



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**Influencia del microambiente del tejido adiposo de  
individuos con diferente grado de adiposidad sobre el  
fenotipo de los monocitos**

**T E S I S**

Que presenta

**REBECA STEPHANIE KLIMEK LEYVA**

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS  
EN LA ESPECIALIDAD DE BIOMEDICINA MOLECULAR**

Directora de la tesis  
Dra. María Carmen Sánchez Torres

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de la Dra. María Carmen Sánchez Torres, en el Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional

## **COMITÉ TUTORIAL**

Directora de tesis:

Dra. María Carmen Sánchez Torres

Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV

Asesores:

Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete

Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV

Dr. Michael Schnoor

Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV

La Ing. en Biotecnología Rebeca Stephanie Klimek Leyva realizó esta tesis de maestría con una beca otorgada por CONACYT (No. 422665)

## AGRADECIMIENTOS

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.
- A la Dra. María Carmen Sánchez Torres, mi gratitud y cariño por su infinita paciencia, profesionalidad y enseñanzas otorgadas.
- A mis asesores, el Dr. Michael Schnoor por su apoyo en el desarrollo de este proyecto y en especial al Dr. Vianney Ortiz por su disponibilidad, apoyo y confianza en mi trabajo.
- A mis padres por ser el motor de mi vida y por su apoyo y amor incondicional.
- A mi familia por siempre estar presente a lo largo de mi maestría y darme ánimos.
- A mis compañeros de laboratorio Angélica Girón, Keity Farfán, Adrián Duque y Eduardo Patiño porque sin ustedes este viaje no hubiera sido tan ameno y sobre todo por brindarme su amistad y apoyo incondicional.
- A mis compañeros de maestría por su apoyo moral y amistad desinteresada.
- A la Dra. Norma Segovia, auxiliar de nuestro laboratorio, por su apoyo absoluto y consejos brindados.
- A Julio Ramírez, técnico de nuestro laboratorio, por siempre tener la mejor disposición para ayudarme, por sus consejos y su arduo trabajo.
- A Ninfa Arreola y Maru Maqueda por sus consejos brindados y ayudarme siempre que lo necesité.
- Al Banco de Sangre del Hospital “La Raza” del IMSS, por su trato amable y permitirme la obtención de las muestras para el desarrollo de este trabajo.

## ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	5
RESUMEN EN ESPAÑOL .....	7
RESUMEN EN INGLÉS.....	9
INTRODUCCION .....	11
Tejido Adiposo .....	11
El tejido adiposo en la obesidad.....	12
Fenotipo y funciones de los macrófagos.....	14
Acumulación de macrófagos en la obesidad.....	16
Fenotipo de los ATM en la obesidad .....	17
Influencia del microambiente del AT en la obesidad sobre el fenotipo de los macrófagos.....	20
Hipoxia del AT.....	20
Muerte celular del adipocito .....	21
Hiperglicemia.....	21
Lípidos.....	22
Factores secretados por el AT .....	23
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN .....	27
HIPOTESIS .....	27
OBJETIVOS .....	28
Objetivo general .....	28
Objetivos particulares.....	28
METODOLOGÍA.....	29
Aislamiento de monocitos.....	29
Obtención de muestras de tejido adiposo .....	29
Generación de los medios condicionados de tejido adiposo.....	30
Extracción de RNA .....	31
Determinación de citocinas y marcadores asociados a los fenotipos M1, M2 y MMe por RT-PCR cuantitativa.....	31

RESULTADOS.....	33
Los monocitos en condiciones de adherencia y cultivados con SFB adquieren un fenotipo pro-inflamatorio .....	33
Los MC de AT subcutáneo de individuos obesos y delgados promueven un fenotipo anti-inflamatorio en los monocitos.....	34
Los monocitos expuestos a MC de AT de omento de individuos obesos exhiben un fenotipo mixto.....	35
Los monocitos expuestos a MC de AT de individuos delgados y obesos adquieren un fenotipo anti-inflamatorio, independientemente del origen del AT .....	36
La expresión de CCL2 y CCR2 se incrementa diferencialmente en monocitos expuestos a MC de omento de individuos obesos .....	39
Los monocitos expuestos a MC de individuos obesos no recapitulan la activación metabólica .....	40
La expresión del eje CCL2/CCR2 se asocia positivamente con marcadores anti-inflamatorios.....	41
DISCUSIÓN .....	44
CONCLUSIONES.....	51
PERSPECTIVAS.....	52
BIBLIOGRAFÍA .....	53

## ABREVIATURAS

ABCA1: cassette transportador de unión a ATP A1

AT: tejido adiposo

ATM: macrófagos de tejido adiposo

BAT: tejido adiposo marrón

CD274: ligando 1 de muerte programada

CLS: estructuras tipo corona

COX-2: ciclooxigenasa 2

ECM: matriz extracelular

GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos

HFD: dieta alta en grasas

IFN: interferón

IL: interleucina

iNOS: sintasa inducible de óxido nítrico

LPS: lipopolisácarido bacteriano

LYVE-1: receptor endotelial de hialuronato de vasos linfáticos

M1: macrófagos pro-inflamatorios

M2: macrófagos anti-inflamatorios

MCP1 o CCL2: proteína quimioatrayente de monocitos

M-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos

MHC-II: complejo principal de histocompatibilidad de clase II

MΦ: macrófagos

Mrc1: receptor de manosa C tipo 1

Mrc2: receptor de manosa C tipo 2

NO: óxido nítrico

NOS: sintasa de óxido nítrico

PLIN2: perilipina

PPAR: receptor activado por el proliferador de peroxisomas

ROS: especies reactivas de oxígeno

T<sub>H</sub>2: linfocitos T cooperadores de tipo 2

Treg: linfocitos T reguladores

TOLL: receptor tipo toll

TNF: factor de necrosis tumoral

WAT: tejido adiposo blanco

Ym1: quitinasa tipo 3

## RESUMEN EN ESPAÑOL

La obesidad se considera un estado de inflamación crónica de bajo grado, y las células del tejido adiposo (AT) juegan un papel muy importante en su establecimiento. El AT es el órgano endócrino más grande del cuerpo y está compuesto por diversas poblaciones celulares que son capaces de secretar una amplia variedad de factores. Entre las células no adipocíticas que componen el AT destacan los macrófagos (M $\phi$ ). Estas células se acumulan durante la obesidad, consecuencia del reclutamiento de sus precursores monocíticos desde la sangre, y constituyen la base para la generación de muchos de los mediadores inflamatorios que se encuentran incrementados durante la obesidad. Los M $\phi$  son células muy versátiles, y son capaces de responder a las señales específicas del tejido al cual migraron y diferenciarse hacia diversos fenotipos funcionales. Sin embargo, no se ha descrito aún si el microambiente del AT en el contexto de la obesidad puede influenciar el fenotipo de los monocitos a su llegada al tejido. Lo anterior ha sido reportado por algunos grupos de investigación en M $\phi$  de tejido adiposo, donde se ha descrito una activación metabólica de éstos (con incremento de moléculas como ABCA1 y PLIN2), diferente de las activaciones pro- (M1) y anti-inflamatorias (M2) descritas en situaciones de inflamación aguda. Sin embargo, existen pocos estudios acerca de la función de los precursores de los M $\phi$  del AT, los monocitos sanguíneos, cuando se extravasan al AT en individuos con distinto grado de adiposidad. En el presente trabajo se generaron medios condicionados (MC) a partir de AT subcutáneo y de omento de individuos delgados y obesos, una herramienta que nos permitió evaluar si los factores secretados por el AT promueven cambios en el fenotipo de los monocitos. Los MC de individuos obesos, sin importar la localización del AT, indujeron una polarización alternativa M2 en los monocitos, con incrementos en la expresión del mRNA de marcadores asociados a esta activación como IL10, CD163 y CD163L1, así como una ligera disminución en la expresión de marcadores pro-inflamatorios (TNF, IL6). Se detectó también un incremento selectivo en la expresión de transcritos de CCL2, CCR2 e ITGAX cuando los monocitos fueron expuestos a MC de omento de individuos obesos. Las moléculas CCL2 y CCR2 están implicadas en el reclutamiento de monocitos al AT, e ITGAX representa un marcador de M $\phi$  pro-inflamatorios reclutados al AT. Además se observó que el aumento en la expresión de CCL2/CCR2 correlacionaba



positivamente con la expresión de marcadores anti-inflamatorios como IL10 y CD163, lo cual sucedía también entre CCR2 e ITGAX. Finalmente, nuestros datos indicaron que la expresión de marcadores asociados a la activación metabólica (ABCA1 y PLIN2) no son inducidos por los MC de individuos obesos en los monocitos. En conjunto nuestros resultados indican que el AT de individuos obesos produce factores que incrementan la síntesis de moléculas de reclutamiento al tejido por parte de los monocitos (CCR2 y CCL2), así como de marcadores característicos de M $\phi$  con función anti-inflamatoria y de remodelación de tejidos (IL10, CD163). Si bien no descartamos que una parte de los M $\phi$  presentes en el AT durante la obesidad tengan un perfil inflamatorio, como lo sugiere el incremento en la expresión de ITGAX en monocitos expuestos a MC de omento de individuos obesos, nuestros datos apoyan la idea de que los M $\phi$  del AT de individuos obesos tienen una actividad clave como células responsables de orquestar la remodelación del tejido que conlleva la obesidad, promoviendo procesos como la angiogénesis, la regeneración y destrucción de la matriz extracelular, y la eliminación de las células muertas.

## RESUMEN EN INGLÉS

Obesity is considered a state of chronic low-grade inflammation, and the adipose tissue (AT) plays important roles in its establishment. The AT is the largest endocrine organ in the body and is composed by diverse cellular populations that secrete a wide variety of factors. Macrophages (M $\phi$ ) are among the non-adipocyte cells that comprise the AT. These cells accumulate during obesity mainly as a result of the recruitment of blood monocytes, and generate many of the inflammatory mediators that are increased during obesity. M $\phi$  are very versatile cells, and are able to respond to specific tissue signals and differentiate towards diverse functional phenotypes. Nevertheless, it has not yet been described if the microenvironment of the AT in the context of obesity can influence the phenotype of monocytes upon their arrival to the tissue. The above has been reported by some research groups in AT M $\phi$ , where a “metabolic activation” different from the pro- (M1) and anti-inflammatory (M2) activation has been described. The expression of molecules such as ABCA1 and PLIN2 characterize that particular activation. However, there are few studies addressing the function of the precursors of AT M $\phi$ , the blood monocytes, when they extravasate to AT of individuals with different degrees of adiposity. In the present work, conditioned media (CM) were generated from subcutaneous and omentum AT of lean and obese individuals, a tool that allowed us to evaluate whether the factors secreted by AT promoted changes in monocyte phenotype. The CM of obese individuals, regardless of AT localization, induced an alternative polarization (M2) in the monocytes, with increases in mRNA expression of markers associated with this activation such as IL10, CD163 and CD163L1, as well as slight decrease in the expression of pro-inflammatory markers (TNF, IL6). A selective increase in the expression of CCL2, CCR2 and ITGAX transcripts was also detected when the monocytes were exposed to CM from omentum of obese individuals. The CCL2 and CCR2 molecules are involved in the recruitment of monocytes to AT, and ITGAX represents a marker of pro-inflammatory M $\phi$  recruited to AT. The increase of CCL2/CCR2 axis expression was positively correlated with the expression of anti-inflammatory markers such as IL10 and CD163, which also occurred between CCR2 and ITGAX. Finally, our data indicated that the expression of markers associated with metabolic activation (ABCA1 and PLIN2) was not induced by CM of obese individuals in

monocytes. Overall, our results indicate that the AT of obese individuals produces factors that increases the synthesis of recruitment molecules in the monocytes (CCR2 and CCL2), as well as M $\phi$  markers associated with anti-inflammation and tissue remodeling (IL10, CD163). Although we do not rule out that a part of the AT M $\phi$  generated during obesity presents an inflammatory profile, as suggested by the increased expression of ITGAX in monocytes exposed to CM from the omentum of obese individuals, our data support the idea that the AT M $\phi$  from obese individuals have a key activity as cells that orchestrate the tissue remodeling that accompanies obesity, promoting processes such as angiogenesis, regeneration and destruction of the extracellular matrix, and elimination of dead cells.

## INTRODUCCIÓN

### Tejido Adiposo

El tejido adiposo (AT) es un tejido conectivo sin una anatomía específica (1) que funciona como un órgano de almacenamiento de energía a largo plazo, y tiene un papel clave en la integración del metabolismo sistémico (2). En la actualidad es considerado como el órgano endócrino más grande, secretor de hormonas como leptina y adiponectina, factores de crecimiento y mediadores pro- y anti-inflamatorios (3). El AT está compuesto principalmente por adipocitos, pero también contiene una matriz de tejido conectivo, tejido nervioso, células endoteliales, fibroblastos y células inmunes; estos componentes funcionan como una unidad integrada y componen la fracción estromal-vascular del AT. Existen dos tipos principales de AT: el blanco (WAT) y el marrón (BAT). El primero tiene la función de almacenar energía y de soporte mecánico, mientras que el segundo se caracteriza por presentar una mayor cantidad de mitocondrias y se especializa en quemar energía para la termogénesis y en el metabolismo de lípidos (1, 4-6). El WAT está distribuido a lo largo del cuerpo en dos depósitos principales, el visceral (VAT, con localización intra-abdominal alrededor del omento, intestino y áreas perirenales), que ocupa el 10% del cuerpo, y el subcutáneo (SAT, con localización en nalgas, muslos y abdomen), que ocupa el 85% (7). Ambos tejidos tienen diferencias fisiológicas, celulares y de localización, entre otras. Por ejemplo el VAT está más innervado y contiene un número mayor de células inmunes; sus adipocitos son más grandes y presentan una mayor capacidad lipolítica e hipertrófica, mientras que el SAT contiene adipocitos pequeños, con una mayor capacidad de adipogénesis y de acumulación de lípidos (8). En general, el VAT se caracteriza por tener una mayor actividad metabólica, ser inmunológicamente dinámico, y por tener una mayor asociación con factores de riesgo del síndrome metabólico (9). Anteriormente se mencionó que el AT es un órgano endócrino que regula la homeostasis metabólica. Esta función es mediada, en parte, por su capacidad para secretar numerosas proteínas que ejercen funciones pleiotrópicas a través de varias rutas metabólicas. Estos factores que son secretados por el AT son llamados adipocinas (2, 5). Las adipocinas son moléculas que exhiben características de

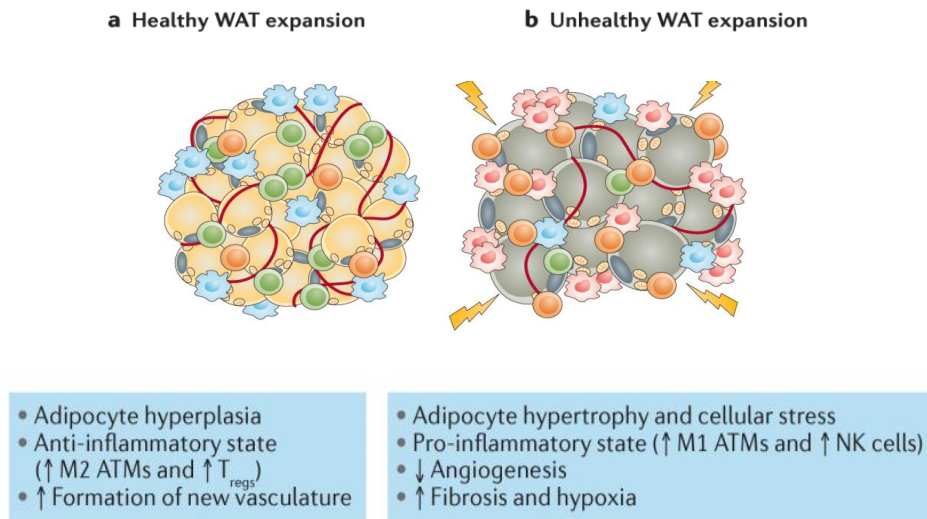
hormonas durante procesos metabólicos, así como también funciones de citocinas en la modulación de la respuesta inmune; entre ellas se puede señalar que aumentan la activación celular, sobrevivencia, quimiotaxis e incrementan la producción de citocinas pro- y anti-inflamatorias (10). Además de estas señales eferentes, los adipocitos expresan numerosos receptores, entre ellos el receptor tipo Toll (TLR)-4, los cuales les permiten responder a señales (4) como la presencia de patógenos, señales e peligro endógenas, y citocinas. Los adipocitos son sensibles a los efectos del factor de necrosis tumoral (TNF), interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-11 e interferón (IFN)- $\gamma$ , lo cual activa múltiples cascadas de señalización, induciendo la secreción de adipocinas (11).

La plasticidad del AT le provee una base mecanicista para sus funciones pleiotrópicas, las cuales modulan la homeostasis inmune y endocrina (12). Una característica única del WAT es su extraordinaria capacidad para cambiar sus dimensiones en respuesta al estatus nutricional, por medio de la remodelación del tejido. Este tejido puede alterar su tamaño, función, estado inflamatorio y su distribución en el cuerpo. Desde una perspectiva celular, el WAT cambia la composición de la matriz extracelular (ECM), vascularización, tamaño y número de adipocitos, niveles de estrés oxidativo, perfil de secreción de adipocinas y el estado inflamatorio de las células inmunes infiltradas. Esto se logra a partir del alargamiento de los adipocitos pre-existentes por la acumulación de lípidos (hipertrofia) o por el incremento del número de adipocitos (hiperplasia) (13). Es clásicamente aceptado que la hiperplasia permite una expansión saludable del AT, debido a que es mediada por la formación de adipocitos funcionales a partir de células progenitoras; en contraste la hipertrofia conduce típicamente a la sobrecarga de lípidos y a la disfunción de los adipocitos (14).

### **El tejido adiposo en la obesidad**

El AT de individuos delgados está compuesto por un sistema balanceado de mediadores anti- y pro-inflamatorios y de células inmunes que sustentan el almacenamiento normal del AT, la función endocrina y la acción sistémica de la insulina para mantener el metabolismo normal de todo el cuerpo. La obesidad es una enfermedad metabólica caracterizada por la

acumulación de WAT debido al incremento de ingesta de alimento y a los estilos de vida sedentarios (3). En la obesidad el WAT altera sus funciones y falla en la expansión adecuada para responder al consumo excesivo de nutrientes. Esta remodelación del tejido asociada a la obesidad genera un estado pro-inflamatorio (Fig. 1) (11). La expansión disfuncional se debe principalmente a la hipertrofia de los adipocitos; a medida que los adipocitos aumentan de tamaño algunos mueren por apoptosis y son rodeados por macrófagos (M $\phi$ ) pro-inflamatorios, formando las estructuras tipo corona (CLS), las cuales se han convertido en una característica particular de la inflamación en el AT (14). Estos procesos van acompañados de un cambio en el perfil secretor de adipocinas, el cual incluye un aumento de factores pro-inflamatorios como TNF, IL-1- $\beta$ , IL-6, leptina, resistina y la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP)-1 (CCL2), con una reducción paralela de factores anti-inflamatorios, como IL-10 y adiponectina. A nivel de tejido estas alteraciones están asociadas con un mayor grado de fibrosis e hipoxia, así como con modificaciones en la abundancia y composición de la fracción estromal-vascular. En esta fracción se encuentran una menor cantidad de células anti-inflamatorias como linfocitos T reguladores (Treg) y cooperadores de tipo 2 (T<sub>H</sub>2), así como un aumento de células pro-inflamatorias como linfocitos T<sub>H</sub>1 y T CD8<sup>+</sup>. También existe un cambio en la proporción de los M $\phi$  anti-inflamatorios (M2) y pro-inflamatorios (M1), ya que en los M $\phi$  de tejido adiposo (ATM) en individuos delgados predominan los primeros mientras que en sujetos obesos estas células se activan y adoptan un fenotipo M1. Además, algunos de los factores pro-inflamatorios que se producen durante la obesidad promueven la infiltración de monocitos, los cuales en el AT se diferencian hacia M $\phi$  de tipo pro-inflamatorio (11, 14, 15). El AT es un fuerte candidato para la iniciación de la cascada de cambios celulares que promueven la respuesta inflamatoria de bajo grado en la obesidad, debido a que es una fuente de factores solubles que estimulan la función celular inmune (15). Además, se han encontrado diferencias entre los depósitos de AT, esto mediante experimentos *ex vivo* que han mostrado que el status inflamatorio, determinado por la liberación de las citocinas, está elevado en el VAT comparado con el SAT, lo cual implicaría que el fenotipo de los M $\phi$  difiere entre los dos depósitos de AT (16).



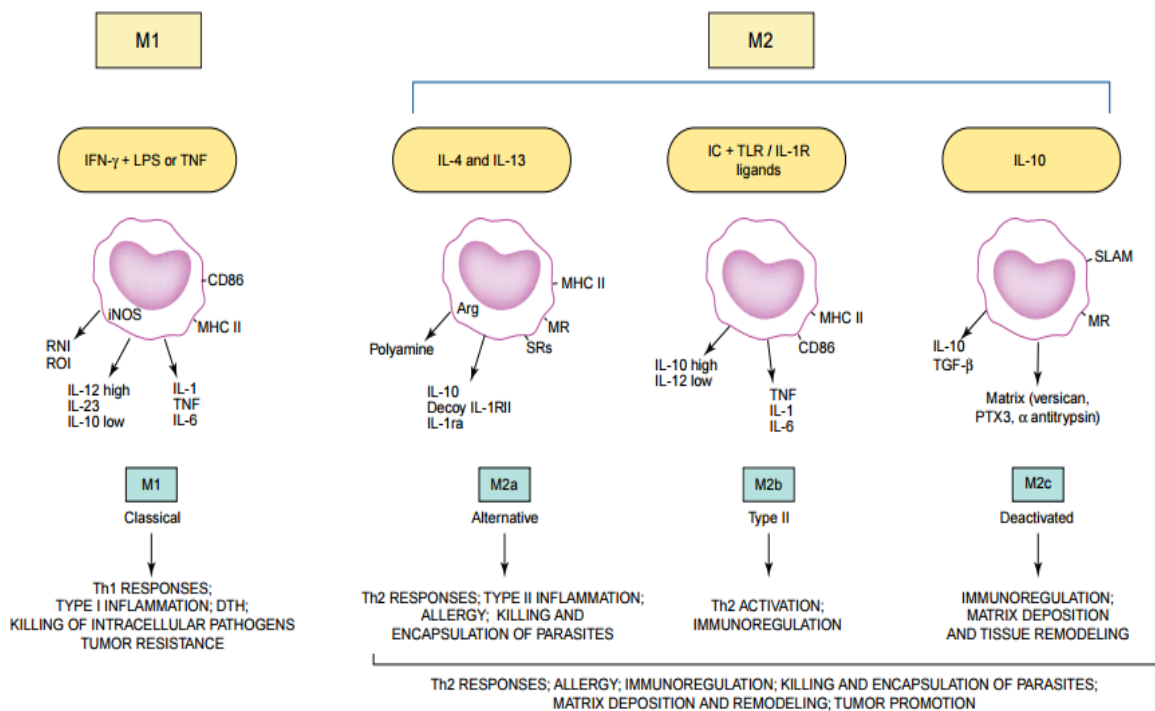
**Figura 1. Expansión adecuada del WAT en comparación con la expansión inducida por la obesidad.** Tomada de Kusminski y col., 2016 (15).

### Fenotipo y funciones de los macrófagos

Los M $\phi$  son células fagocíticas residentes en tejidos linfoides y no linfoides, y probablemente son las células más plásticas entre las de origen hematopoyético, además de ser un componente esencial de la inmunidad innata y de jugar un papel central en la inflamación y la defensa del huésped (17). Los M $\phi$  tienen una función importante en la homeostasis tisular, y son capaces de reconocer y eliminar patógenos, células neoplásicas, células muertas y “debris” celular, en una manera dependiente de la activación (18). La mayoría de los M $\phi$  residentes de tejido derivan de progenitores embrionarios en condiciones homeostáticas, y tienen la capacidad de mantener sus números a través de una proliferación local. Durante la inflamación esta situación cambia, y el tejido se ve enriquecido con M $\phi$  derivados de monocitos, aunque también existe una mayor tasa de proliferación de los M $\phi$  residentes (19, 20). La polarización tanto de los M $\phi$  residentes como de los M $\phi$  derivados de monocitos ocurre por la activación de diferentes programas de diferenciación, y estas células son capaces de responder

apropiadamente a los diferentes contextos tisulares en los que se encuentran, siendo la diversidad funcional una de las características clave de los M $\phi$ . Las señales a las que están expuestos dictan la respuesta transcripcional que da forma al fenotipo y la función de los M $\phi$  sobre las bases del contexto fisiológico y patofisiológico, lo cual explica su heterogeneidad (20, 21). Basado en su patrón de expresión de genes y su función, los M $\phi$  han sido clasificados en “clásicamente activados” o M1 y en “alternativamente activados” o M2. El fenotipo M1 es promovido por mediadores de la respuesta TH1 como el lipopolisácarido (LPS) e IFN- $\gamma$ , y se caracteriza por la producción incrementada de citocinas pro-inflamatorias (IL-6, TNF, IL-1 $\beta$ , IL-12 e IL-23) y de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS, NOS), por lo que están especializados en procesos inflamatorios mediados por microorganismos intracelulares (Fig. 2). En general estas células expresan altos niveles del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC-II), moléculas co-estimuladoras (CD80 y CD86) y la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS), la cual genera óxido nítrico (NO) a partir de L-arginina; además, los M $\phi$  M1 expresan quimiocinas que atraen células TH1, como CXCL9 y CXCL10. (22, 23). En contraste, mediadores de tipo TH2 como IL-4 inducen la diferenciación hacia el fenotipo M2, el cual activa la expresión de factores que promueven la remodelación de los tejidos y ayudan a resolver la inflamación (22). Este fenotipo se caracteriza por una actividad fagocítica incrementada, la expresión de citocinas anti-inflamatorias (IL-10, IL-1RA), de receptores tipo lectina y scavenger, y quimiocinas como CCL17, CCL18, CCL22 y CCL24, así como la producción de ornitina y poliaminas a partir de L-arginina por su expresión de arginasas (Fig. 2) (17, 24). Recientemente se ha demostrado que dos marcadores permiten diferenciar subpoblaciones de M $\phi$  humanos *in vitro* e *in vivo*, la lectina CLEC5A para los M $\phi$  M1 y el receptor scavenger CD163L1 para los M $\phi$  M2 (25). Los fenotipos M1 y M2 no son estables, y un M $\phi$  puede adoptar una variedad de fenotipos funcionales dependiendo de los cambios continuos y sutiles en el microambiente del tejido (20, 21).





**Figura 2. Inductores y propiedades funcionales de diferentes poblaciones polarizadas de macrófagos.** Tomada de Mantovani y col., 2004 (26).

### Acumulación de macrófagos en la obesidad

Entre las células inmunes que se infiltran al AT de obesos los M $\phi$  son funcional y numéricamente dominantes. En ratones y humanos delgados los M $\phi$  representan alrededor del 5% de las células de la fracción estromal-vascular del AT, mientras que durante la obesidad constituyen hasta un 50% de éstas, lo que indica que la obesidad altera sustancialmente la proporción de M $\phi$  (27). Cabe mencionar de manera importante que la presencia aumentada de los M $\phi$  en el AT de ratones obesos ocurre independientemente de la etiología de la obesidad: formas monogénicas de obesidad y la obesidad inducida por la dieta resultan en un mayor número de ATM (28). Tradicionalmente la acumulación de los ATM en la obesidad es considerada una consecuencia de la migración de monocitos periféricos, esto demostrado por medio de experimentos de trasplante de médula ósea y mediante métodos de seguimiento

de monocitos *in vivo* (27, 29). Se cree que la contribución de los monocitos se debe al hecho de que el reclutamiento tiene el objetivo específico de proveer una población funcional de células diferenciadas (20). Recientemente, la evidencia ha mostrado que en ratones a los que se les indujo obesidad existe una proliferación *in situ* de M $\phi$  residentes que predomina en las etapas tempranas de la obesidad, mientras que los monocitos reclutados contribuyen a la acumulación de los ATM en etapas tardías de la misma (30). Se ha comprobado en modelos de ratón que el receptor CCR2 y su ligando CCL2, un eje comúnmente involucrado en el reclutamiento de monocitos, son requeridos para la acumulación de ATM, y que esta acumulación está acompañada de un aumento en la expresión de genes inflamatorios (31-33). A su vez, se han descrito otras quimiocinas involucradas en el reclutamiento de M $\phi$  al AT en el contexto de la obesidad, como CCL5 y CX3CL1 (34-36). Por otra parte, se ha reportado que la pérdida de peso disminuye los números de ATM y de marcadores inflamatorios y, como consecuencia, se produce una mejoría en la resistencia a la insulina (33, 37). Adicionalmente, los M $\phi$  en el AT de individuos delgados se localizan de manera dispersa en el intersticio del tejido, mientras que en individuos obesos se encuentran localizados tanto en el intersticio como agrupados en las estructuras CLS (38).

### **Fenotipo de los ATM en la obesidad**

Los hallazgos en estudios animales y experimentos *in vitro* han sugerido que los ATM juegan un papel crítico en el establecimiento del estado inflamatorio crónico y de disfunciones metabólicas como la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y la resistencia a la insulina (23). El fenotipo adquirido por los M $\phi$  en el contexto de la obesidad ha sido examinado usando marcadores intracelulares y de membrana, los cuales son considerados específicos de M $\phi$  de tipo M1 o M2. Se ha descrito en ratones delgados y obesos poblaciones de ATM con características fenotípicas y funcionales diferentes. En los ratones delgados se ha definido que los ATM poseen características de tipo M2, debido a que expresan marcadores canónicos de esta polarización como arginasa 1, quitinasa tipo 3 (Ym1), lectinas como los receptores de manosa tipo 1 y 2 (Mrc1, Mrc2) y Mlg1 (Clec10a), así como los marcadores pan-macrofágicos F4/80 y

CD11b. En contraste, en los ratones expuestos a una dieta alta en grasas (HFD) existe una población de M $\phi$  que es reclutada al AT y que expresa F4/80 y CD11c, así como marcadores pro-inflamatorios como IL-6 e iNOS; estas células abundan más en el VAT que en el SAT, consistente con la hipótesis de que la grasa visceral juega un papel más prominente en la resistencia a la insulina durante la obesidad. Estos hallazgos definieron que la obesidad inducía un cambio en el fenotipo de los ATM (23, 39, 40).

En humanos la caracterización del fenotipo de los ATM es controversial. Se ha reportado una subpoblación de ATM CD16-/CD206+ cuya acumulación se asocia con la adiposidad aumentada; sin embargo, presentan un fenotipo de M $\phi$  con capacidades de remodelación tisular o M2, los cuales expresan bajos niveles de IL-8 y de ciclooxygenasa-2 (COX-2), y una expresión incrementada del receptor endotelial de hialuronato de vasos linfáticos (LYVE)-1 (41). Igualmente, se encontró que los ATM del SAT de individuos obesos presentan marcadores M2 como CD163, y su nivel de expresión se encuentra altamente asociado con el de CD14 y CD68; estos ATM expresaban altos niveles de IL10 y bajos niveles de TNF. Este perfil M2 podría representar un mecanismo protector para contrarrestar la inflamación crónica de bajo grado en la obesidad (42). En contraste, Wentworth y col. identificaron un fenotipo mixto en los ATM del SAT y del VAT de individuos obesos (43). Éstos se localizan en las CLS y co-expresan CD11c y CD206. Poseen un perfil M1 debido a que expresan altos niveles de integrinas, moléculas de presentación antigénica (CD86, CD1) y citocinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF), aunque también sintetizan altos niveles de IL-10 basalmente y en respuesta a LPS (43). También se ha demostrado que una población de M $\phi$  CD40+ se incrementan en número en la obesidad; sin embargo el número de M $\phi$  que expresan CD163 y CD206, dos marcadores asociados *in vitro* al fenotipo M2, no se modifica (44). Adicionalmente, Zeyda y col. (45) demostraron que los ATM presentan un fenotipo único, el cual se encuentra representando a las dos polarizaciones de M $\phi$  descritas M1/M2, debido a que expresan marcadores de superficie de tipo M2 como el receptor de manosa CD206, el receptor scavenger CD163 y la integrina  $\alpha$ v $\beta$ 5, y producen citocinas anti-inflamatorias, pero también son capaces de secretar grandes cantidades de citocinas pro-inflamatorias (45). Recientemente Kratz y col. (22) demostraron que el tratamiento *in vitro* de M $\phi$  derivados de monocitos humanos con glucosa, insulina y palmitato,

factores que se encuentran aumentados en individuos obesos, produce un fenotipo “metabólicamente activado” distinto de la activación clásica o alternativa. Los autores analizaron la expresión de marcadores de superficie en M $\phi$  humanos generados en presencia del factor estimulante de colonias de granulocitos/M $\phi$  (GM-CSF) o del factor estimulante de colonias de M $\phi$  (M-CSF), polarizados hacia un perfil M1 o M2 respectivamente, e identificaron algunos marcadores del fenotipo M1 conservados entre humanos y ratones: PD-L1 o ligando 1 de muerte programada (CD274), la ADP-ribosil-ciclase CD38 y SLAMF7 (CD319), que además se expresaban en condiciones de inflamación *in vivo*. Sin embargo, los ATM de individuos obesos producían citocinas inflamatorias pero no al nivel de los M $\phi$  M1, y a su vez no mostraban expresión de ninguno de los marcadores de superficie asociados al fenotipo M1. Por el contrario, se encontró una expresión incrementada de los marcadores ABCA1 (casette transportador de unión a ATP A1), CD36 (receptor scavenger de clase B) y PLIN2 (perilipina 2), todos involucrados en el transporte o en el metabolismo de lípidos. Esta observación sugiere que en el contexto de la obesidad existen estímulos distintos a los de la activación clásica, como son la insulina, la glucosa y los ácidos grasos libres, los cuales promueven un estado inflamatorio en los M $\phi$ . De esta manera, el estímulo *in vitro* de M $\phi$  con estas moléculas recapitula lo observado *in vivo* en los ATM de sujetos obesos. Los autores exploraron también la posibilidad de que los factores secretados por el AT de individuos obesos estuvieran regulando el fenotipo de los M $\phi$ ; para ello, M $\phi$  derivados de monocitos humanos fueron tratados con medios condicionados de VAT. Esta exposición indujo la expresión de IL-1 $\beta$ , TNF, ABCA1 y CD36, por lo que se concluye que en los M $\phi$  tratados con fluidos biológicos se reproduce la expresión de marcadores asociados al fenotipo “metabólicamente activado” observado en los ATM *in vivo*. Adicionalmente, los autores sugieren que el ácido palmítico podría ser el principal regulador de la activación metabólica de estos M $\phi$ , ya que por sí solo fue capaz de inducir la expresión de PLIN2 e IL-1 $\beta$ . El mecanismo molecular propuesto es la unión del palmitato al receptor TLR4. Su internalización promueve la activación del receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR)- $\gamma$ , un factor de transcripción cuya actividad está asociada con la atenuación de la inflamación (22).

## **Influencia del microambiente del AT en la obesidad sobre el fenotipo de los macrófagos**

Actualmente existe mucha controversia acerca de cómo el microambiente del AT en el contexto de la obesidad puede afectar el fenotipo de los M $\phi$ . Algunos de los factores que dan forma al fenotipo de los ATM serán mencionados a continuación.

### **Hipoxia del AT**

La hipoxia ocurre cuando la disponibilidad de oxígeno no coincide con la demanda del tejido. En el AT de humanos y ratón se ha reportado que debido a su rápida expansión durante el desarrollo de la obesidad ésta ocurre con inadecuado suministro de sangre. En estudios con modelos animales se ha demostrado que el AT de animales obesos se caracteriza por presentar áreas hipóxicas y una mayor expresión de genes relacionados con procesos hipóxicos como HIF1- $\alpha$  (16, 46). Algunos reportes indican que la hipoxia en el AT se debe a las alteraciones en el diámetro del adipocito y a la densidad de los capilares en el tejido (47). Estas condiciones hipóxicas se han asociado con un elevado estrés del retículo endoplásmico de los adipocitos, muerte celular y la remodelación fibrótica (16, 46). Existen pocos reportes acerca de cómo la hipoxia afecta la polarización de los M $\phi$ . Fujisaka y col. encontraron que los ATM viscerales de ratones obesos tenían una mayor expresión de genes relacionados con la hipoxia, y que éstos tenían características pro-inflamatorias (48). Además, las células CD14+ del AT de individuos obesos expuestas a condiciones hipóxicas secretan una mayor cantidad de citocinas pro-inflamatorias y, similarmente, M $\phi$  derivados de monocitos mantenidos en condiciones hipóxicas tienen una mayor respuesta inflamatoria cuando son expuestos a ácidos grasos saturados (16, 47). De manera interesante se ha reportado que una exposición de los adipocitos a condiciones hipóxicas induce una producción desregulada de adipocinas y citocinas, como adiponectina e IL-6, las cuales afectan las funciones de los M $\phi$  (49).

### **Muerte celular del adipocito**

La obesidad está asociada con la muerte celular de adipocitos vía apoptosis y necrosis; la muerte de los adipocitos se eleva a un 60% a las cuatro semanas en ratones que fueron alimentados con una HFD, coincidiendo con la expresión de genes inflamatorios. Se ha hipotetizado que los ATM son reclutados para fagocitar los “debris” celulares después de la apoptosis del adipocito (28). Además, en modelos animales se ha observado que los adipocitos muertos están rodeados por M $\phi$  con características pro-inflamatorias, formando las CLS, y juntos forman lesiones fibróticas (50). Las señales liberadas por las células que se encuentran en apoptosis son fuertes quimioatrayentes, y a su vez tienen un efecto en las respuestas de células inmunes. Un ejemplo es la proteína nuclear HMGB1, la cual actúa como una señal de peligro que atrae y activa a las células inmunes. De manera interesante, los niveles de HMGB1 están aumentados en el AT y asociados a la inflamación. También se ha encontrado que la inhibición de la muerte celular en ratones deficientes de factores pro-apoptóticos reduce el número de M $\phi$  en el AT (16, 49).

### **Hiperglicemia**

En adipocitos y M $\phi$  existen efectos deletéreos debido a la exposición prolongada a altos niveles de glucosa. Cuando se cultivan adipocitos en medio con glucosa por periodos prolongados de tiempo se induce una producción aumentada de varias citocinas pro-inflamatorias como IL-6. En los M $\phi$  la hiperglicemia interfiere con la acción de IL-4 para polarizar a los M $\phi$  de tipo M2 (16). A su vez se ha encontrado que una alta dosis de glucosa induce un marcado incremento en los niveles de proteína y mRNA de TLR2 y TLR4 en monocitos humanos; esta exposición desencadena la activación de NF- $\kappa$ B dependiente de MyD88, lo que conlleva la secreción de citocinas pro-inflamatorias (51).

## Lípidos

Un ambiente rico en lípidos durante el desarrollo de la obesidad puede representar un importante factor estresante en los ATM, debido a que son unas moléculas importantes para la señalización de respuestas inmunes y metabólicas (52). En general hay tres formas por las cuales los ATM pueden ser expuestos a los lípidos: vía quilomicrones provenientes de la dieta, de la lipólisis en los adipocitos, o después de la muerte celular de los mismos. La hiperlipidemia no conlleva al parecer la acumulación de ATM, indicando que los lípidos resultantes de la lipólisis de adipocitos y la muerte celular de éstos representan las causas principales de la acumulación excesiva de lípidos en los ATM durante la obesidad. Los adipocitos de individuos obesos presentan tasas basales más altas de lipólisis que los de los sujetos delgados, y la exposición a los ácidos grasos (FA) regula el fenotipo de los M $\phi$  de manera importante. Se ha observado *in vitro* que los M $\phi$  expuestos a ácidos grasos saturados (SFA) y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) pueden activar la producción de citocinas pro-inflamatorias típicas de la polarización M1 como TNF e IL-1 $\beta$ . Además de la exposición extracelular a los ácidos grasos, los ATM también almacenan lípidos, y se ha reportado en ratones con obesidad genética e inducida por la dieta que los M $\phi$  pro-inflamatorios tienen un mayor contenido de lípidos comparados con los M $\phi$  anti-inflamatorios. Asimismo, se ha señalado que el aumento de FA intracelulares es otra fuente de señalización pro-inflamatoria, debido a que están asociados con el estrés del retículo endoplásmico. Los SFA y sus derivados (incluyendo las ceramidas) están clasificados como patrones moleculares asociados a peligro (DAMP) que son reconocidos por el complejo NLRP3 e inducen la secreción de IL-1 $\beta$ . También se ha reportado que inducen un fenotipo pro-inflamatorio en los M $\phi$  vía TLR (16, 28). Diversos grupos de investigación han definido que los FA libres (FFA) son moléculas muy importantes en la señalización debido a que pueden activar vías pro-inflamatorias en las células inmunes. En los M $\phi$  los FFA activan la cascada de señalización de de la MAPK JNK y de la cinasa del inhibidor  $\kappa$ B (IKKB) vía TLR2 y TLR4, aumentando así la expresión de genes pro-inflamatorios y la secreción de quimiocinas. Por otra parte, también se ha encontrado que el grado de saturación de los ácidos grasos impacta en la polarización de los M $\phi$ . Así, mientras que los SFA inducen un fenotipo M1, los ácidos grasos insaturados inducen el fenotipo M2. Por ejemplo, los M $\phi$

tratados con el ácido oleico (insaturado) expresan niveles incrementados de marcadores de tipo M2 como CLEC10A y CD163 (53-57). El tipo de FA almacenado en el adipocito, el tiempo de exposición a lípidos, el fenotipo inflamatorio de los M $\phi$  y la presencia de varias moléculas de señalización inflamatorias podrían explicar la respuesta predominantemente anti-inflamatoria de los ATM en individuos delgados frente a la respuesta pro-inflamatoria en el AT de sujetos obesos después de la exposición a lípidos (16).

### Factores secretados por el AT

Como se ha descrito antes, el AT ha sido reconocido como el órgano endocrino más grande, el cual regula procesos metabólicos e inflamatorios. Siguiendo el desarrollo de la obesidad, el estado secretorio de los adipocitos se encuentra alterado debido a los cambios en el AT (Fig. 3). Las adipocinas, citocinas y quimiocinas son mediadores clave que ligan a los adipocitos y a los M $\phi$  en la regulación de la inflamación en el AT. Se ha establecido que existe un *loop* paracrino que involucra a estos mediadores el cual tiene una influencia en el estado de inflamación crónica de bajo grado en la obesidad (3, 58, 59).

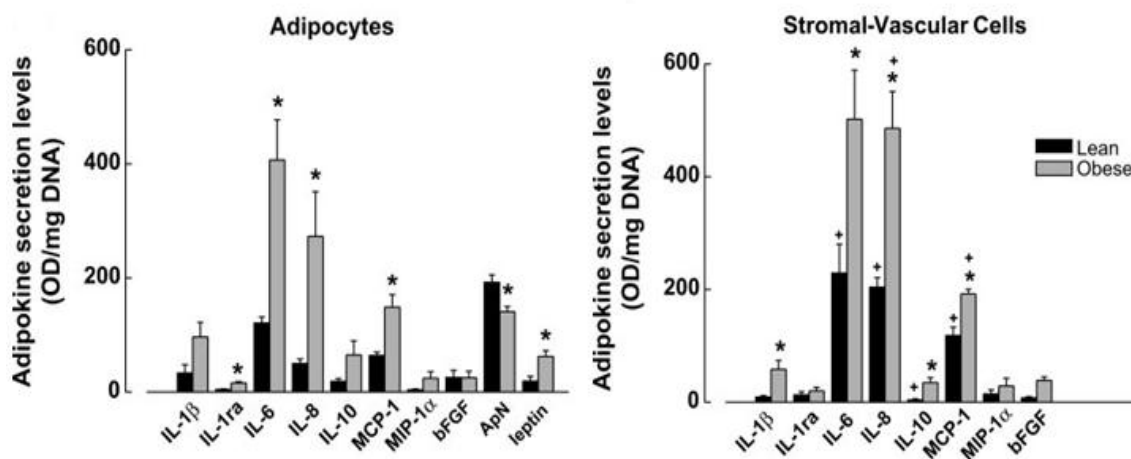


Figura 3. Factores secretados por adipocitos (izquierda) y por células de la fracción estromal-vascular (derecha) del VAT de individuos delgados y obesos. Tomada de Maury y col., 2007 (60).



## *Adiponectina*

La adiponectina es producida por los adipocitos y circula en altos niveles en la sangre (4, 61). La expresión es mayor en SAT que en el VAT (62). Una fuerte y consistente asociación inversa ha sido establecida entre la adiponectina, el índice de masa corporal y los estados pro-inflamatorios. Se ha demostrado que un exceso de citocinas pro-inflamatorias producidas en el AT inhibe la expresión del mRNA de adiponectina en los adipocitos (6, **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Los hallazgos en los modelos experimentales indican que la adiponectina protege contra la obesidad ligada a la disfunción metabólica. La administración de adiponectina a un ratón obeso reduce los niveles de glucosa, ácidos grasos y triglicéridos en plasma (2, 63). De igual manera, la sobre-expresión de adiponectina en el ratón deficiente de leptina (*ob/ob*) mejora el metabolismo de la glucosa, reduce los números de ATM y disminuye la expresión de TNF.

La adiponectina modula la función y fenotipo de los M $\phi$ . Este factor inhibe la transformación de los M $\phi$  a células espumosas por medio de la supresión de receptores scavenger tipo A (SR-A) (2), disminuye la producción de TNF en los M $\phi$  estimulados con LPS e inhibe la activación de NF- $\kappa$ B en M $\phi$  de ratón. A la par, la adiponectina estimula la producción de citocinas anti-inflamatorias como IL-10 en M $\phi$  humanos (64). Lovren y col. (65) demostraron que la adiponectina promueve la diferenciación de monocitos hacia un fenotipo de M $\phi$  M2, con inducción de marcadores como la arginasa. Asimismo, la incubación de M $\phi$  M1 con los sobrenadantes de M $\phi$  tratados con adiponectina inhibe la producción de TNF y de CCL2 (65). Del mismo modo, Ohashi y col. en el 2009 (66) reportaron que los M $\phi$  peritoneales y los M $\phi$  de la fracción celular estromal vascular aislados del AT de ratones deficientes de adiponectina mostraron altos niveles de marcadores M1 (TNF, IL-6, CCL2) y menores de marcadores M2 (arginasa-1, IL-10) con respecto a los ratones silvestres. Además, el tratamiento de los M $\phi$  con adiponectina recombinante aumenta los niveles de marcadores M2 y reduce los de ROS en M $\phi$  derivados de monocitos humanos y en células de la fracción estromal vascular aisladas del AT de humanos. Estos datos en conjunto demuestran que la adiponectina funciona como un regulador de la polarización de M $\phi$  (66).

### *Leptina*

La leptina es secretada por los adipocitos y es esencial para la regulación del peso, la función endócrina y respuestas inflamatorias (67, 68). Una de sus principales acciones es el control del peso corporal y la deposición de grasa a través de sus efectos en los receptores hipotalámicos, lo cual conlleva la inhibición del apetito. Se ha encontrado que los niveles de leptina en suero están fuertemente correlacionados con los de la masa de grasa corporal en individuos obesos (67), y que la deficiencia de leptina causa obesidad mórbida en animales y humanos. En la obesidad humana está bien establecida la presencia de la resistencia a leptina (68).

La leptina impacta en varias funciones de los M $\phi$ , así como también en su fenotipo. Los M $\phi$  procedentes del ratón ob/ob exhiben *in vitro* una capacidad fagocítica disminuida con respecto a la de los ratones silvestres, y la adición exógena de leptina a M $\phi$  silvestres tiene como consecuencia un aumento en la fagocitosis y en la síntesis de citocinas *in vitro* (69, 70). Se ha reportado que el ratón ob/ob exhibe irregularidades fenotípicas en los M $\phi$ , debido a que poseen una expresión alterada de TLR y una sensibilidad aumentada a LPS y TNF (71). Por otro lado, se ha encontrado que la leptina promueve la secreción de citocinas pro-inflamatorias como TNF, IL-6, IL-1 $\beta$  en monocitos. Estos datos sugieren que la leptina favorece la función fagocítica de los M $\phi$  y su producción de citocinas pro-inflamatorias (72, 73). Adicionalmente, Gruen y col. (68) demostraron que la leptina es un potente quimioatrayente para monocitos y M $\phi$  (74, 75).

### *Citocinas*

El AT contiene muchas células capaces de producir citocinas que promueven distintos fenotipos en los ATM, como los adipocitos y las células inmunes.

Las citocinas IL-4 e IL-13 han sido ampliamente descritas como las principales inductoras del fenotipo M2 en los M $\phi$  (76). Kang y col. (77) demostraron que al exponer M $\phi$  a medios condicionados de adipocitos se promovía un fenotipo M2, con inducción de la expresión de marcadores como las lectinas Mgl1 y Mgl2. Estos efectos eran mediados por la producción de IL-4 y especialmente de IL-13 por parte de los adipocitos. En cuanto a otras células inmunes se

ha demostrado que las células NKT aumentan la polarización M2 por medio de la señalización IL-4/STAT6 (28), y recientemente se ha demostrado que los eosinófilos son una de las fuentes principales de IL-4 en el AT. Wu y col. encontraron que el 90% de las células que secretan IL-4 en ratones delgados son eosinófilos, y su presencia en el AT correlacionaba negativamente con el índice de masa corporal. Como consecuencia, el ratón deficiente de eosinófilos gana más peso que el ratón control cuando son expuestos a una HFD y presenta peores perfiles metabólicos (78).

La citocina anti-inflamatoria IL-10 ha sido asociada de manera importante con el fenotipo M2 debido a su capacidad para inducir la expresión de genes como la quitinasa tipo 3 (Chi3l3), arginasa (Arg) y el factor de crecimiento de endotelios vasculares (VEGF)-A (76, 79). Se ha reportado que la expresión de IL-10 se encuentra incrementada en la fracción de adipocitos y M $\phi$  de VAT de ratones con una HFD (80). Igualmente, en humanos obesos se ha demostrado que la fracción estromal-vascular del VAT secreta mayores niveles de IL-10 que la de los individuos delgados (60). Por otra parte, Fujisaka y col. (81) determinaron que la sobre-expresión sistémica de IL-10 aumenta el número de M $\phi$  M2 en el VAT, por lo que se especula que la señalización por IL-10, así como por IL-4/IL13, en los monocitos podría contribuir al aumento de los ATM con un fenotipo M2.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN**

La prevalencia de la obesidad y el sobrepeso continúa en aumento en una gran parte de la población mundial, y su aparición contribuye al desarrollo de enfermedades metabólicas como hipertensión y diabetes mellitus tipo 2, entre otras. La obesidad se considera un estado de inflamación crónica de bajo grado, y cursa con infiltración de monocitos al tejido adiposo (AT). Los monocitos tienen una gran plasticidad y cambian su programa transcripcional dependiendo de las señales del microambiente en el que residen, lo cual les permite diferenciarse hacia diferentes tipos de macrófagos. El AT en el contexto de la obesidad puede ser muy complejo, por ejemplo existe un incremento de zonas necróticas de adipocitos y de regiones hipóxicas, secreción alterada de adipocinas, citocinas y quimiocinas, y niveles extracelulares incrementados de ácidos grasos libres. Este microambiente único del AT en el contexto de la obesidad podría modificar el fenotipo de los monocitos reclutados. Debido a que los macrófagos juegan un papel crítico en la inflamación del AT, es necesario estudiar cómo el microambiente del AT modifica el fenotipo de los precursores de los macrófagos.

## **HIPOTESIS**

Los factores solubles producidos por el tejido adiposo de individuos con diferente grado de adiposidad promueven distintos fenotipos en los monocitos humanos.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Definir el perfil génico asociado a la inflamación y a la activación metabólica de los monocitos humanos cultivados con medios condicionados de explantes de tejido adiposo de individuos con distinto grado de adiposidad.

### **Objetivos particulares**

1. Evaluar la expresión de marcadores asociados al fenotipo M1 (ITGAX, CLEC5A), M2 (CD163, CD163L1) y al de los macrófagos “metabólicamente activados” (ABCA1, PLIN2) en monocitos expuestos a medios condicionados de explantes de SAT y VAT procedentes de individuos delgados y obesos.
2. Determinar la expresión de citocinas (TNF, IL6, IL10), quimiocinas (CCL2) y receptores de quimiocinas (CCR2) en monocitos expuestos a medios condicionados de explantes de SAT y VAT de individuos delgados y obesos.
3. Realizar estudios de correlación de la expresión génica con el índice de masa corporal de los individuos.

## **METODOLOGÍA**

### **Aislamiento de monocitos**

Los concentrados leucocitarios se obtuvieron a partir de donantes sanos del banco de sangre del CMN “La Raza” del IMSS. Las células se sometieron a un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque (densidad 1.077 g/ml). Las células fueron centrifugadas a 800 xg durante 30 min a temperatura ambiente y se aislaron las PBMC de la interfase entre el Ficoll y el plasma. La población de monocitos CD14+ fue purificada a partir de  $400 \times 10^6$  PBMC por selección positiva mediante MACS (Magnetic Cell Sorting) utilizando un anticuerpo (Ab) anti-CD14 conjugado con microesferas magnéticas (Miltenyi Biotec).

### **Obtención de muestras de tejido adiposo**

Las muestras de tejido adiposo fueron obtenidas de pacientes delgados y obesos que fueron sometidos a apendicectomía o colecistectomía por laparoscopia. Se obtuvieron muestras de SAT y de VAT (omento). Los criterios de inclusión y exclusión para el reclutamiento de los sujetos de estudio fueron:

- Criterios de inclusión: Individuos mayores de 18 años de ambos sexos, metabólicamente sanos (ausencia de factores asociados al síndrome metabólico o sólo circunferencia de cintura mayor al punto de corte), que firmen un consentimiento informado.
- Criterios de exclusión: individuos metabólicamente inestables o dismetabólicos (circunferencia de cintura mayor al punto de corte y presencia de uno o varios factores asociados al síndrome metabólico), individuos que estén con tratamientos para la hipertensión, hiperglicemia o dislipidemia, individuos con diagnóstico de cáncer, endocrinopatías, o enfermedades crónicas renales o hepáticas.

Las características de los individuos incluidos en el estudio se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1. Características de los donadores de tejido adiposo subcutáneo y visceral incluidos en el estudio.**

<b>Grupo</b>	<b>Delgados</b>	<b>Obesos</b>
No.	6	6
Edad <sup>a)</sup> (media ± SD)	32 ± 9.3	35.4 ± 3.5
IMC <sup>b)</sup> (media ± SD)	<b>21.9 ± 0.7</b>	<b>36.5 ± 3.5<sup>f)</sup></b>
Glucosa <sup>c)</sup> (media ± SD)	98.2 ± 7.3	98 ± 17.8
Colesterol <sup>d)</sup> (media ± SD)	141.4 ± 29.8	163.2 ± 34.8
Triglicéridos <sup>e)</sup> (media ± SD)	80 ± 29.6	108.4 ± 55.95

a) Años.

b) IMC: índice de masa corporal (kg/m<sup>2</sup>).

c) Rango normal: 70-110 mg/dl.

d) Rango normal: 136-200 mg/dl.

e) Rango normal: 30-183 mg/dl.

f) # p< 0.00001.

### **Generación de los medios condicionados de tejido adiposo**

El tejido adiposo fue cortado en piezas de 2 a 4 mm, las cuales fueron cultivadas durante 24 h en medio DMEM/F12 carente de suero fetal bovino (SFB), suplementado con antibióticos y L-glutamina 2.5 mM, en una relación de 100 mg de tejido por ml de medio. El medio condicionado (MC) obtenido se congeló a -80°C hasta su uso.

### **Condiciones de cultivo de monocitos**

Los monocitos se cultivaron en una proporción de 2.2 x 10<sup>6</sup>/ml durante 12 h con medio RPMI 1640 y DMEM/F12 en una proporción 50% v/v, suplementado con 5% SFB, L-glutamina 2.5 mM y antibióticos 1%. Estas condiciones de cultivo fueron empleadas para analizar el efecto de los

MC de tejido adiposo, y los monocitos fueron cultivados durante 12 h en medio RPMI 1640 y medios condicionados de individuos delgados y obesos, en una proporción 50% v/v, suplementado con 5% SFB, L-glutamina 2.5 mM y antibióticos . Los monocitos recién aislados se utilizaron como control en algunos experimentos.

### **Extracción de RNA**

Una vez recolectadas las células, la extracción de RNA se realizó con el reactivo Trizol® (Ambion). Se añadieron 250 µL de Trizol a  $5-7 \times 10^6$  células. La mezcla se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min a 4°C y se obtuvo la fase acuosa, a la cual se le añadieron 125 µL de isopropanol y se incubó 10 min a 4 °C. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min a 4°C y se desechó el sobrenadante. A continuación se adicionaron 250 µL de etanol 75% diluido en agua con dietilpirocarbonato (DEPC), se mezcló y se centrifugó nuevamente a 8,000 rpm por 5 min a 4°C. El sobrenadante se desechó y el RNA se resuspendió en 15 µL de agua-DEPC. El RNA se incubó a 60°C por 10 min y finalmente se cuantificó por espectrofotometría y se evaluó su integridad en un gel de agarosa al 1 %.

### **Determinación de citocinas y marcadores asociados a los fenotipos M1, M2 y MMe por RT-PCR cuantitativa**

Una vez obtenido el RNA, el cDNA se obtuvo mediante el Kit *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis* (Thermo Scientific). El análisis de la expresión génica se realizó mediante PCR cuantitativa (qRT-PCR) utilizando las sondas y oligonucleótidos prediseñados de Applied Biosystems (*TaqMan® Gene Expression Assays*, Thermo Scientific) para las citocinas *TNF*, *IL6*, e *IL10*, la quimiocina *CCL2*, su receptor *CCR2*, los marcadores *CLEC5A* e *ITGAX* (M1), *CD163* y *CD163L1* (M2), *ABCA1* y *PLIN2* (activación metabólica) y *TBP* (*Tata Binding Protein*) como control, en el sistema 7500 de Applied Biosystems, bajo las siguientes condiciones:



Componentes de reacción	µL para Rx. Vol total de 20 µL
20X TaqMan® Gene Expression Assay	0.5
2X TaqMan® Gene Expression Master Mix	10
cDNA template (1 to 100 ng)	9.5 µL (25 ng)

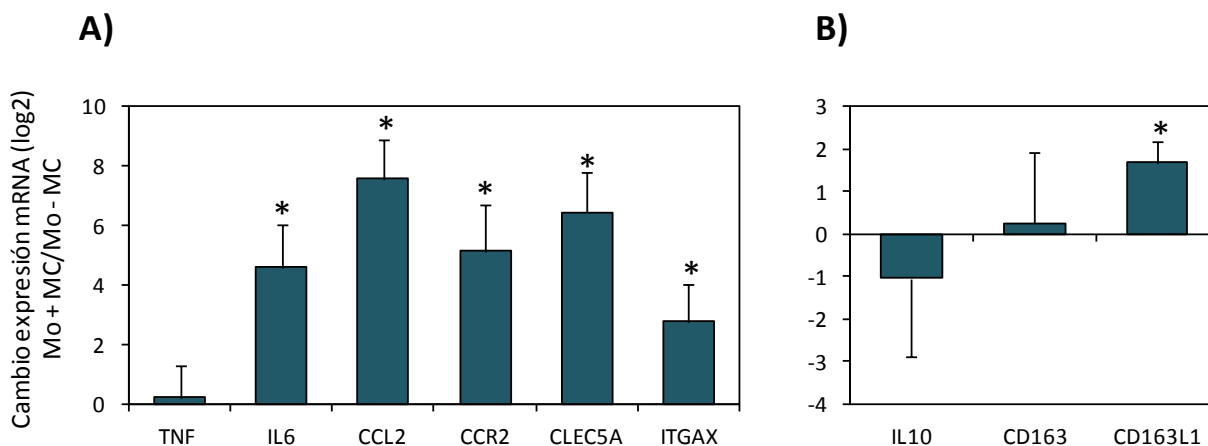
	Incubación UNG	Activación AmpliTaq Gold	PCR	
			40 ciclos	
			Desnaturalización	Alineamiento/Extensión
<b>Temperatura</b>	50 °C	95 °C	95 °C	60 °C
<b>Tiempo</b>	2 min	10 min	15 seg	1 min
<b>Volumen</b>	20 µL			

Los valores de  $\Delta Ct$  (*cycle threshold*) se obtuvieron relativizando cada valor de Ct del gen problema al valor de Ct de *TBP*. Para comparar los niveles de transcritos entre dos condiciones problema se empleó la fórmula  $Q_r = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ , donde la  $\Delta\Delta Ct$  entre dos condiciones se calculó con la siguiente fórmula:  $\Delta\Delta Ct_{(condición\ 1 - condición\ 2)} = (\Delta Ct_{gen-TBP})_{condición\ 1} - (\Delta Ct_{gen-TBP})_{condición\ 2}$ .

## RESULTADOS

### **Los monocitos en condiciones de adherencia y cultivados con SFB adquieren un fenotipo pro-inflamatorio**

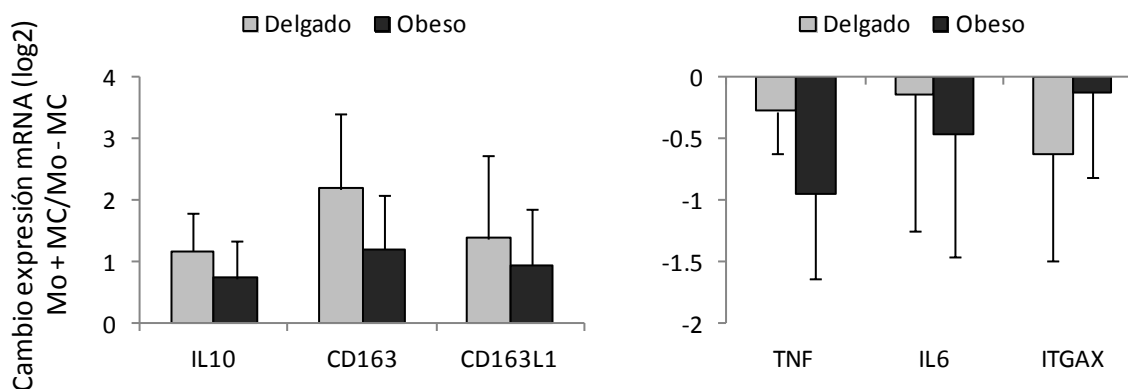
Se ha demostrado que las condiciones de cultivo son un importante factor para la modulación de la expresión de algunos genes, por lo cual inicialmente se investigó cómo la condición de cultivo en conjunto con la adherencia podrían afectar la expresión de genes pro-inflamatorios y anti-inflamatorios en los monocitos. Para explorar esta posibilidad los monocitos fueron cultivados en medio DMEM/RPMI al 50% v/v suplementado con SFB 5%. Se evaluó a las 12 horas por medio de qRT-PCR la expresión de genes anti-inflamatorios como IL10, CD163 y CD163L1, y pro-inflamatorios como TNF, IL6, CCL2 y CLEC5A, entre otros. Como condición control se utilizaron monocitos recién aislados y se analizó el mismo panel de genes mencionados anteriormente. Las gráficas representan el cambio de la expresión de los genes de los monocitos en cultivo con respecto a los monocitos recién aislados. Los monocitos cultivados incrementan la expresión de genes pro inflamatorios, con incrementos significativos de hasta 250 veces más que los monocitos recién aislados (Fig. 4A). En contraste, el cambio en la expresión de los genes anti-inflamatorios fue irregular, con una disminución en la expresión de IL10 y un incremento significativo de CD163L1, mientras que CD163 no experimentó cambios (Fig. 4B). Con estos datos concluimos que el cultivo con SFB y/o los procesos de adherencia a la placa de cultivo inducen en los monocitos sanguíneos la expresión selectiva de genes pro-inflamatorios, tanto de citocinas (IL6 y CCL2) como de marcadores asociados al fenotipo M1 (CCR2, CLEC5A e ITGAX).



**Figura 4. Efecto de la condición de cultivo y adherencia en la expresión de genes pro- y anti-inflamatorios en monocitos.** Análisis por qRT-PCR de monocitos humanos cultivados durante 12 horas. El nivel de la expresión de los genes se encuentra representado como el cambio de la expresión de los genes de los monocitos en cultivo con respecto a monocitos recién aislados. Los resultados representan las medias  $\pm$  SD de los monocitos expuestos a 6 MC independientes. \*Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con la prueba t de Student.

### Los MC de SAT de individuos obesos y delgados promueven un fenotipo anti-inflamatorio en los monocitos

El AT secreta factores diferenciales en el contexto de la obesidad con respecto al AT de individuos delgados, los cuales pueden modular el fenotipo de los precursores de los M $\phi$ . Para evaluar esta regulación los monocitos sanguíneos de individuos sanos fueron cultivados con MC de SAT de individuos delgados y obesos. Se analizó por qRT-PCR la expresión de citocinas y marcadores pro- y anti-inflamatorios para definir si se promovía una polarización de tipo M1 o M2 en los monocitos. Como se muestra en la Fig. 5, los MC de SAT de individuos obesos y delgados promueven paralelamente la expresión de la citocina inmunosupresora IL10 y de marcadores anti-inflamatorios como los receptores tipo scavenger CD163 y CD163L1, mientras que indujeron un decremento en la expresión de citocinas pro-inflamatorias como TNF e IL-6, así como de ITGAX. Por lo tanto, los monocitos expuestos a los factores secretados por el SAT de individuos delgados y obesos adquieren una polarización más cercana a la del tipo M2.

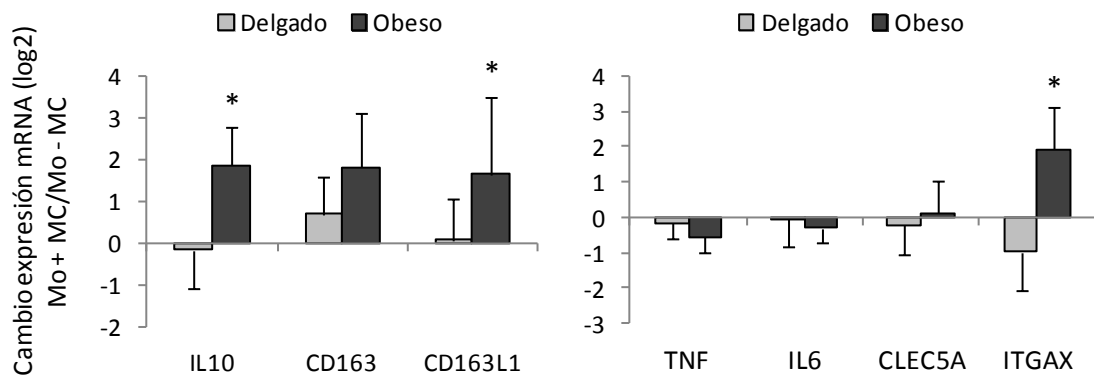


**Figura 5. Polarización anti-inflamatoria de los monocitos expuestos a MC de SAT.** Análisis por qRT-PCR de la expresión de los genes indicados en monocitos humanos expuestos durante 12 h a MC de SAT procedente de individuos delgados y obesos. El nivel de la expresión de los genes se representa como el cambio de su expresión en los monocitos expuestos a MC con respecto a los monocitos cultivados en ausencia de MC. Los resultados son las medias  $\pm$  SD de los monocitos expuestos a 6 MC independientes. \*Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con la prueba t de Student.

### Los monocitos expuestos a MC de AT de omento de individuos obesos exhiben un fenotipo mixto

La mayoría de los estudios han reportado que el VAT del omento se caracteriza por ser inmunológicamente activo y más asociado a la disfunción metabólica que el AT subcutáneo. Por este motivo se exploró la eventualidad de que los factores secretados por este depósito de grasa pudieran modelar un fenotipo distinto al de los monocitos expuestos a MC de SAT. Para probar esta hipótesis se realizó un análisis de qRT-PCR donde se evaluó la expresión de genes asociados al fenotipo M2 como IL10, CD163 y CD163L1, y al fenotipo M1 como TNF, IL6, CLEC5A e ITGAX. Identificamos que los MC de VAT de individuos obesos inducían en los monocitos la expresión de marcadores asociados a la activación M2, con un aumento significativo en la expresión de IL10 y CD163L1 (Fig. 6). Los marcadores pro-inflamatorios como IL6, TNF y CLEC5A no mostraron variaciones o disminuyeron su expresión aunque, de manera interesante, detectamos un incremento significativo en la expresión de ITGAX en presencia de

MC de individuos obesos (Fig. 6). ITGAX es un marcador que es utilizado para describir a una población de M $\phi$  reclutados al AT en el contexto de la obesidad y con características pro-inflamatorias. Conjuntamente estos resultados sugieren que en el contexto de la obesidad los monocitos recién reclutados al tejido visceral adquieren un fenotipo mixto, con la propiedad de sintetizar IL10 y de adquirir marcadores anti-inflamatorios como CD163L1, acompañado de un incremento en la expresión del marcador inflamatorio ITGAX.

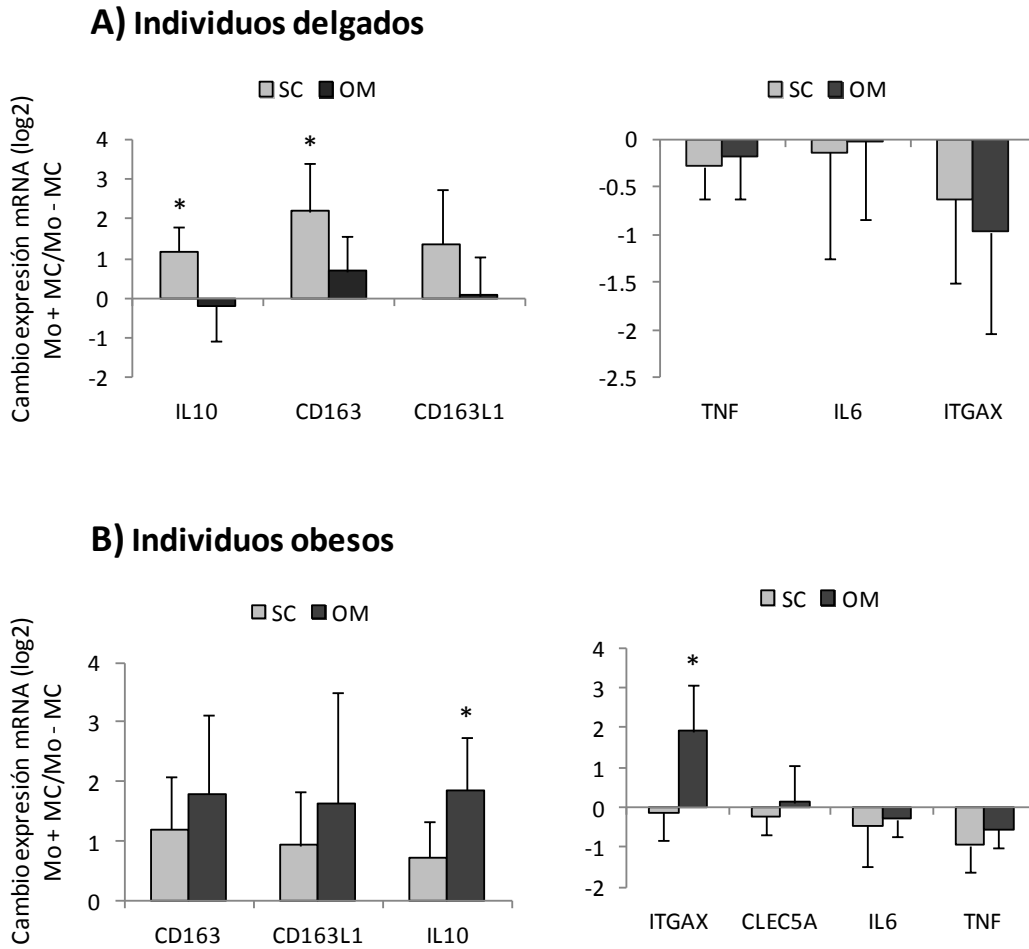


**Figura 6. Regulación de la expresión de marcadores pro- y anti-inflamatorios en los monocitos expuestos a MC de VAT de individuos delgados y obesos.** Análisis por qRT-PCR de la expresión de los genes indicados en monocitos humanos expuestos durante 12 h a MC proveniente del VAT de individuos delgados y obesos. El nivel de la expresión de los genes se encuentra representado como el cambio de la expresión de los genes de los monocitos cultivados con MC con respecto a los monocitos en ausencia de MC. Los resultados son las medias  $\pm$  SD de los monocitos expuestos a 6 MC independientes. \*Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con la prueba t de Student.

### Los monocitos expuestos a MC de AT de individuos delgados y obesos adquieren un fenotipo anti-inflamatorio, independientemente del origen del AT

Para determinar el panorama general del cambio en la expresión de los genes analizados en los monocitos expuestos a MC de individuos delgados y obesos entre los depósitos analizados, se realizaron las comparaciones correspondientes de los resultados de la exposición de los monocitos a los MC obtenidos por medio de qRT-PCR. Como se muestra en la Fig. 7A, el nivel de expresión de los marcadores anti-inflamatorios CD163 e IL10 se encuentra

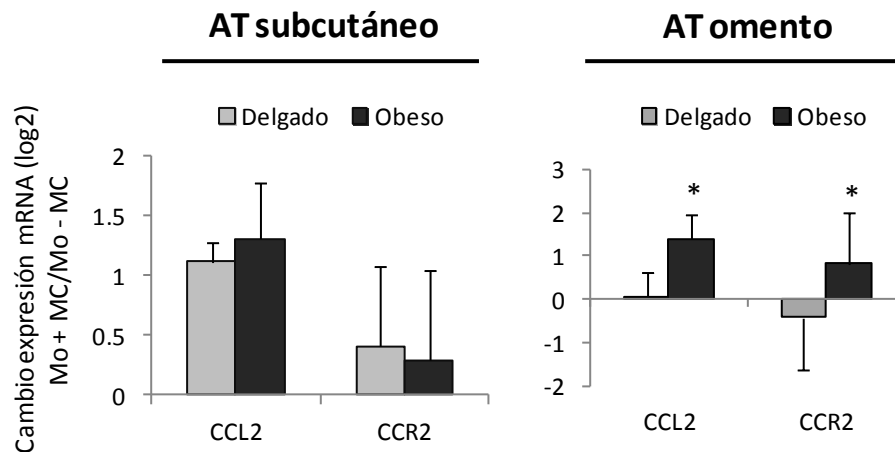
significativamente incrementado en los monocitos expuestos a MC de SAT con respecto a los de VAT de individuos delgados, mientras que para los marcadores pro-inflamatorios TNF, IL6 e ITGAX, se detectó una disminución en su expresión en ambos depósitos. Por otro lado, factores producidos por el SAT y el VAT de individuos obesos inducen la expresión de marcadores anti-inflamatorios como CD163, CD163L1 e IL10 (Fig. 7B). La expresión de IL10 fue significativamente mayor en los monocitos expuestos a MC de VAT en relación a los expuestos a MC de SAT de individuos obesos. En cuanto a la expresión de los marcadores inflamatorios, la expresión de TNF e IL6 se redujo en los monocitos expuestos a MC de ambos tipos de depósitos de individuos obesos, y para CLEC5A no se observan variaciones importantes en su expresión. Un dato interesante fue la expresión de ITGAX, el cual sólo se encontró incrementado significativamente en los monocitos expuestos a MC de VAT con respecto a MC de SAT de individuos obesos. Por lo tanto, podemos concluir que factores secretados por el SAT de individuos delgados inducen una polarización anti-inflamatoria en los monocitos, mientras que tanto factores secretados por el SAT como por el VAT tuvieron este comportamiento en individuos obesos. En general no se detectaron variaciones significativas en la expresión de las citocinas inflamatorias TNF e IL6 en ninguna circunstancia, aunque tendieron a disminuir su expresión. Este mismo comportamiento se observó para la expresión de la lectina CLEC5A. Sin embargo, factores secretados por el AT de ambos depósitos disminuyeron la expresión de ITGAX en sujetos delgados y sólo se detectó un aumento en su expresión con MC de VAT de individuos obesos.



**Figura 7. Efecto de los factores secretados por el SAT y VAT de individuos delgados y obesos sobre la expresión génica de los monocitos.** Expresión de genes relacionados con los fenotipos M1 y M2 en monocitos expuestos a MC de SAT y VAT de individuos delgados (A) y obesos (B), evaluada por qRT-PCR. El nivel de la expresión de los genes se encuentra representado como el cambio en la expresión de los genes indicados en los monocitos cultivados con MC con respecto a los monocitos no expuestos a MC. Los resultados representan las medias  $\pm$  SD de los monocitos cultivados con 6 MC independientes. \*Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con la prueba t de Student.

## La expresión de CCL2 y CCR2 se incrementa diferencialmente en monocitos expuestos a MC de omento de individuos obesos

Debido a que el reclutamiento de monocitos al AT en la obesidad parece ser parcialmente dependiente del eje CCR2/CCL2 y a que éstos expresan CCL2 en respuesta a estímulos de activación (39, 82), consideramos la posibilidad de que factores producidos por el AT indujeran la expresión de este eje en los monocitos. Encontramos que la expresión de CCR2 y CCL2 era promovida cuando los monocitos eran expuestos a MC de SAT de individuos delgados y obesos. En contraste, solamente los monocitos expuestos a MC de VAT expresaban diferencialmente CCL2 y CCR2, siendo significativamente mayor en los monocitos expuestos a MC de individuos obesos (Fig. 8).



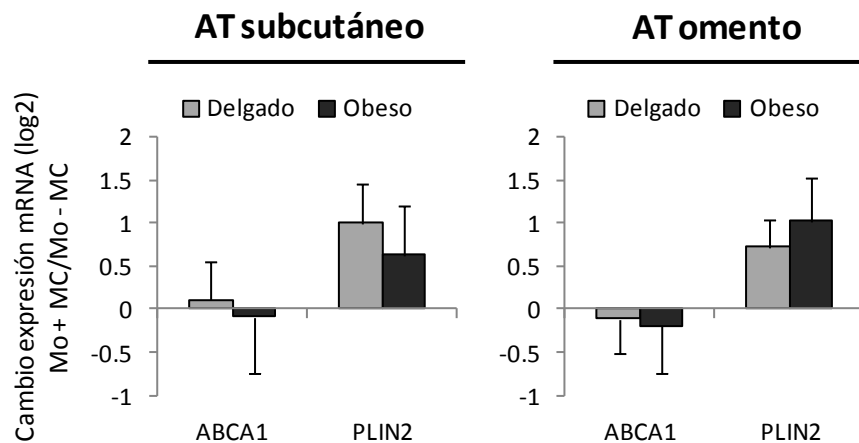
**Figura 8. Expresión de CCL2 y de su receptor CCR2 en monocitos expuestos a MC.** Análisis de la expresión de CCL2 y CCR2 por qRT-PCR en monocitos humanos expuestos durante 12 h a MC de SAT (panel izquierdo) y de VAT (panel derecho) de individuos delgados y obesos. El nivel de la expresión de los genes se encuentra representado como el cambio de la expresión de los genes en los monocitos cultivados con MC con respecto a los monocitos cultivados en ausencia de MC. Los resultados representan las medias  $\pm$  SD de los monocitos expuestos a 6 MC independientes. \*Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con la prueba t de Student.



## Los monocitos expuestos a MC de individuos obesos no recapitulan la activación metabólica

Se ha demostrado que los microambientes específicos de la obesidad inducen un fenotipo distinto a la activación clásica y alternativa en los ATM, el cual ha sido denominado como “metabólicamente activado”. Estos ATM se caracterizan por la expresión de ABCA1 y PLIN2, dos moléculas asociadas al metabolismo de lípidos (22).

Para determinar si el microambiente generado por los factores del AT puede inducir la expresión de estos marcadores representativos del fenotipo “metabólicamente activado” en los precursores de los M $\phi$  se realizó un análisis de su expresión en los monocitos expuestos a los MC durante 12 h. Este análisis arrojó que la expresión de ABCA1 no era inducida en los monocitos expuestos a MC de SAT o VAT, tanto de individuos delgados como de obesos. En contraste, PLIN2 se indujo en todas las condiciones evaluadas. Por lo tanto, estos hallazgos sugieren que los factores secretados por el AT de individuos obesos no promueven específicamente la expresión de marcadores asociados a la activación metabólica de los M $\phi$ .

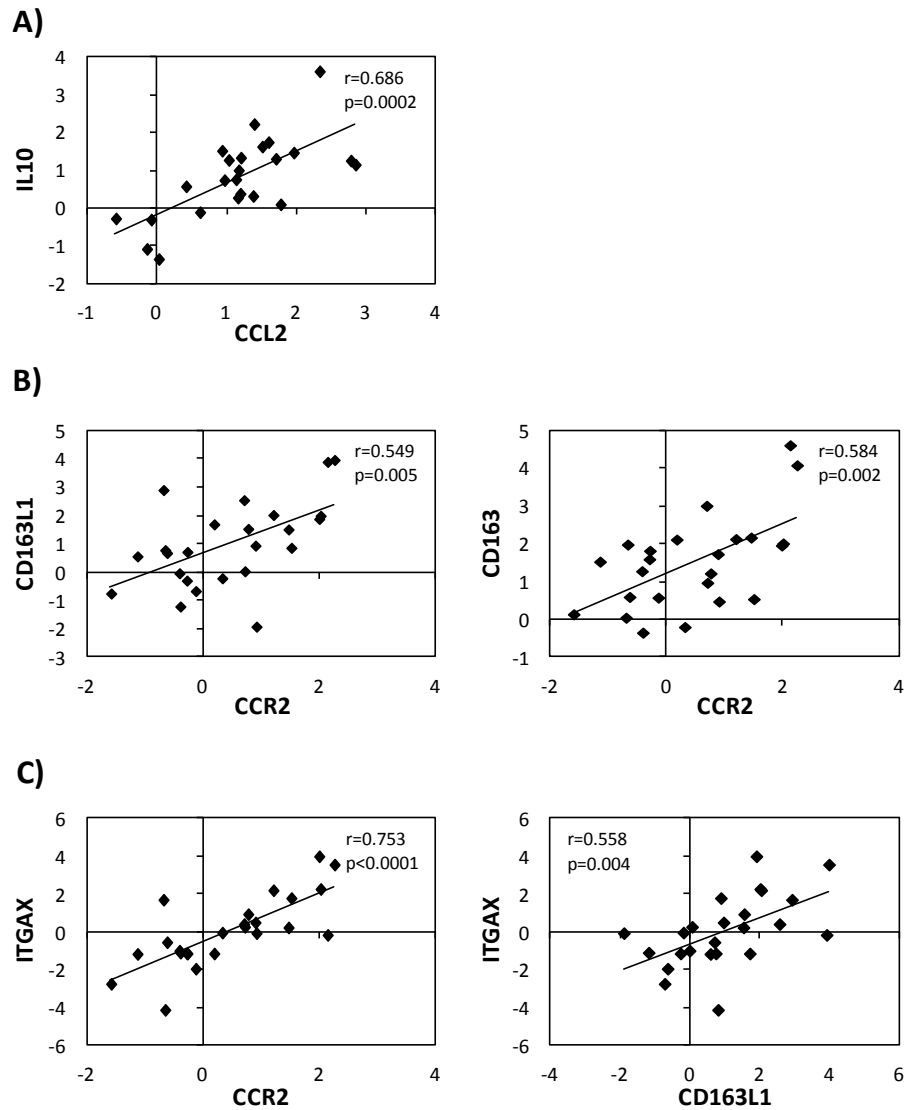


**Figura 9. Expresión de marcadores relacionados al fenotipo metabólicamente activados en monocitos expuestos a MCs.** Análisis de la expresión de ABCA1 y PLIN2 por qRT-PCR en monocitos humanos expuestos durante 12 h a MC de AT subcutáneo (panel izquierdo) y de omento (panel derecho) de individuos delgados y obesos. El nivel de la expresión de los genes está representado como el cambio de la expresión de los genes de los monocitos cultivados con MC con respecto a los monocitos en ausencia de MC. Los resultados representan las medias  $\pm$  SD de los monocitos expuestos a 6 MC independientes. \*Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con la prueba t de Student.

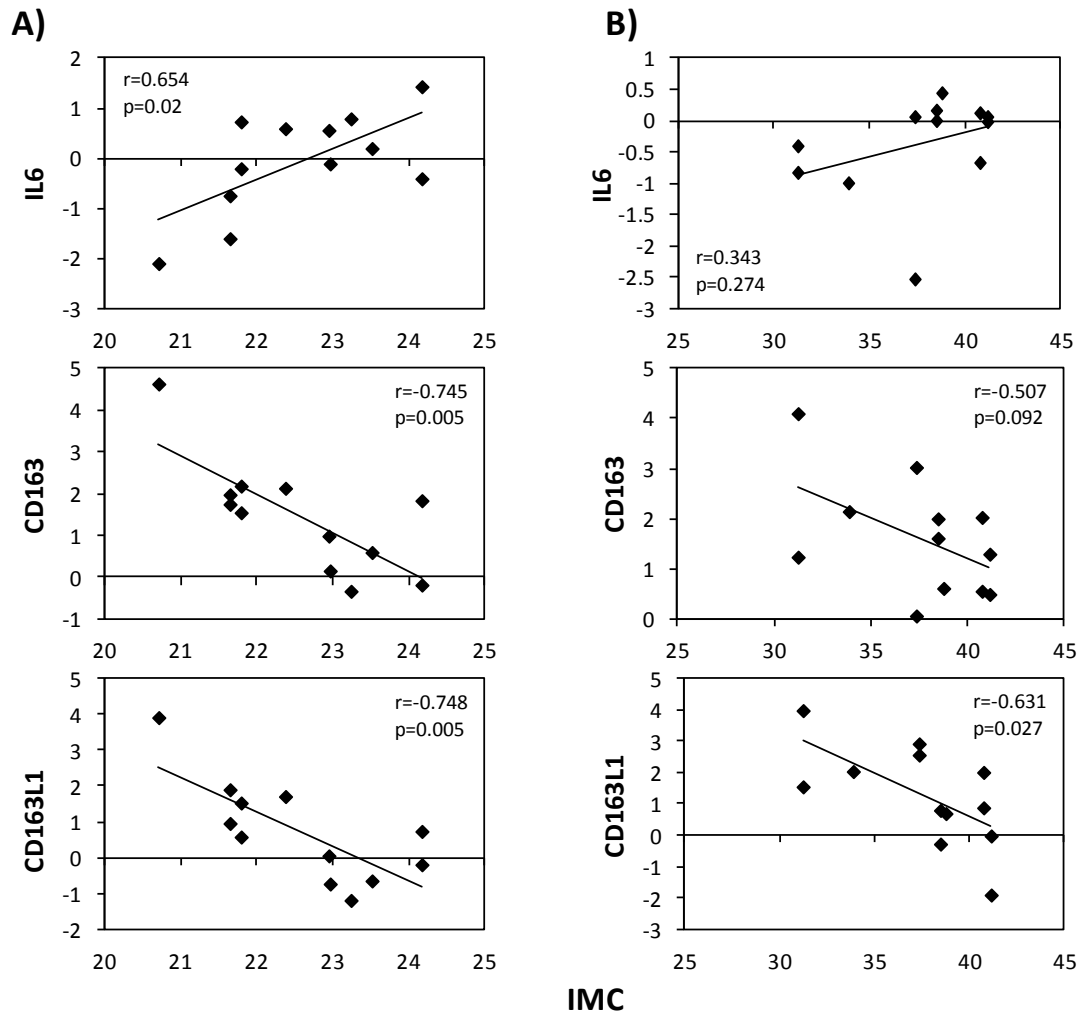
## **La expresión del eje CCL2/CCR2 se asocia positivamente con marcadores anti-inflamatorios**

En el análisis de correlación entre los genes analizados en los monocitos expuestos a MC de SAT y de VAT de individuos delgados y obesos se encontró que existía una correlación positiva estadísticamente significativa entre la expresión de CCL2 y la de IL10 (Fig. 10A), así como de la expresión de CCR2 y la de CD163 y CD163L1 (Fig. 10B). Además, la expresión de CCR2 correlacionó positivamente con la de ITGAX (Fig. 10C). La expresión de ITGAX también correlacionó positivamente con la expresión de otros marcadores anti-inflamatorios como CD163L1 (Fig. 10C). No se encontraron correlaciones estadísticamente significativas entre ITGAX, CCL2 o CCR2 con ningún marcador inflamatorio. La expresión de TNF e IL6 correlacionó positivamente en todas las condiciones evaluadas, así como la de los marcadores anti-inflamatorios IL10, CD163 y CD163L1 (datos no mostrados).

Con respecto a los datos de expresión génica en relación con el IMC de cada individuo, no se encontró ninguna correlación significativa cuando se analizaron todos los individuos juntos o los individuos estratificados por el tipo de depósito graso (datos no mostrados). Sin embargo, cuando se analizaron los individuos clasificados por su IMC (delgados y obesos por separado) se observó que el IMC correlacionó positivamente con la expresión de IL6 y negativamente con la de CD163 y CD163L1 en los individuos delgados (Fig. 11A). Aunque las tendencias se mantuvieron en los individuos obesos, los análisis arrojaron correlaciones estadísticamente significativas exclusivamente con CD163L1 (Fig. 11B).



**Figura 10. Análisis de correlación entre la expresión de CCR2/CCL2 con marcadores anti-inflamatorios.** Expresión de los genes indicados en los monocitos tratados con MC de AT subcutáneo y de omento en individuos delgados y obesos. Cada símbolo (rombos) corresponde a los datos obtenidos con un MC individual. La expresión de los genes se representa como el cambio de la expresión de los genes de los monocitos cultivados con MC con respecto a los monocitos en ausencia de MC (log2). En cada gráfica se muestran los valores del coeficiente de correlación de Pearson (r) y los valores de p con la prueba de Pearson.



**Figura 11. Análisis de correlación entre la expresión de marcadores génicos y el IMC de los individuos.** Expresión de los genes indicados en los monocitos tratados con MC de AT subcutáneo y de omento en individuos delgados (A) y obesos (B). Cada símbolo (rombos) corresponde a los datos obtenidos con un MC individual. La expresión de los genes se representa como el cambio de la expresión de los genes de los monocitos cultivados con MC con respecto a los monocitos en ausencia de MC (log2). En cada gráfica se muestran los valores del coeficiente de correlación de Pearson (r) y los valores de p con la prueba de Pearson.

## DISCUSIÓN

La obesidad es ampliamente considerada un estado de inflamación crónica de bajo grado y se ha reportado que los ATM participan en su establecimiento. A su vez, se ha encontrado que los ATM se acumulan en el AT de individuos y ratones obesos y que estos provienen en su mayoría de monocitos sanguíneos los cuales, dependiendo de las señales del microambiente, pueden diferenciarse hacia diferentes tipos de  $M\phi$  (29, 31, 33). En este trabajo se realizó un análisis detallado del impacto del microambiente del AT en la obesidad, en específico de los factores secretados por éste, en el fenotipo de los precursores de los  $M\phi$ , analizando la expresión de marcadores asociados a la polarización M1 o M2. Este estudio demuestra que los factores secretados por el AT de individuos delgados generan un fenotipo anti-inflamatorio en los monocitos, debido a que inducen la expresión de marcadores asociados a la polarización M2 como CD163, CD163L1 e IL10. Además estos MC no inducen la expresión de citocinas o marcadores relacionados al fenotipo M1 como TNF, IL6 o ITGAX, lo cual concuerda ampliamente con lo reportado en la literatura (22, 39, 41, 43, 81), sugiriendo así que los ATM derivados de monocitos de individuos delgados poseen una función relacionada con la homeostasis del tejido. Para determinar si los factores secretados por el AT en la obesidad inducían un cambio en el fenotipo de los monocitos, estos fueron expuestos a MC de individuos obesos. Se encontró un aumento en la expresión de marcadores anti-inflamatorios como CD163, CD163L1 e IL10, en monocitos expuestos a MC de individuos obesos con respecto a individuos delgados, esto acompañado de una reducción en la expresión de marcadores pro-inflamatorios como TNF, IL6 y CLEC5A, sin diferencias significativas entre monocitos expuestos a MC de individuos delgados y obesos. Estos resultados difieren de algunos trabajos en los cuales se describe una polarización de tipo pro-inflamatoria en los ATM de ratones obesos (27, 39, 83). No obstante varias líneas de evidencia apoyan nuestros hallazgos, como lo encontrado por Fjeldborg y col., quienes comparan la expresión de marcadores relacionados con el fenotipo M1 y M2 en ATM subcutáneos de individuos delgados y obesos. Este grupo describió que existía un cambio en el fenotipo de los ATM pero un fenotipo M2 o anti-inflamatorio, debido a que encontraron un aumento en la expresión de IL10 y de CD163 (42). A su vez, Spencer y col. demostraron que existe una mayor abundancia de  $M\phi$  de tipo M2 en el SAT de

individuos obesos con respecto al de delgados, debido a que expresan altos niveles de TGF- $\beta$  y promueven fibrosis; además, al cultivar células THP-1 con adipocitos se promovía en los M $\phi$  una mayor expresión de IL10 (84). Entonces, el microambiente del AT en el contexto de la obesidad induce un fenotipo anti-inflamatorio en los ATM y como se ha demostrado por primera vez en este trabajo, en sus precursores, por lo que probablemente esta polarización pudiera ser un mecanismo benéfico para contrarrestar la inflamación en el tejido. En lo que respecta a los posibles inductores secretados por el AT en el contexto de la obesidad que pudieran estar promoviendo este fenotipo anti-inflamatorio en los monocitos, se sabe que las citocinas clave que regulan la activación alternativa de los M $\phi$  son IL-4/IL-13, las cuales sobre-regulan la expresión de marcadores asociadas al fenotipo M2 (76). Kang y col. estudiaron si el AT era capaz de secretar estas citocinas y, por lo tanto, mediar la activación alternativa. Este grupo reportó que los adipocitos son capaces de producir IL4 e IL13; además, al exponer a M $\phi$  derivados de medula ósea a MC de adipocitos se inducía la expresión de lectinas asociadas al fenotipo M2 y una mayor actividad de STAT6, el cual es un efector clave en la señalización de citocinas tipo Th2 como IL-4 (77). Del mismo modo, se ha implicado a la citocina IL-10 como un inductor clave en la activación alternativa de los M $\phi$ , ya que sobre-regula la expresión de marcadores asociados a este fenotipo como CD163, CD163L1 y CD206 (80, 81, 86). Con respecto a los ATM, se ha descrito que es secretada en mayor cantidad en el AT de humanos y de ratones obesos con respecto a delgados (60, 81, 85). Además, se ha descrito que el eje CCL2/CCR2, el cual media el reclutamiento de monocitos al tejido en estado de inflamación, regula la polarización de los M $\phi$  hacia un fenotipo M2, debido a que regula a la baja la secreción de citocinas pro-inflamatorias y aumenta la producción de IL-10 (87). Por estas razones especulamos que los principales factores secretados por el AT en el contexto de la obesidad que pudieran estar promoviendo una polarización de tipo M2 en los precursores de los monocitos son IL10, IL4, IL13 y el eje CCL2/CCR2, aunque probablemente existe una plétora de factores existentes en los MC, de los cuales aún no se ha descubierto su capacidad para inducir una polarización M2 en los ATM.

Por otro lado, se ha descrito ampliamente en la literatura tanto en humano como en ratón que existe una población específica de ATM que expresa el gen ITGAX, el cual codifica para la

integrina CD11c. Se ha determinado que esta población proviene de precursores de la médula ósea y que generalmente posee características de un fenotipo M1, entre ellas una mayor expresión de citocinas pro-inflamatorias. Al analizar la expresión de ITGAX en los monocitos encontramos que solo era inducida significativamente en los monocitos expuestos a factores secretados por el omento de individuos obesos. Esto correlaciona con la literatura debido a que se ha descrito en humano y ratón que los ATM que expresan CD11c en su mayoría provienen de monocitos (27, 29, 39, 43). Además, esta población tiene la particularidad de acumularse durante la obesidad primordialmente en el omento (88), por lo que estos hallazgos y nuestros resultados demuestran que la expresión de ITGAX está siendo regulada positivamente en los precursores de los M $\phi$  por algún factor secretado específicamente por el AT de omento de individuos obesos. Igualmente se ha reportado que los ATM que expresan CD11c se encuentran localizados en las CLS, áreas que se caracterizan por tener una remodelación de tejido muy activa, por lo que los M $\phi$  localizados en estas estructuras podrían presentar propiedades de una polarización M2, además de las pro-inflamatorias abundantemente descritas. De manera interesante se ha descrito en la literatura un fenotipo mixto en los ATM CD11c+ de humano, debido a que se encontró que éstos exhiben tanto características pro-inflamatorias como propiedades de M $\phi$  M2; entre ellas podemos mencionar la capacidad para expresar altos niveles de IL-10 a nivel de mRNA y de proteína, lo cual concuerda en parte con nuestros resultados (43). A su vez, Shaul y col. describieron en ratón que los ATM CD11c+ tenían características de M $\phi$  de tipo M2, como una mayor expresión de genes relacionados con la remodelación de tejido, entre ellos CD163, CD206, MMP-2 y LYVE-1 (89). Esto sugiere que debido a que durante la obesidad el AT sufre cambios extraordinarios en su fisiología para almacenar el exceso de energía, los M $\phi$  con una polarización de tipo M2 podrían ayudar a mantener la homeostasis del tejido y a sustentar el proceso de expansión y remodelación del AT, debido a que esta polarización en particular posee capacidades o funciones para promover la angiogénesis y adipogénesis, captación y metabolismo de lípidos, fagocitosis de células necróticas o apoptóticas, degradación de la ECM, entre otras (42, 89-92). Es importante señalar que los monocitos expuestos a MC de individuos obesos no recapitulan la expresión de marcadores pro-inflamatorios (a excepción

de ITGAX), como se ha reportado en el fenotipo mixto. Esto podría deberse a que la expresión de marcadores asociados a un fenotipo M1 ha sido analizada en ATM aislados directamente del AT, por lo que quizás la inducción de una polarización de tipo M1 requiera en conjunto de otros factores o señales existentes en el microambiente del AT en la obesidad que no están comprendidas en los MC, como podrían ser el estado de hipoxia y un ambiente rico en lípidos, de los cuales se ha comprobado su efecto en la inducción de un fenotipo M1 en los M $\phi$  (47, 48, 53). Un estudio previo indicó que el microambiente que se presenta en AT en la obesidad polariza a los ATM hacia un fenotipo único al cual se denominó como “metabólicamente activado”. Esto fue demostrado en M $\phi$  derivados de monocitos expuestos a MC de individuos obesos y en ATM (22). Nosotros no observamos que factores secretados por el AT de individuos obesos induzcan este fenotipo en los monocitos con respecto a MC de individuos delgados. La expresión de los genes ABCA1 y PLIN2, los cuales se encuentran asociados a este fenotipo, no se detectó de manera especialmente incrementada en los monocitos expuestos a MC de individuos obesos. ABCA1 no se indujo en ninguna de las condiciones evaluadas, mientras que PLIN2 lo hizo en todas. Se ha sugerido que los lípidos son el inductor más efectivo de la expresión de ambos genes (93, 94), por lo que consideramos que los MC de individuos obesos podrían no contener los niveles suficientes de ácidos grasos libres para estimular de manera eficiente la expresión de PLIN2 y ABCA1 en los monocitos. Alternativamente, nuestros hallazgos podrían sugerir que la expresión de estos marcadores asociados al metabolismo de lípidos es dependiente del estado de diferenciación de las células mononucleares monocítico/macrofágicas, y que los factores secretados por el AT en la obesidad no son capaces de inducir el fenotipo metabólicamente activado en los monocitos, pero sí en los M $\phi$  completamente diferenciados.

La acumulación de ATM en la obesidad es considerada, en parte, una consecuencia del reclutamiento de monocitos sanguíneos al AT, los cuales migran hacia un gradiente quimiotáctico. En la literatura se ha descrito ampliamente que la quimiocina CCL2 tiene un papel fundamental en el reclutamiento de monocitos a sitios periféricos durante la inflamación, y específicamente al AT; por ejemplo, se ha reportado que una deficiencia de CCL2 y de su receptor CCR2 en ratones obesos lleva a una disminución en el contenido de ATM y a



un estado de resistencia a la insulina (31, 32). Con estos antecedentes, en nuestro trabajo analizamos si el AT de un individuo obeso es capaz de secretar factores que provoquen cambios en la expresión del eje CCR2/CCL2 en los monocitos y, por lo tanto, contribuir probablemente a la acumulación de ATM. Se encontró que la expresión de CCR2 y CCL2 se encuentra incrementada en los monocitos expuestos a MC de SAT sin diferencias significativas entre individuos obesos y delgados, lo cual ha sido reportado para CCL2 en M $\phi$  de SAT (42). De manera interesante, encontramos que los niveles de expresión de CCL2 y de CCR2 se encontraban incrementados solamente en los monocitos expuestos a MC de omento de individuos obesos con respecto a delgados, lo cual concuerda con la literatura debido a que se ha descrito que existe una mayor infiltración de monocitos al omento de ratones obesos con respecto a los ratones delgados (88), además de la capacidad incrementada de la SVF de individuos obesos de secretar CCL2 (60). Con estos resultados podemos inferir que, debido a que el omento se encuentra muy ligado a la disfunción metabólica, éste es capaz de regular en los individuos delgados una baja inducción de la expresión de CCL2, lo que conllevaría un bajo nivel de reclutamiento de monocitos y evitaría la generación de respuestas inflamatorias exacerbadas. El omento de individuos obesos muestra un escenario diferente, ya que los factores secretados por este tejido inducen la expresión del eje CCL2/CCR2 en los monocitos. De esta manera, sugerimos que éste es uno de los principales mecanismos por el cual existe una mayor acumulación de ATM en la obesidad, lo cual coincide con algunos reportes donde se describe la capacidad de los factores secretados por el AT de individuos y de ratones obesos para incrementar la migración de monocitos al AT (29, 95).

En este trabajo se realizaron análisis de correlación entre algunos de los genes analizados con el fin de discernir si la modulación de la expresión de algún gen se encontraba asociado a la regulación de otros. Sorprendentemente encontramos que tanto la expresión de CCL2 como la de su receptor CCR2 correlacionan positivamente con IL10 (CCL2) o con moléculas cuya expresión es fuertemente dependiente de IL-10 como CD163 y CD163L1 (CCR2). Por otro lado, la expresión de otra molécula potencialmente asociada al fenotipo inflamatorio como ITGAX correlaciona positivamente con la expresión de CCR2 y de CD163L1. Este es un dato interesante debido a que recién Wouters y col. identificaron una asociación positiva entre los

ATM CD11c+ y los monocitos CCR2+ (96). Estos hallazgos, en conjunto con los reportados en nuestro estudio, podrían indicar que los monocitos CCR2+ en sangre contribuyen a la acumulación de los ATM CD11c+, y a su vez que la expresión de CD11c+ en los monocitos recién reclutados al AT se encuentra bajo el control de factores secretados específicamente por el omento de individuos obesos. Igualmente, se ha demostrado que la quimiocina CCL2, la cual se encuentra incrementada en la obesidad, es capaz de estimular la expresión de integrinas en monocitos, entre ellas CD11c (97, 98). Por otro lado, la correlación positiva entre la expresión del eje CCL2/CCR2 y marcadores anti-inflamatorios como IL10, CD163 y CD163L1 podría parecer contradictoria debido a los roles clásicos de ambos grupos de moléculas. Sin embargo, se ha reportado que IL10 es capaz de inducir la secreción de CCL2 biológicamente activa en monocitos de sangre periférica en ausencia de otro tipo de estimulación (99). Por lo tanto, esta correlación implicaría que el reclutamiento de monocitos al AT está más asociado al mantenimiento de la homeostasis del AT, independientemente de grado de adiposidad del individuo.

Finalmente, se realizaron también análisis de correlación entre el IMC de los individuos y la expresión de todos los genes evaluados. Cuando analizamos los MC en conjunto no encontramos ninguna correlación significativa. Sin embargo, al evaluar separadamente los MC de individuos delgados y de obesos encontramos que los individuos delgados (independientemente del tipo de AT) presentan fuertes asociaciones positivas de su IMC con la expresión de la citocina inflamatoria IL6, y negativas con la expresión de CD163 y CD163L1. Estos datos son similares a los descritos en ratón y en algunos trabajos con AT de humanos, es decir, un mayor IMC correlaciona positivamente con marcadores inflamatorios y negativamente con marcadores anti-inflamatorios. En los individuos obesos, si bien se mantienen las mismas tendencias, la variabilidad es grande y sólo se pudieron detectar asociaciones significativas de su IMC con la expresión de CD163L1. Es posible que la heterogeneidad de microambientes generada en el AT durante la obesidad (zonas de hipoxia, zonas de angiogénesis, zonas necróticas) influya en la mayor variabilidad de los resultados obtenidos con los individuos obesos; sin embargo, sugerimos que, en general, el AT de individuos con mayor IMC secreta factores que regulan el perfil génico de los monocitos,

incrementando su producción de IL6 y disminuyendo la expresión de marcadores anti-inflamatorios dependientes de IL-10.

En resumen, en este trabajo demostramos que los monocitos sanguíneos, precursores de los ATM, son polarizados hacia un fenotipo anti-inflamatorio cuando son expuestos a MC de individuos obesos, debido a que muestran una mayor expresión de IL10, CD163 y CD163L1 unido a una disminución de marcadores pro-inflamatorios en los dos tejidos grasos evaluados. Además, existe una mayor expresión del eje CCL2/CCR2/IL10/ITGAX solamente en los monocitos expuestos a MC de omento de individuos obesos con respecto a delgados. Este dato sugiere que la mayor infiltración de monocitos existente en el omento de individuos obesos se debe a la secreción de factores en este tejido que incrementan la expresión de CCL2 y de su receptor, y que este incremento podría relacionarse en parte con la producción aumentada de IL-10 en situaciones de obesidad. De esta manera, los monocitos extravasados al omento de individuos obesos encontrarían un microambiente de factores que promoverían su polarización M2. Los ATM de tipo M2 estarían involucrados en los grandes procesos de remodelación del AT que tienen lugar durante la obesidad. Sin embargo, aunque éste sea el panorama general, no descartamos que los distintos microambientes que se generan durante esta remodelación puedan promover la polarización de los monocitos hacia otros fenotipos alternativos.

## CONCLUSIONES

1. Los factores secretados por el AT de individuos obesos inducen la expresión de marcadores asociados a la activación alternativa de los macrófagos y disminuyen la expresión de marcadores asociados al fenotipo M1. Estos resultados sugieren que durante la obesidad el AT podría inducir macrófagos de tipo homeostático como un mecanismo de compensación para reducir la inflamación o con un papel de remodelación del tejido.
2. Los monocitos expuestos a MC de individuos obesos no recapitulan la activación metabólica, ya que no incrementan la expresión de ABCA1 y PLIN2 con respecto a los monocitos expuestos a MC de individuos delgados.
3. La expresión del eje CCL2/CCR2 se encuentra incrementada en monocitos expuestos a MC de omento de individuos obesos, en concordancia con el mayor número de ATM descrito en este tejido. La expresión de estas moléculas correlaciona positivamente con la de IL10, pero no con la de citocinas inflamatorias como TNF o IL6, por lo que es posible que IL-10 constituya un inductor fundamental de CCL2 y de CCR2 en el omento de individuos obesos.
4. La expresión de ITGAX sólo es inducida significativamente en los monocitos expuestos a factores secretados por el omento de individuos obesos, y su expresión correlaciona positivamente con la de CCR2 y con la de la molécula anti-inflamatoria CD163L1. Estos datos, en conjunto con los anteriores, sugieren que la expresión de ITGAX en este tejido estaría más asociada a los microambientes de remodelación del tejido que a los relacionados con la inflamación.
5. En resumen, los factores secretados por el AT de diferentes depósitos grasos durante la obesidad son capaces de cambiar el fenotipo de los monocitos y probablemente tener un impacto en su diferenciación a ATM.

## **PERSPECTIVAS**

1. Determinar los factores incluidos en los MC de individuos delgados y obesos que provocan los cambios génicos determinados en este trabajo.
2. Evaluar los niveles de proteína de las moléculas estudiadas con el fin de determinar si la inducción o supresión génica correlaciona con la expresión global de la proteína.
3. Incluir en el estudio a un grupo de individuos con síndrome metabólico, ya que no existen trabajos que evalúen los cambios que pueda provocar el microambiente del AT de estos individuos en los monocitos, y se ha demostrado que algunas características del AT de estos sujetos son diferentes con respecto a los obesos (ej: tamaño de los adipocitos, número de CLS) (43).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Cinti S. The adipose organ at a glance. *Dis. Model Mech.* 2012; 5: 588-594.
2. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, *et al.* Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2011; 11: 85-97.
3. Bai Y, Sun Q. Macrophage recruitment in obese adipose tissue. *Obesity Rev.* 2015; 16: 127-136.
4. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004; 89: 2548-2556.
5. AL-Suhaimi EA, Shehzad A. Leptin, resistin and visfatin: the missing link between endocrine metabolic disorders and immunity. *Eur. J. Med. Res.* 2013; 18: 12.
6. Waki H, Tontonoz P. Endocrine functions of adipose tissue. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2007; 2: 31-56.
7. Gesta S, Tseng YH, Kahn CR. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* 2007; 131: 242-256.
8. Ibrahim MM. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obesity Rev.* 2009; 11: 11-18.
9. Exley M, Hand L, O'Shea D, Lynch L, *et al.* Interplay between the immune system and adipose tissue in obesity. *J. Endocrinol.* 2014; 223: 41-48.
10. Barnes MA, Carson MJ, Nair MG. Non-traditional cytokines: How catecholamines and adipokines influence macrophages in immunity, metabolism and the central nervous system. *Cytokine* 2015; 72: 210-219.
11. Fuster JJ, Ouchi N, Gokce N, *et al.* Obesity-induced changes in adipose tissue microenvironment and their impact on cardiovascular disease. *Circ. Res.* 2016; 118: 1786-1807.
12. Bing C. Is interleukin-1 $\beta$  a culprit in macrophage-adipocyte crosstalk in obesity? *Adipocyte* 2015; 4: 149-152.
13. Martinez-Santibañez G, Lumeng CN. Macrophages and the regulation of adipose tissue remodeling. *Annu. Rev. Nutr.* 2014; 34: 57-76.
14. Deng T, Lyon CJ, Bergin S, Caligiuri MA, Hsueh WA. Obesity, inflammation and cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2016; 11: 421-449.
15. Kusminski CM, Bickel PE, Scherer PE. Targeting adipose tissue in the treatment of obesity-associated diabetes. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2016; 15: 639-660.
16. Boutens L, Stienstra R. Adipose tissue macrophages: going off track during obesity. *Diabetologia* 2016; 59: 879-894.
17. Locati M, Mantovani A, Sica A. Macrophage activation and polarization as an adaptive component of innate immunity. *Adv. Immunol.* 2013; 120: 163-184.
18. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, *et al.* Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J. Lipid Res.* 2005; 46: 2347-2355.
19. Ginhoux F, Jung S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 2014; 14: 392-404.
20. Italiani P, Boraschi D. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. *Front. Immunol.* 2014; 5: 1-22.
21. Lawrence T, Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat. Rev. Immunol.* 2011; 11: 750-761.
22. Kratz M, Coats BR, Hisert KB, *et al.* Metabolic dysfunction drives a mechanistically distinct proinflammatory phenotype in adipose tissue macrophages. *Cell Metab.* 2014; 20: 614-625.
23. Castoldi A, Naffah de Souza C, Câmara NO, *et al.* The macrophage switch in obesity development. *Front. Immunol.* 2016; 6: 637.

24. Biswas SK, Mantovani A. Orchestration of metabolism by macrophages. *Cell Metab.* 2012; 15: 432-437.
25. González-Domínguez E, Samaniego R, Flores-Sevilla JL, *et al.* CD163L1 and CLEC5A discriminate subsets of human resident and inflammatory macrophages in vivo. *J. Leukoc. Biol.* 2015; 98(4): 453-466.
26. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004; 25(12): 677-686.
27. Weisberg SP, McCann D, Desai M, *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation. *J. Clin. Invest.* 2003; 112: 1796-1808.
28. Hill AA, Bolus WR, Hasty AH. A decade of progress in adipose tissue macrophage biology. *Immunol. Rev.* 2014; 262: 134-152.
29. Oh DY, Morinaga H, Talukdar S, *et al.* Increased macrophage migration into adipose tissue in obese mice. *Diabetes* 2012; 61: 346-354.
30. Zheng C, Yang Q, Cao J, *et al.* Local proliferation initiates macrophage accumulation in adipose tissue during obesity. *Cell Death Dis.* 2016; 7: 2167.
31. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, *et al.* MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J. Clin. Invest.* 2006; 116(6): 1494-505.
32. Weisberg SP, Hunter D, Huber R, *et al.* CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J. Clin. Invest.* 2006; 116: 115-124.
33. Lumeng CN, DeYoung SM, Bodzin JL, *et al.* Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes* 2007; 56: 16-23.
34. Kitade H, Sawamoto K, Nagashimada M, *et al.* CCR5 plays a critical role in obesity-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance by regulating both macrophage recruitment and M1/M2 status. *Diabetes* 2012; 61: 1680-1690.
35. Keophiphath M, Rouault C, Divoux A, *et al.* CCL5 promotes macrophage recruitment and survival in human adipose tissue. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2010; 30 :39-45.
36. Polyák A, Ferenczi S, Dénes A, *et al.* The fractalkine/CX3CR1 system is implicated in the development of metabolic visceral adipose tissue inflammation in obesity. *Brain Behav. Immun.* 2014; 38: 25-35.
37. Lee BC, Lee J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. *Biochim. Biophys. Acta* 2014; 1842: 446-462.
38. Hill AA, Bolus WR, Hasty AH. A decade of progress in adipose tissue macrophage biology. *Immunol. Rev.* 2014; 262: 134-152.
39. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. Clin. Invest.* 2007; 117: 175-184.
40. Dalmas E, Karine Clément K, Guerre-Millo M. Defining macrophage phenotype and function in adipose tissue. *Trends Immunol.* 2011; 32 :307-314.
41. Bourlier V, Zakaroff-Girard A, Miranville A, *et al.* Remodeling phenotype of human subcutaneous adipose tissue macrophages. *Circulation* 2008; 117: 806-815.
42. Fjeldborg K, Pedersen SB, Møller HJ, *et al.* Human adipose tissue macrophages are enhanced but changed to an anti-inflammatory profile in obesity. *J. Immunol. Res.* 2014; 2014: 309548.
43. Wentworth JM, Naselli G, Brown WA, *et al.* Pro-inflammatory CD11c+CD206+ adipose tissue macrophages are associated with insulin resistance in human obesity. *Diabetes* 2010; 59: 1648-1656.
44. Aron-Wisnewsky J, Tordjman J, Poitou C, *et al.* Human adipose tissue macrophages: M1 and M2 cell surface markers in subcutaneous and omental depots and after weight loss. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2009; 94: 4619-4623

45. Zeyda M, Farmer D, Todoric J, *et al.* Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production. *Int. J. Obesity* 2007; 31: 1420-1428.
46. Trayhurn P. Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. *Physiol. Rev.* 2013; 93: 1-21.
47. O'Rourke RW, White AE, Metcalf MD, *et al.* Hypoxia-induced inflammatory cytokine secretion in human adipose tissue stromovascular cells. *Diabetologia* 2011; 54: 1480-1490.
48. Fujisaka S, Usui I, Ikutani M, *et al.* Adipose tissue hypoxia induces inflammatory M1 polarity of macrophages in an HIF-1 $\alpha$ -dependent and HIF-1 $\alpha$ -independent manner in obese mice. *Diabetologia* 2013; 56: 1403-1412.
49. Ye J. Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance. *Int. J. Obes.* 2009; 33: 54-66
50. Divoux A, Tordjman J, Lacasa D *et al.* Fibrosis in human adipose tissue: composition, distribution and link with lipid metabolism and fat mass loss. *Diabetes* 2010; 59: 2817-2825.
51. Dasu MR, Devaraj S, Zhao L, *et al.* High glucose induces Toll-like receptor expression in human monocytes. *Diabetes* 2008; 57: 3090-3098.
52. Sun S, Ji Y, Kersten S, *et al.* Mechanisms of inflammatory responses in obese adipose tissue. *Annu. Rev. Nutr.* 2012; 32: 261-286.
53. Nguyen MT, Favelyukis S, Nguyen AK, *et al.* A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 35279-35292.
54. Anderson EK, Hill AA, Hasty AH. Stearic acid accumulation in macrophages induces toll-like receptor 4/2-independent inflammation leading to endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2012; 32: 1687-1695.
55. Lee JY, Ye J, Gao Z, *et al.* Reciprocal modulation of Toll-like receptor-4 signaling pathways involving MyD88 and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT by saturated and polyunsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 37041-37051.
56. Lee JY, Sohn KH, Rhee SH, *et al.* Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 16683-16689.
57. Orr JS, Kennedy A, Anderson-Baucum EK, *et al.* Obesity alters adipose tissue macrophage iron content and tissue iron distribution. *Diabetes* 2014; 63: 421-432.
58. Tanaka M, Ikeda K, Suganami T, *et al.* Macrophage-inducible C-type lectin underlies obesity-induced adipose tissue fibrosis. *Nat. Commun.* 2014; 5: 4982.
59. Andrade-Oliveira V, Câmara NO, Moraes-Vieira PM. Adipokines as drug targets in diabetes and underlying disturbances. *J. Diabetes Res.* 2015; 2015: 681612.
60. Maury E, Ehala-Aleksejev K, Guiot Y, *et al.* Adipokines oversecreted by omental adipose tissue in human obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2007; 293: E656-E665.
61. Sood A, Shore SA. Adiponectin, leptin, and resistin in asthma: Basic mechanisms through population studies. *J. Allergy* 2013; 2013: 785835.
62. Tsatsanis C, Zacharioudaki V, Androulidaki A, *et al.* Adiponectin induces TNF- $\alpha$  and IL-6 in macrophages and promotes tolerance to itself and other pro-inflammatory. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 335: 1254-1263.
63. Greenberg AS, Obin MS. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006; 83: 461S-465S.
64. Manigrasso MR, Ferroni P, Santilli F, *et al.* Association between circulating adiponectin and interleukin-10 levels in android obesity: Effects of weight loss. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005; 90: 5876-5879.



65. Lovren F, Pan Y, Quan A, *et al.* Adiponectin primes human monocytes into alternative anti-inflammatory M2 macrophages. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2010; 299: H656-H663.
66. Ohashi K, Parker JL, Ouchi N, *et al.* Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype. *J. Biol. Chem.* 2010; 285: 6153-6160.
67. Ekmen N, Helvacı A, Gunaldi M, *et al.* Leptin as an important link between obesity and cardiovascular risk factors in men with acute myocardial infarction. *Indian Heart J.* 2016; 68: 132-137.
68. Gruen ML, Hao M, Piston DW, *et al.* Leptin requires canonical migratory signaling pathways for induction of monocyte and macrophage chemotaxis. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2007; 293: C1481-C1488.
69. Mancuso P, Gottschalk A, Phare SM, *et al.* Leptin-deficient mice exhibit impaired host defense in Gram-negative Pneumonia. *J. Immunol.* 2002; 168: 4018-4024.
70. Mancuso P, Canetti C, Gottschalk A, *et al.* Leptin augments alveolar macrophage leukotriene synthesis by increasing phospholipase activity and enhancing group IVC iPLA2 (cPLA2) protein expression. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2005; 287: L497-L502.
71. Jitprasertwong P, Jaedicke KM, Nile CJ, *et al.* Leptin enhances the secretion of interleukin (IL)-18, but not IL-1b, from human monocytes via activation of caspase. *Cytokine* 2014; 65: 222-230.
72. Naylor C, Petri Jr WA. Leptin Regulation of Immune Responses. *Cell* 2016; 22: 88-98.
73. Zarkesh-Esfahani H, Pockley G, Metcalfe RA, *et al.* High-dose leptin activates human leukocytes via receptor expression on monocytes. *J. Immunol.* 2001; 167: 4593-4599.
74. Fraser DA, Thoen J, Reseland JE, *et al.* Decreased CD4+ lymphocyte activation and increased interleukin-4 production in peripheral blood of rheumatoid arthritis patients after acute starvation. *Clin. Rheumatol.* 1999; 18: 394-401.
75. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2006; 6: 772-783.
76. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 2003 3: 23-35.
77. Kang K, Reilly SM, Karabacak V, *et al.* Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPAR delta regulate macrophage polarization and insulin sensitivity. *Cell Metab.* 2008; 7: 485-495.
78. Wu D, Molofsky AB, Liang HE, *et al.* Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science* 2011; 332: 243-247.
79. Nakamura R, Sene A, Santeford A, *et al.* IL10-driven STAT3 signalling in senescent macrophages promotes pathological eye angiogenesis. *Nat. Commun.* 2015; 6: 7847.
80. Makita N, Hizukuri Y, Yamashiro K, *et al.* IL-10 enhances the phenotype of M2 macrophages induced by IL-4 and confers the ability to increase eosinophil migration. *Int. Immunol.* 2015; 27: 131-141.
81. Fujisaka S, Usui I, Bukhari A, *et al.* Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. *Diabetes* 2009; 58:2574-2582.
82. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 2011; 11: 762-774.
83. Xu H, Barnes GT, Yang Q, *et al.* Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 2003; 112: 1821-1830.
84. Spencer M, Yao-Borengasser A, Unal R, *et al.* Adipose tissue macrophages in insulin-resistant subjects are associated with collagen VI and fibrosis and demonstrate alternative activation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2010; 299: 1016-1027.
85. Li P, Lu M, Nguyen MT, *et al.* Functional heterogeneity of CD11c-positive adipose tissue macrophages in diet-induced obese mice. *J. Biol. Chem.* 2010; 285: 15333-15345,
86. Buechler C, Ritter M, Orso E, *et al.* Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J. Leukoc. Biol.* 2000; 67: 97-103.

87. Sierra-Filardi E, Nieto C, Domínguez-Soto A, *et al.* CCL2 shapes macrophage polarization by GM-CSF and M-CSF: Identification of CCL2/CCR2-dependent gene expression profile. *J. Immunol.* 2014; 192: 3858-3867.
88. Harman-Boehm I, Bluher M, Redel H, *et al.* Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: Effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007; 92: 2240-2247.
89. Shaul ME, Bennett G, Strissel KJ, *et al.* Dynamic, M2-like remodeling phenotypes of CD11c adipose tissue macrophages during high-fat diet–induced obesity in mice. *Diabetes* 2007; 56: 1517-1526.
90. Xu X, Grijalva A, Skowronski A, *et al.* Obesity activates a program of lysosomal-dependent lipid metabolism in adipose tissue macrophages independently of classic activation. *Cell Metab.* 2013; 18: 816-830.
91. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, *et al.* Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels. *Diabetes* 2007; 56: 1517-1526.
92. Fitzgibbons TP, Czech MP. Emerging evidence for beneficial macrophage functions in atherosclerosis and obesity-induced insulin resistance. *J. Mol. Med.* 2016; 94: 267-275.
93. Schmitz G, Langmann T. Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression. *Biochim. Biophys. Acta* 2005; 1735: 1-19.
94. Fan B, Gu JQ, Yan R, *et al.* High glucose, insulin and free fatty acid concentrations synergistically enhance perilipin 3 expression and lipid accumulation in macrophages. *Metab. Clin. Exp.* 2013; 62: 1168-1179.
95. Ito A, Suganami T, Yamauchi A, *et al.* Role of CC chemokine receptor 2 in bone marrow cells in the recruitment of macrophages into obese adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 2008; 283: 35715–35723.
96. Wouters K, Gaens K, Bijnen M, *et al.* Circulating classical monocytes are associated with CD11c+ macrophages in human visceral adipose tissue. *Sci. Rep.* 2017; 7: 42665.
97. Jiang Y, Beller DI, Frenzl G, *et al.* Graves. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J. Immunol.* 1992; 148: 2423-2428.
98. Vaddi K, Newton RC. Regulation of monocyte integrin expression by P-family chemokines. *J Immunol.* 1994; 153: 4721-4732
99. Yano S, Yanagawa H, Nishioka Y, *et al.* T Helper 2 cytokines differently regulate monocyte chemoattractant protein-1 production by human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *J. Immunol.* 1996; 157: 2660-2665.