

**LAS NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE INDUCEN LA ACTIVACIÓN DEL
INFLAMOSOMA NLRP3 Y LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS
PROINFLAMATORIAS EN CÉLULAS PRIMARIAS HUMANAS.**

DIANA MARYORY GOMEZ GALLEGO

Escuela de Microbiología

Universidad de Antioquia

Medellín

2016

**LAS NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE INDUCEN LA ACTIVACIÓN DEL
INFLAMOSOMA NLRP3 Y LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS
PROINFLAMATORIAS EN CÉLULAS PRIMARIAS HUMANAS.**

DIANA MARYORY GOMEZ GALLEGO

Presentado para obtener el título de Magister en Microbiología y Bioanálisis

Tutor

Juan Carlos Hernández López

Comité Tutorial

Juan Álvaro López

Silvio Urcuqui Inchima

Walter D. Cardona Maya

Escuela de Microbiología

Universidad de Antioquia

Medellín

2016

TABLA DE CONTENIDO	Pág.
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	4
1. NANOBIOTECNOLOGÍA Y MEDICINA	4
1.1. NANOPARTÍCULAS	5
2. SISTEMA INMUNE INNATO	7
2.1. INFLAMASOMA NLRP3	8
2.2. INMUNOMODULACIÓN	9
2.3. NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE E INMUNOMODULACIÓN	11
3. REFERENCIAS	14
OBJETIVOS	21
HIPÓTESIS	22
CAPÍTULO 1: EFECTO INMUNOMODULADOR DE NANOPARTÍCULAS USADAS EN NANOMEDICINA (Artículo de revisión)	23
CAPÍTULO 2: SILICA NANOPARTICLES INDUCE NLRP3 INFLAMMASOME ACTIVATION IN HUMAN PRIMARY IMMUNE CELLS	36
1. INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA 1: ESTANDARIZACIÓN DE CONDICIONES EXPERIMENTALES	67

2. INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA 2: EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE EN LA FORMACIÓN DE NETs	79
ANEXOS: Certificados de participación en eventos académicos	83

RESUMEN

El rápido avance de la nanotecnología ha permitido diseñar, fabricar y utilizar nanopartículas (NP) que interactúan con los sistemas biológicos para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades, surgiendo así una nueva disciplina llamada nanomedicina. En este sentido, se ha desarrollado una amplia gama de aplicaciones médicas, por ejemplo, en imágenes para diagnóstico, biosensores, administración de fármacos y genes, terapia fototérmica, ingeniería tisular y materiales biomiméticos, entre otras. Dado que el tamaño de las nanopartículas les permite interactuar directamente con las células o con el medio ambiente extracelular, éstas pueden desencadenar una secuencia de efectos biológicos que dependen en gran medida de sus características fisicoquímicas y determinan la biocompatibilidad y la eficacia de los resultados deseados. Para garantizar un uso eficaz y seguro de los nanomateriales en aplicaciones biomédicas, es necesario en primer lugar, estudiar y caracterizar sus interacciones con el sistema biológico de interés, incluyendo el sistema inmune, ya que la comprensión de los mecanismos detrás de los diferentes resultados permitirá predecir la relación que existe entre ellos. Una de las nanopartículas más usadas en el campo biomédico son las nanopartículas de sílice, pero a la fecha, sus efectos en los componentes del sistema inmune y en particular, en los de la inmunidad innata han sido poco estudiado. Por lo tanto, se desconoce si dichos nanomateriales pueden alterar o no la expresión y función de los receptores de la inmunidad innata implicados en la respuesta inflamatoria. Aunque la sílice es considerada como un material biocompatible, como nanomaterial presenta cambios en sus propiedades fisicoquímicas que pueden ocasionar, tanto *in vitro* como *in vivo*, efectos deletéreos de las funciones celulares. Estudios previos han demostrado por ejemplo que las partículas de sílice con

diferentes propiedades fisicoquímicas (tamaño, forma, y porosidad, entre otras) pueden inducir la liberación de citoquinas proinflamatorias en células de la inmunidad, incluyendo monocitos/macrófagos y células dendríticas, a través de la activación del inflamasoma NLRP3. Sin embargo, se desconoce la participación de otros tipos celulares, importantes en el proceso inflamatorio, como los neutrófilos.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar *in vitro*, el potencial efecto inmunomodulador de NP de sílice de 12 y 200nm en la expresión de citoquinas proinflamatorias y componentes de los inflamasoma NLRP3 en neutrófilos y células mononucleares de sangre periférica (CMSP) obtenidas de individuos sanos. Los neutrófilos y CMSP se estimularon con las respectivas NP y se cuantificó tanto *i*) la expresión de los componentes del inflamasoma NLRP3 (NLRP3, ASC, Caspasa-1) y de los receptores tipo Toll 2 y 4 (TLR2 y TLR4) por RT-PCR en tiempo real como *ii*) la producción de las citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6 e IL-18) por RT-PCR en tiempo real y por ELISA.

En las CMSP se observó que las NP de sílice de ambos tamaños inducen la producción de IL-1 β e IL-6, así como la expresión de los componentes del inflamasoma NLRP3, de manera dosis dependiente. Sin embargo dichas NP no inducen la producción detectable de IL-18 en esas células. En contraste, en los neutrófilos se encontró que sólo las NP de 200nm indujeron producción de IL-6. Aunque en estas células se evidenció la expresión de los componentes del inflamasoma NLRP3, no se evidenció la producción de IL-1 β o IL-18. En conclusión, los resultados encontrados observados en el presente estudio muestran que las NP de sílice inducen la producción de citoquinas pro-inflamatorias de una manera

dosis dependiente y dicha producción depende del modelo celular, pero no del tamaño de la NP. En el caso de la IL-1 β , según los resultados observados, depende de la activación del inflamasoma NLRP3.

Adicionalmente, con el objetivo de fortalecer la formación y recopilar información científica se realizó una revisión de literatura en la revista IATREIA -Efecto inmunomodulador de nanopartículas usadas en nanomedicina- 2016 Oct-Dic;29(4):445-457. DOI 10.17533/udea.iatreia.v29n4a06 en la cual se discuten los hallazgos más recientes sobre las NP y el sistema inmune.

Este trabajo concluye con la propuesta de un modelo que pretende explicar los efectos de las NP de sílice sobre los componentes de los inflamasomas, a partir de los resultados obtenidos en este estudio y con aportes recientes de la literatura.

Finalmente, se presenta material suplementario en el que se incluye la estandarización de las técnicas y condiciones de los experimentos realizados y algunos resultados adicionales.

INTRODUCCIÓN

1. NANOBIOTECNOLOGÍA Y NANOMEDICINA

La nanotecnología es una disciplina extensa y heterogénea de la tecnología en la que se diseñan, fabrican, caracterizan, y aplican estructuras, componentes y sistemas a nivel de la escala de los nanómetros manteniendo un control sobre su tamaño y forma (1–3). A su vez, la nanobiotecnología es la rama de la nanotecnología que combina la ingeniería molecular con la biología, las reglas de la química, la física y la genética con el fin de fabricar estructuras sintéticas a escala nanométrica. La nanobiotecnología estudia además las interacciones entre los sistemas nanométricos y los sistemas biológicos (4–6).

La aplicación de la nanobiotecnología para el tratamiento de enfermedades, diagnóstico, monitoreo y control de sistemas biológicos ha sido recientemente referido como Nanomedicina, por el Instituto Nacional de Salud de EE.UU. (7). Esta es un área interdisciplinaria de la investigación en ciencias básicas, ingeniería y medicina que ofrecerá nuevas innovaciones y aplicaciones (5,8). Algunos de los desarrollos más importantes de la nanomedicina y que son objeto de estudio incluyen: sistemas de diagnóstico en la detección precoz de enfermedades (9); recubrimientos y nanocompuestos para mejorar la bioactividad y biocompatibilidad de los implantes; aditivos para mejorar la solubilidad y biodisponibilidad de fármacos poco solubles (10); desarrollo de nueva generación de materiales en el ámbito de la ingeniería tisular y de los materiales biomiméticos (11); diseño de nuevos sistemas de encapsulación, transporte y administración dirigida y controlada de fármacos y genes a tejidos o células específicas (12,13); adyuvantes para

vacunas (10); diseño y fabricación de nanoobjetos que pueden detectar e introducirse al interior de células cancerosas para su tratamiento (14–16).

Hasta la fecha, se han estudiado y diseñado diversos tipos de nanoobjetos para su uso en nanomedicina: nanopartículas poliméricas, metálicas y a base de lípidos, nanocápsulas, dendrímeros, liposomas, micelas y Quantum Dots (2,13,17). Estos objetos de tamaño nanométrico (por lo menos una de sus dimensiones se encuentra entre 1 y 100nm) asumen nuevas propiedades y funciones que difieren marcadamente de un objeto del mismo material en una escala mayor y tienen la habilidad de interactuar con los sistemas celulares más complejos (17,18).

1.1. NANOPARTÍCULAS

Las NP son especialmente atractivas para la construcción de estructuras de alto rendimiento, debido a sus propiedades físicas y químicas únicas. Muchas de estas propiedades pueden ser cambiadas sin alterar la composición del material, sino simplemente cambiando su tamaño, forma o funcionalizando su superficie. Los avances en la manipulación de las condiciones de síntesis han permitido adaptar las propiedades de las NP para el control racional de su morfología, así como su estabilidad en función del tiempo, de acuerdo con su uso específico (19–22). Las NP pueden imitar los procesos biológicos, por lo que su uso en la medicina podría dar solución a los problemas asociados con la solubilidad, inmunocompatibilidad, citotoxicidad y biodisponibilidad (11). Son una de las más prometedoras candidatas para el suministro de fármacos a través de la barrera hematoencefálica, para aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico del sistema nervioso

central como el Alzheimer (16,23,24). Pueden ser especialmente útiles también para el tratamiento de tumores diseminados. Los medicamentos que han sido transportados con éxito hasta el sistema nervioso central, usando NP como vehículo incluyen la dalargina hexapéptido, el dipéptido kytorfina, loperamida, tubocurarina, el MRZ 2/576, antagonista del receptor de NMDA, y la doxorubicina (24).

Usando células madre como transportadores celulares es posible cargar drogas específicas a los tumores cerebrales, por ejemplo, para el tratamiento del glioma, logrando además proteger el agente terapéutico y permitiendo su liberación controlada (25).

Nanopartículas de Sílice

Estudios recientes sugieren un gran potencial para las NP de sílice, ya que pueden ser usadas como nuevos instrumentos en el campo biotecnológico y biomédico. Las inusuales propiedades fisicoquímicas y biológicas de estas NP pueden ser atribuidas a su gran área superficial, distribución de tamaño, cristalinidad, propiedades de superficie, propiedades electrónicas, solubilidad, agregación y forma (26,27). Además presentan alta estabilidad química y térmica; son poco apetecidas por microorganismos y pueden actuar como una barrera, limitando el efecto del ambiente exterior en el núcleo de la partícula (28). Debido a la estabilización electrostática, la superficie de la sílice promueve su dispersión en solución acuosa, lo que lo hace adecuado para realizar bioensayos (27). De ahí que tengan el potencial para ser usadas como nuevos dispositivos biomédicos en aplicaciones tales como: matrices para entrega controlada de drogas/genes, biosensores, imagen para diagnóstico e ingeniería de tejidos (26). Se han usado también como sensores para ensayos simultáneos de niveles de glucosa, L-glutamato e hipoxantina en el cuerpo estriado de ratas, como biomarcador en la identificación de células de leucemia mediante la obtención de imágenes

por microscopía óptica, diagnóstico y tratamiento de cáncer e inmovilización de enzimas (29). Se ha reportado que la sílice es capaz de guardar y entregar gradualmente drogas terapéuticamente relevantes como antibióticos y otros (27). Es usada además para intensificar la biocompatibilidad de varios sistemas de entrega de fármacos como NP magnéticas, biopolímeros y micelas (27).

Nanopartículas de sílice dopadas con óxido de gadolinio y conjugados con ADN mostraron mayor eficacia de transfección *in vitro*, en comparación con el Polyfect (Quiagen) en células COS-7 y células 293T (12). Esto muestra que las NP de sílice con su superficie modificada son capaces de facilitar la transferencia de ADN plasmídico en células de mamífero *in vitro*. Teniendo en cuenta tanto la inercia química como la biocompatibilidad de la sílice, estas NP podrían proporcionar una nueva plataforma para la entrega de genes no virales, así como un agente de contraste en imágenes de resonancia magnética (12).

2. SISTEMA INMUNE INNATO

El sistema inmune, constituido por componentes celulares y solubles, protege al organismo de agentes o sustancias posiblemente nocivas. La primera línea de defensa de un organismo es la respuesta inmune innata, que comprende células y mecanismos que actúan de forma no específica. La activación de la inmunidad innata depende de receptores de reconocimiento de patrones (PRR, del inglés *pattern recognition receptors*) que reconocen patrones moleculares conservados como los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, del inglés *pathogen-associated molecular patterns*) o señales de peligro (DAMP, del inglés *danger/damage-associated molecular patterns*) (30,31).

La activación de estos receptores promueve la respuesta inflamatoria a través de la producción de citoquinas y otros mediadores. Los PRR mejor caracterizados son los TLR (del inglés Toll-like receptors), de los cuales se han descrito 10 en humanos (TLR1 a TLR10), y los receptores tipo NOD (NLR), que incluyen los NLRP (del inglés nucleotide binding oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin domain containing protein) y los NLRC (del inglés nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and CARD domain containing protein) (32,33).

2.1. INFLAMASOMA NLRP3

Los NLR son receptores citosólicos que regulan la inflamación (proceso fisiológico del sistema inmune para el control de las infecciones) y la apoptosis. Molecularmente tienen tres dominios en la región amino-terminal: un dominio de reclutamiento y activación de caspasas (CARD, del inglés *caspase activation and recruitment domain*), un dominio pyrin (PYD), y un dominio IAP (del inglés *inhibitor of apoptosis domain*) de baculovirus (BIR, del inglés *baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat*), responsables de mediar la transducción de la señal y la activación de caspasas inflamatorias, a través del inflamasoma. En la región central tienen un dominio de unión a nucleótidos (NOD), responsable de la oligomerización; y en la región carboxi-terminal, una secuencia repetitiva rica en leucinas (LRR, *leucine rich region*), que es la que se une a ligandos específicos (32–34).

Los inflamasomas son plataformas de señalización multiproteícos que controlan la respuesta inflamatoria. Se agrupan mediante PRR tras la detección de microorganismos patógenos y señales de peligro en el citosol de las células hospederas y así activan caspasas

inflamatorias para producir citoquinas e inducir la muerte de células por piroptosis (32,34). Uno de los mejor caracterizados es el inflamasoma NLRP3, que contienen la proteína NLRP3. Es un miembro de la familia de los NLR y contiene un PYD, un dominio NACHT central y un dominio LRR. El LRR expone el dominio NACHT por agregación homotípica, desencadenando una cascada que conduce a la formación del complejo NLRP3 / ASC / Pro-Caspasa-1. La Pro-Caspasa-1 en el complejo se autocliva espontáneamente, para producir Caspasa-1 activa, responsable de escindir pro-IL-1 β y pro-IL-18 en sus formas maduras (32,34–36).

La activación del inflamasoma es un proceso altamente controlado e implica dos señales específicas. En primer lugar, los PAMP tales como el LPS estimulan los TLR, desencadenando la expresión de pro-IL-1 β , pro-IL-18 y NLRP3. A continuación, una segunda señal es la implicada de activar la Caspasa-1 que finalmente procesa la pro-IL-1 β y pro-IL-18 dando origen a las formas maduras. Esta segunda señal, que activa la formación del complejo del inflamasoma, es desencadenada por un grupo de PAMP o DAMP (endógenos o exógenos) no relacionados entre sí, química y biológicamente, tales como el ATP, los cristales de urato monosódico, la irradiación UVB y los contaminantes ambientales, sílice y amianto (37–40).

2.2. INMUNOMODULACIÓN

Inmunoestimulación

Cuando un compuesto o material se introduce en el cuerpo, el sistema inmunitario lo reconoce como extraño y puede provocar una respuesta inmune multi-nivel. Cuando esto

ocurre, la actividad de uno o más componentes de los complejos inmunorreguladores es directamente potenciada, y se observan efectos inmunoestimulantes tales como hipersensibilidad (41). La estructura molecular, la arquitectura de los motivos de plegamiento, los productos de degradación, la formulación, la pureza del empaque y la estabilidad de los productos farmacéuticos son factores responsables de inmunoestimulación (42). Además, factores tales como la dosis, la vía y el tiempo de administración, el mecanismo de acción, y el sitio de la actividad - que son propiedades extrínsecas al material - también son críticos en la inmunoestimulación (13,43). Como parte de la inmunoestimulación, las nanopartículas han mostrado propiedades adyuvantes. Los adyuvantes son sustancias que potencian la respuesta inmunitaria del cuerpo a un antígeno. En el contexto del cáncer, los productos farmacéuticos se consideran adyuvantes cuando, por la estimulación del sistema inmune, suprimen la formación de tumores secundarios después del tratamiento (13).

Inmunosupresión

Se describe como la regulación negativa o la prevención de la activación del sistema inmune. Aunque la inmunosupresión tiene sus inconvenientes, tales como el aumento de la susceptibilidad a las infecciones causadas por bacterias, virus, hongos y levadura(13), así como el desarrollo de neoplasias (44), también es deseable en algunos casos, por ejemplo para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y para la aceptación de tejidos extraños en pacientes con trasplante de órganos. Al igual que con la inmunoestimulación, factores tales como la dosis, la vía y el tiempo de administración, el mecanismo de acción, y el sitio de la actividad afectarán la respuesta del cuerpo a un inmunosupresor (43).

2.3. NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE E INMUNOMODULACIÓN

Aunque la sílice es generalmente considerada como un material no citotóxico, es bien conocido que como nanomaterial puede tener cambios en sus propiedades fisicoquímicas inherentes como tamaño, forma, características de la superficie, capacidad de adsorción, hidrofobicidad y actividad catalítica, lo que puede llevar a la evocación de efectos deletéreos sobre las funciones celulares *in vivo* e *in vitro* (29,45–49). Esto incluye efectos en el crecimiento celular, la apoptosis, la adhesión y la migración celular, contribuyendo a la toxicidad de las NP en sistemas vivos (26,47–50), así como al medio ambiente con el cual entra en contacto (13). Además, la ruta de entrega de un nanomaterial en el cuerpo ya sea por vía oral o intravenosa, induce diferentes reacciones inmunes (51,52).

Lee y colaboradores (26) estudiaron la influencia de las NP de sílice en la respuesta inflamatoria y la apoptosis, y definieron los mecanismos de acción y las condiciones estructurales de los poros de NP de sílice tanto *in vitro* como *in vivo*, comparando nanopartículas de sílice mesoporosas y coloidales. Sus resultados mostraron que las NP mesoporosas inducen menor expresión de citoquinas proinflamatorias como factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleuquina 1beta (IL-1 β) e interleuquina 6 (IL-6) en macrófagos que las nanopartículas coloidales. Sin embargo en un estudio posterior (53), examinaron las diferencias en la toxicidad y los cambios histológicos, en una población de linfocitos, y los niveles séricos de IgG/IgM, en ratones femeninos de la cepa BALB/c, entre los tratados con NP de sílice mesoporosas y cristalinas, encontrando mayor citotoxicidad en las nanopartículas mesoporosas. Hirai y colaboradores (54) mostraron que las NP amorfas de sílice con diámetros de 70 y 100 nm, aumentaban la entrada de antígeno exógeno desde el endosoma al citoplasma e inducían presentación cruzada en células dendríticas murinas;

por el contrario, las partículas de tamaño submicrónico de sílice (> 100 nm) no tenían el mismo efecto.

Diferentes autores han estudiado el potencial efecto citotóxico, *in vitro*, de las NP de sílice con especial atención en la inducción de estrés oxidativo, como mecanismo de toxicidad. Así, Park y colaboradores (55) estudiaron la inducción de estrés oxidativo de las NP de sílice porosas y NP *fumed* (partículas amorfas de baja densidad), usando células humanas de epitelio bronquial (BEAS-2B) mediante evaluación de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la inducción de enzimas antioxidantes, tales como la superóxido dismutasa y el grupo hemo oxigenasa-1. Encontró que ambas NP inducían citotoxicidad ejercida por estrés oxidativo, siendo más sensibles las células expuestas a nanopartículas porosas, que a las NP *fumed*. Posteriormente, Passagne y colaboradores (56) estudiaron las vías moleculares involucradas en la citotoxicidad y el estrés oxidativo inducido por NP de sílice, en dos líneas celulares de epitelio tubular proximal renal humano (HK-2) y porcino (LLC-PK1). Los autores mostraron que existía una dependencia de tiempo y tamaño; es decir, había un aumento en la citotoxicidad con las nanopartículas de tamaño más pequeño (20nm). Otro estudio mostró que las partículas de sílice no cristalina de tamaño nano y submicrónico pueden desencadenar la liberación de IL-1 β en la línea celular RAW264.7 (macrófagos murinos) pre-activada con LPS, a través de mecanismos similares a los de las NP de sílice cristalina (cuarzo), que implican la captación de la NP, fuga del fagosoma y activación del inflamasoma NLRP3. Este estudio muestra también que la producción de IL-1 β inducida por la sílice no depende únicamente del área superficial de las nanopartículas, sino también de factores como la reactividad de la partícula o el mecanismo de captación de ésta (57).

Varios estudios han reportado además que las partículas no cristalinas de sílice pueden inducir activación del inflammasoma NLRP3, dependiendo del tamaño de la partícula y el tipo de células evaluadas (58). Recientemente se demostró que las partículas de sílice con diámetros entre 15 y 1000 nm, inducen una alta producción de IL-1 β , en macrófagos humanos diferenciados a partir de la línea celular THP-1. Además se ha reportado que la producción de IL-1 β inducida por partículas de sílice depende de la producción de ROS, ruptura del endosoma, la posterior activación del inflammasoma NLRP3 y escisión de caspasa-1 (59,60).

Peeters y colaboradores demostraron la activación del inflammasoma NLRP3 en células primarias humanas derivadas del epitelio bronquial y en la línea celular de epitelio bronquial BEAS-2B, expuestas a dosis tóxicas de sílice cristalina. Interesantemente, dicha estimulación también induce la liberación de las alarminas no convencionales HMGB1 y bFGF, importantes para la potenciación de la respuesta inflamatoria sistémica (46).

A pesar del creciente interés de los nanomateriales y sus aplicaciones en la biomedicina, son limitados los estudios en células humanas primarias, las cuales representan el modelo más aproximado al comportamiento *in vivo* de los materiales exógenos, para uso en humanos. Por lo anterior, en el presente trabajo se evaluó el efecto de las NP de sílice en la activación del inflammasoma NLRP3 y la producción de citoquinas por neutrófilos y células mononucleares de sangre periférica.

REFERENCIAS

1. Roco MC. Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. *Curr Opin Biotechnol.* 2003;14(3):337–46.
2. Bawarski WE, Chidlowsky E, Bharali DJ, Mousa SA. Emerging nanopharmaceuticals. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med.* 2008;4(4):273–82.
3. Sainz V, Coniot J, Matos AI, Peres C, Zupančič E, Moura L, et al. Regulatory aspects on nanomedicines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;468(3):504–10.
4. Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Nanomedicine: current status and future prospects. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2005;19(3):311–30.
5. Wang M, Thanou M. Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacol Res.* 2010;62(2):90–9.
6. Chang EH, Harford JB, Eaton MAW, Boisseau PM, Dube A, Hayashi R, et al. Nanomedicine: Past, present and future - A global perspective. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;468(3):511–7.
7. Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev.* 2001;53(2):283–318.
8. Misra R, Acharya S, Sahoo SK. Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy. *Drug Discov Today.* 2010;15(19–20):842–50.
9. Gao X, Chen J, Chen J, Wu B, Chen H, Jiang X. Quantum dots bearing lectin-functionalized nanoparticles as a platform for in vivo brain imaging. *Bioconjug Chem.* 2008;19(11):2189–95.
10. Moddarese M, Brown MB, Zhao Y, Tamburic S, Jones SA. The role of vehicle-nanoparticle interactions in topical drug delivery. *Int J Pharm.* 2010;400(1–2):176–82.

11. GOLDBERG M, LANGER R, JIA X. Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2007;18(3):241–68.
12. Bhakta G, Sharma RK, Gupta N, Cool S, Nurcombe V, Maitra A. Multifunctional silica nanoparticles with potentials of imaging and gene delivery. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med.* 2011;7(4):472–9.
13. Naahidi S, Jafari M, Edalat F, Raymond K, Khademhosseini A, Chen P. Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. *J Controlled Release.* 2013;166(2):182–94.
14. Parveen S, Sahoo SK. Polymeric nanoparticles for cancer therapy. *J Drug Target.* 2008;16(2):108–23.
15. Rosenholm JM, Sahlgren C, Lindén M. Multifunctional mesoporous silica nanoparticles for combined therapeutic, diagnostic and targeted action in cancer treatment. *Curr Drug Targets.* 2011;12(8):1166–86.
16. Patel T, Zhou J, Piepmeier JM, Saltzman WM. Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery to the Central Nervous System. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64(7):701–5.
17. Singh R, Lillard JW. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp Mol Pathol.* 2009;86(3):215–23.
18. Thakkar KN, Mhatre SS, Parikh RY. Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med.* 2010;6(2):257–62.
19. Daniel M-C, Astruc D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chem Rev.* 2004;104(1):293–346.

20. Rahman IA, Padavettan V. Synthesis of Silica Nanoparticles by Sol-Gel: Size-Dependent Properties, Surface Modification, and Applications in Silica-Polymer Nanocomposites—A Review. *J Nanomater.* 2012;2012:e132424.
21. Reverchon E, Adami R. Nanomaterials and supercritical fluids. *J Supercrit Fluids.* 2006;37(1):1–22.
22. Silva GA. Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. *Surg Neurol.* 2004;61(3):216–20.
23. Roney C, Kulkarni P, Arora V, Antich P, Bonte F, Wu A, et al. Targeted nanoparticles for drug delivery through the blood-brain barrier for Alzheimer's disease. *J Control Release Off J Control Release Soc.* 2005;108(2–3):193–214.
24. Kreuter J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv Drug Deliv Rev. de;*47(1):65–81.
25. Roger M, Clavreul A, Venier-Julienne M-C, Passirani C, Montero-Menei C, Menei P. The potential of combinations of drug-loaded nanoparticle systems and adult stem cells for glioma therapy. *Biomaterials.* 2011;32(8):2106–16.
26. Lee S, Yun H-S, Kim S-H. The comparative effects of mesoporous silica nanoparticles and colloidal silica on inflammation and apoptosis. *Biomaterials.* 2011;32(35):9434–43.
27. Slowing II, Vivero-Escoto JL, Wu C-W, Lin VS-Y. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;60(11):1278–88.
28. Carturan G, Toso RD, Boninsegna S, Monte RD. Encapsulation of functional cells by sol-gel silica: actual progress and perspectives for cell therapy. *J Mater Chem.* 2004;14(14):2087–98.

29. Lin W, Huang Y, Zhou X-D, Ma Y. In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006;217(3):252–9.
30. Jiao Q, Li L, Mu Q, Zhang Q, Jiao Q, Li L, et al. Immunomodulation of Nanoparticles in Nanomedicine Applications. *BioMed Res Int*. 2014:e426028.
31. Luo Y-H, Chang LW, Lin P, Luo Y-H, Chang LW, Lin P. Metal-Based Nanoparticles and the Immune System: Activation, Inflammation, and Potential Applications *BioMed Res Int*. 2015:e143720.
32. Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(7):407–20.
33. Hernández JC, Inchima SU. Activación y regulación del inflammasoma NLRP3 en las enfermedades infecciosas. *Iatreia*. 2012;25(4):380–90.
34. Guo H, Callaway JB, Ting JP-Y. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med*. 2015;21(7):677–87.
35. Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and Functions of Inflammasomes. *Cell*. 2014;157(5):1013–22.
36. He Y, Hara H, Núñez G. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2016 [citado el 14 de noviembre de 2016];0(0). Disponible en: [http://www.cell.com/trends/biochemical-sciences/abstract/S0968-0004\(16\)30148-7](http://www.cell.com/trends/biochemical-sciences/abstract/S0968-0004(16)30148-7)
37. Hari A, Zhang Y, Tu Z, Detampel P, Stenner M, Ganguly A, et al. Activation of NLRP3 inflammasome by crystalline structures via cell surface contact. *Sci Rep*. 2014;4:7281.

38. Dostert C, Pétrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J. Innate Immune Activation Through Nalp3 Inflammasome Sensing of Asbestos and Silica. *Science*. 2008;320(5876):674–7.
39. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, et al. Silica crystals and aluminum salts mediate NALP-3 inflammasome activation via phagosomal destabilization. *Nat Immunol*. 2008;9(8):847–56.
40. Goncalves DM, de Liz R, Girard D. Activation of Neutrophils by Nanoparticles. *ScientificWorldJournal*. 2011;11:1877–85.
41. Descotes J. Importance of immunotoxicity in safety assessment: a medical toxicologist's perspective. *Toxicol Lett*. 2004;149(1–3):103–8.
42. Chamberlain P, Mire-Sluis AR. An overview of scientific and regulatory issues for the immunogenicity of biological products. *Dev Biol*. 2003;112:3–11.
43. Říhová B. Biocompatibility and immunocompatibility of water-soluble polymers based on HPMMA. *Compos Part B Eng*. 2007;38(3):386–97.
44. Vial T, Descotes J. Immunosuppressive drugs and cancer. *Toxicology*. 2003;185(3):229–40.
45. Jin Y, Kannan S, Wu M, Zhao JX. Toxicity of luminescent silica nanoparticles to living cells. *Chem Res Toxicol*. 2007;20(8):1126–33.
46. Vivero-Escoto JL, Slowing II, Lin VS-Y. Tuning the cellular uptake and cytotoxicity properties of oligonucleotide intercalator-functionalized mesoporous silica nanoparticles with human cervical cancer cells HeLa. *Biomaterials*. 2010;31(6):1325–33.
47. Chung T-H, Wu S-H, Yao M, Lu C-W, Lin Y-S, Hung Y, et al. The effect of surface charge on the uptake and biological function of mesoporous silica nanoparticles in 3T3-L1 cells and human mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2007;28(19):2959–66.

48. Trewyn BG, Nieweg JA, Zhao Y, Lin VS-Y. Biocompatible mesoporous silica nanoparticles with different morphologies for animal cell membrane penetration. *Chem Eng J*. 2008;137(1):23–9.
49. Huang X, Teng X, Chen D, Tang F, He J. The effect of the shape of mesoporous silica nanoparticles on cellular uptake and cell function. *Biomaterials*. 2010;31(3):438–48.
50. Dobrovolskaia MA. Pre-clinical immunotoxicity studies of nanotechnology-formulated drugs: Challenges, considerations and strategy. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 2015;220(Pt B):571–83.
51. Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nat Nanotechnol*. 2007;2(8):469–78.
52. Dobrovolskaia MA, Shurin M, Shvedova AA. Current understanding of interactions between nanoparticles and the immune system. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2016;299:78–89.
53. Lee S, Kim M-S, Lee D, Kwon TK, Khang D, Yun H-S, et al. The comparative immunotoxicity of mesoporous silica nanoparticles and colloidal silica nanoparticles in mice. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:147–58.
54. Hirai T, Yoshioka Y, Takahashi H, Ichihashi K, Yoshida T, Tochigi S, et al. Amorphous silica nanoparticles enhance cross-presentation in murine dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;427(3):553–6.
55. Park E-J, Park K. Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles in vivo and in vitro. *Toxicol Lett*. 2009;184(1):18–25.
56. Passagne I, Morille M, Rousset M, Pujalté I, L'azou B. Implication of oxidative stress in size-dependent toxicity of silica nanoparticles in kidney cells. *Toxicology*. 2012;299(2–3):112–24.

57. Sandberg WJ, Låg M, Holme JA, Friede B, Gualtieri M, Kruszewski M, et al. Comparison of non-crystalline silica nanoparticles in IL-1 β release from macrophages. Part Fibre Toxicol. 2012;9:32.
58. Yue H, Wei W, Yue Z, Lv P, Wang L, Ma G, et al. Particle size affects the cellular response in macrophages. Eur J Pharm Sci. 2010;41(5):650–7.
59. Morishige T, Yoshioka Y, Inakura H, Tanabe A, Yao X, Narimatsu S, et al. The effect of surface modification of amorphous silica particles on NLRP3 inflammasome mediated IL-1 β production, ROS production and endosomal rupture. Biomaterials. 2010;31(26):6833–42.
60. Yazdi AS, Guarda G, Riteau N, Drexler SK, Tardivel A, Couillin I, et al. Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1 α and IL-1 β . Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(45):19449–54.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto inmunomodulador de las nanopartículas de sílice en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias e Inflamasoma, en cultivos de células humanas primarias.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cuantificar el nivel de expresión del mRNA de los componentes del inflamasoma NLRP3 (NLRP3, ASC, Caspasa-1), de los receptores tipo Toll 2 y 4 (TLR2 y TLR4), y de las citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL6 e IL-18) por RT-PCR en tiempo real, en neutrófilos y células mononucleares de sangre periférica de donantes sanos, estimuladas in vitro con nanopartículas de sílice.
- Cuantificar la producción de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β , IL-18 e IL-6, en sobrenadantes de neutrófilos y células mononucleares de sangre periférica de donantes sanos, estimuladas in vitro con nanopartículas de sílice.

HIPÓTESIS

Las características físico-químicas de las nanopartículas de sílice promueven la activación de los receptores de la inmunidad innata, incluyendo los receptores tipo Toll y los componentes del Inflamasoma NLRP3, de monocitos y neutrófilos, favoreciendo la activación de una respuesta inflamatoria evidenciada por la producción de citoquinas pro-inflamatorias.

CAPÍTULO 1

ARTÍCULO DE REVISIÓN: Efecto inmunomodulador de Nanopartículas usadas en Nanomedicina. IATREIA 2016; 29(4):445-57.

Efecto inmunomodulador de nanopartículas usadas en nanomedicina

Diana Maryory Gómez-Gallego¹, Silvio Urcuqui-Inchima², Juan Carlos Hernández¹

RESUMEN

Las nanopartículas (NP) son estructuras con tamaño en la escala nanométrica (1×10^{-9} m). Por sus características, en los últimos años ha crecido su potencial para usarlas en los campos biotecnológico y biomédico en una amplia gama de aplicaciones, tales como el diagnóstico, la terapia y la medicina regenerativa.

El sistema inmunológico es el responsable de la defensa del cuerpo ante organismos patógenos y otros agentes extraños, como las NP, que pueden ser reconocidas por dicho sistema, interactuar con él y modular su función induciendo efectos inmunosupresores o inmunoestimuladores. Las primeras se podrían utilizar como agentes terapéuticos antiinflamatorios o para tratar las enfermedades autoinmunes, y las que activan el sistema inmune, como adyuvantes en vacunación o potenciadores de la respuesta inmune en cáncer y otras enfermedades humanas. Sin embargo, su uso en nanomedicina debe estar sujeto a ensayos previos que determinen su efecto en la respuesta inmune antes de aplicarlas a los sistemas biológicos. Por esta razón es importante conocer su composición, tamaño y características superficiales, entre otras propiedades fisicoquímicas, directamente implicadas en los efectos sobre el sistema inmune. Se presenta una visión general de la relación entre las propiedades fisicoquímicas de las NP candidatas para ser usadas en los campos biomédico y biotecnológico y su actividad inmunomoduladora.

PALABRAS CLAVE

Inmunomodulación; Nanomedicina; Nanopartículas

SUMMARY

Immunomodulating effect of nanoparticles used in nanomedicine

Nanoparticles (NP) are structures with a size on the nanometer scale (1×10^{-9} m). Due to their characteristics, their potential use in the fields of biotechnology and biomedicine has grown in

¹ Infettare, Facultad de Medicina, Universidad Cooperativa de Colombia, Medellín, Colombia.

² Grupo Inmunovirología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Correspondencia: Juan Carlos Hernández; juankhernandez@gmail.com

Recibido: enero 27 de 2016

Aceptado: marzo 02 de 2016

Cómo citar: Gómez-Gallego DM, Urcuqui-Inchima S, Hernández JC. Efecto inmunomodulador de nanopartículas usadas en nanomedicina. *Iatreia*. 2016 Oct-Dic;29(4):445-457. DOI 10.17533/udea.iatreia.v29n4a06.

recent years with a wide range of applications, such as diagnosis, therapy and regenerative medicine.

The immune system is responsible for defending the body against pathogenic organisms and other foreign agents, such as NP, which can be recognized by such system, interact with it and modulate its function inducing immunostimulatory or immunosuppressive effects. The latter could be used as anti-inflammatory therapeutic agents or to treat autoimmune diseases, and those that activate the immune system, as adjuvants in vaccination or enhancers of the immune response in cancer and other human diseases. However, their use in nanomedicine should be submitted to preliminary tests to determine their effects on the immune response before being applied to biological systems. For this reason it is important to know their composition, size and surface characteristics, as well as other physicochemical properties, directly involved in the effects on the immune system. We present an overview about the relationship between the physicochemical characteristics of NP candidates to be used in the biomedical and biotechnological fields and their immunomodulatory activity.

KEY WORDS

Immunomodulation; Nanomedicine; Nanoparticles

RESUMO

Efeito imunomodulador de nanopartículas usadas na nanomedicina

As nanopartículas (NP) são estruturas com um tamanho na escala nanométrica (1×10^{-9} m). Por suas características, nos últimos anos há crescido seu potencial para ser usadas no campo biotecnológico e biomédico em uma ampla gama de aplicações, tais como o diagnóstico, a terapia e a medicina regenerativa.

O sistema imunológico é o responsável da defesa do corpo ante organismos patógenos e outros agentes estranhos, como as NP, que podem ser reconhecidas pelo sistema imunológico, interatuar com ele e modular sua função induzindo um efeito imunossupressor ou imunostimulador. As NP com efeitos imunossupressores poderiam ser utilizadas como agentes terapêuticos anti-inflamatórios ou para tratar as doenças autoimunes e as NP que ativam o sistema

imune, como adjuvantes em vacinação ou potenciadores da resposta imune no câncer e outras patologias humanas. Porém, seu uso na nanomedicina deve estar sujeito a ensaios prévios que determinem seu efeito na resposta imune antes de ser aplicadas aos sistemas biológicos. Por esta razão é importante conhecer seu composição, tamanho e características da superfície, entre outras propriedades físico-químicas, diretamente implicadas nos efeitos sobre o sistema imune. Aqui recopilamos uma visão geral da relação entre as propriedades físico-químicas das NP candidatas para ser usadas no campo biomédico e biotecnológico e sua atividade imunomoduladora.

PALAVRAS CHAVE

Imunomodulação; Nanomedicina; Nanopartículas

INTRODUCCIÓN

La nanotecnología es una disciplina extensa y heterogénea en la que se diseñan, fabrican, caracterizan y aplican estructuras en la escala nanométrica. Lo interesante es que las propiedades de las nanopartículas (NP) se pueden manipular, para modificar su tamaño o forma sin afectar su composición química (1-5).

Las NP tienen propiedades físicas y químicas únicas como su pequeño tamaño, gran área superficial, alta relación de aspecto, o sea, la proporción entre su ancho y su altura, lo que permite que tengan gran potencial para diferentes aplicaciones biomédicas (1,2). La nanomedicina es la aplicación de la nanotecnología para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades, y para el monitoreo y control de sistemas biológicos, un área interdisciplinaria de la investigación en ciencias básicas, ingeniería y medicina (2,4,6,7).

Entre los desarrollos más importantes de la nanomedicina se encuentran sistemas de diagnóstico para la detección temprana de enfermedades (8-10), recubrimientos para mejorar la biocompatibilidad de implantes o prótesis, aditivos para mejorar la solubilidad y biodisponibilidad de fármacos (11,12), materiales para ingeniería tisular, medicina regenerativa y biomiméticos (13-15), sistemas de encapsulación, transporte y administración dirigida y controlada de fármacos y genes a tejidos o células específicas (6,9,11-13,15,16), adyuvantes para vacunas (11) y terapias antitumorales (7,17), entre otras.

Hasta la fecha se han diseñado y estudiado diversos tipos de NP, tanto orgánicas como inorgánicas, para uso en nanomedicina: NP poliméricas, cerámicas, metálicas, lipídicas, a base de carbono, nanocápsulas, dendrímeros, liposomas, micelas, *Quantum Dots*, políplexos, entre otros (2,12,18) (figura 1). Estas NP asumen nuevas propiedades y funciones que

difieren marcadamente de un objeto del mismo material en una escala mayor, y son precisamente esas propiedades las que les dan la posibilidad de atravesar las barreras biológicas y llegar hasta diferentes células y tejidos, permitiéndoles interactuar con los sistemas celulares e incluso imitar los procesos biológicos (3,18).

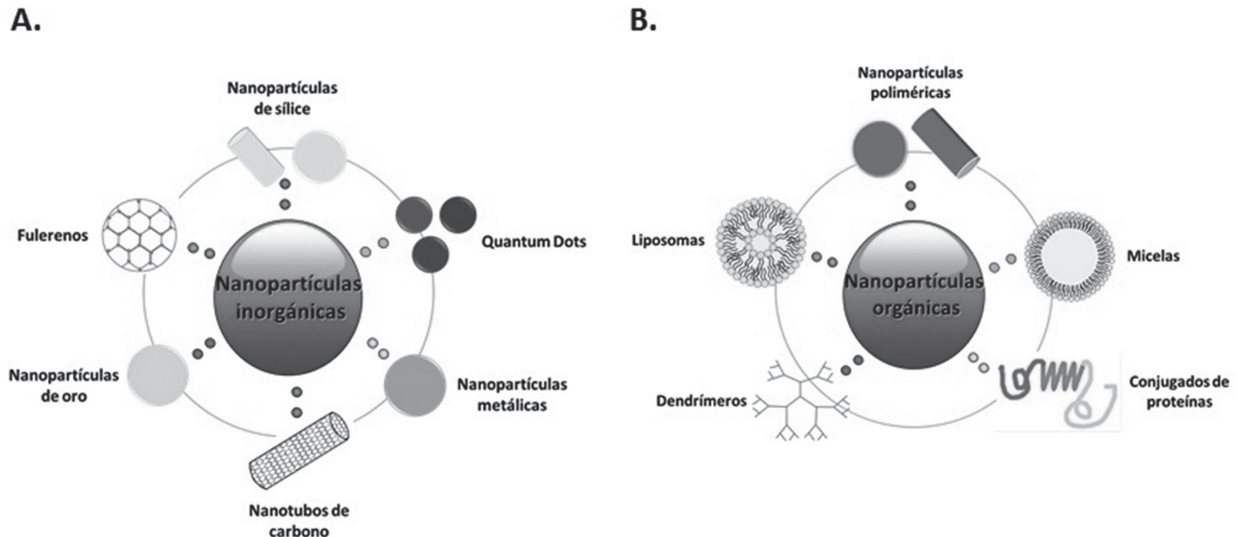


Figura 1. Nanopartículas usadas en nanomedicina. Las NP se clasifican según su composición química en los siguientes dos grupos: A. Nanopartículas inorgánicas como las de silice, los *Quantum Dots*, las metálicas, los nanotubos de carbono, las de oro y los fulerenos. B. Nanopartículas orgánicas como los liposomas, las micelas, los dendrímeros, los conjugados de proteínas y las poliméricas

Es así como el uso de diferentes NP para el desarrollo de nuevas aplicaciones biomédicas va cada día en aumento. Sin embargo, los efectos perjudiciales en la salud humana y en especial los relacionados con la respuesta inmune resaltan la necesidad de estudios de seguridad e inmunomodulación previos a su implementación comercial. En esta revisión se discute la actividad inmunomoduladora de diferentes NP utilizadas en nanomedicina, según sus propiedades fisicoquímicas y los mecanismos subyacentes.

ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA DE DIFERENTES NANOPARTÍCULAS

La diversidad química y estructural de las NP, sumada a la capacidad de llegar a diferentes células y tejidos,

es ventajosa para su uso; sin embargo, esas mismas características y propiedades hacen que, cuando una NP se introduce en el organismo, el sistema inmunitario la reconozca como un agente extraño y se produzca una respuesta inmune (19,20). Además, factores como la dosis y la vía de administración, el mecanismo de acción y el sitio de la actividad -que son propiedades extrínsecas al material- también son críticos en el establecimiento de la respuesta inmune (12,21). Por esta razón, se han reportado múltiples efectos inmunomoduladores mediados por las NP en diferentes componentes de la respuesta inmune (12).

Como parte de la inmunostimulación, las NP han mostrado propiedades adyuvantes (potenciadoras de la respuesta inmune), incluso en el contexto del cáncer, favoreciendo la eliminación de tumores secundarios

refractarios al tratamiento (12). Además, se han descrito múltiples modificaciones a las NP que les confieren efectos específicos sobre la respuesta inmune, pero que no serán consideradas en esta revisión, pues dichos efectos se asocian directamente con estas modificaciones. Por otra parte, la inmunosupresión se describe como la regulación negativa o la prevención de la activación del sistema inmune. Aunque la inmunosupresión

tiene sus inconvenientes, tales como el aumento de la susceptibilidad a las infecciones causadas por microorganismos (12) y el desarrollo de neoplasias (22), también puede ser deseable para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y para la compatibilidad de tejidos en pacientes que reciben trasplantes. A continuación se discuten los efectos inmunomoduladores reportados para las diferentes NP (tabla 1).

Tabla 1. Inmunomodulación *in vivo* de diferentes nanopartículas usadas en nanomedicina

NANOMATERIAL	EFFECTOS EN EL SISTEMA INMUNE	REFERENCIA
Fulerenos		
C60	Aumento de IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12, IFN- γ e IgE	23
NP derivadas de fulerenos	Aumento de la respuesta de linfocitos Th1	24
C60 hidroxilados	Disminución de la respuesta proliferativa de linfocitos T y B, histamina, ROS, enzimas cinasas (Lyn y Syk), TNF- α , IL-1 β y elastasa 2. Aumento de IL-11 y mieloperoxidasa	26-29
Nanotubos de carbono		
Nanotubos de carbono	Aumento de IL-4, IL-5, IL-13, IL-33, IFN- γ , IL-17A, IL-23, TGF- β , PDGF-AA, CCL3, CCL11, eotaxina, IgG1; afluencia de macrófagos, eosinófilos y neutrófilos; producción de colágeno, moco y MMP13	33,34,36-38
	Disminución de la respuesta de linfocitos T. Aumento de IL-10, TNF- α , IL-6, MCP1 y NAD(P)H1 oxidorreductasa	39-42
NP de sílice		
NP amorfas de sílice	Aumento de los niveles de IgE, IgG, sCD40 y citocinas Th2	51-53
NP de sílice no porosas	Aumento de ROS, TNF- α y NO	54
NP de oro		
NP de oro	Inmunogenicidad	61
Dendrímeros		
<i>Pan HLA DR-binding epitope</i> (PADRE)-derivatized-dendrimer (PDD)	Aumento de la inmunidad adaptativa	75
Dendrímeros de poliamidoamina	Disminución de citocinas inducidas por LPS	76
Dendrímeros de poliamidoamina conjugados con heteroglucano	Aumento de la producción de óxido nítrico y generación de ROS. Aumento de los marcadores celulares CD4, CD8, CD19, CMH-II	78

ROS: especies reactivas del oxígeno, por la sigla en inglés de *reactive oxygen species*; PDGF-AA: factor de crecimiento derivado de plaquetas, compuesto de dos cadenas A (-AA), por la sigla en inglés de *platelet derived growth factor*; CCL: ligando de quimiocina; MMP: metaloproteinasas de matriz, por la sigla en inglés de *matrix metalloproteinases*; MCP: proteína quimioatrayente de monocitos, por la sigla en inglés de *monocyte chemotactic protein*; sCD40: CD40 soluble; LPS: lipopolisacárido

Fulerenos de carbono (C60)

Representan la tercera forma molecular más estable del carbono, tras el grafito y el diamante. Los más conocidos son los formados por 60 átomos de carbono (C60). Recientemente ha aumentado su uso en la industria y la biomedicina, debido a sus propiedades fisicoquímicas, por lo que su toxicidad ambiental y en la salud humana ha motivado la investigación (23,24).

Con respecto a sus propiedades inmunomoduladoras, Park y colaboradores (23) demostraron en un modelo murino que C60 induce un aumento en la producción de citocinas proinflamatorias como IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-12 y de citocinas del perfil Th1, como IFN- γ . Estos hallazgos se correlacionaron con la presencia de infiltrado linfocítico en el pulmón. Además, pueden favorecer la maduración de las células dendríticas (DC, por su sigla en inglés) mediante la producción de citocinas, incluyendo IL-12p70, así como el aumento en la expresión de CD80, CD83, CD86 y CMH-II (23). Otros autores han informado un aumento en la supervivencia de los neutrófilos, que se relacionó con una mayor capacidad bactericida luego de la estimulación con C60. Dicho efecto confiere resistencia a *Streptococcus pyogenes* en ratones infectados (25), lo que sugiere su potencial inmunoestimulante.

Sin embargo, otros autores han informado un efecto inmunosupresor de C60. Por ejemplo, se encontró que el tratamiento con él disminuye la hipersensibilidad tipo I, al prevenir la degranulación de mastocitos y basófilos dependiente de IgE (26). En modelos murinos de artritis, se ha informado que C60 suprime la producción de citocinas proinflamatorias, reduciendo la sinovitis y mejorando la sintomatología de la enfermedad (27). La inmunosupresión mediada por C60 no siempre resulta beneficiosa para el individuo. Un estudio publicado en 2009 (28) demostró que su administración intraperitoneal en ratones con melanoma aumenta significativamente el crecimiento del tumor, mediado por la producción de óxido nítrico, así como por una reducción en la respuesta proliferativa de linfocitos T y B. También se ha informado que C60 puede afectar la función de los neutrófilos, disminuyendo la explosión oxidativa, la liberación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET, por la sigla en inglés de *neutrophil extracellular traps*), la expresión de elastasa-2 y la degranulación (29).

Nanotubos de carbono

Los nanotubos de carbono (CNT, por la sigla en inglés de *carbon nano tubes*) son estructuras tubulares en monocapa (*single-walled nanotubes*) que tienen una sola pared cilíndrica, o en multicapa (*multi-walled nanotubes*) que pueden formarse a partir de un conjunto coaxial de CNT en monocapa, o como una sola hoja de grafito dispuesta en forma de rollo. Los CNT tienen propiedades mecánicas, eléctricas, ópticas y térmicas únicas y un enorme potencial para aplicaciones industriales y biomédicas. Sin embargo, su uso es todavía limitado debido a su baja solubilidad, su poca dispersión, su toxicidad y sus efectos secundarios en el sistema inmunológico (30,31), por lo que aún se requieren más estudios para una mejor comprensión de los mecanismos que causan dichos efectos. Diferentes estudios han demostrado que los CNT inducen inmunoestimulación *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, se ha demostrado que la instilación de CNT multicapa causa alteración de la función pulmonar en ratones debido al desarrollo de inflamación asociada a Th2 dependiente de IL-33, aumento de la hiperreactividad de las vías respiratorias, reclutamiento de eosinófilos y células linfoides innatas y producción de citocinas y quimiocinas (32). Además, en ratones provocan un aumento significativo en la expresión del ARNm de citocinas incluyendo IL-4, que se asocia con un aumento en la diferenciación celular esplénica de LT CD4+ y CD8+ (33). También se ha asociado con inflamación pulmonar por infiltración de células, depósito de colágeno, formación de granulomas y una huella inflamatoria marcada por citocinas (IL-33), quimiocinas (CCL3 y CCL11) y producción de la metaloproteína de matriz extracelular-13 (MMP13) (34). En un estudio reciente (35) se presentaron pruebas de la generación de ROS por el sistema NADPH oxidasa en macrófagos expuestos a CNT multicapa, lo que se relacionó con daño lisosomal y producción de IL-1 β . Igualmente, se ha informado que los CNT aumentan la inflamación de las vías respiratorias inducida por alérgenos, caracterizada por un aumento en los niveles de IgG1, afluencia de macrófagos, eosinófilos y neutrófilos, producción de colágeno, TGF- β 1, IL-13, eotaxina y quimiocina regulada y activada del timo (TARC, por la sigla en inglés de *Thymus and activation-regulated chemokine*) de manera dosis dependiente (36,37). Estos efectos se asocian con

un aumento de linfopoyetina estromal tímica, IL-25, IL-33 y factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos en las vías respiratorias. Otro estudio (30) demostró que los CNT multicapa aumentan la secreción basal de citocinas (TNF- α , IL-2, IL-5, IL-6, IL-12/23p40 e IFN- γ) en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de donantes sanos estimuladas con agonistas de los TLR (por la sigla en inglés de *toll-like receptors*) o mitógenos. Sin embargo, inhibieron la respuesta inmune en CMSP de individuos alérgicos. Este trabajo demostró también que los CNT multicapa alteran la capacidad de los monocitos de diferenciarse a DC funcionales. Se ha informado también que tanto los CNT monocapa como los multicapa pueden promover respuestas alérgicas (38,39). En ratones sensibilizados con ovoalbúmina (OVA), los CNT aumentan la fibrosis de las vías respiratorias con elevación de los niveles de ARNm de IL-5 en ratones con asma alérgica, pero no tienen efecto en ratones sanos (39).

Por el contrario, otros estudios sugieren que los CNT multicapa pueden inducir inmunosupresión en ratones, caracterizada por respuesta reducida y disfunción de linfocitos T, además de un incremento en los niveles de IL-10 y prostaglandinas (33,40,41). Asimismo, la preincubación de linfocitos T vírgenes con DC tratadas con CNT monocapa reduce la proliferación de los linfocitos T (42).

Nanopartículas de sílice

Las NP de sílice son biodegradables y en general presentan una buena biodistribución; estas características se pueden atribuir a su gran área superficial, distribución de tamaño, cristalinidad, propiedades de superficie, solubilidad y alta estabilidad química y térmica. Son fácilmente sintetizables y se pueden fabricar de distintas formas y tamaños (43,44). Aunque la sílice es generalmente considerada como un material no citotóxico, es bien conocido que como nanomaterial tiene cambios en sus propiedades fisicoquímicas, lo que puede llevar a efectos dañinos sobre las funciones celulares *in vivo* e *in vitro* (45), incluidas las del sistema inmune.

Con respecto a sus propiedades inmunoestimuladoras, se han reportado los efectos inflamatorios de nanopartículas de sílice amorfa de 30 nm en CMSP y monocitos purificados, relacionados con un aumento

en la producción de IL-1 β , IL-8 y ROS, así como con la activación del inflamasoma NLRP3 (46). Otros estudios indican que las NP de sílice pueden favorecer respuestas inmunes alérgicas de tipo Th2 en ratones expuestos a OVA, induciendo mayores niveles de inmunoglobulinas IgE, IgG e IgG1 (47). Estas NP también inducen la producción de TNF- α dependiente de la producción de ROS y de la activación de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK, por la sigla en inglés de *mitogen-activated protein kinases*) en macrófagos, activando una respuesta inflamatoria (48,49). Chen y colaboradores (50) mostraron que células de Kupffer estimuladas con NP de sílice liberan grandes cantidades de ROS, TNF- α y óxido nítrico causando inflamación. Varios autores han referido la capacidad de las NP de sílice para activar el inflamasoma NLRP3 (46). Lee y colaboradores (43) informaron que las NP de sílice coloidales inducen mayor expresión de las citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β e IL-6 en macrófagos, que las NP mesoporosas, y que estas a su vez presentan mayor actividad proinflamatoria que las NP cristalinas (51). Hirai y colaboradores (52) mostraron que las NP amorfas de sílice con diámetro de 70 y 100 nm aumentan el paso de antígenos desde el endosoma al citoplasma induciendo la presentación cruzada en DC murinas.

Diferentes estudios han evidenciado el efecto inmunomodulador de las NP de sílice, con especial atención a la participación del estrés oxidativo como mecanismo de toxicidad. Uno de ellos demuestra que las NP porosas inducen mayor estrés oxidativo y de enzimas, tales como la superóxido-dismutasa y el grupo hemo-oxigenasa-1, que las nanopartículas no porosas en células del epitelio bronquial humano (53). Passagne y colaboradores (54) encontraron que las NP de sílice inducen estrés oxidativo, dependiente del tiempo y de su tamaño. Igualmente, se ha demostrado que las NP de sílice no cristalina, de tamaño nano y submicrónico, pueden inducir una alta producción de IL-1 β por mecanismos que implican la activación del inflamasoma NLRP3, en macrófagos murinos preactivados con LPS (55) y en macrófagos humanos (48,56,57). Por otro lado, Peeters y colaboradores (58) demostraron que las NP de sílice cristalina inducen la activación del inflamasoma NLRP3 en células humanas derivadas del epitelio bronquial. Dicha estimulación induce la liberación de las alarminas HMGB1 (por la sigla en inglés de *high mobility group box 1*) y

bFGF, importantes para la potenciación de la respuesta inflamatoria sistémica.

Nanopartículas de oro (AuNP)

Son NP metálicas que presentan propiedades ópticas y electrónicas totalmente dependientes de su forma y tamaño. Las AuNP han surgido como un candidato atractivo para la administración dirigida de diversos agentes terapéuticos debido a su baja citotoxicidad, parámetros optimizables de la superficie, estabilidad y biocompatibilidad en condiciones *in vivo* (59,60).

Parween y colaboradores (61) demostraron que AuNP formuladas con alumbre activan la inmunidad humoral contra *Plasmodium falciparum*, y muestran escasa inmunogenicidad en los ratones expuestos, por lo que se sugirió que podrían ser útiles en el desarrollo de un adyuvante contra dicho parásito. Estudios recientes hallaron que tanto los macrófagos como los neutrófilos humanos internalizan las AuNP lo que aumenta la producción intracelular de ROS (62,63). También se ha demostrado que las AuNP pueden iniciar una respuesta inflamatoria mediante la activación de macrófagos tanto *in vitro* como *in vivo* (64). Uno de esos estudios halló que AuNP de 40 nm aumentan no solo la hiperreactividad de las vías respiratorias, sino también el número de neutrófilos y macrófagos en ratones sensibilizados (65). Asimismo, AuNP de 13 nm recubiertas con polietilenglicol (PEG) pueden inducir una respuesta inflamatoria aguda y apoptosis en el hígado, con presencia de numerosas vesículas citoplasmáticas y lisosomas en células de Kupffer y macrófagos del bazo. Sin embargo, otros estudios han demostrado que las AuNP tienen propiedades antiinflamatorias, inhibiendo la respuesta celular inducida por citocinas proinflamatorias *in vivo* e *in vitro* (14,66).

Quantums-dots

Los *Quantums Dots* (QD) son una categoría particular de NP de aproximadamente 1-20 nm de diámetro, que se caracterizan por su estructura cristalina compuesta de un material semiconductor. Su fotoestabilidad los hace ideales para la formación de imágenes. Entre los más utilizados están los QD de sulfuro de cadmio y seleniuro de cadmio (67,68). Como los QD son fuertes donadores de energía, se ha demostrado

que pueden inducir la generación de ROS mediante la transferencia de energía a moléculas de oxígeno cercanas, ocasionando daños en diferentes organelas y muerte celular (69).

Nguyen y colaboradores (70) informaron que la pre-exposición a QD suprime la respuesta inmune de macrófagos a *Pseudomonas aeruginosa*, debido a la reducción de los niveles de óxido nítrico, TNF- α , KC/CXCL-1 e IL-8. También se ha informado que la inyección de QD estimula en ratones la proliferación de células inmunes como linfocitos T y macrófagos, induciendo la producción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias (71).

Dendrímeros

Los dendrímeros son polímeros sintéticos globulares de distribución y tamaño monodisperso. Sus propiedades fisicoquímicas los hacen similares a las biomoléculas; son altamente biocompatibles, tienen una biodistribución predecible y características que les permiten interactuar con la membrana según su tamaño y carga superficial. Tienen múltiples grupos funcionales en la superficie que se pueden utilizar para acoplar diferentes moléculas biológicamente relevantes. Se destaca su uso como andamios para la presentación de antígenos, especialmente péptidos, que los hace buenos candidatos como adyuvantes en la formulación de vacunas (72,73). Córdoba y colaboradores (74) demostraron el potencial de glicodendrímeros para estimular DC y activar el sistema inmune. Se ha informado también que dendrímeros *derivatizados* (o sea, modificados químicamente para producir un compuesto con nuevas propiedades) con PADRE (por la sigla en inglés de *pan HLA DR-binding epitope*) tienen la capacidad de aumentar la eficacia de la anfotericina B liposomal y su orientación hacia las células presentadoras de antígeno, activando la respuesta inmune adaptativa como consecuencia de la activación de linfocitos T, con lo que se logra reducir la carga parasitaria en leishmaniasis cutánea murina (75).

Sin embargo, otros autores han demostrado que los dendrímeros tienen propiedades inmunosupresoras. Dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM) conjugados con eritromicina demostraron tener actividad antibacteriana y además un gran efecto antiinflamatorio,

evidenciado en la supresión de la producción de óxido nítrico en macrófagos murinos activados con LPS (76). De manera similar, estos dendrímeros *derivatizados* con grupos alquilo protegen contra la sepsis fatal y la secreción *in vivo* e *in vitro* de citocinas inducidas por LPS (77). Además, los dendrímeros pueden afectar la estructura y actividad de moléculas inmunes; por ejemplo, los dendrímeros de PAMAM pueden afectar la estructura secundaria y la conformación de la molécula de γ -globulina, inhibir la activación del complemento y deteriorar la reacción antígeno-anticuerpo de los glóbulos rojos humanos (78). Igualmente, se ha informado que en modelos murinos los dendrímeros heteroglucanos glicoconjugados pueden inducir mejoras en las funciones inmunológicas tales como la producción de óxido nítrico y la generación de ROS (79). También inducen una alta regulación de los marcadores de superficie de células inmunes (CD4, CD8, CD19, MHC-II) y de los niveles de citocinas.

Nanopartículas poliméricas

Son partículas coloidales de tamaño submicrónico usadas en diferentes aplicaciones biomédicas debido a sus propiedades como alta biodegradabilidad y biocompatibilidad, circulación prolongada y a que pueden *funcionalizarse* (o sea, modificarles la estructura mediante la introducción de átomos o grupos funcionales en la superficie) con un amplio espectro de agentes terapéuticos (80).

Se han informado algunas NP poliméricas como activadoras del sistema inmune al favorecer la activación de DC y linfocitos T. Por ejemplo, las NP anfífilas de polianhídrido poseen propiedades que mimetizan componentes de los patógenos, como se evidenció en su capacidad para activar DC de manera similar al LPS (81). Las NP de polianhídrido metil vinil éter comaleico (PVMA NP) utilizadas como adyuvante activan diferencialmente las DC a través de receptores TLR2 y TLR4, de manera dosis dependiente (82-84). NP basadas en quitosano prometen ser una buena opción como adyuvantes y como sistemas para la entrega de antígenos. Por ejemplo, la vacunación intranasal con NP de quitosano cargadas con toxoide tetánico induce respuesta inmune sistémica y en las mucosas (85).

CONCLUSIÓN

El notable progreso de la nanotecnología y su aplicación en biomedicina ha ampliado los rangos y tipos de NP usadas. Esta revisión presenta una visión general de resultados recientes sobre los efectos inmunomoduladores de varias de estas NP. Tales resultados muestran que actualmente se están utilizando las NP en aplicaciones cada vez más diversas y complejas, pero aún existen muchas preguntas acerca de su papel inmunomodulador, que no se han abordado por completo.

Para las aplicaciones en nanomedicina, el efecto inmunomodulador de las NP es un arma de doble filo: se puede obtener beneficio de sus propiedades para estimular o suprimir el sistema inmune y usarlas, por ejemplo, como adyuvantes o como antiinflamatorios respectivamente, pero, al mismo tiempo, es necesario evitar las respuestas inmunes indeseables (inflamación, hiperreactividad, inmunosupresión) con el fin de minimizar los efectos secundarios sistémicos. Los factores que influyen en los diferentes mecanismos de la respuesta inmune son múltiples y complejos, entre ellos: la composición química de las partículas, el tamaño, la forma, la composición y la carga de la superficie, la vía de exposición y la dosis. Igualmente, las variaciones e incluso contradicciones de los efectos inmunomoduladores de las NP reportadas a la fecha, pueden estar asociadas con las condiciones particulares de cada preparación y con los modelos celulares o animales utilizados. Por esto, para su aplicación potencial en medicina y otras áreas, es crucial investigar la relación entre las características fisicoquímicas de las NP y la respuesta inmune sistémica en diferentes modelos biológicos, pues los enfoques actuales de predicción y prevención de la inmunomodulación de las NP siguen siendo muy precarios, por lo que se deben fomentar estudios mucho más profundos.

AGRADECIMIENTOS

Al doctor Felipe García Quiroz por la lectura crítica del manuscrito y sus aportes para mejorarlo.

CONFLICTOS DE INTERESES

Ninguno que declarar.

FUENTES DE FINANCIACIÓN

Este trabajo fue financiado por el Comité Nacional para el Desarrollo de la Investigación (CONADI) de la Universidad Cooperativa de Colombia, y la Universidad de Antioquia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sainz V, Coniot J, Matos AI, Peres C, Zupan I E, Moura L, et al. Regulatory aspects on nanomedicines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Dec;468(3):504-10. DOI 10.1016/j.bbrc.2015.08.023.
2. Chang EH, Harford JB, Eaton MA, Boisseau PM, Dube A, Hayeshi R, et al. Nanomedicine: Past, present and future - A global perspective. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Dec;468(3):511-7. DOI 10.1016/j.bbrc.2015.10.136.
3. Kumar S, Anselmo AC, Banerjee A, Zakrewsky M, Mitragotri S. Shape and size-dependent immune response to antigen-carrying nanoparticles. *J Control Release*. 2015 Dec;220(Pt A):141-8. DOI 10.1016/j.jconrel.2015.09.069.
4. Boisseau P, Loubaton B. Nanomedicine, nanotechnology in medicine. *C R Phys*. 2011 Sept;12(7):620-36. DOI 10.1016/j.crhy.2011.06.001.
5. Silva GA. Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. *Surg Neurol*. 2004 Mar;61(3):216-20.
6. Santos T, Boto C, Saraiva CM, Bernardino L, Ferreira L. Nanomedicine Approaches to Modulate Neural Stem Cells in Brain Repair. *Trends Biotechnol*. 2016 Feb. pii: S0167-7799(16)00036-6. DOI 10.1016/j.tibtech.2016.02.003.
7. Misra R, Acharya S, Sahoo SK. Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy. *Drug Discov Today*. 2010 Oct;15(19-20):842-50. DOI 10.1016/j.drudis.2010.08.006.
8. Gao X, Chen J, Chen J, Wu B, Chen H, Jiang X. Quantum dots bearing lectin-functionalized nanoparticles as a platform for in vivo brain imaging. *Bioconjug Chem*. 2008 Nov;19(11):2189-95. DOI 10.1021/bc8002698.
9. Bhakta G, Sharma RK, Gupta N, Cool S, Nurcombe V, Maitra A. Multifunctional silica nanoparticles with potentials of imaging and gene delivery. *Nanomedicine*. 2011 Aug;7(4):472-9. DOI 10.1016/j.nano.2010.12.008.
10. Rosenholm JM, Sahlgren C, Lindén M. Multifunctional mesoporous silica nanoparticles for combined therapeutic, diagnostic and targeted action in cancer treatment. *Curr Drug Targets*. 2011 Jul;12(8):1166-86. DOI 10.2174/138945011795906624.
11. Moddarese M, Brown MB, Zhao Y, Tamburic S, Jones SA. The role of vehicle-nanoparticle interactions in topical drug delivery. *Int J Pharm*. 2010 Nov;400(1-2):176-82. DOI 10.1016/j.ijpharm.2010.08.012.
12. Naahidi S, Jafari M, Edalat F, Raymond K, Khademhosseini A, Chen P. Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. *J Control Release*. 2013 Mar;166(2):182-94. DOI 10.1016/j.jconrel.2012.12.013.
13. Goldberg M, Langer R, Jia X. Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2007;18(3):241-68.
14. Chen H, Zeng Y, Liu W, Zhao S, Wu J, Du Y. Multifaceted applications of nanomaterials in cell engineering and therapy. *Biotechnol Adv*. 2013 Sep-Oct;31(5):638-53. DOI 10.1016/j.biotechadv.2012.08.002.
15. Singh RK, Kim H. Inorganic nanobiomaterial drug carriers for medicine. *J Tissue Eng Regen Med*. 2013 Dec;10(6):296-309. DOI 10.1007/s13770-013-1092-y.
16. Tosi G, Costantino L, Ruozi B, Forni F, Vandelli MA. Polymeric nanoparticles for the drug delivery to the central nervous system. *Expert Opin Drug Deliv*. 2008 Feb;5(2):155-74. DOI 10.1517/17425247.5.2.155.
17. Wang M, Thanou M. Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacol Res*. 2010 Aug;62(2):90-9. DOI 10.1016/j.phrs.2010.03.005.
18. Singh R, Lillard JW Jr. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp Mol Pathol*. 2009 Jun;86(3):215-23. DOI 10.1016/j.yexmp.2008.12.004.
19. Dobrovolskaia MA. Pre-clinical immunotoxicity studies of nanotechnology-formulated drugs: Challenges, considerations and strategy. *J Control Release*. 2015 Dec;220(Pt B):571-83. DOI 10.1016/j.jconrel.2015.08.056.
20. Dobrovolskaia MA, Shurin M, Shvedova AA. Current understanding of interactions between nanoparticles and the immune system. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2015 Dec. pii: S0041-008X(15)30168-X. DOI 10.1016/j.taap.2015.12.022. Forthcoming.
21. Říhová B. Biocompatibility and immunocompatibility of water-soluble polymers based on HPMA. *Compos*

- Part B-Eng. 2007 Apr;38(3):386-97. DOI 10.1016/j.compositesb.2006.07.007.
22. Vial T, Descotes J. Immunosuppressive drugs and cancer. *Toxicology*. 2003 Apr;185(3):229-40. DOI 10.1016/S0300-483X(02)00612-1.
 23. Park EJ, Kim H, Kim Y, Yi J, Choi K, Park K. Carbon fullerenes (C60s) can induce inflammatory responses in the lung of mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010 Apr;244(2):226-33. DOI 10.1016/j.taap.2009.12.036.
 24. Yang D, Zhao Y, Guo H, Li Y, Tewary P, Xing G, et al. [Gd@C(82)(OH)(22)](n) nanoparticles induce dendritic cell maturation and activate Th1 immune responses. *ACS Nano*. 2010 Feb;4(2):1178-86. DOI 10.1021/nn901478z.
 25. Tsao N, Luh TY, Chou CK, Wu JJ, Lin YS, Lei HY. Inhibition of group A streptococcus infection by carboxyfullerene. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Jun;45(6):1788-93. DOI 10.1128/AAC.45.6.1788-1793.2001.
 26. Ryan JJ, Bateman HR, Stover A, Gomez G, Norton SK, Zhao W, et al. Fullerene nanomaterials inhibit the allergic response. *J Immunol*. 2007 Jul;179(1):665-72. DOI 10.4049/jimmunol.179.1.665.
 27. Yudoh K, Karasawa R, Masuko K, Kato T. Water-soluble fullerene (C60) inhibits the development of arthritis in the rat model of arthritis. *Int J Nanomedicine*. 2009;4:217-25.
 28. Zogovic NS, Nikolic NS, Vranjes-Djuric SD, Harhaji LM, Vucicevic LM, Janjetovic KD, et al. Opposite effects of nanocrystalline fullerene (C60) on tumour cell growth in vitro and in vivo and a possible role of immunosuppression in the cancer-promoting activity of C60. *Biomaterials*. 2009 Dec;30(36):6940-46. DOI 10.1016/j.biomaterials.2009.09.007.
 29. Jovanović B, Anastasova L, Rowe EW, Palić D. Hydroxylated fullerenes inhibit neutrophil function in fathead minnow (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). *Aquat Toxicol*. 2011 Jan;101(2):474-82. DOI 10.1016/j.aquatox.2010.11.002.
 30. Laverny G, Casset A, Purohit A, Schaeffer E, Spiegelhalter C, de Blay F, et al. Immunomodulatory properties of multi-walled carbon nanotubes in peripheral blood mononuclear cells from healthy subjects and allergic patients. *Toxicol Lett*. 2013 Feb;217(2):91-101. DOI 10.1016/j.toxlet.2012.12.008.
 31. Čolić M, Džopalić T, Tomić S, Rajković J, Rudolf R, Vuković G, et al. Immunomodulatory effects of carbon nanotubes functionalized with a Toll-like receptor 7 agonist on human dendritic cells. *Carbon*. 2014 Feb;67:273-87. DOI 10.1016/j.carbon.2013.09.090.
 32. Beamer CA, Girtsman TA, Seaver BP, Finsaas KJ, Migliaccio CT, Perry VK, et al. IL-33 mediates multi-walled carbon nanotube (MWCNT)-induced airway hyper-reactivity via the mobilization of innate helper cells in the lung. *Nanotoxicology*. 2013 Sep;7(6):1070-81. DOI 10.3109/17435390.2012.702230.
 33. Wang X, Podila R, Shannahan JH, Rao AM, Brown JM. Intravenously delivered graphene nanosheets and multiwalled carbon nanotubes induce site-specific Th2 inflammatory responses via the IL-33/ST2 axis. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:1733-48. DOI 10.2147/IJN.S44211.
 34. Wang X, Katwa P, Podila R, Chen P, Ke PC, Rao AM, et al. Multi-walled carbon nanotube instillation impairs pulmonary function in C57BL/6 mice. *Part Fibre Toxicol*. 2011 Aug;8:24. DOI 10.1186/1743-8977-8-24.
 35. Sun B, Wang X, Ji Z, Wang M, Liao YP, Chang CH, et al. NADPH Oxidase-Dependent NLRP3 Inflammasome Activation and its Important Role in Lung Fibrosis by Multiwalled Carbon Nanotubes. *Small*. 2015 May;11(17):2087-97. DOI 10.1002/sml.201402859.
 36. Ronzani C, Casset A, Pons F. Exposure to multi-walled carbon nanotubes results in aggravation of airway inflammation and remodeling and in increased production of epithelium-derived innate cytokines in a mouse model of asthma. *Arch Toxicol*. 2014 Feb;88(2):489-99. DOI 10.1007/s00204-013-1116-3.
 37. Inoue K, Koike E, Yanagisawa R, Hirano S, Nishikawa M, Takano H. Effects of multi-walled carbon nanotubes on a murine allergic airway inflammation model. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009 Jun;237(3):306-16. DOI 10.1016/j.taap.2009.04.003.
 38. Ryman-Rasmussen JP, Tewksbury EW, Moss OR, Cesta MF, Wong BA, Bonner JC. Inhaled multiwalled carbon nanotubes potentiate airway fibrosis in murine allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2009 Mar;40(3):349-58. DOI 10.1165/rcmb.2008-0276OC.
 39. Nygaard UC, Hansen JS, Samuelson M, Alberg T, Marioara CD, Løvik M. Single-walled and multi-walled carbon nanotubes promote allergic immune responses in mice. *Toxicol Sci*. 2009 May;109(1):113-23. DOI 10.1093/toxsci/kfp057.

40. Mitchell LA, Gao J, Wal RV, Gigliotti A, Burchiel SW, McDonald JD. Pulmonary and systemic immune response to inhaled multiwalled carbon nanotubes. *Toxicol Sci.* 2007 Nov;100(1):203-14. DOI 10.1093/toxsci/kfm196.
41. Mitchell LA, Lauer FT, Burchiel SW, McDonald JD. Mechanisms for how inhaled multiwalled carbon nanotubes suppress systemic immune function in mice. *Nat Nanotechnol.* 2009 Jul;4(7):451-6. DOI 10.1038/nnano.2009.151.
42. Tkach AV, Shurin GV, Shurin MR, Kisin ER, Murray AR, Young SH, et al. Direct effects of carbon nanotubes on dendritic cells induce immune suppression upon pulmonary exposure. *ACS Nano.* 2011 Jul;5(7):5755-62. DOI 10.1021/nn2014479.
43. Lee S, Kim MS, Lee D, Kwon TK, Khang D, Yun HS, et al. The comparative immunotoxicity of mesoporous silica nanoparticles and colloidal silica nanoparticles in mice. *Int J Nanomedicine.* 2013;8:147-58. DOI 10.2147/IJN.S39534.
44. Slowing II, Vivero-Escoto JL, Wu CW, Lin VS. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008 Aug;60(11):1278-88. DOI 10.1016/j.addr.2008.03.012.
45. Huang X, Teng X, Chen D, Tang F, He J. The effect of the shape of mesoporous silica nanoparticles on cellular uptake and cell function. *Biomaterials.* 2010 Jan;31(3):438-48. DOI 10.1016/j.biomaterials.2009.09.060.
46. Yang EJ, Choi IH. Immunostimulatory effects of silica nanoparticles in human monocytes. *Immune Netw.* 2013 Jun;13(3):94-101. DOI 10.4110/in.2013.13.3.94.
47. Yoshida T, Yoshioka Y, Fujimura M, Yamashita K, Higashisaka K, Morishita Y, et al. Promotion of allergic immune responses by intranasally-administrated nanosilica particles in mice. *Nanoscale Res Lett.* 2011 Mar;6(1):195. DOI 10.1186/1556-276X-6-195.
48. Morishige T, Yoshioka Y, Inakura H, Tanabe A, Narimatsu S, Yao X, et al. Suppression of nanosilica particle-induced inflammation by surface modification of the particles. *Arch Toxicol.* 2012 Aug;86(8):1297-307. DOI 10.1007/s00204-012-0823-5.
49. Park HJ, Sohn JH, Kim YJ, Park YH, Han H, Park KH, et al. Acute exposure to silica nanoparticles aggravate airway inflammation: different effects according to surface characteristics. *Exp Mol Med.* 2015 Jul;47:e173. DOI 10.1038/emm.2015.50.
50. Chen Q, Xue Y, Sun J. Kupffer cell-mediated hepatic injury induced by silica nanoparticles in vitro and in vivo. *Int J Nanomedicine.* 2013;8:1129-40. DOI 10.2147/IJN.S42242.
51. Lee S, Yun HS, Kim SH. The comparative effects of mesoporous silica nanoparticles and colloidal silica on inflammation and apoptosis. *Biomaterials.* 2011 Dec;32(35):9434-43. DOI 10.1016/j.biomaterials.2011.08.042.
52. Hirai T, Yoshioka Y, Takahashi H, Ichihashi K, Yoshida T, Tochigi S, et al. Amorphous silica nanoparticles enhance cross-presentation in murine dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Oct;427(3):553-6. DOI 10.1016/j.bbrc.2012.09.095.
53. Eom HJ, Choi J. Oxidative stress of silica nanoparticles in human bronchial epithelial cell, Beas-2B. *Toxicol In Vitro.* 2009 Oct;23(7):1326-32. DOI 10.1016/j.tiv.2009.07.010.
54. Passagne I, Morille M, Rousset M, Pujalté I, Lazou B. Implication of oxidative stress in size-dependent toxicity of silica nanoparticles in kidney cells. *Toxicology.* 2012 Sep;299(2-3):112-24. DOI 10.1016/j.tox.2012.05.010.
55. Sandberg WJ, Låg M, Holme JA, Friede B, Gualtieri M, Kruszewski M, et al. Comparison of non-crystalline silica nanoparticles in IL-1 β release from macrophages. *Part Fibre Toxicol.* 2012 Aug;9:32. DOI 10.1186/1743-8977-9-32.
56. Yue H, Wei W, Yue Z, Lv P, Wang L, Ma G, et al. Particle size affects the cellular response in macrophages. *Eur J Pharm Sci.* 2010 Dec;41(5):650-7. DOI 10.1016/j.ejps.2010.09.006.
57. Yazdi AS, Guarda G, Riteau N, Drexler SK, Tardivel A, Couillin I, et al. Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1 α and IL-1 β . *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Nov;107(45):19449-54. DOI 10.1073/pnas.1008155107.
58. Peeters PM, Perkins TN, Wouters EF, Mossman BT, Reynaert NL. Silica induces NLRP3 inflammasome activation in human lung epithelial cells. *Part Fibre Toxicol.* 2013 Feb;10:3. DOI 10.1186/1743-8977-10-3.
59. Joseph MM, Aravind SR, Varghese S, Mini S, Sreelekha TT. PST-Gold nanoparticle as an effective anticancer

- agent with immunomodulatory properties. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2013 Apr;104:32-9. DOI 10.1016/j.colsurfb.2012.11.046.
60. Loo C, Lin A, Hirsch L, Lee MH, Barton J, Halas N, et al. Nanoshell-enabled photonics-based imaging and therapy of cancer. *Technol Cancer Res Treat*. 2004 Feb;3(1):33-40.
 61. Parween S, Gupta PK, Chauhan VS. Induction of humoral immune response against PfMSP-1(19) and PvMSP-1(19) using gold nanoparticles along with alum. *Vaccine*. 2011 Mar;29(13):2451-60. DOI 10.1016/j.vaccine.2011.01.014.
 62. Martinez Paino IM, Zucolotto V. Poly(vinyl alcohol)-coated silver nanoparticles: Activation of neutrophils and nanotoxicology effects in human hepatocarcinoma and mononuclear cells. *Environ Toxicol Phar*. 2015 Mar;39(2):614-21. DOI 10.1016/j.etap.2014.12.012.
 63. Fatima F, Bajpai P, Pathak N, Singh S, Priya S, Verma SR. Antimicrobial and immunomodulatory efficacy of extracellularly synthesized silver and gold nanoparticles by a novel phosphate solubilizing fungus *Bipolaris tetramera*. *BMC Microbiol*. 2015 Feb;15:52. DOI 10.1186/s12866-015-0391-y.
 64. Fallarini S, Paoletti T, Battaglini CO, Ronchi P, Lay L, Bonomi R, et al. Factors affecting T cell responses induced by fully synthetic glyco-gold-nanoparticles. *Nanoscale*. 2013 Jan;5(1):390-400. DOI 10.1039/c2nr32338a.
 65. Cho WS, Cho M, Jeong J, Choi M, Cho HY, Han BS, et al. Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009 Apr;236(1):16-24. DOI 10.1016/j.taap.2008.12.023.
 66. Sumbayev VV, Yasinska IM, Garcia CP, Gilliland D, Lall GS, Gibbs BF, et al. Gold nanoparticles down-regulate interleukin-1 β -induced pro-inflammatory responses. *Small*. 2013 Feb;9(3):472-7. DOI 10.1002/smll.201201528.
 67. Romoser AA, Chen PL, Berg JM, Seabury C, Ivanov I, Criscitiello MF, et al. Quantum dots trigger immunomodulation of the NF κ B pathway in human skin cells. *Mol Immunol*. 2011 Jul;48(12-13):1349-59. DOI 10.1016/j.molimm.2011.02.009.
 68. Juzenas P, Chen W, Sun YP, Coelho MA, Generalov R, Generalova N, et al. Quantum dots and nanoparticles for photodynamic and radiation therapies of cancer. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008 Dec;60(15):1600-14. DOI 10.1016/j.addr.2008.08.004.
 69. Lovrić J, Cho SJ, Winnik FM, Maysinger D. Unmodified cadmium telluride quantum dots induce reactive oxygen species formation leading to multiple organelle damage and cell death. *Chem Biol*. 2005 Nov;12(11):1227-34. DOI 10.1016/j.chembiol.2005.09.008.
 70. Nguyen KC, Seligy VL, Tayabali AF. Cadmium telluride quantum dot nanoparticle cytotoxicity and effects on model immune responses to *Pseudomonas aeruginosa*. *Nanotoxicology*. 2013 Mar;7(2):202-11. DOI 10.3109/17435390.2011.648667.
 71. Hoshino A, Hanada S, Manabe N, Nakayama T, Yamamoto K. Immune response induced by fluorescent nanocrystal quantum dots in vitro and in vivo. *IEEE Trans Nanobioscience*. 2009 Mar;8(1):51-7. DOI 10.1109/TNB.2009.2016550.
 72. Heegaard PM, Boas U, Sorensen NS. Dendrimers for vaccine and immunostimulatory uses. A review. *Bioconjug Chem*. 2010 Mar;21(3):405-18. DOI 10.1021/bc900290d.
 73. Gothwal A, Kesharwani P, Gupta U, Khan I, Iqbal Mohd Amin MC, Banerjee S, et al. Dendrimers as an Effective Nanocarrier in Cardiovascular Disease. *Curr Pharm Des*. 2015;21(30):4519-26.
 74. Córdoba EV, Pion M, Rasines B, Filippini D, Komber H, Ionov M, et al. Glycodendrimers as new tools in the search for effective anti-HIV DC-based immunotherapies. *Nanomedicine*. 2013 Oct;9(7):972-84. DOI 10.1016/j.nano.2013.03.004.
 75. Daftarian PM, Stone GW, Kovalski L, Kumar M, Vosoughi A, Urbietta M, et al. A targeted and adjuvanted nanocarrier lowers the effective dose of liposomal amphotericin B and enhances adaptive immunity in murine cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis*. 2013 Dec;208(11):1914-22. DOI 10.1093/infdis/jit378.
 76. Bosnjakovic A, Mishra MK, Ren W, Kurtoglu YE, Shi T, Fan D, et al. Poly(amidoamine) dendrimer-erythromycin conjugates for drug delivery to macrophages involved in periprosthetic inflammation. *Nanomedicine*. 2011 Jun;7(3):284-94. DOI 10.1016/j.nano.2010.10.008.
 77. Cromer JR, Wood SJ, Miller KA, Nguyen T, David SA. Functionalized dendrimers as endotoxin sponges. *Bioorg Med Chem Lett*. 2005 Mar;15(5):1295-8. DOI 10.1016/j.bmcl.2005.01.026.

78. Lin J, Hua W, Zhang Y, Li C, Xue W, Yin J, et al. Effect of poly(amidoamine) dendrimers on the structure and activity of immune molecules. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Feb;1850(2):419-25. DOI 10.1016/j.bbagen.2014.11.016.
79. Devi KS, Behera B, Sahoo B, Maiti TK. Heteroglucan-dendrimer glycoconjugate: a modulated construct with augmented immune responses and signaling phenomena. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Sep;1840(9):2794-805. DOI 10.1016/j.bbagen.2014.04.023.
80. Masood F. Polymeric nanoparticles for targeted drug delivery system for cancer therapy. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016 Mar;60:569-78. DOI 10.1016/j.msec.2015.11.067.
81. Petersen LK, Ramer-Tait AE, Broderick SR, Kong C, Ulery BD, Rajan K, et al. Activation of innate immune responses in a pathogen-mimicking manner by amphiphilic polyanhydride nanoparticle adjuvants. *Biomaterials*. 2011 Oct;32(28):6815-22. DOI 10.1016/j.biomaterials.2011.05.063.
82. Silva JM, Videira M, Gaspar R, Pr at V, Florindo HF. Immune system targeting by biodegradable nanoparticles for cancer vaccines. *J Control Release*. 2013 Jun;168(2):179-99. DOI 10.1016/j.jconrel.2013.03.010.
83. Lou PJ, Cheng WF, Chung YC, Cheng CY, Chiu LH, Young TH. PMMA particle-mediated DNA vaccine for cervical cancer. *J Biomed Mater Res A*. 2009 Mar;88(4):849-57. DOI 10.1002/jbm.a.31919.
84. Shaky a AK, Nandakumar KS. Applications of polymeric adjuvants in studying autoimmune responses and vaccination against infectious diseases. *J R Soc Interface*. 2013 Feb;10(79):20120536. DOI 10.1098/rsif.2012.0536.
85. Sayin B, Somavarapu S, Li XW, Sesardic D, Senel S, Alpar OH. TMC-MCC (N-trimethyl chitosan-mono-N-carboxymethyl chitosan) nanocomplexes for mucosal delivery of vaccines. *Eur J Pharm Sci*. 2009 Nov;38(4):362-9. DOI 10.1016/j.ejps.2009.08.010.



CAPÍTULO 2

**SILICA NANOPARTICLES INDUCE NLRP3 INFLAMMASOME ACTIVATION
IN HUMAN PRIMARY IMMUNE CELLS**

SILICA NANOPARTICLES INDUCE NLRP3 INFLAMMASOME ACTIVATION IN HUMAN PRIMARY IMMUNE CELLS

Diana M. Gómez¹, Silvio Urcuqui-Inchima², Juan C. Hernández¹

¹INFETTARE, Facultad de Medicina, Universidad Cooperativa de Colombia, Medellín, Colombia.

²Grupo Inmunovirología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, UdeA, Calle 70 # 52-21, Medellín, Colombia

Corresponding autor: Juan C. Hernández. Address: Calle 50 # 40-74, Medellín, Colombia.

E-mail: juankhernandez@gmail.com

Funding Sources:

This study was funded by Universidad Cooperativa de Colombia and Universidad de Antioquia. The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests

The authors have no financial conflict of interest.

SILICA NANOPARTICLES INDUCE NLRP3 INFLAMMASOME ACTIVATION IN HUMAN PRIMARY IMMUNE CELLS

ABSTRACT

Background: In recent years, the potential use of silica nanoparticles (SNPs) among different biomedical fields has grown. A deep understanding of the physicochemical properties of nanoparticles (NPs) and their regulation of specific biological responses is crucial for the successful application of NPs. Exposure to NP physicochemical properties (size, shape, porosity, etc.) could result in deleterious effects on cellular functions, including a proinflammatory response mediated through activation of the NLRP3 inflammasome. The aim of this study was to evaluate the potential *in vitro* immunomodulatory effect of 12 nm and 200 nm SNPs on the expression of proinflammatory cytokines and NLRP3 inflammasome components in human primary neutrophils and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).

Results: This study demonstrate that regardless of the size of the nanoparticles, SNPs induce the production of proinflammatory cytokines in a dose-dependent manner. Induced IL-1 β production after exposure to SNPs suggests the involvement of NLRP3 inflammasome activation in this process.

Conclusion: SNPs induce the production of proinflammatory cytokines in a dose dependent manner. Furthermore, our data suggest that the production and release of IL-1 β occurs through the formation of the NLRP3 inflammasome.

Keywords: silica nanoparticles, immunomodulation, NLRP3 inflammasome, proinflammatory cytokines

BACKGROUND

Nanotechnology has great potential for use in several medical applications such as medical diagnostics, therapy and tissue engineering. As nanotechnology develops, nanoparticles have been used in an increasingly wide range of applications and to obtain different results due to their unique physicochemical properties (1,2). Recent studies suggest great potential for SNPs as new tools in biotechnology and the biomedical field. NPs have unusual physicochemical properties such as their large surface area, size distribution, crystallinity, surface properties, electronic properties, solubility, ability to aggregate and shape (3,4). For these reasons, biomedical uses of silica nanoparticles (SNPs) are rapidly increasing and include drug delivery systems, labeling, and tissue engineering (4–6). However, due to the physicochemical properties of SNPs, which are different from bulk particles, they interact with biological systems differently and require further study (7). Several investigations have revealed that SNPs, due to their foreign nature, can be recognized by the immune system and induce immunomodulatory effects (through stimulation or suppression of immune responses). Interactions between SNPs and immune-competent cells may be desirable for some applications but may be unwanted for others (3,4,8).

The immune system defends organisms against a wide variety of pathogenic agents and danger signals. The first line of defense is the innate immunity response, which comprises both innate cells and effector molecules involved in host protection. This response is dependent on initial recognition of the pathogen by pattern recognition receptors (PRRs), which recognize conserved molecular pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) or

danger signals called danger/damage-associated molecular patterns (DAMPs) present in the environment (1,7). It has been reported that innate immune cells such as macrophages, dendritic cells and monocytes internalize SNPs and produce pro-inflammatory cytokines such as interleukin (IL)-1 β and IL-18 (5). This process involves a cytosolic multiprotein complex, called the inflammasome, which plays a major role in innate immunity. One of the best characterized is the NLRP3 inflammasome, which contains the protein NLRP3 (previously termed Nalp3 or Cryopyrin). This is a member of the NOD-like receptors (NLRs) family and consists of a N-terminal PYRIN domain (PYD), a central NACHT domain and C terminal leucine-rich repeats (LRRs). The LRR exposes the NACHT domain for homotypic aggregation, triggering a cascade leading to NLRP3/ASC/Pro-Caspase-1 complex formation. Consequently, triggered by the signaling of PAMPs or DAMPs, the NLRP3 inflammasome regulates caspase-1 activation and the maturation of IL-1 β and IL-18 (9–13).

This is a highly controlled process involving detection of two specific signals. First, a priming signal is required to induce the transcription and translation of pro-IL-1 β and pro-IL-18 and the expression of NLRP3. PAMPs, such as lipopolysaccharide (LPS), stimulate the activation of Toll-like receptors (TLRs), which results in the generation of a priming signal. Then, a second signal causes inflammasome activation, leading to the formation of the complex and activation of Caspase-1, which modifies pro-IL-1 β and pro-IL-18, resulting in their maturation. This second signal is triggered by a group of chemically and biologically unrelated PAMPs or DAMPs (endogenous or exogenous), such as ATP (16),

monosodium urate crystals, UVB irradiation, and the environmental pollutants silica and asbestos (9,14,15).

Several studies have shown that SNPs can act as a second signal to stimulate the assembly of the NLRP3 inflammasome (14,15). However, other studies have demonstrated that the effects of SNPs on cells vary with the physicochemical properties of the SNPs, such as chemical composition, crystallinity, size, shape and surface area (3,16). For example, it was recently reported that SNPs are sensed by the NLRP3 inflammasome and induce the release of mature IL-1 β , but this response is dependent of the SNP size (8). Similarly, silica particle size impacts immune responses, with submicron amorphous silica particles inducing higher inflammatory responses than silica particles over 1000 nm in size (5). On the other hand, Sandberg *et al.* demonstrated that non-crystalline silica particles of nano- and submicro-sizes induced IL-1 β release from LPS-primed cells; however, the differential response patterns obtained suggest that silica-induced IL-1 β responses depend not only on the particle surface area but also on factors such as particle reactivity or particle uptake (17). Therefore, due to these varying results, the interactions and responses of the immune system to the SNPs must be evaluated before any biomedical application.

Neutrophils and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) are essential players in immunity, providing an effective defense against foreign agents and playing a key role during inflammation by using several mechanisms including inflammasome activation (18,19). However, the literature addressing SNP activation of the inflammasome in neutrophils and PBMCs is poorly documented, even more so in human primary cells. Then,

the aim of this work was to evaluate the potential *in vitro* immunomodulatory effect of SNPs on the expression of pro-inflammatory cytokines and inflammasome components in human primary neutrophils and PBMCs.

METHODS

Ethics statement.

Following ethical guidelines, all donors gave written informed consent before enrollment in the study. Study protocols were reviewed and approved by the Institutional Research Ethics Boards at the Universidad Cooperativa de Colombia and were conducted according to the Declaration of Helsinki.

Silica nanoparticles

Two different monodisperse spherical SNPs with diameters of 12nm (nanopowder, spec. surface area 175-225 m²/g (BET Surface Area Analysis of Nanoparticles), 99.8% trace metals basis, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) and 200nm (nanoparticles, mesoporous, 200 nm particle size, pore size 4 nm, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) were used to investigate how particle size and concentration affect the immunomodulatory effect of human cells. The 12nm silica nanoparticle was previously characterized (20) and its reported physicochemical properties include an state amorphous, with a surface area of 175-225 m²/g, and ζ : -11.6 ± 1.0 mV.

PBMC and Neutrophil isolation

Fresh whole-blood samples were obtained by venipuncture and collected into EDTA-coated tubes. Human PBMCs were isolated using a standard Ficoll/Histopaque-1077 (Histopaque 1077, Sigma - USA) gradient and cultured in RPMI medium (RPMI 1640, Gibco-USA) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma-Aldrich), as previously described (21). Neutrophils were isolated from blood samples collected into ACD (citric acid, citrate, dextrose) anticoagulant-coated tubes (BD Pharmingen, San Diego, CA). Neutrophils were isolated by dextran sedimentation (Sigma), followed by centrifugation over Ficoll-Hypaque (Sigma), as previously reported (22). To avoid cell death or cellular activation during isolation, all buffers and reagents were used at 4°C. Cellular viability was monitored by trypan blue exclusion and found to be consistently $\geq 95\%$; cellular purity ($\geq 96\%$) was verified by Wright stain.

Cell culture and treatment with SNPs

PBMCs (1.5×10^5 cells/well) or neutrophils (2×10^5 cells/well) were seeded in 96-well plates and treated with RPMI-1640 containing 12 nm or 200 nm SNPs (10^{-1} - 10^5 ng/mL). Cells unexposed to SNPs served as a negative control, whereas cells stimulated with 50 ng/ml lipopolysaccharide (LPS, Invitrogen, San Diego, CA) were used as a positive control. PBMCs were incubated overnight, and neutrophils were incubated for 4 hours at 37°C and 5% CO₂.

To evaluate the effect of priming in the inflammasome activation (23), cells were pre-treated with 50 pg/ml LPS for 2 h, before exposure to increasing concentrations of the SNPs for 4 h. Cells were then centrifuged, and the supernatants were collected and immediately frozen at -80°C until cytokine quantification using ELISA. To analyze RNA levels, we followed the same protocol described above, but seeded the cells in a 24-well

plate at a density of 1×10^6 cells/well and incubated them for 4 h at 37 °C and 5% CO₂ to maximize RNA yield for targeted immune outputs. Then, PBMC or neutrophil pellets were used for total RNA extraction. All reagents and materials used in the experiments were endotoxin free.

Cytokine Analysis

To investigate the effect of SNPs on IL-1 β , IL-6 (OptEIA, BD Biosciences, USA) and IL-18 (eBiosciences, San Diego, CA, USA) production, cytokine concentrations (pg ml⁻¹) in cell culture supernatants were determined using a commercial ELISA assay according to the manufacturer's instructions. All samples were run in duplicate. Cytokine concentrations were calculated from a standard curve of the corresponding recombinant human cytokine.

Transcriptional analysis of inflammasome components by real-time PCR

A previously optimized quantitative real-time PCR (qPCR) assay was used to quantify mRNA levels (21,24). Briefly, total RNA was purified from cells using a One Step RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) and was reverse transcribed into cDNA in a 20 μ L reaction volume using a RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA), following the manufacturers' instructions. qPCR was performed using SYBR Green Mastermix (Thermo Scientific, Waltham, MA) and a Real-Time PCR detection system (Bio-Rad CFX96, USA). A list of primer sequences used to detect immune and housekeeping gene mRNAs is presented in Table 1.

Cytotoxicity Assay

Cell viability was assessed using 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. After exposure of cells to SNPs of each concentration lasting as long as 24 h for PBMC and up to 8 h for Neutrophils, supernatant was removed from each well, and the cells were washed with PBS. The cells were then incubated in fresh serum-free medium containing 0,5 mg/mL MTT for 4 h at 37 °C. The resulting formazan product was dissolved in 100 µL of DMSO. Finally, the absorbance was measured at 570 nm using a microplate reader (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Scientific). The data were normalized to the absorbance of the untreated control cells.

Statistical analysis

Data were plotted and analyzed using Prism 5.0 software (Graph Pad Software, CA). All results represent at least three independent experiments. Normality was determined by Shapiro-Wilks test. The data were analyzed using a nonparametric one-way Kruskal-Wallis test. Dunn's Multiple Comparison test was used as a post-test to compare samples within the dataset. Values of $p < 0.05$ (*) were considered significant, and values of $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***) were considered highly significant.

RESULTS

SNPs do not have cytotoxic effects on PBMCs and neutrophils

The cytotoxicity of 12 nm and 200 nm SNPs on PBMCs and neutrophils was assessed at different concentrations using the MTT reduction method (Figure 1). PBMCs exposed to 12 nm or 200 nm SNPs for 24 hours at concentrations of 1×10^2 , 1×10^3 and 1×10^4 ng/mL did not show any changes in cell viability. Similarly, 12 nm and 200 nm SNPs did not have a

significant cytotoxic effect on neutrophils at any concentration when cells were exposed for 8 hours.

SNPs induce IL-1 β and IL-6 release in PBMCs and neutrophils

The release of two proinflammatory cytokines after treatment with 12 nm and 200 nm SNPs was assessed in the culture supernatants of PBMCs. The results indicate that 200 nm SNPs induced the release of IL-6 at SNP concentrations above 1×10^4 ng/ml (Fig. 2); 12 nm SNPs induced the production of IL-1 β at SNP concentrations higher than 1×10^1 ng/ml, but only resulted in significant differences when compared to controls at concentrations higher than 1×10^4 ng/ml (Fig. 2). The 12 nm NPs also induced the release of IL-6 at concentrations above 1×10^2 ng/ml (Figure 2). Neutrophil stimulation with 12 nm and 200 nm SNPs did not result in the significant production of IL-1 β (Figure 3). IL-6 was only detected in neutrophils stimulated with 200 nm NPs at 1×10^4 ng/ml. Levels of IL-18 from PBMCs and neutrophils stimulated with 12 nm and 200 nm SNP were not detected (data not shown).

SNPs induce IL-1 β and IL-6 release in primed PBMCs and neutrophils

The activation of the NLRP3 inflammasome involves two specific signals; during the first (priming-signal), PAMPs such as LPS stimulate multiple signaling receptors and induce the expression of pro-IL-1 β , pro-IL-18 and NLRP3 (23,25). To generate a priming signal, PBMC and neutrophil cultures were primed with LPS (50 pg/ml, 2 h) before exposure to the SNPs for 4 h. When PBMCs were primed and then exposed to 12 nm or 200 nm SNPs (1×10^4 ng/ml), there was release of IL-1 β at higher levels than when the PBMCs were not primed (Fig. 4). IL-6 release was significantly elevated when PBMCs were exposed to 12

nm SNPs at a concentration of 1×10^4 ng/mL (Fig. 4). Levels of IL-18 from LPS-primed PBMCs stimulated with 12 nm and 200 nm SNPs were not detected (data not shown). IL-6 production in LPS-primed neutrophils was detected after stimulation with 1×10^4 ng/ml 200 nm SNPs (Figure 5), but not when exposed to any concentration of 12 nm NPs (data not shown). Levels of IL-1 β or IL-18 from LPS-primed neutrophils stimulated with 12 nm or 200 nm SNPs were not detected (data not shown).

SNPs induce the expression of NLRP3 inflammasome components and proinflammatory cytokines

Quantification of mRNA expression in PBMCs revealed that both 12 nm and 200 nm SNPs increased the mRNA of IL-6 and IL-1 β at two concentrations tested (1×10^4 and 1×10^3 ng/mL) in PBMCs. Likewise, the 200 nm SNPs administered at 1×10^4 ng/mL increased the expression of TLR2, TLR4, ASC, and NLRP3 (Fig. 6). The 12 nm SNPs administered at 1×10^3 ng/mL resulted in decreased expression of TLR4 and increased expression of NLRP3 (Fig. 6).

As shown in figure 7, both 12 nm and 200 nm SNPs increased the mRNA levels of TLR2, caspase-1, and IL-6 in neutrophils at both concentrations of SNPs evaluated (1×10^4 and 1×10^3 ng/mL). The 200 nm SNPs at 1×10^4 ng/mL increased the expression of ASC and IL-18 in neutrophils, and SNPs at a concentration of 1×10^3 ng/mL increased the mRNA levels of NLRP3 and IL-1 β . Although 12 nm SNPs increased the expression of NLRP3, IL-1 β and IL-18 at 1×10^4 ng/mL, only the IL-6 mRNA was increased at 1×10^3 ng/mL (Fig. 7).

DISCUSSION

SNPs have been used in nanobiotechnology for various applications, such as controlled drug/gene delivery matrices, biosensors, diagnostic imaging and tissue engineering (3,26). However, SNPs can induce immune responses affecting their safe use for human applications.

In these studies, we ensured that all experiments focused on measuring cytokine levels were conducted in non-cytotoxic conditions (Fig. 1). It has been previously reported that cytotoxic effects of SNPs appear at concentrations above 1×10^4 ng/mL in different cellular models (27–29). Similar to previous reports (20), our results provided evidence that both 12 nm and 200 nm SNPs induce the production of IL-1 β and IL-6 by PBMCs. However, SNPs do not induce detectable IL-18 production (as observed in response to microbial stimulation), likely due to low levels of this cytokine that cannot be detected by the ELISA test used (30,31). The induced cytokine levels could have an impact on individuals treated with SNPs, resulting in initiation of the innate immune response and also regulation of adaptive immunity (32,33).

Neutrophils are among the first immune cells to arrive at the site of inflammation, where they initiate a rapid, nonspecific, phagocytic response and the release of soluble mediators (34). However, our results indicate that 200 nm SNPs induce IL-6, but not IL-1 β or IL-18 production in our *in vitro* cellular model. These results suggest that in neutrophils, the inflammatory response after stimulation with the SNPs is not mediated through activation

of the inflammasome or IL-1 β /IL-18 production but through other mechanisms; the most likely mechanism of this response is the production of ROS, which has been implicated in the inflammation induced by many types of NPs of varying composition and structure (35,36). Neutrophils and other cells internalize NPs through phagocytosis, followed by ROS production via NADPH oxidase, leading to damage to the mitochondrial membrane and the release of its contents. ROS trigger an inflammatory cascade via activation of redox-sensitive MAPK and NF- κ B signaling pathways, and they also increase the transcription of multiple proinflammatory cytokines, including IL-1 β , IL-6, IL-18, and TNF- α (37–40). This is the most probable mechanism of transcription of IL-6 in cells stimulated with SNPs evaluated in our study.

Similar to others reports (5), our results indicate that the cytokine production after exposure to SNPs is dose-dependent, but contrary to reports from other groups (20,41), this response was not dependent on the size of the NPs. These contradictory findings suggest that various nanomaterials induce biological effects in response to differences in particle characteristics, but this response is also dependent on the cellular model evaluated, as indicated by our results.

Maturation of IL-1 β and IL-18 is strongly regulated by the NLRP3 inflammasome. Thus, even if pro-IL-1 β /18 protein is present on the cell, it cannot be released until NLRP3 inflammasomes are formed. After the correct assembly of NLRP3 inflammasomes, caspase-1 is activated and cleaves the pro-form of IL-1 β /18 to generate mature IL-1 β /18 (12,13). Therefore, we evaluated the expression of NLRP3 inflammasome components

after the cells were stimulated with SNPs. Our results provided evidence that SNPs induce expression of the inflammasome components (NLRP3, ASC, Casp-1) as well as IL-1 β , IL-6 and IL-18 in PBMCs and neutrophils in a dose-dependent manner.

The mechanism by which PBMCs and neutrophils recognize SNPs and then activate the NLRP3 inflammasome with the consequent release of IL-1 β and IL-18 is not fully understood. A recent report indicate that scavenger receptor B1 (SR-B1) is a silica receptor associated with canonical inflammasome activation associated with caspase-1-mediated inflammatory responses in mouse macrophages and human peripheral blood monocytes (42). Lately, different authors have reported that cathepsin B leakage after lysosomal rupture and the presence of cytoplasmic ROS play a crucial role in the activation of the NLRP3 inflammasome. However, it is unclear if these phenomena act separately or in a coordinated manner or how endosomal rupture occurs (5,15). Some studies have reported that SNPs activate NLRP3 inflammasomes after the generation of ROS, leading to IL-1 β release (14,43).

Some reports suggest that ROS trigger destabilization of the lysosomal membrane by lipid oxidation. Kojima and collaborators demonstrated that ATP released from the P2X7 receptor in response to the stimulation of KUP5 cells with SNPs induces ROS production via cell-membrane NADPH oxidase. The ROS activation of inflammasomes leads to caspase-1-dependent processing of IL-1 β (41).

On the other hand, some studies suggest that phagocyte membrane binding with particles may directly regulate NLRP3 inflammasome activity accompanied by K^+ efflux. The tension generated during particle binding changes the surface curvature and triggers ion channel opening. Recent papers reviewed a list of NLRP3 activators and identified K^+ efflux as an event common among them all; however, mechanisms of ion channel opening related to NLRP3 activation remain unclear (9).

Several studies regarding immunological studies with NPs have been conducted using macrophage cell lines, but not in PBMCs or neutrophils; it was recently reported, however, that macrophages differ in their mechanisms of inflammasome activation compared to other cells. The signals involved in inflammasome activation can be characterized as primers or activators of IL-1 β production. The priming signals include PAMPs such as LPS and trigger the synthesis of inactive pro-IL-1 β in macrophages via activation of TLRs, whereas elements such as K^+ efflux, ROS or lysosomal rupture are considered upstream of inflammasome activation. While macrophages require two signals to produce mature IL-1 β , monocytes and neutrophils constitutively express active caspase-1 and need only one signal for IL-1 β release (44,45). However, our study shows that in PBMCs, priming with LPS and then stimulating with SNPs results in greater production of IL-1 β than in non-primed cells (Figure 8).

In conclusion, our results demonstrate that SNPs induce the production of proinflammatory cytokines in a dose dependent manner and that this stimulation takes place independently of

NP size. In addition, these data suggest that the production and release of IL-1 β occurs through the formation of the NLRP3 inflammasome.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the donor individuals who participated in this study and the collaboration of the personnel from Grupo Inmunovirología.

REFERENCES

1. Jiao Q, Li L, Mu Q, Zhang Q, Jiao Q, Li L, et al. Immunomodulation of Nanoparticles in Nanomedicine Applications. *BioMed Res Int*. 2014:e426028.
2. Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64, Supplement:61–71.
3. Lee S, Yun H-S, Kim S-H. The comparative effects of mesoporous silica nanoparticles and colloidal silica on inflammation and apoptosis. *Biomaterials*. 2011;32(35):9434–43.
4. Slowing II, Vivero-Escoto JL, Wu C-W, Lin VS-Y. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008;60(11):1278–88.

5. Kusaka T, Nakayama M, Nakamura K, Ishimiya M, Furusawa E, Ogasawara K. Effect of Silica Particle Size on Macrophage Inflammatory Responses. PLoS ONE [Internet]. 2014 [citado el 17 de marzo de 2016];9(3). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3969333/>
6. Bhakta G, Sharma RK, Gupta N, Cool S, Nurcombe V, Maitra A. Multifunctional silica nanoparticles with potentials of imaging and gene delivery. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med.* 2011;7(4):472–9.
7. Luo Y-H, Chang LW, Lin P, Luo Y-H, Chang LW, Lin P. Metal-Based Nanoparticles and the Immune System: Activation, Inflammation, and Potential Applications *BioMed Res Int.* 2015:e143720.
8. Baron L, Gombault A, Fanny M, Villeret B, Savigny F, Guillou N, et al. The NLRP3 inflammasome is activated by nanoparticles through ATP, ADP and adenosine. *Cell Death Dis.* 2015;6(2):e1629.
9. Hari A, Zhang Y, Tu Z, Detampel P, Stenner M, Ganguly A, et al. Activation of NLRP3 inflammasome by crystalline structures via cell surface contact. *Sci Rep.* 2014;4:7281.
10. Guo H, Callaway JB, Ting JP-Y. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med.* 2015;21(7):677–87.
11. Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and Functions of Inflammasomes. *Cell.* 2014;157(5):1013–22.

12. Jin C, Flavell RA. Molecular mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *J Clin Immunol.* 2010;30(5):628–31.
13. Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(7):407–20.
14. Dostert C, Pétrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J. Innate Immune Activation Through Nalp3 Inflammasome Sensing of Asbestos and Silica. *Science.* 2008;320(5876):674–7.
15. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, et al. Silica crystals and aluminum salts mediate NALP-3 inflammasome activation via phagosomal destabilization. *Nat Immunol.* 2008;9(8):847–56.
16. Yue H, Wei W, Yue Z, Lv P, Wang L, Ma G, et al. Particle size affects the cellular response in macrophages. *Eur J Pharm Sci.* 2010;41(5):650–7.
17. Sandberg WJ, Låg M, Holme JA, Friede B, Gualtieri M, Kruszewski M, et al. Comparison of non-crystalline silica nanoparticles in IL-1 β release from macrophages. *Part Fibre Toxicol.* 2012;9:32.
18. Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(3):159–75.
19. Kruger P, Saffarzadeh M, Weber ANR, Rieber N, Radsak M, Bernuth H von, et al. Neutrophils: Between Host Defence, Immune Modulation, and Tissue Injury. *PLOS Pathog.* 2015;11(3):e1004651.

20. Breznan D, Das DD, O'Brien JS, MacKinnon-Roy C, Nimesh S, Vuong NQ, et al. Differential cytotoxic and inflammatory potency of amorphous silicon dioxide nanoparticles of similar size in multiple cell lines. *Nanotoxicology*. 2017;11(2):223–35.
21. Hernandez JC, St Laurent G, Urcuqui-Inchima S. HIV-1-exposed seronegative individuals show alteration in TLR expression and pro-inflammatory cytokine production ex vivo: An innate immune quiescence status? *Immunol Res*. 2016;64(1):280–90.
22. Giraldo DM, Hernandez JC, Velilla P, Urcuqui-Inchima S. HIV-1–neutrophil interactions trigger neutrophil activation and Toll-like receptor expression. *Immunol Res*. 2015;64(1):93–103.
23. Hernandez JC, Latz E, Urcuqui-Inchima S. HIV-1 Induces the First Signal to Activate the NLRP3 Inflammasome in Monocyte-Derived Macrophages. *Intervirology*. 2014;57(1):36–42.
24. Hernández JC, Stevenson M, Latz E, Urcuqui-Inchima S. HIV Type 1 Infection Up-Regulates TLR2 and TLR4 Expression and Function in Vivo and in Vitro. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012;28(10):1313–28.
25. Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, et al. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol Baltim Md* 1950. 2009;183(2):787–91.

26. Carturan G, Toso RD, Boninsegna S, Monte RD. Encapsulation of functional cells by sol-gel silica: actual progress and perspectives for cell therapy. *J Mater Chem.* 2004;14(14):2087-98.
27. Lin W, Huang Y, Zhou X-D, Ma Y. In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006;217(3):252-9.
28. Gómez-Gallego DM, Espinal-Correa CE, Ossa-Giraldo AC. Evaluación in vitro de la citotoxicidad y genotoxicidad de agregados de nanopartículas de sílice sintetizadas por el método sol-gel. *Biotechnol Apl.* 2015;32(1):1201-6.
29. Wu Y, Tang W, Wang P, Liu C, Yuan Y, Qian J. Cytotoxicity and Cellular Uptake of Amorphous Silica Nanoparticles in Human Cancer Cells. *Part Part Syst Charact.* 2015;32(7):779-87.
30. Vankayalapati R, Wizel B, Weis SE, Samten B, Girard WM, Barnes PF. Production of interleukin-18 in human tuberculosis. *J Infect Dis.* 2000;182(1):234-9.
31. El-mezzein REH, Matsumoto T, Nomiya H, Miike T. Increased secretion of IL-18 in vitro by peripheral blood mononuclear cells of patients with bronchial asthma and atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol.* 2001;126(2):193-8.
32. Dinarello CA. Interleukin 1 and interleukin 18 as mediators of inflammation and the aging process. *Am J Clin Nutr.* 2006;83(2):447S-455S.
33. Chen M, Wang H, Chen W, Meng G. Regulation of adaptive immunity by the NLRP3 inflammasome. *Int Immunopharmacol.* 2011;11(5):549-54.

34. Gonçalves DM, Chiasson S, Girard D. Activation of human neutrophils by titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles. *Toxicol In Vitro*. 2010;24(3):1002–8.
35. Manke A, Wang L, Rojanasakul Y. Mechanisms of Nanoparticle-Induced Oxidative Stress and Toxicity. *BioMed Res Int*. 2013;2013:e942916.
36. Sarkar A, Ghosh M, Sil PC. Nanotoxicity: oxidative stress mediated toxicity of metal and metal oxide nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol*. 2014;14(1):730–43.
37. Di Gioacchino M, Petrarca C, Lazzarin F, Di Giampaolo L, Sabbioni E, Boscolo P, et al. Immunotoxicity of nanoparticles. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2011;24(1 Suppl):65S–71S.
38. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2000;279(6):L1005–28.
39. Parnsamut C, Brimson S. Effects of silver nanoparticles and gold nanoparticles on IL-2, IL-6, and TNF- α production via MAPK pathway in leukemic cell lines. *Genet Mol Res GMR*. 2015;14(2):3650–68.
40. Khan HA, Abdelhalim M a. K, Alhomida AS, Al Ayed MS. Transient increase in IL-1 β , IL-6 and TNF- α gene expression in rat liver exposed to gold nanoparticles. *Genet Mol Res GMR*. 2013;12(4):5851–7.
41. Kojima S, Negishi Y, Tsukimoto M, Takenouchi T, Kitani H, Takeda K. Purinergic signaling via P2X7 receptor mediates IL-1 β production in Kupffer cells exposed to silica nanoparticle. *Toxicology*. 2014;321:13–20.

40. Yazdi AS, Guarda G, Riteau N, Drexler SK, Tardivel A, Couillin I, et al. Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1 α and IL-1 β . *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(45):19449–54.
41. Kojima S, Negishi Y, Tsukimoto M, Takenouchi T, Kitani H, Takeda K. Purinergic signaling via P2X7 receptor mediates IL-1 β production in Kupffer cells exposed to silica nanoparticle. *Toxicology*. 2014;321:13–20.
42. Tsugita M, Morimoto N, Tashiro M, Kinoshita K, Nakayama M. SR-B1 Is a Silica Receptor that Mediates Canonical Inflammasome Activation. *Cell Rep*. 2017;18(5):1298–311.
43. Yazdi AS, Guarda G, Riteau N, Drexler SK, Tardivel A, Couillin I, et al. Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1 α and IL-1 β . *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(45):19449–54.
44. Yang E-J, Choi I-H. Immunostimulatory Effects of Silica Nanoparticles in Human Monocytes. *Immune Netw*. 2013;13(3):94–101.
45. Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, Joosten LAB, Opitz B, van der Meer JHM, et al. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1 β in monocytes and macrophages. *Blood*. 2009;113(10):2324–35.

Table 1. Primers

Gen	Primers 5' - 3'	Annealing temperature
TLR2	Fw: GGCCAGCAAATTACCTGTGTG Rv: CCAGGTAGGTCTTGGTGTTC	63 °C
TLR4	Fw: CTGCAATGGATCAAGGACCA Rv: TCCCACTCCAGGTAAGTGTT	61 °C
IL-1β	Fw: CTTTGCCGATCCGCCGC Rv: ATCACGCCCTGGTGCCTGG	60 °C
IL-18	Fw: ATGGCTGCTGAACCAGTAGAAG Rv: CAGCCATACCTCTAGGCTGGC	62 °C
IL-6	Fw: ATTCGGTACATCCTCGAC Rv: GGGGTGGTTATTGCATC	56 °C
NLRP3	Fw: AGCACCAGCCAGAGTCTAAC Rv: CCCCAACCACAATCTCCGAAT	57 °C
ASC	Fw: AACCCAAGCAAGATGCGGAAG Rv: TTAGGGCCTGGAGGAGCAAG	62 °C
Caspasa-1	Fw: CAAGGGTGCTGAACAAGG Rv: GGGCATAGCTGGGTTGTC	60 °C
β-actina	Fw: ATCTGGCACCACACCTTCTACAATGAGCTGCG Rv: CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC	60 °C

FIGURES

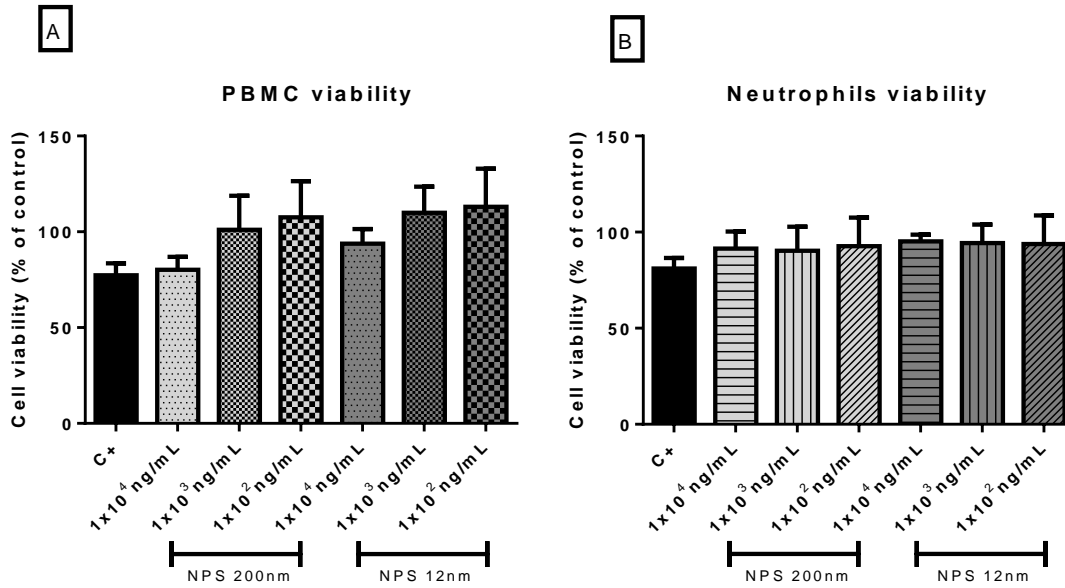


Figure 1. SNP do not have cytotoxic effect on PBMC and neutrophils. Figure 1. SNPs do not have cytotoxic effects in PBMCs and neutrophils. (A) PBMCs treated with 12 nm and 200 nm SNPs at 10^2 – 10^4 ng/mL for 24 hours and (B) Neutrophils treated with 12 nm and 200 nm SNPs at 10^2 – 10^4 ng/mL for 8 hours. C⁺: Positive control (DMSO).

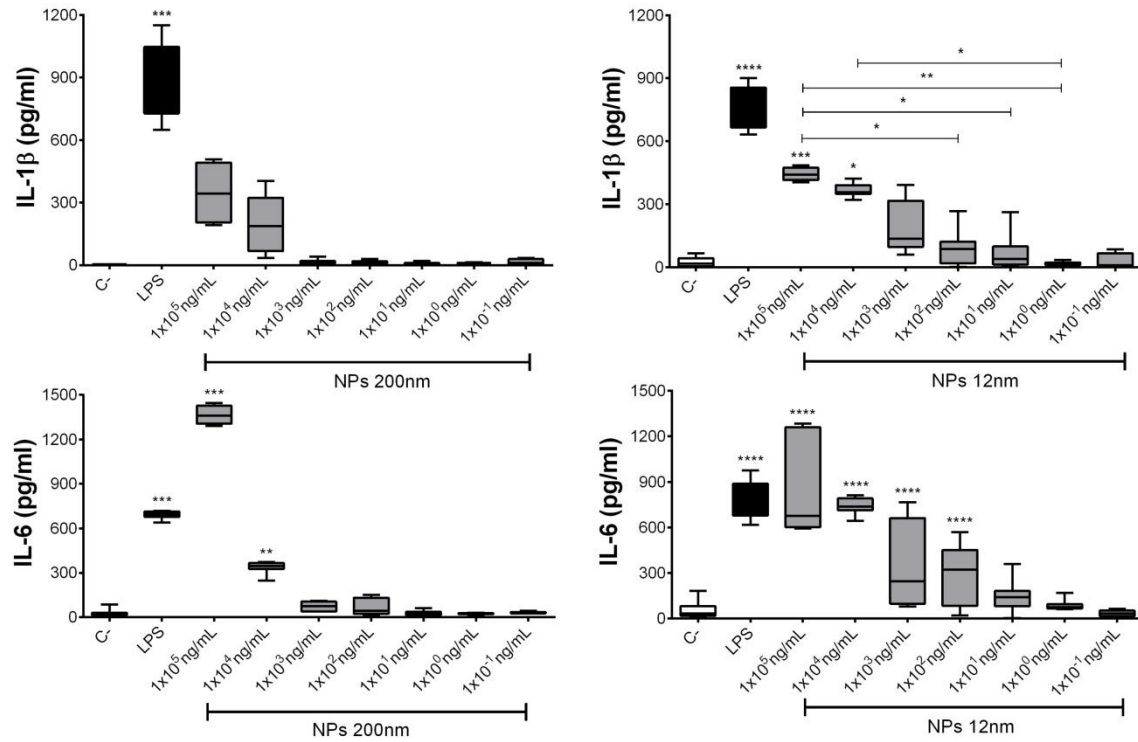


Figure 2. SNP induce IL-1 β and IL-6 release in PBMC. PBMCs were treated with SNPs overnight, and supernatant levels of IL-1 β and IL-6 were assessed by ELISA. Data represent the medians \pm IR of at least three independent experiments. Kruskal-Wallis analysis shows significance. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. * Represent statistical difference between treatment and negative control. *—* Represent statistical difference between the treatments. C⁻: Negative control (cells without treatment)

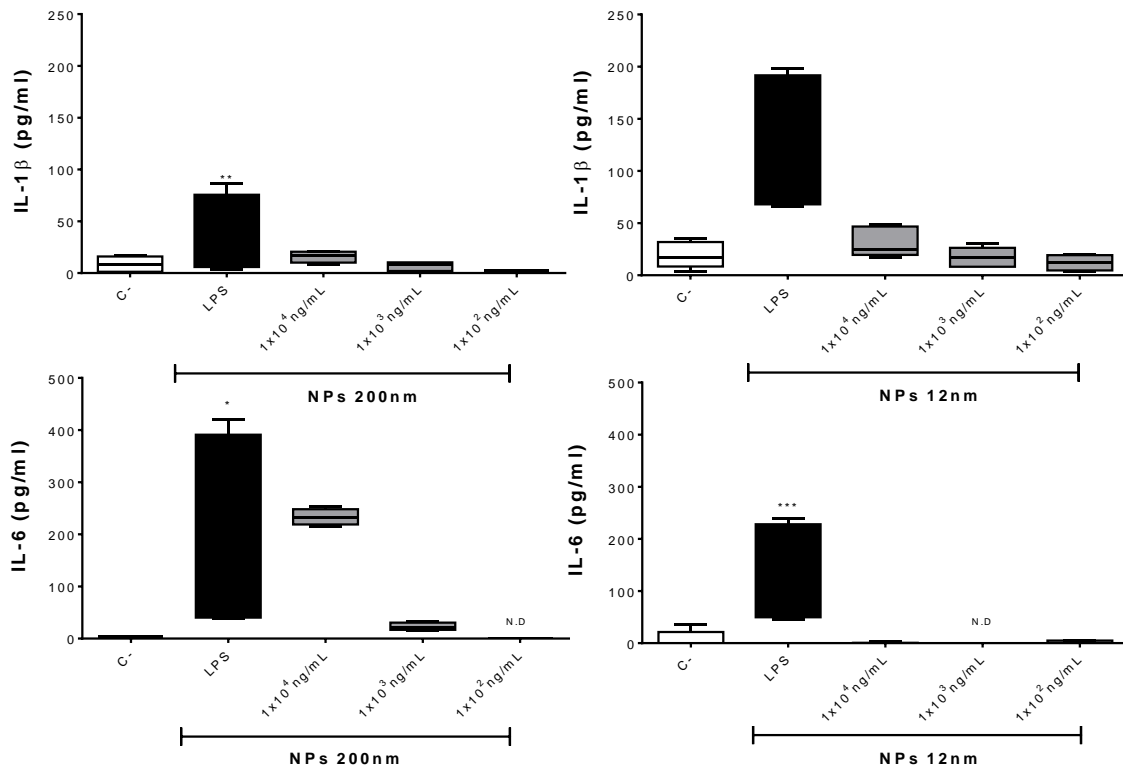


Figure 3. SNP induction of IL-1 β and IL-6 release in neutrophils. Neutrophils were treated with SNPs for 6 h, and supernatant levels of IL-1 β and IL-6 were assessed by ELISA. Data represent medians \pm IR of three independent experiments. Kruskal-Wallis analysis shows significance. * p <0.05, **<0.01, *** p <0.001. C⁻: Negative control (cells without treatment)

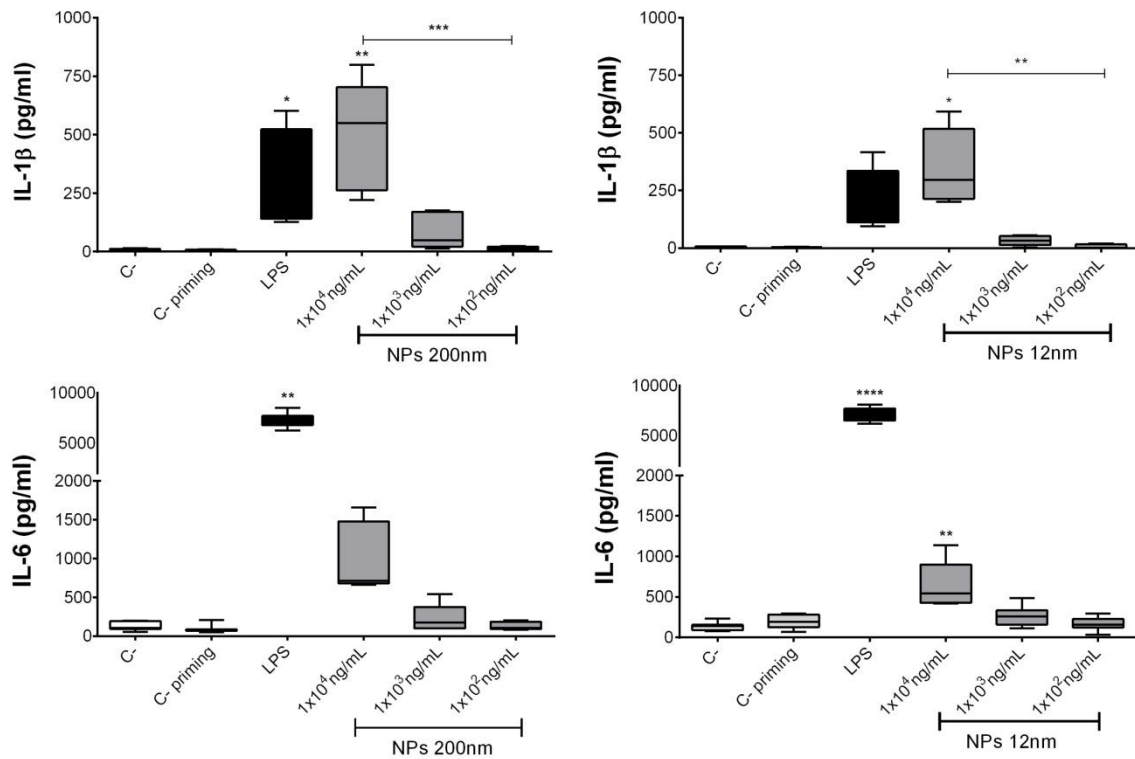


Figure 4. SNP induce IL-1 β and IL-6 release in primed PBMC. PBMC cultures were primed with LPS (50 pg/ml, 2 h) and then treated with SNPs (4 h). Supernatant levels of IL-1 β and IL-6 were assessed by ELISA. . Data represent medians \pm IR of three independent experiments. Kruskal-Wallis analysis shows significance. * p <0.05, **<0.01, *** p <0.001. * Represent statistical difference between treatment and negative control. _ * Represent statistical difference between the treatments. C⁻: Negative control (cells without treatment)

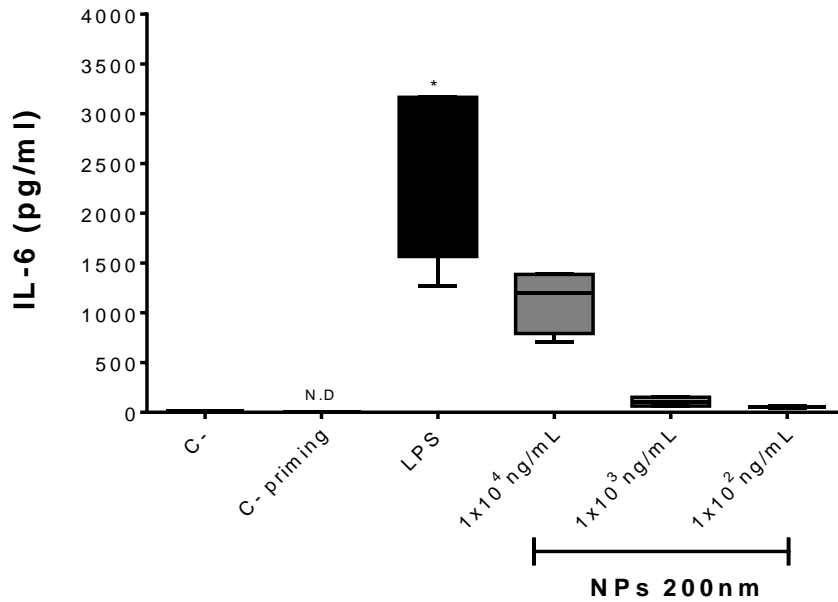


Figure 5. SNP induce IL-6 release in primed neutrophils. Neutrophils were primed with LPS (50 pg/ml, 2 h) and then treated with SNPs (4 h). Supernatant levels of IL-6 were assessed by ELISA. Data represent medians \pm IR of three independent experiments. Kruskal-Wallis analysis shows significance. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. C⁻: Negative control (cells without treatment)

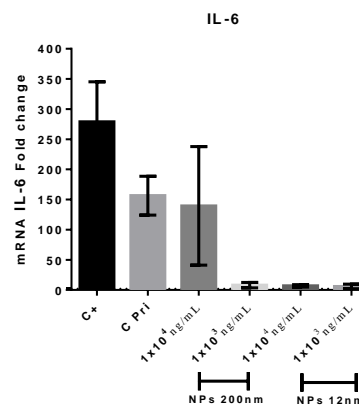
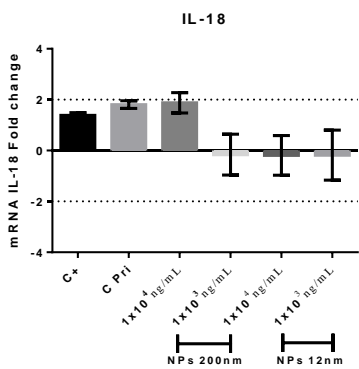
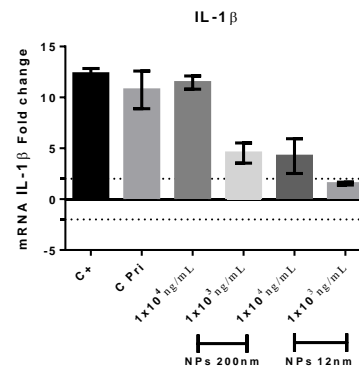
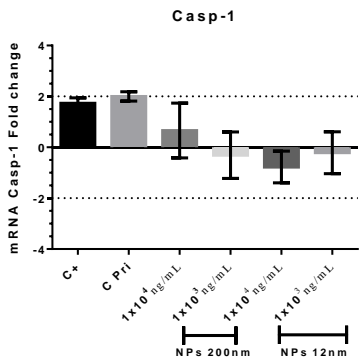
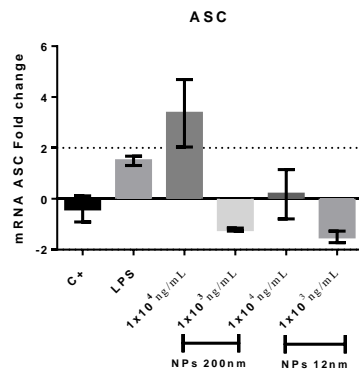
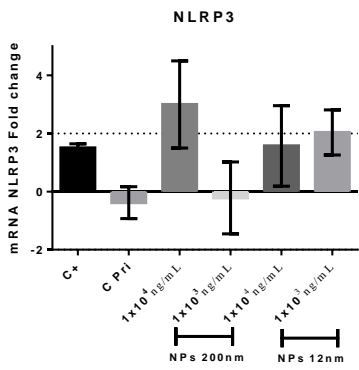
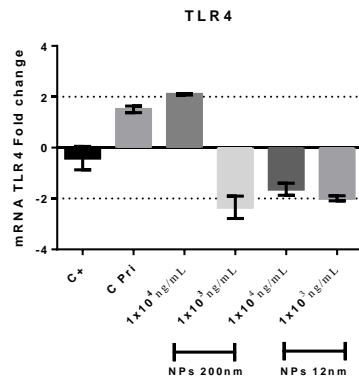
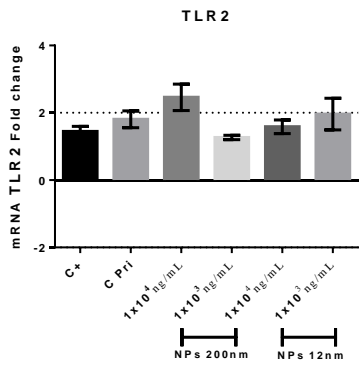


Figure 6. SNP induce the expression of the inflammasome NLRP3 components and proinflammatory cytokines in PBMC. Expression of TLR2, TLR4, NLRP3, ASC, caspase-1, IL-1 β , IL-18 and IL-6 genes in PBMCs stimulated for 4 h with 12 nm and 200 nm SNPs (1×10^4 and 1×10^3 ng/mL) analyzed by quantitative PCR. C⁺: Positive control (LPS 50ng/mL). C^{PR}: Priming Control (LPS 50pg/mL)

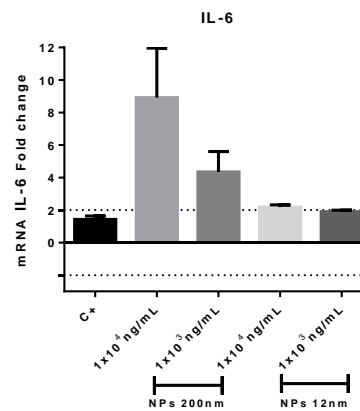
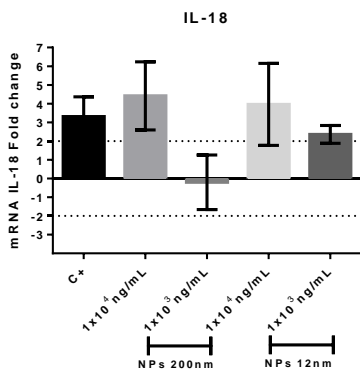
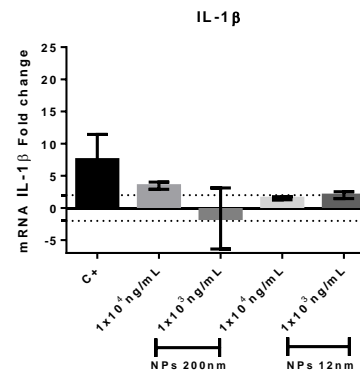
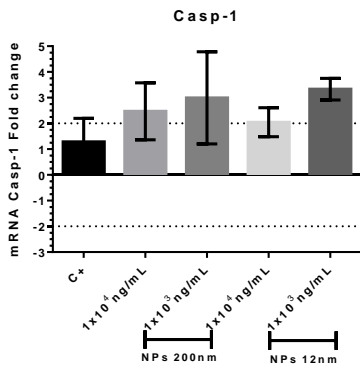
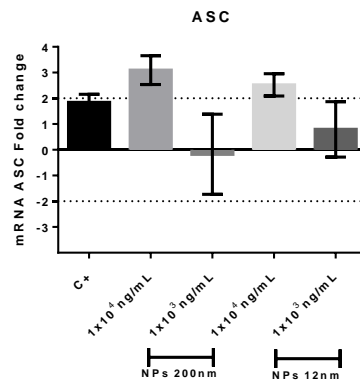
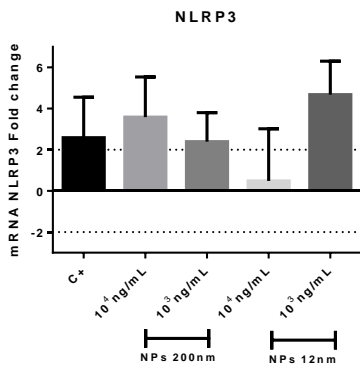
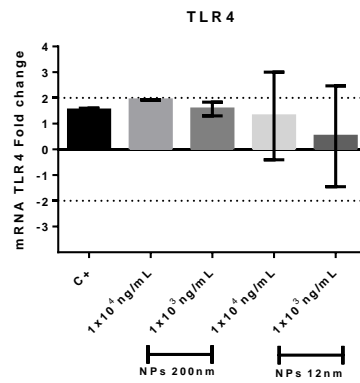
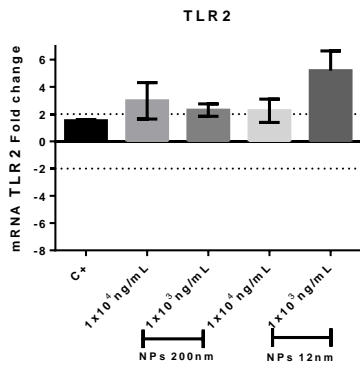


Figure 7. SNP induce the expression of the inflammasome NLRP3 components and proinflammatory cytokines in Neutrophils. Expression of TLR2, TLR4, NLRP3, ASC, Caspase-1, IL-1 β , IL-18 and IL-6 genes in Neutrophils stimulated for 4 h with 12 and 200nm silica nanoparticles (1×10^4 y 1×10^3 ng/mL) was analyzed by quantitative PCR. C⁺: Positive control (LPS 50ng/mL). C^{PR1}: Priming Control (LPS 50pg/mL)

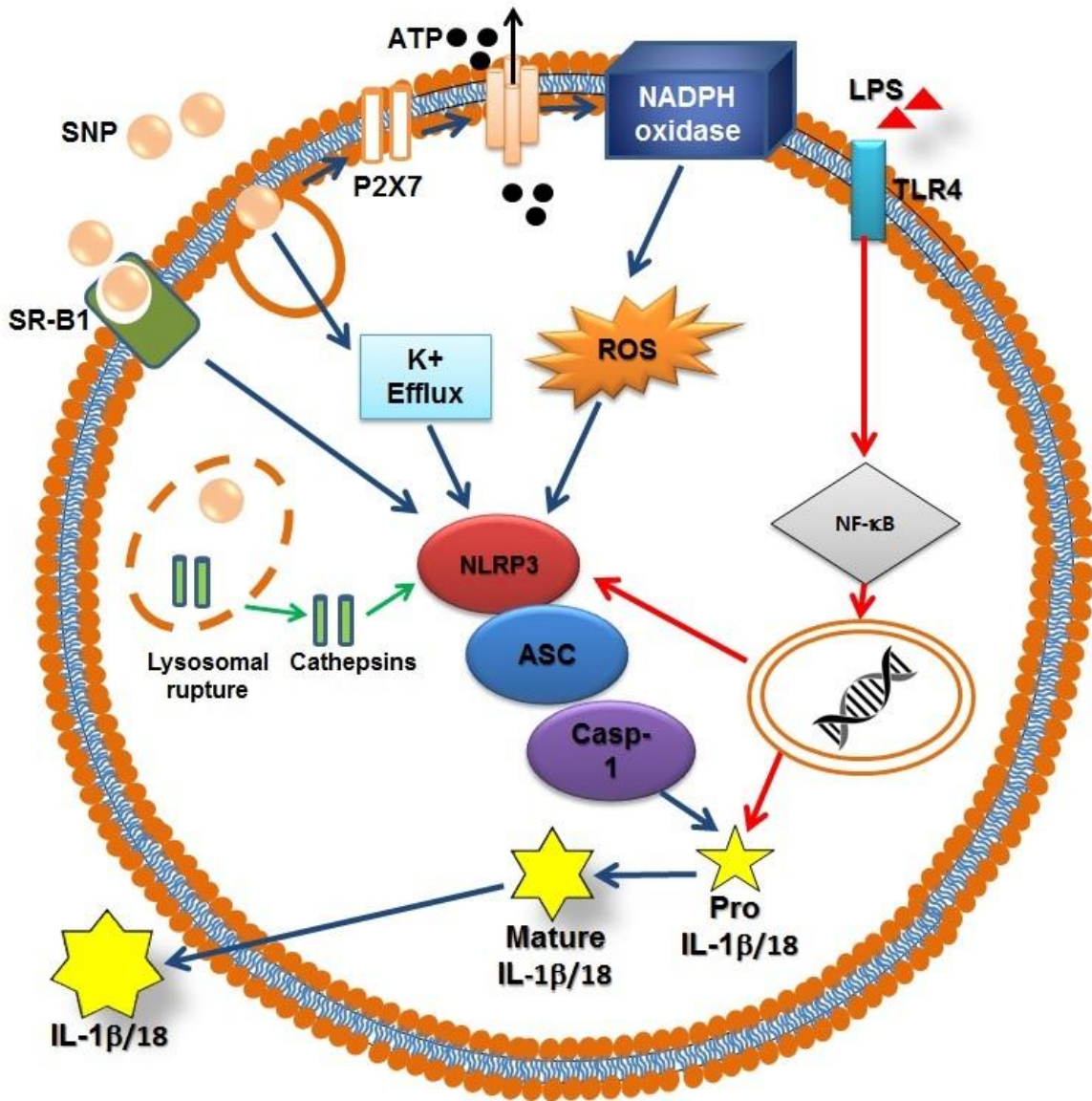


Fig. 8. Production of IL-1β and IL-18 in cells exposed to SNP. Signal 1 is provided by PAMPs (LPS) and leads to the upregulation of NLRP3 and pro-IL-1β/18 through the activation of the transcription factor NF-κB activation pathway. Signal 2 is provided by SNP that activates NLRP3 through lysosomal rupture, ROS or K⁺ efflux.

1. INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA 1: ESTANDARIZACIÓN DE TÉCNICAS Y CONDICIONES DE LOS EXPERIMENTOS

Con el fin de estandarizar las técnicas usadas en el estudio, así como las condiciones experimentales (condiciones de cultivo, concentraciones de los tratamientos, etc), se hicieron una serie de experimentos previos a los definitivos usando nanopartículas de sílice disponibles en el laboratorio.

Se muestran a continuación algunos de los resultados obtenidos de esta estandarización.

1.1. Estandarización de las condiciones de cultivo (densidad celular y concentración de los tratamientos) de PBMC para ELISA

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica siguiendo el protocolo de aislamiento y se sembraron 150.000 cel/pozo en 100uL de RPMI suplementado con SBF al 10%. En platos de cultivo de 96 pozos se sirvieron 5 tratamientos: C-, C+ (LPS 50ng/mL) y 3 concentraciones de NP (1×10^4 , 1×10^3 y 1×10^2 ng/mL). Se incubó toda la noche a 37°C, 5% CO₂. Después de la incubación se recogió el sobrenadante y se hizo ELISA con las siguientes interleuquinas: IL-6, IL-1 β , IL-8 y TNF- α

Resultados:

Los resultados mostrados en la figura suplementaria 1 A-D que las nanopartículas de sílice inducen la producción de citoquinas pro inflamatorias detectables por ELISA a las concentraciones evaluadas, por lo tanto se establecen estas condiciones para los experimentos posteriores.

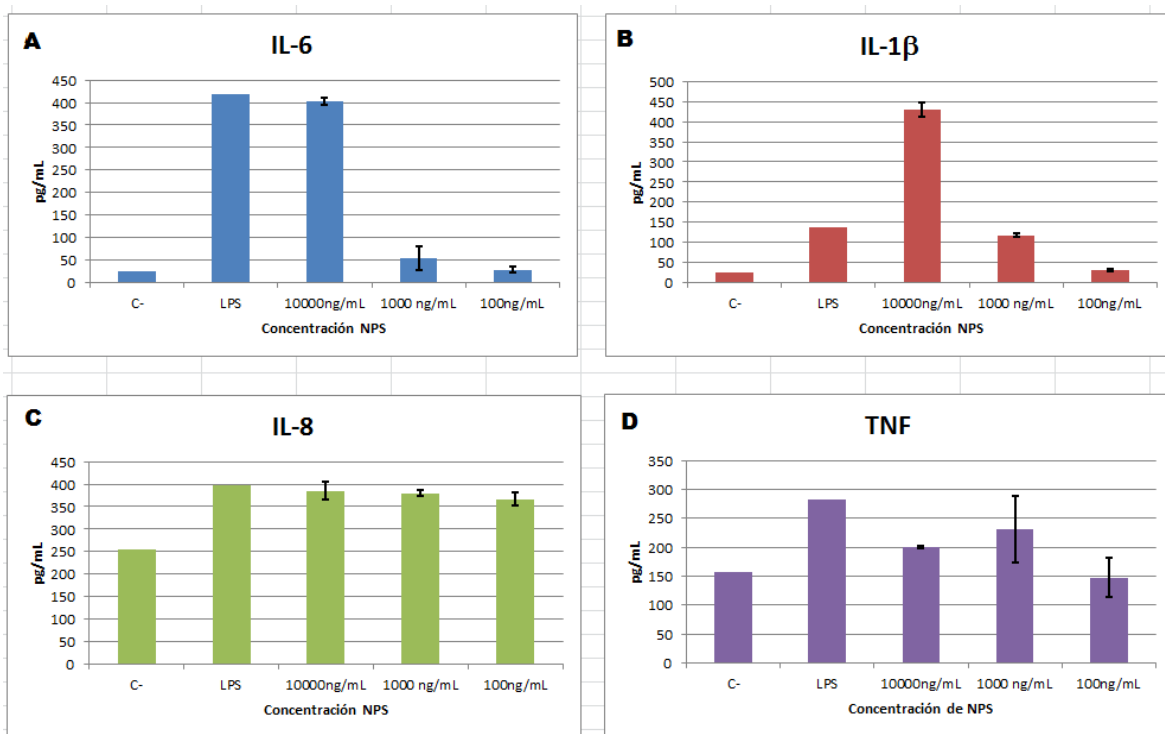


Figura suplementaria 1. Producción de: A. IL-6, B. IL-1 β , C. IL-18 y D. TNF- α en PBMC estimuladas con nanopartículas de sílice a diferentes concentraciones, medida por ELISA

1.2. Estandarización de las condiciones de cultivo (densidad celular y concentración de los tratamientos) de PBMC para análisis transcripcional.

Se aislaron PBMC de sangre periférica siguiendo el protocolo de aislamiento previamente descrito y se sembraron 1'000.000 cel/pozo en un volumen final de 1000uL de RPMI suplementado con SBF al 10%. Se sirvieron 4 pozos: C-, C+ (LPS 50ng/mL) y 2 concentraciones de NP (10^4 y 10^3 ng/mL) y se incubó durante 4 horas a 37°C, 5% CO₂. Luego de la incubación se separan las células y se lisan con buffer de lisis.

Se hace extracción de ARN según el protocolo de extracción del Kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) y posteriormente se hace PCR inversa usando 180ng de cada muestra para obtener cDNA según el protocolo del kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA). Así:

- Se hizo la siguiente mezcla:
 - RNA total : volumen para 180ng
 - Primer Random Hexámero: 1uL
 - Agua: hasta 12uL
 - Volumen total: 12uL
- Se incubó por 5' a 65°C
- Se adicionó la siguiente mezcla:
 - Buffer de reacción: 4uL
 - Inhibidor de RNAasa: 1uL
 - dNTPmix: 2uL
 - Transcriptasa reversa: 1 uL
 - Volumen total: 20uL
- Ciclo de amplificación:
 - 5' a 25°C
 - 60' a 42°C
 - 5' a 70°C
 - 30'' a 4°C

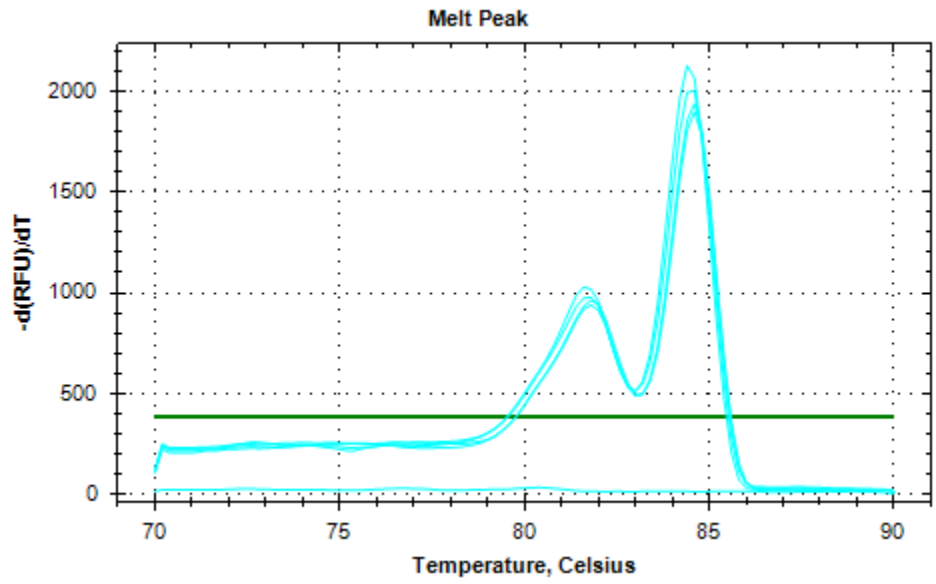
Con el cDNA obtenido se hace PCR en tiempo real de los genes que se evaluaron en el estudio. Para esto, se hace una amplificación con gradiente de temperatura, con el fin de

estandarizar las temperaturas de anillamiento y melting de cada uno de los primers de los genes (TLR2, TLR4, IL-1 β , IL-18, ASC, Caspasa-1, β -Actina y β 2 Microglobulina) en un volumen final de 15 μ L. Además de esto, Se hace análisis transcripcional de las amplificaciones obtenidas

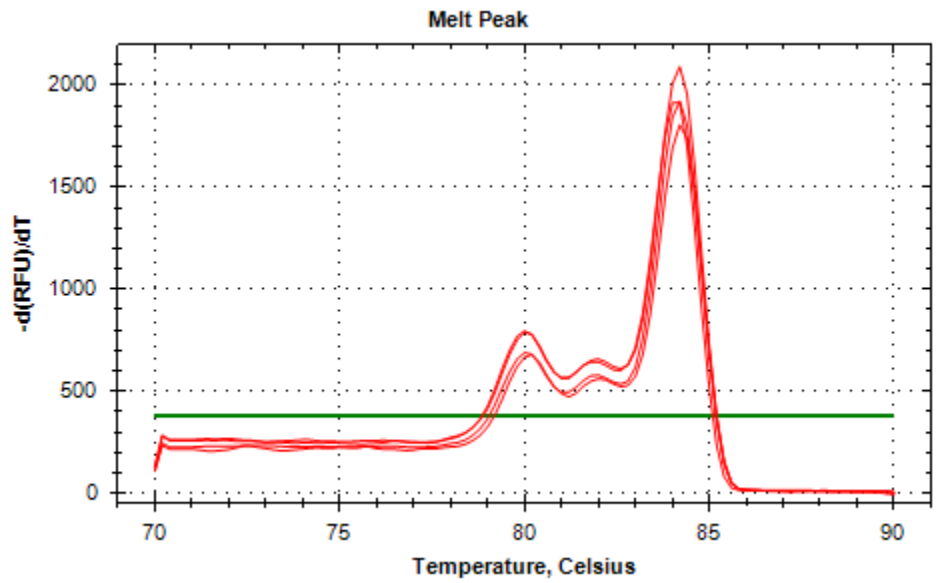
Resultados:

Tabla suplementaria 1. Cuantificación de ARN obtenido

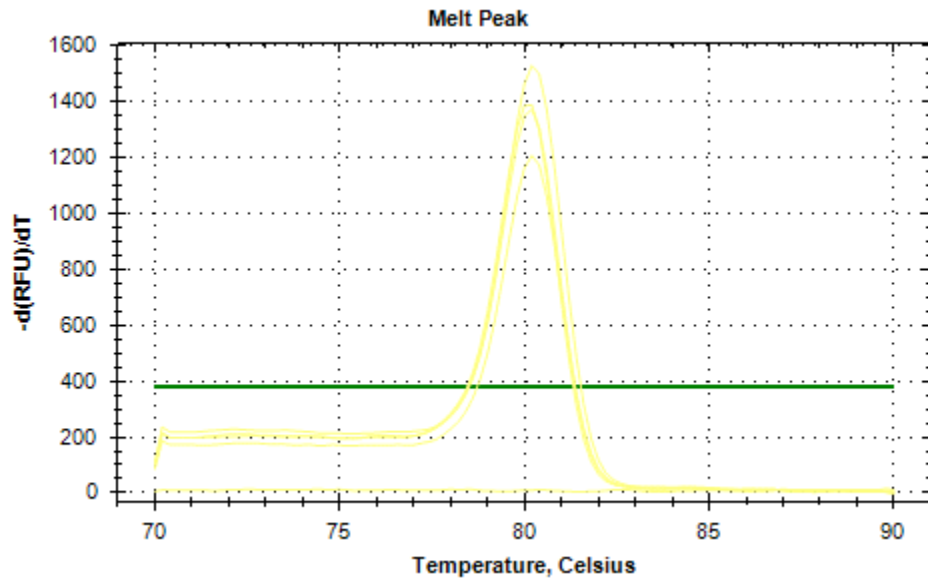
Muestra	ug/mL	260/280
C-	17,5	1,80
LPS	22,4	1,74
NP 1,0ug/mL	21,3	1,92
NP 10ug/mL	16,6	1,99



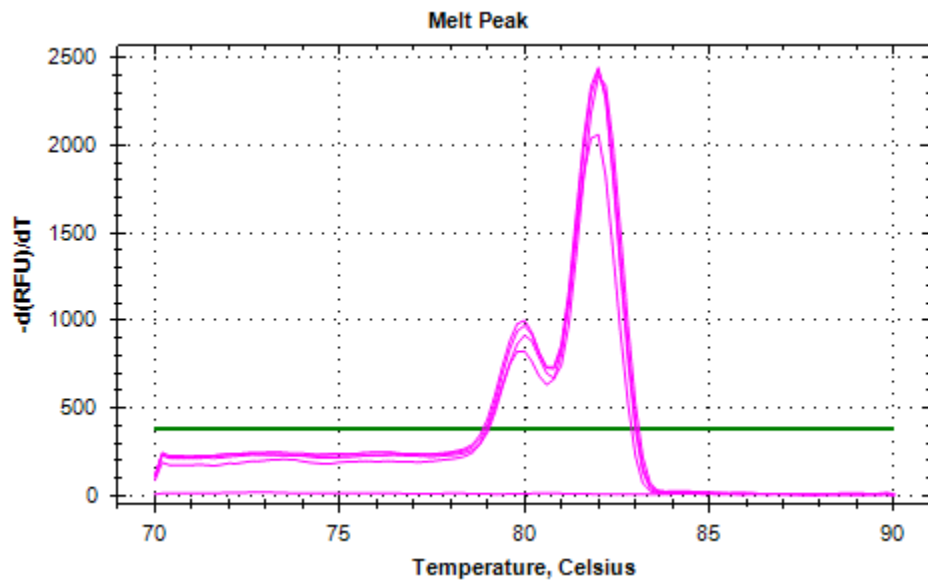
Gráfica suplementaria 1. Curva Melting gen 1L-1 β



Gráfica suplementaria 2. Curva Melting gen TLR2

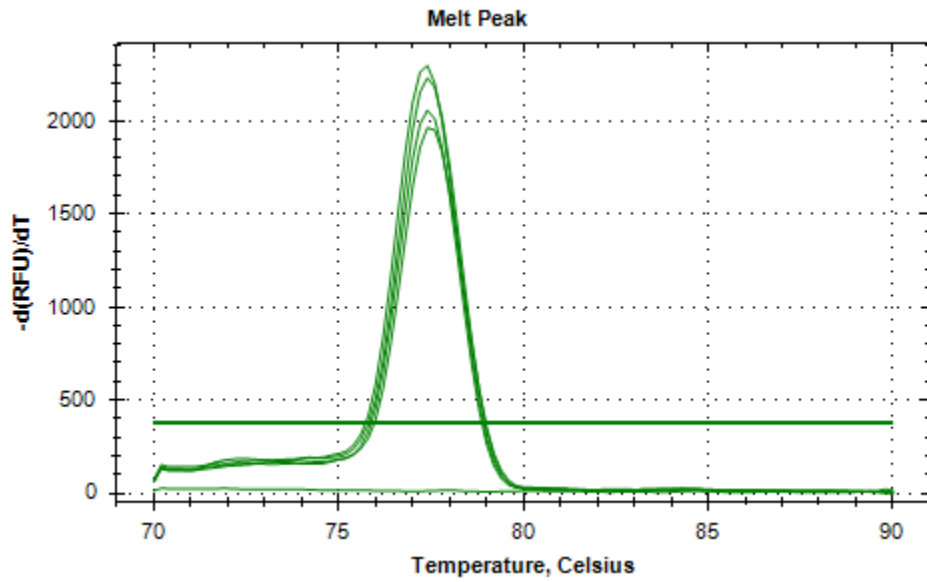
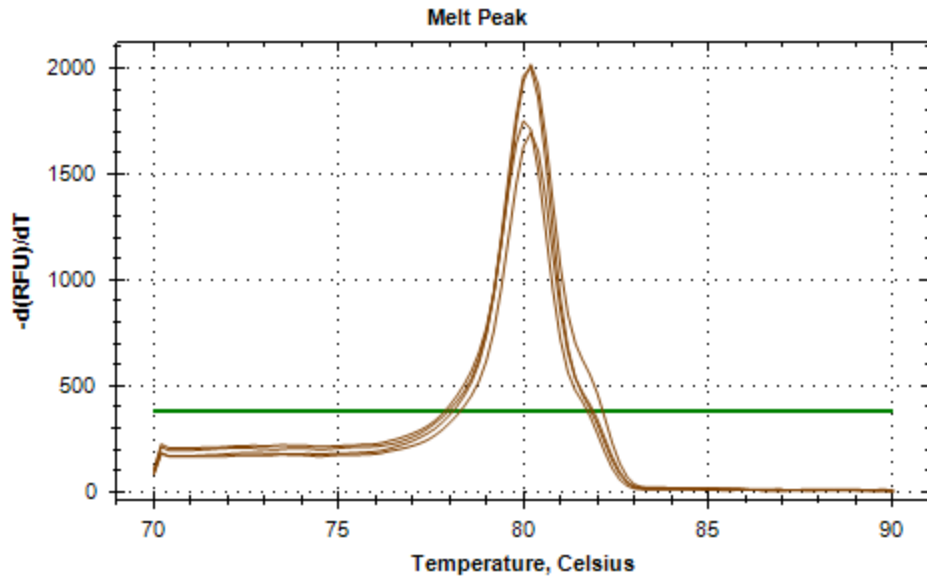


Gráfica suplementaria 3. Curva Melting gen ASC

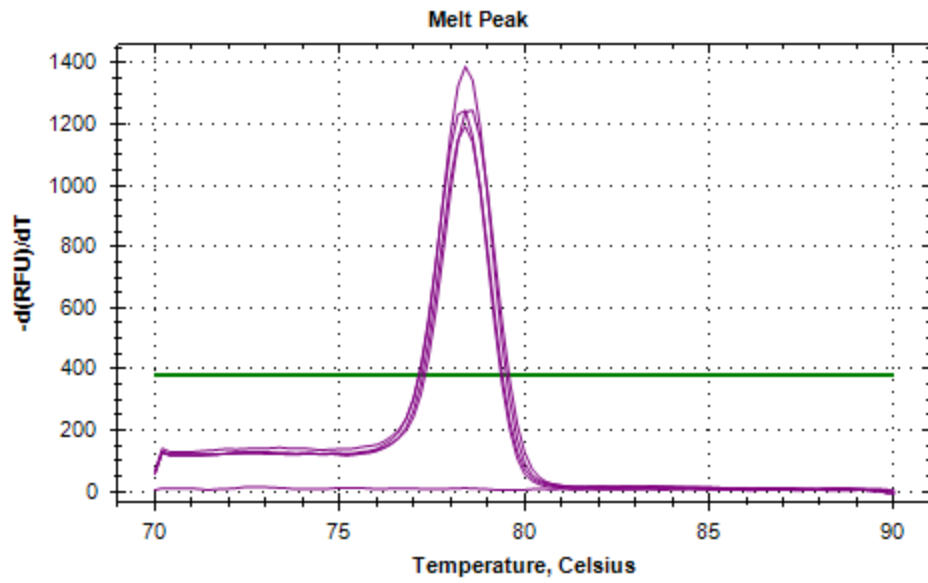


Gráfica suplementaria 4. Curva Melting gen TLR4

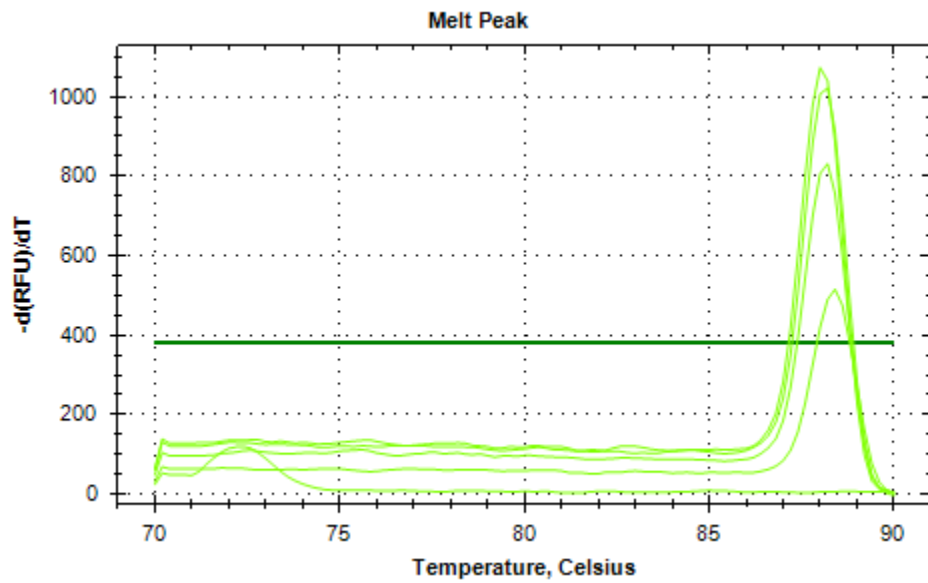
Gráfica suplementaria 5. Curva Melting gen Caspasa-1



Gráfica suplementaria 6. Curva Melting gen IL-18



Gráfica suplementaria 7. Curva Melting gen β 2-Microglobulina



Gráfica suplementaria 8. Curva Melting gen β -actina

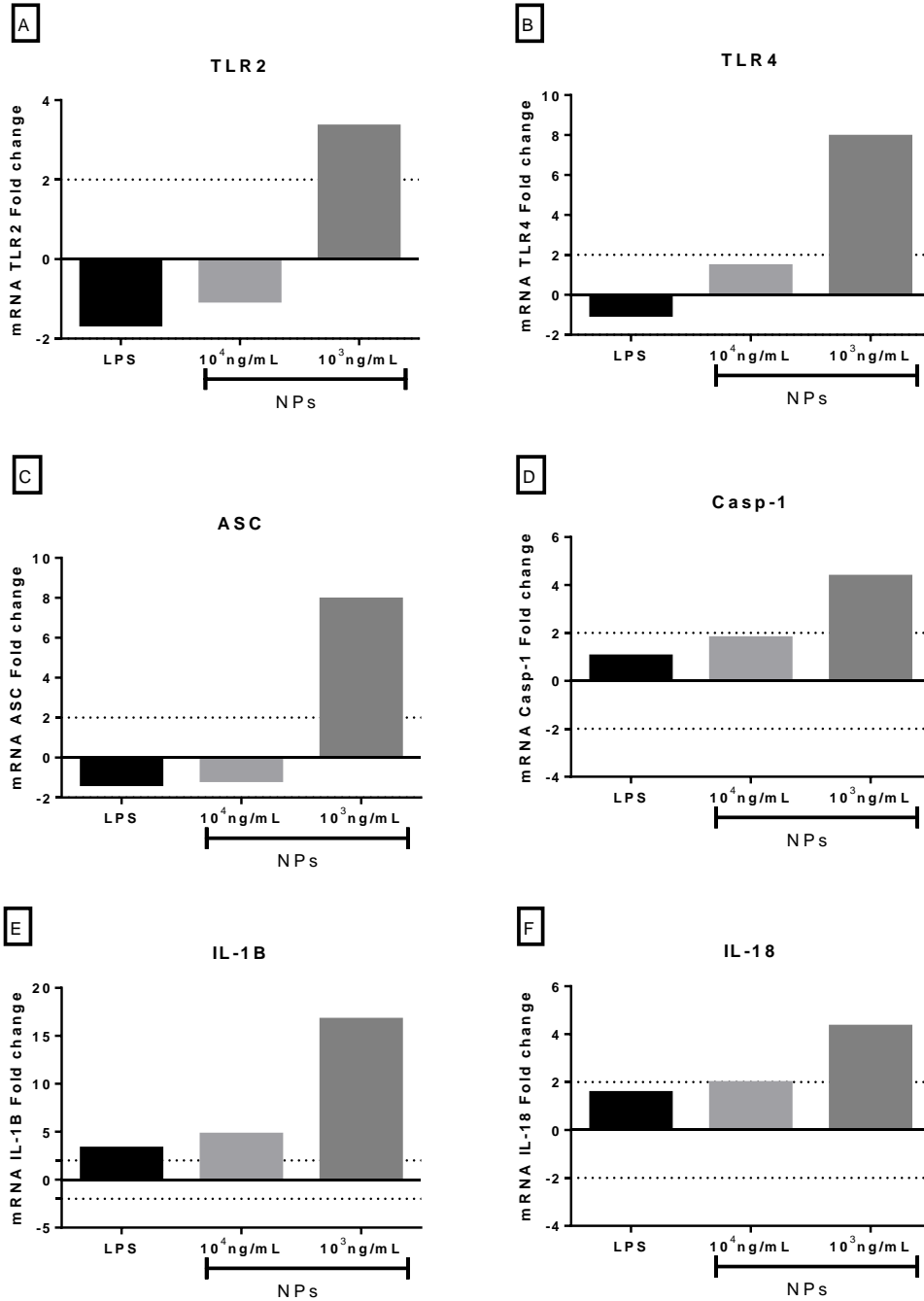


Figura suplementaria 2. Cuantificación de ARNm de PBMC estimulada con NP de sílice. La expresión de los genes TLR2, TLR4, ASC, Caspase-1, IL-1 β , IL-18 en PBMC estimuladas durante 4 horas con nanopartículas de sílice de (1x10⁴ y 1x10³ ng/ml) PCR.

1.3. Estandarización de las condiciones de aislamiento y cultivo de neutrófilos

Se extrajeron 8,0mL de sangre periférica en un tubo vacutainer tapa amarilla, de 1 sólo donante. Se aislaron NEUTRÓFILOS siguiendo el protocolo de aislamiento. Luego se hace conteo y prueba de viabilidad celular con azul de tripano y prueba de pureza con tinción de Wright. Para los cultivos, se sembraron 250.000 y 200.000 cel/pozo en 100uL de RPMI suplementado con SBF al 10% e incubadas a 37°C, 5% CO₂ por tiempos entre 0 y 6 horas, evaluando viabilidad celular y producción basal de interleuquina 6 en los sobrenadantes por ELISA.

Resultados

Aislamiento:

- Viabilidad: 90%
- # Células: 7'000.000
- Pureza: 94%

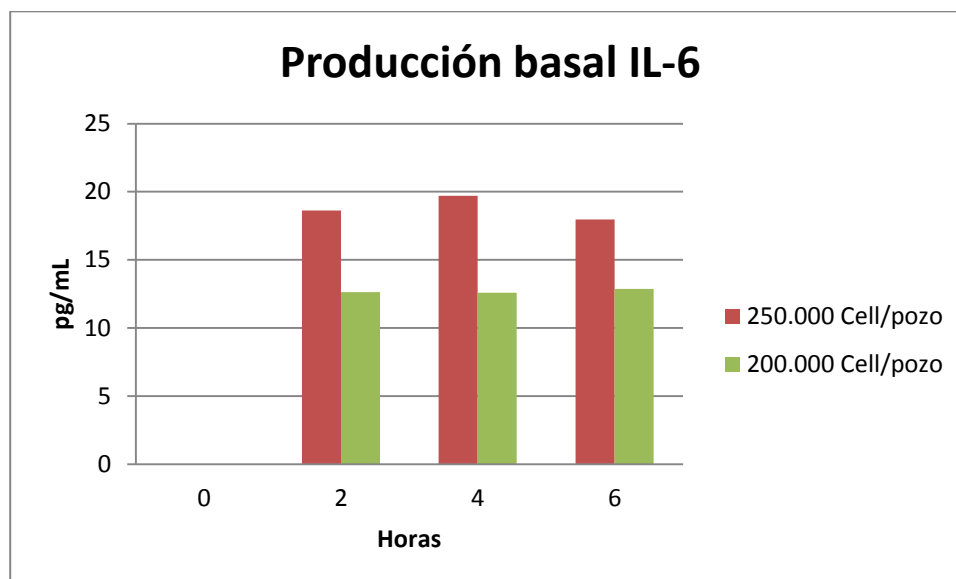
Los resultados mostrados en la tabla suplementaria 2 muestran que los neutrófilos mantienen una buena viabilidad celular (mayor al 90%) durante las 4 primeras horas de cultivo, a partir de ahí la viabilidad empieza a disminuir, por lo que se concluye que en los experimentos posteriores con neutrófilos los cultivos se harán durante 4 horas.

De la cuantificación de la IL-6 (Gráfica suplementaria 10) en los diferentes tiempos y para las dos concentraciones celulares evaluadas se observa que sólo hay diferencia significativa entre el tiempo 0 y los demás tiempos, pero al incrementar el tiempo de cultivo, no incrementa la producción de IL-6. Sin embargo, la producción de citoquina es mayor

cuando la concentración células es de 250.000cel/mL a cualquier tiempo, por lo que se decide que la concentración óptima para cultivar los neutrófilos es de 200.000cel/mL

Tabla suplementaria 2. Viabilidad de neutrófilos cultivados durante diferentes tiempos

Tiempo	200.000 cel/pozo	250.000 cel/pozo
0 Horas	83%	90%
2 Horas	90%	100%
4 Horas	96%	97%
6 horas	76%	78%



Gráfica suplementaria 10. Producción basal de IL-6 en neutrófilos cultivados

2. INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA 2: EFECTO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE EN LA FORMACIÓN DE NETs

Los neutrófilos median su actividad antimicrobiana a través de la fagocitosis, la degranulación y la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs, *neutrophil extracellular traps*). Las NETs actúan para atrapar y degradar los patógenos, y están compuestas de ADN extracelular, histonas y proteínas granulares, incluyendo α -defensinas y catelicidina (1). Aunque son importantes en la defensa del huésped, la producción y persistencia excesivas de las NETs se asocia con numerosas enfermedades inflamatorias crónicas (2) Las NETs contribuyen en gran medida a la defensa inmune, tanto innata como adaptativa y estudios previos revelaron que la generación y activación de NETs no sólo causa inflamación mediada por patógenos, sino también inflamación estéril (3), por ejemplo cuando los neutrófilos se ponen en contacto con nanomateriales (4–6). Por lo anterior se evaluó el potencial de las nanopartículas de sílice de 12 y 200nm para inducir la formación de NETs como marcador de la actividad de los neutrófilos.

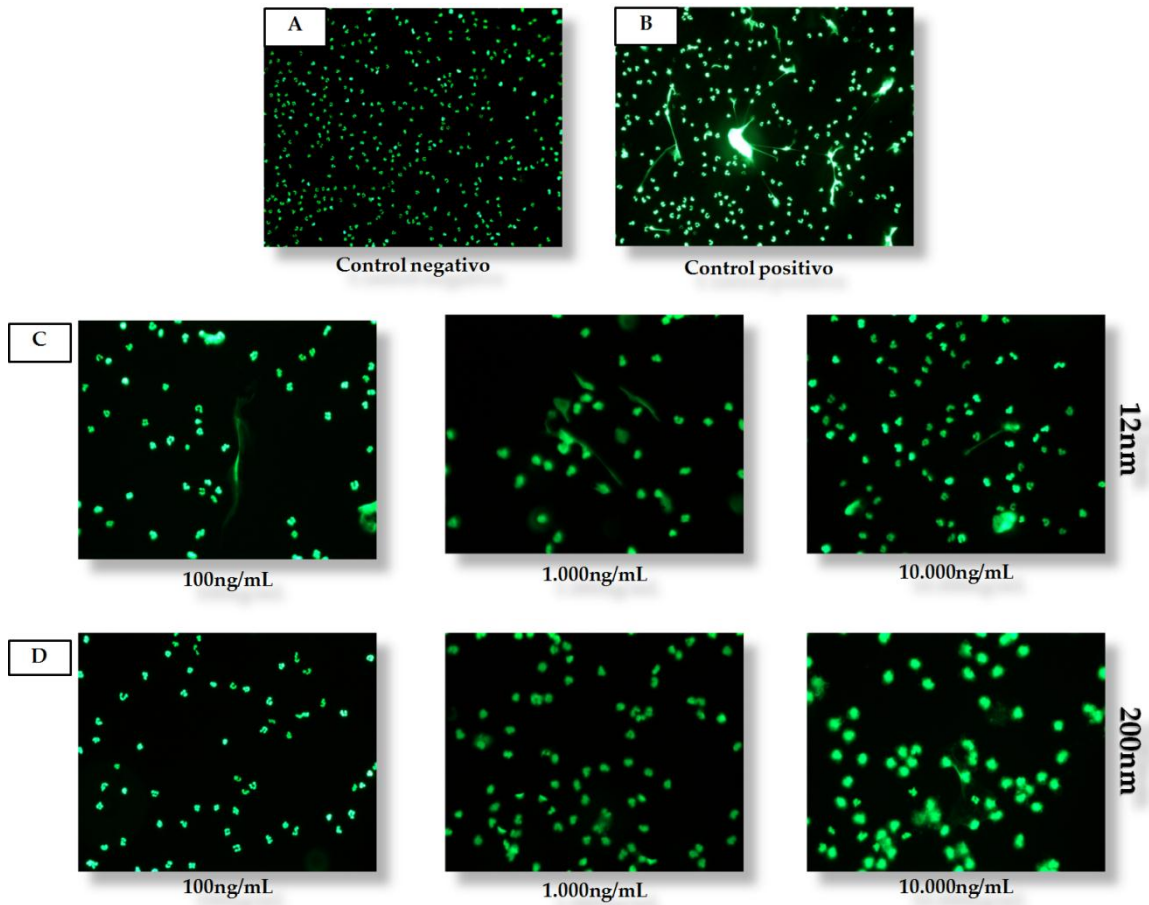
2.1. Materiales y métodos

Para la evaluación de NETs se hizo extracción de neutrófilos según el protocolo previamente descrito. Se sembraron 500.000cel/mL en un volumen final de 1mL en placas de 6 pozos en las que se colocaron cubreobjetos redondos (12mm de diámetro). Luego se trataron las células con PBS 1X que contenía nanopartículas de 12nm o 200nm a las concentraciones a evaluar (100, 1.000 y 10.000ng/mL), se usó 100ng de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, *Phorbol Myristate Acetate*) como control positivo y células sin ningún tratamiento como control negativo. Se incubó a 37°C en ambiente de 5% de CO₂

durante 3 horas, terminado este tiempo se descartó el exceso de células y estímulo que no se adhirieron al cubreobjetos y se realizaron 2 lavados con PBS 1X, se fijaron las NETs con paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente durante 20 minutos y se realizaron otros 2 lavados. Posterior a esto, se adicionó 1mL de solución de Sytox Green durante 15 minutos para hacer la tinción, se realizaron 2 lavados con PBS para eliminar el exceso y se observaron las NETs en un microscopio de fluorescencia utilizando los filtros correspondientes (los cubreobjetos se colocaron de manera invertida sobre una gota de PBS contenida sobre un portaobjetos)

2.2. Resultados

El análisis por microscopía de fluorescencia muestra núcleos verdes normales en los neutrófilos sin tratamiento como se ilustra en el Supl. 1A. Los neutrófilos se activaron con PMA y se monitorizaron a las 3 h, como se muestra en la Supl. 1B. La incubación de los neutrófilos con nanopartículas de sílice llevó a una cierta pérdida de lóbulos y expansión de los núcleos, lo que indica una posible citotoxicidad y formación NETs, que fue más marcada para las nanopartículas de 12nm y dependiente de la concentración Supl. 1C y 1D.



Suplemento 1. Efectos de las nanopartículas de sílice en la formación de NETs examinada con microscopía de fluorescencia y tinción con Sytox Green. **A.** Control negativo (PBS). **B.** Control positivo (PMA). **C.** NP de 12nm. **D.** NP de 200nm

REFERENCIAS

1. Wright TK, Gibson PG, Simpson JL, McDonald VM, Wood LG, Baines KJ. Neutrophil extracellular traps are associated with inflammation in chronic airway disease. *Respirology*. 2016;21(3):467–75.
2. Lande R, Ganguly D, Facchinetti V, Frasca L, Conrad C, Gregorio J, et al. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med*. 2011;3(73):73ra19.
3. Cui B-B, Tan C-Y, Schorn C, Tang H-H, Liu Y, Zhao Y. Neutrophil extracellular traps in sterile inflammation: the story after dying? *Autoimmunity*. 2012;45(8):593–6.
4. Hwang T-L, Aljuffali IA, Hung C-F, Chen C-H, Fang J-Y. The impact of cationic solid lipid nanoparticles on human neutrophil activation and formation of neutrophil extracellular traps (NETs). *Chem Biol Interact*. 2015;235:106–14.
5. Goncalves DM, de Liz R, Girard D. Activation of Neutrophils by Nanoparticles. *ScientificWorldJournal*. 2011;11:1877–85.
6. Hwang T-L, Hsu C-Y, Aljuffali IA, Chen C-H, Chang Y-T, Fang J-Y. Cationic liposomes evoke proinflammatory mediator release and neutrophil extracellular traps (NETs) toward human neutrophils. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2015;128:119–26.



V Escuela NanoAndes: Nanobiotecnología Micronanoelectrónica



Association
Puya de
Raimondi

El comité organizador otorga el presente certificado a:

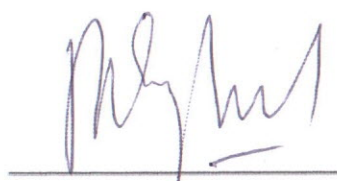
Diana Gómez



Por su participación tanto en las sesiones teórico– prácticas, con una duración de 40 h y presentación de póster, realizadas durante los eventos de la V Escuela NanoAndes - 2015, del 23 al 27 de Noviembre, en el Centro Nacional de Alta Tecnología, San José, Costa Rica.


Dr. José Roberto Vega Baudrit
Director

LANOTEC - CeNAT


Dr. Robert Baptist
Consejero Científico

CEA-LETI



Universidad Cooperativa
de Colombia

Certifica que

DIANA MAYORY GÓMEZ

Participó como ponente en

**VIII Jornadas
Nacionales
de Investigación**

“La paz necesita una economía más solidaria”

Con una intensidad de **4** horas

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA DE LAS
NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE, SOBRE COMPONENTES DE LA INMUNIDAD INNATA.**

Ponencia

Alba Luz Muñoz Restrepo

Directora sede Medellín

Nidia Albeny Rodríguez Tamayo

Coodinador (a) del Centro de
Investigación