

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Grado en Medicina

SISTEMA DE QUIMIOQUINAS EN LA ACUMULACIÓN DE MACRÓFAGOS EN EL TEJIDO ADIPOSO. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MONOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA Y MACRÓFAGOS DE GRASA

AUTORAS

Lucía Reyes Albelo

Carmen María Reyes Taboada

TUTORES

Jose Federico Díaz González

Sergio Iván Santos Concepción

PROYECTO ORIGINAL

Regulación de la inflamación grasa en la obesidad humana. Papel del sistema de quimioquinas y de los receptores alfa2-adrenérgicos en la acumulación de macrófagos en el tejido adiposo (Instituto de Salud Carlos III. PI21/00406). IP: Federico Díaz González

Tabla de contenido

1. Resumen.....	2
2. Abstract	3
3. Introducción	4
Macrófagos y obesidad.....	4
Sistema de quimioquinas en el tejido adiposo	6
4. Hipótesis de trabajo y objetivos	8
Hipótesis	8
Objetivos.....	8
5. Material y métodos	9
Obtención muestras de grasa de ratón	9
Obtención muestras de grasa humana	9
Aislamiento de leucocitos de tejido graso	11
Aislamiento de leucocitos de sangre periférica.....	11
Marcaje con anticuerpos	12
6. Resultados	14
Aislamiento e identificación de leucocitos: neutrófilos y macrófagos de grasa visceral de ratón	14
Aislamiento e identificación de leucocitos en sangre periférica y grasa subcutánea, peritoneal y visceral de pacientes con obesidad mórbida.....	14
Expresión diferencial de receptores de quimioquinas en monocitos de SP y macrófagos de aislado de las tres localizaciones de grasa obtenidas	14
7. Discusión	19
8. Conclusiones.....	20
9. ¿Qué hemos aprendido durante el TFG?.....	21
10. Índice de figuras	22
11. Bibliografía.....	23

1. Resumen

Una de las principales preocupaciones sanitarias en todo el mundo es la obesidad, un proceso vinculado a inflamación de bajo grado en el que los macrófagos parecen desempeñar un papel fundamental. Está bien establecido que la mayoría de los macrófagos residentes en los individuos delgados pertenecen al tipo M2 antiinflamatorio, mientras que en el tejido adiposo de los individuos obesos aumenta significativamente el número de macrófagos, preferentemente del fenotipo M1 inflamatorio. La fuerza motriz responsable del reclutamiento de macrófagos en el tejido adiposo en la obesidad humana aún no se ha dilucidado por completo. El objetivo de este proyecto es entender los mecanismos que regulan la acumulación de macrófagos en el tejido adiposo de individuos obesos, específicamente el sistema de quimioquinas en el control del reclutamiento de macrófagos, y la supervivencia en el tejido adiposo en un modelo de obesidad en ratón. Creemos que esta propuesta podría arrojar luz sobre la relación entre obesidad e inflamación y caracterizar posibles dianas terapéuticas que, modulando el número de macrófagos en el tejido adiposo, mejorarán el estado de salud de las personas con obesidad. En este trabajo de TFG se pretende poner a punto el proceso de aislamiento de leucocitos de tejido adiposo y caracterizar la población de monocito/macrófago infiltrante en grasa de pacientes con obesidad mórbida sometidos a cirugía bariátrica.

Palabras clave: macrófagos, obesidad, quimioquinas, humano, ratón.

2. Abstract

A major health concern worldwide is obesity, a process linked to low-grade inflammation in which macrophages play a key role. It is well established that most resident macrophages in lean individuals belong to the anti-inflammatory M2 type, whereas in the adipose tissue of obese individuals the number of macrophages is significantly increased, preferentially of the inflammatory M2 phenotype. The driving force responsible for macrophage recruitment into adipose tissue in human obesity remains to be fully elucidated. The aim of this project is to understand the mechanisms that regulate macrophage accumulation in adipose tissue of human obese individuals, specifically the chemokine system, and survival in adipose tissue in a mouse model of obesity and inflammation. We believe that this proposal could shed light on the relationship between obesity and inflammation and characterize potential therapeutic targets that, by modulating the number of macrophages in adipose tissue, could help to improve the health status of people with obesity. In this Final Degree Project (FDP) we aim to fine-tune the process of isolating leukocytes from adipose tissue and to characterize the fat infiltrating monocyte/macrophage population in morbidly obese patients undergoing bariatric surgery.

Keywords: *macrophages, obesity, chemokine, human, mice.*

3. Introducción

Está demostrada la asociación entre el índice de masa corporal (IMC) y la mortalidad general (1). Cada vez hay más datos que indican el papel determinante sobre el riesgo de obesidad que desempeñan el estilo de vida, las preferencias alimentarias y los antecedentes genéticos del individuo. Todos estos factores afectan a la ingesta de alimentos, al metabolismo de los nutrientes y a la termogénesis de los lípidos y los ácidos grasos (2). Estudios en humanos han descrito que polimorfismos en distintos genes causan obesidad monogénica (3,4). De manera similar, varios estudios realizados en ratones también han encontrado mutaciones en determinados genes que predisponen a la obesidad (5,6).

Cada vez existe más evidencia que respalda que la relación entre la inflamación y el tejido adiposo contribuye al control del equilibrio energético, la glucemia y al perfil lipídico. Numerosos artículos de investigación apoyan la asociación de la inflamación de bajo grado inducida por la obesidad con el desarrollo de la resistencia a la insulina (7,8). El origen de esta inflamación sistémica de bajo grado parece localizarse en el tejido adiposo blanco, donde las células inmunitarias infiltrantes (principalmente macrófagos con polaridad inflamatoria, M1), al liberar citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF)- α y la interleucina (IL)-6 (9), entre otras acciones, incluyendo la captación y degradación de catecolaminas (10), regulan la activación termogénica y el reclutamiento de células blancas en el tejido adiposo (11).

Por lo tanto, el control de la inflamación del tejido adiposo se ha convertido en un objetivo prometedor en la búsqueda de nuevas herramientas para mejorar el estado metabólico de los pacientes obesos.

Macrófagos y obesidad

La infiltración de macrófagos en el tejido adiposo de individuos obesos fue descrita por primera vez en 2003 (9). El porcentaje de macrófagos en el estroma vascular del tejido adiposo es de un 5-10% en individuos delgados, pudiendo llegar a un 50% en obesos. En ratones obesos los macrófagos constituyen un 45-60% de todo el tejido adiposo mientras que en los ratones delgados supone solamente un 10-15% (9). Tanto en ratones como en humanos el contenido de macrófagos en el tejido adiposo está asociado al tamaño de los

adipocitos y al peso corporal. La infiltración de macrófagos en la grasa visceral (omental) es especialmente exagerada en la obesidad de tipo central, donde se asocia con estados comórbidos relacionados con la obesidad (12). En este sentido, la acumulación de macrófagos en el tejido adiposo se vincula con el desarrollo de la progresión de la resistencia a la insulina de la diabetes tipo 2 (13). Sin embargo, no todos los individuos con un IMC elevado desarrollan resistencia a la insulina.

En los casos de obesidad, no solo aumenta el número de macrófagos en el tejido adiposo, sino que también adoptan un fenotipo inflamatorio M1. El tejido adiposo de los sujetos delgados sanos contiene macrófagos M2 antiinflamatorios, los cuales mantienen la homeostasis del tejido y la sensibilidad a la insulina mediante la secreción de citoquinas anti-inflamatorias, como la IL-10. Por lo tanto, la obesidad se asocia con la desestabilización del equilibrio entre los macrófagos M1 y M2, lo que conlleva a que el número de macrófagos M1 supere considerablemente el número de macrófagos M2 (14). Por el contrario, la pérdida de peso se asocia con el cambio inverso; con la transición de los macrófagos M1 a los M2 (15). Esto pone de manifiesto que la obesidad desempeña un papel importante en el desarrollo de la resistencia a la insulina, asociada al número y al fenotipo de los macrófagos implicados.

La noradrenalina aumenta la lipólisis mediante la estimulación de los receptores β 3 adrenérgicos (16). Investigaciones recientes han identificado macrófagos en el tejido adiposo que captan y degradan activamente catecolaminas, reduciendo de esta forma la lipólisis (10). Esta acción antilipolítica de los macrófagos es el principal argumento para desarrollar intervenciones terapéuticas dirigidas contra ellos con la finalidad del control de la obesidad (17). Sin embargo, esta prometedora estrategia para la obesidad aún no ha demostrado su efectividad clínica (8). Existen algunas estrategias para lograr la depleción de los macrófagos en modelos animales utilizando lipopolisacáridos (LPS) (18,19) o liposomas que contienen clodronato (20), pero los graves efectos secundarios de estas intervenciones limitan estos enfoques como opciones terapéuticas reales para el manejo de la obesidad (19,21).

Como el desarrollo de los adipocitos viscerales difiere en la diferenciación de los adipocitos subcutáneos, cabe suponer que estos adipocitos difieren en su potencial para atraer a los macrófagos. Se sabe que el tejido adiposo visceral expresa más IL-6, CCL2, CCL3, factor estimulante de colonias-1 y otros genes asociados con los macrófagos y la

inflamación (22-24). En la obesidad humana, sigue sin conocerse si la presencia de macrófagos M1 en el tejido adiposo proviene de los monocitos, su precursor en sangre periférica, o es debida a la repolarización de los macrófagos M2 ya presentes en el tejido graso. Estudios experimentales en ratones obesos han demostrado que los macrófagos M1 se reponen continuamente por monocitos procedentes de sangre periférica (14, 25). Sun et al. predicen cuatro mecanismos diferentes para el inicio de la infiltración de macrófagos en el tejido graso: la muerte de los adipocitos, la hipoxia, el aumento de la secreción de quimiocinas y la desregulación de los flujos de ácidos grasos (26).

Una mejor comprensión de los mecanismos implicados en el reclutamiento de macrófagos en el tejido adiposo inflamado podría ayudar a identificar posibles dianas terapéuticas para el tratamiento de la obesidad y la resistencia a la insulina en humanos. Sin embargo, la fuerza motriz responsable de la migración y el reclutamiento de monocitos de sangre periférica en el tejido adiposo de las personas obesas no está totalmente aclarada.

Sistema de quimioquinas en el tejido adiposo

Varias quimioquinas, citoquinas de bajo peso molecular, se producen localmente en los lugares de destino del tráfico y la localización de los leucocitos (27). Actualmente se han descrito más de 50 quimioquinas y 20 receptores de quimioquinas en la membrana celular acoplados a proteínas G (28). Tras la unión de una quimioquina a su receptor, las vías de señalización intracelular median respuestas funcionales como la quimiotaxis, secreción de factores solubles y la activación transcripcional (29). La mayoría de los leucocitos expresan más de un receptor de quimioquinas con promiscuidad variable (capacidad de reconocer a más de una quimioquina) y, además, son potencialmente capaces de responder de forma sinérgica a señales de migración simultáneas (30). Al unirse a sus ligandos, los receptores de quimioquinas se internalizan rápidamente siguiendo una vía de degradación o de reciclaje. Este mecanismo, conocido como desensibilización (31), limita la magnitud y la duración de la señalización, protegiendo así a la célula de la sobreestimulación por quimioquinas (32). Nuestro grupo ha utilizado con éxito el fenómeno de la desensibilización para evaluar *in vivo* las quimioquinas que desempeñan un papel importante en la migración de las células B al tejido sinovial inflamado en pacientes con artritis inflamatoria (33). El fundamento de este enfoque es que la citocina que provoca la regulación a la baja de su receptor en el foco inflamatorio

debe desempeñar un papel biológico relevante en el proceso de migración de este tipo celular, en el contexto de esta propuesta, en el reclutamiento de macrófagos al tejido adiposo de pacientes obesos.

La obesidad humana provoca una desregulación del medio intercelular a través de la secreción de quimiocinas y adipocinas por parte del tejido adiposo, la mayoría de las cuales son producidas por la población vascular estromal (26,34). En este estudio asumimos que la producción de quimiocinas en el tejido adiposo contribuye presumiblemente a la acumulación de macrófagos en este tejido. Numerosos estudios en humanos han demostrado, principalmente a nivel de expresión génica, el aumento de diferentes citocinas ($\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-6), así como de quimiocinas, entre ellas CCL2, CCL3, CCL5, CCL7, CCL8, CCL19, CXCL1, CXCL5, CXCL8, CXCL10 y CXCL14 en el tejido adiposo de individuos obesos (23,24,35). Se ha estudiado el papel de varios receptores de quimiocinas y sus ligandos en modelos de ratón de la obesidad. Los receptores de quimiocinas como CCR2/CCR5 (36) y CXCR2 (receptor de CXCL5) (37), así como la quimiocina CXCL14 (35) han demostrado, con diferente extensión y consistencia (38), estar implicados en la adiposidad en modelos de ratón de obesidad. Sin embargo, en los seres humanos no se ha dilucidado la implicación de estas u otras quimiocinas o receptores de quimiocinas como fuerza impulsora del reclutamiento de macrófagos en el tejido adiposo. El objetivo principal de esta propuesta es determinar qué quimioquinas desempeñan los papeles más relevantes en la acumulación de macrófagos en el tejido adiposo de los individuos obesos.

4. Hipótesis de trabajo y objetivos

Hipótesis

La obesidad constituye un estado inflamatorio de baja intensidad. La acumulación de macrófagos en el tejido adiposo interviene en la regulación de la cantidad de grasa corporal y en la resistencia a la insulina. Datos de diversos estudios apuntan a que los receptores $\alpha 2$ -adrenérgicos reducen la capacidad de los leucocitos para transmigrar y acumularse en el foco inflamatorio teniendo un papel clave en la inflamación.

La principal hipótesis de este trabajo es que el perfil de quimioquinas presente en el tejido adiposo, actuando individual o sinérgicamente, juega un papel clave en la acumulación de monocitos/macrófagos en el tejido adiposo de individuos obesos. Al regular la capacidad de los leucocitos para migrar al foco inflamatorio, los receptores $\alpha 2$ -adrenérgicos podrían ejercer un efecto regulador sobre la migración y la acumulación de macrófagos en el tejido adiposo de estos individuos. Los receptores $\alpha 2$ -adrenérgicos también podrían participar en la supervivencia de los macrófagos en el foco inflamatorio.

La confirmación de estas hipótesis ayudaría a comprender los mecanismos que promueven la obesidad identificando la principal fuerza motriz que condiciona la acumulación de macrófagos en el tejido adiposo.

Objetivos

- El objetivo principal de este trabajo de TFG es poner a punto las técnicas de disgregación de tejido graso para aislar y caracterizar mediante citometría las poblaciones de leucocitos infiltrantes en tejido graso de pacientes con obesidad mórbida sometidos a cirugía bariátrica.
- Para poner a punto la técnica se realizan experimentos utilizando grasa visceral de ratones.
- De manera tentativa se han estudiado los niveles diferenciales de expresión de diversos receptores de quimioquinas en monocitos de sangre periférica y macrófagos de tejido graso.

5. Material y métodos

Obtención muestras de grasa de ratón

Se han realizado un total de 6 experimentos independientes utilizando en total a 15 ratones pertenecientes a la cepa C57BL/6. Los animales seleccionados eran de 6 meses de edad y sexo masculino con un peso comprendido entre 25-30 g. El objetivo era aislar y caracterizar las poblaciones de leucocitos infiltrantes (macrófagos y neutrófilos) del tejido adiposo visceral murino mediante el marcaje con anticuerpos y análisis por citometría de flujo.

Se sacrificaron los animales mediante dislocación cervical previa anestesia con sevoflurano (Baxter). El protocolo experimental para el uso de animales fue revisado y aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de La Laguna.

Utilizando material quirúrgico, se realizó una incisión ventral a los ratones y se extrajo el tejido graso visceral (ver **Figura 1**). El tejido graso se procesó siguiendo la técnica de disgregación y aislamiento descrita más adelante.



Figura 1. Imagen de la obtención de tejido graso visceral de ratón mediante aproximación ventral tras sacrificio.

Obtención muestras de grasa humana

La situación sobrevenida de pandemia por COVID-19 ha retrasado las cirugías bariátricas programadas en el HUC durante el año 2022 y solo tres de ellas se han realizado. Esta situación parece, al menos parcialmente superada y se han reiniciado este

tipo de intervenciones desde hace 2 meses. Cuatro pacientes han sido incluidos (IMC>30), pero como se ha comentado, solo tres han sido intervenidos quirúrgicamente de cirugía bariátrica laparoscópica mediante la técnica de bypass gástrico.

Todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito para este estudio antes de participar. Se han obtenido en el acto quirúrgico simultáneamente muestras de sangre periférica (SP), grasa subcutánea (SC), grasa preperitoneal (PP) y grasa visceral (V).

La **Tabla 1** muestra las características antropométricas y parámetros analíticos de los 4 pacientes que han firmado el consentimiento informado para entrar en este estudio.

Tabla 1. Variables clínicas y analíticas de los pacientes evaluados.

	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4
Fecha cirugía	22/04/2022	06/05/2022	Retrasada	13/05/2022
Peso (kg)	143,2	145,2	174,7	95
Talla (m)	1,75	1,66	1,71	1,55
IMC	46,75	52,69	59,74	39,54
Pto. Cintura (cm)	138,5	118/140	140/162	111/124
Masa grasa (%)	34,6	52,6	52,2	42,5
Masa muscular (%)	54,9	38,9	45,9	30,4
TA (mmHg)	168/81	205/180-99/97	179/97	174/87
FC (lpm)	79	63	97	83
Insulina basal (uU/ml)	23,1	6,7	43,4	40,4
Glucosa basal (mg/dl)	97	77	150	79
HOMA	5,53	1,27	16,07	7,88
A1c (%)	5,81	5,58	8,62	5,18
Creatinina (mg/dL)	0,72	0,73	0,58	0,54
FG (ml/min/sup)	133	87	118	128
GOT (U/L)	13	19	20	22
GPT (U/L)	23	15	29	16
GGT (U/L)	23	12	19	28

Falc (U/L)	70	75	82	99
CT (mg/dl)	190	194	181	358
LDL-c (mg/dL)	111	104	98	Cálculo imposible
HDL-c (mg/dL)	28	73	44	30
TG (mg/dL)	252	86	192	217

Aislamiento de leucocitos de tejido graso

Una vez obtenida la muestra de grasa, y con el objetivo de extraer células mononucleares del tejido adiposo, seguimos los pasos descritos a continuación:

Lavamos la muestra de grasa sumergiéndola en RPMI 1640 suplementado con L-glutamina, 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% de penicilina/estreptomicina (medio completo; Biowest).

Colocamos el tejido graso en una placa de Petri y le añadimos 10 mL de RPMI + 1% de Bovine Serum Albumin (BSA)(Sigma). Disgregamos el tejido mecánicamente con ayuda de material quirúrgico.

Añadimos colagenasa II (2 mg/mL = 10 mg en 10 mL RPMI) (Collagenase, Type II, Clostridium histolyticum; Sigma-Aldrich) e incubamos durante 30 min a 37°C en agitación suave.

Posteriormente, filtramos las partículas grandes en un tamiz de nylon de 40 µl (Falcon) para recolectar mayoritariamente las células que pasan a través del filtro debido a su tamaño, en un tubo Falcon de 50 mL.

Luego, añadimos 2% de FBS (100 µl FBS en 10 mL medio RPMI) y centrifugamos a 500 g 5 min a 4 °C. Nos quedamos con el pellet, y descartamos el sobrenadante.

Aislamiento de leucocitos de sangre periférica

Las células mononucleares fueron aisladas de muestras de sangre de pacientes recolectadas en tubos heparinizados (BD) y diluido 1:1 en PBS mediante gradiente de Lymphosep (Biowest). Tras centrifugación a 500 g durante 30 min a temperatura ambiente se lavó con PBS la capa de células mieloides recolectada (interfase

plasma/Lymphoset Ficoll), y se centrifugó a 260 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. El pellet de células resultante se empleó para el marcaje con anticuerpos.

Marcaje con anticuerpos

Una vez obtenido el pellet, las células fueron lavadas con 500 µl de FACS (buffer salino PBS + 1% FBS) y luego centrifugadas 125 g a 4 °C durante 5 minutos.

Posteriormente, se fijaron las células (BD Biosciences, Fixtation/Permeabilization kit). Se añadió 200 µl de Fixation and Permeabilization Solution y se mantuvo 10 min en oscuridad en nevera (4° C).

Centrifugamos a 125 g a 5 min y lavamos las células con 100 µl de FACS. Volvemos a centrifugar, esta vez 10 min, y resuspendemos el pellet resultante en 200 µl de Wash Buffer (llevamos solución a 1X; 900 µl H2O + 100 µl Wash Buffer 10X).

Añadimos 50 µl de células resuspendidas a cada Eppendorf, para conseguir en el siguiente paso una concentración 1:50 del anticuerpo.

A continuación, añadimos los anticuerpos conjugados con ficoeritrina (PE) CD14 (3G8 clone; BD) o con fluoresceína-5-isotiocianato (FITC) CD16 (M5E2 clone; BD). Los anticuerpos para receptores de quimioquinas estaban conjugados con Adenomatous polyposis coli protein (APC), anti-human CCR1 (REA158 clone; Miltenyi Biotec), CCR2 (1D9 clone; BD), CCR3 (REA574 clone; Miltenyi Biotec), CCR4 (REA279 clone, Miltenyi Biotec), CCR5 (3A9 clone; BD), CCR6 (11A9 clone; BD), CCR7 (2-L1-A; BD), CXCR1 (5A12 clone; BD), CXCR2 (6C6 clone; BD) y CXCR3 (1C6 clone; BD).

Incubamos en frío y oscuridad las células marcadas con anticuerpos durante 30 minutos. Luego centrifugamos 10 minutos a 125 g a 4 °C en PBS

Resuspendimos las células en 200 µl de FACS buffer y procedimos a lectura en el citómetro de flujo.

El nivel de fluorescencia de anticuerpos controles del mismo isotipo fue usado como control. Las muestras fueron analizadas usando un equipo de citometría de flujo, Accuri C6 (BD Biosciences), y los datos fueron analizados en escala logarítmica con el programa BD Accuri C6.

Los datos se muestran como porcentaje de infiltración en forma de medias \pm DS en el caso de los ratones o como concentración de células en 10 mL respecto a gramo de grasa procesada en el caso de muestras humanas.

6. Resultados

Aislamiento e identificación de leucocitos: neutrófilos y macrófagos de grasa visceral de ratón

Las muestras de grasa de ratones fueron pesadas y procesadas según el protocolo descrito en 6 experimentos independientes utilizando a 15 ratones. El pellet de células infiltrante fue marcado con anticuerpos monoclonales fluorescentes y analizados por citometría de flujo como se ha descrito. La **Figura 2** muestra el análisis de las poblaciones de neutrófilos y macrófagos obtenidas de grasa abdominal de un experimento representativo. Las células fueron marcadas con CD11b, CD14, Ly6G y CCR2 mostrando positividad para CD11b y CCR2 ambas poblaciones y parcialmente positiva en neutrófilos para Ly6G. Los porcentajes de neutrófilos y macrófagos infiltrantes en grasa visceral de ratón fueron $6.16 \pm 1.18\%$ y $30.02 \pm 4.84\%$, respectivamente.

Aislamiento e identificación de leucocitos en sangre periférica y grasa subcutánea, peritoneal y visceral de pacientes con obesidad mórbida

Durante el acto quirúrgico de cirugía bariátrica laparoscópica de tres pacientes (**Tabla 1**) se recogieron muestras de sangre periférica (SP), grasa subcutánea (SC), preperitoneal (PP) y visceral (V). Las muestras fueron procesadas para la obtención de leucocitos según los protocolos descritos. La **Figura 3** muestra el análisis de la expresión de CD16 y CD14 en la población de monocito/macrófagos definidos por tamaño/complejidad mediante de citometría de flujo en un experimento representativo en SP, SC, PP y V.

El número de macrófagos por gramo de grasa procesado fue de 495 ± 361 en SC, 2577 ± 1264 en PP y 4049 ± 2027 en V.

Expresión diferencial de receptores de quimioquinas en monocitos de SP y macrófagos de aislado de las tres localizaciones de grasa obtenidas

La **Figura 4** muestra la expresión relativa de los receptores de quimioquinas CCR1, CCR3, CCR5, CCR7, CXCR1, CXCR2 y CXCR3 en macrófagos aislados de tejido graso SC, V y PP respecto de la expresión en monocitos de SP que fue considerada 100%. La expresión de estos receptores estudiados en las tres regiones grasa analizadas fue superior a la de SP.

Figura 2.

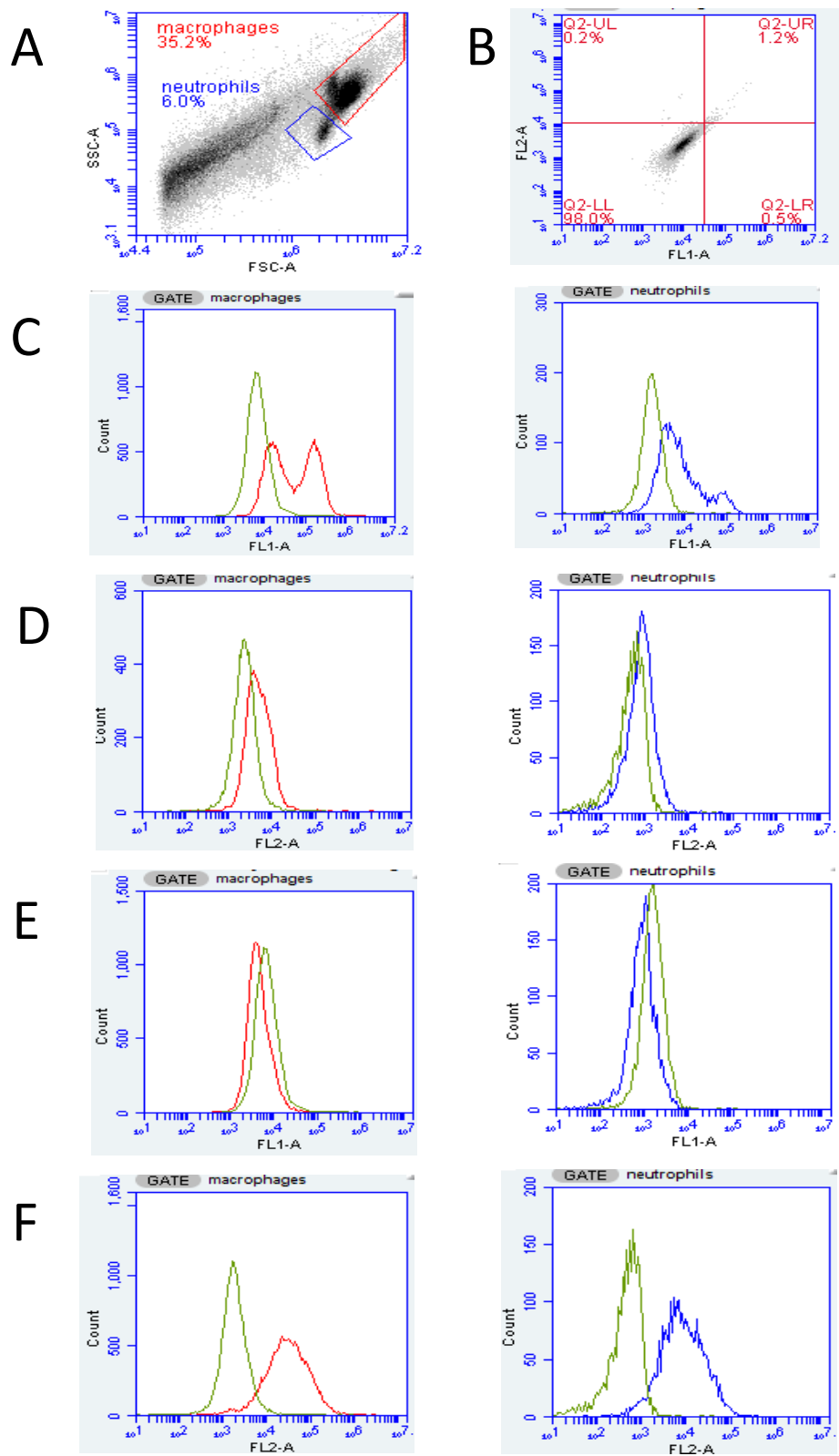


Figura 2. Aislamiento e identificación de leucocitos en grasa de ratón. **A)** Dot blot de la distribución de las poblaciones de **macrófagos** y **neutrófilos** aisladas de grasa de ratón definidas por tamaño (FSC, Forward Scatter) y por complejidad (SSC, Side Scatter). **B)** Dot blot de la fluorescencia FL1 (FITC) y FL2 (PE) de la población conjunta de células con morfología de neutrófilo (área en azul) y macrófago (área en rojo) marcado con isotipos controles. Los números muestran el porcentaje de células en cada región. **C)** Histograma de citometría de flujo de la expresión de CD11b en **macrófagos** y en **neutrófilos**, **D)** Histograma de citometría de flujo de la expresión de CD14 en **macrófagos** y en **neutrófilos**. **E)** Histograma de citometría de flujo de la expresión de Ly6G en **macrófagos** y en **neutrófilos**. **F)** Nivel de expresión de CCR2 en **macrófagos** y en **neutrófilos**. En **verde** el nivel de expresión de los respectivos controles negativos de isotipo.

Figura 3.

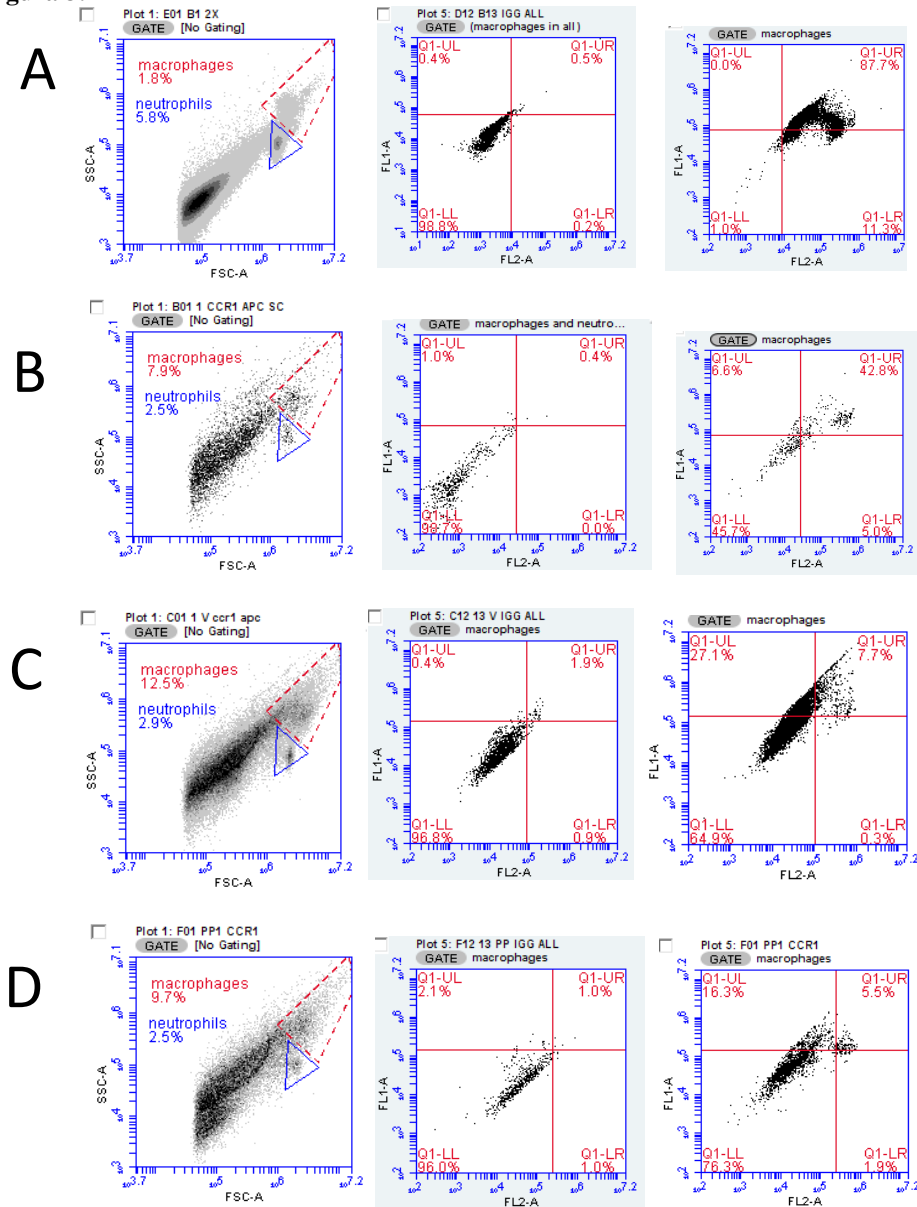


Figura 3. Caracterización de monocitos de sangre periférica y macrófagos de tejidos graso subcutáneo, visceral y pre-peritoneal en pacientes con obesidad mórbida. A) Izquierda: Dot Blot de citometría que muestra la distribución de la población de **macrófagos** y de **neutrófilos** definidas por tamaño (FSC, Forward Scatter) y complejidad (SSC, Side Scatter) en sangre periférica (SP). Los números muestran los porcentajes de células en cada región. **Centro:** Dot blot de citometría de flujo que muestra la fluorescencia de células marcadas con isotipos controles de FL1 (FITC) y FL2 (PE) en SP. Los números muestran el porcentaje de células en cada región. **Izquierda:** Dot blot de citometría de flujo que muestra la distribución y porcentaje de células con doble marcaje para CD14 y CD16, en SP; **B)** La misma distribución de Dot blot y significado de números que en SP pero en células aisladas de grasa subcutánea; **C)** visceral; y **D)** preperitoneal.

Figura 4

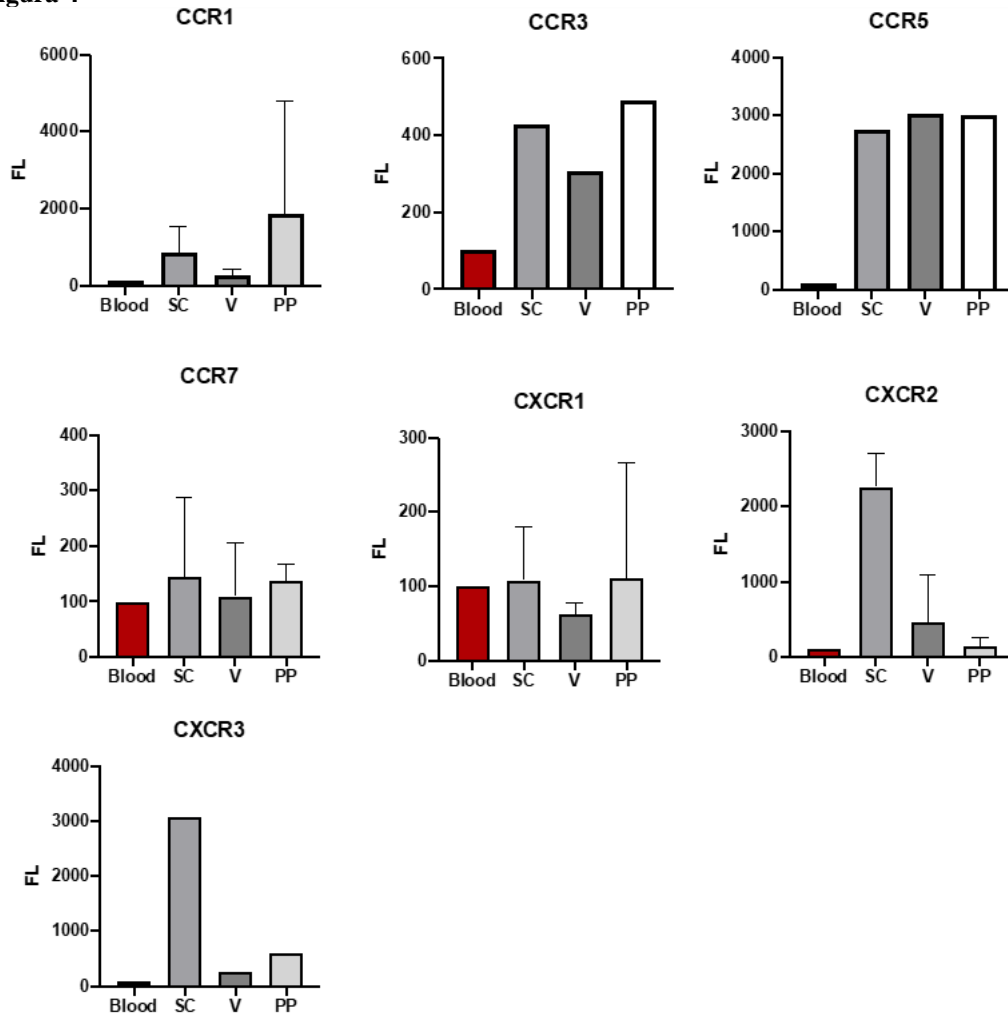


Figura 4. Gráficas de barras que muestran el nivel de intensidad de fluorescencia de los receptores de quimioquinas CCR1, CCR3, CCR5, CCR7, CXCR1, CXC2 y CXCR3 en sangre periférica (SP), tejido graso subcutáneo (SC), tejido graso visceral (V) y tejido graso preperitoneal (PP) en los tres pacientes procesados. Los datos son relativos al nivel de expresión de SP que fue considerado

7. Discusión

Este trabajo fue diseñado para poner a punto las técnicas de aislamiento de macrófagos en nuestro laboratorio, paso esencial para poder acometer los objetivos del proyecto titulado: “Regulación de la inflamación grasa en la obesidad humana. Papel del sistema de quimioquinas y de los receptores alfa2-adrenérgicos en la acumulación de macrófagos en el tejido adiposo” PI21/00406, financiado por el Instituto de Salud Carlos III.

Los datos muestran que utilizando técnica de disgregación con colagenasa sobre tejido grasa tanto de ratón como humano, se obtiene una población de macrófagos infiltrantes que puede ser cuantificada, caracterizados fenotípicamente y que permite el análisis del nivel de expresión de receptores de quimioquinas.

Los datos preliminares muestran un aumento esperado de la infiltración macrofágica en grasa visceral de pacientes obesos respecto de la subcutánea (9).

Por cuestiones de puesta a punto y de complejidad inherente a los experimentos que necesitan procesamiento en fresco solo han sido analizados 7 de los potenciales 14 diferentes receptores de quimioquinas que se han planteado estudiar: CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR6 CXCR7 y CXCR14. De los estudiados no parece que exista una reducción del nivel de expresión de ninguno de ellos: CCR1, CCR2, CCR5, CCR7, CXCR2 o CXCR3 en los macrófagos infiltrantes de grasa respecto de los monocitos de SP que permita atribuir a sus ligandos un potencial efecto quimioatrayente al tejido grasa. Solo el nivel de CXCR1 en macrófagos de grasa visceral parece mostrar una tendencia a reducir su expresión respecto de la de monocitos de SP, un dato que necesita confirmación aumentando el tamaño muestral.

La expresión diferencial de estos receptores no se ha analizado dependiendo del fenotipo antiinflamatorio M2 o inflamatorio M1 de los macrófagos infiltrantes, un aspecto que será abordado en próximos experimentos.

8. Conclusiones

- La conclusión de este trabajo es que es posible el aislamiento de macrófagos de grasa procedente de tres localizaciones de pacientes sometidos a cirugía bariátrica por obesidad mórbida.
- El nivel de infiltración de macrófagos en grasa visceral es numéricamente mayor que en grasa subcutánea y preperitoneal en estos pacientes.
- El análisis de los niveles de expresión de receptores de quimioquinas CCR1, CCR3, CCR5, CCR7, CXCR2 y CXCR3 mostró una tendencia al aumento de expresión en monocitos de grasa respecto de la expresión en monocitos de SP.
- El nivel de CXCR1 en macrófagos de grasa visceral parece mostrar una tendencia a reducir su expresión respecto de la de monocitos de SP.

9. ¿Qué hemos aprendido durante el TFG?

Durante la elaboración de este TFG hemos conseguido las siguientes competencias:

- Adquisición de habilidades y conocimientos sobre procedimientos esenciales de laboratorio.
- La técnica de extracción de grasa visceral de ratones.
- Procesamiento de muestras biológicas de grasa y sangre periférica humanas para el aislamiento de células infiltrantes.
- Principios básicos de citometría de flujo.
- Interpretación de resultados de citometría de flujo con su representación gráfica.

10. Índice de figuras

Figura 1. Imagen de la obtención de tejido graso visceral de ratón mediante aproximación ventral tras sacrificio.....	9
Figura 2. Identificación de leucocitos en grasa de ratón.....	15
Figura 3. Caracterización de monocitos de sangre periférica y macrófagos de tejidos graso SC, V y PP en pacientes con obesidad mórbida.	17
Figura 4	18

11. Bibliografía

1. Flegal KM, Kit BK, Orpana H, Graubard BI. Association of all-cause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2013;309(1):71-82.
2. Gonzalez-Muniesa P, Martinez-Gonzalez MA, Hu FB, Despres JP, Matsuzawa Y, Loos RJF, et al. Obesity. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17034.
3. Farooqi IS, Wangensteen T, Collins S, Kimber W, Matarese G, Keogh JM, et al. Clinical and molecular genetic spectrum of congenital deficiency of the leptin receptor. *N Engl J Med*. 2007;356(3):237-47.
4. Saeed S, Bonnefond A, Manzoor J, Shabbir F, Ayesha H, Philippe J, et al. Genetic variants in LEP, LEPR, and MC4R explain 30% of severe obesity in children from a consanguineous population. *Obesity (Silver Spring)*. 2015;23(8):1687-95.
5. Molecular and functional genetics of the proopiomelanocortin gene, food intake regulation and obesity, (2017).
6. Tian X, Yan C, Liu M, Zhang Q, Liu D, Liu Y, et al. CREG1 heterozygous mice are susceptible to high fat diet-induced obesity and insulin resistance. *PLoS One*. 2017;12(5):e0176873.
7. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science*. 1996;271(5249):665-8.
8. Reilly SM, Saltiel AR. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nat Rev Endocrinol*. 2017;13(11):633-43.
9. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1796-808.

10. Camell CD, Sander J, Spadaro O, Lee A, Nguyen KY, Wing A, et al. Inflammasome-driven catecholamine catabolism in macrophages blunts lipolysis during ageing. *Nature*. 2017;550(7674):119-23.
11. Villarroya F, Cereijo R, Villarroya J, Gavalda-Navarro A, Giralt M. Toward an Understanding of How Immune Cells Control Brown and Beige Adipobiology. *Cell Metab*. 2018;27(5):954-61.
12. Harman-Boehm I, Bluher M, Redel H, Sion-Vardy N, Ovadia S, Avinoach E, et al. Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(6):2240-7.
13. Heilbronn LK, Campbell LV. Adipose tissue macrophages, low grade inflammation and insulin resistance in human obesity. *Curr Pharm Des*. 2008;14(12):1225-30.
14. Lumeng CN, DelProposto JB, Westcott DJ, Saltiel AR. Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. *Diabetes*. 2008;57(12):3239-46.
15. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. 2007;117(1):175-84.
16. Baskin AS, Linderman JD, Brychta RJ, McGehee S, Anflick-Chames E, Cero C, et al. Regulation of Human Adipose Tissue Activation, Gallbladder Size, and Bile Acid Metabolism by a beta3-Adrenergic Receptor Agonist. *Diabetes*. 2018;67(10):2113-25.
17. Targeting macrophages as a potential therapeutic intervention: Impact on inflammatory diseases and cancer, (2018).
18. Soler C, Valdes R, Garcia-Manteiga J, Xaus J, Comalada M, Casado FJ, et al. Lipopolysaccharide-induced apoptosis of macrophages determines the up-regulation of concentrative nucleoside transporters Cnt1 and Cnt2 through tumor necrosis factor-alpha-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem*. 2001;276(32):30043-9.

19. Zhao J, Bi W, Xiao S, Lan X, Cheng X, Zhang J, et al. Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice. *Sci Rep.* 2019;9(1):5790.
20. Bader JE, Enos RT, Velazquez KT, Carson MS, Sougiannis AT, McGuinness OP, et al. Repeated clodronate-liposome treatment results in neutrophilia and is not effective in limiting obesity-linked metabolic impairments. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2019;316(3):E358-E72.
21. Hamesch K, Borkham-Kamphorst E, Strnad P, Weiskirchen R. Lipopolysaccharide-induced inflammatory liver injury in mice. *Lab Anim.* 2015;49(1 Suppl):37-46.
22. Gesta S, Tseng YH, Kahn CR. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell.* 2007;131(2):242-56.
23. Hardy OT, Perugini RA, Nicoloso SM, Gallagher-Dorval K, Puri V, Straubhaar J, et al. Body mass index-independent inflammation in omental adipose tissue associated with insulin resistance in morbid obesity. *Surg Obes Relat Dis.* 2011;7(1):60-7.
24. Tourniaire F, Romier-Crouzet B, Lee JH, Marcotorchino J, Gouranton E, Salles J, et al. Chemokine Expression in Inflamed Adipose Tissue Is Mainly Mediated by NF-kappaB. *PLoS One.* 2013;8(6): e66515.
25. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest.* 2006;116(6):1494-505.
26. Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest.* 2011;121(6):2094-101.
27. Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nat Immunol.* 2001;2(2):108-15.
28. Griffith JW, Sokol CL, Luster AD. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:659-702.
29. Thelen M. Dancing to the tune of chemokines. *Nat Immunol.* 2001;2(2):129-34.

30. Proudfoot AE, Ugucioni M. Modulation of Chemokine Responses: Synergy and Cooperativity. *Front Immunol.* 2016;7:183.
31. Bennett LD, Fox JM, Signoret N. Mechanisms regulating chemokine receptor activity. *Immunology.* 2011;134(3):246-56.
32. Marchese A. Endocytic trafficking of chemokine receptors. *Curr Opin Cell Biol.* 2014;27:72-7.
33. Armas-Gonzalez E, Dominguez-Luis MJ, Diaz-Martin A, Arce-Franco M, Castro-Hernandez J, Danelon G, et al. Role of CXCL13 and CCL20 in the recruitment of B cells to inflammatory foci in chronic arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2018;20(1):114.
34. Curat CA, Wegner V, Sengenès C, Miranville A, Tonus C, Busse R, et al. Macrophages in human visceral adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin. *Diabetologia.* 2006;49(4):744-7.
35. Nara N, Nakayama Y, Okamoto S, Tamura H, Kiyono M, Muraoka M, et al. Disruption of CXC motif chemokine ligand-14 in mice ameliorates obesity-induced insulin resistance. *J Biol Chem.* 2007;282(42):30794-803.
36. Huh JH, Kim HM, Lee ES, Kwon MH, Lee BR, Ko HJ, et al. Dual CCR2/5 Antagonist Attenuates Obesity-Induced Insulin Resistance by Regulating Macrophage Recruitment and M1/M2 Status. *Obesity (Silver Spring).* 2018;26(2):378-86.
37. Chavey C, Lazennec G, Lagarrigue S, Clape C, Iankova I, Teyssier J, et al. CXC ligand 5 is an adipose-tissue derived factor that links obesity to insulin resistance. *Cell Metab.* 2009;9(4):339-49.
38. Inouye KE, Shi H, Howard JK, Daly CH, Lord GM, Rollins BJ, et al. Absence of CC chemokine ligand 2 does not limit obesity-associated infiltration of macrophages into adipose tissue. *Diabetes.* 2007;56(9):2242-50.