



RESEÑA DE INVESTIGACIÓN

Mecanismos Moleculares y Terapéuticas para Reducir la Inflamación del Tejido Adiposo en la Obesidad

Molecular Mechanisms and Therapeutics to Reduce Adipose Tissue Inflammation in Obesity

Dario C. Ramirez, Ph.D.¹ & Sandra E. Gomez Mejiba, Ph.D.²¹Director of the Laboratory of Experimental & Transductional Medicine and²Director of the Laboratory of Experimental Therapeutics. IMIBIO-SL-UNSL-CONICET, San Luis, San Luis, Argentina

- Correspondencia: Dr Dario C. Ramirez (ramirezlabimibiosl@gmail.com) and Dra Sandra E. Gomez Mejiba (sandraegomezmejiba@yahoo.com). IMIBIO-SL-CCT-San Luis. Universidad Nacional de San Luis. Chacabuco y Pedernera. San Luis Capital, 5700 San Luis, Argentina

Recibido 27 noviembre 2015, Aceptado 31 enero 2016.

DOI: <https://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.2376688.v4>

© 2016 Todos los derechos reservados

Resumen

La inflamación del tejido adiposo (TA) en obesidad es un proceso central que liga a la obesidad con la inflamación sistémica y el síndrome metabólico. En este proceso los mecanismos de adipogénesis/adiposidad como también la activación inflamatoria de los macrófagos, representan un punto crítico para la búsqueda de nuevas terapéuticas basadas en mecanismos para reducir la inflamación del TA en la obesidad. Basados en nuestros datos clínicos y bioquímicos, discutimos el rol de dos factores de transcripción claves en el proceso de adipogénesis en adipocitos (Nrf-2) y de activación inflamatoria de macrófagos (NF-κB). Se discuten estrategias para la búsqueda de nuevas estructuras químicas que induzcan la activación de la vía del Nrf-2 en adipocitos y reduzcan la activación del NF-κB en los macrófagos usando modelos celulares y moleculares. La elevada incidencia de obesidad y síndrome metabólico a nivel global garantizan la búsqueda de nuevas estructuras químicas de origen natural o sintético para efectivizar la adipogénesis y reducir la inflamación del TA.

Palabras clave: obesidad, inflamación del tejido adiposo, adipogénesis, macrófago, Nrf-2, NF-κB, terapéutica

Abstract

Adipose tissue (AT) inflammation in obesity is a key process linking obesity, systemic inflammation and metabolic syndrome. The understanding of the molecular mechanisms of adipogenesis/adiposity as well as inflammatory activation of macrophages is critical in the search of novel therapeutics to reduce AT inflammation in obesity. Herein, based on our clinical as well as biochemical data we discuss the role of two transcription factors involved in adipogenesis (Nrf-2) and inflammatory activation of macrophages (NF-κB). We focus our discussion on strategies aimed at screening libraries of natural and synthetic compounds in the search for novel structures able to induce Nrf-2 activation in adipocytes and to reduce NF-κB activation in macrophages by using molecular and cellular models. The growing incidence of metabolic syndrome in obesity justifies the search for novel chemical structures to enhance adipogenesis and to reduce AT inflammation.

Key words: Obesity, adipose tissue inflammation, adipogenesis, macrophage, Nrf-2, NF-κB, therapeutics

Introducción

La obesidad es una enfermedad inflamatoria crónica de bajo grado o parainflamación producida por un desbalance entre la cantidad de energía consumida y la gastada que conduce a un balance energético netamente positivo (1). Este balance energético positivo conduce a la acumulación de ácidos grasos libres (AGL) provenientes de la dieta o resultantes de lipogénesis en forma de triglicéridos (TG) en células especializadas llamadas adipocitos. Estas células acumulan TG en forma de vesículas lipídicas. La acumulación de TG en adipocitos y la determinación/diferenciación de células madres mesenquimales llevan a hipertrofia e hiperplasia del tejido adiposo (TA).

Por otro lado, el exceso de AGL localmente conduce a inflamación del TA, especialmente el TA visceral, a partir del cual numerosos mediadores de la inflamación y productos oxidados son liberados a la circulación sistémica (1-2).

Estos mediadores y los AGL son los responsables de muchas de las anomalías metabólicas ligadas a la obesidad entre ellas el síndrome metabólico (SM), una de las consecuencias más serias del sobrepeso y obesidad. El SM es una constelación de anomalías metabólicas que incluyen obesidad central, resistencia a la insulina, dislipidemia, hígado graso no alcohólico e hipertensión (3). Por lo tanto, la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas para reducir la inflamación del TA en obesidad es de crítica importancia para reducir la incidencia de SM en pacientes con sobrepeso u obesos.

El TA al igual que otros tejidos es constantemente patrullado por macrófagos que derivan de monocitos circulantes cuya principal misión es la reparación y homeostasis tisular. En la inflamación del tejido adiposo, varios mecanismos han sido considerados (1). La mayoría de ellos están ligados a una infiltración de monocitos, los que se diferencian bajo la presión del microambiente tisular en macrófagos polarizados hacia un fenotipo pro-inflamatorio (clásicamente activados o M1) que secretan gran cantidad de mediadores de la inflamación y especies reactivas del oxígeno (1, 4). Estudios previos han mostrado que en el TA de pacientes obesos los macrófagos con el fenotipo M1 están dispuestos en estructuras similares a coronas (*Crown-like structures*) alrededor de los adipocitos muertos (5). Aún no se sabe con exactitud si es la muerte del adipocito lo que conduce a la acumulación de macrófagos en esta disposición o si los macrófagos están allí para fagocitar los restos celulares de la célula ya muerta por hipoxia u otros mecanismos. Es interesante remarcar que la interacción entre vías proinflamatorias (NF- κ B) y de respuesta celular al daño genómico (p53) coexisten en ese microambiente del TA obeso (2).

Es de destacar que la concentración de lipopolisacárido bacteriano (LPS), un componente de la pared de bacterias Gram negativas que escapa a la circulación por translocación a partir de la flora intestinal, así como también AGL resultantes del exceso de AGL absorbidos o neosintetizados, están incrementados en la circulación de pacientes obesos y su concentración se correlaciona con inflamación sistémica y la incidencia de anomalías metabólicas asociadas a la obesidad (1, 6).

El entendimiento de las bases moleculares de la inflamación del TA es importante para el desarrollo de nuevas terapias basadas en mecanismos moleculares bien definidos para reducir la incidencia del SM en pacientes obesos.

La acumulación de AGL como TG en los adipocitos es un proceso anti-inflamatorio

Cuando la capacidad de acumulación de AGL en el TA ha sido saturada, estos pasan a circulación. Los AGL tales como mirístico (C14:0), palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0) son pro-inflamatorios. Esto se debe a su capacidad para activar las vías de señales de traducción ligadas a receptores tipo-*Toll*, en particular Toll-like receptor-2 (TLR-2) que conduce a la activación del regulador maestro de la respuesta inflamatoria, NF- κ B, especialmente en macrófagos que conforman el TA (5). La activación de esta vía de señalamiento conduce a la unión de las subunidades p65/p50 y de los co-activadores a los elementos de respuesta de varios genes proinflamatorios, incluyendo la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), la ciclooxigenasa tipo 2, factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), IL-6, IL-1 β , IL-8, proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1), entre otros (4-5). Por lo tanto, terapéuticas dirigidas a reducir la activación inflamatoria de los macrófagos es de vital importancia para reducir la inflamación del TA y la consecuente inflamación sistémica.

En la obesidad un balance energético positivo lleva a la diferenciación de células madres del TA a adipocitos como una respuesta adaptativa al exceso energético. Varios factores de transcripción ligados al proceso de programación y diferenciación a adipocitos, como otros ligados al proceso inflamatorio han sido involucrados en la regulación del patrón de expresión génica (7). El PPAR- γ y CEBP- α son reguladores maestros del proceso de adipogénesis, sin embargo recientemente nuestros datos en poblaciones de niños obesos (3) además de estudios en biología celular y molecular (7) han mostrado que el Factor Nuclear Eritroide-2 (Nrf-2) tiene un rol clave en la adipogénesis y protección contra el SM en obesidad. Aquellos niños obesos que expresan menos Nrf-2 son más susceptibles al SM. El Nrf-2 ha sido considerado hasta recientemente el regulador maestro de la respuesta celular adaptativa al estrés oxidativo y electrofílico debido a que regula la expresión de varios genes de la fase 2 del metabolismo de xenobióticos (7). Sin embargo, estudios recientes de nuestro equipo de trabajo así como también de otros investigadores, han puesto de manifiesto su importancia en el proceso de adipogénesis y almacenamiento seguro de AGL (3, 7). Por lo tanto, al promover la incorporación de AGL en la forma de TG, el factor de transcripción Nrf-2 juega también un rol anti-inflamatorio (3).

Búsqueda de terapéuticas basadas en mecanismos moleculares para reducir la inflamación del TA en obesidad

Visto el rol fundamental de la adipogénesis y la activación inflamatoria de los macrófagos en el TA obeso, nuestros equipos de investigación han focalizado su atención en: 1) efectivizar la acumulación de AGL como TG en adipocitos, y 2) Interferir con la activación inflamatoria de los macrófagos focalizada en la inhibición de la activación del NF- κ B. Con este fin se dispone de una colección de compuestos tipo diterpenoides fraccionados a partir de extractos vegetales de la flora autóctona de la cordillera andina y también de compuestos tipo nitrona sintéticos. Estos compuestos son

seleccionados en base a la inducción de la síntesis de glutatión, expresión de la glutatión-S-transferasa que es una enzima limitante en la síntesis de glutatión e ingreso de Nrf-2 al núcleo, y de la expresión de PPAR γ en modelos de líneas celulares de adipocitos humanos y murinos. Por otro lado, estos estudios están siendo agilizados con el desarrollo de una línea celular reportera para Nrf-2 que permitirá el tamizaje inicial de la colección de compuestos.

En cuanto a la selección de compuestos con actividad anti-inflamatoria, nuestros estudios demostraron que el compuesto tipo nitrona, 5,5-dimetil-1-pirrolina *N*-óxido (DMPO), además de atrapar proteínas radicalizadas [(8) y referencias citadas en el mismo], puede inhibir la síntesis de óxido nítrico (NO) inducida por LPS en una línea celular tipo macrófago (RAW 264.7) (9). Nuestros datos experimentales demostraron que DMPO no interfiere con la síntesis de NO por la iNOS, una enzima que oxida L-arginina a L-citrulina y NO (10). La inhibición de la producción de NO se debe a la inhibición en la expresión de la iNOS causada por la disminución en el ingreso de NF- κ B p65 al núcleo (10). DMPO no solo reduce la expresión de la iNOS, sino que también redujo la producción de los otros mediadores de la inflamación inducidos por LPS y bajo el control transcripcional del NF- κ B (10). La disminución de la expresión de genes bajo el control del NF- κ B se debe a una disminución en la fosforilación e inhibición de la proteólisis del sensor de la respuesta celular inflamatoria, I κ B α . Esta inhibición se debe a una interferencia causada por DMPO en las vías de señales de traducción gatilladas por LPS ligada a MAPquinasas (Akt, JNK, ERK y p38) (10). El spin trap no afectó la unión del LPS-marcado fluorescentemente a su receptor en la superficie del macrófago. Nuestros datos aún no publicados indican que el DMPO causó disminución en la producción del radical anión superóxido, el cual es crítico como segundo mensajero en la cascada de señalamiento gatillada por LPS. Estos efectos podrían deberse a una inhibición causada por LPS en el ensamblaje de la NADPH oxidasa, que reduce oxígeno molecular a superóxido, o a la inhibición en el señalamiento entre el complejo TLR-4/PKC δ , la cual es crítica para la fosforilación de subunidad p47^{phox} que es necesaria para el ensamblaje en la membrana de la NADPH oxidasa y activación de la producción de superóxido.

El análisis de los datos de microarray e interactoma (*Ingenuity Pathway Analysis*) sugieren que DMPO causa cambios en el patrón de expresión génica ligados a una interferencia no solo con TLR-4 sino también con TLR-3 y TLR-9. Estos tres receptores tienen en común dominios citoplasmáticos críticos en el señalamiento río abajo denominados dominios TIR (*Toll* IL-1 receptor). Basados en estos hallazgos nuestros recientes estudios de modelado molecular indican que el spin trap se liga a tres residuos discretos en el dominio TIR y podrían ser los responsables de apagar la activación inflamatoria de los macrófagos por DMPO. El significado biológico de este hallazgo en la inhibición causada por DMPO en la respuesta inflamatoria gatillada por DMPO aún queda por ser definida.

Conclusiones

La inflamación del TA en la obesidad es un proceso central en la inflamación sistémica que conecta la obesidad con el SM. En el microambiente en el TA obeso tanto el LPS así como también los AGL, son factores de presión que afectan tanto el proceso de lipogénesis además de la activación inflamatoria de los macrófagos. El entendimiento de las bases moleculares de cómo estos factores afectan estos procesos llevará a la búsqueda racional de nuevas estructuras químicas que efectivicen los procesos de lipogénesis y reduzcan la activación inflamatoria de los macrófagos. De esta forma servirían como bases moleculares para el diseño de nuevos fármacos para reducir la inflamación del TA, inflamación sistémica e incidencia del SM en la obesidad.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido soportado por fondos de la UNSL a DCR (PROICO 2-3214) y a la SEGM (PROICO 10-0414). Otros fondos fueron provistos por la Agencia Nacional de Ciencia y Tecnología a DCR (PICT-2014-3369).

Referencias

1. McNelis JC, Olefsky JM. Macrophages, immunity, and metabolic disease. *Immunity* 2014; **41**:36-48.
2. Minamino T, Orimo M, Shimizu I, Kunieda T, Yokoyama M, Ito T, et al. A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nat Med.* 2009; **15**: 1082-1087.
3. Santillan LD, Moyano M, Frau M, Flores O, Siewert S, Zirulnick F, et al. Reduced blood nrf-2 mRNA in local overweight boys at risk of metabolic complications: a study in San Luis City, San Luis, Argentina. *Metab Syndr Relat Disord.* 2013; **11**:359-365.
4. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003; **112**:1796-1808.
5. Chawla A, Nguyen KD, Goh YP. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat Rev Immunol.* 2011; **11**:738-749.
6. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes.* 2007; **56**:1761-1772.
7. Xue P, Hou Y, Chen Y, Yang B, Fu J, Zheng H, et al. Adipose deficiency of Nrf2 in ob/ob mice results in severe metabolic syndrome. *Diabetes.* 2013; **62**:845-854.

8. Gomez-Mejiba SE, Zhai Z, Della-Vedova MC, Munoz MD, Chatterjee S, Towner RA, et al. Immuno-spin trapping from biochemistry to medicine: advances, challenges, and pitfalls. Focus on protein-centered radicals. *Biochim Biophys Acta*. 2014; **1840**:722-729.
9. Zhai Z, Gomez-Mejiba SE, Gimenez MS, Deterding LJ, Tomer KB, Mason RP, et al. Free radical-operated proteotoxic stress in macrophages primed with lipopolysaccharide. *Free Radic Biol Med*. 2012; **53**:172-181.
10. Zhai Z, Gomez-Mejiba SE, Zhu H, Lupu F, Ramirez DC. The spin trap 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW 264.7 cells. *Life Sci*. 2012; **90**: 432-439.