



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

**REGULACIÓN DE LA RESPUESTA DE INTERFERONES
TIPO I Y SU RELACIÓN CON LA 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:

DOCTOR EN CIENCIAS

APROBACIÓN

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



Dr. Jesús Hernández López

Director de Tesis



Dra. Graciela Caire Juvera

Asesora



Dra. Verónica Mata Haro

Asesora

Maricela Montalvo Corral

Dra. Maricela Montalvo Corral

Asesora

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González

Director General

AGRADECIMIENTOS

A las instituciones que hicieron posible el desarrollo de esta tesis, en primer lugar al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado durante mis estudios de posgrado. Agradezco también al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A.C.) por brindarme sus instalaciones para la realización de mi investigación de tesis doctoral.

Agradezco enormemente al Dr. Jesús Hernández por darme la confianza de trabajar en su laboratorio, por su gran apoyo y por guiarme y enseñarme como ser un buen investigador.

A mis asesoras Dra. Maricela Montalvo Corral, Dra. Verónica Mata Haro y Dra. Graciela Caire Juvera por su tiempo y dedicación invertidos en la mejoría de este trabajo.

Quiero agradecer a todos mis maestros durante mi formación de posgrado. En particular a la Dra. Ana María Calderón de la Barca, la Dra. Verónica Mata Haro y el Dr. Jesús Hernández por los valiosos conocimientos que, gracias a ellos, adquiriré en las aulas de CIAD.

Agradezco a todos mis compañeros de las distintas clases que tomé en CIAD durante mi posgrado. En particular a aquellos con los que pude formalizar una amistad sincera y duradera.

A mis amigos Jorge Rocha, Gabriel Fuente, Gabriel Iván Romero, Karina Chávez, Anna González, Monse y José Alfredo.

A todos mis compañeros de laboratorio: Maricela, Lupita, Alexel, Edgar, Mónica, Erika Silva, Lilian, Carlos, Anita, Erika Salcido, Jaudiel, Sue, Melissa, Héctor, Ana.

Al equipo de futbol de CIAD, los piglets, los Maistros y Nutriciencias.

A toda mi familia, a mi padre, madre y mi esposa e hijo por su apoyo incondicional.

DEDICATORIA

A mi Papá Liberato Terán.

A Marissa y Gabrielito.

A mi Mamá Flérida Cabanillas

AGRADECIMIENTOS A LOS SERVICIOS DE APOYO

Por su participación y asistencia técnica en el trabajo de laboratorio: a Q. B. Mónica Reséndiz Sandoval, Dra. Maricela Montalvo Corral, Dra. Erika Silva Campa, Dr. Alexel Burgara Estrella.

Asistencia en trámites y servicios en docencia: Dra. Gloria Yépiz, Héctor Galindo Murrieta, Verónica Araiza Sánchez, Laura García Cruz y Argelia Marín Pacheco.

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.

CONTENIDO

RESUMEN	x
ABSTRACT	xii
INTRODUCCIÓN	1
INTEGRACIÓN DEL MANUSCRITO DE TESIS	11
HIPÓTESIS	13
OBJETIVOS	13
Objetivo general	13
Objetivos específicos	13
Capítulo 1	14
Capítulo 2	22
Capítulo 3	29

Capítulo 1

Producción de interferon- α e interferon- β en obesidad y expresión del supresor de señalización de citocinas.

Capítulo 2

Producción de interferon α y β , citocinas pro-inflamatorias y la expresión del supresor de señalización de citocinas (SOCS) en sujetos obesos infectados con influenza A/H1N1.

Capítulo 3

Leptina, supresor de señalización de citocinas-3 e interferones tipo I en obesidad.

RESUMEN

La obesidad, como un estado de inflamación crónica, está asociada a una pobre respuesta inmune. Durante la pasada pandemia de Influenza A/H1N1 en el 2009, la obesidad fue un factor de riesgo asociado a una mayor morbilidad y mortalidad durante la infección. En ratones, la obesidad se asocia con una alta mortalidad durante la infección con el virus de la Influenza A y una respuesta de interferones tipo I (IFN-I) disminuida. Los IFN-I son las citocinas más importantes en la respuesta inmune innata antiviral y son regulados por las proteínas supresoras de señalización de citocinas (SOCS). SOCS3 es además el regulador principal de la hormona leptina, cuyo incremento está asociado a inflamación crónica en personas con obesidad, y de las citocinas pro-inflamatorias como la interleucina (IL)-6 y factor de necrosis tumoral (TNF)- α . El objetivo de este trabajo fue investigar la participación de SOCS3 en la regulación de la respuesta de IFN-I en personas con obesidad. Para ello, se evaluaron los niveles de expresión de SOCS3 y la respuesta de IFN-I en células mononucleares (CMN) de personas con obesidad estimuladas con ligandos de TLR-3 y TLR-7. Dado que la obesidad se relacionó con mayor riesgo de mortalidad durante la pandemia de influenza A/H1N1 del 2009, se evaluó la respuesta de IFN-I y de citocinas pro-inflamatorias y su relación con las expresiones de SOCS3 en pacientes con obesidad infectados con el virus de la Influenza A/H1N1. Además, se investigó el efecto de concentraciones elevadas de leptina y de la inflamación inducida por LPS en la expresión de SOCS3 y en la respuesta de IFN-I en personas sin obesidad y monocitos U937. Por último, se determinó el papel de SOCS3 en la inhibición de IFN-I en personas con obesidad utilizando la técnica de silenciamiento con siRNA. Los resultados obtenidos durante esta investigación demuestran que las personas con obesidad presentan una respuesta inhibida de IFN-I y una expresión basal de SOCS3 elevada. También se demostró que las personas con obesidad infectadas con el virus de la influenza A/H1N1 presentan una respuesta disminuida de interferones tipo I y citocinas pro-inflamatorias. Además, se encontró que la leptina y la inflamación inducen la expresión de SOCS3 e inhiben la respuesta de

interferones tipo I en CMN de personas sin obesidad y en monocitos U937 estimulados con ligandos de TLR-3 y TLR-7. Por último, los ensayos del silenciamiento del gen SOCS3 confirmaron que SOCS3 participa en la inhibición de la respuesta de IFN-I en CMN de personas con obesidad. En conclusión, los resultados obtenidos demuestran que las personas con obesidad presentan una respuesta deficiente de IFN-I debido a la expresión elevada de SOCS3. La leptina y la inflamación inducida por LPS pueden ser un mecanismo asociado a esta pobre respuesta induciendo la expresión de SOCS3 en personas con obesidad. Los resultados obtenidos ayudan a explicar la alta susceptibilidad de las personas con obesidad a sufrir complicaciones durante las infecciones virales como hepatitis e influenza A.

Palabras clave: Obesidad, interferones tipo I, SOCS3, leptina, Influenza

ABSTRACT

Obesity is a chronic pro-inflammatory state associated with a poor immune response. During the last Influenza A/H1N1 pandemic in 2009, obesity was recognized as an independent risk of mortality during the infection. In mice, obesity results in a high mortality during Influenza A infection and an aberrant type I interferons (IFN-I) response. IFN-I are the most important cytokines against viral infections and are regulated by the family of proteins named suppressors of cytokine signalling (SOCS). SOCS3 is also the main regulator of the hormone leptin, whose increase is associated with chronic inflammation in people with obesity, and the pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α . The aim of this work was to investigate the participation of SOCS3 in the regulation of IFN-I response in people with obesity. For this, we evaluated SOCS3 transcript levels and IFN-I response in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from people with obesity stimulated with TLR-3 and TLR-7 ligands. Because obesity was related with higher risk of mortality during 2009 influenza A/H1N1, we also evaluated IFN-I response and pro-inflammatory cytokines and their relationship with SOCS3 expression in obese and non-obese patients infected with Influenza A/H1N1 virus. Furthermore, we investigated the effect of high dose leptin- and LPS- induced inflammation in SOCS3 expression and IFN-I response in people without obesity and monocytes U937. Finally, we determined the role of SOCS3 in the inhibition of IFN-I in people with obesity by silencing the gene with siRNA in PBMC from volunteers with and without obesity. The results obtained during this investigation demonstrate that people with obesity present a diminished IFN-I response due to increased basal expression of SOCS3. We also demonstrated that, obese patients infected with influenza A/H1N1 virus, present an aberrant IFN-I response and reduced production of pro-inflammatory cytokines. Furthermore, leptin- and LPS- induced inflammation led to SOCS3 expression and inhibited IFN-I response in PBMC from non-obese people and monocytes U937 stimulated with TLR-3 and TLR-7 ligands. Finally, siRNA silencing assays further confirmed a role of SOCS3 in inhibition of IFN-I response in PBMC from obese volunteers. In conclusion, the results obtained

during this investigation demonstrate that PBMC from people with obesity have a diminished capability to induce IFN-I response due to high expression of SOCS3. Leptin- and LPS- induced inflammation might be a mechanism associated to this poor response in obese people. This results help to explain the susceptibility of obese people to suffer complications during viral infections such as influenza A.

Key words: Obesity, type I interferons, SOCS3, leptin, Influenza

INTRODUCCIÓN

La obesidad es una enfermedad crónica de etiologías múltiples, incluyendo factores genéticos, metabólicos, ambientales y sociales. Aparece cuando hay un aumento en el tejido adiposo que conlleva a un aumento en el peso corporal. Está considerada como la epidemia del siglo XXI, con un incremento continuo y estable (Karalis et al., 2009; Misra and Khurana, 2008). 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 a las personas con IMC de más de 40 kg/m² (Ogden et al., 2007).

El sobrepeso y la obesidad han surgido como una epidemia tanto en países desarrollados como en desarrollo 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 y se incrementó un 15% para 1980. Para el año 2000 alrededor del 31% de la población de Estados Unidos era obesa. Durante este periodo de 20 años, la prevalencia de obesidad se duplicó en adultos y se triplicó en niños. 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 la población en México y Argentina presentaban algún grado de sobrepeso, 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. Para el 2006, datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición del 2006 (ENSANUT) mostraron que la obesidad se incrementó a 24.2% en hombres y 34.5% en mujeres (Ford and Mokdad, 2008). Datos publicados en la ENSANUT 2012 indican que en México, el 69.4% de los adultos mayores a 20 años presentan algún grado de sobrepeso u obesidad y el 26.8 % son obesos. Estos estudios demuestran que la prevalencia de obesidad en adultos en México aumentó considerablemente del año 2000 al 2012. 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 and Kompoti, 2006), por lo que es sumamente importante investigar los mecanismos por los cuales la obesidad afecta las funciones sistémicas.

El tejido adiposo es un órgano multifuncional con importantes funciones no solo de almacenamiento de energía, sino que también lleva a cabo funciones endócrinas e inmunológicas. El tejido adiposo secreta sustancias biológicamente activas, como interleucina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) y la leptina, las cuales pueden actuar en células del sistema inmune causando inflamación local y sistémica (Tilg and Moschen, 2006).

La obesidad es un estado de inflamación crónica asociado a condiciones metabólicas crónicas como resistencia a la insulina, diabetes tipo II, aterosclerosis, enfermedad hepática y cáncer (Kanneganti and Dixit, 2012; Ouchi et al., 2011). El primer vínculo entre obesidad y citocinas pro-inflamatorias se presentó en el estudio de Hotamisligil et al. (1993), quien estableció el concepto

del papel de la inflamación en la obesidad (Hotamisligil, Shargill and Spiegelman, 1993). Así, la obesidad está asociada a un cuadro inflamatorio crónico, caracterizado por una producción anormal de adipocinas y la activación de vías de señalización pro-inflamatorias, resultado en la inducción de marcadores biológicos de inflamación (Bastard et al., 2002; Fried, Bunkin and Greenberg, 1998). Además, la reducción del peso corporal en personas está acompañada por una disminución y normalización de estos parámetros biológicos (Esposito et al., 2003; Manco et al., 2007; Moschen et al., 2010; Van Dielen et al., 2004). Una gran cantidad de estudios científicos en modelos animales demuestran que este proceso inflamatorio está asociado a la obesidad y a sus enfermedades asociadas, como resistencia a la insulina, tolerancia a la leptina, diabetes tipo II, enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer (Gardner et al., 2011; Nakamura, Fuster and Walsh, 2014; Ouchiet al., 2011; Papathanassoglou et al., 2006).

Diversos estudios que evalúan la relación obesidad-sistema inmune indican que, tanto en personas como en modelos animales, el exceso de tejido adiposo está asociado a una pobre respuesta inmune (Amar et al., 2007; Moulin et al., 2009; Papathanassoglou et al., 2006; Smith et al., 2007). La obesidad se relaciona con mayor tasa de infección y cáncer y se sabe que factores nutricionales, metabólicos y endocrinológicos están involucrados en cambios inmunológicos (Moulin et al., 2009).

La obesidad altera la respuesta inmune e incrementa la susceptibilidad a la infección y mortalidad durante la infección con el virus de la influenza (Fezeu et al., 2011). Ratones con obesidad inducida por la dieta presentan una respuesta deficiente de interferones tipo I durante la infección con el virus de la influenza A, que conduce a una citotoxicidad reducida de células NK, respuesta pro-inflamatoria retardada y una alta mortalidad (Smith et al., 2007), sugiriendo un escenario similar en personas con obesidad. Los interferones (IFN) tipo I son las citocinas más importantes involucradas en la respuesta inmune temprana hacia las infecciones de tipo viral y son regulados principalmente por la familia de

supresores de señalización de citocinas (SOCS) (Zimmerer et al., 2007), en particular SOCS1 y SOCS3 (Vlotides et al., 2004). Cuando una célula es infectada por un virus, las partículas virales son reconocidas por receptores que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos; los receptores más importantes en el reconocimiento viral son el TLR-3, TLR-7 y RIG-1. Una vez que el virus es reconocido a través de alguno de estos receptores, se activarán los factores reguladores de interferón (IRF), factores de transcripción que activan en el núcleo la expresión y posterior producción de IFN- α e IFN- β . A su vez, los interferones tipo I inducirán la expresión de los genes estimulados por interferón (ISG), un conjunto de más de 100 genes involucrados en la respuesta inmune antiviral. Sin embargo, algunos virus son capaces de inducir la expresión de SOCS1 o SOCS3, disminuyendo así la respuesta de interferones tipo I lo que les permite evadir al sistema inmune, replicarse e infectar células de los tejidos del cuerpo humano y provocar enfermedad en el hospedero (Michaud et al., 2010;Pauli et al., 2008). SOCS3 es también un regulador principal de la leptina, insulina y de las citocinas pro-inflamatorias clásicas TNF- α e IL-6, las cuáles están elevadas en personas con obesidad. Incluso, SOCS-3 ha sido identificado como un mediador de tolerancia a la leptina y resistencia a la insulina en diversos tejidos que presentan receptores a estas hormonas involucradas en el metabolismo energético (Bjørnbæk et al., 1998;Myers, Cowley and Münzberg, 2008;Rui et al., 2002).

La alteración de los niveles séricos de leptina en personas con obesidad es uno de los mecanismos asociados a inflamación y alteraciones metabólicas. La ausencia de leptina en ratones deficientes del receptor de la leptina (db/db) induce obesidad, crecimiento deficiente, infertilidad y diabetes mellitus. Además, la administración de leptina exógena a los ratones db/db reduce la obesidad y resulta en ratones magros y normales (Banks et al., 2000). Sin embargo, la administración de leptina exógena no presenta efectos positivos en las personas con obesidad o en ratones con obesidad inducida por la dieta, este fenómeno se conoce como tolerancia a la leptina. SOCS3 es un regulador principal de la señalización de la leptina y, aunque no es el único mecanismo regulador, la sobreexpresión de

SOCS3 se asocia a resistencia a la leptina en una gran cantidad de estudios en modelos animales de obesidad. Por ejemplo, Van Heek y colaboradores (1997) describieron por primera vez el fenómeno de resistencia a la leptina en ratones con obesidad inducida por la dieta utilizando una dieta alta en grasa (Van Heek et al., 1997). Posteriormente, Bjørbæk y colaboradores (1998) propusieron por primera vez a SOCS3 como un mediador de esta tolerancia en obesidad (Bjørbæk et al., 1998). Un año después, Emilsson y colaboradores (1999) demostraron que la administración de leptina incrementa la expresión de SOCS3 en el hipotálamo y en tejidos periféricos (Emilsson et al., 1999). Ratones con deficiencia heterocigota de SOCS3 mantienen sensibilidad central hacia la leptina y presentan protección al desarrollo de obesidad y sus complicaciones metabólicas asociadas. Estos ratones también pierden peso fácilmente y presentan un incremento en la señalización del receptor de la leptina en el hipotálamo en respuesta a la administración con leptina exógena (Howard et al., 2004). Además, ratones con depleción selectiva de SOCS3 en células pro-opiomelanocortina positivas (POMC) presentan mayor sensibilidad a la leptina y glucosa, lo que resulta en pérdida de peso y una ingestión adecuada de alimentos tras la infusión con leptina (Kievit et al., 2006). Por otro lado, la inducción constitutiva de STAT3 incrementa la expresión de SOCS3 en neuronas POMC, esto resulta en resistencia a la leptina y a su vez en un incremento de la ingestión de comida y la adiposidad (Ernst et al., 2009). Todas estas investigaciones sugieren que los tejidos continuamente expuestos a la leptina, incluyendo las células del sistema inmune, pueden acumular cantidades excesivas de SOCS3 y proveer así un mecanismo potencial de tolerancia a la leptina.

Diferentes células del sistema inmune expresan el receptor de la leptina (ObR). Linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, linfocitos B, y monocitos/macrófagos expresan el receptor ObR. De las células mononucleares de sangre periférica, los monocitos son el tipo celular que expresan en mayor cantidad el receptor ObR. Datos publicados por Papathanassoglou et al., (2006b) muestran que en un modelo de tolerancia a leptina en ratones con obesidad inducida por la dieta, la señalización

de la vía ObR/STAT-3 está suprimida (Papathanassoglou et al., 2006). Por otro lado, la pioglitazona, un fármaco utilizado en pacientes con diabetes para mejorar la sensibilidad a la insulina, suprime la expresión de SOCS3, incrementa la activación de STAT3 y la producción de adiponectina en el tejido adiposo (Kanatani et al., 2007). En conjunto, todas estas investigaciones indican que los niveles elevados de leptina pueden alterar la expresión de SOCS3 en células mononucleares de personas con obesidad, particularmente en aquellas células que expresan mayoritariamente el ObR como es el caso de monocitos. A su vez, la inducción en la expresión de SOCS3 pudiera disminuir no solamente la señalización de la leptina, sino otras vías que también estuvieran siendo reguladas por SOCS3 como es el caso de los interferones tipo I.

En base a lo anterior, en esta tesis se investigó el papel de SOCS3 en la regulación de la respuesta de IFN-I en personas con obesidad. También se investigó la respuesta de IFN-I y de citocinas pro-inflamatorias y su relación con la expresión de SOCS3 en pacientes con obesidad infectados con el virus de la Influenza A/H1N1. Además, se investigó el efecto de altas concentraciones de leptina y de la inflamación inducida por LPS en la respuesta de interferones tipo I en personas sin obesidad y monocitos U937. Los resultados obtenidos durante nuestra investigación demuestran que SOCS3 participa en la inhibición de la respuesta de interferones tipo I en células mononucleares de personas con obesidad. También se demostró que las personas con obesidad infectadas con el virus de la influenza A/H1N1 presentan una respuesta inhibida de interferones tipo I y citocinas pro-inflamatorias. Por último, se encontró que la leptina y la inflamación inducida por LPS inducen la expresión de SOCS3 e inhiben la respuesta de interferones tipo I en CMN de personas sanas estimuladas con ligandos de TLR-3 y TLR-7.

BIBLIOGRAFÍA

- Amar, S., Zhou, Q., Shaik-Dasthagirisahab, Y., and Leeman, S. (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, 20466.
- Atkinson, R. (2007). Viruses as an etiology of obesity. p. 1192. Mayo Clinic.
- Banks, A. S., Davis, S. M., Bates, S. H., and Myers, M. G. (2000). Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J Biol Chem* 275, 14563.
- Bastard, J. P., Maachi, M., van Nhieu, J. T., Jardel, C., Bruckert, E., Grimaldi, A., Robert, J. J., Capeau, J., and Hainque, B. (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, 2084.
- Bautista, L., Casas, J., Herrera, V., Miranda, J., Perel, P., Pichardo, R., González, A., Sanchez, J., Ferreccio, C., and Aguilera, X. (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, 364.
- Bjørnbæk, C., Elmquist, J. K., Frantz, J. D., Shoelson, S. E., and Flier, J. S. (1998). Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Molecular cell* 1, 619.
- Emilsson, V., Arch, J. R., de Groot, R. P., Lister, C. A., and Cawthorne, M. A. (1999). Leptin treatment increases suppressors of cytokine signaling in central and peripheral tissues. *FEBS Lett* 455, 170.
- Ernst, M. B., Wunderlich, C. M., Hess, S., Paehler, M., Mesaros, A., Koralov, S. B., Kleinridders, A., Husch, A., Münzberg, H., Hampel, B., Alber, J., Kloppenburg, P., Brüning, J. C., and Wunderlich, F. T. (2009). Enhanced Stat3 activation in POMC neurons provokes negative feedback inhibition of leptin and insulin signaling in obesity. *J Neurosci* 29, 11582.
- Esposito, K., Pontillo, A., Di Palo, C., Giugliano, G., Masella, M., Marfella, R., and Giugliano, D. (2003). Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women. *JAMA: the journal of the American Medical Association* 289, 1799.
- Falagas, M. E., and Kompoti, M. (2006). Obesity and infection. *The Lancet Infectious Diseases* 6, 438.

- Fezeu, L., Julia, C., Henegar, A., Bitu, J., Hu, F., Grobbee, D., Kengne, A. P., Hercberg, S., and Czernichow, S. (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., Gonzalez, C., Sereday, M., Mazza, C., and Braguinsky, J. (2008). Obesity prevalence and trends in Latin-American countries. *Obesity Reviews* 2, 99.
- Ford, E. S., and Mokdad, A. H. (2008). Epidemiology of obesity in the Western Hemisphere. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 93, s1.
- Fried, S. K., Bunkin, D. A., and Greenberg, A. S. (1998). Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 83, 847.
- Gardner, E. M., Beli, E., Clinthorne, J. F., and Duriancik, D. M. (2011). Energy Intake and Response to Infection with Influenza. *Annual Review of Nutrition* 31, 353.
- Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S., and Spiegelman, B. M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259, 87.
- Howard, J. K., Cave, B. J., Oksanen, L. J., Tzamelis, I., Bjørbaek, C., and Flier, J. S. (2004). Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of *Socs3*. *Nat Med* 10, 734.
- Kanatani, Y., Usui, I., Ishizuka, K., Bukhari, A., Fujisaka, S., Urakaze, M., Haruta, T., Kishimoto, T., Naka, T., and Kobayashi, M. (2007). Effects of pioglitazone on suppressor of cytokine signaling 3 expression: potential mechanisms for its effects on insulin sensitivity and adiponectin expression. *Diabetes* 56, 795.
- Kanneganti, T. D., and Dixit, V. D. (2012). Immunological complications of obesity. *Nature Immunology* 13, 707.
- Karalis, K., Giannogonas, P., Kodela, E., Koutmani, Y., Zoumakis, M., and Teli, T. (2009). Mechanisms of obesity and related pathology: linking immune responses to metabolic stress. *FEBS Journal* 276, 5747.
- Kievit, P., Howard, J. K., Badman, M. K., Balthasar, N., Coppari, R., Mori, H., Lee, C. E., Elmquist, J. K., Yoshimura, A., and Flier, J. S. (2006). Enhanced leptin sensitivity and improved glucose homeostasis in mice lacking suppressor of cytokine signaling-3 in POMC-expressing cells. *Cell Metab* 4, 123.

- Manco, M., Fernandez-Real, J. M., Equitani, F., Vendrell, J., Valera Mora, M. E., Nanni, G., Tondolo, V., Calvani, M., Ricart, W., and Castagneto, M. (2007). Effect of massive weight loss on inflammatory adipocytokines and the innate immune system in morbidly obese women. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 92, 483.
- Michaud, F., Coulombe, F., Gaudreault, E., Paquet-Bouchard, C., Rola-Pleszczynski, M., and Gosselin, J. (2010). Epstein-Barr Virus Interferes with the Amplification of IFN α Secretion by Activating Suppressor of Cytokine Signaling 3 in Primary Human Monocytes. *PLoS one* 5, e11908.
- Misra, A., and Khurana, L. (2008). Obesity and the metabolic syndrome in developing countries. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 93, s9.
- Moschen, A. R., Molnar, C., Geiger, S., Graziadei, I., Ebenbichler, C. F., Weiss, H., Kaser, S., Kaser, A., and Tilg, H. (2010). Anti-inflammatory effects of excessive weight loss: potent suppression of adipose interleukin 6 and tumour necrosis factor expression. *Gut* 59, 1259.
- Moulin, C. M., Marguti, I., Peron, J. P. S., Rizzo, L. V., and Halpern, A. (2009). Impact of adiposity on immunological parameters. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* 53, 183.
- Myers, M. G., Cowley, M. A., and Münzberg, H. (2008). Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annu. Rev. Physiol.* 70, 537.
- Nakamura, K., Fuster, J. J., and Walsh, K. (2014). Adipokines: a link between obesity and cardiovascular disease. *J Cardiol* 63, 250.
- Ogden, C., Yanovski, S., Carroll, M., and Flegal, K. (2007). The epidemiology of obesity. *Gastroenterology* 132, 2087.
- Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J., and Walsh, K. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature Reviews Immunology* 11, 85.
- Papathanassoglou, E., El-Haschimi, K., Li, X. C., Matarese, G., Strom, T., and Mantzoros, C. (2006). Leptin receptor expression and signaling in lymphocytes: kinetics during lymphocyte activation, role in lymphocyte survival, and response to high fat diet in mice. *The Journal of Immunology* 176, 7745.
- Pauli, E. K., Schmolke, M., Wolff, T., Viemann, D., Roth, J., Bode, J. G., and Ludwig, S. (2008). Influenza A virus inhibits type I IFN signaling via NF- κ B-dependent induction of SOCS-3 expression. *PLoS Pathogens* 4, e1000196.

- Rui, L., Yuan, M., Frantz, D., Shoelson, S., and White, M. F. (2002). SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *Journal of Biological Chemistry* 277, 42394.
- Smith, A. G., Sheridan, P. A., Harp, J. B., and Beck, M. A. (2007). Diet-induced obese mice have increased mortality and altered immune responses when infected with influenza virus. *The Journal of nutrition* 137, 1236.
- Tilg, H., and Moschen, A. R. (2006). Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology* 6, 772.
- Van Dielen, F., Buurman, W., Hadfoune, M., Nijhuis, J., and Greve, J. (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, 4062.
- Van Heek, M., Compton, D. S., France, C. F., Tedesco, R. P., Fawzi, A. B., Graziano, M. P., Sybertz, E. J., Strader, C. D., and Davis, H. R. (1997). Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin. *J Clin Invest* 99, 385.
- Vlotides, G., Sørensen, A., Kopp, F., Zitzmann, K., Cengic, N., Brand, S., Zachoval, R., and Auernhammer, C. (2004). SOCS-1 and SOCS-3 inhibit IFN- γ -induced expression of the antiviral proteins 2, 5-OAS and MxA. *Biochemical and biophysical research communications* 320, 1007.
- Yang, H., Youm, Y., Vandanmagsar, B., Rood, J., Kumar, K., Butler, A., and Dixit, V. (2009). Obesity accelerates thymic aging. *Blood* 114, 3803.
- Zimmerer, J. M., Lesinski, G. B., Kondadasula, S. V., Karpa, V. I., Lehman, A., RayChaudhury, A., Becknell, B., and Carson, W. E. (2007). IFN- α -induced signal transduction, gene expression, and antitumor activity of immune effector cells are negatively regulated by suppressor of cytokine signaling proteins. *The Journal of Immunology* 178, 4832.

INTEGRACIÓN DEL MANUSCRITO DE TESIS

La información derivada de esta investigación se sintetizó en capítulos con formato de artículo que fueron ordenados de acuerdo a los objetivos particulares.

Capítulo 1 “**Producción de interferon- α e interferon- β en obesidad y expresión del supresor de señalización de citocinas**”.

En este capítulo se describe cómo las células mononucleares de personas con obesidad presentan una respuesta deficiente de IFN- α e IFN- β tras el estímulo con ligandos de TLR-3 y TLR-7. Esta respuesta estuvo asociada a una expresión basal elevada de SOCS3. La respuesta pro-inflamatoria en personas con obesidad también se vio comprometida cuando sus CMN fueron estimuladas con el ligando de TLR-3.

Artículo publicado, referencia: Teran-Cabanillas, E., Montalvo-Corral, M., Caire-Juvera, G., Moya-Camarena, S. Y. and Hernández, J. 2013. Decreased interferon- α and interferon- β production in obesity and expression of suppressor of cytokine signaling. *Nutrition*, 29: 207-212.

Capítulo 2 “**Producción de interferon α y β , citocinas pro-inflamatorias y la expresión del supresor de señalización de citocinas (SOCS) en sujetos obesos infectados con influenza A/H1N1**”.

En este capítulo se describe cómo las CMN de personas con obesidad infectadas con el virus de la influenza A/H1N1, estimuladas ex vivo con ligandos de TLR-3 y TLR-7, presentan una respuesta menor de IFN-I y de citocinas pro-inflamatorias en comparación con las CMN de personas sin obesidad también infectadas con influenza AH1/N1. Se observó que esta inhibición fue más significativa en CMN estimuladas con el ligado del TLR-3 que con el ligando de TLR-7. Otro dato interesante fue que los participantes sin obesidad infectados con el virus de la influenza A/H1N1 presentaron mayor expresión basal de SOCS1 y SOCS3.

Artículo publicado, referencia: Eli Terán-Cabanillas, Maricela Montalvo-Corral, Erika Silva-Campa, Graciela Caire-Juvera, Silvia Y. Moya-Camarena, Jesús Hernández (2014). Production of interferon α and β , pro-inflammatory cytokines and the expression of suppressor of cytokine signaling (SOCS) in obese subjects infected with influenza A/H1N1. *Clinical Nutrition* 33: 922-926.

Capítulo 3 “**Leptina, supresor de señalización de citocinas-3 e interferones tipo I en obesidad**”.

En este capítulo se evaluó la participación de SOCS3 en la inhibición de la respuesta de IFN-I en personas con obesidad. También se investigó la participación de la leptina y de la inflamación inducida por LPS en la inducción de SOCS3 y en la inhibición de IFN-I en CMN de personas sin obesidad y en monocitos U937. Los resultados mostraron que el silenciamiento con siRNA específico para SOCS3 incrementó la respuesta de IFN-I en personas con obesidad. Además, la leptina y el LPS inhibieron la respuesta de IFN-I en CMN de personas sin obesidad y en monocitos U937. Los resultados descritos en este capítulo confirman que SOCS3 participa en la inhibición de interferones tipo I en personas con obesidad y que la leptina y la inflamación crónica pueden ser un detonador de dicha inhibición, lo cual explica la pobre respuesta inmune observada en personas obesidad durante infecciones virales.

Este capítulo se presenta en forma de manuscrito y se encuentra en revisión para publicación en la revista *Clinical Nutrition* con el título: Leptin induces SOCS3 expression and inhibits type I interferons; SOCS3 silencing restores interferons response in obesity.

HIPÓTESIS

Las personas con obesidad presentan una respuesta deficiente de interferones tipo I debido a la expresión elevada de SOCS3.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la participación de SOCS3 en la inducción de una respuesta deficiente de interferones tipo I en células mononucleares de personas con obesidad.

Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de la obesidad en la respuesta de IFN α/β y en la expresión de SOCS en pacientes infectados con influenza AH1N1.
2. Generar un modelo *in vitro* de tolerancia en monocitos U937 y CMN para evaluar el efecto de la leptina y el LPS en la respuesta de interferones tipo I.
3. Evaluar el efecto del SOCS3 durante la inducción de inflamación para determinar su papel en la supresión de la producción de IFN- α/β .
4. Silenciar el gen SOCS3 con siRNA para determinar su papel en la inhibición de IFN α/β en personas con obesidad.

Capítulo 1

Producción de interferon- α e interferon- β en obesidad y expresión del supresor de señalización de citocinas

Eli Terán-Cabanillas, Maricela Montalvo-Corral, Graciela Caire Juvera, Silvia Y. Moya-Camarena, Jesús Hernández (2013). Decreased interferon- α and interferon- β production in obesity and expression of suppressor of cytokine signaling. *Nutrition* 29: 207-212.

Resumen

La obesidad se ha asociado a una respuesta inmune deficiente y a un incremento en la mortalidad durante infecciones virales. SOCS1 y SOCS3 regulan negativamente la respuesta de interferones tipo I y ciertos virus inducen su expresión, inhibiendo así la respuesta de interferones. Además, SOCS3 es un regulador clave de la leptina, TNF- α e IL-6, citocinas pro-inflamatorias que se encuentran elevadas en personas con obesidad. Lo anterior, sugiere que SOCS3 podría estar sobre-expresado en personas con obesidad. En esta etapa, se evaluó la respuesta de interferones tipo I y su relación con la expresión de SOCS1 y SOCS3 en personas con obesidad. Se incluyeron 60 individuos de entre 18 a 50 años de edad agrupados en: personas sin obesidad (IMC <25 n=30) y personas con obesidad (IMC >30 n=30). Se separaron CMN de los participantes y se midieron niveles basales de SOCS1 y SOCS3 por PCR en tiempo real (qRT-PCR). Posteriormente las CMN fueron estimuladas con ligandos para TLR-3 y TLR-7. Se midió la respuesta de IFN- α e IFN- β y citocinas pro-inflamatorias por qRT-PCR y/o ELISA y la expresión de SOCS1 y SOCS3 por qRT-PCR y Western blot. Los resultados mostraron que las CMN de personas con obesidad presentan una respuesta deficiente de interferones tipo I cuando son estimuladas con ligandos de TLR; esta respuesta estuvo asociada con niveles basales elevados de SOCS3 pero no de SOCS1. Las CMN de personas con obesidad también presentaron niveles basales elevados de IL-6 y una respuesta deficiente de citocinas pro-inflamatorias tras el estímulo con el ligando de TLR-3 en comparación con los participantes sin obesidad. En conclusión, los resultados demuestran que la obesidad está relacionada con una respuesta deficiente de IFN- α e IFN- β y una expresión basal elevada de SOCS3. Esto explica, al menos en parte, la respuesta inmune inadecuada que se observa en personas con obesidad durante infecciones virales como hepatitis e influenza.

Capítulo 2

Producción de interferon α y β , citocinas pro-inflamatorias y la expresión del supresor de señalización de citocinas (SOCS) en sujetos obesos infectados con influenza A/H1N1

Eli Terán-Cabanillas, Maricela Montalvo-Corral, Erika Silva-Campa, Graciela Caire-Juvera, Silvia Y. Moya-Camarena, Jesús Hernández (2014). Production of interferon α and β , pro-inflammatory cytokines and the expression of suppressor of cytokine signaling (SOCS) in obese subjects infected with influenza A/H1N1. *Clinical Nutrition* 33: 922-926.

Resumen

Durante la pandemia de Influenza A/H1N1 en el 2009, la obesidad fue reconocida como un factor de riesgo independiente de morbilidad y mortalidad. En modelos murinos, los mecanismos asociados a alta mortalidad en obesidad durante la infección con el virus de la influenza A incluyen una capacidad reducida de producir interferones tipo I y una respuesta pro-inflamatoria retardada. En base a lo anterior se hipotetizó un escenario similar en humanos donde las personas con obesidad infectadas con influenza A/H1N1 presentarían una pobre respuesta de interferones tipo I. Con el objetivo de corroborar nuestra hipótesis, en este capítulo se evaluó la producción de interferones tipo I, respuesta de citocinas pro- y anti-inflamatorias en CMN de sujetos con y sin obesidad infectados con el virus de la influenza A/H1N1. También se evaluó la expresión de SOCS1 y SOCS3 y del factor nuclear-kB (NF-kB). Los IFN-I y las citocinas pro- y anti-inflamatorias se evaluaron por qRT-PCR y/o ELISA en CMN estimuladas con ligandos de TLR-3 y TLR-7. Se evaluaron los niveles de mRNA de SOCS1, SOCS3 y NF-kB por qRT-PCR. Los resultados mostraron que las células mononucleares de voluntarios con obesidad infectados con influenza A/H1N1 tienen una respuesta menor de IFN-I que los voluntarios sin obesidad en respuesta a la estimulación con el ligando de TLR-3. La respuesta de citocinas pro-inflamatorias también se vio afectada en CMN estimuladas con el ligando de TLR-3. Los participantes sin obesidad infectados con el virus de la influenza A/H1N1 presentaron mayor expresión basal de SOCS1 y SOCS3. En conclusión, estos resultados sugieren que las personas con obesidad infectadas con influenza A/H1N1 tienen una respuesta de IFN-I y de citocinas pro-inflamatorias deficiente. Estos resultados ayudan a explicar la alta mortalidad asociada a obesidad durante la infección con el virus de la influenza A/H1N1.

Capítulo 3

Leptina, supresor de señalización de citocinas-3 e interferones tipo I en obesidad

Leptin, suppressor of cytokine signaling-3 and type I interferons response in obesity. Elí Terán-Cabanillas and Jesús Hernández. Manuscrito en revisión en la revista Clinical Nutrition.

Resumen

El tejido adiposo blanco es un órgano endócrino activo que secreta sustancias con actividad biológica llamadas adipocinas. La producción alterada de adipocinas es uno de los mecanismos involucrados en la asociación entre obesidad y enfermedades crónicas como diabetes y cáncer. La obesidad, considerada como un aumento del tejido adiposo, está asociada a un cuadro inflamatorio crónico, caracterizado por una producción anormal de adipocinas y la activación de vías de señalización pro-inflamatorias, resultado en la inducción de marcadores biológicos de inflamación. La leptina es la adipocina más estudiada, se sabe que tiene múltiples efectos en las células del sistema inmune y se considera una citocina pro-inflamatoria. SOCS3 es un regulador principal de la señalización de la leptina y de las citocinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF- α , las cuales están elevadas en personas con obesidad, y su sobre-expresión induce tolerancia en la vía de señalización a la leptina en modelos animales de obesidad inducida por la dieta. SOCS3 además, es un regulador principal de IFN-I; incluso, algunos virus inducen su expresión en la célula infectada para inhibir a los IFN-I y evadir la respuesta inmune. En estudios anteriores, hemos demostrado que las CMN de personas con obesidad presentan una expresión basal de SOCS3 elevada y una respuesta disminuida de IFN-I tras el estímulo con ligandos de TLR-3 y TLR-7 y durante la infección con el virus de la influenza A/H1N1. Sin embargo, el papel de SOCS3 y de la leptina en la inhibición de IFN-I en personas con obesidad no ha sido previamente investigado. En base a lo anterior, en este capítulo se evaluó la participación de SOCS3 en la inhibición de IFN-I. También se investigó la participación de la leptina y de la inflamación inducida por LPS en la inducción de SOCS3 y en la inhibición de IFN-I en CMN de personas sin obesidad y en monocitos U937. Las citocinas fueron evaluadas por qRT-PCR y/o ELISA, la expresión de SOCS1 y SOCS3 se evaluó por qRT-PCR. Para evaluar el papel de SOCS3 y SOCS1 en la inhibición de IFN-I en personas con obesidad, se silenciaron los genes con siRNA específico para cada gen. Para evaluar el papel de la leptina en la inhibición de IFN-I, se estimularon CMN de personas sin obesidad y monocitos U937 por 4 o 24 horas con leptina o LPS y posteriormente

se indujo la producción de IFN-I con ligados de TLR-3 y TLR-7. Los resultados mostraron que el silenciamiento con siRNA específico para SOCS3 incrementó la respuesta de IFN-I en personas con obesidad. En cambio, el silenciamiento de SOCS3 no incrementó la respuesta IFN-I en personas sin obesidad lo que demuestra que SOCS3 participa en la inhibición de IFN-I en personas con obesidad. Además, la leptina y el LPS inhibieron la respuesta de IFN-I en CMN de personas sin obesidad y en monocitos U937. Los resultados obtenidos confirman que SOCS3 participa en la inhibición de interferones tipo I en personas con obesidad y que la leptina y la inflamación crónica pueden ser un detonador de dicha inhibición, lo cual explica la pobre respuesta inmune observada en personas con obesidad durante infecciones virales.

De: Clinical Nutrition espenjournals@espen.org
Asunto: A manuscript number has been assigned to YCLNU-D-14-00553
Fecha: 24 de septiembre de 2014 9:44
Para: jhdez@ciad.mx

CN

Ms. Ref. No.: YCLNU-D-14-00553
Title: "Leptin induces SOCS3 expression and inhibits type I interferons; SOCS3 silencing restores interferons response in obesity"
Clinical Nutrition

Dear Dr. Jesus Hernandez,

Your submission "Leptin induces SOCS3 expression and inhibits type I interferons; SOCS3 silencing restores interferons response in obesity" has been assigned manuscript number YCLNU-D-14-00553.

To track the status of your paper, please do the following:

1. Go to this URL: <http://ees.elsevier.com/yclnu/>
2. Enter your login details
3. Click [Author Login]
This takes you to the Author Main Menu.
4. Click [Submissions Being Processed]

Thank you for submitting your work to Clinical Nutrition.

Kind regards,

Nicolaas E. Deutz, MD, PhD
Editor-in-Chief
Clinical Nutrition

Please note that the editorial process varies considerably from journal to journal. To view a sample editorial process, please click here:
http://ees.elsevier.com/eeshelp/sample_editorial_process.pdf

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

Manuscript Number: YCLNU-D-14-00553

Title: Leptin induces SOCS3 expression and inhibits type I interferons; SOCS3 silencing restores interferons response in obesity

Article Type: Full Length Article

Keywords: Obesity, Leptin, SOCS3, type I interferons

Corresponding Author: Dr. Jesus Hernandez, PhD

Corresponding Author's Institution: CIAD

First Author: Eli Terán-Cabanillas

Order of Authors: Eli Terán-Cabanillas; Jesus Hernandez, PhD

Abstract: Background & aims: Obesity is a chronic pro-inflammatory state associated with an impaired immune response. We have previously shown that people with obesity present a diminished type I interferons response in PBMCs after toll-like receptor (TLR) stimulation and influenza A/H1N1 infection. This finding was accompanied by high expression of suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS3) but not of SOCS1. SOCS3 is not only a key regulator of type I interferons but also of leptin and pro-inflammatory cytokines, which are elevated in obesity. However, the role of SOCS3 in the inhibition of type I interferons in obese individuals remains unknown. Methods: Cytokines and SOCS1 and SOCS3 expression were measured by qRT-PCR and/or by ELISA in PBMC and U937 cells, treated or not treated with leptin or LPS, and stimulated with TLR-3 and TLR-7 ligands. To evaluate the role of SOCS3 and SOCS1 in the inhibition of type I interferons in people with obesity, genes were silenced by siRNA for SOCS1 and SOCS3. Results: Here we demonstrate that Leptin- and LPS-induced SOCS3 expression produce hyporesponsiveness to TLR-3 and TLR-7 ligands in PBMCs from healthy donors and U937 monocytes. We also demonstrate that SOCS3 but not SOCS1 gene silencing by siRNA increases the type I interferons response in PBMCs obtained from obese people. An increase in type I interferons was not observed in PBMCs from healthy volunteers after SOCS3 siRNA silencing, which further confirms that SOCS3 participates in the inhibition of type I interferons in people with obesity. Conclusions: Our results demonstrate for the first time that SOCS3 participates in the inhibition of type I interferons in PBMCs of obese individuals. Leptin induced SOCS3 and reduced type I interferons response in PBMC from non-obese volunteers. These results help to explain the aberrant immune response observed in people with obesity.

Opposed Reviewers:

1 **Leptin induces SOCS3 expression and inhibits type I interferons; SOCS3 silencing restores**
2 **interferons response in obesity**

3

4 **Short title:** Leptin and response of type I interferons

5

6 Elí Terán-Cabanillas, Jesús Hernández*

7 Laboratorio de Inmuología, Coordinación de Nutrición, Centro de Investigación en Alimentación y

8 Desarrollo, A.C., Hermosillo, Sonora. Mexico

9

10 *To whom correspondence:

11 Jesús Hernández

12 Laboratorio de Inmunología,

13 Coordinación de Nutrición,

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

15 Km 0.6 Carretera a la Victoria. Hermosillo, Sonora. México. 83304.

16 Phone: +52 662 2800010

17 Fax: +52 662 2892400

18 Email: jhdez@ciad.mx

19

20

21

22

23

24

25

26

27 **Abstract**

28 *Background & aims:* Obesity is a chronic pro-inflammatory state associated with an impaired
29 immune response. We have previously shown that people with obesity present a diminished type
30 I interferons response in PBMCs after toll-like receptor (TLR) stimulation and influenza A/H1N1
31 infection. This finding was accompanied by high expression of suppressor of cytokine signaling-
32 3 (SOCS3) but not of SOCS1. SOCS3 is not only a key regulator of type I interferons but also of
33 leptin and pro-inflammatory cytokines, which are elevated in obesity. However, the role of
34 SOCS3 in the inhibition of type I interferons in obese individuals remains unknown.

35 *Methods:* Cytokines and SOCS1 and SOCS3 expression were measured by qRT-PCR and/or by
36 ELISA in PBMC and U937 cells, treated or not treated with leptin or LPS, and stimulated with
37 TLR-3 and TLR-7 ligands. To evaluate the role of SOCS3 and SOCS1 in the inhibition of type I
38 interferons in people with obesity, genes were silenced by siRNA for SOCS1 and SOCS3.

39 *Results:* Here we demonstrate that Leptin- and LPS-induced SOCS3 expression produce
40 hyporesponsiveness to TLR-3 and TLR-7 ligands in PBMCs from healthy donors and U937
41 monocytes. We also demonstrate that SOCS3 but not SOCS1 gene silencing by siRNA increases
42 the type I interferons response in PBMCs obtained from obese people. An increase in type I
43 interferons was not observed in PBMCs from healthy volunteers after SOCS3 siRNA silencing,
44 which further confirms that SOCS3 participates in the inhibition of type I interferons in people
45 with obesity.

46 *Conclusions:* Our results demonstrate for the first time that SOCS3 participates in the inhibition
47 of type I interferons in PBMCs of obese individuals. Leptin induced SOCS3 and reduced type I
48 interferons response in PBMC from non-obese volunteers. These results help to explain the
49 aberrant immune response observed in people with obesity.

50 *Keywords:* Obesity, Leptin, SOCS3, type I interferons

51 **1. Introduction**

52

53 Obesity is a pro-inflammatory state related to metabolism-associated chronic conditions, such as
54 insulin resistance, type II diabetes, atherosclerosis, liver disease and cancer [1, 2]. Altered
55 concentrations of adipokines, factors that are secreted by adipose tissue, such as leptin, are
56 potentially key contributors to the inflammatory state observed in obesity [2]. Leptin is a
57 cytokine-like hormone product of the *ob/ob* gene[3] and is positively correlated with body mass
58 index (BMI) [4]. Several studies have demonstrated proinflammatory actions for this adipokine
59 in a variety of immune cells [5-7]. SOCS-3 is a key regulator of leptin and has been identified as
60 a mediator of leptin and insulin resistance in obesity [8-10]. Moreover, SOCS-3 is a key regulator
61 of type I interferons and pro-inflammatory cytokines such as TNF- α . We have previously shown
62 that SOCS-3 is overexpressed in people with obesity. In addition, SOCS-3 expression was
63 directly correlated with a negative production of type I interferons and pro-inflammatory
64 cytokines after TLR stimulation in people with obesity, suggesting that SOCS-3 might play a key
65 role in the induction of this aberrant response [11].

66

67 Type 2 diabetes, a common underlying disease of obesity, is related to the elevated expression of
68 TLR-2 and TLR-4 [12]. Recently diagnosed obese Type 2 diabetic subjects present increased
69 TLR activation and increased serum levels of TLR ligands, such as lipopolysaccharide (LPS)
70 [13]. High glucose levels induce TLR expression in human monocytes[14] and high-dose leptin
71 also activates human leukocytes in a TLR-independent fashion. However, prior exposure of
72 innate immune cells to LPS causes them to be refractory to further endotoxin stimulation, also
73 termed endotoxin tolerance (ET) [15]. Bacterial LPS is recognized by the TLR-4, this recognition
74 results in the activation of the TLR-4 signaling which enables the innate immune system to cope

75 with invasive pathogens. However, *in vivo* LPS exposure of human blood leukocytes induces
76 cross-tolerance to multiple TLR ligands, including TLR-3 and TLR-7 ligands [16]. Furthermore,
77 the expression of SOCS3 is induced by ligation of TLR4 [17] and chronic JAK-STAT signaling
78 causes leptin resistance in the central nervous system and insulin resistance in peripheral organs
79 through SOCS3 activation [18].

80
81 As obese individuals present high leptin serum levels and SOCS3 overexpression, and because
82 SOCS3 is also a key regulator of type I interferons, we hypothesize that SOCS3 inhibits the type
83 I interferons response in people with obesity. We also explore the effect of high-dose leptin and
84 inflammation induced by LPS in the type I interferons response of healthy donors and SOCS
85 expression both *ex vivo* and *in vitro*.

86

87 **2. Methods**

88

89 *2.1 Subjects, PBMCs isolation and U937 Cells*

90 For siRNA experiments, three healthy (BMI <25) and three obese (BMI >30) adult volunteers
91 (aged 20–45 years) were included in this study. The included participants had sustained no
92 disease for at least two weeks before sampling. Pregnancy, any pharmacologic treatment and
93 immunosuppressive conditions were exclusion criteria. Obese volunteers were not engaged in
94 physical activity for at least two weeks prior to blood sampling and were following their
95 normally consumed diets. Peripheral blood (18 ml) was collected into heparinized tubes from
96 fasting participants. The protocol was approved by the ethical committee of the Centro de
97 Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. and all volunteers provided written informed

98 consent. PBMC were obtained by Ficoll gradient centrifugation. The human monocyte U937 cell
99 line was maintained and grown in suspension in RPMI1640 medium supplemented with 10%
100 heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine and antibiotics (100U/ml penicillin
101 and 100 µg/ml streptomycin) at 37°C and 5% CO₂ atmosphere.

102

103 *2.2 Reagents*

104 Human recombinant leptin (R&D Systems, Abingdon, UK) was reconstituted with 20 mM sterile
105 Tris/HCl (pH 8.0, w/v), according to the manufacturer's instructions. Working dilutions were
106 prepared in cell-culture medium. Reconstituted leptin was stored at -80°C. Leptin concentrations
107 used in the experiments (10, 100 and 1000 ng/ml, as indicated) were chosen based on previous
108 studies.[5, 6] To avoid endotoxin contamination, polymyxin B (InvivoGen, San Diego, CA,
109 USA) was used in all leptin experiments at a concentration of 10 µg/mL. TLR-3 and TLR-7
110 ligands were used at a concentration of 5 µg/mL (Poly I:C and CL264, respectively; InvivoGen,
111 San Diego, CA, USA) in the presence of Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA),
112 according to the manufacturers' instructions.

113

114 *2.3 Ex vivo and in vitro cross-tolerance by leptin and LPS assay*

115 One million U937 human monocyte cell line or PBMCs per well were stimulated with either LPS
116 or leptin. Next, cells were washed twice with warm RPMI-1640 and held in complete medium for
117 1 h through the recovery period and re-stimulated for 20 h with a TLR-3 or TLR-7 ligand at a
118 concentration of 5 µg/mL (Poly I:C and CL264, respectively; InvivoGen, San Diego, CA, USA)
119 in the presence of Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), according to the
120 manufacturers' instructions. After each incubation period, the cells were harvested and

121 centrifuged; the cell pellet was used to isolate RNA and the cell culture supernatant was obtained
122 for the later determination of cytokines by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

123

124 *2.4 RNA extraction and qRT-PCR assay*

125 Total RNA was isolated from 1×10^6 PBMCs using the RNeasy mini-kit (Qiagen, Valencia, CA,
126 USA), according to the manufacturer's instructions. RNA concentration and purity were analyzed
127 by absorbance in a spectrophotometer (NanoDrop, Wilmington, DE, USA). The RNA was stored
128 at -70°C until used. Real-time qRT-PCR was performed using the One-step Brilliant II
129 SYBRGREEN QRT-PCR Master Mix kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) in a Step One system
130 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The primers for IFN- α 2 [19] and SOCS1 and
131 SOCS3[20] have been described previously. The cycle threshold (Ct) values of each gene were
132 normalized against the endogenous Ct values of the β -actin gene and compared with the non-
133 stimulated cells. The values are represented as the mean fold relative increments ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$).

134

135 *2.5 ELISA for quantification of cytokines*

136 Quantification of type I IFNs and TNF- α was performed in supernatants of the stimulated cells in
137 a 1:10 dilution with assay buffer. IFN- α was quantified using the Human Interferon-Alpha Multi-
138 Subtype ELISA Kit (VeriKine, Piscataway, NJ, USA), IFN- β was quantified using the Human
139 Interferon- β ELISA Kit (TFB, Tokyo, Japan) and TNF- α was quantified using the Human TNF
140 alpha ELISA Ready-SET-Go![®] (eBioscience, San Diego, CA, USA). The absorbance was
141 measured in the ELISA reader model 680 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The results were
142 analyzed using a four parameter logistic model in GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc.,
143 San Diego, CA, USA).

144

145 *2.6 siRNA-mediated knockdown of human SOCS1 and SOCS3*

146 For SOCS-3 and SOCS-1 mRNA silencing, cells were transfected 48 h prior to stimulation with
147 leptin or LPS with the ready-to-use FlexiTube siRNA premix for SOCS-3 (Hs_SOCS3_6),
148 SOCS-1 (Hs_SOCS1_4) and siRNA control (Qiagen, Valencia, CA, USA), following the
149 manufacturer's instructions. In brief, siRNA premix was added directly to the cells at a final
150 concentration of 50 nM and a final volume of 300 μ l in a 48-well plate.

151

152 *2.7 Statistical Analysis*

153 Data are presented as the means \pm SEM, and the significance level was established at $p < 0.05$. The
154 comparisons between groups were performed using Student's *t* test. Analyses were conducted
155 using Stata 9.2 (StataCorp LP, College Station, TX, USA).

156

157 **3. Results**

158

159 *3.1 High-dose leptin and LPS induce SOCS1 and SOCS3 in PBMCs and human monocytes U937* 160 *in vitro*

161 To analyze the induction of SOCS1 and SOCS3 by leptin and LPS, PBMCs from healthy
162 volunteers and U937 monocytes were stimulated with different doses of leptin and LPS and the
163 expression of SOCS1 and SOCS3 were measured. As expected, SOCS1 and SOCS3 were
164 induced after LPS in U937 monocytes (Figure 1A and 1B, respectively) and in PBMC (Figure
165 1C). In U937 cells, SOCS1 and SOCS3 expression was higher when monocytes were stimulated
166 with leptin at 100 ng/mL ($p < 0.05$). In contrast, SOCS1 and SOCS3 expression was induced

167 similarly, regardless of the LPS dose used. Because leptin induced higher SOCS expression at
168 100 ng/mL, this concentration was used for the following experiments. Contrary to the U937
169 monocytes' response, LPS induced higher mRNA levels (33.90 ± 6.06) of SOCS-3 than leptin
170 (18.91 ± 7.69) in PBMC.

171

172 *3.2 High-dose leptin activates PBMCs and human monocytes U937*

173 High-dose leptin has been previously shown to be capable of activating monocytes and PBMC;
174 however, we aimed to determine the dose (10-1000 ng/mL) that highly induced TNF- α under our
175 experimental conditions. LPS, a common inductor of TNF- α , was used as a reference to compare
176 TNF- α induction by leptin. Leptin induced TNF- α transcripts in U937 monocytes similarly
177 regardless of the dose used (figure 2A). Induction of TNF- α transcripts by leptin was similar to
178 those observed with LPS (figure 2A). Moreover, to ensure that TNF- α production was induced
179 by leptin, we studied supernatants from cells stimulated with 100 ng/mL of leptin or 10 ng/mL of
180 LPS and measured TNF- α production by ELISA. As expected, leptin induced TNF- α production
181 in both U937 human monocytes and PBMC (figures 2B and 2C). In PBMC, TNF- α production
182 was similar in cells stimulated with leptin or LPS ($p > 0.05$; figure 2C). Alternatively, LPS
183 induced higher concentrations of TNF- α in U937 monocytes ($p < 0.05$; figure 2B). Interestingly,
184 leptin induced higher production of TNF- α in PBMC than in monocytes U937 (30.17 pg/mL and
185 13.22, respectively; figures 2B and 2C).

186

187 *3.3 High-dose leptin and LPS induce cross-tolerance to TLR-3 and TLR-7 ligands in vitro*

188 It has been demonstrated that LPS induces cross-tolerance to multiple TLR ligands [16]. To
189 evaluate whether leptin is able to also induce cross-tolerance to TLR ligands, U937 cells and

190 PBMCs from healthy volunteers were stimulated with LPS (10 ng/mL) or leptin (100 ng/mL) for
191 either 4 or 24 h. Then, we compared IFN- α expression by qRT-PCR and IFN α/β production by
192 ELISA after TLR-3 and TLR-7 stimulation for 20 h with untreated cells. As expected, in U937
193 monocytes, LPS stimulation for 4 h induced hyporesponsiveness to TLR-3 and TLR-7 ligands
194 (Poly I:C and CL264, respectively) (figure 3A). However, only the TLR-3 pathway was
195 significantly affected after 24 h pre-stimulation with LPS (figure 3B). In contrast, leptin
196 stimulation for 4 h induced cross-tolerance to TLR-3 and TLR-7 ligands similar to LPS but had a
197 stronger effect than LPS in the induction of hyporesponsiveness at 24 h to both TLR-3 and TLR-
198 7 ligands ($p<0.05$) (figure 3A and 3B). In PBMCs, pretreatment of cells for 24h with both LPS
199 and leptin induced hyporesponsiveness to TLR-3 and TLR-7 ligands (figure 3C).

200
201 Next, to ensure that leptin and LPS induce cross-tolerance to TLR-3 and TLR-7 ligands, we
202 measured IFN- α and IFN- β production in the supernatants of stimulated PBMCs from healthy
203 volunteers by ELISA. As expected, pretreatment with LPS or leptin for 4 and 24 h inhibited the
204 production of IFN- β after TLR-3 stimulation compared to those previously untreated cells
205 ($p<0.05$) (figure 3D). However, although pretreatment with LPS or leptin for 4h inhibited the
206 IFN- α production, this was not statically different ($p>0.05$) (figure 3E). Contrary, pretreatment of
207 PBMCs with LPS or leptin for 24 h significantly inhibited the production of IFN- α after TLR-7
208 stimulation compared to those previously untreated cells ($p<0.05$) (figure 3E).

209
210 *3.4 SOCS3 but not SOCS1 gene silencing by siRNA increases the type I interferons response in*
211 *PBMCs from obese individuals*

212 To determine whether SOCS proteins were involved in inducing an aberrant type I interferons
213 response in people with obesity, SOCS1 and SOCS3 genes were silenced in PBMCs from obese
214 individuals using siRNA specific for those genes and a siRNA control. When PBMCs from
215 people with obesity were silenced for SOCS3, there was an increase in IFN- α transcript levels
216 compared to siRNA control-treated cells, regardless of the TLR ligand used ($p < 0.05$) (figure 4A).
217 In contrast, when PBMCs from people with obesity were treated with siRNA for SOCS1, there
218 was no significant increase in IFN- α transcript levels after stimulating the cells with a TLR-3 or
219 TLR-7 ligand ($p > 0.05$) (figure 4B), suggesting that SOCS3 but not SOCS1 participates in the
220 aberrant-type interferons response observed in people with obesity. Next, to probe whether
221 SOCS3 siRNA silencing participates in the inhibition of type I interferons only in people with
222 obesity, we silenced PBMCs from people without obesity and measured IFN- α transcript levels
223 after TLR stimulation. PBMCs from non-obese volunteers silenced by siRNA for SOCS1 or
224 SOCS3 did not demonstrate increased IFN- α transcript levels after TLR-3 or TLR-7 stimulation
225 (figure 4C, 4D).

226

227 *3.5 SOCS3 siRNA-silencing gene restores IFN- α production in people with obesity*

228 Finally, to probe whether SOCS3 participates in the induction of the aberrant type I interferons
229 response in people with obesity, IFN- α production by ELISA was measured in cell supernatants
230 from people with or without obesity, silenced or not, for the genes SOCS1 and SOCS3 and
231 siRNA control. As expected, and in concordance with the qRT-PCR results, there was an
232 increase in IFN- α production in those cells from people with obesity that were silenced for
233 SOCS3 and stimulated with the TLR-3 ligand ($p < 0.05$) (figure 5A). However, there was no
234 statistical increase of IFN- α production in TLR-7 stimulated cells after SOCS3 silencing in

235 people with obesity ($p>0.05$) (figure 5C). Although there was no significant increase in IFN- α
236 production in TLR-7 stimulated cells after SOCS3 silencing in the obese individuals, the
237 production of IFN- α was similar to that observed in non-obese volunteers only in the SOCS3-
238 silenced cells (figure 5C). PBMC treated with siRNA for SOCS1 and siRNA control did not
239 demonstrate increased IFN- α production in people with obesity regardless of the TLR ligand
240 used, and IFN- α production was lower than that observed in non-volunteers ($p<0.05$) (figure 5B
241 and 5D).

242

243 **4. Discussion**

244

245 We investigated the effect of leptin, considered a pro-inflammatory cytokine, and the induction of
246 the pro-inflammatory response through LPS, in the tolerance to type I interferons. The hypothesis
247 that pro-inflammatory cytokines such as IL-6 and TNF- α and leptin could cause systemic
248 tolerance in obesity and thus inhibit the cellular response through the induction of SOCS3 has
249 been proposed by our group and others, but has not been investigated thus far [18, 21, 22]. To
250 examine this hypothesis, we first evaluated whether high-dose leptin was able to induce a
251 proinflammatory response and SOCS expression in PBMCs from healthy volunteers and in
252 human monocytes U937. As expected, high-dose leptin induced SOCS1 and SOCS3 expression
253 in PBMCs and monocytes U937. Interestingly, SOCS1 and SOCS3 expression was higher in
254 monocytes stimulated with leptin than with LPS, contrary to the effect observed in PBMCs where
255 high SOCS3 expression was observed in LPS-stimulated cells. One possible explanation for this
256 finding is that monocytes are the cells with a higher expression of the leptin receptor within
257 PBMCs [21] and thus a cell line of monocytes such as U937 is able to induce a higher response

258 with leptin than that observed with other PMBCs, where the expression of leptin receptor is
259 lower. The dose of leptin that induced higher SOCS-1 and SOCS-3 expression was 100 ng/mL.
260 Usually, blood leptin concentrations observed under physiological conditions are 1–100 ng/ml
261 [6]. This experimental dose was chosen because we were interested in the effects of leptin that
262 might be observed in physiological conditions and because at this concentration, we observed a
263 higher induction of SOCS1 and SOCS3 expression. TNF- α measurement experiments
264 corroborated that a concentration of 100 ng/mL of leptin was sufficient to activate PBMCs and
265 U937 monocytes. Contradictory data have been published regarding the effect of leptin on TNF-
266 α production. While some reports indicated that leptin alone does not induce TNF- α production
267 in human monocytes [23] and mouse peritoneal macrophages [24], it has been reported by others
268 that leptin is capable of directly inducing TNF- α production in human monocytes [6, 25].

269
270 Afterwards, we investigated whether leptin- and LPS-induced inflammation inhibits type I
271 interferons. de Vos *et al.* have previously shown that LPS induces cross-tolerance to multiple
272 TLR ligands, including TLR-3 and TLR-7; however, the mechanisms involved in the induction
273 of this tolerance were not evaluated [16]. Because pro-inflammatory cytokines induced by LPS
274 are down-regulated by SOCS3 and leptin is also regulated by SOCS3, we hypothesized that
275 leptin would also induce tolerance to TLR-3 and TLR-7 ligands. Our results showed that, as
276 previously reported by de Vos *et al.*, LPS induces cross-tolerance to TLR-3 and TLR-7 ligands.
277 However, we here demonstrate for the first time that leptin is also able to induce cross-tolerance
278 to TLR ligands. This result is of particular importance because people with obesity present high
279 levels of serum leptin. Indeed, as noted above, the concentration of leptin used to investigate
280 whether leptin induces cross-tolerance to TLR ligands (100 ng/mL) is usually found under

281 physiological conditions. Previous reports have demonstrated that obesity, a state associated with
282 high levels of serum leptin, is related to a diminished type I interferons response during influenza
283 A/H1N1 infection in diet-induced obese mice [22]. We have previously reported a diminished
284 type I interferon response in PBMCs from people with obesity stimulated with TLR ligands and
285 also in obese people infected with influenza A/H1N1 infection. The fact that leptin was able to
286 induce inhibition of the type I interferon response during TLR stimulation explains, at least in
287 part, why obesity is related to a poor response after infection with pathogens that are recognized
288 through TLR ligands such as hepatitis and influenza viruses. Another possible explanation of the
289 inhibition of type I interferons by leptin is that leptin might down-regulate TLR-3 and TLR-7
290 expression and thus reduce cellular response after TLR stimulation. However, Jaedicke *et al.*
291 collaborators have shown that leptin indeed up-regulates TLR-2 expression in human monocytes
292 while having no effect on TLR-4 expression [23]. A cross-regulation between TNF- α and IFN- α
293 has been proposed recently based on the observation that a fraction of rheumatoid arthritis (RA)
294 patients treated with anti-TNF- α therapy develops lupus-like syndromes, an autoimmune disease
295 related to high amounts of type I interferon genes, that reverses with cessation of the therapy [26,
296 27]. Supporting this hypothesis, Palucka *et al.* demonstrated that exogenous TNF- α inhibits IFN-
297 α release from PBMCs exposed to influenza virus [28]. Because SOCS3 is also a regulator of
298 TNF- α , it is possible that SOCS3 is involved in these lupus-like syndromes after anti-TNF- α
299 treatment and while our results also help to support this hypothesis, additional studies are
300 required to further investigate it.

301
302 We have previously shown that PBMCs from people with obesity present a diminished ability to
303 produce type I interferons after TLR stimulation and influenza A/H1N1 infection and that this

304 aberrant response was directly correlated with a high expression of SOCS3 but not SOCS1 in
305 people with obesity, suggesting a possible role for SOCS3 in the induction of this diminished
306 response. SOCS3 is a key regulator of type I interferons and also of leptin and pro-inflammatory
307 cytokines, which are elevated in obesity. Moreover, SOCS3 participation in the induction of
308 tolerance or the inhibition of the cellular response has been described in peripheral tissues as
309 causing insulin and leptin resistance and glucose intolerance [29]. Our siRNA experiments
310 confirm that SOCS3 participates in the aberrant type I interferons response after TLR stimulation
311 in people with obesity. Interestingly, after siRNA silencing of SOCS1 and SOCS3, only the
312 PBMCs from obese volunteers that were silenced for SOCS3 showed an increase in IFN- α
313 expression and production. This increase in the IFN- α response was not observed in the non-
314 obese volunteers, which confirms that SOCS3 is involved in the inhibition of type I interferons
315 after TLR stimulation in obesity.

316
317 In conclusion, our results demonstrate for the first time that SOCS3 participates in the inhibition
318 of type I interferons in PBMCs of obese individuals. In addition, we investigated the role of
319 leptin and LPS-induced inflammation in inducing the inhibition of type I interferons in PBMCs
320 from healthy volunteers and U937 monocytes. These results help to explain the aberrant immune
321 response observed in people with obesity during viral infections and may help to develop novel
322 strategies for therapeutic interventions that may reduce the higher risk of mortality observed in
323 obesity during the course of infectious diseases.

324
325 **Acknowledgements.** This study was partially supported by the FONDO SECTORIAL
326 SALUD-CONACYT grant 127013. We thank Monica Reséndiz for her technical assistance.

327 **Author contribution**

328 Conceived and designed the experiments: ETC JH. Performed the experiments: ETC. Analyzed
329 the data: ETC JH. Contributed reagents/materials/analysis tools: JH. Wrote the paper: ETC JH

330

331 **Competing interests**

332 Authors declare that no competing interests exist.

333

334 **References**

335

336 [1] Kanneganti TD, Dixit VD. Immunological complications of obesity. *Nature Immunology*. 2012;13:707-
337 12.

338 [2] Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature*
339 *Reviews Immunology*. 2011;11:85-97.

340 [3] Lago F, Dieguez C, Gómez-Reino J, Gualillo O. Adipokines as emerging mediators of immune response
341 and inflammation. *Nature clinical practice Rheumatology*. 2007;3:716-24.

342 [4] Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley R, Lee G, Zhang Y, et al. Leptin levels in human and rodent:
343 measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature medicine*.
344 1995;1:1155-61.

345 [5] Zarkesh-Esfahani H, Pockley AG, Wu Z, Hellewell PG, Weetman AP, Ross RJ. Leptin indirectly activates
346 human neutrophils via induction of TNF- α . *The Journal of Immunology*. 2004;172:1809-14.

347 [6] Zarkesh-Esfahani H, Pockley G, Metcalfe RA, Bidlingmaier M, Wu Z, Ajami A, et al. High-dose leptin
348 activates human leukocytes via receptor expression on monocytes. *The Journal of Immunology*.
349 2001;167:4593-9.

350 [7] Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI. Leptin modulates the T-cell immune
351 response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature*. 1998;394:897-901.

352 [8] Myers MG, Cowley MA, Münzberg H. Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annu Rev*
353 *Physiol*. 2008;70:537-56.

354 [9] Bjørnbæk C, Elmquist JK, Frantz JD, Shoelson SE, Flier JS. Identification of SOCS-3 as a potential
355 mediator of central leptin resistance. *Molecular cell*. 1998;1:619-25.

356 [10] Rui L, Yuan M, Frantz D, Shoelson S, White MF. SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by
357 ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277:42394-8.

358 [11] Teran-Cabanillas E, Montalvo-Corral M, Caire-Juvera G, Moya-Camarena SY, Hernández J. Decreased
359 interferon- α and interferon- β production in obesity and expression of suppressor of cytokine signaling.
360 *Nutrition*. 2013;29:207-12.

361 [12] Ahmad R, Al-Mass A, Atizado V, Al-Hubail A, Al-Ghimlas F, Al-Arouj M, et al. Elevated expression of
362 the toll like receptors 2 and 4 in obese individuals: its significance for obesity-induced inflammation. *J*
363 *Inflamm (Lond)*. 2012;9:48.

364 [13] Dasu MR, Devaraj S, Park S, Jialal I. Increased toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in
365 recently diagnosed type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care*. 2010;33:861-8.

- 366 [14] Dasu MR, Devaraj S, Zhao L, Hwang DH, Jialal I. High glucose induces toll-like receptor expression in
367 human monocytes mechanism of activation. *Diabetes*. 2008;57:3090-8.
- 368 [15] Yang Y, Sun H, Mo X, Liu Y, Jia H, Li X, et al. Prediction of Novel Genes Associated with Negative
369 Regulators of Toll-like Receptors-Induced Inflammation Based on Endotoxin Tolerance. *Inflammation*.
370 2012;1-11.
- 371 [16] de Vos AF, Pater JM, van den Pangaart PS, de Kruif MD, van't Veer C, van der Poll T. In vivo
372 lipopolysaccharide exposure of human blood leukocytes induces cross-tolerance to multiple TLR ligands.
373 *The Journal of Immunology*. 2009;183:533-42.
- 374 [17] Baetz A, Frey M, Heeg K, Dalpke AH. Suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins indirectly
375 regulate toll-like receptor signaling in innate immune cells. *Journal of Biological Chemistry*.
376 2004;279:54708-15.
- 377 [18] Wunderlich CM, Hövelmeyer N, Wunderlich FT. Mechanisms of chronic JAK-STAT3-SOCS3 signaling
378 in obesity. *JAK-STAT*. 2013;2:e23878.
- 379 [19] Loseke S, Grage-Griebenow E, Wagner A, Gehlhar K, Bufe A. Differential expression of IFN-[alpha]
380 subtypes in human PBMC: evaluation of novel real-time PCR assays. *Journal of immunological methods*.
381 2003;276:207-22.
- 382 [20] Jia D, Rahbar R, Chan RWY, Lee SMY, Chan MCW, Wang BX, et al. Influenza Virus Non-Structural
383 Protein 1 (NS1) Disrupts Interferon Signaling. *PloS one*. 2010;5:e13927.
- 384 [21] Papathanassoglou E, El-Haschimi K, Li XC, Matarese G, Strom T, Mantzoros C. Leptin receptor
385 expression and signaling in lymphocytes: kinetics during lymphocyte activation, role in lymphocyte
386 survival, and response to high fat diet in mice. *The Journal of Immunology*. 2006;176:7745-52.
- 387 [22] Smith AG, Sheridan PA, Harp JB, Beck MA. Diet-induced obese mice have increased mortality and
388 altered immune responses when infected with influenza virus. *The Journal of nutrition*. 2007;137:1236-
389 43.
- 390 [23] Jaedicke KM, Roythorne A, Padget K, Todryk S, Preshaw PM, Taylor JJ. Leptin up-regulates TLR2 in
391 human monocytes. *Journal of leukocyte biology*. 2013.
- 392 [24] Loffreda S, Yang S, Lin H, Karp C, Brengman M, Wang D, et al. Leptin regulates proinflammatory
393 immune responses. *The FASEB Journal*. 1998;12:57-65.
- 394 [25] Santos-Alvarez J, Goberna R, Sánchez-Margalet V. Human leptin stimulates proliferation and
395 activation of human circulating monocytes. *Cellular immunology*. 1999;194:6-11.
- 396 [26] Cantaert T, Baeten D, Tak PP, van Baarsen LG. Type I IFN and TNF α cross-regulation in immune-
397 mediated inflammatory disease: basic concepts and clinical relevance. *Arthritis Res Ther*. 2010;12:219.
- 398 [27] Ivashkiv LB. Type I interferon modulation of cellular responses to cytokines and infectious
399 pathogens: potential role in SLE pathogenesis. *Autoimmunity*. 2003;36:473-9.
- 400 [28] Palucka AK, Blanck J-P, Bennett L, Pascual V, Banchereau J. Cross-regulation of TNF and IFN- α in
401 autoimmune diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
402 2005;102:3372-7.
- 403 [29] Ueki K, Kondo T, Kahn CR. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin
404 resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by
405 discrete mechanisms. *Molecular and Cellular Biology*. 2004;24:5434-46.

406

407

408

409

410 **Figure legends**

411 **Figure 1.** High-dose leptin induces SOCS1 and SOCS3 in PBMCs and human monocytes U937
412 *in vitro*. A) SOCS1 expression in monocytes U937 after stimulation with LPS (black bars) or
413 leptin (white bars). B) SOCS3 expression in monocytes U937 after stimulation with LPS (black
414 bars) or leptin (white bars). C) SOCS3 expression in PBMCs from healthy volunteers in non-
415 stimulated cells (gray bars) and after stimulation with LPS (10 ng/mL) (black bars) or leptin (100
416 ng/mL) (white bars). The results of four independent experiments; values are expressed as the
417 means \pm SEM.

418
419 **Figure 2.** High-dose leptin induces TNF- α in PBMCs and human monocytes U937. A) TNF- α
420 relative expression to non-stimulated cells measured by qRT-PCR after LPS (black bars) or leptin
421 (white bars) at indicated doses. B) TNF- α production in cell supernatants from non-stimulated
422 PBMCs (gray bars), stimulated with 10 ng/mL of LPS (black bars) and stimulated with 100
423 ng/mL of leptin (white bars). C) TNF- α production in cell supernatants from non-stimulated
424 human monocytes U937 (gray bars), stimulated with 10 ng/mL of LPS (black bars) and
425 stimulated with 100 ng/mL of leptin (white bars). The results of four independent experiments;
426 values are expressed as the means \pm SEM.

427
428 **Figure 3.** High-dose leptin induces tolerance to TLR-3 and TLR-7 ligands in PBMCs and
429 monocytes U937. A) mRNA expression of IFN- α 2 in monocytes U937 treated for 4 h with leptin
430 (white bars), LPS (black bars) or left untreated (gray bars) and then stimulated for 20 h with a
431 TLR-3 ligand (Poly I:C) or TLR-7 ligand (CL264). B) Similar to A, but cells were treated for 24
432 h with either LPS or leptin and then stimulated with TLR-3 or TLR-7 ligand. C) mRNA

433 expression of IFN- α 2 in PBMCs from healthy volunteers treated for 4 h with leptin (white bars),
434 LPS (black bars) or left untreated (gray bars) and then stimulated for 20 h with a TLR-3 ligand
435 (Poly I:C) or TLR-7 ligand (CL264). D) IFN- β production in PBMCs supernatants from healthy
436 volunteers treated for 4 h and 24 h with leptin (white bars), LPS (black bars) or no treatment
437 (gray bars) and then stimulated for 20 h with a TLR-3 ligand (Poly I:C). E) IFN- α production in
438 PBMCs supernatants from healthy volunteers treated for 4 h and 24 h with leptin (white bars),
439 LPS (black bars) or without treatment (gray bars) and then stimulated for 20 h with TLR-7 ligand
440 (CL264). Values are expressed as the means \pm SEM and represent four independent experiments.

441
442 **Figure 4.** SOCS3 silencing by siRNA increases IFN- α response in PBMCs from obese people
443 stimulated with TLR ligands. A) IFN- α expression measured by qRT-PCR in PBMCs from obese
444 volunteers silenced by siRNA specific for the gene SOCS3 and then stimulated with a TLR-3
445 (TLR-3L) or TLR-7 (TLR-7L) ligand for 20 h. B) Same as A, but PBMCs from obese volunteers
446 were silenced by siRNA specific for the gene SOCS1. C) IFN- α expression measured by qRT-
447 PCR in PBMCs from non-obese volunteers silenced by siRNA specific for the gene SOCS3 and
448 then stimulated with a TLR-3 (TLR-3L) or TLR-7 (TLR-7L) ligand for 20 h. D) Same as C, but
449 PBMCs from non-obese volunteers were silenced by siRNA specific for SOCS1. The results of
450 three independent experiments; values are expressed as the means \pm SEM.

451
452 **Figure 5.** SOCS-3 silencing restores IFN- α production in PBMCs from obese individuals. A)
453 IFN- α production in cell supernatants of PBMCs from obese (black bars) and non-obese (white
454 bars) volunteers silenced by siRNA specific for SOCS3 and then stimulated with a TLR-3 ligand
455 (TLR-3L). B) Same as A, but PBMCs were silenced by siRNA specific for SOCS1. C) IFN- α

456 production in cell supernatants of PBMCs from obese (black bars) and non-obese (white bars)
457 volunteers silenced by siRNA specific for SOCS3 and then stimulated with a TLR-7 ligand
458 (TLR-7L). D) Same as C, but PBMCs were silenced by siRNA specific for the SOCS1 gene. The
459 results of three independent experiments; values are expressed as the means \pm SEM.

460

461

462

463

464

465

466

467

468

469

470

471

472

473

474

475

476

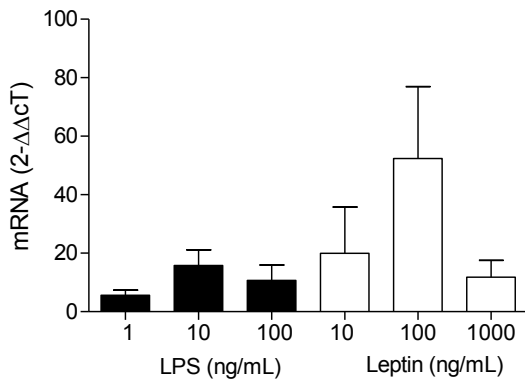
477

478

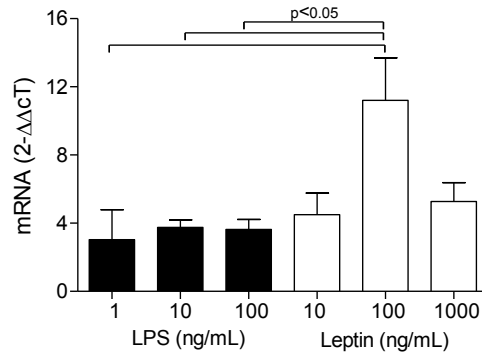
479

480

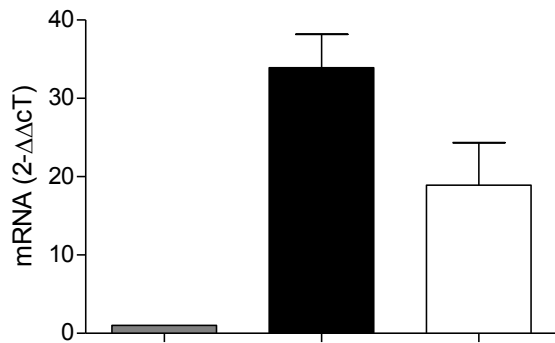
A)



B)



C)



481

482 **Figure 1**

483

484

485

486

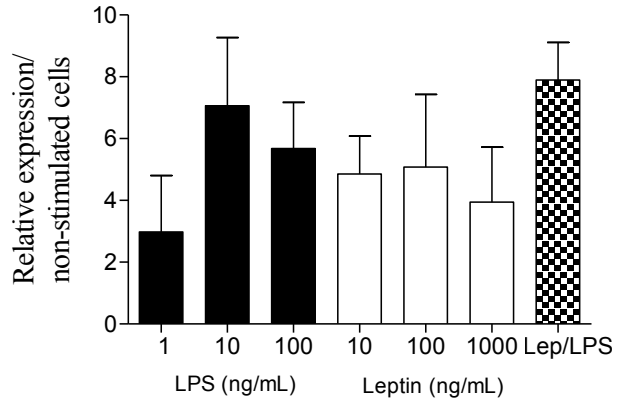
487

488

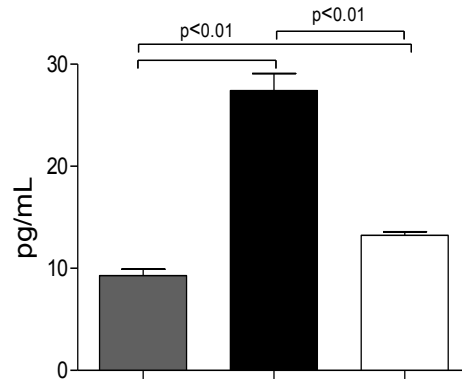
489

490

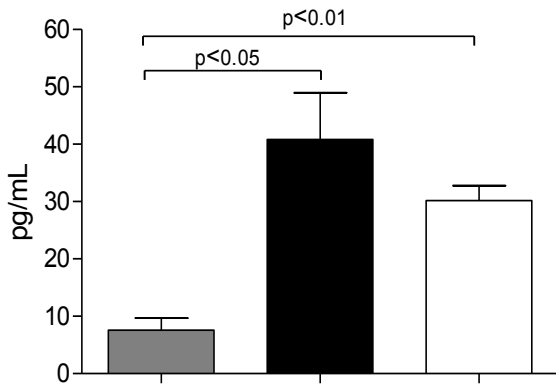
A)



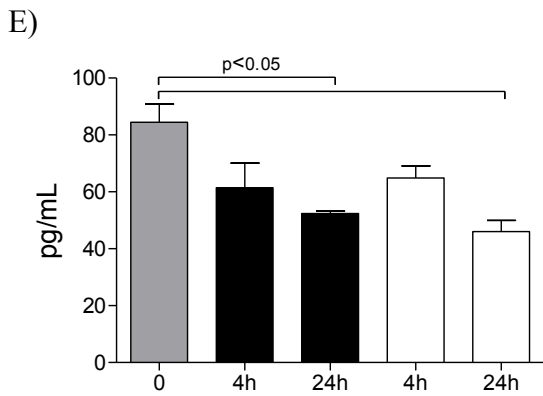
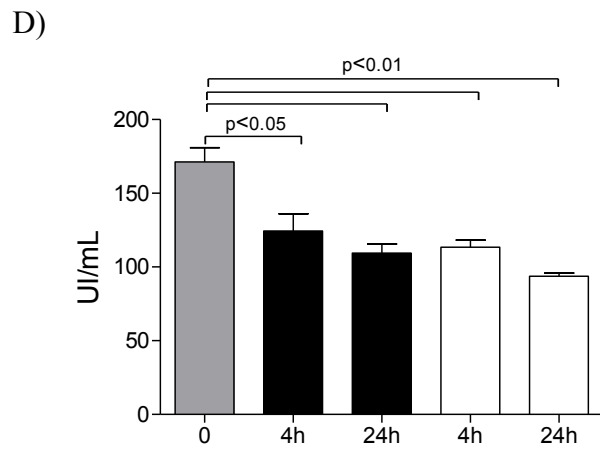
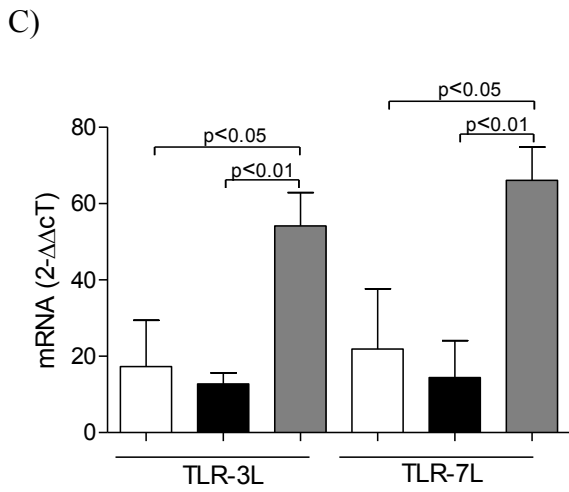
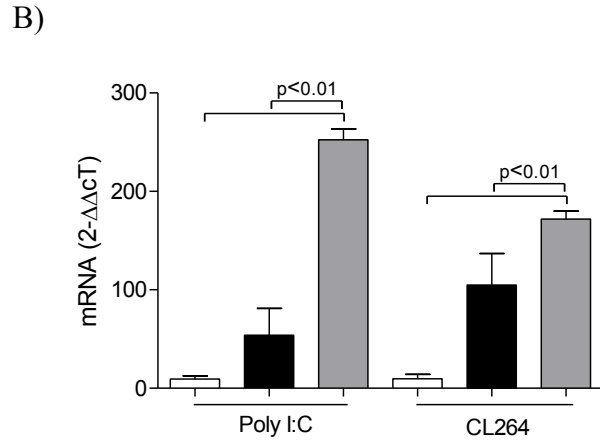
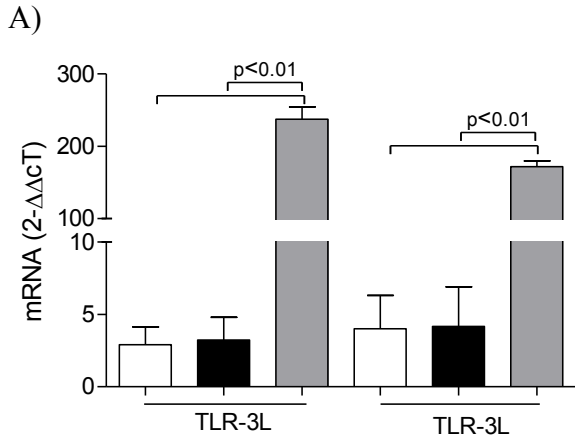
B)



C)



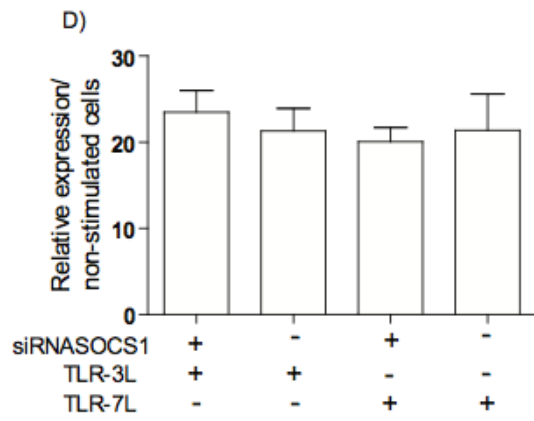
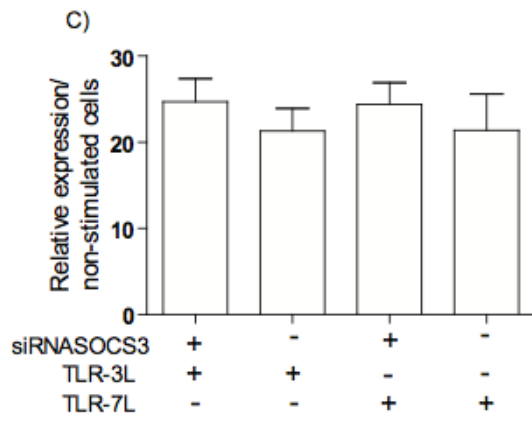
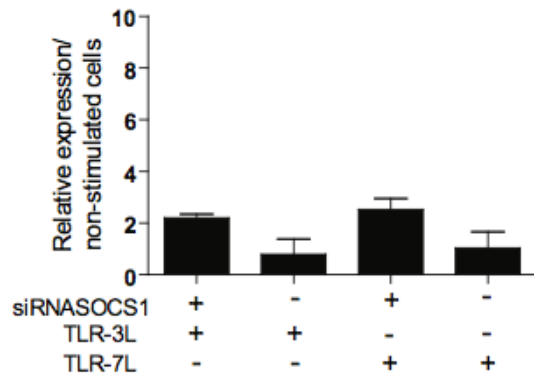
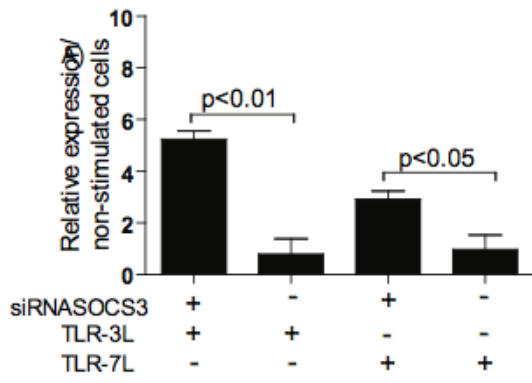
492 **Figure 2**



499

500 **Figure 3**

501



502

503 **Figure 4**

504

505

506

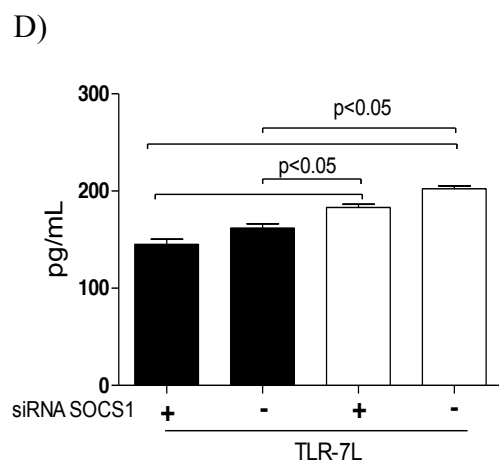
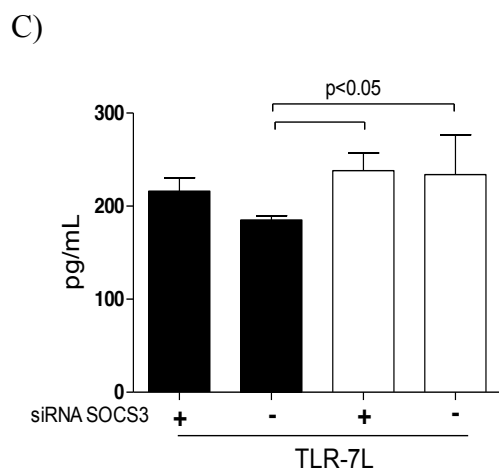
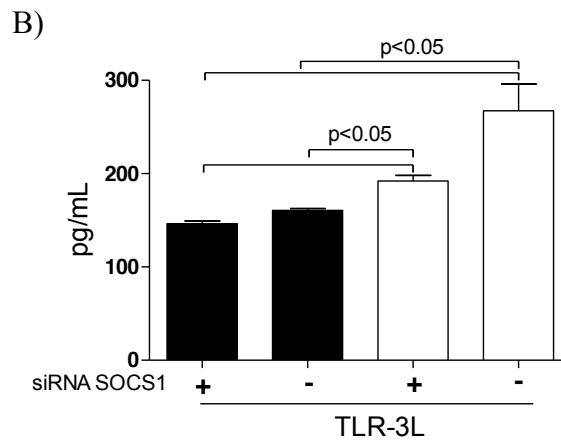
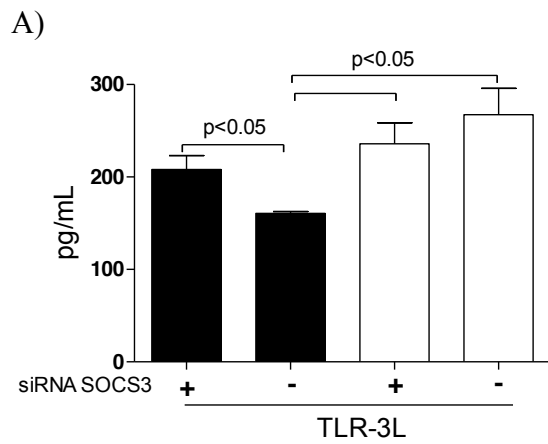
507

508

509

510

511



512 **Figure 5**

513

ICMJE Conflict of Interest

[Click here to download ICMJE Conflict of Interest: YCLNU_Conflict_of_Interest_ETC.pdf](#)

ICMJE Conflict of Interest

[Click here to download ICMJE Conflict of Interest: YCLNU_Conflict_of_Interest_JH.pdf](#)