



## **INHIBICIÓN SELECTIVA DE MACRÓFAGOS INFLAMATORIOS DE TEJIDO ADIPOSO OBESO PARA EL TRATAMIENTO DE LA DIABETES DE TIPO 2 ASOCIADA A LA OBESIDAD**

**Cristina López Rodríguez**

Facultat de Ciències de la Salut i Vida – Facultat Pompeu Fabra

**Ángel Luis Corbi López**

Centro de Investigaciones Biológicas - CSIC Consejo Superior de Investigaciones  
Científicas

## 1. Resumen

Los macrófagos del tejido adiposo inflamatorio desempeñan un papel clave en patologías asociadas a la obesidad, incluyendo la diabetes tipo 2. Las evidencias previas apoyan la idea de que la reprogramación funcional de macrófagos podría ser utilizada para tratar estas enfermedades. Sin embargo, estas potenciales aproximaciones están actualmente limitadas por la imposibilidad de que los tratamientos que afectan los macrófagos inflamatorios del tejido graso no alteren al mismo tiempo las funciones homeostáticas de los macrófagos tisulares de este y otros tejidos. Nuestra hipótesis es que los macrófagos inflamatorios en el tejido adiposo de la grasa poseen perfiles transcripcionales específicos que los distinguen de otros macrófagos inflamatorios, y que estas diferencias pueden ser explotadas para diseñar estrategias que permitan inhibir o reprogramar selectivamente los macrófagos patogénicos del tejido adiposo. El objetivo principal del proyecto ha sido la identificación de la firma génica inflamatoria específica de macrófagos humanos activados por grasa, para que dicha firma génica sea empleada para el diseño de protocolos que permitan inhibir de forma específica su efecto patogénico en obesidad. También planteábamos desarrollar un modelo de obesidad de ratón para analizar *in vivo* las funciones inflamatorias y la sensibilidad farmacológica de los macrófagos humanos. Nuestros resultados en macrófagos expuestos *in vitro* de manera aguda al ácido graso palmitato, característicamente enriquecido en el entorno de la grasa visceral obesa, han identificado perfiles génicos asociados a procesos inflamatorios y metabólicos, y sensibles a moduladores antiinflamatorios. Asimismo, el análisis de poblaciones de macrófagos residentes en el tejido adiposo visceral sano y obeso en un modelo de ratón ha permitido identificar nuevos perfiles génicos, no directamente asociados con inflamación, de macrófagos *in vivo* en un contexto de obesidad crónica. Estos resultados podrían impulsar un conocimiento más preciso sobre la patogénesis de la obesidad y ayudar a mejorar las estrategias terapéuticas para el tratamiento de patologías asociadas.

## 2. Resultados

### 1. Determinación del transcriptoma de macrófagos humanos derivados de sangre periférica expuestos a palmitato *in vitro* y análisis comparativo de respuestas inflamatorias a palmitato en macrófagos humanos y de ratón

Datos consolidados en la bibliografía científica han mostrado que el tejido adiposo obeso presenta concentraciones elevadas del ácido graso palmitato, el cual induce un estado de activación proinflamatoria en macrófagos residentes en este tejido. Esta activación hacia un estado crónico de inflamación de bajo grado exacerba patologías asociadas a la obesidad, entre otras el riesgo de diabetes tipo 2.

Nuestro análisis ha identificado genes específicamente regulados por palmitato en macrófagos humanos *in vitro*, entre los que destacan genes inducidos por XBP1, que promueve la respuesta de estrés *unfolded protein response* (UPR), y la inhibición de genes, como la IL10, regulados por el factor MAF.

Hemos obtenido el mismo resultado de activación de XBP1 por palmitato en macrófagos de ratón derivados de médula ósea, así como en macrófagos residentes en tejido adiposo visceral de ratón. En este apartado también hemos identificado un efecto común del palmitato en macrófagos humanos y de ratón a nivel de inducción de genes de citoquinas proinflamatorias como TNF, IL6, IL1b y de represión de la citoquina antiinflamatoria IL10.

Los resultados de este apartado refuerzan el concepto de que la respuesta inflamatoria y de estrés a palmitato está esencialmente conservada entre macrófagos humanos y de ratón, lo cual apoya la utilidad de desarrollar abordajes *in vivo* en modelos de ratón.

También hemos efectuado experimentos de RNAseq sobre macrófagos humanos derivados de monocitos y expuestos a LPS, CL264 (ligando de TLR7) o palmitato, durante 30 minutos, 2 horas, 4 horas o 12 horas. Los datos crudos de estos análisis ya se han depositado en el repositorio Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) con número de acceso GSE156921. Actualmente estamos realizando experimentos para completar esta información con datos funcionales que avalen las particularidades de la activación de macrófagos inducida por

palmitato, así como tratando de validar estos resultados mediante el análisis de muestras de macrófagos obtenidos de patologías inflamatorias.

## **2. Determinación del transcriptoma de macrófagos humanos expuestos a serotonina (5-HT) *in vitro* y a inmunoglobulina intravenosa (IVIg) *in vivo***

Resultados previos de nuestro equipo y otros han mostrado que la serotonina (5-HT) y, de manera separada, la inmunoglobulina intravenosa (IVIg) pueden atenuar funciones inflamatorias en macrófagos, de ahí que uno de nuestros objetivos incluyese el análisis de estos compuestos en la expresión de genes relevantes en el fenotipo inflamatorio de macrófagos activados por ácidos grasos.

Hemos identificado un efecto represor de la 5-HT sobre los genes que codifican para las enzimas implicadas en la síntesis de colesterol en macrófagos, mientras que, en cambio, la 5-HT aumenta la expresión de genes que codifican para las proteínas responsables del *efflux* de colesterol en macrófagos.

En cuanto a la IVIg, hemos obtenido el transcriptoma de monocitos humanos expuestos a IVIg *in vivo* y determinado los efectos de IVIg sobre las distintas subpoblaciones de monocitos de sangre periférica *in vivo*.

Los resultados con 5-HT se han obtenido en experimentos de RNAseq realizados sobre macrófagos humanos derivados de monocitos y expuestos a BW723C86 (agonista del receptor de serotonina 5-HT<sub>2B</sub>) o serotonina (5-HT). Los datos crudos de estos análisis ya se han depositado en el repositorio Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) con número de acceso GSE161774. Actualmente estamos realizando los análisis funcionales y metabolómicos que nos permitan validar la hipótesis de que la serotonina altera el metabolismo lipídico intracelular mediante la alteración de la expresión/función de los factores LXR y SREBP.

Los resultados obtenidos con tratamiento de IVIg en humanos derivan de experimentos de RNAseq y citometría de flujo realizados sobre células (monocitos, linfocitos T, linfocitos B, células NK) aisladas de individuos antes y después de la infusión de inmunoglobulinas intravenosas (IVIg, 6 horas). Los resultados transcripcionales aún no se han depositado en el repositorio Gene Expression Omnibus. Todos estos resultados constituyen la base de un artículo actualmente en fase de redacción en el que

describimos la capacidad de las IVIg de promover la aparición de *myeloid-derived suppressor cells* (MDSC) en sangre periférica.

### **3. Identificación de metabolitos intracelulares inducidos por palmitato en macrófagos de ratón *in vitro* y en poblaciones de macrófagos residentes en tejido adiposo visceral en condiciones sanas y de obesidad.**

Observaciones obtenidas en este proyecto mostraban que el palmitato inducía un perfil de genes inflamatorios tanto en macrófagos humanos como de ratón. Estos resultados nos condujeron a analizar la contribución de vías metabólicas relevantes en la actividad pro- y antiinflamatoria de los macrófagos, como son el uso de glucosa y la oxidación mitocondrial de ácidos grasos, en la inducción de genes proinflamatorios por palmitato. Nuestros resultados indicaron que los macrófagos activados con estímulos inflamatorios clásicos (por ejemplo, productos bacterianos como el LPS) o por palmitato muestran una sensibilidad comparable a inhibir la glicólisis con 2-DG (un análogo no metabolizable de la glucosa). Asimismo, no son afectados por una concentración baja de etomoxir (que inhibe el transporte de ácidos grasos de cadena larga a la mitocondria) en cuanto a la expresión de genes de citoquinas y quimioquinas características del fenotipo inflamatorio asociado a obesidad: Il6, Tnf, Ccl2. Aunque hemos observado diferencias en el grado de sensibilidad de algunos genes (*Cpt1a*, *Ccl2*) a la 2-DG en función de si son inducidos por LPS o por palmitato, estas son moderadas. Estos resultados sugieren que respuestas inflamatorias frente a patógenos y lípidos comparten mecanismos de activación y ponen en relieve la oportunidad de identificar nuevos elementos diferenciadores entre ambos tipos de respuesta.

Dado que los experimentos con estos fármacos no revelaron una susceptibilidad específica entre el palmitato y el LPS a la inhibición de las vías metabólicas testadas, analizamos los perfiles de metabolitos del ciclo de Krebs y varios derivados lipídicos en macrófagos estimulados con LPS o palmitato. Hemos determinado que los macrófagos estimulados con palmitato presentan un perfil lipídico diferente al de macrófagos estimulados con productos bacterianos inflamatorios (LPS). Este perfil lipídico se reproduce en macrófagos de distinto origen (médula ósea o tejido adiposo) cultivados en presencia de palmitato y también se observa característicamente elevado *in vivo* en la población de macrófagos considerada como más inflamatoria y patogénica (células CD11c) en tejido adiposo obeso. Estos resultados identifican características metabólicas que distinguen macrófagos inflamatorios en un contexto de tejido adiposo

obeso frente a macrófagos cuya actividad inflamatoria ha sido inducida por estímulos microbianos. Actualmente estamos llevando a cabo ensayos con inhibidores del procesamiento del palmitato en diferentes tipos de macrófagos para determinar si es posible atenuar la activación inflamatoria de macrófagos por palmitato sin suprimir su capacidad de respuesta a productos microbianos.

#### **4. Determinación del transcriptoma de diferentes poblaciones de macrófagos de ratón obtenidas de tejido adiposo visceral sano y obeso *in vivo***

Los macrófagos de tejido graso comprenden diferentes subpoblaciones cuyo papel específico en la homeostasis y patologías del tejido graso obeso no está bien caracterizado. Para poder estudiarlas en detalle, establecimos un protocolo de inducción de obesidad en ratones con dieta rica en grasa y azúcar con un 60 % de kilocalorías procedentes de grasa. Este modelo reproduce la patología metabólica e inflamatoria asociada a la obesidad en humanos. Nuestros análisis en diferentes poblaciones (monocitos, macrófagos CD206+/CD301+ y macrófagos CD11c+) aisladas de tejido adiposo de ratones normales y obesos muestran que la obesidad causa una inversión en la proporción de macrófagos CD206+/CD301+ y macrófagos CD11c+. Nuestros datos también mostraron que la población CD11c+ ya presentaba algunas características proinflamatorias (mayor expresión de Il6 e Il1b) en condiciones homeostáticas. En estos análisis observamos que la expresión de genes inflamatorios característicamente inducidos por tratamiento agudo con palmitato en macrófagos humanos y de ratón *in vitro* apenas variaba dentro de una misma población de macrófagos de tejido adiposo *in vivo* (siendo relativamente estables hasta las 32 semanas de dieta rica en grasa), sino que el sesgo inflamatorio del tejido en obesidad se asociaba al enriquecimiento del tejido en macrófagos CD11c+ inflamatorios.

Muy recientemente hemos podido llevar a cabo la secuenciación de RNA (RNAseq) de estas poblaciones y obtener el transcriptoma de monocitos, macrófagos CD206+ y macrófagos CD11c+ de tejido adiposo de ratones normales y obesos. Actualmente estamos analizando estos resultados, y su estudio preliminar confirma que el estado obeso no induce un marcado perfil de genes inflamatorios en estas poblaciones, pero sí que altera principalmente las respuestas asociadas a la capacidad de los macrófagos de responder a interferón de tipo I y II, así como procesos relacionados con migración celular y remodelación de matriz extracelular. Actualmente estamos confirmando estas observaciones en nuevos experimentos. La caracterización transcriptómica y

metabólica de macrófagos de tejido adiposo sano y obeso junto con el estudio del impacto de metabolitos lipídicos derivados del palmitato sobre sus funciones pro- y antiinflamatorias constituyen el núcleo de un manuscrito en preparación con el que esperamos concluir los resultados más recientes y novedosos del proyecto.

### 3. Relevancia y posibles implicaciones futuras

Dada la relevancia patológica de los macrófagos en las condiciones inflamatorias que acompañan la obesidad, los datos transcripcionales que se han generado durante el proyecto (y especialmente los de macrófagos expuestos a palmitato) nos han permitido identificar toda una serie de genes cuya expresión podría estar ligada a dicha patología, y que constituyen potenciales marcadores de dicha patología. La validez de los resultados generados viene avalada por la identificación de un programa de expresión génica de la *unfolded protein response* entre los genes más aumentados en macrófagos tras su exposición a palmitato. Estos resultados se complementan con la identificación de perfiles génicos *in vivo* de diferentes poblaciones de macrófagos residentes en tejido adiposo de ratones sanos y obesos, cuyo análisis preliminar revela firmas génicas novedosas respecto a las identificadas con los tratamientos con palmitato. El estudio de la potencial utilidad de dichos genes como biomarcadores se está iniciando en la actualidad, mediante el análisis de macrófagos de tejido adiposo de pacientes obesos.

Por otra parte, y dada la prevalencia de enfermedades cuyo tratamiento requiere del empleo de inhibidores de la recaptación de la serotonina (SSRI), los datos que hemos generado evidencian que la serotonina modifica a la baja la expresión de genes que codifican las enzimas que controlan el metabolismo del colesterol, mientras que potencia la expresión de los genes que codifican moléculas implicadas en el *efflux* de colesterol. Si se confirman estos resultados a nivel proteico y metabólico, nuestros resultados proporcionarán información relevante en cuanto a las potenciales consecuencias de los tratamientos con SSRI en pacientes con depresión clínica. Por otro lado, la identificación de metabolitos lipídicos aumentados inducidos por palmitato en macrófagos inflamatorios de tejido adiposo obeso *in vivo* e *in vitro* abre la oportunidad de aplicar moduladores farmacológicos de su síntesis para atenuar selectivamente la activación inflamatoria de macrófagos de tejido graso obeso sin

alterar respuestas inflamatorias beneficiosas frente a agentes microbianos, por ejemplo.

#### 4. Bibliografía científica generada

Debido al largo período de tiempo transcurrido desde la concesión del proyecto (2016) hasta la formalización del convenio entre el CSIC (institución donde se lleva a cabo el subproyecto 201619-31) y la Fundació La Marató de TV3, pasaron casi dos años antes de iniciar las actividades específicas previstas en los objetivos de este proyecto. Principalmente este hecho, y en cierta medida también las circunstancias asociadas a la pandemia por la COVID-19 en el 2020, han retrasado la finalización de algunos resultados que aun no han podido ser consolidados en publicaciones. Así, por ejemplo, tenemos en fase de redacción un manuscrito que describe la capacidad inmunomoduladora de la IVIg en macrófagos inflamatorios y su posible aplicabilidad en obesidad, y estamos preparando otro manuscrito sobre la caracterización transcriptómica y metabólica de macrófagos de tejido adiposo sano y obeso. Finalmente, diversas metodologías utilizadas en este proyecto han sido puestas a punto en varios trabajos del grupo, cuyos resultados han contribuido a este proyecto. En estos trabajos se reconoce el apoyo de la financiación de la Fundació La Marató de TV3.

1. Riera-Borrull M, Cuevas VD, Alonso B, Vega MA, Joven J, Izquierdo E, Corbí ÁL. *Palmitate Conditions Macrophages for Enhanced Responses toward Inflammatory Stimuli via JNK Activation*.

J Immunol. 199: 3858-3869 (2017). [Correction: J Immunol. 203: 580 (2019)]

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900602>. PMID: 31175161.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700845>. PMID: 29061766.

2. Tellechea M, Buxadé M, Tejedor S, Aramburu J, López-Rodríguez C.

*NFAT5-regulated macrophage polarization supports the proinflammatory function of macrophages and T lymphocytes*.

J. Immunol. 200: 305-315 (2018).

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601942>. PMID: 29150563.



3. Buxadé M, Huerga Encabo H, Riera-Borrull M, Quintana-Gallardo L, López-Cotarelo P, Tellechea M, Martínez-Martínez S, Redondo JM, Martín-Caballero J, Flores JM, Bosch E, Rodríguez-Fernández JL, Aramburu J, López-Rodríguez C.  
*Macrophage-specific MHCII expression is regulated by a remote Ciita enhancer controlled by NFAT5.*  
J. Exp. Med. 215: 2901-2918 (2018).  
<https://doi.org/10.1084/jem.20180314>. PMID: 30327417.
4. Aramburu J, López-Rodríguez C.  
*Regulation of Inflammatory Functions of Macrophages and T Lymphocytes by NFAT5.*  
Front Immunol. 10: 535 (2019).  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00535>. PMID: 30949179.
5. Huerga Encabo H, Traveset L, Argilaguet J, Angulo A, Nistal-Villán E, Jaiswal R, Escalante CR, Gekas C, Meyerhans A, Aramburu J, López-Rodríguez C.  
*The transcription factor NFAT5 limits infection-induced type I interferon responses.*  
J. Exp. Med. 217: e20190449 (2019).  
<https://doi.org/10.1084/jem.20190449>. PMID: 31816635.
6. Samaniego R, Domínguez-Soto Á, Ratnam M, Matsuyama T, Sánchez-Mateos P, Corbí ÁL,\* Puig-Kröger A.\* (Shared senior authorship.)  
*Folate Receptor  $\beta$  (FR $\beta$ ) Expression in Tissue-Resident and Tumor-Associated Macrophages Associates with and Depends on the Expression of PU.1.*  
Cells 9: 1445 (2020).  
<https://doi.org/10.3390/cells9061445>. PMID: 32532019.
7. Nieto C, Rayo I, de las Casas-Engel M, Izquierdo E, Alonso B, Béchade C, Maroteaux L, Vega MA, Corbí ÁL.  
*Serotonin (5-HT) Shapes the Macrophage Gene Profile through the 5-HT<sub>2B</sub>-Dependent Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor.*  
J Immunol 204: 2808-2817 (2020).  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1901531>. PMID: 32253244.
8. Vega MA, Simón-Fuentes M, González de la Aleja A, Nieto C, Colmenares M, Herrero C, Domínguez-Soto Á, Corbí ÁL.

*MAFB and MAF Transcription Factors as Macrophage Checkpoints for COVID-19 Severity.*

Front Immunol. 11: 603507 (2020).

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.603507>. PMID: 33312178.