



Fundació
La Marató de TV3

22è SIMPOSIUM
Diabetis i Obesitat



INHIBICIÓ SELECTIVA DE MACRÒFAGS INFLAMATORIS DE TEIXIT ADIPÓS OBÈS PER AL TRACTAMENT DE LA DIABETIS DE TIPUS 2 ASSOCIADA A L'OBESITAT

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. Resum

Els macròfags de teixit adipós inflamatori tenen un paper clau en patologies associades a l'obesitat, inclosa la diabetis de tipus 2. Evidències prèvies donen suport a la idea que la reprogramació funcional de macròfags es podria utilitzar per tractar aquestes malalties. No obstant això, aquestes aproximacions potencials estan actualment limitades per la manca de tractaments que inhibeixin els macròfags inflamatoris del teixit gras sense alterar les funcions homeostàtiques beneficioses dels macròfags tissulars d'aquest teixit o d'altres. La nostra hipòtesi és que els macròfags inflamatoris en el teixit adipós del greix tenen perfils transcripcionals específics que els distingeixen d'altres macròfags inflamatoris i que aquestes diferències es poden explotar per dissenyar estratègies que permetin inhibir o reprogramar selectivament els macròfags patogènics del teixit adipós. L'objectiu principal del projecte ha estat identificar la signatura gènica inflamatòria específica de macròfags humans activats per greix, de manera que aquesta signatura gènica es pugui utilitzar per dissenyar protocols que permetin inhibir de manera específica el seu efecte patogènic en obesitat. També plantejàvem desenvolupar un model d'obesitat de ratolí per analitzar *in vivo* les funcions inflamatòries i la sensibilitat farmacològica dels macròfags humans. Els nostres resultats en macròfags exposats *in vitro* de manera aguda a l'àcid gras palmitat, característicament enriquit en l'entorn del greix visceral obès, han identificat perfils gènics associats a processos inflamatoris i metabòlics, i sensibles a moduladors antiinflamatoris. Així mateix, l'anàlisi de poblacions de macròfags residents en el teixit adipós visceral sa i obès en un model de ratolí ha permès identificar nous perfils gènics, no directament associats amb inflamació, de macròfags *in vivo* en un context d'obesitat crònica. Aquests resultats podrien impulsar un coneixement més precís sobre la patogènesi de l'obesitat, i ajudar a millorar les estratègies terapèutiques per al tractament de les patologies associades.

2. Resultats

1. Determinació del transcriptoma de macròfags humans derivats de sang perifèrica i exposats a palmitat *in vitro* i anàlisi comparativa de respostes inflamatòries a palmitat en macròfags humans i de ratolí

Dades consolidades en la bibliografia científica han mostrat que el teixit adipós obès presenta concentracions elevades de l'àcid gras palmitat, el qual indueix un estat d'activació proinflamatòria en macròfags residents en aquest teixit. Aquesta activació cap a un estat crònic d'inflamació de baix grau exacerba patologies associades a l'obesitat, entre d'altres el risc de tenir diabetis de tipus 2.

La nostra anàlisi ha identificat gens específicament regulats pel palmitat en macròfags humans *in vitro*, entre els quals destaquen gens induïts per XBP1, que promou la resposta d'estrès *unfolded protein response* (UPR), i la inhibició de gens, com la IL10, regulats pel factor MAF.

Hem obtingut un resultat similar d'activació d'XBP1 per palmitat en macròfags de ratolí derivats de medul·la òssia, així com en macròfags residents de teixit adipós visceral de ratolí. En aquest apartat també hem identificat un efecte comú del palmitat en macròfags humans i de ratolí en la inducció de gens de citocines proinflamatòries com TNF, IL6, IL1b i de repressió de la citocina antiinflamatòria IL10.

Els resultats d'aquest apartat reforcen el concepte que la resposta inflamatòria i d'estrès a palmitat està essencialment conservada entre macròfags humans i de ratolí, la qual cosa dona suport a la utilitat de desenvolupar abordatges *in vivo* en models de ratolí.

També hem efectuat experiments d'RNAseq sobre macròfags humans derivats de monòcits i exposats a LPS, CL264 (l·ligand de TLR7) o palmitat, durant 30 minuts, 2 hores, 4 hores o 12 hores. Les dades crues d'aquestes anàlisis ja s'han dipositat al repositori Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) amb número d'accés GSE156921. Actualment estem fent experiments per completar aquesta informació amb dades funcionals que avalin les particularitats de l'activació de macròfags induïda per palmitat, així com tractant de validar aquests resultats mitjançant l'anàlisi de mostres de macròfags obtinguts de patologies inflamatòries.

2. Determinació del transcriptoma de macròfags humans exposats a serotonina (5-HT) *in vitro* i a immunoglobulina intravenosa (IVIg) *in vivo*

Resultats previs del nostre equip i d'altres han mostrat que la serotonina (5-HT) i, de manera separada, la immunoglobulina intravenosa (IVIg), poden atenuar funcions

inflamatories en macròfags. Per aquest motiu un dels nostres objectius incloïa l'anàlisi de l'efecte d'aquests compostos en l'expressió de gens rellevants en el fenotip inflamatori de macròfags activats per àcids grassos.

Hem identificat un efecte repressor de la 5-HT sobre els gens que codifiquen per enzims implicats en la síntesi de colesterol en macròfags, mentre que, en canvi, la 5-HT augmenta l'expressió de gens que codifiquen per a les proteïnes responsables de l'*efflux* de colesterol en macròfags.

Quant a IVIg, hem obtingut el transcriptoma de monòcits humans exposats a IVIg *in vivo* i hem determinat els efectes d'IVIg sobre les diferents subpoblacions de monòcits de sang perifèrica *in vivo*.

Els resultats amb 5-HT s'han obtingut en experiments d'RNAseq realitzats sobre macròfags humans derivats de monòcits i exposats a BW723C86 (agonista del receptor de serotonina 5-HT_{2B}) o serotonina (5-HT). Les dades crues d'aquestes anàlisis ja s'han dipositat al repositori Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) amb número d'accés GSE161774. Actualment estem fent les anàlisis funcionals i metabolòmiques que ens permetran validar la hipòtesi que la serotonina altera el metabolisme lipídic intracel·lular mitjançant l'alteració de l'expressió o funció dels factors LXR i SREBP.

Els resultats obtinguts amb tractament d'IVIg en humans deriven d'experiments d'RNAseq i citometria de flux realitzats sobre cèl·lules (monòcits, limfòcits T, limfòcits B, cèl·lules NK) aïllades d'individus abans i després de la infusió d'immunoglobulines intravenoses (IVIg, 6 hores). Els resultats transcripcionals encara no s'han dipositat al repositori Gene Expression Omnibus. Tots aquests resultats constitueixen la base d'un article actualment en fase de redacció en el qual descrivim la capacitat de les IVIg de promoure l'aparició de *myeloid-derived suppressor cells* (MDSC) en sang perifèrica.

3. Identificació de metabòlits intracel·lulars induïts per palmitat en macròfags de ratolí *in vitro* i en poblacions de macròfags residents en el teixit adipós visceral en condicions sanes i d'obesitat

Observacions obtingudes en aquest projecte mostraven que el palmitat induïa un perfil de gens inflamatoris tant en macròfags humans com de ratolí. Aquests resultats ens

van portar a analitzar la contribució de vies metabòliques rellevants en l'activitat pro- i antiinflamatòria dels macròfags, com són l'ús de glucosa i l'oxidació mitocondrial d'àcids grassos, en la inducció de gens proinflamatoris per palmitat. Els nostres resultats van indicar que els macròfags activats amb estímuls inflamatoris clàssics (per exemple, productes bacterians com l'LPS) o per palmitat mostraven una sensibilitat comparable a inhibir la glicòlisi amb 2-DG (un anàleg no metabolitzable de la glucosa). Així mateix, no es veien afectats per una concentració baixa d'etomoxir (que inhibeix el transport d'àcids grassos de cadena llarga a la mitocòndria) pel que fa a l'expressió de gens de citocines i quimiocines característiques del fenotip inflamatori associat a obesitat: *IL6*, *TNF*, *CCL2*. Tot i que hem observat diferències en el grau de sensibilitat d'alguns gens (*CPT1a*, *CCL2*) a la 2-DG en funció de si són induïts per LPS o per palmitat, aquestes són moderades. Aquests resultats suggereixen que respostes inflamatòries davant patògens i lípids comparteixen mecanismes d'activació i posen en relleu l'oportunitat d'identificar nous elements diferenciadors entre els dos tipus de resposta.

Atès que els experiments amb aquests fàrmacs no van revelar una susceptibilitat específica entre el palmitat i l'LPS a la inhibició de les vies metabòliques testades, vam analitzar els perfils de metabòlits del cicle de Krebs i diversos derivats lipídics en macròfags estimulats amb LPS o palmitat. Hem determinat que els macròfags estimulats amb palmitat presenten un perfil lipídic diferent al dels macròfags estimulats amb productes bacterians inflamatoris (LPS). Aquest perfil lipídic es reproduïx en macròfags de diferent origen (moll de l'os o teixit adipós) cultivats en presència de palmitat, i també s'observa característicament elevat *in vivo* en la població de macròfags considerada com més inflamatòria i patogènica (cèl·lules CD11c) en teixit adipós obès. Aquests resultats identifiquen característiques metabòliques que distingeixen macròfags inflamatoris en un context de teixit adipós obès de macròfags activats per estímuls microbians. Actualment estem duent a terme assajos amb inhibidors del processament del palmitat en diferents tipus de macròfags per determinar si és possible atenuar la seva activació inflamatòria per palmitat sense suprimir la capacitat de resposta a agents microbians.

4. Determinació del transcriptoma de diferents poblacions de macròfags de ratolí obtingudes de teixit adipós visceral sa i obès *in vivo*

Els macròfags de teixit gras comprenen diferents subpoblacions, el paper específic de les quals en l'homeòstasi i patologies del teixit gras obès no està ben caracteritzat. Per poder estudiar-les en detall, vam establir un protocol d'inducció d'obesitat en ratolins amb dieta rica en greix i sucre amb un 60 % de quilocalories procedents de greix. Aquest model reproduïx la patologia metabòlica i inflamatòria associada a l'obesitat en humans. Les nostres anàlisis en diferents poblacions (monòcits, macròfags CD206+/CD301+ i macròfags CD11c+) aïllades de teixit adipós de ratolins normals i obesos mostren que l'obesitat causa una inversió en la proporció de macròfags CD206+/CD301+ i macròfags CD11c+. Les nostres dades també van mostrar que la població CD11c+ ja presentava algunes característiques proinflamatòries (expressió més gran d'IL6 i IL1b) en condicions homeostàtiques. En aquestes anàlisis observem que l'expressió de gens inflamatoris característicament induïts per tractament agut amb palmitat gairebé no variava dins d'una mateixa població de macròfags de teixit adipós *in vivo* (i eren relativament estables fins al cap de 32 setmanes de dieta rica en greix), sinó que el biaix inflamatori en el teixit obès s'associava a l'enriquiment del teixit en macròfags CD11c+ inflamatoris.

Molt recentment hem pogut dur a terme la seqüenciació d'RNA (RNAseq) d'aquestes poblacions i obtenir el transcriptoma de monòcits, macròfags CD206+ i macròfags CD11c+ de teixit adipós de ratolins normals i obesos. Actualment estem analitzant aquests resultats, l'estudi preliminar dels quals confirma que l'estat obès no indueix un marcat perfil de gens inflamatoris en aquestes poblacions, però altera principalment les respostes associades a la capacitat dels macròfags de respondre a interferó de tipus I i II, així com processos relacionats amb migració cel·lular i remodelació de la matriu extracel·lular. Actualment estem confirmant aquestes observacions en nous experiments. La caracterització transcriptòmica i metabòlica de macròfags de teixit adipós sa i obès juntament amb l'estudi de l'impacte de metabòlits lipídics derivats del palmitat sobre les seves funcions pro- i antiinflamatòries constitueixen el nucli d'un manuscrit en preparació amb el qual esperem concloure els resultats més nous del projecte.

3. Rellevància i possibles implicacions futures

Atesa la rellevància patològica dels macròfags en les condicions inflamatòries que acompanyen l'obesitat, les dades de transcriptòmica que s'han generat durant el projecte (i especialment les relatives als macròfags exposats a palmitat) ens han permès identificar tot un seguit de gens l'expressió dels quals podria estar lligada a aquesta patologia, de la qual són potencials marcadors. La validesa dels resultats generats és avalada per la identificació d'un programa d'expressió gènica de la *unfolded protein response* entre els gens més augmentats en macròfags després de la seva exposició a palmitat. Aquests resultats es complementen amb la identificació de perfils gènics *in vivo* de diferents poblacions de macròfags residents al teixit adipós de ratolins sans i obesos, l'anàlisi preliminar dels quals revela signatures gèniques noves respecte a les identificades amb els tractaments amb palmitat. L'estudi de la potencial utilitat d'aquests gens com a biomarcadors s'està iniciant actualment, mitjançant l'anàlisi de macròfags de teixit adipós de pacients obesos.

D'altra banda, i atesa la prevalença de malalties el tractament de les quals requereix l'ús d'inhibidors de la recaptació de la serotonina (SSRI), les dades que hem generat evidencien que la serotonina disminueix l'expressió de gens que codifiquen els enzims que controlen el metabolisme del colesterol, mentre que potencia l'expressió dels gens que codifiquen molècules implicades en l'*efflux* de colesterol. Si es confirmen aquests resultats a escala proteica i metabòlica, els nostres resultats proporcionaran informació rellevant pel que fa a les potencials conseqüències dels tractaments amb SSRI en pacients amb depressió clínica. D'altra banda, la identificació de metabòlits lipídics induïts per palmitat en macròfags inflamatoris de teixit adipós obès *in vivo* i *in vitro* obre l'oportunitat d'aplicar moduladors farmacològics de la seva síntesi per atenuar selectivament l'activació inflamatòria de macròfags de teixit gras obès sense alterar respostes inflamatòries beneficioses davant d'agents microbians, per exemple.

4. Bibliografia científica generada

Atès el llarg període de temps transcorregut des de la concessió del projecte (2016) fins a la formalització del conveni entre el CSIC (institució on es porta a terme el subprojecte 201619-31) i la Fundació La Marató de TV3, van passar gairebé dos anys abans de començar les activitats específiques previstes en els objectius d'aquest projecte. Sobretot aquest fet, i també en certa manera les circumstàncies associades a la pandèmia per la COVID-19 el 2020, han retardat la finalització d'alguns resultats que encara no s'han pogut consolidar en publicacions. Així, per exemple, estem redactant un manuscrit en què descrivim la capacitat immunomoduladora de l'IVIg en macròfags inflamatoris i la seva possible aplicabilitat en obesitat, i estem acabant els resultats per a un altre manuscrit sobre la caracterització transcriptòmica i metabòlica de macròfags de teixit adipós sa i obès. Finalment, diverses metodologies utilitzades en aquest projecte han estat posades a punt en diversos treballs del grup, els resultats dels quals van contribuir a aquest projecte. En aquests treballs es reconeix el suport del finançament 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, Argilaguët 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 β (FR β) 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_{2B}-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.