



LEPTINA EXACERBA INFLAMAÇÃO EM MACRÓFAGOS POR UMA VIA DEPENDENTE DE mTORC2

Palavras-Chave: MACRÓFAGOS, LEPTINA, mTORC2

Autores/as:

JULIANA SILVEIRA PRODONOFF¹; LAUAR DE BRITO MONTEIRO¹; CRISTHIANE FAVERO DE AGUIAR¹

Prof. Dr. PEDRO MANOEL MENDES DE MORAES VIEIRA¹

¹Laboratório de Imunometabolismo, Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes. Instituto de Biologia, Universidade de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil.

INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença que afeta milhões de pessoas ao redor do mundo, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (relatório de 2016). Ela está associada a inflamação sistêmica de baixo grau que, por sua vez, se correlaciona com infiltração de células do sistema imune no tecido adiposo (AT) (WEISBERG et al., 2003; ELLULU et al., 2017). A leptina é uma adipocina com funções pró-inflamatórias (MORAES-VIEIRA et al., 2012). Ela é produzida pelo AT e age no hipotálamo, regulando ingestão alimentar e gasto energético (COHEN, 2006). Em um contexto de obesidade, há resistência hipotalâmica à leptina, o que leva à hiperleptinemia (MYERS; COWLEY; MÜNZBERG, 2008). Sendo a leptina de caráter pró-inflamatório, a hiperleptinemia pode agravar a inflamação sistêmica de baixo grau e a infiltração de macrófagos no AT. Logo, é essencial compreender como a leptina modula a função de macrófagos. O mTOR (*mammalian target of rapamycin*) é um sensor metabólico responsável por regular diversas funções celulares. Ele é composto por dois complexos proteicos, mTORC1 e mTORC2 (SWITON et al., 2017). O principal constituinte de mTORC1 é a proteína Raptor e, de mTORC2, a proteína Rictor (SWITON et al., 2017). A deleção de Raptor em macrófagos já foi correlacionada com a redução de inflamação local em AT de animais obesos (JIANG et al., 2014). Ademais, evidências sugerem que a modulação do metabolismo de glicose por mTORC2 é essencial para um fenótipo anti-inflamatório de macrófagos (HUANG et al., 2016). Todavia, nossos resultados preliminares indicam que a leptina modula a atividade de mTORC2 e o perfil pró-inflamatório dessa adipocina depende de tal complexo proteico. Temos como hipótese que a leptina, já associada à ativação da via de PI3K/AKT/mTOR (VARELA; HORVATH, 2012), funciona como um sinalizador de estado nutricional sistêmico que, por meio da via do mTOR (especificamente, por mTORC2), informa o macrófago sobre a disponibilidade sistêmica de nutrientes. Assim, a célula pode adaptar seu metabolismo e, conseqüentemente, sua função. Nesse projeto, nosso objetivo foi determinar como a leptina modula a via de mTORC2, e a subsequente função e metabolismo de macrófagos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nossos primeiros experimentos tinham como objetivo determinar se a rapamicina, um inibidor da atividade dos complexos 1 e 2 de mTOR, modula os efeitos mediados pela leptina em macrófagos. Para tanto, estimulamos macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs) foram pré-tratados com leptina (100ng/mL) e ativados com LPS (100ng/mL). A ativação de mTORC1 induz a fosforilação da S6-quinase-1 (S6-K) e da proteína 4E-BP1 (MA; BLENIS, 2009; QIN; JIANG; ZHANG, 2016), enquanto que a ativação de mTORC2 leva à fosforilação de AKT em sua serina 473 (QIN; JIANG; ZHANG, 2016). Na Figura 1A, observa-se que a fosforilação de S6K (p-S6K) é aumentada com a administração de LPS, e o tratamento com leptina não provoca uma mudança nessa fosforilação. Na Figura 1B também é mostrado que a administração de rapamicina (100nM) reduz a fosforilação de 4E-BP1 (p-4EBP1) em BMDMs sob administração de LPS. Isso indica que a leptina não modula a atividade de mTORC1. Todavia, na figura 1B, percebemos que a fosforilação de AKT aumenta com a administração de leptina, indicando que essa adipocina modula a atividade de mTORC2. Além disso, mesmo sob o tratamento com leptina, a fosforilação de AKT(ser473) (p-AKT(ser473)) é eliminada após administração de rapamicina. Logo, esses dados indicam que a rapamicina inibe a atividade de ambos os complexos de mTOR, por sua vez induzida por leptina e LPS.

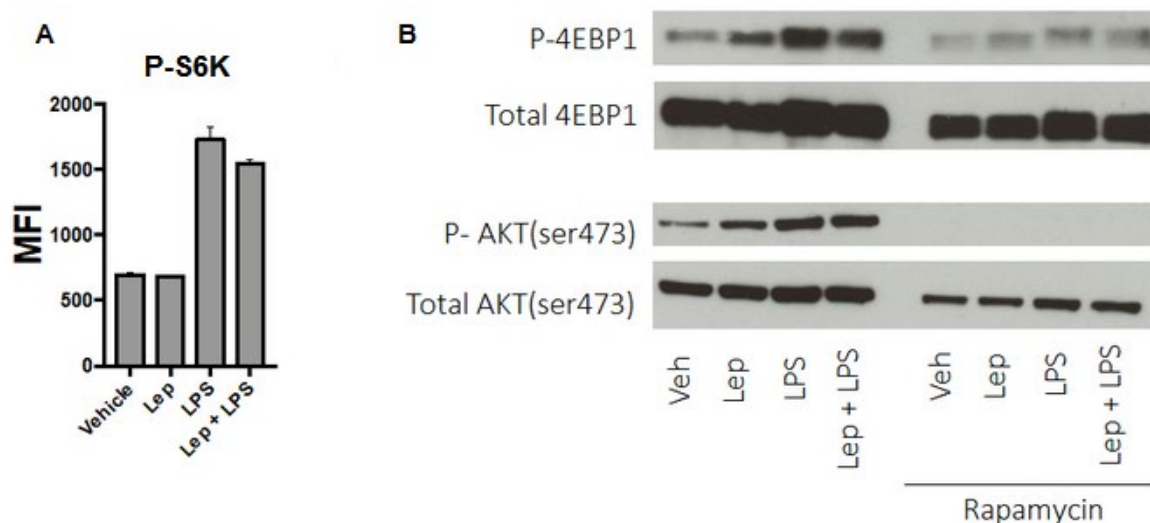


Figura 1: Rapamicina inibe a fosforilação de alvos de mTORC1 e mTORC2. A) MFI de S6 quinase fosforilada (p-S6K) por citometria de fluxo. n=3, representativo de 3 experimentos independentes. B) Western blotting representativo indicando os níveis proteicos de 4EBP1 total e fosforilado (acima) e AKT(ser473) total e fosforilada (abaixo). Figura representativa de 2 experimentos independentes.

Nosso próximo objetivo foi analisar o perfil de secreção das citocinas TNF- α (Figura 2A), IL-6 (Figura 2B) e IL-12 (Figura 2C) por BMDMs após administração de LPS (100ng/mL) e tratamento com leptina (100ng/mL) e/ou rapamicina (inibidora da atividade de mTOR, 100nM). Observamos que o perfil de secreção de TNF- α e de IL-6 dependem da atividade de mTOR (Figuras 2A-B), e não IL-12 (Figura 2C), uma vez que o tratamento com rapamicina reduziu sua secreção, potencializada pela leptina em macrófagos ativados com LPS (Figura 2). Dessa forma, concluímos que o efeito pró-inflamatório da leptina sobre macrófagos é mediado pela atividade de mTOR.

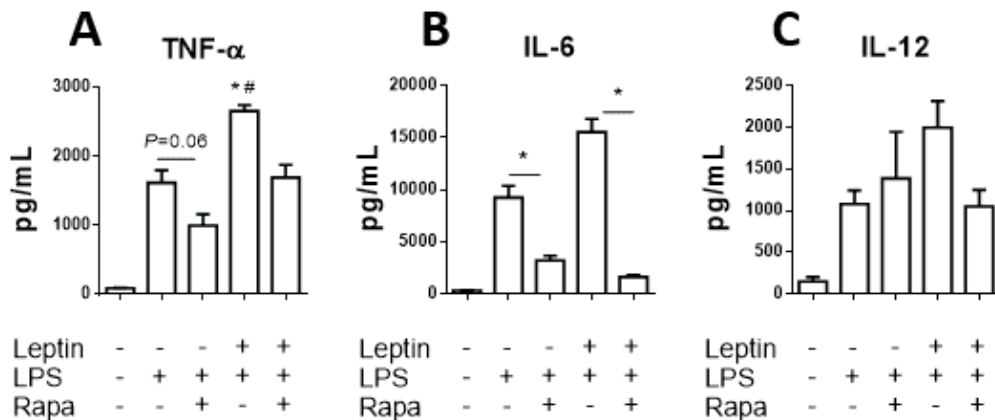


Figura 2: O perfil de secreção de citocinas, induzido por leptina, depende da atividade de mTOR. BMDMs obtidos de animais WT foram pré-tratados com rapamicina (100nM) por 30 minutos e estimulados com leptina (100ng/mL) e LPS (100ng/mL) por 6 horas. Foram, então, mensuradas, as concentrações das citocinas TNF- α (A), IL-6 (B) e IL-12 (C) produzidas por ELISA. n=3/grupo. \pm Erro padrão, *P<0.05.

Em seguida, avaliamos como mTORC1 e mTORC2 modulam a secreção de citocinas pró- e anti-inflamatórias em macrófagos ativados com LPS e tratados com leptina. Tratamos macrófagos *wild-type* (WT, ou fl/fl) e deficientes em Raptor ou Rictor (Raptor $^{-/-}$ ou Rictor $^{-/-}$) com LPS (100ng/mL) ou leptina (100ng/mL) + LPS (100ng/mL) por 6 horas. Observamos que macrófagos Raptor $^{-/-}$ não apresentaram redução na secreção de TNF- α ou de IL-6 (Figura 3A-B). Todavia, a secreção de TNF- α e IL-6 é reduzida em macrófagos Rictor $^{-/-}$ em relação aos WT (Figura 3C-D). Ademais, a leptina não modulou a secreção de IL-12 (pró-inflamatória) e IL-10 (anti-inflamatória) em macrófagos Rictor $^{-/-}$ (Figura 3E-F). Logo, devido ao resultado obtido referente à produção de TNF- α e de IL-6 (Figura 3C-D), é possível inferir que o efeito pró-inflamatório da leptina sobre a produção de citocinas de perfil pró-inflamatório em macrófagos está associado à atividade de mTORC2.

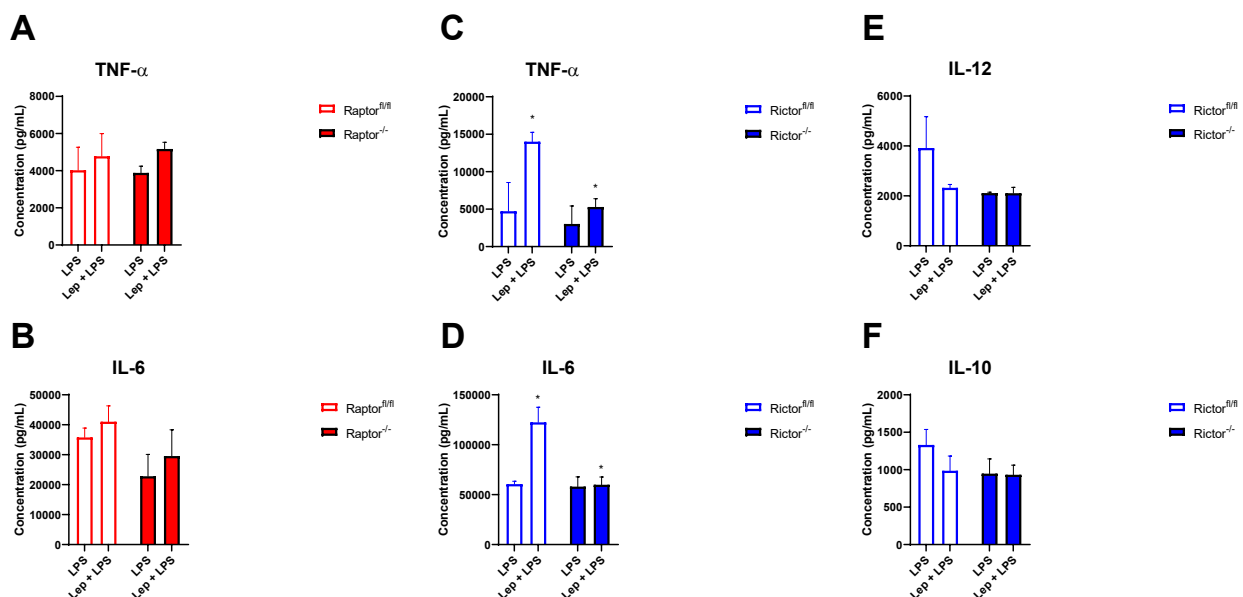


Figura 3: A ausência de mTORC2 reduz a produção de citocinas em BMDMs obtidos de animais *knockout* para a proteína Rictor. Concentração, em pg/mL, de TNF- α (A, C), IL-6 (B, D), IL-10 (E) e IL-12 (F), produzidas por BMDMs deficientes em Rictor

ou Raptor, após tratamento com LPS (100 ng/mL) ou leptina (100 ng/mL) + LPS por 6 horas. As concentrações foram mensuradas por protocolo de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). n=3/grupo. ± Erro padrão, *P<0.05.

A próxima etapa consistiu em avaliar o papel da leptina como um modulador do metabolismo de macrófagos. Foram, então, realizados experimentos objetivando compreender a ação da leptina sobre a função mitocondrial em macrófagos *Rictor*^{-/-} (Figura 4), uma vez que a ativação da via de PI3K/AKT/mTOR por leptina pode induzir um acúmulo de mitocôndrias disfuncionais em macrófagos (MONTEIRO et al., 2019), e nossos dados indicaram que a atividade da leptina em macrófagos está associada a mTORC2. A disfuncionalidade de mitocôndrias é uma característica de células em um contexto de inflamação, que se encontram em uma situação de estresse oxidativo, pela produção exacerbada de ROS, que passa a ser danoso à organela (LÓPEZ-ARMADA et al., 2013). Para avaliar o perfil mitocondrial desses macrófagos, nós utilizamos as *probes MitoTracker Green* e *Red* para determinar a massa e o potencial de membrana mitocondrial, respectivamente, por citometria de fluxo. As células foram tratadas com veículo, leptina (100ng/mL), LPS (100ng/mL) e leptina + LPS por períodos de 6 horas (Figura 4A e C) ou 24 horas (Figuras 4B e D) e, posteriormente, foi avaliada a quantidade de mitocôndrias funcionais (*MitoTracker Green*^{high} e *Red*^{high}) (Figuras 4A e B) e disfuncionais (*MitoTracker Green*^{high} e *Red*^{low}) (Figuras 4C e D). O tratamento com leptina + LPS por um período de 6 horas em macrófagos deficientes em *Rictor* acarreta uma menor funcionalidade de mitocôndrias em células WT (Figura 4A). Após 24h de tratamento com leptina + LPS em células *Rictor*^{-/-}, a disfuncionalidade de mitocôndrias é reduzida em relação ao grupo WT (Figura 4D). Esses resultados indicam que a atividade de mTORC2 está relacionada ao efeito da leptina sobre a disfuncionalidade de mitocôndrias em macrófagos.

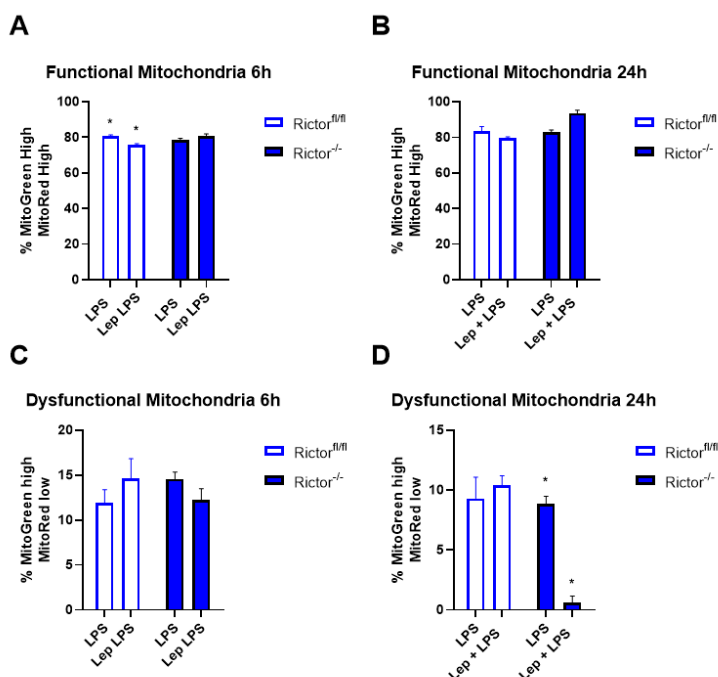


Figura 4: A ausência de mTORC2 impede a evolução da disfuncionalidade de mitocôndrias em BMDMs *Rictor*^{-/-}. BMDMs obtidos de animais com *knockout* para a proteína *Rictor* tratados com LPS (100 ng/mL) ou Leptina (100 ng/mL) + LPS, durante 6 horas (A e C) ou 24 horas (B e D), sendo a leptina administrada 30 minutos anteriormente ao LPS. (A) Porcentagem de mitocôndrias funcionais após 6 horas de tratamento; (B) Porcentagem de mitocôndrias funcionais após 24 horas de tratamento; (C) Porcentagem de mitocôndrias disfuncionais após 6 horas de tratamento; (D) Porcentagem de mitocôndrias disfuncionais após 24 horas de tratamento. n=3/grupo ± Erro padrão, *P<0.05.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados aqui apresentados, percebemos que a ausência de mTORC2 reduz a secreção de citocinas pró-inflamatórias mediada pela leptina em BMDMs estimuladas com LPS. Além disso, observamos que a ausência da atividade de mTORC2 reduz o acúmulo de mitocôndrias disfuncionais nessas células. Concluímos, portanto, que a leptina exacerba o perfil inflamatório de macrófagos por uma via dependente de mTORC2.

BIBLIOGRAFIA

- COHEN, M. M. Role of leptin in regulating appetite, neuroendocrine function, and bone remodeling. **American Journal of Medical Genetics**, v. 140 A, n. 5, p. 515–524, 2006.
- ELLULU, M. S. et al. Obesity & inflammation: The linking mechanism & the complications. **Archives of Medical Science**, v. 13, n. 4, p. 851–863, 2017.
- HUANG, S. C. C. et al. Metabolic Reprogramming Mediated by the mTORC2-IRF4 Signaling Axis Is Essential for Macrophage Alternative Activation. **Immunity**, v. 45, n. 4, p. 817–830, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2016.09.016>>.
- JIANG, H. et al. Macrophage mTORC1 disruption reduces inflammation and insulin resistance in obese mice. **Diabetologia**, v. 57, n. 11, p. 2393–2404, 2014.
- LÓPEZ-ARMADA, M. J. et al. Mitochondrial dysfunction and the inflammatory response. **Mitochondrion**, v. 13, n. 2, p. 106–118, 2013.
- MA, X. M.; BLENIS, J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 5, p. 307–318, 2009.
- MONTEIRO, L. et al. Leptin in the regulation of the immunometabolism of adipose tissue-macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 106, n. 3, p. 703–716, 2019.
- MORAES-VIEIRA, P. M. M. et al. Leptin as a link between the immune system and kidney-related diseases: Leading actor or just a coadjuvant? **Obesity Reviews**, v. 13, n. 8, p. 733–743, 2012.
- MYERS, M. G.; COWLEY, M. A.; MÜNZBERG, H. Mechanisms of leptin action and leptin resistance. **Annual Review of Physiology**, v. 70, p. 537–556, 2008.
- QIN, X.; JIANG, B.; ZHANG, Y. 4E-BP1, a multifactor regulated multifunctional protein. **Cell Cycle**, v. 15, n. 6, p. 781–786, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/15384101.2016.1151581>>.
- SWITON, K. et al. Molecular neurobiology of mTOR. **Neuroscience**, v. 341, p. 112–153, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.11.017>>.
- VARELA, L.; HORVATH, T. L. Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. **EMBO Reports**, v. 13, n. 12, p. 1079–1086, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/embor.2012.174>>.
- WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1796–1808, 2003.