

# EVALUACIÓN INMUNOLÓGICA DE NANOBIOCOMPOSITOS CONJUGADOS DE QUITOSANO-COBRE

Linares Hernandez Liliana Ivette (1), Mora Montés Héctor Manuel (2)

(1) Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad de Guanajuato | Dirección de correo electrónico: linaresh\_ivetqfb@hotmail.com

(2) Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: hmora@ugto.mx

## Resumen

En estudios anteriores se ha descrito la gran actividad bactericida que posee el quitosano al igual que el cobre. Por esta propiedad que ambos compuestos han adquirido una gran importancia en la manipulación a nano escala. Sin embargo estudios han revelado que el cobre a pesar de su relevancia en la bioquímica de los organismos, puede ser letal cuando se sobrepasa cierto umbral. En este trabajo se planeó evaluar la actividad inmuno-tóxica que poseen estas nanobiocompositos conjugados de quitosano-cobre sobre células del sistema inmune, en especial sobre las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y neutrófilos. Se evaluó la citotoxicidad que podría tener las nanopartículas, unas provenientes de una casa comercial y otras sintetizadas por el equipo de investigación, comparándose los efectos con el quitosano e iones de cobre, a través de la medición de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). Además de evaluó si estos compuestos también podría activar la respuesta inmune al detectar la presencia de citosinas, IL-6. IL-10 y TNF- $\alpha$  a través de la técnica ELISA. Se encontró que los compuestos son más citotóxicos cuando disminuye la concentración. Mientras que la liberación de las interleucinas aumenta cuando la concentración también aumenta.

## Abstract

Previous studies described the strong bactericidal activity of both chitosan and copper. Due to this property, these compounds have become increasingly important in nanoscale manipulation. Despite the relevance in the cell biochemistry, several studies have shown that copper can be lethal, when a certain threshold is exceeded. In this paper, we planned to evaluate the immuno-toxic activity of chitosan-copper conjugates on cells of the immune system, especially on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and neutrophils. The cytotoxicity elicited by commercial and in-house elaborated nanoconjugates was evaluated and compared with chitosan and copper ions, through the measurement of lactate dehydrogenase enzyme (LDH). In addition, we assessed whether these compounds may also have the potential to stimulate cytokine production. Our results indicate the compounds are more cytotoxic when the concentration decreases; while interleukin production increases in a dose-dependent manner..

## Palabras Clave

PBMCs, Neutrófilos, Inmuno-citotoxicidad, LDH, Interleucinas

## INTRODUCCIÓN

La integración de nanotecnología y biología provee la oportunidad de desarrollar materiales a nano-escala que pueden ser aplicados en áreas científicas biológicas, medicina clínica y tecnologías de envasado. [1] La bio-actividad de las nanopartículas es influenciada por su pequeño tamaño, tales propiedades pueden ser actividades bioquímicas, respuesta molecular, su transporte y distribución. [2]

El cobre, como otros compuestos de este elemento, ha demostrado tener actividades bactericidas contra una amplia variedad de microorganismos, incluyendo *Vibrio cholerae*, *Shigella*, *E. coli*, *Salmonella*, hongos, virus y otros tipos de microorganismos. [3] Además el Cu ha tenido gran interés debido al número de matrices de polímeros usados en su preparación, ya sea de forma natural o sintética. Entre los biopolímeros de mayor interés están los polisacáridos, celulosa, almidón y el quitosano, [4] siendo este el de nuestro interés. El quitosano, compuesto de poli ( $\beta$ -(1-4)-2-amino-2-deoxy-D-glucosa), es un polímero que en los últimos años se ha utilizado en diversas actividades de la vida y salud humana [5] debido a que se ha demostrado algunas ventajas en lo que se refiere a su fuerza mecánica, la biocompatibilidad y sus propiedades antibacterianas cuando se utiliza puro [6]

Sin embargo, metales no esenciales, como la plata, puede ser tóxico para bacterias, teniendo actividades biosidas en bajas concentraciones. Por otro lado, el cobre, a pesar de su relevancia en la bioquímica de los organismos, puede ser letal cuando se sobrepasa cierto umbral. [7] Aunque el cobre está involucrado en diferentes procesos en el organismo, juega un rol doble, ya que puede ser un agente pro-cáncer, y tal vez en la forma de nanopartículas muestre diferentes efectos. [2]

Además de citotoxicidad, las nanopartículas pueden actuar sobre el sistema inmunológico. [8] Estas son absorbidas por las células inmunes innatas, por ejemplo los macrófagos, donde pueden activar o suprimir funciones del sistema inmune, ocasionando el posible desarrollo del cáncer, enfermedades inflamatorias o autoinmunes, y alteraciones de las respuestas inmunes del huésped a patógenos. [9]

Aunque el sistema inmune innato es crítico en la detección de la exposición a NP y funciona como una primera línea de defensa, existen pocos estudios que han evaluado las interacciones NP con el sistema inmunológico. [9]

## MATERIALES Y MÉTODOS

El primer paso para nuestra investigación fue obtener las células de interés, células mononucleares de sangre periférica y neutrófilos, para ello se extrajo sangre de 5 donadores diferentes a través de una venopunción, obteniéndose en tubos vacountanier con EDTA como anticoagulante. Posteriormente se separaron las células de interés por medio de un gradiente compuesto de Histopacque y buffer fosfato salino (PBS). A los PBMCs se les realizaron lavados con la misma solución buffer, mientras que a la porción con los componentes eritrocitarios se trató con una solución lisis de eritrocitos para obtener así la recuperación de neutrófilos. Después se re-suspendieron las células en una solución Roswell Park Memorial Institute (RPMI por sus siglas en inglés, Roswell Park Memorial Institute medium).

Posteriormente se realizaron las interacciones de las células con las soluciones problema, las cuales eran:

1. La primera solución de Quitosano
2. La segunda solución de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) en tres concentraciones: alta (C8, 5.3 % w/v), mediana (C5, 0.576 % w/v), y baja (C1, 0.017 % w/v).
3. La tercera de nanopartículas comerciales, provenientes de la casa comercial SkySpring Nanomaterials Inc. con una pureza de 99.8%, morfología esférica y un diámetro promedio de 60 nm. A las cuales se les denominó como nCu, presente en tres concentraciones: alta (C8, 5.3 % w/v), mediana (C5, 0.576 % w/v), y baja (C1, 0.017 % w/v).
4. Una cuarta solución también de nanopartículas sintetizadas por el equipo de CINESTAV Querétaro, bajo el procedimiento de Descomposición

Térmica, a las cuales se les denominó como nCu<sub>dt</sub>, presente en tres concentraciones: alta (C8, 5.3 % w/v), mediana (C5, 0.576 % w/v), y baja (C1, 0.017 % w/v).

En una placa se colocaron 10, 20, 30, 40 y 50  $\mu$ L en cada pozo por duplicado, posteriormente se esterilizó con luz UV, se llevó cada pozo a un volumen de 100  $\mu$ L de RPMI, y se colocó 100  $\mu$ L de la solución de PBMCs o neutrófilos, según el caso. Se dejaron interactuar por 24 hr y 6 hr respectivamente, a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>.

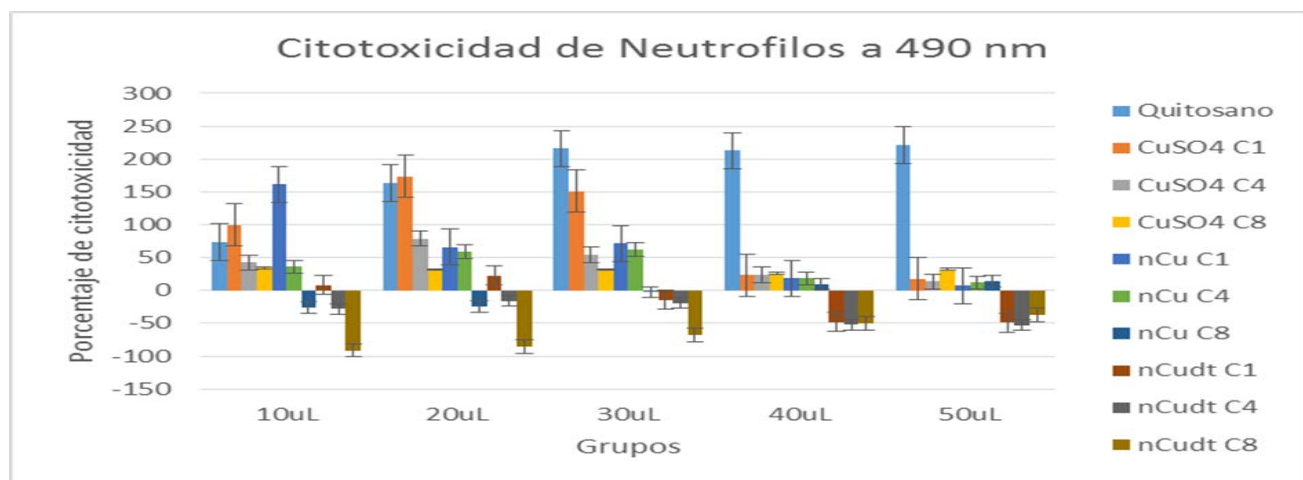
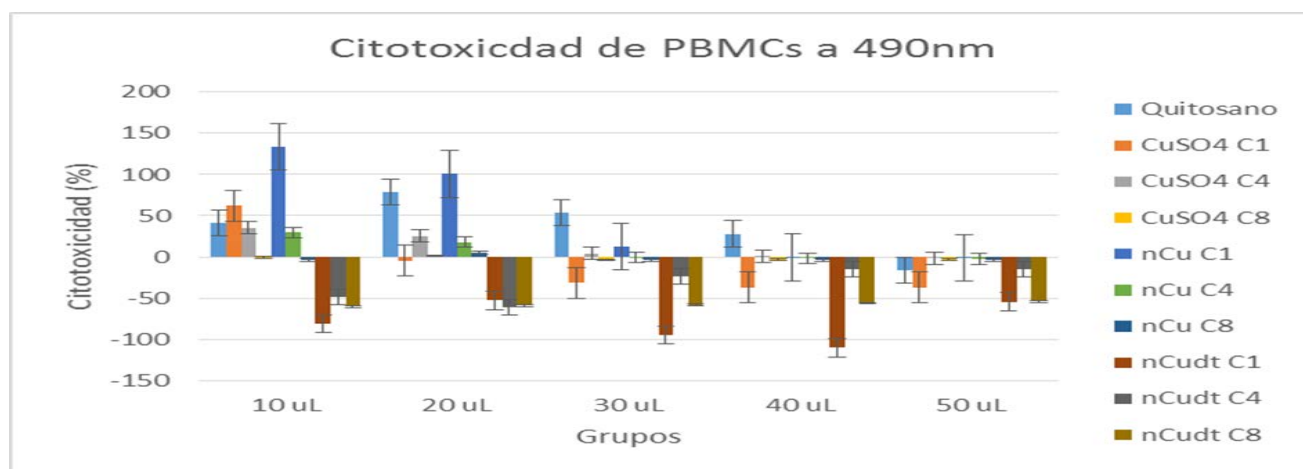
Se recuperó el sobrenadante, este se utilizó para los siguientes ensayos, la medición de citotoxicidad, a través de la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) y la activación del sistema inmune por la detección de las interleucinas IL-6, IL-10 y TNF- $\alpha$ ,

El ensayo de citotoxicidad se realizó con ayuda de un kit comercial, Pierce LDH Citotoxicity Assay kit, el cual consiste en una prueba colorimétrica medida a 490 nm para detectar la formación del formazan, compuesto directamente proporcional a la cantidad de LDH liberado al espacio extracelular, y que a su vez se obtiene tras una serie de reacciones enzimáticas.

Por otro lado, la detección de las interleucinas y el TNF- $\alpha$  se realizó a través de la técnica ELISA midiendo a 450 nm. Se evaluó los sobrenadantes de las interacciones realizadas con 50  $\mu$ L de cada solución de interés.

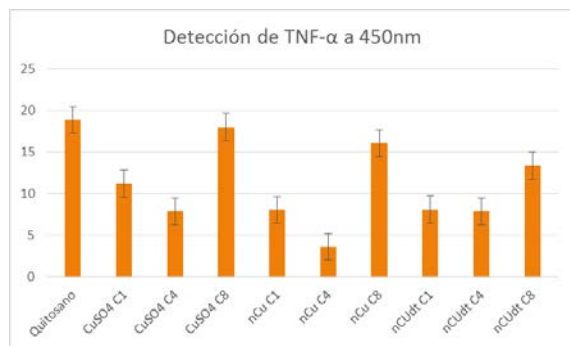
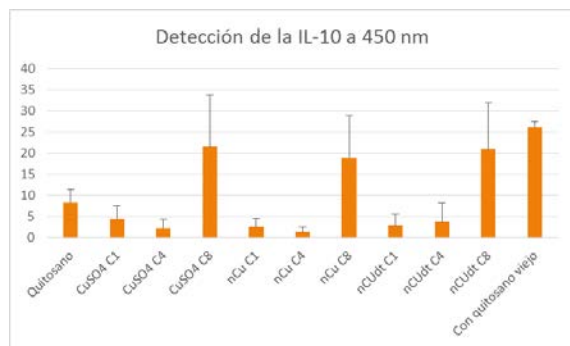
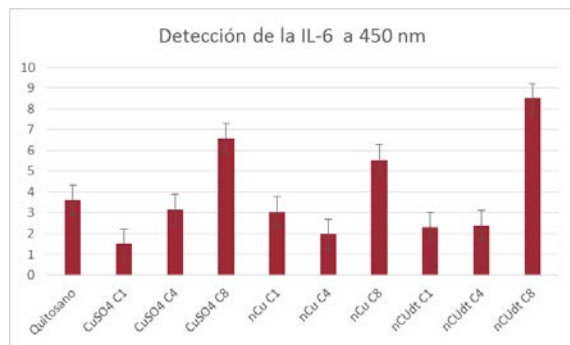
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados fueron los siguientes, considérese que se muestra el promedio de 3 muestras diferentes:



Como se puede observar las tres soluciones ( $\text{CuSO}_4$ , nCu y nCudt) tienen a disminuir su toxicidad cuando aumenta la concentración para ambos tipos de células. Mientras que el quitosano solo presenta este comportamiento con los PBMCs mientras que con los neutrófilos presenta citotoxicidad en todas las interacciones. Para comprobar esto se realizó un estudio del tipo ANOVA, el cual nos indicó que respecto a los PBMCs las soluciones no tenían distinción respecto a los valores del quitosano, mientras que en el caso de los neutrófilos las soluciones de nCudt en la cantidad de 40  $\mu\text{L}$  y 50  $\mu\text{L}$  comparadas con el quitosano estos tenían diferencias significativas.

Respecto al ensayo de detección de citosinas los resultados obtenidos fueron los siguientes:



Respecto al ensayo de detección de citosinas, se observa que la IL-6 y el TNF- $\alpha$  disminuyen en las concentraciones baja y mediana. En la bibliografía consultada, se menciona que dicho efecto se observa en pretratamientos con quitosano disuelto en agua (11). Sin embargo dichos resultados no son confiables debido a la falta de repeticiones y aún se trabaja en el análisis de datos.

## CONCLUSIONES

El análisis estadístico con indica que los PBMCs en todas las soluciones problema en la cantidad de 50  $\mu\text{L}$  no presentan toxicidad, mientras que en las interacciones de los neutrófilos solo en la cantidad de 40 y 50 las soluciones de nCudt C1, C4 y C8, no presentan dicho efecto. Todas las demás soluciones presentan citotoxicidad, sin importar cantidad ni concentración.

Los datos obtenidos en estos ensayos son prometedores, sin embargo para tener datos más confiables se recomienda ampliar el rango de donadores en ambos ensayos.

## AGRADECIMIENTOS

Le agradezco al Doctor Mora Montés Héctor Manuel por la oportunidad y su confianza para trabajar en este proyecto. Este proyecto fue financiado por la Universidad de Guanajuato (Convocatoria Institucional para Fortalecer la Excelencia Académica 2015).

## REFERENCIAS

- [1] Díaz—Visurraga, J., Daza, C., Pozo, C., Becerra, A., von Plessing, C., Garcia, A., (2012) Study on antibacterial alginate-stabilized copper nanoparticles by FT-IR and <sup>31</sup>P-NMR correlation spectroscopy. Dovepress. International journal of Nanomedicine. 7: 3597–3612. doi: 10.2147/IJN.S32648
- [2] Mroczek-Sosnowska, N., Sawosz, E., Prasad Vadalasetty, K., Lukasiewicz, M., Niemic, J., Wierzbicki, M., Ktwin, M., Jaworski, S., Chwalibog, A. (2015) Nanoparticles of Copper Stimulate Angiogenesis at Systemic and Molecular Level. International Journal of Molecular Sciences. 16(3): 4838–4849. Doi:10-3390/ijms16034838

- [3] Dankovich, T. A., Smith, J. A. (2014) Incorporation of copper nanoparticles into paper for point-of-use water purification. *Water Res.* 63: 245-251 doi: 10.1016/j.watres.2014.06.022
- [4] Pinto, R. J., Daina, S., Sadocco, P., Pascoal Neto, C., Trindate, T. (2013) Antibacterial Activity of Nanocomposites of Copper and Cellulose. *BioMed Research International*. 2013, ID 280512 doi: 10.1155/2013/280512
- [5] Vimala, K., Yallapu, M. M., Varaprasad, K., Narayana Reddy, N., Ravindra, S., Sudhakar Naidu, N., Mohana Raju, K. (2011) Fabrication of Curcumin Encapsulated Chitosan-PVA Silver Nanocomposite Films for Improved Antimicrobial Activity. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 2011, 2: 55-64; doi: 10.4236/jbnb.2011.21008.
- [6] Muhd Julkapli, N., Md Akii, H., Ahmad, Z. (2012) Preparation, Properties and Applications of Chitosan-Based Biocomposites/Blend Materials: A Review. *Journal Composite Interfaces*. 18: 449-507. Doi: 10.1163/156855411x610232
- [7] Palza, H., Piozzi, A. (2015) Antimicrobial Polymers with Metal Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*. 16 (1): 2099-2116 doi: 10.3390/ijms16012099
- [8] Nguyen, V. Q., Ishihara, M., Kinoda, J., Hattori, H., Nakamura, S., Ono, T., Miyahira, Y., Matsui, T. (2014) Development of antimicrobial biomaterials produced from chitin-nanofiber sheet/silver nanoparticle composites. *Journal Nanobiotechnology*. 3: 12-49 Doi: 10.1186/s12951-014-0049-1.
- [9] Mori, Y., Ono, T., Miyahira, Y., Nguyen, V. Q., Matsui, T., Ishihara, M. (2013) Antiviral activity of silver nanoparticle/chitosan composites against H1N1 influenza A virus. *Nanoscale Res Lett*. 8(1): 93. Doi: 10.1186/1556-276x-8-93
- [10] Lee, Y. K., Choi, E. J., Webster, T. J., Kim, S. H., Khang, D. (2014) Effect of the protein corona on nanoparticles for modulating cytotoxicity and immunotoxicity. *International Journal of Nanomedicine*. 10: 97-113. Doi: 10.2147/IJN.S72998
- [11] Yeh, M. Y., Shih, Y. L., Chung, H. Y., Chou, J., Lu, H. F., Liu, C. H., Liu, J. Y., Huang, W. W., Peng, S. F., Wu, L. Y., Chung, J. G. (2016) Chitosan promotes immune responses, ameliorates glutamic oxaloacetic transaminase and glutamic pyruvic transaminase, but enhances lactate dehydrogenase levels in normal mice in vivo. *Experimental and therapeutic medicine*. 11(4): 1300-1306. Doi: 10.3892/etm.2016.3057