

Efecto de nanopartículas arqueolípicas en células endoteliales humanas

Effect of archaeolipid nanoparticles on human endothelial cells

Charó N1, Jerez H2, Tatti S3, Romero2* E, Schattner M1*.

¹ Instituto de Medicina Experimental (IMEX-CONICET-ANM),
Buenos Aires, Argentina.

² Centro de Investigación y Desarrollo en Nanomedicinas (CIDEN), Universidad
Nacional de Quilmes, Buenos Aires, Argentina.

³ Departamento de Obstetricia y Ginecología, Hospital de Clínicas,
Buenos Aires Argentina.

**Equally Contributed*

mschattner@hotmail.com
eder19lilia@gmail.com

Fecha recepción: 6/8/2021

Fecha aprobación: 12/8/2021

MEJOR TRABAJO INVESTIGACIÓN BÁSICA CONGRESO CAHT 2021



ARTICULO
ORIGINAL

HEMATOLOGÍA
Volumen 25 n° 2: 33-40
Mayo - Agosto 2021

Palabras claves: nanopartículas,
arqueosomas,
células endoteliales,
antiinflamatorio.

Keywords: nanoparticles,
archaeosomes,
endothelial cells,
antiinflammatory.

Resumen

Igual que los liposomas, los arqueosomas son nanopartículas (NPs), utilizadas como sistemas de liberación de fármacos. Los arqueosomas son liposomas preparados con arqueolípidos; sin embargo, su efecto sobre el endotelio vascular, datos cruciales para su ingreso en la clínica, es desconocido. En este estudio analizamos el efecto de nuevos arqueosomas preparados a partir de una cepa hiperhalófila de la Patagonia Argentina en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVECs) en condiciones fisiológicas e inflamatorias y lo comparamos con el de liposomas convencionales. Si bien ninguna de las NPs afectó la viabilidad y expresión de ICAM-1 y E-selectina en condiciones basales, los arqueosomas redujeron la expresión de ambas moléculas y la secreción de IL-6 inducida por LPS y Pam3CSK4, efecto no observado con TNF- α y asociado a una inhibición en la activación de la vía NF- κ B y ERK1/2.

Ninguno de estos parámetros fue modificado por los liposomas. En forma similar, solamente los arqueosomas fueron endocitados por HUVECs.

Nuestros datos revelan una importante capacidad de estos arqueosomas para disminuir la activación endotelial y sugieren que, cargados con drogas antiinflamatorias, podrían magnificar su actividad sobre el endotelio inflamado siendo de especial interés su investigación en vasculopatías.

Abstract

The same as liposomes, archaeosomes are nanoparticles (NPs), made of archaeolipids employed as drug delivery systems. Up to date, the effect of archaeosomes on the vascular endothelium, critical data for its admission to the clinic, remains largely unknown. In this study we analyzed the effect of new archaeosomes prepared from a hyperhalophilic strain from Patagonia Argentina on human umbilical

vein endothelial cells (HUVECs) under physiological and inflammatory conditions and compare it with that of conventional liposomes. Although none of the NPs affected the viability and expression of ICAM-1 and E-selectin under basal conditions, the archaeosomes reduced the expression of both molecules and the secretion of IL-6 induced by LPS and Pam3CSK4, an effect not observed with TNF- α and associated with an inhibition in the activation of the NF- κ B and ERK1/2 pathway. None of these parameters were modified by the liposomes. Similarly, only archaeosomes were endocytosed by HUVECs.

Our data reveal an important capacity of these archaeosomes to decrease endothelial activation and suggest that loaded with anti-inflammatory drugs, they could magnify their activity on inflamed endothelium, their research in vasculopathies being of special interest.

Introducción

La nanomedicina ha desarrollado una gran variedad de nanopartículas (NPs) como sistemas de liberación dirigida de fármacos o sustancias bioactivas siendo los liposomas los de mayor éxito comercial, ya que poseen ciertas ventajas como ser biocompatibles, biodegradables y no inmunogénicos^(1,2).

Los arqueosomas son una nueva familia de NPs, que consisten en nanovesículas preparadas con lípidos extraídos de diferentes géneros del dominio Arquea, que poseen una mayor estabilidad respecto a los liposomas convencionales en ambientes fisicoquímica y enzimáticamente hostiles^(3,4). Por lo tanto, los arqueosomas están siendo extensamente estudiados para aplicaciones potenciales como sistemas de administración de fármacos/genes y antígenos^(5,6).

La administración terapéutica de NPs se lleva a cabo principalmente por vía endovenosa, donde inevitablemente hay un estrecho contacto entre NPs y la pared vascular. El endotelio no sólo es una barrera física que separa los microambientes intra y extravascular, sino que también es fundamental para el mantenimiento de la función vascular y la homeostasis. Además, la lesión o disfunción endotelial es la causa inicial de aterosclerosis y otras enfermedades cardiovasculares⁽⁷⁾. En este contexto, el conocimiento sobre la seguridad y toxicidad así como el posible efecto regulador de las NPs sobre las células endoteliales es crucial para su eventual uso clínico.

Nuestro grupo reportó el diseño de arqueosomas

preparados a partir de una nueva cepa hiperhalófila, *Halorubrum tebenquinchense*, aislada de la Patagonia Argentina⁽⁸⁾. Estos arqueosomas mostraron ser vehículos efectivos para la administración de dexametasona en potenciales terapias inhalatorias para el asma persistente⁽⁹⁾, así como en la administración oral para la mucosa inflamada en trastornos gastrointestinales⁽¹⁰⁾. Teniendo en cuenta su uso potencial en condiciones inflamatorias y que no existen reportes sobre su efecto sobre el endotelio, en este estudio investigamos la interacción y el efecto de estos arqueosomas en células endoteliales humanas en condiciones fisiológicas e inflamatorias.

Materiales y métodos

El estudio se realizó siguiendo los principios de la Declaración de Helsinki y contó con el aval del Comité de Ética Institucional. Se utilizaron cordones umbilicales obtenidos de partos normales a término en el Servicio de Obstetricia del Hospital de Clínicas José de San Martín, Buenos Aires, previa obtención del consentimiento informado de las madres.

Las células endoteliales se aislaron de la vena del cordón umbilical humano (HUVECs) por digestión con colagenasa tipo I, siguiendo procedimientos descriptos anteriormente⁽¹¹⁾ y fueron cultivadas en medio de crecimiento endotelial EGM2 utilizándose células hasta el cuarto pasaje.

Se prepararon arqueosomas con arqueolípidos polares totales (APT) extraídos de la arqueobacteria hiperhalófila *Halorubrum tebenquichense* y colesterol APT:colesterol 7:3 m:m y liposomas convencionales conteniendo L- α -fosfatidilcolina 1,2-hidrogenada:colesterol 7,5:2,5 m:m. Las formulaciones se prepararon por el método de resuspensión de la película lipídica. La caracterización estructural se determinó mediante dispersión de luz dinámica y de análisis de fases usando un equipo nanoZsizer.

La viabilidad celular y la presencia de apoptosis se analizaron por microscopía de fluorescencia marcando las células con naranja de acridina y bromuro de etidio. La expresión de ICAM-1 y E-selectina se evaluó por citometría de flujo y la secreción de IL-6 por ensayos de ELISA. Para analizar la captación de NPs por las HUVECs se utilizaron NPs marcadas con un fosfolípido conjugado a rodamina (RhPE) y se analizaron por citometría y microscopía confocal. Las vías de señalización se evaluaron por citometría y *Western blot*.

La activación endotelial se realizó estimulando con ligandos de los receptores tipo Toll (TLR) 2 y 4; como agonista del TLR2 se utilizó el lipopéptido mimético de componentes de la pared de las bacterias Gram positivas Pam3CysSerLys4 (Pam3CSK4) adquirido en *InvivoGen*, y para el TLR4 el lipopolisacárido (LPS) componente de las Gram negativas adquirido en *Sigma-Aldrich*. También se utilizó la citoquina proinflamatoria factor de necrosis tumoral (TNF- α) de *Cell Signaling Technology*.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm ESM (error standard de la media) de 4 a 5 experimentos independientes y se analizaron por ANOVA de una vía, post-test Bonferroni. Valores de $p < 0.05$ fueron

considerados estadísticamente significativos.

Resultados

Efecto de las NPs sobre sobre viabilidad celular y apoptosis en HUVECs

Como se muestra en la Figura 1A, la exposición de arqueosomas y liposomas a células endoteliales durante 24 horas no modificó la viabilidad de las HUVECs, sugiriendo que los arqueosomas, al igual que los liposomas, son biocompatibles con las HUVECs. La presencia de células apoptóticas fue detectada sólo en presencia de arqueosomas a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$, en consecuencia, en el resto de los experimentos, las NPs fueron utilizados a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 1B).

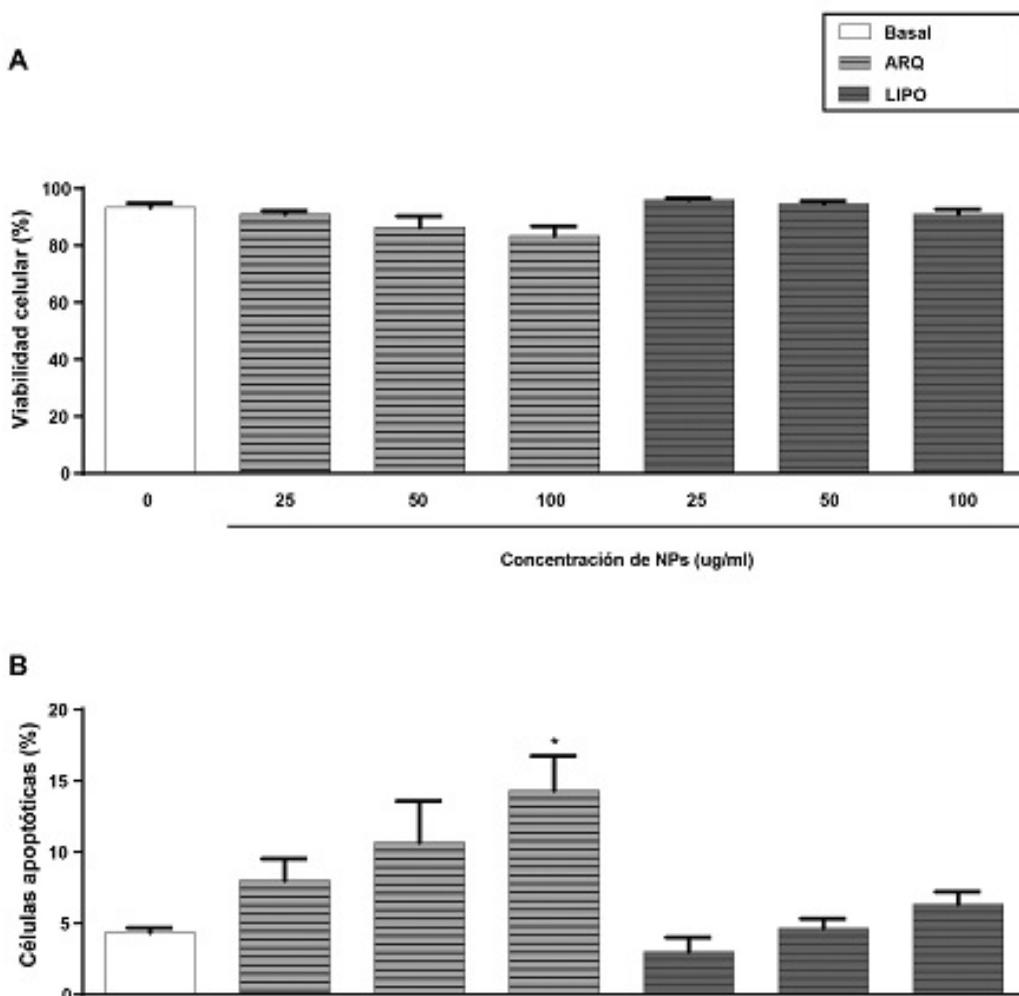


Figura 1. Efecto de las NPs sobre viabilidad celular y apoptosis en HUVECs. Las HUVECs fueron incubadas durante 24 horas en presencia de arqueosomas (ARQ) o liposomas (LIPO). Luego se analizó por microscopía de fluorescencia A) viabilidad celular y B) apoptosis, marcando las células con naranja de acridina y bromuro de etidio. * $p < 0.05$ vs basal.

Disminución en la expresión de E-selectina e ICAM-1 y la secreción de IL-6 en HUVECs mediada por arqueosomas

Para evaluar el efecto de los arqueosomas sobre respuestas efectoras del endotelio, inicialmente analizamos la expresión de moléculas de adhesión celular.

La presencia de NPs no modificó los niveles basales de E-selectina o ICAM-1. Sin embargo, la incubación con los arqueosomas redujo notablemente la expresión de ambas moléculas de adhesión inducida por LPS y Pam3CSK4, pero no por TNF- α (Figura 2A-B). Por otro lado, la expresión de E-selectina o

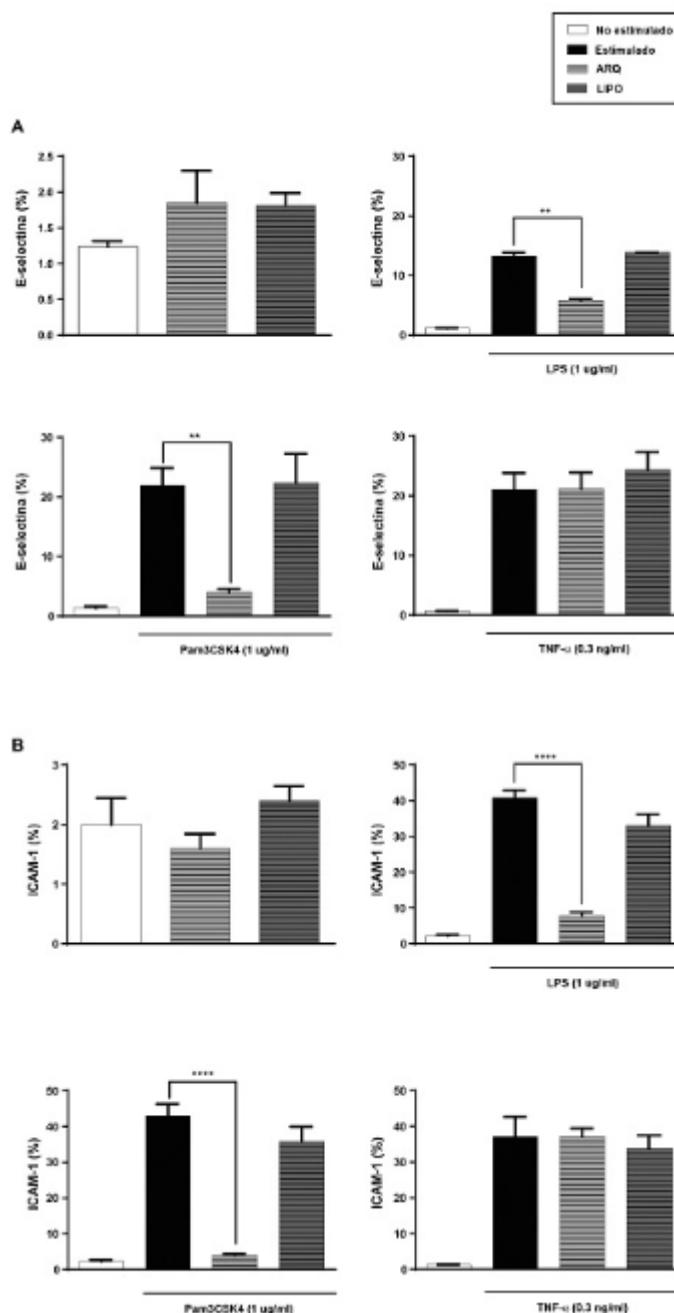


Figura 2. Efecto de las NPs sobre los niveles de expresión de E-selectina e ICAM-1 en HUVECs. Las HUVECs en condiciones basales o estimuladas con LPS, Pam3CSK4 o TNF- α se incubaron en ausencia o presencia de arqueosomas (ARQ) o liposomas (LIPO) y luego se evaluó por citometría de flujo la expresión de (A) E-selectina y (B) ICAM-1 luego de 4 y 18 horas post-estimulación, respectivamente. ** $p < 0.01$ y **** $p < 0.0001$ entre los grupos seleccionados.

ICAM-1 inducidas por cualquiera de los estímulos no se modificó en presencia de los liposomas. Entre las diferentes citoquinas liberadas por el endotelio, la IL-6 es una de las principales moléculas proinflamatorias. Los niveles de IL-6 gatillados por LPS o Pam3CSK4 en presencia de los arqueosomas se redujeron significativamente, efecto que no se observó con TNF- α . La formulación liposomal no ejerció efecto sobre los niveles de IL-6 (Figura 3).

Los arqueosomas inhiben la activación de las vías MAPK y NF- κ B en HUVECs

Las vías de señalización MAPK y NF- κ B están involucradas en la respuesta inflamatoria de HUVECs⁽¹²⁾. En la Figura 4A se observa que los arqueosomas atenúan la activación de la vía NF- κ B inducida por LPS, reflejándose en una disminución de la degradación de su inhibidor I κ B α , y disminuyen la fosforilación de ERK (vía de las MAPK). Este último resultado también se evidenció por citometría (Figura 4B).

Captación celular de NPs por HUVECs

Considerando que el efecto de las NPs generalmente está determinado en parte por cómo son procesadas por las células, se investigó el destino de los arqueosomas durante su interacción con las HUVECs utilizando nanopartículas marcadas con RhPE. En condiciones basales, la captación fue significativamente mayor para los arqueosomas que para los liposomas luego de la incubación durante 1 o 4 horas (Figura 5A). La internalización de los arqueosomas también se observó mediante microscopía confocal (Figura 5B).

Discusión

Los resultados obtenidos revelan que, a diferencia de los liposomas convencionales que no mostraron efecto alguno sobre el endotelio, los arqueosomas derivados de arqueolípidos de *H. tebenquichense* no son citotóxicos para el endotelio y ejercen un efecto antiinflamatorio asociado a una mayor internalización de los arqueosomas y a una inhibición de las vías NF- κ B y ERK1/2.

La acción inhibitoria selectiva de los arqueosomas en las respuestas de activación endotelial inducida por agonistas del TLR4 o TLR2, pero no por citoquinas inflamatorias, aún no está esclarecida. Sin embargo, el hecho de que este efecto no se observó al estimular las HUVECs con TNF- α , que actúa a través del TNFR1 y TNFR2, sugiere una posible interacción de los arqueosomas con los TLRs. En este sentido, previamente reportamos que, en macrófagos, los arqueosomas son reconocidos por el receptor *scavenger* tipo A (SRA)⁽⁹⁾. El SRA también se expresa en células endoteliales⁽¹³⁾ junto con el SREC-I que se expresa abundantemente^(14,15). Llamativamente, SREC-I puede asociarse con TLR2 y TLR4. Murshid y col. demostraron que el LPS además de ser ligando del TLR4 también es reconocido por el SREC-I, el cual induce la translocación del TLR4 en microdominios lipídicos formando un complejo LPS-TLR4-SREC-I que aumenta la señalización gatillada por el TLR4⁽¹⁶⁾. En el contexto de nuestro trabajo, se podría hipotetizar que, en presencia de LPS y arqueosomas, se formaría un complejo constituido por LPS-TLR4-SREC-I-arqueosomas y esto

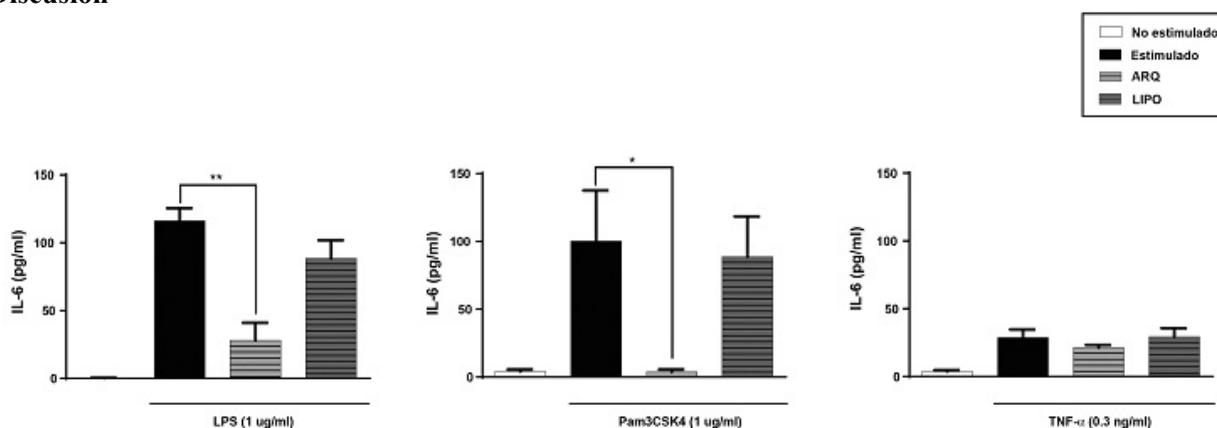


Figura 3. Efecto de NPs sobre la secreción de IL-6 en HUVECs. Las HUVECs se estimularon con LPS, Pam3CSK4 o TNF- α en ausencia o presencia de arqueosomas (ARQ) o liposomas (LIPO) durante 18 horas. La liberación de IL-6 se determinó en los sobrenadantes mediante ELISA. *p < 0.05 y **p < 0.01 entre los grupos seleccionados.

conllevaría, contrariamente, a la inhibición de la señalización del TLR4 por la presencia de los arqueosomas. Son necesarios futuros experimentos para esclarecer las bases moleculares del efecto inhibitorio de los arqueosomas sobre respuestas de activación endotelial.

Nuestros datos revelan, por primera vez, una capaci-

dad importante de los arqueosomas para disminuir marcadamente la activación endotelial. Arqueosomas cargados con drogas antiinflamatorias, podrían magnificar su actividad antiinflamatoria sobre endotelio inflamado, siendo de especial interés su investigación en vasculopatías.

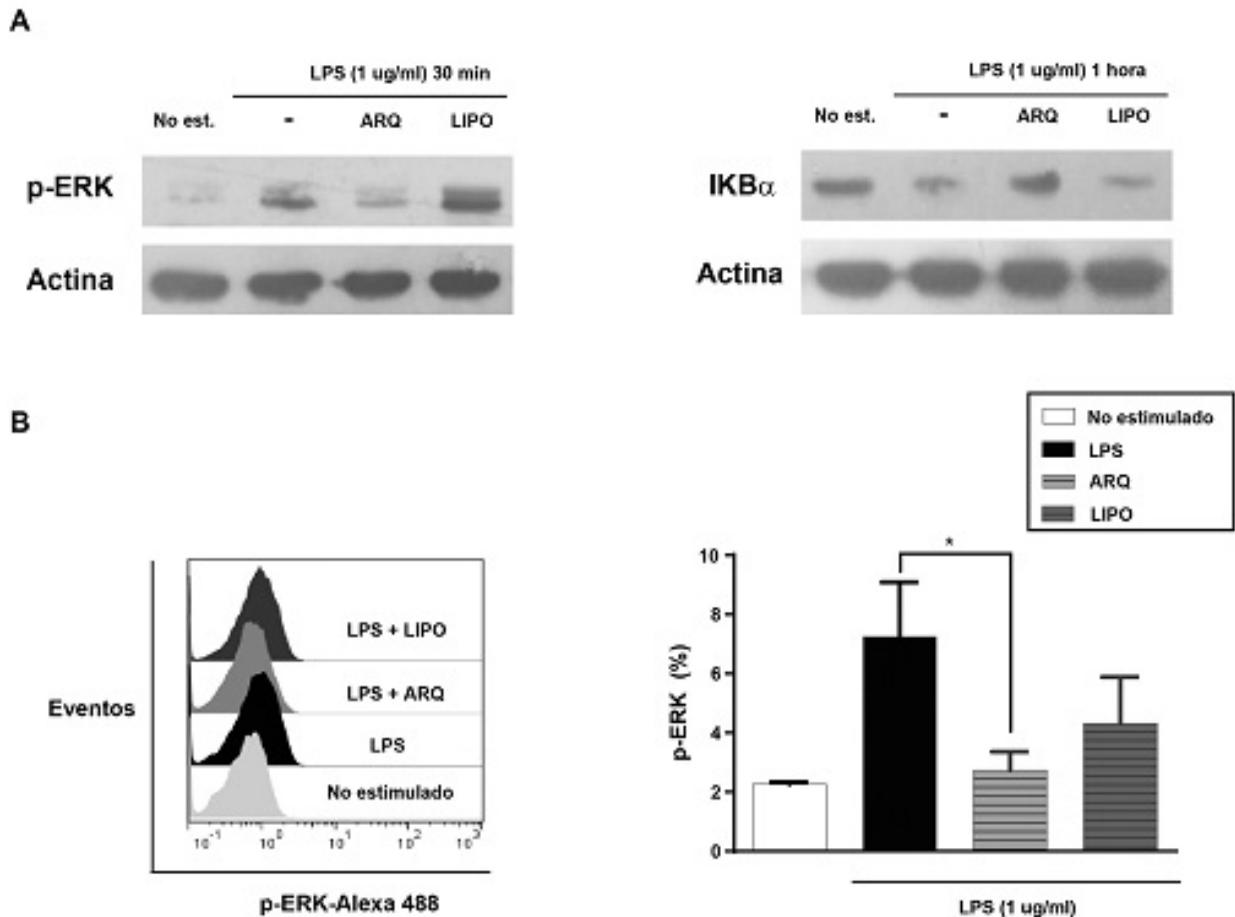


Figura 4. Efecto de las NPs sobre la activación de las vías de señalización inducidas por LPS en HUVECs. A) Las HUVECs se estimularon con LPS en ausencia o presencia de arqueosomas (ARQ) o liposomas (LIPO) durante 30 minutos o 1 hora. Los extractos celulares se analizaron por *Western Blot* para IKB α , p-ERK y actina como control de carga. B) Las HUVECs se estimularon con LPS en ausencia o presencia de nanopartículas durante 30 minutos, se marcaron con anti-p-ERK y analizaron por citometría de flujo. Las imágenes representan tres experimentos independientes. * $p < 0.05$ entre los grupos seleccionados.

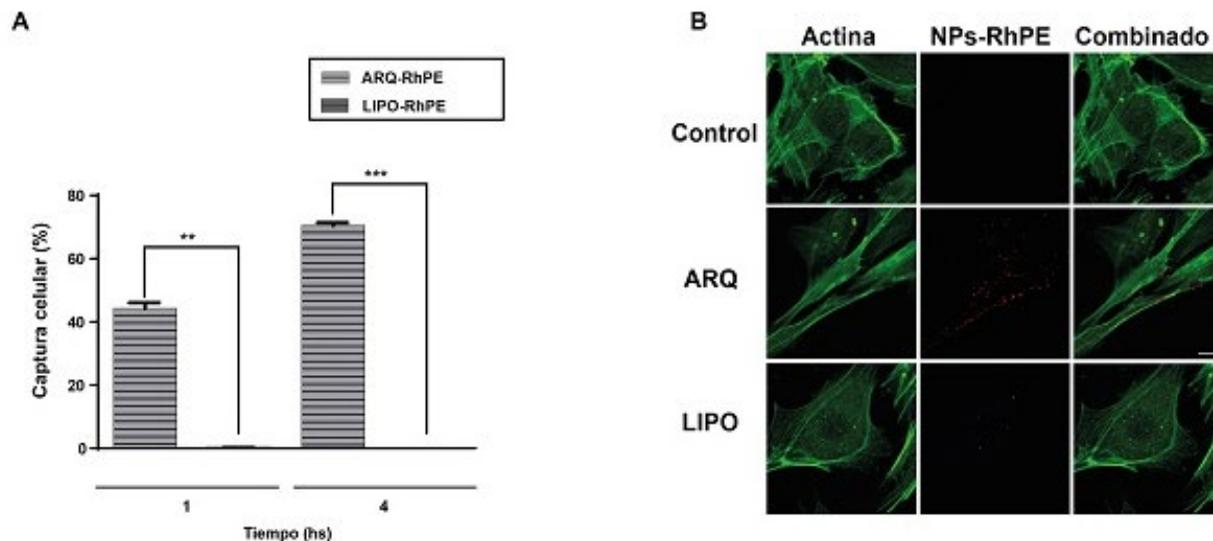


Figura 5. Captación celular de nanopartículas por HUVECs. Las HUVECs se incubaron durante 1 y 4 horas con arqueosomas (ARQ) o liposomas (LIPO) (ARQ-RhPE y LIPO-RhPE). Los ensayos de captación se realizaron mediante (A) citometría de flujo y (B) microscopía confocal. Imágenes representativas muestran nanopartículas-RhPE (rojo) y actina en el citoplasma (verde, tinción con faloidina-FITC). Barras de escala: 10 μ m. ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ entre los grupos seleccionados.

Conflictos de interés: los autores declaran no poseer conflictos de interés.

Bibliografía

1. Lechuga Laura. Nanomedicina: aplicacion de la nanotecnología en la salud. Curso Biotecnol Apl a la Salud Humana [Internet]. 2011;15van. Available from: http://digital.csic.es/bitstream/10261/44635/1/7_Nanomedicina.pdf
2. Bozzuto G, Molinari A. Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:975-99.
3. Jose Morilla M, Mengual Gomez D, Cabral P y col. M Cells Prefer Archaeosomes: An In Vitro/In Vivo Snapshot Upon Oral Gavage in Rats. *Curr Drug Deliv*. 2012;8(3):320-9.
4. Kaur G, Garg T, Rath G, Goyal AK. Archaeosomes: an excellent carrier for drug and cell delivery. *Drug Deliv [Internet]*. 2016;23(7):2497-512. Available from: <http://dx.doi.org/10.3109/10717544.2015.1019653>
5. Benvegnu T, Lemiegre L, Cammas-Marion S. New Generation of Liposomes Called Archaeosomes Based on Natural or Synthetic Archaeal Lipids as Innovative Formulations for Drug Delivery. *Recent Pat Drug Deliv Formul*. 2009;3(3):206-20.
6. Moghimipour E, Kargar M, Handali S. Archaeosomes as means of nano-drug delivery. *Rev Med Microbiol*. 2014;25(2):40-5.
7. Michael A. GJ, Guillermo G-C. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;176(1):139-48.
8. Gonzalez RO, Higa LH, Cutrullis RA y col. Archaeosomes made of Halorubrum tebenquichense total polar lipids: A new source of adjuvancy. *BMC Biotechnol*. 2009;9:71.
9. Altube MJ, Selzer SM, De Farias MA, Portugal RV, Morilla MJ, Romero EL. Surviving nebulization-induced stress: Dexamethasone in pH-sensitive archaeosomes. *Nanomedicine*. 2016;11(16):2103-17.
10. Higa LH, Jerez HE, De Farias MA, Portugal RV, Romero EL, Morilla MJ. Ultra-small solid archaeolipid nanoparticles for active targeting to macrophages of the inflamed mucosa. *Nanomedicine*. 2017;12(10):1165-75.
11. Mena HA, Carestia A, Scotti L, Parborell F, Schattner M, Negrotto S. Extracellular histones reduce survival and angiogenic responses of late outgrowth progenitor and mature endothelial cells. *J Thromb Haemost*. 2016;14(2):397-410.
12. Joyce DE, Grinnell BW. Recombinant human activated protein C attenuates the inflammatory response in endothelium and monocytes by modulating nuclear factor- κ B. *Crit Care Med*. 2002;30(5 SUPPL.).
13. Ben J, Zhu X, Zhang H, Chen Q. Class A1 scavenger receptors in cardiovascular diseases. *Br J Pharmacol*. 2015;172(23):5523-30.
14. Adachi H, Tsujimoto M, Arai H, Inouel K. Expression cloning of a novel scavenger receptor from human endothelial cells. *J Biol Chem*. 1997;272(50):31217-20.
15. Adachi H, Tsujimoto M. Characterization of the human gene encoding the scavenger receptor expressed by endothelial cell and its regulation by a novel transcription factor, endothelial zinc finger protein-2. *J Biol Chem*. 2002;277(27):24014-21.
16. Murshid A, Borges TJ, Lang BJ, Calderwood SK. The scavenger receptor SREC-I cooperates with toll-like receptors to trigger inflammatory innate immune responses. *Front Immunol*. 2016;7(JUN).



Atribución – No Comercial – Compartir Igual (by-nc-sa): No se permite un uso comercial de la obra original ni de las posibles obras derivadas, la distribución de las cuales se debe hacer con una licencia igual a la que regula la obra original. Esta licencia no es una licencia libre.