

Las Nanopartículas supermagnéticas de óxido de hierro con revestimiento de poliacrilato (NPOHA), efecto sobre macrófagos humanos infectados con *Listeria monocytogenes*

Juan Pablo Gallo Garzón

Trabajo de investigación para optar por el título de Biólogo

Asesor

Mauricio Rojas López

Cotutora

Ana María Daza Zapata

Universidad de Antioquia

Facultad de ciencias exactas y naturales

Instituto de Biología

El Carmen de Viboral

2020

Tabla de contenido

Abreviaturas.....	4
Resumen	5
Introducción	7
Materiales y métodos	11
Materiales.....	11
Obtención de las nanopartículas.....	11
Muestreo.....	11
Obtención y cultivo de los fagocitos mononucleares.....	12
Ensayo de exposición de fagocitos mononucleares a nanopartículas y <i>L. monocytogenes</i>	13
Medición de citoquinas y quimioquinas en sobrenadantes de los cultivos de fagocitos mononucleares expuestos a nanopartículas e infectados con <i>L. monocytogenes</i>	13
Tinción de bacterias con SYTO 9 Green	14
Análisis estadístico.....	14
Resultados.....	15
Crecimiento intracelular de listeria en presencia de NPOHA	15
Unión e internalización de <i>L. monocytogenes</i> en macrófagos expuestos a NPOHA.....	15
Expresión y acumulación de interleuquinas.....	15
Crecimiento extracelular de listeria en presencia de NPOHA.....	16
Discusión y conclusiones.....	17

Agradecimientos.....	20
Tablas y leyendas.....	21
Figuras y leyendas.....	22
Referencias.....	25

Abreviaturas

1. AMCyAn: anticuerpos murinos para CD45
2. ANOVA: análisis de varianzas
3. BHI: caldo de infusión de cerebro y corazón
4. CBA: arreglo de perlas citométrico
5. DNA: ácido desoxirribonucleico
6. FITC: isotiocianato de fluoresceína
7. g: gravedad
8. IC: intervalo de confianza
9. IL: interleuquina
10. MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos 1
11. MOI: multiplicidad de infección
12. NPOHA: nanopartículas de óxido de hierro recubiertas de poliacrilato de sodio,
13. OD: densidad óptica
14. PBS: solución salina tamponada con fosfato
15. PeCy7: estreptavidina-Ficoeritrina / Cy7
16. ROS: especies reactivas de oxígeno, IONS: nanopartículas de óxido de hierro.
17. RPMI: instituto Conmemorativo de Roswell Park
18. SBF: suero bovino fetal
19. Syto: tinción fluorescente de ácido nucleico
20. TNF: factor de necrosis tumoral
21. UFC: unidades formadoras de colonias

RESUMEN

Las células fagocíticas mononucleares, monocitos y macrófagos, tienen amplia participación en los procesos de inflamación, su resolución y en la orquestación y regulación de la respuesta adaptativa. Los monocitos han sido clasificados en tres subpoblaciones según la expresión del CD14 y el CD16. Tienen elevada plasticidad funcional en la eliminación de microorganismos y en procesos angiogénicos. Se ha considerado que el uso extracorpóreo de nanopartículas supermagnéticas de óxidos ferrosos podría evidenciar y caracterizar los infiltrados mononucleares en sitios en los que se requería acceder mediante procedimiento invasivos como biopsias, lavados broncoalveolares o, en algunos casos dada su complejidad, se hacen quirófanos como las biopsias estereotáxicas.

En el Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética (GICIG) se han hecho estudios con Nanopartículas recubiertas con poliacrilato de sodio (NPOHA). Estos estudios que incluyen los efectos sobre células mononucleares de sangre periférica no han mostrado que no afectan las respuestas a mitógenos y antígenos como el toxoide tetánico ni su capacidad de activar linfocitos T CD4 y CD8, pero sí reducen su capacidad de remoción de células apoptóticas y la agregación plaquetaria.

Tratando de ampliar y comprender el impacto putativo de las NPOHA sobre los fagocitos mononucleares, este trabajo se enfocó en evaluar los efectos sobre la respuesta efectora de macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica, expuestos a las NPOHA e infectados con *Listeria monocytogenes*.

Las NPOHA no tuvieron actividad directa sobre *L. monocytogenes* y, aunque no hubo efecto sobre el crecimiento intracelular de *L. monocytogenes*, en presencia de las NPOHA se observó reducción en la unión e internalización de la bacteria. Los incrementos en los niveles de IL6, IL8, pero no TNF α , inducidos por la infección fueron menores en los fagocitos expuestos a NPOHA. Si la menor internalización de bacterias, con la menor producción de citoquinas en presencia de NPOHA es consecuencia de una mayor replicación dentro del ambiente intracelular, requiere más evidencia, como el estudio de la replicación bacteriana

en función del tiempo, la evaluación del escape putativo del fagolisosoma en presencias de las nanopartículas, entre otros mecanismos que no se exploran en este trabajo.

Palabras clave: NPOHA, *Listeria monocytogenes*, macrófagos, efecto.

INTRODUCCIÓN.

El sistema de fagocitos mononucleares desempeña papeles esenciales en el mantenimiento de la homeostasis tisular en condiciones basales, así como en la orquestación y la génesis de la inflamación y su resolución, la respuesta adaptativa y su regulación (6,7). Se reconoce que los macrófagos tisulares se forman en el saco embrionario y se localizan en los tejidos antes del nacimiento (8) y, a lo largo de la edad adulta, se mantienen mediante la proliferación de los reservorios de células residentes con una entrada mínima de monocitos de la circulación (9), salvo en algunos procesos inflamatorios. Los monocitos circulantes representan células versátiles y dinámicas, compuestas por subpoblaciones heterogéneas que difieren en fenotipo, tamaño, morfología y perfiles transcripcionales (10,11). Los diferentes tipos de monocitos se definieron con base en la expresión superficial del CD14 y del CD16 en humanos. Las células CD14⁺⁺ CD16⁻, han sido denominadas como la subpoblación clásica; las CD14⁺ CD16⁺, como la subpoblación intermedia y la CD14⁻ CD16⁺⁺ como la subpoblación no clásica, a su vez dentro de esta última subpoblación aproximadamente un monocitos son Slan⁺ (slanMo), y son considerados como los principales productores de la citoquinas inflamatorias (12,13). También se ha caracterizado la población de monocitos Tie-2 (TEMs), los cuales promueven la angiogénesis de tumores y parecen favorecer el crecimiento tumoral, la metástasis y además antagonizan varios de los mecanismos efectores contra el tumor (14).

Los monocitos se reclutan rápidamente en los sitios de infección e inflamación (1,15), donde exhiben una considerable plasticidad funcional, que va desde la capacidad de destruir a un microorganismo hasta tener funciones angiogénicas (11). Además, participan en las diferentes etapas durante los procesos inflamatorios crónicos (16). Pero es de notarse que, durante estos procesos, el compromiso tisular sólo es evidente en las fases más tardías de las patologías cuando el daño es evidente y cuando la intervención médica es fundamentalmente paliativa. La detección temprana de células en los tejidos comprometidos podría favorecer su pronóstico e intervención de forma más temprana y dirigida.

En estudios previos del Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética ha sido de particular interés el entendimiento del comportamiento de los fagocitos mononucleares en diversas patologías. Se han reportado alteraciones en pacientes en las subpoblaciones de monocitos en tuberculosis y diferencias funcionales que parecen estar relacionadas con su etapa de diferenciación (17). En el caso del lupus eritematoso sistémico (LES) es evidente el compromiso de los monocitos no clásicos en la enfermedad, incluida su presencia en las lesiones renales (18). Estos estudios *in vitro* mostraron cambios en las proporciones de monocitos circulantes en pacientes con LES; además, mostraron alteraciones funcionales que sugieren la pérdida de su capacidad reguladora sobre la proliferación de los linfocitos T (19). El daño mediado por complejos inmunes se considera una de las principales causas de morbilidad en pacientes con la enfermedad (20). En varios procesos inflamatorios crónicos y divergentes, que incluyen obesidad (21), diabetes (22), aterosclerosis (15), enfermedades cardiovasculares (23), VIH (24), enfermedad de Chron (25). Además, los monocitos CD14 + CD16 + no clásicos aumentan significativamente con la edad, pero muestran una expresión de superficie HLA-DR y CX3CR1 reducida en los ancianos (26), lo que pone de relieve el hecho de que los monocitos tienen un papel muy diverso en las condiciones fisiológicas (27).

En la mayoría de los casos, para acceder a muestras de los tejidos comprometidos se requiere de procedimientos invasivos como biopsias, cateterismos, lavados broncoalveolares, por lo que se ha considerado que el uso extracorpóreo de nanopartículas supermagnéticas derivadas de óxidos ferrosos y ferrumóxidos (28) puede constituirse como una alternativa para visualizar la presencia de los fagocitos mononucleares de forma no invasiva y con la posibilidad de repetirse para hacer seguimientos que permitan visualizar la evolución de la patología.

Algunas de estas nanopartículas se han desarrollado en nuestra Universidad por el Grupo de Estado Sólido de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Las NPOHA están formadas por un núcleo de óxido de hierro y preparadas por el método de coprecipitación de las sales $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, con un revestimiento de ácido poliacrílico para su funcionalización y estabilización (28,29). El revestimiento de acrilato, al parecer, les permite interactuar con receptores “scavenger”, debido a la carga negativa que esta molécula provee.

Estos receptores de membrana son ampliamente encontrados en monocitos y macrófagos (30). Es así como se ha estudiado la interacción de las nanopartículas en estas poblaciones celulares, evidenciado que macrófagos tisulares internalizan en mayor medida las nanopartículas (28).

En el Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética se han iniciado los estudios conducentes a entender los efectos que estas puedan tener sobre células mononucleares de sangre periférica y, más específicamente, sobre las células fagocíticas mononucleares que serían su blanco primario. Hasta el momento se ha encontrado que las NPOHA no generan cambios significativos en su funcionamiento y fisiología y que tienen una mayor captación por parte de los monocitos no clásicos.

Las NPOHA interactuarían directamente con los fagocitos mononucleares y las evidencias obtenidas en el Grupo sugieren que las NPOHA son inocuas y que su más probable aplicación estaría dirigida a permitir revelar la presencia de infiltrados de fagocitos de manera no invasiva. Hemos querido abordar el problema considerando que aún en forma mínima puedan comprometer la función de los fagocitos. No se ha observado que las NPOHA comprometan las respuestas a estímulos solubles, o la capacidad de activar linfocitos T CD3 y CD4 en respuesta a mitógenos y antígenos como el toxoide tetánico, pero sí tiene efectos sobre la remoción de células apoptóticas y la agregación plaquetaria (4,5) y no es claro si otras de las funciones de los fagocitos pueden estar comprometidas. Una de estas funciones es la capacidad efectora que puedan tener durante las infecciones. Por ello se quiso evaluar si la presencia de nanopartículas puede comprometer el curso de la infección con *L. monocytogenes*.

L. monocytogenes es un bacilo intracelular Gram positivo, facultativo y que ha sido ampliamente usado como modelo de infecciones intracelulares (31,32). Mediante los ensayos de unidades formadoras de colonia (UFC) y espectrofotometría se evaluó el crecimiento intracelular de la bacteria a partir de lisados de macrófagos expuestos a las NPOHA e infectados con *L. monocytogenes*. No se encontraron diferencias en el recuento de las bacterias intracelulares, ni se observó efecto directo de las NPOHA sobre el crecimiento de las bacterias en medio líquido y en ausencia de células. No obstante, se observó una menor

cantidad de bacterias unidas e internalizadas por los fagocitos pretratados con NPOHA, una menor acumulación de IL-6, TNF- α e IL-8.

En este punto, no es claro si la no diferencia en el crecimiento intracelular sea debida a un mayor crecimiento bacteriano dentro de los macrófagos que compensara el un menor número de bacterias unidas y fagocitadas, es decir que la carga bacteriana inicial no fue la misma, pero el recuento de UFC terminó siendo comparable.

Concluimos que el tratamiento con NPOHA en macrófagos infectados con *Listeria monocytogenes* no inhabilita el control de la bacteria y, dado que las nanopartículas reducen la cantidad de listeria unida e internalizada, así como la acumulación de IL6, TNF- α e IL8, se requieren ensayos que permitan evaluar la replicación de las bacterias en función del tiempo. Por tanto, el uso de estas nanopartículas para el rastreo de células fagocíticas en el contexto de una infección intracelular, podría mitigar la capacidad efectora de los fagocitos.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Materiales

El anti-CD14-RD1 My4 (IgG2b de ratón, clona 322A-1) fue obtenido de Beckman Coulter. Las siguientes monoclonales, fueron obtenidos de BD Biosciences (San Jose, CA): anti-CD45-PeCy7 (IgG2b, κ clona 30-F11), anti-CD3-PeCy5 (IgG2a, κ clona HIT3 α), anti-CD56-PE (IgG1, κ , clona MY31), anti-CD19 AMCyan (IgG1, κ clona HIB19), así como el estuche comercial de citoquinas inflamatorias humanas (RUO).

PBS libre de calcio y magnesio, el Syto 9 Green, RPMI1640 y Suero Bovino Fetal fueron obtenidos de GIBCO Lifetechnologies, Thermo Fisher (Waltham, Massachusetts).

Obtención de las nanopartículas

Las nanopartículas fueron preparadas en el Grupo de Estado Sólido del Instituto de Física en la Universidad de Antioquia, usando el método de coprecipitación a partir de una solución de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (relación estequiométrica 1:2) en medio alcalinizado y adición de NaOH 0.1 M. Más adelante se recubrieron con ácido poliacrílico para su estabilización (33).

Muestreo

Se obtuvieron muestras sangre periférica de 60 mL de individuos sanos que aceptaron ser donantes voluntarios y que firmaron el consentimiento informado. Los individuos eran mayores de 18 años, y declararon no padecer algún tipo de enfermedad autoinmune, infecciosa o haber sido recientemente sometidos a procedimientos quirúrgicos. Diez mililitros la muestra se depositaron en un tubo sin anticoagulante para extraer el suero autólogo después de su coagulación. El coágulo se retrajo mediante centrifugación a 2000 xg. Los restantes 50 mL de sangre fueron desfibrinados mediante agitación continua en Erlenmeyers de 120 mL conteniendo esferas vidrio de 20 mm de diámetro.

Obtención y cultivo de los fagocitos mononucleares

Las muestras desfibrinadas se diluyeron en la proporción 1:1 en PBS suplementado con 0.05% de SBF, posteriormente, alícuotas de 11 mL de sangre diluida se centrifugaron por 30 min a 900 xg sobre un gradiente de densidad con 3 mL Ficoll hypaque. La interfase de células mononucleares se lavó con PBS suplementado con 0.05% de SBF y se centrifugó a 900 xg por 10 minutos. Las células precipitadas fueron suspendidas en 5 mL con PBS suplementado con 0.05% de SBF y se tomaron 10 μ L de la suspensión con 90 μ L de azul de tripano para realizar recuento de células viables en la cámara de Neubauer. Cien microlitros de la muestra fueron teñidos con anti-CD14+-RD1 y anti- CD45+ PeCy5 (0.5 μ l de cada anticuerpo) se incubaron durante 20 minutos en la oscuridad y a temperatura ambiente. Posteriormente se adquirieron las muestras en un citómetro LSR Fortessa II (BD Biosciences).

En platos de 48 pozos se sembraron 3×10^5 células CD14+ en un volumen de 800 μ L de RPMI 1640 suplementado con 0.5% de suero autólogo, inactivado por calor durante una hora a 56°C. Las células fueron incubadas a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa durante cuatro horas. Después de la incubación, las células fueron lavadas con PBS precalentado a 37°C. Las monocapas fueron incubadas 12 horas y se les hizo cambio de medio con RPMI 1640 suplementado con 10% y el 50% de los pozos fueron tratados con las nanopartículas a una concentración final de hierro de 64 μ g/mL, y a los cultivos se les permitió completar su diferenciación hasta las 120 h.

Se conservó un pozo sin exponer a las nanopartículas para la determinación de la pureza de las monocapas. Las células fueron desprendidas remoción física con un embolo de una jeringa de 1 mL, las células fueron suspendidas en 100 μ L de PBS y teñidas con una mezcla que de los siguientes anticuerpos: anti-CD3, anti-CD56, anti-CD19; donde la mezcla contenía 1.5 μ L y las muestras fueron adquiridas en el citómetro de flujo. Las impurezas fueron en promedio de un 3% de células CD3+ y 0.2 a 1.0% de células CD19+.

Ensayo de exposición de fagocitos mononucleares a nanopartículas y *L. monocytogenes*

Las *L. monocytogenes* fueron cultivadas durante la noche, 12 horas aproximadamente y se midieron las densidades ópticas 620 nm de una dilución de 1:9 en PFA al 4% v/v en PBS de cada uno los cultivos de las bacterias en BHI utilizando como blanco de lectura una dilución del medio sin bacterias. El valor estimado de las bacterias ha sido previamente referenciado (34). La concentración de bacterias fue ajustada para hacer la infección a una multiplicidad de infección (MOI) de 1:5 basándose en el número de monocitos inicialmente sembrados.

La infección se llevó a cabo mediante la remoción del medio adicionando 800 μ L con la suspensión de bacterias durante 20 minutos a 37°C y 5% CO₂. Después de incubación se retiró el medio y se adicionaron 800 μ L de RPMI 1640 suplementado con 5% de SBF y 10 μ g/ml de gentamicina por 2h a 37°C y 5% CO₂. Después de dos horas se recolectaron los sobrenadantes para congelar a -80°C para la posterior cuantificación de citoquinas. Las células fueron lisadas mediante la adición de agua bidestilada estéril con 0.1% de Tritón X-100 v/v, los lisados fueron diluidos en PBS 10⁻¹ hasta 10⁻³; para determinar el número de UFC sobre BHI Agar (34).

Medición de citoquinas y quimioquinas en sobrenadantes de los cultivos de fagocitos mononucleares expuestos a nanopartículas e infectados con *L. monocytogenes*

Las citoquinas fueron medidas mediante el ensayo comercial de CBA (“*Cytokine Bead Array*”), con pequeñas variaciones a las instrucciones del proveedor. Brevemente, las diluciones estándares y los sobrenadantes fueron mezclados con perlas con diferentes cantidades de Aloficocianina (APC) y revestidas con anticuerpos específicos para la identificación de las citoquinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-8, MCP-1 e IL-10), se incubaron durante toda la noche y después de la incubación se lavaron dos veces mediante centrifugación a 900 x g durante 5 min con una solución provista por el fabricante. Para el revelado se adicionó un coctel de anticuerpos conjugados con PE (Ficoeritrina) y específicos contra cada uno de las citoquinas, luego de remover el exceso de anticuerpos mediante dos lavados con centrifugación como. Las muestras fueron analizadas en el citómetro de flujo.

Las concentraciones de citoquinas fueron determinadas mediante regresión polinomial utilizando el Statgraphics Centurion 16.1.18.

Tinción de bacterias con SYTO 9 Green.

Las listerias se llevaron a una concentración 10×10^6 bacterias/mL en PBS y se tiñeron $0.05 \mu\text{g/mL}$ del colorante SYTO 9 Green por 10 minutos a 37°C en un agitador orbital. Los tubos se sometieron a centrifugación por 5 minutos a $1200 \times g$, para después suspender el botón con $400 \mu\text{L}$ de RPMI e incubar por 40 minutos en agitación. Las bacterias fueron lavadas sucesivas veces hasta que no se detectó Syto 9 Green en los sobrenadantes. La presencia de Syto 9 Green en los sobrenadantes fue evidenciada mediante el marcaje de 10×10^5 células U937.

Las bacterias marcadas se usaron para los ensayos de adherencia e internalización por macrófagos humanos; la proporción para la infección fue de 1:5 macrófagos: bacteria en $800 \mu\text{L}$ de RPMI 1640 suplementado con $10 \mu\text{g/ml}$ de gentamicina para prevenir la replicación de las bacterias extracelulares, con un tiempo de incubación de 40 minutos en agitación continua a 37°C (34). La fluorescencia de las células debida a la unión y captación fue analizada mediante el citómetro y, para estimar la fluorescencia debida únicamente a las bacterias intracelulares, se adicionaron $10 \mu\text{L}$ de azul tripano el cual extingue la fluorescencia del colorante SYTO 9 Green debida de las bacterias extracelulares, y analizaron nuevamente las células nuevamente en el citómetro de flujo.

Análisis estadístico.

Las comparaciones entre las medias de los tratamientos de las muestras pareadas fueron comparadas mediante ANOVA I y ANOVA II contrastando las medias mediante la prueba de Tuckey. En algunos casos, se evaluaron las diferencias entre tratamientos pareados mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon. Estos análisis se hicieron con el GraphPad Prism versión 5 (GraphPad Software, San Diego, CA).

RESULTADOS

Crecimiento intracelular de listeria en presencia de NPOHA

Con el propósito de evidenciar si las NPOHA afectan directamente el crecimiento intracelular de la *Listeria monocytogenes* dentro de los macrófagos, las monocapas de fagocitos se expusieron a las nanopartículas durante su diferenciación y posteriormente se infectaron con la bacteria. Las densidades y las UFC se muestran en la Tabla 1, las pequeñas variaciones que se observaron entre las células tratadas y no tratadas con nanopartículas indican que no hubo diferencias estadísticas entre los tratamientos de cada ensayo, indicando que no hubo efecto apreciable de las NPOHA sobre el crecimiento intracelular de la listeria.

Unión e internalización de *L. monocytogenes* a macrófagos expuesto a NPOHA

Teniendo la evidencia en la que no se observó inhibición en el crecimiento intracelular de *L. monocytogenes* se quiso establecer si había diferencias en la unión e internalización de las *L. monocytogenes* marcada con SYTO 9 Green debida al tratamiento con las nanopartículas, como lo muestra la **Figura 1**; no hubo diferencias en las intensidades medias de fluorescencia de las células expuestas y no al azul de tripano, sugiriendo que la señal era debida a las bacterias internalizadas, sin embargo, el tratamiento con las NPOHA inhibieron significativamente la unión y la internalización de las bacterias.

Expresión y acumulación de interleuquinas

Las cantidades de IL12p70 estuvieron por debajo de los límites de detección y no se observaron variaciones en las cantidades de IL10 entre los tratamientos comparados con los controles. El tratamiento con las nanopartículas solas no indujo acumulación de citoquinas diferencial con el control no tratado. La infección con *L. monocytogenes* indujo una mayor acumulación significativamente mayor de IL-6, IL-8 y TNF- α . En presencia de las nanopartículas la infección con *L. monocytogenes* redujo significativamente la acumulación

de IL6 y de IL-8. Se observó, además, que la TNF- α tuvo menor acumulación, a niveles comparables con los del control, pero sin alcanzar diferencia significativa.

Crecimiento extracelular de listeria en presencia de NPOHA

Para conocer si existía un efecto directo de las nanopartículas sobre el crecimiento de *L. monocytogenes*, las bacterias fueron expuestas directamente a ellas durante 6 y 7 hora. La **Figura 4** muestra las densidades ópticas a los dos tiempos y entre observaciones independientes no se pudo concluir que las NPOHA tuviera un efecto directo sobre la replicación de las listerias.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El hecho de que las partículas supermagnéticas de óxido de hierro con revestimiento de poliacrilato (NPOHA) puedan interactuar con receptores *scavenger* (35), ha promovido en nuestro Grupo la necesidad de explorar sus efectos en la función de los fagocitos mononucleares en diversos contextos, dados los usos putativos que las nanopartículas puedan tener para la detección y rastreo extracorpóreo de estas células en procesos inflamatorios crónicos. La internalización de las NPOHA a través de estos receptores podría modular la función de los fagocitos induciendo una trayectoria asociada con la activación M2, por lo que varios de los mecanismos efectores de los fagocitos podrían estar comprometidos. Previamente hemos observado que la remoción de cuerpos apoptóticos, en la que también han estado involucrados estos receptores, está disminuida, así como también la agregación plaquetaria inducida por ácido araquidónico y por ésteres de forbol (5).

La fagocitosis de bacterias por monocitos y macrófagos, es una estrategia de contención que involucra privar a la bacteria de los nutrientes del medio extracelular, además de buscar su eliminación mediante la unión del fagosoma con el lisosoma (36,37); por parte de la bacteria se han reportado algunas proteínas como proteínas de superficie bacteriana, InIA (internalina) e InIB (38), además del peptidoglucano y ácido lipoteicoico que están presentes en todas las bacterias Gram-positivas que pueden interactuar, bajo condiciones no opsónicas como las que se usaron en el presente trabajo, con receptores *scavenger*, receptores tipo lectina C, integrinas, receptores tipo Toll y siglecs (39). No obstante, hay que tener en cuenta que *L. monocytogenes* puede formar colas de actina cuando escapa del fagolisosoma al citosol (40). En este sentido, y para futuras investigaciones, la formación de colas de actina en presencia de las nanopartículas debe ser considerada como una posible vía mediante la cuál sea favorecida su replicación.

La adherencia e internalización de las bacterias marcadas con Syto 9 por los macrófagos expuestos a las nanopartículas se vió disminuida. Previamente se había reportado que la interacción con la NPOHA puede regular negativamente la expresión del CD36 y a su vez

diezmar la capacidad de reconocer cuerpos apoptóticos (5). Estudios previos de nuestro grupo evaluando diferentes respuestas de monocitos a las nanopartículas recubiertas con acrilatos, mostrando que no se compromete el estallido respiratorio ni de monocitos ni de neutrófilos, por lo que desconsideramos que estos mecanismos puedan estar involucrados.

No obstante, las nanopartículas de óxido de hierro podrían tener un efecto dual. Como lo indica Ranmadugala et al.2017, nanopartículas de óxido de hierro desnudas y cubiertas por (3-aminopropil) trietoxisilano afectaron la viabilidad de *B. subtilis* y la formación de bio-películas de forma dependiente a la concentración, encontrándose que a concentraciones altas entre 300 y 400 $\mu\text{g/mL}$ de nanopartículas desnudas se redujo la cantidad de la bacteria, mientras que en concentraciones menores a 200 $\mu\text{g/mL}$ sirvieron como fuente de hierro para promover su replicación (41). En común, Gholima et al.2016 evidenció que el uso de nanopartículas de óxido de hierro desnudas, cubiertas por glicina y ácido lipoamino, inhibieron el crecimiento de seis bacterias Gram positivas, incluyendo *Listeria monocytogenes*, y Gram negativas en concentraciones entre 200 y 100 $\mu\text{g/mL}$, mientras las que comprendían 1 y 10 $\mu\text{g/mL}$ también promovieron su crecimiento (42), conjuntamente Ebrahiminezhad et al.2012 obtuvieron resultados similares con nanopartículas de magnetita, donde a una concentración inferior o cercana a 20 $\mu\text{g/mL}$ la replicación de la listeria se favoreció y mayor a 40 $\mu\text{g/mL}$ se inhibió (43). Considerando que en el presente trabajo se utilizó una concentración de 64 $\mu\text{g/mL}$ de NPOHA, y la concentración estimada por célula es de alrededor de 60 pg/mL (5), no podemos afirmar que las NPOHA tengan efecto directo sobre las *L. monocytogenes*, pero que se requieren diseños más complejos que permitan establecer si el rango de concentración intracelular puede facilitar el crecimiento de la listeria. Otro factor que han considerado en la literatura es su tamaño, 12.4 nm es la medida de las nanopartículas usadas en este estudio, una dimensión en el rango de nanopartículas de plata y zinc entre 10 a 12 nm que mostraron propiedades bacteriostáticas en *S. aureus* y *V. natriegens* (44–46), pero esto sería objeto de otro estudio.

Con antelación en nuestro grupo se realizó un estudio de exposición de macrófagos derivados de monocitos a NPOHA, los resultados referentes a la acumulación de citoquinas mostraron un incremento en la acumulación de IL8 y IL6, efecto que se asemeja al que describen en la

referencia (47), donde la producción de IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, IFN- γ e IL-10 fue inducida en un tratamiento de sangre total con NPOHA. Los resultados obtenidos en este trabajo son contrarios a los previos presentados por el Grupo en el que se usaron estímulos solubles como toxoide tetánico y la PHA (5). La inhibición en la acumulación de IL8 y IL6 en macrófagos expuestos a las NPOHA e infectados con *Listeria monocytogenes* sugieren que de alguna forma las nanopartículas limitan la acumulación de citoquinas proinflamatorias en respuestas a un parasito intracelular, o que dentro del fagolisosoma que contiene las nanopartículas la bacteria no alcanzan a ser estímulo suficiente para alcanzar niveles comparables a los de las células sin tratamiento. Este es un punto de importancia inherente al uso de las NPOHA en pacientes, pues estas citoquinas son primordiales para la respuesta innata al momento de una infección intracelular (48,49). Es de notarse que los niveles de TNF- α no fueron muy diferentes de los del grupo control, sugiriendo que el efecto sobre la acumulación de citoquinas obedeció en cada caso a una vía diferencial sobre la que tuvieron efecto las nanopartículas.

El ensayo de efecto directo de las NPOHA sobre las colonias de listeria no mostró cambios significantes entre las 6 y 7 horas de incubación con la nanopartículas; teniendo en cuenta todo lo anterior, podemos concluir que las NPOHA no tienen un efecto directo sobre *L. monocytogenes* en un ámbito extracelular, no obstante al verse igual carga bacteriana y menos unión e internalización por parte de los macrófagos tratados con las NPOHA, es claro que se requieren más ensayos con la evaluación de más puntos en función del tiempo, además de saber si las bacterias escapan o no del fagolisosoma. Por lo tanto, hipotetizamos que la diferencia en la actividad fagocítica se ve compensada por la mayor replicación y menos capacidad efectora de los fagocitos sobre las listerias, apoyándonos en el hecho de que hubo una menor acumulación de citoquinas como la IL-6 y la IL-8.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, mis gratitudes a mi familia y en especial a mí madre, la cual me apoyo en los momentos difíciles de la vida estudiantil y por fuera de ella; a mí asesor Mauricio Rojas López, por todo el conocimiento que compartió con mí persona, además de darme la oportunidad por realizar este trabajo junto a él, a Ana María daza por apoyarme y mostrarme el norte en los problemas técnicos de laboratorio y de igual forma al GICIG, el cual compartió sus espacios académicos para realizar esta investigación. Por último, a la Universidad de Antioquia por permitirme formarme en la carrera de biología.

TABLAS Y LEYENDAS

	OD		UFC	
	<i>L.m.</i>	<i>L.m.</i> + NPOHA	<i>L.m.</i>	<i>L.m.</i> + NPOHA
Promedio	1,05	1,11	106,83	101,30
95% IC	0,10	0,12	9,26	12,64

Tabla 1. Las nanopartículas no afectaron el crecimiento extracelular de *L. monocytogenes*. Densidades ópticas a 620 nm y recuento de unidades formadoras de colonia (UFC) en agar BHI a partir de lisados de macrófagos humanos expuestos a NPOHA e infectados con *L. monocytogenes*. Las densidades ópticas fueron obtenidas después de 6 horas de incubación a 37°C. Se aplicó una prueba de rangos con signos de Wilcoxon para los experimentos, el valor p para las UFC es de 0.35 y el de las densidades ópticas es 0.5, n = 6 observaciones independientes.

FIGURAS Y LEYENDAS

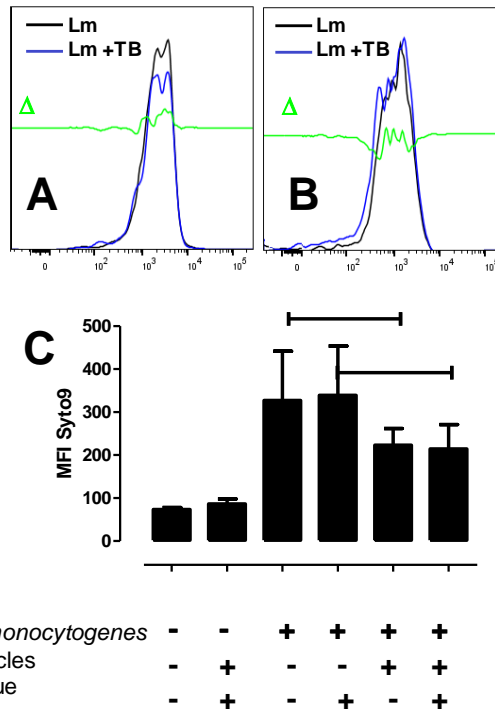


Figura 1. Histogramas representativos del ensayo de unión de *L. monocytogenes* marcada con SYTO 9 a macrófagos diferenciados en ausencia (A) o presencia de NPOHA (B). Después de detectar la señal de fluorescencia del SYTO9, se adicionaron 10 μ L de azul de tripano (TB) al 1% a fin de extinguir la fluorescencia periférica y poder estimar la señal de fluorescencia de las bacterias que habían sido únicamente internalizadas. En (C) se representa el consolidado de tres ensayos independientes en los que se usó ANOVA para hacer las comparaciones entre tratamientos.

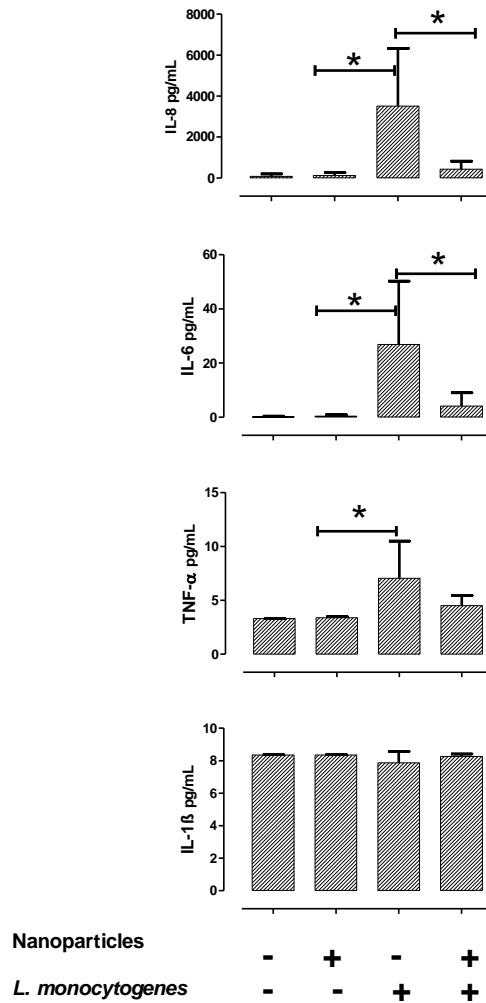


Figura 3. Las nanopartículas inhibieron la acumulación de IL-8, IL-6 y TNF- α inducida por la infección de *L. monocytogenes*. Las muestras para el ensayo fueron los sobrenadantes de cultivos de macrófagos humanos de 6 sujetos diferentes, expuestos a NPOHA e infectados con *L. monocytogenes*. Anova I, fue utilizada para comparar las medias de los tratamientos. Las diferencias significativas con $p \leq 0.05$ son indicadas (*).

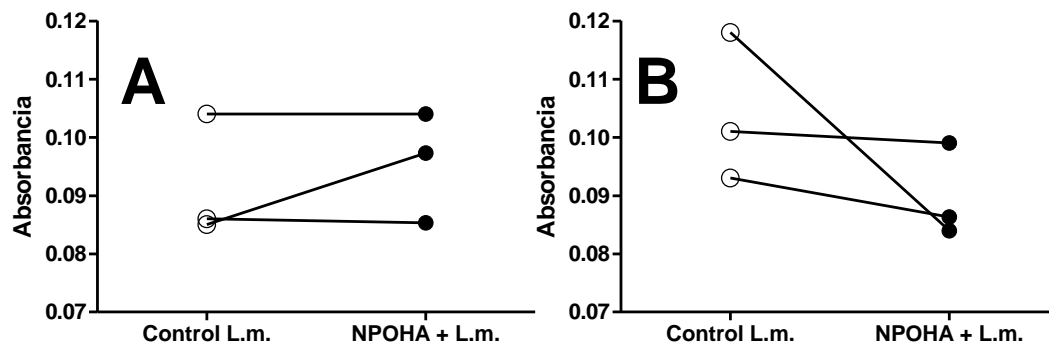


Figura 4. Densidades ópticas de *L. monocytogenes* expuesta y no expuesta a NPOHA durante 6 (A) y (B) 7 horas de incubación, los valores se tomaron a 620 nm después de la exposición a las nanopartículas. Una prueba de Wilcoxon para cada hora de incubación arrojó un valor p de 0.5.

REFERENCIAS.

1. Serbina N V., Pamer EG. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol.* 2006 Mar;7(3):311–7.
2. Zhang X, Qin J, Zou J, Lv Z, Tan B, Shi J, et al. Extracellular ADP facilitates monocyte recruitment in bacterial infection via ERK signaling. *Cell Mol Immunol.* 2018 Jan 1;15(1):58–73.
3. Weissleder R, Nahrendorf M, Pittet MJ. Imaging macrophages with nanoparticles. Vol. 13, *Nature Materials.* Nature Publishing Group; 2014. p. 125–38.
4. Villegas MG, Ceballos MT, Urquijo J, Torres EY, Ortiz-Reyes BL, Arnache-Olmos OL, et al. Poly(acrylic acid)-Coated Iron Oxide Nanoparticles interact with mononuclear phagocytes and decrease platelet aggregation. *Cell Immunol.* 2019 Apr 1;338:51–62.
5. Giraldo-Villegas M, Urquijo J, Arnache-Olmos OL, Rojas-López M. Polyacrylic acid-coated iron oxide nanoparticles could be a useful tool for tracking inflammatory monocytes. *Futur Sci OA.* 2019;5(10).
6. Schlitzer A, McGovern N, Ginhoux F. Dendritic cells and monocyte-derived cells: Two complementary and integrated functional systems. Vol. 41, *Seminars in Cell and Developmental Biology.* Academic Press; 2015. p. 9–22.
7. Lee S, Huen S, Nishio H, Nishio S, Lee HK, Choi BS, et al. Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair. *J Am Soc Nephrol.* 2011 Feb 1;22(2):317–26.
8. Murray PJ. Macrophage Polarization. *Annu Rev Physiol.* 2017 Feb 10;79(1):541–66.
9. Zhu Y, Herndon JM, Sojka DK, Kim KW, Knolhoff BL, Zuo C, et al. Tissue-Resident Macrophages in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Originate from Embryonic Hematopoiesis and Promote Tumor Progression. *Immunity.* 2017 Aug 15;47(2):323–338.e6.
10. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* 2003 Jul 1;19(1):71–82.
11. Boyette LB, Macedo C, Hadi K, Elinoff BD, Walters JT, Ramaswami B, et al. Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets. *PLoS One.* 2017;12(4).
12. Hamers AAJ, Dinh HQ, Thomas GD, Marcovecchio P, Blatchley A, Nakao CS, et al. Human Monocyte Heterogeneity as Revealed by High-Dimensional Mass Cytometry. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019 Jan 1;39(1):25–36.

13. Ahmad F, Döbel T, Schmitz M, Schäkel K. Current Concepts on 6-sulfo LacNAc Expressing Monocytes (slanMo). Vol. 10, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2019.
14. Venneri MA, De Palma M, Ponzoni M, Pucci F, Scielzo C, Zonari E, et al. Identification of proangiogenic TIE2-expressing monocytes (TEMs) in human peripheral blood and cancer. *Blood*. 2007 Jun 15;109(12):5276–85.
15. Zhang X, Huang F, Li W, Dang JL, Yuan J, Wang J, et al. Human gingiva-derived mesenchymal stem cells modulate monocytes/macrophages and alleviate atherosclerosis. *Front Immunol*. 2018 Apr 30;9(APR):878.
16. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. Vol. 9, *Oncotarget*. Impact Journals LLC; 2018. p. 7204–18.
17. Castaño D, García LF, Rojas M. Increased frequency and cell death of CD16 + monocytes with Mycobacterium tuberculosis infection. *Tuberculosis*. 2011 Sep;91(5):348–60.
18. Thomas G, Tacke R, Hedrick CC, Hanna RN. Nonclassical Patrolling Monocyte Function in the Vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015 Jun 27;35(6):1306–16.
19. Burbano C, Vasquez G, Rojas M. Modulatory Effects of CD14+CD16++ Monocytes on CD14++CD16– Monocytes: A Possible Explanation of Monocyte Alterations in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol*. 2014 Dec;66(12):3371–81.
20. Lewis EJ, Roberts JL. Circulating Immune Complexes and Systemic Lupus Erythematosus. In: *Pediatric Nephrology*. Dordrecht: Springer Netherlands; 1981. p. 347–51.
21. Medeiros NI, Mattos RT, Menezes CA, Fares RCG, Talvani A, Dutra WO, et al. IL-10 and TGF- β unbalanced levels in neutrophils contribute to increase inflammatory cytokine expression in childhood obesity. *Eur J Nutr*. 2018 Oct 1;57(7):2421–30.
22. Khondkaryan L, Margaryan S, Poghosyan D, Manukyan G. Impaired Inflammatory Response to LPS in Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Inflam*. 2018;2018.
23. Weber C, Shantsila E, Hristov M, Caligiuri G, Guzik T, Heine GH, et al. Role and analysis of monocyte subsets in cardiovascular disease. *Thromb Haemost*. 2016 Dec 2;116(10):626–37.
24. Chen P, Su B, Zhang T, Zhu X, Xia W, Fu Y, et al. Perturbations of Monocyte Subsets and Their Association with T Helper Cell Differentiation in Acute and Chronic HIV-1-Infected Patients. *Front Immunol*. 2017;8:272.
25. Tang Y, Zhao L, Lei N, Chen P, Zhang Y. Crohn’s Disease Patients with Depression Exhibit Alterations in Monocyte/Macrophage Phenotype and Increased Proinflammatory Cytokine Production. *Dig Dis*. 2019 Jun 19;1–11.
26. Seidler S, Zimmermann HW, Bartneck M, Trautwein C, Tacke F. Age-dependent alterations of monocyte subsets and monocyte-related chemokine pathways in healthy adults. *BMC Immunol*. 2010 Jun 21;11(1):30.
27. Puissant-Lubrano B, Apoil PA, Guedj K, Congy-Jolivet N, Roubinet F, Guyonnet S, et al. Distinct effect of age, sex, and CMV seropositivity on dendritic cells and monocytes in

- human blood: *Immunol Cell Biol.* 2018 Jan 1;96(1):114–20.
28. Weissleder R, Nahrendorf M, Pittet MJ. Imaging macrophages with nanoparticles. *Nat Mater.* 2014;13(2):125–38.
 29. Sanchez LM, Martin DA, Alvarez VA, Gonzalez JS. Polyacrylic acid-coated iron oxide magnetic nanoparticles: The polymer molecular weight influence. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 2018 Apr 20;543:28–37.
 30. Fujiwara M, Baldeschwieler JD, Grubbs RH. Receptor-mediated endocytosis of poly(acrylic acid)-conjugated liposomes by macrophages. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 1996 Jan 12;1278(1):59–67.
 31. Ringel-Scaia VM, Powell MD, Read KA, Allen IC, Oestreich KJ. Systemic listeria monocytogenes infection as a model to study T helper cell immune responses. In: *Methods in Molecular Biology.* Humana Press Inc.; 2019. p. 149–60.
 32. D’Orazio SEF. Innate and Adaptive Immune Responses during *Listeria monocytogenes* Infection. *Microbiol Spectr.* 2019 May 24;7(3).
 33. Marín T, Montoya P, Arnache O, Calderón J. Influence of Surface Treatment on Magnetic Properties of Fe₃O₄ Nanoparticles Synthesized by Electrochemical Method. *J Phys Chem B.* 2016 Jul 14;120(27):6634–45.
 34. Boyartchuk V, Rojas M, Yan B-S, Jobe O, Hurt N, Dorfman DM, et al. The Host Resistance Locus *sst1* Controls Innate Immunity to *Listeria monocytogenes* Infection in Immunodeficient Mice. *J Immunol.* 2004 Oct 15;173(8):5112–20.
 35. Q J, L L, Q M, Q Z. Immunomodulation of Nanoparticles in Nanomedicine Applications. *Biomed Res Int.* 2014;2014.
 36. Uribe-Quero E, Rosales C. Control of phagocytosis by microbial pathogens. Vol. 8, *Frontiers in Immunology.* Frontiers Media S.A.; 2017. p. 1368.
 37. Conte MP, Longhi C, Polidoro M, Petrone G, Buonfiglio V, Santo S Di, et al. Iron Availability Affects Entry of *Listeria monocytogenes* into the Enterocytelike Cell Line Caco-2. Vol. 64, *INFECTION AND IMMUNITY.* 1996.
 38. Braun L, Cossart P. Interactions between *Listeria monocytogenes* and host mammalian cells. Vol. 2, *Microbes and Infection.* Elsevier Masson SAS; 2000. p. 803–11.
 39. Plüddemann A, Mukhopadhyay S, Gordon S. The interaction of macrophage receptors with bacterial ligands. Vol. 8, *Expert Reviews in Molecular Medicine.* Cambridge University Press; 2006. p. 1–25.
 40. Goldberg MB. Actin-Based Motility of Intracellular Microbial Pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2001 Dec 1;65(4):595–626.
 41. Ranmadugala D, Ebrahiminezhad A, Manley-Harris M, Ghasemi Y, Berenjian A. The effect of iron oxide nanoparticles on *Bacillus subtilis* biofilm, growth and viability. *Process Biochem.* 2017 Nov 1;62:231–40.
 42. Gholami A, Rasoul-Amini S, Ebrahiminezhad A, Abootalebi N, Niroumand U, Ebrahimi N, et al. Magnetic properties and antimicrobial effect of amino and lipoamino acid coated iron

oxide nanoparticles. 2016;

43. Ebrahimezhad A, Davaran S, Rasoul-Amini S, Barar J, Moghadam M, Ghasemi Y. Synthesis, Characterization and Anti-*Listeria monocytogenes* Effect of Amino Acid Coated Magnetite Nanoparticles. *Curr Nanosci.* 2012 Nov 21;8(6):868–74.
44. Raghupathi KR, Koodali RT, Manna AC. Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. *Langmuir.* 2011 Apr 5;27(7):4020–8.
45. Dakal TC, Kumar A, Majumdar RS, Yadav V. Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles. *Front Microbiol.* 2016 Nov 16;7(NOV):1831.
46. Dong Y, Zhu H, Shen Y, Zhang W, Zhang L. Antibacterial activity of silver nanoparticles of different particle size against *Vibrio Natrie*gens. Mukherjee A, editor. *PLoS One.* 2019 Sep 13;14(9):e0222322.
47. Couto D, Freitas M, Porto G, Lopez-Quintela MA, Rivas J, Freitas P, et al. Polyacrylic acid-coated and non-coated iron oxide nanoparticles induce cytokine activation in human blood cells through TAK1, p38 MAPK and JNK pro-inflammatory pathways. *Arch Toxicol.* 2015 Oct 24;89(10):1759–69.
48. Havell EA. Synthesis and secretion of interferon by murine fibroblasts in response to intracellular *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun.* 1986;54(3):787.
49. Nakane A, Yamada K, Hasegawa S, Mizuki D, Mizuki M, Sasaki S, et al. Endogenous cytokines during a lethal infection with *Listeria monocytogenes* in mice. *FEMS Microbiol Lett.* 1999 Jun 1;175(1):133–42.