



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Propiedades electrofisiológicas y producción de óxido nítrico
en macrófagos murinos durante su interacción con OMVs de
E. coli JC8031**

Andrés Felipe Leal Bohórquez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina-Maestría en Bioquímica
Bogotá, Colombia

2017

**Propiedades electrofisiológicas y producción de óxido nítrico
en macrófagos murinos durante su interacción con OMVs de
E. coli JC8031**

Andrés Felipe Leal Bohórquez

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:

Magíster en Bioquímica

Director: *María Elisa Forero Vivas. Ph.D.*

Codirector: *María Marcela Camacho Navarro. Ph.D.*

Grupo de Investigación

Biofísica y Biología de Membranas

Biología Celular y Funcional e Ingeniería de Biomoléculas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina-Maestría en Bioquímica

Bogotá, Colombia

2017

Todos los triunfos nacen cuando nos atrevemos a comenzar...

Eugene Ware.

Agradecimientos

A *Dios* y *Mi Madre* quienes son mi norte y la razón de hacer ciencia sin abandonar mi fe, mis creencias, mis valores, mi esencia.

A mi familia y en especial a mi tía *Luchy* (Q.E.P.D.), por ser un ejemplo vivo del amor de Dios; así mismo, a mis tías *Gloria* y *Clarita* y mis tíos *Jairo* y *Pedro* por todo su apoyo.

A mi mejor amigo y casi hermano *Dario Puerto*, por permanecer a mi lado durante todo este proceso en el que sus consejos han servido de motivación para que yo no desfallezca, para que siga confiando en que algún día todo el esfuerzo invertido dará frutos. ¡Gracias gordo por no soltarme a pesar de los momentos difíciles!... Y como lo prometimos hace unos años, que esta amistad perdure “*¡Para Siempre mi hermano!*”.

A *Andrea Buitrago*, por su compañía en estos casi dos años de trabajo en equipo. No me equivoqué al confiar en ti, en tus capacidades y sobre todo en tu honestidad a la hora de hacer ciencia. Gracias por ayudarme a entender que “*solo se llega más rápido, pero juntos se llega más lejos*” ... ¡Lo logramos!

A mis compañeros del grupo de Biofísica y Biología de Membranas y en especial a *Cristina*, *Derly*, *Iveth* y *Viviana* por tantas horas de conversaciones en torno a la ciencia y a la vida.

A las Profesoras *María Elisa Forero*, *María Marcela Camacho* y *Ana Luisa Muñoz* por su confianza, apoyo y paciencia durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

A los Profesores *Carlos Arturo Guerrero, Luis Alberto Gómez* y *Orlando Acosta* por su orientación durante estos dos años en los que aprendí a interpretar de una forma más crítica, entendiendo que es necesario dejar de lado la visión simplista en un área como la ciencia, donde todo es mucho más complejo de lo que parece.

A la *Universidad Nacional de Colombia* y la *Fundación Juan Pablo Gutiérrez Cáceres* por la financiación de mis estudios de maestría.

Al *Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (Colciencias)* por la financiación del proyecto de investigación “*Caracterización de la permeabilidad iónica y el estado funcional de macrófagos murinos durante la interacción: MO- vesículas de membrana externa de Escherichia coli JC8031*” a través de la convocatoria 620 de 2014.

Resumen

A pesar de la importante morbi-mortalidad que revisten las enfermedades infectocontagiosas en la actualidad, su tratamiento y las alternativas de inmunización no son satisfactorios. Es por esto, que la búsqueda de nuevas estrategias para el control de este grupo de patologías se hace imperiosa y es allí donde las tecnologías de liberación controlada como las vesículas de membrana externa (OMVs; *por sus siglas en inglés*) cobran particular interés. El uso de vesículas derivadas de especies como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Shigella spp* han mostrado actividad inmunomoduladora *in vivo* e *in vitro*, debido en parte a la presencia moléculas inmunogénicas como el lipopolisacárido. Gracias a que estas OMVs son reconocidas por el sistema inmune en un contexto similar a lo ocurrido durante el proceso infeccioso real, el uso de cepas no patógenas e hipervesiculantes como *E. coli* JC8031 supone una alternativa más promisoría que las tradicionales sales de aluminio. Pese a esto, a la fecha no existe evidencia que soporte el efecto que tienen estas nanovesículas en la fisiología de células del sistema inmune como el macrófago y que resulta particularmente importante en la búsqueda de adyuvantes válidos. Por este motivo, durante este trabajo de investigación se determinó el impacto que tiene la interacción macrófago_OMVs de *E. coli* JC8031 sobre la viabilidad celular, permeabilidad iónica y activación clásica de macrófagos de ratón J774A.1. Los hallazgos de este estudio muestran que la internalización de 0,1 µg/mL OMV es tiempo-dependiente y no compromete la viabilidad del macrófago luego de 48 horas de incubación. Así mismo, se registró hiperpolarización de la membrana plasmática del macrófago que estuvo acompañada de incremento en corrientes macroscópicas de entrada y sobreexpresión de los transcritos de los canales Kir 2.1, KCa 3.1 y BK. Por otro lado, durante las primeras 6 horas de interacción se encontraron los niveles de expresión del ARNm de la iNOS más altos, comportamiento que fue consistente con la detección de la proteína y el producto de su actividad enzimática en el periodo 12-48 horas. En conclusión, estos hallazgos sugieren que el macrófago es activado clásicamente durante las primeras 6 horas de internalización de 0,1 µg/mL de OMV de *E. coli* JC8031, tiempo en el cual los cambios en las propiedades biofísicas registradas podrían sugerir polarización hacia activación alternativa.

Palabras clave: *E. coli* JC8031, Calcio, Hiperpolarización, iNOS, Macrófago, OMV.

Abstract

Despite the significant morbidity and mortality of infectious-contagious diseases nowadays, the alternatives for treatment and immunization are not satisfactory. For this reason, the search for new control strategies for this group of pathologies becomes imperative. In this context, controlled release technologies such as outer membrane vesicles (OMVs) are of interest. The use of vesicles derived from species such as *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Shigella spp* have shown immunomodulatory activity *in vivo* and *in vitro*, in part, due to the presence of immunogenic molecules such as lipopolysaccharide. Because these OMVs are recognized by the immune system in a context similar to the actual infectious process, the use of non-pathogenic and hypervesiculant strains such as *E. coli* JC8031 suggest a promising alternative compared to the traditional aluminum salts. To date, there is no evidence that supports the effect of these nanovesicles on the physiology of cells of the immune system like the macrophage, and this is particularly important in the search of valid adjuvants. Therefore, the impact of the interaction between macrophage_OMVs from *E. coli* JC8031 on cell viability, ionic permeability and classical activation of the macrophage-like cell line J774A.1 was determined during this research. The findings of this study show that the internalization of 0.1 µg/mL OMV is time-dependent and does not compromise the viability of the macrophage after 48 hours of incubation. Also, hyperpolarization of the macrophage plasma membrane was observed, along with an increase in macroscopic inward currents and over-expression of the transcripts of Kir 2.1, KCa 3.1 and BK channels. On the other hand, the highest iNOS levels of mRNA were found during the first 6 hours of interaction; this behavior was consistent with detection of protein and the product of its enzymatic activity in the 12-48 hour period. In conclusion, these findings suggest that the macrophage is classically activated during the first 6 hours of internalization of 0.1 µg/mL of OMV from *E. coli* JC8031. At this time, changes in the biophysical properties may suggest polarization towards an alternative activation.

Keywords: *E. coli* JC8031, Calcium, Hyperpolarization, iNOS, Macrophage, OMV.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de Figuras	XIII
Lista de Tablas	XIV
Lista de abreviaturas	XV
Introducción	1
1. Capítulo 1. Enfermedades infecciosas, OMVs y Macrófagos	3
1.1 Inmunización como estrategia para el control de enfermedades infecciosas	4
1.1.1 Inmunización con OMVs.	6
1.1.2 Inmunización con OMVs.	6
1.2 Macrófagos.....	11
1.2.1 Macrófagos y respuesta inmune innata.	11
1.2.2 Endocitosis.	15
1.2.3 Permeabilidad iónica y respuesta inmune.	17
2. Capítulo 2. OMVs de <i>E. coli</i> JC8031 son internalizadas sin comprometer la viabilidad celular del macrófago	21
2.1 Materiales y métodos	21
2.1.1 Cultivo celular.....	21
2.1.2 Aislamiento y marcaje de vesículas de membrana externa.	22
2.1.3 Ensayo de internalización.	23
2.1.4 Impacto de la interacción MO_OMV sobre la viabilidad celular.	23
2.1.5 Evaluación de cambios morfológicos.	24
2.1.6 Análisis de datos.	25
2.2 Resultados	25
2.2.1 Las OMVs de <i>E. coli</i> JC8031 son internalizadas de una manera tiempo dependiente. ..	25
2.2.2 OMVs aisladas de <i>E. coli</i> JC8031 no comprometen la viabilidad celular de macrófagos J774A.1, durante las primeras 24 horas post-interacción.....	29
2.2.3 OMVs de <i>E. coli</i> JC8031 no inducen cambios morfológicos asociados a apoptosis en macrófagos J774A.1.....	29
3. Capítulo 3. La internalización de OMVs de <i>E. coli</i> JC8031 induce cambios en la permeabilidad iónica de macrófagos J774A.1	31
3.1 Materiales y métodos	31
3.1.1 Cultivo celular y OMVs.	31
3.1.2 Whole-Cell Patch Clamp.....	32
3.1.3 Expresión génica de canales iónicos.	34

3.1.4	Análisis de datos.	39
3.2	Resultados	40
3.2.1	OMVs de <i>E. coli</i> JC8031 inducen hiperpolarización celular y cambios en la capacitancia de membrana de macrófagos de ratón de la línea J774A.1.....	40
3.2.2	La internalización de OMVs de <i>E. coli</i> JC8031 induce disminución en las corrientes de salida e incrementan las corrientes de entrada.	42
3.2.3	La internalización de OMVs aisladas de <i>E. coli</i> JC8031 promueve la sobreexpresión de canales de potasio dependientes de voltaje y/o calcio.	46
4.	Capítulo 4. OMVs de <i>E. coli</i> JC8031 promueven la activación clásica del macrófago....	49
4.1	Materiales y métodos	50
4.1.1	Cultivo celular y OMVs.....	50
4.1.2	Niveles de expresión génica de la iNOS.	50
4.1.3	Detección de la Sintasa de Óxido Nítrico Inducible (iNOS).	52
4.1.4	Determinación de nitritos por Griess.	53
4.1.5	Análisis de datos.	53
4.2	Resultados	54
4.2.1	OMVs de <i>E. coli</i> JC8031 favorecen la transcripción, traducción y actividad enzimática de la iNOS en macrófagos J774A.1.....	54
5.	Capítulo 5. Discusión	57
6.	Conclusiones y recomendaciones	67
6.1	Conclusiones	67
6.2	Recomendaciones.....	68
Anexo A:	Curva de proliferación celular – WST-1	69
Anexo B:	Electroforesis y cuantificación de ARN.....	71
Anexo C:	Diseño bioinformático de los primers usados en qPCR-SYBR® Green	73
Anexo D:	Gradiente de temperaturas para los genes utilizados en qPCR-SYBR® Green.....	75
Anexo E:	Amplicones y curvas melting de ensayos de qPCR-SYBR® Green.....	77
Anexo F:	Amplicones de ensayos de qPCR-TaqMan®	83
Anexo G:	Estandarización del número de células para detección de nitritos.....	85
Anexo H:	Curva estándar de nitritos	87
Anexo I:	Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, San Francisco-California, USA. 2016	89
Anexo J:	First International Congress of Science, Technology and Innovation of the Americas, Bogotá, Colombia. 2017	91
Anexo K:	Consolidado de análisis estadístico	93
Bibliografía	97

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Sistema Tol-Pal en bacterias Gram-negativas.....	10
Figura 2. Receptores tipo Toll (TLRs) descritos en macrófagos.....	12
Figura 3. Representación esquemática de canales Kv	18
Figura 4. Internalización de OMVs-DiO en macrófagos J774A.1	26-27
Figura 5. Viabilidad de macrófagos J774A.1 estimulados con OMVs de <i>E. coli</i> JC8031	29
Figura 6. Cambios morfológicos de macrófagos estimulados con OMVs de <i>E. coli</i> JC8031	30
Figura 7. Condiciones de termociclado para qPCR-SYBR® Green	37
Figura 8. Potencial de reposo	41
Figura 9. Transitorio capacitivo	42
Figura 10. Corriente de salida y sensibilidad a Caribdotoxina	43
Figura 11. Corriente de entrada y sensibilidad a Cloruro de Bario	45
Figura 12. Expresión génica de canales iónicos.....	48
Figura 13. Condiciones de termociclado para qPCR-TaqMan®	51
Figura 14. Niveles de expresión génica de la iNOS	54
Figura 15. Detección y actividad enzimática de la iNOS	56
Figura 16. Modelo teórico de la interacción MO_OMV	65

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Participación de las OMVs en la fisiología bacteriana	6
Tabla 2. Sistemas de entrega de antígenos recombinantes.....	8
Tabla 3. Receptores involucrados en fagocitosis	15
Tabla 4. Canales de K ⁺ activados por calcio y/o voltaje	19
Tabla 5. Master mix de RT-PCR 2X	36
Tabla 6. Condiciones RT-PCR	36
Tabla 7. Master mix de qPCR-SYBR® Green	37
Tabla 8. Master mix de PCR convencional para gradientes de temperatura	38
Tabla 9. Condiciones de termociclado para PCR convencional	39
Tabla 10. Sondas qPCR-TaqMan®	50
Tabla 11. Master mix de qPCR-TaqMan®	51
Tabla 12. Mix de reacción para el ensayo FCANOS	52

Lista de abreviaturas

ADNc: Ácido Desoxirribonucleico complementario

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

BK: Big potassium channel

Cm: Capacitancia de membrana

DEPC: Dietil pirocarbonato

DIC: Differential interference contrast

DMSO: Dimetilsulfóxido

dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

H3A: Histona 3A

iNOS: inducible Nitric Oxide Synthase

KCa 3.1: Canal iónico de potasio activado por calcio

Kir 2.1: Canal iónico de potasio rectificador de entrada

Kv 1.3: Canal iónico de potasio voltaje-dependiente

LDH: Lactato Deshidrogenasa

LPS: Lipopolisacárido

MO: Macrófago

OMV: Outer Membrane Vesicle

NO: Óxido Nítrico

Osm: Osmolaridad

PAMPs: Pathogen-associated molecular patterns

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

SBFi: Suero bovino fetal inactivo

TAG: Triacilgliceroles

TLR: Toll-like receptor

Vm: Voltage Membrane/Potencial de reposo

Introducción

Las enfermedades infecciosas constituyen la tercera causa de muerte a nivel mundial (WHO, 2016). Para 2015, según la Organización Mundial de Salud (OMS), se estimaron cerca de 5,7 millones de muertes como consecuencia de una patología infecciosa, de las cuales 9 mil fueron estimadas para Colombia (WHO, 2016). A pesar de la importante morbi-mortalidad que revisten las enfermedades infecciosas, en la actualidad el tratamiento y las alternativas de inmunización para su control no son satisfactorias (Nabel, 2013). Contrario a lo que supondría este panorama, una revisión llevada a cabo por Pedrique *et al.*, 2013, mostró que entre el periodo 2000-2011 sólo 37 (4%) nuevas formulaciones fueron indicadas para estas afecciones y 4 (1%) nuevos medicamentos fueron aprobados para este mismo grupo de patologías.

Es por lo anterior, que la búsqueda de nuevas estrategias para el control de las enfermedades infectocontagiosas se hace imperiosa y es allí donde las tecnologías de liberación controlada como las vesículas de membrana externa (OMVs; *por sus siglas en inglés*), cobran particular interés (Ünal *et al.*, 2011; Rosenthal *et al.*, 2014). Estas vesículas están conformadas por moléculas inmunogénicas como lipopolisacárido, adhesinas e invasinas; son estructuras esféricas con diámetros entre los 20 y 250 nm que se liberan durante el crecimiento exponencial de bacterias Gram-negativas y han mostrado ser una buena alternativa para inducir respuesta inmune protectora en animales y humanos, debido en parte a su reconocimiento por receptores tipo Toll (TLRs; *por sus siglas en inglés*), los cuales se encuentran en diversos linajes celulares incluidos los macrófagos (Fantappie *et al.*, 2014; Schwechheimer *et al.*, 2015; Van der Pol *et al.*, 2015).

Aunque en los últimos años el estudio sobre OMVs como plataformas para el transporte de antígenos ha venido en aumento, las implicaciones fisiológicas que tienen lugar durante la interacción OMV-célula hospedera requieren mayor investigación. En este estudio, fue evaluado el impacto que tiene la interacción de OMVs de una cepa hipervesiculante de *E. coli* no patógena (JC8031) sobre la viabilidad celular, las propiedades electrofisiológicas de la membrana y la producción de óxido nítrico (NO) en macrófagos de ratón de la línea celular J774A.1.

1. Capítulo 1. Enfermedades infecciosas, OMVs y Macrófagos

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), para el 2015 cerca de 6 millones de personas fallecieron en todo el mundo como consecuencia de una patología infecciosa, de los cuales poco más de 195 mil se registraron para la región de las Américas. Parte de este complejo problema radica en la gran diversidad de microorganismos que se encuentran involucrados en estas patologías y la adaptación evolutiva que han logrado para sobrevivir en sus hospederos, suponiendo un mayor reto en el control de este grupo de afecciones para la comunidad científica (Mack *et al.*, 2009).

Como consecuencia de la amplia gama de microorganismos implicados en las patologías de origen infeccioso, las estrategias de control dependerán del caso particular de cada patógeno y aspectos importantes de su fisiología tales como ciclo de vida, célula hospedera, presencia en hospederos intermediarios, mecanismos de resistencia a tratamientos convencionales entre otros (Nakatani, 2016).

Dado este panorama, las acciones encaminadas a su control pueden variar desde intervenciones sociales para el mejoramiento de algunas condiciones como la disposición de excretas o el hacinamiento para el control de parasitosis como la amebiosis, enfermedad de Chagas, leishmaniosis etc., hasta el desarrollo de nuevos fármacos y vacunas para bacterias como *Mycobacterium tuberculosis* en la que se siguen utilizando medicamentos descubiertos hace más de 50 años como estreptomycin y rifampicina, para los que se reportan resistencias cromosomales que han contribuido a que la tuberculosis se encuentre entre las 10 principales causas de muerte en el mundo según el reporte del 2016 de la

OMS; por lo que es imperioso el diseño de nuevas alternativas preventivas o terapéuticas que mitiguen el impacto que estas afecciones tienen en la población mundial.

1.1 Inmunización como estrategia para el control de enfermedades infecciosas

Una inmunización adecuada requiere de varios factores combinados entre los cuales resultan críticos la presentación antigénica efectiva por parte de células del sistema inmune y la producción de una serie de mediadores proinflamatorios que contribuyan a generar memoria inmunológica (Rosenthal *et al.*, 2014). En este contexto, la utilización de diversas preparaciones como microorganismos vivos atenuados o el uso de coadyuvantes han permitido el diseño de algunas formulaciones que a pesar de ser útiles en los procesos de inmunización no resultan del todo inocuos y en algunas ocasiones, han mostrado baja eficacia en la inducción de respuestas inmunológicas protectoras (Batista *et al.*, 2014).

De esta manera, entre 1920-1930 Glenny *et al.*, mostraron por primera vez el uso de derivados de aluminio como adyuvantes en la inmunización de caballos contra los toxoides diftérico y tetánico (Glenny *et al.*, 1926; Batista *et al.*, 2014). Desde entonces, compuestos de aluminio han sido empleados en la práctica clínica como el principal vehículo de diversos medicamentos y antígenos recombinantes. A pesar de que los derivados de aluminio son considerados poco tóxicos y han sido ampliamente utilizados en humanos desde 1932, su uso durante casi un siglo ha mostrado diferentes efectos adversos (Batista *et al.*, 2014). En este sentido, la administración de sales de aluminio como coadyuvante de formulaciones vacunales ha sido asociada a la patogénesis de diversas entidades clínicas como Alzheimer, Guillan-Barre, esclerosis lateral amiotrófica, síndrome de Gulf War y mioscitis macrofágica entre otros; fenómenos parcialmente atribuidos al poco aclaramiento sistémico del aluminio y su relación con eventos de autoinmunidad (Shaw & Tomljenovic, 2013).

Sumada a la evidente toxicidad del aluminio como adyuvante; la administración de antígenos precipitados en estas sales promueve de manera preferencial memoria inmunológica mediada por anticuerpos (Th2), la cual es poco efectiva en aquellos patógenos que para su control por parte del sistema inmune requieren una respuesta de tipo celular (Th1) y sus respectivos mediadores proinflamatorios (He *et al.*, 2015).

Ante el panorama descrito previamente, el uso de plataformas como los virosomas ha supuesto una mejor alternativa comparada con el transporte de antígenos mediado por los adyuvantes tradicionales e incluso los liposomas convencionales, gracias a la presencia de proteínas adosadas a su superficie capaces de promover la fusión de membranas con la célula hospedera y contribuir a un mejor procesamiento del péptido de interés (Batista *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2017).

Aunque el uso de estas partículas similares a virus (VLP; *por sus siglas en inglés*), ha mostrado activación de linfocitos T citotóxicos y la producción de anticuerpos protectores contra agentes virales como el virus de la influenza y la hepatitis (Awate *et al.*, 2013), en patógenos intracelulares como *Leishmania spp* o *Mycobacterium spp* cuyo control por parte del sistema inmune radica principalmente en inmunidad celular y no humoral, el uso de estas novedosas alternativas representa una estrategia poco efectiva; en parte, porque los virosomas carecen de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs; *por sus siglas en inglés*) y como consecuencia no contribuyen a la expresión de mediadores microbicidas como NO o proteínas relacionadas con inmunidad adaptativa celular, tales como interferón γ (IFN- γ), factor de necrosis tumoral α (TNF- α) o interleucina 12 (IL-12) (Underhill & Goodridge, 2012; Batista *et al.*, 2014).

Es por lo anterior que la búsqueda de nuevas alternativas de inmunización se hace imperiosa y es bajo esta premisa que las OMVs se postulan como una promisoriosa estrategia para el transporte e internalización de antígenos de interés, a la vez que suponen una activación del sistema inmune más efectiva que las formulaciones basadas en virosomas debido a su reconocimiento por TLRs y posterior procesamiento celular,

evitando adicionalmente la bioacumulación observada con otras formulaciones como el aluminio (Rosenthal *et al.*, 2014).

1.1.2 Inmunización con OMVs. Desde la nanobiotecnología han surgido propuestas que buscan el transporte de antígenos en plataformas altamente inmunogénicas, poco tóxicas y con bajos costos de producción. Entre éstas, se describen las partículas similares a patógeno (PLP; *por sus siglas en inglés*); éstas PLPs son diseñadas en escalas nanométricas a partir de diversas fuentes como biopolímeros, cápsides virales o aisladas desde OMVs, capaces de inducir activación de la respuesta inmunológica de una manera similar a lo que sucedería durante el proceso infeccioso real (Rosenthal *et al.*, 2014; Gause *et al.*, 2017).

Las OMVs son estructuras esféricas con diámetros entre los 20-250 nm producidas durante el crecimiento exponencial bacteriano y que participan en diversos procesos fisiológicos como la detoxificación celular, adquisición de nutrientes esenciales, formación de biofilms y supervivencia en ambientes hostiles (Hoekstra *et al.*, 1976; Schwechheimer *et al.*, 2015); así como en la patogenicidad bacteriana mediante la liberación, transporte y entrega de factores de virulencia en células hospederas (Lee *et al.*, 2008; O'Donoghue & Krachler, 2016) (Tabla 1). Estas características descritas para las OMVs han permitido derivar estrategias de inmunización en las que antígenos con capacidad inmunogénica son expresados heterológicamente en la superficie o el periplasma de las vesículas mediante técnicas de ingeniería genética (Rosenthal *et al.*, 2014).

Tabla 1. Participación de las OMVs en la fisiología bacteriana

Función	Características	Ejemplo
Liberación	Componentes insolubles (Ej. Lípidos) Transporte de moléculas a regiones distales Péptidos protegidos de la degradación proteolítica	PQS Adhesinas
Entrega	Lisis espontánea de la OMV Interacción OMV_Hospedero mediante endocitosis	ClyA Toxina Shiga

Tabla 1. Continuación

Función	Características	Ejemplo
Supervivencia	Secreción de proteínas mal plegadas o agentes tóxicos Liberación de ADN viral Adquisición de nutrientes	Antibióticos Aminopeptidasas
Biofilm	Inactivación de moléculas tóxicas	Proteínas del complemento Antibióticos
Patogénesis	Liberación y entrega de factores de virulencia	LT Hemolisinas Fosfolipasas Toxina

Fuente: Adaptado de Ellis & Kuehn, 2010 y Kulp & Kuehn, 2010. **PQS.** 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona. **ClyA.** Citolisina A de *E. coli*. **LT.** Toxina termolábil de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC; *por sus siglas en inglés*).

En este sentido, Kesty *et al.*, 2004 mostraron por primera vez la posibilidad de inducir expresión heteróloga de antígenos en OMVs de una cepa no invasiva de *E. coli* (DH5- α), mediante la clonación de Ail, una adhesina proveniente de *Yersinia enterocolítica*, cuya secuencia fue fusionada a la secuencia señal del transportador de arginina (Tat) con el fin de favorecer el transporte de la proteína hasta la membrana externa. Adicionalmente, en este estudio se encontró que OMVs cargadas con Ail eran internalizadas por células CHO en contraste con vesículas silvestres, sugiriendo que la proteína además de ser expresada en la superficie de la membrana externa conservaba su estructura nativa y actividad biológica. Para el 2007, ensayos realizados por Alaniz *et al.*, permitieron determinar que vesículas nativas provenientes de *Salmonella typhimurium* estimulaban la liberación de mediadores proinflamatorios como NO, TNF- α e IL-12 en macrófagos de la línea celular J774, sugiriendo que los constituyentes de las OMVs eran suficientes para inducir activación clásica del macrófago, posiblemente por la interacción con TLRs, los cuales reconocen gran diversidad de PAMPs tales como flagelina, lipopéptidos y lipopolisacáridos, todos ellos presentes en éstas vesículas (Mizel *et al.*, 2003; Kulp *et al.*, 2010; Underhill & Goodridge, 2012; Martínez & Gordon, 2014).

Debido a las características de las OMVs y su actividad inmunogénica intrínseca, investigadores en todo el mundo han centrado sus esfuerzos en la evaluación de su

capacidad inmunoestimuladora con o sin antígenos expresados heterológicamente en modelos *in vitro* e *in vivo*, con resultados que indican inducción de respuestas humorales protectoras en modelos murinos contra diversos patógenos como *Chlamydia muridarum*, *Streptococcus spp* y *Brucella abortus*, entre otros (Bartolini *et al.*, 2013; Fantappie *et al.*, 2014; Kaur *et al.*, 2016). Además de la respuesta humoral inducida por las OMVs, esta plataforma ofrece una ventaja adicional sobre otros adyuvantes como el aluminio al promover respuesta inmune celular (Batista *et al.*, 2014) (Tabla 2).

Tabla 2. Sistemas de entrega de antígenos recombinantes

Coadyuvante/ Sistema de entrega	Ventajas	Desventaja
Aluminio	Inducción de respuesta Th2	Ausencia de respuesta Th1 Poco aclaramiento sistémico Eventos de Autoinmunidad
Liposomas	Inducción respuesta Th2 Baja citotoxicidad	Requieren expresión de varios PAMPs
Virosomas	Expresión de ligandos para receptores específicos	Fusión de membranas y liberación de Ags en citoplasma
OMVs	Presencia de múltiples PAMPs Expresión de múltiples antígenos Inmunomodulación hacia Th1 y Th2	Genotoxicidad Toxicidad debida a LPS

Fuente: Adaptado de Batista *et al.*, 2014 y Rosenthal *et al.*, 2014. **LPS:** Lipopolisacárido. **PAMPs:** Patrones moleculares asociados a patógenos.

Lo anterior resulta particularmente importante porque supone que la inmunización con antígenos de patógenos intracelulares como *Leishmania spp* o *M. tuberculosis*, podrían contribuir a un mejor control de la infección al promover un balance entre las respuestas Th1-Th2. Consistente con esto, Mitra *et al.*, 2015 mostraron que OMVs provenientes de diferentes serotipos de *Shiguella spp* promovían expresión del ARNm de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS; *por sus siglas en inglés*) y la producción de IL-4 en macrófagos peritoneales aislados de ratones BALB/c cocultivados con linfocitos T CD4⁺; así como la producción de IFN- γ , TNF- α e IL-6 en ratones de la misma cepa murina después de la inmunización con vesículas aisladas a partir de éste patógeno intracelular.

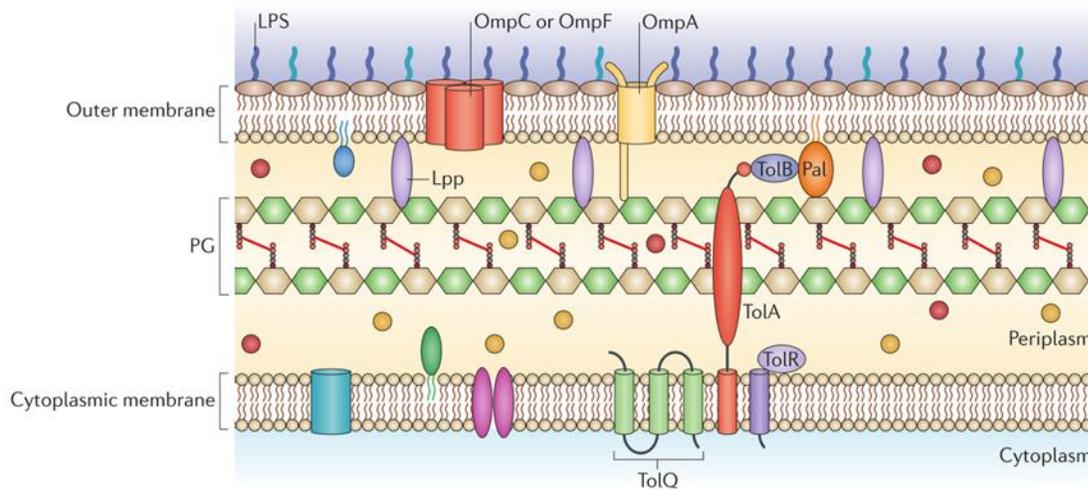
Por su parte, Daleke-Schermerhorn *et al.*, 2014 expresaron simultáneamente los antígenos ESAT6, Ag85B y Rv2660c de *M. tuberculosis* sobre la superficie de OMVs aisladas de una cepa hipervesiculante de *Salmonella entérica* atenuada, capaces de inducir la síntesis de IL-2 durante el cocultivo de células dendríticas de médula ósea e hibridoma de células T derivadas de ratones C57BL/6. Este hallazgo muestra la posibilidad de generar OMVs multiantigénicas capaces de estimular al sistema inmune mediante la actividad sinérgica entre los componentes propios de las OMVs y los antígenos expresados heterológamente.

En 2013, Kim *et al.*, encontraron que la inmunización con OMVs de *E. coli* promovía la supervivencia de ratones C57B/6 y BALB/c durante la sepsis inducida por la administración intraperitoneal del bacilo. Estos hallazgos, fueron consistentes con una reducción del número de unidades formadoras de colonia (UFC) en sangre y lavado broncoalveolar, así como en la producción de mediadores proinflamatorios como TNF- α e IL6. Al mismo tiempo, células dendríticas derivadas de médula ósea que internalizaron estas vesículas mostraron incremento en IL-12, IL-6, IL-1 β e IL-17, mientras que una correlación inversa se reportó para IL-4, sugiriendo que las OMVs inducían respuesta inflamatoria sistémica capaz de controlar la infección por el bacilo (Kim *et al.*, 2013).

Finalmente, Fantappie *et al.*, 2014 mostraron que la expresión heteróloga de antígenos de *Streptococcus spp* fusionados al extremo amino-terminal de ompA de *E. coli*, promovía su transporte hacia el espacio periplásmico de OMVs aisladas de una cepa carente de esta porina (*E. coli* BL21^{*ΔompA*}). En este mismo estudio, ensayos funcionales revelaron que las proteínas internalizadas en estas vesículas mantenían su forma nativa y experimentos *in vivo* realizados con ratones CD1 revelaron incremento en la producción de isotipos IgG2A luego de la inmunización con OMVs cargadas con las proteínas recombinantes, mientras que la administración de la proteína purificada y administrada con hidróxido de aluminio indujo isotipos IgG1 en mayor cantidad, sugiriendo que estas vesículas promovían de forma preferencial una respuesta inmune adaptativa celular (Fantappie *et al.*, 2014).

Aunque los hallazgos descritos previamente resultan interesantes, el uso de OMVs derivadas de especies bacterianas patógenas como adyuvantes vacunales suponen varios riesgos representados en parte, por la presencia de factores de virulencia internalizados en el espacio periplásmico o expuesto en la superficie de las vesículas; así como elevada concentración de LPS que podría resultar tóxica (Ellis & Kuehn, 2010; Kulp & Kuehn, 2010). Es por lo anterior que el uso de cepas hipervesiculantes y no patógenas como *E. coli* JC8031, reviste particular interés como modelo para la obtención de mayor número de vesículas bajo condiciones estándar de cultivo gracias a la delección que posee en los genes *tolRA*, los cuales en cepas silvestres interactúan con una lipoproteína asociada al peptidoglicano en bacterias Gram-negativas llamada Pal, para favorecer la integridad de la membrana externa a través de una interacción adicional con proteínas de membrana como *ompA* (Figura 1) (Bernadac *et al.*, 1998; Walburger *et al.*, 2002; Wojdyla *et al.*, 2015).

Figura 1. Sistema Tol-Pal en bacterias Gram-negativas



Fuente: Schwechheimer *et al.*, 2015. En la figura se muestran las interacciones entre las proteínas TolR, TolA, TolB y Pal, las cuales están dadas por enlaces covalentes que en conjunto contribuyen con la estabilidad de la membrana externa en bacterias Gram-negativas.

Bajo esta línea, Chen *et al.*, 2010 haciendo uso de *E. coli* JC8031 para la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP; *por sus siglas en inglés*) fusionada a la citolisina ClyA de *E. coli*, mostraron que ratones BALB/c inoculados con OMVs que expresaban la quimera GFP-ClyA, presentaban títulos de anticuerpos IgG dos semanas post-

inmunización contra GFP con un comportamiento similar al evidenciado cuando las proteínas eran administradas con hidróxido de aluminio como adyuvante. Estos resultados mostraron la posibilidad de aumentar la inmunogenicidad de péptidos con escasa capacidad antigénica como la GFP de una forma similar al aluminio, el cual es utilizado ampliamente en la práctica clínica como coadyuvante pero que ha sido asociado a diversos efectos adversos como previamente se mencionó (Shaw & Tomljenovic, 2013; Rosenthal *et al.*, 2014).

Aunque el uso de OMVs aisladas de *E. coli* JC8031 suponen una mejor alternativa que las vesículas derivadas de cepas patógenas no hipervesiculantes, a la fecha no existen aproximaciones experimentales que permitan comprender el impacto que tiene la interacción de éstas nanoestructuras sobre parámetros biofísicos, inmunológicos o moleculares que den cuenta de estados funcionales específicos de macrófagos y que se hacen imperiosos como parte de la caracterización inicial en el desarrollo de nuevas plataformas de inmunización basadas en OMVs.

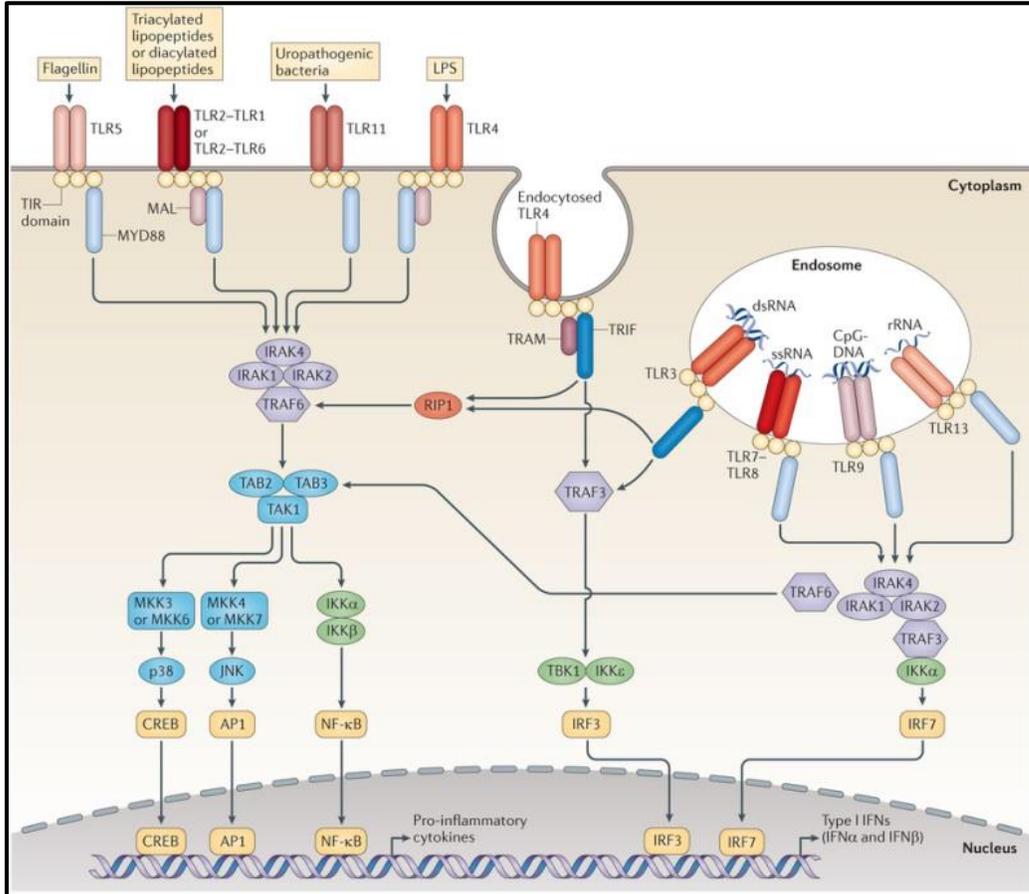
1.2 Macrófagos

Los macrófagos son las células con mayor plasticidad funcional del sistema hematopoyético y como consecuencia se encuentran distribuidos en todos los tejidos (Martínez & Gordon, 2014). Estas células participan activamente en el reconocimiento inicial de patógenos, así como su fagocitosis, procesamiento y presentación de antígenos, contribuyendo de esta manera a la activación de la respuesta inmune innata y la polarización hacia la respuesta adaptativa (Martínez & Gordon, 2014).

1.2.1 Macrófagos y respuesta inmune innata. En los eventos iniciales del reconocimiento de patógenos, una serie de receptores conocidos como TLRs contribuyen a la identificación de PAMPs, los cuales definen la vía de activación celular del macrófago

(clásica o alternativa) y la subsecuente respuesta efectora a través de la liberación de diversos mediadores proinflamatorios (Figura 2) (O'Neill *et al.*, 2013).

Figura 2. Receptores tipo Toll (TLRs) descritos en macrófagos.



Fuente: Tomado de van O'Neill *et al.*, 2013. Algunos PAMPs bacterianos como LPS o flagelina (Presentes en OMVs) actúan como ligandos para TLR4 y TLR5, respectivamente, promoviendo la transducción de señales que favorecen la producción de interleucinas proinflamatorias responsables de la activación del macrófago.

Dos vías de activación han sido descritas en macrófagos referidas como activación clásica (M1) o alternativa (M2) y cuya divergencia parece estar determinada por la interacción ligando-receptor, así como la subsecuente transducción de señales que median la liberación de diferentes citoquinas asociadas a la polarización de linfocitos Th1 o Th2 (Martínez & Gordon, 2014).

1.2.1.1 Vía clásica de activación. Durante el reconocimiento de LPS, principal componente de bacterias Gram-negativas, la dimerización y transfosforilación del TLR4 induce la activación de una vía de señalización dependiente de Myd88 la cual promueve la translocación de factores de transcripción como AP-1 y NF- κ B al núcleo y la subsecuente transcripción de genes relacionados con citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-12 e IL-6, moléculas quimioatrayentes como CCL2 y CXCL10, así como la expresión de los genes del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC-II, *por sus siglas en inglés*) (O'Neill et al., 2013; Martínez & Gordon, 2014).

Estos eventos iniciales son fundamentales para la estimulación posterior de la respuesta inmune adaptativa y determinan el perfil de respuesta efectora frente al agente invasor. De esta manera, una vez interactúan macrófago y linfocito T, la estimulación con citoquinas como IL-12 direccionan la polarización de linfocitos Th0 hacia un fenotipo Th1, caracterizado por la producción de IFN- γ que contribuye a generar una respuesta más robusta por parte del macrófago con el fin de destruir patógenos intracelulares que hayan sido fagocitados (Gasteiger & Rudensky, 2014; Martínez & Gordon, 2014).

Por otro lado, una elevada actividad metabólica es observada en macrófagos como respuesta a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS; *por sus siglas en inglés*) y especies reactivas de nitrógeno (RNS; *por sus siglas en inglés*), producto de las actividades oxidativas de NADPH e iNOS, respectivamente (Gostner *et al.*, 2013; Galván-Peña & O'Neill, 2015). En el caso particular de la iNOS, esta es una de las tres isoformas descritas en humanos, junto con las sintasas de óxido nítrico endotelial (eNOS) y neuronal (nNOS) las cuales contrario a la iNOS, son enzimas constitutivas sensibles a calcio (Campbell *et al.*, 2014; Bogdan, 2015); pese a esto, todas tienen como función la generación de NO a partir de arginina como sustrato (Bogdan, 2015).

Por su parte, se han descrito diversas funciones para el NO entre las que se destacan su actividad como vasodilatador, inmunomodulador y neurotransmisor (Yang *et al.*, 2013; Cobos, 2014). En otro escenario, el NO cumple un papel importante en la

inmunidad innata en conjunto con las ROS, en un proceso fisiológico denominado estallido respiratorio. Dado que estas especies reactivas son tóxicas para la célula, evidencia previa sugiere que la actividad de la iNOS durante la activación clásica del macrófago implica su reclutamiento a zonas proximales al fagosoma que se genera como consecuencia de la internalización de patógenos intracelulares como *M. tuberculosis* (Miller *et al.*, 2004). Una vez movilizada la enzima, tiene lugar la síntesis de NO a partir de Arginina, el cual es posteriormente traslocado al fagosoma naciente donde tienen lugar reacciones de oxidoreducción con algunas especies reactivas de oxígeno como el anión superóxido (O_2^-) para formar intermediarios reactivos como el peroxinitrito ($OONO^-$), el cual promueve la nitración de tirosinas presentes en las proteínas presentes en la estructura de la pared celular o membrana externa de bacterias y parásitos (Pohanka *et al.*, 2013; Pisoschi *et al.*, 2015). Pese a que este es el principal mecanismo microbicida por el cual actúan las especies reactivas de nitrógeno, también ha sido descrito que el NO es capaz de inducir la formación de S-nitrosotioles y de manera más reciente se ha sugerido que podría tener un papel protector frente a la formación de biofilms (Barraud *et al.*, 2015; Bogdan, 2015).

Finalmente y como mecanismo de regulación, el NO es rápidamente convertido a especies menos tóxicas para la célula como nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-). Aunque las reacciones que subyacen la oxidación de NO_2^- a NO_3^- *in vivo* no es clara, algunos autores sugieren que el mecanismo bioquímico podría implicar la participación de algunas oxihemoproteínas (Bryan & Grishman, 2007).

1.2.1.2 Vía alternativa de activación. La activación alternativa del macrófago o referida también como M2, es una vía caracterizada por la producción de diversas citoquinas capaces de inducir diferentes estados funcionales del macrófago. En contraste con la vía de activación clásica, en esta vía los macrófagos liberan IL-4 la cual promueve la activación de las vías de transducción JAK1 y JAK3, permitiendo la translocación del factor de transcripción STAT6 al núcleo (Martínez & Gordon, 2014). Como consecuencia, son sobre-expresados transglutaminasa 2, receptores de manosa, colesterol hidrolasa y una

serie de citocinas con actividad pro o antiinflamatorias como IL-1 o IL-10, respectivamente (Rószler, 2015).

A pesar de la amplia gama de posibilidades de activación que se describen para ésta vía, el fenotipo M2 contribuye de manera preferente con la inmunidad adaptativa humoral y sus respectivas actividades efectoras contra patógenos extracelulares (Th2), sin embargo, para este mismo fenotipo una subclase denominada M2c ejerce actividades reguladoras de la respuesta inmune mediante la liberación de citocinas como el factor de crecimiento transformante β (TGF- β ; *pos sus siglas en inglés*) el cual regula negativamente la actividad del macrófago, favoreciendo su inactivación (Martínez & Gordon, 2014).

1.2.2 Endocitosis. La endocitosis es un proceso independiente de la polimerización de filamentos de actina caracterizado por la internalización de moléculas pequeñas ($\approx 100\text{nm}$) (Underhill & Goodridge, 2012).

Por otro lado, la fagocitosis es una forma especializada de endocitosis e involucra el citoesqueleto; es llevada a cabo por células como macrófagos, neutrófilos y células dendríticas mediante la cual son englobadas una amplia variedad de partículas como microorganismos y células apoptóticas a través de diversos ligandos que son reconocidos por receptores presentes en la membrana de estos fagocitos (Tabla 3).

Tabla 3. Receptores involucrados en fagocitosis

Tipo de fagocitosis	Receptores	Ligandos
Partículas Oponizadas	Familia Fc	Partículas opsonizadas por anticuerpos
	Complemento	Partículas opsonizadas por complemento
Partículas no Oponizadas	$\alpha 5\beta 1$ Integrina	Fibronectina
	Dectina 1	β -Glucano
	Scavenger A	Bacterias
	$\alpha V\beta 5$ Integrina	Células apoptóticas
Activada por PAMPs	TLRs	LPS, Flagelina, Peptidoglicano

Fuente: Adaptado de Underhill & Goodridge, 2012.

Una vez tiene lugar la interacción ligando-receptor, las partículas que serán internalizadas son recubiertas por membrana citoplasmática en un proceso denominado exocitosis focal, seguido por la invaginación de dicha membrana y su liberación al citoplasma donde participan proteínas como dinamina, una GTPasa capaz de escindir los fagosomas formados para que ingresen al tráfico vesicular (Di *et al.*, 2003; Mao & Finnemann, 2015).

Bajo este contexto, la fagocitosis supone la pérdida de una porción de membrana citoplasmática que será destinada al recubrimiento de la partícula a internalizar. Esta premisa puede ser determinada experimentalmente por técnicas electrofisiológicas dado que la membrana celular se comporta eléctricamente como un capacitor, es decir, como un condensador de cargas eléctricas constituido por dos placas conductoras paralelas (Medios extra e intracelular) separadas por un dieléctrico (Bicapa lipídica) (Hille, 2001). Dado que esta capacidad de almacenar cargas, denominada capacitancia de membrana (C_m), es un parámetro biofísico proporcional al área de la membrana, alteraciones en esta medición reflejarán cambios directos durante procesos de exocitosis y/o endocitosis (Holevinsky *et al.*, 1998; Di *et al.*, 2003; Quintana *et al.*, 2010).

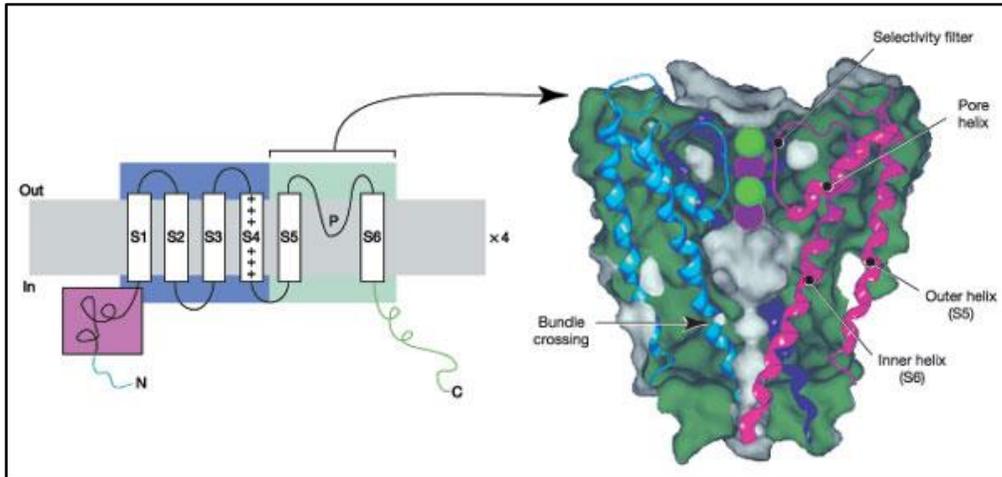
Por otro lado, una vez es liberado el endosoma/fagosoma desde la membrana citoplasmática, inicia un tráfico vesicular en el cual suceden varias alteraciones entre las que se destaca la acidificación de dicho endosoma hasta alcanzar pH ácido entre 4,5 y 5,0, el cual es provisto por la fuerza protón motriz de ATPasas vacuolares que contribuyen con el influjo de hidrogeniones necesarios para la actividad de enzimas lisosomales que serán vertidas durante un proceso de fusión con lisosomas para dar origen al fagolisosoma y en el cual tienen lugar una serie de actividades microbicidas mediadas principalmente por ROS y RNS (Gordon, 2016; Pauwels *et al.*, 2017). Como consecuencia de éstos pasos de maduración del fagosoma sucesivos y la degradación de las partículas internalizadas, se generan antígenos particulados que son presentados por fagocitos a través del antígeno leucocitario humano tipo II (HLA-II; *por sus siglas en inglés*) a linfocitos vírgenes, con el fin de obtener una respuesta efectora que contribuya con la resolución del proceso

infeccioso mediante la activación de la respuesta inmune adaptativa celular y/o humoral (Goldberg & Rizzo, 2015).

1.2.3 Permeabilidad iónica y respuesta inmune. En macrófagos, la presencia de canales iónicos ha sido asociada con diversos estados funcionales entre las que se incluyen el restablecimiento del potencial de membrana, apoptosis, proliferación, diferenciación, activación de la respuesta inmune, entre otros (Gallin, 1991; Forero *et al* 1999; Felipe *et al.*, 2010; Camacho, 2012; Grizel *et al.*, 2014). Estos canales iónicos además de ser descritos en estas células se han encontrado en linfocitos, monocitos y células dendríticas donde su bloqueo ha mostrado reducción en la liberación de mediadores proinflamatorios tipo TNF- α e IL8, sugiriendo que su actividad es importante en la respuesta inmunológica y el estado funcional de células no excitables (Qiu *et al.*, 2002; Panyi *et al.*, 2014). A pesar de lo anterior, la conexión entre vías de señalización y la participación de canales iónicos no es del todo clara y requiere más investigación.

1.2.3.1 Canales de K⁺ dependientes de voltaje (Kv). Los Kv corresponden a 12 familias de proteínas tipo canal selectivos a K⁺ constituidos por seis dominios transmembranales y un sensor de voltaje el cual consiste en una hélice transmembranal en el que se encuentran residuos de aminoácidos cargados positivamente (Arginina o Lisina, segmento S4) y que son los responsables de la cinética de apertura o cierre del canal en respuesta a cambios en el potencial de reposo (Figura 2) (Yellen, 2002; Tao *et al.*, 2010).

Registros electrofisiológicos realizados con la técnica de *Patch Clamp* en configuración de célula entera, han mostrado que macrófagos derivados de médula ósea (BMDM, *por sus siglas en inglés*) y células Raw264.7 cultivados en presencia del factor estimulante de colonia-macrófago (M-CSF; *por sus siglas en inglés*), estimulados con LPS o TNF- α , elicitan corrientes de salida de gran amplitud sensibles a Margatoxina (MgTx) y Stichodactyla-toxina (ShK), sugiriendo la participación de canales Kv1.3 en la activación clásica de éstas células (Vicente *et al.*, 2003-2005).

Figura 3. Representación esquemática de canales Kv

Fuente: Tomado de Yellen 2002. Se muestran la distribución de los seis dominios transmembranales de los canales Kv, así como el sensor de voltaje ubicado en el dominio S4 y el poro de selectividad (P) a potasio.

1.2.3.2 Canales rectificadores de entrada de K^+ . Estos canales, presentes en macrófagos, células dendríticas y microglía fueron descritos por primera vez por Périer *et al.*, 1994 mediante registros electrofisiológicos en modo voltaje sostenido (*Voltage-Clamp*). Este grupo de canales caracterizados por conductancias pequeñas (13pS) y sensibilidad a Ba^{2+} , son responsables de restaurar el potencial de reposo a través del influjo de iones potasio al interior celular (Lee *et al.*, 2009; Bose *et al.*, 2015). Aunque evidencia reciente muestra que la amplitud de las corrientes de entrada elicítadas por macrófagos estimulados con LPS disminuye, así como una regulación a la baja en los transcritos de estos canales después de la diferenciación de monocitos THP-1 a macrófagos, su papel en la activación de la respuesta inmune aún no está claro (Moreno *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2016).

1.2.3.3 Canales de K^+ activados por calcio y voltaje. Este grupo de canales son activados por Ca^{2+} y/o voltaje y de acuerdo con sus propiedades biofísicas han sido descritos tres tipos (Tabla 4).

Tabla 4. Canales de K⁺ activados por calcio y/o voltaje

Canal	Propiedades Biofísicas		Sensibilidad Farmacológica
	Activación	Conductancia (pS)	
Baja Conductancia (SK)	[Ca ²⁺] _i subμM	5-20	Apamina
Conductancia Intermedia (IK)	[Ca ²⁺] _i subμM	20-80	NS6180-TRAM34
Alta conductancia (BK)	[Ca ²⁺] _i μM /Despolarización	100-200	Paxilina-IbTx-ChTx

Fuente: Adaptado de Pardo, 2012. **IbTx.** Iberiotoxina. **ChTx.** Charybdotoxin.

Los canales SK son codificados por tres genes (KCa 2.1, KCa 2.2, KCa 2.3) y expresados principalmente en neuronas y células de la microglía, donde parecen contribuir con la activación celular mediante la sobre-regulación de la NOS y la producción de NO, aunque no se ha descrito la vía de señalización implicada (Schlichter *et al.*, 2010; Dolga & Culmsee., 2012).

Por otro lado, canales de conductancia intermedia (KCa 3.1) han sido implicados en proliferación, migración y actividad fagocítica de macrófagos (Zhang *et al.*, 2015; Grimaldi *et al.*, 2016). La apertura de estos canales está determinada por un incremento en las concentraciones intracelulares de calcio; evento que induce hiperpolarización celular de la membrana citoplasmática resultado de la salida de K⁺ y que a su vez favorece el influjo de Ca²⁺ por gradiente eléctrico desde el medio extracelular o desde compartimentos de almacenamiento intracelular como el retículo endoplásmico. Este fenómeno contribuye a la regulación de la señalización celular dependiente de calcio, así como la modulación de diversas funciones del macrófago como la producción de citoquinas proinflamatorias y la subsecuente activación celular (Gao *et al.*, 2010; Wulff & Castle., 2010; Liu *et al.*, 2016).

Finalmente, los canales de potasio de alta conductancia activados por voltaje y calcio o BK responden al incremento en los niveles de calcio intracelular gracias a la presencia de residuos de aminoácidos cargados negativamente y altamente conservados donde se encuentra un sitio de unión a calcio; así como a estados de despolarización de la

membrana plasmática por la presencia de aminoácidos cargados positivamente que contribuyen a la apertura y cierre del canal, para permitir el eflujo de iones potasio e inducir un estado transitorio de hiperpolarización mientras el potencial de reposo es reestablecido (Pardo *et al.*, 2012).

En cuanto al papel de este grupo de canales en la activación clásica y/o alternativa, la evidencia actual no es clara. Ensayos realizados por Papavlassopoulos *et al.*, 2006 muestran que macrófagos humanos obtenidos de sangre periférica y estimulados con 5 ng/mL de LPS disminuyen la liberación de mediadores proinflamatorios como TNF- α e IL-8 cuando son preincubados con paxilina, un bloqueador de canales BK, sugiriendo su participación en la activación clásica del macrófago. En contraste con estos hallazgos, Essin *et al.*, 2009 haciendo uso de macrófagos derivados de médula ósea de ratones C57BL/6 wild type (BK^{+/+}) y deficientes (BK^{-/-}), no reportan diferencias en los niveles de expresión de TNF- α tras el estímulo con 10 ng/mL de LPS.

Por otro lado y de manera más reciente, Yoshida, 2017 en su tesis doctoral muestra que macrófagos Raw 264.7 estimulados con LPS sobreexpresan canales BK, los cuales son inmunolocalizados en la membrana plasmática de las células durante las primeras 12 horas de interacción, mientras que en tiempos más tardíos (24 horas), la fluorescencia asociada a estos canales es similar al control de células no tratadas, sugiriendo que si bien estos canales juegan un rol en la activación clásica, este podría estar limitado a las primeras horas de activación; pese a esto, la vía de señalización implicada permanece sin dilucidar.

A pesar de lo anterior y aunque la participación de canales sensibles a calcio es poco entendida en el contexto de la activación del macrófago, es claro que la señalización por este catión juega un rol importante en procesos de fagocitosis, endocitosis, maduración del endosoma y la liberación de mediadores proinflamatorios como IL-12 y TNF- α , por lo que sería viable suponer la participación de esta serie de canales en procesos fisiológicos del macrófago como la activación celular (Nunes & Demaurex, 2010; Libako *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2016).

2. Capítulo 2. OMVs de *E. coli* JC8031 son internalizadas sin comprometer la viabilidad celular del macrófago

Existe en la literatura evidencia controversial sobre los mecanismos involucrados en la interacción OMV_célula hospedera y las consecuencias que dicha interacción tiene en términos de viabilidad celular. Se ha descrito que algunas vesículas pueden ser internalizadas a través de diversas vías de endocitosis o fusionarse con la membrana citoplasmática para liberar su contenido al citoplasma y que la presencia de proteínas asociadas a OMVs como ClyA o VacA en *E. coli* y *Helicobacter pylori* respectivamente, inducen citotoxicidad (Ellis & Kuehn, 2010; O'Donoghue & Krachler, 2016). Por este motivo y asumiendo que la internalización de las vesículas resultaría en una presentación antigénica más eficiente que la fusión de membranas al evitar la degradación proteolítica de futuros péptidos internalizados por parte de proteasas citoplasmáticas, la primera intención de este trabajo fue determinar si OMVs provenientes de *E. coli* JC8031 son internalizadas por macrófagos murinos J774A.1 y si existe compromiso de su viabilidad.

2.1 Materiales y métodos

2.1.1 Cultivo celular. Macrófagos murinos de la línea celular J774A.1 (ATCC® TIB-67) crecidos en monocapa fueron mantenidos en frascos de cultivo de 25cm² y medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640™, *Gibco*), suplementado con suero bovino fetal inactivo al 10% (SBFi, *Gibco*), pH 7.4, 37°C y 5% de CO₂, hasta por cuatro semanas. 2,5x10⁴ cel/mL fueron utilizadas en los ensayos propuestos, luego de determinar la fase de

crecimiento exponencial a partir de un ensayo de proliferación celular llevado a cabo con la metodología WST-1 (*Roche*) (Anexo A).

2.1.2 Aislamiento y marcaje de OMVs. Se utilizó la cepa hipervesiculante de *E. coli* JC8031 (Bernadac *et al.*, 1998) donada gentilmente por el Dr. Mathew DeLisa, Universidad de Cornell, Facultad de Química e Ingeniería Biomolecular, Ithaca, NY, USA y se siguió el protocolo descrito previamente por Chen *et al.*, 2010. Brevemente, una colonia bacteriana proveniente de cultivo axénico fue transferida a 10 mL de caldo Luria Bertani (LB) durante 18 horas a 37°C y agitación constante (\approx 120 rpm). Transcurrido el tiempo de incubación, el medio fue transferido a 100 mL de caldo LB y una incubación adicional bajo las mismas condiciones previamente descritas, fue llevada a cabo. Posteriormente, se realizó separación por centrifugación a 15000 rpm/15 minutos a 4°C; el sobrenadante obtenido fue filtrado a través de membranas estériles de 0,22 μ m (*Merck MilliporeTM*) y ultra-centrifugado a 23000 rpm/2 horas 30 minutos a 4°C para precipitar las OMVs. Los pasos de centrifugación fueron llevados a cabo en una centrífuga ULTRA 4.0 Hanil Science Industrial, rotor A50U-8, No. 6.

Finalmente, las OMVs obtenidas se resuspendieron en buffer fosfato salino (PBS) 1X estéril y fueron almacenadas a 4°C hasta su uso por un periodo máximo de 4 semanas. La concentración de triacilgliceroles (TAG) presente en las OMVs fue cuantificada mediante una serie de reacciones acopladas que confluyen en la formación de peróxido de hidrógeno el cual en presencia de 4-aminopirimidina, 4-clorofenol y peroxidasa forman quinoneimina, un producto coloreado cuantificable por espectrofotometría a 500 nm, usando el kit para determinación de TAG de Biosystems (*BioSystems S.A.*),

Para el marcaje de las OMVs, fue utilizada la metodología descrita por Parker *et al.*, 2010. Brevemente, 10 μ L de la sonda lipofílica DiO275 (3,3'-dioctadecyloxacarbocyanine perchlorate; *Invitrogen*) disuelta en dimetilsulfóxido según las indicaciones del fabricante (2mg/mL; DMSO, *SigmaTM*) fueron mezclados con 100 μ L de OMVs (\approx 5 mg) e incubadas durante 20 minutos a 37°C. Cumplido el tiempo de

incubación, se realizaron dos lavados a 23000 rpm/2 horas 30 minutos a 4°C en una centrífuga ULTRA 4.0 Hanil Science Industrial, rotor A50U-8, No. 6 para retirar el colorante libre y la concentración de TAG fue nuevamente cuantificada. En todos los casos, 10µL de las OMVs resuspendidas en PBS 1X estéril fueron sembradas en agar LB con el fin de descartar contaminación bacteriana o fúngica.

2.1.3 Ensayo de internalización. Para evaluar la internalización de las OMVs en macrófagos J774A.1, se siguió la metodología descrita por Parker *et al.*, 2010. Brevemente, $2,5 \times 10^4$ cel/mL fueron sembradas en microplacas de 96 pozos (*CostarTM*) 24 horas antes de los ensayos con el fin de favorecer su adherencia a la matriz provista. Transcurrido el tiempo de incubación, el medio de cultivo fue retirado y 0,1 µg/mL de OMVs-DiO (*Exi/Emi*: 484/501 nm) diluidas en medio suplementado fueron adicionados a las células previamente servidas y posteriormente se realizaron incubaciones durante 3, 6, 12 o 24 horas. Para la visualización, el medio con OMVs no internalizadas se retiró y dos lavados con PBS 1X frío estéril fueron realizados durante 5 minutos. Luego, 40 µL de Hoechst 33342 (*Exi/Emi*: 350/461 nm; 10µg/mL; *Invitrogen*) disueltos en *buffer* Hank's fueron adicionados para marcar núcleo y como referente de localización durante la evaluación de internalización de las OMVs mediante microscopia de epifluorescencia, haciendo uso de un microscopio Zeiss Axioobserver A.1® (*Zeiss, Alemania*).

2.1.4 Impacto de la interacción MO_OMV sobre la viabilidad celular. Para determinar el efecto citotóxico de las OMVs, un ensayo de reducción mitocondrial de sales de tetrazolium conocido como MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) fue llevado a cabo. Brevemente, $2,5 \times 10^4$ cel/mL fueron sembradas en microplacas de 96 pozos (*CostarTM*) 24 horas antes de los ensayos de viabilidad celular. Finalizado el tiempo de incubación 0,1 y 1 µg/mL de OMVs se adicionaron a las células previamente servidas y posteriormente el cultivo se re-incubó durante 3, 6, 12, 24 y 48 horas adicionales. Posteriormente, 10 µL de MTT a una concentración de 5 mg/mL (*Sigma*®) se adicionaron a cada tiempo de interacción y una incubación adicional por 3 horas se llevó a cabo. Con el fin de resuspender los cristales de formazán generados como

consecuencia de la actividad reductora de la succinato deshidrogenasa mitocondrial en células viables, el medio se retiró completamente y 100 μ L de DMSO (*Sigma*) se adicionaron a cada pozo. La absorbancia de cada pozo fue leída a una longitud de onda de 562 nm con ayuda de un lector para microplacas ELX800 (*Biotek*). En estos ensayos, células sin tratamiento representaron el 100% de viabilidad celular y fueron incubados durante los mismos tiempos detallados previamente. Los datos obtenidos se expresaron como porcentaje (%) de viabilidad celular calculado a partir de la ecuación 1:

$$\text{Ecuación 1.: \% Viabilidad Celular: } \frac{\text{Abs Células Tratadas con OMVs} \times 100}{\text{Abs Control Negativo}}$$

Adicionalmente, se llevó a cabo la cuantificación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH; *Número EC 1.1.1.27*) en sobrenadante, la cual es liberada desde el citoplasma al medio extracelular como consecuencia de la lisis celular generada durante muerte celular necrótica. Brevemente, $2,5 \times 10^4$ cel/mL fueron servidas e incubadas durante 24 horas con 0,1 y 1 μ g/mL de OMVs o estaurosporina 1 μ M (*Sigma*TM) como control positivo de muerte celular (Leanza *et al.*, 2012), mientras que células sin tratamiento representaron el control negativo. La cuantificación de LDH presente en el sobrenadante fue realizada haciendo uso del kit comercial Cytotoxicity Detection Kit (LDH; *Roche*) en el cual NAD⁺ es reducido a NADH/H⁺ durante la oxidación del lactato a piruvato, reacción que es catalizada por acción de la LDH presente en el sobrenadante. Posteriormente, una NADH-diaforasa transfiere un grupo H⁺ a una sal de tetrazolium para reducirlo a una sal de formazán soluble que es cuantificable por espectrofotometría a 490/600nm.

2.1.5 Evaluación de cambios morfológicos. Con el fin de determinar si existía compromiso en la viabilidad celular mediada por la inducción de apoptosis/necrosis en macrófagos J774A.1 tratados con OMVs, ensayos de microscopia de epifluorescencia fueron realizados de acuerdo con la metodología reportada por Ribble *et al.*, 2005. Para esto, $2,5 \times 10^4$ cel/mL servidas en microplacas de 96 pozos (*Costar*TM) fueron incubados con 0,1 y 1 μ g/mL de OMVs o LPS de *E. coli* O26:B6 (*Sigma*®) durante 24 horas.

Finalizado el tiempo de incubación, 100µL de una solución 100µg/mL de naranja de acridina/bromuro de etidio (NA/BE, *Molecular Probes*) se adicionaron a cada pozo. La visualización fue realizada mediante microscopia de epifluorescencia haciendo uso de un microscopio Zeiss Axioobserver A.1® (*Zeiss, Alemania*). En este ensayo, estaurosporina 1µM (*SigmaTM*) fue utilizado como control positivo de apoptosis (Leanza *et al.*, 2012) y células sin tratamiento correspondieron al control negativo.

2.1.6 Análisis de datos. Los datos generados se analizaron y graficaron con el programa OriginPro 2016, (*OriginLag Corporation Northampton, MA, USA*). Las significancias estadísticas fueron determinadas a partir de un análisis bivariado haciendo uso de la prueba t-Student y valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

2.2 Resultados

2.2.1 Las OMVs de *E. coli* JC8031 son internalizadas de una manera tiempo dependiente. En los ensayos de internalización, se observó un incremento en el patrón de fluorescencia verde en el citoplasma de macrófagos de ratón de la línea J774A.1 incubados en presencia de 0,1 µg/mL OMVs marcadas con la sonda fluorescente DiO.

Durante las primeras 3 horas de interacción la fluorescencia se ubicó en la región citoplasmática, sin embargo 6 y 12 horas post-interacción el patrón de fluorescencia fue visto perinuclear luego de analizar la contra-tinción realizada con Hoechst 33342, el cual tiñe núcleos gracias a su afinidad por ADN de doble cadena. Finalmente, luego de 24 horas fue posible determinar la presencia de OMVs-DiO en un mayor número de células, así como una mayor intensidad de fluorescencia que de igual forma al comportamiento descrito para las primeras 12 horas, localizó perinuclearmente (Figura 4).

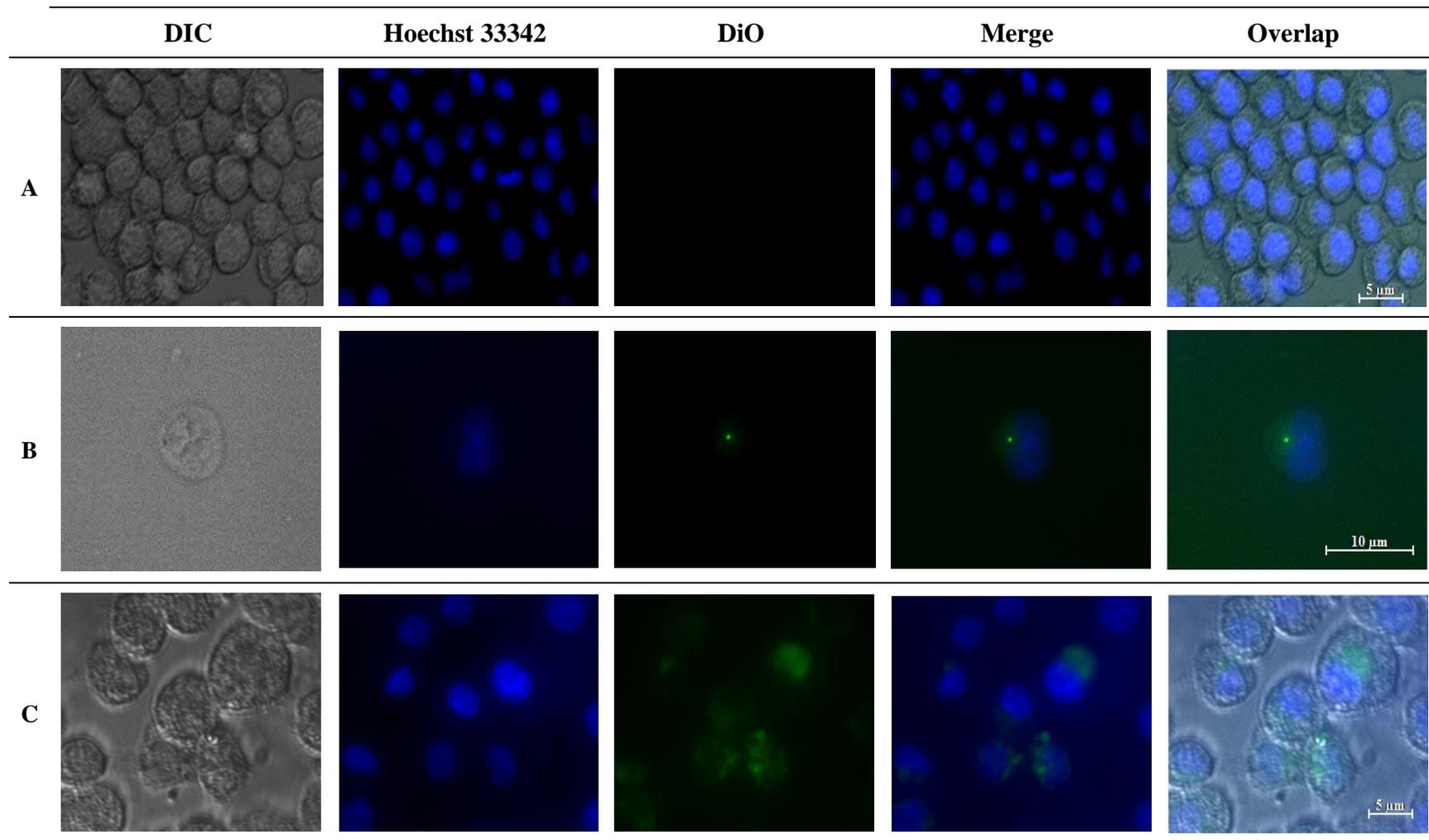
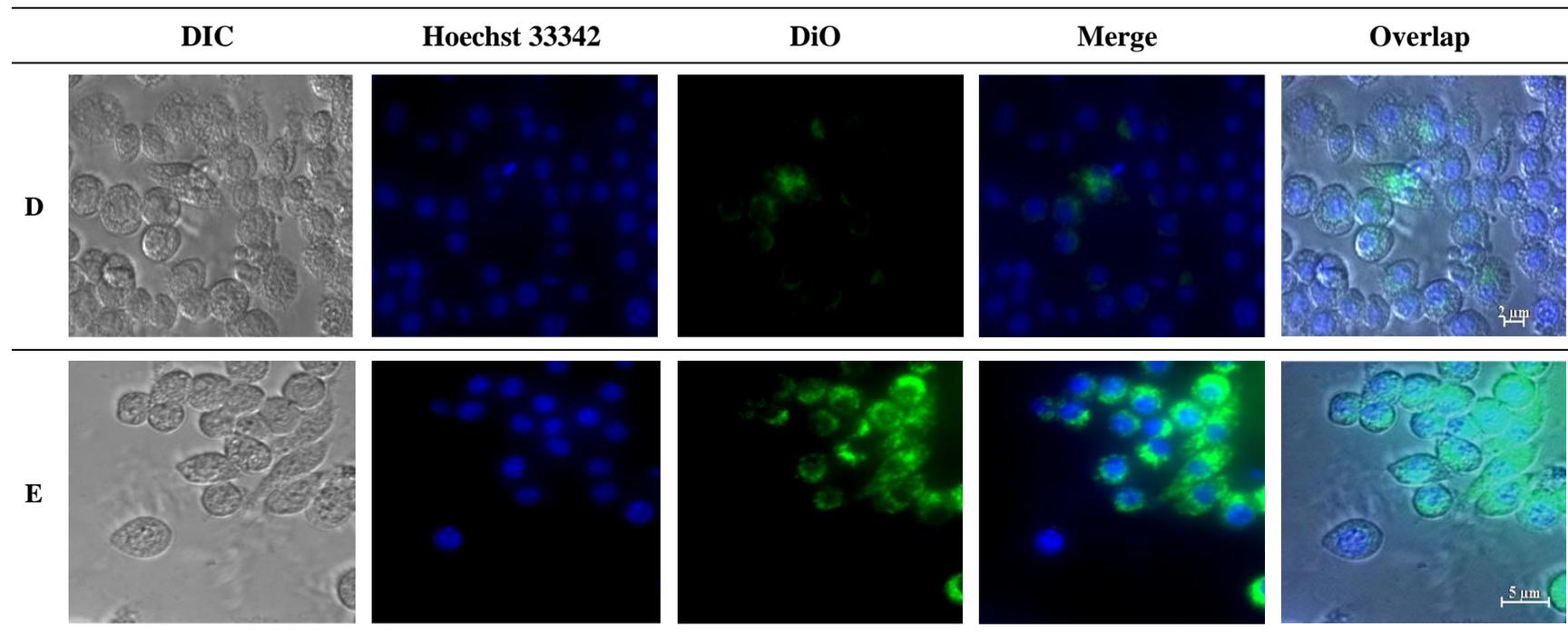
Figura 4. Internalización de OMVs-DiO en macrófagos J774A.1

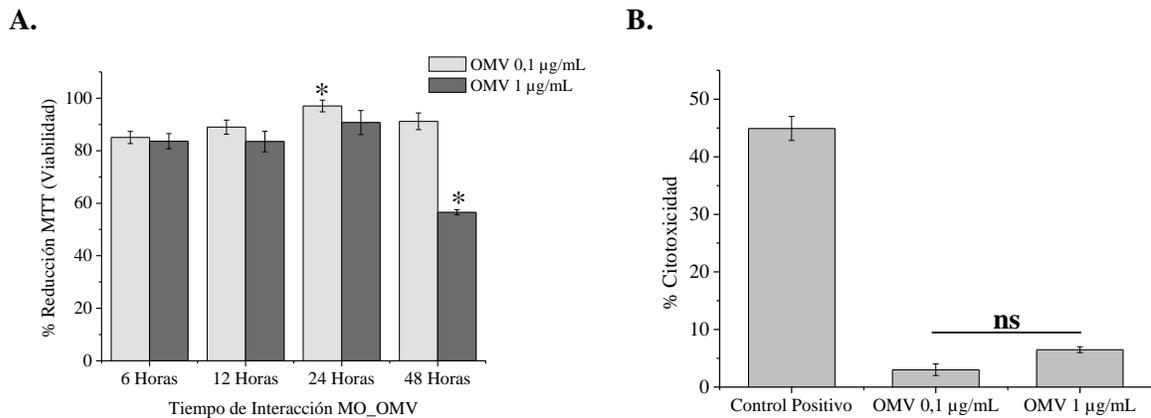
Figura 4. Continuación...



Se muestran fotografías de microscopia de epifluorescencia para macrófagos control (**A**) y estimulados con 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de OMVs-Dio aisladas de *E. coli* JC8031 durante 3 (**B**), 6 (**C**), 12 (**D**) y 24 (**E**) horas. La fluorescencia verde corresponde a OMVs marcadas con la sonda fluorescente DiO, mientras que la fluorescencia azul representa la tinción realizada con Hoechst 33342 (Núcleos).

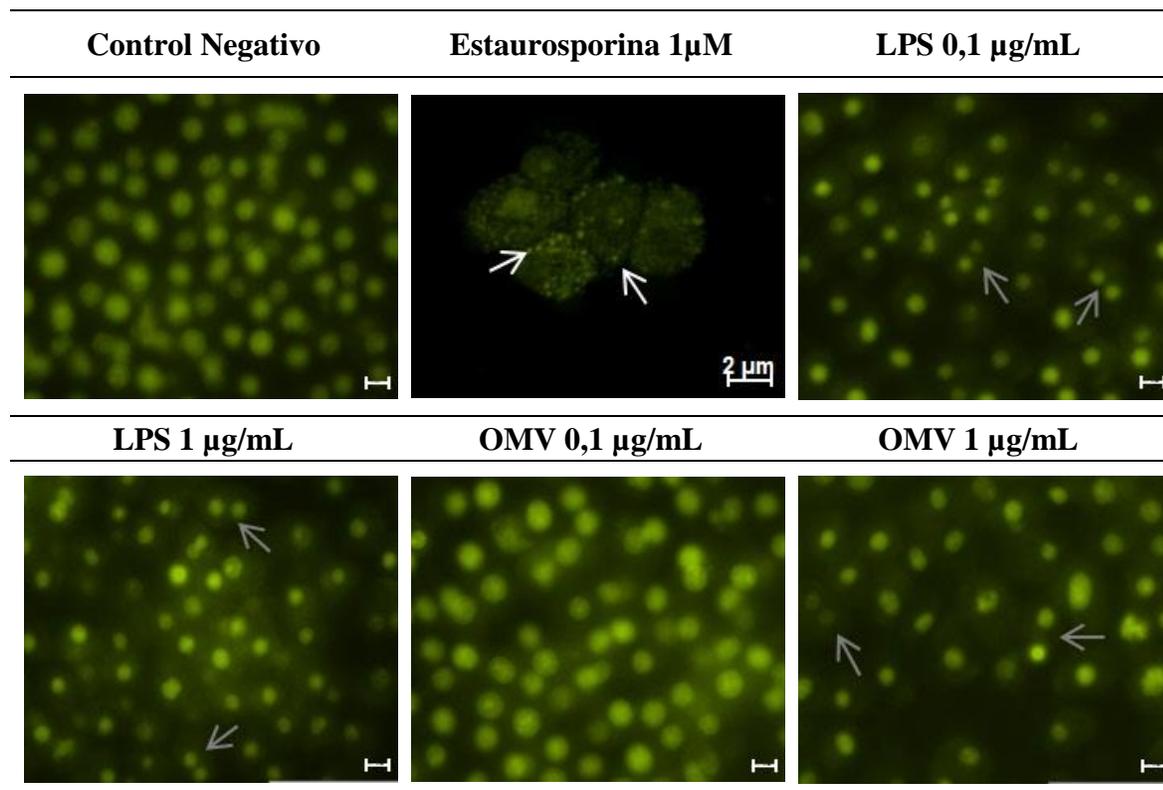
2.2.2 OMVs aisladas de *E. coli* JC8031 no comprometen la viabilidad celular de macrófagos J774A.1, durante las primeras 24 horas post-interacción. Durante las primeras 24 horas de interacción, la viabilidad celular de macrófagos tratados con 0,1 y 1 $\mu\text{g/mL}$ de OMVs se redujo entre el 3 y 11%. En contraste, el uso de 1 $\mu\text{g/mL}$ de OMVs mostró reducción de la viabilidad estadísticamente significativa 48 horas post-interacción ($44\% \pm 0,95$, $p=0,0069$; $n=5$) (Figura 5A). Consistente con esto, en el ensayo de liberación de LDH se observó que 1 $\mu\text{g/mL}$ induce citotoxicidad superior al uso de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de OMVs, aunque esta diferencia no mostró significancia ($6\% \pm 0,5$ vs $3\% \pm 1$, $p=0,08868$, $n=2$) (Figura 5B).

Figura 5. Viabilidad de macrófagos J774A.1 estimulados con OMVs de *E. coli* JC8031



Se muestran los promedios \pm ES de cinco experimentos independientes para el ensayo de MTT (A) y dos para LDH 24 horas post-interacción (B). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. * $p<0.05$. ns: No significativo.

2.2.3 OMVs de *E. coli* JC8031 no inducen cambios morfológicos asociados a apoptosis en macrófagos J774A.1. En estos ensayos, macrófagos incubados 24 horas con 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de OMVs no presentaron cambios morfológicos sugestivos de apoptosis como fragmentación nuclear, reducción del volumen citoplasmático o presencia de cuerpos apoptóticos los cuales fueron observados en células tratadas con estaurosporina 1 μM . En contraste, células estimuladas durante el mismo periodo de tiempo con 1 $\mu\text{g/mL}$ de OMVs mostraron binucleación y citoplasmas más prominentes, similar a lo observado con 0,1 y 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS sugiriendo posible activación celular (Figura 6).

Figura 6. Cambios morfológicos de macrófagos estimulados con OMVs de *E. coli* JC8031

Se muestran cambios morfológicos en macrófagos estimulados durante 24 horas con estaurosporina como control positivo de apoptosis, LPS como control positivo de activación celular y OMVs obtenidas de *E. coli* JC8031. Las células fueron teñidas con naranja de acridina/bromuro de etidio (100 μ g/mL) y visualizadas por microscopía de epifluorescencia. Las flechas blancas señalan hallazgos típicos de apoptosis como condensación de la cromatina, mientras que las flechas grises indican presencia de células binucleadas. Las barras corresponden a una escala de 1 μ m.

3. Capítulo 3. La internalización de OMVs de *E. coli* JC8031 induce cambios en la permeabilidad iónica de macrófagos J774A.1

Las propiedades eléctricas de células no excitables como los macrófagos han provisto información importante sobre estados funcionales específicos (Camacho, 2012). En este contexto, se ha descrito que la infección de patógenos intracelulares como *Leishmania amazonensis* induce hiperpolarización celular de macrófagos J774A.1 y reducción en la producción de NO (Forero *et al.*, 1999; Camacho *et al.*, 2008), sugiriendo que la despolarización celular es necesaria para la activación clásica del macrófago y que es consistente con lo observado en registros electrofisiológicos de macrófagos estimulados con LPS y/o IFN- γ (Vicente *et al.*, 2006; Villalonga *et al.*, 2010); aunque en otros escenarios la despolarización ha sido asociada con activación alternativa en estas células (Li *et al.*, 2016). Dada esta evidencia controversial y asumiendo que 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de OMVs de *E. coli* JC8031 son internalizadas sin comprometer la viabilidad celular del macrófago (Figura 4), durante esta investigación se evaluaron cambios en las propiedades eléctricas pasivas y activas que permitieran comprender los mecanismos fisiológicos que tienen lugar durante la interacción MO_OMV como parte de la caracterización inicial de estas nanoestructuras en el desarrollo de futuros coadyuvantes científicamente válidos.

3.1 Materiales y métodos

3.1.1 Cultivo celular y OMVs. El cultivo de macrófagos y la obtención de OMVs fueron realizados según los protocolos descritos en los ítems 2.1.1 y 2.1.2, respectivamente. Los

registros electrofisiológicos se realizaron a temperatura ambiente (18-20°C) sobre células adheridas (24 a 30 horas) a cubreobjetos estériles mantenidos en medio RPMI + 10% SBFi en placas de Petri de 35mm, con y sin 0,1 µg/mL de OMVs durante 6, 12 y 24 horas. Una hora antes de iniciar los registros se realizó cambio del medio de cultivo (RPMI + 10% SBFi) (Forero *et al.*, 1999).

3.1.2 Whole-Cell Patch Clamp. Para registrar las propiedades eléctricas de la membrana plasmática de macrófagos murinos se utilizó la técnica electrofisiológica de *Patch Clamp* en configuración de célula entera (*Whole-Cell Patch Clamp*) y en modo voltaje sostenido (*Voltaje-Clamp*) (Hamill *et al.*, 1981). Los estímulos de voltaje programados con el software pClamp10 (Axon Instruments, Foster City, CA) fueron enviados a la célula a través de una interfase analógica-digital (DigiData 1550B; *Molecular Devices*) y las señales/respuestas eléctricas se registraron con un amplificador Axopatch-200B (*Molecular Devices*). Finalmente, las señales eléctricas registradas se analizaron empleando el módulo pClampfit del software pClamp10.

Las células fueron bañadas en una solución externa con las siguientes condiciones iónicas (mM): 145 NaCl, 5 KCl, 1 CaCl₂, 2 MgCl₂, 10 Hepes-Na, 5 Glucosa (pH 7.4, 300 mOsm). Las pipetas se fabricaron con vidrios capilares de hematocrito no heparinizados (borosilicato) y una solución interna cuya composición iónica fue en mM: 140 K-Glutamato, 2 KCl, 5 EGTA-K, 0.5 CaCl₂, 4 MgCl₂, 10 Hepes-K, 3 ATP-Na₂, 0,5 GTP-Na Glucosa (pH 7.4, 300 mOsm). La resistencia eléctrica de los electrodos con solución interna se mantuvo entre 2-3 MΩ y aquellos registros con resistencias en serie (Rs) menores a 10 MΩ, fueron tenidos en cuenta para los análisis de resultados. Los parámetros biofísicos que se midieron incluyeron:

3.1.2.1 Potencial de reposo (Vm): Definido como el potencial durante el cual el flujo neto de la corriente iónica a través de la membrana plasmática es igual a 0 (I=0). Este valor fue registrado con el amplificador Axopatch-200B (Axon Instruments, Foster City, CA) en

modo corriente sostenida (*Current-Clamp*) durante los dos primeros minutos luego de establecer la configuración de célula entera (*Whole-Cell*).

Como una medida adicional del potencial de reposo, fue llevado a cabo un ensayo de epifluorescencia haciendo uso de la sonda aniónica DISBAC₂(3) (Bis-(1,3-Diethylthiobarbituric Acid) Trimethine Oxonol; *Molecular Probes*) de acuerdo con las indicaciones del fabricante y el protocolo descrito por Li *et al.*, 2016, con algunas modificaciones. Brevemente, $2,5 \times 10^4$ cel/mL células fueron servidas en microplacas de 96 pozos e incubadas con 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de OMVs durante 6, 12 y 24 horas. Finalizado el tiempo de incubación, fueron adicionados 10 μL de la sonda (0,5 μM) diluidos en buffer salino balanceado de Hank's (HBSS) y las células fueron analizadas por microscopia de epifluorescencia haciendo uso de un microscopio Zeiss Axioobserver A.1® (*Zeiss, Alemania*) (*Exi/Emi*: 530/560 nm). Para el análisis, fue determinada la intensidad de pixeles haciendo uso del software libre ImageJ (*NIH*).

3.1.2.2 Capacitancia de Membrana (Cm): La Cm se midió en modo voltaje sostenido (*Voltaje-Clamp*) luego de establecer la configuración de célula entera (*Whole-Cell*) y una vez registrado el potencial de reposo de la membrana. Brevemente, desde un potencial de sostenimiento (*Holding Potential*) de -60 mV se enviaron 12 pulsos de -10 mV y 10 milisegundos (ms) de duración a fin de generar un transitorio de corriente capacitiva (I_c , la cual es proporcional a la cantidad de corriente almacenada y, por tanto, al área de la membrana celular) sin comprometer corrientes iónicas activadas por voltaje. El valor de la Cm se calculó a partir de la constante de tiempo tau (τ) representada en la ecuación 2.

$$\text{Ecuación 2: } \tau (\tau) = \text{Resistencia}(R_m) \times \text{Capacitancia} (C_m)$$

La resistencia eléctrica de la membrana (R_m), se determinó a partir de la amplitud de la corriente capacitiva registrada (I_c), elicitada por un pulso de 10mV empleando la Ley de Ohm representada en la ecuación 3. Por su parte, la constante de tiempo (tau- τ) de carga del capacitor fue determinada ajustando la curva del transitorio capacitivo (I_c) con una

función exponencial simple para finalmente calcular la capacitancia de la membrana a partir de la ecuación 4.

$$\textbf{Ecuación 3.}: \textit{Resistencia (Rm)} = \frac{\textit{Voltaje (V)}}{\textit{Corriente (I)}}$$

$$\textbf{Ecuación 4}: \textit{Capacitancia (Cm)} = \frac{\textit{tau (\tau)}}{\textit{Resistencia (Rm)}}$$

3.1.2.3 Densidad de corriente. Este parámetro se midió en modo de *Voltage Clamp*, previa cancelación de la Cm y a un potencial de sostenimiento de -60 mV. Para lograr la apertura de canales iónicos de salida dependientes de voltaje, se enviaron pulsos despolarizantes desde -100 hasta +120 mV y 300 ms de duración, mientras que la apertura de canales iónicos de entrada fue generada con pulsos hiperpolarizantes desde -140 hasta +20 mV y 300 ms de duración. La densidad de corriente fue posteriormente normalizada frente al valor de la capacitancia de membrana obtenida para cada célula (pA/pF). Finalmente, para evaluar la sensibilidad farmacológica de las corrientes de salida y entrada, fueron llevados a cabo registros en presencia de Caribdotoxina (100nM-30 minutos de interacción) y Cloruro de Bario (5mM-10 minutos de interacción), respectivamente.

3.1.3 Expresión génica de canales iónicos. A fin de evaluar la participación de los canales iónicos Kv 1.3, Kir 2.1, KCa 3.1 y BK en los cambios de la permeabilidad iónica observada en macrófagos J774A.1 incubados con 0,1 µg/mL de OMVs de *E. coli* JC8031 durante las primeras 6 y 12 horas de interacción, fueron llevados a cabo ensayos de PCR en tiempo real cuantitativa (qPCR) haciendo uso de la técnica SYBR® Green e Histona 3 como gen de referencia.

3.1.3.1 Extracción manual de ARN total. Transcurrido el tiempo de incubación deseado, se realizó una extracción de ARN total con Trizol® (*Invitrogen*). Para esto, 5×10^6 cel/mL fueron colectadas con ayuda de un scraper y dos lavados con PBS 1X estéril fueron realizados a fin de retirar detritos celulares. En una fase inicial de homogenización, fue

adicionado 1 mL de Trizol con el fin de favorecer lisis celular; posteriormente, las células lisadas se centrifugaron a 12000 g/10 minutos a 4°C y el sobrenadante se transfirió a un eppendor de 1,5 mL nuevo. Con el fin de separar la fase acuosa donde se halla el ARN, 200 µL de cloroformo se adicionaron y se realizó una nueva centrifugación a 12000 g/15 minutos a 4°C. El sobrenadante, fue transferido a un nuevo eppendorf y una cantidad isovolumétrica de isopropanol frío se adicionó para favorecer la precipitación del ARN. Luego, se realizó una centrifugación a 12000 g/10 minutos a 4°C y el sobrenadante se descartó para dejar únicamente la presencia de un pellet que corresponde al ARN total obtenido.

Finalmente, al pellet fue adicionado 1mL de etanol al 75% diluido en H₂O-DEPC 0.1% y se centrifugó a 7500 g/5 minutos a 4°C para posteriormente permitir que se secara completamente. Este pellet fue resuspendido en H₂O-DEPC 0.1% y almacenado a -80°C hasta su utilización en ensayos de qPCR. La integridad, calidad y concentración del ARN extraído se realizó por visualización en gel de agarosa 0,8% y cuantificación espectrofotométrica en NanoDrop. Una relación 260:280 cercana a 2,0 se consideró óptima y fue interpretada como indicativo de ausencia de trazas fenólicas u otros contaminantes durante el proceso de extracción (Anexo B).

3.1.3.2 Retrotranscripción (RT-PCR). La RT-PCR fue llevada a cabo en un equipo para PCR convencional C100™ Thermo Cycler (*Bio-Rad*) haciendo uso del kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (*Applied Biosystem*), según las indicaciones del fabricante. Para esto, 10 µL de ARN total en una concentración de 50 ng/µL fueron adicionados al master mix descrito a continuación con el fin de sintetizar ADNc:

Tabla 5. Master mix de RT-PCR 2X

Reactivo	Concentración Inicial	Volumen (μL)	Concentración Final
H ₂ O UP	NA	4,2	NA
Buffer RT	10X	2	2X
dNTPs	100 mM	0,8	8 mM
Primers Random	10X	2	2 X
Transcriptasa Reversa	500U/ μL	1	50U/ μL
Volumen Final	NA	10	NA

NA.: No Aplica.

Las condiciones de termociclado sugeridas por el kit incluyen:

Tabla 6. Condiciones RT-PCR

Número de ciclos	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (Minutos)
1	25	10
	37	120
	85	5
NA	4	∞

NA.: No Aplica.

Los ADNc obtenidos fueron almacenados a -20°C hasta su uso en ensayos de qPCR.

3.1.3.3 PCR en tiempo Real (qPCR)-SYBR® Green. Se utilizó la metodología de qPCR relativa para la cuantificación de la expresión génica de los canales iónicos mencionados previamente. El ensayo se llevó a cabo haciendo uso del kit comercial LigthCycler® 480 SYBR Green I Master (*Roche*), el cual provee un master mix listo para usar y en el que se encuentra un intercalante fluorescente de ADN de doble cadena llamado SYBR® Green (*Ex/Em*: 480/530 nm), que al unirse al surco menor del ADN emite 1000 veces más fluorescencia que en su estado libre en solución permitiendo de ésta manera detectar la presencia de amplicones en cada ciclo de amplificación sin necesidad de llevar a cabo electroforesis en gel de agarosa.

Según las indicaciones del fabricante el mix de reacción para cada ensayo incluyó:

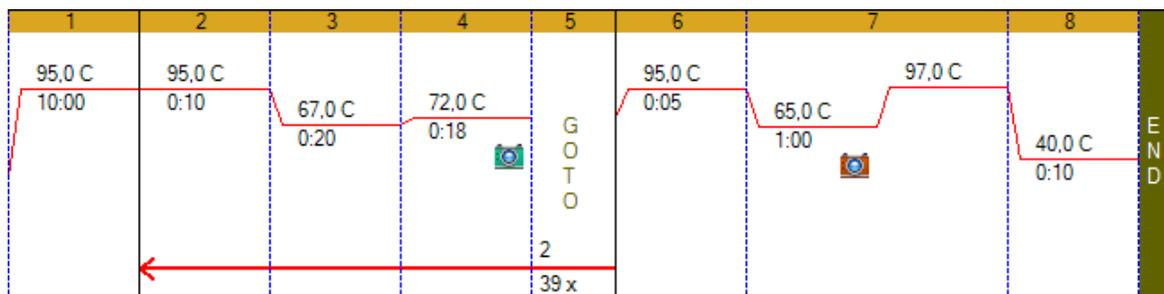
Tabla 7. Master mix de qPCR-SYBR® Green

Reactivo	Concentración Inicial	Volumen (µL)	Concentración Final 1X
H ₂ O UP	NA	1,5	NA
Primer Forward	10 µm	0,5	0,5 µm
Primer Reverse	10 µm	0,5	0,5 µm
Master mix	2X	5	1X
ADNc	≈100ng	2,5	NA
Volumen Final	NA	10	NA

NA.: No Aplica.

Adicionalmente y con el fin de descartar la presencia de ADN genómico como resultado de contaminación durante la extracción de ARN, fueron llevado a cabo ensayos de qPCR a partir de muestras de ARN no retrotranscritas. Los ensayos de qPCR se realizaron en un termociclador para qPCR CFX96™ (*Bio-Rad*) y de acuerdo con las siguientes condiciones de termociclado sugeridas por la casa comercial:

Figura 7. Condiciones de termociclado para qPCR-SYBR® Green



El panel 1 y 2 corresponden a las temperaturas utilizadas para desnaturalizar la doble hebra del ADNc; en 3 se muestran las condiciones necesarias para la hibridación entre el ADNc y los primers; y en 4 se encuentra los requerimientos para llevar a cabo la extensión del amplímero deseado. Finalmente, el panel 6 y 7 corresponden al diseño de las curvas de disociación generado para evaluar la calidad de los amplicones obtenidos y que en estos ensayos no mostró presencia de amplificadores inespecíficos o dímeros de primer.

Según las indicaciones de la casa comercial, las condiciones de reacción seleccionadas para los pasos 3 y 4 (Anillamiento y Extensión, respectivamente), dependen estrictamente del juego de primers que se utilizan para flanquear la secuencia de ADNc diana. Por esta razón, previo a los ensayos de qPCR fue llevado a cabo un diseño de primers para los cinco genes evaluados a través de la plataforma Primer-BLAST de NCBI y la síntesis fue realizada por *Invitrogen* (Anexo C).

Una vez obtenidos los primers, fueron realizados gradientes de temperatura por PCR convencional a partir de muestras de ADNc sintetizado de macrófagos estimulados con 1 µg/mL de LPS de *E. coli* O26:B6 (*Sigma*®) como control positivo de activación, con el fin de determinar la temperatura de anillamiento ideal para los ensayos de qPCR. Las mezclas de reacción de estos experimentos incluyeron:

Tabla 8. Master mix de PCR convencional para gradientes de temperatura

Reactivo	Concentración Inicial	Volumen (µL)	Concentración Final
H ₂ O UP	NA	19,05	NA
Buffer Taq Pol	10X	2,5	1X
MgCl ₂	50 Mm	0,75	1,5 Mm
dNTPs	10 Mm	0,5	0,2 Mm
Primer F	10 µM	0,5	0,2 µM
Primer R	10 µM	0,5	0,2 µM
Taq Polimerasa	5 U/µL	0,2	0,04 U/µL
ADNc	≈100ng	1,0	NA
Volumen Final	NA	25	NA

Las muestras se termociclaron en un equipo C100™ Thermo Cyclor (*Bio-Rad*) y las condiciones utilizadas fueron:

Tabla 9. Condiciones de termociclado para PCR convencional

Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (Minutos)
1	94	4
30	94	0,5
	Gradiente*	0,5
	72	30
1	72	4
1	4	∞
	60	1

*El gradiente de temperatura seleccionado para cada gen fue determinado a partir de las temperaturas melting teóricas obtenidas al momento de diseñar los primers.

Finalmente, los productos de PCR fueron separados en gel de agarosa 2% corrido a 70V durante 60 minutos y teñidos con SYBR® Safe 1X (*Invitrogen*TM) durante 30 minutos. La visualización fue realizada mediante un transiluminador Vilber Lourmat-Doc-Print VX2 (*Sigma*®) y el tamaño de los amplicones obtenidos fue comparado con un marcador de peso molecular de 100 pb (*Invitrogen*TM) (Anexo D).

3.1.4 Análisis de datos. Los datos de los registros electrofisiológicos, así como los obtenidos de las corridas de qPCR fueron graficados y analizados estadísticamente según la metodología descrita en el ítem 2.1.6. Para el caso particular de los ensayos de qPCR, en cada corrida se realizó una curva estándar la cual fue diseñada con diluciones en base 10 de un ADNc obtenido de macrófagos estimulados con 1 µg/mL de LPS (*E. coli* O26:B6; *Sigma*®) durante 24 horas. A partir de este montaje fue posible determinar la eficiencia de la reacción, así como la linealidad entre tres diluciones realizadas. Se validaron únicamente experimentos en los cuales la eficiencia fue $\geq 90\%$ y el coeficiente de correlación lineal $\geq 0,95$. Adicionalmente, los productos de amplificación fueron analizados mediante la realización de curvas de disociación como se describe en el panel 6 y 7 de la figura 6. Los resultados crudos de los ensayos de qPCR se detallan en el anexo E.

Una vez obtenidos los experimentos que cumplían con los criterios de calidad previamente mencionados, estos fueron analizados con la metodología del $\Delta\Delta C_t$ y los datos

se normalizaron respecto al control negativo de la siguiente forma (Schmittgen & Livak, 2008):

$$2^{\Delta} - [(NOSGE - GRGE) - (NOSCN - GRCN)]$$

Dónde:

NOSGE: Promedio del Ct de iNOS del grupo experimental

GRGE: Promedio del Ct del gen de referencia del grupo experimental

NOSCN: Promedio del Ct de iNOS del control negativo

GRCN: Promedio del Ct de del gen de referencia del control negativo

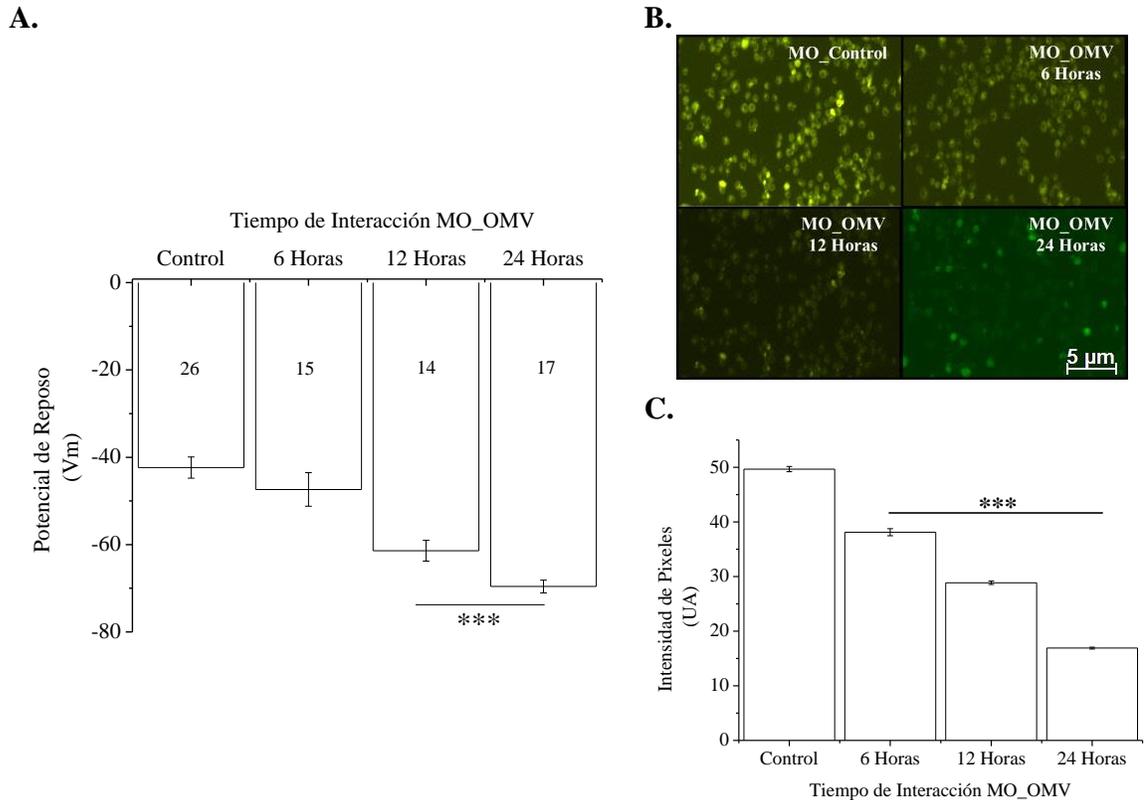
3.2 Resultados

3.2.1 OMVs de *E. coli* JC8031 inducen hiperpolarización celular y cambios en la capacitancia de membrana de macrófagos de ratón de la línea J774A.1. Luego de alcanzar la configuración *Whole-Cell* el potencial de reposo celular (V_m) fue registrado para macrófagos con o sin estímulo de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de OMVs durante 6, 12 y 24 horas. En este sentido, para células no tratadas se registraron potenciales de reposo de $-42,3 \text{ mV} \pm 2,42$ ($n= 26$), mientras que en las primeras 6 horas de interacción se observó tendencia hacia hiperpolarización ($-47,4 \text{ mV} \pm 3,84$, $p=0,27924$, $n= 15$) que incrementó significativamente respecto al control luego de 12 ($-61,41 \text{ mV} \pm 2,37$, $p= <0,001$, $n= 14$) y 24 ($-69,6 \text{ mV} \pm 1,46$, $p= <0,001$, $n= 17$) horas (Figura 8A).

Consistente con los registros electrofisiológicos, ensayos de epifluorescencia realizados con la sonda aniónica DISBAC2(3) la cual se repele de la membrana citoplasmática cuando ésta tiende a hiperpolarizarse, mostraron que macrófagos estimulados con 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de OMVs reducían la intensidad de fluorescencia, así como la intensidad de pixeles luego de ser cuantificados mediante ImageJ. En este contexto, la intensidad del pixelado para células sin tratamiento fue $49,6 \pm 0,48$, mientras que esta

medición fue reducida de manera estadísticamente significativa luego de 6 horas ($38,1 \pm 0,65$, $p = <0,001$), 12 ($28,87 \pm 0,3$, $p = <0,001$) y 24 ($16,9 \pm 0,16$, $p = <0,001$) horas de interacción (Figura 8B).

Figura 8. Potencial de reposo

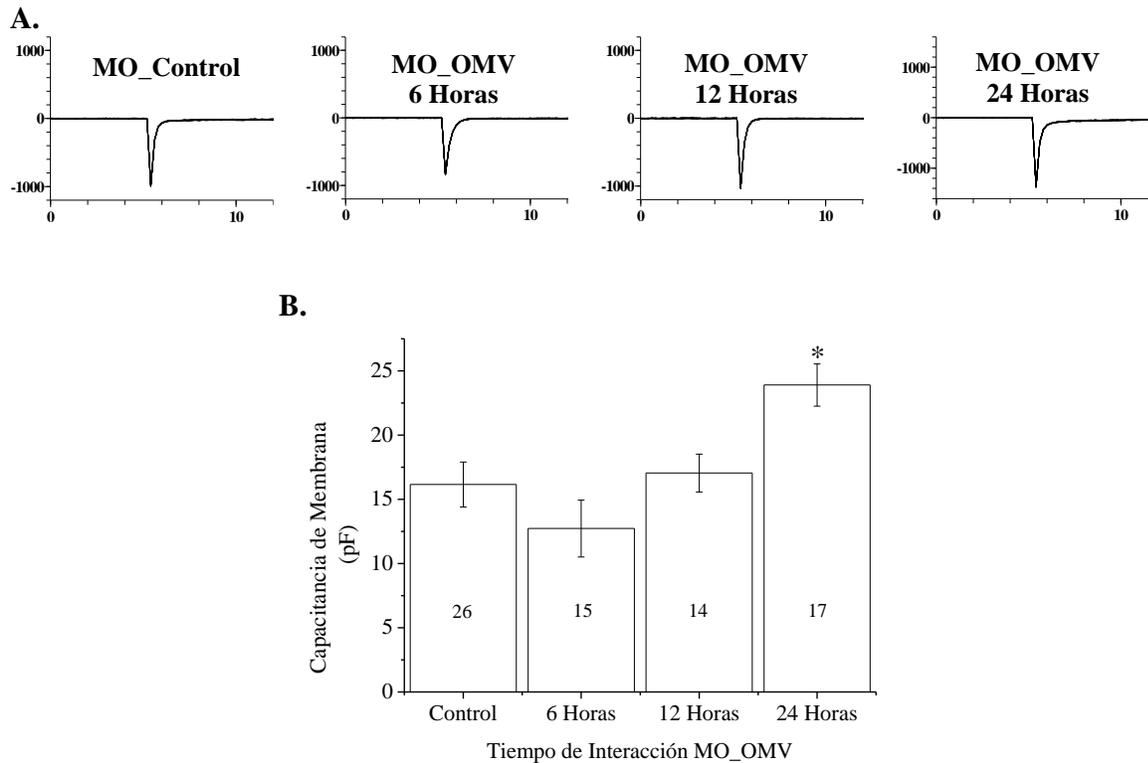


En **A** se muestra el promedio de los registros electrofisiológicos realizados \pm ES para macrófagos estimulados con $0,1 \mu\text{g/mL}$ de OMVs durante 6, 12 y 24 horas. El valor fue obtenido con el amplificador en modo *Current-Clamp* durante los dos primeros minutos luego de establecer la configuración *Whole-Cell*. Los números al interior de las barras representan el número de células analizadas para cada grupo experimental. En **B** se presentan las fotografías de epifluorescencia de células incubadas con $0,5 \mu\text{M}$ de la sonda DISBAC2(3) así como la cuantificación de la intensidad de pixeles de al menos cien células analizadas mediante ImageJ en tres experimentos independientes (**C**). *** $p < 0,001$.

En cuanto a la capacitancia de membrana, macrófagos estimulados con $0,1 \mu\text{g/mL}$ de OMVs mostraron valores de C_m de $12,7 \text{ pF} \pm 2,21$ ($p = 0,23433$, $n = 15$) durante las primeras 6 horas similar a lo observado en el control ($16,1 \text{ pF} \pm 1,75$, $n = 26$); comportamiento que se mantuvo luego de 12 horas de interacción ($17,05 \text{ pF} \pm 1,47$; $p = 0,69739$, $n = 14$). En contraste, luego de 24 horas los registros de C_m fueron

significativamente superiores respecto al control negativo ($23,9 \text{ pF} \pm 1,64$; $p= 0,00252$, $n=17$) (Figura 9).

Figura 9. Transitorio capacitivo



En **A**, se muestra un trazo representativo del transiente capacitivo de macrófagos estimulados con $0,1 \mu\text{g/mL}$ de OMVs durante 6, 12 y 24 horas. El eje X representa el tiempo en milisegundos (ms) y en el eje Y se grafica la corriente elicitada (pico Amperios, pA) luego de enviar un pulso de -10mV . En **B**, se muestra el promedio de las mediciones de C_m realizadas \pm ES. Los números al interior de las barras representan el número de células analizadas para cada grupo experimental. $*p<0.05$.

3.2.2 La internalización de OMVs de *E. coli* JC8031 induce disminución en las corrientes de salida e incrementan las corrientes de entrada. Luego de cancelar la capacitancia de membrana y desde un potencial de sostenimiento de -60 mV , fueron enviados pulsos despolarizantes desde -100 mV hasta $+120 \text{ mV}$ y 300 ms de duración con el fin de abrir canales iónicos dependientes de voltaje y registrar las corrientes elicidadas por macrófagos con o sin OMVs durante 6 a 24 horas de incubación. En este sentido, una reducción en la amplitud de la densidad de corriente de salida fue registrada en una manera tiempo-dependiente para pulsos despolarizantes de $+40 \text{ mV}$ luego de 12 ($6,4 \text{ pA/pF} \pm 1,0$;

$p = 0,04463$, $n = 16$) y 24 ($3,5 \text{ pA/pF} \pm 0,5$; $p = < 0,0001$, $n = 15$) horas de interacción, respecto al control no tratado ($10,1 \text{ pA/pF} \pm 1,5$; $n = 20$) (Figura 10A).

Por otro lado, los registros electrofisiológicos realizados en presencia de Caribdotoxina muestran que 6 horas post-interacción el porcentaje de bloqueo es similar al control en pulsos despolarizantes de +40 mV ($35,1\% \pm 9,4$ vs $27,7\% \pm 3,72$, $p = 0,55737$, $n = 7$) y +60 mV ($35,2\% \pm 9,3$ vs $31,5\% \pm 4,68$, $p = 0,73235$, $n = 7$). En contraste, un incremento significativo de la población sensible a la toxina fue encontrado luego de 12 horas de interacción en el pulso de +40 mV ($44,32\% \pm 7,8$, $p = 0,03994$, $n = 7$) respecto al control; fenómeno que fue revertido a las 24 horas ($32,2\% \pm 3,47$; $p = 0,48214$, $n = 7$) (Figura 10B-C), sugiriendo la participación de canales BK y/o KCa 3.1.

Figura 10. Corriente de salida y sensibilidad a Caribdotoxina

A.

Densidad de Corriente de Salida

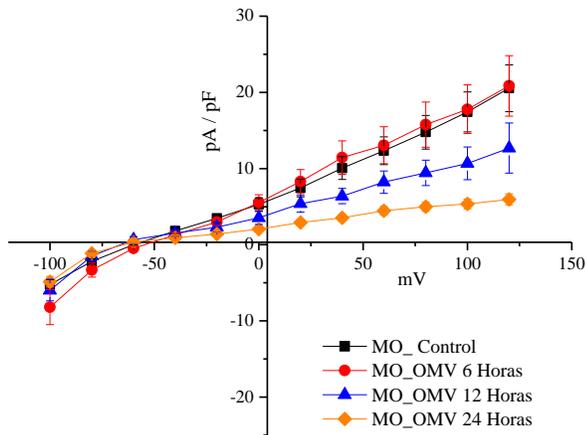
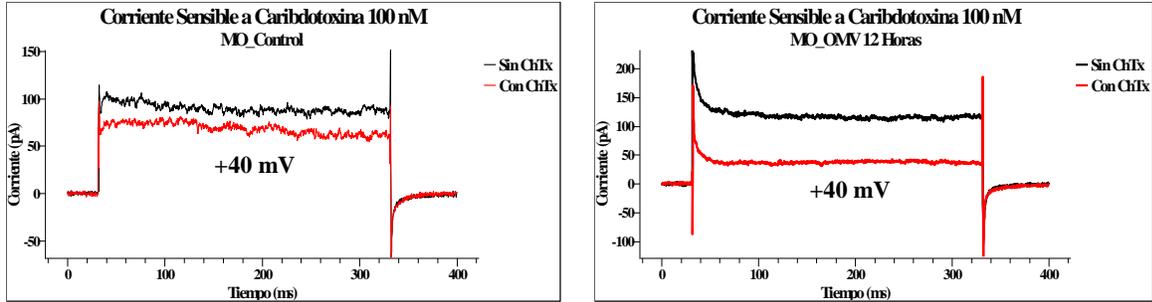
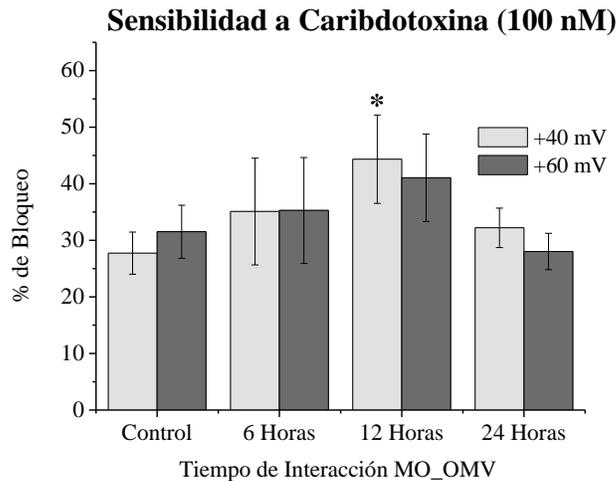


Figura 10. Continuación...**B****C**

En **A**, se grafica el promedio \pm ES para la densidad de corriente de salida obtenida después de normalizar las corrientes elicítadas por la capacitancia de membrana (pA/pF) para células sin estímulo ($n=20$) o incubadas con $0,1 \mu\text{g/mL}$ de OMVs durante 6 ($n=11$), 12 ($n=16$) y 24 ($n=15$) horas, luego del envío de pulsos despolarizantes desde -100mV hasta $+120\text{mV}$ y 300 ms de duración. En **B**, se muestra el trazo crudo de dos registros realizados en macrófagos sin tratamiento y estimulados durante 12 horas con OMVs en ausencia y presencia de Caribdotoxina (ChTx) 100 nM. En **C**, se presenta el porcentaje de bloqueo luego de la perfusión de Caribdotoxina 100 nM ($n=7$). $*p<0.05$.

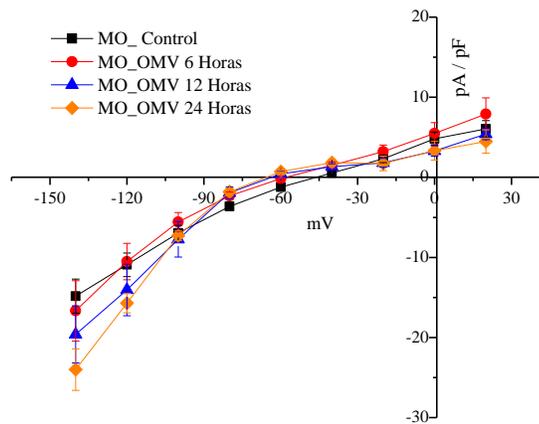
Consistente con lo encontrado en la densidad de corriente de salida, los registros electrofisiológicos para macrófagos estimulados con $0,1 \mu\text{g/mL}$ de OMVs mostraron incremento en la amplitud de la corriente de entrada luego de 24 horas de interacción a pulso hiperpolarizante de -120 mV respecto al control ($-15,7 \pm 1,22$ vs $10,9 \pm 1,47$, $p=0,02519$, $n=14$) (Figura 11A).

Estas corrientes de entrada no mostraron diferencia en la sensibilidad a Bario 5 mM luego de 6 horas de interacción al compararse con el control no tratado en pulsos hiperpolarizantes de -120 mV ($80,9\% \pm 10,17$ vs $72,2\% \pm 6,26$, $p=0,50874$, $n=5$) y -100 mV ($78,1\% \pm 13,1$ vs $70,1\% \pm 8,03$, $p=0,6586$, $n=5$). En contraste, se observó bloqueo luego de 12 horas para los pulsos de -120 mV ($90,7\% \pm 3,08$, $p=0,02488$, $n=5$) y -100 mV ($90,2\% \pm 1,8$, $p=0,03324$, $n=5$) respecto al control y de manera similar a lo observado con Caribdotoxina, luego de 24 horas este comportamiento fue revertido para -120 mV ($72,5\% \pm 7,39$, $p=0,97557$, $n=5$) y -100 mV ($66,5\% \pm 6,41$, $p=0,7347$, $n=5$) (Figura 11B-C).

Figura 11. Corriente de entrada y sensibilidad a Cloruro de Bario

A.

Densidad de Corriente de Entrada



B.

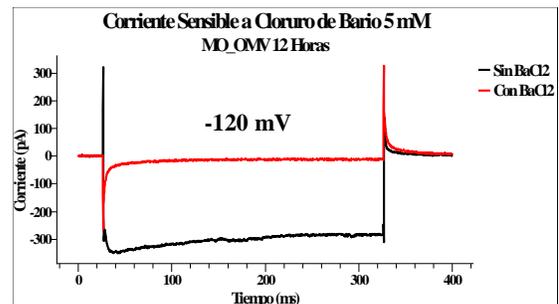
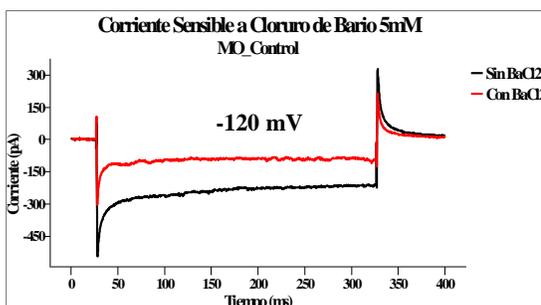
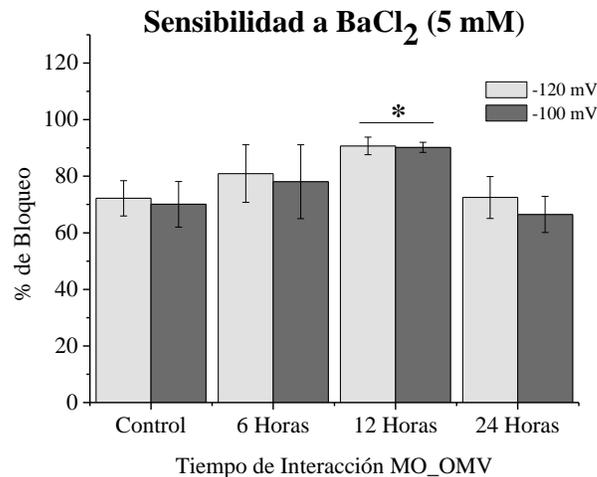


Figura 11. Continuación...**C.**

En **A**, se grafica el promedio \pm ES para la densidad de corriente de entrada obtenida después de normalizar las corrientes elicidas por la capacitancia de membrana (pA/pF) para células sin estímulo ($n=14$) o incubadas con $0,1 \mu\text{g/mL}$ de OMVs durante 6 ($n=10$), 12 ($n=10$) y 24 ($n=7$) horas, luego del envío de pulsos hiperpolarizantes desde -140 mV hasta $+20 \text{ mV}$ y 300 ms de duración. En **B**, se muestra el trazo crudo de dos registros realizados en macrófagos sin tratamiento y estimulados durante 12 horas con OMVs en ausencia y presencia de Cloruro de Bario 5 mM . En **C**, se presenta el porcentaje de bloqueo luego de la perfusión de Cloruro de Bario 5 mM ($n=5$). $*p < 0.05$.

3.2.3 La internalización de OMVs aisladas de *E. coli* JC8031 promueve la sobreexpresión de canales de potasio dependientes de voltaje y/o calcio. Dado que el incremento en la densidad de la corriente de entrada observado durante las primeras 12 horas de interacción podría corresponder a la respuesta fisiológica del macrófago ante la hiperpolarización celular inducida por las OMVs (Figuras 8 y 11), en este trabajo se evaluaron los niveles de expresión génica de los canales iónicos Kv 1.3 y Kir 2.1 dado que se describen como los principales responsables del restablecimiento del potencial de reposo en estas células (Vicente *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2009; Bose *et al.*, 2015). Pese a que no fue medida la cantidad de proteína, los niveles de expresión génica fueron consistentes con los hallazgos electrofisiológicos registrados y en este sentido, una regulación a la baja fue observada para Kv 1.3 luego de 12 horas de interacción, mientras que en este mismo tiempo niveles de expresión superiores al control fueron encontrados en Kir 2.1 (Figura 12).

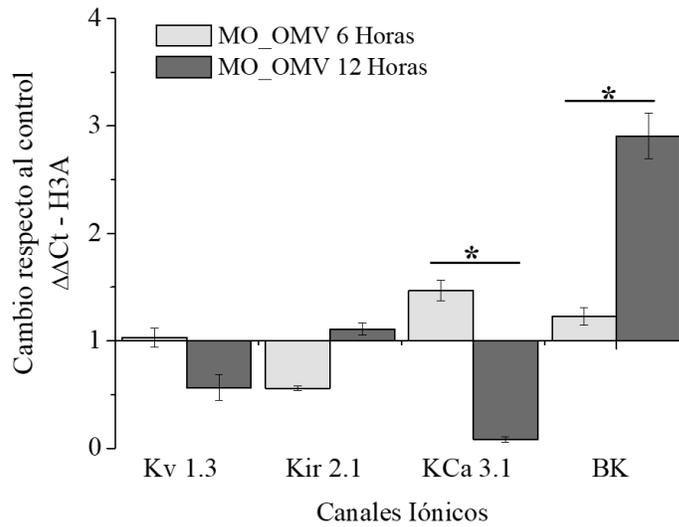
En vista de que los registros electrofisiológicos en presencia de Caribdotoxina 100 nM mostraron un mayor bloqueo de las corrientes de salida en macrófagos estimulados durante 12 horas con 0,1 $\mu\text{g/mL}$ OMVs (Figura 10), sugiriendo la participación de canales de potasio de alta conductancia activados por despolarización y calcio o BK (Pardo, 2012), los niveles de transcripción para este canal fueron determinados mediante qPCR. En este sentido, los ensayos de expresión génica mostraron sobreexpresión 6 (1,22 veces \pm 0,08, n=2) y 12 (2,91 veces \pm 0,21; $p = 0,01084$ respecto a las 6 horas, n=2) horas pos-interacción con OMVs de *E. coli* JC8031 (Figura 12), pese a la hiperpolarización de la membrana plasmática encontrada (Figura 8).

En otro escenario y teniendo en cuenta que, según Buitrago, 2017 (Comunicación personal) la internalización de las vesículas fue reducida significativamente luego de la pre-incubación de los macrófagos con una solución hipertónica de sacarosa (0,45 M), pero no en presencia de citocalasina D o nistatina, se determinó que OMVs derivadas de *E. coli* JC8031 son endocitadas por un mecanismo dependiente de clatrina. Frente a este panorama y considerando que tanto la endocitosis, como la liberación de algunos mediadores proinflamatorios sugestivos de activación clásica del macrófago como IL-12 requieren la participación de calcio (Liu *et al.*, 2016), durante esta investigación se decidió evaluar los niveles de expresión génica del canal iónico KCa 3.1, el cual es sensible a Caribdotoxina así como los canales BK (Rauer *et al.*, 2000; Lam & Wulff, 2011), pero que en contraste con estos, son activados por incremento en los niveles de calcio intracelular independiente del potencial eléctrico de la membrana (Gao *et al.*, 2010; Grimaldi *et al.*, 2016).

Aunque no fueron medidos los niveles de proteína, lo encontrado para KCa 3.1 fue consistente con la premisa plantada previamente y como se muestra en la figura 11, durante las primeras 6 horas de interacción KCa 3.1 fue sobre-expresado respecto a macrófagos no tratados (1,46 veces \pm 0,09, n=2) lo que resultó consistente con la hiperpolarización celular observada durante las primeras 12 horas de interacción, mientras

que los niveles de ARNm para las 12 horas fueron regulados a la baja ($0,083 \text{ veces} \pm 0,02$, $p=0,03454$ respecto a las 6 horas, $n=2$).

Figura 12. Expresión génica de canales iónicos



Se muestran los niveles de expresión génica para cuatro canales iónicos normalizados frente al gen de referencia histona 3 (H3A) de macrófagos incubados con $0,1 \mu\text{g/mL}$ de OMVs aisladas de *E. coli* JC8031 durante 6 y 12 horas. Los datos son presentados como el promedio \pm ES de los cambios de expresión del transcrito respecto al control no tratado. $*p<0,05$.

4. Capítulo 4. OMVs de *E. coli* JC8031 promueven la activación clásica del macrófago

Estudios previos han mostrado que durante la activación clásica del macrófago con LPS y/o IFN- γ hay incremento en las corrientes de salida sensibles a Margatoxina, sugiriendo despolarización celular y participación de canales Kv 1.3 (Vicente *et al.*, 2006; Villalonga *et al.*, 2010). Contrario a esto, en este trabajo la caracterización electrofisiológica mostró que la internalización de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de OMVs aisladas de *E. coli* JC8031 induce hiperpolarización celular acompañada de un incremento en la densidad de corriente de entrada en macrófagos J774A.1 (Figuras 8 y 11). Por otro lado, se ha reportado que OMVs de especies bacterianas como *S. typhimurium* promueven la liberación de mediadores proinflamatorios como NO, IL-12 y TNF- α en macrófagos J774, modelo similar al utilizado en este trabajo (Alaniz *et al.*, 2007), por lo que la activación clásica del macrófago en el contexto de la endocitosis de OMVs, donde además de LPS existen otros PAMPs reconocidos, podría no necesariamente venir acompañada de la marcada despolarización que se registra cuando se utiliza solamente LPS. Para comprobar esta hipótesis, durante esta investigación se buscó determinar si OMVs de *E. coli* JC8031 promueven la activación clásica del macrófago mediante la evaluación del comportamiento de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS; *Número EC 1.14.13.39*), como principal marcador de fenotipo M1 en este tipo de células (Martínez & Gordon, 2014).

4.1 Materiales y métodos

4.1.1 Cultivo celular y OMVs. El cultivo de macrófagos y la obtención de OMVs fueron realizados según los protocolos descritos en los ítems 2.1.1 y 2.1.2, respectivamente.

4.1.2 Niveles de expresión génica de la iNOS. Los niveles de expresión de la iNOS se determinaron mediante qPCR a partir de macrófagos servidos en flask de 25cm² previamente incubados durante 3 a 24 horas con 0,1 y 1 µg/mL de OMVs.

4.1.2.1 Extracción manual de ARN total. Para la extracción de ARN total se siguió la metodología descrita en ítem 3.1.3.1. De igual forma, el análisis por electroforesis en gel de agarosa, así como la cuantificación es mostrada en el Anexo B.

4.1.2.2 Retrotranscripción (RT-PCR). Los ensayos de RT-PCR siguieron los protocolos establecidos en el ítem 3.1.3.2, sin modificaciones.

4.1.2.3 PCR en tiempo Real (qPCR)-Sondas TaqMan®. Para evaluar el comportamiento del transcrito de la iNOS se llevó a cabo un ensayo de qPCR relativa haciendo uso del kit comercial TaqMan® Gene Expression Máster Mix (*Applied Biosystem*), el cual usa un juego de sondas fluoro marcadas que basan su actividad en el principio físico de FRET (*Flourescence Resonance Energy Transfer*). Como genes de referencia fueron utilizados la Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa (GAPDH; *por sus siglas en inglés; Número EC 1.2.1.12*) y β-Actina (Tabla 10) (Ferraz & Fernández, 2016).

Tabla 10. Sondas qPCR-TaqMan®

GR	Id Ensayo	Secuencia de la sonda (5'-3')	Fluorocromo
iNOS	Mm00607939_s1	GCCTTGTGTCAGCCCTCAGAGTACA	FAM
GAPDH	Mm99999915_g1	GGTGTGAACGGATTTGGCCGTATTG	VIC
β-Actina	Mm00440502_m1	ACTGAGCTGCGTTTTACACCCTTTC	VIC

GR. Gen de referencia.

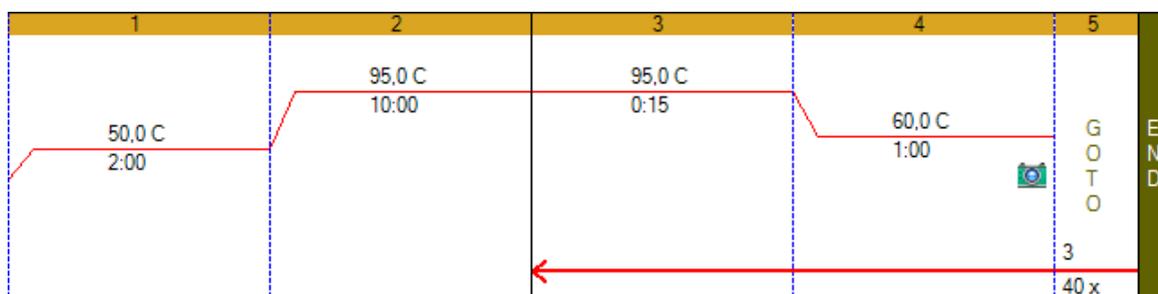
El mix de reacción según la casa comercial incluyó:

Tabla 11. Master mix de qPCR-TaqMan®

Reactivo	Concentración Inicial	Volumen (µL)	Concentración Final 1X
H ₂ O UP	NA	2.5	NA
Master mix	2X	5	1X
Sonda TaqMan®	20X	0,5	1X
ADNc	NA	2	NA
Volumen Final	NA	10	NA

Los ensayos de qPCR fueron llevados a cabo en un termociclador para qPCR CFX96™ (*Bio-Rad*) y de acuerdo con las siguientes condiciones de termociclado sugeridas por la casa comercial:

Figura 13. Condiciones de termociclado para qPCR-TaqMan®



Los datos fueron analizados con la metodología del $\Delta\Delta C_t$ de la misma manera que lo descrito en el ítem 3.1.4 pero normalizados contra la expresión de los genes de referencia GADPH y β -Actina. Así mismo, se llevaron a cabo ensayos de qPCR con muestras de ARN no retrotranscritas con el objetivo de descartar la presencia de ADN genómico. En el anexo F se muestran los datos crudos de las curvas de amplificación obtenidas para los ensayos de qPCR-TaqMan®.

4.1.3 Detección de la Sintasa de Óxido Nítrico Inducible (iNOS). Con el fin de determinar si adicionalmente al transcrito evaluado por qPCR, la iNOS era traducida durante la interacción/internalización de OMVs, un ensayo de fluorimetría fue llevado a cabo. Para esto, se hizo uso del kit comercial FCANOS (*Sigma*®) el cual detecta la presencia de la proteína a través de su actividad enzimática mediante la adición de arginina, un sustrato oxidable por la iNOS que resulta en la formación de citrulina y NO como productos finales de la reacción. Este sistema en particular utiliza un derivado permeable a la membrana celular denominado diamino-fluoresceína 2-diacetato (DAF-2 DA) que al reaccionar con el NO generado como resultado de la actividad enzimática de la iNOS, produce una forma fluorescente denominada triazolofluoresceína.

Para lograr esto, $2,5 \times 10^4$ cel/mL fueron cultivados en microplacas de 96 pozos con 0,1 y 1 $\mu\text{g/mL}$ de OMVs durante 3, 6, 12 y 24 horas. Al finalizar cada periodo de interacción, el medio de cultivo fue retirado y 200 μL del mix de reacción detallado en la tabla 11 se adicionó a cada pozo. Las células se mantuvieron a temperatura ambiente durante dos horas y finalmente la placa fue leída a una longitud de onda de excitación/emisión de 485/535 en un fluorómetro Twinkle LB970 (*Berthold Technologies*) gentilmente facilitado por la Pontificia Universidad Javeriana, Sede Bogotá.

Tabla 12. Mix de reacción para el ensayo FCANOS

Ensayo Fluorimetría		Control de Inhibición	
Reactivo	Volumen μL 1X	Reactivo	Volumen μL 1X
Buffer de reacción	190	Buffer de reacción	189,9
Arginina	10	Arginina	10
DAF-2 DA	0,1	DAF-2 DA	0,1
Volumen Final	200,1	DPI 1mM	0,1
		Volumen Final	200,1

DAF-2-DA. Diamino fluoresceína di-acetato. **DPI.** Diphenyleneiodonium chloride.

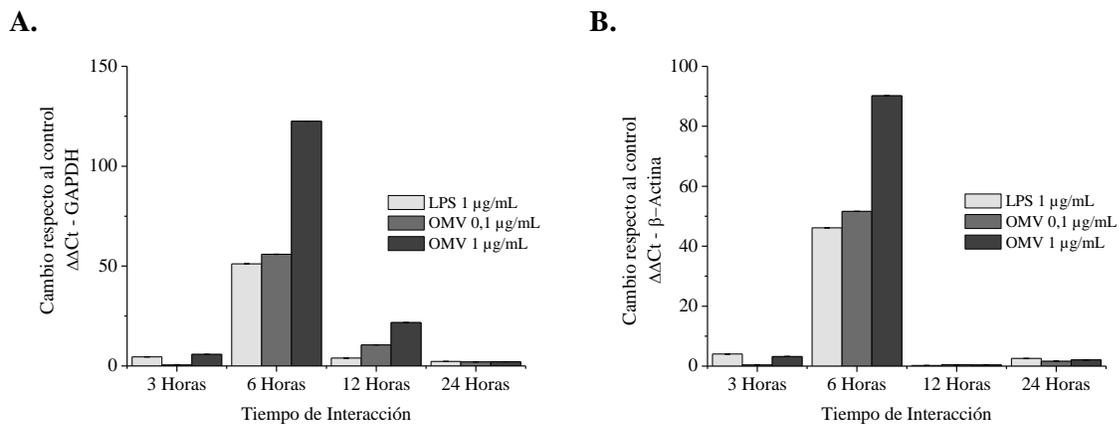
4.1.4 Determinación de nitritos por Griess. Para la cuantificación de nitritos (NO_2^-) se utilizó la metodología colorimétrica de Griess (Bryan & Grisham, 2007.). Aunque inicialmente se determinó que la fase de crecimiento exponencial de las células era $2,5 \times 10^4$ cel/mL, los primeros ensayos no permitieron detectar valores de nitritos cuantificables por el método de Griess en macrófagos estimulados con LPS como control positivo, fenómeno que podría ser explicado, al menos en parte, por la baja sensibilidad del método utilizado ($0,5\text{-}65 \mu\text{M}$). Por este motivo, fue necesario ajustar el número de células requerido para los ensayos de detección de nitritos sin comprometer la fase exponencial previamente establecida para lo cual se realizaron experimentos células-respuesta y se estableció que 5×10^4 cel/mL eran suficientes para la determinación de nitritos por la metodología propuesta (Anexo G). De ésta manera, 5×10^4 cel/mL fueron servidas en microplacas de 96 pozos e incubadas con $0,1$ y $1 \mu\text{g/mL}$ de OMVs durante 3, 6, 12 y 24 horas, tiempo en el cual $100 \mu\text{L}$ del sobrenadante se transfirieron a una microplaca nueva y se mezclaron con $100 \mu\text{L}$ del reactivo de Griess (*Sigma*®) que al reaccionar con los nitritos presentes en el medio genera un derivado azoico coloreado que puede ser detectado por espectrofotometría utilizando una longitud de onda de 562 nm en un lector de microplacas ELX800 (*Biotek*). La concentración de nitritos fue calculada a partir de la extrapolación de los datos de absorbancia a una curva estándar realizada con concentraciones entre 100 y $1,5 \mu\text{M}$ de nitrito de sodio (*Sigma*®) (Anexo H).

4.1.5 Análisis de datos. Todos los datos fueron analizados y graficados según la metodología descrita en el ítem 2.1.6.

4.2 Resultados

4.2.1 OMVs de *E. coli* JC8031 favorecen la transcripción, traducción y actividad enzimática de la iNOS en macrófagos J774A.1. Los análisis de expresión génica luego de la normalización frente al gen de referencia GAPDH mostraron que la iNOS alcanza sus mayores niveles de transcripción luego de 6 horas de interacción con 0,1 $\mu\text{g/mL}$ OMVs de *E. coli* JC8031 ($55,9 \text{ veces} \pm 0,08, n=2$), respecto al control de macrófagos no tratados, similar a lo observado con 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS. Estos resultados mostraron dosis-dependencia y en este sentido el uso de 1 $\mu\text{g/mL}$ de OMVs promovió una mayor transcripción del gen ($122,5 \text{ veces} \pm 0,03, n=2$) (Figura 14A). Los datos fueron consistentes con la normalización frente al gen de referencia β -Actina, donde se observó el mismo comportamiento en los niveles de expresión del gen, con una tendencia dosis-respuesta similar a lo observado con GAPDH (Figura 14B). Por otro lado, 12 horas post-interacción se evidenciaron menores niveles de transcripción, los cuales fueron similares a los encontrados luego de 24 horas de incubación.

Figura 14. Niveles de expresión génica de la iNOS



Se muestran los niveles de expresión del gen que codifica para la iNOS, luego de normalizar los datos frente a los genes de referencia GAPDH (A) y β -Actina (B). Los datos muestran el número de veces que se expresó el gen luego de compararlos con los niveles de expresión de macrófagos no tratados con OMVs o LPS, para los cuales la expresión basal del gen fue asumida como 1. Los resultados corresponden a dos experimentos independientes \pm ES.

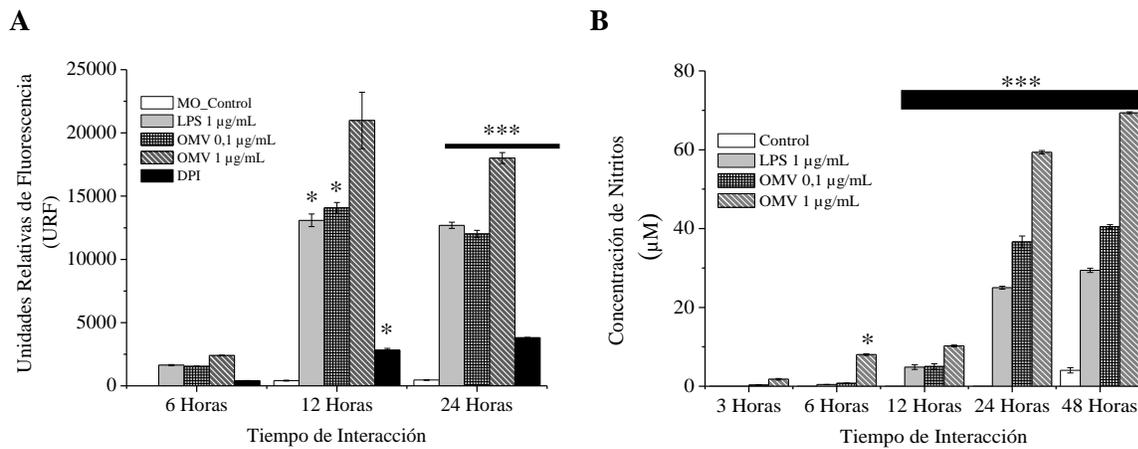
Para determinar la presencia de la enzima iNOS, como producto de la traducción del transcrito previamente observado, se llevó a cabo un ensayo de detección fluorométrica como se describe en el ítem 4.1.3. Como se esperaba, los ensayos de fluorimetría mostraron mayores unidades relativas de fluorescencia luego de 12 horas de incubación con 0,1 µg/mL OMVs (14,077 URF ± 427,5, $p = 0,01923$, $n = 4$) o 1 µg/mL LPS (13,085 URF ± 500, $p = 0,02452$, $n = 4$), respecto al control no tratado (412 URF ± 32,5, $n = 4$) y que podrían corresponder a la traducción de ARN mensajero observado a las 6 horas (Figura 14A y B). Así como se observó para los niveles de expresión génica, la incubación con 1 µg/mL OMVs mostró mayores niveles de fluorescencia (20,987 URF ± 2,275; $p = 0,0686$, $n = 4$) que el tratamiento con 0,1 µg/mL OMVs. Por otro lado, para el grupo experimental incubado durante 24 horas se observó una disminución en las unidades relativas de fluorescencia luego de la interacción de los macrófagos con 0,1 µg/mL OMVs (12,015 URF ± 275,1; $p = <0,001$, $n = 4$), 1 µg/mL OMVs (18,007 ± 432,4; $p = <0,001$, $n = 4$) y 1 µg/mL de LPS (12,696 URF ± 245,6; $p = <0,001$, $n = 4$), los cuales fueron estadísticamente significativos al compararse con el control de macrófago no tratados (458,74 URF ± 21,9, $n = 4$) (Figura 15A).

Dado que en el contexto de la iNOS, la funcionalidad de la enzima está determinada por su capacidad de catalizar la oxidación de L-Arginina a citrulina y NO, el cual es rápidamente reducido a especies menos tóxicas para la célula como nitrito y nitrato (Bogdan, 2015), en este trabajo fue evaluado adicionalmente al transcrito por qPCR y la detección de la proteína por fluorimetría; el producto de su actividad enzimática mediante la reacción colorimétrica de Griess, la cual detecta la presencia de nitritos en sobrenadante (Bryan & Grisham, 2007).

La concentración de nitritos fue detectada a partir de las 6 horas de interacción con 1 µg/mL OMVs (8,1 µM ± 0,22; $p = 0,00983$, $n = 6$), con un comportamiento tiempo y dosis dependiente. Así mismo, la mayor concentración de nitritos fue observada en macrófagos estimulados durante 48 horas para los grupos experimentales de 1 µg/mL LPS (29,4 µM ± 0,53; $p = <0,001$, $n = 6$), 0,1 µg/mL OMVs (40,5 µM ± 0,51; $p = <0,001$, $n = 6$)

y 1 $\mu\text{g/mL}$ OMVs ($69,4 \mu\text{M} \pm 0,25$; $p = <0,001$, $n = 6$), mientras que para células no tratadas la concentración fue $4,1 \mu\text{M} \pm 0,67$ ($n = 6$) para el mismo tiempo (Figura 15B).

Figura 15. Detección y actividad enzimática de la iNOS



Se muestra el promedio \pm ES de 4 ensayos realizados por fluorimetría para la detección de la iNOS (A); así como el promedio \pm ES de 6 ensayos realizados para la cuantificación de nitritos por el método de Griess (B). * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$. **DPI:** Diphenyleneiodonium Chloride, inhibidor de la actividad enzimática de la iNOS.

5. Capítulo 5. *Discusión*

A pesar de que las enfermedades de origen infectocontagioso constituyen la tercera causa de muerte a nivel mundial, en la actualidad el tratamiento y las alternativas de inmunización no son satisfactorias, por lo que la búsqueda de nuevas y mejores estrategias se hace indispensable (Nabel, 2013; WHO, 2016).

En este contexto, el uso de plataformas altamente inmunogénicas y con escasa toxicidad diseñadas a escala nanométrica como las OMVs aisladas de bacterias Gram-negativas, cobran particular interés gracias a la presencia de reconocidos inmunógenos capaces de activar el sistema inmune al ser reconocidas de una manera similar a lo que ocurriría en el proceso infeccioso normal, su relativa facilidad de obtención cuando se usan cepas hipervesiculantes, así como la incapacidad de auto-replicación de estas nanoestructuras biológicas (Rosenthal *et al.*, 2014). A pesar de esto, la utilización de OMVs supone un reto adicional en términos de seguridad debido al alto contenido de LPS y la presencia de factores de virulencia que han sido previamente asociados con el desarrollo de diversas entidades clínicas como la gastritis (Parker *et al.*, 2010).

Por este motivo y como parte de la caracterización inicial de estas vesículas como futuros adyuvantes más seguros que las tradicionales sales de aluminio, en este trabajo se buscó determinar si existía compromiso de la viabilidad celular de macrófagos murinos J774A.1 durante la internalización de OMVs derivadas de una especie no patógena e hipervesiculante de *E. coli* denominada JC8031.

En este sentido, ensayos de epifluorescencia con OMVs-DiO y reducción de la capacitancia de membrana sugieren que 0,1 $\mu\text{g/mL}$ OMVs de *E. coli* JC8031 son internalizadas de una manera tiempo dependiente (Fig. 4 y 9) en macrófagos murinos J774A.1, sin comprometer su viabilidad celular (Fig. 5 y 6). Consistente con estos hallazgos, recientemente se ha mostrado que OMVs derivadas de cepas no patógenas de *E. coli* como Nissle 1917, ECOR12 y DH5 α son endocitadas sin afectar la viabilidad de células HT29 y Caco-2 (Tyrer *et al.*, 2014; Cañas *et al.*, 2016), sugiriendo que la ausencia de factores de virulencia en vesículas aisladas de bacterias no patógenas favorecen la supervivencia de la célula hospedera y suponen una estrategia segura para el desarrollo de alternativas de inmunización basadas en estas plataformas. A pesar de esto, hallazgos similares en términos de viabilidad han sido reportados para patotipos conocidos de *E. coli* como el adherente-invasivo LF82 y el serotipo enterohemorrágico O157:H7 (Tyrer *et al.*, 2014), para las cuales se describen importantes factores de virulencia que contribuyen a la colonización/invasión de la bacteria como HtrA y DsbA en LF82 y la Toxina Shiga en O157:H7 (Kim *et al.*, 2010; Martínez & García, 2014).

Lo anterior pone en manifiesto que la sola medida de viabilidad celular no es suficiente para determinar la seguridad de las OMVs y hace imperiosa la caracterización rigurosa de estas nanovesículas antes de su uso en modelos animales y evidentemente en humanos. Bajo esta premisa, reportes previos muestran que OMVs de cepas no patógenas de *E. coli* inducen reducción en los niveles de glutatión, formación de aductos de 8-Oxo-2'deoxiguanosina, fragmentación de ADN, arresto del ciclo celular en fase G2, así como la sobre-expresión, reclutamiento y fosforilación de la histona 2A en enterocitos humanos, sugiriendo que estas vesículas inducen genotoxicidad por la generación no controlada de especies reactivas de oxígeno (Tyrer *et al.*, 2014; Cañas *et al.*, 2016). Estos hallazgos son particularmente importantes, porque además de registrar daños sobre el ADN se reporta que la viabilidad celular no se compromete después de largos periodos de incubación (Hasta 7 días), lo que podría traducirse en una acumulación de mutaciones.

A pesar de no haber llevado a cabo ensayos que permitan descartar o confirmar el efecto genotóxico de OMVs de *E. coli* JC8031 en macrófagos J774A.1, en este estudio se utilizaron concentraciones de vesículas considerablemente menores que las reportadas por otros autores (5 $\mu\text{g/mL}$ vs 0,6 $\mu\text{g/mL}$ de proteína que corresponde a 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de TAG; según Buitrago, 2017 en comunicación personal), lo que permite especular un menor efecto en el contexto de la endocitosis de estas vesículas por parte del macrófago, aunque esta hipótesis debe ser objeto de investigaciones futuras.

Dado que las propiedades eléctricas dan información importante sobre estados funcionales específicos particularmente en células no excitables como los macrófagos, durante esta investigación se determinó si la internalización de OMVs de *E. coli* JC8031 promovía cambios en estas propiedades que se correlacionaran con activación celular. En este sentido, durante las primeras 6 horas de interacción se observó la mayor expresión de la iNOS (Fig. 14), evento que fue consistente con la detección de la proteína por fluorometría a las 12 horas y el producto de su actividad enzimática 24 y 48 horas más tarde (Fig. 15). Este comportamiento estuvo acompañado por una reducción en la amplitud de las corrientes de salida totales en pulsos de +40 mV luego de 12 horas de interacción con 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de OMVs y que fueron sensibles a caribdotoxina 100 nM, sugiriendo la participación de canales BK en la activación clásica del macrófago como previamente ha sido observado para estas células (Papavlassopoulos *et al.*, 2006, Scheel *et al.*, 2006); aunque existe evidencia en la que macrófagos derivados de médula ósea de ratones deficientes para BK (*BK*^{-/-}) no compromete la liberación de mediadores proinflamatorios como TNF- α , ni las actividades oxidativas dependientes de NADPH luego de la estimulación con LPS (Essin *et al.*, 2009).

Para evaluar esta premisa en el contexto de la activación clásica inducida por OMVs de *E. coli* JC8031, fueron medidos los niveles de expresión relativa de canales BK por qPCR. En este sentido, se encontró sobreexpresión de estos canales luego de 6 y 12 horas de interacción (Fig. 12), soportando la evidencia encontrada en los registros electrofisiológicos, al menos para las primeras 12 horas (Fig. 10). Aunque en conjunto

estos resultados son consistentes, es importante considerar que la probabilidad de apertura del canal está dada por incremento en los niveles de calcio intracelular, así como despolarización de la membrana plasmática (Pardo, 2012; Latorre *et al.*, 2016) e incluso reportes previos sugieren que el canal podría ser funcional en ausencia de calcio postulándolo como un canal únicamente voltaje dependiente (Cui *et al.*, 1997).

Con base en lo anterior y a pesar de la sobreexpresión vista para canales BK en los ensayos de qPCR, los registros electrofisiológicos para potencial de reposo no mostraron despolarización de la membrana plasmática que permitieran encontrar un correlato funcional con los niveles de transcripción descritos en este trabajo, por lo que sería viable suponer la existencia de niveles de regulación pre y postraduccional que podrían comprometer la traducción, transporte y/o función del canal en la membrana plasmática durante la interacción del macrófago con OMVs de *E. coli* JC8031 (Kyle & Braun, 2014).

Ante este panorama, se ha descrito que algunas especies reactivas como el peróxido de hidrógeno, el anión superóxido y los reactivos intermediarios de nitrógeno como el NO, pueden regular la actividad del canal a través de la oxidación de la cisteína 911 la cual se ubica en la región de unión a calcio presente en el dominio citoplasmático (Tang *et al.*, 2004) y que durante la activación clásica del macrófago son generados para promover su actividad microbicida (Gordon, 2016; Pauwels *et al.*, 2017). Dado que durante este trabajo se observaron concentraciones de nitritos (medida indirecta de NO) durante el periodo 12 a 48 horas es viable sugerir, al menos en parte, que la sobreexpresión del canal observada luego de 6 y 12 horas (Fig. 12) es el resultado del cense por parte de la célula de una proteína no funcional que debe ser direccionada al sistema ubiquitin-proteosoma para su degradación y la necesidad de reemplazarla con el fin de no comprometer la viabilidad del macrófago (Kyle & Braun, 2014).

En otro escenario, se ha sugerido que en vista del compromiso que sufre la membrana celular durante la endocitosis como el observado durante las primeras 6 horas de interacción en los registros de capacitancia de membrana (Fig. 9), podría haber

internalización de canales iónicos asociados a regiones específicas de la bicapa lipídica como rafts, clatrininas o caveolinas (Lamb *et al.*, 2009). Bajo este contexto, sería razonable especular que la endocitosis de las vesículas podría comprometer la presencia de canales BK en la membrana citoplasmática, sin embargo, a la fecha ensayos de co-inmunoprecipitación sugieren que estas proteínas se encuentran asociadas a regiones ricas en caveolina pero no en clatrina (Toro *et al.*, 2014), vía por la cual según Buitrago, 2017, son internalizadas las OMVs de *E. coli* JC8031 y que resulta consistente con el tamaño de estas vesículas, así como la presencia de TLRs en estas zonas de la membrana celular (Husebye *et al.*, 2006; McGettrick & O'Neill, 2010).

Bajo esta línea y dado que tanto la endocitosis mediada por receptor, así como algunas actividades fisiológicas del macrófago implican oscilaciones de Ca^{2+} intracelular (Andersen & Moestrup, 2014; Liu *et al.*, 2016) durante esta investigación se determinaron los niveles de transcripción del canal iónico de conductancia intermedia KCa 3.1, el cual contrario a los canales BK, requiere solamente incremento en los niveles de calcio intracelular para su apertura, generando hiperpolarización de la membrana plasmática como consecuencia del eflujo de potasio (Pardo, 2012; Penna & Stutzin 2015). En este trabajo, los ensayos de expresión génica mostraron que KCa 3.1 fue sobreexpresado durante las primeras 6 horas y regulado a la baja luego de 12 horas de interacción (Fig. 12), evento que podría ser consistente con los porcentajes de bloqueo encontrado en registros electrofisiológicos realizados en presencia de Caribdotoxina (Fig. 10), toxina a la cual estos canales resultan sensibles (Wulff, 2010). Aunque no existen reportes conocidos sobre la participación de estos canales en la activación clásica de macrófagos, en microglía se ha descrito que KCa 3.1 contribuye a la transcripción y traducción de la iNOS al parecer por una vía dependiente de p38 MAPK (Kaushal *et al.*, 2007).

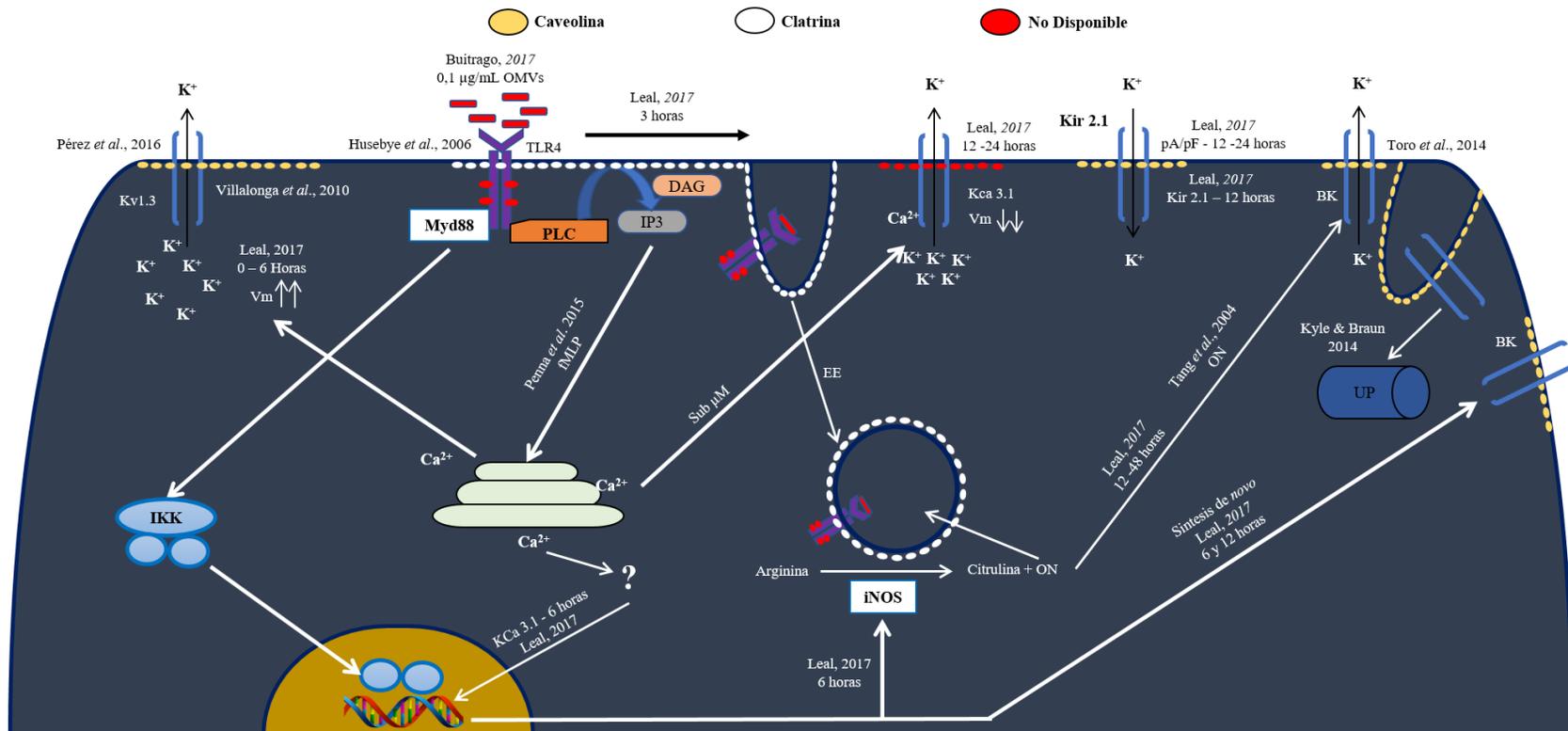
Sumado a lo anterior y aunque no fue cuantificada la concentración intracelular de calcio, los ensayos de expresión génica para KCa 3.1, así como la sensibilidad a Caribdotoxina sugieren la participación de Ca^{2+} durante la endocitosis de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ OMVs de *E. coli* JC8031. En este contexto, Chiang *et al.*, 2012 mostraron que la

endocitosis del complejo LPS/TLR4 en macrófagos Raw 264.7 es parcialmente inhibida cuando las células son pre-incubadas con 2-APB (Aminoethoxydiphenyl borate), un antagonista de receptores IP3, sugiriendo que la endocitosis del complejo es dependiente del incremento en los niveles de este catión, principalmente liberado desde organelos intracelulares como el retículo endoplasmático. Esta evidencia, podría ser similar a lo observado en el contexto de la internalización de OMVs, las cuales como previamente se mencionó, son endocitadas por un mecanismo dependiente de clatrina tal y como se ha reportado para el complejo LPS/TLR4 (Husebye *et al.*, 2006; McGettrick & O'Neill, 2010). De manera similar a lo encontrado en este estudio y lo descrito por Chiang *et al.*, 2012, la hiperpolarización celular mediada por la apertura de canales KCa 3.1 ha sido registrada en macrófagos derivados de monocitos U937 durante la estimulación con formyl-Met-Leu-Phe, un péptido producido por *E. coli*, como consecuencia de un incremento en los niveles de calcio intracelular aunque en periodos más tempranos (≈ 15 minutos) que los evaluados en esta investigación y que también han sido atribuidos a liberación desde retículo endoplasmático (Penna *et al.* 2015).

Por otro lado, Nguyen *et al.*, 2017 encontraron que tras la estimulación con LPS, microglías (macrófagos del sistema nervioso) derivadas de ratones C57BL/6 elicitan corrientes de salida sensibles a PAP-1 y TRAM-34, bloqueadores de canales Kv 1.3 y KCa 3.1, respectivamente, sugiriendo la participación de estos canales en la activación clásica de macrófagos, mientras que la incubación de estas células en presencia de IL-4 generó un incremento en la densidad de corriente de entrada de estas células sensibles a Ba²⁺ junto con la sobreexpresión de canales Kir 2.1. Pese a que el modelo celular reportado por Nguyen *et al* difiere al utilizado en la presente investigación, los hallazgos tanto biofísicos como moleculares resultan consistentes, por lo que sería viable suponer que OMVs derivadas de *E. coli* JC8031 promueven un balance en la respuesta inmune polarizando el macrófago hacia un fenotipo M1 durante las primeras 6 horas de interacción, y posteriormente hacia M2 que supondrían un interesante efecto dual sobre el control de patógenos intracelulares.

Aunque durante esta investigación no fueron determinados algunos mediadores proinflamatorios como IL-4 que permitan confirmar la hipótesis planteada previamente, estudios recientes muestran que las OMVs promueven respuestas inmunológicas de tipo Th1 y Th2, sugiriendo que células como el macrófago podrían ser polarizadas hacia fenotipos M1 y M2 en una manera tiempo-dependiente, contribuyendo con la activación de la respuesta inmune adaptativa celular y humoral observada en modelos *in vivo* (Fantappie *et al.*, 2014; Mitra *et al.*, 2015). En este contexto y considerando la compleja composición bioquímica de las OMVs, es viable suponer que la interacción ligando-receptor no debe estar restringida a la tradicional dualidad LPS-TLR4; supuesto que ha sido confirmado previamente por Alaniz *et al.*, 2007 para OMVs de *S. typhimurium* y células dendríticas deficientes de TLR4, en las cuales se observaron niveles altos de IL-12 sugiriendo la participación de otras interacciones como la dada entre flagelina y TLR5. Así mismo, estudios recientes realizados por Mitra *et al.*, 2015 muestran que OMVs provenientes de *Shigella spp* además de promover la transcripción de la iNOS, como también se describe para *S. typhimurium* y *P. gingivalis*, incrementan la producción de IL-4 en macrófagos murinos cocultivados con linfocitos TCD4+, soportando la hipótesis de la actividad inmunomoduladora de las vesículas hacia ambos fenotipos en el macrófago (Clásico y Alternativo) y que explicarían el balance entre las respuestas Th1 y Th2 reportado en modelos murinos (Alaniz *et al.*, 2007; Imayoshi *et al.*, 2011; Kaparakis & Ferrero, 2015).

En conclusión, este trabajo muestra que la internalización de 0,1 µg/mL de OMVs obtenidas de *E. coli* JC8031 no afecta la viabilidad de macrófagos J774A.1 e induce cambios en las propiedades eléctricas de la membrana plasmática que se correlacionan con la activación clásica de estas células, hallazgos a partir de los cuales fue generado un modelo de interacción detallado en la figura 16. Hasta nuestro conocimiento, este trabajo es el primero que reporta el impacto que tiene la internalización de estas vesículas sobre aspectos claves en la fisiología de los macrófagos como viabilidad celular, permeabilidad iónica y activación celular; los cuales resultan fundamentales en el diseño de nuevas alternativas de inmunización científicamente válidas.

Figura 16. Modelo teórico de la interacción MO_OMV

Modelo. En eventos tempranos (<6 horas) tienen lugar la interacción de diversos PAMPs presentes en las OMVs como LPS y/o flagelina con sus respectivos receptores tipo TLRs, los cuales se encuentran anclados a regiones de la membrana ricas en clatrina (Husebye *et al.*, 2006). Esta interacción permite la dimerización y transfosforilación del respectivo TLR así como la transducción de vías de señalización como Myd88 para favorecer la transcripción de la iNOS (Leal, 2017). Dado que la fosforilación de TLRs puede promover el reclutamiento de la fosfolipasa C, tendría lugar la liberación de segundos mensajeros como IP3 (Penna *et al.*, 2015) el cual viajaría hasta los receptores para IP3 ubicados en el retículo endoplasmático donde sería liberado Ca²⁺ hacia el citoplasma generando despolarización celular y la subsecuente apertura de canales iónicos dependientes de voltaje como Kv 1.3 (Villalonga *et al.*, 2010). En el transcurso de las primeras 6 horas tendría lugar el inicio de la transcripción de la iNOS proceso en el cual se ha descrito la participación de canales KCa 3.1 (Kaushal *et al.*, 2007) quienes a su vez podrían estar regulados por el influjo de calcio desde el retículo endoplasmático. Este incremento en concentraciones sub µM de Ca²⁺, promovería la apertura de canales KCa 3.1 presentes en la membrana plasmática permitiendo el eflujo de potasio e induciendo hiperpolarización celular (Leal, 2017) evento que generaría la apertura de canales tipo Kir 2.1 para promover el influjo de potasio y contribuir al restablecimiento del potencial de reposo de los macrófagos. Dada la presencia de NO en el espacio citoplasmático, éste podría contribuir a la oxidación de la cisteína 911 de canales BK (Tang *et al.*, 2004) ubicados en regiones ricas en caveolinas (Toro *et al.*, 2014) y que podrían participar en la regulación de la respuesta inflamatoria, generando la necesidad de retirar esta población de canales de la membrana plasmática (Kyle & Braun, 2014) y favoreciendo la síntesis de novo (Kyle & Braun, 2014).

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

0,1 $\mu\text{g/mL}$ OMVs de *E. coli* JC8031 son internalizadas de una manera tiempo dependiente, sin comprometer la viabilidad celular de macrófagos murinos J774A.1.

Macrófagos estimulados con OMVs de *E. coli* JC8031 elicitan corrientes de salida y entrada similares al control durante las primeras 6 horas de interacción, así como los mayores niveles de sobreexpresión de la iNOS, sugiriendo activación clásica del macrófago.

Durante las primeras 6 horas de internalización, las OMVs de *E. coli* JC8031 indujeron la sobreexpresión de canales de potasio de conductancia intermedia, sensibles a calcio o KCa 3.1, sugiriendo un incremento en las concentraciones de Ca^{2+} intracelular.

Cambios en la densidad de las corrientes de entrada observados durante 12 y 24 horas de interacción, podrían ser la respuesta funcional a la activación alternativa del macrófago.

La producción de intermediarios reactivos de nitrógeno como el NO generados durante la activación clásica del macrófago, podrían contribuir a la oxidación de canales BK y su subsecuente transcripción de *novo*, suponiendo un posible mecanismo de regulación.

6.2 Recomendaciones

Llevar a cabo ensayos que permitan dilucidar si existe genotoxicidad durante la endocitosis de 0,1 µg/mL de OMVs aisladas de *E. coli* JC8031.

Hacer mediciones electrofisiológicas en tiempos de interacción inferiores a las 6 horas, con el objetivo de evaluar si existe despolarización celular de la membrana plasmática que permita soportar la hipótesis del cambio de fenotipo M1 a M2 en el tiempo.

Cuantificar los niveles de calcio intracelular con el fin de confirmar el incremento del catión durante la endocitosis de 0,1 µg/mL de OMVs aisladas de *E. coli* JC8031.

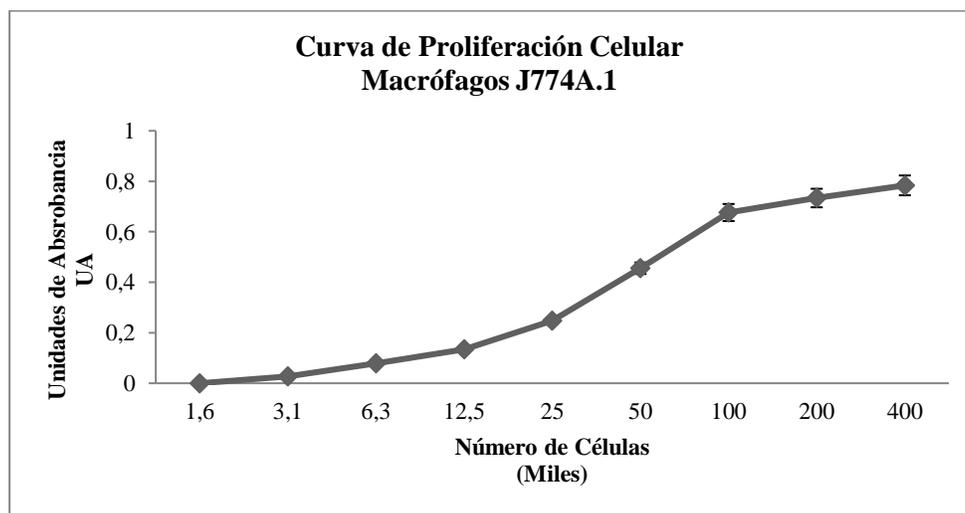
Realizar registros electrofisiológicos en presencia de quelantes de Ca²⁺ como BAPTA o inhibidores como 2-APB, con el fin de determinar la fuente de su influjo al citoplasma, en caso de que existiera.

Cuantificar los niveles de transcrito y proteína de mediadores como IL-4, Arg-1 e IL10 durante el periodo 6 a 24 horas, para determinar si los cambios en las propiedades biofísicas observadas (pA/pF), corresponden a la activación alternativa del macrófago como se sugiere en este trabajo.

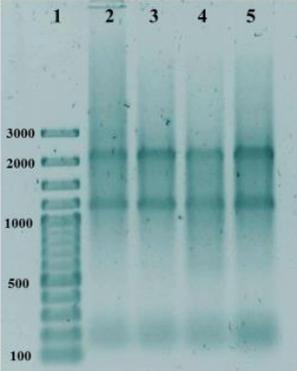
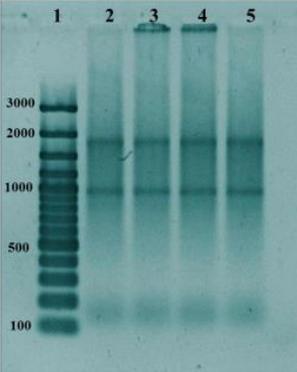
Expresar heterológamente en OMVs de *E. coli* JC8031 antígenos provenientes de patógenos intracelulares como *Leishmania amazonensis* o *Mycobacterium tuberculosis* y evaluar el estado funcional de macrófagos J774A.1 durante la internalización de vesículas cargadas.

Anexo A: Curva de proliferación celular – WST-1

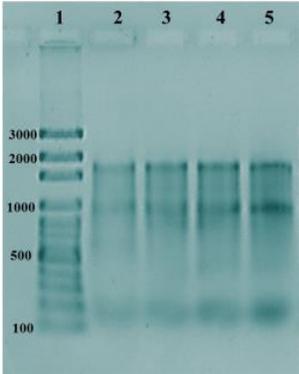
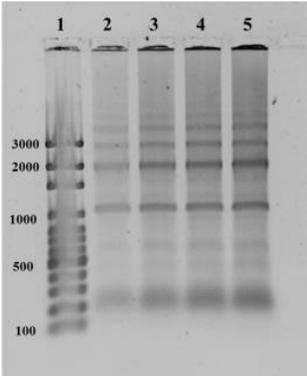
Con el objetivo de determinar la fase de crecimiento exponencial de las células, fue generada una curva de proliferación celular haciendo uso del ensayo colorimétrico WST-1 (*Sigma*) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Brevemente, 100 μL de una suspensión celular 1×10^6 cel/mL fueron servidas en diluciones seriadas desde 1:2 hasta 1:64 en microcaplas de 96 pozos (*CostarTM*) durante 44 horas. Cumplido el tiempo de incubación, 10 μL de WST-1 fueron adicionados a cada pozo y las células fueron reincubadas hasta completar 48 horas. Finalmente, la absorbancia de cada pozo se leyó a una longitud de onda de 450/630nm con ayuda de un lector para microplacas ELX800 (*Biotek*). Los datos obtenidos fueron tabulados en Excel 2010 (*Microsoft Word*) y el punto donde se observó mayor linealidad (25,000 cel/mL) fue establecido como la fase de crecimiento exponencial para el modelo utilizado.



Anexo B: Electroforesis y cuantificación de ARN

Tiempo de interacción	Pozo	Concentración ng/ μ L	Relación 260:280
<p>3 horas</p> 	1. MPM 100bp	NA	NA
	2. MO_Control	780	1,83
	3. MO_LPS	761,4	1,93
	4. MO_OMV 0,1 μ g/mL	453,9	1,9
	5. MO_OMV 1 μ g/mL	829,6	1,9
<p>6 horas</p> 	1. MPM 100bp	NA	NA
	2. MO_Control	1156,5	1,99
	3. MO_LPS	716,7	1,95
	4. MO_OMV 0,1 μ g/mL	649,3	1,88
	5. MO_OMV 1 μ g/mL	818,5	1,88

Anexo B: Continuación...

Tiempo de interacción	Pozo	Concentración ng/ μ L	Relación 260:280
<p style="text-align: center;">12 horas</p> 	1. MPM 100bp	NA	NA
	2. MO_Control	612,3	2.0
	3. MO_LPS	354,3	1,86
	4. MO_OMV 0,1 μ g/mL	758,6	1,88
	5. MO_OMV 1 μ g/mL	659,9	1,88
<p style="text-align: center;">24 horas</p> 	1. MPM 100bp	NA	NA
	2. MO_Control	793,4	1,95
	3. MO_LPS	1003,4	1,90
	4. MO_OMV 0,1 μ g/mL	909	1,92
	5. MO_OMV 1 μ g/mL	893,7	1,89

Anexo C: Diseño bioinformático de los primers usados en qPCR-SYBR® Green

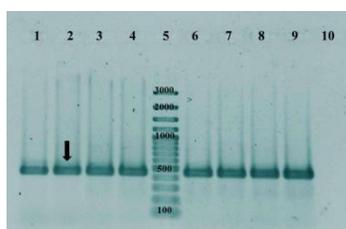
Los primers fueron diseñados a partir de la secuencia de referencia registrada en NCBI para el ARN mensajero de cada gen de interés anotado para *Mus musculus* taxId:10090.

Gen	Access Number		Sequence (5'→3')	PL (bp)	Length	Tm (°C)	GC (%)	SC	S 3' C
H3A	NM_008210.5	Fw	CCGTGAAATCAGACGCTATCAGAAG	450	25	61,74	48.00	4.00	3.00
		Rv	ACACACAAATGAACGTGGAGAAACG		25	62,64	44.00	4.00	2.00
KV1.3	NM_145983.2	Fw	GAAGAGGAAGAAGATGAGCA	360	20	53,99	40.00	3.00	0.00
		Rv	GATCTGGTTCACTTTTGAGC		20	55,87	50.00	4.00	1.00
Kir 2.1	NM_008425.4	Fw	AATACCACCATGAAGACAGC	385	20	55,42	45.00	4.00	2.00
		Rv	GTAAAGTCCATACCCGACAA		20	54,80	45.00	3.00	0.00
KCa 3.1	NM_001163510.1	Fw	CATCCCTGCTCCTGTGTTTTTC	136	21	59,18	52.38	2.00	0.00
		Rv	TTTATCGTGGGGCTTGGTCG		20	60,39	55.00	2.00	2.00
BK	XM_017315887.1	Fw	GGGTCAACATTCCCATCATC	86	20	56,16	50.00	3.00	1.00
		Rv	TGTGTCAGGGTCATCGTCAT		20	58,73	50.00	3.00	2.00

PL. Product Length. **SC.** Self-complementary. **S-3' C.** Self-3' Complementary

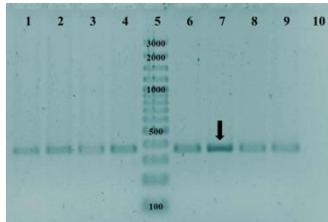
Anexo D: Gradiente de temperaturas para los genes utilizados en qPCR-SYBR® Green

Histona 3 A (H3A) – 450bp



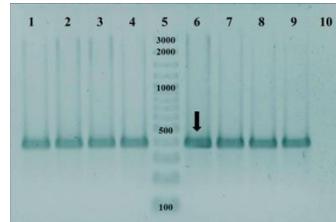
1. 67,8°C. 2. 67,1°C. 3. 65,8°C. 4. 63,4°C. 5. MPM 100bp. 6. 60,5°C. 7. 58,2°C. 8. 56,6°C. 9. 55,6°C. 10. CN.

Kv 1.3 – 360bp



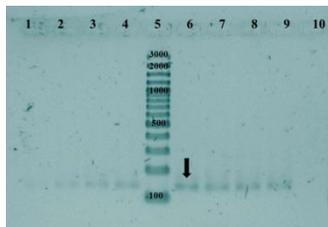
1. 60°C. 2. 59,4°C. 3. 58,3°C. 4. 56,3°C. 5. MPM 100bp.
6. 53,9°C. 7. 52°C. 8. 50,7°C. 9. 50°C. 10. CN.

Kir 2.1 – 385bp



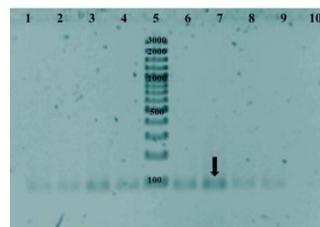
1. 60°C. 2. 59,4°C. 3. 58,3°C. 4. 56,3°C. 5. MPM 100bp.
6. 53,9°C. 7. 52°C. 8. 50,7°C. 9. 50°C. 10. CN.

KCa 3.1 – 136bp



1. 65°C. 2. 64,4°C. 3. 63,2°C. 4. 61°C. 5. MPM 100bp.
6. 58,3°C. 7. 56,2°C. 8. 54,7°C. 9. 54°C. 10. CN.

BK – 86bp



1. 63°C. 2. 62,3°C. 3. 61°C. 4. 58,6°C. 5. MPM 100bp.
6. 55,7°C. 7. 53,4°C. 8. 51,8°C. 9. 51°C. 10. CN.

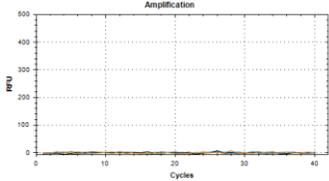
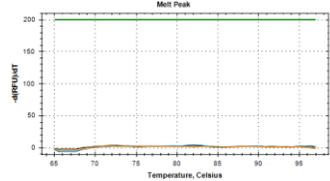
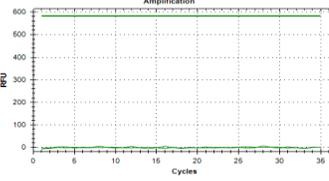
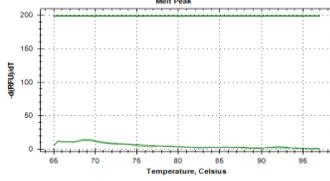
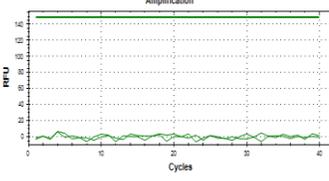
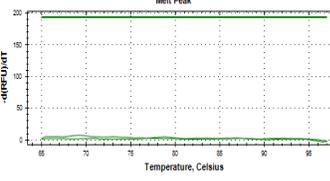
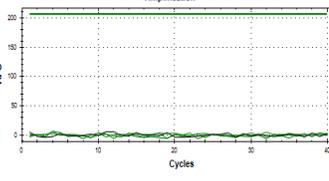
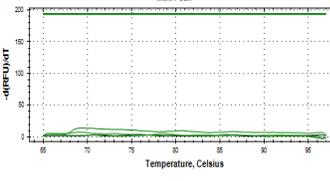
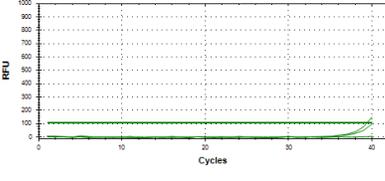
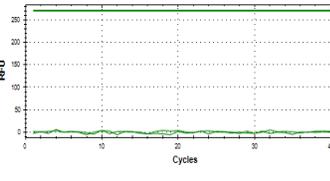
Anexo D: Continuación...

A partir de los gradientes de temperatura realizados, las temperaturas de anillamiento, así como los tiempos de extensión elegidos fueron:

Primer	Longitud del amplicón (bp)	Tm (°C)	Ta (°C)	Tiempo de Extensión* (Seg)
H3A	450	Fw: 61,74 Rw: 62,64	67	18
Kv 1.3	360	Fw: 53,99 Rw: 55,87	52	15
Kir 2.1	385	Fw: 55,42 Rw: 54,80	55	14
KCa 3.1	136	Fw: 59,18 Rw: 60,39	56	6
BK	86	Fw: 56,16 Rw: 58,73	53	3

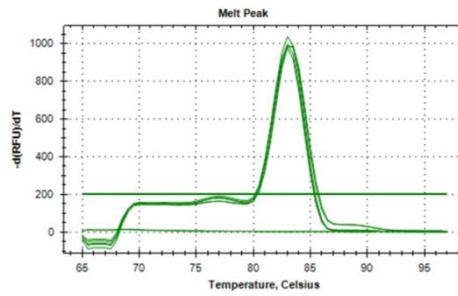
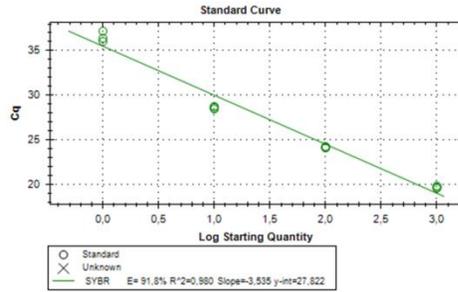
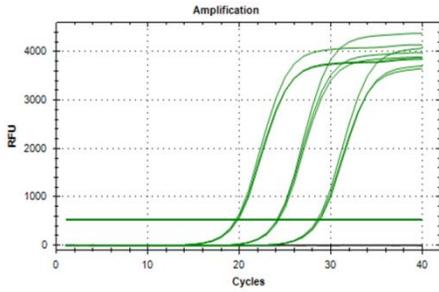
Tm: Temperatura melting. **Ta:** Temperatura de anillamiento seleccionado luego de llevar a cabo los gradientes de temperatura. *El tiempo de extensión está dado por el cociente que existe entre el tamaño del amplicón para cada gen dividido entre 25.

Anexo E: Amplicones y curvas melting de ensayos de qPCR-SYBR® Green

Control Negativo qPCR – RNA sin retrotranscribir		
Gen	Amplímero	Curva Melting
Histona 3		
Kv 1.3		
Kir 2.1		
KCa 3.1		
BK		

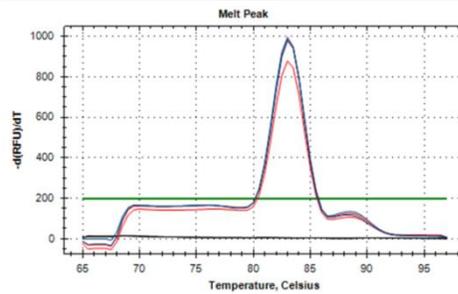
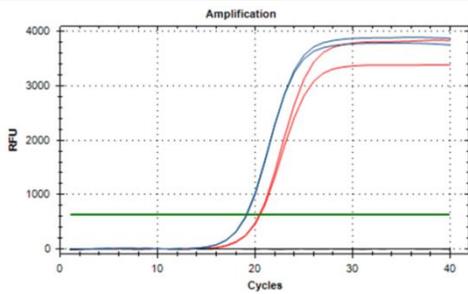
Anexo E: Continuación...

Histona 3 A (H3A)

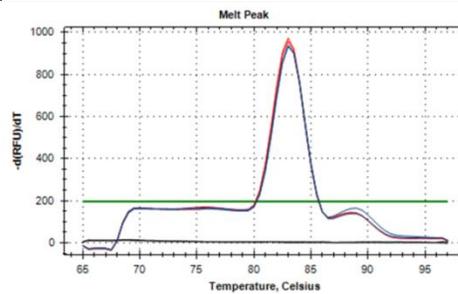
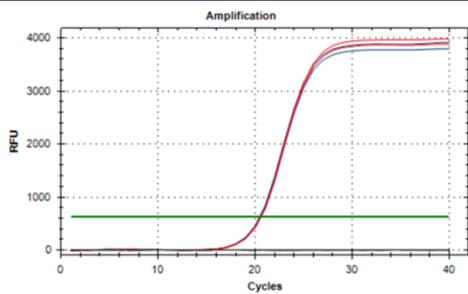


Histona 3 A (H3A)

6 horas



12 horas



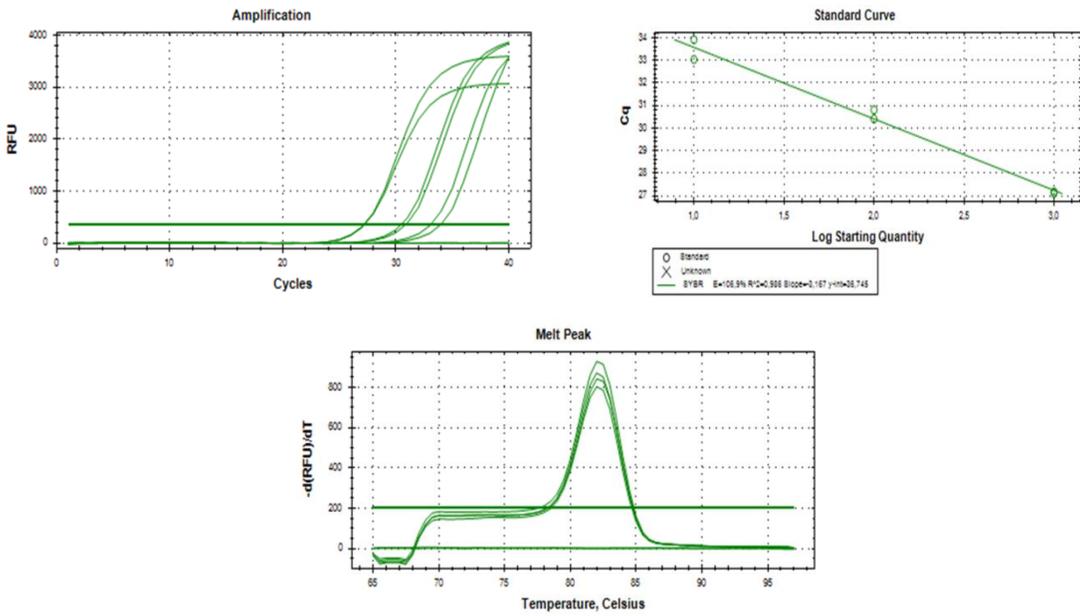
■ MO_Control

■ MO_OMV 0,1 µg/mL

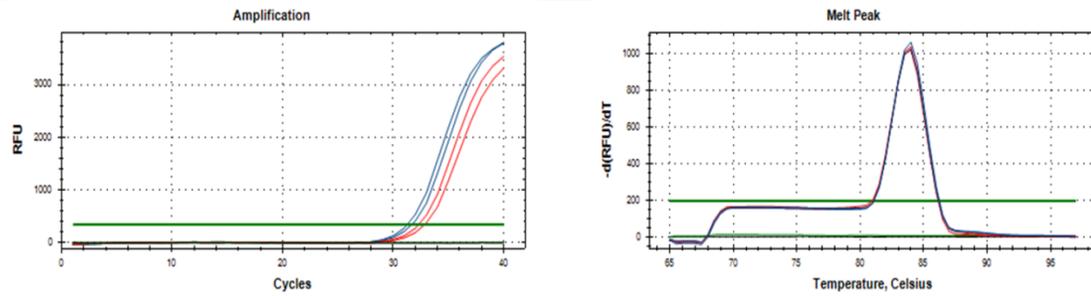
■ Control Negativo qPCR

Anexo E: Continuación...

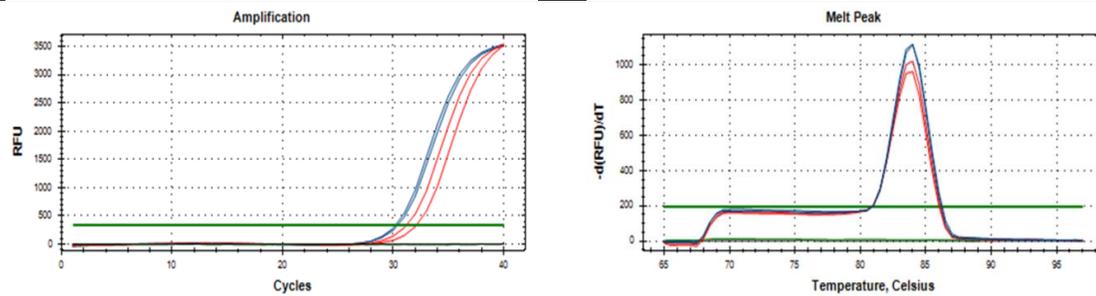
Kv 1.3



6 horas



12 horas



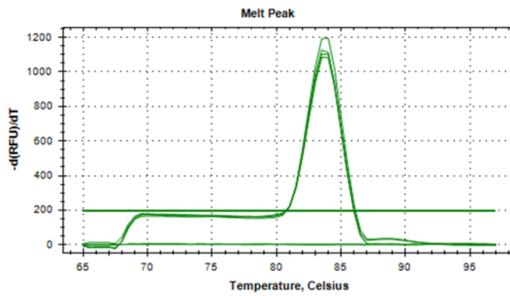
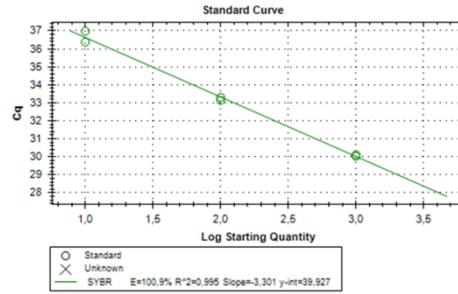
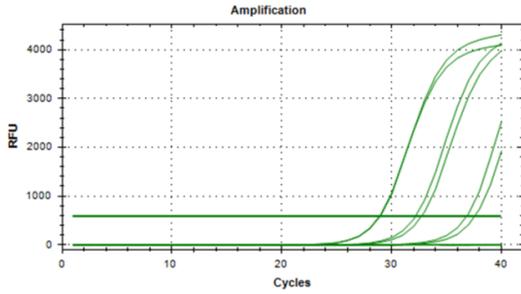
■ MO_Control

■ MO_OMV 0,1 µg/mL

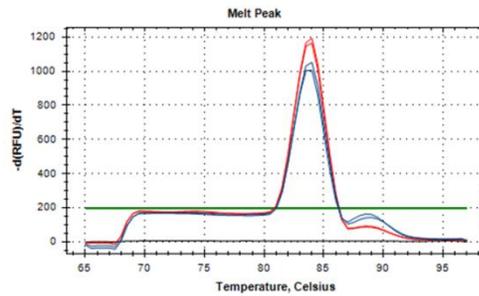
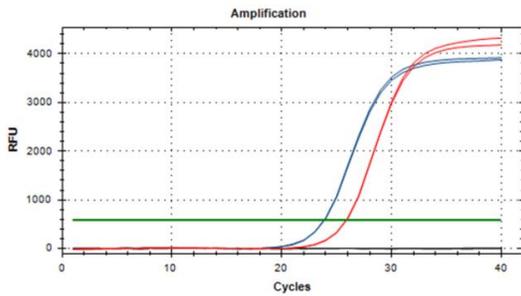
■ Control Negativo Qpcr

Anexo E: Continuación...

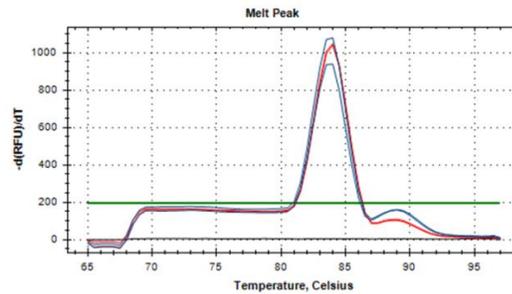
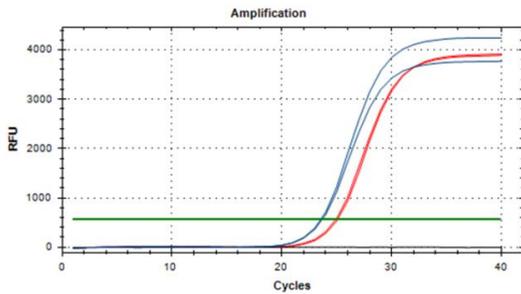
Kir 2.1



6 horas



12 horas



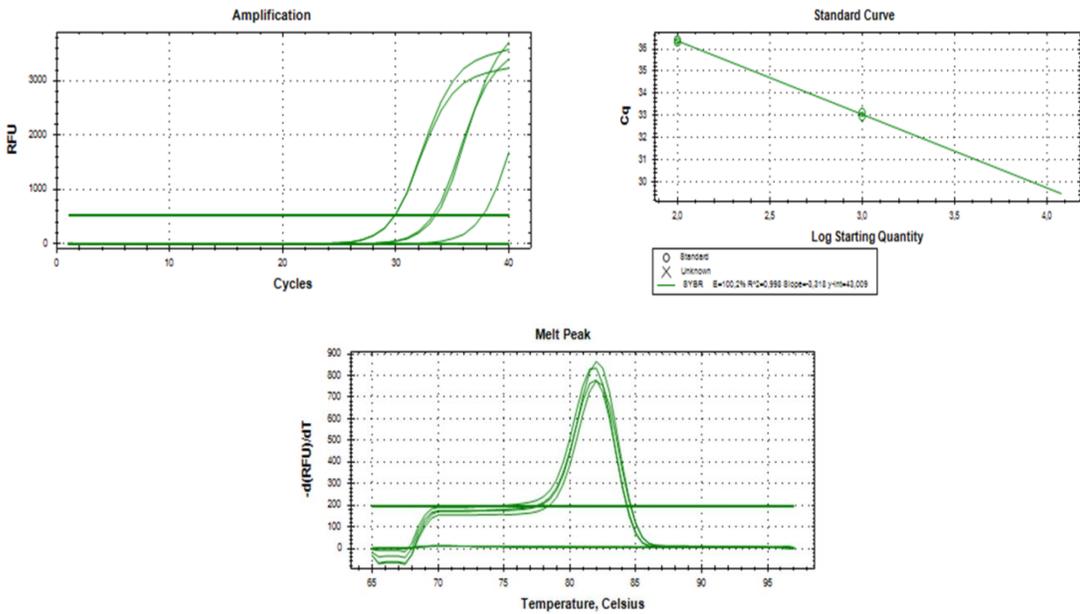
■ MO_Control

■ MO_OMV 0,1 µg/mL

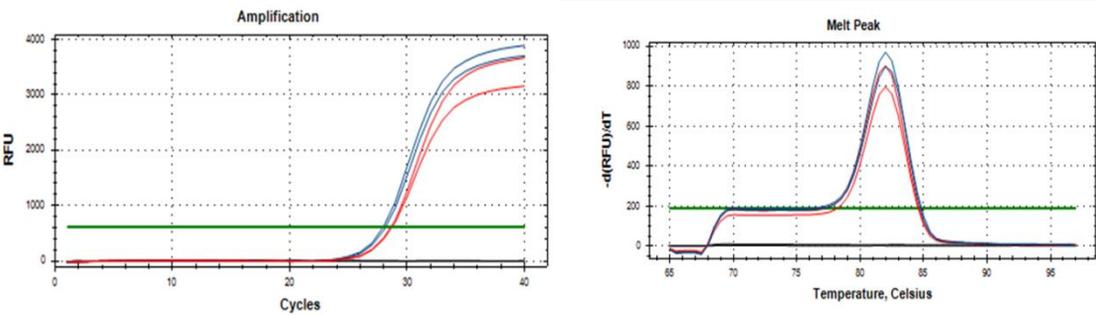
■ Control Negativo qPCR

Anexo E: Continuación...

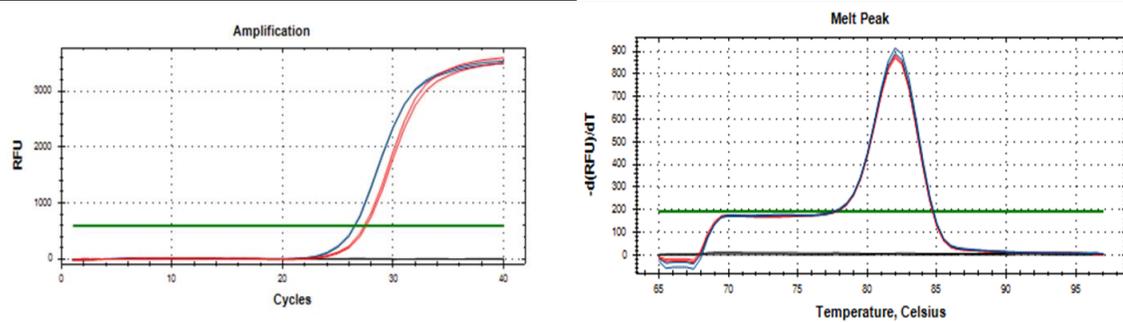
KCa 3.1



6 horas



12 horas



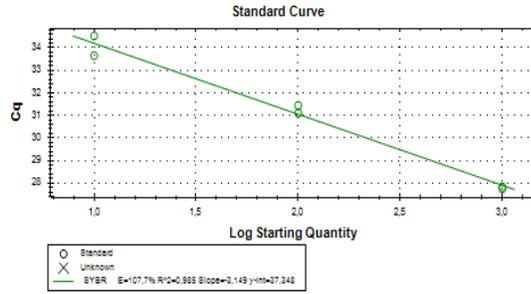
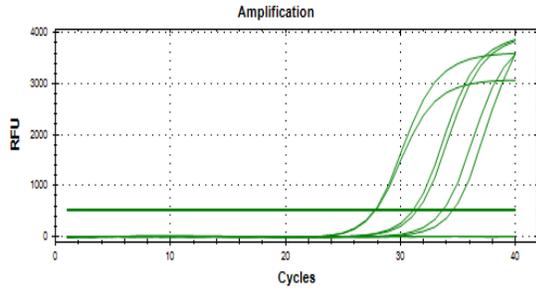
■ MO_Control

■ MO_OMV 0,1 µg/mL

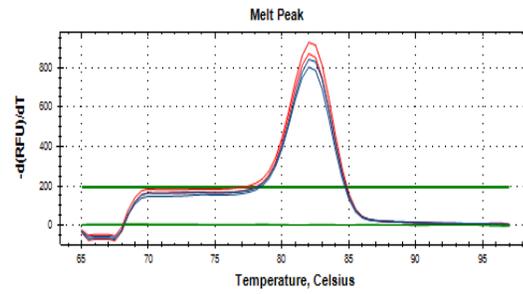
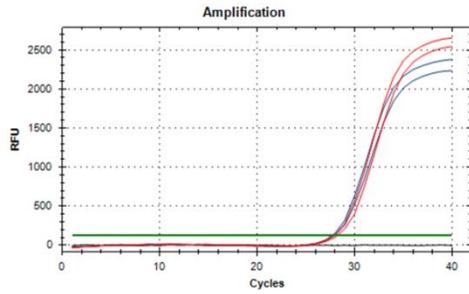
■ Control Negativo qPCR

Anexo E: Continuación...

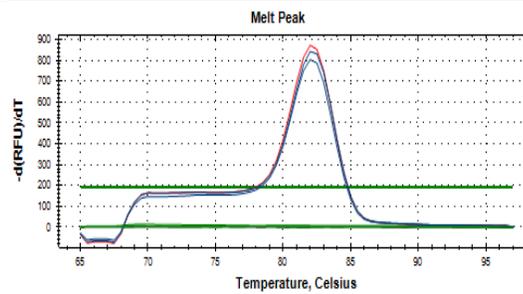
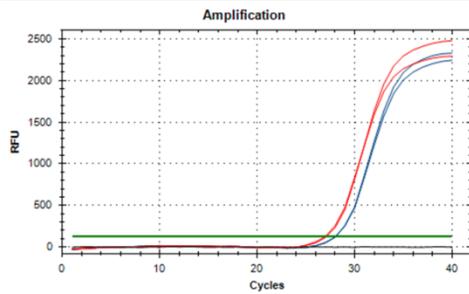
BK



6 horas



12 horas



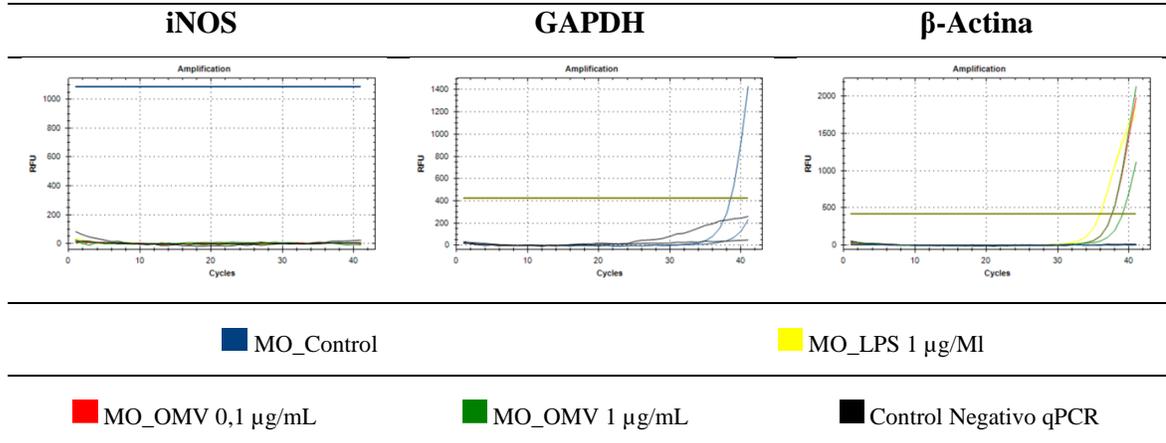
■ MO_Control

■ MO_OMV 0,1 µg/mL

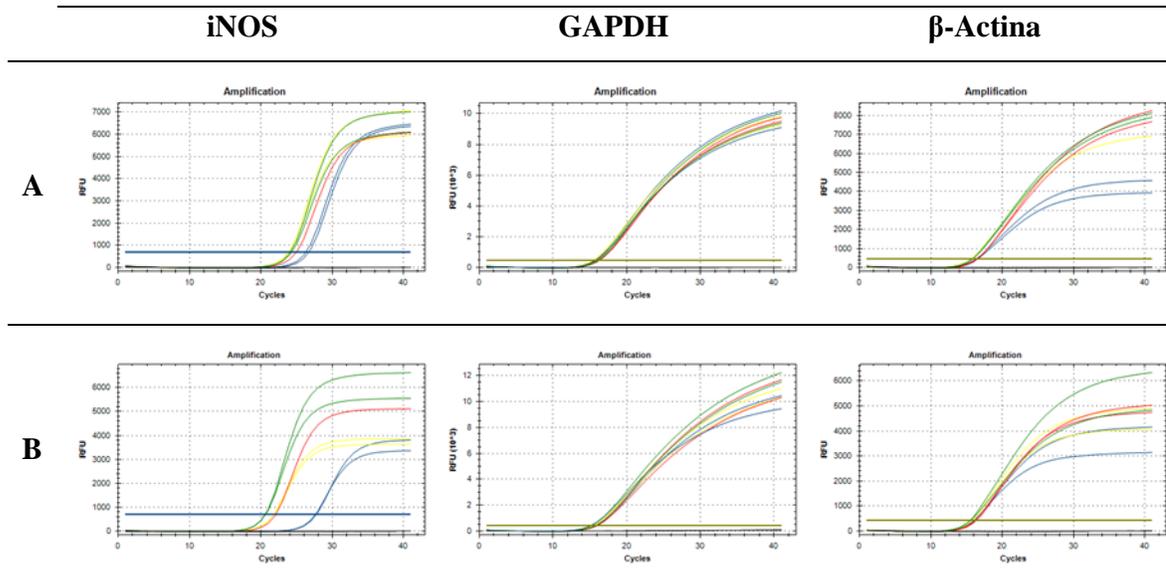
■ Control Negativo qPCR

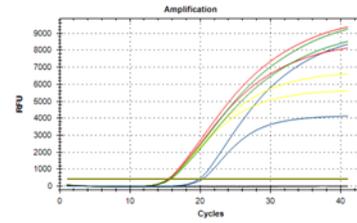
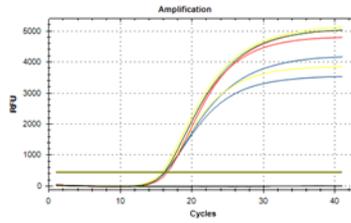
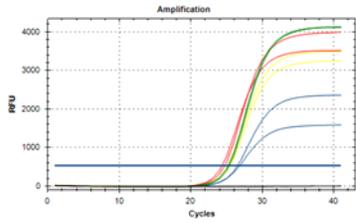
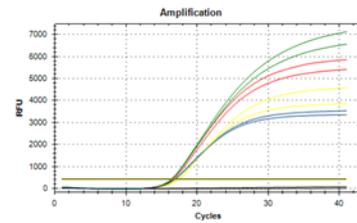
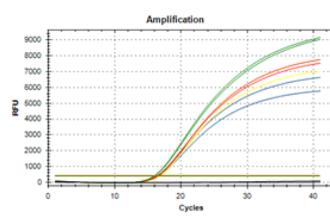
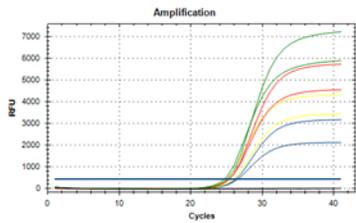
Anexo F: Amplicones de ensayos de qPCR-TaqMan®

Control Negativo qPCR – RNA sin retrotranscribir



Curvas de amplificación



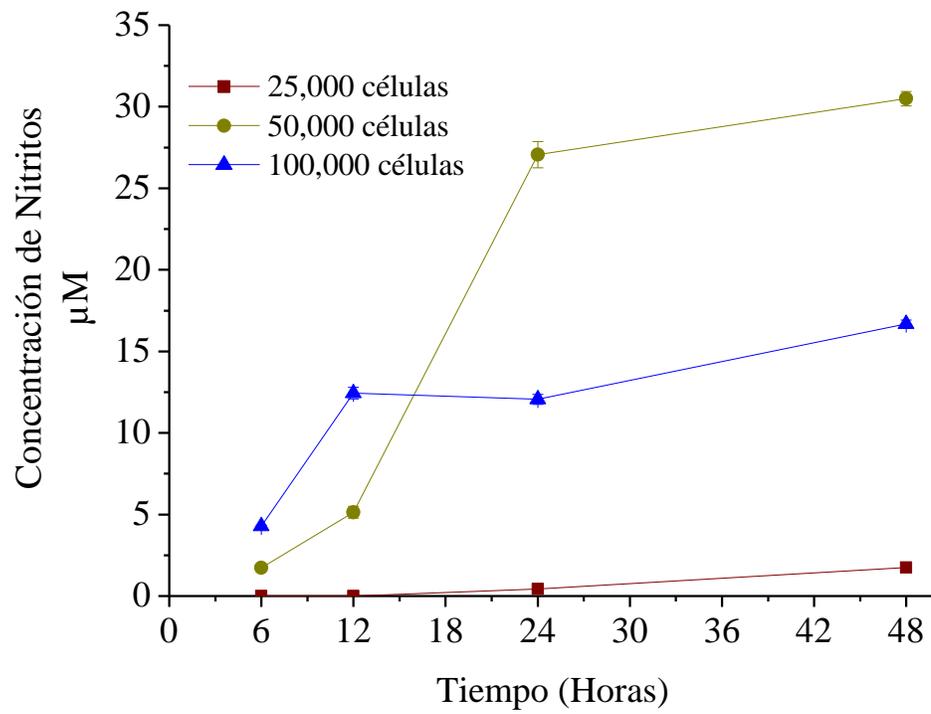
*Anexo F. Continuación...***Curvas de amplificación****iNOS****GAPDH** **β -Actina****C****D**

■ MO_Control

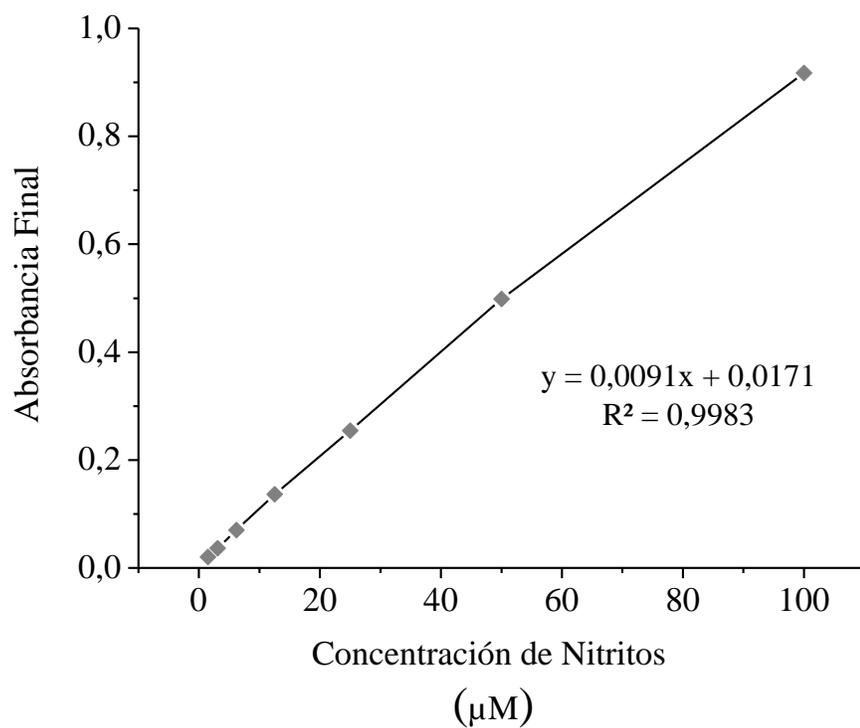
■ MO_LPS 1 μ g/MI■ MO_OMV 0,1 μ g/mL■ MO_OMV 1 μ g/mL

■ Control Negativo qPCR

Anexo G: Estandarización del número de células para detección de nitritos



Anexo H: Curva estándar de nitritos



Anexo I: Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, San Francisco-California, USA. 2016

Certificado de asistencia al evento



an international forum for cell biology

8120 woodmont avenue, suite 750 • Bethesda, Maryland 20814-2762, usa
tel: 301-347-9300 • fax: 301-347-9310 • email: ascbinfo@ascb.org • website: www.ascb.org

02/07/2017

To Whom It May Concern:

This confirms that Andres Leal attended the Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, which was held December 3-7, 2016, at the Moscone Center in San Francisco, CA.

Sincerely,

Marta Chacon
Membership Manager

OFFICERS

PETER WALTER
President

SHIRLEY M. TILGHMAN
Past President

PIETRO DE CAMILLI
President-Elect

KATHLEEN J. GREEN
Secretary

GARY J. GORBSKY
Treasurer

*

COUNCIL

JOHN K. HAYNES
REBECCA HEALD
ANTHONY A. HYMAN
IAN G. MACARA
IRA MELLMAN
TOM MISTELI

DENISE J. MONTELL
JODI NUNNARI
SAMARA RECK-PETERSON
ANNE SPANG
CLAIRE E. WALCZAK
ORA A. WEISZ

*

COMMITTEE CHAIRS

BRUNO DA ROCHA-AZEVEDO
Co-Chair
PINAR GUREL
Co-Chair
Committee for Postdocs & Students

Memorias del evento – *Molecular Biology of the Cell*

Póster 1

P1621

Board Number: B1456

Electrophysiological properties of macrophage-like cell line J774A.1 during the internalization of outer membrane vesicles (OMV) from *Escherichia coli* JC8031.

A.F. Leal^{1,2}, M.M. Camacho¹, J.D. Valderrama², M.E. Forero¹;

¹Universidad Nacional de Colombia, Bogota, Colombia, ²Universidad Antonio Nariño, Bogotá, Colombia

Outer membrane vesicles (OMV) have been proposed as exogenous antigen carriers. In order to discriminate effects associated with antigen specificity from those derived from OMV alone, the impact of their internalization on the electrical properties of macrophages was determined. The model studied was the murine macrophage-like cell line J774.A1 exposed to empty OMV (eOMV), obtained from *E. coli* JC8031, a nonpathogenic and hypervirulent strain. Macrophages were recorded with the patch clamp technique in the whole cell configuration and passive and active electrical properties measured after

Póster 2

P406

Board Number: B966

Pro-inflammatory cytokines and oxide nitric production in murine macrophage J774A.1 cell line during the internalization of outer membrane vesicles (OMV) from *Escherichia coli* JC8031.

A.F. Buitrago^{1,2}, A.F. Leal^{1,3}, A.L. Muñoz¹, J.D. Valderrama¹, M.E. Forero¹;

¹Universidad Antonio Nariño, Bogota D.C, Colombia, ²Universidad El Bosque, Bogota D.C, Colombia,

³Universidad Nacional de Colombia, Bogota D.C, Colombia

In order to evaluate the physiological impact of outer membrane vesicles (OMV) obtained from *E. coli* JC8031, as exogenous antigen carriers, we studied the effect of the internalization of "empty" OMV (without exogenous antigens), on the viability and the activation of the innate immune response in the J774A.1 macrophage cell line. Cell cultures viability was evaluated with the MTT assay, and the

Anexo J: First International Congress of Science, Technology and Innovation of the Americas, Bogotá, Colombia. 2017

Certificado de asistencia al evento



FIRST INTERNATIONAL CONGRESS OF SCIENCE, TECHNOLOGY AND
INNOVATION OF THE AMERICAS

This certificate of attendance is given to

Andrés Felipe Leal Bohórquez

For participating in the

FIRST INTERNATIONAL CONGRESS OF SCIENCE, TECHNOLOGY AND INNOVATION
OF THE AMERICAS

Held in Bogotá, Colombia May 18 - 19, 2017

Nuria Estrella Matta Camacho
NURIA ESTELLA MATTÁ CAMACHO
Co-Chair, Organizing Committee

Viswanathan Arunachalam
VISWANATHAN ARUNACHALAM
Co-Chair, Organizing Committee

Memorias del evento – *Abstract Book*

Póster

**B26. CLASSICAL ACTIVATION OF MACROPHAGE-
LIKE CELL LINE J774A.1 DURING THE
INTERNALIZATION OF OMV FROM *E. coli* JC8031**

Andrea Buitrago Roa
Departamento de Química - Facultad de Ciencias - Universidad Antonio Nariño.
andreaio2@gmail.com

Andrés Felipe Leal
Maestría Bioquímica - Facultad de Medicina - Universidad Nacional de Colombia
aflealb@unal.edu.co

Anexo K: Consolidado de análisis estadístico

Promedio del porcentaje de viabilidad evaluado por el ensayo de MTT (n=5)						
Tiempo de interacción	OMV 0,1 µg/mL	ES	p valor	OMV 1 µg/mL	ES	p valor
6 Horas	85,0	2,3	Ref	83,6	2,9	Ref
12 Horas	89,0	2,7	0,3120	83,5	3,9	0,3282
24 Horas	97,0	2,2	0,0099	90,7	4,6	0,9810
48 Horas	91,2	3,2	0,2495	56,5	1,0	0,0069

Ensayo LDH - 24 Horas (n=2)			
Grupo Experimental	% Citotoxicidad	ES	p valor
Control Positivo	44,9	2,0	Ref
OMV 0,1 µg/mL	3	1	0,01118
OMV 1 µg/mL	6,5	0,5	0,0259

Promedio de las mediciones de potencial de reposo (mV)			
Tiempo de Interacción	Vm	ES	p valor
Control (n=26)	-42,34	2,4	Ref.
6 Horas (n=15)	-47,38	3,8	0,27924
12 Horas (14)	-61,41	2,3	2,00E-06
24 Horas (n=17)	-69,58	1,4	5,00E-11

Promedio de la intensidad de pixeles (UA)			
Tiempo de Interacción	Pixeles	ES	p valor
Control (n=26)	49662,35	478,0	Ref
6 Horas (n=15)	38126,05	648,8	8,63E-39
12 Horas (14)	28866,68	304,7	4,57E-75
24 Horas (n=17)	16902	160,8	1,75E-231

Promedio de la densidad de corriente de salida (pA/pF)												
Pulso	MO_ Control (n=20)	ES	P valor	MO_OMV 6 Horas (n=11)	ES	P valor	MO_OMV 12 Horas (n=16)	ES	P valor	MO_OMV 24 Horas (15)	ES	P valor
-100	-5,22	0,6	-	-8,18	2,3	-	-5,97	1,4	-	-4,84	0,6	-
-80	-2,17	0,3	-	-3,30	0,9	-	-1,48	0,5	-	-1,11	0,2	-
-60	0,00	0,0	-	-0,46	0,2	-	0,65	0,4	-	0,34	0,0	-
-40	1,79	0,2	-	1,31	0,2	-	1,52	0,4	-	0,91	0,1	-
-20	3,47	0,5	-	2,9	0,4	-	2,30	0,6	-	1,41	0,2	-
0	5,28	0,8	-	5,53	1,0	-	3,52	0,8	-	2,05	0,2	-
20	7,44	1,1	-	8,29	1,5	-	5,38	1,0	-	2,91	0,3	-
40	10,06	1,5	Ref	11,44	2,1	0,65488	6,38	1,0	0,04463	3,54	0,4	< 0,01
60	12,34	1,8	-	13,05	2,4	-	8,21	1,4	-	4,46	0,5	-
80	14,76	2,2	-	15,76	2,9	-	9,44	1,6	-	4,99	0,6	-
100	17,41	2,	-	17,78	3,2	-	10,67	2,1	-	5,35	0,6	-
120	20,53	3,0	-	20,84	3,9	-	12,68	3,2	-	5,94	0,7	-

Porcentaje de corriente bloqueada con Caribdotoxina 100 nM (n=7)						
Tiempo de Interacción	+40 mV	ES	P valor	+60 mV	ES	P valor
Control	27,74	3,7	Ref	31,53	4,6	Ref
6 Horas	35,09	9,4	0,55737	35,27	9,3	0,73235
12 Horas	44,32	7,8	0,03994	41,06	7,7	0,31
24 Horas	32,21	3,4	0,48214	28,01	3,2	0,54404

Promedio de la densidad de corriente de entrada (pA/pF)												
Pulso	MO_ Control (n=14)	ES	P valor	MO_OMV 6 Horas (n=10)	ES	P valor	MO_OMV 12 Horas (n=10)	ES	P valor	MO_OMV 24 Horas (n=7)	ES	P valor
-140	-14,83	2,1	-	-16,67	3,7	-	-19,60	3,5	-	-24,01	2,6	-
-120	-10,91	1,4	Ref	-10,50	2,2	0,882	-14,06	3,2	0,38857	-15,70	1,2	0,02519
-100	-6,95	0,9	-	-5,58	1,1	-	-7,72	2,2	-	-7,28	0,6	-
-80	-3,64	0,5	-	-2,33	0,4	-	-1,92	0,7	-	-1,81	0,5	-
-60	-1,22	0,2	-	-0,14	0,1	-	0,44	0,3	-	0,70	0,1	-
-40	0,54	0,2	-	1,50	0,4	-	1,33	0,3	-	1,83	0,4	-
-20	2,31	0,4	-	3,22	0,8	-	1,82	0,5	-	1,73	0,9	-
0	4,82	0,8	-	5,49	1,3	-	3,29	0,6	-	3,33	1,1	-
20	6,05	1,0	-	7,90	2,0	-	5,40	0,7	-	4,48	1,4	-

Porcentaje de corriente bloqueada con Cloruro de Bario 5 mM (n=5)						
Tiempo de Interacción	+40 mV	ES	p valor	+60 mV	ES	p valor
Control	72,18	6,2	Ref	70,08	8,0	Ref
6 Horas	80,91	10,1	0,50874	78,05	13,1	0,6586
12 Horas	90,69	3,1	0,02488	90,19	1,8	0,03324
24 Horas	72,5	7,3	0,97557	66,48	6,4	0,7347

Expresión génica de canales iónicos $\Delta\Delta Ct$ normalizado frente al gen de referencia H3A					
Canal Iónico	MO_OMV 6 Horas	ES	MO_OMV 12 Horas	ES	p Valor
Kv 1.3	1,03	0,1	0,56	0,1	0,31915
Kir 2.1	0,56	0,02	1,11	0,1	0,05538
KCa 3.1	1,46	0,1	0,08	0,02	0,03454
BK	1,22	0,1	2,91	0,2	0,01084

Expresión génica de la iNOS $\Delta\Delta Ct$ normalizado frente al gen de referencia GAPDH								
Grupo experimental	MO_OMV 3 Horas	ES	MO_OMV 6 Horas	ES	MO_OMV 12 Horas	ES	MO_OMV 24 Horas	ES
Control Negativo	1	0,1	1	0,04	1	0,2	1	0,1
LPS 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	4,56	0,1	51,14	0,02	3,91	0,04	2,26	0,1
OMV 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,54	0,03	55,93	0,1	10,55	0,02	2,04	0,1
OMV 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5,77	0,04	122,53	0,03	21,70	0,1	2,12	0,04

Expresión génica de la iNOS $\Delta\Delta Ct$ normalizado frente al gen de referencia β -Actina								
Grupo experimental	MO_OMV 3 Horas	ES	MO_OMV 6 Horas	ES	MO_OMV 12 Horas	ES	MO_OMV 24 Horas	ES
Control Negativo	1	0,2	1	0,1	1	0,03	1	0,06
LPS 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	4,02	0,8	46,10	0,8	0,21	0,05	2,55	0,2
OMV 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,41	0,7	51,62	0,09	0,42	0,2	1,64	0,4
OMV 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	3,22	0,1	90,18	0,0	0,41	0,5	2,08	0,6

Cuantificación fluorométrica de la iNOS - Unidades relativas de fluorescencia (URF) (n=4)												
Tiempo de interacción	MO_Control	ES	Valor p	LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	ES	Valor p	OMV 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	ES	p Valor	OMV 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	ES	p Valor
6 Horas	0	0	Ref.	1640	50	NA	1545	5	NA	2397,5	27,5	NA
12 Horas	412,5	32,5	Ref.	13085	500	0,02452	14077,5	427,5	0,01923	20987,5	2227,5	0,0686
24 Horas	458,75	21,9	Ref.	12696,25	245,6	1,E-05	12015	275,1	2,E-05	18007,5	432,3	3E-05

Bibliografía

Alaniz, R. C., Deatherage, B. L., Lara, J. C., & Cookson, B. T. (2007). Membrane vesicles are immunogenic facsimiles of *Salmonella typhimurium* that potently activate dendritic cells, prime B and T cell responses, and stimulate protective immunity in vivo. *The Journal of Immunology*, 179(11), 7692-7701.

Andersen, C. B., & Moestrup, S. K. (2014). How calcium makes endocytic receptors attractive. *Trends in biochemical sciences*, 39(2), 82-90.

Awate, S., Babiuk, L. A. B., & Mutwiri, G. (2013). Mechanisms of action of adjuvants. *Frontiers in immunology*, 4, 114.

Barraud, N., J Kelso, M., A Rice, S., & Kjelleberg, S. (2015). Nitric oxide: a key mediator of biofilm dispersal with applications in infectious diseases. *Current pharmaceutical design*, 21(1), 31-42.

Bartolini, E., Ianni, E., Frigimelica, E., Petracca, R., Galli, G., Scorza, F. B., ... & Donati, M. (2013). Recombinant outer membrane vesicles carrying *Chlamydia muridarum* HtrA induce antibodies that neutralize chlamydial infection in vitro. *Journal of extracellular vesicles*, 2.

Batista-Duharte, A., Lastre, M., & Perez, O. (2014). Immunological adjuvants. Determinant factors in the efficacy-toxicity ratio of the contemporary vaccines. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 32(2), 106-114.

Bernadac, A., Gavioli, M., Lazzaroni, J. C., Raina, S., & Llobès, R. (1998). *Escherichia coli* tol-pal mutants form outer membrane vesicles. *Journal of bacteriology*, 180(18), 4872-4878.

Bogdan, C. (2015). Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. *Trends in immunology*, 36(3), 161-178.

Bose, T., Ciešlar-Pobuda, A., & Wiechec, E. (2015). Role of ion channels in regulating Ca²⁺ homeostasis during the interplay between immune and cancer cells. *Cell death & disease*, 6(2), e1648.

Bryan, N. S., & Grisham, M. B. (2007). Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(5), 645-657.

Camacho, M. (2012). Electrical Membrane Properties in the Model *Leishmania*-Macrophage. *INTECH* Open Access Publisher.

Camacho, M., Forero, M. E., Fajardo, C., Niño, A., Morales, P., & Campos, H. (2008). *Leishmania amazonensis* infection may affect the ability of the host macrophage to be activated by altering their outward potassium currents. *Experimental parasitology*, 120(1), 50-56.

Campbell, M. G., Smith, B. C., Potter, C. S., Carragher, B., & Marletta, M. A. (2014). Molecular architecture of mammalian nitric oxide synthases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(35), E3614-E3623.

Cañas, M. A., Giménez, R., Fábrega, M. J., Toloza, L., Baldomà, L., & Badia, J. (2016). Outer membrane vesicles from the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 and the commensal ECOR12 enter intestinal epithelial cells via clathrin-dependent endocytosis and elicit differential effects on DNA damage. *PLoS one*, 11(8), e0160374.

Chen, D. J., Osterrieder, N., Metzger, S. M., Buckles, E., Doody, A. M., DeLisa, M. P., & Putnam, D. (2010). Delivery of foreign antigens by engineered outer membrane vesicle vaccines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(7), 3099-3104.

Chiang, C. Y., Veckman, V., Limmer, K., & David, M. (2012). Phospholipase C γ -2 and intracellular calcium are required for lipopolysaccharide-induced Toll-like receptor 4 (TLR4) endocytosis and interferon regulatory factor 3 (IRF3) activation. *Journal of Biological Chemistry*, 287(6), 3704-3709.

Cobos, L. (2014, October). Endothelium and arterial hypertension. *Anales de la Facultad de Medicina* (Vol. 75, No. 4, pp. 345-350). UNMSM. Facultad de Medicina.

Cui, J., Cox, D. H., & Aldrich, R. W. (1997). Intrinsic voltage dependence and Ca²⁺ regulation of mslo large conductance Ca-activated K⁺ channels. *The Journal of general physiology*, 109(5), 647-673.

Daleke-Schermerhorn, M. H., Felix, T., Soprova, Z., Corinne, M., Vikström, D., Majlessi, L., ... & Baumgarten, T. (2014). Decoration of outer membrane vesicles with multiple antigens by using an autotransporter approach. *Applied and environmental microbiology*, 80(18), 5854-5865.

Di, A., Nelson, D. J., Bindokas, V., Brown, M. E., Libunao, F., & Palfrey, H. C. (2003). Dynamin regulates focal exocytosis in phagocytosing macrophages. *Molecular biology of the cell*, 14(5), 2016-2028.

Dolga, A. M., & Culmsee, C. (2012). Protective roles for potassium SK/KCa² channels in microglia and neurons. *Frontiers in pharmacology*, 3, 196.

Ellis, T. N., & Kuehn, M. J. (2010). Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(1), 81-94.

Essin, K., Gollasch, M., Rolle, S., Weissgerber, P., Sausbier, M., Bohn, E., ... & Kettritz, R. (2009). BK channels in innate immune functions of neutrophils and macrophages. *Blood*, 113(6), 1326-1331.

Fantappie, L., de Santis, M., Chiarot, E., Carboni, F., Bensi, G., Jousson, O., ... & Grandi, G. (2014). Antibody-mediated immunity induced by engineered *Escherichia coli* OMVs carrying heterologous antigens in their lumen. *Journal of extracellular vesicles*, 3.

Felipe, A., Soler, C., & Comes, N. (2010). Kv 1.5 in the immune system: the good, the bad, or the ugly? *Frontiers in physiology*, 1, 152.

Ferraz, F. B., & Fernandez, J. H. (2016). Selection and validation of reference house-keeping genes in the J774A1 macrophage cell line for quantitative real-time PCR. *Genet Mol Res GMR*, 15, 5017720.

Forero, M. E., Marín, M., Corrales, A., Llano, I., Moreno, H., & Camacho, M. (1999). *Leishmania amazonensis* infection induces changes in the electrophysiological properties of macrophage-like cells. *Journal of Membrane Biology*, 170(2), 173-180.

Gallin, E. K. (1991). Ion channels in leukocytes (No. AFRRI-SR91-36). *Armed Forces Radiobiology Research Inst Bethesda MD*.

Galván-Peña, S., & O'Neill, L. A. (2015). Metabolic reprogramming in macrophage polarization. M1/M2 Macrophages: *The Arginine Fork in the Road to Health and Disease*, 5(420), 275.

Gao, Y. D., Hanley, P. J., Rinné, S., Zuzarte, M., & Daut, J. (2010). Calcium-activated K⁺ channel (KCa 3.1) activity during Ca²⁺ store depletion and store-operated Ca²⁺ entry in human macrophages. *Cell calcium*, 48(1), 19-27.

Gasteiger, G., & Rudensky, A. Y. (2014). Opinion: Interactions of innate and adaptive lymphocytes. *Nature reviews. Immunology*, 14(9), 631.

Gause, K. T., Wheatley, A. K., Cui, J., Yan, Y., Kent, S. J., & Caruso, F. (2017). Immunological Principles Guiding the Rational Design of Particles for Vaccine Delivery. *ACS nano*.

Glenny, A. T., Pope, C. G., Waddington, H., & Wallace, U. (1926). The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. *J Pathol Bacteriol*, 29(29), 31-40.

Goldberg, A. C., & Rizzo, L. V. (2015). MHC structure and function-antigen presentation. Part 2. *Einstein (São Paulo)*, 13(1), 157-162.

Gordon, S. (2016). Phagocytosis: an immunobiologic process. *Immunity*, 44(3), 463-475.

Gostner, J. M., Becker, K., Fuchs, D., & Sucher, R. (2013). Redox regulation of the immune response. *Redox Report*, 18(3), 88-94.

Grimaldi, A., D'alessandro, G., Golia, M. T., Grössinger, E. M., Di Angelantonio, S., Ragozzino, D., ... & Limatola, C. (2016). KCa 3.1 inhibition switches the phenotype of glioma-infiltrating microglia/macrophages. *Cell death & disease*, 7(4), e2174.

Grizel, A. V., Glukhov, G. S., & Sokolova, O. S. (2014). Mechanisms of activation of voltage-gated potassium channels. *Acta Naturae*, 6(4 (23)).

Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., & Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv European journal of physiology*, 391(2), 85-100.

Hille B. Ion channels of exc He, P., Zou, Y., & Hu, Z. (2015). Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism. Human vaccines & immunotherapeutics, 11(2), 477-488. itable membranes. Third edition. *Sinauer Associates*; 2001

Hoekstra, D., van der Laan, J. W., de Leij, L., & Witholt, B. (1976). Release of outer membrane fragments from normally growing *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 455(3), 889-899.

Holevinsky, K. O., & Nelson, D. J. (1998). Membrane capacitance changes associated with particle uptake during phagocytosis in macrophages. *Biophysical journal*, 75(5), 2577-2586.

Husebye, H., Halaas, Ø., Stenmark, H., Tunheim, G., Sandanger, Ø., Bogen, B., ... & Espevik, T. (2006). Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *The EMBO journal*, 25(4), 683-692.

Imayoshi, R., Cho, T., & Kaminishi, H. (2011). NO production in RAW264 cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis* extracellular vesicles. *Oral diseases*, 17(1), 83-89.

Kaparakis-Liaskos, M., & Ferrero, R. L. (2015). Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles. *Nature Reviews. Immunology*, 15(6), 375.

Kaur, G., Singh, S., Sunil Kumar, B. V., Mahajan, K., & Verma, R. (2016). Characterization and Immunogenicity of Outer Membrane Vesicles from *Brucella abortus*. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 37(3), 261-272.

Kaushal, V., Koeberle, P. D., Wang, Y., & Schlichter, L. C. (2007). The Ca²⁺-activated K⁺ channel KCNN4/KCa 3.1 contributes to microglia activation and nitric oxide-dependent neurodegeneration. *Journal of Neuroscience*, 27(1), 234-244.

Kesty, N. C., & Kuehn, M. J. (2004). Incorporation of heterologous outer membrane and periplasmic proteins into *Escherichia coli* outer membrane vesicles. *Journal of Biological Chemistry*, 279(3), 2069-2076.

Kim, O. Y., Hong, B. S., Park, K. S., Yoon, Y. J., Choi, S. J., Lee, W. H., ... & Gho, Y. S. (2013). Immunization with *Escherichia coli* outer membrane vesicles protects bacteria-induced lethality via Th1 and Th17 cell responses. *The Journal of Immunology*, 190(8), 4092-4102.

Kim, S. H., Lee, S. R., Kim, K. S., Ko, A., Kim, E., Kim, Y. H., & Chang, K. T. (2010). Shiga toxin A subunit mutant of *Escherichia coli* O157: H7 releases outer membrane vesicles containing the B-pentameric complex. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 58(3), 412-420.

Kulp, A., & Kuehn, M. J. (2010). Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annual review of microbiology*, 64, 163-184.

Kyle, B. D., & Braun, A. P. (2014). The regulation of BK channel activity by pre-and post-translational modifications. *Frontiers in physiology*, 5.

Lam, J., & Wulff, H. (2011). The lymphocyte potassium channels Kv1. 3 and KCa 3.1 as targets for immunosuppression. *Drug development research*, 72(7), 573-584.

Lamb, F. S., Moreland, J. G., & Miller Jr, F. J. (2009). Electrophysiology of reactive oxygen production in signaling endosomes. *Antioxidants & redox signaling*, 11(6), 1335-1347.

Latorre, R., Castillo, K., Carrasquel-Ursulaez, W., Sepulveda, R. V., Gonzalez-Nilo, F., Gonzalez, C., & Alvarez, O. (2017). Molecular determinants of BK channel functional diversity and functioning. *Physiological reviews*, 97(1), 39-87.

Leanza, L., Zoratti, M., Gulbins, E., & Szabò, I. (2012). Induction of apoptosis in macrophages via Kv 1.3 and Kv 1.5 potassium channels. *Current medicinal chemistry*, 19(31), 5394-5404.

Lee, E. Y., Choi, D. S., Kim, K. P., & Gho, Y. S. (2008). Proteomics in gram-negative bacterial outer membrane vesicles. *Mass spectrometry reviews*, 27(6), 535-555.

Lee, Y. M., Thompson, G. A., Ashmole, I., Leyland, M., So, I., & Stanfield, P. R. (2009). Multiple residues in the P-region and M2 of murine Kir 2.1 regulate blockage by external Ba²⁺. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 13(1), 61-70.

Li, C., Levin, M., & Kaplan, D. L. (2016). Bioelectric modulation of macrophage polarization. *Scientific reports*, 6.

Libako, P., Nowacki, W., Castiglioni, S., Mazur, A., & Maier, J. A. (2016). Extracellular magnesium and calcium blockers modulate macrophage activity. *Magnesium research*, 29(1), 11-21.

Liu, X., Wang, N., Zhu, Y., Yang, Y., Chen, X., Fan, S., ... & Zheng, J. (2016). Inhibition of extracellular calcium influx results in enhanced IL-12 production in LPS-treated murine macrophages by downregulation of the CaMKK-AMPK-SIRT1 signaling pathway. *Mediators of inflammation*, 2016.

Mack, A., Choffnes, E. R., Hamburg, M. A., & Relman, D. A. (Eds.). (2009). Microbial Evolution and Co-Adaptation: A Tribute to the Life and Scientific Legacies of Joshua Lederberg: Workshop Summary. *National Academies Press*.

Mao, Y., & Finnemann, S. C. (2015). Regulation of phagocytosis by Rho GTPases. *Small GTPases*, 6(2), 89-99.

Martínez, F. O., & Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*, 6(13.10), 12703.

Martínez-Medina, M., & Garcia-Gil, L. J. (2014). *Escherichia coli* in chronic inflammatory bowel diseases: An update on adherent invasive *Escherichia coli* pathogenicity. *World journal of gastrointestinal pathophysiology*, 5(3), 213.

- McGettrick, A. F., & O'Neill, L. A. (2010). Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. *Current opinion in immunology*, 22(1), 20-27.
- Miller, B. H., Fratti, R. A., Poschet, J. F., Timmins, G. S., Master, S. S., Burgos, M., ... & Deretic, V. (2004). Mycobacteria inhibit nitric oxide synthase recruitment to phagosomes during macrophage infection. *Infection and immunity*, 72(5), 2872-2878.
- Mitra, S., Sinha, R., Nag, D., & Koley, H. (2015). Immunomodulatory role of outer membrane vesicles of *Shigella* in mouse model. *Trials in Vaccinology*, 4, 56-60.
- Mizel, S. B., Honko, A. N., Moors, M. A., Smith, P. S., & West, A. P. (2003). Induction of macrophage nitric oxide production by Gram-negative flagellin involves signaling via heteromeric Toll-like receptor 5/Toll-like receptor 4 complexes. *The Journal of Immunology*, 170(12), 6217-6223.
- Moreno, C., Prieto, P., Macías, Á., Pimentel-Santillana, M., de la Cruz, A., Través, P. G., ... & Valenzuela, C. (2013). Modulation of voltage-dependent and inward rectifier potassium channels by 15-epi-lipoxin-A4 in activated murine macrophages: implications in innate immunity. *The Journal of Immunology*, 191(12), 6136-6146.
- Nabel, G. J. (2013). Designing tomorrow's vaccines. *New England Journal of Medicine*, 368(6), 551-560.
- Nakatani, H. (2016). Global Strategies for the Prevention and Control of Infectious Diseases and Non-Communicable Diseases. *Journal of epidemiology*, 26(4), 171-178.
- Nguyen, H. M., Grössinger, E. M., Horiuchi, M., Davis, K. W., Jin, L. W., Maezawa, I., & Wulff, H. (2017). Differential Kv 1.3, KCa 3.1, and Kir 2.1 expression in "classically" and "alternatively" activated microglia. *Glia*, 65(1), 106-121.
- Nunes, P., & Demaurex, N. (2010). The role of calcium signaling in phagocytosis. *Journal of leukocyte biology*, 88(1), 57-68.
- O'Donoghue, E. J., & Krachler, A. M. (2016). Mechanisms of outer membrane vesicle entry into host cells. *Cellular microbiology*, 18(11), 1508-1517.
- O'Neill, L. A., Golenbock, D., & Bowie, A. G. (2013). The history of Toll-like receptors [mdash] redefining innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 13(6), 453-460.
- Panyi, G., Beeton, C., & Felipe, A. (2014). Ion channels and anti-cancer immunity. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 369(1638), 20130106.
- Papavlassopoulos, M., Stamme, C., Thon, L., Adam, D., Hillemann, D., Seydel, U., & Schromm, A. B. (2006). MaxiK blockade selectively inhibits the lipopolysaccharide-induced I κ B- α /NF- κ B signaling pathway in macrophages. *The Journal of Immunology*, 177(6), 4086-4093.
- Pardo, Á. Y. G. (2012). Importancia fisiológica de los canales de potasio de alta conductancia dependiente de calcio y voltaje. *Cuerpo, Cultura y Movimiento*, 2(3-4), 69-80.

- Parker, H., Chitcholtan, K., Hampton, M. B., & Keenan, J. I. (2010). Uptake of *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles by gastric epithelial cells. *Infection and immunity*, 78(12), 5054-5061.
- Pauwels, A. M., Trost, M., Beyaert, R., & Hoffmann, E. (2017). Patterns, Receptors, and Signals: Regulation of Phagosome Maturation. *Trends in Immunology*.
- Pedrique, B., Strub-Wourgaft, N., Some, C., Olliaro, P., Trouiller, P., Ford, N., ... & Bradol, J. H. (2013). The drug and vaccine landscape for neglected diseases (2000–11): a systematic assessment. *The Lancet Global Health*, 1(6), e371-e379.
- Penna, A., & Stutzin, A. (2015). KCa 3.1-Dependent Hyperpolarization Enhances Intracellular Ca²⁺ Signaling Induced by fMLF in Differentiated U937 Cells. *PLoS one*, 10(9), e0139243.
- Périer, F., Radeke, C. M., & Vandenberg, C. A. (1994). Primary structure and characterization of a small-conductance inwardly rectifying potassium channel from human hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(13), 6240-6244.
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European journal of medicinal chemistry*, 97, 55-74.
- Pohanka, M. (2013). Role of oxidative stress in infectious diseases. A review. *Folia microbiologica*, 58(6), 503-513.
- Qiu, M. R., Campbell, T. J., & Breit, S. N. (2002). A potassium ion channel is involved in cytokine production by activated human macrophages. *Clinical & Experimental Immunology*, 130(1), 67-74.
- Quintana, E., Torres, Y., Alvarez, C., Rojas, A., Forero, M. E., & Camacho, M. (2010). Changes in macrophage membrane properties during early *Leishmania amazonensis* infection differ from those observed during established infection and are partially explained by phagocytosis. *Experimental parasitology*, 124(3), 258-264.
- Rauer, H., Lanigan, M. D., Pennington, M. W., Aiyar, J., Ghanshani, S., Cahalan, M. D., ... & Chandy, K. G. (2000). Structure-guided transformation of charybdotoxin yields an analog that selectively targets Ca²⁺-activated over voltage-gated K⁺ channels. *Journal of Biological Chemistry*, 275(2), 1201-1208.
- Ribble, D., Goldstein, N. B., Norris, D. A., & Shellman, Y. G. (2005). A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. *BMC biotechnology*, 5(1), 12.
- Rosenthal, J. A., Chen, L., Baker, J. L., Putnam, D., & DeLisa, M. P. (2014). Pathogen-like particles: biomimetic vaccine carriers engineered at the nanoscale. *Current opinion in biotechnology*, 28, 51-58.
- Röszer, T. (2015). Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. *Mediators of inflammation*, 2015.

Scheel, O., Papavlassopoulos, M., Blunck, R., Gebert, A., Hartung, T., Zähringer, U., ... & Schromm, A. B. (2006). Cell activation by ligands of the toll-like receptor and interleukin-1 receptor family depends on the function of the large-conductance potassium channel MaxiK in human macrophages. *Infection and immunity*, 74(7), 4354-4356.

Schlichter, L. C., Kaushal, V., Moxon-Emre, I., Sivagnanam, V., & Vincent, C. (2010). The Ca²⁺ activated SK3 channel is expressed in microglia in the rat striatum and contributes to microglia-mediated neurotoxicity in vitro. *Journal of neuroinflammation*, 7(1), 4.

Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols*, 3(6), 1101-1108.

Schwechheimer, C., & Kuehn, M. J. (2015). Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nature Reviews Microbiology*, 13(10), 605-619.

Shaw, C. A., & Tomljenovic, L. (2013). Aluminum in the central nervous system (CNS): toxicity in humans and animals, vaccine adjuvants, and autoimmunity. *Immunologic research*, 56(2-3), 304-316.

Singh, N., Gautam, S. P., Kumari, N., Kaur, R., & Kaur, M. (2017). Virosomes as Novel drug delivery System: An Overview. *PharmaTutor*, 5(9), 47-55.

Tang, X. D., Garcia, M. L., Heinemann, S. H., & Hoshi, T. (2004). Reactive oxygen species impair Slo1 BK channel function by altering cysteine-mediated calcium sensing. *Nature structural & molecular biology*, 11(2), 171.

Tao, X., Lee, A., Limapichat, W., Dougherty, D. A., & MacKinnon, R. (2010). A gating charge transfer center in voltage sensors. *Science*, 328(5974), 67-73.

Toro, L., Li, M., Zhang, Z., Singh, H., Wu, Y., & Stefani, E. (2014). MaxiK channel and cell signalling. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 466(5), 875-886.

Tyrer, P. C., Frizelle, F. A., & Keenan, J. I. (2014). *Escherichia coli*-derived outer membrane vesicles are genotoxic to human enterocyte-like cells. *Infectious agents and cancer*, 9(1), 2.

Ünal, C. M., Schaar, V., & Riesbeck, K. (2011, September). Bacterial outer membrane vesicles in disease and preventive medicine. In *Seminars in immunopathology* (Vol. 33, No. 5, pp. 395-408). Springer-Verlag.

Underhill, D. M., & Goodridge, H. S. (2012). Information processing during phagocytosis. *Nature Reviews Immunology*, 12(7), 492-502.

Van der Pol, L., Stork, M., & van der Ley, P. (2015). Outer membrane vesicles as platform vaccine technology. *Biotechnology journal*, 10(11), 1689-1706.

Vicente, R., Escalada, A., Coma, M., Fuster, G., Sánchez-Tilló, E., López-Iglesias, C., ... & Felipe, A. (2003). Differential voltage-dependent K⁺ channel responses during proliferation and activation in macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 278(47), 46307-46320.

Vicente, R., Escalada, A., Soler, C., Grande, M., Celada, A., Tamkun, M. M., ... & Felipe, A. (2005). Pattern of Kv β subunit expression in macrophages depends upon proliferation and the mode of activation. *The Journal of Immunology*, 174(8), 4736-4744.

Vicente, R., Escalada, A., Villalonga, N., Texidó, L., Roura-Ferrer, M., Martín-Satué, M., ... & Felipe, A. (2006). Association of Kv 1.5 and Kv 1.3 contributes to the major voltage-dependent K⁺ channel in macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 281(49), 37675-37685.

Villalonga, N., David, M., Bielanska, J., Vicente, R., Comes, N., Valenzuela, C., & Felipe, A. (2010). Immunomodulation of voltage-dependent K⁺ channels in macrophages: molecular and biophysical consequences. *The Journal of general physiology*, 135(2), 135-147.

Walburger, A., Lazdunski, C., & Corda, Y. (2002). The Tol/Pal system function requires an interaction between the C-terminal domain of TolA and the N-terminal domain of TolB. *Molecular microbiology*, 44(3), 695-708.

WHO. (2016). Causes of death estimates for 2000-2015. On line: <http://apps.who.int/gho/data/node.main.GHECOD?lang=en>.

Wojdyla, J. A., Cutts, E., Kaminska, R., Papadakos, G., Hopper, J. T., Stansfeld, P. J., ... & Kleanthous, C. (2015). Structure and function of the Escherichia coli Tol-Pal stator protein TolR. *Journal of Biological Chemistry*, 290(44), 26675-26687.

Wulff, H., & Castle, N. A. (2010). Therapeutic potential of KCa 3.1 blockers: recent advances and promising trends. *Expert review of clinical pharmacology*, 3(3), 385-396.

Yang, J., Zhang, R., Lu, G., Shen, Y., Peng, L., Zhu, C., ... & Gupta, M. (2013). T cell-derived inducible nitric oxide synthase switches off TH17 cell differentiation. *Journal of Experimental Medicine*, jem-20122494.

Yellen, G. (2002). The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature*, 419(6902), 35-42.

Yoshida. (2017). Role of BK channels in macrophage activation. Doctoral thesis. On line: http://discovery.ucl.ac.uk/1544376/1/Yoshida_Minae%20Yoshida%20Thesis.pdf

Zhang, S. X., Wang, X. P., Gao, C. Y., Ju, C. H., Zhu, L. J., & DU, Y. (2015). Effect of Kv 1.3 and KCa 3.1 potassium ion channels on the proliferation and migration of monocytes/macrophages. *Sheng li xue bao: [Acta physiologica Sinica]*, 67(5), 505-512.

Zhang, W., Lei, X. J., Wang, Y. F., Wang, D. Q., & Yuan, Z. Y. (2016). Role of Kir 2.1 in human monocyte-derived foam cell maturation. *Journal of cellular and molecular medicine*, 20(3), 403-412.