

## Los liposomas desencadenan nicho de médula ósea de la formación de células de la "foam----omaceno--enfoy-en la hematopoyis en ratones)

Autor enlaza abierta panel de superposición

\*\*\*\*\*

<https://doi.org/10.1016/j.jlr.2022.100273> Obtenga derechos y contenido

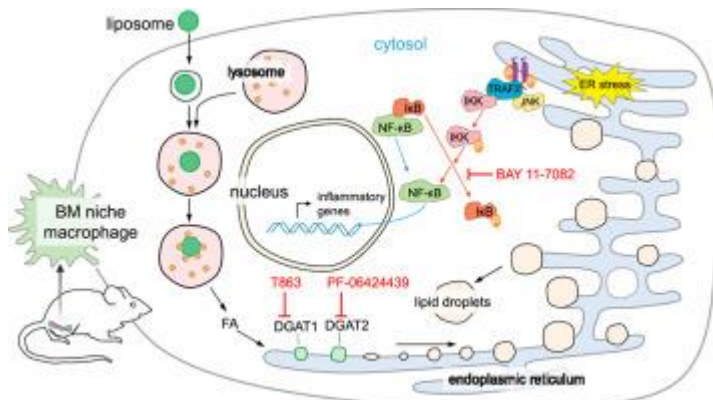
Bajo licencia Creative Commons

acceso abierto

### Resumen

Los liposomas son la plataforma de nanoportadores más utilizada para la entrega de agentes terapéuticos y diagnósticos, y una serie de liposomas han sido aprobados para su uso en la práctica clínica. Después de la administración sistémica, la mayoría de los liposomas son limpiados por macrófagos en el sistema mononuclear de fagocitos, como el hígado y la médula ósea (BM). Sin embargo, la mayoría de los estudios se han centrado en investigar los resultados terapéuticos de los fármacos liposomales, y muy pocos estudios han evaluado los posibles efectos secundarios de los nanocarrileros vacíos en las funciones de los macrófagos en el sistema mononuclear de fagocitos. Aquí, evaluamos los posibles efectos de los liposomas vacíos en las funciones de los macrófagos de nicho de BM. Siguiendo la administración de liposomas, observamos la acumulación de gotitas (LD) en macrófagos primarios cultivados y macrófagos de nicho de BM. Encontramos que estos macrófagos acumulados por LD, similares a las células de espuma, exhibieron una mayor expresión de citocinas inflamatorias, como IL-1 e IL-6. Proporcionamos más bien evidencia de que la deposición y degradación de liposoma indujo la biogénesis LD en la membrana reticular endoplasmática y posteriormente perturbamos la homeostasis endoplasmática y activaron la transmembrana de la vía de señalización de la inositol-requisitoing transmembrana/endoribonuclea 1 $\alpha$ /NF- $\kappa$ B, que es responsable de la activación inflamatoria de los macrófagos después de la engulfmentación de la liposoma. Finalmente, también mostramos los efectos secundarios de los macrófagos disfuncionales de nicho de BM en hematopoyis en ratones, como la promoción de la producción sesgada mieloides y el deterioro de la eritropoyis. Este estudio no sólo llama la atención sobre la seguridad de los medicamentos liposomales en la práctica clínica, sino que también proporciona nuevas direcciones para el diseño de portadores de medicamentos a base de lípidos en estudios preclínicos.

### Resumen gráfico



1. Descargar Descargar [imagen de alta resolución \(220KB\)](#)
2. Descargar Descargar [imagen a tamaño completo](#)

•

- [Artículo anterior articleen cuestión](#)
- [Próximo artículo en cuestión](#)

### Palabras clave suplementarias

Degradación liposoma  
 macrófagos  
 gota de lipídico  
 ERE estrés  
 inflamación estéril  
 efecto secundario  
 nanocarrier  
 Sistema mononuclear de fagocitos  
 citocinas inflamatorias  
 eritropoiesis

### Abreviaturas

BM  
 médula ósea  
 DGAT  
 diacylglycerol aciltransferasa  
 DiD  
 DiIC18(5) sólido (1,1''-dioctadecil-3,3, 3',3'-tetrametilindodicarbocyanina, sal de 4-clorobenzenosulfonato)  
 DiO  
 DiOC18(3) 3,3o-dioctadeliloxacarbocyanina perclorato  
 Urgencias  
 retículo endoplasmico  
 HSC  
 célula tallo hematopoyética  
 IF  
 inmunofluorescencia  
 IRE1.  
 inositol-requisando transmembrana kinase/endoribonucleasa 1  
 LD  
 gota de lipídico  
 LT-HSC  
 HSC a largo plazo  
 LSK  
 Lin<sup>-</sup>Sca1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>  
 MPS  
 Sistema mononuclear de fagocitos  
 NP  
 nanopartículas  
 PFA  
 desformaldehído  
 RT-qPCR  
 PCR cuantitativo en tiempo real  
 TAG  
 triacylglycerol

En las últimas décadas, incontables nanopartículas (PN) han sido diseñadas para la entrega de medicamentos, y varios de estos NP se han aplicado con éxito en la práctica clínica 1(1). Los NPs basados en lípidos son una de las plataformas NP que se utilizan más comúnmente para entregar moléculas pequeñas, ácidos nucleicos, péptidos y tintes de imagen porque estos portadores son considerados portadores de drogas relativamente seguros (2, 33, 44, 55). Entre estos transportistas, los liposomas son el nanocarrier más utilizado y comercializado con éxito. Actualmente, hay más de 20 productos liposomales disponibles en el mercado, como Doxil, DepoCyt y Marqibo 6(6).

Principalmente, los liposomas ayudan a lograr la liberación de drogas controlables o la entrega específica de objetivos. Tras décadas de desarrollo, la especificidad de los sistemas de administración de medicamentos lipomiales en los medicamentos vectores a sitios o células objetivo se ha mejorado significativamente optimizando las propiedades fisicoquímicas y los ligandos superficiales de estos sistemas (6, 77). Sin embargo, después de la administración sistémica, la mayoría de los liposomas son inevitablemente envueltos por macrófagos residentes y otras células fagocíticas en el sistema de fagocitos mononucleares (MPS), como el hígado, el bazo, los pulmones y la médula ósea (8, 9, 10, 11). Son las funciones de estas células fagocíticas en el MPS afectadas después del engulfimiento de la NP? Estudios previos han reportado la influencia de liposomas en la función de las células de Kupffer en el hígado (12, 13, 14). Sin embargo, ninguno de los estudios evaluó el efecto de los liposomas en las funciones de los macrófagos en el BM.

A diferencia del hígado y los pulmones, el BM es el sitio primario de la nueva producción de células sanguíneas (o hematopoyis), y el BM también se llama el suelo fértil que amamenta las células madre hematopoyéticas de las 16seembradas (HSC) (15, 16). Los liposomas también se acumulan en el BM después de la administración sistémica (17, 18); deberíamos considerar que la acumulación de NPs en el BM es una contaminación microambiental del suelo .. En los últimos 10 años, ha habido avances sustanciales en la caracterización de los macrófagos de nicho de BM. Los macrófagos de nicho de BM no son sólo células efectoras del sistema inmunitario innato sino que también participan en el mantenimiento de HSC y maduración eritroide en homeostasis (19, 20, 21, 22). Además, la disfunción de los macrófagos de nicho de BM resulta en hematopoyis anormal, lo que conduce a diversas enfermedades (23, 24, 25, 26). Estudios previos han demostrado que los NPs basados en lípidos inducen una interrupción a largo plazo en las células sanguíneas periféricas (27, 28). Los cambios en las células sanguíneas periféricas se correlacionan con la disfunción de los macrófagos de nicho de BM después de engullir NPs basados en lípidos?

Para cerrar esta brecha de conocimiento, estudiamos los efectos de la absorción de liposomas en las funciones de macrófago y la hematopoyis de BM. Encontramos que los macrófagos cultivados in vitro adquieren un fenotipo proinflamatorio después de la absorción de liposomas. Estas características también se observan en los macrófagos de nicho de BM de ratones después de la administración sistémica de liposoma. Con la ayuda de varios inhibidores, demostramos que la gota lipídica (LD) anormal induce estrés retículo endoplasmático (ER) y regula la expresión de genes proinflamatorios a través de la vía de señalización NF- $\kappa$ B. Finalmente, investigamos cómo los macrófagos de nicho de BM disfuncionales afectan la hematopoyis después de la administración de liposoma. Juntos, estos hallazgos indican que los liposomas inducen la activación proinflamatoria de los macrófagos de nichos BM y afectan aún más su capacidad para regular la hematopoyesis. Este estudio no sólo llama la atención sobre la seguridad de las nanomedicinas en la práctica clínica, sino que también proporciona nuevos enfoques para el diseño de portadores de medicamentos a base de lípidos para su uso en estudios preclínicos.

## **Materiales y métodos**

### **Animales**

Los ratones masculinos C57BL/6 fueron obtenidos de Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co Ltd. Los ratones tenían 6 o 8 semanas cuando se usaron en estos experimentos. El Comité de Ética de Investigación Animal de la Universidad Médica de Xuzhou aprobó todos los procedimientos experimentales.

### **Cultura y estimulación de células primarias**

Una suspensión unicelular de BM se preparó limpiando la cavidad del BM. Luego se cultivaron células BM de ratón en medio completo RPMI-1640 que contenían 10% desnaturalizado FBS, penicilina-streptomina (100 U/ml) y 50 ng/ml factor de macrófago de ratón recombinante (catalogo no: 576404; BioLegend) durante 6 días, y suplementado con factor de macrófago de estimulación de colonias en el día por cambio de medio fresco. El día 6, se cosecharon macrófagos para su posterior identificación y experimentos.

Para la estimulación in vitro, se mantuvieron macrófagos en completo medio RPMI-1640 suplementado con 100 ng/ml lipopolisaccharide (catálogo: L4391; Sigma-Aldrich), 50 ng/ml IFN- $\gamma$  (catalogo no.: 575302;

BioLegend), o 50 ng/ml IL-4 (catálogo no: 574304; BioLegend) para 24 h. En algunos experimentos, los macrófagos se trataron con 20 M T863 y 20 M PF-06424439 o 10 M BAY 11-7085. Los inhibidores indicados fueron comprados a MedChemExpress.

### Citometría de flujo

Las células estaban manchadas con los anticuerpos indicados durante 30 min en el amortiguador de clasificación de células activado por fluorescencia de la fluorescencia (PBS suplementado con 2% FBS). Se utilizaron los siguientes anticuerpos: APC anti-mouse F4/80 (BM8; BioLegend), FITC anti-mouse F4/80 (BM8; BioLegend), BV421 anti-mouse CD11b (M1/70; BioLegend), APC anti-mouse CD86 (GL-1; BioLegend), PE/Cyanine7 anti-mouse CD206 (C068C2; BioLegend), PE anti-mouse CD71 (RI7217; BioLegend), FITC anti-mouse Ter119 (TER-119; BD), FITC anti-mouse CD11b (M1/70; BioLegend), PE anti-mouse Gr-1 (RB6-8C5; BD), PE-Cy7 anti-mouse CD150 (TC15-12F12.2; BD), BV421 anti-mouse CD48 (HM48-1; BioLegend), PE anti-mouse c-Kit2 (ACK2; BD), y APC anti-mouse Sca-1 (W18174A; BD; BD). Para el análisis cuantitativo de LD, las células fueron incubadas en medio RPMI-1640 suplementado con 1 g/ml BODIPY 493/503 durante 30 min en incubadora de 37°C. Luego, las células fueron lavadas y usadas para la citometría de flujo. Las dobles y las células muertas fueron excluidas sobre la base de la dispersión delantera y la distribución lateral de dispersión y la exclusión 7-AAD (BioLegend). Los datos fueron adquiridos por citometría de flujo en un analizador de células LSRFortessa™ (BD Biosciences) y analizados con FlowJo, versión 10.1 (Tree Star).

### Preparación de liposomas

Los liposomas fueron preparados por el método de inyección de etanol descrito antes (2929). Brevemente, 10 mg de fosfolípidos (1-*o*-fosfatidilolína de la soja; CAS no: 8002-43-5; Aladdin) y 5 mg de colesterol (no CAS: 57-88-5; Aladdin) se disolvieron en etanol de 500 l. La fase orgánica resultante se añadió desnivel a 4 ml de PBS con 100 rpm/min revuelo. Luego, el disolvente orgánico fue retirado por ultracentrifugación de la suspensión de liposoma a 14.000 rpm para 1 h. Los precipitados obtenidos se dispersaron en PBS y se almacenaron a 4°C. La contaminación por endotoxina en la solución de liposoma almacenada fue evaluada por el método cromogénico de liméfo amilacitos. Los niveles de endotoxina de dos lotes representativos de liposomas preparados fueron de 0.0139 y 0.0121 unidades de endotoxina/ml, respectivamente. Después de la dilución con agua, el tamaño de las partículas y el potencial zeta de los liposomas fueron medidos por un Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Reino Unido). Para DiD (DiIC18(5) sólido [1,1'-dioctadecil-3,3, 3'',3''-tetrametilindocarbocana, sal de 4-clorobencenosulfonato]) liposomas cargados de 4-clorobenceno ] o DiO (DiOC18(3) liposomas cargados de 3,3'-dioctadecoxacarbocyanine perclorado), la solución de carga DiD (o DiO) se añadió a la solución etanol.

### Extracción de ARN y PCR cuantitativa

El ARN total se extrajo de macrófagos y se purificó usando TRIzol™ Reagent (catálogo: 15596026; Invitrogen). La transcripción inversa de las transcripciones de ARN en ADN complementario se realizó con el PrimeScript™ RT Reagent Kit (catalog no.: RR037A; TaKaRa). Se realizaron ensayos cuantitativos de PCR en tiempo real (RT-qPCR). Se determinaron los niveles de transcripción con 2X Universal SYBR Green Fast qPCR Mix (catálogo no.: RK21203; ABclonal) usando el Sistema LightCycler 480 (Roche). Los niveles de expresión de los genes diales se normalizaron con el del gen *de* la limpieza. Además, la expresión génica relativa del grupo tratado se normalizó con la del grupo control para obtener el cambio relativo de la expresión.

Todos los primeros fueron sintetizados por GENEWIZ, y sus secuencias fueron las siguientes: "*actin*, 5'-GTGATTTTCATCCGTAGAGA-3" (adelar) y 5'-GCCGGACTCATCGTACTCC-3 (reversar); *CD86*, 5'-TCAATGGGCHCATATCTGCC-3 (adelar) y 5'-GCCAAAATACCACATCACTTCACT-3 (reverse); *CD206*, 5'-CTCTGTTCTCTCTATTGGGGGGGGGGGGGGGACGC-3 (adelar) y 5'-TGGCACTCCACAAACATAATTTGA-3 (reversa); *Arg1*, 5'-CATTGGCTTGAGAGACAGAC-3 (adelza) y 5'-GCTGAGAGTCTCTTCTCCACC-3 (reversa); *NOS2*, 5'-GAGACAGGAGAGAAGCAC-3 (adel-lugar) y 5'-CCCACAGTTTTTCTCTCTCTTC-3 (reversación); *IL-6*, 5'-TACCACTTCAACAAGTCGGAGGC-3 (adelar) y 5'-CTGCAAGTGTTTTTTTTTC-3 (revers); *IL-1*, 5'-GAAATGCCACCTTGAGAGTGTG-3- (adelar) y 5'-TGATATCTCTCATCAGGAGG-3- (reversación); *DGATI*, 5'-GGAATCCCCGTACAA-3 (adelar) y 5'-CATTTGCTGCCATCGTGTC-3 (adelgaza- (reverse); *DGATI*, 5'-GGAATATCCCCGCACAA-3 (adelgaza) y



se dividen por una Leica criostata (Leica, Alemania). La mitad de los huesos fueron lavados con PBS para eliminar OCT y bloqueados con 2% BSA durante 30 minutos. Los anticuerpos primarios fueron incubados durante la noche a 4°C, seguidos por los anticuerpos secundarios durante 2 h a temperatura ambiente, y Hoechst 33342 durante 30 min a temperatura ambiente. Después de la incubación, los huesos se lavaron dos veces con PBS para obtener imágenes. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: anticuerpo monoclonal antimouse enclonal (eBioV.7C7; Invitrogen) y anticuerpo antiratú FITC.

### **Imágenes confocal**

Las imágenes fueron adquiridas utilizando un microscopio confocal de fluorescencia Zeiss LSM 880 (Zeiss, Alemania) con láseres fijos (405, 488, 561, y 633 nm). Adquirimos BODIPY493/503, imágenes de DiO, o FITC en 488 nm excitación, Hoechst 33342 o BV421 imágenes en 405 nm excitación, y imágenes de APC o DiD en 633 nm excitación. Posteriormente se importaron imágenes al software ImageJ (Institutos Nacionales de Salud) para su análisis.

### **Biodistribución in vivo de liposomas**

Para mapear la biodistribución in vivo de los liposomas, los liposomas cargados de DiD (25 µg DiD por ratón) fueron inyectados por vía intravenosa en los ratones. El día 1 después de la inyección de liposomas, los huesos fueron cosechados para la obtención de imágenes de fluorescencia por el IVIS-Lumina S5TM (PerkinElmer).

### **Análisis de sangre periférica y conteo de números de células BM**

Se recolectó sangre periférica en tubos que contenían EDTA. Los recuentos de glóbulos se obtuvieron con un analizador de hematología (Mindray, China). Para contar las células BM, las células BM fueron procesadas para generar suspensiones unicelulares. Los números totales de células BM se determinaron usando un analizador de hematología (Mindray). El número de diferentes tipos de células en el BM se calculó sobre la base del conteo de células BM y el análisis de citometría de flujo con marcadores apropiados.

### **Análisis estadístico**

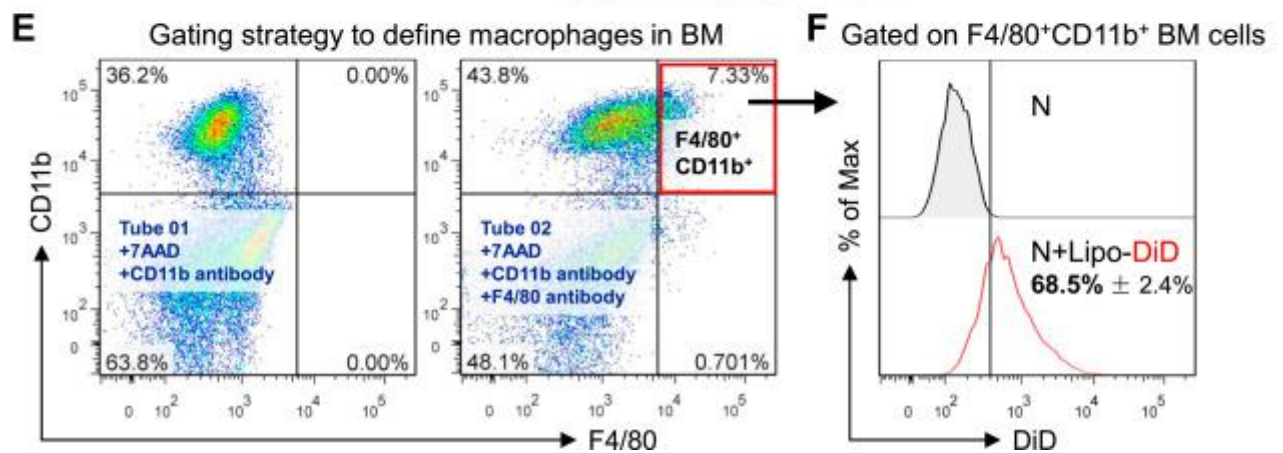
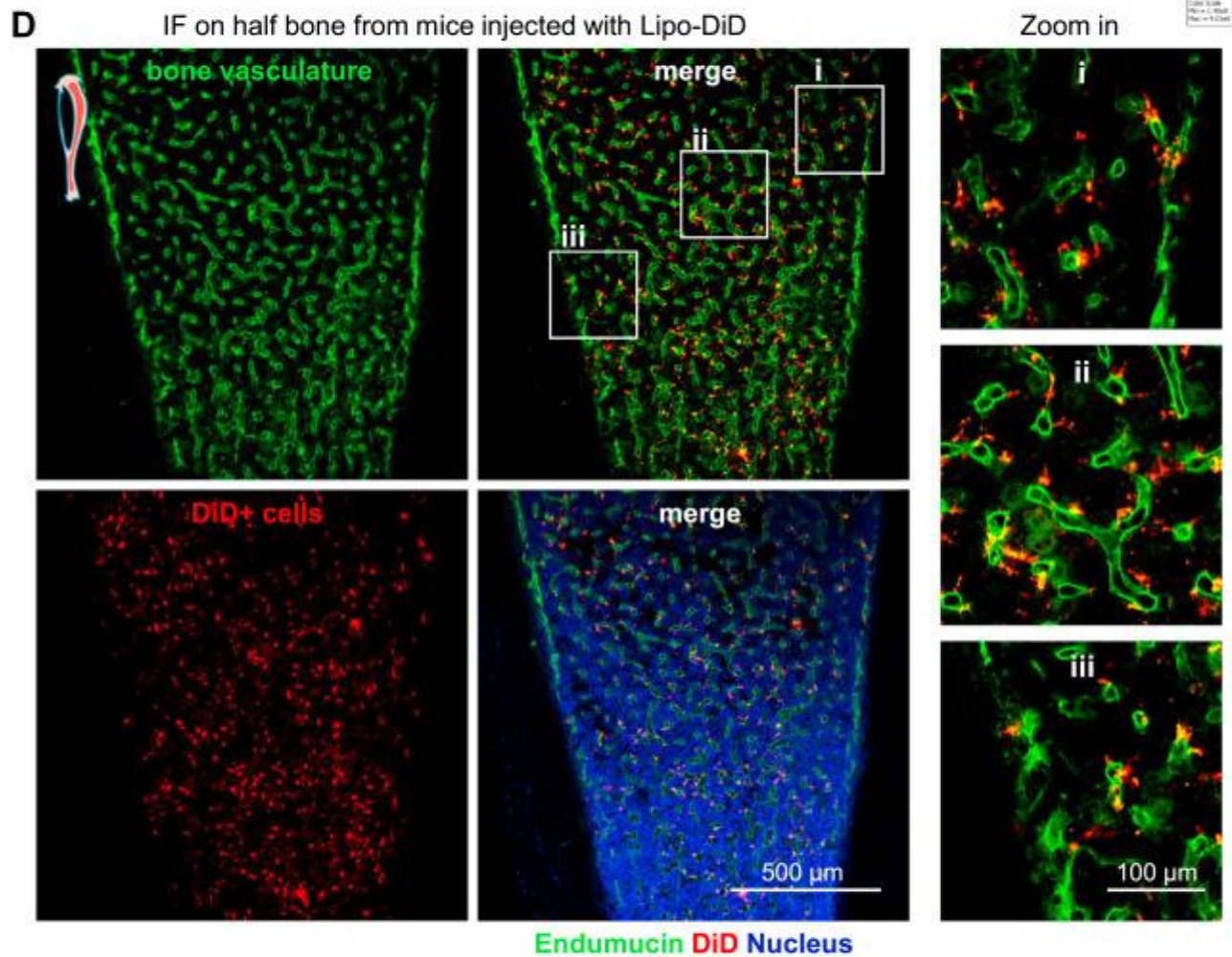
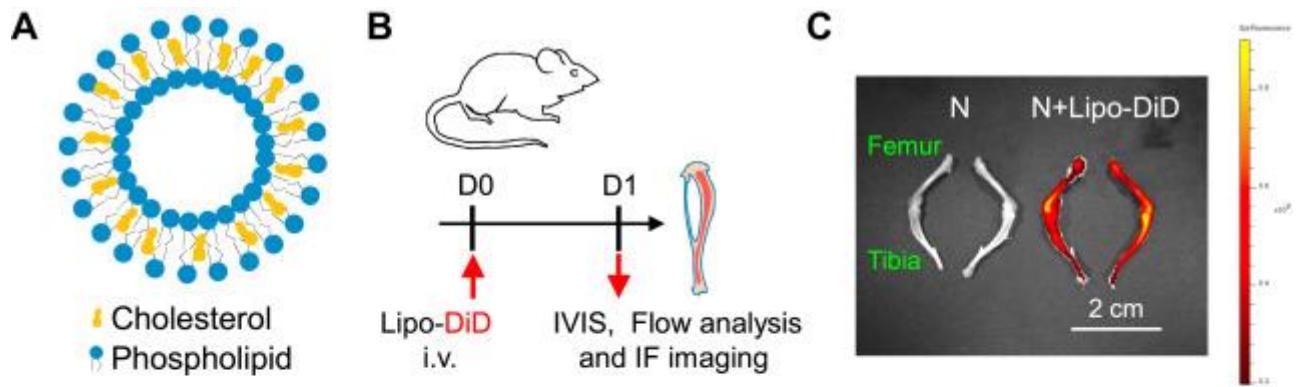
Los datos fueron analizados con el software GraphPad Prism (versión 8.0; GraphPad Software, Inc). Las comparaciones para dos grupos se calcularon usando los *t*-test de estudiantes de dos colas sin emparejar, se calcularon comparaciones de más de dos grupos utilizando ANOVA unidireccional con múltiples pruebas de comparación. Los datos se probaron para la distribución normal antes de su análisis. Los datos se presentan como la media ± SD. Las diferencias se consideraron significativas cuando los valores de *P* estaban por debajo de 0,05.

## **Resultados**

### **Los macrófagos de nichos de BM envuelven liposomas tras administración sistémica**

Para evaluar los posibles efectos secundarios de los liposomas, preparamos liposomas por el método de inyección de etanol en este estudio (2929). Los principales componentes de los liposomas son el fosfolípido natural y el colesterol (Fig. 1 A). Se ha demostrado que las propiedades fisicoquímicas, incluyendo el tamaño, la carga y la composición lipídica, afectan la eficiencia de la focalidad de las células (30). La mayoría de los materiales clínicos son de tamaño medio (de 10 a 300 nm de diámetro) (5, 77). En este estudio, el diámetro medio de los liposomas fue de aproximadamente 160 nm (fig. 1 A), y el potencial de zeta media era de aproximadamente 5,9 mV cuando los liposomas se disolvieron en agua (fig. 1 B).





1. Descargar: [Descargar imagen de alta resolución \(3MB\)](#)
2. Descargar [imagen a tamaño completo](#)

Fig. 1. Los liposomas se acumulan en macrófagos de nicho de BM después de la administración sistémica. R: Estructura escématica de liposomas. B: Configuración experimental. Los liposomas se inyectaron por vía intravenosa en las venas de rabo de ratones. El día 1 después de la inyección de lipooma, se cosecharon huesos para su análisis. C: Representar imágenes del sistema de imágenes in vivo de huesos de ratones normales (N) y ratones normales inyectados con liposomas cargados de DiD (N . Lipo-DiD). D: IF se utilizó para investigar la distribución de liposomas cargados de DiD en los huesos después de la inyección sistémica; Endomucina (color verde), DiD (color rojo), núcleos (color azul, Hoechst 33342); la barra de escala representa 500 mimos. E: Estrategia de clasificación para la cuantificación de los macrófagos de nicho de BM. F: Se utilizó un citómetro de flujo para evaluar la intensidad de fluorescencia DiD de F4/80 y <sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> células <sup>de</sup> médula ósea en ratones después de la inyección de liposoma cargada de DiD. Los datos se calcularon a partir de ratones individuales (n = 3). Todos los experimentos se repitieron al menos dos veces, y se muestran resultados representativos.

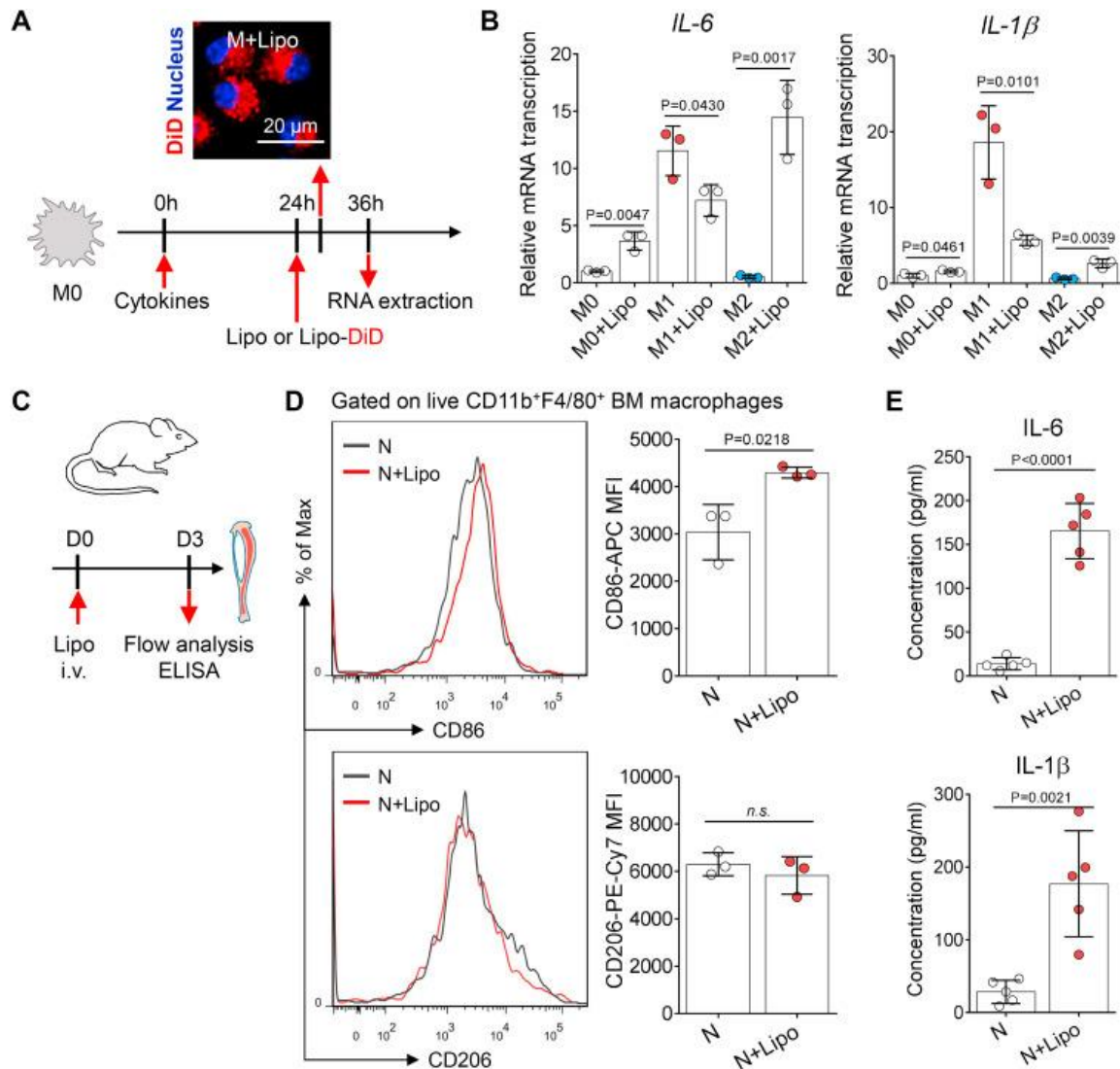
Para evaluar la biodistribución de los liposomas in vivo, los liposomas fueron etiquetados con el tinte de carbocínina lipófila (DiD) (Fig. 1 B). Utilizando un sistema de imágenes in vivo, se detectaron fuertes señales de fluorescencia DiD en los huesos de los ratones el primer día después de la inyección sistémica (fig. 1 C). Estos resultados sugieren que los liposomas cargados de DiD fueron envueltos por células BM. A continuación, investigamos la distribución de liposomas en el BM en una resolución unicelular. El BM es un tejido altamente vascularizado en el que la vasculatura de BM trabaja en coordinación con otras células estromales perivasculares para apoyar y regular la hematopoyis (15, 1616). Imágenes de inmunofluorescencia mostraron que muchas células perivasculares fueron etiquetadas con el tinte DiD (Fig. 1 D). Se utilizó citometría de flujo para determinar la identidad de estas células DiD positivas. Encontramos que la mayoría de las células DiD positivas eran positivas para marcadores de macrófagos (CD11b y F4/80) (fig subesuprmental. S1 C). Además, aproximadamente el 70% de los macrófagos de nicho de BM positivo CD11b<sup>-</sup> y F4/80 fueron manchados con el tinte DiD (Fig. 1 E, F). Estos resultados indicaron que una alta proporción de macrófagos de nicho de BM envolvió los liposomas después de la administración sistémica. Los macrófagos de nicho de BM juegan un papel fundamental en la regulación de la hematopoyis de BM; sin embargo, el efecto del engullimiento liposome en las funciones de nicho de macrófagos BM no se ha aclarado claramente.

### **La absorción de lipooma induce la activación proinflamatoria de macrófagos in vitro e in vivo**

Para investigar el efecto de la absorción de lipoomas en las funciones de macrófagos, utilizamos células BM de ratón para desarrollar macrófagos primarios (figupcional. S2 A, B). Aquí, desarrollamos dos subtipos de macrófagos activados (proflamatorios M1 y antiinflamatorios M2) de macrófagos ingenuos (M0) usando diferentes citocinas (3131) (fija subplemental. S2 A). Los resultados de RT-qPCR mostraron que los macrófagos M1 presentaron altos niveles de expresión *CD86* y *NOS2*, mientras que los macrófagos M2 tienen expresión elevada de *CD206* y *Arginase-1* (fija subsuprmental. S2 C), indicando que los macrófagos ingenuos se habían polarizado con éxito en los estados de activación como se esperaba.

A continuación, administramos liposomas para activar macrófagos in vitro. Usando microscopía confocal, encontramos que los macrófagos envolvieron liposomas cargados DiD 2 h después de la administración (Fig. 2 A). Los resultados de RT-qPCR mostraron que los macrófagos M2 tratados con lipoomas habían aumentado la expresión génica de marcadores M1 (como *CD86* y *NOS2*) y disminución de la expresión génica de marcadores M2 (como *CD206* y *Arginase-1*) (fija subplemental. S2 D). Estos hallazgos indicaron que la absorción de lipoomas provocó la repolarización de macrófagos M2 hacia el fenotipo proinflamado. Tanaka y otros. (32) reportaron hallazgos similares, a saber, que los liposomas regulan la expresión de CD80 y CD86 en células dendríticas desinquisivas de BM. Además, la absorción de liposoma elevó la expresión génica de citocinas proinflamatorias (*IL-6* e *IL-1*) en macrófagos M2 (Fig. 2 B).





1. Descargar: [Descargar imagen de alta resolución \(869KB\)](#)
2. Descargar [imagen a tamaño completo](#)

Fig. 2. La administración de lipooma induce la activación inflamatoria de los macrófagos. A: Panorama escénica de los procedimientos experimentales. Imágenes representativas de la deposición de lipooma (color rojo, DiD) en macrófagos (color azul, núcleo). La dosis de liposomas para el tratamiento in vitro de células fue de 1 mg/ml. La barra de escala representa 20 mimos. B: Doce horas después de la administración de lipoomas, se utilizó RT-qPCR para evaluar la expresión de genes *IL-6* e *IL-1* en macrófagos activados. Un punto representa los datos de macrófagos derivados de un ratón ( $n = 3$ ). C: Configuración experimental. El día 3 después de la inyección intravenosa de lipooma, se cosecharon huesos para su análisis. D: Se utilizó citometría de flujo para evaluar la expresión del marcador de superficie (CD86 y CD206) de F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>BM macrófagos de ratones normales (N) y ratones normales inyectados con liposomas (N + Lipo). Fluorescencia CD86 y CD206 (MFI) en macrófagos de nicho BM no tratados o aquellos tratados con liposomas. Los puntos representan datos de ratones individuales ( $n = 3$ ). E: Niveles de las citocinas inflamatorias indicadas en el líquido extracelular del BM de los ratones después de la administración de liposome. Los puntos representan datos de ratones individuales ( $n = 5$ ). Todos los experimentos se repitieron al menos dos veces, y se muestran resultados representativos. MFI, intensidad de fluorescencia mezquina.

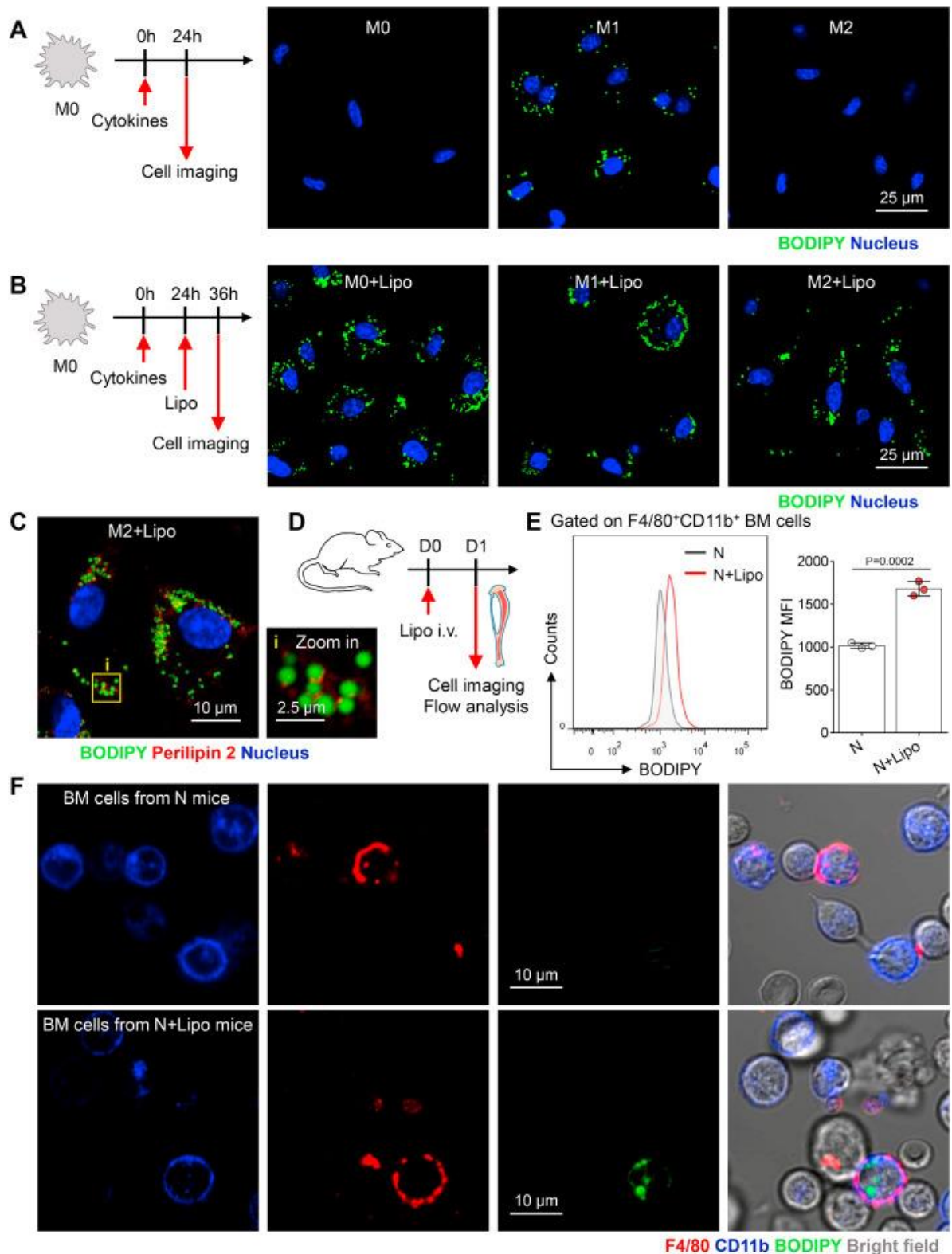
Para investigar si el efecto de la absorción de lipoomas en la activación del macrófago sigue siendo significativo in situ, también analizamos los cambios en la expresión de marcadores de superficie en macrófagos de BM antes/después de la administración de lipoomas (Fig. 2 C). Los resultados de la citometría de flujo mostraron que la administración de lipoomas regulaba la expresión proteica de CD86

en macrófagos de nicho de BM (Fig. 2 D). Los cambios en la expresión del marcador de superficie CD206 en macrófagos de nicho de BM no fueron significativos (Fig. 2 D), que podría ocurrir debido a la retención de marcadores 33proteicos (33). También analizamos los niveles de citocinas proinflamatorias en el fluido extracelular del BM de los ratones tratados con lipooma. Los resultados de ELISA mostraron que los niveles de IL-6 e IL-1 en el fluido extracelular BM se incrementaron significativamente después de la administración de liposomas (Fig. 2 E). Demostramos que después de la extravasación, la mayoría de los liposomas fueron envueltos por macrófagos de nicho BM (Fig. S1 C). Por lo tanto, el aumento de las citocinas proinflamatorias en el líquido extracelular del BM podría resultar de la activación proinflamatoria de los nichos de BM macrofagos después de la absorción de lipoomas. En general, estos hallazgos sugieren que la absorción de lipooma induce la activación proinflamatoria de macrófagos in vitro e in vivo. Sin embargo, se necesitan nuevos experimentos para investigar cómo la absorción de lipoomas apoya la activación proinflamatoria de los macrófagos M2.

### **Macrófagos tratados con lipoomas exhibe acumulación de LD in vitro e in vivo**

Las células de la espuma son macrófagos M2 cargados de grasa, y pueden secretar citocinas proinflamatorias para mantener el microambiente inflamatorio local en los sitios de lesiones (34, 35, 36). Inspirados por la formación de células de espuma, especulamos que la degradación del lipooma y sus cascadas podrían correlacionarse con la activación inflamatoria de los macrófagos M2 después de la administración de lipoomas.

Similar a las composiciones de los LDLs, un liposoma es una vesícula esférica que contiene fosfolípidos y moléculas de colesterol. Anteriormente, descubrimos que a diferencia de los NP no lipídicos, los liposomas podían inducir la formación de LD en macrófagos. En este estudio, el tinte BODIPY se utilizó para manchar LDs en macrófagos antes/después de la administración de lipoomas. Usando microscopía confocal, encontramos que los macrófagos M1 exhibieron mayor acumulación de LD que los macrófagos M0 y macrófagos M2 activados antes de la administración de liposomas (Fig. 3 A), que era coherente con los informes anteriores (37, 38). La administración de liposomas indujo acumulación de gotitas positivas con BODIPY en macrófagos M0 y M2, produciendo macrófagos parecidos a las células de espuma (Fig. 3 B). Perilipin 2 (también conocido como adipophilin) es una proteína asociada a la LD y localizada exclusivamente en la superficie de los LDs (39,39). Imágenes de inmunofluorescencia mostraron que las gotitas positivas de BODIPY en macrófagos M2 tratados con lipoomas también fueron positivas para perilipin 2, confirmando su identidad LD (Fig. 3 C). Además, encontramos que otro liposoma comercial (que contiene fosfatidilcolina y colesterol, proporcionado por Liposoma BV) también indujo la formación de LD e inflamación estéril en macrófagos M2 (Fig. S3 A, B). Esto es consistente con estudios previos que muestran que varios NPs basados en lípidos que contienen diferentes fosfolípidos inducen eficientemente acumulación de LD en macrófagos (40, 41).



1. Descargar: [Descargar imagen de alta resolución \(1MB\)](#)
2. Descargar [imagen a tamaño completo](#)

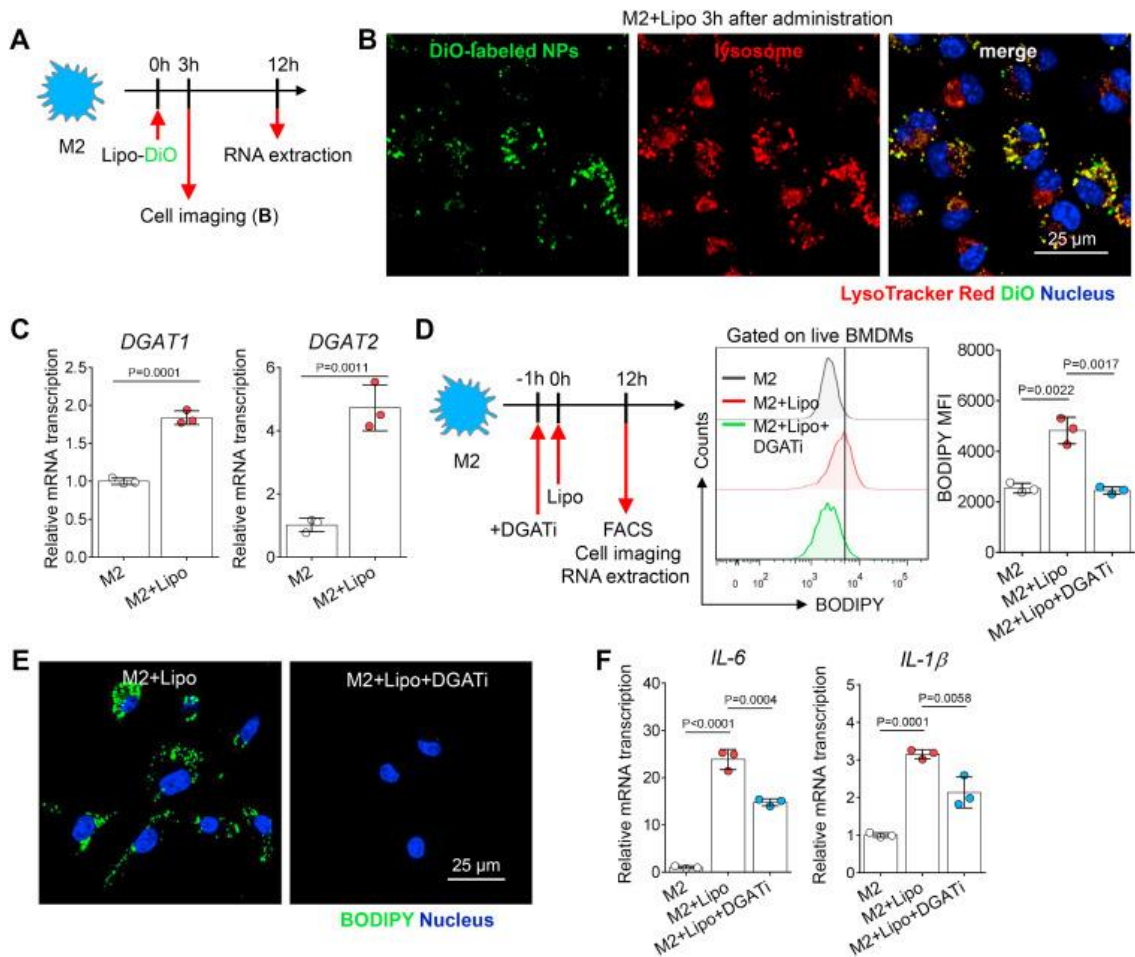
Fig. 3. La administración de liposoma induce la acumulación de LD en macrófagos. R: Configuración experimental. Imágenes representativas de microscopía confocal de LDs (color verde, BODIPY) y núcleos (color azul, Hoechst 33342) en macrófagos antes de la administración de liposoma. La barra de escala representa 25 micras. B: Configuración experimental. Imágenes representativas de microscopía confocal de fluorescencia de LDs (color verde, BODIPY) y núcleos (color azul, Hoechst 33342) en

macrófagos después de la administración de lipoomas. La barra de escala representa 25 micras. C: Edítomenos de microscopía confocal de fluorescencia representativas de LDs (color verde, BODIPY), perilipin 2 (color rojo) y núcleos (color azul, Hoechst 33342) en macrófagos después de la administración de lipoomas. La barra de escala representa 10 micras. D: Configuración experimental. El día 1 después de la inyección intravenosa de lipooma, los huesos se cosecharon para su análisis. E: Se utilizó citometría de flujo para evaluar la intensidad de fluorescencia BODIPY de F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> BM macrófagos de ratones normales (N) y ratones normales inyectados con liposomas (N . Lipo). Bodipy 493/503 fluorescencia (MFI) en macrófagos de nicho BM no tratada o aquellos tratados con liposomas. Los puntos representan datos de ratones individuales (n = 3). F: Imágenes representativas de fluorescencia de LDs en macrófagos de nicho de BM después de inmunocitoquímica (ICC) y tinción BODIPY gratuita. Morfología celular (color gris, campo brillante), LDs (color verde, BODIPY), F4/80 (color rojo) y CD11b (color azul). La barra de escala representa 10 micras. Todos los datos mostrados fueron representativos de dos carreras independientes de experimentos. Todos los experimentos se repitieron al menos dos veces, y se muestran resultados representativos. MFI, intensidad de fluorescencia mezquina.

Para investigar si los LDs se acumulan en macrófagos de nicho de BM después de la administración sistémica de lipooma, se cosechó BM para preparar una suspensión unicelular el día 1 después de la administración; estas células fueron manchadas con tinte BODIPY para su análisis (Fig. 3 D). Los resultados de la citometría de flujo mostraron que los <sup>+</sup>macrófagos de BM F4/80 y CD11b de ratones inyectados en lipooma tenían una intensidad de fluorescencia BODIPY más alta que las de ratones normales (Fig. 3 E). Morfológicamente, usando microscopía confocal, encontramos que F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> BM macrófagos acumulados LDs después de la inyección de lipooma (Fig. 3 F). Colectivamente, estos datos sugieren que la absorción de lipooma desencadena la biogénesis LD en macrófagos in vitro e in vivo, pero aún se desconoce si esto contribuye a la reactivación de los macrófagos.

### **La biogénesis de LD contribuye a la inflamación del macrófago tras el engullimiento lipooma**

Los LDs son cada vez más reconocidos como actores dinámicos en la regulación inmune (42, 43). Estudios recientes han demostrado que los macrófagos mejoran la biogénesis LD para apoyar la defensa del huésped cuando se expone a estímulos inflamatorios, como parásitos, bacterias y virus (44, 45, 46). Para dilucidar la relación entre la degradación del lipooma y la formación de LD en macrófagos, el tinte de LysoTracker Red se utilizó para manchar lisosomas en macrófagos M2 después de la administración de lipooma cargada de DiO (Fig. 4 A). Usando microscopía confocal, encontramos que las vesículas etiquetadas con DiO se solaparon con LysoTracker Los lisosomas positivos de rojo (Fig. 4 B), indicando que los liposomas se acumularon en lisosomas después de la endocitosis. Este hallazgo es consistente con un informe anterior de que los liposomas son ingeridos por macrófagos vía endocitosis, y los endoomas se fusionan posteriormente con lisosomas que contienen fosfolipasas (47). Las fosfolipasas lisosomal pueden interrumpir las bicapas de lipoomas y hidrolize fosfolípidos para producir ácidos grasos libres (4848), proporcionando los ingredientes comunes para la formación de LD en macrófagos.



1. Descargar: [Descargar imagen de alta resolución \(976KB\)](#)
2. Descargar [imagen a tamaño completo](#)

Fig. 4. La formación LD se correlaciona con la activación inflamatoria de los macrófagos. R: Configuración experimental. Los liposomas cargados de DiO se administraron a macrófagos cultivados in vitro; 3 h después de la administración de liposomas, los macrófagos se contratenían con LysoTracker Red y Hoechst 33342. B: Imágenes confocales de liposomas etiquetadas y lisosomas en macrófagos; liposomas (color verde, DiO), lisosomas (color rojo, LysoTracker), y núcleos (color azul, Hoechst 33342); la barra de escala representa 25 micras. C: Doce horas después de la administración de liposomas, se utilizó RT-qPCR para evaluar la expresión génica *DGAT1* y *DGAT2* de macrófagos M2. Un punto representa los datos de macrófagos derivados de un ratón (n = 3). D: Configuración experimental. Los macrófagos fueron analizados 12 h después de la administración de liposoma en presencia o la ausencia de inhibidores de la DGAT. Luego, se utilizó citometría de flujo para evaluar la intensidad de fluorescencia BODIPY de macrófagos M2 después del tratamiento (M2, M2 - Lipo, M2 - BODIPY 493/503 fluorescencia (IMP) en macrófagos no tratados o en los tratados con liposomas e inhibidores. Un punto representa los datos de macrófagos derivados de un ratón (n = 3). E: Imágenes confocal confocal de flujo reconecence de LDs (color verde, BODIPY) y núcleos (color azul, Hoechst 33342) en macrófagos de M2 después del tratamiento (M2 y lipo, M2 - lipo y DGATi). La barra de escala representa 25 mimos. F: RT-qPCR se utilizó para evaluar la expresión génica *IL-6* e *IL-1β* de macrófagos M2 después del tratamiento (M2, M2 - Lipo, M2 - DGATi). Un punto representa los datos de macrófagos derivados de un ratón (n = 3). Todos los experimentos se repitieron al menos dos veces, y se muestran resultados representativos. MFI, intensidad de fluorescencia mezcló.

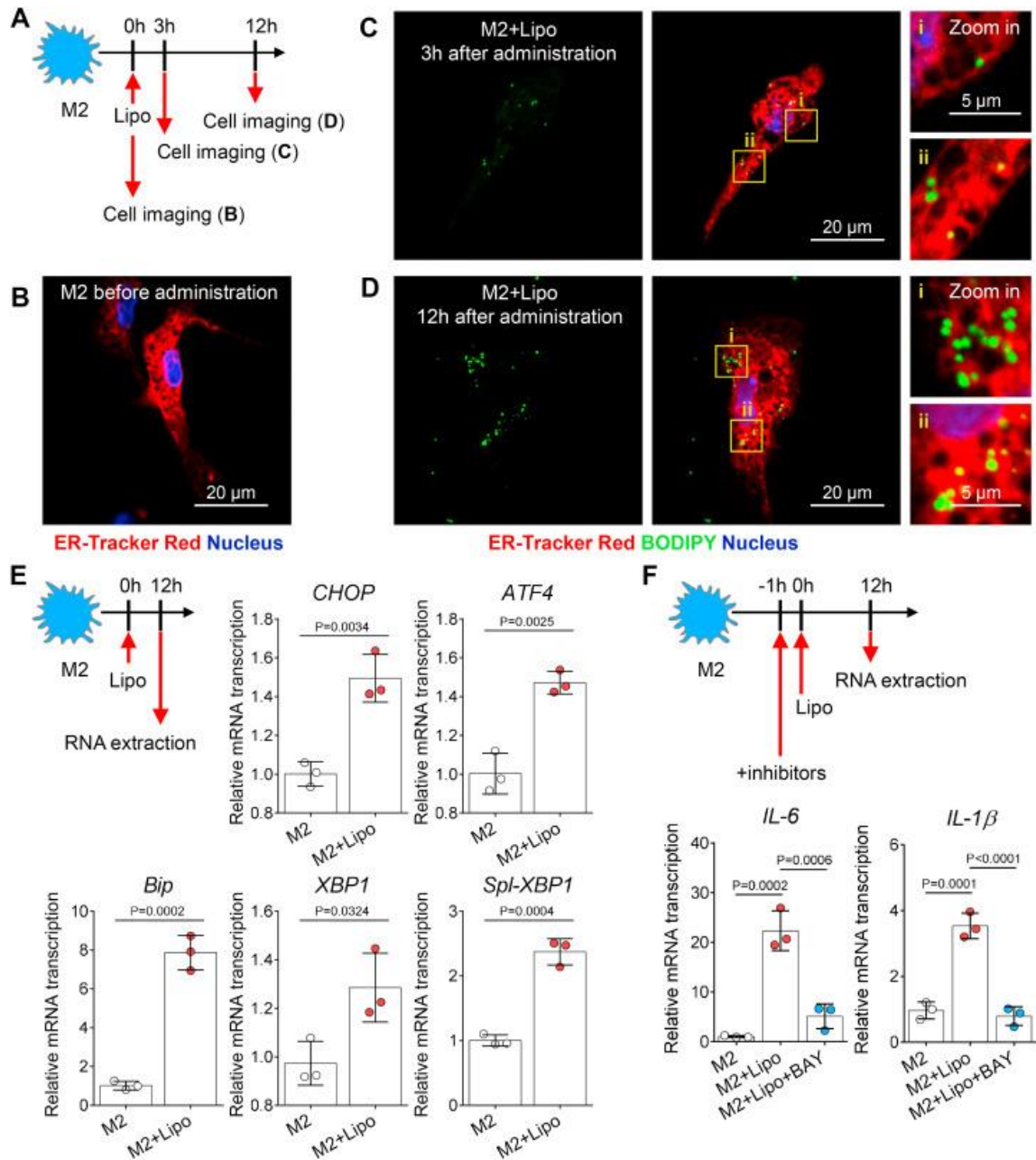
Triacylglycerols (TAG) son los principales componentes de las enzimas LDs, y acyl-CoA:diacylglycerol aciltransferasa (DGAT) son las únicas enzimas comprometidas con la biosíntesis de TAG (4949). También investigamos la expresión génica relativa de enzimas responsables de la biogénesis LD. Utilizando RT-qPCR, encontramos que la expresión génica de *DGAT-1* y *DGAT-2* fue elevada en macrófagos tratados con liposoma, lo que indica que estos macrófagos habían mejorado las capacidades de

biogénesis LD (Fig. 4 C). Castoldi y *otros.* (3838) encontró que la inhibición de la síntesis de TAG suprime la producción de citocinas inflamatorias, como IL-1 e IL-6. Para determinar el papel de la síntesis de TAG en la producción de citocinas proinflamatorias, se utilizó un inhibidor de la DGAT1 (T863) y un inhibidor de la DGAT2 (PF-06424439) para pretratar macrófagos bajo administración de lipoomas (fig. 4 D). Los resultados de la microscopía confocal y la citometría de flujo mostraron que los inhibidores de la DGAT suprimieron el desarrollo y la acumulación de LD (Fig. 4 D, E) y la expresión de genes en macrófagos tratados con liposomas ( F). En conjunto, los datos indican que el desarrollo de LDs soporta la activación proinflamatoria de los macrófagos M2 después de la absorción de lipoomas.

### **La biogénesis LD inducida por la deposición del lipooma inicia el estrés de la ER en macrófago y regula la expresión génica proinflamatorio**

La formación LD se produce en el lado citoplasmático de la membrana de Urgencias (5050). Urgencias suministra la mayoría de las moléculas necesarias para la biogénesis LD (4949). En este estudio, el tinte de ER-Tracker se utilizó para manchar la ERE en macrófagos M2 antes/después de la administración de lipoomas (fig. 5 A, B). Utilizando microscopía confocal, encontramos que unos pocos LDs se superpusieron con los túbulos de Urgencias 3 h después de la administración de lipoomas, mientras que algunos LDs más grandes dejaron Urgencias y fueron distribuidos en el citoplasma 12 h después de la administración de lipoomas (fig. 5 C, D). Estos datos demuestran que la biogénesis LD inducida por liposomas se produce en la membrana de Urgencias.





1. Descargar: [Descargar imagen de alta resolución \(1MB\)](#)
2. Descargar Descargar [imagen a tamaño completo](#)

Fig. 5. La biogénesis LD inducida por el liposome interrumpe la homeostasis de ER en macrófagos. R: Configuración experimental. Los liposomas se administraron a macrófagos de cultivo in vitro; 3 h y 12 h después de la administración de liposomas, los macrófagos se contratan con BODIPY, ER-Tracker Red y Hoechst 33342. B: Emoción confocal de flujo divisor de imágenes de Urgencias (color rojo rojo de ER) y núcleos (color azul, Hoechst 33342) en macrófagos antes de la administración de liposome. La barra de escala representa 20 micras. C, D: Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia representativas de LDs (color verde, BODIPY), ER (color rojo ER-Tracker) y núcleos (color azul, Hoechst 33342) en macrófagos 3 h o 12 h después del tratamiento con liposoma. La barra de escala representa 20 micras. E: Configuración experimental. RT-qPCR se utilizó para evaluar el gen relacionado con el estrés de Urgencias (*CHOP*, *ATF4*, *ATF4*, *Bip*, *XBP1* y *Spl-XBP1*) en macrófagos M2 después del tratamiento (M2, M2 y Lipo). Un punto representa los datos de macrófagos derivados de un ratón (n = 3). F: RT-qPCR se utilizó para evaluar la expresión génica *IL-6* e *IL-1* de macrófagos M2 después de 12 h de tratamiento con liposoma en presencia o la ausencia de inhibidores de la NF-B (M2, M2 y Lipo, M2 y

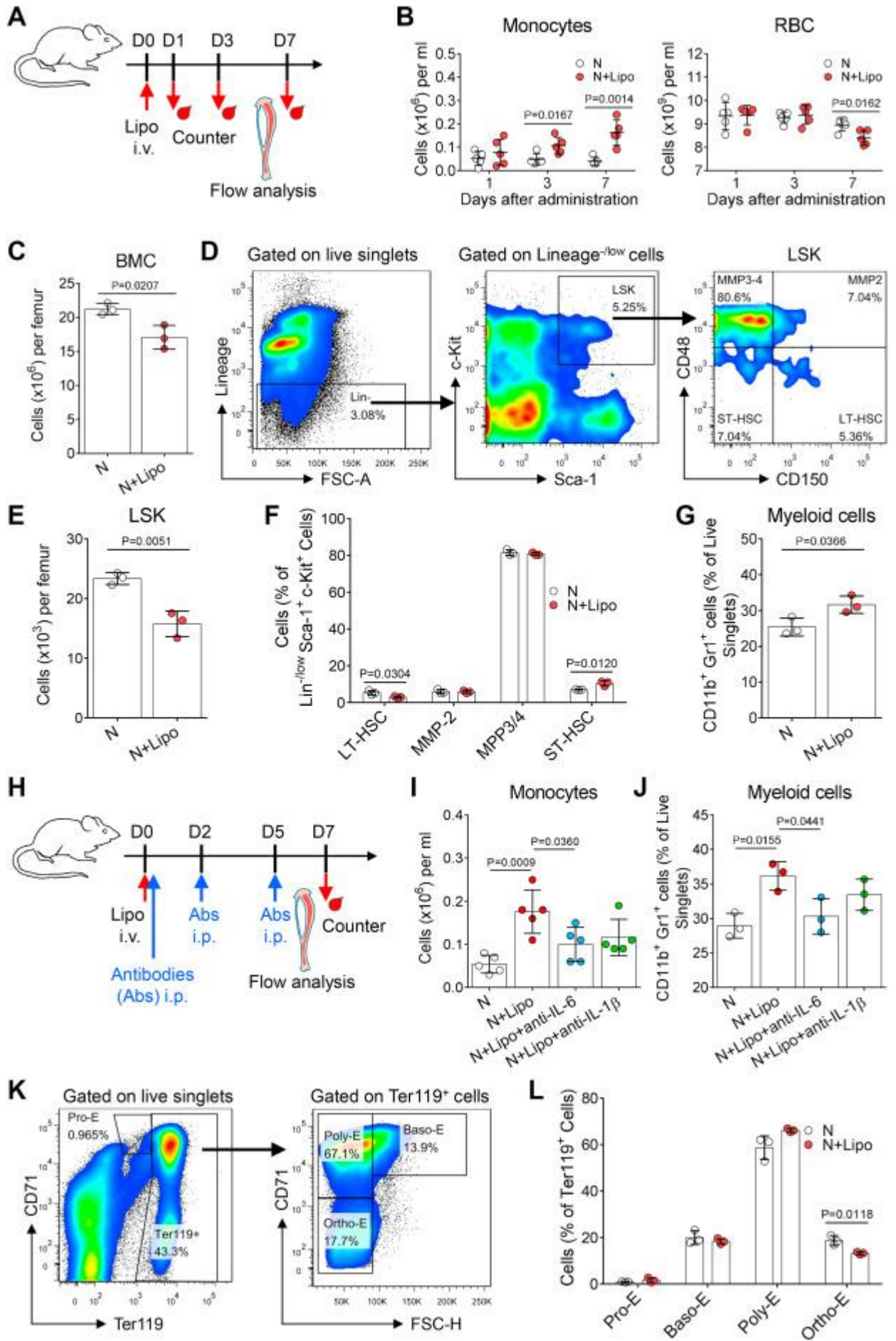
Lipo y Lipo y BAY). Un punto representa los datos de macrófagos derivados de un ratón (n = 3). Todos los experimentos se repitieron al menos dos veces, y se muestran resultados representativos.

Los estresores fisiológicos y patológicos interrumpen la homeostasis ER, y esto se conoce como estrés de Urgencias. Por ejemplo, la incorporación anormal de lípidos en Urgencias puede contribuir al inicio del estrés de la ERE (51, 52). La acumulación de evidencia sugiere que el estrés de la ERE es una de las características de las células de espuma que se encuentran en las placas ateroscleróticas (53, 54). La expansión de Urgencias es un sello distintivo del estrés de Urgencias (5555). En este estudio, también encontramos que la absorción de lipooma desencadena la expansión de Urgencias en macrófagos M2 (Fig. 5 B, D), indicando que el desarrollo de LD podría inducir estrés de Urgencias. La señalización de estrés de ER se produce a través de la activación de tres sensores de transmembrana de ER, y estas vías de señalización activan los programas transcripción de kinase/doribonuclea de ER (IRE1 $\alpha$ ) mediado, activando el factor de transcripción 6 (ATF6) y proteína-cinasa cinasa (PERK) programas de transcripción programado de ER mediate (5656). Para verificar esta hipótesis, evaluamos la homeostasis de Urgencias y el estrés antes/después de la administración de lipoomas. Utilizando RT-qPCR, los marcadores de las vías de señalización de estrés de Urgencias se expresaron en niveles más altos en macrófagos después de la absorción de lipoomas (Fig. 5 E), indicando que el tratamiento con lipooma indujo el estrés de las ERE y activó las vías del sensor de Urgencias en macrófagos M2.

Diferentes líneas de investigación han revelado que las vías activadas por el estrés de las Urgencias pueden iniciar una inflamación estéril (5656). En respuesta al estrés de Urgencias, la vía mediada por IRE1 inicia la degradación de I-B y conduce a la activación de NF-B. El NF-B activado migra al núcleo e induce la transcripción de genes 57inflamatorios, como TNF- $\alpha$ , IL-1 y IL-6 (57). A continuación, investigamos si el estrés de Urgencias está involucrado en la reactivación de los macrófagos tratados con lipooma. BAY 11-7082 es un inhibidor de la fosforilación y el NF-B (5858). Después del tratamiento con BAY 11-7082, la expresión génica de citocinas proinflamatorias en macrófagos tratados con lipoomas se bloqueó significativamente (Fig. 5 F). Se hace evidente que la absorción de lipooma desencadena la activación inflamatoria del macrófago a través de la vía de ERE de ER mediada por estrés de Urgencias-NF-B.

### **Macomas de nicho de BM disfuncionales afectan a la hematopoyis tras la entrega sistémica de lipooma**

A continuación, investigamos el efecto de los macrófagos tratados con lipoomas en la hematopoyis de BM (Fig. A). Los cambios en los recuentos de células sanguíneas periféricas son indicativos de la dinámica HSC en el nicho de BM. Curiosamente, encontramos que los liposomas indujeron cambios a largo plazo en los recuentos de células sanguíneas periféricas, como un aumento del número de monocitos y un número disminuido de glóbulos rojos (Fig. 6 B y Fija suplementaria. S4 A). Estos resultados indican que podría haber una perturbación persistente del nicho de BM HSC después de la administración de lipoomas sistémicos.



1. Descargar: [Descargar imagen de alta resolución \(1MB\)](#)
2. Descargar [imagen a tamaño completo](#)

Fig. 6. Los macrófagos de nicho de BM disfuncionales afectan a la hematopoyis tras la entrega de lipoomas. R: Configuración experimental. Los huesos y las muestras de sangre periférica se recolectaron para su análisis en los puntos de tiempo indicados después de la inyección de lipooma. B: Cambios en los recuentos de glóbulos rojos y en células sanguíneas de sangre periférica después de la administración de lipoomas. Los puntos representan datos de ratones individuales (n = 5). C: El número de células nucleadas de BM en los fémures de los ratones 7 días después de la administración de lipoomas. Los puntos representan datos de ratones individuales (n = 3). D: Estrategia de referencia para la cuantificación de <sup>+</sup> las celdas de LSK (Lin c-Kit - Scal-1 -). E: El número de células LSK en los fémures de los ratones 7 días después de la administración de lipoomas. Los puntos representan datos de ratones individuales (n = 3). F: El porcentaje de LT-HSCs, HSC a corto plazo, células MPP2 y MPP3/4 en la población de células LSK. Los puntos representan datos de ratones individuales (n = 3). G: El porcentaje de <sup>+</sup> células de Gr-1 de CD11b en la población celular nucleada de BM. Los puntos son datos de ratones individuales (n = 3). H: Configuración experimental. Los ratones fueron inyectados con liposomas y luego tratados con bloqueo anti-IL-6, bloqueo anti-IL-1 en los puntos de tiempo indicados, o sin tratamiento (control). Luego se recolectaron huesos y muestras de sangre periférica para su análisis. I: Cambios en los recuentos de monocitos de sangre periférica después de la administración de lipoomas y el tratamiento de anticuerpos. Los puntos representan datos de ratones individuales (n = 5). J: El porcentaje de <sup>+</sup> células de CD11b y Gr-1 en la población celular nucleada de BM después de la administración de liposomas y el tratamiento con anticuerpos. Los puntos representan datos de ratones individuales (n = 3). K: Estrategia de calificación para la cuantificación de proerythroblasts (Pro-E), basofotos eritroblas (Baso-E), eritofos eritos policromaticos (Poly-E), y eripitallas eritrobrás orto-otors (Ortho-E) en parcelas de citometría de flujo de células individuales de CD71 y Ter119 manchadas. L: El porcentaje de células Pro-E, Baso-E, Poly-E y Ortho-E en células de BM Ter119 . . . . . Los puntos representan datos de ratones individuales (n = 3). Todos los experimentos se repitieron al menos dos veces, y se muestran resultados representativos.

Para verificar esta hipótesis, investigamos la dinámica de las células BM el día 7 después de la administración de lipoomas. Se encontró una disminución significativa en el número total de células nucleadas de BM en ratones tratados con lipooma (Fig. 6 C). A continuación, analizamos los HSC y las células <sup>+</sup> progenitoras hematopoyéticas (Lin Scal - c-Kit y LSK) en el BM (Fig. 6 D) (5959). En comparación con los ratones no tratados, se redujo el porcentaje y el número absoluto de células LSK totales en ratones tratados con lipooma (Fig. 6 E y Fija suplementaria. S4 B). Las células LSK se pueden subdividir en HSCs a largo plazo (LT-HSCs), HSCs a corto plazo, MPP2 (celular progenitor multipotente), y MPP3/4 (Fig. 6 D) (6060). Los ratones tratados con liposomas tenían un porcentaje disminuido de LT-HSC y un porcentaje mayor de HSC a corto plazo en la población de células LSK (fig. 6 F). Además, el número absoluto de LT-HSC totales en el BM de ratones tratados con lipoomas disminuyó significativamente (fig. 6 F), indicando que la homeostasis HSC fue interrumpida después de la entrega de lipooma.

Además de HSCs/células progenitoras hematopoyéticas, también analizamos otras células sanguíneas en el BM. Encontramos que el porcentaje de <sup>+</sup> células mieloides CD11b - Gr-1 entre células BM nucleadas se incrementó significativamente después de la administración de lipoomas (Fig. 6 G). Estos datos indicaban que la administración lipooma inducía la diferenciación y salida sesgada de mieloides, lo que era consistente con los hallazgos del recuento de sangre periférica (Fig. 6 B). Se ha demostrado que IL-6 e IL-1 regula la diferenciación mieloides (61, 62, 63, 64). Es el aumento del nivel de IL-6 y/o IL-1 en el fluido extracelular del BM un factor que explica la diferenciación mieloides después de la administración de lipoomas? Para verificar esta hipótesis, se inyectó a ratones con liposomas y luego se les trató con bloqueo anti-IL-6, bloqueo anti-IL-1, o sin tratamiento (control) (fig. 6 H). En comparación con el grupo control, los ratones tratados con lipooma que recibieron bloqueo IL-6 mostraron un número reducido de monocitos de sangre periférica y porcentaje de células mieloides BM, mientras que estos ratones que recibieron bloqueo de IL-1 no mostraron cambios generales (fig. 6 I, J), indicando que el nicho de nicho de BM IL-6 en lugar de IL-1 promovió la diferenciación mieloides de una manera paracrina después de la administración de liposomas.

Para investigar el efecto de la macrófago BM inducida por lipoomas disfuncional en la eritropoyesis, se utilizaron Ter119 y CD71 para mapear el desarrollo de eritroblast (Fig. 6 K). Utilizando la citometría de flujo, encontramos que la inyección de lipooma redujo notablemente el porcentaje de eritroblastos

ortocromatic entre las células Ter119 (Fig. 6 L), indicando que la maduración eritemoid tardía fue bloqueada. Una disminución significativa en el número absoluto de eritroblastos ortocromáticos se observó después de la administración de lipoomas (figa desparpamental. S4 D). Los resultados del recuento de glóbulos sanguíneos periféricos mostraron que la administración de lipooma redujo el número de glóbulos rojos maduros en el torrente sanguíneo (Fig. 6 B), que es consistente con los hallazgos de los análisis de BM. En conjunto, estos datos sugieren que los macrófagos de BM disfuncionales afectan la hematopoyis después de engullir los liposomas.

## Debate

Los liposomas han sido ampliamente estudiados para la entrega de diferentes tipos de medicamentos, como ácidos nucleicos, fármacos moleculares y reactivos diagnósticos. Afortunadamente, algunas de estas plataformas NP han resultado en formulaciones de fármacos que han alcanzado el desarrollo clínico (1). Aunque los liposomas son engullidos por las células dialis después de su administración sistémica, la mayoría de los liposomas son aclarados por macrófagos en el MPS, como el hígado, el bazo, el BM y los ganglios linfáticos (7). Los macrófagos del MPS también forman parte del sistema inmunitario innato, que ha planteado la cuestión de si la absorción de lipoomas por células fagocíticas afecta sus funciones. Se han realizado múltiples estudios de seguridad *in vitro* (6565); sin embargo, hay muy pocos estudios que se hayan centrado en el tóxico de los portadores de drogas en macrófagos en el MPS *in vivo* (66, 67).

Un liposoma es una vesícula esférica que contiene lípidos, similar a las composiciones de LDL. Los macrófagos envuelven la LDL y forman células de espuma en las paredes de los vasos sanguíneos, y sus funciones inmunitarias críticas se disminuyen simultáneamente (68). Mostramos que la absorción de lipooma indujo la formación de LD en los macrófagos, dándoles un aspecto celular de espuma. Este resultado es consistente con los hallazgos de Fujita *et al.* (40, 41). Se ha demostrado que las modificaciones en los números de LD y la composición de la proteína LD se correlacionan con los cambios en la función de las células inmunes, como la activación de células mieloides (4242). El presente estudio reveló que la formación de LD fue responsable de la activación inflamatoria de los macrófagos después de la absorción de lipoomas. Además, este estudio también reveló la importancia central del estrés de Urgencia inducido por biogénesis de LD en la activación inflamatoria de los macrófagos tratados con lipooma.

A diferencia de otros órganos MPS, el BM es el sitio principal de la hematopoyis. Desde otro punto de vista, el BM es el suelo fértil que enferma a los HSC. Los macrófagos de nicho de BM juegan papeles cruciales en la maduración esteroide y el mantenimiento de HSC en homeostasis (20, 2121, 69). La disfunción de los macrófagos de nicho de BM resulta en hematopoyis anormal y en diversas enfermedades (23, 24). En este estudio, encontramos que la administración de lipoomas provocó la activación proinflamatoria de los macrófagos de nicho de BM y afectó la hematopoyis, por ejemplo, causando la producción mezclada y la eritropoyis disemulada. Nuestros resultados son consistentes con otros informes que muestran que IL-6 e IL-10 son reguladores particularmente importantes de diferenciación mieloides que funcionan de manera paracrina (61, 62, 63, 64). Podría haber varias razones que expliquen la eritropoyis deteriorada. En primer lugar, se ha demostrado que los macrófagos proinflamatorios son disfuncionales en el reciclaje de hierro y la fagocitosis (70). Además, se ha demostrado que la IL-6 limita la disponibilidad de hierro a los eritroblastos durante las etapas de la síntesis de hemoglobina (71, 72). Estos hallazgos despiertan nuestra atención a la aplicación de NPs basados en lípidos en la práctica clínica, especialmente para pacientes con infección o disfunción hematopoyética de BM. Además, los recuentos de células sanguíneas periféricas son un índice importante para el diagnóstico clínico. Se observaron cambios persistentes en los recuentos de células sanguíneas periféricas después de la administración de lipoomas, que deben tenerse en cuenta cuando los pacientes reciben nanoformulaciones liposomales.

## Conclusión

Aquí, investigamos los posibles efectos adversos de los liposomas en la hematopoyis. La absorción de lipooma induce la formación de células de la factorumaza y activación inflamatoria *in vitro* e *in vivo*. Proporcionamos además evidencia de que la degradación del lipooma después del engullido del lipooma causa la formación y acumulación de LD en macrófagos, y el estrés de Urgencias mediado por biogénesis de LD está involucrado en la activación inflamatoria de los macrófagos. Además, también mostramos el



efecto de macrófagos de nicho disfuncionales de BM en hematopoyis en ratones. En conjunto, este estudio llama la atención sobre la seguridad de las nanomedicinas en la práctica clínica.

### **Disponibilidad de datos**

Todos los datos están incluidos en el artículo.

### **Datos complementarios**

Este artículo contiene datos complementarios.

### **Conflicto de intereses**

Los autores declaran que no tienen conflictos de intereses con el contenido de este artículo.

### **Reconocimientos**

Este trabajo fue apoyado por la concesión de la Fundación de Ciencias Naturales de la Provincia de Jiangsu (subvención: BK20210906 y BK20210912), la concesión de la Fundación de Ciencias Naturales de las Instituciones de Educación Superior de la Provincia de Jiangsu (convenida no.: 21KJB32000421KJB320004), la subvención inicial de la Universidad Médica de Xuzhou (subvención: D2020057 y D2021004), y la concesión de la Fundación Nacional de Ciencias Naturales de China (subvención: 31872795 y

### **Contribuciones de autor**

Y. L. conceptualización; Y. H. y H. K. metodología; R. Software Y.; K. Y. e Y. D. validación; R. Y., M. R. y H. K. investigación; M. R., K. Y., Y. D. y H. K. recursos; Y. L. writing-original draft; S. Y., W. J., J. P., K. X., y L. Z. writing-review & edición; L. Z. supervisión; Y. L., Y. H., y L. Z. financiación de la adquisición.

### **Datos complementarios**

Descargar: [Descargar documento de Word \(1MB\)](#)

Figuras S1 S4

### **Referencias**

1. 1
2. 2

Y. Liu, L. Wang, Q. Canción, M. Ali, W.N. Crowe, G.L. Kucera, *et al.*

La nanoimmunoterapia intrapleural promueve respuestas innatas y adaptativas inmunes para mejorar la terapia anti-PD-L1 para el derrame pleural maligno

Nat. Nanotechnol., 17 (2022), pp. 206 a 216

Búsquetca de Google

- 3

M. Li, Y. Li, S. Li, L. Jia, H. Wang, M. Li, *et al.*

Los sistemas de nanoentrega y aplicaciones de mRNA

Eur. J. - Med. Chem., 227 (2022), p. 113910

Búsquetca de Google



• 4

K. Paunovska, D. Loughrey, J.E. Dahlman  
Sistemas de administración de medicamentos para la terapia de ARN  
Nat. Rev. Genet., 23 (2022), pp. 265 a 280  
Búsqueda de Google

• 5

R. Weissleder, M. Nahrendorf, M.J. Pittet  
Macrófagos de imagen con nanopartículas  
Nat. Mater., 13 (2014), pp. 125 a 138  
Búsqueda de Google

6

R. Tenchov, R. Bird, A.E. Curtze, Q. Zhou  
nanopartículas limpiadas-desde liposomas hasta la entrega de vacunas de ARNm, un panorama de  
diversidad y avance de la investigación  
ACS Nano (28 de junio de 2021), 10.1021/acsnano.1c04996  
Epub delante de la impresión  
Búsqueda de Google

• 7

L. Sercombe, T. Veerati, F. Moheimani, S.Y. Wu, A.K. Sood, S. Hua  
Avances y desafíos de la distribución de medicamentos asistidos por liposoma  
Frente. Pharmacol., 6 (2015), p. 286  
Búsqueda de Google

• 8

Y. Tang, X. Wang, J. Li, Y. Nie, G. Liao, Y. Yu, *et al.*  
Superar la barrera del sistema reticuloendotelial a la entrega de medicamentos con una estrategia de "no-  
eat-us"  
ACS Nano, 13 (2019), pp. 13015-13026  
Búsqueda de Google

• 9

- S. Yona, S. Gordon  
Del sistema reticuloendotelial a mononuclear de fagocitos - los años no contabilizados  
Frente. Immunol., 6 (2015), p. 328  
Búsqueda de Google

• 10

T. Ishida, M. Ichihara, X. Wang, H. Kiwada  
El bazo juega un papel importante en la inducción de la limpieza sanguínea acelerada de liposomas  
PEGyled  
J. Control Release, 115 (2006), pp. 243-250  
Búsqueda de Google

• 11

T. Ishida, S. Kashima, H. Kiwada  
La contribución de la actividad fagocítica de los macrófagos hepáticos al fenómeno acelerado del  
aclaramiento sanguíneo (ABC) de liposomas PEGylated en ratas  
J. Control Release, 126 (2008), pp. 162-165  
Búsqueda de Google

• 12

J. Li, C. Chen, T. Xia  
Comprensión de las interacciones nanomateriales-híbridas para facilitar el desarrollo de nanoaplicaciones  
más seguras  
Adv. Mater., 34 (2022), Artículo 2106456  
Búsqueda de Google

• 13

H.H. Gustafson, D. Holt-Casper, D.W. Grainger, H. Ghandehari  
Toma de administración de nanopículas: el problema de los fagocitos  
Nano Today, 10 (2015), pp. 487 a 510  
Búsqueda de Google

• 14

J. Szebeni, S.M. Moghimi  
Liposoma de las respuestas inmunes innatas: una perspectiva de beneficios y reacciones adversas  
J. Liposome Res., 19 (2009), pp. 85-90

Búsqueda de Google

• 15

S.J. Morrison, D.T. Scadden

El nicho de médula ósea para células madre hematopoyéticas

Naturaleza, 505 (2014), pp. 327 a 344.

Búsqueda de Google

• 16

X. Gao, C. Xu, N. Asada, P.S. Frenette

El nicho de células madre hematopoyéticas: de embrión a adulto

Desarrollo, 145 (2018), Artículo 139691

Búsqueda de Google

• 17

A. fiscal. Hume

El sistema mononuclear de fagocitos

Curr. Opin. Immunol., 18 (2006), pp. 49-53

Búsqueda de Google

• 18

A.M. Buiting, F. Zhou, J.A. Bakker, N. van Rooijen, L. Huang

Biodistribución de clodronato y liposomas utilizados en el enfoque 'suicidio' de macrófago mediado en el liposoma

J. Immunol. Métodos, 192 (1996), pp. 55 a 62

Búsqueda de Google

• 19

A. Chow, D. Lucas, A. Hidalgo, S. Méndez-Ferrer, D. Hashimoto, C. Scheiermann, *et al.*

Los macrófagos de médula ósea CD169 promueven la retención de células madre hematopoyéticas y progenitoras en el nicho de células madre mesenquimales

J. Expe. Med., 208 (2011), pp. 261 a 271

Búsqueda de Google

• 20

L. Bennett, M. Mumau, N.A. Espectamiento

Macrófagos fertilizan el suelo para promover el crecimiento de células hematopoyéticas

Inmunidad, 50 (2019), pp. 1342-1344

Búsqueda de Google

• 21

A. Chow, M. Huggins, J. Ahmed, D. Hashimoto, D. Lucas, Y. Kunisaki, *et al.*

Los macrófagos CD169 proporcionan un nicho de promoción de la eritropoyesis bajo homeostasis y estrés

Nat. Med., 19 (2013), pp. 429-436

Búsqueda de Google

• 22

I.G. Winkler, N.A. Sims, A.R. Pettit, V. Barbier, B. Nowlan, F. Helwani, *et al.*

Los macrófagos de médula ósea mantienen nichos de células madre hematopoyéticas (HSC) y su agotamiento moviliza HSCs

Sangre, 116 (2010), pp. 4815-4828

Búsqueda de Google

• 23

B.J. Frisch, C.M. Hoffman, S.E. Latchney, M.W. LaMere, J. Myers, J. Ashton, *et al.*

Los macrófagos de médula ósea envejecidos expanden las células madre hematopoyéticas con plaquetas a través de Interleukin1B

JCI Insight, 5 (2019), Artículo e124213

Búsqueda de Google

• 24

A. McCabe, J.N.P. Smith, A. Costello, J. Maloney, D. Katikaneni, K.C. MacNamara

Pérdida hematopoyética de células madre y fracaso hematopoyético en anemia aplásica severa es impulsada por macrófagos y expresión de podoplanina aberrante

Haematologica, 103 (2018), pp. 1451-1461

Búsqueda de Google

• 25

E. Karakike, E.J. Giamarellos-Bourboulis

Síndrome de activación de macrófago: una entidad distinta que conduce a la muerte temprana en sepsis

Frente. Immunol., 10 (2019), p. 55

Búsqueda de Google

• 26

- S. Boettcher, M.G. Manz

Regulación de la inflamación y hematopoiesis impulsadas por la infección

Trends Immunol., 38 (2017), pp. 345 a 357

Búsqueda de Google

• 27

G. Jovicic, D. Bugarski, M. Kataranovski, N. Stojanovic, M. Petakov, L. Mojovic, *et al.*

El efecto in vivo de los liposomas en la hematopoyis

Druga Dev. Ind. Pharm., 25 (1999), pp. 517 a 521

Búsqueda de Google

• 28

E. Winter, C. Dal Pizzol, C. Locatelli, T.B. Crezkynski-Pasa

Desarrollo y evaluación de nanopartículas lipídicas para la entrega de medicamentos: estudio de toxicidad in, in vitro e in vivo

J. Nanosci. Nanotechnol., 16 (2016), pp. 1321-1330

Búsqueda de Google

• 29

C. Jaafar-Maalej, R. Diab, V. Andrieu, A. Elaissari, H. Fessi

Método de inyección de etanol para la preparación de liposomas hidrofílicos y cargados de droga lipofílica

J. Liposome Res., 20 (2010), pp. 228 a 243

Búsqueda de Google

• 30

C. Kelly, C. Jefferies, S.A. Cryan

Entrega de fármacos liposomales dirigidos a monocitos y macrófagos

J. Drug Deliv., 2011 (2011), p. 727241

Búsqueda de Google

• 31

W. Ying, P.S. Cheruku, F.W. Bazer, S.H. Seguro, B. Zhou

Investigación de la polarización de macrófagos mediante macrófagos derivados de la médula ósea

J. Vis. Exp (2013), p. 50323

Búsqueda de Google

• 32

T. Tanaka, A. Legat, E. Adam, J. Steuve, J.S. Gatot, M. Vandenbranden, *et al.*

Los liposomas catiónicos de diC14-amidina estimulan las células mieloides dendríticas a través del receptor similar al peaje 4

Eur. J. Immunol., 38 (2008), pp. 1351-1357

Búsqueda de Google

• 33

Y. Li, Y. El, K. Miao, Y. Zheng, C. Deng, T.M. Liu

Imágenes de la dinámica de mitocondria de macrófago in vivo revela fenotipo de activación celular para diagnóstico

Teranóstico, 10 (2020), pp. 2897-2917

Búsqueda de Google

• 34

V. Guerrini, M.L. Gennaro

Células de espuma: un tamaño no cabe en todo

Trends Immunol., 40 (2019), pp. 1163-1179

Búsqueda de Google

• 35

Y. Yuan, P. Li, J. Ye.

La homeostasis lipídica y la formación de células de espuma derivadas de macrófagos en aterosclerosis

Célula de proteínas, 3 (2012), pp. 173-181

Búsqueda de Google

• 36

H.S. Kruth, W. Huang, yo. Ishii, W.Y. Zhang

Formación de células de espuma macrófago con lipoproteína nativa de baja densidad

J. Biol. Chem., 277 (2002), pp. 34573 a 3454580

Búsqueda de Google

• 37

M. Rosas-Ballina, X.L. Guan, A. Schmidt, D. Bumann

La activación clásica de los macrófagos conduce a la formación de gotitas lipídicas sin la síntesis de ácido graso

Frente. Immunol., 11 (2020), p. 131

Búsqueda de Google

• 38

A. Castoldi, L.B. Monteiro, N. van Teijlingen Bakker, D.E. Sanin, N. Rana, M. Corrado, *etc.*

La síntesis de triacylglycerol mejora la función inflamatoria del macrófago

Nat. Commun., 11 (2020), p. 4107

Búsqueda de Google

• 39

C. Londos, C. Sztalryd, J.T. Tansey, A.R. Kimmel

Papel de las proteínas PAT en el metabolismo de los lípidos

Biochimie, 87 (2005), pp. 45-49

Búsqueda de Google

• 40

K. Fujita, M. Somiya, S. Kuroda, S. Hinuma

Inducción de gotitas de lípidos en células no macrófagas, así como macrófagos por liposomas y exosomas

Biochem. Biofófimas. Res. Commun., 510 (2019), pp. 184 a 190

Búsqueda de Google

• 41

P.A. Keyel, O.A. Tkacheva, A.T. Larregina, R.D. Salter

La estimulación de coordenadas de los macrófagos por micropartículas y los ligandos TLR induce la formación de células de espuma

J. Immunol., 189 (2012), pp. 4621-4629

Búsqueda de Google

• 42

M.H. den Brok, T.K. Raaijmakers, E. Collado-Camps, G.J. Adema

Rápide gotitas como moduladores inmunes en células mieloides

Trends Immunol., 39 (2018), pp. 380 abla de los artículos

Búsqueda de Google

• 43

W. Zhang, L. Xu, L. Zhu, Y. Liu, S. Yang, M. Zhao

Deletras de lípidos, el centro de la integración del metabolismo celular y el sistema inmunológico

Frente. Physiol., 12 (2021), p. 746749

Búsqueda de Google

• 44

S.S.G. Dias, V.C. Soares, A.C. Ferreira, C.Q. Sacramento, N. Fintelman-Rodrigues, J.R. Temerozo, *et al.*

Las gotitas lípidas alimentan la replicación y producción de mediadores inflamatorios SARS-CoV-2

PLoS Pathog., 16 (2020), Artículo e1009127

Búsqueda de Google

• 45

M. Bosch, M. Sánchez-Alvarez, A. Fajardo, R. Kapetanovic, B. Steiner, F. Dutra, *et al.*

Las gotas de lípidos mameales son centros innéticos que integran el metabolismo celular y la defensa del hués

Ciencia, 370 (2020), Artículo eaay8085

Búsqueda de Google

• 46

A.L. Vallochi, L. Teixeira, K.D.S. Oliveira, C.M. Maya-Monteiro, P.T. Bozza

La gota lipid, un jugador clave en las interacciones huésticas-parásito

Frente. Immunol., 9 (2018), p. 1022

Búsqueda de Google

• 47

N. Van Rooijen, A. Sanders

Agotamiento mediado de los macrófagos: mecanismo de acción, preparación de liposomas y aplicaciones

J. Immunol. Métodos, 174 (1994), pp. 83-93

Búsqueda de Google

• 48

V. Hinkovska-Galcheva, T. Treadwell, J.M. Shillingford, A. Lee, A. Abe, J.J.G. Tesmer, *et al.*

- La inhibición de la fosfolipasa lisosómica A2 predice fosfoliposis inducida por fármacos  
J. Lipid Res., 62 (2021), p. 100089  
Búsqueda de Google
- 49
- J.A. Olzmann, P. Carvalho  
Dinámica y funciones de gotitas de lípidos  
Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 20 (2019), pp. 137-155  
Búsqueda de Google
- 50
- A. Kassan, A. Herms, A. Fernández-Vidal, M. Bosch, N.L. Schieber, B.J. Reddy, y otros.  
Acyl-CoA sintetasa 3 promueve la biogénesis de gota lipídica en microdominios de ER  
J. Cell Biol., 203 (2013), pp. 985-1001  
Búsqueda de Google
- 51
- N.M. Borradaile, X. Han, J.D. Harp, S.E. Gale, D.S. Ory, J.E. Schaffer  
Disrupción de la estructura e integridad del retículo endoplasmático en la muerte celular lipotóxica  
J. Lipid Res., 47 (2006), pp. 2726-2737  
Búsqueda de Google
- 52
- J.H. Moffitt, B.A. Fielding, R. Evershed, R. Berstan, J.M. Currie, A. Clark  
Las propiedades fisicoquímicas adversas de la tripalmitina en las células beta conducen a cambios morfológicos y lipotoxicidad in vitro  
Diabetologia, 48 (2005), pp. 1819-1829  
Búsqueda de Google
- 53
- M. Myoishi, H. Hao, T. Minamino, K. Watanabe, K. Nishihira, K. Hatakeyama, et al.  
Aumento del estrés retículo endoplasmático en placas ateroscleróticas asociadas al síndrome coronario agudo  
Circulation, 116 (2007), pp. 1226-1233  
Búsqueda de Google
- 54
- B. Feng, P.M. Yao, Y. Li, C.M. Devlin, D. Zhang, H.P. Harding, et al.  
El retículo endoplasmático es el sitio de la citotoxicidad inducida por el colesterol en macrófagos  
Nat. Cell Biol., 5 (2003), pp. 781 a 792  
Búsqueda de Google
- 55
- S. Schuck, W.A. Prinz, K.S. Thorn, C. Voss, P. Walter  
La expansión de la membrana alivia el estrés retículo endoplasmático independientemente de la respuesta a las proteínas desplegadas  
J. Cell Biol., 187 (2009), pp. 525 a 536  
Búsqueda de Google
- 56
- A.D. Garg, A. Kaczmarek, O. Krysko, P. Vandenabeele, D.V. Krysko, P. Agostinis  
Inflamación inducida por el estrés de Urgencias: ayuda o impide la progresión de la enfermedad?  
Tendencias Mol. Med., 18 (2012), pp. 589-598  
Búsqueda de Google
- 57
- K. Zhang, R.J. Kaufman  
Del estrés endoplasmático-retículo hasta la respuesta inflamatoria  
Naturaleza, 454 (2008), pp. 455-462  
Búsqueda de Google
- 58
- N. Mori, Y. Yamada, S. Ikeda, Y. Yamasaki, K. Tsukasaki, Y. Tanaka, et al.  
Bahía 11-7082 inhibe el factor de transcripción NF-kappaB e induce la apoptosis de las líneas de células T infectadas por HTLV-I y células de leucemia T adultas primarias  
Sangre, 100 (2002), pp. 1828-1834  
Búsqueda de Google
- 59
- G. Brown, C.J. Mooney, L. Alberti-Servera, L. Muenchow, K.M. Toellner, R. Ceredig, et al.  
Versatilidad de células madre y progenitoras y las acciones instructivas de las citoquinas en hematopoyis

- Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., 52 (2015), pp. 168-179

Búsqueda de Google

• 60

H. Oguro, L. Ding, S.J. Morrison

Los marcadores familiares de SLAM resuelven subpoblaciones funcionalmente distintas de células madre hematopoyéticas y progenitores multipotentes

Cell Stem Cell, 13 (2013), pp. 102 a 116

Búsqueda de Google

• 61

R. Empate, H. Li, S. - Cai, Z. Liang, W. Shan, B. Wang, *et al.*

La señalización de la interleucina-6 regula la aparición de células madre hematopoyéticas

Expe. Mol. Med., 51 (2019), pp. 1 a 12

Búsqueda de Google

• 62

J.L. Zhao, C. Ma, R.M. O'Connell, A. Mehta, R. DiLoreto, J.R. Heath, *et al.*

Conversión de señales de peligro en señales de citoquinas por células madre hematopoyética y progenitoras para la regulación de la hematopoyosis inducida por el estrés

Cell Stem Cell, 14 (2014), pp. 445 a 459

Búsqueda de Google

• 63

E.M. Pietras, C. Mirantes-Barbeito, S. Fong, D. Loeffler, L.V. Kovtonyuk, S. Zhang, *et al.*

La exposición crónica interleucina-1 impulsa las células madre hematopoyéticas hacia la diferenciación mieloide precoz a expensas de la auto-renovación

Nat. Cell Biol., 18 (2016), pp. 607 a 618

Búsqueda de Google

• 64

P.R. Nagareddy, M. Kraakman, S.L. Maestros, R.A. Storzaker, D.J. Gorman, R.W. Grant, *etc.*

Los macrófagos de tejido adiposo promueven la mielopoiesis y la monocitosis en la obesidad

Cell Metab., 19 (2014), pp. 821-835

Búsqueda de Google

• 65

- S. Doktorovova, E.B. Souto, A.M. Silva

Nanotoxicología aplicada a nanopartículas lipídicas sólidas y portadores de lípidos nanoestructurados - una revisión sistemática de los datos in vitro

Eur. J. Pharm. Biopharm., 87 (2014), pp. 1 a 18

Búsqueda de Google

• 66

H. Parhiz, J.S. Brenner, P.N. Patel, T.E. Papp, H. Shahnawaz, Q. Li, *et al.*

Añadida a la inflamación preexistente, las nanopartículas de mRNA-lípidos inducen exacerbación de la inflamación (IE)

J. Control Release, 344 (2022), pp. 50 a 61

Búsqueda de Google

• 67

R. Kedmi, N. Ben-Arie, D. Peer

La toxicidad sistémica de las nanopartículas de lípidos cargadas positivamente y el papel del receptor 4 similar al peaje en la activación inmune

Biomateriales, 31 (2010), pp. 6867-6875

Búsqueda de Google

• 68

L.J. den Hartigh, J.E. Connolly-Rohrbach, S. Por favor, T.R. Huser, J.C. Rutledge

Los ácidos grasos de los productos de liporóina de muy baja densidad inducen acumulación de gotas de lípidos en monocitos humanos

J. Immunol., 184 (2010), pp. 3927-3936

Búsqueda de Google

• 69

A.N. Seyfried, J.M. Maloney, K.C. MacNamara

Macrófagos orquestan programas hematopoyéticos y regulan la función HSC durante el estrés inflamatorio

Frente. Immunol., 11 (2020), p. 1499

Búsqueda de Google



- 70

E. Gammella, P. Buratti, G. El Cairo, S. Recalcati  
Macrófagos: reguladores centrales de la balanza de hierro  
Metallomics, 6 (2014), pp. 1336-1345

Búsqueda de Google

- 71

J. Hom, B.M. Dulmovits, N. Mohandas, L. Blanc  
La isla eritroblana como paradigma emergente en la anemia de la inflamación  
Immunol. Res., 63 (2015), pp. 75 a 89

Búsqueda de Google

- 72

T. Ganz  
Anemia de inflamación  
N. Engl. J. Med., 381 (2019), pp. 1148-1157

Búsqueda de Google