

Decifrando os perfis imunológicos e metabólicos de macrófagos em proximidade com subtipos distintos de adipócitos

Palavras-Chave: Imunometabolismo, obesidade, adipócitos, macrófagos

Autores(as):

Matheus Barbosa – IB – UNICAMP

Prof. Dr. Pedro Manoel Mendes de Moraes Vieira – IB – UNICAMP

Dra. Monara Kaéle Sérvulo Cruz Angelim – IB – UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A obesidade tornou-se uma epidemia mundial que representa uma grave ameaça à saúde humana (“Obesity and overweight”, OMS, [s.d.]). A resistência à insulina e inflamação crônica de baixo grau causada pela obesidade, contribuem para o desenvolvimento de comorbidades, tais como diabetes *mellitus* do tipo 2 e doenças cardiovasculares¹. Durante o desenvolvimento da obesidade, o tecido adiposo branco, principal responsável pelo armazenamento de gordura, passa por diversas mudanças, incluindo a expansão de células imunes, especialmente macrófagos².

Os macrófagos podem ser produzidos no período embrionário ou a partir de monócitos circulantes e são caracterizados por marcadores em sua superfície ou expressão gênica. Essas células funcionam como sentinelas nos tecidos que residem e encontram-se preparados para defender o organismo por meio da fagocitose de microrganismos, células necróticas ou apoptóticas, por desempenhar função de apresentadores de antígenos e pela produção de fatores inflamatórios. Dois subtipos de macrófagos estão bem caracterizados: macrófagos classicamente ativados (M1) ou pró-inflamatórios, e, alternativamente ativados (M2) ou anti-inflamatórios. Macrófagos M1 são identificados pela expressão dos receptores F4/80, CD11b e CD11c e pela secreção de fatores inflamatórios como TNF- α , IL-1 β e IL-6⁴. Por outro lado, macrófagos M2 expressam os receptores F4/80, CD11b, CD301 e CD206, e citocinas anti-inflamatórias, como por exemplo, IL-4 e IL-10⁵. Em indivíduos magros, os MTAs desempenham ainda funções de eferocitose e controle da proliferação de adipócitos progenitores. Entretanto, com o avanço da obesidade, os macrófagos adquirem um fenótipo mais voltado para o perfil inflamatório e associados com o metabolismo lipídico¹.

Resultados de sequenciamento de RNA revelam uma diversidade maior de macrófagos do tecido adiposo (MTAs), em humanos e roedores, que contribuem diferentemente para a inflamação sistêmica. No mínimo, três populações adicionais já foram caracterizadas: (1) CD11b+ Ly6c+; (2) CD11b+ Ly6c- CD9+; (3) CD11b+ Ly6c- CD9-. Eles diferem em localização e nas funções que desempenham⁶. Adicionalmente, os MTAs ativam diferentes rotas metabólicas de acordo com a resposta imunológica que desempenham no TA. A esse respeito, Wculek et al. (2023)⁷ demonstrou que macrófagos altamente inflamatórios são dependentes de fosforilação oxidativa (OXPHOS) para lidar com o alto conteúdo de lipídios que encontram. Quando a OXPHOS é prejudicada, a resistência à insulina e a hepatosteatose são melhoradas na obesidade. Estes resultados demonstram que o metabolismo energético de MTA pode modular os efeitos da obesidade.

Similar aos MTAs, os adipócitos apresentam diferentes fenótipos no tecido adiposo. Em 2021, Backdahl⁸ e colaboradores demonstraram que, em humanos, através de sequenciamento de RNA, existem três classes de adipócitos com localização e expressão gênica específicas. A saber, a adipocina leptina (*LEP*), as proteínas presentes em gotículas de lipídios perilipina-1 e -4 (*PLIN-1/PLIN-4*) e, proteínas de fase aguda amilóide sérica A1 e A2 (*SAA1/SAA2*). De acordo com essa expressão gênica, os adipócitos foram caracterizados em AdipoLEP, AdipoPLIN

e AdipoSAA e estão principalmente envolvidos na sinalização/secreção de leptina, ao metabolismo de glicose e lipídios, e, ao metabolismo de retinol, respectivamente. Neste mesmo estudo, os autores identificaram que os macrófagos se associavam às diferentes classes de adipócitos. Porém, está para ser investigado se *os perfis imunológicos e metabólicos de MTAs podem ser modulados pelos adipócitos adjacentes*. Sendo assim, este trabalho tem como objetivo caracterizar as populações de macrófagos quando em co-cultura com adipócitos knockdown para o gene *lep* (AdiposhLEP) e com superexpressão para os genes *plin1* e *saa1* (AdiposhPLIN e AdiposhSAA), sendo aqui apresentados dados preliminares obtidos.

METODOLOGIA:

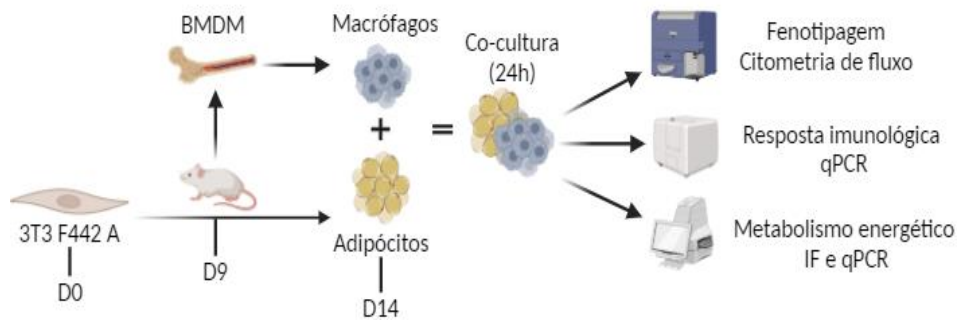


Figura 1: Linha temporal do fluxo de diferenciação celular e co-cultura.

No dia 0 (D0), adipócitos foram diferenciados a partir da linhagem celular de fibroblastos 3T3 F442A. Após nove dias (D9), os macrófagos foram gerados a partir de monócitos derivados da medula óssea (BMDM) de camundongos C57Bl/6J (CEUA: 6301-1). Estas células foram diferenciadas utilizando meio enriquecido da linhagem celular L929 durante 5 dias⁹. Após a completa diferenciação (D14) de adipócitos e macrófagos, a co-cultura foi realizada na proporção de 1:2 por 24h. Em seguida, o fenótipo de macrófagos (CD11b⁺) foi analisado por citometria de fluxo, qPCR e imunofluorescência. Para visualizar as mitocôndrias, os macrófagos foram diferenciados a partir do BMDM de animais Pham^{Flox}LyzM^{cre}, onde a proteína fluorescente Dendra2 é expressa nas mitocôndrias de células da linhagem mielóide.

RESULTADOS:

1. Fenótipo de macrófagos em co-cultura com adipócitos.

O fenótipo de macrófagos foi analisado através de citometria de fluxo, analisando a porcentagem de macrófagos CD45⁺/CD11b⁺ que expressam diferentes marcadores para identificação de subtipos de macrófagos do tecido adiposo. Os resultados mostram que, quando com co-cultura com 3T3 não diferenciada ou diferenciadas em adipócitos, os macrófagos apresentam um perfil anti-inflamatório: CD301⁺, CD11c⁻, Ly6c⁺ e CD11b⁺. Por fim, com a finalidade de caracterizar os adipócitos diferenciados a partir de 3T3 foi realizada microscopia CARS para identificar gotas lipídicas nos adipócitos e os macrófagos foram marcados com anticorpo F480, onde observa-se uma diferenciação de 3T3 em adipócitos com sucesso.

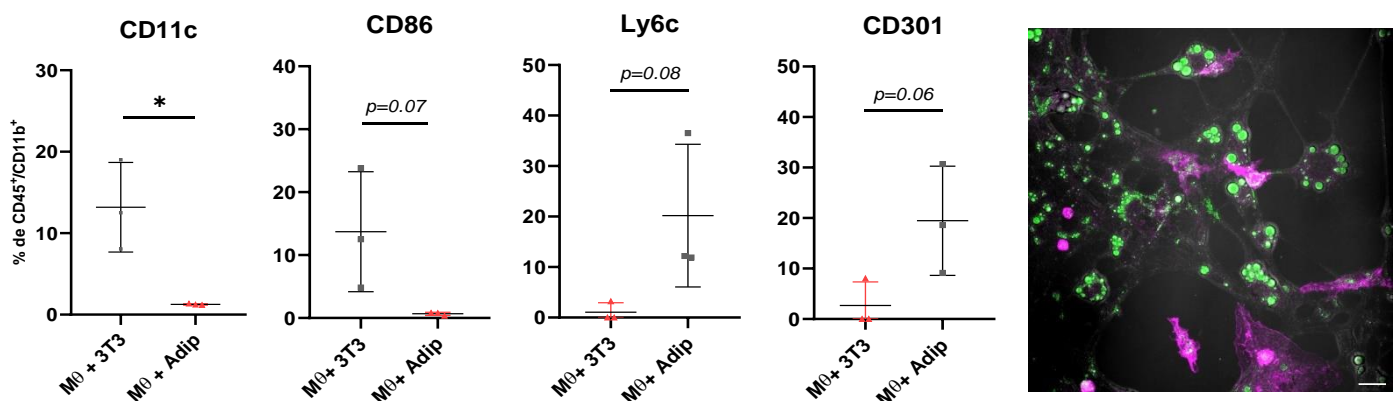


Figura 2: Análise do perfil de ativação de macrófagos por citometria de fluxo. Valores estão expressos em média \pm desvio padrão. $*p < 0.05$, *test t student*. Imagem representativa da co-cultura entre adipócitos e macrófagos. Verde: microscopia CARS identifica gotículas lipídicas nos adipócitos, Magenta: macrófagos identificados através da marcação com anticorpo F4/80, escala 20 μ m.

2. Perfil inflamatório de macrófagos em co-cultura com adipócitos.

Com a finalidade de avaliar a expressão de genes relacionados ao perfil inflamatório de macrófagos, foi realizada *real time quantitative reverse transcription PCR* (RT-qPCR). Os resultados mostram uma diminuição de IL-6, NOS2, IL-1 β e aumento de IL-10, revelando um perfil anti-inflamatório (M1) de macrófagos quando estão em co-cultura com adipócitos.

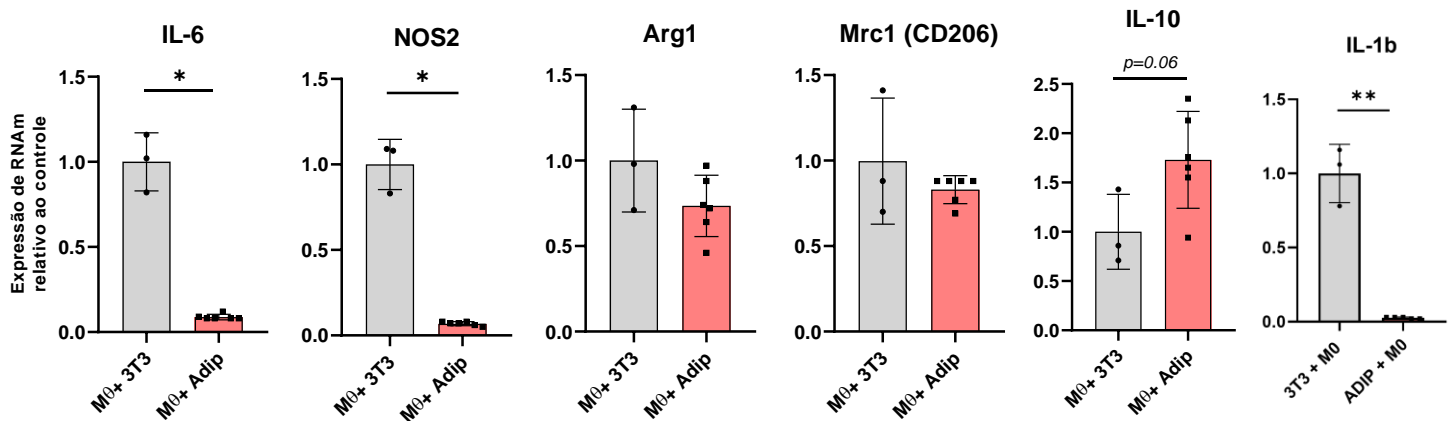


Figura 3: Análise do perfil inflamatório de macrófagos por RT-qPCR. Níveis de RNAm em relação ao controle para genes do perfil de ativação de macrófagos cultivados com células 3T3 não diferenciadas ou diferenciadas em adipócitos. $*p < 0.05$, *test t student*.

3. Perfil metabólico de macrófagos em co-cultura com adipócitos.

O perfil metabólico dos macrófagos quando co-cultivados com adipócitos, foi avaliado em relação aos genes que estão associados à glicólise (pfkfb3 e Glut1) e a captação de mitocondrial de ácidos graxos (Cpt1). Com isso, foi possível observar uma queda na expressão dos genes Pfkfb3, Glut1 e Cpt1; demonstrando que as vias glicolíticas e de beta oxidação dos macrófagos está sendo modulados quando cultivados em células 3T3 não diferenciada e diferenciada em adipócitos.

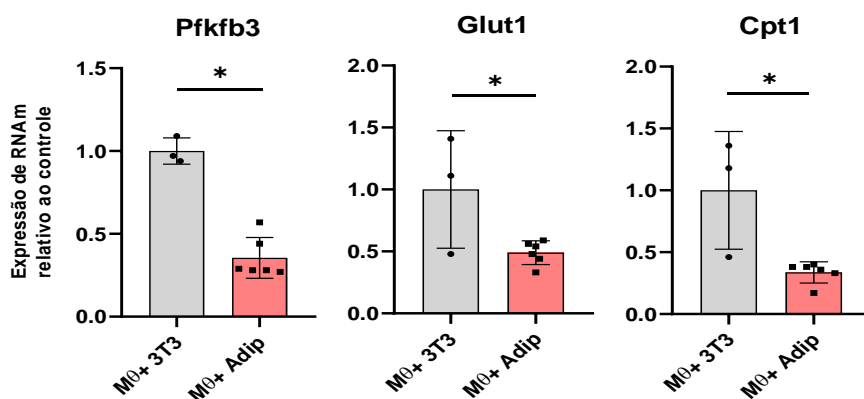


Figura 4: Análise do perfil de macrófagos através de RT-qPCR. Expressão de RNAm para genes metabólicos associados à glicólise (pfkfb3 e Glut1) e captação mitocondrial de ácidos graxos (Cpt1), das células em co-cultura: macrófagos com células 3T3 não diferenciadas ou diferenciadas em adipócitos. Valores estão expressos em média \pm desvio padrão. $*p < 0.05$, *test t student*.

4. Dinâmica mitocondrial de macrófagos em co-cultura com adipócitos.

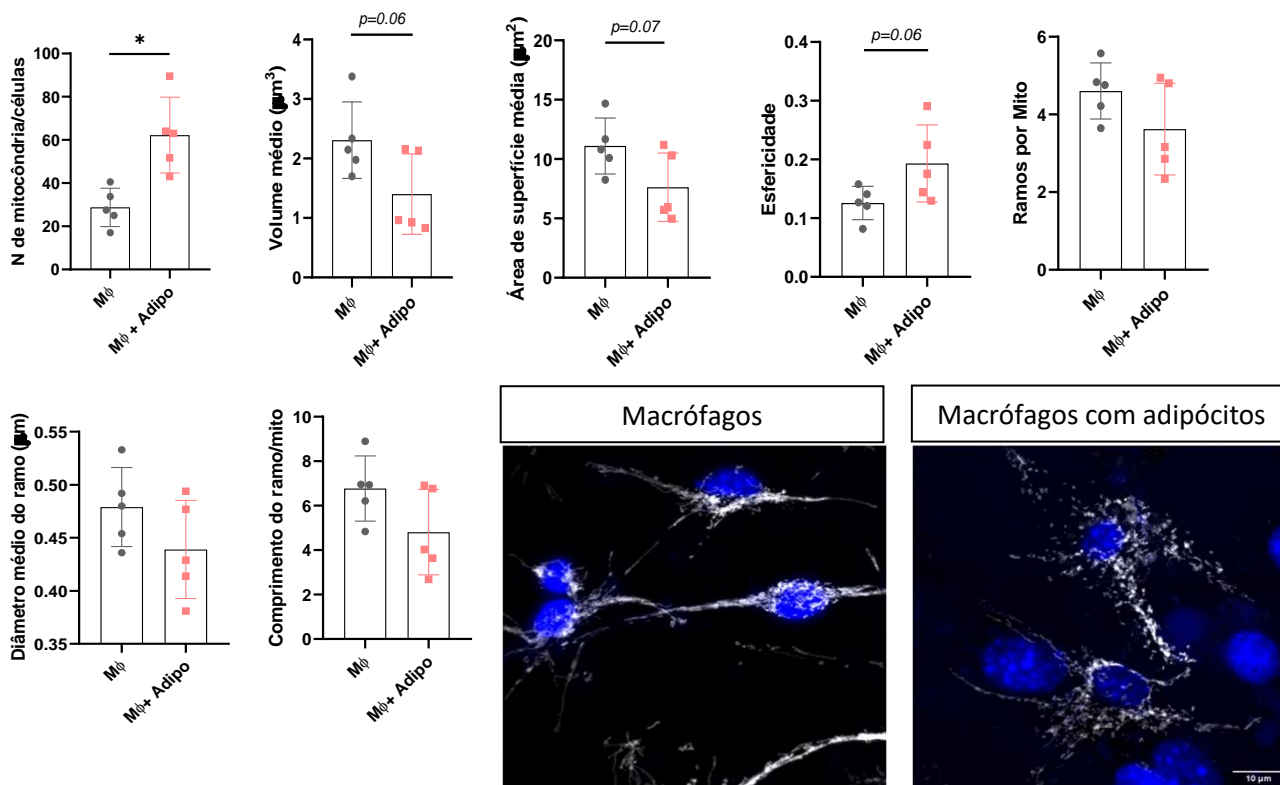


Figura 5: Análise da dinâmica mitocondrial de macrófagos cultivados com adipócitos. Valores estão expressos em média \pm desvio padrão. * $p < 0.05$, test t student Em azul, marcação de Hoechst mostra núcleos e, em cinza, a proteína Dendra2 localizada na mitocôndria dos macrófagos. Barra de escala: 10 μm .

Macrófagos diferenciados de BMDM de camundongo PhamFloxLyzMcre, onde a proteína fluorescente Dendra2 está localizada em mitocôndrias de células da linhagem mieloide. Com isso, imagens da mitocôndria de macrófagos (MO), cultivados ou não com adipócitos, foram adquiridas no microscópio confocal AiryScan e os parâmetros mitocondriais foram analisados no ImageJ, utilizando o plugin Mitochondria Analyzer 3D (n = 20 macrófagos/grupo). Os resultados mostram uma fissão mitocondrial de macrófagos quando em co-cultura com adipócitos, com redução do volume, da superfície, aumento de esfericidade e número de mitocôndrias por células.

Conclusões Parciais:

Nossos resultados preliminares confirmam dados da literatura que evidenciam MTAs no tecido adiposo de animais saudáveis apresentando perfil anti-inflamatório¹⁰. Quando co-cultivados com adipócitos *in vitro*, macrófagos derivados de BMDM expressam mais CD301 e IL-10, em detrimento das proteínas inflamatórias CD11c, CD86, IL-6 e NOS2. Adicionalmente, expressam Ly6c, demonstrando a diferenciação a partir de monócitos. Interessantemente, estes macrófagos apresentam mitocôndrias mais fragmentadas, o que sugere aumento na atividade destas organelas possivelmente por reutilização das gotículas lipídicas advindas dos adipócitos. Nossos resultados apoiam a hipótese de que os adipócitos podem modular o perfil inflamatório e metabólico dos macrófagos *in vitro*. O projeto continuará avaliando o fenótipo dos macrófagos e a dinâmica mitocondrial quando co-cultivados com diferentes tipos de adipócitos (Adipo^{LEP}, Adipo^{PLIN} e Adipo^{SAA}).

Referência Bibliográfica

1. Cai, Z., Huang, Y. & He, B. New Insights into Adipose Tissue Macrophages in Obesity and Insulin Resistance. *Cells* **11**, 1424 (2022).
2. Chakarov, S., Blériot, C. & Ginhoux, F. Role of adipose tissue macrophages in obesity-related disorders. *J Exp Med* **219**, e20211948 (2022).

3. Weinstock, A. *et al.* Single-Cell RNA Sequencing of Visceral Adipose Tissue Leukocytes Reveals that Caloric Restriction Following Obesity Promotes the Accumulation of a Distinct Macrophage Population with Features of Phagocytic Cells. *Immunometabolism* **1**, e190008 (2019).
4. Da, H. *et al.* Distinct macrophage populations direct inflammatory versus physiological changes in adipose tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **115**, (2018).
5. A, N. *et al.* CD206+ M2-like macrophages regulate systemic glucose metabolism by inhibiting proliferation of adipocyte progenitors. *Nature communications* **8**, (2017).
6. Hill, D. A. *et al.* Distinct macrophage populations direct inflammatory versus physiological changes in adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, E5096–E5105 (2018).
7. Wculek, S. K. *et al.* Oxidative phosphorylation selectively orchestrates tissue macrophage homeostasis. *Immunity* (2023) doi:10.1016/j.immuni.2023.01.011.
8. Bäckdahl, J. *et al.* Spatial mapping reveals human adipocyte subpopulations with distinct sensitivities to insulin. *Cell Metabolism* **33**, 1869-1882.e6 (2021).
9. de Brito Monteiro, L. *et al.* M-CSF- and L929-derived macrophages present distinct metabolic profiles with similar inflammatory outcomes. *Immunobiology* **225**, 151935 (2020).
10. DAEMEN, S.; SCHILLING, J. D. The Interplay Between Tissue Niche and Macrophage Cellular Metabolism in Obesity. *Frontiers in Immunology*, v. 10, 22 jan. 2020.