

/info-tipos-cancer/linfomas-y-mieloma/mieloma?art=1

7. Leone, P.E., Walker, B.A., Jenner, M., Chiechio, L., Dagrada, G., Protheroe, R., Johnson, D., Brito, J., Else, M., Gonzalez, D., Ross, F., Chen-Kiang, S., Davies, F.E. y Morgan, G.J. (2008). Deletions of CDKN2C in multiple myeloma: Biological and clinical implications. *Clin Cancer Res*, 14(19), 6033-6041.
8. Elosua, C., Catalina, P., Walker, B.A., Dickens, N.J., Avramidou, A., Brito, L., Davenport, E., Jenner, M.J., Gonzalez, D., Davies, F.E., Morgan, G.J., Leone, P.E. (2008) Molecular characterization of Human Multiple Myeloma Cell Lines by Genome-Wide Profiling identifies Kinase Pathway alterations. *Blood*, 112(11), 1694.
9. Leone, P.E., Elosua, C., Catalina, P., Palma, C., Walker, B.A., Dickens, N.J., Avramidou, A., Brito, L., Davenport, E., Jenner, M.J., David Gonzalez, D., Davies, F.E., Morgan, G.J. (2009) Human Multiple Myeloma Cell Lines: Molecular characterization by genome-wide profiling identifies alterations involving key enzymatic proteins. *Proceedings ASHG 59th Annual Meeting* (1284/W/Poster Board #942). Available at <http://www.ashg.org/2009meeting/abstracts/fulltext/>
10. Tomotoshi, M., Dongwei, Z. y Hideyuki, S. (2005). Aurora-A - A guardian of poles. *Nature Reviews Cancer*. Recuperado el 20 de Junio del 2017, de <http://www.nature.com/nrc/journal/v5/n1/full/nrc1526.html>
11. Globocan. (2012). Population Fact Sheets. Recuperado el 23 de mayo del 2015 de http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx
12. Dar, A.A., Goff, L.W., Majid, S., Berlin, J. y El-Rifai, W. (2010). Aurora Kinase Inhibitors - Rising Stars in Cancer Therapeutics? *Mol Cancer Ther*, 9(2), 268-278.
13. Solomon, D., Wang, Y., Fox, S., Lambeck, T., Giesting, S., Lan, Z. y Knudsen, E. (2003). Cyclin D1 Splice Variants Differential effects on localization, RB phosphorylation, and cellular transformation. *J Biol Chem*, 278(32), 30339-30347.
14. Braggio, E. y Albarracín, F. (2013). El uso de alteraciones genéticas en la estratificación por riesgo del Mieloma Múltiple. *Medicina*, 73, 369-375.
15. Montesdeoca, B. (2015). Estado del Mieloma Múltiple, diagnóstico clínico, medicina de laboratorio e identificación de alteraciones genéticas asociadas con la patogénesis en el Hospital Carlos Andrade Marín en un periodo de tiempo comprendido entre 1986 a 2012. Recuperado el 29 de junio del 2017 de <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/2200/0/9177/Estado%20del%20mieloma%20m%C3%BAltiple%20diagn%C3%B3stico%20cl%C3%ADnico%20de%20laboratorio%20e%20de%20n%20de%20alteraciones%20gen%C3%A9ticas%20asoc-1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
16. American Cancer Society. (2014). Multiple myeloma. Recuperado el 30 de agosto del 2015 de <http://www.cancer.org/cancer/multiplemyeloma/detailedguide/multiple-myeloma-staging>
17. Kyle, R. y Rajkumar, S. (2009). Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia*, 23, 3-9.
18. Mazzeri L., Lombardi G., Abeltino M., Ricca M., Donofrio G., Giuliani N., Cantoni A.M., Corradi A., Bonati A., Lunghi P. (2013). Aurora and IKK kinases cooperatively interact to protect multiple myeloma cells from Apo2L/TRAIL. *Blood*, 122(15), 2641-53.
19. Genecards (2017). CCND1. Recuperado el 29 de Junio del 2017 de <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CCND1>
20. Wang, S., Huang, Y., Su, R., Fang, Z. y Han, M. (2015). Cyclin D1 G870A polymorphism is associated with an increased risk of multiple myeloma. *Genet Mol Res*, 14(2), 5856-5861.
21. Tchatchou, S., Wirtenberger, M., Hemminki, K., Sutter, C., Meindl, A., Wappenschmidt, B. y Burwinkel, B. (2007). Aurora kinases A and B and familial breast cancer risk. *Cancer Lett*, 247(2), 266-272.
22. Paz-y-Miño, C. y López, A. (2014). Genética molecular y citogenética humana. Fundamentos, aplicaciones e investigaciones en el Ecuador. Quito, Ecuador: Yachay EP.

Artículo Original

Expresión y Función del Receptor de la Leptina (OBR) en Células Periféricas Mononucleares aisladas de personas con peso normal u Obesidad

Funes Salome,¹ Santander Stephanie,² Marcelo Grijalva,^{1,3} Marco Fornasini,^{2,4} Manuel Eduardo Baldeón.^{2,4}

¹ Centro de Nanociencias y Nanotecnología, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

² Centro de Investigación Traslacional, Universidad de las Américas, ³ Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, ⁴ Centro de Investigación Biomédica, Universidad Tecnológica Equinoccial, Quito Ecuador.

DIRECCIÓN PARA CORRESPONDENCIA: Manuel E. Baldeón, Av. Occidental y Av. Mariana de Jesús. Bloque "T". Cuarto piso, Oficina I-32, Teléfono: 593 1-800-101020 ext 2115, manuel.baldeon@ute.edu.ec

RESUMEN

Antecedentes: La hormona leptina tiene funciones importantes en el control del balance energético y en la respuesta inmunológica. En las personas con obesidad existe resistencia del receptor de leptina (OBR) en el hipotálamo y además tienen altos niveles séricos de la hormona. El riesgo incrementado a infecciones en personas con obesidad podría estar relacionado a la resistencia de OBR en células inmunes. Pocos estudios han comparado la respuesta inmune entre personas con obesidad y controles de peso normal. Este estudio comparó la expresión y respuesta del OBR en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs por sus siglas en inglés) aisladas de personas con obesidad y peso normal.

Métodos: Quince sujetos con obesidad fueron emparejados por edad y sexo con controles de peso normal. Células mononucleares de sangre periférica fueron aisladas después de ayunar durante la noche. La expresión de OBR en la superficie de los PBMCs recientemente aisladas fue medida por citometría de flujo. Se midió además la respuesta de PBMCs a la estimulación con leptina, LPS, o fitohemaglutinina mediante la cuantificación de IL-6, TNF- α y proliferación celular in vitro.

Resultados: Se observó una mayor expresión de OBR en PBMCs de hombres con peso normal en comparación con hombres con obesidad, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa. La estimulación con leptina provocó la proliferación de PBMCs de forma dosis dependiente, similar al resultado que se obtuvo con la estimulación de LPS y fitohemaglutinina. Además, el tratamiento con leptina provocó una mayor liberación de IL-6 de las células aisladas de hombres con peso normal que de hombres con obesidad, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa. No se observó un patrón similar de la expresión de OBR o en la liberación de citoquinas en las mujeres participantes.

Conclusiones: Aunque las diferencias de la expresión de OBR y liberación de citoquinas por parte de PBMCs no fueron estadísticamente significativas, la baja expresión del receptor y la baja respuesta a la estimulación con leptina en hombres con obesidad podrían indicar una resistencia del receptor en estas células inmunes. Al parecer existen diferencias en la respuesta del OBR entre mujeres que hombres. Son necesarios más estudios para evaluar la resistencia del OBR en células inmunes en sujetos con obesidad.

Palabras clave: Resistencia al receptor de leptina, obesidad, células mononucleares de sangre periférica, leptina.

ABSTRACT

Background: The hormone leptin has important functions in the control of the energy balance and the immune response. People with obesity have high serum levels of leptin and receptor (OBR) resistance to the hormone in the hypothalamus. The increased risk for infections in people with obesity could be related to resistance of OBR in immune cells. Few studies have compared the immune response between people with obesity and normal weight controls. This study compared OBR expression and function in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) isolated from people with normal weight or obesity.

Methods: Fifteen subjects with obesity were matched by age and sex with normal weight controls. Peripheral blood mononuclear cells were isolated after fasting overnight from all participating individuals. Leptin-receptor expression on the surface of newly isolated PBMCs was measured by flow cytometry. The response of PBMCs to stimulation with leptin, LPS, or phytohemagglutinin was measured by quantification of IL-6, TNF- α and cell proliferation in vitro.

Results: Greater OBR expression was observed in PBMCs of normal weight men compared to obese men, although the difference was not statistically significant. The stimulation with leptin provoked the proliferation of PBMCs in a dose-dependent manner, similar to the result that was obtained with the stimulation of LPS and phytohemagglutinin. In addition, treatment with leptin caused a greater release of IL-6 from cells isolated from normal weight men than from obese men, although the difference was not statistically significant. No similar pattern of OBR expression or cytokine release was observed in the participating women.

Conclusions: Although differences in OBR expression and cytokine release by PBMCs were not statistically significant, low receptor expression and low response to leptin stimulation in obese men could indicate receptor resistance in these cells. Apparently there are differences in the OBR response between women and men. More studies are needed to evaluate the OBR resistance in immune cells in obese subjects.

Key Words: Leptin receptor resistance, obesity, peripheral blood mononuclear cells, leptin.

INTRODUCCION

La obesidad es considerada uno de los problemas de salud más importantes por la Organización Mundial de Salud, debido a su alta prevalencia tanto en países industrializados como en los países en vías de desarrollo,¹ se estimó que aproximadamente 600 millones de personas tenían la enfermedad para el 2014.² Debido a las co-morbilidades asociadas a la obesidad, los sistemas de salud experimentan grandes cargas económicas y sociales.³ Las comorbilidades asociadas con la obesidad incluyen la diabetes, el cáncer, hipertensión y otras enfermedades crónicas.³ Además la obesidad se ha asociado con un mayor riesgo de infecciones.⁴ Estudios epidemiológicos demuestran que la obesidad está asociada con enfermedades nosocomiales y post quirúrgicas como pancreatitis, periodontitis, influenza, infecciones urinarias y de la piel.⁵ Aunque la relación entre obesidad y el riesgo de

infección no ha sido establecida completamente, es posible que el riesgo esté relacionado a la resistencia del receptor de leptina (OBR-b) expresado en la superficie de las células inmunes.⁶ La leptina humana es una hormona de 16KDa, producto del gen OB, cuya principal función es controlar la ingesta de alimentos y el balance energético. Las funciones de la leptina se realizan a través de la activación de receptores específicos expresados en la superficie de las células blanco.⁷ Se han descrito 6 isoformas diferentes del receptor, pero solo la variedad más larga (OBR-b) es capaz de activar la vía intracelular JAK2/STAT3 de las neuronas del hipotálamo para controlar el balance energético.⁸ La leptina es sintetizada y secretada por los adipocitos como una señal de suficiencia de energía, a mayor cantidad de grasa almacenada mayor producción de leptina. En condiciones de restricción alimenticia, la producción de leptina está disminuida

lo que lleva a una búsqueda de alimentos y a un menor metabolismo energético. Por otro lado, en condiciones de abundancia de energía los niveles de leptina se incrementan para limitar el consumo de alimentos y estimular el metabolismo interno. En humanos y modelos animales de obesidad, alteraciones en la síntesis de leptina o en su función causan obesidad.⁹ Además, la leptina ha sido involucrada en otros procesos fisiológicos no metabólicos como hematopoyesis, reproducción, angiogénesis y respuesta inmune.⁷ La leptina es una citoquina de tipo Th1, activa la circulación de monocitos e incrementa la producción de citoquinas, mejora la fagocitosis en macrófagos y actúa como un quimio atrayente. La leptina promueve la quimiotaxis de neutrófilos y estimula la producción de peróxido de hidrógeno.¹⁰ En la respuesta inmune adaptativa, la leptina estimula la proliferación de células T y contribuye a la maduración de los linfocitos B.⁷

Existe evidencia que la activación defectuosa del OBR en el hipotálamo conduce a obesidad. Por ejemplo, mutaciones de OBR-b, limitado acceso de la hormona al sistema nervioso central, y alteraciones de las vías intracelulares en el hipotálamo pueden conducir a la obesidad.¹¹ La autorregulación de la expresión del receptor de leptina en la superficie de las neuronas del hipotálamo parece ser la principal causa de resistencia central a la leptina, ya que el aumento de los niveles séricos de leptina disminuye la expresión de OBR-b limitando su activación.¹² La Obesidad se caracteriza por altas concentraciones séricas de leptina como resultado de la resistencia del OBR-b.⁸ En consecuencia, personas con obesidad no pueden regular el consumo de energía a pesar los de los altos niveles circulantes de la hormona.⁹ Los mecanismos exactos de la disfunción de la leptina en la obesidad no han sido completamente definidos, sin embargo, es claro que la activación de la vía de leptina en el hipotálamo está alterada.⁸ Por otra parte, no se ha evaluado completamente la función del OBR-b en las células inmunes de los individuos con obesidad.⁸ Actualmente existe limitada información sobre la resistencia del OBR-b expresado en células inmunes de pacientes con obesidad. Nosotros hipotetizamos que de manera similar a la resistencia del OBR-b a la leptina que se observa en las neuronas del hipotálamo, existe también resistencia del OBR en las células inmunes en personas con obesidad. Consecuentemente, el objetivo del presente estudio fue comparar la expresión y respuesta del OBR-b a la leptina en PBMCs de personas con obesidad y

controles con peso normal.

SUJETOS Y METODOS

Sujetos. Treinta sujetos entre 20 y 60 años de edad, con peso normal ($18 \leq \text{BMI} \leq 25$ Kg/m²; n=15) y obesidad ($\text{BMI} \geq 30$ Kg/m²; n=15) fueron reclutados para el estudio. Los sujetos con obesidad fueron emparejados por edad y sexo con sujetos control.

Medidas antropométricas. La talla y el peso se midieron con los voluntarios en posición de pie usando ropa ligera sin zapatos. La talla se midió con un estadiómetro de montaje de pared (SECA, Hamburgo, Alemania) y el peso se midió utilizando una balanza electrónica. (BC-534, TANITA, Tokio, Japón) previamente calibrada. El Índice de masa corporal (IMC) se calculó estimando el radio de peso en kilogramos dividido para la talla en metros al cuadrado.

Recolección de muestras de sangre. Para la toma de muestra de sangre, se pidió a los participantes que asistieran al laboratorio después del ayuno de la noche; se tomó una muestra de sangre venosa (60 ml) con Na₂EDTA alrededor de las 8:00 am. Las muestras de sangre se procesaron inmediatamente después de su extracción. Para facilitar el análisis in vitro de las células inmunes, solamente se procesaron muestras de una pareja a la vez (con peso normal y con obesidad). Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Las PBMCs se aislaron de cada participante utilizando la técnica de gradiente de densidad como se ha descrito anteriormente.¹³ Brevemente, las muestras de sangre con EDTA fueron colocadas debajo de una capa de Histopaque (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA) y centrifugadas a 3000 rpm por 30 min a temperatura ambiente. La capa de PBMCs fue colectada y lavada con buffer de fosfato salino (PBS; GIBCO Laboratories, Grand Island, N.Y.). Luego, los eritrocitos fueron eliminados incubándolos por 5 min con una solución de lisis (155mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃ y 0.1mM Na₂EDTA). Finalmente, las PBMCs se lavaron nuevamente con PBS y re-suspendieron en medio RPMI (GIBCO) con 10 % de suero fetal bovino (FBS) y 1% de solución de penicilina estreptomina (GIBCO). **Expresión de OBR de superficie celular en PBMCs por citometría de Flujo.** Para cuantificar la abundancia de OBR en la superficie de las PBMCs de los participantes, la expresión del receptor fue medido por citometría de flujo.

Las PBMCs se diluyeron en 200 μ l de PBS/2% FBS a una concentración de 1000 células/ μ l y colocadas en placas de cultivo celular de fondo en U (Corning, New York, USA). Las placas fueron centrifugadas a 1800 rpm por 5 min a temperatura ambiente. Subsecuentemente, las células fueron incubadas con el anticuerpo PE-conjugado anti-human CD14 (1:100; BD Bioscience; eBioscience, San Diego, CA, USA), con el anticuerpo APC-conjugado mouse anti-human OBR IgG2B (1:10; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) o con el anticuerpo APC-conjugado anti-mouse IgG2B control de isotipo (1:10; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) por 20 min a 4°C. Al finalizar el periodo de incubación, las PBMCs fueron lavadas dos veces con PBS/2% FBS y centrifugadas a 1800 rpm por 5 min a 4°C. Después del lavado final, las células fueron resuspendidas en 200 μ l de PBS/2%FBS. La fluorescencia se midió en 50.000 células (eventos) por muestra utilizando un Accuri C6 Sampler Counter (BD Accuri™ Cytometers; BD Biosciences, Ann Arbor, MI, USA) y la proporción de células que expresaban el OBR fue determinada por el promedio de la intensidad de fluorescencia (MFI, mean fluorescence intensity, por sus siglas en Inglés). Las entradas (gates) se definieron para excluir detritus celulares y uniones inespecíficas del anticuerpo. Los resultados fueron analizados por el FACS acquisition and analysis BD Csmpler software (BD Accuri™ Cytometers). Las determinaciones se realizaron en triplicado.

Respuesta de PBMCs a la estimulación con leptina. Para evaluar la respuesta de las células inmunes a la estimulación con leptina in vitro, el efecto de la hormona en la activación de las PBMCs fue evaluada. La proliferación celular fue medida usando el kit colorimétrico ELISA BrdU (Roche Molecular Biochemicals; Mannheim, Germany) siguiendo los protocolos del fabricante. Rápidamente, 200 μ l de la suspensión de PBMCs (1.000 células) aisladas de sujetos con peso normal se transfirió a pocillos individuales de una placa de 96 pocillos (Corning). Luego de añadir 10 μ l de BrdU, las células fueron tratadas en triplicado con concentraciones crecientes de leptina recombinante (Sigma Chemical Co; 250, 500 and 1 μ g/mL) por 48 horas; se utilizó fitohemaglutinina (PHA; GIBCO) como control positivo y como control negativo solamente medio de cultivo. Las células fueron incubadas a 37°C con 5% CO₂ y 90% humedad en una incubadora de chaqueta de agua (Model 3110, Thermo Fisher Scientific,

Waltham, MA, USA). Al final del periodo de tratamiento, la absorbancia fue medida a 370nm en un lector de placas (Synergy™, HT; Bio-Tek Instruments, Winooski, VT).

Medición de la producción de citoquinas por ELISA. El efecto de la estimulación de leptina en la liberación de citoquinas por los PBMCs fue medida por ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante. Las PBMCs recientemente aisladas (5x10⁶ cells) se cultivaron en placas de 6 pocillos (Corning). Después, las células fueron tratadas en duplicado con leptina humana recombinante (1 μ g/mL), LPS (1 μ g/mL) o 10 μ l PBS como control por 24 horas. Al finalizar el periodo de tratamiento, el medio enriquecido fue colectado y almacenado a 80°C hasta analizar la producción de citoquinas. La concentración de citoquinas (IL-6, and TNF- α) fue medida en medio de cultivo celular con los respectivos kits de ELISA (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Análisis Estadístico. La prueba T-test fue usada para el análisis de las muestras independientes y comparar las diferencias en IMC, edad, expresión de OBR y expresión de citoquinas en PBMCs cultivadas con y sin leptina. La prueba T-test pareada fue usada para evaluar los cambios en las variables continuas con los grupos de estudio. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos si $p < 0.05$. Los datos fueron analizados usando el programa SPSS (versión 22, SPSS Inc. Chicago, IL).

RESULTADOS

Datos demográficos de los voluntarios participantes. Los datos demográficos y las características clínicas relevantes de los voluntarios se presentan en la Tabla 1. Los datos mostraron que la edad media de los sujetos con peso normal y obesidad fue comparable, además el número de mujeres y hombres fue similar. La mayoría de personas con obesidad que participan en el estudio tuvieron obesidad tipo II (IMC: 35 - 40) mientras que los individuos con peso normal tuvieron un promedio de 22.42 \pm 4.49 de IMC, **Tabla 1**. Como se esperaba las comorbilidades de obesidad como la diabetes, hipertensión e hipercolesterolemia fue más frecuentes en voluntarios con obesidad que en los individuos con peso normal aunque muchos participantes con obesidad no presentaron estas enfermedades, **Tabla 1**.

Tabla 1. Características clínicas y demográficas de los sujetos participantes con obesidad o peso normal.

	Sujetos con obesidad	Sujetos con peso normal	valor-p
N	15	15	---
IMC (promedio \pm DS)	37.04 \pm 4.49	22.42 \pm 4.49	<0.0001
Edad (promedio \pm DS)	36 \pm 13	35 \pm 12.12	NS
Género (M/H)	8 / 7	8 / 7	NS
Medicación			
Anti-hipertensivos	3	1	NS
Hormonas	1	0	NS
Hipoglucemiantes orales	1	0	NS
Hipolipemiantes	1	0	NS
Comorbilidades			
Diabetes	1	0	NS
Hipertensión	2	1	NS
Hipercolesterolemia	1	0	NS
Otras	1	3	NS

NS: no diferencia estadística, DS: Desviación estándar, M: mujer; H: hombre

Expresión de OBR de superficie de PBMCs de personas con peso normal y obesidad. Como una primera aproximación para estudiar la abundancia de OBR en PBMCs de individuos con obesidad o peso normal como un indicador de resistencia del receptor, se analizó su expresión en la superficie celular por cartometría de flujo. Los datos demostraron que las PBMCs de todos los participantes expresaron OBR en la superficie celular. La expresión del OBR en PBMCs de personas con obesidad o peso normal fue 2.4 \pm 0.9 and 2.6 \pm 1.3 MFI respectivamente. La diferente expresión del OBR en ambos grupos de células no fue estadísticamente significativa. Sin embargo, en las células CD14- de hombres con peso normal hubo una tendencia a una mayor expresión de OBR que en células de hombres con obesidad, sin embargo la diferencia no fue estadísticamente significativa, **Tabla 2**. Además, se observó un patrón similar de la expresión a nivel de mRNA del OBR en PBMCs aisladas de hombres con peso normal y sujetos con obesidad (datos no mostrados). Por otro lado, se observó una mayor expresión de OBR en superficie de PBMCs de mujeres con obesidad que en mujeres con peso normal, sin embargo las diferencias no fueron significativas, **Tabla 2**.

Tabla 2. Expresión de OBR en PBMCs de sujetos con obesidad o peso normal por citometría de flujo.

	HOMBRES			MUCERES		
	Peso normal	Obesidad	Valor-p	Peso normal	Obesidad	Valor-p
PBMCs	2.55 \pm 1.71	1.93 \pm 0.93	0.43	2.59 \pm 0.73	2.80 \pm 0.84	0.63
CD14	2.62 \pm 0.94	2.27 \pm 0.45	0.42	2.95 \pm 1.62	3.12 \pm 1.27	0.60
CD14	2.59 \pm 0.72	1.43 \pm 0.75	0.23	2.01 \pm 0.61	2.26 \pm 0.76	0.44

Los datos expresan el promedio de la intensidad de fluorescencia (MFI, mean fluorescence intensity, por sus siglas en Inglés). Las determinaciones se realizaron en triplicado.

Efecto del tratamiento con leptina en la proliferación de PBMCs. Para evaluar la respuesta de las PBMCs a la estimulación con leptina in vitro, la respuesta a dosis crecientes de la hormona fue analizada. Inicialmente, se trató de determinar la mejor dosis de leptina para ser utilizada en el resto de estudios in vitro. Las PBMCs fueron obtenidas y cultivadas como se indicó en Materiales y Métodos. Posteriormente los cultivos celulares fueron tratados con 10 μ l de BrDU en presencia de concentraciones crecientes de leptina (250, 500 y 1000 ng/mL), LPS (1 μ g/mL) o fitohemaglutinina (1%) por 48 horas. Los PBMCs de individuos con peso normal respondieron a los tres diferentes tratamientos, **Figura 1**. Hubo un incremento significativo en la proliferación celular en respuesta a LPS y fitohemaglutinina comparado con los controles no tratados. Además, se observó un incremento en la proliferación de PBMCs que fue dosis dependiente a la estimulación por leptina, **Figura 1**. La mayor proliferación de PBMCs se observó con una dosis de leptina de 1 μ g/mL. Por lo tanto esa dosis de la hormona se utilizó en todos los siguientes experimentos.

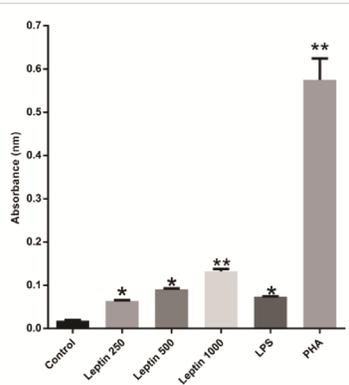


Figura 1. Proliferación de PBMCs en respuesta a dosis crecientes de leptina. Las células fueron tratadas con o sin leptina (250 ng/ml, 500 ng/ml and 1 µg/ml) por 48 horas; 1 µg/ml LPS and 1% PHA se utilizaron como controles positivos. La proliferación celular se midió en triplicado como se indica en Materiales y Métodos. Los valores de absorbancia son el promedio de triplicados ± DS. * p ≤ 0.001, ** p ≤ 0.0001 comparados con controles no tratados.

Efecto de la leptina en la secreción de citoquinas en PBMCs. Inicialmente, se evaluó la secreción basal de IL-6 y TNF por parte de las PBMCs aisladas de sujetos con peso normal o con obesidad. Con este propósito, PBMCs recientemente aisladas se cultivaron por 24 horas como se indicó en Materiales y métodos. Al finalizar el periodo de cultivo, las concentraciones de IL-6 y TNF se midieron en el medio de cultivo enriquecido utilizando kits de ELISA específicos para cada citoquina. Hubo una mayor concentración de IL-6 en el medio de cultivo de células de personas con obesidad (448.6±223.5 pg/mL) que en el medio de cultivo de células de personas con peso normal (372.6±174.2 pg/mL), aunque las diferencias no fueron estadísticamente diferentes. Por otro lado las concentraciones basales de TNF en el medio de cultivo de los PBMCs de individuos con peso normal (21.30±2.8 pg/mL) fue similar que las concentraciones de TNF en el medio celular de

personas con obesidad (21.76±3.3 pg/mL), Figura 2. Posteriormente se analizó la secreción de IL-6 en PBMCs estimuladas con 1 µg/mL de leptina o 1 µg/ml de LPS por 24 horas. Los datos demostraron que los tratamientos con LPS y leptina incrementaron significativamente la secreción de IL-6 de las PBMCs de los individuos de ambos grupos de estudio (p=0.0004), Figura 3a. Las concentraciones de IL-6 en respuesta a leptina fue similar en el medio de células de individuos con peso.

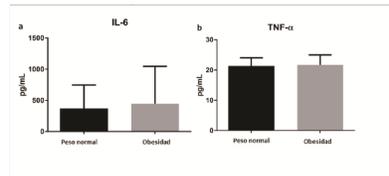


Figura 2. Producción basal de IL-6 y TNF-α por PBMCs aisladas de sujetos con peso normal u obesidad. Células recientemente aisladas (5x10⁶ células) se cultivaron por 24 horas sin ninguna estimulación. Las concentraciones de IL-6 (a) and TNF-α (b) se midieron por ELISA en el medio de cultivo enriquecido. Los datos son el promedio de triplicados ± DS de las concentraciones de citoquinas de todos los sujetos participantes en cada grupo de estudio.

normal y obesidad. Un patrón similar de secreción de IL-6 fue observada con el tratamiento con LPS, Figura 3a. Un análisis más profundo de la secreción de IL-6 luego de la estimulación LPS considerando por separado hombres y mujeres, mostró que la secreción de IL-6 fue consistentemente mayor de PBMCs aisladas de hombres con peso normal que de hombres con obesidad, Figura 3b; aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. De manera similar, la secreción de IL-6 por PBMCs de hombres con peso normal tendió a ser mayor en hombres con peso normal que de hombres con obesidad luego de la estimulación con leptina, Figura 3c. Contrariamente, la secreción de IL-6 por PBMCs de mujeres con obesidad después de la estimulación con leptina tendió a ser mayor que de PBMCs de mujeres con peso normal, Figura 3c. Respecto a la secreción de TNF, las PBMCs de individuos con peso normal u obesidad fueron

cultivadas por 24 horas en presencia de 1 µg/mL de leptina o 1 µg/mL de LPS. Los datos demostraron que la estimulación con LPS incremento significativamente la secreción de TNF por las PBMCs de individuos con peso normal u obesidad (p= 0.001), Figura 4. El TNF liberado en respuesta a LPS fue similar en células de individuos con peso normal u obesidad. El tratamiento con Leptina también estimulo la liberación de TNF de los PBMCs de sujetos de ambos grupos de estudio, sin embargo en menor magnitud que la estimulación con LPS. Un análisis más extenso de la estimulación con LPS y leptina en la liberación de TNF fue considerado separando hombres y mujeres, en este análisis no se encontró ninguna tendencia (datos no indicados).

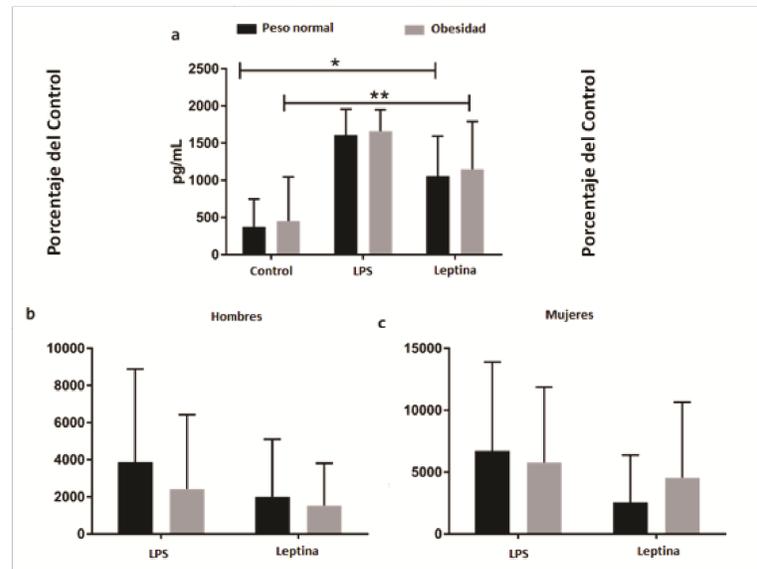


Figura 3. Efectos de la leptina y LPS en la secreción de IL-6 por PBMCs de sujetos con peso normal y obesidad. Células recientemente aisladas (5x10⁶ células) se cultivaron por 24 horas en presencia de 1 µg/ml LPS o 1 µg/ml leptina. Al final del periodo de tratamiento, se midieron las concentraciones de IL-6 por ELISA. (a) Concentraciones de IL-6 en el medio de cultivo de células de todos los participantes; (b) Concentraciones de IL-6 en el medio de cultivo de células de hombres (* p ≤ 0.005, ** p ≤ 0.0001); (c) Concentraciones de IL-6 en el medio de cultivo de células de mujeres. Los datos son el promedio de triplicados ± DS de las concentraciones de citoquinas.

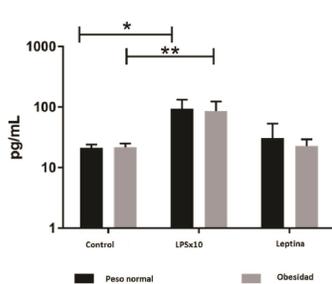


Figura 4. Efectos de la leptina y LPS en la secreción de TNF- α por PBMCs de sujetos con peso normal y obesidad. Células recientemente aisladas (5x10⁶ células) se cultivaron por 24 horas en presencia de 1 μ g/ml LPS o 1 μ g/ml leptina. Al final del periodo de tratamiento, se midieron las concentraciones de TNF por ELISA (* p \leq 0.005 and ** p \leq 0.0001). Las concentraciones de la citoquina se expresan en escala logarítmica. Los datos son el promedio de triplicados \pm DS de las concentraciones de citoquinas.

DISCUSION

Los resultados demostraron que las PBMCs aisladas de los individuos con peso normal o con obesidad respondieron a la estimulación con leptina in vitro. Los datos indicaron que la estimulación del OBR en la superficie celular con leptina provocó proliferación celular y liberación de IL6 por parte de las PBMCs. Además se observó mayor expresión de OBR y mayor liberación de IL-6 en PBMCs aislados de hombres con peso normal que de las células aisladas de hombres con obesidad, sin embargo las diferencias no fueron estadísticamente significantes. La mayor expresión y respuesta del OBR a la estimulación con leptina de PBMCs aisladas de hombres con peso normal que de PBMCs de hombres con obesidad podría ser indicativo de resistencia del OBR en las células inmunes de pacientes con obesidad. Trabajos previos indican que el incremento de la concentración sérica de leptina en la obesidad conduce a la resistencia del OBR a nivel de hipotálamo.¹² La resistencia del OBR a nivel central se caracterizada por la disminución de su expresión en

la superficie celular de neuronas individuales.¹² Además, la resistencia del OBR a nivel periférico se ha evidenciado por una disminución en la expresión del receptor a nivel del musculo esquelético en hombres con obesidad.¹⁴ En ese estudio, la expresión de OBR en musculo esquelético de brazo y pierna fue 28% y 25% menor en hombres con obesidad comparado con individuos de peso normal.¹⁴ En el presente estudio también se demostró la disminución de aproximadamente 24% en la expresión del OBR en la superficie celular en células inmunes aisladas de hombres con obesidad comparados con hombres de peso normal, sin embargo la diferencia no fue estadísticamente significativa. Es posible que las altas concentraciones de leptina que se observan en la obesidad podrían tener un efecto negativo general en la expresión de OBR en superficie celular de todos los tejidos en los que se expresa el receptor. Estos datos son consistentes con la noción de que la resistencia a leptina en la obesidad es un fenómeno ampliamente distribuido que podría tener efectos sistémicos. En el presente estudio la disminución de la expresión de OBR fue más evidente en linfocitos CD14- que forman parte de la respuesta inmune específica. Las consecuencias biológicas de la disminución de la expresión de OBR en los linfocitos necesitan ser estudiadas con más detalle.

Pocos estudios in vitro han comparado directamente la respuesta inmune de PBMCs de sujetos con peso normal y obesidad emparejados por edad y género. Los resultados demostraron una secreción basal de IL-6 y TNF por las PBMCs aisladas de individuos con peso normal y sujetos con obesidad. La cantidad de citoquinas liberadas no fue estadísticamente diferente entre las células de personas con peso normal comparadas con células de personas con obesidad, aunque la secreción de IL-6 fue mayor del último grupo. O'Rourke et al han demostrado menor secreción basal de IL-6 y TNF por PBMCs de personas con obesidad comparada con controles de peso normal.¹⁵ Contrariamente, Sirota et al reporta que PBMCs aisladas de pacientes con obesidad muestran mayor producción basal de TNF- α y IL-1 β comparado con las células de individuos con peso normal mientras que la producción de IL-6 no fue diferente entre grupos.¹⁶ Es posible que las diferencias observadas en la expresión basal de las citoquinas mencionada podrían deberse a diferencias en las condiciones experimentales utilizadas en el presente estudio, nosotros comparamos directamente la

función de las células inmunes de sujetos emparejados por edad y género que no fue considerado en los estudios indicados.

Estudios previos han demostrado el efecto estimulador del tratamiento con leptina para la secreción de citoquinas y la proliferación celular de PBMCs in vitro.¹⁷ Similar a estudios previos, los resultados de la presente investigación demostraron que la estimulación de PBMCs con leptina de individuos con peso normal o individuos con obesidad incrementó significativamente la secreción de IL-6. No hubo diferencias estadísticamente significativas en la secreción de IL-6 o TNF en el medio de cultivo de los PBMCs de individuos con obesidad o individuos con peso normal. Sin embargo, se observó una tendencia constante a tener mayores niveles de IL-6 secretada de las células aisladas de individuos con peso normal después de la estimulación con leptina. Un patrón similar de secreción se observó con la estimulación con LPS. Contrariamente, tras la estimulación con leptina, la secreción de TNF fue similar entre PBMCs de individuos con peso normal e individuos con obesidad. O'Rourke et al también reporta mayor secreción de IL-6 y TNF en PBMCs de individuos con peso normal tratados con leptina comparados con las células de individuos con obesidad y las diferencias no fueron estadísticamente diferentes.¹⁵ Es ese estudio, no hubo un emparejado individual por edad o sexo de los sujetos de peso normal con sujetos con obesidad.

El presente estudio tiene algunas limitaciones debido a la naturaleza de las condiciones experimentales. El tamaño de muestra no fue calculado e incluye un total de 30 individuos; 15 con peso normal y 15 con obesidad de los cuales 8 pares fueron mujeres y 7 de hombres. Dado que observamos diferencias importantes en la respuesta a la leptina dependiendo del género, parece que el tamaño de muestra podría haber resultado en la falta de poder estadístico para probar la hipótesis de este estudio. A pesar de que nosotros observamos patrones constantes de la expresión de OBR y la liberación de citoquinas inducidas por leptina no pudimos establecer diferencias estadísticamente significativas. En relación al aislamiento de las PBMCs, las muestras de sangre fueron analizadas inmediatamente luego de su extracción, se evitó la congelación de las células para disminuir la muerte celular. En consecuencia un máximo de un par (individuos con peso normal y

obesidad) fue simultáneamente analizado lo que pudo haber provocado un cierto grado de variabilidad entre los ensayos para todo el grupo de estudio.

ABREVIACIONES

OBR: receptor de leptina
 PBMCs: células mononucleares periférica de la sangre
 LPS: lipopolisacárido
 PHA: fitohemaglutinina
 IL: interleuquina
 TNF: factor de necrosis tumoral
 IMC: índice de masa corporal
 %BF: porcentaje de grasa corporal
 FBS: suero fetal bovino
 PBS: buffer fosfato salino
 BrdU: 5-bromine-2-desoxiuridina
 MFI: mean fluorescence intensity

DECLARACIONES

El comité de Ética de la Universidad de las Américas, UDLA, Quito - Ecuador, aprobó este estudio. Todos los participantes firmaron un Consentimiento Informado después de recibir una explicación detallada del estudio.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. José Castro quien ayudó en el reclutamiento de los voluntarios; a los doctores D. Cherylin Sirois y Rachid Seqqat quienes ayudaron en el análisis de los datos. Este proyecto fue financiado por el Departamento de Investigación y Relaciones con la Comunidad de la ESPE y del Centro de Investigación Traslacional de las UDLA.

BIBLIOGRAFIA

- James, P.T., et al., The worldwide obesity epidemic. *Obes Res*, 2001. 9 Suppl 4: 228S-233S.
- World Health Organization, W. Obesity and overweight. Fact sheet N 311. 2015 January, 2015 [cited 2016 4/25/2016]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.
- Luckie, A., F. Cortes, and S. Ibarra, Obesidad: Trascendencia y repercusión medico-social. *Revista de Especialidades Medico-Quirurgicas*, 2009. 14: 191-201.

4. Bandaru, P., H. Rajkumar, and G. Nappanveetil, The impact of obesity on immune response to infection and vaccine: an insight into plausible mechanisms. *Endocrinology & Metabolic Syndrome*, 2013. 2013.

5. Huttunen, R., M. Karppelin, and J. Syrjanen, Obesity and nosocomial infections. *J Hosp Infect*, 2013. 85(1): 8-16.

6. Huttunen, R. and J. Syrjanen, Obesity and the risk and outcome of infection. *Int J Obes (Lond)*, 2013. 37(3): 333-40.

7. Fernandez-Riejos, P., et al., Role of leptin in the activation of immune cells. *Mediators Inflamm*, 2010. 2010: 568343.

8. Yang, R. and L.A. Barouch, Leptin signaling and obesity: cardiovascular consequences. *Circ Res*, 2007. 101(6): 545-59.

9. Spiegelman, B.M. and J.S. Flier, Obesity and the regulation of energy balance. *Cell*, 2001. 104(4): 531-43.

10. Sanchez-Margalet, V., et al., Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells: mechanisms of action. *Clinical & Experimental Immunology*, 2003. 133(1): 11-19.

11. Martin, S.S., A. Qasim, and M.P. Reilly, Leptin resistance: a possible interface of inflammation and

metabolism in obesity-related cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*, 2008. 52(15): 1201-10.

12. Martin, R.L., et al., Leptin resistance is associated with hypothalamic leptin receptor mRNA and protein downregulation. *Metabolism*, 2000. 49(11): 1479-1484.

13. Fuss, I.J., et al., Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood. 2009: Wiley Online Library.

14. Fuentes, T., et al., Leptin receptor 170 kDa (OB-R170) protein expression is reduced in obese human skeletal muscle: a potential mechanism of leptin resistance. *Experimental physiology*, 2010. 95(1): 160-171.

15. O'Rourke, R., et al., Alterations in peripheral blood lymphocyte cytokine expression in obesity. *Clinical & Experimental Immunology*, 2006. 146(1): 39-46.

16. Sirota, P., et al., Difference in inflammatory cytokine production by mononuclear cells from obese and non-obese schizophrenic patients. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 2015. 132(4): 301-305.

17. Zarkesh-Esfahani, H., et al., High-dose leptin activates human leukocytes via receptor expression on monocytes. *The Journal of Immunology*, 2001. 167(8): 4593-4599.

Presentación de caso

Comunicación Interauricular tipo seno coronario, aspectos clínicos, abordaje quirúrgico y utilidad de la ecocardiografía en el diagnóstico y en el transoperatorio

Lasso C, Cristhina Paula,¹ Segarra A. Carol,¹ Izaguirre Emiliano,² Valiente Juan,¹ Lasso M. Rafael,¹ Enriquez Dario,¹ Lasso M. Ramiro.¹

¹ Servicio de Cardiología, ² Servicio de Ecosonografía, Hospital de Especialidades de las Fuerzas Armadas N° 1, Quito, Ecuador.

DIRECCIÓN PARA CORRESPONDENCIA: Dr. Ramiro Lasso M. Hospital de Especialidades de las Fuerzas Armadas N° 1. Telf.: 0999728051. E-mail: ramirolassomed@yahoo.com.mx

RESUMEN

Se trata de la revisión de una patología rara y aún no descrita en nuestro país, como es la comunicación interauricular de tipo seno coronario. Abordamos de forma global, tanto los aspectos clínicos, como los métodos diagnósticos, poniendo énfasis especial en la utilidad de la ecocardiografía y el abordaje quirúrgico. Presentamos además, el caso clínico de una paciente del hospital de Especialidades de las Fuerzas Armadas, las dificultades diagnósticas que se asocian a una cardiopatía congénita acianótica, como es la comunicación interauricular tipo seno coronario, la cirugía realizada y la utilidad de la ecocardiografía transesofágica transoperatoria.

Palabras clave: Comunicación interauricular, seno coronario, eco transesofágico.

ABSTRAC

This is the review of a rare pathology not yet described in our country, such as coronary sinus interatrial communication. We deal comprehensively with both clinical aspects and diagnostic methods, with particular emphasis on the usefulness of echocardiography and surgical approach. We present, in addition, the clinical case of a patient of the Armed Forces Specialties hospital, the diagnostic difficulties that are associated with acyanotic congenital heart disease, such as coronary sinus interatrial communication, surgery performed and the utility of transoperative transesophageal echocardiography.

Key words: Atrial septal defect, coronary sinus, transesophageal echo.

INTRODUCCIÓN

La comunicación interauricular (CIA) o defecto septal interauricular, es un desarrollo inadecuado del tabique interauricular, que separa ambas aurículas, es decir, un orificio entre las cavidades superiores del corazón, que provoca una comunicación anormal entre aurícula derecha e izquierda. Como la presión es más elevada en el lado izquierdo del corazón, la sangre es impulsada a través del orificio, creando un cortocircuito (Cc) izquierda-derecha.^{1,2}

EPIDEMIOLOGIA

A nivel mundial cerca del 1-2% de niños nacidos vivos presenta algún problema cardiovascular congénito. La CIA, como anomalía aislada, según varios meta análisis y revisiones, representa un 7 a 10 % de las cardiopatías congénitas. Debido a su historia natural, pues la mayoría de veces es asintomática, son de difícil diagnóstico, por lo que su incidencia probablemente esté infraestimada. Cabe anotar que el foramen oval permeable, que constituye también una comunicación entre las 2 aurículas, se detecta entre