

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR**

**Influencia del microambiente del tejido adiposo de individuos  
delgados, con sobrepeso y obesos sobre el perfil inflamatorio de  
los macrófagos**

**T E S I S**

**QUE PRESENTA**

**M. EN C. ANGÉLICA GIRÓN ULLOA**

**PARA OBTENER EL GRADO DE**

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE BIOMEDICINA MOLECULAR**

**DIRECTORA DE LA TESIS:**

**DRA. MARÍA CARMEN SÁNCHEZ TORRES**

El presente trabajo se desarrolló 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 TUTORAL

### **Directora de tesis:**

Dra. María Carmen Sánchez Torres

### **Asesores:**

Dr. Leopoldo Santos Argumedo

Departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV

Dr. Michael Schnoor

Departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV

Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete

Departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV

Dra. Victoria Campos Peña

Instituto Nacional de Neurología y neuocirugía

La M. en C. Angélica Girón Ulloa realizó esta tesis de doctorado con una beca otorgada por CONACYT (No. 261967)

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al CONACyT por la beca otorgada durante mis estudios de doctorado y el desarrollo de esta tesis.

Gracias al personal administrativo del CINVESTAV por abrirme las puertas en sus instalaciones y todas las facilidades otorgadas en cuanto a apoyos para congresos y cursos.

Gracias a la doctora Ma. Carmen Sánchez Torres por la oportunidad de trabajar en su laboratorio, los conocimientos compartidos, su dirección en la realización de los experimentos y en el análisis de los resultados obtenidos en este trabajo.

Gracias a mis compañeros del laboratorio, Eduardo, Adrián, Pepe, Érika, Keity, Rebeca, Ramón y Miguel por enseñarme el valor de la amistad y el compañerismo en el trabajo, porque siempre me hicieron sentir en un ambiente agradable sin envidias ni egoísmo.

Agradezco especialmente a mi compañera Érika González Domínguez, quien contribuyó en gran parte a este trabajo con sus conocimientos y su asesoría técnica en los experimentos realizados.

A la auxiliar de nuestro laboratorio, la doctora Norma Segovia Gamboa, por su asesoría técnica y su disposición en atender las necesidades del laboratorio que, si no fuesen suplidas, el desarrollo de este trabajo no hubiera sido posible.

A Julio Ramírez, el técnico del laboratorio quien siempre está pendiente de las necesidades físicas del laboratorio y por su disposición en preparar los materiales que utilizamos en cada ensayo.

A Ninfa Arreola y Maru Maqueda por su amabilidad y su constante disposición para apoyarnos con los procesos administrativos en el área de las cotizaciones y pedidos de materiales y reactivos así como de apoyos económicos para congresos, becas y exámenes.

Doy gracias a mis padres y hermanas quienes siempre me han apoyado en cada paso de mi formación profesional porque han confiado en mí y me han animado a seguir adelante.

Gracias a mi esposo por su ayuda y comprensión cada vez que tenía que ir al laboratorio en fines de semana o días festivos. Gracias por su apoyo moral en los días difíciles de esta formación profesional y la confianza que puso en mí para ver terminada esta etapa.

Finalmente, pero no por ser el menos importante, agradezco a Dios por permitir que estas puertas en el área profesional hayan sido abiertas y por darme la voluntad y la determinación de iniciar y llegar al final de esta etapa.

## ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	5
RESUMEN EN ESPAÑOL .....	7
RESUMEN EN INGLÉS .....	10
INTRODUCCIÓN.....	13
1. El tejido adiposo.....	13
1.1. Macrófagos del tejido adiposo e inflamación .....	15
1.2. Fenotipo y funciones de los macrófagos del tejido adiposo: Activación clásica y alternativa .....	16
2. Otras células inmunes que contribuyen a la inflamación en el tejido adiposo .....	21
3. Adipocinas y su influencia sobre las células del sistema inmunitario.....	23
3.1. La leptina.....	24
3.2. La resistina .....	26
3.3. La adiponectina.....	27
4. Vías de señalización implicadas en la obesidad/resistencia a la insulina .....	30
4.1. Activación de la cinasa N-terminal de c-Jun (JNK) .....	30
4.2. Activación del receptor tipo Toll-4.....	31
5. Antecedentes directos.....	33
JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	34
HIPÓTESIS .....	35
OBJETIVO GENERAL.....	35
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	35
MATERIALES Y MÉTODOS .....	36
1. Aislamiento de monocitos.....	36
2. Generación de macrófagos M1 y M2.....	36
3. Ensayos de Western blot.....	36
4. Obtención y selección de muestras de tejido adiposo.....	37
5. Obtención de RNA.....	38
6. Expresión de citocinas y de marcadores de ATMs mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real.....	39
7. Análisis estadístico .....	40

RESULTADOS.....	41
1. El tejido adiposo visceral tiene una mayor densidad de macrófagos que el tejido subcutáneo en condiciones de homeostasis. ....	41
2. En individuos delgados predomina un microambiente inflamatorio en el VAT con respecto al SAT. ....	42
3. La expresión de marcadores pan-macrofágicos incrementa con relación al índice de masa corporal de los individuos únicamente en el tejido adiposo subcutáneo.....	47
4. En la obesidad se favorece la expresión de marcadores asociados al fenotipo alternativo de los macrófagos, mientras que, con el sobrepeso se incrementan los mediadores inflamatorios. ....	51
5. Expresión del eje CCL2/CCR2 en el tejido adiposo de individuos con distinto grado de adiposidad.....	57
6. La leptina inhibe la secreción de IL-10 en macrófagos anti-inflamatorios con un efecto dosis-dependiente.....	58
7. La leptina promueve la repolarización de los macrófagos M2 mediante la supresión de la expresión de la IL10 y la inducción de citocinas pro-inflamatorias.....	60
8. La leptina promueve la activación de ERK1/2 en los macrófagos anti-inflamatorios sin modificar la fosforilación de los otros miembros de las MAPK. ....	62
DISCUSIÓN .....	65
PERSPECTIVAS .....	77
BIBLIOGRAFÍA.....	78

## **ABREVIATURAS**

**AdipoR:** receptor de adiponectina

**AMPK:** cinasa dependiente de AMP

**AT:** tejido adiposo

**ATMs:** macrófagos del tejido adiposo

**BAT:** tejido adiposo marrón

**CCL2:** ligando 2 de la quimiocina con motivos C-C

**CD163:** receptor scavenger de hemoglobina

**CD206:** receptor de manosa

**CLEC5A:** miembro de la familia 5 de dominio de lectina tipo C

**COX:** ciclooxigenasa

**db/db:** deficientes del receptor de leptina

**DC:** célula dendrítica

**DM2:** diabetes mellitus tipo 2

**ERK:** cinasa regulada por señales extracelulares

**fIAcrp:** adiponectina de larga longitud

**gAcrp:** adiponectina globular

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

**HFD:** dieta alta en grasas

**ICAM:** molécula de adhesión intercelular

**IFN:** interferón

**IKK:** cinasa de I $\kappa$ B

**IL:** interleucina

**IMC:** índice de masa corporal

**iNOS:** sintasa de óxido nítrico inducible

**IRS:** sustrato del receptor de la insulina

**ITGAM:** integrina alfa M

**ITGAX:** integrina alfa X

**Jak:** cinasa Janus

**JNK:** N-terminal cinasa de c-jun

**LPS:** lipopolisacárido bacteriano  
**MAPK:** proteína cinasa activada por mitógenos  
**MCP-1:** proteína quimioatrayente de monocitos  
**M-CSF:** factor estimulante de colonias de macrófagos  
**MKK:** cinasa de proteína cinasa activada por mitógenos  
**MMP:** metaloproteínasa de matriz  
**NF-κB:** factor nuclear κB  
**NK:** células asesinas naturales  
**ob/ob:** deficientes de leptina  
**ObR:** receptor de leptina  
**PAI:** inhibidor del activador del plasminógeno  
**PI3K:** fosfatidil inositol-3-cinasa  
**PPAR:** receptor activado por proliferadores de peroxisomas  
**RAG-1:** gen 1 activador de la recombinación  
**RNS:** especies reactivas de nitrógeno  
**ROS:** especies reactivas de oxígeno  
**RT-PCR:** reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real  
**SAT:** tejido adiposo subcutáneo  
**STAT:** factores transductores de señales y activadores de la transcripción  
**SVF:** fracción vascular estromal  
**TGF:** factor de crecimiento transformante  
**TLR:** receptor tipo Toll  
**TNF:** factor de necrosis tumoral  
**Treg:** célula T reguladora  
**VAT:** tejido adiposo visceral  
**VEGF:** factor de crecimiento de endotelio vascular  
**WAT:** tejido adiposo blanco  
**WT:** wild-type

## RESUMEN EN ESPAÑOL

La obesidad es una enfermedad crónica caracterizada por la expansión del tejido adiposo (AT), la infiltración de células inmunes y el aumento de la producción de moléculas inflamatorias como TNF, IL-6, IL-8, iNOS, CCL2 o ICAM-1. Los leucocitos más representativos en el AT son los macrófagos, los cuales son una fuente importante de citocinas proinflamatorias como el TNF y la IL-6. Los macrófagos del tejido adiposo (ATMs) se infiltran en el AT durante la obesidad y contribuyen a la inflamación y resistencia a la insulina en ratones y humanos (1). Esta acumulación ha sido más notoria en el tejido adiposo visceral (VAT) que en el subcutáneo (SAT). Lumeng et al. (2) encontraron una población de ATM F4/80+ CD11c+ en ratones obesos que no estaban presentes en los animales delgados. Esta población expresa genes pro-inflamatorios y se derivan del reclutamiento de monocitos sanguíneos. Los autores postularon que los ATM "cambian" su fenotipo de células residentes tipo M2 a macrófagos M1 durante la obesidad inducida por una dieta rica en grasas (HFD). Otros autores han reportado que los ATMs en el tejido adiposo de ratones obesos presentan un fenotipo mixto M1/M2 y perfiles de remodelación y que estos ATM adquieren un fenotipo más M2 con la alimentación prolongada con HFD (3). En humanos, la caracterización del fenotipo ATM ha sido más difícil y los resultados son contradictorios. Hay informes que coinciden sobre el "cambio de fenotipo" M2 a M1 durante la obesidad (3); otros han encontrado que los ATMs en sujetos delgados tienen un fenotipo M1 que cambia a M2 durante la obesidad (4). Finalmente, otros autores han propuesto que los ATM tienen capacidades de remodelación y angiogénesis en el tejido en la obesidad, mientras que los ATM en sujetos delgados presentan un fenotipo mixto (6,7). Dados los datos contradictorios sobre el fenotipo de los ATMs en individuos delgados y obesos, en el presente estudio se planteó caracterizar el fenotipo de este tipo de células en el SAT y el VAT de individuos delgados, con sobrepeso y obesos. Para lograr esto, obtuvimos muestras de SAT y VAT de individuos que se sometieron a apendicectomía laparoscópica o cirugía de colecistectomía. Los criterios de inclusión fueron: sujetos mayores de 18 años, ambos sexos, y metabólicamente sanos. Algunos de los tejidos se incluyeron en

O.C.T. para evaluar los marcadores de monocitos / macrófagos CD14, CD68, CD163 y CD163L1, y las citocinas TNF, IFN- $\gamma$  e IL-10 mediante microscopía confocal multicolor. Otras muestras se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se pesaron para realizar la extracción de ARN, del cual se obtuvo el cDNA y se evaluó la expresión génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real utilizando sondas y oligonucleótidos prediseñados para CD68, ITGAM, ITGAX, TNF, CD163, CD163L1, IL10, IFNG, IL4, CCL2 y CCR2. La expresión génica se expresó en relación con TBP y ACTB utilizando el método Ct cuantitativa. En este estudio también evaluamos el papel de la leptina en la repolarización de macrófagos del tejido adiposo, para lograr este objetivo, los macrófagos M2 y M1 se generaron in vitro y se estimularon con leptina para evaluar la expresión del ARNm genes de citocinas y la fosforilación de los miembros de MAPK.

La expresión de los marcadores pan-macrófagos CD68 e ITGAM (que codifica la cadena  $\alpha$ M de la integrina, CD11B) fue mayor en el VAT que en la SAT de sujetos delgados, lo que concuerda con lo reportado anteriormente en cuanto a la mayor abundancia de ATMs en el VAT. También encontramos una mayor expresión de citocinas proinflamatorias, como el *TNF* y el *IFNG*, y una menor expresión de la citocina antiinflamatoria *IL10* en el VAT, lo que sugiere un estado más proinflamatorio en el VAT que en el SAT en condiciones homeostáticas. La expresión de CD68 e ITGAM fue mayor en el SAT de los obesos con respecto a los sujetos delgados y su expresión se correlacionó con el índice de masa corporal (IMC) de los donantes. También observamos una mayor expresión de *CCR2* en sujetos obesos. Este hecho podría estar relacionado con el reclutamiento de *novo* de monocitos circulantes al tejido adiposo durante la obesidad, ya que detectamos una alta densidad de células CD14+ en el SAT de obesos en comparación con individuos delgados. Sin embargo, no se observaron diferencias en el VAT. La expresión del gen proinflamatorio *ITGAX* (que codifica la subunidad  $\alpha$ X de la integrina, CD11C) se incrementó en el SAT de los individuos con sobrepeso y obesos en comparación con los sujetos delgados. La expresión de este gen se correlaciona de manera positiva con el IMC de donantes delgados y con sobrepeso. De manera similar, la expresión de *TNF* y *IFNG* tendió a aumentar en los donantes

con sobrepeso y, sorprendentemente, se correlacionaron negativamente con el IMC en la obesidad. Esta tendencia también se observó en el VAT. Los donantes con sobrepeso u obesos no modificaron la expresión del ARNm de IL10 con respecto a individuos delgados en el SAT, en contraste, detectamos un aumento de transcritos de IL10 en el VAT que se correlaciona positivamente con el IMC. Finalmente, observamos que la expresión de los marcadores M2 CD163 y CD163L1 fue favorecida en el SAT de los obesos. Con respecto al papel de la leptina en la repolarización de macrófagos, encontramos una tendencia a aumentar la expresión de citocinas proinflamatorias, incluyendo la quimiocina CCL2 y una reducción evidente de los niveles de proteína y mRNA de IL-10 en ambos tipos de macrófagos. Además, la leptina solo promovió la activación de la MAPK Erk, pero no modificó la fosforilación de JNK ni de p38.

En resumen, se presentaron diferencias más significativas en el SAT que en el VAT con respecto a los números y el fenotipo de los ATMs con relación al grado de adiposidad. En sujetos con sobrepeso detectamos los niveles más altos de marcadores proinflamatorios, que podrían estar relacionados con el inicio de una expansión anómala de la AT. Nuestros datos sugieren que la obesidad está asociada con la abundancia de ATMs solo en el SAT. Estas células podrían derivar, al menos en parte, de los monocitos sanguíneos y la presentación de los fenotipos antiinflamatorios podrían asociarse con la remodelación de tejidos. Por otro lado, sugerimos que la leptina podría promover la repolarización de los macrófagos homeostáticos del tejido adiposo mediante la supresión de la IL-10 y la promoción de la expresión de citocinas proinflamatorias.

## RESUMEN EN INGLÉS

Obesity is a chronic disease characterized by adipose tissue (AT) expansion, accumulation of immune cells and increased production of inflammatory molecules like TNF, IL-6, IL-8, iNOS, CCL2, or ICAM-1. The more representative leukocytes in the AT are the macrophages, and they are a prominent source of pro-inflammatory cytokines such as TNF and IL-6. Adipose tissue macrophages (ATMs) infiltrate the AT during obesity and contribute to inflammation and insulin resistance in mice and humans (7). This accumulation has been reported more notable in visceral adipose tissue (VAT) than in subcutaneous (SAT). Lumeng et al. (21) found a population of ATMs F4/80+CD11c+ in obese mice that were not present in the lean animals. They expressed pro-inflammatory genes and derive from the recruitment of blood monocytes. The authors postulated that ATMs “switch” their phenotype from M2 resident cells to M1 macrophages during high-fat diet (HFD) induced-obesity. Others authors have reported that ATMs in adipose tissue from obese mice presented a mixed M1/M2 phenotype and remodeling profiles, and that these ATMs become more M2-like with extended HFD-feeding (3). In humans, the characterization of ATM phenotype has been more difficult and the results are contradictory. There are coincident reports about the M2 to M1 “phenotype switch” during obesity (23); others have reported that ATMs in lean subjects have a M1 phenotype that change to M2 during obesity (28). Finally, other authors have proposed that ATMs have enhanced capacities of tissue remodeling and angiogenesis in obesity whereas the ATMs in lean subjects present a mixed phenotype (24, 27). Given the conflicting data on ATM phenotype in lean and obese individuals, in the present study we sought to characterize the phenotype of this cell type in SAT and VAT of healthy lean, overweight and obese donors. To aim this, we obtained samples of SAT and VAT from lean, overweight and obese patients undergoing laparoscopic appendectomy or cholecystectomy surgery. Inclusion criteria were: subjects older than 18 years of age, both genders, and metabolically healthy. Some of the tissues were included in O.C.T. to evaluate the monocyte/macrophage markers CD14, CD68, CD163 and CD163L1, and the cytokines TNF, IFN- $\gamma$  and IL-10 by multicolor Confocal

microscopy. Other samples were snap frozen in liquid nitrogen and weighted. RNA extraction from frozen samples was performed, and total RNA was reverse transcribed. Gene expression was evaluated by quantitative real time PCR using pre-design probes and oligonucleotides for *CD68*, *ITGAM*, *ITGAX*, *TNF*, *CD163*, *CD163L1*, *IL10*, *IFNG*, *IL4*, *CCL2* and *CCR2*. Gene expression was expressed relative to *TBP* and *ACTB* using the  $\Delta$ Ct method. In this study we also evaluated the role of leptin in the repolarization of adipose tissue macrophages, to accomplish with this objective, macrophages M2 and M1 were generated *in vitro* and stimulated with leptin to evaluate the mRNA expression of cytokines genes and phosphorylation of members of MAPK.

The expression of the pan-macrophage markers *CD68* and *ITGAM* (encoding the integrin  $\alpha$ M chain, *CD11B*) was higher in VAT than in SAT of lean subjects, according with the already reported higher abundance of ATMs in VAT. We also found higher expression of pro-inflammatory cytokines, such as TNF and IFN- $\gamma$ , and lower expression of the anti-inflammatory cytokine *IL10* in VAT, which suggest a more prevalent pro-inflammatory state in VAT than in SAT in homeostatic conditions. *CD68* and *ITGAM* expression was higher in SAT from obese with respect to lean subjects, and their expression correlated with the body mass index (BMI) of the donors. We also observed a higher expression of *CCR2* in obese subjects. This fact might be related with the *de novo* recruitment of circulating monocytes to AT during obesity, since we detected high density of CD14+ cells in SAT from obese compared with lean individuals. However, no differences were observed in VAT. The expression of the pro-inflammatory gene *ITGAX* (encoding the integrin  $\alpha$ X subunit, *CD11C*) was increased in the SAT from overweight and obese individuals compared with lean subjects. The expression of this gene correlated with BMI in lean and overweight donors. Similarly, expression of *TNF* and *IFNG* tended to increase in overweight donors and, surprisingly, they correlate negatively with BMI in obesity. This trend was also observed in VAT. Overweight or obese donors did not modify their expression of *IL10* mRNA with respect to lean individuals in SAT, but in contrast we detected an augment of *IL10* transcripts in VAT that positively correlates with BMI. Finally, we observed that the expression of the M2 markers *CD163* and

*CD163L1* were enhanced in the obese SAT. Regarding to the role of leptin in the repolarization of macrophages, we found trends to increase the expression of pro-inflammatory cytokines including the chemokine *CCL2* and an evident reduction of protein and mRNA levels of IL-10 in both macrophages phenotypes. Leptin only promoted activation of Erk MAPK but did not change JNK nor p38 phosphorylation.

In summary, there were more significant differences in SAT than in VAT with respect to the numbers and phenotype of ATMs in relation to the degree of adiposity. In overweight subjects we detected the highest levels of pro-inflammatory markers, which could be related with the initiation of an anomalous expansion of the AT. Our data suggest that obesity is associated with abundance of ATMs only in SAT. These cells seemed to be derived, at least in part, from blood monocytes, presented an anti-inflammatory phenotype and they could be associated with tissue remodeling. In the other hand we suggested that leptin could promote the repolarization of homeostatic adipose tissue macrophages by the suppression of IL-10 and the promotion of proinflammatory cytokines expression.

# INTRODUCCIÓN

## 1. El tejido adiposo

El tejido adiposo es un tejido conectivo laxo especializado que está compuesto en su mayor parte por adipocitos. Las funciones que se le han atribuido a este tejido son: almacenamiento y generación de energía, aislante térmico y amortiguador mecánico en mamíferos. Se distribuye en todo el cuerpo humano, y su patrón de distribución es influenciado por la edad, el sexo, el genotipo, la dieta, el nivel de actividad física, hormonas y drogas. Este tejido está conformado por aproximadamente el 80% de grasa y el 20% restante por agua, proteínas y minerales. El tejido adiposo se ha dividido en dos tipos, el tejido adiposo blanco (WAT) y el tejido adiposo marrón (BAT). El WAT es responsable del soporte mecánico y el almacenamiento energético de cuerpo, mientras que el BAT está especializado en la termogénesis y la oxidación de lípidos (1, 2). Existen dos tipos de WAT, el visceral (ocupando el 10% del cuerpo) y el subcutáneo (que ocupa el 80%). El tejido adiposo visceral (VAT) tiene mayor actividad metabólica en comparación con el tejido subcutáneo y sus alteraciones están más asociadas con la disfunción endotelial, la esteatosis hepática, niveles incrementados de adiponectina, aterosclerosis y síndrome metabólico (3). El tejido adiposo es un órgano endócrino e inmunitario que puede secretar una variedad de adipocinas, así como factores pro-y anti-inflamatorios capaces de modificar la sensibilidad a la insulina en el propio tejido y de manera sistémica. Además, tiene funciones importantes en la defensa antimicrobiana, reparación tisular e inflamación (4).

Se ha demostrado que los adipocitos tienen propiedades inflamatorias; responden a estímulos derivados de agentes patógenos y a citocinas, y expresan un gran número de receptores. Los adipocitos son sensibles a los efectos del factor de necrosis tumoral (TNF) el cual, a través de sus receptores p55 y p75, activa el factor nuclear (NF)- $\kappa$ B y cinasas como ERK, JNK y PI3K. El receptor de lipopolisacárido tipo Toll (TLR4) se expresa en tejido adiposo y en adipocitos cultivados *in vitro*. Los adipocitos responden también a interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-11, interferón

(IFN)- $\gamma$  y componentes de la pared celular de hongos (5). Además de los adipocitos, el tejido adiposo está compuesto de varios tipos celulares en su fracción vascular estromal, como fibroblastos, pre-adipocitos, células inmunes y constituyentes vasculares. Este tejido es un órgano dinámico capaz de responder ante el exceso o escasez de nutrientes modificando sus características estructurales, morfológicas o de composición celular. La presentación de todos estos sucesos que cambian la morfología del tejido se conoce como “remodelación” del tejido adiposo y este término se refiere a cambios tanto en la composición celular de la fracción vascular estromal del tejido, a cambios en la matriz extracelular, a la modificación en el tamaño del adipocito, y a la generación de *novo* de adipocitos (hiperplasia y adipogénesis, respectivamente) (6). Uno de los principales eventos que modifican al tejido adiposo es el estado de inflamación inducido por el sobrepeso u obesidad, ya que durante este estado este tejido puede ser infiltrado por diferentes tipos de células inmunes como macrófagos, linfocitos B y T y neutrófilos. Además de la infiltración de células inmunes, el tejido adiposo obeso se caracteriza por la hipertrofia de los adipocitos debido al almacenamiento del exceso de energía en forma de grasa, incremento en la angiogénesis y sobreproducción de matriz extracelular, lo cual conduce a un aumento en la secreción de adipocinas pro-inflamatorias y al desarrollo de un estado crónico inflamatorio de bajo grado (7). Este estado de inflamación crónica de bajo grado deriva en la alteración de diferentes parámetros fisiológicos como la presión sanguínea, la sensibilidad a la insulina, y la concentración de triglicéridos y de adipocinas. El tejido adiposo inflamado en la obesidad está caracterizado por la producción incrementada de mediadores pro-inflamatorios como TNF, IL-6, IL-8, sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS), factor de crecimiento transformante (TGF)- $\beta$ 1, proteína C reactiva, molécula de adhesión intercelular (ICAM)-1 soluble, la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1, CCL2) y proteínas pro-coagulantes como el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI)-1, factor tisular y factor VII (7, 8). La condición de obesidad está fuertemente relacionada al desarrollo de resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo 2 (DM2). A pesar de que aún no se conocen los mecanismos por los cuales se desarrolla la resistencia a la insulina en la obesidad, se ha

determinado que la distribución del exceso de la grasa corporal es importante, siendo la inflamación del tejido adiposo blanco la que se ha relacionado a esta alteración. Además, algunos estudios muestran que la expansión del tejido adiposo visceral es la que se asocia de manera directa con la circunferencia de la cintura y con el desarrollo de la resistencia a la insulina y no la del tejido subcutáneo (8, 9).

### **1.1. Macrófagos del tejido adiposo e inflamación**

La población celular de leucocitos en el tejido adiposo está representada en mayor proporción por macrófagos, tanto en estado de obesidad como de no obesidad. Los macrófagos son una población celular heterogénea que ejerce diferentes funciones en la inflamación durante la respuesta inmune innata y adaptativa. Durante un proceso infeccioso las células mononucleares de sangre periférica derivadas de médula ósea se activan y migran al sitio de inflamación en un proceso llamado quimiotaxis y se diferencian a macrófagos en el tejido (10). Weisberg et. al. demostraron que aproximadamente del 10 al 15% de las células nucleadas en el tejido adiposo de ratones delgados corresponden a macrófagos (ATMs), y del 45 a 60% en ratones obesos (7). Actualmente se conoce que los ATMs se acumulan en el tejido adiposo obeso en ratones y humanos, y que es el principal tipo celular que contribuye a la inflamación y a la resistencia a la insulina en este tejido (11-13). Se ha encontrado una correlación positiva de la expresión *Cd68* (macrosialina, marcador pan-macrofágico), *Csfr1* (receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos -M-CSF-) y *Emr1* (*F4/80*) con la masa corporal y el tamaño del adipocito en el tejido adiposo de distintos modelos de ratones (7). En sujetos obesos se ha observado que el incremento de ATMs en el tejido visceral es más notable que en el tejido subcutáneo y que este incremento se correlaciona positivamente con el consumo de glucosa y con los niveles de insulina (14,15) Por otro lado, se ha demostrado que el número de macrófagos infiltrados al tejido adiposo subcutáneo disminuye ante la pérdida de peso, así como también los marcadores de macrófagos asociados a inflamación (16).

Diversos estudios han demostrado que el reclutamiento de macrófagos al tejido adiposo es dependiente de la vía CCL2/CCR2. CCL2 o MCP-1 es una proteína quimioatrayente de monocitos secretada principalmente por los macrófagos y células endoteliales. En la obesidad el mRNA de CCL2 se incrementa en el tejido adiposo así como también los niveles plasmáticos de la proteína. Kanda et. al demostraron en un modelo de ratón transgénico que sobre-expresa MCP-1 en el tejido adiposo y en un modelo de ratón deficiente de esta quimiocina que esta molécula contribuye al incremento en el número de ATMs, al desarrollo de resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa, así como también al desarrollo de esteatosis hepática ante el consumo de una dieta alta el grasas (HFD) (17). Por otro lado, se ha estudiado la implicación de CCR2 en la obesidad, observando que la deficiencia de este receptor disminuye la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo, incrementa los niveles de adiponectina, mejora la esteatosis hepática y la sensibilidad a la insulina (18). Recientemente, se demostró mediante el uso de ratones transgénicos que sobre-expresan el receptor gp130 soluble que la señalización trans de la IL-6 está implicada en la acumulación de ATMs en condiciones de obesidad (19).

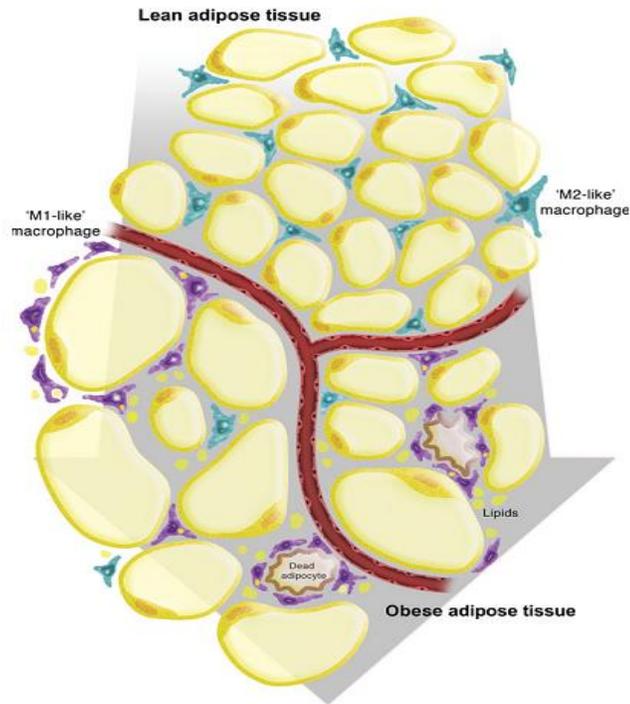
## **1.2. Fenotipo y funciones de los macrófagos del tejido adiposo: Activación clásica y alternativa**

Los macrófagos son una población celular muy heterogénea cuyo fenotipo y funciones dependen de distintos factores microambientales, es decir, son células con gran plasticidad que se activan por los diferentes estímulos a los cuales están expuestos. Se han descrito *in vitro* dos tipos de macrófagos de acuerdo con su estado de activación. Los macrófagos clásicamente activados o de tipo M1 que son generados en presencia de estímulos como lipopolisacárido bacteriano (LPS) e IFN- $\gamma$ , producen grandes cantidades de citocinas pro-inflamatorias como el TNF, IL-6 e IL-12 y especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS). Los macrófagos alternativamente activados o de tipo M2 se generan en presencia de citocinas como IL-4 e IL-13, poseen características anti-inflamatorias y producen grandes

cantidades de IL-10, del receptor señuelo de IL-1 (IL-1R2) y del antagonista del receptor de IL-1 (IL-1RA) (20).

Actualmente se ha postulado que existe un cambio de fenotipo de los ATMs de un estado de activación alternativa o M2 (que expresan en ratón *Ym1*, *Arg1* e *il10*) hacia un fenotipo pro-inflamatorio (incremento en la expresión de *Tnfa* y *Nos2*) durante el desarrollo de la obesidad inducida por una dieta alta en grasas. Se han descrito dos poblaciones de macrófagos del tejido adiposo con características fenotípicas y funcionales diferentes. Una población de estos macrófagos reside en el tejido y poseen características de una activación alternativa o de tipo M2 y se relacionan con la supresión de la respuesta inmune y con la remodelación de la matriz extracelular. Estas células son una población dominante en estados de delgadez. Los ATMs de ratones delgados expresan genes de tipo M2 como *Ym1* (*Ym1*/quitinasa 3 tipo 3), *Arg1* (arginasa 1), *il10* (IL-10), *Mrc2* (receptor de manosa C tipo 2) y *Mgl1/2* (lectina galactosa-N-acetil galactosamina 1 y 2 específicas de macrófagos) y co-expresan los marcadores de membrana F4/80 y CD11b. Por otro lado, en un estado de obesidad inducido por la dieta, hay otra población de macrófagos que incrementa su número en el tejido adiposo y que provienen del reclutamiento. Estos macrófagos expresan F4/80, CD11b y CD11c y co-expresan genes pro-inflamatorios como *il6* (IL-6), *Nos2* (iNOS) y *tnf* (TNF) (21). Por otro lado, se ha descrito que la distribución de los ATMs es distinta según su perfil inflamatorio. Los macrófagos de tipo M2 en el tejido de un sujeto delgado es dispersa, mientras que los macrófagos de tipo M1 en los obesos se encuentran rodeando a los adipocitos necróticos formando estructuras de tipo corona (Ver Fig.1 ) (22). Shaul et. al. han descrito una transición de distintos fenotipos de ATMs con el desarrollo de la obesidad basado en la expresión de MGL1. Los autores observaron un incremento en la población de macrófagos CD11c+ en ratones alimentados con una dieta alta en grasas con respecto a los ratones con una dieta normal y encontraron una expresión diferencial de MGL1 en estos macrófagos: MGL1-/CD11c+, MGL1med/CD11c+ y MGL1+/CD11c-. Los ATMs MGL1+/CD11c- fueron predominantes en el tejido adiposo de los ratones delgados, tenían características de una polarización M2, expresan IL-13, IL-10, STAT-6, CD206 y CD163 y niveles

reducidos de transcritos M1 como IL-12p40 e IL-1b, sin embargo, luego de 8 semanas de una dieta alta en grasas, esta población celular incrementa la expresión de los niveles de marcadores de tipo inflamatorio como CCR2, iNOS e IL-12p40 con una concomitante disminución de algunos genes M2 y la inducción de genes de función inmunosupresora como IL-10, IL-1Ra y STAT-6. Las subpoblaciones CD11c+ no presentaron un perfil inflamatorio estricto, es decir, conservaron la expresión incrementada de genes inflamatorios como IL-1b e IL-12p40, disminuyeron algunos genes antiinflamatorios como IL-10, IL-13, STAT-6, CD206 y CD163, pero aumentaron la expresión de Arg1 y genes relacionados con la remodelación tisular como MMP-12, ADAM-8 y VEGF. La población MGL1med/CD11c+ presentó una expresión intermedia de los genes de tipo M1 y M2. A las 12 semanas de una HFD estas tres poblaciones aumentaron en número, pero en proporción los macrófagos MGL1+/CD11c- disminuyeron, mientras que la población MGL1med/CD11c+ fue la más predominante y demostraron una mayor inducción de genes como MMP-2, CD163 y LYVE-1 que las otras subpoblaciones de ATMs. Esto sugiere que, con la progresión en la obesidad, las poblaciones de ATMs se vuelve heterogéneas y van adquiriendo un fenotipo mixto, favoreciéndose las poblaciones con capacidades de remodelación (23).



**Figura 1.** Distribución de los macrófagos en el tejido adiposo delgado y obeso. Tomado de (22).

En humanos también se ha reportado el fenómeno de este cambio fenotípico M2/M1 utilizando los marcadores CD40(M1), CD163 y CD206(M2) para la identificación de ambas subpoblaciones de macrófagos, encontrando un mayor número de macrófagos CD40+ en el tejido adiposo de sujetos obesos con respecto a los delgados, sin variación de la población CD163+ y CD206+ (24). Aunado a estos datos se encontró que tras la pérdida de peso se incrementaron los macrófagos que expresaban estas moléculas asociadas al fenotipo M2. Por el contrario, también existen reportes que postulan un cambio de fenotipo desde un perfil inflamatorio hacia un perfil antiinflamatorio con la obesidad que se podría estar relacionado con la remodelación del tejido (25). Se ha encontrado una subpoblación de macrófagos que co-expresa CD14 y CD206 cuya acumulación se asocia con el índice de masa corporal; esta población presenta un fenotipo de macrófagos residentes de tejido, tienen bajos niveles de expresión de IL-8 y COX-2 (ciclooxigenasa-1) y una

expresión incrementada de LYVE-1 (receptor endotelial de hialuronato de vasos linfáticos-1) que podría asociarse con su capacidad de remodelación y angiogénesis del tejido adiposo. (26). Otros autores han identificado la expresión de Colágeno VI en áreas de fibrosis (en el SAT) que correlaciona positivamente con el índice de masa corporal y de manera negativa con la sensibilidad a la insulina; estas zonas fibróticas son abundantes en macrófagos los cuales tienen una alta expresión de CD206 y escasa para CD86 y también expresan CD150, un marcador que identifica a macrófagos M2c, subtipo involucrado en la reparación tisular, producción de matriz extracelular y secretan altos niveles de TGF- $\beta$ . Estos autores también describieron que los ATMs del tejido adiposo de los individuos delgados presentan un fenotipo “mezclado” M1/M2 ya que encontraron que expresaban CD86 y CD206 (27).

Datos adicionales en la literatura apuntan a que los fenotipos de los macrófagos con la obesidad no cambian hacia un perfil “puro”. (28) Zeyda et. al. demostraron que los ATMs presentan un fenotipo “mezclado” M1/M2: expresan marcadores de superficie de tipo M2 como el receptor de manosa CD206, CD163, integrina  $\alpha v \beta 5$ , entre otros, y son capaces también de secretar citocinas pro- y anti-inflamatorias (29). También se ha reportado el incremento en poblaciones de macrófagos que expresan el marcador inflamatorio CD11c junto con CD206 en la obesidad, las cuales se encontraron agrupadas en estructuras de tipo corona rodeando a los adipocitos y cuya abundancia estaba asociada a la resistencia a la insulina, además su incremento se observó tanto en el tejido subcutáneo como en el visceral, siendo mayor en el subcutáneo. Estos macrófagos expresan altos niveles de integrinas, moléculas de presentación antigénica y secretan mayores niveles de citocinas inflamatorias como IL-1b, IL-6 y TNF en respuesta a LPS con respecto a la población residente (definida como CD11c-) además de producir IL-10 (28).

Otros estudios muestran el papel de los ATMs como células presentadoras de antígeno. Se ha observado un incremento en el número de células T CD4<sup>+</sup> en el tejido adiposo visceral de ratones sometidos a una dieta alta en grasas comparado con los controles, y que los ATMs son capaces de captar antígenos y presentarlos

en el contexto de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II e inducir la proliferación de células T CD4<sup>+</sup> tanto *in vivo* como *in vitro* (30).

## **2. Otras células inmunes que contribuyen a la inflamación en el tejido adiposo**

Además de los macrófagos, otras células del sistema inmune también pueden ejercer un papel pro-inflamatorio o anti-inflamatorio en el tejido adiposo. Dentro de las células que se han descrito que juegan un papel pro-inflamatorio en este tejido se encuentran los neutrófilos, las células T CD4<sup>+</sup> Th1, células T CD8<sup>+</sup>, células B y células dendríticas (DCs). Además, existen células con función anti-inflamatoria o asociadas con la inflamación de tipo II como son las células T reguladoras (Tregs), células T CD4<sup>+</sup> Th2 y los eosinófilos (31).

Los neutrófilos son células del sistema inmune innato capaces de secretar una gran variedad de enzimas anti-microbianas (lisozima, elastasa, mieloperoxidasa y defensinas) y de migrar a tejidos inflamados. También pueden madurar en sitios de inflamación local y producir grandes cantidades de citocinas y quimiocinas como TNF, IL-1 $\beta$ , IL-8 y MIP-1 $\alpha$ , lo cual repercute en el reclutamiento de otras células inmunes, principalmente macrófagos. En la obesidad inducida por una dieta alta en grasas (HFD) el número de neutrófilos se incrementa en el tejido adiposo, aunque en menor proporción que el número de macrófagos (32). Talukdar et al. (33) demostraron que la inhibición farmacológica o la delección genética de la elastasa de neutrófilos mejora la resistencia a la insulina y suprime la inflamación en el hígado y el tejido adiposo; además, esta inhibición estuvo asociada con la disminución del número de ATMs CD11c<sup>+</sup>.

Los eosinófilos están especializados en la respuesta antiparasitaria y tienen una función central en las respuestas de tipo Th2, que participan en la respuesta antiinflamatoria, en la polarización M2 de los macrófagos y en la diferenciación de linfocitos Th2. En el tejido adiposo el número de eosinófilos se reduce en la obesidad. Los ratones deficientes de este tipo celular muestran una actividad

incrementada de macrófagos de tipo M1, ganancia de peso y resistencia sistémica a la insulina (34).

Las DCs son células que juegan un papel importante en la transición de la respuesta inmune innata y adaptativa al presentar antígenos en el contexto de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad a las células T. El papel de las DCs en la obesidad aún no está bien estudiado (33, 34). Bartola et. al. encontraron un incremento de la subpoblación convencional de DCs CD11c<sup>high</sup>F4/80<sup>neg</sup> y otra subpoblación atípica CD11c<sup>high</sup>F4/80<sup>low</sup>CX3CR1<sup>+</sup> en el tejido adiposo de ratones con diabetes tipo 2 y resistencia a la insulina, ésta última subpoblación presentó la capacidad de inducir un perfil de tipo Th17 en el tejido adiposo de los ratones obesos. Por otro lado, en el tejido adiposo de ratones delgados presentaba una preponderancia de DCs CD11c<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> sugiriendo un papel en la inducción de células Tregs CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>. La delección de DCs en ratones deficientes de *flt3l* mejora la resistencia a la insulina inducida por la obesidad, presentando una disminución en el número de ATMs y macrófagos en el hígado (35, 36).

Otra de las poblaciones celulares importantes que intervienen durante el desarrollo de la inflamación en la obesidad y la resistencia a la insulina son los linfocitos. Los ratones deficientes de la enzima RAG-1 alimentados con una HFD presentan ganancia de peso y adiposidad y desarrollan resistencia a la insulina, lo cual sugiere la importancia de las células T y B en esta alteración inducida por la obesidad (37). El tejido visceral de ratones obesos presenta una proporción incrementada de células T CD4<sup>+</sup> Th1 productoras de INF- $\gamma$  respecto a células T Foxp3<sup>+</sup>. Además, las células de estos ratones obesos producen mayores niveles de INF- $\gamma$  que las células de ratones delgados cuando son estimulados *in vitro*. Se ha demostrado que esta citocina regula la expresión de genes como el TNF $\alpha$ , CD68, MCP-1, RANTES, IL-10 y STAT-1 en el tejido adiposo y su deficiencia limita la acumulación de células inmunes y mejora la sensibilidad a la insulina. Winer et al. demostraron que la reconstitución de células T CD4<sup>+</sup> en ratones deficientes de *Rag1* mejoran la resistencia a la insulina, por otro lado, la reconstitución con células T CD4<sup>+</sup> de ratones deficientes de Stat6 (tienen un desarrollo normal de células Th1, pero no

desarrollan células Th2) no mejoran la resistencia a la insulina. De acuerdo con estas observaciones las células Th1 podrían exacerbar la inflamación inducida por la obesidad y el desarrollo de la resistencia a la insulina (37-39). Las células T reguladoras (Tregs) están involucradas en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica y la homeostasis. Estas células se encuentran enriquecidas en el tejido adiposo de ratones delgados y su número disminuye en los modelos murinos de obesidad y en los pacientes obesos. Las células Tregs funcionan en el tejido adiposo delgado para mantener el estado anti-inflamatorio, esto lo hacen produciendo grandes cantidades de IL-10 y de esta manera promueven un estado de activación alternativo de los macrófagos (40). Lumeng et al., demostró que la IL-10 también puede actuar sobre la función de los adipocitos. Cuando los adipocitos son estimulados con IL-10, entonces Akt es fosforilado y la expresión de la quimiocina CCL2 disminuye, además el consumo de glucosa ante el estímulo con insulina se ve facilitado (21). La depleción de las células Tregs en un ratón transgénico que expresa Foxp3 acoplado a la toxina diftérica (Foxp3-DTR), la resistencia a la insulina se desarrolla de manera espontánea en los tejidos que responden a la insulina, incluyendo el tejido adiposo, esto aunado a una incrementada expresión de genes pro-inflamatorios. Por el contrario, la inducción de la expansión de estas células en ratones obesos mejora la resistencia a la insulina (40).

### **3. Adipocinas y su influencia sobre las células del sistema inmunitario**

El tejido adiposo blanco es un órgano que secreta varios factores derivados de los adipocitos que se denominan adipocinas. Las adipocinas son moléculas pleiotrópicas que incluyen la leptina, adiponectina, visfatina, apelina, vaspina, hepcidina, RBP4 y citocinas inflamatorias como TNF e IL-1 $\beta$ . Estas proteínas actúan de manera autócrina o endócrina regulando diferentes procesos fisiológicos, entre ellos la sensibilidad a la insulina, la respuesta inmune, la función cardiovascular, el apetito y la saciedad, la distribución del tejido adiposo y el gasto de energía, entre otros. En la obesidad algunos de estos factores son modificados y conducen al

desarrollo de la resistencia a la insulina y a la DM2. Las principales hormonas derivadas de los adipocitos son la adiponectina, la leptina, la resistina y la visfatina (41).

### 3.1. La leptina

La leptina es una hormona secretada por los adipocitos que tiene como función el control del apetito y del metabolismo. Fue descubierta en el ratón en 1994 por Jeffrey M. Friedman. La palabra leptina se deriva del griego *leptos*, que significa “delgado”. La estructura primaria de la proteína está compuesta de 167 aminoácidos. Se han identificado seis isoformas de la leptina que tienen diversas funciones biológicas, desde el control de la presión sanguínea hasta la regulación del sistema inmune. Los niveles de leptina que circulan en la sangre son directamente proporcionales a la masa del tejido adiposo blanco y al índice de masa corporal, que van desde 5 a 10 ng/ml en sujetos sanos hasta 40 a 100 ng/ml en individuos obesos. Además, los niveles de leptina se encuentran incrementados en la obesidad, en desórdenes metabólicos como la resistencia a la insulina o la DM2. Esta hormona señala a través del receptor de leptina (ObR), el cual tiene varias isoformas que son producto de *splicing* alternativo: ObRa, ObRb, ObRc, ObRd, ObRe y ObRf. Son miembros de la superfamilia del receptor de citocinas de la clase I y todas las isoformas comparten un dominio extracelular idéntico de unión a ligando, pero sólo ObRb tiene un dominio citoplásmico largo y la capacidad de señalizar a través de las cinasas Janus (Jak), STAT3 (Transductor de Señal y Activador de la Transcripción-3) y a través de la vía Akt/mTOR (Proteína Cinasa B/Blanco de Rapamicina en mamíferos). El receptor funcional de la leptina ObRb se expresa en el hipotálamo regulando la homeostasis energética y la función neuroendócrina, y en todos los tipos celulares del sistema inmune. (41, 42). En células mononucleares de sangre periférica el receptor se encuentra predominantemente expresado en monocitos (43).

Además de sus funciones en el metabolismo, la leptina está involucrada en la regulación de la respuesta inmune, es considerada como una adipocina pro-

inflamatoria ya que promueve las respuestas de linfocitos Th1 y también puede ejercer sus acciones en otros tipos de células del sistema inmune como monocitos, macrófagos, DCs, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y células asesinas naturales (NK) (3142). Participa en la activación de monocitos y macrófagos promoviendo la fagocitosis por la activación de la vía de la fosfolipasa A2 y la producción de ciclooxigenasas, leucotrienos, óxido nítrico, IL-18 (mediante la activación del inflamasoma/caspasa-1) y citocinas pro-inflamatorias como TNF e IL-1 $\beta$  (44-47). También estimula la proliferación de monocitos humanos circulantes *in vitro* y regula positivamente la expresión de marcadores de activación como CD25 (cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2), CD71 (receptor de transferrina), CD69 y CD38. Además, incrementa la expresión de otros marcadores de activación ya presentes en altos niveles sobre la superficie de monocitos no activados como HLA-DR, CD11b y CD11c (48). Algunos ensayos *in vitro* han mostrado que la leptina tiene funciones quimioatrayentes sobre los monocitos y macrófagos que es dependiente de la vía de JAK2/STAT3, las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y PI3K (fosfatidil-inositol 3-cinasa) (49).

Los macrófagos humanos generados *in vitro* en presencia de leptina, expresan altos niveles de marcadores característicos del fenotipo M2, como el receptor de manosa (MR) y CD209 y bajos de CD40, CD80 y CD86. Sin embargo, estos macrófagos tienen un perfil de secreción de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1b, MCP-1 y MIP-1a muy similar al de los macrófagos M1 en respuesta al LPS. Los autores sugieren que la leptina podría promover el fenotipo de activación de los macrófagos que infiltran el tejido adiposo (50). El tejido adiposo de ratones reconstituidos con médula ósea deficiente del receptor de leptina (WT/db) que son sometidos a una dieta alta en grasas presentan una menor expresión de genes proinflamatorios como Tnfa, Il6 y Ccl2, comparado con los ratones control; además, tienen menor abundancia de estructuras de tipo corona y la mayoría de los ATMs son MGL1+ CCR2- sugiriendo un fenotipo anti-inflamatorio. Estos hallazgos indican que la leptina podría tener un papel importante en el cambio de los ATMs hacia un fenotipo proinflamatorio en la obesidad (51).

En células polimorfonucleares de sujetos sanos la leptina estimula la producción de especies reactivas de oxígeno y la quimiotaxis. En las células NK interviene en todos los procesos del desarrollo celular, diferenciación, proliferación, activación y citotoxicidad. La leptina también puede inducir la linfopoyesis en ratón y proveer una señal de supervivencia para los timocitos dobles positivos  $CD4^+CD8^+$  y simples positivos  $CD4^+CD8^-$  (52). Además promueve la proliferación de células T humanas y la polarización hacia un fenotipo de tipo Th1 (53). El modelo de ratón db/db (deficientes del receptor de leptina) resulta en un fenotipo de obesidad y diabetes. Los ratones ob/ob (deficientes de leptina), db/db y aquellos que son tratados con un antagonista del receptor de leptina tienen una respuesta incrementada a los efectos letales del lipopolisacárido (LPS) bacteriano (54).

### **3.2. La resistina**

La resistina es una hormona que se descubrió en el 2001 en el ratón y fue llamada así por su característica de “resistir” a la acción de la insulina. Fue descrita inicialmente como una hormona específica de adipocitos y se conoce que tiene una importante relación con la resistencia a la insulina, la obesidad y la diabetes. Sin embargo en humanos se ha demostrado que esta hormona también puede ser producida por el epitelio intestinal, células de músculo esquelético, linfocitos y macrófagos. La resistina humana es un péptido rico en cisteínas con una secuencia madura constituida de 108 aminoácidos. Pertenece a la familia RELM/FIZZ que incluye tres proteínas secretoras adicionales ricas en cisteínas que comparten homología con la resistina. El gen humano está localizado en el cromosoma 19 y los segmentos maduros tienen un 55% de identidad con los del ratón. Sin embargo, poseen regiones del promotor divergentes, lo que sugiere diferentes mecanismos de regulación, distribución de tejido y funciones. La proteína madura puede formar oligómeros y circular en el suero humano en diferentes isoformas de bajo y alto peso molecular en el rango de 7 a 22 ng/ml (55).

Los niveles en suero de esta proteína tienen una correlación positiva con el índice de masa corporal y la masa grasa corporal, además de que sus valores incrementan

con la edad. La resistina antagoniza el efecto de la insulina y se encuentra incrementada en condiciones de obesidad inducida por la dieta así como también en modelos genéticos de obesidad y de resistencia a la insulina (56). En macrófagos se ha demostrado que la resistina promueve la captación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas (oxLDL) y la formación de células espumosas, lo cual es mediado aparentemente por la inducción de la expresión de SR-A y CD36, así como por la reducción de una proteína transportadora que regula el flujo de salida del colesterol (57). En células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y macrófagos se ha demostrado que la resistina induce la producción de citocinas pro-inflamatorias como IL-6, TNF, IL-12 e IL-1 $\beta$  mediante la activación de la vía de NF $\kappa$ B y la vía de las MAPK (58). Por otro lado, en humanos se ha demostrado que además de las citocinas pro-inflamatorias también se incrementa la expresión del mRNA de la resistina tras el estímulo con LPS (59). El modelo de ratón transgénico que expresa la resistina humanizada en macrófagos y que carece de la resistina murina presenta mayor resistencia a la insulina comparado con los controles. Estos ratones muestran un estado inflamatorio exacerbado en el WAT caracterizado por una expresión aumentada de genes pro-inflamatorios y mayor infiltración de macrófagos al tejido (60).

### **3.3. La adiponectina**

La adiponectina (Acrp30) es una proteína de 244 aminoácidos con homología al colágeno tipo VII y X y al factor C1q del complemento. Es secretada por los adipocitos y actúa como una hormona que sensibiliza a la acción de la insulina y posee funciones anti-inflamatorias. Se encuentra en la circulación sanguínea en altas concentraciones y en diferentes isoformas moleculares. Los niveles séricos de adiponectina disminuyen en sujetos obesos, en la resistencia a la insulina y en la DM2, mientras que sus niveles se incrementan ante la pérdida de peso o con el uso de medicamentos que mejoran la resistencia a la insulina como las tiazolidinedionas (61).

La forma monomérica de la adiponectina está presente en la circulación como adiponectina de larga longitud (fIAcrp), la cual forma un número de formas oligoméricas llamadas de bajo peso molecular (LMW), de peso molecular medio (MMW) y de alto peso molecular (HMW). Esta proteína puede ser escindida proteolíticamente a la forma globular de la adiponectina (gAcrp) que contiene la cabeza globular sin el dominio tipo colágeno. Esta característica facilita la formación de trímeros pero no de oligómeros HMW. Los niveles de oligómeros totales y la forma HMW de la adiponectina se correlacionan de manera inversa con el índice de masa corporal, la glucosa, la insulina, los triglicéridos, el grado de resistencia a la insulina y con la acumulación de masa visceral. La adiponectina total y en particular la forma HMW se encuentra en mayores niveles en el suero de las mujeres que en los hombres. Además, es la isoforma biológicamente más activa con respecto a la sensibilidad a la insulina. Por otro lado, la forma globular puede producirse en órganos blanco por ruptura proteolítica, pero no está claro si existe en la circulación (62). La forma monomérica de la adiponectina está compuesta de cuatro regiones: el péptido N-terminal, una región hipervariable corta, un dominio tipo colágeno y un dominio globular C-terminal tipo C1q. Tres monómeros (30 kDa) se asocian en el dominio globular para formar el trímero de adiponectina, a su vez, de cuatro a seis trímeros se asocian a través de sus dominios de colágeno para dar lugar a la estructura más grande. La adipocina humana está codificada por el gen *ADIPOQ* en el locus cromosomal 3q27, y contiene tres exones y dos intrones. Es la adipocina más abundante y sus concentraciones séricas se encuentran en el rango de 5 a 30 µg/ml. La adiponectina puede regular la función de los cardiomiocitos, células endoteliales, células endoteliales progenitoras, macrófagos, leucocitos y la vasculatura del músculo liso de manera endócrina y parácrina (63,65).

Se conocen dos receptores de adiponectina, AdipoR1 y AdipoR2, los cuales se expresan principalmente en músculo esquelético e hígado, respectivamente. Estos receptores tienen siete dominios transmembranales pero son diferentes a los receptores acoplados a proteínas G en estructura y función. El receptor AdipoR1 tiene gran afinidad por la forma globular de la adiponectina mientras que AdipoR2 reconoce mejor la forma larga. La adiponectina tiene funciones esenciales en

músculo esquelético e hígado. En el músculo esquelético las funciones de sensibilización a la insulina están mediadas por la vía de AMPK y por PPAR $\alpha$ . En el hígado activa el transporte de glucosa e inhibe la gluconeogénesis vía AMPK, activa la oxidación de los ácidos grasos y disminuye la inflamación mediante la vía de PPAR $\alpha$ . Además disminuye el contenido de triglicéridos en los tejidos al incrementar la expresión del transportador de ácidos grasos CD36 (64). Los receptores de adiponectina incrementan la actividad de la cinasa dependiente de AMP (AMPK) y del receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR)- $\alpha$ , lo que puede acelerar la oxidación de ácidos grasos y el consumo de glucosa (62, 63).

Diversos estudios *in vitro* muestran el papel de la adiponectina sobre diferentes tipos celulares y tejidos. En macrófagos cultivados suprime la expresión del receptor scavenger de clase A (SR-A), disminuye la activación de NF- $\kappa$ B y regula de manera positiva la producción de IL-10 (64,66). Los macrófagos peritoneales y las células de la fracción estromal vascular (SVF) del tejido adiposo de ratones deficientes de adiponectina muestran un incremento de marcadores de macrófagos asociados al fenotipo clásicamente activado (M1), con niveles incrementados de TNF, IL-6, CCL2 y una disminución en marcadores de tipo M2 como arginasa-1, MGL-1 (Lectina 1 tipo C tipo galactosa de macrófagos) e IL-10 (67). También la adiponectina inhibe la actividad fagocítica y la producción de IL-6, TNF, IL-1 e IL-8 en macrófagos e induce la producción de mediadores anti-inflamatorios como la IL-10 e IL-1RA en monocitos, DCs y macrófagos (68-72). Mandal et. al. demostraron que la forma globular y la forma de larga longitud de la adiponectina actúan por vías de señalización diferentes para disminuir la respuesta inflamatoria en los macrófagos. La fIAcrp promueve la polarización de las células de Kupffer hacia un fenotipo M2 en un mecanismo que es dependiente de la IL-4 y de la activación de STAT6. Sin embargo la gAcrp tiene un impacto más discreto sobre la expresión de los marcadores de tipo M2 actuando por un mecanismo dependiente de la IL-10, la enzima hemo-oxigenasa (HO)-1 y de STAT3 (73).

#### **4. Vías de señalización implicadas en la obesidad/resistencia a la insulina**

Como se ha mencionado anteriormente, la obesidad es un estado de inflamación crónica ocasionado por la presencia de niveles incrementados de ácidos grasos libres, la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo y la subsecuente producción de mediadores inflamatorios. En consecuencia también se activan diferentes vías de señalización implicadas en la inflamación y en la resistencia a la insulina.

##### **4.1. Activación de la cinasa N-terminal de c-Jun (JNK)**

El grupo de proteínas de señalización JNK perteneciente a la familia de las MAPK están codificadas por tres genes. JNK1 y JNK2 se expresan de manera ubicua mientras que JNK3 se expresa en un número limitado de tejidos como el cerebro y el corazón. JNK1 es la isoforma a la que se la ha atribuido el papel central en la obesidad y la resistencia a la insulina. JNK1 se activa por las cinasas de MAPK MKK4 y MKK7. En respuesta a nutrientes o señales inflamatorias, JNK e IKK, son activadas y pueden fosforilar a IRS-1 en la Ser307 (equivalente a la Ser312 en humanos); este sitio de fosforilación evita la interacción del dominio de unión a fosfotirosina (PTB) del IRS-1 con el receptor de insulina fosforilado en tirosina, lo cual inhibe la cascada de señalización del receptor e induce la resistencia a la insulina (74-76). Algunas otras cinasas que pueden fosforilar a IRS-1 son S6K (proteína ribosomal S6), proteína cinasa C (PKC), ERK, mTOR. Estas cinasas a su vez pueden activar diferentes factores de transcripción como la proteína activante (AP)-1, NK- $\kappa$ B y factores regulados por IFN (IRF), todos ellos involucrados en la expresión de factores relacionados con la inflamación (47).

El estudio hecho en ratones deficientes de JNK demuestra que esta cinasa tiene un papel crucial en la obesidad y en el establecimiento de la resistencia a la insulina. Los ratones deficientes de JNK1 pero no de JNK2 muestran una menor tendencia a aumentar de peso y no desarrollan resistencia a la insulina ante el consumo de una HFD (77). Por otro lado, la deficiencia de JNK en macrófagos no impide el desarrollo de la obesidad pero ejerce protección contra la hiperglicemia, hiperinsulinemia y la intolerancia a la glucosa e insulina ante el consumo de una

HFD. Además, esta cinasa promueve la polarización M1 de los macrófagos y la acumulación de los mismos en el tejido adiposo (78). La alimentación con una HFD en ratones causa la activación de JNK1 en tejidos sensibles a la insulina como el tejido adiposo, el músculo y el hígado. Sin embargo aún no se conoce bien el mecanismo por el cual se activa esta vía. Se han reportado cuatro mecanismos por los cuales JNK1 se activa en la obesidad. El primero postula que la exposición de las células a ácidos grasos saturados *in vitro* causa estrés del retículo endoplásmico y la inducción de la vía de la respuesta a proteínas no plegadas (UPR), lo que lleva a la activación de JNK1. El segundo mecanismo es que los ácidos grasos saturados pueden actuar como ligandos de TLRs que activan la vía de JNK. El tercero involucra la activación de la proteína cinasa de linaje mezclado (MLK) mediada por la PKC y la subsecuente activación de JNK mediada por la proteína “scaffold” JIP1. En el cuarto mecanismo se propone que en la resistencia a la insulina inducida por HFD la expresión de citocinas pro-inflamatorias promueve la activación de JNK (79).

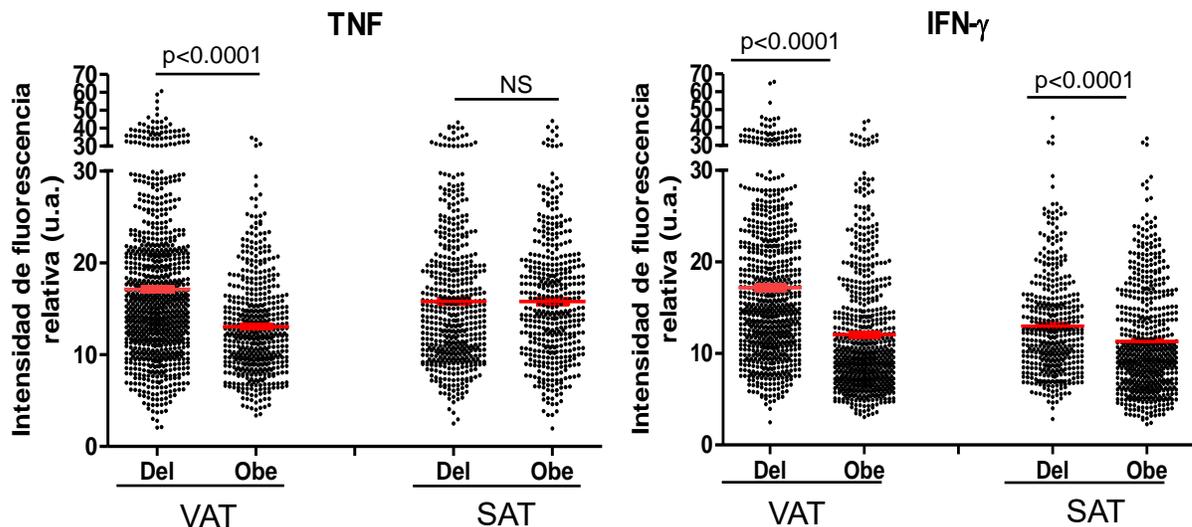
#### **4.2. Activación del receptor tipo Toll-4**

Los TLRs son receptores de reconocimiento de patrones que tienen como función el reconocimiento de patógenos y la activación de la respuesta inmune innata. Existen más de diez miembros en la familia de los TLRs. Los TLRs, en especial el 2 y el 4, pueden reconocer diversos ligandos endógenos como los ácidos grasos saturados, las LDL modificadas, proteínas de choque térmico, el HMGB-1 (caja del grupo de alta movilidad-1) y productos de degradación de matriz extracelular. El TLR4 media la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B tras la unión con su ligando (el mejor conocido es el LPS), lo que promueve la expresión de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias como IL-6, TNF, CCL2, IL-1 $\beta$ , entre otras (80). Adicionalmente, la activación del TLR4 por los ácidos grasos saturados conlleva a la regulación positiva de la vía de biosíntesis de ceramidas. Las ceramidas disminuyen la sensibilidad a la insulina y el transporte de glucosa mediante la defosforilación de la PKB/Akt por la proteína fosfatasa 2A (81,82).

En condiciones basales, NF- $\kappa$ B se encuentra secuestrado en el citoplasma mediante la unión con I $\kappa$ B $\alpha$ . La cinasa  $\beta$  de I $\kappa$ B (IKK $\beta$ ) fosforila I $\kappa$ B $\alpha$  y promueve su degradación por la vía del proteasoma. Esto permite la exposición de la secuencia de localización nuclear de NF- $\kappa$ B y su translocación al núcleo donde induce la transcripción de genes involucrados en la respuesta inflamatoria. Además del LPS, se ha reportado que estímulos como los ácidos grasos libres, (ej: ácido palmítico) causan la activación de IKK y la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  a través de la activación del TLR4 en diferentes tipos celulares, incluidos los adipocitos y los macrófagos (83). Se ha demostrado que una HFD induce la expresión de genes pro-inflamatorios que dependen de la actividad de IKK $\beta$ . La delección específica en hígado de IKK $\beta$  mejora la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina en el propio tejido, y disminuye la respuesta inflamatoria ante una HFD. De forma similar, la delección de esta cinasa en el linaje mieloide mejora la sensibilidad a la insulina a nivel sistémico (84). Por otro lado, la delección de TLR4 a nivel sistémico genera protección contra la resistencia a la insulina inducida por la dieta (83). Adicionalmente, una mutación en el dominio citoplasmático del receptor TLR4 disminuye los niveles de expresión de algunos marcadores de inflamación, como la infiltración de los monocitos en el tejido adiposo y la producción de citocinas como TNF y CCL2 en respuesta a una HFD (85) En humanos también existen reportes acerca de la activación de los TLRs en la obesidad. Creely et al. encontraron un incremento en la expresión y actividad de TLR2 en el tejido adiposo subcutáneo de sujetos obesos comparado con los controles delgados (86). Sin embargo, el papel de los TLRs en el contexto de la obesidad en humanos aún no está bien entendido.

## 5. Antecedentes directos

En nuestro laboratorio se ha evaluado la expresión de diversas moléculas y citocinas asociadas a la polarización de tipo M1 y M2 de macrófagos generados *in vitro* y recientemente de los macrófagos del tejido adiposo. La caracterización del estado de activación de los macrófagos del tejido adiposo se comenzó con la utilización de tinciones inmunohistoquímicas evaluadas mediante microscopía confocal multicolor. En estos experimentos se ha determinado la expresión de citocinas y marcadores de membrana asociados al fenotipo proinflamatorio y antiinflamatorio de los macrófagos. La evaluación de la expresión de citocinas proinflamatorias como TNF e IFN- $\gamma$  en el tejido adiposo visceral y subcutáneo de individuos delgados, con sobrepeso y obesos, nos sugieren un cambio hacia un fenotipo antiinflamatorio en la obesidad como ha sido reportado por algunos autores, ya que encontramos una disminución de la expresión de ambas citocinas en el VAT de los sujetos obesos y una disminución solo de IFN- $\gamma$  en el SAT (Figura 2).



**Figura 2.** Expresión de citocinas proinflamatorias en el tejido adiposo de sujetos delgados y obesos. Se evaluó la expresión de TNF e IFN- $\gamma$  en el tejido adiposo visceral (VAT) y subcutáneo (SAT) por microscopía confocal en 5 donantes por grupo de adiposidad.

## **JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En el siglo XXI, la obesidad es sin duda un grave problema de salud pública, ya que no sólo se asocia alteraciones como la resistencia a la insulina y la diabetes, sino que también conlleva al desarrollo de enfermedades de mortalidad como las enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer. Actualmente este problema de salud influenciada por los hábitos alimenticios y la falta de actividad física, no sólo afecta a la población adulta, sino también a la población infantil. La inflamación crónica dada en la obesidad está mediada por diversos factores moleculares y celulares que puede conducir a alteraciones de tipo metabólico. En la obesidad el microambiente del AT es muy complejo, presentando zonas de hipoxia, hipertrofia y muerte celular. Además, se producen alteraciones en la síntesis de adipocinas, citocinas, quimiocinas, y metabolitos como los ácidos grasos o la glucosa. La obesidad está asociada a un estado de inflamación crónica de bajo grado. Los ATM de tipo M1 se han postulado como células clave de estos procesos inflamatorios y de la generación de la resistencia a la insulina. Sin embargo, algunos estudios indican que los ATM de tipo M2 predominan durante la obesidad y favorecen los procesos de expansión del AT. Por lo tanto, los fenotipos patológicos de los ATM aún no están completamente definidos. En este estudio pretendemos esclarecer los perfiles fenotípicos y funcionales de los ATM en diferentes depósitos grasos de individuos con distinto IMC, así como algunos de los factores del microambiente del AT que pueden modular sus distintos estados de activación.

## **HIPÓTESIS**

1. El microambiente del tejido adiposo de individuos obesos favorece el desarrollo de ATMs con fenotipo M2 asociados a la remodelación del tejido.
2. La leptina, una adipocina cuya expresión se incrementa con la obesidad, promueve una re-polarización inflamatoria en los macrófagos de tipo homeostático.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la contribución de factores asociados a la función del tejido adiposo de individuos con distinto IMC al perfil inflamatorio de los macrófagos *in vivo* e *in vitro*.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Evaluar la expresión de genes relacionados a la función de los macrófagos en el tejido adiposo visceral y subcutáneo de individuos con diferente grado de adiposidad.
2. Determinar la capacidad de la leptina como factor de repolarización en macrófagos de tipo M2 generados *in vitro* a partir de monocitos:
  - a) Analizar la expresión de citocinas y marcadores asociados al fenotipo pro- y anti-inflamatorio de los macrófagos.
  - b) Evaluar la activación de vías de señalización relacionadas con la inflamación.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. Aislamiento de monocitos**

Los concentrados leucocitarios fueron obtenidos 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 células mononucleares (PBMC) de la interfase entre el Ficoll y el plasma. La población de monocitos CD14<sup>+</sup> fue purificada a partir de 400 x 10<sup>6</sup> de PBMC por selección positiva mediante MACS (*Magnetic Cell Sorting*) utilizando un anticuerpo (Ab) anti-CD14 conjugado con microesferas magnéticas (Miltenyi Biotec).

### **2. Generación de macrófagos M1 y M2**

Los monocitos CD14<sup>+</sup> se cultivaron a una densidad de 0.7 x 10<sup>6</sup> células/ml en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), L-glutamina 2 mM y antibióticos 1%. El medio fue suplementado con GM-CSF (1000 U/ml, ProBiomed) o con M-CSF (10 ng/ml, Calbiochem) para inducir la diferenciación de los monocitos hacia macrófagos de tipo M1 y M2 respectivamente. Las citocinas se adicionaron al tiempo 0, día 2 y día 4. Una vez alcanzado el sexto día, los macrófagos fueron estimulados o no con 50ng/ml de leptina durante 1, 2, 4 y 8 horas para obtener el RNA y medir la expresión de citocinas. Para evaluar la activación de proteínas de señalización, los macrófagos se estimularon con la misma concentración de leptina durante 15, 30 minutos y 1 hora y fueron lisados con SDS al 5%.

### **3. Ensayos de Western blot**

Los lisados totales de los macrófagos fueron sonicados 5 veces con pulsos de 10 segundos a 40 Amp. Las muestras se centrifugaron durante 20 min a 14,000 rpm para recuperar los lisados de proteínas totales. Los lisados fueron resuspendidos

en buffer de carga y resueltos en geles de SDS-PAGE al 12% bajo condiciones reductoras. A continuación, las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF. Las membranas se bloquearon con TBS-T (Tris 0.2 M, NaCl 1.37 M, 0.1% Tween 20) y BSA 5%, lavadas con TBS-T y se incubaron con los Ab primarios anti-fosfo-AMPK, -fosfo-JNK, -fosfo-p38 y -fosfo-Erk1/2 (Cell Signaling) diluidos en TBS-T con BSA 5% durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, las membranas se lavaron con TBS-T y fueron incubadas con los correspondientes Ab secundarios conjugados a peroxidasa (Dako). En seguida, las membranas fueron incubadas con anticuerpos primarios anti-AMPK, -JNK, -p38, -Erk1/2 (Cell Signaling), o -gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, Santa Cruz Biotech.) y con sus correspondientes Ab secundarios conjugados a peroxidasa. Las reacciones fueron reveladas mediante el sistema de quimioluminiscencia Immun-Star™ (BioRad Laboratories).

#### **4. Obtención y selección de muestras de tejido adiposo**

Las muestras de tejido adiposo se obtuvieron de pacientes delgados, con sobrepeso y obesos que fueron sometidos a apendicectomía o colecistectomía por laparoscopia en el Hospital General de Ticomán (Protocolo no. 208/010/15/18) y el Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos (No. 111.2018). Se obtuvieron muestras de tejido adiposo subcutáneo y visceral (particularmente el omentum). Los pacientes analizados en este estudio fueron seleccionados usando los siguientes criterios: 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. Los individuos mayores de 18 años de ambos sexos, metabólicamente inestables (circunferencia de cintura mayor al punto de corte y presencia de uno o varios factores asociados al síndrome metabólico) y que cursaran con tratamiento para hipertensión, hiperglicemia o dislipidemia o tuvieran diagnóstico de enfermedades crónico-degenerativas o enfermedades endócrinas fueron descartados del estudio.

En la Tabla 1 se resumen las características de los sujetos evaluados en este estudio a partir de los cuales se obtuvieron las muestras de tejido adiposo.

**Tabla 1. Características de los donadores de tejido adiposo subcutáneo y visceral analizados en este estudio.**

Grupo	n	Sexo		Edad <sup>a)</sup>	IMC <sup>b)</sup>	Glucosa	Colesterol	Triglicéridos
		Mujer:	Hombre	(media ± SD)	(media ± SD) <sup>b)</sup>	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)
<b>Delgado</b>	18	1:1		40.72±13.9	22.9±1.1	99±10.29	169.73±37.3	132.4±65.5
<b>Sobrepeso</b>	19	0.9:1		35±10.4	27.8±1.07	100.94±17.7	192.89±3	154±72
<b>Obeso (I-III)</b>	19	1:1.1		39.26±9	36.27±4	105.57±25.5	175.57±33.3	130.41±58.8

<sup>a)</sup>Años.

<sup>b)</sup>IMC: índice de masa corporal (kg/m<sup>2</sup>). Delgado: 18.5-24.9. Sobrepeso: 25-29.9. Obeso (tipos I-III): 30-49.9.

El tejido fue procesado de diferentes formas. Una parte fue incluida en la resina O.C.T. para realizar cortes de congelación en criostato y otra parte fue congelada directamente en nitrógeno líquido para la obtención de RNA.

## 5. Obtención de RNA

Las muestras de tejido adiposo previamente congeladas fueron pesadas entre 100-200 mg para ser trituradas en mortero de porcelana; el tejido triturado fue colocado en un tubo conteniendo 1 ml de trizol (Invitrogen). En el caso de los macrófagos generados *in vitro*, las células se lavaron una vez sobre la placa y se añadió el reactivo. El tejido adiposo triturado se agitó en vórtex varias veces y se centrifugó a 4°C a 14 000 rpm durante 20 min para eliminar los restos de tejido no

homogeneizados y se retiró el trizol cuidadosamente dejando la capa grasa. Posteriormente se procedió con la técnica de separación descrita por el fabricante.

## 6. Expresión de citocinas y de marcadores de ATMs mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real

El RNA total del tejido adiposo (de los ATMs cuando sea posible) o de los macrófagos cultivados *in vitro* fue aislado mediante el método de Trizol® (Ambion). Una vez obtenido el RNA, el cDNA se obtuvo mediante el Kit *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis* (Thermo Scientific). A continuación se procedió a evaluar la expresión de *CD68*, *CD163*, *ITGAM* (CD11b), *ITGAX* (CD11c), *CD163L1*, *CLEC5A*, *CCR2*, *CCL2*, *TNF*, *IL4*, *IL10*, *IFNG* y como controles *TBP* (*Tata Binding Protein*) y *ACTB* ( $\beta$ -actina), mediante PCR cuantitativa (qPCR) utilizando las sondas y oligonucleótidos prediseñados de Applied Biosystems (*TaqMan® Gene Expression Assays*), en el sistema 7500 de Applied Biosystems, bajo las siguientes condiciones:

Componentes de reacción	$\mu\text{L}$ para Rx. Vol total de 20 $\mu\text{L}$
20X TaqMan® Gene Expression Assay	0.5
2X TaqMan® Gene Expression Master Mix	10
cDNA template (1 to 100 ng)	9.5 $\mu\text{L}$ (25 ng)

	Incubación UNG	Activación AmpliTaq Gold	PCR	
			40 ciclos	
			Desnaturalización	Alineamiento/Extensión
Temperatura	50 °C	95 °C	95 °C	60 °C
Tiempo	2 min	10 min	15 seg	1 min
Volumen	20 $\mu\text{L}$			

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

## 7. Análisis estadístico

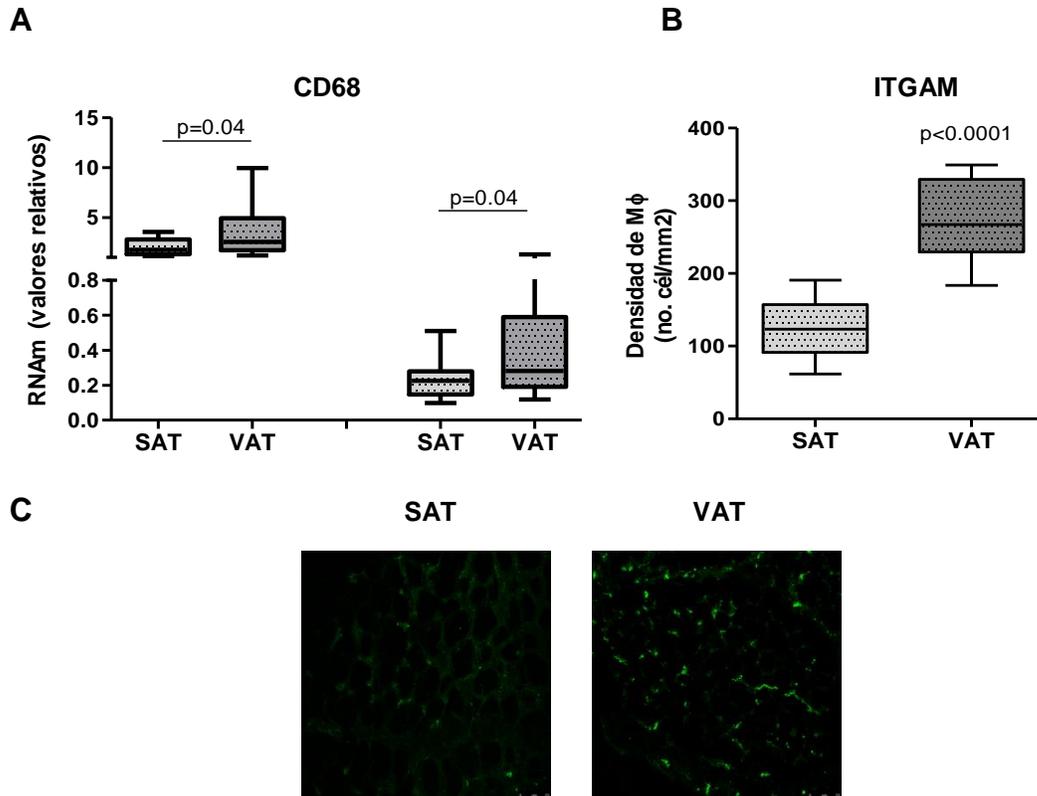
El análisis estadístico para los ensayos *in vitro* se realizó utilizando los paquetes Excel y GraphPad Prism versión 5. Se utilizó el test paramétrico *t* de Student y los grupos de valores se expresaron como la media  $\pm$  SD. Un valor de  $p < 0.05$  se considerará estadísticamente significativo.

## RESULTADOS

### **1. El tejido adiposo visceral tiene una mayor densidad de macrófagos que el tejido subcutáneo en condiciones de homeostasis.**

En la literatura se ha reportado que la acumulación de los macrófagos en el tejido adiposo es un fenómeno determinante en la inflamación y en el desarrollo de la resistencia a la insulina. Diversos estudios en humanos y modelos murinos de obesidad han reportado que el incremento en el número de macrófagos se observa tanto en tejido adiposo subcutáneo como en el visceral. En este último se ha observado que hay un mayor porcentaje de macrófagos en condiciones homeostáticas y que durante la obesidad el incremento en el número de macrófagos es más evidente que en el SAT. Por otro lado, se conoce que ambos depósitos grasos tienen perfiles de secreción diferentes, distintas tasas de lipólisis y adipogénesis por lo que resulta interesante evaluar cómo estas condiciones y el perfil de expresión de algunas citocinas podrían repercutir en el perfil de activación de los macrófagos en cada tejido graso en condiciones de homeostasis energética, además de que son pocos los estudios comparativos entre los dos tipos de tejido. En primer lugar, se analizó la expresión relativa de diversos genes relacionados con la función de los macrófagos mediante la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real. Todos los datos a nivel de RNA fueron comparados con los resultados previamente obtenidos de tinciones inmunohistoquímicas evaluadas mediante microscopía confocal multicolor de 5 donantes por condición para corroborar los hallazgos. En primer lugar, se evaluaron las diferencias en cuanto a la densidad de los macrófagos presentes en el SAT y en el VAT en condiciones homeostáticas (delgados). Datos previos en la literatura indican que existe una mayor abundancia de células inmunes en el tejido adiposo visceral. Para evaluar esta cuestión, se midió la expresión de marcadores pan-macrofágicos, CD68 e ITGAM (que codifica para la integrina CD11b). Los resultados obtenidos sugieren una mayor número de macrófagos en el VAT tal como se había reportado, ya que ambos marcadores se encontraron incrementados en este tejido con respecto al SAT (Fig. 3A). Este

hallazgo fue apoyado por los datos obtenidos de la microscopía confocal en donde se observó una mayor densidad de células CD68+ en el VAT (Fig. 3B).

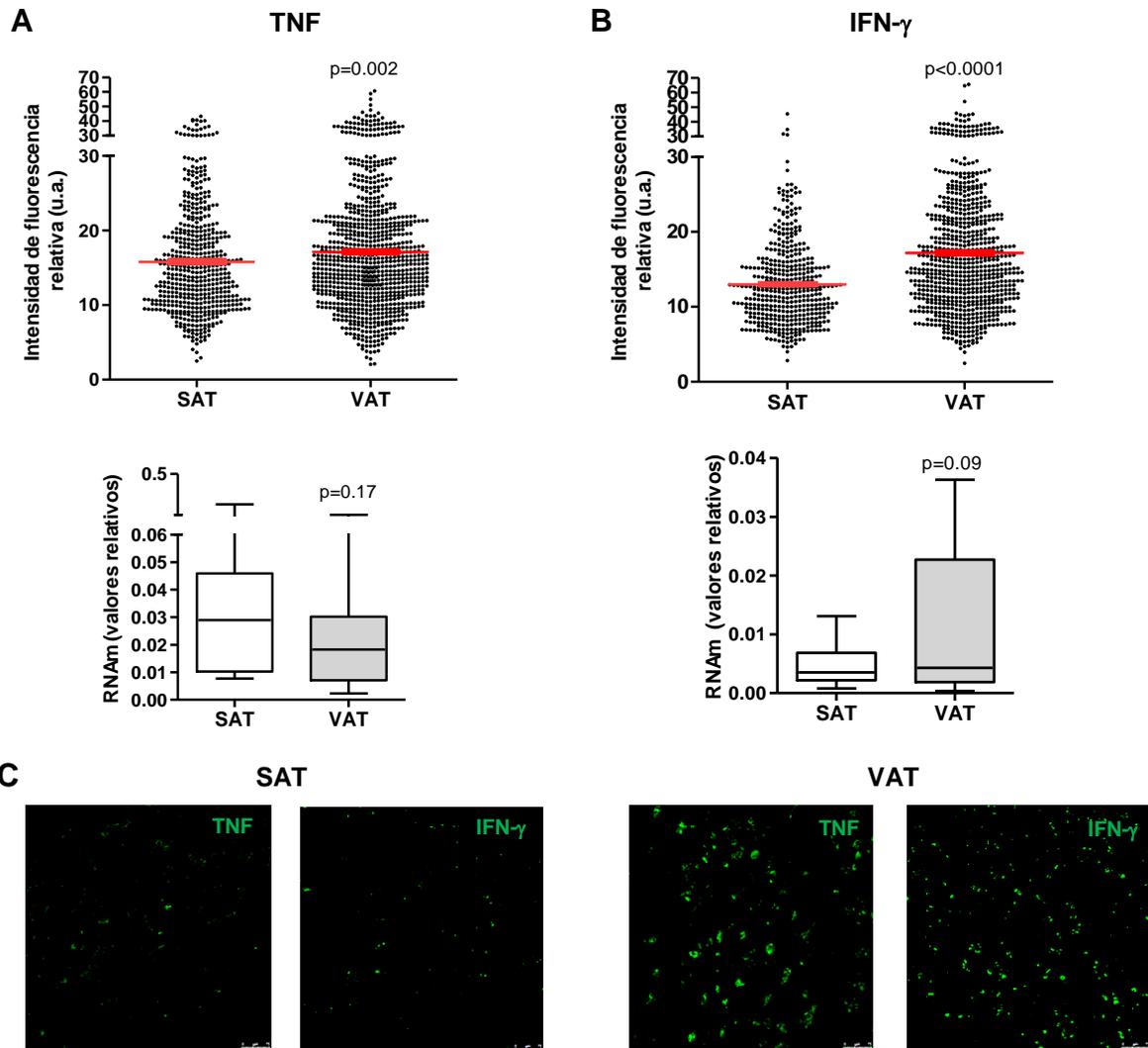


**Figura 3. El tejido adiposo visceral tiene mayor densidad de macrófagos en condiciones de homeostasis.** A) Se muestra los niveles de la expresión relativa del RNAm de *CD68* e *ITGAM* en el tejido adiposo de individuos delgados (n=18) en SAT y VAT. B) Datos obtenidos de microscopía confocal de 5 donantes por grupo de adiposidad: se muestra el número de células CD68+ por área determinada. C) Imagen representativa de la microscopía de la expresión de CD68. Prueba estadística: t de student no pareada.  $p=0.04$ (\*),  $p<0.0001$ (\*\*\*).

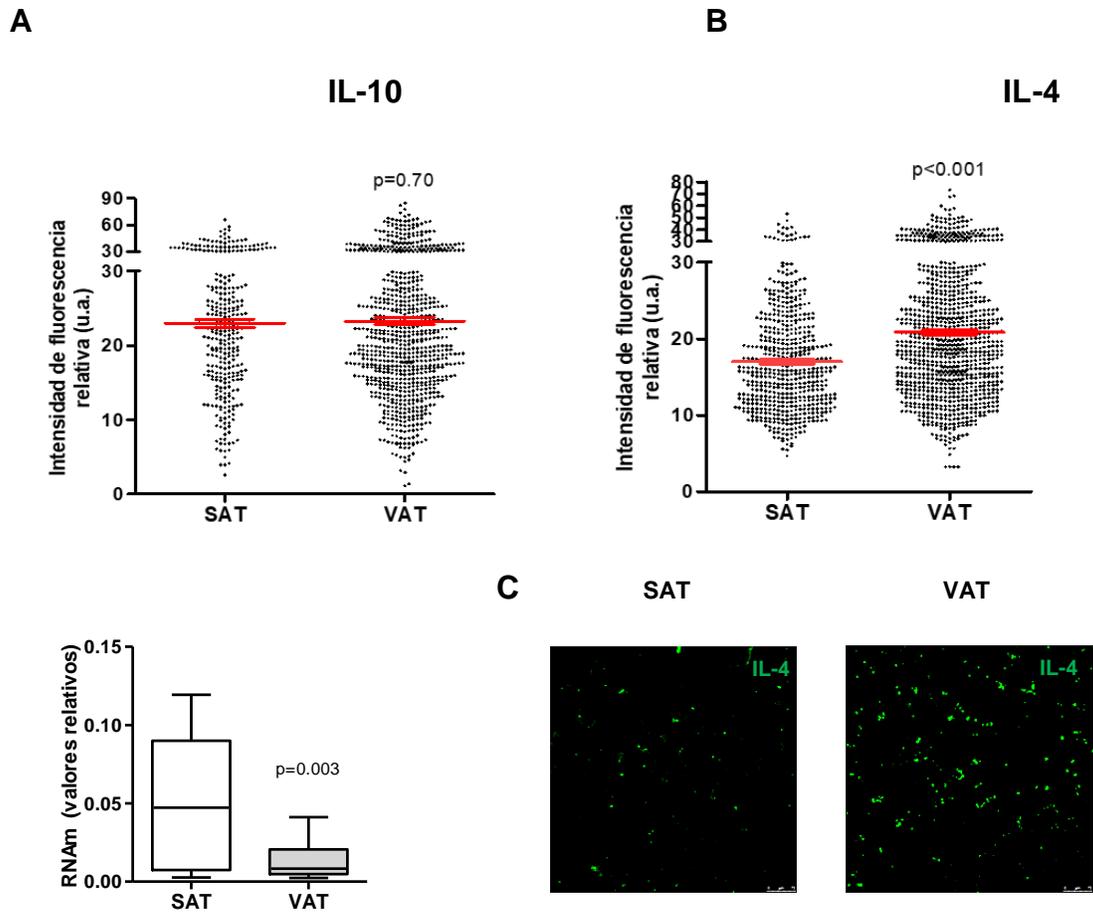
## 2. En individuos delgados predomina un microambiente inflamatorio en el VAT con respecto al SAT.

Para continuar con la evaluación del fenotipo de los macrófagos y las características del microambiente en condiciones de homeostasis, se comparó la expresión de genes asociados a la activación clásica y alternativa de los macrófagos. Los marcadores asociados al perfil de macrófagos proinflamatorios evaluados fueron la citocina típicamente expresada por esta población, TNF y la citocina de polarización

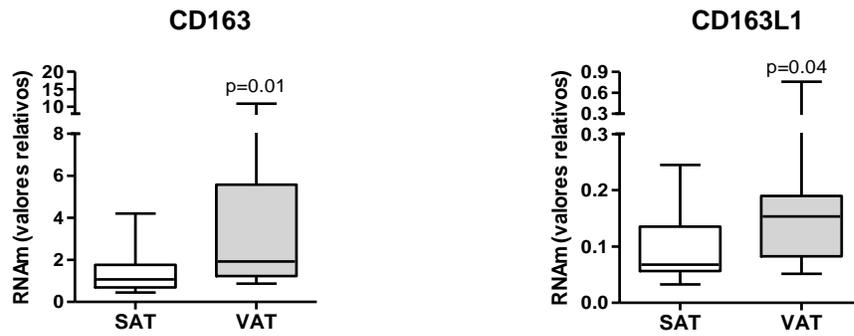
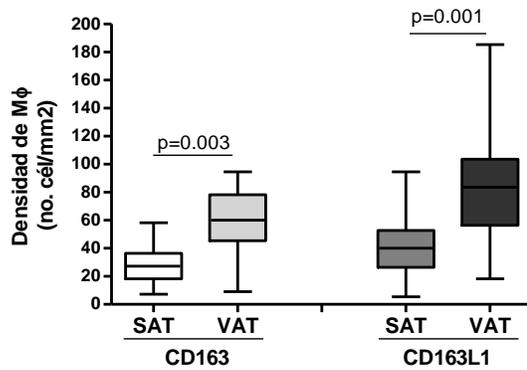
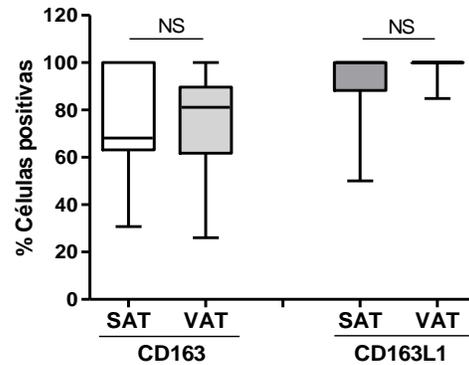
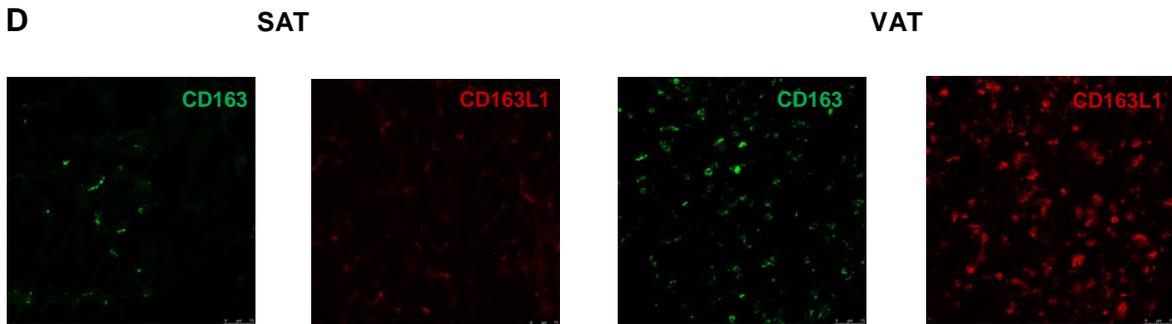
M1, IFN- $\gamma$ . Ambas citocinas tuvieron una mayor expresión a nivel de proteína en el VAT (Fig. 4A y B panel superior), aunque no hubo diferencias significativas con respecto a los niveles de expresión del RNA mensajero (Fig. 4A y B panel inferior). Con respecto a los marcadores asociados al fenotipo M2, la citocina prototipo IL-10, tuvo una expresión similar en ambos tipos de tejido a nivel de proteína y los niveles de RNAm mostraron ser mayores en el tejido adiposo subcutáneo (Fig. 5A). La citocina de tipo Th2, IL-4, tuvo una mayor expresión de la proteína en el tejido adiposo visceral, mientras que los niveles del RNA fueron prácticamente indetectables (Fig. 5B). Por otro lado, se evaluó la expresión de algunos marcadores de membrana relacionados al fenotipo antiinflamatorio, CD163 y CD163L1 (miembros de la familia de receptores “scavenger”); éste último descrito en otro trabajo de nuestro grupo en células productoras de IL-10 presentes en tejidos sanos de hígado y colon. Estos dos marcadores se encontraron aumentados en el tejido adiposo visceral con respecto al subcutáneo a nivel de RNAm (Fig. 6A). En relación con esto, el tejido adiposo visceral también presentó mayor densidad de células positivas para estas proteínas (Fig. 6B), sin embargo, no hubo diferencias al analizar el porcentaje de células positivas para ambos marcadores del total de macrófagos (células CD68+) presentes en cada tejido (Fig. 6C).



**Figura 4. En el VAT de individuos delgados existe una mayor expresión de citocinas proinflamatorias que en el SAT.** En el panel superior se muestran los datos obtenidos mediante microscopía confocal de la expresión en células nucleadas de las citocinas TNF (A) e IFN-g (B). Los resultados muestran la media  $\pm$  SD de 5 donantes por condición. Las gráficas del panel inferior muestran la expresión relativa del RNAm de las mismas citocinas del tejido adiposo de 18 donantes con IMC=22.9 $\pm$ 1.1. (C) Imagen representativa de la microscopía de la expresión de TNF e IFN- $\gamma$ . Prueba estadística: t de student no pareada. Prueba estadística: t de student no pareada <sup>NS</sup> $p>0.05$ , \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.005$ , \*\*\* $p<0.0005$ .



**Figura 5. Expresión de citocinas anti-inflamatorias en el VAT y SAT de individuos delgados.** En el panel superior se muestran los datos obtenidos mediante microscopía confocal de la expresión en células nucleadas de las citocinas IL-10(A) e IL-4 (B). Los resultados muestran la media  $\pm$  SD de 5 donantes por condición. La gráfica del panel inferior muestra la expresión relativa del RNAm de *IL10* del tejido adiposo de 18 donantes con  $IMC=22.9\pm 1.1$ . Los niveles del RNAm de *IL4* fueron indetectables. (C) Imagen representativa de la expresión de IL-4 visto por microscopía. Prueba estadística: t de student no pareada. <sup>NS</sup> $p>0.05$ , \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.005$ , \*\*\* $p<0.0005$ .

**A****B****C****D**

**Figura 6. El porcentaje de células que expresan marcadores de superficie de tipo M2 es similar entre los dos tipos de tejido graso.** Las gráficas del panel superior (A) representan la expresión relativa de *CD163* y *CD163L1* en el VAT y SAT de individuos delgados. (B) Densidad de células CD68+ que coexpresan *CD163* y *CD163L1*. (C) Porcentaje de células *CD163*+ y *CD163L1*+ del total de macrófagos CD68+. (D) Expresión de *CD163* y *CD163L1* en imágenes representativas de microscopía confocal.

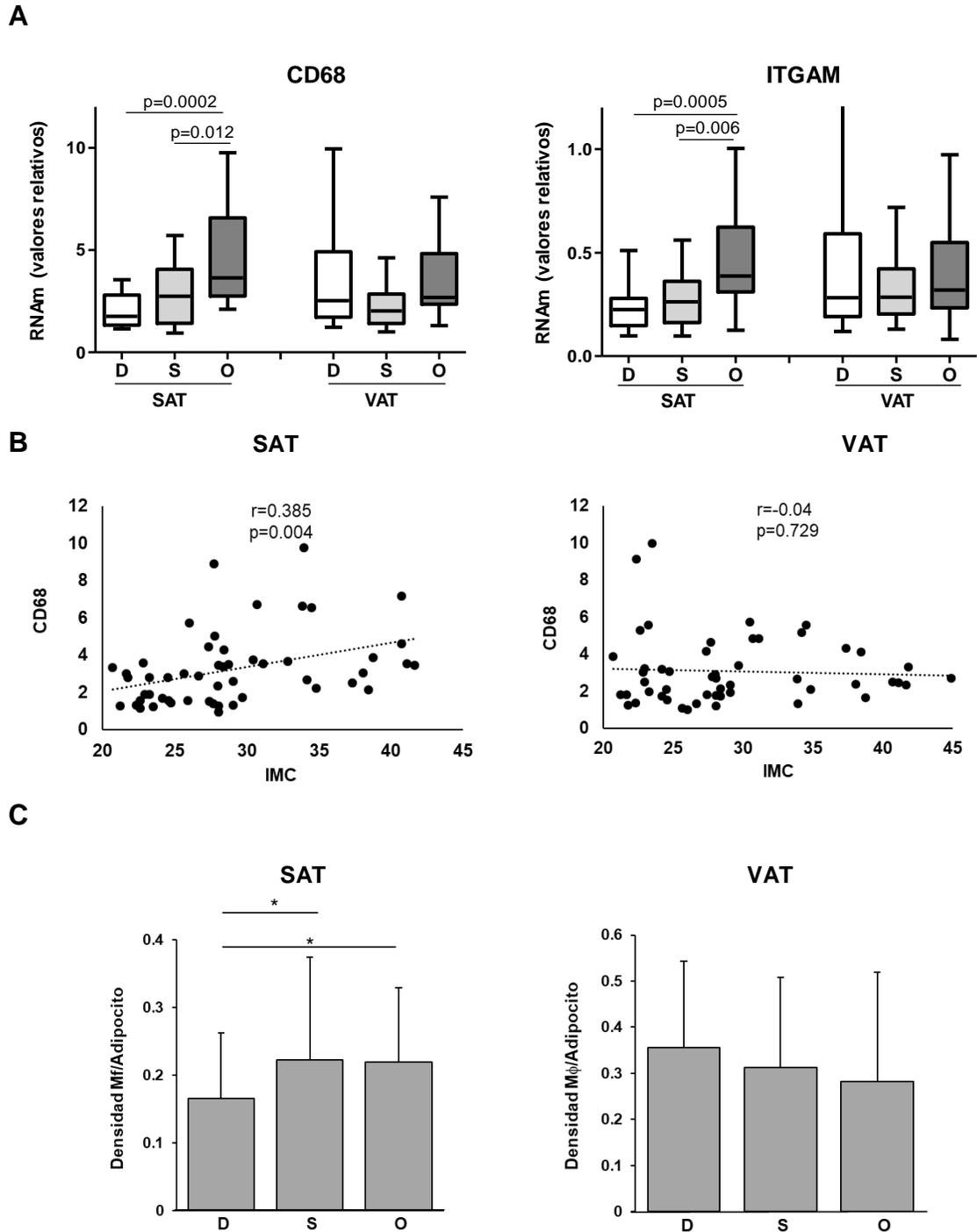
En resumen, en el VAT predomina la expresión de citocinas proinflamatorias, sin embargo, también se expresan marcadores asociados al fenotipo M2 en proporciones similares a los del SAT en condiciones homeostáticas.

### **3. La expresión de marcadores pan-macrofágicos incrementa con relación al índice de masa corporal de los individuos únicamente en el tejido adiposo subcutáneo.**

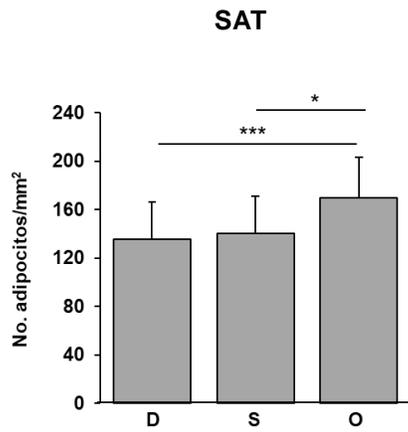
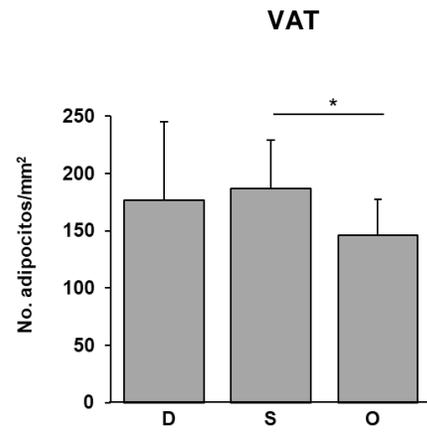
Con el fin de evaluar cómo se modificaba la expresión de los marcadores asociados a la función de los macrófagos con el incremento en el grado de adiposidad, se midieron sus niveles en el tejido adiposo de individuos delgados, con sobrepeso y obesos. En primer lugar, se analizó la expresión de los marcadores pan-macrofágicos para analizar el incremento de macrófagos con la obesidad descrito ampliamente en la literatura. Los resultados muestran un incremento significativo de ambos marcadores en los sujetos obesos con respecto a los delgados y con sobrepeso; sin embargo, esto solo se observó en el tejido adiposo subcutáneo ya que diferencia de lo descrito en el VAT donde se ha observado un incremento más evidente de CD68 con la obesidad, su expresión no se vio modificada (Fig. 7A). De acuerdo con esto, el análisis de correlación muestra una correlación positiva entre la expresión de los dos marcadores con el IMC en el SAT, pero no en el VAT (Fig. 7B). Para corroborar que el incremento a nivel de RNAm correspondía realmente al aumento en el número de macrófagos, analizamos la densidad de macrófagos por adipocito mediante microscopía confocal y observamos que esta densidad se favorece con el sobrepeso y la obesidad. De igual manera esto solamente fue observado en el SAT mientras que la densidad de macrófagos se mantuvo sin cambios en el VAT (Figura 7C).

Sorpresivamente, al analizar la densidad de macrófagos en los cortes de tejido encontramos otra característica diferencial entre los dos tipos de depósitos grasos; en el SAT la densidad de adipocitos incrementó a mayor adiposidad, mientras que, en el VAT la densidad fue menor (Fig. 8A y 8B), dicho de otra manera, esto significa que en el SAT los adipocitos se vuelven más pequeños y en el VAT aumentan su

tamaño, lo que podrían sugerir que el primero es un tejido que se expande principalmente por hiperplasia, en cambio el segundo tendría una expansión dada preferentemente por un proceso de hipertrofia.



**Figura 7. La expresión de los marcadores pan-macrofágicos correlaciona con el índice de masa corporal de los individuos en el SAT.** (A) Expresión relativa del RNAm de *CD68* e *ITGAM* en el SAT y VAT de individuos delgados, con sobrepeso y obesos. (B) Análisis de correlación de Spearman entre la expresión de *CD68* y el índice de masa corporal de todos los individuos. (C) Relación del número de macrófagos por cada adipocito contado en individuos delgados, con sobrepeso y obesos. Las barras muestran la media  $\pm$  SD de 5 donantes evaluados. Prueba estadística: t de student no pareada. <sup>NS</sup> $p>0.05$ ,  $*p<0.05$ ,  $**p<0.005$ ,  $***p<0.0005$ .

**A****B**

**Figura 8. Densidad de adipocitos en SAT y VAT con respecto al grado de adiposidad.** Número de adipocitos contados en un área de 1 mm<sup>2</sup> obtenidos mediante microscopía confocal en el tejido adiposo subcutáneo (A) y visceral (B) de individuos delgados, con sobrepeso y obesos. Las barras muestran la media  $\pm$  SD de 5 donantes por condición. Prueba estadística: t de student no pareada. NS $p$ >0.05, \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.005, \*\*\* $p$ <0.0005.

**4. En la obesidad se favorece la expresión de marcadores asociados al fenotipo alternativo de los macrófagos, mientras que, con el sobrepeso se incrementan los mediadores inflamatorios.**

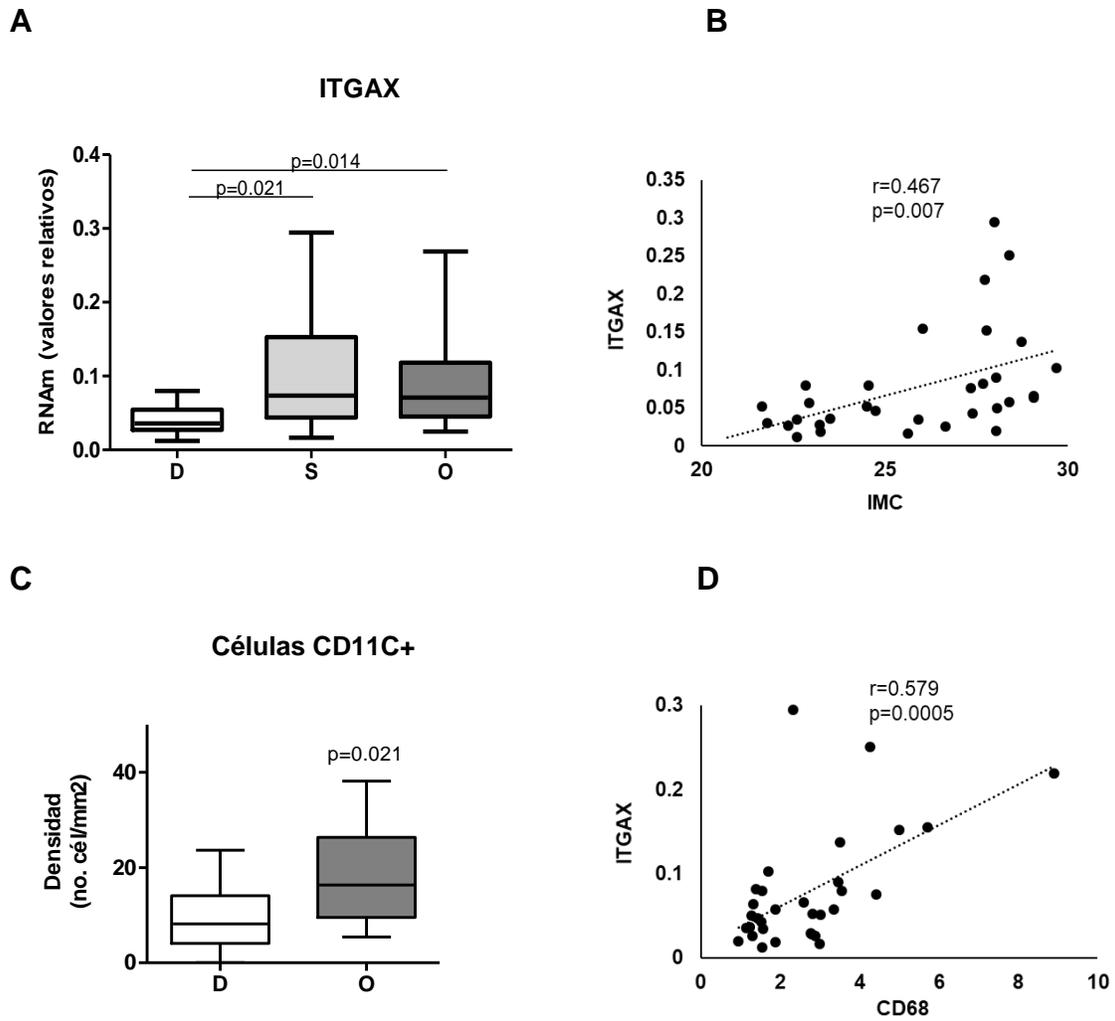
Estas características diferenciales de los procesos de expansión e infiltración celular entre los dos tipos de tejidos nos sugerían el hallazgo de diferentes perfiles fenotípicos de los ATMs en la obesidad, para analizar esta cuestión se analizó la expresión de los marcadores característicos para las poblaciones pro- y antiinflamatoria de macrófagos en el SAT y el VAT, en general, las diferencias más sustanciales fueron encontradas en el SAT, con pocas variaciones de expresión en el VAT. En primer lugar, se evaluó la expresión de dos marcadores de membrana asociados al fenotipo de macrófagos inflamatorios en tejido; uno de ellos, CLEC5A, fue recientemente descrito por nuestro grupo de trabajo en células productoras de TNF encontradas en lámina propia de pacientes con colitis y por primera vez evaluamos su expresión en el tejido adiposo para la búsqueda de perfiles específicos, el otro marcador fue el gen de la integrina CD11C, ITGAX. Con relación a CLEC5A, su expresión fue muy baja y no cambió con el aumento del grado de adiposidad (datos no mostrados), mientras que, ITGAX incrementó en el tejido adiposo de individuos con sobrepeso y obesos comparado con los delgados, sin diferencias entre estos primeros dos grupos (Fig. 9A). Además, visto por microscopía confocal, la densidad de células CD11C+ fue mayor en los sujetos obesos con respecto a los delgados (Fig. 9C). Al realizar el análisis de correlación entre la expresión de este marcador con el IMC de los tres grupos de estudio, no se encontró ninguna significancia, sin embargo, al analizar el grupo de los delgados y con sobrepeso juntos, la correlación resultó ser positiva (Fig. 9B), es decir, el incremento de este marcador parecía favorecerse solo hasta el sobrepeso. De igual manera, se encontró una correlación positiva de este marcador con la expresión de CD68 solo hasta el sobrepeso (Figura 9D).

Con respecto a las citocinas proinflamatorias a nivel de RNAm, TNF e IFNG mostraron una tendencia a incrementarse con el sobrepeso comparado con los delgados, para el caso de TNF en los obesos, los niveles de expresión parecían ser similares a los de los delgados e IFNG conservaba la misma tendencia en obesidad

que en el sobrepeso (Fig. 10A izquierda). En conjunto con esto, encontramos una correlación positiva de ambas citocinas con el IMC que se mantenía entre delgados y con sobrepeso, pero se perdía al incluir el grupo de los obesos (Fig. 10A y 10B derecha). A nivel de proteína, TNF no cambió entre delgados y obesos (Fig. 2) aunque de manera interesante, hubo una correlación negativa entre la expresión del RNAm de TNF y el IMC del grupo de los obesos analizados por separado (Fig. 10C) sugiriendo que con el progreso de la obesidad existe una disminución en la inflamación, adicionalmente también la expresión de IFNG a nivel de proteína fue menor en la obesidad. (Fig. 2). Debido a que observamos que la inflamación en el tejido adiposo parecía disminuir por la regulación negativa de ambas citocinas con la obesidad, continuamos con el análisis de la expresión de los marcadores asociados al fenotipo anti-inflamatorio y se encontró que los marcadores de membrana CD163 y CD163L1 presentaron mayor expresión en la obesidad (Fig. 11A), así mismo, por microscopía se encontró una mayor densidad de células positivas para estas proteínas (Fig. 11B).

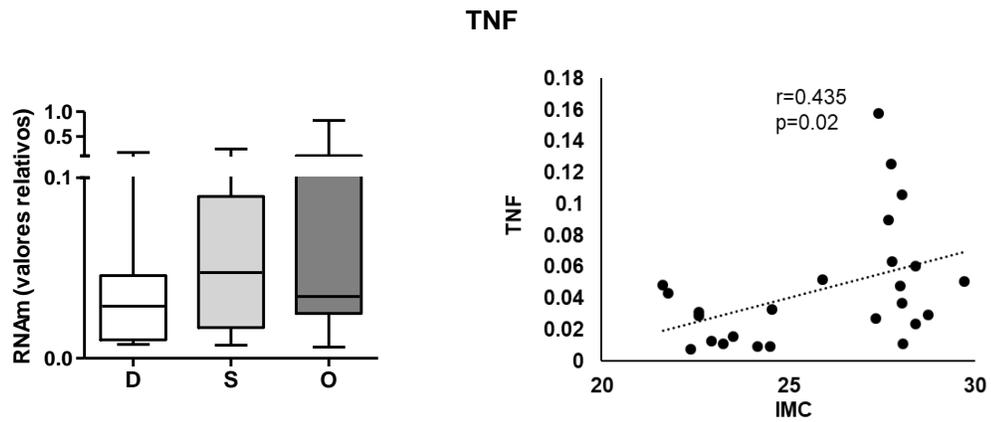
Como se mencionó anteriormente, en el VAT no se observaron diferencias significativas entre los grupos de estudio en la expresión de los transcritos, sin embargo, se encontraron algunas correlaciones. TNF e IFNG (Fig. 12A y B) correlacionaron de manera positiva con el IMC de los individuos delgados y con sobrepeso, tal como se observó en el SAT e IL-10 fue el único marcador que tuvo correlación positiva con el IMC hasta la obesidad (Fig. 12C).

En general, estos datos muestran que en el sobrepeso se presentan los mayores niveles de marcadores asociados al perfil de macrófagos pro-inflamatorios, mientras que en la obesidad se favorece la presencia de genes de macrófagos anti-inflamatorios.

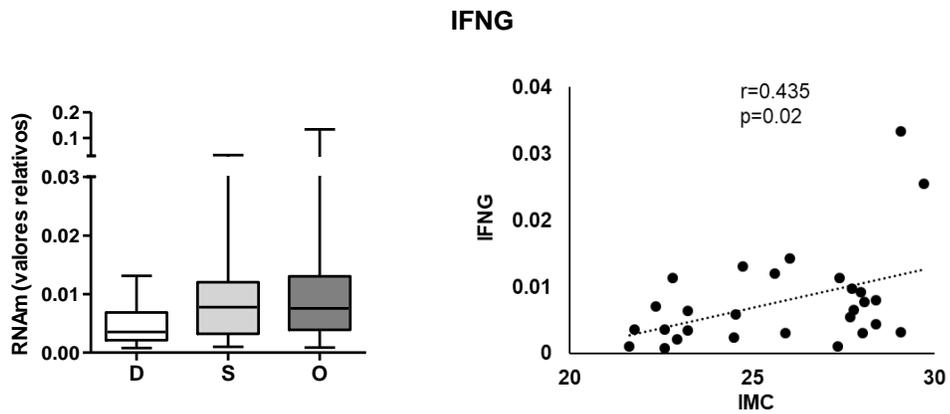


**Figura 9. El marcador de macrófagos inflamatorios, ITGAX, tiene su mayor expresión en el sobrepeso.** (A) Expresión relativa del RNAm de *ITGAX* en el tejido adiposo subcutáneo de individuos delgados, con sobrepeso y obesos evaluada por qRT-PCR. (B) Análisis de correlación de Spearman entre la expresión de *ITGAX* y el IMC de individuos delgados y con sobrepeso. (C) Densidad de células CD11c+ en el tejido subcutáneo de individuos delgados y obesos. (D) Análisis de correlación de Spearman entre la expresión de *ITGAX* y CD68. <sup>NS</sup>p>0.05, \*p<0.05, \*\*p<0.005, \*\*\*p<0.0005.

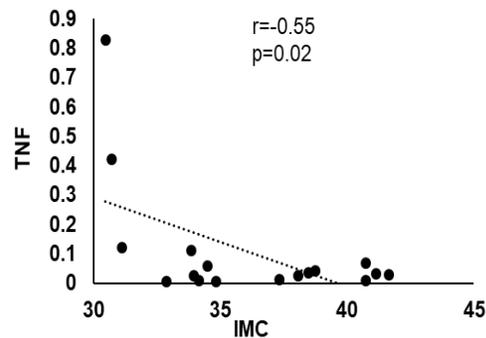
A



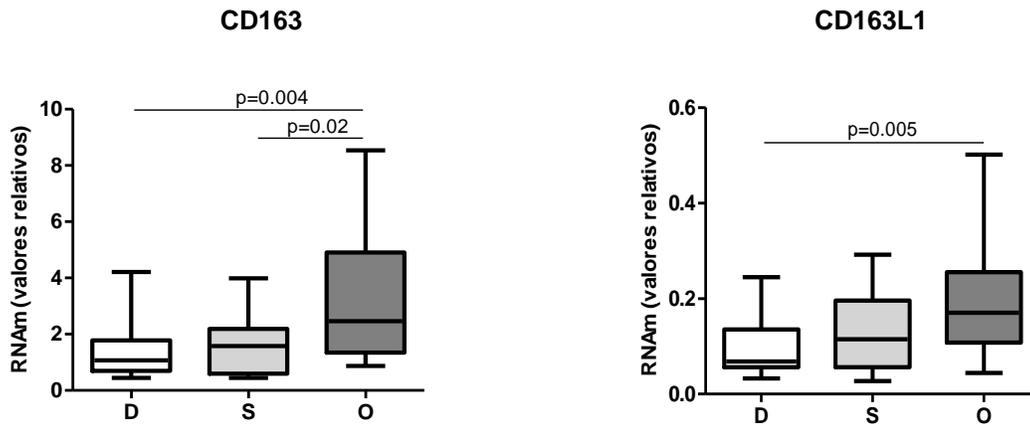
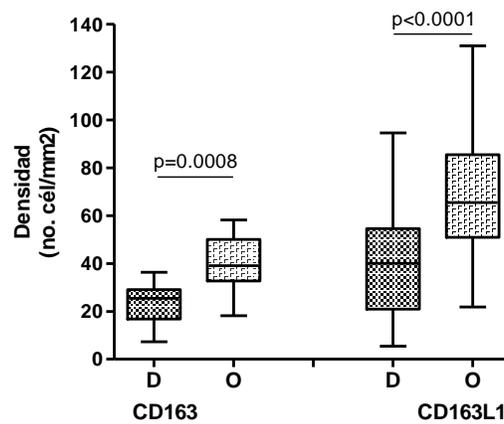
B



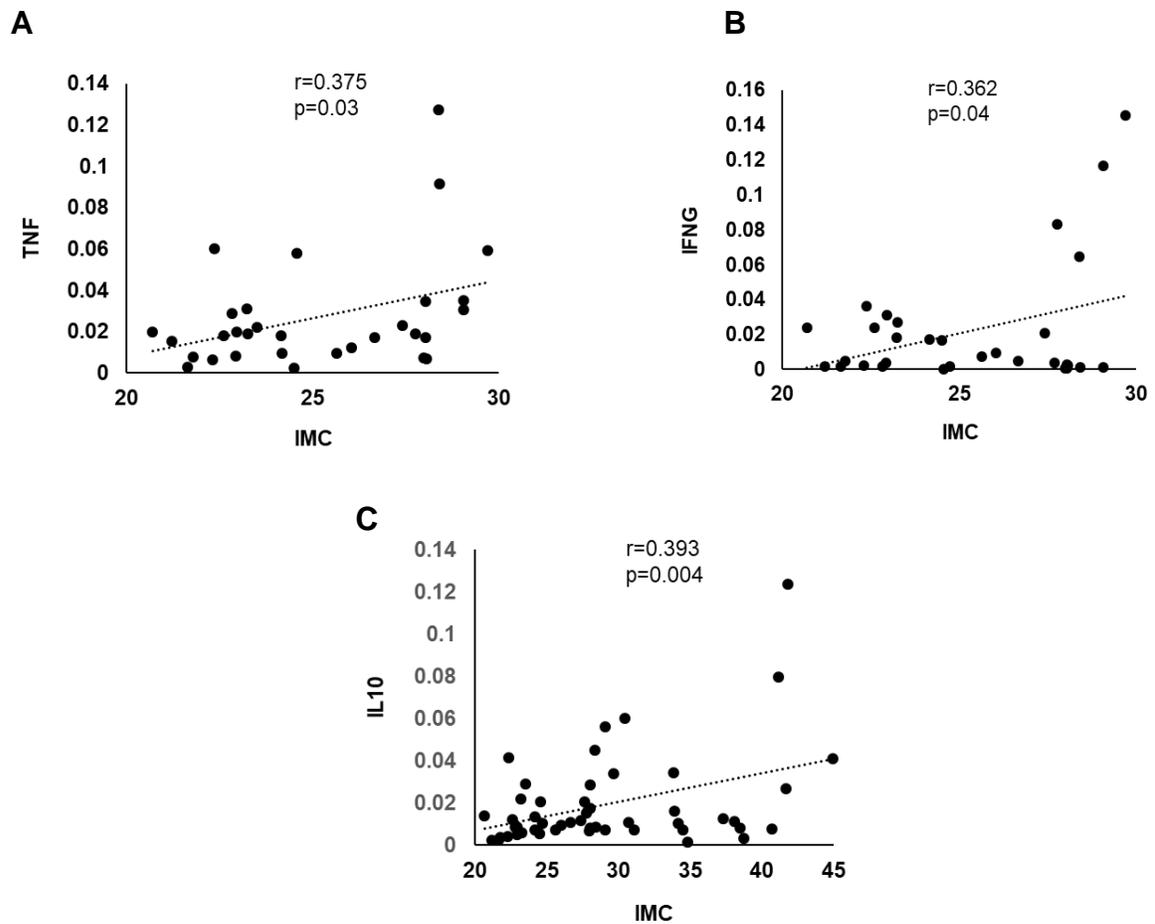
C



**Figura 10. La expresión de las citocinas pro-inflamatorias, TNF e IFNG aumentan hasta el sobrepeso.** A la izquierda: Niveles de expresión relativa del transcrito de *TNF* (A) e *IFNG* (B) en el SAT de sujetos delgados, con sobrepeso y obesos. A la derecha: Correlación entre la expresión de ambas citocinas con el IMC de los sujetos con sobrepeso. (C) Correlación entre la expresión de *TNF* y el IMC de los individuos obesos.

**A****B**

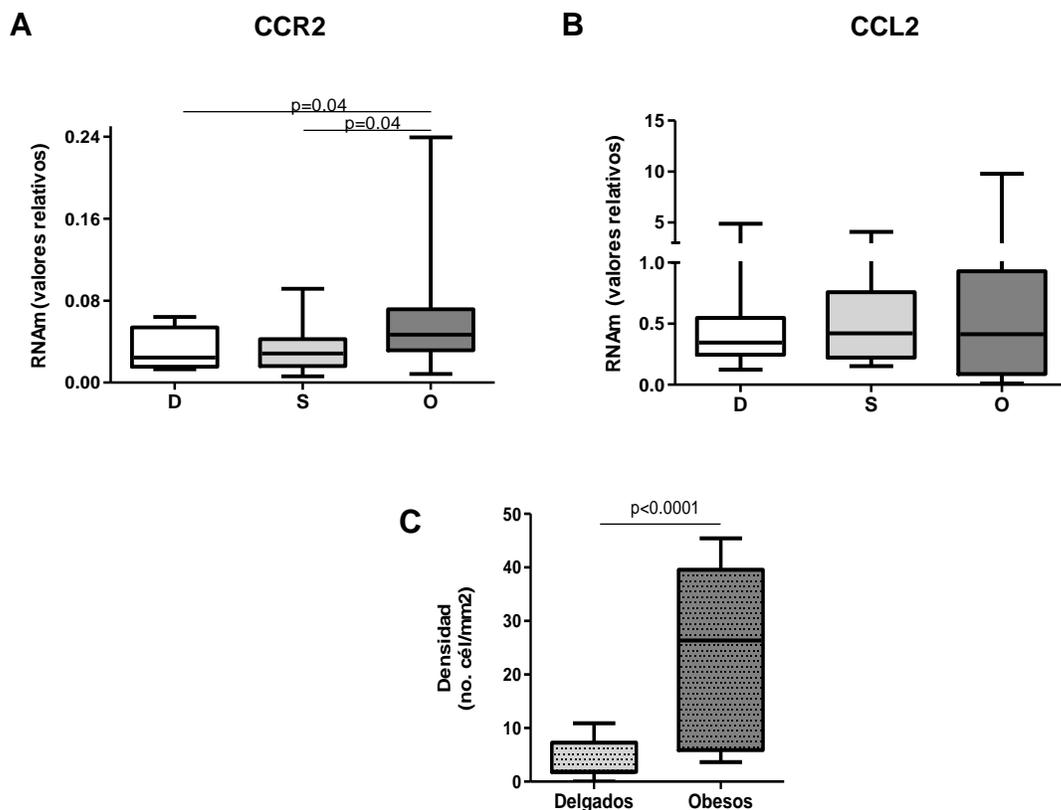
**Figura 11. En la obesidad se favorece la expresión de marcadores de tipo M2.** (A) Expresión relativa del RNAm de *CD163* y *CD163L1* en el SAT de sujetos delgados, con sobrepeso y obesos determinada por qRT-PCR. (B) Densidad de células *CD163*<sup>+</sup> y *CD163L1*<sup>+</sup> en el SAT de individuos delgados y obesos evaluado por microscopía confocal. <sup>NS</sup> $p>0.05$ , \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.005$ , \*\*\* $p<0.0005$ .



**Figura 12. En el VAT, la expresión de IL10 correlaciona con el IMC hasta la obesidad.** Análisis de correlación de Pearson entre la expresión de *TNF* (A), *IFNG* (B) o *IL10* (C) y el IMC de los individuos en el tejido adiposo visceral. En A y B se grafica el IMC del grupo de delgados y con sobrepeso y en C se representa el IMC de todos los individuos del estudio.

## 5. Expresión del eje CCL2/CCR2 en el tejido adiposo de individuos con distinto grado de adiposidad.

Está descrito en la literatura que gran parte del incremento de macrófagos inflamatorios al tejido adiposo obeso se debe al reclutamiento de monocitos sanguíneos y se ha demostrado que la quimiocina CCL2 es crucial para este evento. Para averiguar si el incremento de macrófagos con características antiinflamatorias encontrado en la obesidad en este estudio pudiera tener origen en el reclutamiento de monocitos, analizamos la expresión de esta quimiocina y su receptor, CCR2, el cual se expresa exclusivamente en monocitos. En el tejido adiposo subcutáneo su expresión resultó ser significativamente mayor en la obesidad y en conjunto con esto se observó por datos de microscopía que hubo una mayor densidad de células CD14+, sin embargo, de manera inesperada, la expresión del ligando de CCR2 no se modificó en ninguno de los grupos.

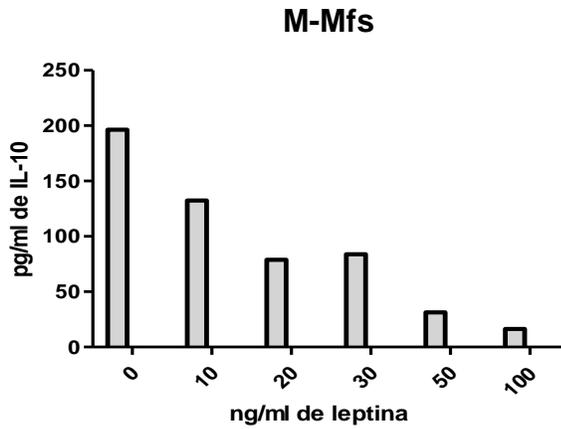


**Figura 13. Expresión del eje CCR2/ CCL2 en el tejido adiposo subcutáneo.** (A) Niveles de expresión relativa del RNAm de CCR2 y CCL2 (B) en el SAT de individuos delgados, con sobrepeso y obesos. (C) Densidad de células CD14+ en el SAT de delgados y obesos, evaluado por microscopía confocal en 5 donantes por condición.

## **6. La leptina inhibe la secreción de IL-10 en macrófagos anti-inflamatorios con un efecto dosis-dependiente.**

Durante el aumento en el grado de adiposidad hay diversos factores en el microambiente del tejido adiposo que podrían estar contribuyendo a la generación de los distintos fenotipos de macrófagos, algunos de ellos son los ácidos grasos libres liberados como producto de la lipólisis durante la hipertrofia de los adipocitos, la muerte celular de los mismos, el estado de hipoxia, las citocinas secretadas por las células inmunes reclutadas y adipocinas producidas por los adipocitos. Una de las principales adipocinas que se desregulan con la obesidad es la leptina, ésta se encuentra elevada en individuos obesos con respecto a los delgados y se le han atribuido funciones pro-inflamatorias debido a que induce la expresión de citocinas como IL-12, TNF, IL-6 e IL-8 sobre células de sistema monocítico-macrofágico.

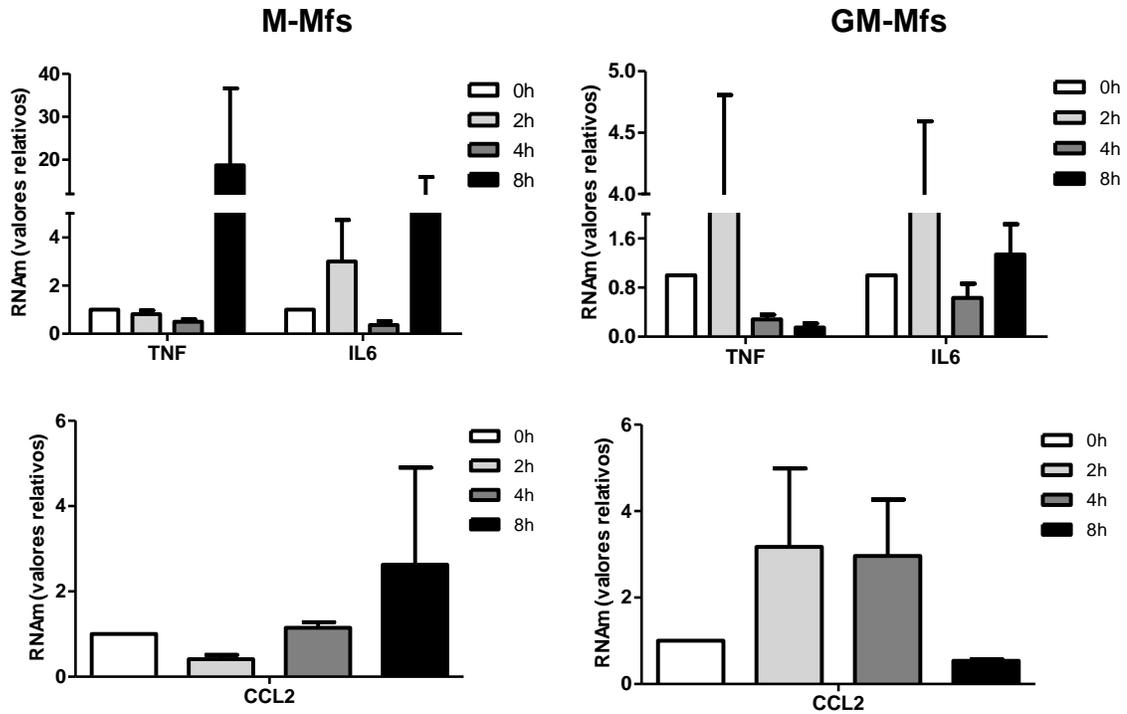
En este trabajo decidimos evaluar el papel de la leptina sobre macrófagos que se han diferenciado previamente hacia un fenotipo anti-inflamatorio y de acuerdo a datos de la literatura, son los que se encuentran en el tejido adiposo de individuos delgados representando a los macrófagos residentes del tejido, por lo que podrían ser los principales afectados por esta adipocina durante el aumento de la adiposidad. En primer lugar, realizamos un ensayo de dosis-respuesta para evaluar la concentración óptima de leptina a utilizar en todos los experimentos. Para ello, diferenciamos durante 6 días macrófagos de tipo M2 y M1 como condición control, en presencia de M-CSF y GM-CSF respectivamente. Estos macrófagos fueron estimulados al sexto día con 10, 20, 30, 50 y 100 ng/ml de leptina o el vehículo durante 24 horas, posteriormente se recogieron los sobrenadantes y se evaluó la secreción de TNF e IL-10 por la técnica de ELISA, sin embargo, mediante este tipo de ensayo solo pudimos detectar la secreción de IL-10 en los macrófagos M2. Lo que observamos fue que la leptina consiguió abatir considerablemente la producción de IL-10 desde una concentración de 10ng/ml, este efecto se vio incrementado a mayores concentraciones de leptina, logrando disminuir casi completamente a la IL-10 al utilizar una concentración de 100ng/ml (Fig. 14). Con estos datos decidimos emplear la leptina a 50ng/ml en posteriores ensayos.



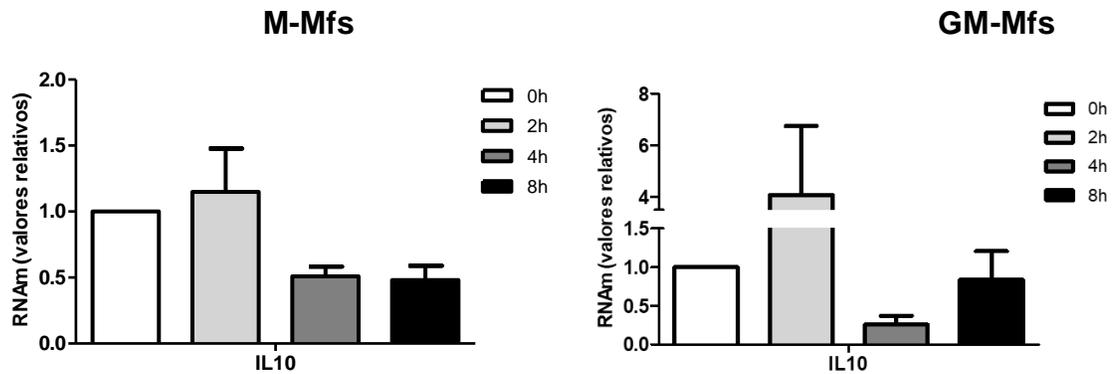
**Figura 14. La leptina suprime la secreción de IL-10 en macrófagos antiinflamatorios.** Los monocitos CD14+ purificados a partir de sangre periférica fueron cultivados en presencia de M-CSF durante 6 días para diferenciar macrófagos de tipo M2. Estas células se estimularon al día 6 con distintas concentraciones de leptina (ng/ml) durante 24h, se recuperaron sobrenadantes y se midieron las concentraciones de IL-10 por la técnica de ELISA. La gráfica muestra los resultados de un donante.

## **7. La leptina promueve la repolarización de los macrófagos M2 mediante la supresión de la expresión de la IL10 y la inducción de citocinas pro-inflamatorias.**

Debido a que con la sensibilidad de detección del ELISA no era posible evaluar todas las condiciones, empleamos la técnica de RT-PCR cuantitativa para medir la expresión de los genes de las citocinas debido a que es un método más sensible y podríamos evaluar todos los cambios. Para estos ensayos, se diferenciaron macrófagos M2 y M1 durante 6 días, en el último día las células fueron estimuladas o no, con 50ng/ml de leptina durante 2, 4 y 8 horas y se realizó la extracción del RNA para medir los niveles de expresión de los transcritos de las citocinas *TNF*, *IL6* e *IL10* y la quimiocina *CCL2* por RT-PCR cuantitativa. Para el caso de las citocinas pro-inflamatorias, observamos una tendencia en el incremento de la expresión de *TNF* en los M2 a tiempos tardíos, mientras que en los M1 esta inducción parece ser más temprana (Fig. 15). El efecto de la leptina sobre la *IL6* fue muy similar en ambas poblaciones, observándose también una tendencia a incrementar su expresión desde las 2h, luego una disminución hacia los niveles basales y un segundo momento de inducción a las 8h. Aunque el estímulo de la leptina promueve la expresión de estas citocinas en ambas poblaciones de macrófagos, el efecto de inducción parece darse a mayores niveles en los macrófagos M2. Con respecto a la quimiocina *CCL2*, la cual está implicada en el reclutamiento de monocitos al tejido adiposo, se observó que la leptina no causó efecto sobre su expresión en los macrófagos generados con M-CSF, mientras que en los M1 se incrementó desde las 2 horas (Fig. 15). Por otro lado, los niveles del transcrito de la *IL10* disminuyeron en los macrófagos de tipo M2 a las 4h y se mantuvo suprimida hasta tiempos más tardíos; en los M1, la leptina parece inducir un ligero incremento de los niveles de esta citocina a las 2 horas y es abatida a más de la mitad de su expresión basal a las 4 horas, para después recuperar sus niveles a las 8 horas (Figura 16). En resumen, los datos sugieren que la leptina podría ejercer un efecto de repolarización de los macrófagos residentes en el tejido adiposo al inducir la expresión de citocinas pro-inflamatorias y suprimir la producción de la *IL10*.



**Figura 15. Efecto de la leptina sobre la expresión de citocinas pro-inflamatorias y la quimiocina CCL2 en macrófagos.** Los monocitos CD14+ purificados a partir de sangre periférica fueron cultivados en presencia de M-CSF y GM-CSF durante 6 días para diferenciar macrófagos de tipo M2 y M1 respectivamente. Estas células se estimularon al día 6 con 50 ng/ml de leptina durante 2, 4 y 8h, posteriormente las células fueron lisadas con trizol para obtener el RNA y realizar ensayos de qRT-PCR. La gráfica muestra la expresión relativa de *TNF* e *IL6* con respecto al control sin estímulo al que se le dio el valor de 1. Se representan la media  $\pm$  SEM de tres diferentes experimentos realizados con 3 donantes sanos.



**Figura 16. La leptina suprime la expresión de *IL10* en los macrófagos M2.** Los monocitos CD14+ purificados a partir de sangre periférica fueron cultivados en presencia de M-CSF y GM-CSF durante 6 días para diferenciar macrófagos de tipo M2 y M1 respectivamente. Estas células se estimularon al día 6 con 50 ng/ml de leptina durante 2, 4 y 8h, posteriormente las células fueron lisadas con trizol para obtener el RNA y realizar ensayos de qRT-PCR. La gráfica muestra la expresión relativa de *TNF* e *IL6* con respecto al control sin estímulo al que se le dio el valor de 1. Se representan la media  $\pm$  SEM de tres diferentes experimentos realizados con 3 donantes sanos.

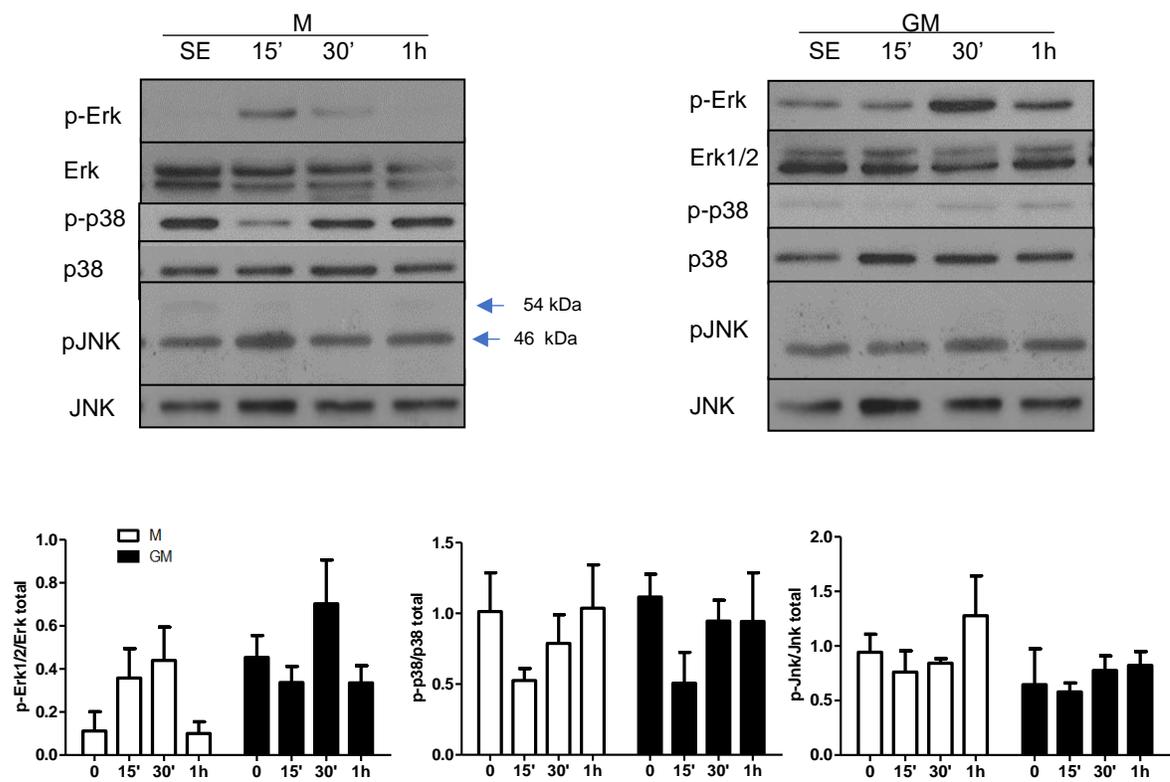
### 8. La leptina promueve la activación de ERK1/2 en los macrófagos antiinflamatorios sin modificar la fosforilación de los otros miembros de las MAPK.

El proceso inflamatorio durante la obesidad es mediado por la activación de distintas vías de señalización, entre las cuales se han descrito cinasas como IKK, PKR y JNK. La leptina en particular ejerce sus funciones a través de su receptor funcional ObRb activando las vías de JAK-STAT, IRS-1-PI3K y MAPK. Debido a que JNK tiene un papel central en la obesidad y su activación está relacionada con la resistencia a la insulina, decidimos evaluar si la leptina podría estar involucrada en su fosforilación y en la de los otros miembros de las MAPK en los macrófagos durante el aumento de peso y si su efecto podría ser diferencial entre los macrófagos que residen el tejido y aquellos que poseen características proinflamatorias. Para realizar estos experimentos, diferenciamos macrófagos antiinflamatorios y proinflamatorios en presencia de M-CSF y GM-CSF, respectivamente durante 6 días. En el último día de la diferenciación estos macrófagos fueron estimulados con 50 ng/ml de leptina durante 15, 30 minutos y 1

hora. Las células fueron recuperadas y lisadas en SDS 5% para obtener extractos proteicos totales y realizar un ensayo de Western Blot para evaluar la fosforilación de p38, ERK1/2 y JNK (Fig. 18).

En general, los resultados muestran un incremento únicamente en la fosforilación de ERK1/2 tras el estímulo con leptina. En condiciones basales, todos los miembros evaluados de la familia de las MAPK se encuentran constitutivamente activados en ambas poblaciones de macrófagos. En el caso de ERK, mostró mayores niveles de fosforilación en los M1 que en los M2 y una mayor fosforilación de p38 y JNK en los M2.

La leptina promovió el aumento en la fosforilación de ERK a tiempos más tempranos en los M2, lográndose a los 15 minutos luego del estímulo y se mantuvo a los 30 minutos, en cambio, en los M1 se observó este incremento hasta los 30 minutos y a una hora del estímulo, la activación de esta cinasa decayó a los niveles basales en ambas poblaciones de macrófagos. En cuanto a p38, observamos una ligera disminución en su fosforilación a los 15 minutos, pero fue recuperada rápidamente en tiempos posteriores y para el caso de la cinasa JNK, no observamos ningún cambio.



**Figura 18. Fosforilación de los miembros de las MAPK en macrófagos estimulados con leptina.** Macrófagos diferenciados en presencia de M-CSF y GM-CSF para obtener poblaciones de tipo M2 y M1, respectivamente, fueron estimulados al día 6 de la diferenciación con 50 ng/ml de leptina durante 15, 30 minutos y 1 hora, se obtuvieron lisados de proteínas totales y se realizó un WB para evaluar la fosforilación de Erk, p38 y Jnk. Como controles de carga se muestran las proteínas totales. El resultado de las gráficas muestra la densitometría hecha para 3 donantes.

## DISCUSIÓN

Desde que se describió que la obesidad constituye un proceso inflamatorio crónico que va acompañado de la infiltración de diferentes tipos de células inmunes, se ha destacado el papel de los macrófagos como elementos cruciales en el desarrollo de la inflamación y las comorbilidades que acompañan al proceso, ya que se ha demostrado en diversos estudios en ratón que la depleción o la disminución en el reclutamiento de estas células al el tejido adiposo mejora la captación de glucosa y la resistencia a la insulina (13, 36). Sin embargo, el papel de los macrófagos en los tejidos no sólo estriba en desencadenar la inflamación sino también en la resolución de ésta e incluso en la reparación tisular. Es por esto que es de vital importancia conocer cómo se modifica el perfil fenotípico de los macrófagos del tejido adiposo desde un estado homeostático y durante el aumento en el peso corporal para entender su repercusión sobre el estado inflamatorio y conocer también cómo algunos factores solubles que se desregulan durante este aumento de peso influyen en su perfil. El fenotipo de los macrófagos del tejido adiposo en ratones delgados y obesos está prácticamente definido, mientras que, en humanos, la caracterización de los perfiles de activación de los macrófagos en este tejido ha sido más complicada ya que el uso de marcadores en cada caso ha sido distinto y no existe a la fecha un consenso general acerca del uso de éstos para identificar poblaciones de macrófagos de grasa. Por otro lado, también se ha estudiado el perfil fenotípico de los macrófagos en los dos tipos de tejido adiposo blanco con el conocimiento que ambos depósitos grasos presentan distintos perfiles de secreción de adipocinas y hormonas (88) que podrían tener una repercusión diferencial sobre la función de los macrófagos, de hecho, hay varios estudios comparativos que indican que el aumento en el tejido adiposo visceral tiene mayor relación con una incrementada infiltración de macrófagos, con el desarrollo de comorbilidades y el síndrome metabólico que el tejido subcutáneo pero está poco estudiado si el perfil fenotípico de estas células se modifica con el tipo de tejido estudiado. En este trabajo realizamos la búsqueda de genes asociados al perfil M1 y M2 de los macrófagos del tejido adiposo utilizados en estudios hechos *in vivo* como *in vitro* y analizamos

las diferencias que existen en la expresión de estos genes en dos tipos de depósitos grasos en individuos metabólicamente sanos. Debido a que los niveles de expresión del RNA no siempre reflejan los niveles de la proteína, comparamos los datos de expresión génica con la expresión de las proteínas obtenidos mediante microscopía confocal y se observó que en la mayoría de las condiciones ambos concuerdan, además, los hallazgos son apoyados por los datos obtenidos mediante inmunohistoquímica y citometría de flujo por otros autores, esto podría indicar que la medición del nivel del RNA resulta un parámetro fiable para la determinación del fenotipo de los ATMs en el tejido adiposo. En primer lugar, se compararon los perfiles de expresión del tejido adiposo visceral y subcutáneo en el estado delgado; en términos generales se observó que en el tejido adiposo visceral en condiciones de homeostasis parece existir un microambiente más inflamatorio, por el mayor número de macrófagos encontrados y la mayor producción de TNF e IFNG. La mayor abundancia de macrófagos en el VAT ya había sido reportada por otros autores (89, 90). y se ha sugerido que este fenómeno se observa debido a que este tejido es más vascularizado y recibe un mayor influjo sanguíneo que el tejido subcutáneo y por lo tanto existe un mayor reclutamiento de macrófagos en condiciones de homeostasis, además, como los macrófagos son los leucocitos más abundantes en el tejido adiposo, es probable que la expresión incrementada de TNF que se observó en el tejido visceral se deba a la predominancia de estas células, puesto que se ha demostrado en ratón que son las principales células que expresan esta citocina (7). Por otro lado, es probable que no solo los macrófagos sino también otros tipos celulares se encuentren en mayor proporción en el tejido visceral que en el tejido subcutáneo, principalmente células T CD4+, T CD8+, entre otras; responsables de la mayor producción de IL-4 e IFN, respectivamente. Al medir marcadores de membrana que distinguen poblaciones inflamatorias y antiinflamatorias de macrófagos *in vivo* (87), solo encontramos diferencias para la expresión de los marcadores de tipo M2, *CD163* y *CD163L1*, pero demostramos que la proporción de células positivas para estos marcadores es similar en ambos tejidos y su expresión incrementada en el tejido visceral es el reflejo del mayor número de macrófagos presentes en este tejido. Es probable que por esta razón

tampoco observáramos diferencias en la producción de IL-10, sin embargo, podría ser que eventualmente el tejido adiposo subcutáneo tuviera una capacidad facilitada de producir esta citocina antiinflamatoria ya que encontramos que los niveles de expresión del transcrito fueron superiores en este tejido. Las observaciones hechas por Zeyda y cols. en el 2007 (29), definieron a los ATMs como células CD14+CD206+ las cuales expresan a su vez marcadores de tipo M2 como CD163, adicionalmente Nakajima y cols. en 2016 (91) encontraron un mayor porcentaje de células CD163+ en el tejido adiposo de individuos delgados en ambos depósitos grasos. Estos datos en conjunto con nuestros hallazgos podrían plantear la identificación de macrófagos residentes del tejido adiposo mediante la expresión de marcadores como CD163 y CD163L1 en estos dos tipos de tejido. En el VAT, la población de macrófagos residentes podría poseer a la vez características proinflamatorias como la capacidad de producir TNF que esté favorecida por la expresión de IFN- $\gamma$ , sin embargo, para demostrar esta idea, sería necesario realizar experimentos en los que se aíslen los ATMs del tejido y se realice la caracterización de cada población celular en estos pacientes. En subsecuentes análisis, observamos que el incremento de la densidad de macrófagos con relación al grado de adiposidad solo se presenta en el tejido subcutáneo sin variaciones en el VAT. Esto difiere de los estudios reportados en los cuales describen un incremento de macrófagos en ambos tipos de depósitos grasos tanto en humanos como en ratones obesos, algunos de ellos muestran que esta infiltración es incluso mayor en el tejido adiposo visceral (15, 24) en comparación con el SAT pero en otros estudios también se han encontrado un mayor porcentaje macrófagos en el tejido adiposo subcutáneo que se encuentran formando estructuras de tipo corona (CLS), lo cual concordaría con nuestros datos (28, 92). Se postula que el evento que desencadena la infiltración de macrófagos al tejido adiposo es la hipertrofia de los adipocitos debido a que conlleva a la muerte de éstos mismos y la liberación de ácidos grasos libres, de esta manera promueve la respuesta inflamatoria (22) Se ha reportado que el porcentaje de macrófagos encontrados en tejido graso correlaciona de manera positiva con el tamaño de los adipocitos tanto en humanos como en ratones (7, 28, 91). Sin embargo, de acuerdo con nuestros hallazgos, no existe relación entre el

proceso de hipertrofia con la infiltración de macrófagos en los individuos obesos. Sugerimos que el hecho de no haber encontrado diferencias en el VAT con respecto al porcentaje de macrófagos a pesar de ser un tejido en donde observamos mayor hipertrofia de los adipocitos con la obesidad podría deberse a la heterogeneidad de las muestras colectadas por la zona de la que se obtuvo dependiendo del tipo de cirugía realizada. Por otro lado, se ha propuesto que el tejido adiposo subcutáneo funciona como el principal órgano de reserva de energía por encontrarse en mayor proporción en el organismo y sus características adipogénicas y se hipotetiza que cuando su capacidad de almacenamiento es superada, los lípidos se acumulan en áreas adicionales a este tejido como lo es el tejido adiposo visceral, por lo tanto, no haber encontrado diferencias en el VAT podría ser explicado por este fenómeno, es decir, el tejido adiposo subcutáneo en este grupo de individuos aún podría tener la capacidad de compensar el exceso de energía mediante la generación de nuevos adipocitos, evitando que el tejido adiposo visceral se expanda sobrepasando su capacidad de almacenamiento y por lo tanto que la tasa de lipólisis y los estímulos inflamatorios generados en este compartimento aún sean bajos como para promover un reclutamiento de macrófagos que sea evidente (93). En cuanto a las diferencias en la forma de expansión entre el VAT y el SAT encontradas en este estudio, coinciden con lo que se ha reportado en la literatura, es decir, se favorece la hiperplasia en el SAT mientras que en el VAT la hipertrofia (88). Con respecto al dato encontrado particularmente en el SAT, existen reportes que indican que la hiperplasia no es un mecanismo extraño a la obesidad; esto se ha observado en ratones obesos alimentados con una dieta alta en grasas durante 20 semanas los cuales muestran un incremento del número de adipocitos de menor tamaño con una concomitante disminución en el porcentaje de células necróticas que procede a un evento de hipertrofia dado en semanas previas que va acompañado de una mayor muerte de adipocitos y un incremento en la expresión de genes proinflamatorios. Es decir, la hiperplasia funciona como un mecanismo de adaptación a la cronicidad del balance energético positivo (94). De acuerdo a nuestros resultados y por lo observado en estos estudios hechos en ratón cabe la posibilidad que el tejido adiposo subcutáneo de los individuos obesos haya experimentado un evento de

hipertrofia en etapas tempranas de la obesidad o en una etapa previa que hubiera inducido una respuesta inflamatoria así como un incremento en la infiltración de macrófagos para posteriormente remodelarse por hiperplasia, de hecho, en el tejido adiposo de individuos con sobrepeso, fue donde encontramos la mayor expresión de citocinas y marcadores asociados al fenotipo M1. Si este es el caso, en este trabajo solo se estaría observando el efecto final ya que no es posible demostrar esto en humanos. En resumen, nuestros resultados indican que el tejido adiposo subcutáneo se remodela en el estado de obesidad mediante una expansión “sana” dada por hiperplasia y consideramos la posibilidad que en los individuos analizados, esto esté relacionado con un mejor control de las alteraciones metabólicas, sin embargo, para asegurar que esta característica observada en este depósito de grasa es propia de un grupo de obesos sin alteraciones metabólicas, será necesario evaluar adicionalmente un grupo de obesos que presenten alguna comorbilidad asociada a la obesidad. En estudios hechos en individuos obesos se ha observado tanto en SAT como en VAT que la presencia de adipocitos de menor tamaño está asociado a pacientes no diabéticos y, al contrario, han encontrado adipocitos de mayor tamaño en los pacientes diabéticos, lo cual apoyaría esta hipótesis. Lo que se postula con relación a esto, es que el crecimiento de los adipocitos está limitado por la fibrosis, lo cual mejora a su vez el estado metabólico, ya que se ha encontrado una correlación negativa entre la cantidad de fibrosis con el diámetro de los adipocitos y con los niveles de triglicéridos y hemoglobina glicosilada, sin embargo; estas relaciones se han encontrado significativas solo en el VAT (95, 96). En cuanto a la predominancia del fenotipo de macrófagos con la obesidad, nuestros resultados indican que, en el SAT, se favorecen los marcadores asociados al fenotipo antiinflamatorio de los macrófagos, como *CD163* y *CD163L1*. Los macrófagos del tejido adiposo de fenotipo antiinflamatorio están especializadas en funciones como la fagocitosis de los adipocitos necróticos, la promoción de la angiogénesis y la adipogénesis así como para contrarrestar la inflamación presentada durante el aumento de peso (94, 97-99), por lo tanto, la presencia de estas poblaciones de macrófagos en el tejido adiposo durante la obesidad podría funcionar no solo como un mecanismo en respuesta a la inflamación, sino que estas células podrían estar

involucradas en lograr la expansión sana del tejido a través de estas funciones. Estas observaciones se contraponen con el modelo de inflamación en la obesidad planteado inicialmente en el modelo murino, pero varios reportes en humanos coinciden con nuestros datos. Fjeldborg y cols. (25) reportaron un incremento de la expresión del RNA de genes antiinflamatorios como *CD163* e *IL10* en el tejido adiposo subcutáneo de individuos obesos con respecto a los delgados y una disminución de los transcritos de *TNF* e *IL6*; Spencer y cols. (27) demostraron que hay mayor abundancia de macrófagos de tipo M2 que se asocian con la fibrosis y expresan altos niveles de TGF- $\beta$  e IL10 en el SAT de los sujetos obesos con respecto al de delgados. Para nuestra sorpresa, la expresión de *TNF* no se vio disminuida en los individuos obesos con respecto a los delgados, sin embargo, se encontró una correlación negativa de la expresión de *TNF* con el índice de masa corporal de los individuos obesos, lo cual podría sugerirnos que la regulación negativa de la inflamación se presenta en etapas crónicas de la obesidad y en individuos extremadamente obesos. Otro dato inesperado en nuestro estudio, fue que los niveles del transcrito de *IL10* no variaron con relación al grado de adiposidad, por lo que su expresión podría no estar relacionada con la adquisición del fenotipo M2 de los macrófagos encontrados en el tejido adiposo de los obesos y es posible que esta citocina no tenga un papel relevante en la inflamación como ha sido propuesto por Kowalski en 2011, donde encontraron que la deficiencia de IL10 en células hematopoyéticas o su ausencia total en ratones alimentados con HFD no incrementa el estado inflamatorio en el tejido adiposo ni empeora el estado metabólico, lo cual fue medido por activación de cinasas proinflamatorias, expresión génica de citocinas proinflamatorias y sensibilidad a la insulina. (100, 101). La fuente de esta citocina en el tejido adiposo se encuentra en varios tipos celulares como macrófagos, linfocitos y los mismos adipocitos, lo que podría también haber complicado observar diferencias a nivel del RNA mensajero por la posible regulación transcripcional diferencial de esta citocina en estas células tomando en cuenta que realizamos las mediciones en tejido total (102).

Como antes mencionamos, en el tejido adiposo de individuos con sobrepeso, fue donde encontramos la mayor expresión de citocinas y marcadores asociados al

fenotipo M1. Los marcadores de membrana asociados al perfil proinflamatorio que evaluamos fueron *CLEC5A* que fue recientemente descrito por nuestro grupo de trabajo cuya expresión está representada principalmente por macrófagos productores de TNF en tejidos como intestino y órganos linfoides secundarios; la expresión de esta molécula fue evaluada por primera vez en el tejido adiposo, no obstante, se expresó poco a nivel de RNAm y no mostró diferencias entre los grupos estudiados. Para el caso de *ITGAX* que codifica para la integrina CD11C obtuvimos resultados que concuerdan con lo reportado en la literatura, ya que su expresión incrementa con el aumento en el IMC y correlaciona con la expresión de CD68. Se ha reportado que los macrófagos que expresan este marcador se relacionan con poblaciones que se reclutan de novo al tejido adiposo en el proceso inflamatorio. Lo interesante en cuanto a la expresión de este marcador fue que tuvo correlación con el IMC solo entre los individuos delgados y con sobrepeso, esto sugiere que a partir del sobrepeso es cuando comienzan a presentarse los estímulos que promueven el reclutamiento de monocitos y su diferenciación hacia poblaciones inflamatorias. Además, observamos un comportamiento similar al de CD11c para citocinas como *TNF* e *IFNG*, lo cual apoya nuestra hipótesis que es en el sobrepeso donde se dan los cambios adversos más significativos y posiblemente estas citocinas estén involucradas en la adquisición del fenotipo proinflamatorio durante esta etapa. Creemos que estas poblaciones inflamatorias de macrófagos que se reclutan en las primeras etapas del aumento de la adiposidad podrían mantenerse hasta la obesidad y coexistir con poblaciones residentes de macrófagos o bien, podrían potencialmente ser reprogramadas para ejercer funciones de reparación, ya que también obtuvimos un análisis de correlación positiva entre la expresión de *ITGAX* con el IMC de individuos delgados y obesos en conjunto, lo cual nos sugiere la presencia de macrófagos CD11+ también en la obesidad. Otra cuestión importante a evaluar fue la expresión del eje *CCL2/CCR2* el cual se ha estudiado es determinante en el reclutamiento de monocitos al tejido adiposo durante la obesidad ya que se ha reportado que los ratones deficientes de esta quimiocina o su receptor que son sometidos a una dieta alta en grasas muestran una disminución en la acumulación de macrófagos en el tejido adiposo, además se ha reportado que la

expresión de CCL2 se incrementa en proporción a la adiposidad, tanto en el tejido graso como a niveles séricos (17, 18, 103). En este estudio encontramos que los niveles del RNAm del receptor de la quimiocina, *CCR2* están incrementados en la obesidad con respecto al sobrepeso y el estado delgado. Este dato sugiere la llegada de monocitos sanguíneos al tejido durante el aumento de peso, lo cual fue consistente con la mayor densidad de estas células encontradas mediante microscopía. En conjunto con estos datos, proponemos que los macrófagos de tipo M2 encontrados en el tejido adiposo de los sujetos obesos podrían provenir del reclutamiento de monocitos, en este caso no con el fin de promover la respuesta inflamatoria sino como parte de un mecanismo regulatorio. De manera inesperada no observamos cambios en la expresión del ligando con el aumento de la adiposidad; a pesar de ser uno de los genes mayormente expresados en este tejido con respecto a los demás transcritos evaluados. Es probable que el reclutamiento de monocitos en estos individuos esté mediado por otras quimiocinas u otros factores además de CCL2, de hecho, diversos autores proponen esto ya que se ha observado que la ausencia del gen de esta quimiocina, así como el uso de bloqueadores químicos de su función no logra abatir completamente el reclutamiento de los macrófagos, por otro lado, no descartamos la posibilidad que al evaluar los niveles de la proteína hubiésemos encontrado diferencias. Una de las quimiocinas que comparte receptor con CCL2 es CCL7 la cual se ha encontrado también aumentada en el tejido adiposo de los sujetos obesos con respecto a los delgados, por lo tanto, cabe la posibilidad que el incremento de monocitos que observamos también pueda deberse a la acción de esta quimiocina, aunque no evaluamos su expresión en este grupo de individuos y se ha correlacionado con la expresión de TNF (104).

En este trabajo también evaluamos la posible participación de la leptina en la adquisición del fenotipo inflamatorio de los macrófagos del tejido adiposo. En diversos estudios se ha planteado la función proinflamatoria de la leptina sobre células del sistema monocítico-macrofágico y debido a que es una adipocina que se incrementa en con la obesidad, sugerimos que podría tener un papel importante en la repolarización de los macrófagos residentes del tejido adiposo, para ello,

realizamos ensayos *in vitro* en los cuales generamos macrófagos con características antiinflamatorias o de tipo M2 y se estimularon con leptina. A nivel de secreción de citocinas, obtuvimos efectos poco notables en el TNF, sin embargo, logramos observar un claro efecto inhibitorio en la secreción de la IL-10 en los macrófagos de tipo M2, que se hizo más evidente a mayor concentración de la adipocina; en conjunto con una disminución en la expresión de su transcrito, lo cual concuerda con su papel proinflamatorio. En la literatura se ha reportado que los ratones deficientes de leptina o del receptor de leptina en un modelo de artritis muestran una producción incrementada de IL-10, lo cual sugiere que la leptina regula la expresión de esta citocina. Sin embargo, no hay estudios que muestren la función directa de la leptina sobre la secreción de esta citocina en macrófagos generados *in vitro*, al menos en nuestro conocimiento; por lo tanto, sería la primera vez que se describe su función inhibitoria sobre la IL-10 en este tipo celular en particular. El único estudio que evalúa la función de la leptina sobre macrófagos utiliza un sistema experimental distinto al nuestro, en el cual se diferencian macrófagos en presencia de suero y leptina. Los macrófagos en contacto con la leptina, a diferencia de nuestros hallazgos, adquieren la capacidad de secretar IL-10 en niveles similares a los macrófagos M2 que fueron polarizados con el estímulo de IL-4 (105). Con respecto a la secreción de TNF en donde no encontramos cambios, existen estudios en los cuales muestran que la leptina por sí sola no induce la secreción de TNF en monocitos primarios, células THP-1 ni macrófagos peritoneales, aunque logra potenciar la respuesta de los monocitos cuando son estimulados con LPS (106-108), en otros casos, solo altas concentraciones de leptina inducen la secreción de TNF y otras citocinas proinflamatorias pero a muy bajos niveles (109). Por otro lado, aunque no encontramos diferencias en la expresión de la proteína, observamos tendencias a incrementarse en los transcritos de TNF e IL6, lo cual nos indicaría que la leptina actúa principalmente a nivel de la transcripción de estas citocinas. Algunos autores sugieren la posibilidad que la leptina pudiera promover la expresión de la proteína de TNF, aunque no su secreción, pues se ha encontrado un incremento a nivel intracelular medido por citometría de flujo (106-108, 43). En este trabajo también encontramos que la leptina

induce la expresión del transcrito de *CCL2* pero solo en los macrófagos de tipo M1. La función de esta quimiocina es la de promover la migración de los monocitos al tejido adiposo durante la obesidad. Pese a que no encontramos diferencias en la expresión de esta quimiocina en los cortes de tejido, no descartamos la posibilidad que la leptina tenga cierta relevancia en el contexto de la obesidad en la amplificación de la respuesta inflamatoria al promover la expresión de *CCL2* por parte de los macrófagos proinflamatorios que comienzan a arribar al tejido adiposo, debido a que se ha observado que los ratones Ob/Ob (deficientes de leptina) y db/db (deficientes del receptor de leptina) presentan un menor número de macrófagos que el que se hubiera esperado encontrar de acuerdo con su peso corporal, por lo que se ha sugerido que la leptina tiene participación en el reclutamiento de los monocitos al tejido (110). Incluso, se ha evidenciado que la leptina por sí misma tiene un papel quimioatrayente de monocitos y macrófagos en ensayos *in vitro* (49).

La leptina ejerce su función al unirse al receptor LepRb activando varias vías de señalización como la de la cinasa Janus 2 (JAK2)/ transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3), el sustrato del receptor de la insulina (IRS)/ fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K), la proteína tirosina fosfatasa que contiene un dominio SH2 (SHP2)/ proteínas activadas por mitógenos (MAPK) y la proteína cinasa activada por AMP (AMPK)/carboxilasa acetil-CoA (ACC) tanto en el sistema nervioso central como en tejidos periféricos. La activación de las MAPK en macrófagos tiene una función en la promoción de la síntesis de citocinas proinflamatorias y tienen un papel esencial en la inflamación y resistencia a la insulina en la obesidad. Particularmente, en este estudio, esperábamos que la cinasa JNK tuviera una mayor activación en macrófagos tras el estímulo con leptina, ya que se ha demostrado que esta adipocina induce la expresión de TNF mediante la activación de JNK en la línea celular RAW264.7 (111) y se ha observado una mayor activación de JNK1/2 en el tejido adiposo, hepático y muscular en ratones obesos con respecto a los tejidos de los ratones delgados. Los ratones deficientes de JNK1 sometidos a una HFD, tienen una disminución en el grado de adiposidad y una mejora en la sensibilidad a la insulina (77), lo cual indica su papel central en la obesidad. La expresión de JNK1/2 específicamente en macrófagos, es relevante

en el desarrollo de la resistencia a la insulina y la inflamación en la obesidad, debido a que los ratones deficientes de estas cinasas muestran una disminución en la infiltración de macrófagos y en el perfil inflamatorio de estas células (78), sin embargo, nuestras observaciones indican cambios no significativos en la fosforilación de esta proteína tras el estímulo con leptina.

En cuanto a la activación de los otros miembros de las MAPK, la leptina no incrementó la fosforilación de p38 aunque parece haber una ligera disminución a tiempos cortos y solo ERK se activó tras el estímulo con la leptina. El papel que se conoce de ERK en la obesidad y la diabetes ha sido obtenido al evaluar su activación y función principalmente en adipocitos. Esta cinasa tiene una actividad incrementada en el tejido adiposo de roedores y humanos que son obesos y diabéticos (112-114). La inhibición química de la vía de esta cinasa en preadipocitos 3T3-L1 disminuye la expresión de adipocitocinas como  $TNF\alpha$ , IL-6, MCP-1 y PAI-1 y la actividad lipolítica (112). Un estudio reciente describe que la ausencia de ERK1 en ratones sometidos a una dieta alta en grasas genera un mayor aumento de peso y mayor resistencia a la insulina que en los ratones WT sugiriendo un papel crucial en la regulación de la obesidad (113).

La activación de la vía de ERK inducido por la leptina ha sido ampliamente estudiado en el sistema nervioso y diversas líneas celulares. En macrófagos, solo conocemos un estudio realizado en la línea celular RAW264.7 en los cuales el estímulo de leptina incrementa la fosforilación de esta cinasa (109); sin embargo, no se aborda su función. En general, la importancia de ERK en el contexto del tejido adiposo particularmente en los macrófagos que residen en este tejido, se ha estudiado mucho menos en comparación con JNK. Por datos no publicados de nuestro laboratorio conocemos que ERK tiene una función importante en la secreción del TNF en macrófagos de tipo inflamatorio y antiinflamatorio ya que la inhibición química de su señalización abate la producción de esta citocina. A pesar de que solo observamos tendencias en la inducción de TNF en los macrófagos tras el estímulo con leptina, sugerimos la posibilidad de que la leptina posea una función reguladora sobre la expresión de esta citocina a través de la vía de ERK.

## CONCLUSIONES

- Las diferencias más significativas en cuanto al número y fenotipo de los ATMs con respecto al grado de adiposidad fueron presentadas en el SAT sin diferencias en el VAT.
- En sujetos con sobrepeso detectamos los niveles más altos de marcadores proinflamatorios, lo cual podría estar relacionado con el inicio de una expansión anómala del tejido adiposo.
- Estos datos sugieren que la obesidad está asociada con la abundancia de ATMs solo en el SAT, aunque no tenemos clara la razón de este hallazgo, sugerimos que podría deberse a un mejor control en los parámetros metabólicos en estos individuos por lo que no se reflejan cambios en el VAT.
- Los macrófagos de tipo anti-inflamatorio encontrados en el tejido adiposo de los individuos obesos podrían derivar de los monocitos sanguíneos y la presencia de estos perfiles podrían cumplir funciones de remodelación del tejido, coadyuvando en la remoción de los adipocitos necróticos, angiogénesis, adipogénesis y contrarrestando la inflamación.
- La leptina promueve la repolarización de los macrófagos homeostáticos del tejido adiposo mediante la supresión de la IL-10 y la promoción de la expresión de citocinas proinflamatorias. La función de esta adipocina sobre los ATMs podría estar mediada principalmente a través de la vía de ERK.

## PERSPECTIVAS

- Analizar la expresión de marcadores de macrófagos en un grupo de individuos que presentan comorbilidades asociadas a la obesidad para dilucidar si las variaciones en el VAT dependen del estado metabólico del individuo/ resistencia a la insulina.
- Obtener muestras de tejido adiposo a partir de liposucciones para realizar la separación de la fracción vascular estromal con el fin de caracterizar las poblaciones individuales de macrófagos en la obesidad en pacientes sanos y con comorbilidades asociadas.
- Determinar la expresión de genes asociados a la remodelación de tejidos en el tejido adiposo de los grupos de estudio.
- Realizar ensayos de inhibición química sobre la vía de ERK tras el estímulo con leptina para evaluar los cambios en la expresión de citocinas y dilucidar su implicación en la regulación de éstas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Shen, W., Wang, Z., Punyanita, M., Lei, J., Sinav, A., Kral, J. G., & Heymsfield, S. B. (2003). Adipose tissue quantification by imaging methods: a proposed classification. *Obesity research*, 11(1), 5-16.
2. AL-Suhaimi, E. A., & Shehzad, A. (2013). Leptin, resistin and visfatin: the missing link between endocrine metabolic disorders and immunity.
3. Exley, M. A., Hand, L., O'Shea, D., & Lynch, L. (2014). Interplay between the immune system and adipose tissue in obesity. *Journal of Endocrinology*, 223(2), R41-R48.
4. Suganami, T., & Ogawa, Y. (2010). Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. *Journal of leukocyte biology*, 88(1), 33-39.
5. Berg, A. H., & Scherer, P. E. (2005). Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circulation research*, 96(9), 939-949.
6. Martinez-Santibañez, G., & Nien-Kai Lumeng, C. (2014). Macrophages and the regulation of adipose tissue remodeling. *Annual review of nutrition*, 34, 57-76.
7. Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Ferrante Jr, A. W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of clinical investigation*, 112(12), 1796.
8. Zeyda, M., & Stulnig, T. M. (2007). Adipose tissue macrophages. *Immunology letters*, 112(2), 61-67.
9. Sørensen, L. P., Parkner, T., Søndergaard, E., Bibby, B. M., Møller, H. J., & Nielsen, S. (2015). Visceral obesity is associated with increased soluble CD163 concentration in men with type 2 diabetes mellitus. *Endocrine connections*, 4(1), 27-36.
10. Hill, A. A., Reid Bolus, W., & Hasty, A. H. (2014). A decade of progress in adipose tissue macrophage biology. *Immunological reviews*, 262(1), 134-152.
11. Lumeng, C. N., Deyoung, S. M., Saltiel, A. R. (2007). Macrophages block insulin action in adipocytes by altering expression of signaling and glucose transport proteins. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 292(1), E166-E174.
12. Lacasa, D., Taleb, S., Keophiphath, M., Miranville, A., & Clement, K. (2007). Macrophage-secreted factors impair human adipogenesis: involvement of proinflammatory state in preadipocytes. *Endocrinology*, 148(2), 868-877.
13. Kratz, M., Coats, B. R., Hisert, K. B., Hagman, D., Mutskov, V., Peris, E., Becker, L. (2014). Metabolic dysfunction drives a mechanistically distinct proinflammatory phenotype in adipose tissue macrophages. *Cell metabolism*, 20(4), 614-625.
14. Greenberg, A. S., & Obin, M. S. (2006). Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *The American journal of clinical nutrition*, 83(2), 461S-465S.
15. Canello, R., Tordjman, J., Poitou, C., Guilhem, G., Bouillot, J. L., Hugol, D., ... & Clément, K. (2006). Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity. *Diabetes*, 55(6), 1554-1561.
16. Canello, R., Henegar, C., Viguerie, N., Taleb, S., Poitou, C., Rouault, C., ... & Clément, K. (2005). Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes*, 54(8), 2277-2286.

17. Kanda, H., Tateya, S., Tamori, Y., Kotani, K., Hiasa, K. I., Kitazawa, R., Kasuga, M. (2006). MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *Journal of Clinical Investigation*, 116(6), 1494.
18. Weisberg, S. P., Hunter, D., Huber, R., Lemieux, J., Slaymaker, S., Vaddi, K., Ferrante Jr, A. W. (2006). CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *Journal of Clinical Investigation*, 116(1), 115.
19. Kraakman, M. J., Kammoun, H. L., Allen, T. L., Deswaerte, V., Henstridge, D. C., Estevez, E., Febbraio, M. A. (2015). Blocking IL-6 trans-signaling prevents high-fat diet-induced adipose tissue macrophage recruitment but does not improve insulin resistance. *Cell metabolism*, 21(3), 403-416.
20. Martinez, F. O., Sica, A., Mantovani, A., & Locati, M. (2007). Macrophage activation and polarization. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 13, 453-461.
21. Lumeng, C. N., Bodzin, J. L., & Saltiel, A. R. (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *Journal of Clinical Investigation*, 117(1), 175.
22. Cinti, S., Mitchell, G., Barbatelli, G., Murano, I., Ceresi, E., Faloia, E., ... & Obin, M. S. (2005). Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *Journal of lipid research*, 46(11), 2347-2355.
23. Shaul ME, Bennett G, Strissel KJ, Greenberg AS, Obin MS. (2010) Dynamic, M2-like remodeling phenotypes of CD11c+ adipose tissue macrophages during high-fat diet--induced obesity in mice. *Diabetes*. 59(5):1171-81.
24. Aron-Wisnewsky, J., Tordjman, J., Poitou, C., Darakhshan, F., Hugol, D., Basdevant, A., ... & Clement, K. (2009). Human adipose tissue macrophages: m1 and m2 cell surface markers in subcutaneous and omental depots and after weight loss. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 94(11), 4619-4623.
25. Fjeldborg, K., Pedersen, S. B., Møller, H. J., Christiansen, T., Bennetzen, M., & Richelsen, B. (2014). Human adipose tissue macrophages are enhanced but changed to an anti-inflammatory profile in obesity. *Journal of immunology research*, 2014.
26. Bourlier, V., Zakaroff-Girard, A., Miranville, A., De Barros, S., Maumus, M., Sengenès, C., ... & Bouloumié, A. (2008). Remodeling phenotype of human subcutaneous adipose tissue macrophages. *Circulation*, 117(6), 806-815.
27. Spencer M, Yao-Borengasser A, Unal R, Rasouli N, Gurley CM, Zhu B, Peterson CA, Kern PA. (2010). Adipose tissue macrophages in insulin-resistant subjects are associated with collagen VI and fibrosis and demonstrate alternative activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 299(6):E1016-27.
28. Wentworth, J. M., Naselli, G., Brown, W. A., Doyle, L., Phipson, B., Smyth, G. K., & Harrison, L. C. (2010). Pro-inflammatory CD11c+ CD206+ adipose tissue macrophages are associated with insulin resistance in human obesity. *Diabetes*, 59(7), 1648-1656.
29. Aszmann, O., Speiser, M., Györi, G., Stulnig, T. M. (2007). Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production. *International journal of obesity*, 31(9), 1420-1428.
30. Morris, D. L., Cho, K. W., DelProposto, J. L., Oatmen, K. E., Geletka, L. M., Martinez-Santibanez, G., Lumeng, C. N. (2013). Adipose tissue macrophages function as antigen-presenting cells and regulate adipose tissue CD4+ T cells in mice. *Diabetes*, 62(8), 2762-2772.
31. Lee, B. C., & Lee, J. (2014). Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1842(3), 446-462.

32. Elgazar-Carmon, V., Rudich, A., Hadad, N., & Levy, R. (2008). Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding. *Journal of lipid research*, 49(9), 1894-1903.
33. Talukdar S, Oh da Y, Bandyopadhyay G, Li D, Xu J, McNelis J, Lu M, Li P, Yan Q, Zhu Y, Ofrecio J, Lin M, Brenner MB, Olefsky JM. Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. *Nat Med*. 2012; 18:1407–1412.
34. Wu, D., Molofsky, A. B., Liang, H. E., Ricardo-Gonzalez, R. R., Jouihan, H. A., Bando, J. K., ... & Locksley, R. M. (2011). Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science*, 332(6026), 243-247.
35. Stefanovic-Racic, M., Yang, X., Turner, M. S., Mantell, B. S., Stolz, D. B., Sumpster, T. L., ... & O'Doherty, R. M. (2012). Dendritic cells promote macrophage infiltration and comprise a substantial proportion of obesity-associated increases in CD11c+ cells in adipose tissue and liver. *Diabetes*, 61(9), 2330-2339.
36. Bertola, A., Ciucci, T., Rousseau, D., Bourlier, V., Duffaut, C., Bonnafous, S., ... & Wakkach, A. (2012). Identification of adipose tissue dendritic cells correlated with obesity-associated insulin-resistance and inducing Th17 responses in mice and patients. *Diabetes*, 61(9), 2238-2247.
37. Patsouris, D., Li, P. P., Thapar, D., Chapman, J., Olefsky, J. M., & Neels, J. G. (2008). Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals. *Cell metabolism*, 8(4), 301-309.
38. Winer, S., Chan, Y., Paltser, G., Truong, D., Tsui, H., Bahrami, J., ... & Dosch, H. M. (2009). Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nature medicine*, 15(8), 921-929.
39. Rocha, V. Z., Folco, E. J., Sukhova, G., Shimizu, K., Gotsman, I., Vernon, A. H., & Libby, P. (2008). Interferon- $\gamma$ , a Th1 Cytokine, Regulates Fat Inflammation A Role for Adaptive Immunity in Obesity. *Circulation research*, 103(5), 467-476.
40. Feuerer, M., Herrero, L., Cipolletta, D., Naaz, A., Wong, J., Nayer, A., ... & Mathis, D. (2009). Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nature medicine*, 15(8), 930-939.
41. Andrade-Oliveira, V., Câmara, N. O., Moraes-Vieira, P. M. (2015). Adipokines as Drug Targets in Diabetes and Underlying Disturbances. *Journal of diabetes research*, 2015.
42. Zhang F, Chen Y, Heiman M, Dimarchi R. Leptin: structure, function and biology. *Vitam Horm*. 2005;71:345-72.
43. Zarkesh-Esfahani, H., Pockley, G., Metcalfe, R. A., Bidlingmaier, M., Wu, Z., Ajami, A., Ross, R. J. (2001). High-dose leptin activates human leukocytes via receptor expression on monocytes. *The Journal of Immunology*, 167(8), 4593-4599.
44. Jitprasertwong, P., Jaedicke, K. M., Nile, C. J., Preshaw, P. M., Taylor, J. J. (2014). Leptin enhances the secretion of interleukin (IL)-18, but not IL-1 $\beta$ , from human monocytes via activation of caspase-1. *Cytokine*, 65(2), 222-230.
45. Mancuso, P., Gottschalk, A., Phare, S. M., Peters-Golden, M., Lukacs, N. W., Huffnagle, G. B. (2002). Leptin-deficient mice exhibit impaired host defense in Gram-negative pneumonia. *The Journal of Immunology*, 168(8), 4018-4024.
46. Mancuso, P., Canetti, C., Gottschalk, A., Tithof, P. K., & Peters-Golden, M. (2004). Leptin augments alveolar macrophage leukotriene synthesis by increasing phospholipase activity and enhancing group IVC iPLA2 (cPLA2 $\gamma$ ) protein expression. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 287(3), L497-L502.

47. Gregor, M. F., & Hotamisligil, G. S. (2011). Inflammatory mechanisms in obesity. *Annual review of immunology*, 29, 415-445.
48. Fraser, D. A., Thoen, J., Reseland, J. E., Førre, Ø., Kjeldsen-Kragh, J. (1999). Decreased CD4+ lymphocyte activation and increased interleukin-4 production in peripheral blood of rheumatoid arthritis patients after acute starvation. *Clinical rheumatology*, 18(5), 394-401.
49. Gruen, M. L., Hao, M., Piston, D. W., Hasty, A. H. (2007). Leptin requires canonical migratory signaling pathways for induction of monocyte and macrophage chemotaxis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 293(5), C1481-C1488.
50. Acedo SC, Gambero S, Cunha FG, Lorand-Metze I, Gambero A. (2013). Participation of leptin in the determination of the macrophage phenotype: an additional role in adipocyte and macrophage crosstalk. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 49(6):473-8.
51. Dib, L. H., Ortega, M. T., Fleming, S. D., Chapes, S. K., & Melgarejo, T. (2013). Bone marrow leptin signaling mediates obesity-associated adipose tissue inflammation in male mice. *Endocrinology*, 155(1), 40-6.
52. Matarese, G., Moschos, S., Mantzoros, C. S. (2005). Leptin in immunology. *The Journal of Immunology*, 174(6), 3137-3142
53. Lord, G. M., Matarese, G., Howard, J. K., Baker, R. J., Bloom, S. R., Lechler, R. I. (1998). Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature*, 394(6696), 897-901.
54. Takahashi, N., Waelpu, W., Guisez, Y. (1999). Leptin is an endogenous protective protein against the toxicity exerted by tumor necrosis factor. *The Journal of experimental medicine*, 189(1), 207-a.
55. Jamaluddin, M. S., Weakley, S. M., Yao, Q., Chen, C. (2012). Resistin: functional roles and therapeutic considerations for cardiovascular disease. *British journal of pharmacology*, 165(3), 622-632.
56. AL-Suhaimi, E. A., Shehzad, A. (2013). Leptin, resistin and visfatin: the missing link between endocrine metabolic disorders and immunity. *prostaglandins*, 3, 7.
57. Lee, T. S., Lin, C. Y., Tsai, J. Y., Wu, Y. L., Su, K. H., Lu, K. Y., Ho, L. T. (2009). Resistin increases lipid accumulation by affecting class A scavenger receptor, CD36 and ATP-binding cassette transporter-A1 in macrophages. *Life sciences*, 84(3), 97-104.
58. Silswal, N., Singh, A. K., Aruna, B., Mukhopadhyay, S., Ghosh, S., Ehtesham, N. Z. (2005). Human resistin stimulates the pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-12 in macrophages by NF- $\kappa$ B-dependent pathway. *Biochemical and biophysical research communications*, 334(4), 1092-1101.
59. Kaser, S., Kaser, A., Sandhofer, A., Ebenbichler, C. F., Tilg, H., Patsch, J. R. (2003). Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines in vitro. *Biochemical and biophysical research communications*, 309(2), 286-290.
60. Qatanani, M., Szwegold, N. R., Greaves, D. R., Ahima, R. S., Lazar, M. A. (2009). Macrophage-derived human resistin exacerbates adipose tissue inflammation and insulin resistance in mice. *The Journal of clinical investigation*, 119(3), 531.
61. Sood, A., Shore, S. A. (2013). Adiponectin, leptin, and resistin in asthma: basic mechanisms through population studies. *Journal of allergy*, 2013.
62. Nigro, E., Scudiero, O., Monaco, M. L., Palmieri, A., Mazzeolla, G., Costagliola, C., Daniele, A. (2014). New insight into adiponectin role in obesity and obesity-related diseases. *BioMed research international*, 2014.
63. Ghoshal, K., Bhattacharyya, M. (2015). Adiponectin: Probe of the molecular paradigm associating diabetes and obesity. *World journal of diabetes*, 6(1), 151.

64. Ouchi, N., Kihara, S., Arita, Y., Nishida, M., Matsuyama, A., Okamoto, Y., Matsuzawa, Y. (2001). Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation*, 103(8), 1057-1063.
65. Kadowaki, T., Yamauchi, T., Kubota, N., Hara, K., Ueki, K., Tobe, K. (2006). Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, 116(7), 1784.
66. Kumada, M., Kihara, S., Ouchi, N., Kobayashi, H., Okamoto, Y., Ohashi, K., Matsuzawa, Y. (2004). Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages. *Circulation*, 109(17), 2046-2049.
67. Ohashi, K., Parker, J. L., Ouchi, N., Higuchi, A., Vita, J. A., Gokce, N., Walsh, K. (2010). Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype. *Journal of Biological Chemistry*, 285(9), 6153-6160.
68. Park, P. H., McMullen, M. R., Huang, H., Thakur, V., & Nagy, L. E. (2007). Short-term Treatment of RAW264. 7 Macrophages with Adiponectin Increases Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) Expression via ERK1/2 Activation and Egr-1 Expression: ROLE OF TNF- $\alpha$  IN ADIPONECTIN-STIMULATED INTERLEUKIN-10 PRODUCTION. *Journal of Biological Chemistry*, 282(30), 21695-21703.
69. Zhao, T., Hou, M., Xia, M., Wang, Q., Zhu, H., Xiao, Y., ... & Ling, W. (2005). Globular adiponectin decreases leptin-induced tumor necrosis factor- $\alpha$  expression by murine macrophages: involvement of cAMP-PKA and MAPK pathways. *Cellular immunology*, 238(1), 19-30.
70. Thakur, V., Pritchard, M. T., McMullen, M. R., & Nagy, L. E. (2006). Adiponectin normalizes LPS-stimulated TNF- $\alpha$  production by rat Kupffer cells after chronic ethanol feeding. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 290(5), G998-G1007.
71. Saijo, S., Nagata, K., Nakano, Y., Tobe, T., & Kobayashi, Y. (2005). Inhibition by adiponectin of IL-8 production by human macrophages upon coculturing with late apoptotic cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 334(4), 1180-1183.
72. Manigrasso, M. R., Ferroni, P., Santilli, F., Taraborelli, T., Guagnano, M. T., Michetti, N., & Davi, G. (2005). Association between circulating adiponectin and interleukin-10 levels in android obesity: effects of weight loss. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90(10), 5876-5879.
73. Mandal, P., Pratt, B. T., Barnes, M., McMullen, M. R., Nagy, L. E. (2011). Molecular mechanism for adiponectin-dependent m2 macrophage polarization link between the metabolic and innate immune activity of full-length adiponectin. *Journal of Biological Chemistry*, 286(15), 13460-13469.
74. Aguirre, V., Uchida, T., Yenush, L., Davis, R., White, M. F. (2000). The c-Jun NH2-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser307. *Journal of Biological Chemistry*, 275(12), 9047-9054.
75. Aguirre, V., Werner, E. D., Giraud, J., Lee, Y. H., Shoelson, S. E., White, M. F. (2002). Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *Journal of Biological Chemistry*, 277(2), 1531-1537.
76. Lee, Y. H., Giraud, J., Davis, R. J., White, M. F. (2003). c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *Journal of Biological Chemistry*, 278(5), 2896-2902.

77. Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Görgün, C. Z., Uysal, K. T., Maeda, K., Hotamisligil, G. S. (2002). A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*, 420(6913), 333-336
78. Han, M. S., Jung, D. Y., Morel, C., Lakhani, S. A., Kim, J. K., Flavell, R. A., Davis, R. J. (2013). JNK expression by macrophages promotes obesity-induced insulin resistance and inflammation. *Science*, 339(6116), 218-222.
79. Sabio, G., Davis, R. J. (2010). cJun NH 2-terminal kinase 1 (JNK1): roles in metabolic regulation of insulin resistance. *Trends in biochemical sciences*, 35(9), 490-496.
80. Jialal, I., Kaur, H., Devaraj, S. (2013). Toll-like receptor status in obesity and metabolic syndrome: a translational perspective. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 99(1), 39-48.
81. Dobrowsky, R. T., Kamibayashi, C., Mumby, M. C., Hannun, Y. A. (1993). Ceramide activates heterotrimeric protein phosphatase 2A. *Journal of Biological Chemistry*, 268(21), 15523-15530.
82. Haus, J. M., Kashyap, S. R., Kasumov, T., Zhang, R., Kelly, K. R., DeFronzo, R. A., Kirwan, J. P. (2009). Plasma ceramides are elevated in obese subjects with type 2 diabetes and correlate with the severity of insulin resistance. *Diabetes*, 58(2), 337-343.
83. Shi, H., Kokoeva, M. V., Inouye, K., Tzameli, I., Yin, H., Flier, J. S. (2006). TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 116(11), 3015.
84. Arkan, M. C., Hevener, A. L., Greten, F. R., Maeda, S., Li, Z. W., Long, J. M., Karin, M. (2005). IKK- $\beta$  links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nature medicine*, 11(2), 191-198.
85. Suganami, T., Mieda, T., Itoh, M., Shimoda, Y., Kamei, Y., Ogawa, Y. (2007). Attenuation of obesity-induced adipose tissue inflammation in C3H/HeJ mice carrying a Toll-like receptor 4 mutation. *Biochemical and biophysical research communications*, 354(1), 45-49.
86. Creely, S. J., McTernan, P. G., Kusminski, C. M., Da Silva, N. F., Khanolkar, M., Evans, M., Kumar, S. (2007). Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 292(3), E740-E747.
87. González-Domínguez É, Samaniego R, Flores-Sevilla JL, Campos-Campos SF, Gómez-Campos G, Salas A, Campos-Peña V, Corbí ÁL, Sánchez-Mateos P, Sánchez-Torres C. (2015). CD163L1 and CLEC5A discriminate subsets of human resident and inflammatory macrophages in vivo. *J. Leukoc. Biol.* pii: jlb.3HI1114-531R.
88. Ibrahim MM (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev.* ;11(1):11-8.
89. Bruun JM, Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B (2005). Monocyte chemoattractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): implication of macrophages resident in the AT. *J Clin Endocrinol Metab.* Apr;90(4):2282-9.
90. Curat CA, Wegner V, Sengenès C, Miranville A, Tonus C, Busse R, Bouloumié A (2006). Macrophages in human visceral adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin. *Diabetologia.* 49(4):744-7.
91. Nakajima S, Koh V, Kua LF, So J, Davide L, Lim KS, Petersen SH, Yong WP, Shabbir A, Kono K. (2016). Accumulation of CD11c+CD163+ Adipose Tissue Macrophages through Upregulation of Intracellular 11 $\beta$ -HSD1 in Human Obesity. *J Immunol.* 197(9):3735-3745.

92. Bigornia SJ, Farb MG, Mott MM, Hess DT, Carmine B, Fiscale A, Joseph L, Apovian CM, Gokce N. (2012). Relation of depot-specific adipose inflammation to insulin resistance in human obesity. *Nutr Diabetes*.2: e30.
93. Barbarroja N, López-Pedreira R, Mayas MD, García-Fuentes E, Garrido-Sánchez L, Macías-González M, El Bekay R, Vidal-Puig A, Tinahones FJ. (2010). The obese healthy paradox: is inflammation the answer? *Biochem J*. 430(1):141-9.
94. Strissel KJ, Stancheva Z, Miyoshi H, Perfield JW 2nd, DeFuria J, Jick Z, Greenberg AS, Obin MS. (2007). Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes*. 56(12):2910-8
95. Muir LA, Neeley CK, Meyer KA, Baker NA, Brosius AM, Washabaugh AR, Varban OA, Finks JF, Zamarron BF, Flesher CG, Chang JS, DelProposto JB, Geletka L, Martinez-Santibanez G, Kaciroti N, Lumeng CN, O'Rourke RW. (2016) Adipose tissue fibrosis, hypertrophy, and hyperplasia: Correlations with diabetes in human obesity. *Obesity (Silver Spring)*. 24(3):597-605
96. Divoux A, Tordjman J, Lacasa D, Veyrie N, Hugol D, Aissat A, Basdevant A, Guerre-Millo M, Poitou C, Zucker JD, Bedossa P, Clément K. (2010). Fibrosis in human adipose tissue: composition, distribution, and link with lipid metabolism and fat mass loss. *Diabetes*. 59(11):2817-25.
97. Pang C, Gao Z, Yin J, Zhang J, Jia W, Ye J. (2008). Macrophage infiltration into adipose tissue may promote angiogenesis for adipose tissue remodeling in obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*.295(2):E313-22.
98. Lee YH, Thacker RI, Hall BE, Kong R, Granneman JG. (2014). Exploring the activated adipogenic niche: interactions of macrophages and adipocyte progenitors. *Cell Cycle*. 13(2):184-90.
99. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Hosoya Y, Yamashita H, Fujita H, Ohsugi M, Tobe K, Kadowaki T, Nagai R, Sugiura S. (2007). Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels. *Diabetes*. 56(6):1517-26.
100. Kowalski GM, Nicholls HT, Risis S, Watson NK, Kanellakis P, Bruce CR, Bobik A, Lancaster GI, Febbraio MA. (2011). Deficiency of haematopoietic-cell-derived IL-10 does not exacerbate high-fat-diet-induced inflammation or insulin resistance in mice. *Diabetologia*. 54(4):888-99.
101. den Boer MA, Voshol PJ, Schröder-van der Elst JP, Korshennikova E, Ouwens DM, Kuipers F, Havekes LM, Romijn JA. (2006). Endogenous interleukin-10 protects against hepatic steatosis but does not improve insulin sensitivity during high-fat feeding in mice. *Endocrinology*. 147(10):4553-8.
102. Juge-Aubry CE, Somm E, Pernin A, Alizadeh N, Giusti V, Dayer JM, Meier CA. (2005). Adipose tissue is a regulated source of interleukin-10. *Cytokine*. 29(6):270-4
103. Takahashi K, Mizuarai S, Araki H, Mashiko S, Ishihara A, Kanatani A, Itadani H, Kotani H. (2003) Adiposity elevates plasma MCP-1 levels leading to the increased CD11b-positive monocytes in mice. *J Biol Chem*. 278(47):46654-60.
104. Tourniaire F, Romier-Crouzet B, Lee JH, Marcotorchino J, Gouranton E, Salles J, Malezet C, Astier J, Darmon P, Blouin E, Walrand S, Ye J, Landrier JF. (2013). Chemokine Expression in Inflamed Adipose Tissue Is Mainly Mediated by NF-κB. *PLoS One*. 8(6):e66515.
105. Jaedicke KM, Roythorne A, Padget K, Todryk S, Preshaw PM, Taylor JJ. (2013). Leptin up-regulates TLR2 in human monocytes. *J Leukoc Biol*. 93(4):561-71.
106. Loffreda S, Yang SQ, Lin HZ, Karp CL, Brengman ML, Wang DJ, Klein AS, Bulkley GB, Bao C, Noble PW, Lane MD, Diehl AM. (1998). Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J*. 12(1):57-65

107. Santos-Alvarez J, Goberna R, Sánchez-Margalet V. (1999). Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes. *Cell Immunol.* 194(1):6-11
108. Tsiotra PC, Boutati E, Dimitriadis G, Raptis SA. (2013). High insulin and leptin increase resistin and inflammatory cytokine production from human mononuclear cells. *Biomed Res Int.* 2013:487081.
109. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest.* 112(12):1821-30.
110. Lee SM, Choi HJ, Oh CH, Oh JW, Han JS. (2014) Leptin increases TNF- $\alpha$  expression and production through phospholipase D1 in Raw 264.7 cells. *PLoS One.* 9(7):e102373.
111. Ozaki KI, Awazu M, Tamiya M, Iwasaki Y, Harada A, Kugisaki S, Tanimura S, Kohno M. (2016). Targeting the ERK signaling pathway as a potential treatment for insulin resistance and type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 310(8):E643-E651.
112. Bashan N, Dorfman K, Tarnovscki T, Harman-Boehm I, Liberty IF, Blüher M, Ovadia S, Maymon-Zilberstein T, Potashnik R, Stumvoll M, Avinoach E, Rudich A. (2007). Mitogen-activated protein kinases, inhibitory-kappaB kinase, and insulin signaling in human omental versus subcutaneous adipose tissue in obesity. *Endocrinology.* 148(6):2955-62.
113. Carlson CJ, Koterski S, Sciotti RJ, Poccard GB, Rondinone CM. (2003). Enhanced basal activation of mitogen-activated protein kinases in adipocytes from type 2 diabetes: potential role of p38 in the downregulation of GLUT4 expression. *Diabetes.* 52(3):634-41.
114. Khan AS, Subramaniam S, Dramane G, Khelifi D, Khan NA. (2017). ERK1 and ERK2 activation modulates diet-induced obesity in mice. *Biochimie.* 137:78-87.