

**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

Respuesta de IFN- α , IFN- β y expresión del supresor de
señalización de citocinas (SOCS3) en personas con
obesidad

POR:

ELÍ TERÁN CABANILLAS

TESIS APROBADA POR LA:

COORDINACIÓN DE NUTRICIÓN

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS

HERMOSILLO, SONORA

AGOSTO DEL 2011

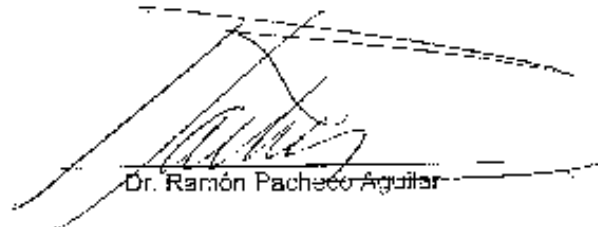
DECLARACIÓN

Se permiten y se agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente.

Para la reproducción parcial o total de este manuscrito con fines académicos, se deberá contar con la autorización del director general del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD), Apartado postal 1735, Hermosillo, Sonora, México.

Las publicaciones en comunidades científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis deberá dar créditos al CIAD, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del director de tesis.

ATENTAMENTE



Dr. Ramón Pacheco Aguilar

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Elí Terán Cabanillas, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



Dr. Jesús Hernández López

Director de Tesis



Dra. Graciela Caire Juvera



Dra. Verónica Mata Haro

Maricela Montalvo Corral

Dra. Maricela Montalvo Corral

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., bajo la dirección del Dr. Jesús Hernández y con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Fondo Sectorial SALUD-CONACYT 127013.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a las instituciones que apoyaron la realización de este trabajo. Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD, A.C.), al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico con el cual pude cursar mi maestría y por el apoyo para mi proyecto de investigación por medio del Fondo Sectorial SALUD-CONACYT 127013.

En primer lugar quisiera agradecer de manera muy especial a mi asesor de tesis Dr. Jesús Hernández L. por sus grandes enseñanzas las cuáles llevaré por siempre en mi formación académica, por su paciencia, dedicación y tiempo.

Quiero dar las gracias a la Dra. Maricela Montalvo del CIAD, A.C. por su gran apoyo durante mi maestría, por haber sido parte muy importante en la realización de esta tesis, por sus consejos y su amistad.

A la QB Mónica Reséndiz por el valioso apoyo técnico para el desarrollo de mi trabajo de investigación.

A mi comité de tesis por su guía y el tiempo dedicado al desarrollo y evaluación de este trabajo, estuvo integrado por la Dra. Maricela Montalvo, Dra Graciela Caire y Dra. Verónica Mata Haro.

También quiero agradecer a la Coordinación de docencia por el apoyo y amabilidad durante estos dos años.

Agradezco a mis compañeros de maestría de la generación 2009-2011 por hacer esta etapa de mi vida una de las más agradables.

Gracias a mis amigos del laboratorio de inmunología por su apoyo incondicional, por su amistad y por los buenos momentos que pase con ustedes.

Por último, por ser los más importantes, agradezco a mi familia. A mis padres ejemplo de superación y amor, a Marissa y Gabrielito por su amor, sin ellos nada de esto fuera posible, los amo.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi Padre Liberato Terán, por ser el ejemplo de vida más grandioso en todos los aspectos. A mi madre, por su amor y dedicación. Todo se los debo a ustedes, los amo con todas mis fuerzas.

A Marissa por su amor y paciencia. A Gabrielito Terán por enseñarme una nueva manera de amar, por ser la mayor de las motivaciones.

Al Tata Chico por los recuerdos, por su vida.

ÍNDICE

FIGURAS	x
RESUMEN	xi
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN.....	2
Obesidad.....	2
Tejido Adiposo y Respuesta Inmune	3
Obesidad y Respuesta Inmune Deficiente.....	5
Características y Función de los Interferones Tipo I	7
Supresor de Señalización de Citocinas (SOCS)	10
HIPÓTESIS	13
OBJETIVOS	13
Objetivo General	13
Objetivos Específicos.....	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
Población de Estudio	14
Muestras de Sangre.....	14
Separación de Células Mononucleares (CMN)	14
Estimulación con Ligandos de TLR-7 y Poly I:C en CMN	15
Extracción de RNA Total.....	16
RT-PCR en Tiempo Real (RT-qPCR)	16
ELISA de IFN- α e IFN- β	17
ELISA de Citocinas Pro-inflamatorias IL-6 e IL-1 β	17
Análisis Estadístico	18
RESULTADOS	19
Características de los Voluntarios.....	19
Efecto de la Obesidad en la Expresión de IFN- α	21
Efecto de la obesidad en la secreción de IFN- α e IFN- β	22
Expresión de SOCS3 en CMN Estimuladas	23

Secreción de Citocinas Proinflamatorias IL-6 e IL-1 β en CMN Estimuladas.....	24
DISCUSIÓN	26
CONCLUSIONES.....	31
BIBLIOGRAFÍA	32

FIGURAS

Figura 1. Activación de interferones tipo I en infecciones virales	9
Figura 2. Regulación de la señalización de citocinas por SOCS.....	12
Figura 3. Expresión de IFN- α 2 e IFN- α 6 en CMN estimuladas	21
Figura 4. Secreción de IFN- α e IFN- β en CMN estimuladas	23
Figura 5. Expresión de SOCS3 en CMN estimuladas	24
Figura 6. Respuesta de citocinas pro-inflamatorias IL-6 e IL-1 β en CMN.	25
Figura 7. Modelo hipotético expresión elevada de SOCS3 y respuesta deficiente de interferones tipo I en personas con obesidad.	30

RESUMEN

La obesidad se ha asociado con una respuesta inmune deficiente y un incremento en la mortalidad durante infección por virus de la influenza. Los interferones- α (IFN- α) e IFN- β o interferones tipo I son citocinas claves en la respuesta inmune temprana a virus y son regulados negativamente por los supresores de señalización de citocinas (SOCS). SOCS son un grupo de 8 proteínas reguladoras, SOCS1-SOCS7 y CIS, encargadas de atenuar la transducción de señales inducida por citocinas. SOCS3 regula negativamente la respuesta de interferones tipo I, leptina e insulina, incluso SOCS3 ha sido identificado como un mediador potencial de la resistencia a leptina e insulina. Por otro lado ciertos virus son capaces de inducir la expresión de SOCS3, inhibiendo la respuesta de interferones y así evadir la respuesta inmune. En este estudio se evaluó la respuesta de IFN- α e IFN- β y su relación con la expresión de SOCS3 en personas con obesidad. Se incluyeron 60 individuos de 18-50 años. Se calculó el índice de masa corporal (kg/m^2) y los voluntarios fueron divididos en dos grupos: personas sin obesidad ($\text{IMC}<25$; $n=30$) y con obesidad ($\text{IMC}>30$; $n=30$). Los voluntarios con obesidad presentaron una respuesta de interferones tipo I deficiente al estímulo con ligandos para TLR-7 y Poly I:C comparada con los pacientes sin obesidad la cual se relacionó con la expresión del supresor de señalización de citocinas. El grupo con obesidad también presentó niveles basales de IL-6 elevados y una respuesta de las citocinas pro-inflamatorias IL-6 e IL-1 β inhibida cuando las CMN fueron estimuladas con Poly I:C.

INTRODUCCIÓN

La obesidad se ha asociado con una respuesta inmune alterada y aumento en la susceptibilidad a la infección y la mortalidad después de la infección con el virus de la influenza (Bercault *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2007; Fezeu *et al.*, 2011). La obesidad afecta la respuesta de IFN- α e IFN- β durante la infección de virus de la influenza A en ratones y provoca una respuesta de citocinas pro-inflamatorias retardada, citotoxicidad reducida de células NK y una mayor mortalidad en ratones con obesidad inducida por la dieta (Smith *et al.*, 2007). Los interferones de tipo I son las principales citocinas que participan en la respuesta inmune temprana a las infecciones virales (De Maeyer y De Maeyer-Guignard 1998) y son regulados por los supresores de la señalización de citocinas (SOCS), una de las principales familias de proteínas reguladoras encargadas de la atenuación de la transducción de señal inducida por citocinas (Vlotides *et al.*, 2004). Algunos virus son capaces de inducir la sobre-expresión de SOCS y así evadir el sistema inmune al disminuir la respuesta de interferones tipo I (Koeberlein *et al.*, 2010; Michaud *et al.*, 2010). Por otro lado, la sobreexpresión de SOCS3 también se ha relacionado con la obesidad. Personas obesas con infección crónica de hepatitis C mostraron un aumento de la expresión hepática de SOCS3, la cual se relacionó con la resistencia al tratamiento antiviral (Walsh *et al.*, 2006). Varios estudios han descrito el papel adverso de la obesidad en las infecciones virales, pero hasta donde sabemos, ningún estudio ha explorado el efecto de la obesidad en la expresión de SOCS3 y su relación en la respuesta de interferones tipo I. El propósito de este estudio fue examinar el efecto de la obesidad en la respuesta de IFN- α e IFN- β y su relación con la expresión de SOCS3.

ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

Obesidad

La obesidad es una enfermedad crónica de etiologías múltiples, incluyendo factores genéticos, metabólicos, ambientales y sociales. Está considerada la epidemia del siglo XXI, con un incremento continuo y estable (Misra y Khurana 2008; Karalis *et al.*, 2009). La Organización Mundial de la Salud clasifica con sobrepeso a las personas con un índice de masa corporal (IMC) de 25-30 kg/m²; con obesidad, a las de un IMC de 30-40 kg/m² y con obesidad mórbida, IMC de más de 40 kg/m² (Ogden *et al.*, 2007).

El sobrepeso y la obesidad han surgido como epidemia en países desarrollados desde inicios de 1980 (Bautista *et al.*, 2009). De acuerdo al National Health and Nutrition Evaluation Survey de los Estados Unidos, la prevalencia de obesidad fue de alrededor del 13% en 1960 e incrementó alrededor del 15% para 1980. Para el año 2000 alrededor del 31% de la población de Estados Unidos era obesa. La prevalencia de obesidad se duplicó en adultos y se triplicó en niños durante ese periodo de 20 años. El incremento en la prevalencia de obesidad ocurrió no solo en los Estados Unidos sino también en todo el mundo (Atkinson 2007).

En general, la prevalencia de obesidad es mayor en mujeres que en hombres, y mayor en zonas urbanas que en las rurales. La prevalencia de sobrepeso es muy alta en la mayoría de los países latinoamericanos. En el año 2000 el 60% de una población de Argentina tuvo un índice de masa corporal ≥ 25 kg/m², al igual que el 35% de la población de Brasil, el 60% de la población en México, el 68% en Paraguay y el 53% en Perú (Filozof *et al.*, 2008).

En México, datos de la Encuesta Nacional de Salud del año 2000 mostraron que el 20.4% de hombres y el 30.2% de mujeres eran obesos. Datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición del 2006 encontraron que la prevalencia de obesidad

en 33,624 adultos de 20 años de edad o mayores fue del 24.2% en hombres y del 34.5% en mujeres (Ford y Mokdad 2008)

Estos resultados demuestran que la prevalencia de obesidad en adultos en México aumentó considerablemente. La obesidad es hoy por hoy uno de los problemas más graves de salud pública del país y del mundo. Las personas con sobrepeso y obesidad tienen mayor riesgo de sufrir problemas de salud, como enfermedades cardiovasculares, diabetes, problemas de la tiroides, resistencia a insulina e inmunodeficiencia (Bautista *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009). La obesidad incrementa la morbilidad y mortalidad a través de sus múltiples efectos en cada uno de los sistemas del cuerpo humano (Falagas y Kompoti 2006), por lo que es sumamente importante investigar los mecanismos por los cuales la obesidad afecta las funciones sistémicas.

Tejido Adiposo y Respuesta Inmune

El tejido adiposo es un órgano multifuncional que juega un papel importante no solo como órgano de almacenamiento de energía, sino también llevando a cabo importantes funciones endocrinas e inmunológicas. Varias moléculas activas secretadas por los adipocitos, como interleucina 6 (IL-6), factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α por sus siglas en inglés) y leptina, pueden actuar en las células del sistema inmune ocasionando una inflamación local y sistémica (Tilg y Moschen 2006). El tejido adiposo produce sustancias con varias funciones relacionadas al sistema inmune. Además, algunas investigaciones sugieren que ciertos tipos de estrategias de reducción de peso pueden modificar y favorecer la respuesta inmunológica (Palmlblad *et al.*, 1980; Zhou *et al.*, 2011). Sin embargo, se necesitan estudios a largo plazo para observar si estos cambios afectan positivamente la habilidad de estos sujetos obesos de controlar infecciones y el desarrollo de tumores.

Un primer vínculo entre la obesidad y una citocina pro-inflamatoria vino del estudio realizado por Hotamisligil y cols., (1993), quienes establecieron el concepto del papel de TNF- α /inflamación en la obesidad. La obesidad está asociada con una respuesta inflamatoria crónica, caracterizada por una producción anormal de adipocinas y activación de algunas vías de señalización pro-inflamatorias, resultando en la inducción de marcadores biológicos de inflamación (Fried *et al.*, 1998; Bastard *et al.*, 2002). Por el contrario, una reducción en el peso corporal está acompañada por un decremento o incluso normalización de estos parámetros biológicos (Esposito *et al.*, 2003; Van Dielen *et al.*, 2004). Esta asociación es significativa, y varios estudios en modelos animales sugieren que estos procesos inflamatorios tienen relación con la obesidad y sus co-morbididades como resistencia a la insulina y leptina, diabetes tipo II y enfermedades cardiovasculares.

De las hormonas producidas por el tejido adiposo, la leptina ha sido la más estudiada. La leptina es una hormona encargada de regular el apetito y el peso corporal a través de su interacción neuronal en el hipotálamo. Se sabe que el IMC es el determinante principal de la cantidad de leptina circulante en el cuerpo (Geloneze *et al.*, 2001). Su receptor funcional no solo se expresa en el hipotálamo, donde la leptina regula la homeostasis energética y la función neuroendócrina, sino también en la mayoría de las células del sistema inmune (La Cava y Matarese 2004).

El papel de los adipocitos en disfunciones metabólicas ha sido considerado desde hace tiempo, sin embargo su papel potencial en los procesos inflamatorios es un concepto relativamente nuevo. Estudios recientes indican que los adipocitos comparten ciertas propiedades con las células del sistema inmune como la activación del complemento (Rosen *et al.*, 1989) y producción de citocinas pro-inflamatorias (Hotamisligil *et al.*, 1993). Precusores de células grasas también comparten características con los macrófagos. Los pre-adipocitos tienen la capacidad de llevar a cabo fagocitosis en respuesta de distintos estímulos (Cousin *et al.*, 1999; Charrière *et al.*, 2003). Incluso, numerosos genes que codifican para factores de transcripción, moléculas de señalización de la respuesta inflamatoria y transportadores de ácidos

grasos, son esenciales para la biología de los adipocitos, los cuales son expresados y funcionales también en los macrófagos (Nagy *et al.*, 1998; Tontonoz *et al.*, 1998).

Obesidad y Respuesta Inmune Deficiente

Estudios que evalúan la respuesta inmune en personas con obesidad y en animales experimentales indican que el exceso de tejido adiposo está asociado con una respuesta inmune deficiente (Amar *et al.*, 2007). La obesidad ha sido asociada a una mayor tasa de infección y a algunos tipos de cáncer (Moulin *et al.*, 2009). Factores nutricionales, metabólicos y endocrinológicos están implicados en los cambios inmunológicos.

Existe evidencia que sugiere que los pre-adipocitos pueden actuar como células tipo macrófagos, apoyando la idea de una participación del tejido adiposo en los procesos inflamatorios (Cousin *et al.*, 1999). Además, se ha estimado que el porcentaje de macrófagos en el tejido adiposo va de menos del 10% en ratones y humanos magros al 40-50% en humanos con obesidad (Weisberg *et al.*, 2003).

Las personas con obesidad presentan una mayor cantidad de leptina circulante. Esta elevación crónica al parecer provoca un estado de resistencia a la leptina el cual puede ser desventajoso para el sistema inmune. Muchos estudios demuestran el papel de la leptina en el sistema inmune. Por ejemplo, ratones infectados con *Klebsiella pneumoniae*, mostraron una concentración de leptina elevada después de la infección, estos ratones tuvieron una sobrevivencia normal durante la infección. Al contrario, cuando ratones deficientes de leptina fueron infectados, no hubo aumento en la concentración de leptina y estos ratones tuvieron funciones reducidas de los macrófagos y una alta mortalidad (Mancuso *et al.*, 2006). Un estudio realizado en ratones con obesidad inducida por la dieta infectados con virus de la influenza A mostró que los niveles de leptina en los ratones obesos, los cuales tuvieron una tasa de mortalidad 6.6 veces mayor que los ratones sin obesidad, disminuyeron durante la

infección Por el contrario, en los ratones sin obesidad los niveles de leptina fueron aumentando conforme los días de la infección (Smith *et al.*, 2007).

En personas con obesidad las respuestas de linfocitos periféricos a la estimulación con mitógenos están reducidas (Palmlad *et al.*, 1980). La respuesta *in vitro* a mitógenos está disminuida en animales obesos y la secreción de IL-4 e IFN- γ está alterada (Falagas y Kompoti 2006). Estudios en modelos animales de obesidad, tanto genética como inducida por la dieta, también reportan disfunción inmune. En ratones obesos se ha observado una producción deficiente de leptina, presentan temperatura corporal baja, hiperfagia, infertilidad y evidencia de defectos en el sistema inmune con atrofia de los órganos linfoides, principalmente afectando el tamaño del timo y la celularidad (Yang *et al.*, 2009).

Un estudio en humanos con obesidad demostró que tienen números similares de monocitos circulantes que personas sin obesidad, pero el número de monocitos que maduraron a macrófagos fue casi 3 veces menor en estos individuos. Además la habilidad de los macrófagos maduros para llevar a cabo una respuesta antimicrobial y citotóxica está inhibida (Krishnan *et al.*, 1982). En un estudio realizado en niños la susceptibilidad a infecciones agudas del tracto respiratorio fue significativamente asociada con el IMC, niños con sobrepeso (IMC \geq 20 kg/m²) tuvieron el doble de riesgo de infección que los niños con IMC menor (Baik *et al.*, 2000).

Se ha encontrado que ratones con obesidad inducida por la dieta son más susceptibles a morbilidad y mortalidad durante una infección con influenza que ratones magros. Los ratones obesos presentaron respuestas anormales del sistema inmune innato, inducción mínima de IFN- α e IFN- β , expresión retrasada de citocinas proinflamatorias y quimiocinas, además de reducción significativa en la toxicidad mediada por células asesinas naturales (Smith *et al.*, 2007).

En otro estudio, personas obesas infectadas con virus de la hepatitis C mostraron mayor resistencia al tratamiento que personas no obesas, además presentaron sobreexpresión de SOCS3, la cual se relacionó directamente con esteatosis hepática (Walsh *et al.*, 2006). Por último, la obesidad es capaz de elevar la expresión de marcadores de macrófagos e inflamatorios. Además, inhibe la expresión de adiponectina en el tejido adiposo alterando así el metabolismo de glucosa y ácidos grasos (Gil *et al.*, 2007).

Características y Función de los Interferones Tipo I

Las primeras citocinas producidas durante una infección viral son la familia de interferones tipo I. IFN- α e IFN- β están asociados con respuestas antivirales tempranas (Cebulla *et al.*, 2000). Sus efectos se extienden al desarrollo de líneas celulares del sistema inmune, inmunidad innata, además de casi a cada aspecto de las respuestas celulares y humorales (Theofilopoulos *et al.*, 2004).

Hay diferentes isotipos de interferones, en humanos existe un tipo de IFN- β , múltiples tipos de IFN- α y otros diferentes isotipos: IFN- δ , - κ , - λ , - τ y - ω . Los diferentes isotipos tienen una estructura similar, se unen al mismo receptor de membrana y están codificados por genes vinculados al cromosoma 9 (Parham 2005). La síntesis de los interferones tipo I se induce por eventos intracelulares posteriores a la infección viral o por la unión de un ligando, al receptor en la membrana celular. Así se puede desencadenar la señalización, por ejemplo, por RNA de doble cadena que se una a un receptor tipo Toll-3 (TLR-3). La infección o unión del ligando, lleva a la fosforilación de una proteína citoplasmática, el factor de respuesta a interferón 3 (IRF3). Este factor, se dimeriza y entra al núcleo, para iniciar la transcripción del gen IFN- β , el cual a su vez es dependiente de los factores de transcripción NF κ B y AP-1. Más aún, el IFN- β secretado actúa de manera autócrina, sobre los receptores de la misma célula en la que fue sintetizado, o parácrinamente, uniéndose a receptores de

células no infectadas. Por otro lado, el factor de respuesta de interferón 7 (IFR-7), inicia con la transcripción de IFN- α , la cual no requiere la participación de NF κ B y AP-1. Así, se retroalimenta positivamente, con una pequeña cantidad de interferón, que induce el incremento de la producción futura de esta citocina (Figura 1).

IFN- α e IFN- β tienen tres funciones principales: La primera es inducir resistencia a la replicación viral por medio de la activación de genes celulares que destruyen mRNA viral e inhiben la traducción de proteínas virales. La segunda función es inducir la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad I (MHC I) en la mayoría de las células del organismo, incrementando así el nivel de presentación de antígeno de las células infectadas a las células T CD8 citotóxicas. Con esto, se aumenta también la resistencia de células no infectadas a células NK. Por último, IFN- α e IFN- β activan a las células asesinas naturales para eliminar a células infectadas con virus (Parham 2005).

Todas las células son capaces de producir interferones tipo I. A pesar de ello, numerosos estudios en ratones y humanos han descrito que las células dendríticas plasmacitoides (pDCs), son la fuente principal de IFN- α e IFN- β después de una infección viral sistémica (Cebulla *et al.*, 2000; Kohlmeier y Woodland 2009)

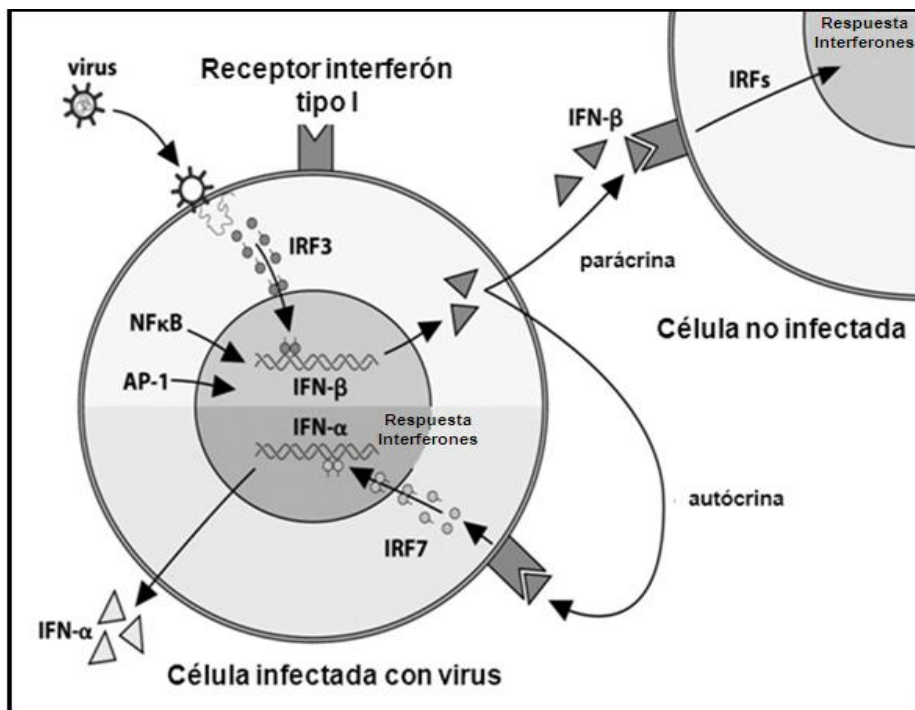


Figura 1. Activación de interferones tipo I en infecciones virales. (Adaptado de Parham, 2005).

En cuanto a las infecciones virales del tracto respiratorio, existe evidencia *in vivo* de que los macrófagos alveolares son los productores principales de IFN- α durante una infección del virus de parainfluenza, haciendo al interferón necesario para la erradicación viral efectiva (Kumagai *et al.*, 2007). Los interferones tipo I producidos después de una infección respiratoria viral forman un ciclo de retroalimentación señalizando a través del receptor IFN- α/β . Además, actúan en coordinación con la señalización de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR por sus siglas en inglés) para promover una producción constante de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 e IL-6 de las células inmunológicas residentes del pulmón (Chan *et al.*, 2005). A su vez, las citocinas proinflamatorias y las señales asociadas a PRR también provocan que los macrófagos alveolares, las células dendríticas y las células epiteliales inicien un programa coordinado de producción de quimiocinas. Posteriormente, las células dendríticas secretan quimiocinas capaces de reclutar células inflamatorias, como neutrófilos y células NK; acto seguido, ellas mismas

secretan quimiocinas asociadas con reclutamiento de monocitos y células T de memoria (Kohlmeier y Woodland 2009).

Así, los interferones tipo I son pieza clave para una gran cantidad de funciones inmunológicas. Su inducción temprana en la respuesta inmune innata provee mecanismos de activación que dirigen procesos subsecuentes, tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa.

Supresor de Señalización de Citocinas (SOCS)

SOCS son reguladores fisiológicos claves de la respuesta inmune innata y adaptativa. Estas moléculas regulan positiva y negativamente la activación de macrófagos y células dendríticas y son esenciales para el desarrollo y diferenciación de células T (Yoshimura *et al.*, 2007; Palmer y Restifo 2009). La familia SOCS son un grupo de 8 proteínas intracelulares cuya función es regular negativamente la señalización del receptor de citocinas (Pothlichet *et al.*, 2008). SOCS son generalmente inestables y son codificadas como genes de respuesta temprana a una gran variedad de estímulos externos incluyendo citocinas, factores de crecimiento, ligandos de receptores Toll, isoproterenol, estatinas, y AMP cíclico (O'Shea *et al.*, 2002).

Una respuesta inmune efectiva requiere la función coordinada de la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa. Las células implicadas en cada tipo de inmunidad responden a estímulos antigénicos a través de una variedad de receptores de superficie e intracelulares y producen citocinas, las cuales dirigen estrictamente la respuesta inflamatoria. La operación de mecanismos de control que regulen la duración y amplitud de la respuesta y la señalización del receptor de citocinas son necesarios para prevenir una hiperactivación del sistema inmune que pudiera llevar a la destrucción de tejido o autoinmunidad. Las proteínas SOCS se

han identificado como un mecanismo principal de regulación de la señalización de citocinas (Vlotides *et al.*, 2004; Yoshimura *et al.*, 2007).

Las proteínas SOCS fueron identificadas en un principio como inhibidoras del transductor de señalización Janus cinasa (JAK) y activadoras del factor de transcripción STAT. Estudios recientes en ratones genéticamente modificados han revelado un extenso papel de estas proteínas en la regulación de mecanismos de señalización dentro del sistema inmune (Palmer y Restifo 2009). Las proteínas SOCS ejercen su retroalimentación negativa a través de diversos mecanismos. SOCS1 y SOCS3 son pseudosustratos inhibidores del sustrato JAKs y bloquean la interacción del dominio catalítico de JAK con sus sustratos proteicos STAT, terminando así la propagación de la señal. También, SOCS es inhibidor competitivo de JAKs y STATs y se pueden unir a los sitios de acoplamiento de fosfotirosina de JAK y STAT en receptores de citocinas activados. Por último, SOCS son componentes de una ligasa E3 y fijan a sus ligandos a la ubiquitinación y degradación proteosomal (O'Shea *et al.*, 2002) (Figura 2).

Se ha encontrado que los virus son capaces de provocar la sobreexpresión de SOCS3 y así regular negativamente las respuestas celulares antivirales y la señalización de interferones (Vlotides *et al.*, 2004). Estudios recientes, muestran que SOCS3 interfiere con la expresión de proteínas virales y la respuesta al tratamiento en pacientes con hepatitis B crónica. En estos pacientes, el incremento en la expresión de SOCS3 fue relacionado con la severidad de la inflamación del hígado (Koeberlein *et al.*, 2010)

En animales obesos las proteínas SOCS están persistentemente elevadas, específicamente SOCS1 y SOCS3 (Smith *et al.*, 2007). Existe evidencia también, que SOCS3 se encuentra elevado en personas con obesidad, produciendo mayor resistencia al tratamiento contra la hepatitis C. Además la sobreexpresión de SOCS3 se relacionó directamente con esteatosis hepática en hepatitis C crónica (Walsh *et al.*, 2006). Además se ha encontrado que SOCS3 es un inhibidor de la transducción

de señal del factor inhibidor de la hormona del crecimiento, insulina y leptina. Además, SOCS3 ha sido identificado como un potencial mediador de la resistencia a la leptina, lo que pudiera explicar porque se encuentra sobreexpresado en personas con obesidad, convirtiendo a esta proteína en uno de los mecanismos de estudio principales para explicar el efecto de la obesidad en la respuesta inmune.

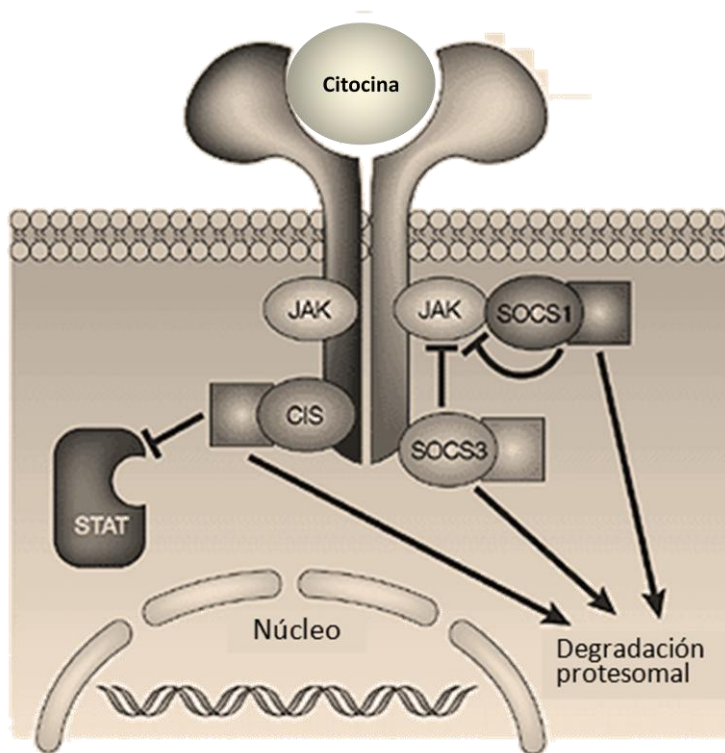


Figura 2. Regulación de la señalización de citocinas por SOCS. Adaptado de (Alexander 2002).

HIPÓTESIS

Las personas con obesidad presentan una respuesta de interferón- α y β reducida la cual se relaciona con la expresión de SOCS3.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la respuesta de IFN- α e IFN- β y su relación con la expresión de SOCS3 en personas con obesidad.

Objetivos Específicos

1. Evaluar la expresión de SOCS3 e interferones tipo I por RT-qPCR en células mono-nucleares de personas con y sin obesidad.
2. Determinar la capacidad de células mono-nucleares de producir IFN- α e IFN- β al estímulo con ligandos para TLR-3 y TLR-7.
3. Estimar la capacidad de células mono-nucleares de producir las citocinas pro-inflamatorias IL-6 e IL-1 β al estímulo con ligandos para TLR-3 y TLR-7.
4. Analizar la relación entre IFN- α e IFN- β y la expresión de SOCS-3 en personas con obesidad

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de Estudio

En este estudio descriptivo transversal se incluyeron 60 individuos (27 hombres y 33 mujeres) entre 18 y 50 años de edad. El protocolo fue aprobado por el comité de ética del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Todos los participantes en el estudio firmaron consentimiento informado por escrito y se midió su índice de masa corporal (kg/m^2). Posteriormente los voluntarios fueron divididos de acuerdo a su IMC en dos grupos: sujetos con obesidad ($\text{IMC} >30$: $n=30$) y sujetos sin obesidad ($\text{IMC} <25$: $n=30$). Como criterio de inclusión, los participantes no debieron presentar patologías crónicas e inmunosupresoras (cáncer, sida) o embarazo o lactancia en el caso de las mujeres.

Muestras de Sangre

El personal capacitado de los servicios de apoyo técnico de CIAD extrajo por punción venosa 18 mL de sangre periférica, la cual se distribuyó en 3 tubos de 6 mL con anticoagulante.

Separación de Células Mononucleares (CMN)

Las CMN se obtuvieron a partir de gradientes de densidad de Ficoll-Hystopaque (GE Healthcare systems) en una proporción 2:1 sangre:ficoll, centrifugándose por 30 min a 1600 rpm en una centrífuga refrigerada a 4 °C. Posteriormente con una pipeta Pasteur se tomó únicamente la capa de células localizada entre la capa de ficoll y el plasma, se colocó en un tubo cónico de 50 mL y se lavó dos veces con medio RPMI 1640 (Invitrogen, NY, USA) suplementado con antibióticos [L-glutamina (2 mM),

penicilina (200 IU/mL), estreptomicina (100 µg/mL), 2-mercaptoethanol (5×10^{-5} µM)]. Los eritrocitos se lisaron con cloruro de amonio (NH₄Cl 0.15 M, KHCO₃ 10mM, EDTA 0.1 mM) por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las CMN se lavaron según se describió anteriormente para finalmente resuspenderlas en medio RPMI 1640 suplementado con antibióticos y suero fetal bovino al 10%. La viabilidad celular se determinó mediante ensayo de exclusión con azul de tripano (SIGMA, MO, USA) y el conteo en cámara de Neubauer, y se ajustaron a una concentración de un 1×10^6 células/mL.

Estimulación con Ligandos de TLR-7 y Poly I:C en CMN

La estimulación de CMN se hizo en placa de cultivo de 48 pozos. Se estimularon 1×10^6 células por pozo con 5 µg/ml de ligando para TLR-7 o 5 µg/ml de Poly I:C en un volumen final de 300 µl durante 4 y 20 horas a 37 °C, 90% de humedad relativa y 5% de CO₂, en presencia de lipofectamina. Primero se mezcló 1 µL de lipofectamina por cada 15 µL de estímulo por 15 minutos, posteriormente la mezcla del estímulo con lipofectamina fue agregada a las células en un volumen final de 300 µL. Finalizado el tiempo de incubación, las células se cosecharon y se centrifugaron, el botón celular de los cultivos a 4 h se usó para la extracción de RNA y posterior cuantificación de transcritos para SOCS3, mientras que las células estimuladas por 20 horas se lisaron y se les extrajo RNA para posterior cuantificación de transcritos para IFN-α2 e IFN-α6 por PCR en tiempo real, y los sobrenadantes se guardaron a -40°C para la determinación de citocinas e IFNs por ELISA.

Extracción de RNA Total

La extracción de RNA de CMN se realizó con el kit RNeasy Mini Kit (QIAGEN) y se siguió las especificaciones del proveedor. Se lisaron 1×10^6 células utilizando buffer lisis RLT. Posteriormente se pasó por una columna de extracción y se centrifugaron. Posteriormente se realizaron lavados para finalmente eluir el RNA de la columna utilizando agua libre de RNAsas. La concentración y pureza se analizó por absorbancia a 260/280 nm en un espectrofotómetro (NanoDrop). Por último el RNA se almacenó a -70°C hasta su uso.

RT-PCR en Tiempo Real (RT-qPCR)

La determinación de la expresión de transcritos de IFN- α y SOCS-3 en CMN de los grupos descritos se realizó mediante RT-qPCR en tiempo real. Para realizar la mezcla de reacción se utilizó el juego de reactivos de One-step QRT-PCR Brilliant® Master Mix (Stratagene, La Jolla, CA). Finalmente la reacción se llevó a cabo en el termociclador One Step system (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los iniciadores para IFN- $\alpha 2$ e IFN- $\alpha 6$ fueron los siguientes: IFN- $\alpha 2$: sentido CTTGAAGGACAGACATGACTTTGGA, anti-sentido GGATGGTTTCAGCCTTTTGGGA, IFN- $\alpha 6$: TCCATGAGGTGATTCAGCAGAC, anti-sentido GCTGCTGGTAAAGTTCAGTATAGAGTTT (Loseke *et al.*, 2003). Los primers para SOCS3 fueron los siguientes: sentido GGAGTTCCTGGACCAGTACG, anti-sentido TTCTTGCTGCTTGTGCCATGT (Jia *et al.*, 2010). Los valores de los Ct (ciclo umbral) de los diferentes genes fueron normalizados contra el gen endógeno β -actina: sentido AAGCAGGAGTATGACGAGTCCG, antisentido: CGGA ACTAAGTCATAGTCCGCC (Min *et al.*, 2009) y se compararon con las células no estimuladas; los resultados de los PCR se presentan como el incremento relativo contra el grupo sin estímulo por medio de la formula ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$).

ELISA de IFN- α e IFN- β

La secreción de IFN- α e IFN- β en sobrenadantes de las células estimuladas se hizo con los paquetes Human Interferon-Alpha Multi-Subtype ELISA y Human Interferon- β ELISA (*TFB, Tokyo, Japan*) respectivamente siguiendo las recomendaciones del proveedor. Los resultados obtenidos se analizaron utilizando un modelo de 4 parámetros con el software Graph-Pad PRISM. 4.0.

ELISA de Citocinas Pro-inflamatorias IL-6 e IL-1 β

El ensayo de ELISA de las citocinas pro-inflamatorias IL-6 e IL-1 β se llevó a cabo en sobrenadantes de células estimuladas en dilución 1:20 con buffer de ensayo en placa de 96 pozos por duplicados. Para IL-6 se utilizó el juego de reactivos human IL-6 cytoset™ (Invitrogen, Carsbland, CA) y para IL-1 β el human IL-1 β cytoset™ (Invitrogen, Carsbland, CA). En primer lugar se incubó la placa de ELISA 100 μ l por pozo de anticuerpo de captura por 18 horas a 4 °C con a una concentración de 1.5 μ g/mL para IL-6 y 2.5 μ g/mL para IL-1 β utilizando buffer de carbonatos como diluyente. Después de las 18 horas de incubación se desechó la solución con el anticuerpo de captura y se bloqueó la placa con 200 μ L de buffer ensayo por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó la placa una vez con buffer de lavado y se añadieron 100 μ L de las muestras diluidas 1:20 en buffer de ensayo y los estándares con concentraciones seriadas de 1000, 500, 250, 125, 62.5 y 31.25 pg/mL junto con 50 μ l de anticuerpo de detección a una concentración de 0.16 μ g/mL y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente con agitación constante. A continuación se desecharon las muestras y estándares, se lavó la placa 5 veces y se agregó 100 μ L de solución de estreptavidina HRP con una concentración de 1/5000 para IL-6 y 1/2500 para IL-1 β . Se incubó 30 minutos con agitación constante. Posteriormente se lavó 5 veces con buffer de lavado, se agregaron 100 μ L de TMB

por pozo y se incubó por 20 minutos. Por último se detuvo la reacción con 100 μ L de H_2SO_4 a una concentración 1.8 N y se midió a una absorbancia de 450 nm en el lector para ELISA (Biorad, Model 680 ELISA reader, CA, USA). Los resultados obtenidos se analizaron utilizando el software de 4 parametros Graph-Pad PRISM. 4.0.

Análisis Estadístico

Las características generales de los participantes del estudio se describieron utilizando la media y la desviación estándar. Para hacer la comparación de las variables de interés entre el grupo de personas con obesidad y el grupo de personas sin obesidad se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney ya que los datos presentaron distribución no normal, como se determinó por la prueba de Kolmogorov–Smirnov. Para evaluar la correlación entre SOCS-3 y IFN- α e IFN- β se llevó a cabo un análisis de correlación de Spearman. Los datos se analizaron utilizando el paquete estadístico NCSS 2007. Se consideró significancia estadística cuando $p < 0.05$.

RESULTADOS

Características de los Voluntarios

Los 60 voluntarios incluidos en el estudio se dividieron en dos grupos: 30 sujetos sin obesidad y 30 con obesidad. Dentro del grupo de sujetos sin obesidad 13 fueron hombres y 17 mujeres y el promedio de edad fue de 34.1 ± 10.0 años. Dentro del grupo de sujetos con obesidad 16 fueron hombres y 14 mujeres y el promedio de edad fue de 32.1 ± 10.1 años. La media del peso para el grupo con obesidad fue de 106.6 ± 20.3 Kg y para el grupo sin obesidad fue de 66.3 ± 10.2 Kg.

En cuanto a la talla, esta fue similar entre ambos grupos: 167.1 ± 9.2 para el grupo de sujetos con obesidad y de 170.1 ± 6.2 para el grupo de sujetos sin obesidad. El promedio de índice de masa corporal para los sujetos con obesidad fue de 37.9 ± 5.7 y de 22.8 ± 2.5 en sujetos sin obesidad. En cuanto al porcentaje de grasa corporal, como se esperaba, el grupo de sujetos con obesidad mostró un marcado aumento, siendo el promedio de 42.4 ± 5.7 comparado con un 26.3 ± 7.1 en los sujetos sin obesidad. La circunferencia de cintura fue de 113.7 ± 15.1 y 81.2 ± 8.4 para el grupo con obesidad y sin obesidad respectivamente.

Por último el índice cintura cadera fue de 0.91 ± 0.05 y 0.81 ± 0.05 para el grupo con obesidad y sin obesidad respectivamente. El índice cintura/cadera es la relación que resulta de dividir el perímetro de la cintura de una persona por el perímetro de su cadera. Los estudios indican que una relación entre cintura y cadera superior a 1.0 en varones y a 0.9 en mujeres está asociada a un aumento en la probabilidad de contraer diversas enfermedades (diabetes mellitus, enfermedades coronarias,

hipertensión arterial, entre otras). En la Tabla 1 se pueden observar las características generales de los dos grupos de estudio.

Tabla 1. Características de participantes en el estudio.

Características	Obesidad n=30 (X ± SD)	Sin obesidad n = 30 (X ± SD)	p*
Genero (M/F)	13/17	16/14	
Edad	34.1 ± 10.02	32.10 ± 10.10	p= 0.444
<u>Antropométricas:</u>			
Peso (Kg.)	106.60 ± 20.26	66.31 ± 10.22	*p<0.0001
Talla (cm.)	167.13 ± 9.22	170.12 ± 6.21	p=0.1470
IMC. (Kg/m ²)	37.91 ± 5.72	22.84 ± 2.46	*p<0.0001

IMC: Índice de masa corporal. *Prueba t-student para dos muestras independientes

Efecto de la Obesidad en la Expresión de IFN- α

Para determinar el efecto de la obesidad en la respuesta de IFN- α evaluamos los niveles de transcritos de IFN- α 2 e IFN- α 6, las dos principales isoformas de IFN- α secretadas después de la estimulación de TLRs. Los resultados mostraron que el grupo de personas con obesidad tienen una respuesta de IFN- α 2 e IFN- α 6 disminuida comparada con el grupo sin obesidad ($p < 0.05$) (Figura 2).

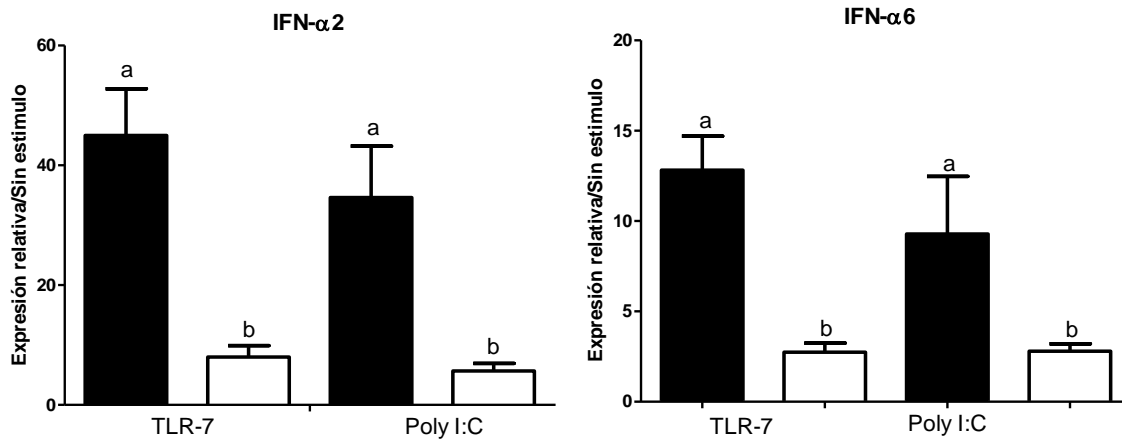


Figura 3. Expresión de IFN- α 2 e IFN- α 6 en CMN estimuladas de personas sin obesidad (barras negras) y con obesidad (barras blancas). Los valores de Ct de cada gen fueron normalizados con el gen constitutivo β -actina y se compararon con células no estimuladas; los valores están representados como la media de la expresión relativa \pm error estándar contra células no estimuladas utilizando la fórmula ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Literales diferentes indican diferencias significativas.

Efecto de la obesidad en la secreción de IFN- α e IFN- β

Para comprobar si el efecto de la obesidad afecta la secreción de IFN- α e IFN- β se midieron estas dos citocinas por medio de ELISA utilizando sobrenadantes de las células estimuladas por 20 horas con ligando para TLR-7 y Poly I:C. Para medir la secreción de IFN- α se utilizó el sobrenadante de CMN estimuladas con ligando para TLR-7 ya que este ligando (CL264), el cual es un derivado de una 9-bencil-8hidroxiadenina la cual contiene una glicina en el grupo bencil (en posición para), induce la secreción de NF- κ B e IFN- α en células que expresan TLR-7. Para medir IFN- β se utilizó el sobrenadante de CMN estimuladas con Poly I:C el cual es un análogo sintético de RNA de doble cadena, un patrón molecular asociado con infecciones virales. Los RNA de doble cadena naturales como sintéticos inducen la respuesta de interferones tipo I y otras citocinas. Poly I:C es reconocido por TLR-3, posteriormente activa la transcripción del factor regulador de interferon 3 (IRF3). La activación de IRF3 conduce a la producción de interferones tipo I, especialmente IFN- β .

Los resultados muestran que los niveles de estas dos citocinas estuvieron significativamente reducidos en los voluntarios con obesidad. En cuanto a IFN- α las CMN de los voluntarios sin obesidad presentaron una media de 218.70 ± 27.63 pg/mL mientras que los voluntarios con obesidad presentaron una media de 77.03 ± 17.88 pg/mL. Esta secreción disminuida en los voluntarios obesos coincide con los niveles de expresión de IFN- α la cual estuvo también reducida en este grupo. En cuanto a la secreción de IFN- β los voluntarios sin obesidad presentaron una secreción media de 47.80 ± 13.52 UI/mL mientras que en los voluntarios con obesidad fue de 19.70 ± 4.26 UI/mL (Figura 3).

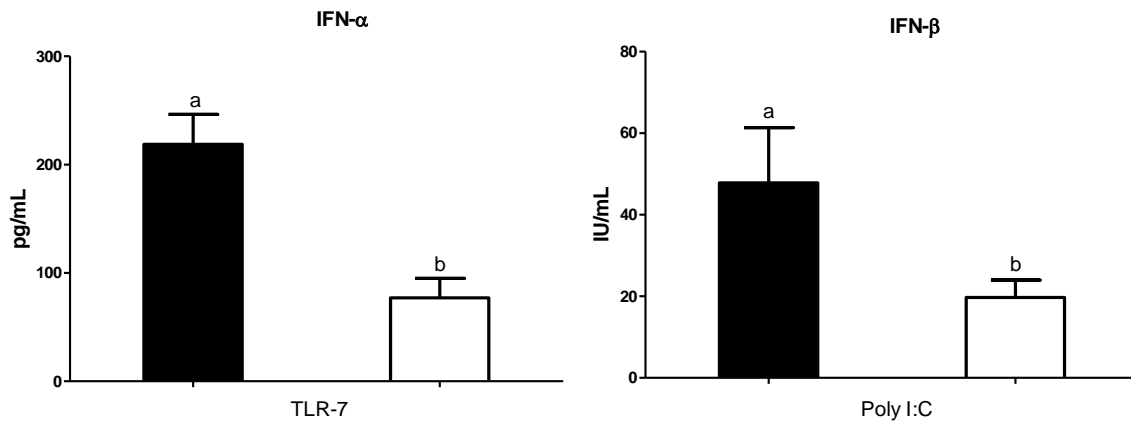


Figura 4. Secreción de IFN- α e IFN- β en CMN estimuladas de personas sin obesidad (barras negras) y con obesidad (barras blancas) estimuladas con ligandos de TLR-3 y TLR-7. Literales diferentes indican diferencias significativas.

Expresión de SOCS3 en CMN Estimuladas

Dado que la expresión de SOCS3 es un mecanismo regulador principal de la señalización de interferones tipo I, su sobreexpresión es un mecanismo común que utilizan los virus para evadir la respuesta inmune y además se encuentra elevado en personas con obesidad, se propuso medir los transcritos de SOCS3 en CMN estimuladas. Después de la estimulación con ligandos para TLR-7 y TLR-3 el grupo sin obesidad mostró mayor expresión de SOCS3 ($p < 0.01$) (Figura 4).

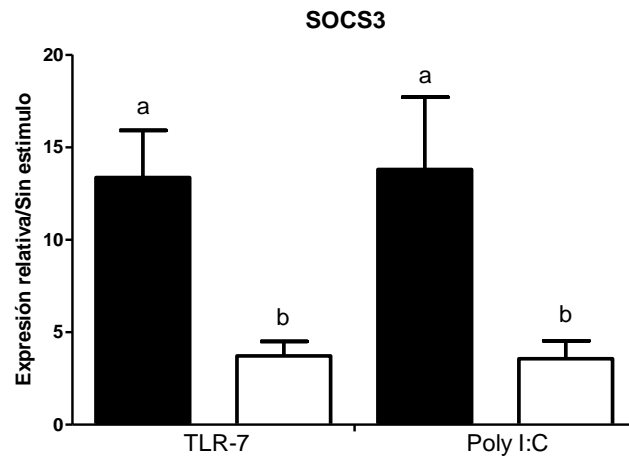


Figura 5. Expresión de SOCS3 en CMN estimuladas de personas sin obesidad (barras negras) y con obesidad (barras blancas). Los valores de Ct de cada gen fueron normalizados con el gen constitutivo β -actina y se compararon con células no estimuladas; los valores están representados como la media de la expresión relativa \pm SEM contra células no estimuladas utilizando la fórmula ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Literales diferentes indican diferencias significativas.

Secreción de Citocinas Proinflamatorias IL-6 e IL-1 β en CMN Estimuladas

Además de la respuesta de interferones tipo I, la respuesta de citocinas pro-inflamatorias juega un papel importante en la respuesta inmune innata hacia las infecciones virales. Para medir el efecto de la obesidad en la respuesta inflamatoria se midió por ELISA las citocinas pro-inflamatorias IL-6 e IL-1 β en CMN estimuladas. El grupo con obesidad presentó una secreción mayor de IL-6 en sobrenadante de CMN sin estímulo, estos resultados indican que las personas con obesidad presentaron un estado de inflamación crónico. Las CMN presentaron una respuesta similar cuando fueron estimuladas con TLR-7. Sin embargo; cuando las CMN fueron estimuladas con Poly I:C se observó una respuesta disminuida en el grupo de personas con obesidad. En cuanto a IL-1 β no hubo diferencias significativas con el

ligando para TLR-7; sin embargo, cuando las CMN fueron estimuladas con Poly I:C, al igual que con IL-6, hubo una respuesta disminuida en el grupo con obesidad.

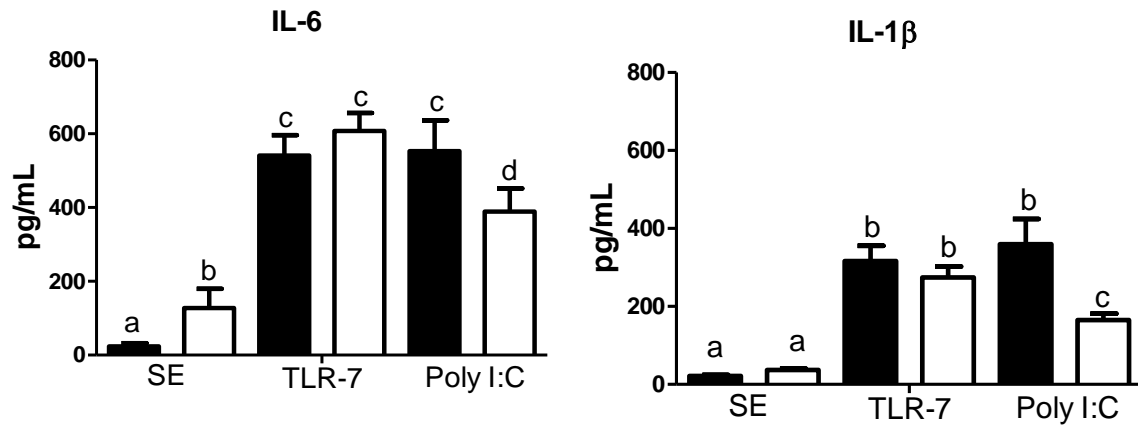


Figura 6. Respuesta de citocinas pro-inflamatorias IL-6 e IL-1 β en CMN sin estimular (SE) y estimuladas de personas sin obesidad (barras negras) y con obesidad (barras blancas). Literales diferentes indican diferencias significativas.

DISCUSIÓN

Existen diversos estudios que demuestran el efecto negativo de la obesidad en la respuesta inmune durante una infección viral; sin embargo, los mecanismos siguen siendo poco conocidos. La mayoría de estos estudios se llevan a cabo en ratones con obesidad inducida por la dieta y pocos han explorado el efecto de la obesidad en la respuesta de interferones tipo I. En esta investigación nuestra hipótesis fue que las personas con obesidad presentan una capacidad reducida de producir una respuesta de interferones tipo I, la cual se relaciona con la expresión de SOCS3.

La importancia de los IFNs, los cuales fueron descubiertos originalmente por su habilidad de proteger a las células de las infecciones virales, es resaltada por la observación que la mayoría de los virus han evolucionado estrategias para evadir su respuesta. Sus efectos se extienden al desarrollo de la respuesta inmune innata, además de casi a cada aspecto de las respuestas celulares y humorales (Theofilopoulos *et al.*, 2004). En esta tesis se observó que las personas con obesidad presentaron una respuesta de interferones tipo I disminuida. Estos resultados coinciden con los encontrados por Smith y colaboradores (Smith *et al.*, 2007) en donde se observó que la obesidad afecta la respuesta de IFN- α e IFN- β durante la infección por virus de la influenza A en ratones con obesidad inducida por la dieta, los ratones presentaron además una respuesta de citocinas pro-inflamatorias retardada, citotoxicidad de células NK reducida y una mayor mortalidad comparados con ratones sin obesidad .

La obesidad está asociada con inflamación crónica caracterizada por una producción de citocinas anormal y una activación de las vías de señalización de la respuesta inflamatoria. El tejido adiposo secreta una variedad de mediadores bioactivos como adiponectina, leptina, resistina o citocinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-6. En nuestro estudio también se encontró una respuesta de citocinas pro-inflamatorias

disminuida en el grupo con obesidad cuando se estimuló a las CMN con el ligando de TLR-3 Poly I:C, sugiriendo que no solo la respuesta de interferones está afectada por la obesidad. Esto coincide con lo reportado por Amar y cols., (Amar *et al.*, 2007) en donde ratones con obesidad inducida por la dieta presentaron una respuesta deficiente de las citocinas pro-inflamatorias IL-6, TNF- α y proteína sérica amiloide A cuando fueron infectados con *Porphyromonas gingivalis*.

Los resultados presentados en esta tesis confirman que la respuesta de IFNs está disminuida en personas con obesidad haciéndolas más susceptibles a la morbilidad y mortalidad por infecciones virales. Los IFNs tipo I son las primeras citocinas producidas durante una infección viral y juegan un papel clave en la respuesta inmune innata temprana hacia los virus. IFN- α e IFN- β tienen tres funciones principales: La primera es inducir resistencia a la replicación viral por medio de la activación de genes celulares que destruyen mRNA viral e inhiben la traducción de proteínas virales. La segunda función, es inducir la expresión del MHC I en la mayoría de células del organismo, incrementando así el nivel de presentación de antígeno de las células infectadas a las células CD8 T citotóxicas. Por último, IFN- α y β activan a las células asesinas naturales para eliminar a células infectadas con virus (Parham 2005).

En este estudio, la expresión de SOCS3 se correlacionó directamente con la respuesta de IFN- α ($r = 0.41 - 0.51$) ($p < 0.01$) y la respuesta de IFN- β ($r = 0.36$) ($p < 0.01$). Es decir, existe una relación directa entre la respuesta de IFN α/β y la expresión de SOCS3, sugiriendo que SOCS3 está regulando adecuadamente la respuesta de interferones tipo I en el grupo sin obesidad y dado que hay una respuesta de interferones tipo I disminuida en el grupo con obesidad, el mecanismo regulador no está siendo activado.

Un estudio en pacientes con infección crónica de hepatitis B presentaron una expresión incrementada de la proteína SOCS3 en biopsias hepáticas, la cual se correlacionó con la severidad de la inflamación hepática (Koeberlein *et al.*, 2010). En

otro estudio, monocitos humanos primarios infectados con el virus Epstein Bar presentaron inhibición en la transducción de la vía de señalización de IFN- α , llevando a una alteración en la secreción de IFN- α (Michaud *et al.*, 2010). Los virus de la influenza A inhiben la señalización de IFNs tipo I a través de un mecanismo que involucra la inducción de SOCS3 (Pauli *et al.*, 2008). Esta inducción directa de SOCS3 por parte del virus parece ser relevante para suprimir la respuesta antiviral ya que en las células deficientes de SOCS3 se observó una fosforilación ininterrumpida de STAT1, la cual se correlacionó con una expresión elevada de los genes dependientes de IFN. Como consecuencia, la carga viral fue reducida en las células deficientes de SOCS3 o donde la expresión de SOCS3 fue bloqueada por RNA de interferencia. Este estudio proporcionó la primera evidencia que los virus de la influenza A suprimen la señalización de IFNs tipo I a nivel de la activación de JAK/STAT, este efecto inhibitorio es debido, al menos en parte, a la inducción de SOCS3, lo cual resulta en una respuesta viral disminuida.

SOCS3 también es un regulador crítico de la señalización de leptina y se ha relacionado como un mediador potencial a la resistencia de leptina (Bjørnbæk *et al.*, 1998). Resultados obtenidos en nuestro grupo de investigación indican que las personas con obesidad presentan mayores niveles de leptina sérica y una expresión basal de SOCS3 elevada. Dado que SOCS3 es también un regulador negativo de los interferones tipo I, la expresión basal elevada de SOCS3 observada en el grupo con obesidad podría ser inducida por el exceso de leptina y así induciría una respuesta disminuida de interferones, haciendo más susceptibles a las personas con obesidad a la infección y mortalidad por infecciones virales (Figura 5). SOCS3 también regula las citocinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF- α , dos citocinas que se encuentran persistentemente elevadas en personas con obesidad. Incluso, TNF- α es capaz de inhibir la degradación de SOCS3 (Dagvadorj *et al.*, 2010). La inflamación basal observada en nuestro grupo con obesidad estaría provocando la activación de su mecanismo regulador, en este caso SOCS3, lo que explicaría la expresión basal elevada de SOCS3, la cual conduce a una respuesta de IFNs y citocinas pro-

inflamatorias disminuida en el grupo con obesidad una vez que las CMN son estimuladas con ligandos para TLR.

Los resultados obtenidos en este estudio ayudan a entender porque la obesidad se ha relacionado con una respuesta inmune deficiente. Un ejemplo de esto es la pasada pandemia causada por el virus de la influenza AH1N1, en la cual la obesidad se ha señalado como factor de riesgo importante de mortalidad, ya que el 36.3 % de las defunciones totales por influenza A/H1N1, desde el inicio de la epidemia hasta noviembre del 2009, fue en personas con esta condición (SSA 2010). Estos datos coinciden con los del Center for Disease Control and Prevention (CDC) en los Estados Unidos, en donde del total de decesos, el 34% fueron pacientes con obesidad y 11% con obesidad mórbida. Otro ejemplo es el estudio hecho por Walsh y colaboradores (Walsh *et al.*, 2006) en el cual la falta de respuesta a la terapia antiviral en personas infectadas con hepatitis C estuvo asociada a la obesidad y a una mayor expresión hepática de SOCS3. Ya que la respuesta inmune innata también activa y polariza la respuesta inmune celular y humoral, los datos obtenidos en esta investigación sugieren que toda la respuesta inmune puede estar afectada por la obesidad.

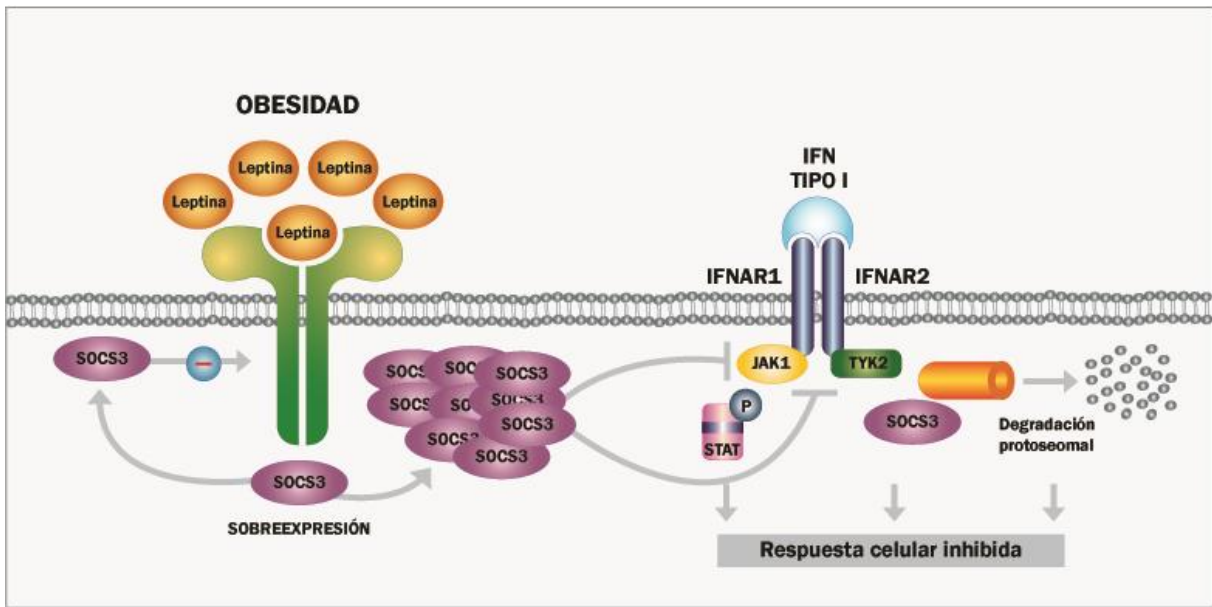


Figura 7. Modelo hipotético expresión elevada de SOCS3 y respuesta deficiente de interferones tipo I en personas con obesidad.

CONCLUSIONES

En conclusión los resultados de esta investigación muestran que las personas con obesidad presentan una respuesta deficiente de interferones tipo I. Los pacientes sin obesidad mostraron una mayor respuesta de IFN- α e IFN- β y una mayor expresión de SOCS3 en CMN estimuladas con ligandos de receptores tipo Toll. En este estudio, la expresión de SOCS3 se correlacionó directamente con la respuesta de IFN- α e IFN- β sugiriendo que SOCS3 está regulando adecuadamente la respuesta de interferones tipo I en el grupo sin obesidad y dado que hay una respuesta de interferones tipo I disminuida en el grupo con obesidad, el mecanismo regulador, en este caso SOCS3, no está siendo activado. Esta respuesta deficiente podría explicar, al menos en parte, la asociación entre la obesidad y mayor morbilidad y mortalidad por infecciones virales.

BIBLIOGRAFÍA

- Alexander, W. S. (2002). "Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system." *Nature Reviews Immunology* **2**(6): 410-416.
- Amar, S., Q. Zhou, Y. Shaik-Dasthagirisahab and S. Leeman (2007). "Diet-induced obesity in mice causes changes in immune responses and bone loss manifested by bacterial challenge." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**(51): 20466.
- Atkinson, R. (2007). *Viruses as an etiology of obesity*, Mayo Clinic.
- Baik, I., G. Curhan, E. Rimm, A. Bendich, W. Willett and W. Fawzi (2000). "A prospective study of age and lifestyle factors in relation to community-acquired pneumonia in US men and women." *Archives of internal medicine* **160**(20): 3082.
- Bastard, J. P., M. Maachi, J. T. van Nhieu, C. Jardel, E. Bruckert, A. Grimaldi, J. J. Robert, J. Capeau and B. Hainque (2002). "Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro." *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **87**(5): 2084.
- Bautista, L., J. Casas, V. Herrera, J. Miranda, P. Perel, R. Pichardo, A. González, J. Sanchez, C. Ferreccio and X. Aguilera (2009). "The Latin American Consortium of Studies in Obesity (LASO)." *Obesity reviews: an official journal of the International Association for the Study of Obesity* **10**(3): 364.
- Bercault, N., T. Boulain, K. Kuteifan, M. Wolf, I. Runge and J. C. Fleury (2004). "Obesity-related excess mortality rate in an adult intensive care unit: A risk-adjusted matched cohort study*." *Critical care medicine* **32**(4): 998.
- Bjørnbæk, C., J. K. Elmquist, J. D. Frantz, S. E. Shoelson and J. S. Flier (1998). "Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance." *Molecular Cell* **1**(4): 619-625.
- Cebulla, C., D. Miller and D. Sedmak (2000). "Viral inhibition of interferon signal transduction." *Intervirology* **42**(5-6): 325-330.

- Cousin, B., O. Munoz, M. Andre, A. Fontanilles, C. Dani, J. Cousin, P. Laharrague, L. Casteilla and L. Enicaud (1999). "A role for preadipocytes as macrophage-like cells." *The FASEB journal* **13**(2): 305.
- Chan, M., C. Cheung, W. Chui, S. Tsao, J. Nicholls, Y. Chan, R. Chan, H. Long, L. Poon and Y. Guan (2005). "Proinflammatory cytokine responses induced by influenza A(H5N1) viruses in primary human alveolar and bronchial epithelial cells." *Respiratory Research* **6**(1): 135.
- Charrière, G., B. Cousin, E. Arnaud, M. André, F. Bacou, L. Pénicaud and L. Casteilla (2003). "Preadipocyte conversion to macrophage." *Journal of Biological Chemistry* **278**(11): 9850.
- Dagvadorj, J., Y. Naiki, G. Tumurkhuu and A. Shadat Mohammad Noman (2010). "Tumor necrosis factor augments lipopolysaccharide induced suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS 3) protein expression by preventing the degradation." *Immunology* **129**(1): 97-104.
- De Maeyer, E. and J. De Maeyer-Guignard (1998). "Type I interferons." *International reviews of immunology* **17**(1-4): 53-73.
- Esposito, K., A. Pontillo, C. Di Palo, G. Giugliano, M. Masella, R. Marfella and D. Giugliano (2003). "Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women." *JAMA: the journal of the American Medical Association* **289**(14): 1799.
- Falagas, M. E. and M. Kompoti (2006). "Obesity and infection." *The Lancet Infectious Diseases* **6**(7): 438-446.
- Fezeu, L., C. Julia, A. Henegar, J. Bitu, F. Hu, D. Grobbee, A. P. Kengne, S. Hercberg and S. Czernichow (2011). "Obesity is associated with higher risk of intensive care unit admission and death in influenza A (H1N1) patients: a systematic review and meta analysis." *Obesity Reviews*.
- Filozof, C., C. Gonzalez, M. Sereday, C. Mazza and J. Braguinsky (2008). "Obesity prevalence and trends in Latin-American countries." *Obesity Reviews* **2**(2): 99-106.

- Ford, E. S. and A. H. Mokdad (2008). "Epidemiology of obesity in the Western Hemisphere." *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **93**(11_Supplement_1): s1.
- Fried, S. K., D. A. Bunkin and A. S. Greenberg (1998). "Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid." *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **83**(3): 847.
- Geloneze, B., M. A. Tambascia, E. M. Repetto, S. G. Pereira, J. C. Pareja and L. A. Magna (2001). "Serum leptin levels after bariatric surgery across a range of glucose tolerance from normal to diabetes." *Obesity surgery* **11**(6): 693-698.
- Gil, A., C. María Aguilera, M. Gil-Campos and R. Cañete (2007). "Altered signalling and gene expression associated with the immune system and the inflammatory response in obesity." *British Journal of Nutrition* **98**(S1): 121-126.
- Hotamisligil, G. S., N. S. Shargill and B. M. Spiegelman (1993). "Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance." *Science* **259**(5091): 87.
- Jia, D., R. Rahbar, R. W. Y. Chan, S. M. Y. Lee, M. C. W. Chan, B. X. Wang, D. P. Baker, B. Sun, J. Peiris and J. M. Nicholls (2010). "Influenza Virus Non-Structural Protein 1 (NS1) Disrupts Interferon Signaling." *PloS one* **5**(11): e13927.
- Karalis, K., P. Giannogonas, E. Kodela, Y. Koutmani, M. Zoumakis and T. Teli (2009). "Mechanisms of obesity and related pathology: linking immune responses to metabolic stress." *FEBS Journal* **276**(20): 5747-5754.
- Koeberlein, B., A. Hausen, N. Bektas, H. Zentgraf, R. Chin, N. L. Toan, R. Kandolf, J. Torresi and C. T. Bock (2010). "Hepatitis B virus overexpresses suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS3) thereby contributing to severity of inflammation in the liver." *Virus research* **148**(1-2): 51-59.
- Kohlmeier, J. and D. Woodland (2009). "Immunity to respiratory viruses." *Annual review of immunology* **27**: 61-82.

- Krishnan, E. C., L. Trost, S. Aarons and W. R. Jewell (1982). "Study of function and maturation of monocytes in morbidly obese individuals." *Journal of Surgical Research* **33**(2): 89-97.
- Kumagai, Y., O. Takeuchi, H. Kato, H. Kumar, K. Matsui, E. Morii, K. Aozasa, T. Kawai and S. Akira (2007). "Alveolar Macrophages Are the Primary Interferon-[alpha] Producer in Pulmonary Infection with RNA Viruses." *Immunity* **27**(2): 240-252.
- La Cava, A. and G. Matarese (2004). "The weight of leptin in immunity." *Nature Reviews Immunology* **4**(5): 371-379.
- Loseke, S., E. Grage-Griebenow, A. Wagner, K. Gehlhar and A. Bufe (2003). "Differential expression of IFN-[alpha] subtypes in human PBMC: evaluation of novel real-time PCR assays." *Journal of immunological methods* **276**(1-2): 207-222.
- Mancuso, P., G. B. Huffnagle, M. A. Olszewski, J. Phipps and M. Peters-Golden (2006). "Leptin corrects host defense defects after acute starvation in murine pneumococcal pneumonia." *American journal of respiratory and critical care medicine* **173**(2): 212.
- Michaud, F., F. Coulombe, E. Gaudreault, C. Paquet-Bouchard, M. Rola-Pleszczynski, J. Gosselin and R. Klein (2010). "Epstein-Barr Virus Interferes with the Amplification of IFN Secretion by Activating Suppressor of Cytokine Signaling 3 in Primary Human Monocytes." *PloS one* **5**(7): e11908.
- Min, H. J., H. Y. Won, Y. C. Kim, S. H. Sung, M. R. Byun, J. H. Hwang, J. H. Hong and E. S. Hwang (2009). "Suppression of Th2-driven, allergen-induced airway inflammation by sauchinone." *Biochemical and biophysical research communications* **385**(2): 204-209.
- Misra, A. and L. Khurana (2008). "Obesity and the metabolic syndrome in developing countries." *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **93**(11_Supplement_1): s9.
- Moulin, C. M., I. Marguti, J. P. S. Peron, L. V. Rizzo and A. Halpern (2009). "Impact of adiposity on immunological parameters." *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* **53**(2): 183-189.

- Nagy, L., P. Tontonoz, J. G. A. Alvarez, H. Chen and R. M. Evans (1998). "Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR [gamma]." *Cell* **93**(2): 229-240.
- O'Shea, J., M. Gadina and R. Schreiber (2002). "Cytokine Signaling in 2002:: New Surprises in the Jak/Stat Pathway." *Cell* **109**(2): S121-S131.
- Ogden, C., S. Yanovski, M. Carroll and K. Flegal (2007). "The epidemiology of obesity." *Gastroenterology* **132**(6): 2087-2102.
- Palmblad, J., D. Hallberg and L. Engstedt (1980). "Polymorphonuclear (PMN) function after small intestinal shunt operation for morbid obesity." *British Journal of Haematology* **44**(1): 101-108.
- Palmer, D. and N. Restifo (2009). "Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in T cell differentiation, maturation, and function." *Trends in immunology*.
- Parham, P. (2005). *The immune system*, Garland Publishing.
- Pauli, E., M. Schmolke, T. Wolff, D. Viemann, J. Roth, J. Bode and S. Ludwig (2008). "Influenza A virus inhibits type I IFN signaling via NF- B-dependent induction of SOCS-3 expression." *PLoS Pathogens* **4**(11).
- Pothlichet, J., M. Chignard and M. Si-Tahar (2008). "Cutting edge: innate immune response triggered by influenza A virus is negatively regulated by SOCS1 and SOCS3 through a RIG-I/IFNAR1-dependent pathway." *The Journal of Immunology* **180**(4): 2034.
- Rosen, B. S., K. S. Cook, J. Yaglom, D. L. Groves, J. E. Volanakis, D. Damm, T. White and B. M. Spiegelman (1989). "Adipsin and complement factor D activity: an immune-related defect in obesity." *Science* **244**(4911): 1483.
- Smith, A. G., P. A. Sheridan, J. B. Harp and M. A. Beck (2007). "Diet-induced obese mice have increased mortality and altered immune responses when infected with influenza virus." *The Journal of nutrition* **137**(5): 1236.
- SSA (2010). "Situación actual de la epidemia."
- Theofilopoulos, A., R. Baccala, B. Beutler and D. Kono (2004). "Type I interferons (/) in immunity and autoimmunity."
- Tilg, H. and A. R. Moschen (2006). "Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity." *Nature Reviews Immunology* **6**(10): 772-783.

- Tontonoz, P., L. Nagy, J. G. A. Alvarez, V. A. Thomazy and R. M. Evans (1998). "PPAR [gamma] promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL." *Cell* **93**(2): 241-252.
- Van Dielen, F., W. Buurman, M. Hadfoune, J. Nijhuis and J. Greve (2004). "Macrophage inhibitory factor, plasminogen activator inhibitor-1, other acute phase proteins, and inflammatory mediators normalize as a result of weight loss in morbidly obese subjects treated with gastric restrictive surgery." *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **89**(8): 4062.
- Vlotides, G., A. S. Sørensen, F. Kopp, K. Zitzmann, N. Cengic, S. Brand, R. Zachoval and C. J. Auernhammer (2004). "SOCS-1 and SOCS-3 inhibit IFN-[alpha]-induced expression of the antiviral proteins 2, 5-OAS and MxA." *Biochemical and biophysical research communications* **320**(3): 1007-1014.
- Walsh, M., J. Jonsson, M. M. Richardson, G. Lipka, D. Purdie, A. Clouston and E. Powell (2006). "Non-response to antiviral therapy is associated with obesity and increased hepatic expression of suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS-3) in patients with chronic hepatitis C, viral genotype 1." *Gut* **55**(4): 529.
- Weisberg, S. P., D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R. L. Leibel and A. W. Ferrante Jr (2003). "Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue." *Journal of Clinical Investigation* **112**(12): 1796-1808.
- Yang, H., Y. Youm, B. Vandanmagsar, J. Rood, K. Kumar, A. Butler and V. Dixit (2009). "Obesity accelerates thymic aging." *Blood* **114**(18): 3803.
- Yoshimura, A., T. Naka and M. Kubo (2007). "SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation." *Nature Reviews Immunology* **7**(6): 454-465.
- Zhou, Q., S. E. Leeman and S. Amar (2011). "Signaling mechanisms in the restoration of impaired immune function due to diet-induced obesity." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**(7): 2867.