que los niveles presentes en el tratamiento eran menores al límite permisible por el Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos, descartando a las endotoxinas exógenas como causantes de una respuesta inflamatoria en monocitos.
- La evaluación de expresión de marcadores de maduración en células tratadas con AuNp's demostró que el tratamiento no aumentó significativamente los niveles de expresión de los receptores CD14, CD 80, CD83, CD86, CD11c y HLA, indicando que no se obtuvo un fenotipo de DC.
- No se observaron cambios en la capacidad fagocítica de células tratadas con AuNp's en comparación a las células sin tratamiento, indicando que ambos grupos mantuvieron el mismo fenotipo.
- No se observaron niveles detectables de los receptores 3, 7, 8 y 9 mediante *Western blot*. Mientras que la activación del TLR4 se vio disminuida, probablemente a la interacción con cierta proteína de la cascada de señalización del TLR4.
- Las moléculas inmunomoduladoras IFN e IDO no se expresaron en niveles detectables por *Western blot*, mientras que galectina fue encontrado sin diferencia significativa en comparación al control sin tratamiento, indicando que nuestras AuNp's no se reconocen como un agente exógeno.
- El perfil de citocinas obtenido coincide con lo esperado para células tipo M1, además se observó que las células tratadas con LPS y AuNp's mostraban un aumento mayor que cualquiera de los tratamientos en forma individual, sugiriendo una posible acción sinérgica entre las AuNp's y el LPS.

9. PERSPECTIVAS

- Analizar los perfiles de citocinas inflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p70, IL-10, TNF- α) con pre y post tratamiento de AuNp's en monocitos y/o macrófagos a diferentes tiempos.
- Examinar los TLRs con pre y post tratamiento de AuNp's en monocitos y/o macrófagos a diferentes tiempos
- Determinar el punto de interacción de las AuNp's en la cascada de señalización del TLR4
- Escalar análisis de inmunosupresión por parte de AuNp's a un modelo *in vivo* de inflamación.
- Estudiar el uso y efecto de sistemas funcionalizados partículas-citocinas/antígeno en diferenciación celular.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2015). *Inmunología celular y molecular*. (J. M. Igea, F. R. Chávez Sánchez, & R. Lascurain Ledesma, Eds.) (8va ed.). Barcelona, España: Elsevier.
- Ahmad, A., Senapati, S., Khan, M. I., Kumar, R., Ramani, R., Srinivas, V., & Sastry, M. (2003). Intracellular synthesis of gold nanoparticles by a novel alkalotolerant actinomycete, *Rhodococcus* species. *Nanotechnology*, *14*(7), 824–828. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/14/7/323>
- Banchereau, J., & Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, *392*(March), 245–252. <https://doi.org/10.1038/32588>
- Begoña Vázquez, M., Sureda, M., & Rebollo, J. (2012). Células dendríticas I: Aspectos básicos de su biología y funciones. *Inmunología*, *31*(1), 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.inmuno.2011.10.001>
- Castillo, P. M., Herrera, J. L., Fernandez-Montesinos, R., Caro, C., Zaderenko, A. P., Mejías, J. A., & Pozo, D. (2008). Tiopronin monolayer-protected silver nanoparticles modulate IL-6 secretion mediated by Toll-like receptor ligands. *Nanomedicine*, *3*(5), 627–635. <https://doi.org/10.2217/17435889.3.5.627>
- Cedeno-Laurent, F., & Dimitroff, C. J. (2012). Galectins and their ligands: Negative regulators of anti-tumor immunity. *Glycoconjugate Journal*, *29*(8–9), 619–625. <https://doi.org/10.1007/s10719-012-9379-0>
- Chávez-galán, L., Olleros, M. L., Vesin, D., Garcia, I., & Harris, R. A. (2015). Much more than M1 and M2 macrophages , there are also CD169 + and TCR + macrophages, *6*(May), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00263>
- Chen, H., Li, X., & Du, Y. (2012). *1D???3D Nano-engineered Biomaterials for Biomedical Applications. Integrated Biomaterials for Biomedical Technology*. <https://doi.org/10.1002/9781118482513.ch1>
- Chen, W. (2011). IDO: more than an enzyme. *Nature Immunology*, *12*(9), 809–811. <https://doi.org/10.1038/ni.2088>
- Colorado Ana Cristina, Agudelo Carlos Andrés, Moncada A, M. E. (2013). Análisis de Biomateriales para uso en ingeniería de tejidos de piel. *Rev. Ing. Biomed.*, *7*, 11–23.
- Cools, N., Ponsaerts, P., Tendeloo, V. F. I. Van, & Berneman, Z. N. (2007). Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. *J Leukoc Biol.*, *82*(6), 1365–1374. <https://doi.org/10.1189/jlb.0307166>
- Démoulin, T., Bassi, I., Thomann-Harwood, L., Jandus, C., Kaeuper, P., Simon, H. U., ... McCullough, K. C. (2013). Alginate-coated chitosan nanogel capacity to modulate the effect of TLR ligands on blood dendritic cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, *9*(6), 806–817. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2013.01.002>

- Dragostin, O. M., Samal, S. K., Dash, M., Lupascu, F., Pânzariu, A., Tuchilus, C., ... Profire, L. (2016). New antimicrobial chitosan derivatives for wound dressing applications. *Carbohydrate Polymers*, *141*, 28–40. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.12.078>
- Dubey, S. P., Lahtinen, M., & Sillanpää, M. (2010). Green synthesis and characterizations of silver and gold nanoparticles using leaf extract of *Rosa rugosa*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *364*(1–3), 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.04.023>
- Ebrahim, A. H., Alalawi, Z., Mirandola, L., Rakhshanda, R., Dahlbeck, S., Nguyen, D., ... Chiriva-Internati, M. (2014). Galectins in cancer: carcinogenesis, diagnosis and therapy. *Annals of Translational Medicine*, *2*(9), 88. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2014.09.12>
- Fukumori, T., Takenaka, Y., Yoshii, T., Choi Kim, H.-R., Hogan, V., Inohara, H., ... Raz, A. (2003). CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. *Cancer Research*, *63*(23), 8302–8311. Retrieved from <http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2016/RA/C6RA10351K%5Cnhttp://www.nature.com/doi/10.1038/ncomms10274>
- Harden, J. L., & Egilmez, N. K. (2012). Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Dendritic cell tolerogenicity. *Immunol Invest.*, *41*(0), 738–764. <https://doi.org/10.3109/08820139.2012.676122>.Indoleamine
- Hargadon, K. M. (2013). Tumor-altered dendritic cell function: Implications for anti-tumor immunity. *Frontiers in Immunology*, *4*(JUL), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00192>
- He, M., Su, D., Liu, Q., Gao, W., & Kang, Y. (2017). Mushroom lectin overcomes hepatitis B virus tolerance via TLR6 signaling. *Scientific Reports*, *7*(1), 5814. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06261-5>
- Hsu, L. W., Ho, Y. C., Chuang, E. Y., Chen, C. T., Juang, J. H., Su, F. Y., ... Sung, H. W. (2013). Effects of pH on molecular mechanisms of chitosan-integrin interactions and resulting tight-junction disruptions. *Biomaterials*, *34*(3), 784–793. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.09.082>
- Huang, H., & Yang, X. (2004). Synthesis of chitosan-stabilized gold nanoparticles in the absence/presence of tripolyphosphate. *Biomacromolecules*, *5*(6), 2340–2346. <https://doi.org/10.1021/bm0497116>
- Hutter, E., Boridy, S., Labrecque, S., Lalancette-Hébert, M., Kriz, J., Winnik, F. M., & Maysinger, D. (2010). Microglial response to gold nanoparticles. *ACS Nano*, *4*(5), 2595–2606. <https://doi.org/10.1021/nn901869f>
- Jain, P. K., Huang, X., El-Sayed, I. H., & El-Sayed, M. A. (2007). Review of some interesting surface plasmon resonance-enhanced properties of noble metal nanoparticles and their applications to biosystems. *Plasmonics*, *2*(3), 107–118. <https://doi.org/10.1007/s11468-007-9031-1>
- Jin, B., Sun, T., Yu, X. H., Yang, Y. X., & Yeo, A. E. T. (2012). The effects of TLR activation on T-cell development and differentiation. *Clinical and Developmental Immunology*, *2012*(Figure 1).

<https://doi.org/10.1155/2012/836485>

- Kadowaki, N., Ho, S., Antonenko, S., de Waal Malefyt, R., Kastelein, R. A., Bazan, F., & Liu, Y.-J. (2002). Subsets of Human Dendritic Cell Precursors Express Different Toll-like Receptors and Respond to Different Microbial Antigens. *The Journal of Experimental Medicine*, 194(6), 863–870. <https://doi.org/10.1084/jem.194.6.863>
- Kawai, T., & Akira, S. (2007). TLR signaling. *Seminars in Immunology*, 19(1), 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2006.12.004>
- Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*, 11(5), 373–384. <https://doi.org/10.1038/ni.1863>
- Khan, H. A., Abdelhalim, M. A. K., Alhomida, A. S., & Ayed, M. S. Al. (2013). Transient increase in IL-1 β , IL-6 and TNF- α gene expression in rat liver exposed to gold nanoparticles, 12(4), 5851–5857.
- Kouo, T., Huang, L., Pucsek, A. B., Cao, M., Solt, S., Armstrong, T., & Jaffee, E. (2015). Galectin-3 Shapes Antitumor Immune Responses by Suppressing CD8+ T Cells via LAG-3 and Inhibiting Expansion of Plasmacytoid Dendritic Cells. *Cancer Immunology Research*, 3(4), 412–423. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.cir-14-0150>
- Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S. (2011). Pathogen Recognition by the Innate Immune System. *International Reviews of Immunology*, 30(1), 16–34. <https://doi.org/10.3109/08830185.2010.529976>
- Lechmann, M., Berchtold, S., Steinkasserer, A., & Hauber, J. (2002). CD83 on dendritic cells: More than just a marker for maturation. *Trends in Immunology*, 23(6), 273–275. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(02\)02214-7](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(02)02214-7)
- Lin, C.-F., Lin, C.-M., Lee, K.-Y., Wu, S.-Y., Feng, P.-H., Chen, K.-Y., ... Tsai, T.-T. (2017). Escape from IFN- γ -dependent immunosurveillance in tumorigenesis. *Journal of Biomedical Science*, 24(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s12929-017-0317-0>
- Liu, F. T., Patterson, R. J., & Wang, J. L. (2002a). Intracellular functions of galectins. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1572(2–3), 263–273. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(02\)00313-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00313-6)
- Liu, F. T., Patterson, R. J., & Wang, J. L. (2002b). Intracellular functions of galectins. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1572(2–3), 263–273. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(02\)00313-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00313-6)
- Lopez-castejon, G., & Brough, D. (2011). Cytokine & Growth Factor Reviews Understanding the mechanism of IL-1 b secretion. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 22(4), 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.10.001>
- López Pacheco, E., Franco-Molina, M. A., Rodríguez-Padilla, C., Zárate-Triviño, D. G., Mendoza-Gamboa,

- E., & Zapata-Benavides, P. (2016). *Potencial de nanopartículas de quitosano como inductor de diferenciación de monocitos humanos a células dendríticas*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Moran, H. B. T., Turley, J. L., Andersson, M., & Lavelle, E. C. (2018). Biomaterials Immunomodulatory properties of chitosan polymers. *Biomaterials*, *184*(May), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.08.054>
- Mukherjee, P., Ahmad, A., Mandal, D., Senapati, S., Sainkar, S. R., Khan, M. I., ... Sastry, M. (2001). Fungus-Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Immobilization in the Mycelial Matrix: A Novel Biological Approach to Nanoparticle Synthesis. *Nano Letters*, *1*(10), 515–519. <https://doi.org/10.1021/nl0155274>
- Munn, D. H., & Mellor, A. L. (2016). IDO in the Tumor Microenvironment: Inflammation, Counter-regulation and Tolerance. *Trends in Immunology*, *37*(3), 193–207. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.01.002.IDO>
- Nguyen, T. X., Do Minh, T., Nghiem, N. M., Vu Xuan, N., Nguyen, V. G., Nguyen, X. C., ... Nguyen, H. H. (2019). Regulation of p38MAPK-mediated dendritic cell functions by the deubiquitylase otubain 1. *Immune Response Genetics*, *93*(6), 462–470. <https://doi.org/10.1111/tan.13534>
- Orlowski, P., Tomaszewska, E., Ranoszek-Soliwoda, K., Gniadek, M., Labedz, O., Malewski, T., ... Krzyzowska, M. (2018). Tannic acid-modified silver and gold nanoparticles as novel stimulators of dendritic cells activation. *Frontiers in Immunology*, *9*(MAY), 1–23. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01115>
- Osorio, F., & Reis e Sousa, C. (2011). Myeloid C-type Lectin Receptors in Pathogen Recognition and Host Defense. *Immunity*, *34*(5), 651–664. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.001>
- Philip, D. (2009). Honey mediated green synthesis of gold nanoparticles. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *73*(4), 650–653. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2009.03.007>
- Philip, D. (2010). Green synthesis of gold and silver nanoparticles using *Hibiscus rosa sinensis*. *Physica E: Low-Dimensional Systems and Nanostructures*, *42*(5), 1417–1424. <https://doi.org/10.1016/j.physe.2009.11.081>
- Radosavljevic, G., Volarevic, V., Jovanovic, I., Milovanovic, M., Pejnovic, N., Arsenijevic, N., ... Lukic, M. L. (2012). The roles of Galectin-3 in autoimmunity and tumor progression. *Immunologic Research*, *52*(1–2), 100–110. <https://doi.org/10.1007/s12026-012-8286-6>
- Raftery, R., O'Brien, F. J., & Cryan, S. A. (2013). Chitosan for gene delivery and orthopedic tissue engineering applications. *Molecules*, *18*(5), 5611–5647. <https://doi.org/10.3390/molecules18055611>
- Raveendran, P., Fu, J., & Wallen, S. L. (2003). Completely “Green” Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, *125*(46), 13940–13941.

<https://doi.org/10.1021/ja029267j>

- Ravindranathan, S., Koppolu, B., Smith, S. G., & Zaharoff, D. A. (2016). Effect of Chitosan Properties on Immunoreactivity. <https://doi.org/10.3390/md14050091>
- Rhee, I. (2016). Diverse macrophages polarization in tumor microenvironment. *Archives of Pharmacal Research*. <https://doi.org/10.1007/s12272-016-0820-y>
- Sallusto, B. F., Cella, M., Danieli, C., & Lanzavecchia, A. (1995). From the *Basel Institute for Immunology, CH-4005 Basel, Switzerland; and tDepartment of Immunology, Istituto Superiore di SanitY, 1-00161 Rome, Italy, *182*(August).
- Sámano-Valencia, C., Martínez-Castanon, G. A., Martínez-Martínez, R. E., Loyola-Rodríguez, J. P., Reyes-Macías, J. F., Ortega-Zarzosa, G., & Niño-Martínez, N. (2013). Bactericide efficiency of a combination of chitosan gel with silver nanoparticles. *Materials Letters*, *106*(September 2016), 413–416. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2013.05.075>
- Seferian, P. G., & Martinez, M. L. (2001). Immune stimulating activity of two new chitosan containing adjuvant formulations, *19*, 661–668.
- Shantsila, E., Wrigley, B., Tapp, L., Apostolakis, S., Montoro-Garcia, S., Drayson, M. T., & Lip, G. Y. H. (2011). Immunophenotypic characterization of human monocyte subsets: Possible implications for cardiovascular disease pathophysiology. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, *9*(5), 1056–1066. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04244.x>
- Sheu, S., Lyu, Y., Lee, M., & Cheng, J. (2013). Immunomodulatory effects of polysaccharides isolated from *Heridium erinaceus* on dendritic cells &. *Process Biochemistry*, *48*(9), 1402–1408. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.06.012>
- Sprangers, S., Vries, T. J. De, & Everts, V. (2016). Monocyte Heterogeneity : Consequences for Monocyte-Derived Immune Cells, *2016*.
- Steinman, R. M., Hawiger, D., & Nussenzweig, M. C. (2003a). Tolerogenic Dendritic Cells. *Annual Review of Immunology*, *21*(1), 685–711. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141040>
- Steinman, R. M., Hawiger, D., & Nussenzweig, M. C. (2003b). Tolerogenic dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, *21*(1), 685–711. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141040>
- Sugunan, A., Thanachayanont, C., Dutta, J., & Hilborn, J. G. (2005). Heavy-metal ion sensors using chitosan-capped gold nanoparticles. *Science and Technology of Advanced Materials*, *6*(3–4 SPEC. ISS.), 335–340. <https://doi.org/10.1016/j.stam.2005.03.007>
- Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*, *140*(6), 805–820.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>

- Thakkar, K. N., Mhatre, S. S., & Parikh, R. Y. (2010). Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 6(2), 257–262. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.07.002>
- Tomić, S., Dokić, J., Vasiljić, S., Ogrinc, N., Rudolf, R., Pelicon, P., ... Čolić, M. (2014). Size-dependent effects of gold nanoparticles uptake on maturation and antitumor functions of human dendritic cells in vitro. *PLoS ONE*, 9(5), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096584>
- Triantafilou, M., & Triantafilou, K. (2002). Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends in Immunology*, 23(6), 301–304. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(02\)02233-0](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(02)02233-0)
- Tsai, C.-Y., Lu, S.-L., Hu, C.-W., Yeh, C.-S., Lee, G.-B., & Lei, H.-Y. (2012). Size-Dependent Attenuation of TLR9 Signaling by Gold Nanoparticles in Macrophages. *The Journal of Immunology*, 188(1), 68–76. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100344>
- Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T., & Pennington, D. J. (2014). Biochimica et Biophysica Acta Cytokines and chemokines : At the crossroads of cell signalling and in fl ammatory disease. *BBA - Molecular Cell Research*, 1843(11), 2563–2582. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.05.014>
- Van der Vorst, E. P. C., & Weber, C. (2019). Novel Features of Monocytes and Macrophages in Cardiovascular Biology and Disease, 30–37. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.312002>
- Vázquez, M. B., Sureda, M., & Rebollo, J. (2012). Células dendríticas I: Aspectos básicos de su biología y funciones. *Inmunologia*, 31(1), 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.inmuno.2011.10.001>
- Vega, G. (2009). Complejo mayor de histocompatibilidad. *Artemisa Medigraphic*, 52(2), 86–89. Retrieved from <http://www.ejournal.unam.mx/rfm/no52-2/RFM052000210.pdf>
- Venezia, S., Refolo, V., Polissidis, A., Stefanis, L., Wenning, G. K., & Stefanova, N. (2017). Toll-like receptor 4 stimulation with monophosphoryl lipid A ameliorates motor deficits and nigral neurodegeneration triggered by extraneuronal α -synucleinopathy. *Molecular Neurodegeneration*, 12(1), 52. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0195-7>
- Villiers, C., Chevallet, M., Diemer, H., Couderc, R., Freitas, H., Van Dorsselaer, A., ... Rabilloud, T. (2009a). From Secretome Analysis to Immunology. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 8(6), 1252–1264. <https://doi.org/10.1074/mcp.M800589-MCP200>
- Villiers, C., Chevallet, M., Diemer, H., Couderc, R., Freitas, H., Van Dorsselaer, A., ... Rabilloud, T. (2009b). From Secretome Analysis to Immunology. *Molecular & Cellular Proteomics*, 8(6), 1252–1264. <https://doi.org/10.1074/mcp.M800589-MCP200>
- Villiers, C. L., Freitas, H., Couderc, R., Villiers, M. B., & Marche, P. N. (2010). Analysis of the toxicity of

- gold nano particles on the immune system: Effect on dendritic cell functions. *Journal of Nanoparticle Research*, 12(1), 55–60. <https://doi.org/10.1007/s11051-009-9692-0>
- Vyas, S. P., & Goswami, R. (2019). Size-dependent cellular uptake and TLR4 attenuation by gold nanoparticles in lung adenocarcinoma cells.
- Wacleche, V. S., Tremblay, C. L., Routy, J., & Ancuta, P. (2018). The Biology of Monocytes and Dendritic Cells : Contribution to HIV Pathogenesis, (Dc), 1–31. <https://doi.org/10.3390/v10020065>
- Wang, J., & Zhou, H. S. (2008). Aptamer-Based Au Nanoparticles-Enhanced Surface Plasmon Resonance Detection of Small Molecules, 80(18), 7174–7178.
- Wieder, E. (2003). Dendritic Cells : A Basic Review. *International Society for Cellular Therapy*, (May), 1–6.
- Xie, Y., Liu, X., & Chen, Q. (2007). Synthesis and characterization of water-soluble chitosan derivate and its antibacterial activity. *Carbohydrate Polymers*, 69(1), 142–147. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.09.010>
- Yeung, A. W. S., Terentis, A. C., King, N. J. C., & Thomas, S. R. (2015). Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in health and disease. *Clinical Science*, 129(7), 601–672. <https://doi.org/10.1042/CS20140392>
- Yildirimer, L., Thanh, N. T. K., & Seifalian, A. M. (2012). Skin regeneration scaffolds: A multimodal bottom-up approach. *Trends in Biotechnology*, 30(12), 638–648. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.08.004>
- Younes, I., & Rinaudo, M. (2015). Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications, (June). <https://doi.org/10.3390/md13031133>
- Zhang, L., & Webster, T. J. (2009). Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. *Nano Today*, 4(1), 66–80. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2008.10.014>