



Universidad de Concepción
Facultad Farmacia

**EVALUACIÓN DEL PROCESAMIENTO Y LA
PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS EN MACRÓFAGOS
THP-1 TRATADOS CON NANOPARTÍCULAS DE ORO
CONJUGADAS CON EL PÉPTIDO AS4923**

POR JORGE THOMAS BUCHERT VARGAS

Tesis presentada a la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción
para optar al grado de Magíster en Bioquímica Clínica e Inmunología

Profesor Guía:

Dr. Enrique Alberto Guzmán Gutiérrez
Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Profesor Co-Guía:

Dr. Patricio Alejandro Oyarzún Cayo
Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño
Universidad San Sebastián

Abril, 2024

Concepción, Chile.

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

TABLA DE CONTENIDOS

Índice de ilustraciones	5
Resumen	7
Abstract	8
1. Introducción	9
1.1 Nanopartículas.....	9
1.2 Nanopartículas de oro	11
1.3 Diseño racional de vacunas.....	15
1.4 Procesamiento y la presentación de antígenos	20
2. Problema de investigación	29
3. Pregunta de investigación	29
4. Hipótesis	30
5. Objetivo general	31
6. Objetivos específicos	31
7. Metodología	32
7.1 Diseño del estudio	32
7.2 Síntesis de nanopartículas de oro desnudas y conjugadas con el péptido AS4923.....	32
7.3 Concentración de nanopartículas de oro conjugadas con el péptido AS4923.....	34
7.4 Potencial z (pZ) de las nanopartículas de oro conjugadas con el péptido AS4923.....	35
7.5 Tamaño y forma de las nanopartículas de oro conjugadas con el péptido AS4923.....	35
7.6 Cultivo de células THP-1 y diferenciación a macrófagos THP-1	36
7.7 Determinación del fenotipo de macrófagos THP-1 por RT-qPCR	37
7.8 Determinación del fenotipo de macrófagos THP-1 por citometría de flujo	39
7.9 Ensayo de viabilidad celular MTT e incuCyte con nanopartículas de oro conjugadas con el péptido AS4923	40

7.10 Determinación de la actividad del proteosoma 20S con las nanopartículas de oro conjugadas con el péptido AS4923.....	41
7.11 Determinación de la actividad de catepsina B con las nanopartículas de oro conjugadas con el péptido AS4923	42
7.12 Determinación de la presentación de antígenos en macrófagos THP-1 tratados con las nanopartículas de oro conjugadas con el péptido AS4923..	44
7.13 Análisis estadístico	45
8. Resultados	47
8.1 Concentración de nanopartículas de oro conjugadas con el péptido AS4923.....	48
9.2 Fenotipo de macrófagos THP-1 por RT-qPCR	50
8.3 Fenotipo de macrófagos THP-1 por citometría de flujo	52
8.4 Ensayo de viabilidad celular MTT con nanopartículas de oro.....	55
8.5 Ensayo de viabilidad celular incuCyte con nanopartículas de oro	57
8.5 Actividad del proteosoma 20S con nanopartículas de oro.....	59
8.6 Actividad de catepsina B con nanopartículas de oro	62
8.7 Presentación de antígenos en macrófagos THP-1 tratados con nanopartículas de oro	64
9. Discusión.....	66
9.1 Caracterización de las nanopartículas de oro.....	66
9.2 Fenotipo de los macrófagos THP-1	68
9.3 Viabilidad celular de macrófagos THP-1 tratados con nanopartículas de oro	70
9.4 Procesamiento de antígenos en macrófagos THP-1	72
9.5 Presentación de antígenos en macrófagos THP-1	76
10. Conclusión y proyecciones	78
11. Agradecimientos.....	82
12. Financiamiento	83
13. Bibliografía.....	84

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Clasificación de nanopartículas.	10
Figura 2. Mecanismos implicados en el procesamiento y presentación de antígenos en superficie.....	22
Figura 3. Caracterización de las nanopartículas de oro.....	49
Figura 4. Expresión de del gen TNF- α y CD11b en macrófagos THP-1	51
Figura 5. Tamaño y granularidad de Macrófagos THP-1	52
Figura 6. Expresión de marcadores de superficie en macrófagos THP-1	54
Figura 7: Actividad metabólica de macrófagos THP-1 tratados con nanopartículas de oro conjugadas con el péptido AS4923	56
Figura 8: Viabilidad celular IncuCyte con las nanopartículas de oro conjugadas con el péptido AS4923.....	58
Figura 9: Actividad del proteosoma con nanopartículas de oro conjugadas con el péptido AS4923	61
Figura 10: Actividad de catepsina B con nanopartículas de oro conjugadas con el péptido AS4923.....	63

Figura 11: Actividad de catepsina B con nanopartículas de oro conjugadas con el péptido AS4923.....	65
Figura 12: Diagrama del sistema proteosoma-ubiquitina.....	74
Figura 13: Modelo propuesto.	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Especificación de los partidores de los genes utilizados.....	38
------------------------------------------------------------------------	----

RESUMEN

Las nanopartículas de oro (AuNPs) han demostrado ser una plataforma versátil para vehicular moléculas como péptidos, convirtiéndose en candidatas para el diseño de nanovacunas. Por lo tanto, es necesario realizar, ensayos *in vitro* evaluando si son capaces de activar el procesamiento y la presentación de antígenos. Por ejemplo, utilizando la línea celular THP-1 para desarrollar un modelo de macrófago *in vitro*, tratándolas con nanopartículas de oro. El objetivo de este trabajo fue evidenciar el procesamiento y la presentación de antígenos en la superficie de macrófagos THP-1 tratados con nanopartículas de oro conjugadas con el péptido AS4923. En este trabajo se logró determinar que en macrófagos THP-1 inducidos con forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) y lipopolisacárido (LPS), expresaron niveles significativamente aumentados de ARNm para los genes TNF- α y CD11b a través de RT-qPCR, mientras que a través de citometría de flujo expresaron los marcadores de superficie CD86, CD40, CD11b y MHC II. Se logró determinar que en macrófagos THP-1 tratados con las AuNPs-AS4923 10 pM, la actividad del proteosoma 20S, la actividad de catepsina B, y el número de moléculas de CD86 y MHC II, aumentan significativamente en comparación a cuando son tratados con el péptido AS4923 por sí solo, o con las AuNPs desnuda. Por lo tanto, las AuNPs-AS4923 a bajas concentraciones son capaces de activar el procesamiento de antígenos a través de la vía citosólica y la vía endocítica, junto con activar la presentación de antígenos en el contexto del MHC II.

ABSTRACT

Gold nanoparticles (AuNPs) are versatile platforms to be conjugated with biomolecules, such as peptides, playing a growing role for the development of nanovaccines. Therefore, it is necessary to carry out in vitro tests evaluating whether they are capable to activate the processing and presentation of antigens. For example, using the human cell line THP-1 to develop an in vitro macrophage model, treated with gold nanoparticles conjugated with the AS4923 peptide. The aim of this research was to demonstrate the processing and presentation of antigens on the surface of THP-1 macrophages treated with gold nanoparticles conjugated with the AS4923 peptide. It was determined that in THP-1 macrophages induced with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and lipopolysaccharide (LPS) from THP-1 cells presented a phenotype that expresses significantly increased levels of mRNA for the TNF- α and TNF- α genes. CD11b through RT-qPCR, while through flow cytometry they expressed the surface markers CD86, CD40, CD11b and major histocompatibility complex class II (MHC II). Through fluorimetric assays, it was determined that in THP-1 macrophages treated with AuNPs-AS4923 10 pM, the activity of the 20S proteasome, cathepsin B, and the number of CD86 and MHC II molecules, increased significantly in comparison a when treated with the AS4923 peptide alone, or with the unmodified AuNPs. Therefore, AuNPs-AS4923 at low concentrations can activate antigen processing through the cytosolic pathway and the endocytic pathway, along with activating antigen presentation in the context of MHC II.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Nanopartículas

El prefijo “nano”, desde la etimología griega denota la millonésima parte de un metro (10^{-9} m), en cuya escala se desarrolla la nanotecnología. Este es un campo multidisciplinario que busca observar, manipular y fabricar materiales en esta escala de tamaño abarcando áreas de investigación desde las ciencias básicas, hasta la medicina e ingeniería (Mansoori & Soelaiman, 2005). Para referirse a estos conceptos, el Instituto de Estándares Británicos (BSI) (BSI, 2011), ha establecido que la nanoescala hace referencia a un tamaño entre 1 – 1000 nm, mientras que un nanomaterial presenta un rango de tamaño entre 1 – 100 nm de diámetro (Potocnik, 2011), consolidando el término “nanopartícula” como un nano-objeto con dimensiones externas a nanoescala. En este contexto, la nanociencia corresponde al estudio de la materia a nano escala.

Las nanopartículas se pueden clasificar, como se muestra en la Figura 1, en aquellas basadas (i) en lípidos, que se presentan tanto como monocapa y bicapa lipídica, debido a sus propiedades anfipáticas (Puri *et al.*, 2009); (ii) las nanopartículas poliméricas, sintetizadas a partir de materiales naturales o

sintéticos, ya sea de monómeros o polímeros preformados (Bolhassani *et al.*, 2014), y las (iii) nanopartículas inorgánicas, sintetizadas a partir de materiales inorgánicos como el hierro, sílice y oro (Yang *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2004; Shukla *et al.*, 2005). Estas últimas se han vuelto más relevantes en el último tiempo, ya que presentan propiedades físicas y electromagnéticas especiales que les otorgan una mayor facilidad para ser funcionalizadas con otras moléculas y conferirles propiedades adicionales (Mitchell *et al.*, 2021). Entre los distintos tipos de nanopartículas inorgánicas, se encuentran las nanopartículas de oro, con un tamaño de hasta 100 nm (Alkilany & Murphy, 2010; Ekimov *et al.*, 1985), las cuales se pueden sintetizar de diferentes formas y tamaños, tales como prismas, varillas y esferas (Hu *et al.*, 2007).

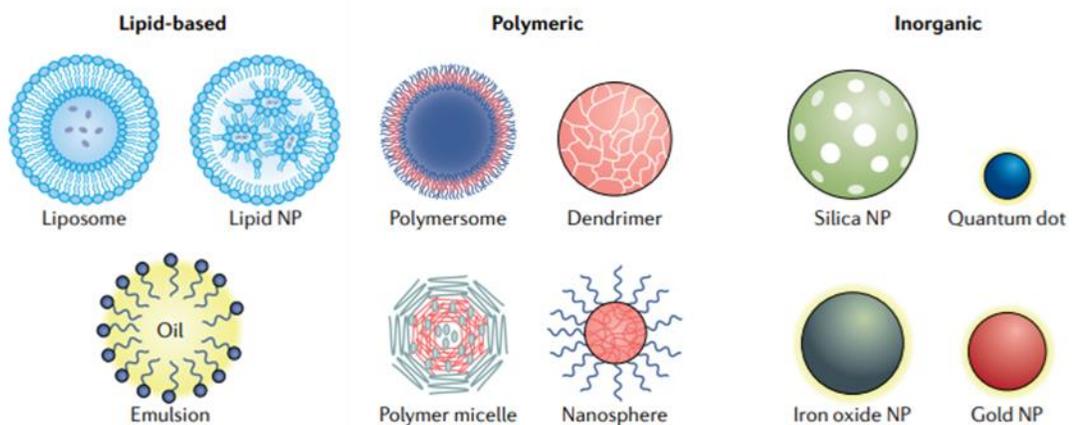


Figura 1. Clasificación de nanopartículas. Las nanopartículas se pueden clasificar en aquellas basadas en (i) Lípidos, (ii) Polímeros y (iii) Metales inorgánicos (Yang *et al.*, 2021).

La nanotecnología es un campo emergente de investigación interdisciplinaria que permite el diseño de nanomateriales capaces de interactuar con células y tejidos a nivel molecular (Mitchell *et al.*, 2021), ya que son capaces de atravesar barreras biológicas, circular por los vasos sanguíneos e interactuar con los compartimentos intracelulares y células del sistema inmune. Aunque sea una herramienta nueva, presenta diversas aplicaciones que van desde procesos industriales hasta su uso en medicina (Wang E. & Wang A., 2014). Sin embargo, a pesar de las proyecciones sobre su uso, se deben evaluar su eficacia y posibles riesgos para la salud humana (Isigonis *et al.*, 2019).

1.2 Nanopartículas de oro

Las nanopartículas de oro (AuNPs, por sus siglas en inglés) son un material nanoestructurado que se caracteriza por su alta relación superficie/volumen, biocompatibilidad y limitada toxicidad que demuestran gran relevancia para su uso en medicina (Rai *et al.*, 2016). Las AuNPs también presentan características estructurales tales como tamaño, forma variable y química superficial estrechamente ligada a su función, que le confieren versatilidad y capacidad para desempeñar múltiples funciones. Uno de los principales usos de las AuNPs ha sido vehiculizar moléculas, ya que son capaces de interactuar con sistemas biológicos, donde el tamaño ha sido relevante para esta función, tanto para cruzar

barreras biológicas como para la interacción con células y estimular la endocitosis, requiriendo un tamaño entre 15 y 30 nm (Alkilany & Murphy, 2010).

En este mismo contexto, se ha observado una mayor captación celular de AuNPs esféricas (Behzadi *et al.*, 2017), sin embargo, este es un proceso donde intervienen múltiples variables y se ha determinado que la modificación de la forma puede alterar la internalización, habiéndose reportado una disminución de la captación en presencia de AuNPs en forma de varillas y estrellas (Yue *et al.*, 2017). Otro aspecto necesario de verificar es la viabilidad celular, ya que se ha determinado que las AuNPs en forma de estrella disminuyen la viabilidad de las células humanas en comparación a las de forma esférica (Steckiewicz *et al.*, 2019). En este aspecto, es relevante la química de superficie, de las AuNPs, ya que es una característica estructural que se relaciona con la carga superficial, las moléculas unidas en la superficie y estado de agregación de éstas, que en conjunto van a definir su estabilidad y capacidad de interactuar con sistemas biológicos (Wang *et al.*, 2016).

En cuanto a la síntesis de las AuNPs, los protocolos utilizados derivan del método de Turkevich, basados en el crecimiento mediado por semilla utilizando oro coloidal desde una solución de ácido cloro áurico (HAuCl_4) y citrato trisódico, que

reduce el oro para así obtener las nanopartículas de oro (Turkevich *et al.*, 1951; Kimling *et al.*, 2006).

Las AuNPs pueden caracterizarse según su concentración, tamaño y carga superficial, ya que son capaces de absorber luz en la región visible del espectro electromagnético (DeLong *et al.*, 2010; Cho *et al.*, 2013). Al respecto, el fenómeno de resonancia de plasmón superficial involucra la perturbación de la luz producto de la nube de electrones de las nanopartículas de oro, y su capacidad de dispersar la luz, permitiendo utilizar métodos espectrofotométricos para determinar su concentración según la Ley de Lambert-Beer, y su carga superficial, denominada potencial Z (pZ), según la medición de la dispersión dinámica de la luz (Amina & Guo, 2020; Shang & Gao, 2014).

El potencial Z (pZ) es una propiedad superficial que deriva del comportamiento de las nanopartículas de oro en una solución iónica determinando su estabilidad electrostática. A partir de las cargas negativas del citrato y las cargas opuestas del solvente se forma una doble capa en la que se obtiene una carga neta superficial, donde los valores de potencial zeta entre -10 mV y +10 mV, se consideran una carga superficial neutra, mientras que valores superiores a +30 mV, son fuertemente catiónicos, e inferiores a -30 mV, son fuertemente aniónicos (Clogston & Patri, 2014; Rodriguez-Loya *et al.*, 2023). Esta determinación es

posible obtenerla midiendo la dispersión dinámica de la luz (Bhattacharjee S, 2017). Por otro lado, para conocer sobre su tamaño, forma y estado de agregación se utiliza la microscopía electrónica de transmisión y de barrido, que permiten obtener imágenes de alta resolución a escala nanométrica (Piella *et al.*, 2017). Adicionalmente, las nanopartículas se pueden caracterizar mediante distintos métodos, según sus características ópticas y físicas, las cuales son de gran importancia para el control de calidad en la síntesis y el uso posterior de estas mismas (Lelo *et al.*, 2021).

Las AuNPs se han destacado por sus propiedades fisicoquímicas que las convierten en una plataforma versátil para la vehiculización de oligonucleótidos, anticuerpos, fármacos, proteínas y péptidos (Yeh *et al.*, 2012). Esto se realiza mediante funcionalización de las AuNPs, lo cual es necesario para su estabilidad, biocompatibilidad y funcionalidad (DeLong *et al.*, 2010), habiendo motivado su amplio uso en biomedicina para el diagnóstico, exámenes imagenológicos de prevención y detección de enfermedades (Carabineiro *et al.*, 2017). Sin embargo, se ha innovado en su uso para el diseño de vacunas basadas en péptidos, tanto como vehículos como adyuvantes (Niikura *et al.*, 2013).

1.3 Diseño racional de vacunas

A lo largo de la historia, el uso de vacunas como estrategia de inmunización ha transformado la salud pública en las últimas décadas disminuyendo la cantidad de casos fatales asociados a enfermedades infecciosas (WHO, 2013). Al respecto se ha evidenciado que son capaces de estimular tanto el sistema inmune innato como adaptativo estimulando la maduración linfocitos T y B para desarrollar la producción de anticuerpos específicos para un determinado antígeno (Kasturi *et al.*, 2011). Este objetivo terapéutico se ha logrado mediante distintos tipos de vacunas, haciendo uso de microorganismos atenuados, inactivados, toxoides, subunidades (proteínas purificadas y péptidos) y ácidos nucleicos (Pollard & Bilker, 2021).

A pesar de este éxito, a nivel de salud pública, sigue siendo un desafío lograr el desarrollo de vacunas más seguras y eficaces debido a la gran diversidad de los microorganismos infecciosos que son patógenos para humanos (Malonis *et al.*, 2020). Al respecto, las vacunas convencionales incluyen microorganismos completos o proteínas que representan una gran carga antigénica potencialmente innecesaria que podrían producir reacciones alérgicas tales como hinchazón, dolor, fiebre, sarpullido y en ocasiones, convulsiones febriles (Li *et al.*, 2014; Pollard & Bilker, 2021).

Dentro del grupo vacunas de subunidades es posible destacar el desarrollo de vacunas peptídicas, las cuales son vacunas diseñadas exclusivamente con péptidos que son capaces de inducir una respuesta inmune mediada por linfocitos T y B (Sesardic, 1993). Su producción se caracteriza por ser económica, fácil, rápida, alta reproducibilidad y selectividad de péptidos inmunogénicos (Li *et al.*, 2014). Sin embargo, la desventaja que presentan es que disminuye la eficacia de la vacuna, ya que la inmunogenicidad del péptido por sí solo es más débil en comparación a las vacunas tradicionales que emplean patógenos completos, ya sea atenuados o inactivados, que presentan una mayor inmunogenicidad (Fujita & Taguchi, 2017).

Las nanovacunas forman parte de nuevas estrategias de vacunación actualmente bajo activo desarrollo, basadas en nanopartículas de diferente naturaleza que pueden vehiculizar una variedad de antígenos peptídicos y ácidos nucleicos (Boisguérin *et al.*, 2021). En particular, dentro del campo de las AuNPs, se ha reportado su aplicación para vehiculización de antígenos y péptidos inmunogénicos, en virtud de su elevada relación superficie/volumen que facilita funcionalizar múltiples copias de péptidos seleccionados para inducir una respuesta inmune (Fujita & Taguchi, 2017; Díaz-Arévalo & Zeng, 2020).

Para desarrollar la respuesta inmune adaptativa, debe ocurrir la presentación de antígenos a través del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II (MHC II), la cual es una función exclusiva de las células presentadoras de antígenos (CPA) (Robinson & Delvig, 2002), y se encuentra restringida a las características del péptido que presenta, y al bolsillo del alelo del antígeno leucocitario humano (HLA) al que se une, siendo relevantes la longitud del péptido, inmunogenicidad del epítipo para activar los linfocitos T cooperadores (CD4⁺), y la secuencia aminoacídica para determinar su afinidad por los alelos HLA a través de interacciones no covalentes (Paul *et al.*, 2013; Stryhn *et al.*, 2000).

Las vacunas basadas en péptidos surgen como una alternativa para optimizar la inducción de una respuesta inmune deseada, utilizando péptidos sintéticos que representan a un epítipo inmunogénico específico de un antígeno (Li *et al.*, 2014; Sesardic, 1993). El diseño de estas vacunas surge a partir del concepto de “péptidos promiscuos”, los cuales son péptidos que son capaces de unirse a múltiples moléculas HLA (Chicz *et al.*, 1993), las cuales presentan secuencias de unión a estos péptidos, y a pesar de que son altamente polimórficas, se han logrado identificar y describir en bases de datos tales como SYFPEITHI, MHCBN, Antigenm FIMM y HLA LIGAND (Wang *et al.*, 2008), donde ha sido posible predecir secuencias de péptidos capaces de unirse a esta moléculas de HLA, de los cuales uno de los que se proponen, corresponde al péptido AS4923,

caracterizado en Protein Data Bank (ID: 2G9H), el cual presenta una secuencia aminoacídica de PKYVKQNTLKLAT e interacciona con la molécula del MHC de clase II DRB1*0101, presentando un 100% de cobertura en la región con la que interacciona en el bolsillo del MHC II.

Se ha descrito como un péptido promiscuo la secuencia PKYVKQNTLKLAT que corresponde a los residuos 306 – 318 de la hemaglutinina del virus de la influenza A (Cepa A/England/878/1969 H3N2), estructura que por ser una proteína de superficie, ha sido relevante para el diseño de vacunas contra la influenza (Bullard & Weaver, 2021).

El péptido AS4923 se encuentra caracterizado en Uniprot con ID: P04664 con su estructura cristalizada en Protein Data Bank (PDB) con ID: 2G9H, unida en el bolsillo del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) II humano, presentando un porcentaje de cobertura del 100% y una equivalencia de residuos completa entre los residuos 91 – 103 de la cadena beta del MHC II. Además, ha demostrado ser capaz de estimular células mononucleares de sangre periférica, y ser un péptido que es reconocido por linfocitos T CD4⁺ a la hora de ser presentado a través del MHC II, activando linfocitos T CD4⁺, por ejemplo, en personas sanas o expuestas previamente al virus de la Influenza A H3N2 (Lamb *et al*, 1982; Babon *et al.*, 2012; Konstantinou, 2017).

Péptidos como estos pueden ser conjugados en la superficie utilizando el pentapéptido conector CALNN que presenta un grupo tiol en el residuo de cisteína para formar un enlace covalente con la superficie de la nanopartícula de oro, por ejemplo, para el diseño de nanovacunas (Lévy *et al.*, 2004; Egorova *et al.*, 2020). Mientras que el resto del péptido conector, corresponde a residuos hidrofóbicos de alanina, leucina y asparagina, con el grupo carboxílico terminal cargado negativamente, estabilizando la nanopartícula conjugada. Este método se basa en el intercambio de ligandos y se trata de la estrategia más simple para funcionalizar nanopartículas destinadas para aplicaciones biomédicas (Jia *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2021).

Uno de los aspectos más importantes para el diseño de vacunas basadas en péptidos es la identificación de epítomos que sean capaces inducir una respuesta inmune humoral y celular, incorporando múltiples epítomos y secuencias que optimicen el procesamiento intracelular, entre otras potencialidades que permite esta estrategia (Petrovsky & Aguilar, 2004; Purcell *et al.*, 2007). Sin embargo, existen antecedentes de que estas vacunas son menos inmunogénicas que las vacunas convencionales (Demento *et al.*, 2011).

Por lo tanto, las vacunas que emplean el uso de péptidos necesitan de la presencia de adyuvantes y vehículos transportadores para aumentar su estabilidad y estimular una respuesta inmune robusta, demostrando que en conjunto son capaces de activar a las células presentadoras de antígenos (Díaz-Arévalo & Zeng, 2020), objetivo el cual se puede lograr diseñando nanovacunas diseñadas con nanopartículas de oro conjugadas con péptidos inmunogénicos (Dykman, 2020).

1.4 Procesamiento y la Presentación de antígenos

Las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I (MHC I) y las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II (MHC II) son glicoproteínas que tienen la capacidad de unir a péptidos pequeños que son procesados a partir de una proteína más grande. El procesamiento de antígenos implica la fragmentación de proteínas y cargarlas en el bolsillo del MHC. En estas vías de procesamiento de antígenos participan distintas proteasas, siendo el proteosoma la protagonista de la vía citosólica a través del MHC I (Hewitt, 2003) y las catepsinas en la vía endocítica a través del MHC II (Sadegh-Nasseri & Kim, 2015).

El proteosoma es un complejo enzimático responsable de la degradación de proteínas propias y no propias, en antígenos peptídicos que se presentarán en el contexto del MHC I, a los linfocitos T citotóxicos (CD8⁺) (Sijts & Kloetzel., 2011). Este proceso llevado a cabo en células eucariotas es dependiente de energía, y ocurre a partir de la ubiquitinación de la proteína, en el cual participan la enzima activadora de la ubiquitina (E1), la enzima conjugadora de ubiquitina (E2) y la ubiquitina ligasa (E3). La ubiquitina forma un enlace tioéster entre un residuo de glicina y un residuo de lisina de la proteína objetivo, para luego ser reconocida por el proteosoma, el cual está compuesto por la proteasa central 20S (Tu *et al.*, 2012; Ebner *et al.*, 2017).

Por otro lado, las catepsinas participan en la vía de procesamiento endocítica y se encuentran albergadas en el interior ácido de los lisosomas que pueden fusionarse con endosomas con el fin de descomponer biomoléculas como lípidos, proteínas, polisacáridos y patógenos. Existe una gran variedad de estas proteasas y se clasifican según el aminoácido presente en su sitio activo, teniendo las familias de serina proteasas, aspartato proteasas y cisteína proteasas (Szulc-Dabrowska *et al.*, 2020; Yadati *et al.*, 2020). Dentro de esta última familia, las catepsinas de tipo B, L y S están involucradas en la degradación de antígenos exógenos que luego son cargados en el contexto del MHC II para presentarlos a linfocitos T CD4⁺ (Zhang *et al.*, 2000). Una vez

procesados los antígenos, se genera un extenso repertorio de péptidos candidatos a ser presentados ya sea en el contexto del MHC de clase I o MHC de clase II (Wieczorek *et al.*, 2017). Además, en ambas vías participan proteínas que catalizan la carga del péptido en esta molécula, ya sea la tapasina en el bolsillo del MHC I, o la cadena invariante en el bolsillo del MHC II, controlando la presentación de antígenos en superficie (Roche & Cresswell, 1990; Wright *et al.*, 2004).

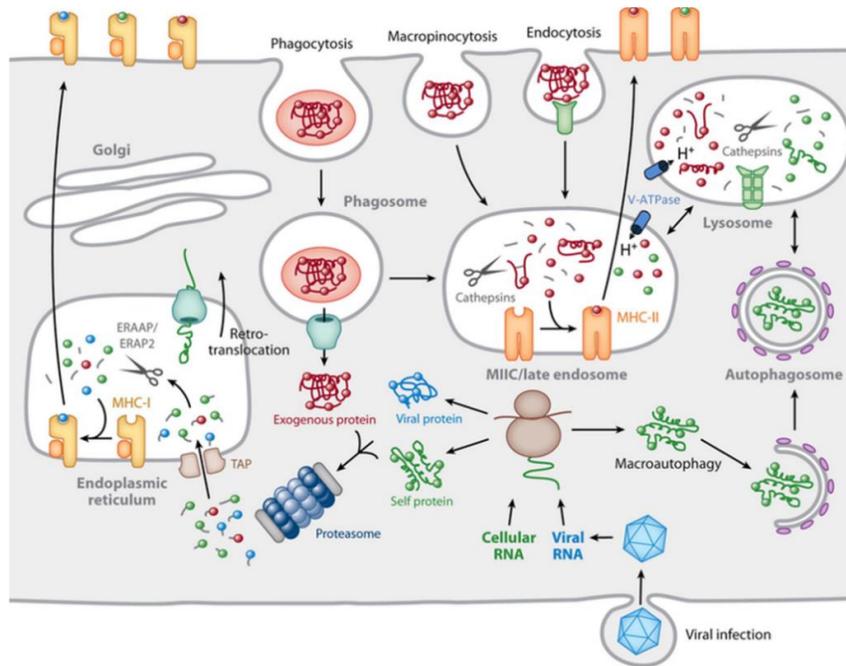


Figura 2. Mecanismos implicados en el procesamiento y presentación de antígenos en superficie. Descripción general de la formación del complejo MHC-péptido. A través de la vía citosólica de procesamiento de antígenos, las proteínas citosólicas son degradadas por el proteosoma y la posterior unión a moléculas MHC de clase I. Por otro lado, a través de la vía endocítica, las proteínas internalizadas en los endosomas son degradada por proteínas clásicamente llamadas cathepsinas y la posterior unión a moléculas MHC de clase II (Roche & Cresswell, 2016).

Las células presentadoras de antígenos tales como macrófagos, células dendríticas y linfocitos B, tienen como función capturar y procesar proteínas y péptidos que son posteriormente traslocados a la superficie celular para presentación a linfocitos T inmaduros, potencialmente iniciando una respuesta inmune adaptativa (Roche & Furuta, 2015). Por lo tanto, un péptido inmunogénico exógeno, podría ser capaz de activar en estas células, el procesamiento y la presentación de antígenos en el contexto del MHC clase II (Sadegh-Nasseri & Kim, 2015), evento el cual ocurre acompañado de un aumento en la expresión de señales coestimuladoras tales como CD40, CD80 y CD86 (Dong *et al.*, 2008; Melichar *et al.*, 2000; Said *et al.*, 2022).

En el contexto de diseñar vacunas basadas en nanopartículas para tratar enfermedades infecciosas, se han utilizado nanovacunas basadas en AuNPs conjugados con péptidos de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) (Sánchez-Villamil *et al.*, 2019), antígenos de superficie de virus de la hepatitis B, influenza (Dykman, 2020) y SARS-CoV-2 (Moshref *et al.*, 2022), tanto en modelo animal *in vivo* como *in vitro*. Utilizando este sistema se ha logrado exitosamente la estimulación de la respuesta inmune en función de la producción de anticuerpos específicos contra estos antígenos y la activación de linfocitos T CD4⁺ (Dey *et al.*, 2021).

En los últimos años, los trabajos en esta área se han limitado al modelo animal y no fue hasta el año 2024 en el que se publicó el primer trabajo en humanos, un Ensayo Clínico de Fase 1, en éste, individuos que recibieron una dosis de una nanovacuna contra el dengue, aumentaron significativamente el recuento de linfocitos T CD8⁺ (Miauton *et al.*, 2024). Sin embargo, aún hace falta mayor evidencia de que puedan ser una alternativa para el diseño de nanovacunas que sean inmunogénicas y biocompatible con la especie humana, tanto en los individuos como a nivel celular, ya que hace falta mayor evidencia de que puedan ser una alternativa para el diseño de vacunas. Asimismo, son escasas las publicaciones de trabajos que busquen dilucidar las vías de procesamiento y presentación de antígenos, en modelos humanos de manera *in vitro*.

La línea celular THP-1 corresponde a monocitos aislados de sangre periférica de una paciente con leucemia monocítica aguda (Tsuchiya *et al.*, 1980), la cual es ampliamente utilizada para estudiar la modulación de la respuesta inmune tanto en la participación de monocitos como de macrófagos. Existen distintos protocolos para promover su diferenciación desde monocitos a macrófagos utilizando Forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) (García *et al.*, 1999), Vitamina D3 (Liu *et al.*, 2005), y lipopolisacáridos (LPS) (Schreiber *et al.*, 2006). Sin embargo, se ha descrito que el agente diferenciador PMA, el cual es un análogo de diacilglicerol (DAG) (Newton *et al.*, 2001), es el más eficiente para obtener

macrófagos a partir de células THP-1, ya que adquieren características similares a los macrófagos obtenidos de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en relación a su morfología, transcripción y expresión de genes, y expresión de marcadores de superficie de macrófagos tales como CD14, CD11b y CD36 (Riddy *et al.*, 2018; Aldo *et al.*, 2013; Starr *et al.*, 2018), en comparación a otros protocolos de diferenciación y líneas celulares de monocitos (Genin *et al.*, 2015).

También, los macrófagos THP-1 han sido utilizados como modelo de macrófagos *in vitro* para estudiar su respuesta nivel molecular frente a nanopartículas de metal (Brzicova *et al.*, 2019). Entre estos experimentos, se han utilizado nanopartículas de sílice como suministro de antígenos con el fin de estimular la respuesta inmune. Sin embargo, los experimentos que se han desarrollado se limitan al estudio de la captación de estas nanopartículas y la viabilidad celular (Huang *et al.*, 2020), mientras que en este modelo celular solamente se ha determinado que las AuNPs esféricas son viables a concentraciones bajas de 10 $\mu\text{g/mL}$ AuNPs (Fátima *et al.*, 2015), pero con AuNPs en otras formas, por ejemplo varillas, se ha logrado determinar cómo se modula la producción de citoquinas antiinflamatorias y la expresión de receptores de superficie (Abuarqoub *et al.*, 2022; Ali *et al.*, 2021)

Con respecto al procesamiento de antígenos se ha descrito en este modelo celular que las proteasas del proteosoma se regulan positivamente frente a estímulos como LPS (Silswal *et al.*, 2017). También existe evidencia de que, tanto en macrófagos como células dendríticas de ratón, al ser enfrentadas a bacterias se estimula el procesamiento de antígenos, aumentando significativamente la actividad de la proteasa central 20S. Por su parte, con respecto a las catepsinas se ha demostrado que la catepsina B, de tipo cisteína peptidasa, aumenta su expresión y actividad tanto en macrófagos derivados de PBMC, como de aquellos obtenidos de la línea celular THP-1, al ser enfrentados a *Mycobacterium tuberculosis* (Szulc-Dabrowska *et al.*, 2020). Además, en ambos casos es posible determinar la actividad de estas proteasas a través de kits de ensayos fluorimétricos (D'Souza., *et al* 2013; Amaral., *et al* 2018)

Por otro lado, para el estudio de la presentación de antígenos en superficie, ha sido posible determinar la localización del complejo péptido-MHC de clase II, tanto en su traslado en el citoplasma, como en la superficie celular. Esto ha sido posible a través microscopía de fluorescencia, colocalizándolo con estructuras como lisosomas y catepsinas (Walseng., *et al* 2008), o directamente contra el complejo péptido-MHC II, cuando se colocaliza con los lípidos de la membrana plasmática (Bosch., *et al* 2013).

Esto también se puede determinar de una manera más indirecta, a partir del cocultivo con células presentadoras de antígenos y linfocitos T inmaduros, analizando posteriormente los niveles de expresión de MHC II en las células presentadoras de antígenos (Lipski *et al.*, 2017; Alkhatabi *et al.*, 2022), o cuantificando citoquinas específicas de linfocitos T CD4⁺ y midiendo su capacidad de proliferación (Viana *et al.*, 2016; Campisi *et al.*, 2017).

En este trabajo de Tesis de Magíster en Bioquímica Clínica e Inmunología, que se realizó en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción, en colaboración con la Universidad San Sebastián, Concepción, se buscó investigar el procesamiento y la presentación de antígenos en la superficie de macrófagos THP-1 tratados con nanopartículas de oro conjugadas con el péptido AS4923, como modelo de nanovacuna. Este estudio se enfocó en la medición de la actividad de las enzimas claves que participan en el procesamiento de antígenos a través de la vía citosólica y endocítica, y finalmente determinando la presentación de antígenos en la superficie de macrófagos THP-1, en función de medir el número de moléculas de CD40, CD86 y MHC de clase II, a través de citometría de flujo.

2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Las nanopartículas de oro conjugadas con péptidos prometen ser una plataforma innovadora y versátil para el diseño de nanovacunas. Sin embargo, aún es escasa la evidencia que permita demostrar que son eficaces para la especie humana. Actualmente no se han realizado experimentos consistentes *in vivo* en humanos, mientras que, de manera *in vitro* se han desarrollado experimentos en la línea celular humana THP-1, los cuales se limitan solamente a evaluar la viabilidad celular y captación de éstas, por lo que se desconoce el efecto sobre el procesamiento y presentación de antígenos al ser tratadas con nanopartículas de oro conjugadas con péptidos, por ejemplo, el péptido AS4923.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto de las nanopartículas de oro conjugadas con el péptido AS4923 sobre el procesamiento y la presentación de antígenos en la superficie de macrófagos THP-1?

4. HIPÓTESIS

Las nanopartículas de oro conjugadas con el péptido AS4923 activan el procesamiento y la presentación de antígenos en macrófagos THP-1.

5. OBJETIVO GENERAL

Evidenciar el procesamiento y la presentación de antígenos en la superficie de macrófagos THP-1 tratados con nanopartículas de oro conjugadas con el péptido AS4923.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.** Evaluar el procesamiento de antígenos vía citosólica de las nanopartículas de oro conjugadas con el péptido AS4923 en macrófagos THP-1
- 2.** Evaluar el procesamiento de antígenos vía endocítica de las nanopartículas de oro conjugadas con el péptido AS4923 en macrófagos THP-1.
- 3.** Determinar la presentación de antígenos del epítipo contenido en el péptido AS4923 conjugado con nanopartículas de oro en macrófagos THP-1.

7. METODOLOGÍA

7.1 Diseño del estudio

Se realizó un estudio de tipo experimental para evaluar de manera *in vitro* el procesamiento y la presentación de antígenos en la superficie de macrófagos THP-1 tratados con nanopartículas de oro conjugadas con el péptido AS4923.

7.2 Síntesis de nanopartículas de oro desnudas y conjugadas con el péptido AS4923

La síntesis de las nanopartículas de oro se realizó en la Universidad San Sebastián, Concepción, en la Facultad de Ingeniería y Tecnología, en el marco del Proyecto FONDECYT N° 1221434. El método de síntesis de las nanopartículas de oro desnudas, o sea sin funcionalizar, se basa en la reducción de citrato. En un tubo eppendorf de 1.5 mL se depositó 1.0 mL de ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) 1 mM y 100 μL de citrato de sodio ($\text{NaH}_2(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3)$) 40 mM, logrando una relación molar 1:4. Luego se ajustó a pH 5,3 utilizando hidróxido de sodio (NaOH) 0,1 M. Se incubó en un

termobloque previamente calentado a 105°C durante 30 minutos, luego se dejó enfriar a temperatura ambiente. La solución fue filtrada utilizando un filtro de nylon Millipore (0,45 µm), se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos, se removió el sobrenadante, luego el pellet se resuspendió con PBS 1X y finalmente se conservó a 4°C en oscuridad, hasta realizar la caracterización y ensayos celulares (Díaz-García *et al.*, 2023).

Para la funcionalización de las nanopartículas de oro, para obtener las AuNPs conjugadas con el péptido AS4923 (AuNPs-AS4923), se realizó una metodología de un solo paso (Jia *et al.*, 2019). El procedimiento es similar al anterior, sin embargo, en la solución del eppendorf de 1.5 mL se añadió el péptido de interés CALNNPKYVKQNTLKLAT, formando una mezcla AuNPs;Péptido en una relación 1:100.000, junto con 100 µL de buffer de clivaje. Se aplicó vortex durante 5 minutos y se mantuvo en agitación orbital durante 2 días. Luego se centrifugó y se resuspendió el pellet como se mencionó anteriormente para almacenar las AuNPs-AS4923.

En los ensayos celulares que se realizaron posteriormente, se buscó comparar los resultados utilizando un control de nanopartículas de oro desnuda, comparándolo con las nanopartículas de oro conjugadas con el péptido AS4923 y el péptido por sí solo. Por lo tanto, las nanopartículas de oro desnudas también

fueron caracterizadas. Además, en cada ensayo se contó con un control de 0 pM de AuNPs, en el que la célula será tratada solamente con medio de cultivo de células THP-1.

7.3 Concentración de nanopartículas de oro conjugadas con el péptido AS4923

La concentración se determinó mediante espectroscopia UV-Vis utilizando un espectrofotómetro de microplacas Epoch TM (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, EE. UU.) en la Universidad San Sebastián, Concepción, Chile. Se sembró por duplicado, 100 μ L de la muestra, en placa de 96 pocillos (SPL, Life Sciences) con un área de 0,32 cm^2 y se registró el espectro de absorción en la región visible (400 a 900 nm). Luego en función de la máxima absorbancia alcanzada a la longitud de onda de 525 nm se calculó la concentración de las nanopartículas de oro según la ley de Lambert-Beer, utilizando el coeficiente de extinción molar (ϵ) de $2,01 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Contreras-Trigo *et al.*, 2018).

$$\textit{absorbancia} = \textit{coeficiente de extinción molar} \times \textit{paso óptico} \times \textit{concentración}$$

7.4 Potencial Z (pZ) de las nanopartículas de oro conjugadas con el péptido AS4923

Las mediciones de la carga superficial se midieron a través de la distribución del potencial Zeta (pZ) de las nanopartículas de oro utilizando el equipo Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments, Westborough, MA, EE. UU., en la Universidad de Concepción, a temperatura ambiente y un ángulo de dispersión de 90° y 1 cm de longitud de trayectoria. Se dispuso de una suspensión diluida de nanopartículas de oro (100 µl diluidos en 1 ml de agua nanopura) para los análisis. Luego se utilizó el software Malvern Zetasizer versión 7.12 para analizar los datos recopilados (Contreras-Trigo *et al.*, 2018).

7.5 Tamaño y forma de las nanopartículas de oro conjugadas con el péptido AS4923

El tamaño y forma de las nanopartículas de oro se determinó mediante microscopía electrónica de transmisión con resolución de 4 Å (TEM; JEOL-JEM 1200EX-II, Tokio, Japón), utilizando una cámara Gatan CCD para la adquisición

de imágenes (modelo 782; Gatan, Inc., Pleasanton, CA, EE. UU.) Las muestras fueron sembradas sobre rejillas de cobre de malla 200 recubiertas con formvar/carbono y se dejaron secar a temperatura ambiente. Los tamaños de partículas y los histogramas de frecuencia se obtuvieron midiendo el diámetro de 100 nanopartículas utilizando el software ImageJ y se calculó el porcentaje de esfericidad (Número de nanopartículas de oro esféricas/total) (Contreras-Trigo *et al.*, 2018).

7.6 Cultivo de células THP-1 y diferenciación a macrófagos THP-1

Las células THP-1 fueron donadas por MSc. Paula Bustos del Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción. Se inició el cultivo de estas células en botellas de cultivo celular T-25 (SPL, Life Sciences) utilizando el medio RPMI 1640/ L-Glutamina en polvo (Life Sciences), junto con 2,0 g de bicarbonato de sodio (MERCK), disueltos en agua autoclavada, ajustando a pH: 7,4 utilizando el medidor de pH HANNA EDGE HI2002 y se filtró utilizando el sistema de filtración Ultra Cruz PES 0,22 µm, para luego añadir penicilina/estreptomicina 100 unidades/mL (Life Technologies). Se preparó el medio de cultivo completo para las células THP-1 utilizando medio RPMI 1640/L-Glutamina suplementado con 10% de suero fetal de bovino

(Biological Industries), 2-mercaptoetanol 0,05 mM (MERCK), 1 mM Piruvato de sodio (Gibco), 10mM HEPES (MERCK), 13,9 mM Glucosa (MERCK). Luego fueron incubadas a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %.

Para el protocolo de diferenciación se aplicó PMA 200 ng/mL por 24 horas, se eliminó el sobrenadante y se agregó lipopolisacárido (LPS) 100 ng/mL durante 4 horas (Chanput *et al.*, 2010).

7.7 Determinación del fenotipo de macrófagos THP-1 por RT-qPCR

Luego de la diferenciación se extrajo el ARN total usando el mini kit RNeasy y el protocolo DNase (Qiagen, #74104). El ARNm contenido en 1 µg de ARN total se transcribió de forma inversa utilizando el kit de Transcripción Reversa – Kit Promega #A3500. Los ensayos de reacción de amplificación se realizaron utilizando el mix qPCR - 5 x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX) junto con el sistema automatizado de PCR Applied Biosystem 7500.

Se usó 28S (ARN ribosomal) como gen de referencia para la normalización y dependiendo de la expresión de los genes, junto con la eficiencia de amplificación, se cuantificó utilizando el método más apropiado, por ejemplo, el método de Livak $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

La comparación de la amplificación de los genes con respecto a los valores de Ct (Número del ciclo en el que la señal fluorescente cruza el umbral), se realizó entre los macrófagos THP-1 con respecto a las células THP-1, por triplicado.

Tabla 1: Especificación de los partidores de los genes utilizados.

Partidores	Secuencia
28S	F: TTGAAAATCCGGGGGAGAG R: ACATTGTTCCAACATGCCA
TNF- α	F: GGAGAAGGGTGACCGACTCA R: CTGCCCAGACTCGGCAA
CD11b	F: CAGCCTTTGACCTTATGTCATGG R: CCTGTGCTGTAGTCGCACT

F: Forward. R: Reverse.

7.8 Determinación del fenotipo de macrófagos THP-1 por citometría de Flujo

Se complementó la determinación del Fenotipo de los macrófagos THP-1 a través de citometría de flujo con el apoyo de la Dra. Estefanía Nova. Se realizó el marcaje de las siguientes moléculas de superficie en 1×10^6 células durante 1 hora a 4°C, utilizando los siguientes anticuerpos: Anticuerpo anti CD86 humano PE (374206), Anticuerpo anti HLA DR humano APC (307622) para MHC II, Anticuerpo anti CD40 humano FITC (E00279) y Anticuerpos anti CD11b APC (340937). Cada muestra se preparó al menos por triplicado y luego fueron procesadas a través del citómetro de flujo LSR-Fortessa X20 (BD) y los datos fueron analizados en el software FlowJo (BD). Se realizó la comparación entre la población celular de células THP-1 y macrófagos THP-1, en función de su tamaño (Forward scatter), granularidad (Side scatter), recuento celular (%) e intensidad de fluorescencia media (MFI).

7.9 Ensayo de viabilidad celular MTT e IncuCyte con nanopartículas de oro conjugadas con el péptido AS4923

Para AuNPs desnuda y AuNPs-AS4923 se trabajó con una curva concentración entre 0 – 1000 pM, tratando a los macrófagos THP-1 durante 24 horas a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %, en donde cada condición se trabajó por triplicado. Luego se realizó el ensayo de viabilidad celular MTT utilizando el protocolo Cur Vybrant MTT Cell proliferation assay kit. Se utilizó la sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a una concentración de 12 mM, se incubó a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % durante 4 horas y las reductasas mitocondriales formaron los cristales de formazán que luego fueron disueltos con dimetilsulfóxido. Finalmente se cuantificó la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm en el lector de microplacas SYNERGY 2 BIOTEK. De esta manera los valores de absorbancia se normalizaron con respecto al control 0 pM de nanopartículas de oro y se determinó como el porcentaje de actividad metabólica.

Para el ensayo de viabilidad celular IncuCyte, previamente los macrófagos fueron tratados con la misma curva de concentraciones, tanto de AuNPs desnuda como de AuNPs-AS4923, se utilizó el equipo IncuCyteS3 (Sartorius GA, Gotinga Alemania), junto con la sonda fluorescente Sytox Green (1x, Invitrogen). Se

obtuvieron imágenes con un objetivo 10x, durante un periodo de tiempo de 24 horas de exposición a las nanopartículas de oro. Además, con las imágenes se segmentó cada célula y se realizó el recuento de cada una de ellas para medir la proliferación de los macrófagos THP-1, normalizada a tiempo 0. En ambos análisis, se utilizó el software IncuCyte S3 para adquirir los datos con respecto al porcentaje de muerte celular entregado por la señal fluorescente y las segmentaciones.

7.10 Determinación de la actividad del proteosoma 20S con las nanopartículas de oro conjugadas con el péptido AS4923

Se preparó una placa con 1×10^5 células THP-1 y se diferenciaron como se indicó en el punto 7.6 de la metodología. Luego se incubaron durante 24 horas a las dos concentraciones más altas de AuNPs desnuda y AuNPs-AS4923, en las que los macrófagos THP-1 presentaron la máxima actividad metabólica y la mínima muerte celular, la cual correspondió a 10 y 100 pM, y se deseó comparar con el péptido por sí solo. Luego se utilizó el kit de ensayo de actividad del proteosoma 20S (No. 10008041) (D'Souza., *et al* 2013), que emplea el uso de un buffer de lisis y ciclos de centrifugación para luego agregar el sustrato para la subunidad

20S del proteosoma, el péptido SUC – LLVY conjugado con el fluoróforo 7-amino-4-metilcumarina (AMC) para medir la señal de fluorescencia en lector de microplacas SYNERGY H1 BIOTEK, en unidades arbitrarias (UA), para un espectro de excitación de 360 nm y emisión de 480. Durante el ensayo se utilizó el reactivo epigallocatequina, un inhibidor específico del proteosoma y para los análisis posteriores se restó a la actividad del proteosoma de cada condición, la actividad del proteosoma cuando se encontraba inhibido, para así comparar entre cada condición, la actividad del proteosoma específica. Además, se preparó una curva de calibración de 6 puntos, incluyendo el cero, con un control positivo que incluía el kit de un lisado de células Jurkat.

7.11 Determinación de la actividad de catepsina B con las nanopartículas de oro conjugadas con el péptido AS4923

Se preparó una placa con 1×10^5 células THP-1 y se diferenciaron como se indicó en el punto 7.6 de la metodología. Luego se incubaron durante 24 horas a las dos concentraciones más altas de AuNPs desnuda y AuNPs-AS4923, en las que los macrófagos THP-1 presentaron la máxima actividad metabólica y la mínima muerte celular, la cual correspondió a 10 y 100 pM, y se deseó comparar con el péptido por sí solo. Luego se utilizó el kit de ensayo de actividad de catepsina B

(ab65300), que emplea el uso de un buffer de lisis y ciclos de centrifugación y lavados con PBS 1X para luego agregar el sustrato para la proteasa catepsina B, el péptido Ac- RR conjugado con el fluoróforo amino-4-trifluorometil cumarina (AFC) para medir la señal de fluorescencia en lector de microplacas SYNERGY H1 BIOTEK en unidades arbitrarias (UA) para un espectro de excitación de 400 nm y emisión de 505. Durante el ensayo se utilizó un inhibidor de catepsinas, incluido en el kit y para los análisis posteriores se restó a la actividad de catepsina B de cada condición, la actividad de catepsina B cuando se encontraba inhibida, para así comparar entre cada condición la actividad de catepsina B específica.

Finalmente, el análisis de los datos realizó normalizando los valores de unidades arbitrarias con respecto a la fluorescencia obtenida con el control de 0 pM de nanopartículas de oro, que corresponde a las células tratadas solamente con medio de cultivo de THP-1.

7.12 Determinación de la presentación de antígenos en macrófagos

THP-1 tratados con las nanopartículas de oro conjugadas con el péptido AS4923

Se diferenciaron 1×10^6 células THP-1 como se indicó en el punto 7.6 de la metodología y luego se incubaron durante 24 horas a la concentración en la que el procesamiento de antígenos medido a través de la actividad de proteasas según en los puntos 7.10 y 7.11 de la metodología, sea diferenciable entre las AuNPs desnuda y AuNPs-AS4923, la cual correspondió a 10 pM. Después se realizó el marcaje de los siguientes marcadores de superficie, durante 1 hora a 4°C, utilizando los siguientes anticuerpos: Anticuerpo anti CD86 humano PE (374206), Anticuerpo anti HLA DR humano APC (307622) para MHC II, Anticuerpo anti CD40 humano FITC (E00279). Cada muestra se preparó por triplicado y luego fueron procesadas a través del citómetro de flujo LSR-Fortessa X20 (BD) y los datos fueron analizados en el software FlowJo (BD). Luego se realizó la comparación en función de la intensidad de fluorescencia media (MFI) entre macrófagos THP-1 tratados.

7.13 Análisis estadístico

El análisis estadístico y los gráficos fueron realizados utilizando el software GraphPad Prism 8 ®. Las variables continuas se expresaron como media \pm desviación estándar (D.E), y se compararon con la prueba t de Student o bien se compararon mediana en un Rango Intercuartílico (RIC), con la prueba U de Mann-Whitney respectivamente, dependiendo si los conjuntos de datos presentaron distribución normal o no, mediante la Prueba de Shapiro-Wilk.

Con respecto a las AuNPs desnudas y AuNPs-AS4923, se ordenaron los datos asociados a concentración, potencial Z y análisis densitométrico comparando las medias \pm desviación estándar (D.E), o bien mediana en un Rango Intercuartílico (RIC), dependiendo de la distribución de los datos.

Con respecto a los ensayos celulares asociados a la determinación del Fenotipo de Macrófagos THP-1, el procesamiento y la presentación de antígenos se contaron valores de Ct, tamaño (Forward scatter), granularidad (Side scatter), recuento celular (%) e intensidad de fluorescencia media (MFI), porcentaje de actividad metabólica y Muerte celular, actividad del proteosoma 20S y actividad de catepsina B. Se aplicaron pruebas de normalidad y para posteriormente

realizar comparaciones multiparamétricas ya sea utilizando pruebas paramétricas o no paramétricas, comparando el efecto observado con los respectivos controles y condiciones. En cada análisis estadístico se estableció como estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

8. RESULTADOS

8.1 Concentración de nanopartículas de oro conjugadas con el péptido AS4923

Se midió el plasmón de resonancia superficial de las nanopartículas de oro a la haciendo la lectura del espectro de absorción entre 400 y 900 nm, tanto para las nanopartículas de oro desnuda (AuNPs desnuda), como aquellas conjugadas con el péptido AS4923 (AuNPs-AS4923), como se muestra en la Figura 1A.

Se obtuvieron espectrogramas similares, sin embargo, la intensidad de absorción máxima de las AuNPs desnuda fue de 1,596 a 525 nm, mientras que para las AuNPs AS4923 fue de 0,859 a 529 nm. A partir de estos valores, a través de la Ley de Lambert-Beer se determinó que las concentraciones fueron de 26 nM y 14 nM, respectivamente.

Se determinó el potencial Z midiendo la dispersión dinámica de la luz de las nanopartículas de oro, donde se observó que para ambas muestras existe un peak de dispersión único que difieren en magnitud, tal y como se muestra en la Figura 1B. Se determinó por triplicado que la carga superficial en función del

Potencial Z de las AuNPs desnuda fue de $-37,53 \pm 0,58$ mV, mientras que el de las AuNPs-AS4923 fue $-1,26 \pm 0,42$ mV, siendo significativamente menor.

La caracterización de las nanopartículas de oro se complementó a través del análisis por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), imágenes que se muestran en la Figura 1C y 1E, para las AuNPs desnudas y Figura 1D y 1F, para las AuNPs-AS4923, con sus respectivos histogramas, que respaldan su forma esférica y distribución de tamaño.

Se determinó que las AuNPs desnudas presentaron un tamaño, según su diámetro, de 22,0 (21,0 – 22,5) nm, con un coeficiente de variación del 7,15% y un porcentaje de esfericidad del 86%. Mientras que las AuNPs-AS4923 presentaron un tamaño significativamente menor, con un diámetro de 9,0 (7,0 – 12,0) nm, coeficiente de variación del 27,58% y un porcentaje de esfericidad del 100%.

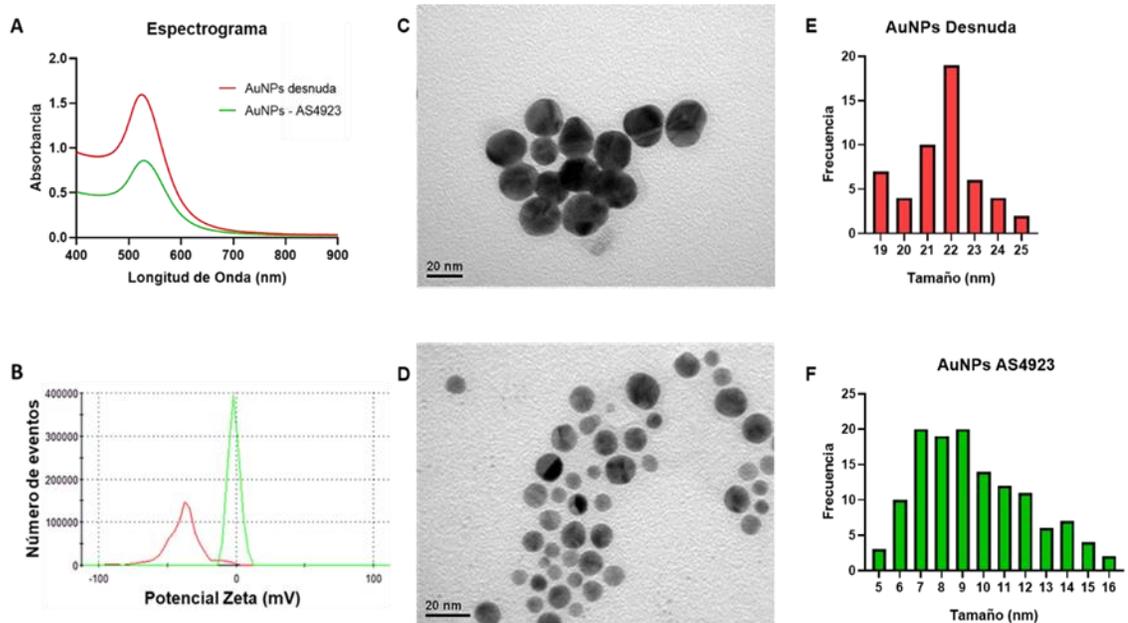


Figura 3. Caracterización de las nanopartículas de oro: **A)** Espectro de absorción en la región visible (400 a 900 nm) para las nanopartículas de oro desnudas (AuNPs desnuda, línea roja), y para nanopartículas de oro conjugadas con el péptido AS4923 (AuNPs-AS4923, línea verde). **B)** Distribución del potencial Zeta (mV) de las AuNPs desnuda (línea roja), y AuNPs-AS4923 (línea verde). **C)** y **D)** Imágenes por Microscopía Electrónica de Transmisión de AuNPs desnuda y AuNPs-AS4923, respectivamente, con una barra de escala de tamaño de 20 nm. **E)** y **F)** Histogramas con la distribución de los tamaños de AuNPs desnuda en barras rojas, y AuNPs-AS4923 en barras verdes. N= 3 replicados.

9.2 Fenotipo de macrófagos THP-1 por RT-qPCR

Se determinó que los macrófagos THP-1 presentaron un aumento de los niveles de expresión del gen que codifica para TNF- α , en comparación con las células THP-1, los cuales no presentaron una curva de amplificación para este gen, tal y como se muestra en la Figura 2A y 2B, con un único producto de PCR según su curva de melting. Por otro lado, en la Figura 2C y 2D, con respecto al gen que codifica para CD11b, se observa que los niveles de expresión aumentaron significativamente en los macrófagos THP-1 con respecto a las células THP-1. Además, para este gen también se observó un único producto de PCR según su curva de melting.

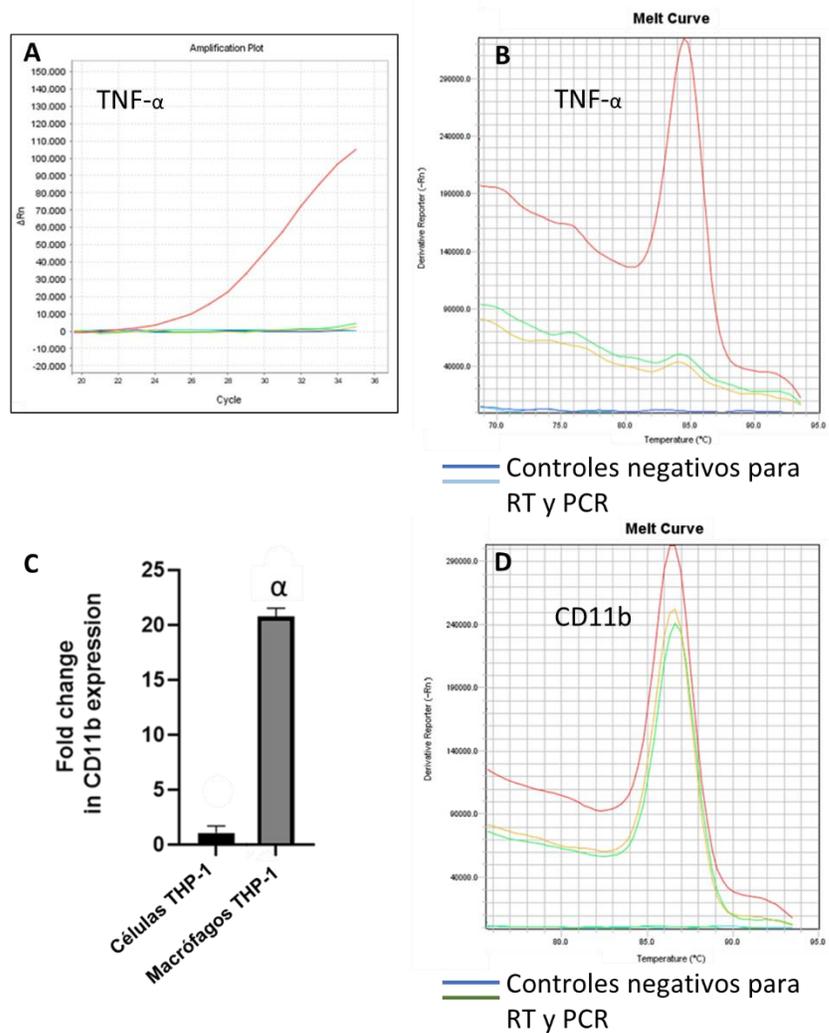


Figura 4. Expresión de del gen TNF- α y CD11b en macrófagos THP-1: **A)** Curva de amplificación para el gen que codifica para TNF- α en células THP-1 (línea verde), y Macrófagos THP-1 (línea roja). y **B)** Curva de melting para el producto de RT-qPCR correspondiente al gen que codifica TNF- α . Controles negativos para producto de transcripción reversa (RT) y PCR, en azul y celeste, respectivamente. **C)** Niveles de expresión del gen que codifica para CD11b, de macrófagos THP-1. **D)** Curva de melting para el producto de RT-qPCR correspondiente al gen que codifica CD11b. α : $p < 0,05$ con respecto a células THP-1. N= 3 replicados.

8.3 Fenotipo de macrófagos THP-1 por citometría de flujo

Se determinó que los macrófagos THP-1, con respecto a las células THP-1, presentaron un aumento significativo del tamaño y granularidad, según sus valores de Forward scatter y Side scatter, en 1,7 y 1,3 veces, respectivamente, tal y como se muestran en la Figura 3A y 3B. Además, en la Figura 3C y 3D, se muestra en el plot de citometría como se desplaza la población de células THP-1, según estos valores, cuando se diferencia a macrófagos THP-1.

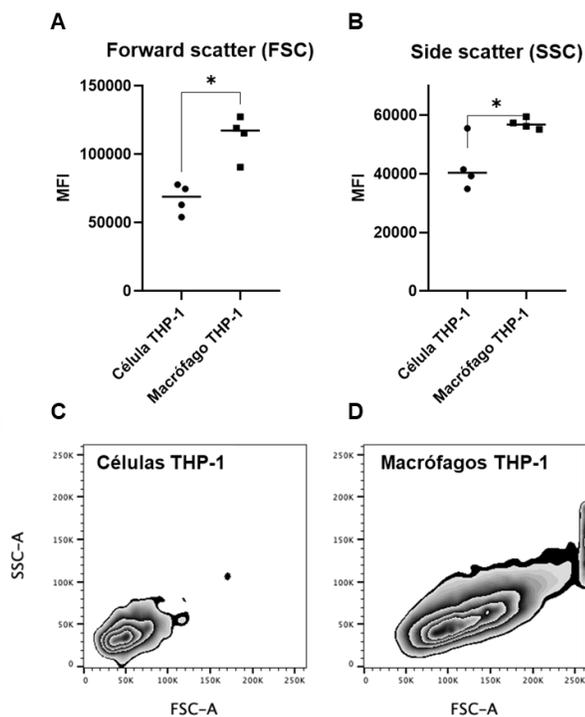


Figura 5. Tamaño y granularidad de Macrófagos THP-1: A) Tamaño (Forward Scatter) y **B)** Granularidad (Side Scatter). **C)** Plot de citometría de células THP-1. **D)** Plot de citometría de macrófagos THP-1. *: $p < 0,05$, con respecto a Células THP-1. N= 4 replicados.

Los macrófagos THP-1 presentan un fenotipo similar a las células THP-1 con respecto a los marcadores de superficie CD40 y CD86, ya que ambas poblaciones no presentaron diferencias significativas en el recuento celular, como se muestra en la Figura 4A y 4B. Mientras que en la Figura 4C, para el marcador CD11b se observó un aumento significativamente mayor en los macrófagos THP-1, en 2,4 veces.

Por otro lado, con respecto al marcador de superficie HLA-DR, que corresponde al complejo mayor de histocompatibilidad de Clase II (MHC II), en la Figura 4D, se observó que tanto las células THP-1 como los macrófagos THP-1, presentaron aproximadamente en un 100 % de sus poblaciones este marcador, sin presentar diferencias significativas.

Sin embargo, según la intensidad de fluorescencia media (MFI), se logró determinar que el número de moléculas MHC II, en la Figura 4E, aumentó significativamente en macrófagos THP-1, en 2,3 veces, con respecto a las células THP-1.

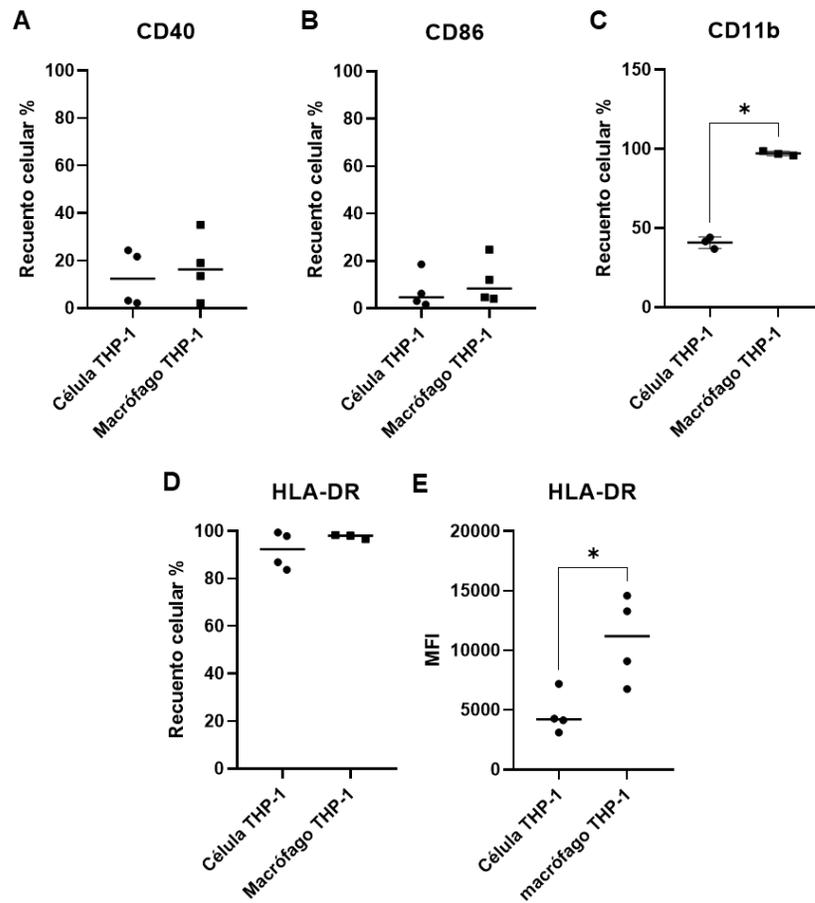


Figura 6. Expresión de marcadores de superficie en macrófagos THP-1: Porcentaje de recuento celular de células THP-1 y macrófagos THP-1, de los marcadores **A) CD40**, **B) CD86**, **C) CD11b** y **D) HLA-DR**; **E) Intensidad de fluorescencia media (MFI) de HLA-DR**. *: $p < 0,05$ con respecto a Célula THP-1. N= 3 replicados.

8.4 Ensayo de viabilidad celular MTT con nanopartículas de oro

Se determinó que el 100 % de la actividad metabólica se alcanzó con los macrófagos THP-1 a 0 pM de nanopartículas de oro conjugadas con el péptido AS4923 (AuNPs-AS4923), mientras que se utilizó como control de muerte celular, dimetilsulfóxido (DMSO) al 10%, disminuyendo significativamente el porcentaje de viabilidad celular hasta un 22,67 % tal como se muestra en cada gráfico de barras de la Figura 5A.

En la Figura 5A se muestra que la actividad metabólica de los macrófagos THP-1 tratados con las AuNPs-AS4923 disminuye significativamente a 100 pM, pero solamente con respecto a 0,1 pM. Este efecto también se observó a 1000 pM ya que la disminución también fue significativa, pero con respecto a todas las concentraciones de AuNPs-AS4923 a las que se trabajó, incluyendo el control de 0 pM. También se evaluó el efecto del solvente de las AuNPs-AS4923, PBS 1X al 10%, y se observó que la actividad metabólica no se veía modificada. Por otro lado, en la Figura 5B, se graficó la curva que muestra la relación dosis – respuesta, la cual indica que la concentración de AuNPs-AS4923 para alcanzar el 50 % del efecto biológico de la disminución de la actividad metabólica observada entre 100-1000 pM, es de 163 pM.

Por lo tanto, se descarta la concentración de AuNPs-AS4923 de 1000 pM y se estableció 100 pM como la máxima concentración de trabajo para los posteriores ensayos celulares.

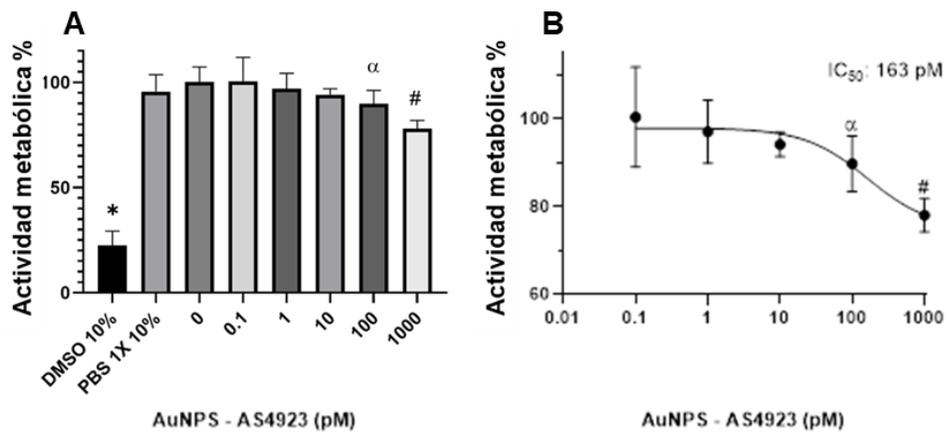


Figura 7: Actividad metabólica de macrófagos THP-1 tratados con nanopartículas de oro conjugadas con el péptido AS4923. A) Porcentaje de actividad metabólica, frente al control de muerte celular con DMSO 10%, efecto del solvente de AuNPs-AS4923 (PBS 1X 10%) y la curva de concentraciones de AuNPs-AS4923 entre 0 – 1000 pM, y **B)** Curva de dosis respuesta, frente a la curva de concentraciones de AuNPs-AS4923 entre 0 – 1000 pM. *p < 0,05 con respecto a todas las otras condiciones. α: p < 0,05 con respecto a 0.1 pM. IC₅₀: Concentración de inhibición del 50 % de la actividad metabólica. N= 3 replicados.

8.5 Ensayo de viabilidad celular IncuCyte con nanopartículas de oro

En la Figura 6A, se muestra que se determinó el porcentaje de muerte celular de macrófagos THP-1 con las nanopartículas oro conjugadas con el péptido AS4923 (AuNPs-AS4923) no se vio modificado durante un periodo de 24 horas en ninguna de las concentraciones probadas entre 0 y 1000 pM. Todas estas condiciones presentaron valores de porcentaje de muerte celular entre un 10 – 20%, sin presentar diferencias significativas, incluso en la condición en la que se evaluó el solvente de las AuNPs-AS4923, PBS 1X 10%. Sin embargo, se observó que la muerte celular aumentó continuamente en el tiempo al probar el control de muerte celular con dimetilsulfóxido (DMSO) al 10%.

Por otro lado, en la Figura 6B, en el mismo experimento, se determinó que no existen diferencias significativas en la capacidad de proliferación de los macrófagos THP-1 tratados, con respecto a ninguna condición.

Por lo tanto, este ensayo indica que los macrófagos son viables en todas las concentraciones tratadas de AuNPs-AS4923.

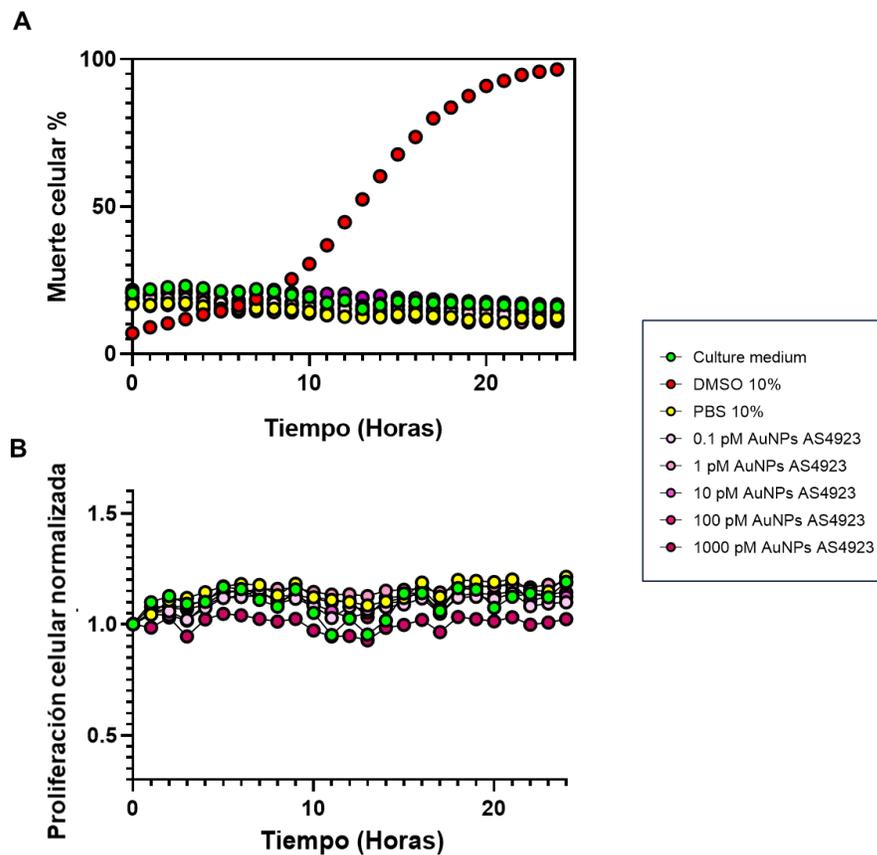


Figura 8: Viabilidad celular de macrófagos THP-1 en presencia de nanopartículas de oro conjugadas con el péptido AS4923. A) Porcentaje de muerte celular de los macrófagos THP-1, y B) Proliferación celular normalizada de los macrófagos THP-1, tratados con AuNPs-AS4923 durante 24 horas. En el gráfico se indica en el recuadro, el color de cada condición evaluada.

8.5 Actividad del proteosoma 20S con nanopartículas de oro

Para evaluar la actividad del proteosoma 20S, se preparó una curva de calibración a partir un de lisado de células Jurkat (incluido en el kit), la cual se observa en la Figura 7A. Esta curva de calibración demostró un rango lineal entre 1.000 – 20.000 unidades arbitrarias de fluorescencia junto con una linealidad R^2 de 0,9987.

Las concentraciones de AuNPs-AS4923 tratadas en este ensayo fueron a 10 y 100 pM, y la actividad del proteosoma que exhibieron se observa en la Figura 7B, en la que en cada condición se evaluó también la actividad del proteosoma cuando es inhibido (Barra azul). La actividad del proteosoma no presentó diferencias significativas con respecto al control de 0 pM de AuNPs cuando fue tratado con 10 pM de AuNPs Desnuda, sin embargo, sí aumentó significativamente cuando fue tratado a 100 pM de AuNPs desnuda y también a 10 y 100 pM de AuNPs-AS4923.

En la Figura 7C se obtuvo la actividad del proteosoma específica producto de las AuNPs, en donde se observó que, a la concentración de 10 pM, el péptido AS4923 por sí solo es capaz de aumentar significativamente la actividad con

respecto al control de 0 pM, mientras que la AuNPs desnuda no muestra diferencias significativas. Sin embargo, cuando el péptido se encuentra conjugado con la nanopartícula de oro (AuNPs-AS4923), la actividad del proteosoma aumenta significativamente con respecto al control de 0 pM, pero también con respecto al péptido por sí solo.

Por otro lado, a 100 pM, la actividad del proteosoma en los macrófagos THP-1 cuando son tratados con el péptido AS4923 por sí solo, no presenta diferencias significativas con respecto al control de 0 pM, pero a esta concentración, sí aumenta significativamente cuando son tratados con las AuNPs desnuda y AuNPs-AS4923.

Sin embargo, la actividad del proteosoma alcanzada a 10 y 100 pM de AuNPs-AS4923, y 100 pM de AuNPs desnuda, no presentan diferencias significativas.

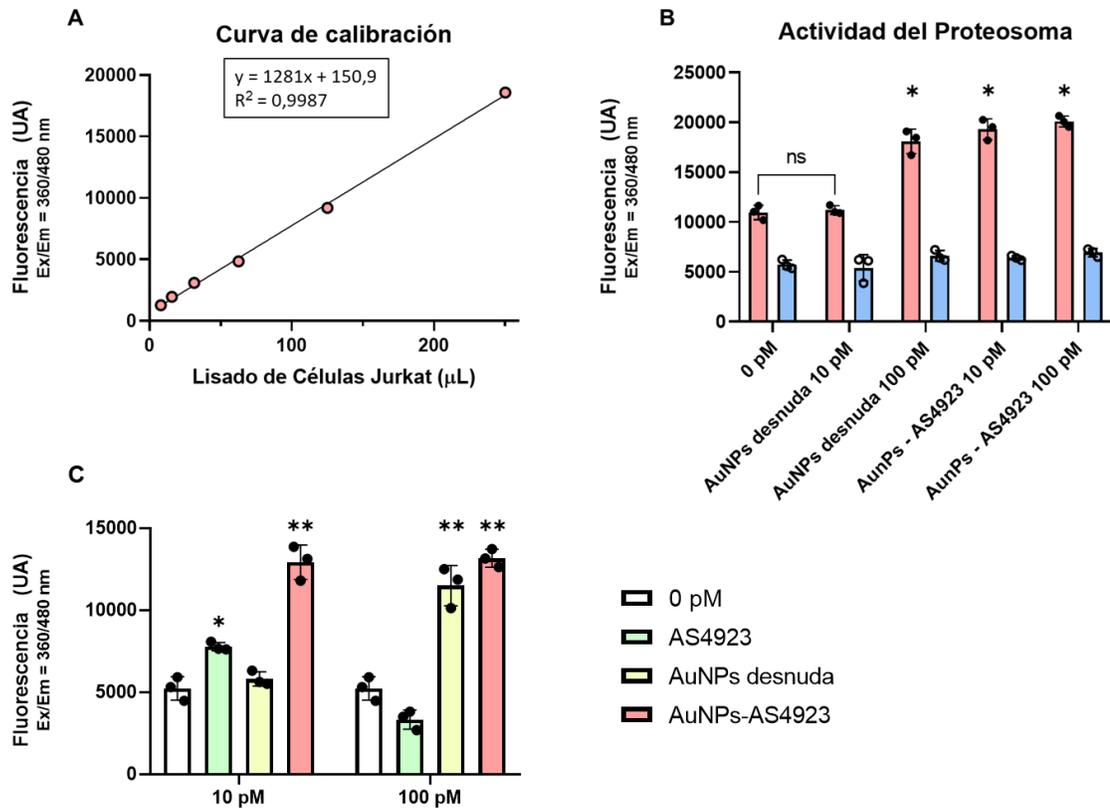


Figura 9: Actividad del proteosoma 20S con nanopartículas de oro conjugadas con el péptido AS4923. A) Curva de calibración. B) Actividad del proteosoma 20S en presencia del sustrato (Barra roja) y en presencia del sustrato junto con el inhibidor (Barra azul). C) Actividad del proteosoma 20S específica separado por concentraciones entre 10 y 100 pM. Para cada barra se tiene la actividad de proteosoma 20S de macrófagos THP-1 tratados con la condición control en ausencia de nanopartículas de oro (AuNPs) (Barra blanca), péptido AS4923 (Barra verde), AuNPs desnuda (Barra amarilla), AuNPs-AS4923 (Barra roja). * $p < 0,05$ con respecto a 0 pM y AuNPs desnuda 10 pM. ** $p < 0,05$ con respecto a 0 pM, AuNPs desnuda 10 pM, AS4923 10 pM y AS4923 100 pM. N= 3 replicados.

8.6 Actividad de catepsina B con nanopartículas de oro

De manera similar a lo anterior, se evaluó la actividad de Catepsina B. Con respecto a la concentración de 10 pM, la actividad de catepsina B normalizada de los macrófagos THP-1, el péptido AS4923 por sí solo y la nanopartícula de oro desnuda (AuNPs desnuda), no presentaron diferencias significativas con respecto al control (Figura 8). Sin embargo, cuando el péptido se encuentra conjugado con la nanopartícula de oro (AuNPs-AS4923), la actividad de catepsina aumenta significativamente con respecto al control de 0 pM y AuNPs desnuda a 10 Pm. Por otro lado, a 100 pM, la actividad de catepsina B aumenta solamente cuando se trata con AuNPs-AS4923. Sin embargo, la actividad de catepsina B alcanzada a 10 y 100 pM de AuNPs-AS4923, y 100 pM de AuNPs desnuda, no presentan diferencias significativas.

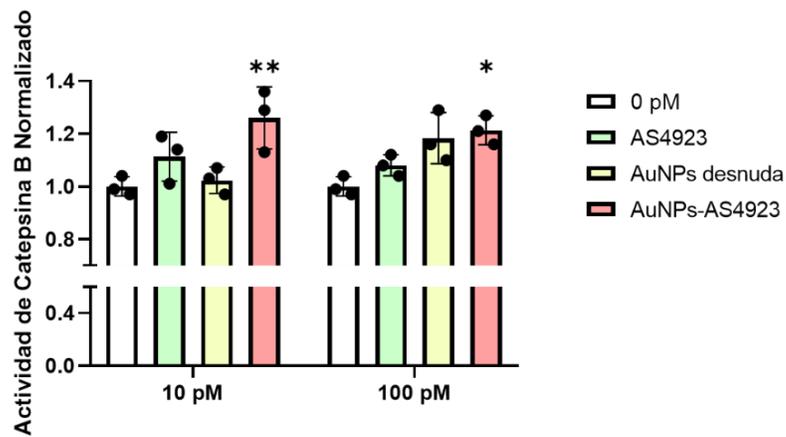


Figura 10: Actividad de catepsina B con nanopartículas de oro conjugadas con el péptido AS4923. Actividad de catepsina B de macrófagos THP-1 tratados con la condición control en ausencia de nanopartículas de oro (AuNPs) (Barra blanca), péptido AS4923 (Barra verde), AuNPs desnuda (Barra amarilla), AuNPs-AS4923 (Barra roja). * $p < 0,05$ con respecto a *: 0 pM. ** $p < 0,05$ con respecto a: 0 pM, AuNPs desnuda 10 pM. N= 3 replicados.

8.7 Presentación de antígenos en macrófagos THP-1 tratados con nanopartículas de oro

A la concentración de 10 pM de nanopartículas de oro conjugadas con el péptido AS4923 (AuNPs-AS4923) se logró determinar un aumento significativo, tanto en la actividad del proteosoma 20S, como en la actividad de catepsina B en macrófagos THP-1. Por lo tanto, en esta condición se procedió a evaluar la presentación de antígenos en macrófagos THP-1, en función de la expresión de marcadores de superficie.

La Figura 9A y 9B, se observa que los macrófagos THP-1 tratados con AuNPs-AS4923 10 pM presentaron un aumento significativo en el número de moléculas CD86, en 1,1 veces, según su intensidad de fluorescencia media (MFI), en comparación al tratamiento con AuNPs desnuda 10 pM. Mientras que con respecto a la molécula CD40, no existieron diferencias significativas.

Por otro lado, con respecto a la molécula HLA-DR, que corresponde al complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II), se observó que los macrófagos THP-1 aumentaron significativamente el número de moléculas de MHC II en 1,5

veces, como respuesta al tratamiento con AuNPs-AS4923 10 pM, en comparación al tratamiento con las AuNPs desnudas a la misma concentración.

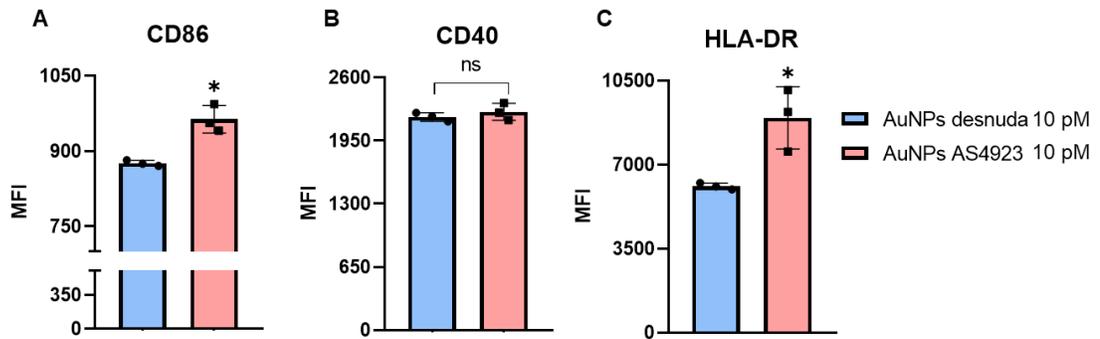


Figura 11: Expresión de marcadores de superficie en macrófagos THP-1 tratados con nanopartículas de oro. Intensidad de fluorescencia media (MFI) de los marcadores **A) CD86**, **B) CD40** y **C) HLA-DR**, en macrófagos THP-1 tratados con nanopartículas de oro desnudas (AuNPs) (Barra azul) y tratados con AuNPs-AS4923 (Barra roja). * $p < 0,05$ con respecto a: AuNPs desnuda 10 pM. N= 3 replicados.

9. DISCUSIÓN

9.1 Caracterización de las nanopartículas de oro

Las nanopartículas de oro caracterizadas fueron similares a las descritas en trabajos que emplean protocolos de síntesis similares, en los que se obtuvieron nanopartículas de oro esféricas con un tamaño entre 10 y 25 nm (Contreras-Trigo *et al.*, 2018). Sin embargo, en estos trabajos, con respecto al espectrograma de las nanopartículas de oro, obtuvieron que la longitud de onda de la intensidad máxima de absorbancia fue 520 nm, a diferencia de nuestro trabajo, donde esta longitud de onda se desplazó a 525 nm para las nanopartículas de oro desnudas (AuNPs desnudas), mientras que para las nanopartículas de oro conjugadas con el péptido AS4923 (AuNPs-AS4923), fue de 529 nm. Sin embargo, con respecto a los espectrogramas de las nanopartículas de oro esféricas y con un tamaño similar, se ha descrito que esta longitud de onda puede variar entre 500 – 550 nm (Haiss *et al.*, 2007; Zuber *et al.*, 2016). Por lo que, a pesar de este desplazamiento en la longitud de onda de la intensidad máxima de absorbancia, para las AuNPs desnudas y AuNPs-AS4923, que se sintetizaron en este trabajo, el espectrograma sigue siendo característico para nanopartículas de oro esféricas de este tamaño.

Con respecto a la funcionalización de las nanopartículas de oro, cuando se compararon los espectrogramas de las AuNPs desnudas con respecto al de las AuNPs-AS4923, se observó una disminución en el valor máximo de la absorbancia, lo cual se demostró a la hora de obtener una concentración menor en la síntesis de las AuNPs-AS4923. Fenómeno el cual también se ha observado en nanopartículas de oro funcionalizadas con compuestos aromáticos, oligonucleótidos y péptidos (Nsiah *et al.*, 2023; Sliem *et al.*, 2007; Mohebbi *et al.*, 2019). Por lo tanto, esta disminución de la concentración durante la funcionalización es probable que ocurra posterior a la funcionalización de las nanopartículas de oro, por ejemplo, con el péptido AS4923, como se observó en este trabajo.

Por otro lado, con respecto a la carga superficial determinada por el potencial Z, las AuNPs desnudas presentaron un valor de potencial Z que las clasifica como nanopartículas de oro con una estabilidad moderada (Rodriguez-Loya *et al.*, 2023). Mientras que con respecto a las AuNPs-AS4923, en literatura se menciona que la funcionalización de las nanopartículas de oro desplaza las moléculas de citrato y modifica la carga superficial, por ejemplo, cuando se conjugan péptidos, sin embargo, estos cambios se han descritos como ligeras modificaciones en el potencial Z, no así como en las AuNPs-AS4923 que presentaron un valor de $-1,26 \pm 0,42$ Mv (Egorova *et al.*, 2020). Por lo tanto, este cambio significaría que,

durante la síntesis de las nanopartículas de oro en este trabajo, se modificó la carga superficial de éstas, en respuesta a la funcionalización del péptido AS4923.

9.2 Fenotipo de los macrófagos THP-1

Los protocolos de diferenciación de células THP-1 para obtener macrófagos THP-1 que utilizan PMA y LPS son variables entre los distintos autores, en cuanto a la concentración del agente diferenciador y los tiempos de incubación, donde se ha observado que generalmente se trabajan con concentraciones de PMA entre 5 - 200 ng/mL, durante 24 a 72 horas (Park *et al.*, 2007; Biriken *et al.*, 2018), mientras que a concentraciones más altas, como por ejemplo 150 ng/mL, utilizan tiempos de incubación menos prolongados, para no provocar efectos no deseados asociados a la sobreestimulación de la vía de señalización de PKC como el aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) e inducción de apoptosis (Hrubik *et al.*, 2016; Bankers-Fullright *et al.*, 2003), es por esto que se trabajó con una concentración de 200 ng/mL de PMA por 24 horas y LPS a 100 ng/mL. Sin embargo, independiente del protocolo que se utilice, siempre se recomienda validarlo determinando el fenotipo de los macrófagos THP-1 (Starr *et al.*, 2018).

A través de los resultados obtenidos se mostró que los macrófagos THP-1 presentaron un fenotipo similar al descrito en literatura, con respecto a la expresión de genes proinflamatorios como TNF- α (Li *et al.*, 2017; Ozleyen *et al.*, 2021), pero también con respecto a la molécula de adhesión CD11b que participa en la adherencia de estas células cuando se diferencian desde células THP-1 que crecen en suspensión, a macrófagos THP-1, los cuales son células adherentes (Yano *et al.*, 2016).

Por otro lado, con respecto a los resultados obtenidos a través de citometría de flujo, los resultados son congruentes con los mostrados en literatura, con respecto al aumento del tamaño y la granularidad de los macrófagos THP-1 posterior a la diferenciación (Forrester *et al.*, 2018). También hay trabajos en los que se muestra un bajo recuento de células que expresan moléculas de la señal coestimuladora CD86, con un 21,2 % (Kadowawi *et al.*, 2011), y para CD40, en los que se muestra que no existen diferencias significativas en la intensidad de fluorescencia media luego de la diferenciación, mientras que para el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II) y CD11b, aumentan significativamente (Sadofky *et al.*, 2019; Deng *et al.*, 2021). Por lo tanto, en este trabajo se cumplió con determinar el fenotipo de los macrófagos THP-1, tal y como se recomienda, y, además, con el protocolo de diferenciación aplicado, presentaron un fenotipo similar al de macrófagos descrito en literatura.

9.3 Viabilidad celular de macrófagos THP-1 tratados con nanopartículas de oro

A pesar de existir otras metodologías para evaluar viabilidad celular como el ensayo de LDH y el ensayo de sulforodamina B, el más utilizado para evaluar la viabilidad celular en células THP-1 tratadas con nanopartículas de oro, corresponde al ensayo MTT (Genin *et al.*, 2015; Premshekharan *et al.*, 2017). Nuestros resultados obtenidos frente a las nanopartículas de oro AuNPs-AS4923 al evaluar el porcentaje de actividad metabólica, son congruentes con respecto a la viabilidad celular observada en otros tipos celulares frente a nanopartículas de oro, como las células monocito/macrófagos de ratón RAM 264.7, y, J774A1 y, K562 y THP-1 de origen humano, las cuales no presentaron disminuciones significativas, incluso en un rango de concentración mayor y modificaciones en su superficie, por ejemplo, la funcionalización con péptidos, sin embargo, hay otros factores implicados como lo son el tamaño, la forma de las nanopartículas de oro y el tiempo de incubación (Alkilany *et al.*, 2010; Fátima *et al.*, 2015; Banerjee *et al.*, 2019).

En este trabajo se logró complementar los resultados obtenidos a través del ensayo MTT, junto con una técnica más sofisticada, correspondiente al ensayo de viabilidad celular IncuCyte, que entrega resultados más confiables, al utilizar una tinción fluorescente de unión a ácidos nucleicos, que realiza un seguimiento en tiempo real a la viabilidad de las células tratadas, a diferencia del ensayo MTT, que corresponde a un ensayo colorimétrico, de punto final y que presenta limitaciones asociadas a resultados erróneos que pueden ser corregidos con el IncuCyte, ya que es capaz de visualizar las células, segmentarlas, contarlas y determinar su capacidad de proliferación (Ghasemi *et al.*, 2021; Szalai *et al.*, 2018). En este trabajo, con ambas metodologías, se lograron los resultados esperados con respecto a que los macrófagos THP-1 resultaran ser viables frente a las concentraciones de AuNPs-AS4923 tratadas, sin embargo, con el ensayo MTT se determinó que la actividad metabólica disminuyó significativamente a la concentración de 1000 pM, lo cual puede estar relacionado con el estrés oxidativo que pueden provocar las nanopartículas de oro en las mitocondrias que se ha descrito en otros trabajos (Tabatabaie *et al.*, 2022).

Por lo tanto, se pudo establecer una concentración de trabajo de hasta 100 pM de AuNPs-AS4923, para evaluar en los siguientes ensayos celulares sobre el procesamiento y la presentación de antígenos, en donde no se vio afectada la actividad metabólica y la viabilidad celular de los macrófagos THP-1.

9.4 Procesamiento de antígenos en macrófagos THP-1

La endocitosis de las nanopartículas de oro funcionalizadas y el posterior procesamiento y presentación de antígenos, son eventos que dependen de energía (Ebner *et al.*, 2017; Furuta *et al.*, 2023), por lo que el procesamiento de antígenos no se debería evaluar a concentraciones en las que la actividad metabólica se encuentra significativamente disminuida. Es por eso se descartó la concentración de 1000 pM de AuNPs-AS4923 y se determinó como una concentración máxima de trabajo de 100 pM de AuNPs-AS4923 para evaluar el procesamiento de antígenos en función de medir la actividad de proteosoma y catepsina B (Ebner *et al.*, 2017).

Con respecto a la actividad del proteosoma, era un resultado esperado que aumentara significativamente cuando los macrófagos THP-1 procesaran el péptido AS4923, sin embargo, también se esperaba que este fuera un aumento mayor cuando se utilizaron las nanopartículas de oro conjugadas con el péptido AS4923 (AuNPs-AS4923) debido a las propiedades como adyuvante que se han descrito para las nanopartículas de oro, donde por ejemplo, en modelos animales, son capaces de inducir una respuesta inmune sin la necesidad de utilizar otros adyuvantes (Dykman & Khlebtsov, 2017).

Sin embargo, también se observó que la actividad del proteosoma aumentaba incluso en presencia de las nanopartículas de oro desnudas cuando se aplicaba una mayor concentración. Este efecto puede estar relacionado con el mecanismo que se muestra en la Figura 12, en el cual se explica que durante el procesamiento de péptidos a través del proteosoma, el cual comienza con la ubiquitinación de estos, participan tres enzimas claves, la enzima activadora de la ubiquitina (E1), la enzima conjugadora de ubiquitina (E2) y la ubiquitina ligasa (E3). Luego, los péptidos ubiquitinados se convierten en el sustrato del proteosoma para que sean degradados. Sin embargo, este proceso se regula con la participación de enzimas desubiquinantes (DUB) para frenar la degradación a través del proteosoma, y con esto disminuir su actividad.

Se ha descrito que para la línea celular A549, correspondiente a adenocarcinoma epitelial alveolar humano, este mecanismo de acción puede verse afectado debido al tratamiento con nanopartículas de oro desnudas de un tamaño de 10 nm, ya que disminuyen la expresión de las enzimas desubiquinantes (DUB) (Ibrahim *et al.*, 2023).

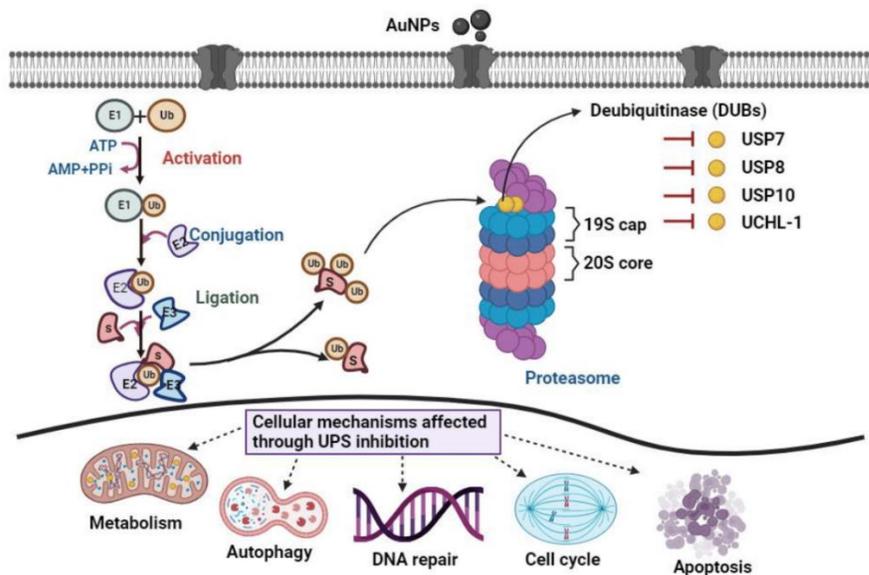


Figura 12: Diagrama del sistema proteosoma-ubiquitina. La enzima activadora de ubiquitina (E1) activan el primer paso del proceso que forma un enlace tioéster en presencia de ATP. Luego, la ubiquitina activada se transfiere a la enzima de conjugación de ubiquitina (E2), y la ubiquitina ligasa (E3) proporcionan especificidad de sustrato para la reacción y catalizan la unión covalente de la ubiquitina al sustrato objetivo. El sustrato poliubiquitinado se desplaza al proteosoma para su degradación y finalmente, las enzimas desubiquinantes (DUB), eliminan la ubiquitina conjugada del sustrato antes de la degradación (Ibrahim *et al.*, 2023).

Por otro lado, con respecto a la actividad de catepsina B, se esperaba que el efecto fuera similar, y que el péptido AS4923 por sí solo también aumentara significativamente la actividad de catepsina B, ya que como se mencionó en la introducción de este trabajo, este péptido se ha descrito que presenta características estructurales y fisicoquímicas que lo convierten en un buen candidato para ser procesado y presentado en el contexto del MHC de clase II, además tradicionalmente, los péptidos exógenos son procesados a través de esta vía (Kimura *et al.*, 2021).

Sin embargo, el aumento fue significativo solamente cuando los macrófagos THP-1 fueron tratados con AuNPs-AS4923. A pesar de esto, este resultado también era esperado ya que es probable que las características del péptido AS4923, junto con las propiedades adyuvantes de las nanopartículas de oro, fueran capaces de aumentar la actividad de catepsina B y activar el procesamiento de antígenos a través de la vía endocítica.

A pesar de que son escasos los trabajos que evalúen como es interactúan las nanopartículas de oro con las proteasas de tipo catepsina, se ha descrito que a concentraciones de 5 µg/mL de AuNPs desnudas de un tamaño de 10 nm, disminuyen significativamente su actividad (Speshock *et al.*, 2011), sin embargo, estas concentraciones de trabajo son mayores a las que se evaluaron en nuestro trabajo.

9.5 Presentación de antígenos en macrófagos THP-1

En este trabajo se logró determinar que en los macrófagos THP-1 al ser tratados con nanopartículas de oro conjugadas con el péptido AS4923 (AuNPs-AS4923) se activan las vías de procesamiento de antígenos en función de un aumento de la actividad del proteosoma y catepsina B, respectivamente. Por lo que el péptido AS4923 tiene el potencial de ser presentado tanto en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC I), como el de clase II (MHC II).

Con los experimentos posteriores relacionados con la presentación de antígenos en macrófagos THP-1, se logró determinar que producto del tratamiento con AuNPs-AS4923 aumenta la presentación de antígenos en el contexto del MHC de clase II. Este escenario es positivo en el caso de que se desee diseñar una vacuna que sea capaz de presentar antígenos en el contexto del MHC de clase II, por ejemplo, a linfocitos T inmaduros y desarrollar una respuesta inmune adaptativa.

Sin embargo, se ha descrito que en células presentadoras de antígenos, la autofagia puede ser inducida por las nanopartículas de oro, lo cual podría ser una de las razones por las cuales aumentaron el número de moléculas de MHC II en

los macrófagos THP-1 (Münz, 2016; Guo *et al.*, 2020). Por lo tanto, dentro de los desafíos que se tienen con este trabajo realizado, es que se pueda demostrar que la presentación de antígenos ocurre a expensas del péptido AS4923, y no péptidos libres del citoplasma.

10. CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES

Dentro de las fortalezas de este trabajo se tiene que fue posible caracterizar las nanopartículas de oro conjugadas con el péptido AS4923 (AuNPs -AS4923) que demostraron ser esféricas, presentar un tamaño de 9,0 (7,0 – 12,0) nm y concentración de 10,7 nM. Las cuales fueron utilizadas para tratar a los macrófagos THP-1.

Por otro lado, con respecto al modelo de macrófago THP-1 que se desarrolló, se logró determinar que presentaron un fenotipo asociado con un aumento de los genes que codifican para TNF- α y CD11b, junto con una expresión moléculas de superficie tales como MHC II, CD86, CD40 y CD11b.

En conjunto se logró determinar que los macrófagos THP-1 tratados con AuNPs-AS4923 hasta una concentración 100 pM, presentaron un bajo porcentaje de muerte celular y su actividad metabólica no se vió alterada.

Esto permitió establecer las concentraciones de trabajo para evaluar el procesamiento de antígenos, logrando determinar que a una concentración de 10 pM de AuNPs-AS4923, se activan la vía citosólica y la vía endocítica, en macrófagos THP-1, en comparación a cuando son tratados con el péptido AS4923 por sí solo o las nanopartículas de oro desnudas (AuNPs). Además, se logró determinar que las AuNPs-AS4923 a una concentración de 10 pM son capaces de activar la presentación de antígenos en macrófagos THP-1 en función de un aumento en el número de moléculas de superficie, tales como el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II) y la señal coestimuladora CD86.

Como limitaciones de este trabajo se tiene que no se evaluó la captación de las nanopartículas de oro y, además, la forma de evaluar la presentación de antígenos es considerada como una metodología indirecta, puesto que, como proyecciones se tiene que al corto plazo se puedan realizar experimentos que puedan resolver esto. Dentro de estos experimentos se pretende evaluar la presentación de antígenos en la superficie de macrófagos THP-1 que fueron tratados con AuNPs-AS4923, utilizando una metodología innovadora que emplea el uso de una molécula de receptor de célula T, un TCR soluble que es capaz de reconocer el péptido AS4923, presentado en el contexto del MHC de clase, a

través de la molécula DRB1*0101, alelo el cual se encuentra caracterizado para la línea celular THP-1 (Battle., *et al* 2012).

Otra limitante de este trabajo es que los experimentos fueron desarrollados de manera *in vitro* utilizando una línea celular, los cuales, por más que pertenezcan a una línea celular humana, siguen siendo poco representativos del modelo humano. Por lo que en una siguiente etapa se planea evaluar las condiciones evaluadas en este trabajo, pero en este caso, en macrófagos humanos de cultivo primario. A pesar de las limitaciones, se concluye que los resultados son positivos para apoyar en el respaldo de que las nanopartículas de oro son candidatas prometedoras para el diseño de nanovacunas basadas en péptidos inmunogénicos.

Además, los resultados fueron los esperados según el respaldo de la literatura y se logró responder a la pregunta de investigación planteada y a la hipótesis propuesta en este trabajo, tal y como se desea graficar en el modelo propuesto de la Figura 13.

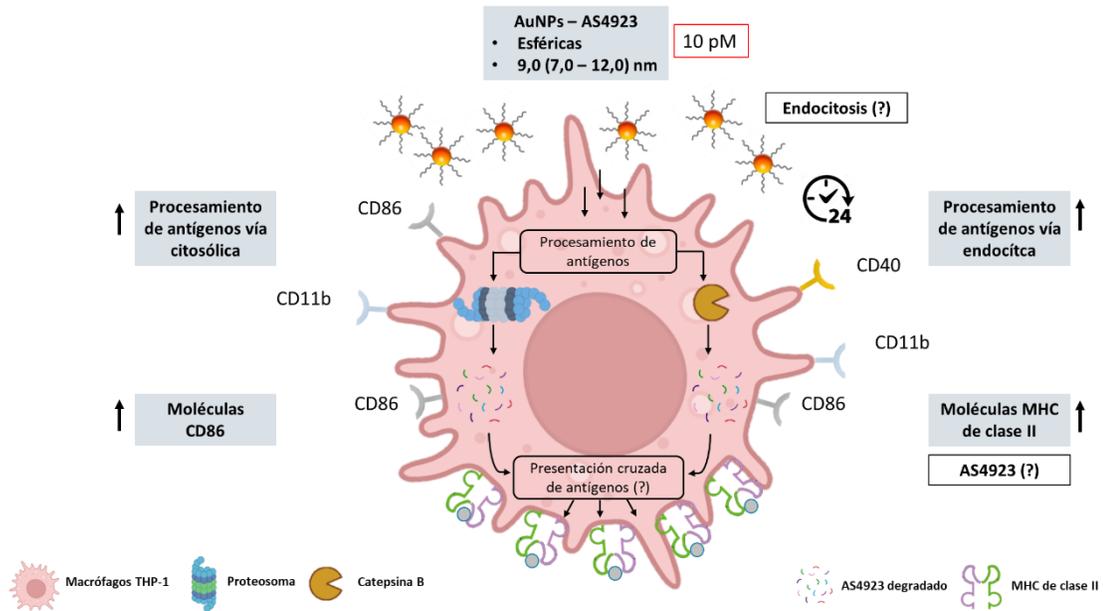


Figura 13: Modelo propuesto: Activación del procesamiento y la presentación de antígenos en macrófagos THP-1 tratados con nanopartículas de oro conjugadas con el péptido AS4923 (AuNPs-AS4923). Elaboración propia.

Por lo tanto, la conclusión de este trabajo es que las nanopartículas de oro conjugadas con el péptido AS4923 en macrófagos THP-1 activan el procesamiento antígenos a través de la vía citosólica y endocítica, y además activan la presentación de antígenos en función de un aumento significativo en el número de moléculas CD86 y MHC de clase II.

11. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer al Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción, y al Laboratorio de Nanobiotecnología de la Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño, de la Universidad San Sebastián, Concepción, por la disposición de espacios físicos, colaboradores y tiempo, para el desarrollo de este trabajo de investigación.

También quisiera agradecer a cada uno de los docentes que participaron en el desarrollo y revisión de este trabajo, colaborando en el cumplimiento de los objetivos establecidos.

12. FINANCIAMIENTO

Este trabajo recibió el financiamiento del Proyecto FONDECYT REGULAR N° 1221434, en el desarrollo de un trabajo en colaboración con la Universidad San Sebastián, Concepción.



13. BIBLIOGRAFÍA

1. Abuarqoub, D., Mahmoud, N. N., Zaza, R., Abu-Dahab, R., Khalil, E. A., & Sabbah, D. A. (2022). The In Vitro Immunomodulatory Effects of Gold Nanocomplex on THP-1-Derived Macrophages. *Journal of immunology research*, 2022, 6031776.
2. Aldo, P. B., Craveiro, V., Guller, S., & Mor, G. (2013). Effect of culture conditions on the phenotype of THP-1 monocyte cell line. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y.: 1989)*, 70(1), 80–86.
3. Ali, H. R., Selim, S. A., & Aili, D. (2021). Effects of macrophage polarization on gold nanoparticle-assisted plasmonic photothermal therapy. *RSC advances*, 11(40), 25047–25056.
4. Alkhattabi, N. A., Hussein, S. A., Tarbiah, N. I., Alzahri, R. Y., & Khalifa, R. (2022). Thymoquinone Effect on Monocyte-Derived Macrophages, Cell-Surface Molecule Expression, and Phagocytosis. *Nutrients*, 14(24), 5240..
5. Alkilany, A. M., & Murphy, C. J. (2010). Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far?. *Journal of nanoparticle research : an interdisciplinary forum for nanoscale science and technology*, 12(7), 2313–2333.

6. Amaral, E. P., Riteau, N., Moayeri, M., Maier, N., Mayer-Barber, K. D., Pereira, R. M., Lage, S. L., Kubler, A., Bishai, W. R., D'Império-Lima, M. R., Sher, A., & Andrade, B. B. (2018). Lysosomal Cathepsin Release Is Required for NLRP3-Inflammasome Activation by *Mycobacterium tuberculosis* in Infected Macrophages. *Frontiers in immunology*, 9, 1427.
7. Amina, S. J., & Guo, B. (2020). A Review on the Synthesis and Functionalization of Gold Nanoparticles as a Drug Delivery Vehicle. *International journal of nanomedicine*, 15, 9823–9857.
8. Babon, J. A., Cruz, J., Ennis, F. A., Yin, L., & Terajima, M. (2012). A human CD4+ T cell epitope in the influenza hemagglutinin is cross-reactive to influenza A virus subtypes and to influenza B virus. *Journal of virology*, 86(17), 9233–9243.
9. Banerjee, K., Ravishankar Rai, V., & Umashankar, M. (2019). Effect of peptide-conjugated nanoparticles on cell lines. *Progress in biomaterials*, 8(1), 11–21.
10. Bankers-Fulbright, J. L., Gleich, G. J., Kephart, G. M., Kita, H., & O'Grady, S. M. (2003). Regulation of eosinophil membrane depolarization during NADPH oxidase activation. *Journal of cell science*, 116(Pt 15), 3221–3226.
11. Battle, R., Poole, K., Haywood-Small, S., Clark, B., & Woodroffe, M. N. (2012). Molecular characterisation of the monocytic cell line THP-1 demonstrates a

discrepancy with the documented HLA type. In *International Journal of Cancer* (Vol. 132, Issue 1, pp. 246–247).

12. Behzadi, S., Serpooshan, V., Tao, W., Hamaly, M. A., Alkawareek, M. Y., Dreaden, E. C., Brown, D., Alkilany, A. M., Farokhzad, O. C., & Mahmoudi, M. (2017). Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell. *Chemical Society reviews*, 46(14), 4218–4244.
13. Bhattacharjee S. (2016). DLS and zeta potential - What they are and what they are not?. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 235, 337–351.
14. Biriken, D., Yazıhan, N., & Yılmaz, Ş. (2018). Değişik konsantrasyonlarda ve sürelerde Phorbol-12-Myristate-13-Acetate ile uyarılan insan THP-1 lösemi hücrelerinin sitokin ve midkin yanıtlarının araştırılması [Investigation of cytokine and midkine responses of human THP-1 leukemia cells induced by phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA) at different concentrations and times]. *Mikrobiyoloji bulteni*, 52(2), 147–155.
15. Boisguérin, P., Konate, K., Josse, E., Vivès, E. y Deshayes, S. (2021). Nanopartículas a base de péptidos para la administración terapéutica de ácidos nucleicos. *Biomedicinas* , 9 (5), 583.
16. Bolhassani, A., Javanzad, S., Saleh, T., Hashemi, M., Aghasadeghi, M. R., & Sadat, S. M. (2014). Polymeric nanoparticles: potent vectors for vaccine

- delivery targeting cancer and infectious diseases. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 10(2), 321–332.
- 17.** Brzicova, T., Javorkova, E., Vrbova, K., Zajicova, A., Holan, V., Pinkas, D., Philimonenko, V., Sikorova, J., Klema, J., Topinka, J., Rossner, P., Jr, & Jr. (2019). Molecular Responses in THP-1 Macrophage-Like Cells Exposed to Diverse Nanoparticles. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 9(5), 687.
- 18.** Bullard, B. L., & Weaver, E. A. (2021). Strategies Targeting Hemagglutinin as a Universal Influenza Vaccine. *Vaccines*, 9(3), 257.
- 19.** Campisi L. (2017). In vitro Antigen-presentation Assay for Self- and Microbial-derived Antigens. *Bio-protocol*, 7(11), e2307.
- 20.** Carabineiro S. (2017). Applications of Gold Nanoparticles in Nanomedicine: Recent Advances in Vaccines. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(5), 857.
- 21.** Chanput, W., Mes, J., Vreeburg, R. A., Savelkoul, H. F., & Wichers, H. J. (2010). Transcription profiles of LPS-stimulated THP-1 monocytes and macrophages: a tool to study inflammation modulating effects of food-derived compounds. *Food & function*, 1(3), 254–261.
- 22.** Chen, H., Paholak, H., Ito, M., Sansanaphongpricha, K., Qian, W., Che, Y., & Sun, D. (2013). 'Living' PEGylation on gold nanoparticles to optimize cancer cell uptake by controlling targeting ligand and charge densities. *Nanotechnology*, 24(35), 355101.

- 23.**Chicz, R. M., Urban, R. G., Gorga, J. C., Vignali, D. A., Lane, W. S., & Strominger, J. L. (1993). Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *The Journal of experimental medicine*, 178(1), 27–47.
- 24.**Cho, E. J., Holback, H., Liu, K. C., Abouelmagd, S. A., Park, J., & Yeo, Y. (2013). Nanoparticle characterization: state of the art, challenges, and emerging technologies. *Molecular pharmaceutics*, 10(6), 2093–2110.
- 25.**Clogston, J. D., & Patri, A. K. (2011). Zeta potential measurement. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 697, 63–70.
- 26.**Contreras-Trigo, B., Díaz-García, V., Guzmán-Gutierrez, E., Sanhueza, I., Coelho, P., Godoy, S. E., Torres, S., & Oyarzún, P. (2018). Slight pH Fluctuations in the Gold Nanoparticle Synthesis Process Influence the Performance of the Citrate Reduction Method. *Sensors* (Basel, Switzerland), 18(7), 2246.
- 27.**DeLong, R. K., Reynolds, C. M., Malcolm, Y., Schaeffer, A., Severs, T., & Wanekaya, A. (2010). Functionalized gold nanoparticles for the binding, stabilization, and delivery of therapeutic DNA, RNA, and other biological macromolecules. *Nanotechnology, science and applications*, 3, 53–63.
- 28.**Demento, S. L., Siefert, A. L., Bandyopadhyay, A., Sharp, F. A., & Fahmy, T. M. (2011). Pathogen-associated molecular patterns on biomaterials: a

paradigm for engineering new vaccines. *Trends in biotechnology*, 29(6), 294–306.

29. Deng, Y., Govers, C., Ter Beest, E., van Dijk, A. J., Hettinga, K., & Wichers, H. J. (2021). A THP-1 Cell Line-Based Exploration of Immune Responses Toward Heat-Treated BLG. *Frontiers in nutrition*, 7, 612397.
30. Dey, A. K., Gonon, A., Pécheur, E. I., Pezet, M., Villiers, C., & Marche, P. N. (2021). Impact of Gold Nanoparticles on the Functions of Macrophages and Dendritic Cells. *Cells*, 10(1), 96.
31. Diaz-Arévalo, D., & Zeng, M. (2020). Nanoparticle-based vaccines: opportunities and limitations. *Nanopharmaceuticals*, 135–150.
32. Díaz-García, V., Haensgen, A., Inostroza, L., Contreras-Trigo, B., & Oyarzun, P. (2023). Novel Microsynthesis of High-Yield Gold Nanoparticles to Accelerate Research in Biosensing and Other Bioapplications. *Biosensors*, 13(12), 992.
33. Dong, L., Wang, S., Chen, M., Li, H., & Bi, W. (2008). The activation of macrophage and upregulation of CD40 costimulatory molecule in lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2008, 852571.

- 34.** Dykman L. A. (2020). Gold nanoparticles for preparation of antibodies and vaccines against infectious diseases. *Expert review of vaccines*, 19(5), 465–477.
- 35.** Dykman, L. A., & Khlebtsov, N. G. (2017). Immunological properties of gold nanoparticles. *Chemical science*, 8(3), 1719–1735.
- 36.** Ebner, P., Versteeg, G. A., & Ikeda, F. (2017). Ubiquitin enzymes in the regulation of immune responses. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 52(4), 425–460.
- 37.** Egorova, E. A., van Rijt, M. M. J., Sommerdijk, N., Gooris, G. S., Bouwstra, J. A., Boyle, A. L., & Kros, A. (2020). One Peptide for Them All: Gold Nanoparticles of Different Sizes Are Stabilized by a Common Peptide Amphiphile. *ACS nano*, 14(5), 5874–5886.
- 38.** Ekimov, A. I., Efros, Al. L., & Onushchenko, A. A. (1985). Quantum size effect in semiconductor microcrystals. In *Solid State Communications* (Vol. 56, Issue 11, pp. 921–924). Elsevier BV.
- 39.** Fatima, F., Bajpai, P., Pathak, N., Singh, S., Priya, S., & Verma, S. R. (2015). Antimicrobial and immunomodulatory efficacy of extracellularly synthesized silver and gold nanoparticles by a novel phosphate solubilizing fungus *Bipolaris tetramera*. *BMC microbiology*, 15, 52.

- 40.** Forrester, M. A., Wassall, H. J., Hall, L. S., Cao, H., Wilson, H. M., Barker, R. N., & Vickers, M. A. (2018). Similarities and differences in surface receptor expression by THP-1 monocytes and differentiated macrophages polarized using seven different conditioning regimens. *Cellular immunology*, 332, 58–76.
- 41.** Fujita, Y., & Taguchi, H. (2017). Nanoparticle-Based Peptide Vaccines. *Micro and Nanotechnology in Vaccine Development*, 149–170.
- 42.** Furuta, K., Onishi, H., Ikada, Y., Masaki, K., Tanaka, S., & Kaito, C. (2023). ATP and its metabolite adenosine cooperatively upregulate the antigen-presenting molecules on dendritic cells leading to IFN- γ production by T cells. *The Journal of biological chemistry*, 299(4), 104587.
- 43.** García, A., Serrano, A., Abril, E., Jimenez, P., Real, L. M., Cantón, J., Garrido, F., & Ruiz-Cabello, F. (1999). Differential effect on U937 cell differentiation by targeting transcriptional factors implicated in tissue- or stage-specific induced integrin expression. *Experimental hematology*, 27(2), 353–364.
- 44.** Genin, M., Clement, F., Fattaccioli, A., Raes, M., & Michiels, C. (2015). M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC cancer*, 15, 577.
- 45.** Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *International journal of molecular sciences*, 22(23), 12827.

- 46.** Guo, L., He, N., Zhao, Y., Liu, T., & Deng, Y. (2020). Autophagy Modulated by Inorganic Nanomaterials. *Theranostics*, 10(7), 3206–3222.
- 47.** Haiss W., Thanh N.T.K., Aveyard J., Fernig D.G. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from uv–vis spectra. *Anal. Chem.* 2007;79:4215–4221.
- 48.** Hewitt E. W. (2003). The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion. *Immunology*, 110(2), 163–169.
- 49.** Hrubik, J., Glisic, B., Samardzija, D., Stanic, B., Pogrmic-Majkic, K., Fa, S., & Andric, N. (2016). Effect of PMA-induced protein kinase C activation on development and apoptosis in early zebrafish embryos. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*, 190, 24–31.
- 50.** Hu, J., Wang, Z., & Li, J. (2007). Gold Nanoparticles With Special Shapes: Controlled Synthesis, Surface-enhanced Raman Scattering, and The Application in Biodetection. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 7(12), 3299–3311.
- 51.** Huang, X., Cavalcante, D. P., & Townley, H. E. (2020). Macrophage-like THP-1 cells show effective uptake of silica nanoparticles carrying inactivated diphtheria toxoid for vaccination. *Journal of nanoparticle research : an interdisciplinary forum for nanoscale science and technology*, 22(1), 23.
- 52.** Ibrahim, B., Akere, T. H., Chakraborty, S., Valsami-Jones, E., & Ali-Boucetta, H. (2023). Gold Nanoparticles Induced Size Dependent Cytotoxicity on Human

Alveolar Adenocarcinoma Cells by Inhibiting the Ubiquitin Proteasome System. *Pharmaceutics*, 15(2), 432.

- 53.** Ielo, I., Rando, G., Giacobello, F., Sfamini, S., Castellano, A., Galletta, M., Drommi, D., Rosace, G., & Plutino, M. R. (2021). Synthesis, Chemical-Physical Characterization, and Biomedical Applications of Functional Gold Nanoparticles: A Review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(19), 5823.
- 54.** Isigonis, P., Hristozov, D., Benighaus, C., Giubilato, E., Grieger, K., Pizzol, L., Semenzin, E., Linkov, I., Zabeo, A., & Marcomini, A. (2019). Risk Governance of Nanomaterials: Review of Criteria and Tools for Risk Communication, Evaluation, and Mitigation. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 9(5), 696.
- 55.** Jia, Y., Yan, X., Guo, X., Zhou, G., Liu, P., & Li, Z. (2019). One Step Preparation of Peptide-Coated Gold Nanoparticles with Tunable Size. *Materials (Basel, Switzerland)*, 12(13), 2107.
- 56.** K Sesardic D. (1993). Synthetic peptide vaccines. *Journal of medical microbiology*, 39(4), 241–242.
- 57.** Kadowaki, T., Inagawa, H., Kohchi, C., Hirashima, M., & Soma, G. (2011). Functional characterization of lipopolysaccharide derived from symbiotic bacteria in rice as a macrophage-activating substance. *Anticancer research*, 31(7), 2467–2476.

- 58.** Kasturi, S. P., Skountzou, I., Albrecht, R. A., Koutsonanos, D., Hua, T., Nakaya, H. I., Ravindran, R., Stewart, S., Alam, M., Kwissa, M., Villingner, F., Murthy, N., Steel, J., Jacob, J., Hogan, R. J., García-Sastre, A., Compans, R., & Pulendran, B. (2011). Programming the magnitude and persistence of antibody responses with innate immunity. *Nature*, 470(7335), 543–547.
- 59.** Kimling, J., Maier, M., Okenve, B., Kotaidis, V., Ballot, H., & Plech, A. (2006). Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *The journal of physical chemistry. B*, 110(32), 15700–15707. <https://doi.org/10.1021/jp061667w>
- 60.** Kimura, S., Maeda, K., Nagashima, R., Miura, K., Arakawa, M., Ebina, H., Tanaka, N., & Morita, E. (2021). Efficient immunogenic peptide antigen delivery to dendritic cells using an ESCRT-mediated extracellular vesicle formation method. *Vaccine*, 39(22), 2976–2982.
- 61.** Konstantinou G. N. (2017). T-Cell Epitope Prediction. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1592, 211–222.
- 62.** L Wang, P., Sidney, J., Dow, C., Mothé, B., Sette, A., & Peters, B. (2008). A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach. *PLoS computational biology*, 4(4), e1000048.

- 63.** Lamb, J. R., Eckels, D. D., Lake, P., Woody, J. N., & Green, N. (1982). Human T-cell clones recognize chemically synthesized peptides of influenza haemagglutinin. *Nature*, 300(5887), 66–69.
- 64.** Lévy, R., Thanh, N. T., Doty, R. C., Hussain, I., Nichols, R. J., Schiffrin, D. J., Brust, M., & Fernig, D. G. (2004). Rational and combinatorial design of peptide capping ligands for gold nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 126(32), 10076–10084.
- 65.** Li, P., Wang, H., Shao, Q., Kong, B., & Qu, X. (2017). Fucoidan modulates cytokine production and migration of THP-1-derived macrophages via colony-stimulating factor-1. In *Molecular Medicine Reports* (Vol. 15, Issue 4, pp. 2325–2332). Spandidos Publications.
- 66.** Li, R., Gu, X., Liang, X., Hou, S., & Hu, D. (2019). Aggregation of Gold Nanoparticles Caused in Two Different Ways Involved in 4-Mercaptophenylboronic Acid and Hydrogen Peroxide. *Materials* (Basel, Switzerland), 12(11), 1802.
- 67.** Li, W., Joshi, M. D., Singhanian, S., Ramsey, K. H., & Murthy, A. K. (2014). Peptide Vaccine: Progress and Challenges. *Vaccines*, 2(3), 515–536.
- 68.** Li, X., Jian, M., Sun, Y., Zhu, Q., & Wang, Z. (2021). The Peptide Functionalized Inorganic Nanoparticles for Cancer-Related Bioanalytical and Biomedical Applications. *Molecules* (Basel, Switzerland), 26(11), 3228.

- 69.**Li, Z. Z., Wen, L. X., Shao, L., & Chen, J. F. (2004). Fabrication of porous hollow silica nanoparticles and their applications in drug release control. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 98(2), 245–254.
- 70.**Lipski, D. A., Dewispelaere, R., Foucart, V., Caspers, L. E., Defrance, M., Bruyns, C., & Willermain, F. (2017). MHC class II expression and potential antigen-presenting cells in the retina during experimental autoimmune uveitis. *Journal of neuroinflammation*, 14(1), 136.
- 71.**Liu, H. Z., Gong, J. P., Wu, C. X., Peng, Y., Li, X. H., & You, H. B. (2005). The U937 cell line induced to express CD14 protein by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and be sensitive to endotoxin stimulation. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT*, 4(1), 84–89.
- 72.**Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408.
- 73.**Malonis, R. J., Lai, J. R., & Vergnolle, O. (2020). Peptide-Based Vaccines: Current Progress and Future Challenges. *Chemical reviews*, 120(6), 3210–3229.
- 74.**Mansoori G., Fauzi Soelaiman T. Nanotecnología: una introducción para la comunidad de estándares. *J. Int. ASTM* 2005; 2 :1–22.

- 75.** Melichar, B., Nash, M. A., Lenzi, R., Platsoucas, C. D., & Freedman, R. S. (2000). Expression of costimulatory molecules CD80 and CD86 and their receptors CD28, CTLA-4 on malignant ascites CD3+ tumour-infiltrating lymphocytes (TIL) from patients with ovarian and other types of peritoneal carcinomatosis. *Clinical and experimental immunology*, 119(1), 19–27.
- 76.** Mohebbi, S., Tohidi Moghadam, T., Nikkhah, M., & Behmanesh, M. (2019). RGD-HK Peptide-Functionalized Gold Nanorods Emerge as Targeted Biocompatible Nanocarriers for Biomedical Applications. In *Nanoscale Research Letters* (Vol. 14, Issue 1). Springer Science and Business Media LLC.
- 77.** Moshref Javadi, M., Taghdisi Hosseinzadeh, M., Soleimani, N., & Rommasi, F. (2022). Evaluating the immunogenicity of gold nanoparticles conjugated RBD with Freund's adjuvant as a potential vaccine against SARS-CoV-2. *Microbial pathogenesis*, 170, 105687.
- 78.** Münz C. (2016). Autophagy Beyond Intracellular MHC Class II Antigen Presentation. *Trends in immunology*, 37(11), 755–763.
- 79.** Newton A. C. (2001). Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chemical reviews*, 101(8), 2353–2364.
- 80.** Niikura, K., Matsunaga, T., Suzuki, T., Kobayashi, S., Yamaguchi, H., Orba, Y., Kawaguchi, A., Hasegawa, H., Kajino, K., Ninomiya, T., Ijiro, K., & Sawa,

- H. (2013). Gold nanoparticles as a vaccine platform: influence of size and shape on immunological responses in vitro and in vivo. *ACS nano*, 7(5), 3926–3938.
- 81.** Nsiah, F., & McDermott, M. T. (2023). Microfluidic Patterning of Chemically Modified Nanoparticles for Surface Enhanced Raman Spectroscopic Mapping. In *BioNanoScience* (Vol. 13, Issue 3, pp. 1074–1089). Springer Science and Business Media LLC.
- 82.** Ozleyen, A., Yilmaz, Y. B., & Tumer, T. B. (2021). Dataset on the differentiation of THP-1 monocytes to LPS inducible adherent macrophages and their capacity for NO/iNOS signaling. *Data in brief*, 35, 106786.
- 83.** Park, E. K., Jung, H. S., Yang, H. I., Yoo, M. C., Kim, C., & Kim, K. S. (2007). Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, 56(1), 45–50.
- 84.** PAS 71:2011, Nanoparticles. Vocabulary. London, United Kingdom: British Standards Institution and 2011.
- 85.** Paul, S., Weiskopf, D., Angelo, M. A., Sidney, J., Peters, B., & Sette, A. (2013). HLA class I alleles are associated with peptide-binding repertoires of different size, affinity, and immunogenicity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 191(12), 5831–5839.

- 86.** Petrovsky, N., & Aguilar, J. C. (2004). Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunology and cell biology*, 82(5), 488–496.
- 87.** Piella, J., Bastús, N. G., & Puntès, V. (2017). Size-Dependent Protein-Nanoparticle Interactions in Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles: The Emergence of the Protein Corona. *Bioconjugate chemistry*, 28(1), 88–97.
- 88.** Pollard, A. J., & Bijker, E. M. (2021). A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nature reviews. Immunology*, 21(2), 83–100.
- 89.** Potocnik J. Off J Eur Communities: Legis. 2011;L275:38–40. doi: 10.3000/19770677.L_2011.275.eng.
- 90.** Premshkharan, G., Nguyen, K., Zhang, H., Forman, H. J., & Leppert, V. J. (2017). Low dose inflammatory potential of silica particles in human-derived THP-1 macrophage cell culture studies - Mechanism and effects of particle size and iron. *Chemico-biological interactions*, 272, 160–171.
- 91.** Purcell, A. W., McCluskey, J., & Rossjohn, J. (2007). More than one reason to rethink the use of peptides in vaccine design. *Nature reviews. Drug discovery*, 6(5), 404–414.
- 92.** Puri, A., Loomis, K., Smith, B., Lee, J. H., Yavlovich, A., Heldman, E., & Blumenthal, R. (2009). Lipid-based nanoparticles as pharmaceutical drug carriers: from concepts to clinic. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, 26(6), 523–580.

- 93.** Rai, M., Ingle, A. P., Birla, S., Yadav, A., & Santos, C. A. (2016). Strategic role of selected noble metal nanoparticles in medicine. *Critical reviews in microbiology*, 42(5), 696–719.
- 94.** Riddy, D. M., Goy, E., Delerive, P., Summers, R. J., Sexton, P. M., & Langmead, C. J. (2018). Comparative genotypic and phenotypic analysis of human peripheral blood monocytes and surrogate monocyte-like cell lines commonly used in metabolic disease research. *PloS one*, 13(5), e0197177.
- 95.** Robinson, J. H., & Delvig, A. A. (2002). Diversity in MHC class II antigen presentation. *Immunology*, 105(3), 252–262.
- 96.** Roche, P. A., & Cresswell, P. (1990). Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature*, 345(6276), 615–618.
- 97.** Roche, P. A., & Cresswell, P. (2016). Antigen Processing and Presentation Mechanisms in Myeloid Cells. *Microbiology spectrum*, 4(3), 10.1128/microbiolspec.MCHD-0008-2015.
- 98.** Roche, P. A., & Furuta, K. (2015). The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nature reviews. Immunology*, 15(4), 203–216.
- 99.** Rodriguez-Loya, J., Lerma, M., & Gardea-Torresdey, J. L. (2023). Dynamic Light Scattering and Its Application to Control Nanoparticle Aggregation in Colloidal Systems: A Review. *Micromachines*, 15(1)

- 100.** Sadegh-Nasseri, S., & Kim, A. (2015). Exogenous antigens bind MHC class II first, and are processed by cathepsins later. *Molecular immunology*, 68(2 Pt A), 81–84.
- 101.** Sadofsky, L. R., Hayman, Y. A., Vance, J., Cervantes, J. L., Fraser, S. D., Wilkinson, H. N., Williamson, J. D., Hart, S. P., & Morice, A. H. (2019). Characterisation of a New Human Alveolar Macrophage-Like Cell Line (Daisy). In *Lung* (Vol. 197, Issue 6, pp. 687–698). Springer Science and Business Media LLC.
- 102.** Said, E. A., Al-Dughaishi, S., Al-Hatmi, W., Al-Reesi, I., Al-Riyami, M., Al-Balushi, M. S., Al-Bimani, A., Al-Busaidi, J. Z., Al-Khabori, M., Al-Kindi, S., Procopio, F. A., Al-Rashdi, A., Al-Ansari, A., Babiker, H., Koh, C. Y., Al-Naamani, K., Pantaleo, G., & Al-Jabri, A. A. (2022). Human macrophages and monocyte-derived dendritic cells stimulate the proliferation of endothelial cells through midkine production. *PloS one*, 17(4), e0267662.
- 103.** Sanchez-Villamil, J. I., Tapia, D., & Torres, A. G. (2019). Development of a Gold Nanoparticle Vaccine against Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *mBio*, 10(4), e01869-19.
- 104.** Schreiber, J., Jenner, R. G., Murray, H. L., Gerber, G. K., Gifford, D. K., & Young, R. A. (2006). Coordinated binding of NF-kappaB family members in the response of human cells to lipopolysaccharide. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America, 103(15), 5899–5904.

- 105.** Shang, J., & Gao, X. (2014). Nanoparticle counting: towards accurate determination of the molar concentration. *Chemical Society reviews*, 43(21), 7267–7278.
- 106.** Shukla, R., Bansal, V., Chaudhary, M., Basu, A., Bhonde, R. R., & Sastry, M. (2005). Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 21(23), 10644–10654.
- 107.** Sijts, E. J., & Kloetzel, P. M. (2011). The role of the proteasome in the generation of MHC class I ligands and immune responses. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 68(9), 1491–1502.
- 108.** Silswal, N., Reis, J., Qureshi, A. A., Papasian, C., & Qureshi, N. (2017). Of Mice and Men: Proteasome's Role in LPS-Induced Inflammation and Tolerance. *Shock (Augusta, Ga.)*, 47(4), 445–454.
- 109.** Sliem, M. A., Ebeid, E. M., & Harith, M. A. (2007). Selective Colorimetric Detection of Viral DNA Sequence of Hepatitis C Virus Genotype-4 Genetic Material Using Gold Nanoparticles. In *Journal of Biomedical Nanotechnology* (Vol. 3, Issue 4, pp. 360–366). American Scientific Publishers.

110. Speshock, J. L., Braydich-Stolle, L. K., Szymanski, E. R., & Hussain, S. M. (2011). Silver and Gold Nanoparticles Alter Cathepsin Activity In vitro. *Nanoscale research letters*, 6(1), 17.
111. Starr, T., Bauler, T. J., Malik-Kale, P., & Steele-Mortimer, O. (2018). The phorbol 12-myristate-13-acetate differentiation protocol is critical to the interaction of THP-1 macrophages with *Salmonella Typhimurium*. *PloS one*, 13(3), e0193601.
112. Steckiewicz, K. P., Barcinska, E., Malankowska, A., Zauszkiewicz-Pawlak, A., Nowaczyk, G., Zaleska-Medynska, A., & Inkielewicz-Stepniak, I. (2019). Impact of gold nanoparticles shape on their cytotoxicity against human osteoblast and osteosarcoma in in vitro model. Evaluation of the safety of use and anti-cancer potential. *Journal of materials science. Materials in medicine*, 30(2), 22.
113. Szalai, P., & Engedal, N. (2018). An Image-based Assay for High-throughput Analysis of Cell Proliferation and Cell Death of Adherent Cells. *Bio-protocol*, 8(9), e2835.
114. Szulc-Dąbrowska, L., Bossowska-Nowicka, M., Struzik, J., & Toka, F. N. (2020). Cathepsins in Bacteria-Macrophage Interaction: Defenders or Victims of Circumstance?. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 601072.
115. Tabatabaie, F., Franich, R., Feltis, B., & Geso, M. (2022). Oxidative Damage to Mitochondria Enhanced by Ionising Radiation and Gold

Nanoparticles in Cancer Cells. *International journal of molecular sciences*, 23(13), 6887.

- 116.** Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., & Tada, K. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *International journal of cancer*, 26(2), 171–176.
- 117.** Tu, Y., Chen, C., Pan, J., Xu, J., Zhou, Z. G., & Wang, C. Y. (2012). The Ubiquitin Proteasome Pathway (UPP) in the regulation of cell cycle control and DNA damage repair and its implication in tumorigenesis. *International journal of clinical and experimental pathology*, 5(8), 726–738.
- 118.** Turkevich, J., Stevenson, P. C., & Hillier, J. (1951). A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. In *Discussions of the Faraday Society* (Vol. 11, p. 55). Royal Society of Chemistry (RSC).
- 119.** Viana, K. F., Fiuza, J. A., Gannavaram, S., Dey, R., Selvapandiyam, A., Bartholomeu, D. C., da Silveira-Lemos, D., Bueno, L. L., Dutra, W. O., Fujiwara, R. T., Nakhasi, H. L., & Giunchetti, R. C. (2016). Application of rapid in vitro co-culture system of macrophages and T-cell subsets to assess the immunogenicity of dogs vaccinated with live attenuated *Leishmania donovani* centrin deleted parasites (LdCen^{-/-}). *Parasites & vectors*, 9, 250.

- 120.** Wang, E. C., & Wang, A. Z. (2014). Nanoparticles and their applications in cell and molecular biology. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro*, 6(1), 9–26.
- 121.** Wang, W., Ding, X., Xu, Q., Wang, J., Wang, L., & Lou, X. (2016). Zeta-potential data reliability of gold nanoparticle biomolecular conjugates and its application in sensitive quantification of surface absorbed protein. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 148, 541–548.
- 122.** Wieczorek, M., Abualrous, E. T., Sticht, J., Álvaro-Benito, M., Stolzenberg, S., Noé, F., & Freund, C. (2017). Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. *Frontiers in immunology*, 8, 292.
- 123.** World Health Organization. Global vaccine action plan 2011–2020. WHO https://www.who.int/immunization/global_vaccine_action_plan/GVAP_doc_2011_2020/en/ (2013).
- 124.** Wright, C. A., Kozik, P., Zacharias, M., & Springer, S. (2004). Tapasin and other chaperones: models of the MHC class I loading complex. *Biological chemistry*, 385(9), 763–778.
- 125.** Yadati, T., Houben, T., Bitorina, A., & Shiri-Sverdlov, R. (2020). The Ins and Outs of Cathepsins: Physiological Function and Role in Disease Management. *Cells*, 9(7), 1679.

- 126.** Yang, J., Jia, C., & Yang, J. (2021). Designing Nanoparticle-based Drug Delivery Systems for Precision Medicine. *International journal of medical sciences*, 18(13), 2943–2949.
- 127.** Yang, L., Cao, Z., Sajja, H. K., Mao, H., Wang, L., Geng, H., Xu, H., Jiang, T., Wood, W. C., Nie, S., & Wang, Y. A. (2008). Development of Receptor Targeted Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Efficient Drug Delivery and Tumor Imaging. *Journal of biomedical nanotechnology*, 4(4), 439–449.
- 128.** Yano, K., Ohkawa, R., Sato, M., Yoshimoto, A., Ichimura, N., Kameda, T., Kubota, T., & Tozuka, M. (2016). Cholesterol Efflux Capacity of Apolipoprotein A-I Varies with the Extent of Differentiation and Foam Cell Formation of THP-1 Cells. In *Journal of Lipids* (Vol. 2016, pp. 1–9). Hindawi Limited.
- 129.** Yeh, Y. C., Creran, B., & Rotello, V. M. (2012). Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology. *Nanoscale*, 4(6), 1871–1880.
- 130.** Yue, J., Feliciano, T. J., Li, W., Lee, A., & Odom, T. W. (2017). Gold Nanoparticle Size and Shape Effects on Cellular Uptake and Intracellular Distribution of siRNA Nanoconstructs. *Bioconjugate chemistry*, 28(6), 1791–1800.
- 131.** Zhang, T., Maekawa, Y., Hanba, J., Dainichi, T., Nashed, B. F., Hisaeda, H., Sakai, T., Asao, T., Himeno, K., Good, R. A., & Katunuma, N. (2000). Lysosomal cathepsin B plays an important role in antigen processing, while

cathepsin D is involved in degradation of the invariant chain in ovalbumin-immunized mice. *Immunology*, 100(1), 13–20.

- 132.** Zuber A., Purdey M., Schartner E., Forbes C., van der Hoek B., Giles D., Abell A., Monro T., Ebendorff-Heidepriem H. Detection of gold nanoparticles with different sizes using absorption and fluorescence based method. *Sens. Actuators B Chem.* 2016;227:117–127.