



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS SOCIALES DE LOS TRABAJADORES DEL ESTADO

CENTRO MÉDICO NACIONAL 20 DE NOVIEMBRE

“NIVELES SÉRICOS DE CÉLULAS ASESINAS NATURALES EN PACIENTES CON OBESIDAD”.

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

ESPECIALISTA EN INMUNOLOGIA CLÍNICA Y ALERGIA.

PRESENTA:

DRA. DIANA ANDREA HERRERA SÁNCHEZ.

ASESORES:

DRA. MARÍA EUGENIA VARGAS CAMAÑO.

DRA. MARÍA ISABEL CASTREJÓN VÁZQUEZ.

México, D.F. Agosto 2014.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DRA. AURA ERAZO VALLE SOLÍS.

Subdirectora de Enseñanza e Investigación.

MTRA. MARÍA EUGENIA VARGAS CAMAÑO.

Asesora de Tesis.

Profesora titular del Curso de Posgrado Inmunología Clínica y Alergia.
Jefa del Servicio Inmunología Clínica y Alergia, CMN 20 de Noviembre.

MTRA. MARÍA ISABEL CASTREJÓN VÁZQUEZ.

Asesora de Tesis.

Profesora adjunta del Curso de Posgrado de Inmunología Clínica y Alergia.
Médica adscrita del Servicio de Inmunología Clínica y Alergia, CMN 20 de Noviembre.

DRA. DIANA ANDREA HERRERA SÁNCHEZ.

Tesista.

Residente del CMN 20 de Noviembre.

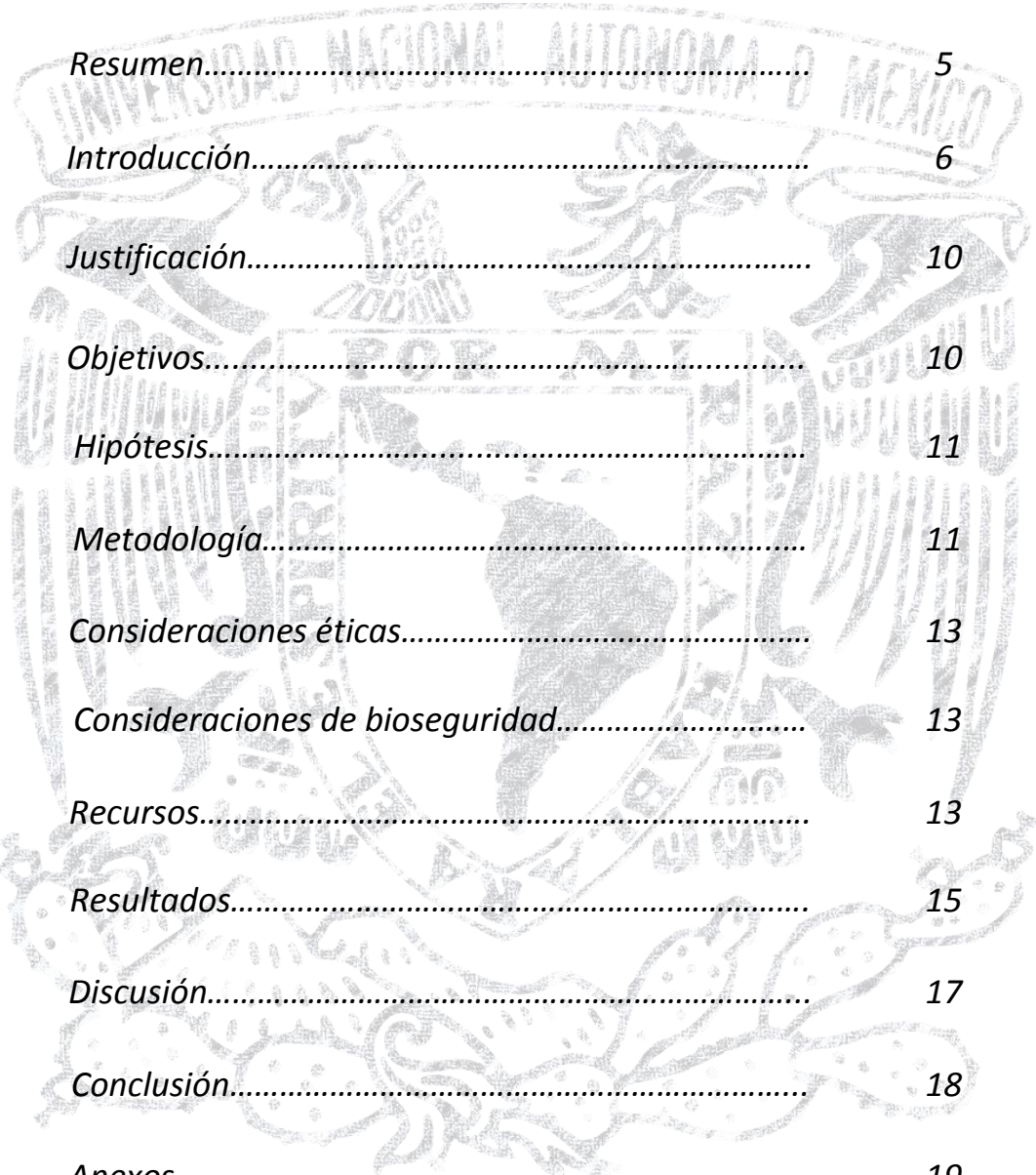


*El Señor es mi pastor,
nada me faltará.
Él me hace descansar en verdes praderas,
me conduce a las aguas tranquilas
y repara mis fuerzas;
me guía por el recto sendero,
por amor de su Nombre.
Aunque cruce por oscuras quebradas,
no temeré ningún mal,
porque Tú estás conmigo:
tu vara y tu bastón me infunden confianza.
Tú preparas ante mí una mesa,
frente a mis enemigos;
unges con óleo mi cabeza
y mi copa rebosa.
Tu bondad y tu gracia me acompañan
a lo largo de mi vida;
habitaré en la Casa del Señor,
por muy largo tiempo.*

Salmo 23.

↻ A mis padres y hermanos por su amor, comprensión y apoyo incondicional en este viaje ↻

ÍNDICE.



<i>Resumen.....</i>	<i>5</i>
<i>Introducción.....</i>	<i>6</i>
<i>Justificación.....</i>	<i>10</i>
<i>Objetivos.....</i>	<i>10</i>
<i>Hipótesis.....</i>	<i>11</i>
<i>Metodología.....</i>	<i>11</i>
<i>Consideraciones éticas.....</i>	<i>13</i>
<i>Consideraciones de bioseguridad.....</i>	<i>13</i>
<i>Recursos.....</i>	<i>13</i>
<i>Resultados.....</i>	<i>15</i>
<i>Discusión.....</i>	<i>17</i>
<i>Conclusión.....</i>	<i>18</i>
<i>Anexos.....</i>	<i>19</i>
<i>Referencias.....</i>	<i>30</i>

1. RESUMEN.

Niveles séricos de células asesinas naturales en pacientes con obesidad.

Herrera Sánchez D., Vargas Camaño M., Castrejón Vázquez M., García Castillo G.

CMN 20 de Noviembre, ISSSTE.

Introducción.

El sobrepeso y obesidad se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa, con índice de masa corporal (IMC) mayor de 25 y 30 kg/m², respectivamente. En México, la prevalencia de obesidad en mayores de 20 años es de 32.4%. El tejido adiposo es productor de una amplia gama de citocinas, quimiocinas y factores similares a hormonas o adipocinas, la mayoría con acciones proinflamatorias. Las células asesinas naturales, pertenecen a la inmunidad innata, se caracterizan por el fenotipo CD3⁻, CD16⁺, CD56⁺. Existe evidencia de la disminución de células NK en sujetos obesos, sin embargo valores normales pueden ser acompañados únicamente de alteraciones en la funcionalidad. Las células NK están involucradas en la inmunovigilancia tumoral, viral, desarrollo de autoinmunidad, diabetes y enfermedades cardiovasculares; existe controversia, si la disminución de NK condicione a mayor riesgo de estas. Con este estudio, se conocerá los niveles séricos en los diferentes grados de obesidad.

Métodos.

Se realizó un estudio transversal, descriptivo y observacional donde se incluyeron a 51 pacientes del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, mayores de 18 años; que no padecieran inmunodeficiencia primaria y/o secundaria, autoinmunidad o alergia. A todos se les cuantificó niveles séricos de células NK. Los niveles fueron comparados con 4 criterios del síndrome metabólico (hipertensión arterial, diabetes mellitus 2, circunferencia abdominal y dislipidemia), que consideramos como factores que pudieran influir en el recuento absoluto.

Resultados.

El rango de edad fue de 19 a 74 años (46±13.1), 37 (72.6%) fueron mujeres y 14 (27.4%) hombres. El promedio global de peso fue de 90.1 kgs (±16.2). La media del IMC global fue de 35.8 kgs/m² (±6.7); 28 (54%) tuvieron Obesidad grado I. El promedio global de células NK fue de 164 cel/μl. Para obesidad grado I: 152 cel/μl, grado II: 161.4 cel/μl y Grado III: 199.1 cel/μl. No hubo correlación estadísticamente significativa con la edad, IMC y los 4 factores de riesgo considerados.

Conclusiones.

A pesar de que no se comprobó la hipótesis, otras posibilidades deben tomarse en cuenta, la localización periférica (tejido adiposo) de las células NK y que estos niveles no valoran la función de las células. Consideramos que su utilidad reside en sentar las bases para futuros trabajos que puedan contar con un número mayor de pacientes, definir los rangos normales en población mexicana sana y confirmar si estos niveles fueron o no influidos por obesidad.

Palabras clave: sistema inmune innato, células asesinas naturales, obesidad.

2. INTRODUCCIÓN.

El sobrepeso y obesidad se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa, con índice de masa corporal (IMC) mayor de 25 y 30 kg/m², respectivamente ⁽¹⁾. El IMC es un cociente que utiliza la talla y el peso para clasificar el sobrepeso y obesidad en adultos, expresado en kg dividido por el cuadrado de la talla en metros.

En la tabla 1 se muestra la clasificación que Organización Mundial de la Salud de la obesidad en adultos.

Tabla 1.

	Riesgo de enfermedad.			
	IMC (Kg/m ²)	Clase de obesidad	Hombres ≤102cm Mujer ≤88cm	Hombres ≥102cm Mujer ≥88cm
Bajo peso	< 18.5		-	-
Normal	18.5-24.9		-	-
Sobrepeso	25.0-29.9		Aumentado	Alto
Obesidad	30.0-34.9	I	Alto	Muy alto
	35.0-39.9	II	Muy alto	Muy alto
Obesidad extrema	>40.0	III	Extremadamente alto	Extremadamente alto

Tomado de la referencia 1.

La prevalencia del sobrepeso y la obesidad se ha incrementado en todo el mundo, ocasionando serios problemas de salud y altos gastos económicos en las sociedades. Se estima que actualmente el 70% de los adultos en Estados Unidos y más del 60% en Reino Unido tienen sobrepeso, y la mitad de ellos son obesos ⁽²⁾.

En México se calcula que 70% de los adultos sufren sobrepeso y obesidad. La prevalencia de obesidad en mayores de 20 años es del 32.4% y mayor en las mujeres (34.5 %) que en los hombres (24.2 %) ^(3,4).

Está demostrado que la obesidad es un factor de riesgo para enfermedades como diabetes mellitus, hipertensión arterial, enfermedad coronaria, apnea obstructiva del sueño y algunos cánceres; además se conoce su asociación con padecimientos músculo-esqueléticos y problemas de salud mental.

La obesidad tiene un origen multifactorial, en el que se involucran la susceptibilidad genética, estilo de vida, con influencia de diversos determinantes como la globalización, cultura, condición económica, educación, urbanización y el entorno político y social.

La causa fundamental del sobrepeso y la obesidad es un desequilibrio energético entre calorías consumidas y gastadas, como consecuencia muchas hormonas y péptidos actúan en un sistema de retroalimentación integrado por el sistema gastrointestinal, adipocitos y el eje hipotálamo-hipofisiario-adrenal. La integración de estos sistemas tiene como finalidad la adecuada adaptación a períodos de privación de alimentos, pero conlleva a una pobre adaptación a la sobrealimentación.

Desde el punto de vista inmunológico se ha demostrado que existe una inflamación sistémica persistente en los obesos, si bien esta respuesta originalmente está dirigida a la eliminación de un agente externo o interno potencialmente dañino, debe de limitarse una vez que ha sido alcanzado el objetivo. Sin embargo, al persistir con obesidad este estímulo no es eliminado, persistiendo con inflamación que a largo tiempo es nociva para el organismo.

Se creía que el tejido adiposo era fisiológicamente inactivo, hoy se sabe que es productor de una amplia gama de citocinas, quimiocinas y factores similares a hormonas o adipocinas, algunas con acciones proinflamatorias, como la leptina, el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-6, proteína quimiotáctica de monocitos (MCP)-1, resistina, proteína de unión al retinol 4 (RBP-4), lipocalina-2, CCL2, IL-18, nicotinamida fosforribosiltransferasa (NAMPT), CXCL5. Otras adipocinas como la adiponectina, IL-10, y la SFRP5 (proteína secretada relacionada a frizzled – secreted frizzled-related protein), tienen actividad antiinflamatoria.

Durante la obesidad, la expansión no controlada del tejido adiposo da lugar a desregulación de las adipocinas, favoreciendo la expresión de adipocinas proinflamatorias e inhibiendo la secreción de las antiinflamatorias.

La hipertrofia del tejido adiposo precede a la angiogénesis, por lo que durante la expansión de los adipocitos, algunos sufren necrosis. Los macrófagos residentes se activan para la fagocitosis de los detritos celulares y una vez activados, producen TNF α , IL-6 y MCP-1. ⁽⁵⁾ Los monocitos circulantes son reclutados e infiltran el tejido adiposo, con esto, se estimula la infiltración adiposa por macrófagos y linfocitos, estos últimos se diferencian al fenotipo TH1, productor de IFN- γ ⁽⁵⁾.

Durante la obesidad, los macrófagos residentes se activan con un fenotipo M1 (proinflamatorio) y permanecen con este fenotipo, estimulando la polarización de los linfocitos a TH1, reclutamiento de leucocitos y producción de radicales libres y proteasas, perpetuando así la inflamación ⁽⁶⁾.

Células asesinas naturales (Natural Killer).

La respuesta inmune está mediada por dos grandes sistemas que proporcionan la inmunidad innata y adaptativa, trabajan juntos para combatir eficazmente la amplia gama de agentes patógenos que desafían el organismo. El sistema inmune innato precede a la inmunidad adaptativa desde un punto de vista filogenético y está presente en las plantas y animales. Aunque a primera vista la inmunidad innata puede parecer primitiva, las células inmunes innatas pueden orquestar la respuesta inmune adaptativa ⁽⁷⁾.

Desde la primera caracterización de las células NK, (del inglés natural killer) se encontró que estas sirven como primera línea de defensa contra una variedad de infecciones. Las células NK, se desarrollan de un progenitor celular CD34⁺ en la médula ósea en presencia de citocinas como IL-15 y constituyen un linaje celular del sistema inmune especializado en apoptosis vía citotoxicidad, siendo parte de la respuesta inmune innata. Constituyen 5 a 10% de los linfocitos en sangre periférica humana, morfológicamente son linfocitos grandes con gránulos citoplasmáticos. Su fenotipo en reposo es: TCR⁻, BCR⁻, CD3⁻, CD16⁺, CD56⁺.

Poseen genes de receptores con capacidad de rearrreglarse (como los receptores de linfocitos T), sin embargo no los emplean durante su maduración; se han descrito muchos receptores que permiten la activación de las células NK. Los receptores al ser activados, ponen en marcha la maquinaria citotóxica de estas células; sin embargo, la mayor especificidad en el reconocimiento de la célula blanco ha provenido de los receptores de inhibición de las células NK.

Estos receptores se caracterizan por interactuar con diversos tipos de complejos de histocompatibilidad clase I (MHC-I), transmitiendo una señal de inhibición de la citotoxicidad que predomina sobre la activación. Esto quiere decir que si se enfrentan receptores de activación e inhibición simultáneamente, la respuesta es de inhibición de la citotoxicidad. Existen dos grandes familias de estos inhibidores, los de tipo lectinas, cuyo principal exponente es CD94/NKG2A y los del tipo similar a inmunoglobulinas, ejemplos son los denominados KIR (Killer inhibitory receptor). Las células NK reconocen determinados segmentos de estos complejos y no es totalmente claro si es necesaria para ello la existencia del péptido antigénico. Estos últimos resultados dan un fuerte apoyo a dos de las acciones más reconocidas de las células NK como son las actividades anti-virales y anti-neoplásicas.

En ambas situaciones, y por mecanismos diferentes, puede disminuir la expresión de los MHC, es decir se remueve la señal inhibitoria, lo que deja libre la posibilidad de activación y lisis. Esta menor presentación antigénica por parte de las células tumorales o transformadas por virus, representa uno de sus principales mecanismos de evasión de la respuesta inmune específica (8, 9,10).

Debido a que expresan un receptor de membrana (CD16) para una región específica de la molécula de anticuerpo, pueden unirse a estos anticuerpos y destruir después las células blanco. Éste es un ejemplo de un proceso denominado citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC, del inglés antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)

Las células NK median sus efectos mediante el reconocimiento y muerte de células diana, producción de citocinas inmunorreguladoras, en particular IFN- γ , que mejora la respuesta inmune innata y ayudan a dar forma a la respuesta inmune adaptativa. Las citocinas IL12 e IL21, median gran parte de su actividad anti-tumoral potenciando la vía de reconocimiento NKG2D cuando se expresa el ligando adecuado (11).

Células asesinas naturales en obesidad.

Las células NK se han encontrado en abundancia en el tejido adiposo, pueden representar hasta el 30 % de las células presentes en la fracción del estroma vascular de epidídimo de tejido adiposo en ratones. En humanos se ha mostrado que es más frecuente que el tejido adiposo visceral exprese niveles más altos de interferón gamma en comparación con el tejido adiposo subcutáneo (12).

Existe evidencia de la disminución de células NK en sujetos obesos, sin embargo valores normales pueden ser acompañados únicamente de alteraciones en la funcionalidad o citotoxicidad. Hay mayor expresión de CD69 en sujetos obesos que sugiere su activación, que junto con el aumento de marcadores inhibitorios, estas células disminuyen su capacidad para matar, contribuyendo a mayor susceptibilidad de enfermedad maligna e infección. (13) Al parecer la pérdida de peso puede mejorar los valores y más frecuentemente la citotoxicidad, los resultados son contradictorios en humanos, no así en ratones (14, 15,16).

Un estudio no encontró diferencia significativa en la citotoxicidad espontánea de las células NK en sujetos obesos en comparación con los no obesos, sin embargo comparó los niveles y actividad de las células NK en pacientes con obesidad (IMC promedio de 36kg/m²) y alteraciones metabólicas, con obesos no complicados; encontrando invariablemente disminución de la células NK en los primeros.

Esto sugiere que las complicaciones metabólicas, parecen influir en los niveles bajos y función de las células NK, si consideramos que solo el 20% de los obesos no presentan dichas complicaciones, la disminución de NK se observa con mayor frecuencia en pacientes obesos metabólicamente no sanos, con alto riesgo de comorbilidades (16).

Previamente se comentó que la adiponectina y leptina, son responsables del balance energético, sus concentraciones se determinan por el grado de obesidad, directamente en el caso de la leptina e inversamente en el caso de la adiponectina, pero ¿Qué relación pueden tener con las células NK?

Hoy sabemos que ambas son parte de la regulación del sistema inmune y sus receptores han sido identificados en las células NK y hasta en el 5% de donadores sanos, se puede encontrar una menor expresión de CD16.

En pacientes obesos las NK no responden a la adiponectina, sugiriendo que son resistentes a sus efectos. Estos hallazgos se ajustan también con el papel protector que se ha propuesto para adiponectina en cáncer, ya que es antiangiogénica, antiinflamatoria e inhibe el crecimiento tumoral en animales (17).

Las células NK de ratas con obesidad inducida por dieta fueron resistentes a la activación por leptina, causada por defecto en la señalización JAK / STAT. Sin embargo, el mecanismo por el cual la leptina altera la función de la célula NK humana especialmente en la obesidad, sigue siendo desconocido (18).

El sistema inmunológico del huésped juega un papel fundamental en la vigilancia, detección y eliminación de células mutadas. Particularmente las células natural killer (NK) son importantes efectoras del sistema inmune innato contra malignidad; tienen la capacidad para matar ciertas células tumorales sin sensibilización previa, su control y crecimiento in vivo e impedir su diseminación (19).

Un meta-análisis ha demostrado que la obesidad se asocia con 25-40 % de tumores malignos en particular, adenocarcinoma de esófago, tiroides, renal, colon, mieloma múltiple y leucemia (20), causados por niveles elevados de adipocinas, una de ellas la leptina. Su estimulación a largo plazo altera significativamente las funciones de las células NK, encargadas de la inmunovigilancia tumoral.

En dos estudios de tumores murinos tratados con leptina fue beneficiosa, se cree sea debida a la mejoría de la función de las células NK, estableciendo la importancia del enlace leptina-NK (21).

En ratones obesos, se ha demostrado que su carga tumoral aumenta tras la exposición a tabaco, asociado en parte a defectos específicos de células NK, que podría explicar los pobres resultados en fumadores obesos con patología oncológica. Estas alteraciones se deben a que el tabaco, inhibe la regulación de CD69 y la liberación de perforina, como se ha visto por la expresión de CD107 en su superficie; teniendo implicaciones en su activación, secreción de citocinas y posterior regulación de la respuesta inmune adaptativa. La importancia radica en que las células NK eliminan tumores por liberación de gránulos citotóxicos, incluyendo perforina, sin olvidar el papel importante del interferón gamma, ya demostrado en humanos (22,23).

Las células NK también están involucradas en el desarrollo de autoinmunidad, diabetes y otras enfermedades cardiovasculares. Particularmente en el caso de diabetes se han descrito alteraciones en células NK, incluso en pacientes de reciente diagnóstico; como un mayor número células NK activadas y menor proporción de inhibidoras, creando un desequilibrio que conduce a menor umbral para su activación y así contribuir a la inflamación crónica.

Se propone que la medición de NKG2D β puede ser valiosa para la detección precoz de la inflamación asociada a la obesidad en las personas con alto riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 (24).

Las células NK también han sido implicadas en la fisiopatología de esteatosis hepática, ya que los hepatocitos deficientes en GNMT (glicina-N-metil-transferasa) acumulan lípidos y expresan activamente ligandos de células NK, lo que hace que dichos hepatocitos sean considerados como dañados o transformados y por ende, se promueva su muerte mediante mecanismos mediados a través de TRAIL (ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF) (25,26).

Sea cual sea el mecanismo por el que se da la obesidad e inflamación, se cree que la respuesta inflamatoria en la obesidad es una forma del organismo de mantener la homeostasis, impidiéndole alcanzar un punto en el que la grasa acumulada deteriore la funcionalidad del organismo. Por otra parte, es muy importante continuar el estudio de estos fenómenos tan relacionados, además de trabajar en el desarrollo de medidas preventivas que eviten el sobrepeso y la obesidad.

Estudios adicionales son necesarios para dilucidar la función exacta del sistema inmunológico específicamente de las células NK en la inflamación asociada a obesidad, en nuestro país no hay ningún estudio relacionado con esto.

3. JUSTIFICACIÓN.

Las enfermedades metabólicas y cardiovasculares ligadas con la obesidad son una pandemia en el mundo occidental, con una gran carga de morbilidad y un impacto económico cada vez mayor. El proceso inflamatorio, parece ser la característica subyacente en patologías asociadas a la obesidad.

Los datos sobre valores y funcionamiento de las células NK en humanos durante la inflamación crónica inducida por obesidad ha sido hasta el momento controversial, por lo que se desconoce exactamente su relevancia clínica, sin embargo fisiopatológicamente podría predisponer a mayor incidencia de cáncer e infecciones virales mortales en pacientes obesos. Es importante conocer las alteraciones y mecanismos por los cuales las células NK pueden contribuir a la inflamación crónica en la obesidad, este conocimiento puede permitir el desarrollo de nuevas terapéuticas con blancos inmunológicos que eviten la progresión del estado proinflamatorio con sus consecuencias clínicas, impactando así en la salud de los individuos y en la salud pública.

4. OBJETIVOS.

a) General.

Conocer los niveles séricos de células NK en pacientes con diferentes grados de obesidad.

b) Especifico.

Comparar CD 56⁺ CD16⁺ con el índice de masa corporal.

5. HIPÓTESIS.

Debido al proceso inflamatorio de la obesidad, las células NK se modificarán inversamente proporcionales al grado de obesidad ($>30\text{kg}/\text{m}^2$).

a) Hipótesis alterna

Los niveles séricos de células NK se encuentran disminuidos en los diferentes grados de obesidad.

b) Hipótesis nula

Los niveles séricos de células NK se encuentran disminuidos en los diferentes grados de obesidad.

6. METODOLOGÍA.

a) Muestra.

Se calculó la muestra con la siguiente fórmula:

$$\frac{k^2 N p q}{e^2 (N - 1) + k^2 p q}$$

Donde n= tamaño de la muestra.

K = valor (1.96 para nivel de confianza del 95%).

N= Número total de posibles encuestados (130).

p= porcentaje calculado, que basado en estudios previos se estima en 26% (0.26).

q= proporción de individuos que no poseen la característica, es decir, es 1-p.

e= Intervalo de error, 5% (0.05).

Número de la muestra: 90 pacientes.

b) Criterios de inclusión.

- ❖ Pacientes del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre.
- ❖ Hombres y mujeres de 18 a 80 años de edad.
- ❖ Cualquier grado de obesidad (definida como $\text{IMC} > 30\text{kg}/\text{m}^2$)
- ❖ Consentimiento informado por escrito.

c) Criterios de exclusión.

- ❖ Se excluirán a los pacientes con diagnóstico médico y por laboratorio establecido de: (Inmunodeficiencia primaria o secundaria: cáncer, VIH), enfermedades autoinmunes, diabetes mellitus tipo 2 descontrolada (glucemia de ayuno $> 126\text{ mg}/\text{dL}$ o hemoglobina glucosilada $> 7\%$), hipertensión arterial descontrolada y enfermedad alérgica.
- ❖ Tratamiento previo o actual con inmunoterapia, inmunomoduladores, quimioterapia e inmunosupresores.
- ❖ Embarazadas
- ❖ Falta de firma de consentimiento informado.

d) Criterios de eliminación.

- ❖ Determinación incompleta de las variables en el estudio.
- ❖ Evidencia de inmunodeficiencia, autoinmunidad o enfermedad alérgica no diagnosticada previamente.
- ❖ Que no acepte participar en el estudio.

e) Definición de variables.

Variable	Tipo de variable	Definición (unidades de medida)
Independientes:		
Edad	Cuantitativa nominal.	Cantidad de años cumplidos a la fecha de aplicación del estudio. Años.
Índice de masa corporal (IMC)	Numérica discreta.	Cociente del peso corporal en kg sobre el cuadrado de la talla en metros (kg/m ²). Grado I (30.0-34.9 kg/m ²), Grado II (35.0-39.9 kg/m ²), Grado III (>40 kg/m ²).
Sexo	Cualitativa continúa.	Hombre/mujer.
Dependientes:		
Células naturales asesinas (NK)	Cuantitativa discontinua.	Número de linfocitos CD3 ⁺ CD56 ⁺ 16 ⁺ cuantificados por Citometría de flujo (células/μL)

f) Métodos.

Se seleccionaran 51 pacientes del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE que cumplan con los criterios de inclusión.

Se les invitará a participar en el estudio, informándoles ampliamente sobre éste; a quienes acepten se les explicará y resolverán dudas acerca del proyecto, se les solicita consentimiento informado y una vez firmado este, se tomará muestra sanguínea por venopunción con sistema de vacío BD Vacutainer® para extracción de sangre de un tubo con anticoagulante K3 EDTA, previa antisepsia con torunda de algodón impregnada con alcohol etílico al 70%.

Una vez tomada la muestra se procesaron antes de 24 horas para su mejor análisis de la siguiente manera: se colocaron 20 μL de una mezcla de anticuerpos (CD45 VioBlue, CD3 APC, y CD56 PE) en un tubo de polipropileno y después se agregaron 50 μL de cada muestra, se agitaron y se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente en cámara oscura. Después se le agregaron 450 μL de solución de lisis BD FACS lysing solution se agitaron y se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente en cámara oscura. La cuantificación se realizó en un equipo MACSQuant después de calibrar con las perlas de calibración MACSQuant y compensar con los anticuerpos individuales de cada fluorocromo y un blanco. Posteriormente se analizaron en el equipo adquiriendo 150 μL de cada muestra y se tomó la región CD45 positiva en un gráfico de granularidad contra CD45. De esta región se construyó un gráfico de CD3 APC contra CD56 PE donde se tomó la cuenta del número de eventos en la región de CD56⁺ considerando las diluciones en la preparación de esta muestra ^(27,28).

Una vez que se tengan los resultados de laboratorio, se llenará la hoja de recolección de datos automatizada de Excel (Anexo 2), donde finalmente se integraran los datos para su análisis estadístico.

g) Análisis estadístico.

Los datos obtenidos en la hoja de recolección de datos (anexo 2), serán vaciadas a hojas de Excel, posteriormente serán analizadas con el software SPSS versión 16 para Windows y Statistical.

El análisis estadístico de los resultados se realizará con Estadística Descriptiva (frecuencias, media, mediana, proporciones, porcentajes y desviaciones estándar) con gráficos, se aplicaran análisis de correlación, varianza y Estadística paramétrica y no paramétrica.

7. CONSIDERACIONES ÉTICAS.

El protocolo será sometido al Comité de Ética y Bioseguridad del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre ISSSTE; comprendido el estudio en el Reglamento de la Ley General de Salud y la Declaración de Helsinki modificada en la 52 Asamblea General, Edimburgo Escocia, Octubre 2000. Nota de Clarificación sobre el párrafo 29, añadida por la Asamblea General, Washington, 2002 ^(29, 30, 31, 32,33) solicitando el consentimiento informado por escrito y firmado por el paciente, padre o tutor, persona o responsable legal, explicando claramente que en caso de que no desee participar no tendrá ninguna repercusión, el objetivo del estudio, los procedimientos que se realizarán y que estos no tienen ningún efecto nocivo a su salud. Se anexa la carta de consentimiento informado (Anexo 3). La información recabada y los resultados obtenidos se manejarán en forma confidencial y se presentarán en forma anónima.

8. CONSIDERACIONES DE BIOSEGURIDAD.

Durante el estudio se realizará toma de muestra por venopunción, el cual es un procedimiento de rutina que se asocia a una baja incidencia de efectos adversos, entre los cuales se encuentran los siguientes, expresados con la frecuencia referida en la literatura ⁽³⁴⁾ :

- Equimosis o hematoma menor (12.3%).
- Diaforesis con hipotensión (2.6%).
- Síncope (< 1%).
- Celulitis o flebitis (muy rara, no reportada en la literatura).

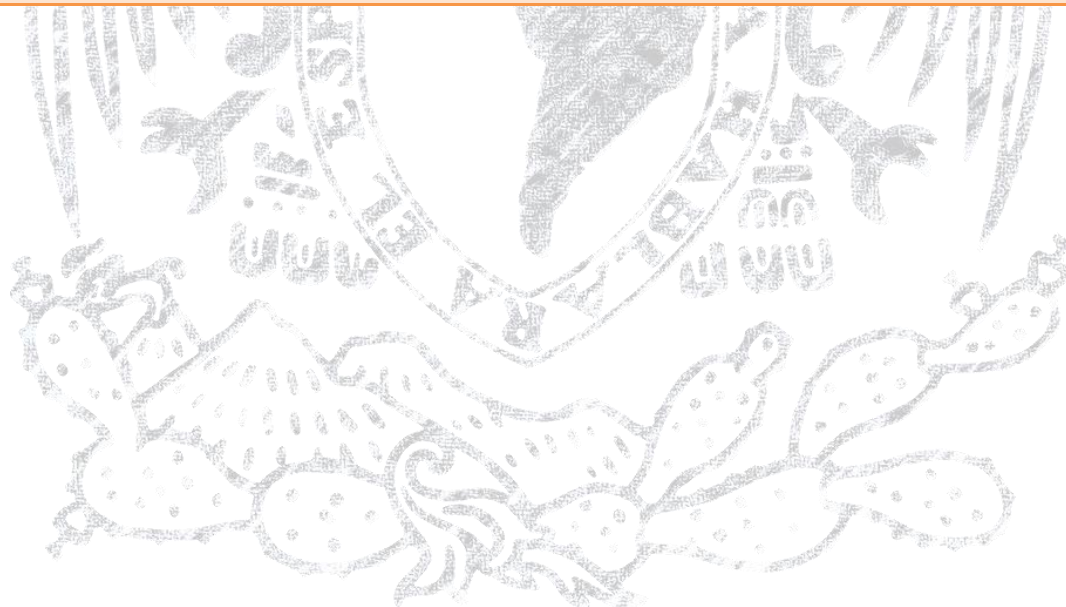
9. RECURSOS.

a) Materiales.

- ❖ Computadoras.
- ❖ Plumas.
- ❖ Hojas.
- ❖ Software Excel y SPSS versión 16 para Windows.
- ❖ Clitómetro de flujo, ya disponible en el Laboratorio de Histocompatibilidad.
- ❖ Anticuerpos monoclonales marcados ya disponibles en el Laboratorio de Histocompatibilidad, como donación externa, no afecta los recursos para pacientes del CMN 20 de Noviembre.

b) Humanos.

Dra. María Eugenia Vargas Camaño.	Jefa de Servicio Inmunología Clínica y Alergia, CMN 20 de Noviembre, ISSSTE. Profesora Titular del Curso Universitario de Inmunología Clínica y Alergia, UNAM.	Supervisión del protocolo. Supervisión del manuscrito final.
Dra. María Isabel Castrejón Vázquez.	Médica adscrita al Servicio de Inmunología Clínica y Alergia, CMN 20 de Noviembre, ISSSTE. Profesora Adjunta del Curso Universitario de Inmunología Clínica y Alergia, UNAM.	Supervisión del protocolo. Análisis estadístico. Supervisión del manuscrito final
Dra. Diana Andrea Herrera Sánchez.	Residente de Inmunología Clínica y Alergia, CMN 20 de Noviembre, ISSSTE.	Investigación bibliográfica, reclutamiento y selección de expedientes a revisar. Elaboración protocolo. Elaboración y llenado de cédulas de recolección de datos. Análisis estadístico. Redacción del manuscrito final.
Q.F.B. Guillermo García Castillo.	Encargado del servicio de Histocompatibilidad, del CMN 20 de Noviembre, ISSSTE.	Supervisión del marco teórico y protocolo. Procesamiento de muestras sanguíneas y recuento absoluto de células NK. Supervisión del manuscrito final.



10. RESULTADOS.

Se realizó un estudio transversal, observacional y descriptivo, que incluyó 51 (100%) pacientes del CMN 20 de Noviembre, en el período de mayo-junio de 2014 que cumplieron con los criterios de inclusión. El rango de edad fue de 19 a 74 años (46 ± 13.1), 37 (72.6%) fueron mujeres y 14 (27.4%) hombres. El promedio global de peso fue de 90.1 kgs (± 16.2), en mujeres 89.9kgs y en hombre de 94.7kgs. La media global de estatura fue 159.4cm (± 9.7), en mujeres 159.31cms, en hombres 159.39cms. La media del IMC global fue de 35.8 kgs/m² (± 6.7), en mujeres fue de 35.7kgs/m² (± 19.4), en hombres 35.7kgs/m² (**Tabla 1**).

De las mujeres: 17 (45.9%), fueron clasificadas como obesidad GI con media 31.5 (± 1.5) y rangos mínimos y máximos de 30-34.1, 10 (27%) como obesidad Grado II, con media 37.2 (± 1.8) y rango mínimo y máximo (35.2-39.9), y 10 (27%) con obesidad Grado III, con media 46.34 (± 6.47) y rango mínimo y máximo de 40.6-57.5. En el caso de los hombres, 11(78.5%) fueron clasificados como obesidad GI, con media 30.7 (± 1.3) y rango mínimo y máximo de 30.0-33.8; 2(14.2%) con obesidad GII, media de 36.8 (± 0.98) y rango mínimo y máximo de 36.1-37.5 y finalmente un solo paciente (7.1%) con obesidad GIII. La media de circunferencia abdominal es de 112 cms (± 11.7), en mujeres 114.6cms (± 33.2), hombres 107.5cms (± 17.1) (**Tabla 1**).

La media de células asesinas naturales (NK) en la muestra de estudio fue de 164cel/ μ l, se consideró rango normal de 37-901 cel/ μ l de acuerdo al proveedor del reactivo ⁽²⁸⁾. La media de células NK en mujeres fue 164 cel/ μ l (± 88.5) y en hombres 165cel/ μ l (± 100) El valor más alto se encontraron en el grupo de mujeres, 446cel/ μ l (**Gráfica 1**).

De acuerdo con la clasificación de la OMS, 28 (55%) pacientes tenían obesidad GI, 12 (24%) obesidad GII y 11 (22%) obesidad GIII. (**Gráfica 2**). El promedio de niveles de células NK para cada grado de obesidad fue el siguiente: en el Grado I 152 cel/ μ l, Grado II 161.4 cel/ μ l y Grado III 199.1 cel/ μ l (**Gráfica 3**).

Al comparar los niveles séricos de NK con la edad, género y talla, se encontró un coeficiente de Pearson (r)= 0.544, con p = 0.44 para la primera, (r)= 0.01, con p = 0.8 para la segunda y (r)= 0.184, con p = 0.008 para la tercera. Por lo tanto la edad, el género y la talla no influyeron en los niveles séricos de NK. (**Gráfica 4, 5, 6**). Al compararlo con el índice de masa corporal, se obtuvo un coeficiente de Pearson (r)= 0.21, p = 0.002, con la circunferencia abdominal (r)=0.0351, ambas con baja correlación, como se muestra en los diagramas de dispersión y que estadísticamente se consideró no significativo (**Gráfica 7,8**).

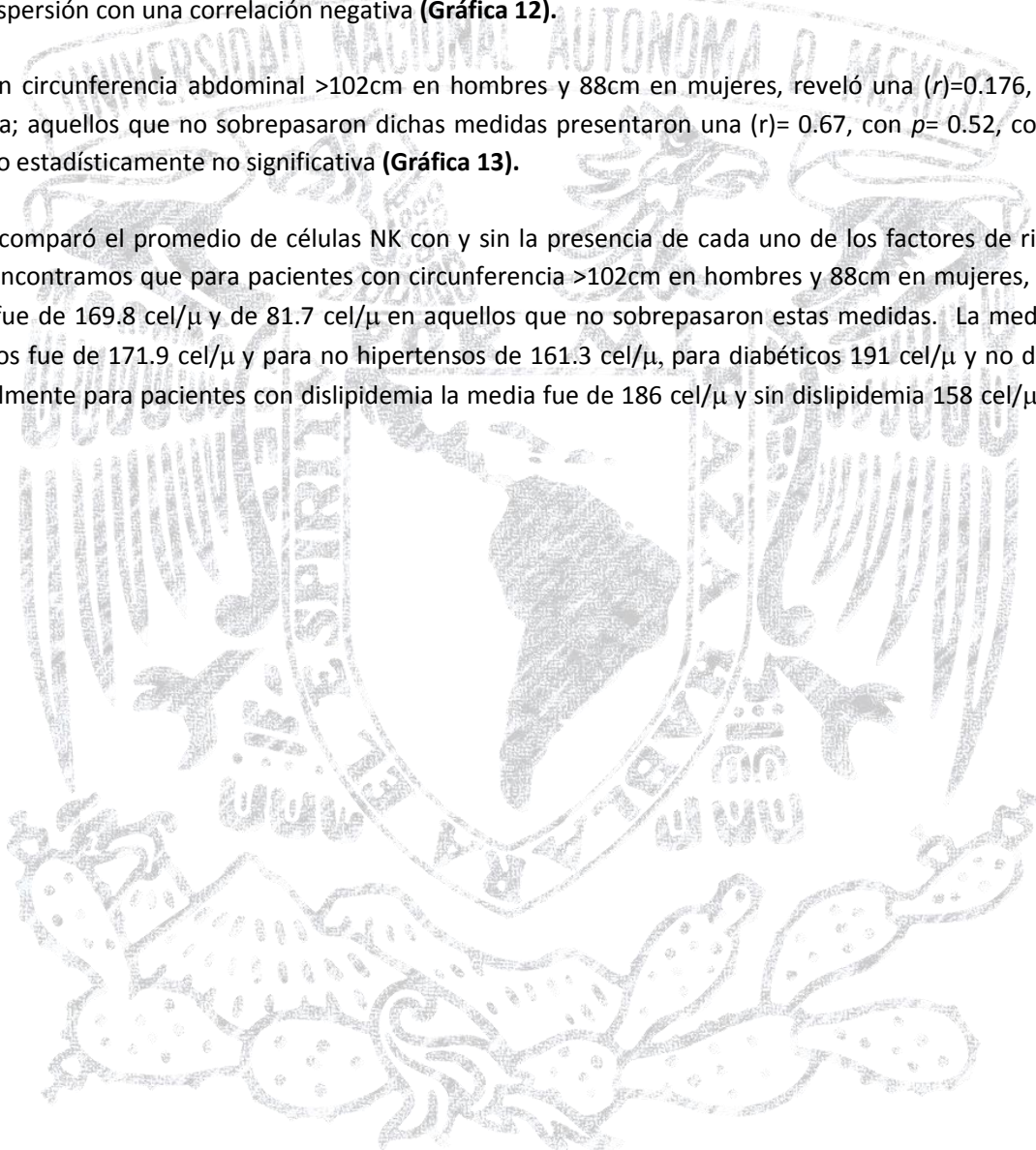
Se tomaron en cuenta 4 criterios de la OMS para el diagnóstico de Síndrome metabólico y que los consideramos como "factores de riesgo": circunferencia abdominal, hipertensión arterial sistémica, diabetes mellitus 2 y dislipidemia; 48 pacientes (94.1%) superaban la circunferencia de 102cm para los hombres y 88cm en el caso de las mujeres; 16 pacientes (31%) fueron hipertensos, 12 pacientes (23.5%) presentaron DM2, mismo porcentaje para la dislipidemia (**Gráfica 9**).

Se realizó un análisis de regresión con estos factores de riesgo y comparación con los niveles séricos de células NK. En el caso de la DM2, se encontró un coeficiente de correlación de Pearson (r)= 0.271, p =0.393, en aquellos no diabéticos (r)= 0.175 y p =0.285, ambos valores bajos, por lo tanto la presencia o ausencia de DM2 no se correlacionó con los niveles de NK (**Gráfica 10**).

La correlación con la hipertensión (r) 0.176, $p=0.514$, comparado con aquellos que no hipertensos (r)= 0.24 y $p=0.156$; ambos con correlación baja; la presencia o ausencia de hipertensión, tampoco influyó en los niveles de NK (**Gráfica 11**). En el caso de la dislipidemia se obtuvo una con (r)= 0.187, $p=0.56$; comparado con aquellos que no presentaban dislipidemia (r)= 0.313 y $p= 0.05$. La dislipidemia tampoco se correlación con los niveles de NK, sin embargo la ausencia de dislipidemia si se correlaciona con los niveles de NK estadísticamente significativa, como se muestra en el diagrama de dispersión con una correlación negativa (**Gráfica 12**).

En aquellos con circunferencia abdominal >102cm en hombres y 88cm en mujeres, reveló una (r)=0.176, $p= 0.23$, correlación baja; aquellos que no sobrepasaron dichas medidas presentaron una (r)= 0.67, con $p= 0.52$, correlación moderada, pero estadísticamente no significativa (**Gráfica 13**).

Finalmente se comparó el promedio de células NK con y sin la presencia de cada uno de los factores de riesgo por separado, así encontramos que para pacientes con circunferencia >102cm en hombres y 88cm en mujeres, la media de células NK fue de 169.8 cel/ μ y de 81.7 cel/ μ en aquellos que no sobrepasaron estas medidas. La media de NK para hipertensos fue de 171.9 cel/ μ y para no hipertensos de 161.3 cel/ μ , para diabéticos 191 cel/ μ y no diabéticos 156 cel/ μ . Finalmente para pacientes con dislipidemia la media fue de 186 cel/ μ y sin dislipidemia 158 cel/ μ (**Gráfica 14**).



11. DISCUSIÓN.

El tejido adiposo es biológicamente activo y desde el punto de vista inmunológico se caracteriza por una inflamación persistente. Realizamos un estudio transversal, observacional y descriptivo con 51 pacientes del CMN 20 de Noviembre, que cumplieron los criterios de inclusión, y se les cuantificó células naturales asesinas en sangre periférica. El objetivo principal era demostrar que dichos niveles son modificados inversamente proporcionales al grado de obesidad.

El promedio de valores en los diferentes grados de obesidad, se encontraron sobre el límite inferior, es decir entre 164 células/ μ l; tomamos en cuenta valores de 37-901 células/ μ l como parámetro de normalidad, establecido por el proveedor ⁽²⁸⁾. Debemos considerar que las células NK se han encontrado en abundancia en el tejido adiposo, y pueden representar hasta el 30 % de las células presentes en la fracción del estroma de tejido adiposo en ratones, que pudiera ser una explicación de su localización periférica, con niveles discretamente bajos a nivel sanguíneo.

Al comparar los resultados con un estudio italiano multicéntrico ⁽³⁵⁾, el promedio de células NK fue de 278 células/ μ l; (rango 73-654), ellos tampoco encontraron influencia del peso, edad y hábitos como tabaquismo o actividad física. En latinoamérica existe un estudio colombiano ⁽³⁶⁾ que intenta caracterizar los valores de referencia de células NK, lo rescatable fue que encontraron niveles diferentes para hombres y mujeres (526.1 células/ μ l vs 298.8 células/ μ l, respectivamente) con una diferencia estadística de $p= 0.0004$. En México no existe caracterización de los niveles de NK absolutos, se intentó realizar en 1999 con un grupo pequeño de jóvenes sanos, reportando solo porcentajes ⁽³⁷⁾.

Un hallazgo interesante en este estudio, es que los pacientes con obesidad Grado III, presentaron los niveles más altos de NK, que no era lo esperado. Esto nos haría concluir que la hipótesis de investigación se descarta en sentido estricto, pero debemos tomar en cuenta las limitaciones del estudio que pueden afectar de manera significativa el resultado:

- a) La n de la muestra es pequeña, lo que causa una distribución anormal de los datos y un bajo poder en los resultados, pero estadísticamente aceptable; esto se debió a falta de reactivo para completar la muestra calculada.
Puede mejorar si se continúa el presente estudio y se amplía el número de participantes, lo ideal sería un estudio previo que caracterizara los niveles normales en población sana mexicana; ya que como vimos anteriormente los rangos entre población latinoamericana y europea parecen diferir.
- b) No se establecieron tiempos de evolución de las enfermedades crónicas, porque el objetivo del estudio era únicamente cuantificar los niveles de NK, esto pudo haber influido en los resultados.
- c) El tener un rango normal de células NK no excluye la posibilidad que la función de estas se encuentre alterada.

A pesar de todo lo anterior y de no haber comprobado la hipótesis del estudio, consideramos que su utilidad reside en sentar las bases para futuros trabajos que puedan contar con un número mayor de pacientes, definir los rangos normales en nuestra población y confirmar si estos niveles fueron o no influidos por obesidad.

12. CONCLUSIONES.

Mirando superficialmente el tema de la obesidad y los factores que llevan a sufrir esta enfermedad parecen ser medianamente simples o que tal vez, sólo se trate de una “moda” que comenzó por una cuestión estética, lamentablemente a través del tiempo llegó a convertirse en un problema de salud mundial. La obesidad se caracteriza por la producción de citocinas, la mayoría proinflamatorias, es decir es un estado inflamatorio de bajo grado, pero persistente. Es causante de otras comorbilidades, como diabetes, dislipidemia e incluso cáncer. Obviamente, México no es ajeno al problema y como lo muestran los resultados somos el país con mayor índice de obesidad –incluyendo a niños- en todo el mundo.

Por ello es necesaria investigación adicional para establecer de manera precisa los mecanismos moleculares específicos involucrados en el proceso de infiltración en el tejido adiposo y una vez que sean identificados, ofrecer un tratamiento dirigido; sin olvidar que la intervención más práctica y económica sigue siendo la disminución progresiva de peso.

Debido a que el estudio del adipocito se ha ligado principalmente al metabolismo de lípidos y carbohidratos, actualmente se conoce muy poco acerca de la participación del tejido adiposo sobre la inmunidad innata, por lo que este estudio puede marcar el inicio de la investigación sobre este tema. A nivel institucional sería útil contar con una citometría que determinara los receptores de las células NK y considerar la funcionalidad de estas células.

13. ANEXOS

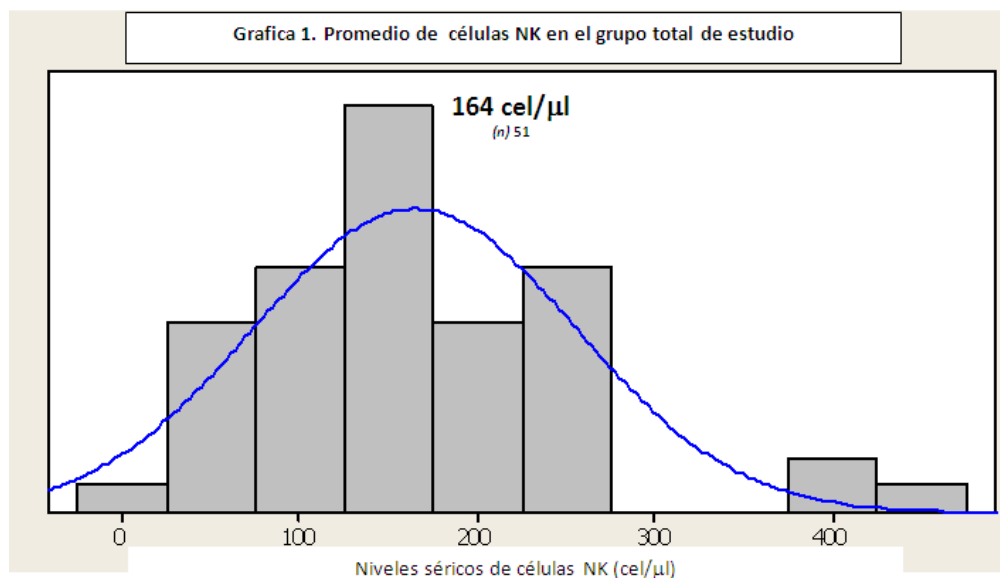
Anexo 1. Tablas y gráficas.

Tabla 1. Descripción general de los pacientes.

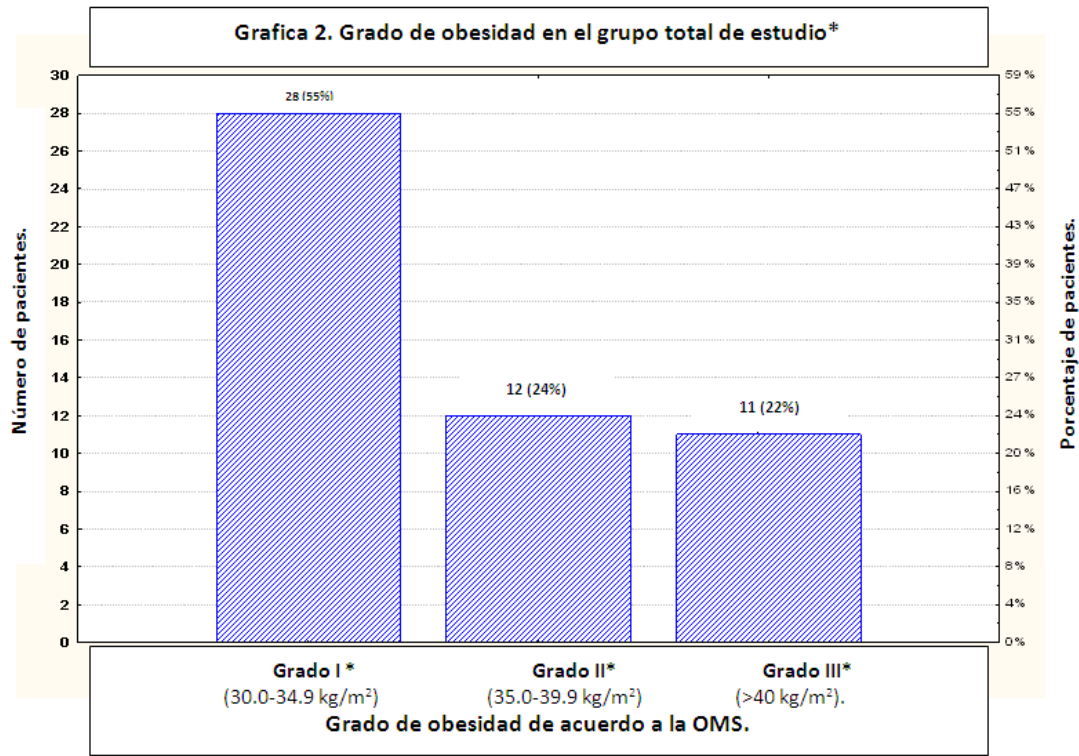
Tabla 1. Descripción general de los pacientes.

Variable	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Edad (años)	46.5	13.2	19.0	74.0
Mujeres	45.8	12.5	19.0	70.0
Hombres	47.9	15.1	27.0	74.0
Peso (kg)	90.1	16.2	62.0	133.0
Mujeres	88.3	17.1	62.0	133.0
Hombres	94.7	12.8	83.0	123.0
Talla (cm)	159.4	9.7	141.0	176.0
Mujeres	155.0	7.3	141.0	170.0
Hombres	170.7	4.4	164.0	176.0
Índice de masa corporal(kg/m ²)	35.8	6.7	30.0	57.5
Mujeres	37.0	7.1	30.0	37.5
Grado I	31.5 (45.9%)	1.5	30.0	34.1
Grado II	37.2 (27%)	1.8	35.2	39.9
Grado III	46.3 (27%)	6.4	40.6	57.5
Hombres	32.3	3.4	30.0	40.6
Grado I	30.7 (78.5%)	1.3	30.0	33.8
Grado II	36.8 (14.2%)	0.9	36.1	37.5
Grado III	40.6 (7.1%)	--	--	--
Circunferencia abdominal (cm)	112.7	11.7	93.0	140.0
Mujeres	114.6	12.4	93.0	140.0
Hombres	107.5	7.4	98.0	123.0

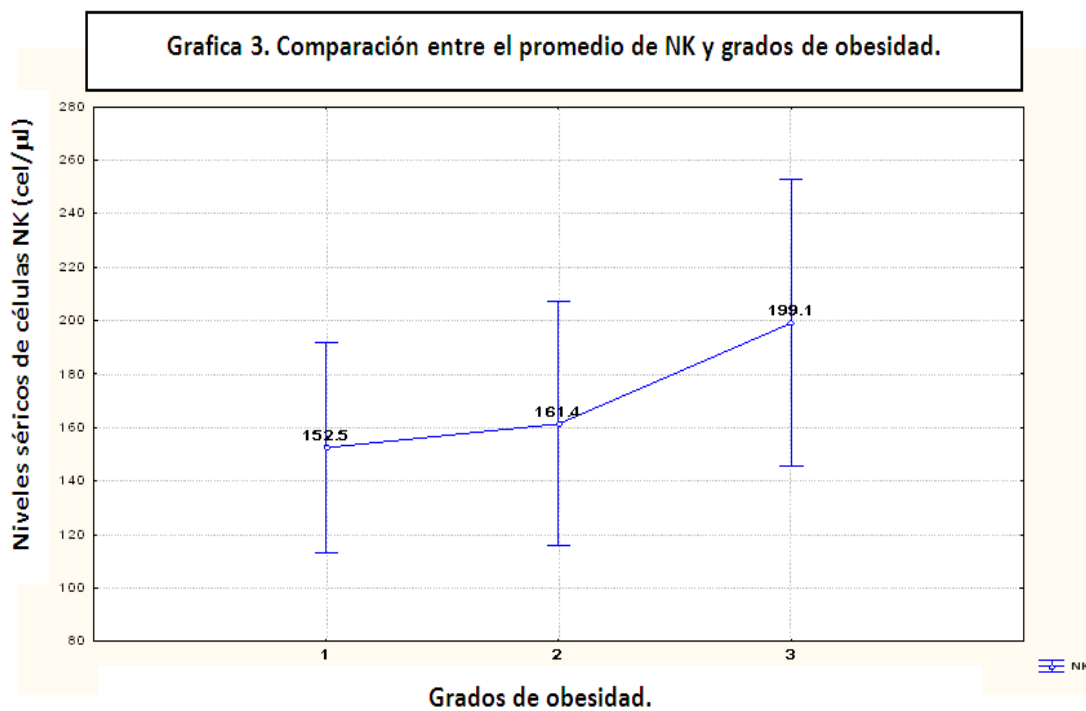
Gráfica 1. Promedio de células NK en el grupo total de estudio.



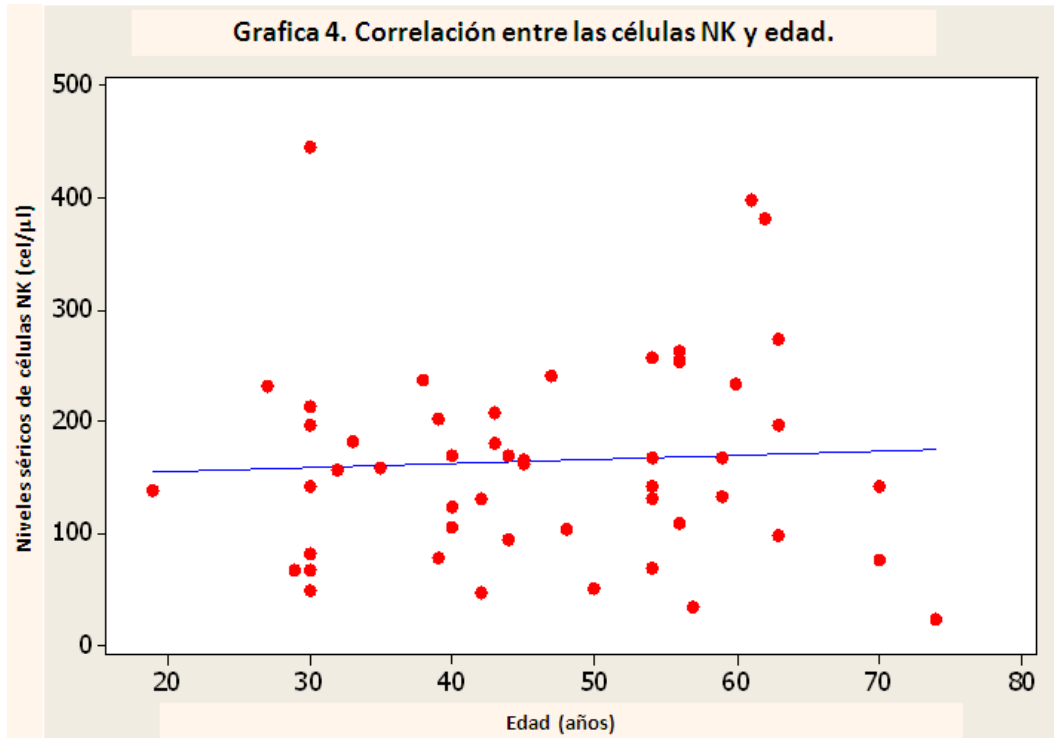
Gráfica 2. Porcentaje y número total de pacientes, de acuerdo al grado de obesidad de la OMS.



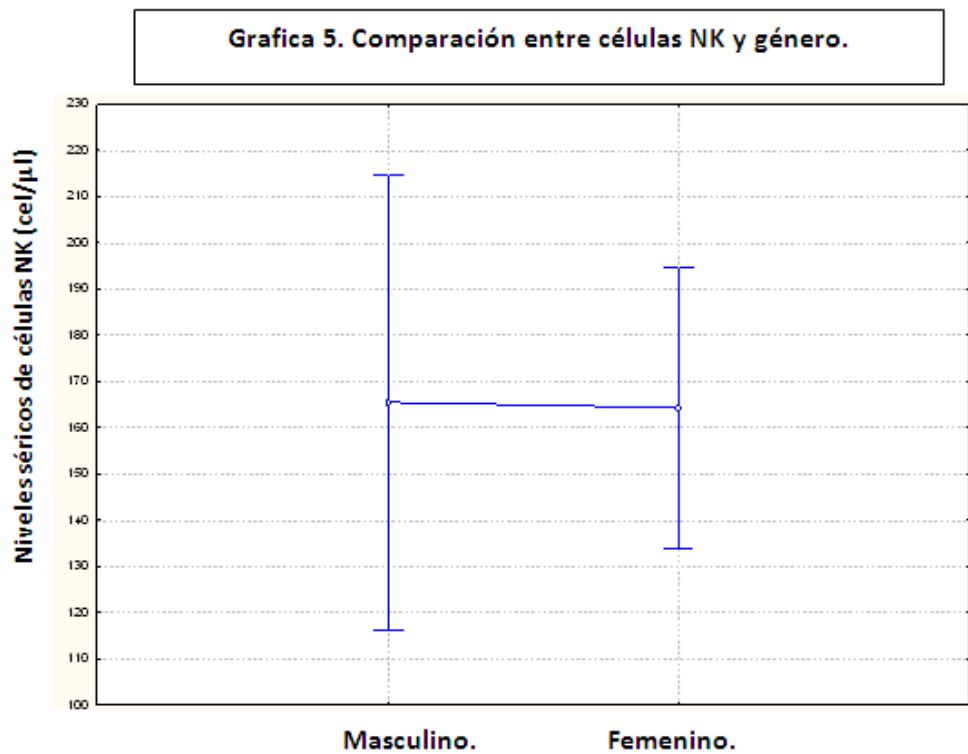
Gráfica 3. Promedio de células NK en los diferentes grados de obesidad.



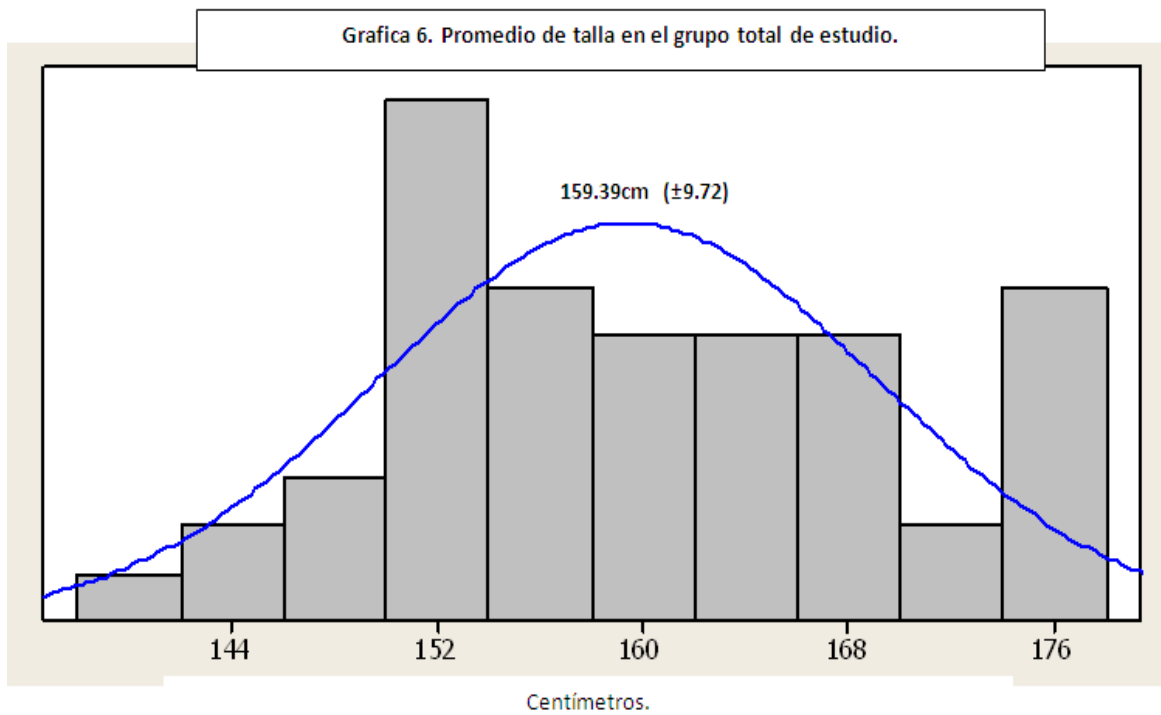
Gráfica 4. Diagrama de dispersión que compara los niveles de células NK y edad.



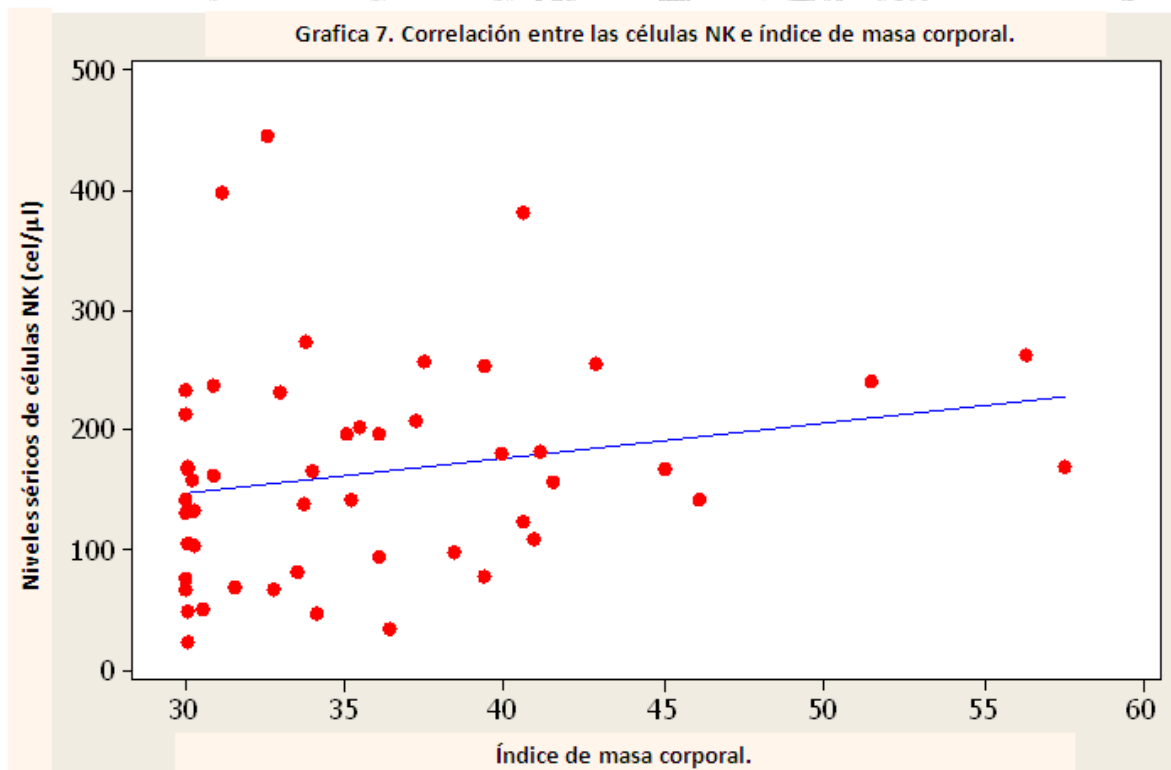
Gráfica 5. Comparación de los niveles de células NK y género.



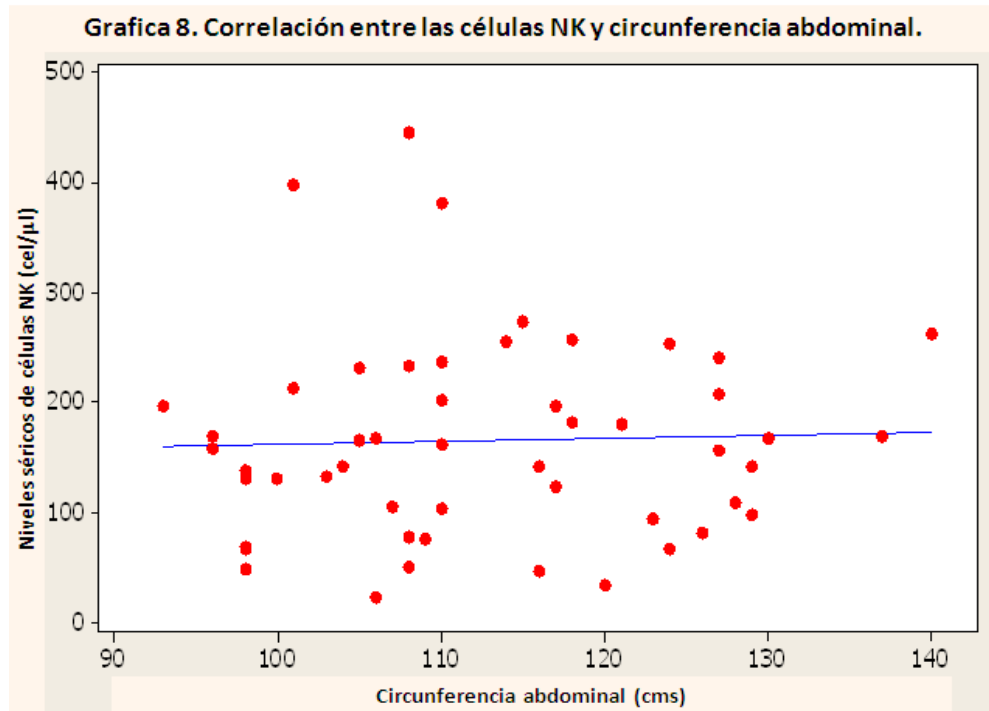
Gráfica 6. Promedio de talla en la población total de estudio.



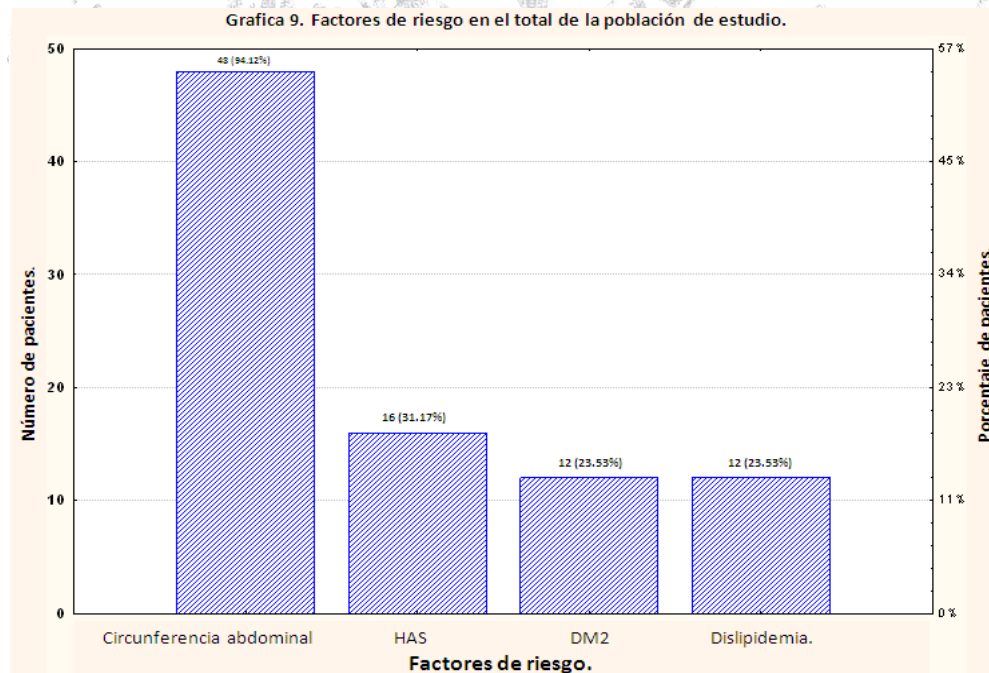
Gráfica 7. Diagrama de dispersión que compara los niveles de células NK e índice de masa corporal.



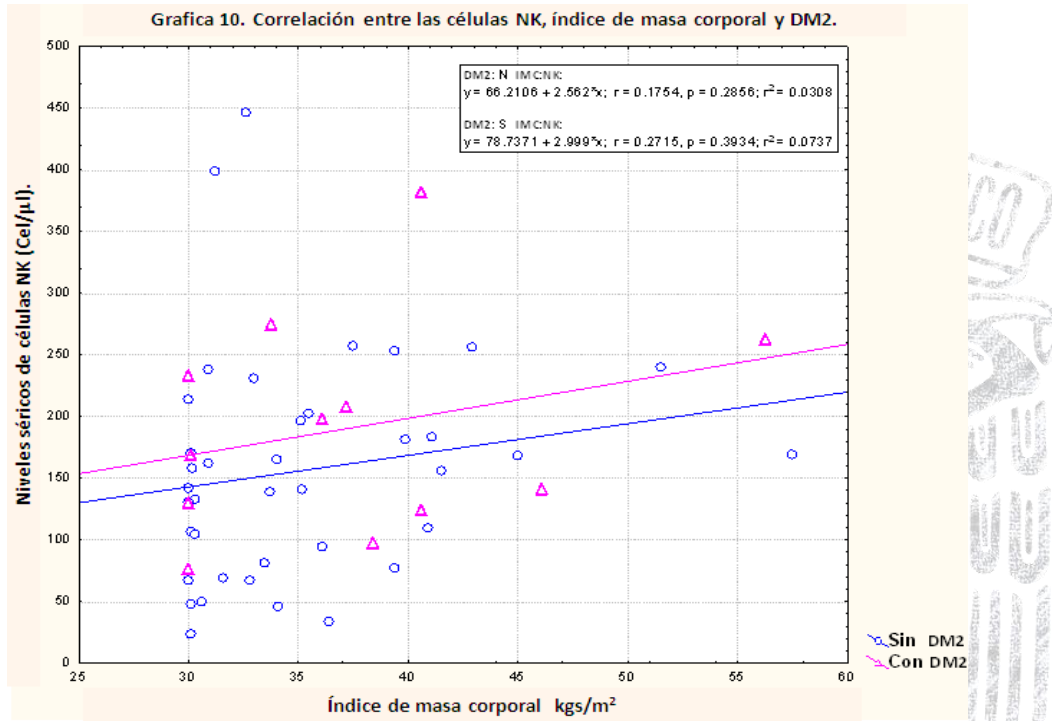
Gráfica 8. Diagrama de dispersión que compara los niveles de células NK y circunferencia abdominal.



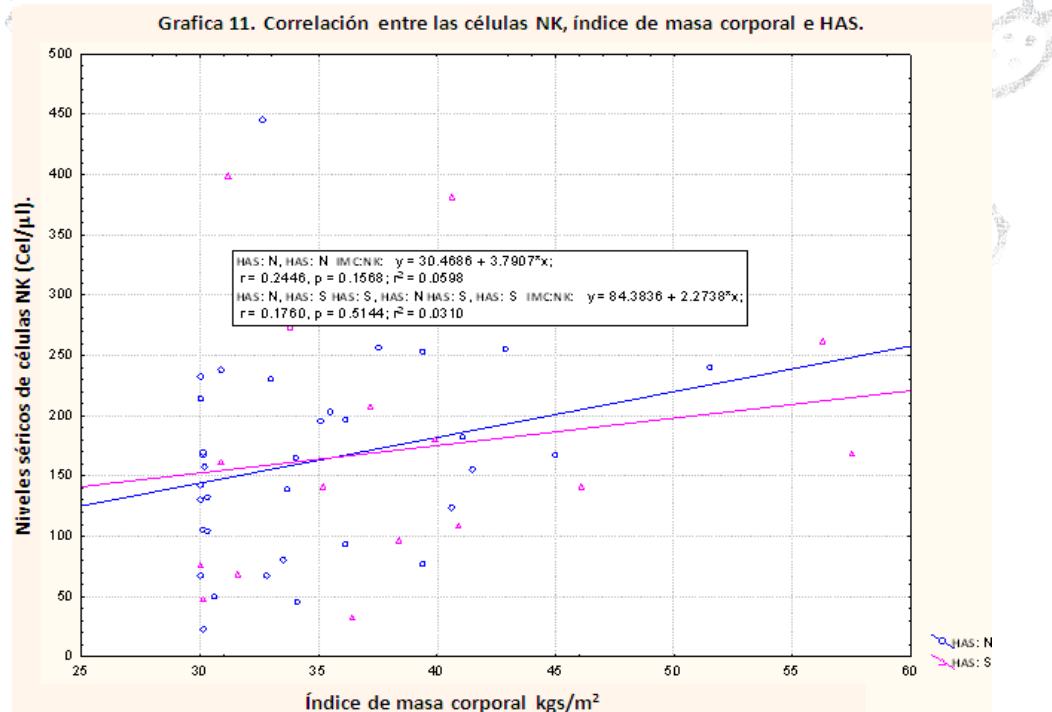
Gráfica 9. Número de pacientes y porcentaje, de los 4 factores de riesgo incluidos en el estudio.



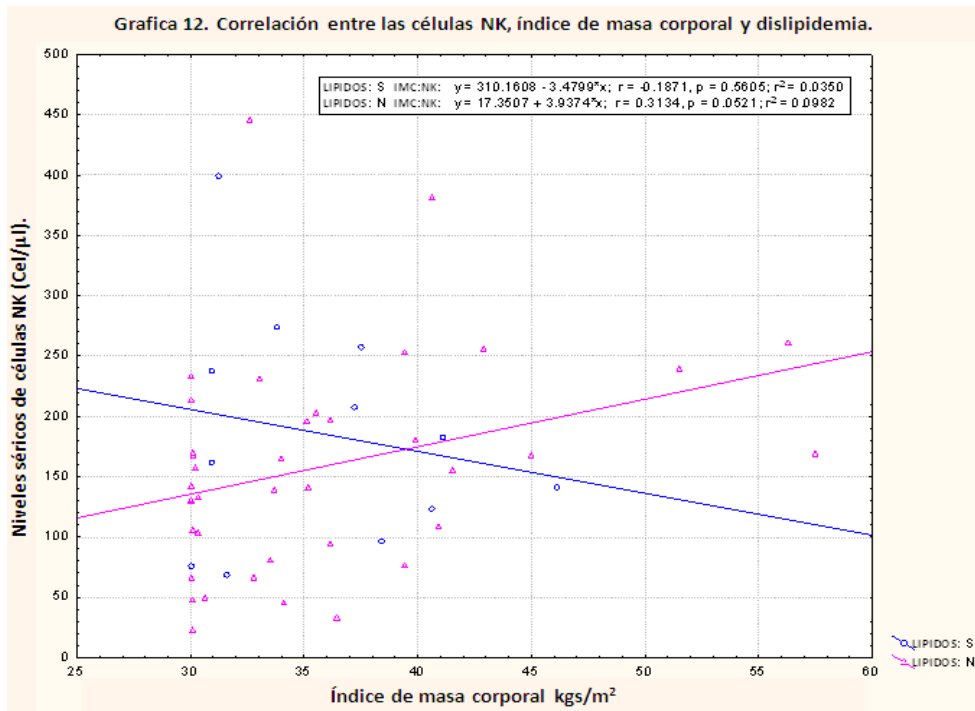
Gráfica 10. Diagrama de dispersión que compara los niveles de células NK, índice de masa corporal y DM2.



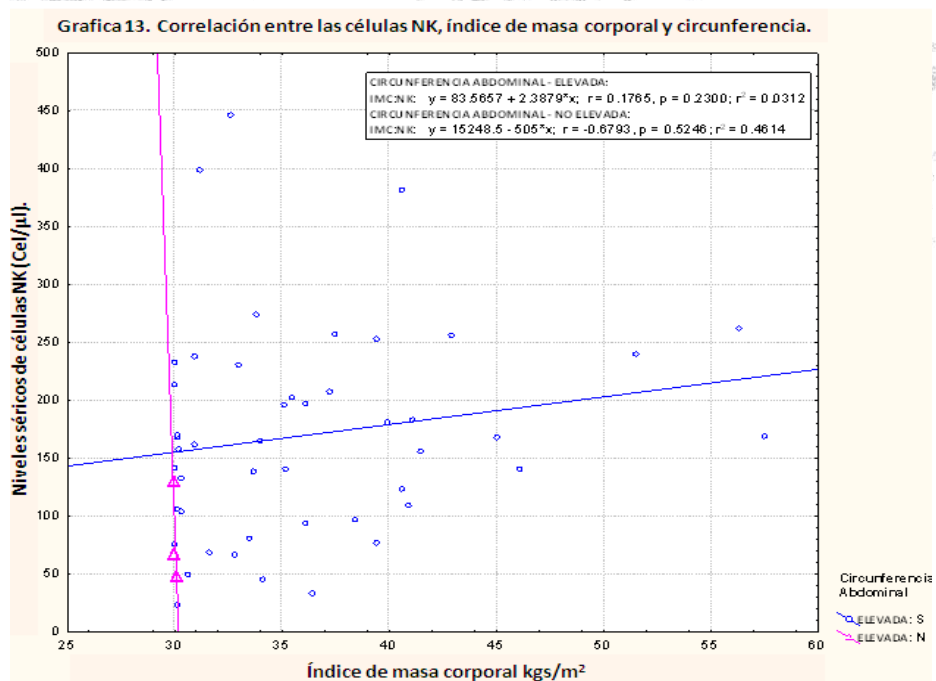
Gráfica 11. Diagrama de dispersión que compara los niveles de células NK, índice de masa corporal e HAS.



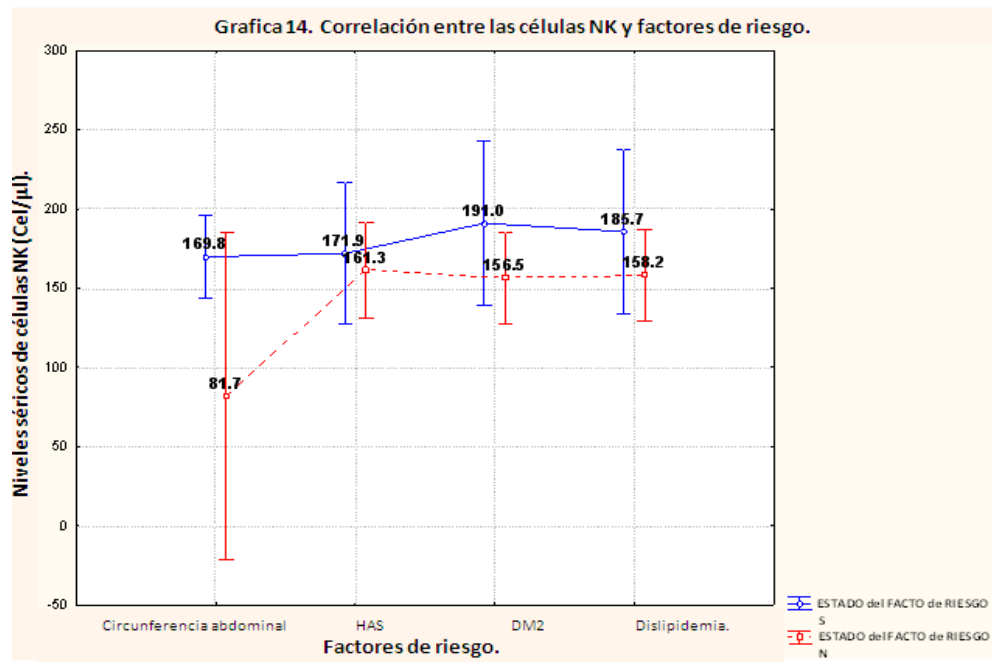
Gráfica 12. Diagrama de dispersión que compara los niveles de células NK, índice de masa corporal y dislipidemia.



Gráfica 13. Diagrama de dispersión que compara los niveles de células NK, índice de masa corporal y circunferencia abdominal.



Gráfica 14. Comparación entre los niveles de NK y los factores de riesgo (Circunferencia abdominal >102cm en hombres, 88cm en mujeres; HAS, DM2 y dislipidemia).



Anexo 2.

Hoja de recolección de datos.



Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado

Centro Médico Nacional 20 de Noviembre.

Inmunología Clínica y Alergia.

Hoja de recolección de datos.

Protocolo "Niveles séricos de células asesinas naturales en pacientes con obesidad".

Nombre:

Edad: Peso: Talla: IMC: kg/m²

Células naturales asesinas.

Factores de riesgo.

CD3⁺CD56⁺16⁺ cel/μL Circunferencia abdominal cm

Diabético (a)

Hipertenso (a)

Elaboró :

Dislipidemia

Anexo 3.

Consentimiento informado.

México D.F a _____ de _____ del 2014.

Por medio de la presente, Yo _____ de manera libre y voluntaria, **DOY MI CONSENTIMIENTO**, para ingresar al estudio titulado: **“Niveles séricos de células asesinas naturales en pacientes con obesidad”**, sin que ello afecte mi atención médica que recibí en el Instituto.

Se me ha informado que el estudio ha sido aceptado y aprobado por el Comité Local de Ética e Investigación Clínica del Hospital CMN 20 de Noviembre, ISSSTE, donde se realizará el estudio. Se me ha explicado, la importancia de dicho estudio para la atención de pacientes con obesidad, así como los conocimientos generados de este tipo de estudios, y los riesgos implícitos del procedimiento.

Para la realización de esta investigación, por venopunción se me tomarán 10ml de mi sangre, se me ha explicado que este es un procedimiento donde se introducirá una aguja en alguna vena visible de mi brazo, los riesgos asociados son hematoma (acumulación local de sangre), infección en el sitio de punción y/o dolor, aunque la probabilidad es baja en caso de presentarse alguno de estos efectos secundarios, los investigadores se comprometen a prestarme atención y tratamiento inmediato; se me ha informado también que dicha muestra se procesará en el laboratorio de histocompatibilidad de este Centro Médico Nacional.

Así mismo, acepto que al firmar la presente carta otorgo mi consentimiento para participar en dicho estudio; mismo que puedo retirar en cualquier momento sin ningún perjuicio para mí o mi tratamiento.

El investigador se ha comprometido a darme la información oportuna de los resultados obtenidos y de las dudas que de ellos surjan, así como sobre cualquier manejo alternativo que pudiera ser ventajoso para mi tratamiento; además se me ha dado la seguridad de que la realización de este estudio no pondrá en riesgo mi integridad física o mental y que mis datos personales son confidenciales, no obstante resultados agrupados que se deriven del mismo, podrán ser presentados en publicaciones o foros científicos y médicos.

Nombre y firma del participante _____

Nombre y firma del investigador: _____

Nombre y firma de testigo 1 (parentesco) _____

Domicilio del testigo 1 _____

Nombre y firma de testigo 2 (parentesco) _____

Domicilio del testigo 2 _____

Lugar y fecha: _____

En caso de dudas o requerir información adicional en relación con el proyecto de investigación, se podrá contactar con la investigadora responsable, Dra. María Eugenia Vargas Camaño, Jefa del servicio de Inmunología Clínica y Alergia, a quien puedo localizar en el noveno piso del edificio de Consulta Externa, de este Centro Médico o al teléfono 52 00 30 35 ext. 14 523.

En caso de cualquier duda o inquietud sobre los aspectos éticos relacionados con esta investigación se puede contactar con el Presidente del Comité de Ética de este Centro Médico Nacional, Dr. Abel Archundúa García, en el teléfono 52 00 30 35 ext. 14 629, o bien a la Coordinación de Investigación del CMN 20 de Noviembre, con la Dra. Silvia García, o al teléfono 52 00 50 03, Ext 14609.

Anexo 4.
Cronograma.



Actividad.	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Agos
Elaboración del marco teórico y protocolo	█	█	█	█	█	█	█	█
Evaluación de Comités de Investigación y Ética.	█	█	█	█	█	█	█	█
Búsqueda de pacientes.	█	█	█	█	█	█	█	█
Recolección de datos	█	█	█	█	█	█	█	█
Procesamiento de datos.	█	█	█	█	█	█	█	█
Análisis de resultados.	█	█	█	█	█	█	█	█
Redacción del escrito final.	█	█	█	█	█	█	█	█
Titulación oportuna.	█	█	█	█	█	█	█	█



14. REFERENCIAS.

1. World Health Organization. Obesity and overweight- Fact sheet No.311. Geneva WHO, 2009.
2. Franco S. Obesity Update 2012. Organization for the Economic Cooperation and Development (OECD publishing); 2012.
3. Barrera-Cruz A., Rodríguez-González A., Molina-Ayala M. Escenario actual de la obesidad en México. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2013; 51(3):292-99.
4. Gutiérrez JP, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Villalpando-Hernández S, Franco A, Cuevas-Nasu L, et al. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública; 2012.
5. Rocha VZ, Folco EJ, Sukhova G, Shimizu K et al. Interferon-gamma, a Th1 cytokine, regulates fat inflammation: a role for adaptive immunity in obesity. *Circ Res.* 2008; 103: 467– 476.
6. González-Chávez A, Elizondo-Argueta S, Gutiérrez-Reyes G, León-Pedroza JI. Pathophysiological implications between chronic inflammation and the development of diabetes and obesity. *Cir Cir* 2011; 79(2):209–16.
7. O'Connor GM, Hart OM, Gardiner CM. Putting the natural killer cell in its place. *Immunology* 2006; 117:1-10.
8. Kirwan SE, Burshtyn DN. Regulation of natural killer cell activity. *Curr Opin Immunol* 2007; 19:46–54.
9. Cooper M, Colonna M, Yokoyama W. Hidden talents of natural killers NK cells in innate and adaptive immunity. *EMBO reports* 2009. 10, 1103–1110.
10. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TB. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol.* 1999 17: 189–220.
11. Roda JM, Parihar R, Magro C, Nuovo GJ, Tridandapani S, et al. Natural killer cells produce T cell-recruiting chemokines in response to antibody-coated tumour cells. *Cancer* 2006 Res 66: 517–526.
12. Caspar-Bauguil S, Cousin B, Galinier A, Segafredo C, Nibbelink M, Andre M, Casteilla L, Penicaud L. Adipose tissues as an ancestral immune organ: site-specific change in obesity. *FEBS Lett* 2005 579: 3487–3492,
13. Lynch L, O'Connell J, Kwasnik A, Cawood T, O'Farrelly C, et al. Are Natural Killer Cells Protecting the Metabolically Healthy Obese Patient? *Obesity* 2009 17: 601–605
14. Lamas O, Martínez JA, Martí A Energy restriction restores the impaired immune response in overweight rats. *Nutr Biochem* 2004 15: 418–425.
15. Martins M, Marguti I, Schatzmann JP. Bariatric Surgery Reverses Natural Killer (NK) Cell Activity and NK-Related Cytokine Synthesis Impairment Induced. *Obesity Surgery* 2011, Volume 21, Issue 1, pp 112-118.
16. Dovio A, Caramello V, Masera RG, Sartori ML, Saba L, et al. Natural killer cell activity and sensitivity to positive and negative modulation in uncomplicated obese subjects: relationship to leptin and diet composition. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004 28: 894–901
17. Kim KY, Kim JK, Han SH, Lim JS, Kim KI, et al. Adiponectin is a negative regulator of NK cell cytotoxicity. *J Immunol* 2006 176: 5958–5964.
18. Nave H, Mueller G, Siegmund B, Jacobs R, Stroh T, Schueler U, Hopfe M, Behrendt P, Buchenauer T, Pabst R, Brabant G. Resistance of Janus kinase-2 dependent leptin signaling in natural killer (NK) cells: a novel mechanism of NK cell dysfunction in diet-induced obesity. *Endocrinology* 2008 149: 3370–3378,
19. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT IFN gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 2001 410: 1107–1111.
20. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* 2008 371: 569–578.

21. Elinav E, Abd-Elnabi A, Pappo O, Bernstein I, Klein A, Engelhardt D, Rabbani E, Ilan Y. Suppression of hepatocellular carcinoma growth in mice via leptin, is associated with inhibition of tumor cell growth and natural killer cell activation. *J Hepatol* 2006 44: 529–536,
22. O’Shea D, Cawood TJ, O’Farrelly C, Lynch L Natural Killer Cells in Obesity: Impaired Function and Increased Susceptibility to the Effects of Cigarette Smoke. *PLoS ONE* 2010 5(1): 86-60.
23. O’Rourke RW, Metcalf MD, White AE, Madala A, Winters BR, Maizlin II, Jobe BA, Roberts CT Jr, Slifka MK, Marks DL. Depot specific differences in inflammatory mediators and a role for NK cells and IFN-gamma in inflammation in human adipose tissue. *Int J Obes (Lond)* 2009. 33: 978–990.
24. Guo H, Xu B, Gao L, Sun X. High frequency of activated natural killer and natural killer T-cells in patients with new onset of type 2 diabetes mellitus. *Experimental Biology and Medicine* 2012; 237: 556–562.
25. Wu L, Parekh VV, Gabriel CL, Bracy DP, Marks-Shulman PA, Tamboli RA, Kim S, Mendez-Fernandez YV, Besra GS, Lomenick JP, Williams B, Wasserman DH, Van Kaer L. Activation of invariant natural killer T cells by lipid excess promotes tissue inflammation, insulin resistance, and hepatic steatosis in obese mice. *Proc Natl Acad Sci.* 2012 8; 109(19):E1143-52.
26. Syn WK, Jung Y, Choi SS, Guy C, Adams DH. Accumulation of natural killer T cells in progressive nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2010 Jun; 51(6):1998-2007.
27. Schmidt, R. Monoclonal antibodies for diagnosis of immunodeficiencies. *Blut.* 1989; 113:598-605.
28. Nicholson JKA; Use of flow cytometry in the evaluation and diagnosis of primary and secondary immunodeficiency diseases. *Arch Patho Lab med*, 1989; 113:598-605.
29. Nuremberg A, Feinstein A. How to evaluate a diagnostic marker test. *Jama.* 1988; 259:1699-1702.
30. Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la salud. Secretaria de Salud. 1987:5-35.
31. Códigos Internacionales de Ética. *Bol of Saint Panam.* 1990; 108(5-6):619-637.
32. Códigos Internacionales de Ética. 52 Asamblea General, Edimburgo Escocia, Octubre 2000 y Nota de Clarificación sobre el parágrafo 29 añadida por la Asamblea General, Washington 2002.
33. Recommendations Guiding Physicians in Biomedical Research Involving Human Subjects. World. Medical Association Declaration of Helsinki. *Respiratory Care.* 1999; 42(6):635-697.
34. Galena HJ. Complicacions occurring from diagnostic venipuncture. *J Fam Pract* 1992; 34: 582-4.
35. Sangostino A., Garbaccio G., Pistorio A., Bolis V., An Italian national multicenter study for the definition of a reference ranges for normal values of peripheral blood lymphocyte subsets in healthy adults. *Haematologica* 1999; 84:499-504
36. Rojas P, Bolaños N, Mercado M; Valores de referencia de células asesinas naturales (NK y NKT) en donantes de sangre de Bogotá. *Acta médica colombiana* Vol 32 Num 3, 2007.
37. Ortiz R., González C., Betancourt M., subpoblaciones de linfocitos en sangre periférica de jóvenes mexicanos sanos: estudio por medio de citometría de flujo. *Bioquímica* Vol 24. No.1 94.1999.