



---

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ACTIVACIÓN CRÓNICA DEL SISTEMA INMUNE EN  
LINFOCITOS T DE PACIENTES OBESOS Y CON  
OBESIDAD MÓRBIDA ANTES Y DESPUÉS DE LA  
CIRUGÍA BARIÁTRICA”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

**ANA LAURA SOSA RODRÍGUEZ**



**MÉXICO, CDMX**

**2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## **JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE: SONIA MAYRA PÉREZ TAPIA**  
**VOCAL: LUZ MARÍA DEL ROCÍO VALDÉS GÓMEZ**  
**SECRETARIO: HÉCTOR ENRIQUE ESPINOSA ARCINIEGA**  
**1ER SUPLENTE: MARIO ADÁN MORENO EUTIMIO**  
**2DO SUPLENTE: TANYA PLETT TORRES**

**SITIO EN DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO  
VILLEGAS INER**

**ASESOR DEL TEMA:**

---

**DR. EN C. HÉCTOR ENRIQUE ESPINOSA ARCINIEGA**

**SUSTENTANTE:**

---

**ANA LAURA SOSA RODRÍGUEZ**

# ÍNDICE

Resumen .....	12
1. Marco teórico .....	14
1.1. Obesidad en México y el mundo .....	14
1.1.1. Epidemiología.....	14
1.1.2. Etiología .....	14
1.1.3. Obesidad: problema de salud pública .....	15
1.1.4. Tipos de obesidad .....	15
1.2. Fisiopatología de la obesidad .....	18
1.2.1. Funciones el tejido adiposo .....	18
1.2.2. Disfunción del tejido adiposo en la obesidad.....	19
1.3. Inmunidad innata en la obesidad .....	20
1.3.1. Infiltración de macrófagos y monocitos en tejido adiposo .....	20
1.3.2. Otras células de la inmunidad innata.....	21
1.4. Linfocitos T en la obesidad .....	23
1.4.1. Activación crónica de linfocitos T.....	23
1.5. Translocación microbiana y Endotoxemia en la Obesidad.....	25
1.6. Obesidad mórbida y cirugía bariátrica.....	26
1.7. Preguntas de investigación .....	28
2. Justificación .....	29

3. Objetivos.....	30
3.1. Objetivo general .....	30
3.2. Objetivos particulares.....	30
4. Hipótesis.....	31
5. Metodología.....	32
5.1. Cohortes estudiadas .....	32
5.1.1. Cohorte de obesos del hospital general de México .....	32
5.1.2. Cohorte de obesos mórbidos del instituto nacional de ciencias médicas y nutrición Salvador Zubirán.....	33
5.1.3. Determinación del grado de obesidad de los sujetos de estudio.....	33
5.2. Obtención de muestras .....	34
5.2.1. Condiciones preanalíticas.....	34
5.2.2. Recolección de sangre venosa.....	34
5.3. Preparación de medios y amortiguadores.....	35
5.3.1. Buffer de lisis de eritrocitos.....	35
5.3.2. Medio completo para cultivo celular .....	35
5.3.3. PBS con 1% de albúmina .....	35
5.3.4. Medio de congelación.....	35
5.4. Extracción de células mononucleares de sangre periférica. ....	37
5.5. Cuenta de PBMC en cámara de Neubauer.....	38
5.6. Preservación de PBMC .....	39

5.6.1. Criopreservación .....	39
5.6.2. Descongelación .....	39
5.7. Titulación de anticuerpos .....	40
5.8. Sensibilización de placa .....	41
5.9. Estimulación de linfocitos T .....	42
5.10. Tinción extracelular .....	44
5.11. Permeabilización de PBMC .....	45
5.12. Tinción intracelular .....	46
5.13. Controles para citometría de flujo .....	47
5.13.1. Controles de compensación .....	47
5.13.2. Controles de compensación FMO .....	47
5.13.4. Citómetro de flujo .....	48
5.14. Determinación de LPS en plasma .....	49
5.15. Análisis .....	50
5.15.1. Análisis de metadatos FCS .....	50
5.15.2. Análisis estadístico de datos .....	53
6. Resultados .....	55
6.1. Activación de linfocitos T y sus subpoblaciones en adultos .....	55
6.2. Concentración de LPS en el plasma de adultos .....	62
6.3. Disfuncionalidad de linfocitos T activados .....	64

6.4. Activación de linfocitos T y sus subpoblaciones en niños .....	67
6.5. Concentración de LPS en plasma de niños .....	72
7. Discusión de resultados.....	74
8. Conclusión.....	78
Glosario .....	79
Referencias .....	82
Anexos.....	97

# ÍDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de la obesidad según la distribución de la grasa corporal. ....	16
Figura 2. Células de la inmunidad innata en el tejido adiposo .....	22
Figura 3. Derivación gastroyeyunal .....	27
Figura 4. Muestras de células mononucleares de sangre periférica de obesos y eutróficos del Hospital General de México .....	32
Figura 5. Muestras de células mononucleares de sangre periférica de pacientes con obesidad mórbida antes y después de la cirugía bariátrica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. ....	33
Figura 6. Estructura molecular del Ficoll PM400. ....	37
Figura 7. Cuenta de PBMC en la cámara de Neubauer .....	38
Figura 8. Sensibilización de placa de 24 pozos con anti-CD3 humano agonista.....	41
Figura 9. Estímulo de células T con anti-CD3 unido a placa y anti-CD28 soluble .....	43
Figura 10. Estrategia de delimitación de poblaciones y subpoblaciones .....	50
Figura 11. Fenotipo de linfocitos T activados .....	51
Figura 12. Estrategia de delimitación de células T disfuncionales.....	52
Figura 13. Activación de linfocitos T CD4+ de adultos .....	57
Figura 14. Activación de linfocitos T CD8+ de adultos .....	59
Figura 15. Activación del total linfocitos T CD4+ antes y después de la cirugía bariátrica .....	61
Figura 16. Correlación entre el índice de masa corporal y la activación de Linfocitos de adultos TEM CD8+ .....	61



Figura 17. Concentración de LPS en sangre de adultos .....	62
Figura 18. Concentraciones de LPS antes y después de la cirugía bariátrica.....	63
Figura 19. Disfuncionalidad de linfocitos T CD4+ .....	64
Figura 20. Disfuncionalidad de linfocitos T de memoria (TM) CD4+.....	66
Figura 21. Activación de Linfocitos T CD4+ de niños .....	67
Figura 22. Correlación entre la activación de Linfocitos T CD4+ y el IMC de niños. ....	69
Figura 23. Activación de linfocitos T en niños y en adultos. ....	70
Figura 24. Concentración de LPS en el plasma de niños eutróficos y obesos.....	72
Figura 25. Correlación entre el IMC y las concentraciones de LPS en plasma de niños.	73

# ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de la obesidad de acuerdo con el IMC según la OMS.....	16
Tabla 2. Panel anticuerpos para para medir activación y funcionalidad por citometría de flujo.....	40
Tabla 3. Volúmenes de anticuerpos para la tinción extracelular de PBMC .....	44
Tabla 4. Volúmenes de anticuerpos para la tinción intracelular de PBMC .....	46
Tabla 5. Configuración del equipo FACS ARIA IIA.....	48
Tabla 6. Diferencia en cuanto a activación de células T y sus subpoblaciones entre los grupos de obesos y obesos mórbidos antes y después de la cirugía bariátrica con respecto a sujetos eutróficos adultos .....	60
Tabla 7 Diferencia en cuanto a la activación de células T y sus subpoblaciones del grupo de niños obesos con respecto al grupo de niños eutróficos .....	68

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento informado del Hospital General de México .....	97
Anexo 2. Criterios de inclusión y exclusión para los donadores del Hospital General de México .....	104
Anexo 3. Consentimiento informado del Hospital de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” .....	105
Anexo 4. Estrategia de gating para la cohorte de obesos y eutróficos .....	112
Anexo 5. Estrategia de gating para determinar funcionalidad en la cohorte de obesos mórbidos.....	114
Anexo 6. Activación de linfocitos T CD8+ en adultos .....	116
Anexo 7. Activación de linfocitos T CD4+ en niños .....	117
Anexo 8. Activación en linfocitos T CD8+ de niños .....	118

## ABREVIATURAS

AGL	Ácidos grasos libres
°C	Grados Celsius
Cat	Catalogo
ECNT	Enfermedades crónicas no transmisibles
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
EBV	Virus de Epstein-Barr por sus siglas en inglés
FMO	Florescencia menos uno por sus siglas en inglés
HIV	Virus de inmunodeficiencia adquirida
HLADR	Antígeno leucocitario humano DR por sus siglas en inglés
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
IL-2	Interleucina 2
IMC	Índice de masa corporal
INER	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas
LAL	Lisado de amebocitos de Limulus
LPL	Lipoproteinlipasa
LPS	Lipopolisacárido

μl	microlitros
μg	microgramos
ml	mililitros
mg	miligramos
MCP	Proteína quimio atrayente de monocitos y macrófagos por sus siglas en inglés
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad por sus siglas en inglés
No.	Número
OMS	Organización Mundial de la Salud
PIB	Producto Interno Bruto
p-NA	p-nitroanilina
RE	Retículo endoplásmico
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
TCR	Receptor de células T por sus siglas en inglés
T <sub>CM</sub>	Linfocitos T de memoria central por sus siglas en inglés
T <sub>EM</sub>	Linfocitos T de memoria efectora por sus siglas en inglés
T <sub>EMRA</sub>	Linfocitos T de memoria efectora CD45RA+ por sus siglas en inglés
T <sub>N</sub>	Células T vírgenes por sus siglas en inglés
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa

## RESUMEN

**Antecedentes:** La obesidad es una epidemia no infecciosa caracterizada por un estado inflamatorio crónico de bajo grado, y es un factor de riesgo para sufrir desordenes fisiológicos y metabólicos que comprometen la calidad de vida. La activación crónica del sistema inmune innato se ha investigado mucho en la obesidad y se ha relacionado con los desórdenes que conlleva, sin embargo, existen pocos estudios sobre linfocitos T en estos sujetos. La activación crónica de células T está asociada con el paso de lipopolisacárido (LPS) bacteriano del intestino a la sangre en diversas patologías infecciosas; además, la activación crónica de células T se ha visto relacionada con el deterioro de sus funciones inmunes. En ausencia de infección, los obesos también tienen mayores concentraciones de LPS en sangre, lo cual sugiere que puede existir mayor activación de células T en estos sujetos.

**Métodos:** El estudio se realizó en dos cohortes distintas: una de ellas formada por 4 grupos de pacientes obesos y eutróficos, niños y adultos; y la otra conformada por pacientes con obesidad mórbida antes y un año después de la cirugía bariátrica. El grado de obesidad se determinó por medio del índice de masa corporal (IMC). Se usó una técnica de inmunofluorescencia para determinar el fenotipo de linfocitos T por medio de la expresión de los marcadores CD4 y CD8, su grado de diferenciación por medio de los marcadores CCR7 y CD45RO, y la activación por medio de los marcadores HLA-DR y CD38 en el citómetro de flujo. Para determinar la funcionalidad se midió por medio de inmunofluorescencia la expresión de CD40L y la producción IL-2 e IFN y ante un estímulo policlonal de 6 horas con anticuerpos anti-CD3 unido a placa y anti-CD28 soluble.

**Resultados:** El porcentaje de activación de células T CD8+ de memoria efectora correlaciona con el índice de masa corporal en adultos, es decir, a mayor grado de obesidad mayor es el porcentaje de sus células T CD8+ de memoria activadas. En cambio, en los niños obesos la activación de células T CD4+ es menor (con respecto a niños eutróficos); esta correlaciona de manera negativa con el IMC. A pesar de que en el plasma de los pacientes obesos se encontró mayor concentración de LPS en sangre, esta no correlaciona con el porcentaje de células T activadas ni en niños ni es adultos. En los

obesos mórbidos el porcentaje de activación de células T CD8+ de memoria efectora y la concentración sanguínea de LPS disminuye al año de la cirugía bariátrica. Adicionalmente en esta misma cohorte se observó que la población de células T CD4+ y T CD8+ de memoria activadas presentan mayor porcentaje de células disfuncionales que la población de linfocitos T no activados; el porcentaje de células disfuncionales no cambió después de la cirugía bariátrica.

**Conclusión:** La activación de células T sigue un patrón distinto en niños y en adultos. En los adultos obesos existe mayor activación de células T que en los adultos eutróficos, en cambio, en niños obesos hay menor la activación de células T que en los niños eutróficos. La concentración de LPS es mayor en el plasma de niños y adultos obesos, pero no parece haber relación con la activación de sus linfocitos T. Por último, después de la cirugía bariátrica la activación de células T y la concentración de LPS en plasma disminuyó.

# 1. MARCO TEÓRICO

## 1.1. OBESIDAD EN MÉXICO Y EL MUNDO

### 1.1.1. EPIDEMIOLOGÍA

La obesidad no es un fenómeno reciente<sup>1</sup>; la alta prevalencia de obesidad en la población actual de países desarrollados y en vías de desarrollo se ha convertido en un serio problema de salud pública<sup>2</sup>. En el 2016 el 52% de la población mundial adulta tenía sobrepeso u obesidad, y existían más de 340 millones de niños y adolescentes en las mismas condiciones<sup>3</sup>. En México según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición del 2016 ENSANUT la prevalencia de obesidad y sobrepeso fue de 72.5% en adultos, 36.3 % en adolescentes y 33.2% en niños<sup>4</sup>. Cabe destacar que las enfermedades crónicas no transmisibles ECNT derivadas de la obesidad, cobran la vida de más de 47 millones de personas al año. Esta cifra es equivalente al 71% del total de muertes que se producen en todo el mundo<sup>5</sup>.

### 1.1.2. ETIOLOGÍA

El sobrepeso y la obesidad se pueden definir como una acumulación excesiva de grasa corporal debido a un desbalance entre las calorías ingeridas y calorías quemadas durante un largo periodo de tiempo. Este desbalance es de índole multifactorial<sup>6</sup> y está influenciado por factores genéticos<sup>7</sup>, fisiológicos<sup>8</sup>, ambientales, culturales y conductuales<sup>9</sup>, siendo los tres últimos los más importantes. La alimentación desbalanceada junto con el auge de la comida chatarra, el crecimiento de las ciudades y el sedentarismo son los factores más importantes reconocidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como responsables de la epidemia<sup>2</sup>. Aunado a esto, los niños de la población mexicana parecen estar genéticamente predispuestos a sufrir obesidad<sup>10</sup> y enfermedades cardiovasculares cuando son adultos<sup>11</sup>. En consecuencia, México tiene el primer lugar en obesidad infantil y el segundo lugar en obesidad en adultos a nivel mundial<sup>12</sup>.



### **1.1.3. OBESIDAD: PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA**

Las complicaciones de salud derivadas de la obesidad son variadas. Existen desde pequeñas complicaciones no fatales; como dificultades respiratorias, problemas musculoesqueléticos e infertilidad hasta complicaciones graves; como riesgo de muerte prematura por enfermedades cardiovasculares<sup>2</sup>. Actualmente se considera a la obesidad como el principal factor de riesgo para padecer ECNT<sup>6</sup>.

La acumulación excesiva de grasa intrabdominal predispone al individuo a sufrir problemas cardiovasculares<sup>13</sup>, además, es un fuerte predictor diabetes tipo 2<sup>6</sup> y se ha asociado con mayor incidencia de cáncer. En mujeres obesas se reportaron mayores casos de cáncer de endometrio, mama, ovario y cáncer cervicouterino, y en hombres obesos fue más común el cáncer de próstata<sup>14</sup>. También se han descrito disfunciones endocrinas y se sugiere la presencia de disfunciones inmunológicas<sup>15,16</sup>: pues durante la pandemia de influenza de H1N1 del 2009, la obesidad fue un factor de riesgo para el pronóstico fatal del paciente<sup>16</sup>.

La obesidad también representa un problema económico para los gobiernos de todo el mundo<sup>17</sup>. Las enfermedades que acarrea y disminución de la vida económicamente activa cuestan el 2.1% del producto interno bruto (PIB) total; esta cifra es equivalente a los costos que generan los conflictos armados en todo el mundo<sup>18</sup>. En México este problema requiere de 82 a 98 millones de pesos anuales, lo cual corresponde al 80% del gasto en salud programado para el 2012<sup>19</sup>. Los costos de las ECNT representan un obstáculo para el desarrollo de México, en el 2015 se destinó el 3.8% del PIB nacional para tratar este problema de salud, mientras que en ese mismo año se destinó menos del 1% del PIB nacional al desarrollo científico y tecnológico<sup>20</sup>.

### **1.1.4. TIPOS DE OBESIDAD**

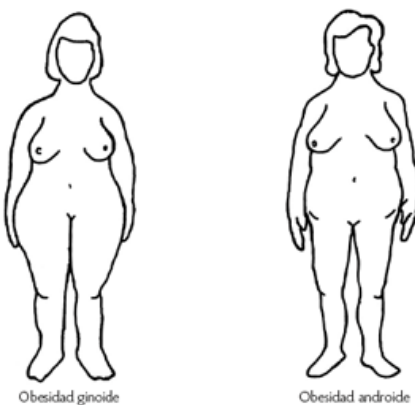
La obesidad puede clasificarse de diversas maneras: acuerdo con el índice de masa corporal (IMC), la distribución de grasa en el cuerpo, o la edad de aparición. La OMS recomienda clasificar a la obesidad de acuerdo con el IMC ya que es fácil de calcular y provee la información útil sobre el grado de sobrepeso y obesidad de una persona (Tabla

1)<sup>2</sup>. El uso exclusivo del IMC tiene un inconveniente; este no aporta información suficiente sobre la distribución la grasa corporal, lo cual es de suma importancia para estimar los riesgos de salud <sup>6</sup>. La cantidad de grasa visceral depositada por arriba de la cintura y no el IMC, predice los riesgos cardiovasculares<sup>13</sup>, la cual puede estimarse por medio de la circunferencia abdominal.

Clasificación	Índice de masa corporal (Kg/m <sup>2</sup> )
Sobrepeso	25-30
Obesidad	30-35
Obesidad severa	35-40
Obesidad mórbida	Mayor a 40

*Tabla 1. Clasificación de la obesidad de acuerdo con el IMC según la OMS*

De acuerdo con la distribución de la grasa corporal, la obesidad puede clasificarse como androide; cuando la grasa predomina en la parte superior del cuerpo (típico del sexo masculino), o ginecoide; cuando la grasa se deposita en la parte inferior del cuerpo (típico del sexo femenino)<sup>6</sup>, (Figura 1). El índice cintura cadera (ICC) permite identificar el tipo de obesidad con base en la distribución corporal; además se usa como parámetro para evaluar el exceso de grasa visceral, la cual se asocia de mejor manera con la predisposición a padecer hipertensión y enfermedades cardiovasculares<sup>10,21-23</sup>.



*Figura 1. Clasificación de la obesidad según la distribución de la grasa corporal. Obtenido de la Revista Mexicana de Ciencias de <https://www.amc.edu.mx>*

Existe otra clasificación con base en la edad a la cual aparece la obesidad. La obesidad hipertrófica aparece en la edad adulta y se caracteriza por el aumento de tamaño de los adipocitos. Por el contrario, la obesidad hiperplásica aparece en la infancia y está caracterizada por tener adipocitos de tamaño normal, pero aumentados en número. Este tipo de obesidad implica un mal pronóstico para el paciente cuando adulto ya que es más difícil de tratar<sup>6</sup>.

A diferencia de lo que ocurre en adultos, el sobrepeso y la obesidad en niños es más difícil de definir. Los infantes se encuentran en desarrollo y se ha observado que la masa de tejido adiposo suele aumentar desde el nacimiento hasta los 9 meses. Luego de este periodo, el tejido adiposo vuelve a disminuir hasta los 6 años, y a partir de ahí vuelve a aumentar hasta la edad adulta. Por lo tanto, el IMC no es suficiente para determinar el grado de obesidad en niños<sup>6</sup>; se requiere el uso de datos adicionales como la edad y el sexo. Para determinar si un niño tiene bajo peso, peso saludable, sobrepeso u obesidad se utilizan los percentiles del IMC publicados en tablas por la OMS, los cuales se pueden determinar a partir del IMC del niño, su sexo y la edad. Los percentiles del IMC son los indicadores más utilizados para evaluar el tamaño y el crecimiento de un niño<sup>24,25</sup>.

## 1.2. FISIOPATOLOGÍA DE LA OBESIDAD

### 1.2.1. FUNCIONES EL TEJIDO ADIPOSO

De manera general, el tejido adiposo está compuesto por adipocitos, células inmunes y células nerviosas con una alta actividad endocrina y metabólica<sup>26</sup>. Las hormonas peptídicas y citocinas llamadas adipocinas actúan sobre el metabolismo de carbohidratos (adiponectina y resistina), el metabolismo de lípidos (proteína transportadora de esterios de colesterol, CETP), la inflamación (TNF  $\alpha$  e IL-6), la coagulación (PAI-1) y la presión arterial (angiotensina II y angiotensinógeno). Además, se encarga de regular conducta alimentaria (leptina), en otras palabras, la leptina se encarga de regular la ingesta de nutrientes por medio de la estrecha conexión que tiene el tejido adiposo con el sistema nervioso central<sup>27-29</sup>.

Los adipocitos son células especializadas en el almacenamiento de lípidos provenientes de la dieta. Estos lípidos se depositan dentro de organelos llamados gotas lipídicas como reserva de energía<sup>30</sup>. En los seres humanos, existen dos tipos de adipocitos: Los adipocitos blancos que contienen una gran cantidad de gotas lipídicas y están diseñados para almacenar el exceso de grasa proveniente de la dieta, y los adipocitos pardos que tienen un menor número de estos organelos, pero contienen una gran cantidad de mitocondrias, lo que les permite generar una gran cantidad de energía en forma de ATP por medio de la fosforilación oxidativa y de producir calor para mantener la temperatura corporal<sup>29</sup>. Además de las funciones mencionadas anteriormente, en los adipocitos se lleva a cabo la síntesis de triacilglicerolos (lípidos de reserva) a partir de los ácidos grasos libres provenientes de la dieta (lipogénesis) o de sustratos provenientes del metabolismo de los carbohidratos (lipogénesis *de novo*). En la lipogénesis *de novo* se convierte el exceso de carbohidratos en lípidos, los cuales se almacenan en forma de triacilglicerolos dentro de los adipocitos. También los adipocitos se encargan de la liberación de los lípidos de reserva al torrente sanguíneo para que puedan ser utilizados cuando existe una alta demanda de energía (lipólisis)<sup>31,32</sup>. Este tejido es capaz de regular el metabolismo en tejidos periféricos como el hígado y el músculo esquelético, este último requiere de un alto suministro de energía para llevar a cabo la contracción muscular<sup>31,33</sup>.

Es importante que exista una proporción adecuada de tejido adiposo en el cuerpo. Como se describió anteriormente, el exceso de tejido adiposo es perjudicial para la salud. Pero, por otro lado, su carencia también es contraproducente; el almacenamiento y aprovechamiento de los lípidos provenientes de la dieta disminuye las concentraciones de triglicéridos y ácidos grasos libres en la sangre (AGL); los cuales en décadas recientes se identificaron como mediadores de alteraciones metabólicas<sup>34,35</sup> y la resistencia a la insulina (ver glosario)<sup>34</sup>. Por lo tanto, se requiere de un tejido adiposo funcional en una proporción adecuada para mantener la salud.

### **1.2.2. DISFUNCIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO EN LA OBESIDAD**

La disfunción en el tejido adiposo se entiende por: cambio en la función secretora de los adipocitos. A medida que aumentan su tamaño, la capacidad que tienen de funcionar como órgano endocrino se ve afectada<sup>26</sup>. Estas células tienen una capacidad limitada para crecer; puesto que la hipertrofia (ver glosario) de estas células disminuye la cantidad de flujo sanguíneo que llega al tejido adiposo, esta condición conocida como hipoxia contribuye a la desregulación en la producción de adipocinas. Este estado se caracteriza por la hipersecreción de adipocinas proinflamatorias, proaterogénicas e inductoras de resistencia a la insulina en tejidos periféricos como el músculo esquelético. Por otro lado, la capacidad que tienen los adipocitos de almacenar de lípidos se reduce a medida que crecen junto con el consecuente aumento de AGL en sangre y el depósito de lípidos en otros tejidos como el hígado, el músculo esquelético y las células  $\beta$  del páncreas. Estos tejidos no están adaptados para almacenar grandes cantidades de lípidos por lo que la excesiva acumulación de ácidos grasos conduce a la disfunción celular. Las altas concentraciones AGL y sus derivados en sangre favorecen la resistencia a la insulina y alteran el metabolismo en estos tejidos. El fenómeno descrito anteriormente se conoce como lipotoxicidad y está fuertemente relacionado con el estrés del retículo endoplásmico, el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial; incluso la  $\beta$  oxidación de ácidos grasos en las mitocondrias se ve afectada, en consecuencia, los lípidos en tejidos periféricos se acumulan. El estrés oxidativo causado por la acumulación de lípidos oxidados y la hipoxia conducen a la inflamación del tejido adiposo<sup>36</sup>.

## **1.3. INMUNIDAD INNATA EN LA OBESIDAD**

En la obesidad existe un estado inflamatorio crónico de bajo grado promovido por el crecimiento descontrolado de los adipocitos y por la desregulación de sus funciones secretoras, metabólicas y de almacenamiento de lípidos. Estos procesos son mediados a través de la acción de citocinas proinflamatorias producidas por células inmunes infiltradas en el tejido adiposo<sup>37</sup>. La inflamación generalizada en este tipo de individuos promueve la resistencia a la insulina en tejido periféricos y diabetes tipo 2 en consecuencia<sup>38</sup>.

### **1.3.1. INFILTRACIÓN DE MACRÓFAGOS Y MONOCITOS EN TEJIDO ADIPOSO**

El estado inflamatorio que se observa en el tejido adiposo de personas obesas es ocasionado por diversas subpoblaciones de leucocitos residentes en el tejido y en la circulación<sup>39</sup>. Una de estas poblaciones leucocitarias son los monocitos y los macrófagos; existen monocitos productores de citocinas proinflamatorias, los cuales se diferencian a macrófagos proinflamatorios conocidos como M1 con fenotipo tipo Th1 y existen monocitos que se diferencian a macrófagos M2, los cuales presentan un fenotipo tipo Th2 y están involucrados en la resolución de la inflamación y la reparación de tejido<sup>40,41</sup>. En la obesidad, los monocitos proinflamatorios circulantes aumentan<sup>42</sup> y los macrófagos residentes en tejido adiposo se polarizan a un perfil M1, mientras que el número de macrófagos M2 disminuye<sup>39,40,43,44</sup>.

El tejido adiposo atrofiado por la obesidad secreta las citocinas MCP-1 y TNF- $\alpha$ <sup>39,45,46</sup>, las cuales se encargan de promover un estado inflamatorio que impacta sobre el metabolismo de los adipocitos y su capacidad de almacenar triglicéridos<sup>47-49</sup>. El MCP-1, es la adipocina responsable de la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo ya que funciona como un potente quimioatrayente<sup>46</sup>. En los pacientes obesos los macrófagos pueden llegar a alcanzar hasta el 50% del total de células inmunes infiltradas en tejido adiposo, mientras que en personas eutróficas esta proporción no supera el 10%<sup>50,44,46</sup>. La inflamación a su vez puede contribuir a la resistencia a la insulina por medio de la acción directa del TNF- $\alpha$  sobre la señalización del receptor de insulina en músculo esquelético<sup>51</sup>. El TNF- $\alpha$  tiene otros efectos sobre el tejido adiposo además de inducir la resistencia a la insulina, también induce la producción de leptina, estimula la lipólisis e inhibe la

lipogénesis: junto con estos efectos induce la apoptosis de los adipocitos, por lo cual, también es un regulador del volumen de adipocitos en el organismo.

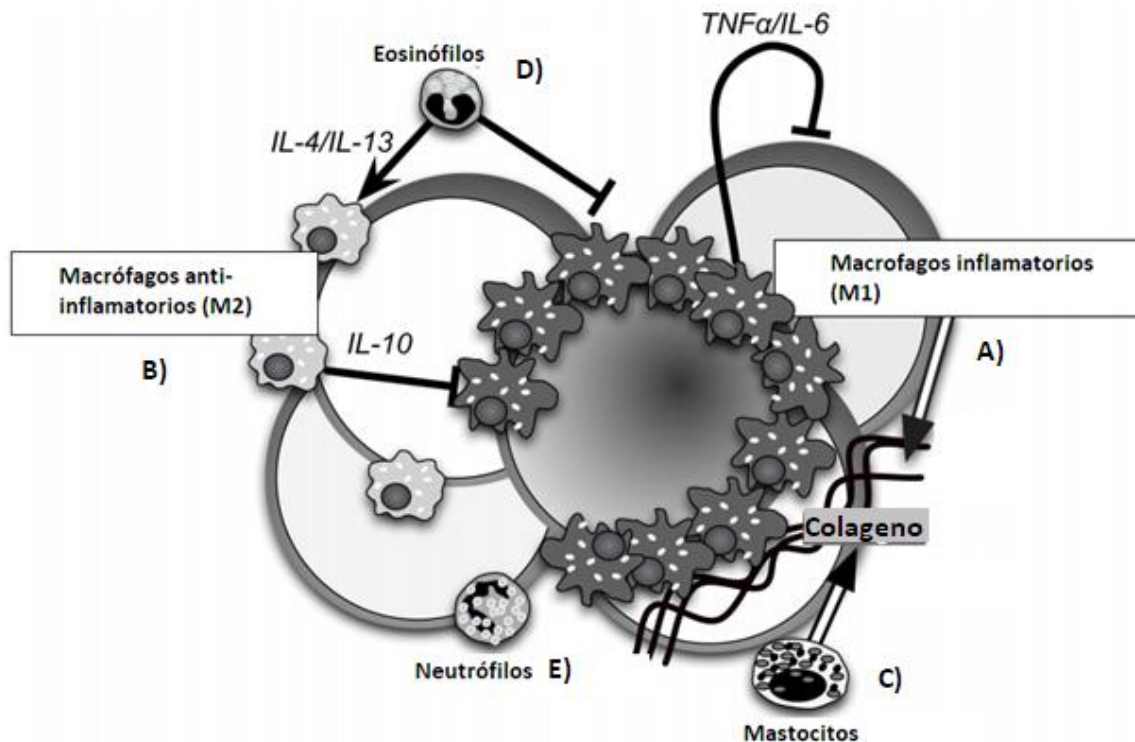
La inflamación altera el metabolismo de lípidos por medio del receptor de hormona nuclear  $PPAR\gamma$ , el cual es un regulador de la adipogénesis y se requiere para la síntesis de triglicéridos y su almacenamiento en adipocitos<sup>52</sup>. El  $TNF-\alpha$  regula negativamente a este receptor ocasionando que disminuya el depósito de lípidos en los adipocitos por medio de un incremento en la lipólisis. En consecuencia, disminuye de la síntesis de triglicéridos y aumentan de AGL circulantes<sup>51</sup>. El  $TNF-\alpha$  también interfiere con el transportador de glucosa regulado por la insulina GLUT 4, en consecuencia, el estado inflamatorio disminuye el ingreso de glucosa dentro de la célula, favorece hiperglicemia y la resistencia a la insulina<sup>53</sup>.

### **1.3.2. OTRAS CÉLULAS DE LA INMUNIDAD INNATA**

Existen otras células de la inmunidad innata además de los macrófagos M1 (Figura 2A) que también participan en el estado inflamatorio observado en la obesidad. Por ejemplo, las células NKT son una fuente importante de citocinas proinflamatorias en el tejido adiposo visceral, lo cual agrava el estado de obesidad de los individuos<sup>54</sup>. En ratones, la deficiencia de NKT parece proteger al individuo contra la ganancia excesiva de peso y la resistencia a la insulina<sup>55</sup>. Algo similar ocurre con los mastocitos ya que la deficiencia de la deficiencia de estas células también parece disminuir la obesidad inducida por la dieta<sup>56</sup> (Figura 2C), sin embargo, hay muy poca información acerca de las funciones que tienen estas células en el tejido adiposo.

Los eosinófilos, también células de la respuesta inmune innata, se encuentran en bajas proporciones en el tejido adiposo comparadas con otras células (Figura 2E). Su deficiencia en ratones está relacionada con mayor ganancia de peso y resistencia a la insulina, lo cual sugiere que los eosinófilos ayudan a mantener un metabolismo saludable<sup>57</sup>. Los eosinófilos son atraídos por un ambiente de citocinas Th2 como IL-4 y e IL-13, las cuales favorecen la presencia de macrófagos M2 en el tejido adiposo, los cuales ayudan a resolver el estado inflamatorio<sup>58-60</sup> como se mencionó anteriormente; estas últimas células parecen tener funciones para de controlar la inflamación. (Figura 2B). Incluso se ha

encontrado que, en infecciones parasitarias provocadas por helmintos al aumentar la cantidad de eosinófilos se controla la inflamación en tejido adiposo, disminuye de la acumulación lípidos y mejora la sensibilidad a la insulina<sup>60</sup>.



*Figura 2. Células de la inmunidad innata en el tejido adiposo  
Comunicación entre células de la inmunidad innata en el tejido adiposo. Modificado de Carey N.  
Lumeng 2013 vol: 34 (1) pp: 12-29<sup>61</sup>*

Se conoce muy poco acerca de las funciones que tienen los neutrófilos en el tejido adiposo, se sabe que colaboran estrechamente con los macrófagos (Figura 2E), pero no se conoce con certeza la relación que existe con estas células y la obesidad. Recientemente se ha descubierto que los neutrófilos son mediadores de la formación de la placa aterosclerótica<sup>62</sup>.



## **1.4. LINFOCITOS T EN LA OBESIDAD**

Los linfocitos T contribuyen al estado inflamatorio que se observa en la obesidad<sup>63</sup>; existen cambios en el perfil funcional de linfocitos T residentes en tejido visceral, lo cual incluye aumento de linfocitos Th1<sup>64-66</sup> (linfocitos T CD4+ efectores proinflamatorios) y linfocitos T CD8+ citotóxicos,<sup>67</sup> con una disminución simultánea del número de linfocitos T reguladores<sup>68</sup>. Incluso la dieta alta de grasa ocasiona la infiltración de linfocitos T CD4+ en tejidos no linfoides y genera el desarrollo de linfocitos T CD4+ efectores inflamatorios menor capacidad de proliferación en ratones<sup>69</sup>.

### **1.4.1. ACTIVACIÓN CRÓNICA DE LINFOCITOS T**

La activación de linfocitos T es un fenómeno natural que ocurre durante una infección aguda como respuesta ante antígeno con el objetivo de inactivar o eliminar al agente infeccioso<sup>41</sup>. También se encargan de restringir la reactivación de infecciones virales latentes y de regular la carga viral durante nuevas reinfecciones. La aparición de nuevos antígenos en el organismo deja como resultado la formación de subpoblaciones de linfocitos T efectores de vida corta, pero altamente funcionales encargadas de eliminar al agente infeccioso en cuestión<sup>70</sup>. Además, se genera una subpoblación de linfocitos T de memoria precursores de los linfocitos T efectores, de larga vida y con limitadas funciones efectoras, pero con la capacidad de reactivarse rápidamente ante una segunda infección<sup>70-72</sup>; estas células son el principal componente de la memoria inmunológica<sup>41</sup>. Existen varios ejemplos en los que observa el proceso antes descrito<sup>73</sup> como la infección por el virus de epstein-barr EBV<sup>74</sup>, en la infección por el virus del papiloma humano PVH<sup>75</sup>, en la leishmaniasis visceral<sup>76,77</sup> y en la infección por el virus de la influenza H7N9<sup>78</sup>. La activación de células T en infecciones aguda suele resolverse una vez frenada la infección, sin embargo, existe otra condición en la cual la activación persiste por largo periodo de tiempo.

Durante infecciones crónicas en donde el sistema inmunológico se encuentra constantemente estimulado por el agente infeccioso pueden aparecer subpoblaciones de células T efectoras “agotadas”, en otras palabras, linfocitos T con funciones efectoras disminuidas. Estas células “agotadas” son incapaces de controlar la infección. El

fenómeno descrito anteriormente se observó en infecciones crónicas virales, como en la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (HIV)<sup>79</sup>. Además la expresión de CD38 (molécula utilizada en este estudio como marcado de activación) en células T en la infección por VIH está asociada con una serie de deficiencias funcionales<sup>80,81</sup>.

La obesidad se considera un factor de riesgo para desenlaces desfavorables de infecciones infecciosas tal como se observó en la pandemia de influenza H1N1 del 2009<sup>82</sup>, lo cual sugiere que podría existir cierta disfunción del sistema inmune de los pacientes obesos para combatir enfermedades infecciosas o para controlar inflamaciones.

## 1.5. TRANSLOCACIÓN MICROBIANA Y ENDOTOXEMIA EN LA OBESIDAD

La translocación bacteriana se refiere al paso de componentes bacterianos de la luz intestinal al torrente sanguíneo, como ocurre en el caso del lipopolisacárido, DNA bacteriano, flagelina o peptidoglicano<sup>83</sup>. El lipopolisacárido (LPS), también conocido como endotoxina, es el principal glucolípido presente en la membrana exterior de las bacterias Gram negativas, las cuales representan el 70% de todas las bacterias de la microbiota<sup>84</sup>. Este componente bacteriano al entrar al torrente sanguíneo puede ser reconocido por células de la inmunidad innata como los monocitos y los macrófagos por medio del receptor tipo toll 4 (TLR 4), lo que desencadena la producción de citocinas proinflamatorias como la IL-1 y el TNF alfa.<sup>85-87</sup>

La translocación de material bacteriano a la sangre ocurre cuando se compromete la integridad de la mucosa intestinal<sup>77</sup>. Este fenómeno se ha identificado como responsable de la activación del sistema inmune en diversas enfermedades en la infección por VIH<sup>88-90</sup>, en la enfermedad inflamatoria del intestino, la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerativa<sup>91</sup> y la leishmaniasis visceral<sup>76,77</sup>.

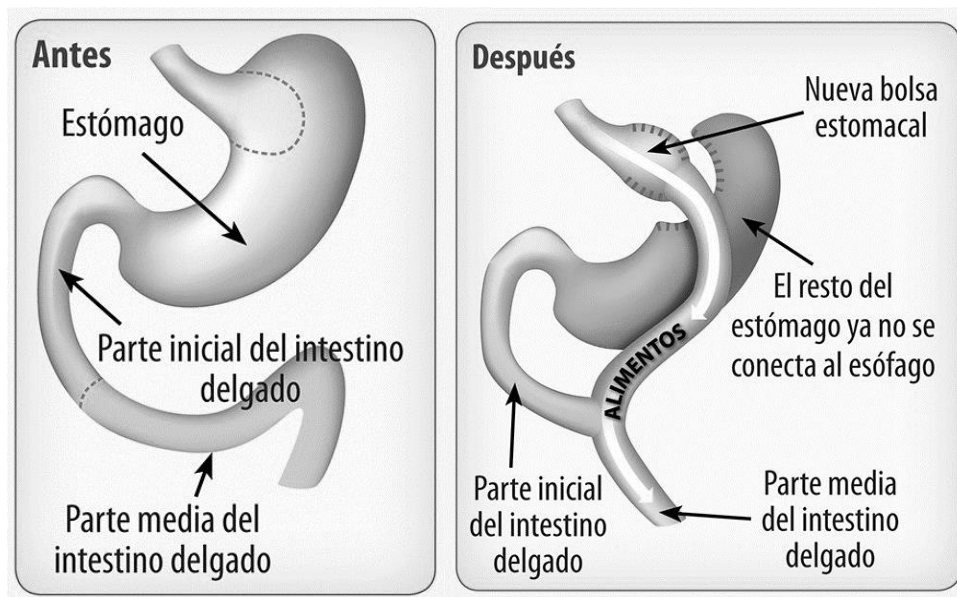
En pacientes obesos la concentración de LPS en sangre está aumentada en ausencia de un agente infeccioso. Esta endotoxemia metabólica (ver glosario) está asociada con incremento en la deposición de lípidos en órganos periféricos<sup>92</sup>, el estrés oxidativo, el ambiente pro inflamatorio<sup>93</sup>, resistencia a la insulina<sup>94</sup> y diabetes tipo 2<sup>94</sup>. El mecanismo por el cual el LPS entra a la sangre en pacientes obesos no es clara, ya que no existe evidencia de que el intestino este dañado. Por otro lado, existen estudios que sugieren que LPS se transporta junto con los lípidos de la dieta<sup>95</sup>.

## 1.6. OBESIDAD MÓRBIDA Y CIRUGÍA BARIÁTRICA

Según la encuesta realizada por el instituto nacional de salud pública ENSANUT MC del 2016, el 3% de la población mexicana tiene obesidad mórbida, en donde la prevalencia es 2.4 veces mayor en mujeres que en hombres<sup>4</sup>. Este tipo de obesidad, también conocida como obesidad grado III se caracteriza por tener índices de masa corporal ( $\text{Kg}/\text{m}^2$ ) mayores a 40<sup>2</sup>. En la obesidad mórbida no solo incrementa el riesgo de presentar síndrome metabólico y anormalidades fisiológicas como se había descrito anteriormente, sino que se presentan problemas óseos y anatómicos que ocasionan que la calidad de vida sea generalmente mala<sup>96</sup>.

Existen tres maneras de tratar a la obesidad extrema: 1) cambios en el estilo de vida, 2) tratamientos farmacológicos y 3) cirugía bariátrica como última alternativa<sup>97</sup>. La primera incluye restricción calórica junto con ejercicio, la cual ha mostrado pobres resultados en donde el 66% de los pacientes sometidos a este tratamiento vuelven a subir de peso dentro los siguientes 24 meses<sup>97</sup>. El tratamiento farmacológico junto con buenos hábitos ha sido el tratamiento más amigable. Los fármacos utilizados tienen efectos positivos adicionales más allá de la pérdida de peso, tal como la disminución de lípidos circulantes, menor presión arterial y menor resistencia a la insulina, sin embargo, los efectos benéficos se revierten poco tiempo después que se suspende el fármaco<sup>98</sup>. La cirugía bariátrica ha sido el único tratamiento efectivo para tratar a la obesidad mórbida en los últimos años y los resultados obtenidos pueden mantenerse de 10 a 15 años<sup>96,97,99</sup>. Este tratamiento es un conjunto de procedimientos quirúrgicos en el tracto gastrointestinal con el objetivo de disminuir el peso corporal<sup>100</sup>.

En México se lleva a cabo un procedimiento quirúrgico denominado “derivación gastroyeyunal” también conocido como “Baipás gástrico” (Figura 3). La derivación gastroyeyunal consiste en dividir el estómago para hacer una pequeña bolsa, la cual se conecta con la parte media del intestino delgado. Después la operación, el paciente se sacia con menos alimentos e ingiere menos calorías<sup>100</sup>.



*Figura 3. Derivación gastroeyunal*

*Obtenido de Science, J. M. E. C. for C. D. and C. Cirugía para bajar de peso en adultos con diabetes o prediabetes y niveles bajos de obesidad. (2014).*

A pesar de que la cirugía bariátrica es el procedimiento con mejores resultados no está exento de riesgos y complicaciones. Las principales causas de mortalidad después de la cirugía bariátrica son debidas a la sepsis bacteriana secundaria a la fuga del reservorio intestinal, hemorragias gastrointestinales y complicaciones tardías como deficiencias nutricionales<sup>101</sup>. Comprender más a fondo los mecanismos patológicos de la obesidad permitirá tener una perspectiva más amplia del problema al que nos enfrentamos hoy en día y abrirá el camino hacia soluciones alternativas menos invasivas y riesgosas que la cirugía bariátrica.

## **1.7. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN**

Todo el panorama expuesto con respecto a la obesidad conlleva a las siguientes preguntas: ¿Cómo se encuentra el grado de activación de células T en los obesos niños y adultos comparados con los adultos y niños eutróficos?, si los obesos tienen más LPS en sangre que los eutróficos, entonces ¿La activación de células T guarda correlación con la concentración de LPS en sangre? ¿Qué tipo de correlación?, ¿Cómo es la función de las células T de los obesos?

Hipotetizando que la activación y la disfuncionalidad de linfocitos T sea mayor en los obesos ¿Cuál es la diferencia en cuanto a activación de células T, concentración de LPS en plasma y función de células T de pacientes obesos mórbidos al año de la cirugía bariátrica?

## **2. JUSTIFICACIÓN**

La investigación científica se ha concentrado en investigar aspectos anatómicos, bioquímicos y metabólicos de los pacientes obesos, sin embargo, se conoce muy poco sobre la inmunidad adaptativa. Por otro lado, es preocupante que hasta el día de hoy la cirugía bariátrica sea el único tratamiento efectivo para tratar la obesidad extrema, sin embargo, la investigación orientada al conocimiento del sistema inmunológico de pacientes obesos permitirá tener una perspectiva más amplia de este fenómeno y de cómo combatir a esta epidemia que ya le ha costado la vida millones de personas en México.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1. OBJETIVO GENERAL**

Estudiar en dos cohortes distintas: la activación de linfocitos T y sus subpoblaciones en pacientes con obesidad y obesidad mórbida. Así como la funcionalidad de estas mismas células en pacientes con obesidad mórbida después de la cirugía bariátrica. De manera adicional, determinar si el LPS en sangre está correlacionado con la activación de linfocitos T.

### **3.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Determinar grado de activación de distintas subpoblaciones de linfocitos T en personas con obesidad y con obesidad mórbida, al igual que en donadores eutróficos.
2. Comparar el grado de activación de linfocitos T de sujetos obesos, obesos mórbidos y de donadores eutróficos; niños y adultos por separado.
3. Comparar las concentraciones de LPS en plasma de obesos y eutróficos.
4. Determinar si hay correlación entre la activación de células T y las concentraciones de LPS en plasma.
5. Evaluar la funcionalidad de células T activadas y no activadas de pacientes con obesidad mórbida antes y después de la cirugía bariátrica.
6. Determinar si las células T activadas de pacientes con obesidad mórbida antes y de la cirugía bariátrica presentan disfunciones.
7. Evaluar si la activación de células T, su disfuncionalidad y la concentración de LPS en plasma de pacientes con obesidad mórbida que se sometieron a la cirugía bariátrica disminuye.



## 4. HIPÓTESIS

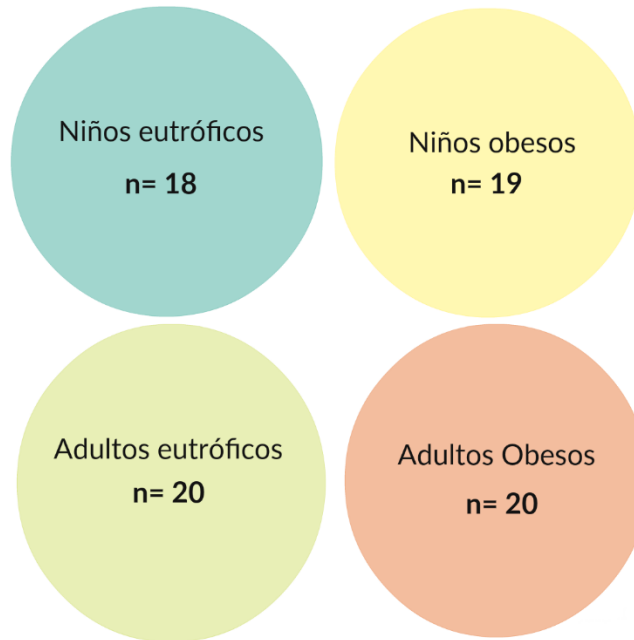
- 1) El grado de activación de células T y sus subpoblaciones de adultos es significativamente mayor en obesos y obesos mórbidos al compararlos con los eutróficos. De igual manera, la activación en las células T y sus subpoblaciones es significativamente mayor en niños obesos con respecto a niños eutróficos.
- 2) La activación de células T tiene correlación significativa con la concentración de LPS en plasma tanto en niños como en adultos.
- 3) La activación de células T, el porcentaje de células disfuncionales y la concentración de LPS en el plasma de pacientes con obesidad mórbida disminuye de manera significativa después de la cirugía bariátrica.

# 5. METODOLOGÍA

## 5.1. COHORTES ESTUDIADAS

### 5.1.1. COHORTE DE OBESOS DEL HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO

El estudio se realizó en dos cohortes distintas: una de ellas formada por 4 grupos de sujetos mexicanos obesos y eutróficos, niños y adultos, reclutados en el Hospital General de México; se incluyeron a 77 sujetos (Anexo 1); 18 niños eutróficos, 19 niños obesos, 20 adultos eutróficos y 20 adultos obesos, ver (Figura 4). Los criterios de inclusión y exclusión pueden verse en el Anexo 2.



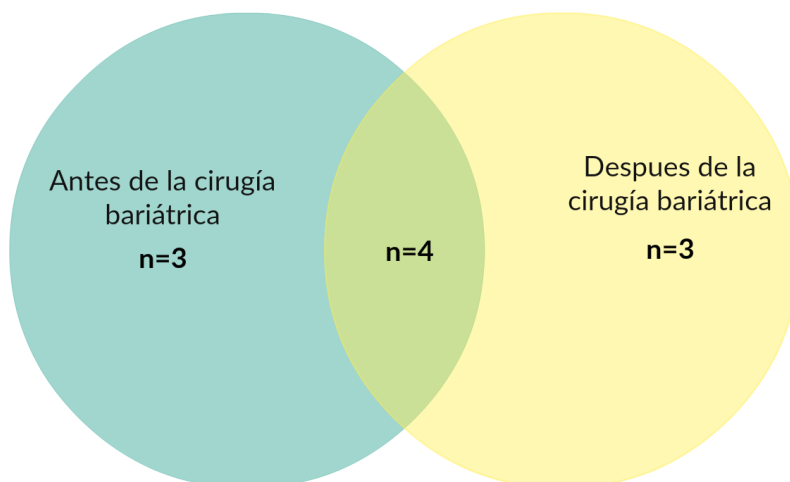
*Figura 4. Muestras de células mononucleares de sangre periférica de obesos y eutróficos del Hospital General de México*

Las muestras de PBMC del Hospital General de México fueron procesadas por el personal del laboratorio de Inmunología Integrativa del INER con el objetivo de determinar únicamente activación de células T y sus subpoblaciones. De esta cohorte se realizó el análisis de los metadatos (ver glosario) obtenidos del citómetro de flujo y el análisis estadístico de los datos obtenidos (Sección 5.15).

### 5.1.2. COHORTE DE OBESOS MÓRBIDOS DEL INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

La segunda cohorte se encuentra conformada por sujetos mexicanos con obesidad mórbida antes y un año después de la cirugía bariátrica reclutados en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

De esta cohorte fue posible recuperar las muestras de 10 pacientes (ver Anexo 3). Sólo se tienen muestras pareadas de 4 pacientes, antes y después de someterse a la cirugía bariátrica (figura 5). En estas células se evaluó el grado de activación y la funcionalidad de células T y de sus subpoblaciones.



*Figura 5. Muestras de células mononucleares de sangre periférica de pacientes con obesidad mórbida antes y después de la cirugía bariátrica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.*

### 5.1.3. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE OBESIDAD DE LOS SUJETOS DE ESTUDIO

En adultos la obesidad se clasificó de acuerdo con el índice de masa corporal ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ), de tal manera que se consideró como eutróficos a los sujetos con IMC de 20 a 25; como obesos a sujetos con IMC entre 30 y 40; y como obesos mórbidos a aquellos sujetos con IMC mayores a 40. En niños la obesidad se clasificó por medio del IMC ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) y los percentiles del IMC especificados en las tablas de la OMS según su edad y su sexo.

## **5.2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS**

### **5.2.1. CONDICIONES PREANALÍTICAS**

Al sujeto participante tanto niño como adulto se le dio a conocer el procedimiento que se llevaría a cabo el día de la prueba. Los sujetos que aceptaron participar en el estudio y firmaron el consentimiento informado comenzaron la prueba a las 8 am para la toma de muestra basal en condiciones de ayuno de 8 horas. A estos sujetos se le realizó un examen físico para medir sus signos vitales (frecuencia cardiaca, presión arterial y frecuencia respiratoria) y se les pidió que llenaran un cuestionario con respecto a variables demográficas y de hábitos de ejercicio.

### **5.2.2. RECOLECCIÓN DE SANGRE VENOSA**

Se recolectaron 30 ml de sangre periférica en tubos verdes con heparinato de sodio (Tubos BD Vacutainer, Ref:367874) por medio de una punción venosa. La muestra de sangre se centrifugó a 2000 rpm por 20 minutos con el objetivo de separar el plasma del paquete globular. Después se recuperaron 5 alícuotas de 1.5 ml de plasma en tubos eppendorf con tapa rosca. Las muestras de plasma se conservaron a -80°C.

El paquete globular se utilizó para aislar PBMC tal como se indica en la sección 5.4

## **5.3. PREPARACIÓN DE MEDIOS Y AMORTIGUADORES**

### **5.3.1. BUFFER DE LISIS DE ERITROCITOS**

Este buffer permite retirar los RBC de la suspensión de PBMC de manera efectiva sin alterar la integridad los linfocitos. El  $\text{NH}_4\text{Cl}$  es la sustancia activa de este buffer; en una solución isotónica permite la rápida hemólisis de los RBC. Está compuesto por  $\text{NH}_4\text{Cl}$  150 mM (J. T. Baker, No. de Cat:0019),  $\text{KHCO}_3$  10 mM (J. T. Baker, No. de Cat: 2940-01) y EDTA 0.1 mM (Sigma Aldrich, Cat: ED455) a  $\text{pH}=7.4$ .

### **5.3.2. MEDIO COMPLETO PARA CULTIVO CELULAR**

La base para preparar medio completo consiste en Advanced RPMI 1640 (Gibco, No. de Cat:12633012), el cual contiene los aminoácidos, vitaminas, sales minerales y las fuentes de carbono principales. Este medio debe suplementarse con suero bovino fetal descomplementado al 10% (Gibco, No. de Cat: 16000036), L-glutamina 0.8 mM, Estreptomycin 22U/ml y Penicilina 22U/ml (Penicillin-Streptomycin Mixtures Lonza, No. de Cat: BW 17-718R). La descomplementación el SFB se logra al calentar el plasma a  $56^\circ\text{C}$  en baño maría por 30 min. Este medio provee los nutrientes, factores de crecimiento y las hormonas necesarias para la supervivencia de las células, además, se encarga de regular el pH y la presión osmótica.

### **5.3.3. PBS CON 1% DE ALBÚMINA**

El PBA se utilizó como buffer de tinción para citometría de flujo de células viables o fijadas. Este medio tiene como base un amortiguador de fosfatos PBS 1X (Lonza, No. de Cat:17-516F) con albúmina al 1% (CALBIOCHEM, No. de Cat: 125693). La presencia de esta proteína reduce la unión inespecífica de anticuerpos y fluorocromos.

### **5.3.4. MEDIO DE CONGELACIÓN**

El medio de congelación consiste en SFB con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotector (Sigma, No. de Cat: D8418). La acción crioprotectora del DMSO se debe principalmente a su habilidad para prevenir la acumulación excesiva de electrolitos y otras

sustancias durante el proceso de congelamiento que puedan inducir la formación de cristales que dañen a la membrana plasmática<sup>102</sup>.

## 5.4. EXTRACCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA.

Las PBMC se extraen a partir de sangre periférica por medio de un gradiente de densidad. El medio ficoll es una matriz formada por molécula Ficoll PM400 ver (figura 6), este medio está dotado de la densidad óptima (1.077 g/ml) para separar a otras células de las PBMC. La migración diferencial de las células durante la centrifugación da como resultado la formación de capas con diferentes contenidos celulares: 1) El botón de eritrocitos, 2) la capa de los granulocitos y, por último, 3) la nube (buffy coat) de células mononucleares junto con otras partículas de baja densidad.

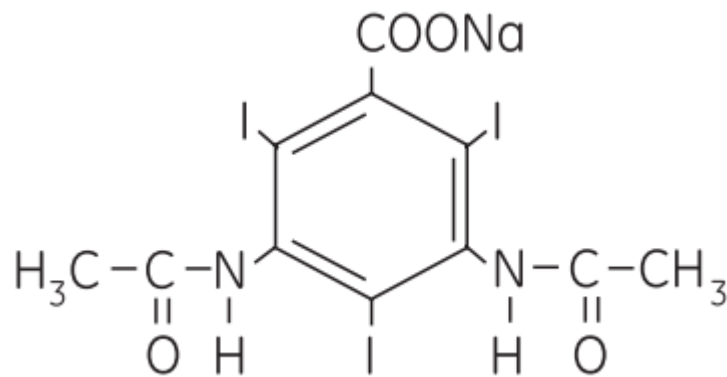
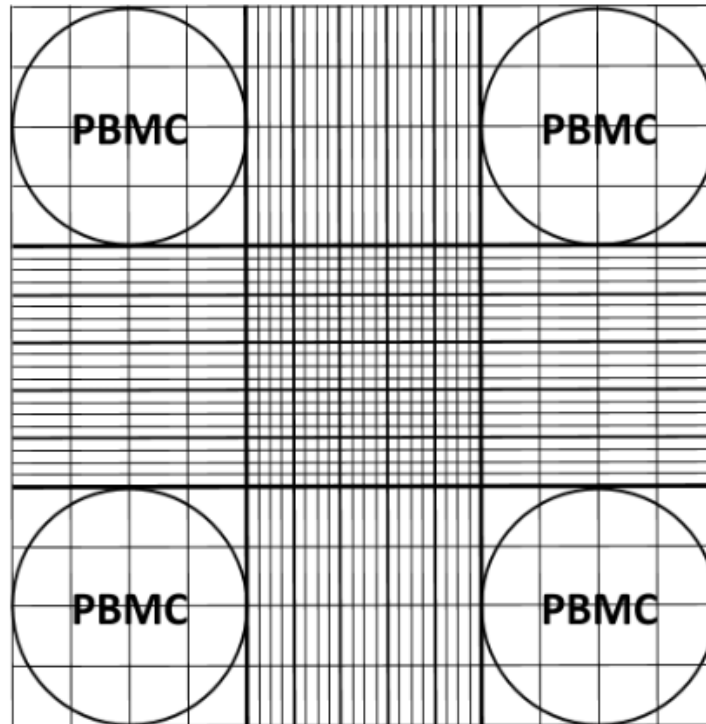


Figura 6. Estructura molecular del Ficoll PM400.  
Del manual "Isolation of mononuclear cells. Methodology and applications" de Sigma Aldrich

Colocar 15 ml del paquete globular en un tubo cónico de 50 ml y se lleva a un volumen final de 35 ml. En otro tubo de 50 ml se colocan 10 ml de Lymphoprep TM (No. de Cat: 111454) y se añade la sangre anteriormente diluida con precaución para mantener intacta la interfase entre la sangre y el ficoll. Centrifugar a 1500 rpm/25 minutos con aceleración y freno lento. Se recupera únicamente la nube de PBMC y se trasvasa a otro tubo de 50 ml. El remanente de eritrocitos se elimina tratando a la muestra con buffer de lisis de eritrocitos por 10 minutos. Transcurrido el tiempo, se lavan las PBMC con PBS a 1500 rpm por 10 minutos con aceleración y freno lento. Se recupera el pellet celular y se añaden 10 ml de medio completo.

## 5.5. CUENTA DE PBMC EN CÁMARA DE NEUBAUER

Realizar una dilución 1:10 de la suspensión celular con azul de tripano y se carga la cámara de Neubauer por uno de los costados con 10 µl de la dilución anterior. Llevar la cámara con las células al microscopio y enfocar a 40X.



*Figura 7. Cuenta de PBMC en la cámara de Neubauer*

Se cuenta el número de células en los recuadros que indica la figura 7 y se saca el promedio. El número total de células aisladas se obtiene por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{No. Total de PBMC} = \text{Promedio PBMC} \left(\frac{10}{1}\right) \left(\frac{10000}{\text{ml}}\right) (10\text{ml})$$

Por rutina, se descontamina la cámara con etanol al 70% v/v una vez que se termine de realizar el conteo. Esto inactiva a los virus envueltos.



## **5.6. PRESERVACIÓN DE PBMC**

### **5.6.1. CRIOPRESERVACIÓN**

Una vez cuantificado el total de PBMC, se retira el medio completo por medio de centrifugación a 1500 rpm por 10 minutos. El botón debe resuspenderse en 1.5 ml de medio de congelación por cada 25 millones de PBMC. Se coloca en cada criovial (Thermo Scientific, No. de Cat: 5000-0020) un volumen máximo de 1.5 ml, y se deja congelar gradualmente hasta -80°. Para este fin, se colocan los tubos en aislantes parciales que se enfrían gradualmente en un congelador a -80°C por 48 h. Transcurrido el tiempo, se transfiere el criovial a un tanque con nitrógeno líquido (-196° C) hasta el día de su procesamiento.

### **5.6.2. DESCONGELACIÓN**

Retirar el criovial con las PBMC del tanque de nitrógeno y colocarlo inmediatamente en un baño maría a 37°C hasta que la muestra haya comenzado a derretirse. En condiciones estériles decantar el contenido del criovial a un tubo con 6 ml de medio completo. Además, se debe lavar el criovial con 1 ml de este mismo medio. Centrifugar el tubo con las células a 600 rpm por 5 minutos con una aceleración y un freno bajo. Después se decanta el medio y se dejan a las PBMC incubándose en 5 ml de medio completo con 0.5 µl de DNase I (Thermo Fisher, No. de Cat:18047019, lote:2050814) equivalente a (1U de DNase I por millón de células) en un frasco de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (Sarstedt, No. de Cat: 83.3910.002) a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> toda la noche.

## 5.7. TITULACIÓN DE ANTICUERPOS

Se determinó el volumen óptimo para cada anticuerpo por separado <sup>103</sup>. El volumen óptimo de cada anticuerpo se determinó por medio de tinciones individuales con diferentes diluciones de los fluoróforos del panel de anticuerpos (Tabla 2) según las recomendaciones de cada marca. La dilución adecuada se selecciona en base al índice de titulación; se selecciona aquella dilución con el mayor índice de titulación (IT).

El IT puede calcularse por medio de la siguiente formula:

$$IT = \frac{MFI \text{ pos} - MFI \text{ neg}}{2 DS}$$

En donde:

MFI pos\* = Índice de fluorescencia media positiva

MFI neg\* = Índice de fluorescencia media negativa

DS = desviación estándar

\*Cada uno de estos valores se obtienen de análisis de datos de citometría de flujo

Especificidad	Fluoróforos	Clona	Isotipo	Marca	Catálogo	Lote
Anti-CD4	APC Cy7	OKT4	Mouse IgG2b, κ	BioLegend	317450	B238460
Anti-CD8	VioBlue	BW135	Mouse IgG2a	Miltenyi	130-098-066	5170914048
Anti-CD45RO	PerCP y5.5	UCHL1	Mouse IgG2a, κ	BioLegend	304222	B238203
Anti-CCR7	PE Cy7	3D12	Rat IgG2a, κ	BD	557648	2335683
Anti-HLADR	A Fluor700	L243	Mouse IgG2a, κ	BioLegend	307626	B254393
Anti-CD38	PE-DZL	HIT2	Mouse IgG1, κ	BioLegend	303538	B243618
Anti-IL2	PE	MQ1-17H12	Rat IgG2a, κ	BioLegend	500307	7235852
Anti-IFN γ	FITC	4S.B3	Mouse IgG1, κ	BioLegend	502507	5323660
Anti- CD40L	APC	5C8	Mouse IgG2a, κ	Miltenyi	130-098-883	5170914046

Tabla 2. Panel anticuerpos para para medir activación y funcionalidad por citometría de flujo

## 5.8. SENSIBILIZACIÓN DE PLACA

Etiquetar una placa de 24 pozos (Sarstedt, No. de Ref:83.3922) tal como se indica en la figura 9; acto seguido, se prepara 6 ml de anticuerpo anti-CD3 humano agonista (BioLegend, No. de Cat:30043, Clona: UCHT1) a una concentración de 10µg/ml. Añadir 1 ml de la disolución anterior a cada pozo tal como se indica en la figura 8. Incubar la placa toda la noche a 4°C y lavar 3 veces con PBS antes de colocar las células.

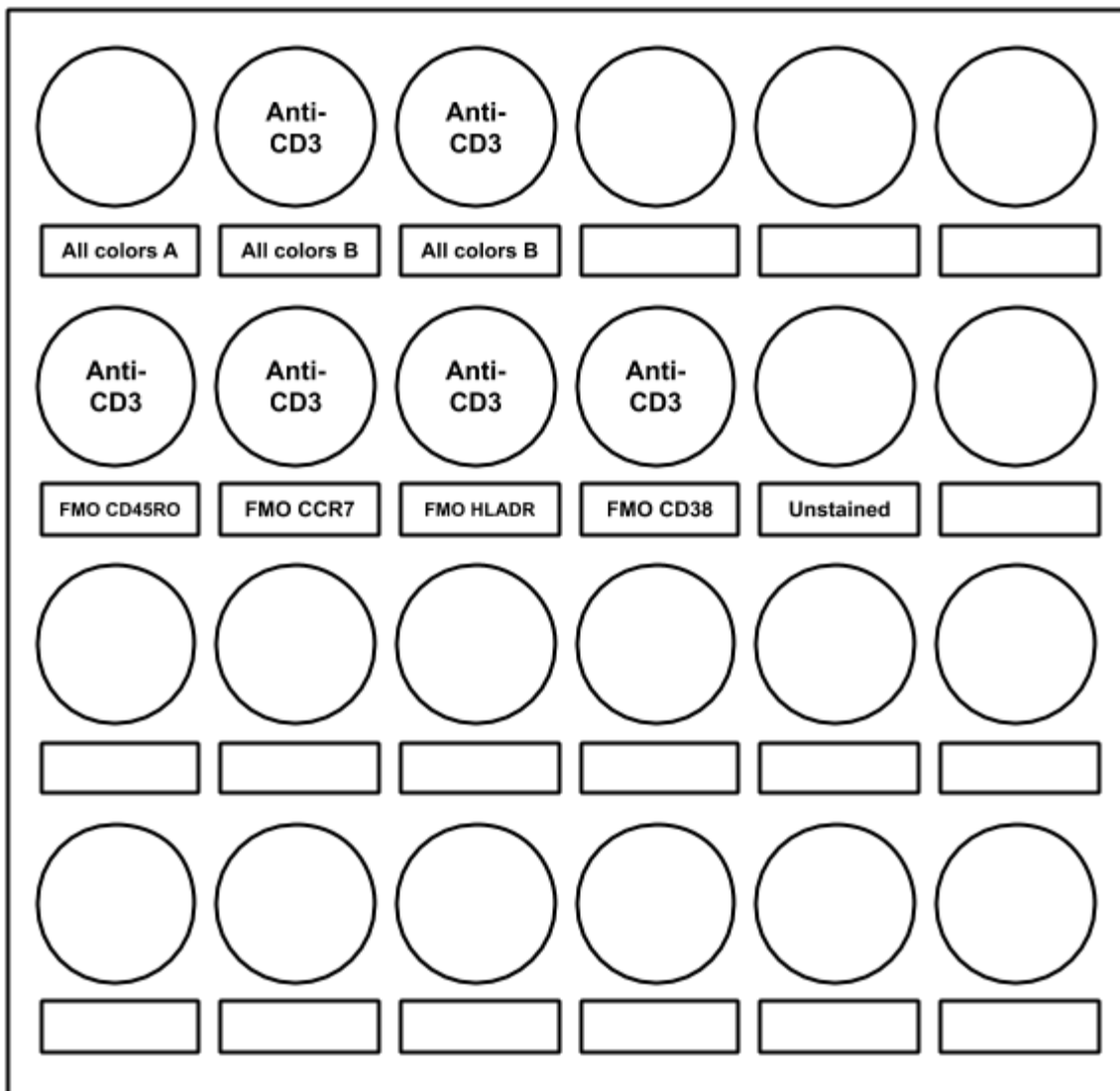


Figura 8. Sensibilización de placa de 24 pozos con anti-CD3 humano agonista.

## 5.9. ESTIMULACIÓN DE LINFOCITOS T

Después de incubar toda la noche, es necesario lavar las células con 10 ml de medio completo. Contar las células tal como se indica en el punto 6.5 y colocar un millón de PBMC en cada uno de los pozos etiquetados. Acto seguido, añadir 1 ml de PBS a los pozos indicados en la Figura 9. Añadir a cada con células pozo; 0.1  $\mu$ L de DNase I, 1  $\mu$ L de anti-CD28 humano agonista (BioLegend, No. de Cat:302934) y 1  $\mu$ L de BD-GolgiPlug Brefeldin A (BD Biosciences, No. de Cat:555029) para inhibir el transporte proteico (Figura 9). Se dejar incubar la placa a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> por 6 horas. Transcurrido ese tiempo, meter la placa al refrigerador a 4°C toda la noche.

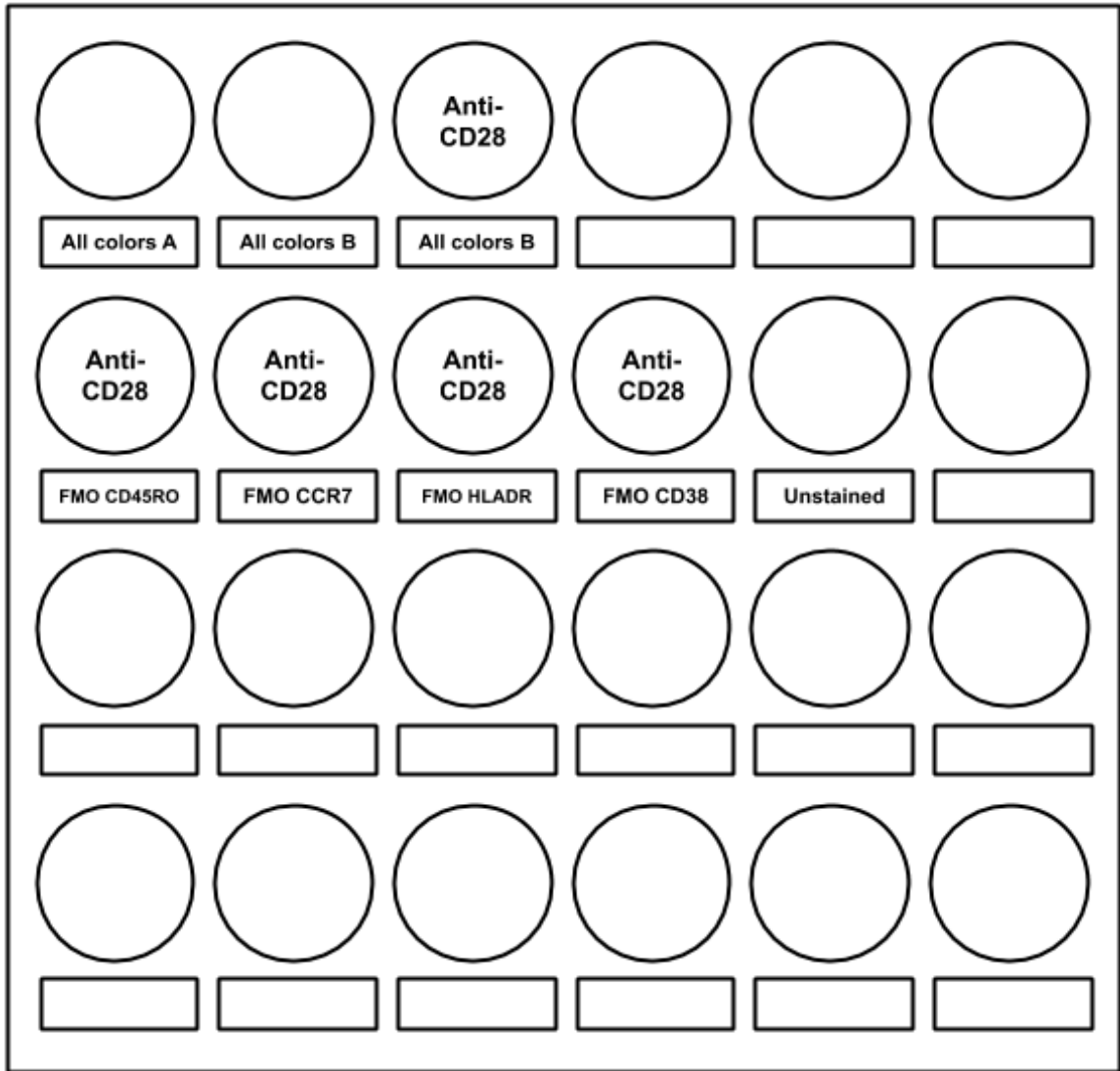


Figura 9. Estímulo de células T con anti-CD3 unido a placa y anti-CD28 soluble

## 5.10. TINCIÓN EXTRACELULAR

Etiquetar 8 tubos de poliestireno de 12X75 de fondo redondo para citometría (Falcon, No. de Cat:10088710) con los mismos rótulos con los cuales se etiquetaron los pozos de la placa (figura 8). Colocar a las células de cada pozo en su respectivo tubo de citometría y lavar una vez con 1 ml de PBS con albumina al 1% a 2500 rpm por 3 minutos. Acto seguido decantar el sobrenadante y resuspender bien el pellet en el PBS remanente. Añadir los volúmenes de anticuerpos indicados en la tabla 3 a los tubos correspondientes. Incubar a 20 minutos en un baño de hielo y por último lavar 2 veces las células con 1 ml de PBA a 2500 rpm por 3 minutos.

Tubo	Volumen de anticuerpos ( $\mu$ l)					
	anti-CD4	anti-CD8	anti-CD45RO	anti-CCR7	anti-HLADR	anti-CD38
All colors A	3	2	4	7.5	2.5	1
All colors B	3	2	4	7.5	2.5	1
All colors C	3	2	4	7.5	2.5	1
FMO CD45RO	3	2	0	7.5	2.5	1
FMO CCR7	3	2	4	0	2.5	1
FMO HLADR	3	2	4	7.5	0	1
FMO CD38	3	2	4	7.5	2.5	0
Unstained	0	0	0	0	0	0

*Tabla 3. Volúmenes de anticuerpos para la tinción extracelular de PBMC*

## 5.11. PERMEABILIZACIÓN DE PBMC

Para llevar a cabo la tinción intracelular, se requiere primero fijar y después permeabilizar las células. Para esto se utiliza el Kit BD Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences, No. de Cat:554714), el cual contiene una solución para fijar y permeabilizar (BD Fixation/Permeabilization) con 4.2% de paraformaldehído que fija los anticuerpos de la tinción extracelular (unir por enlace covalente con las proteínas de la membrana celular) y saponina (tensoactivo que disuelve parcialmente los lípidos de la membrana) para permeabilizar, de tal forma que los anticuerpos de la tinción intracelular sean capaces de llegar a los organelos de interés. Este kit, también tiene una segunda solución de lavado (BD Perm/Wahs Buffer 10X), la cual contiene SFB y saponina con el objetivo de mantener a las células permeabilizadas durante la tinción.

Después del último lavado al final de la tinción extracelular, resuspender el botón de células de cada tubo con 250µL de BD Cytotfix/Cytoperm por 20 minutos a 4°C. Trascorrido ese tiempo, lavar muy bien las células de cada tubo con 1 ml del buffer de tinción BD Perm/Wash 1X dos veces.

## 5.12. TINCIÓN INTRACELULAR

Decantar y resuspender el botón celular con el buffer de tinción remanente. Por último, se procede a adicionar a cada tubo los anticuerpos señalados en la tabla 4. Incuban los anticuerpos con las células por 20 minutos en un baño de hielo en la oscuridad para evitar que se degraden los fluoróforos. Posteriormente lavar las células con 1 ml Wash dos veces. Recuperar el pellet y resuspender en 300  $\mu$ L de paraformaldehído diluido con PBS al 1% (Sigma Aldrich, No. de Cat: F8775) con la finalidad de fijar los anticuerpos a las proteínas intracelulares.

Tubo	Volumen de anticuerpos ( $\mu$ l)		
	anti-CD154	anti-IFN	anti-IL-2
All colors A	1.6	1.2	1
All colors B	1.6	1.2	1
All colors C	1.6	1.2	1
FMO CD45RO	1.6	1.2	1
FMO CCR7	1.6	1.2	1
FMO HLADR	1.6	1.2	1
FMO CD38	1.6	1.2	1
Unstained	0	0	0

Tabla 4. Volúmenes de anticuerpos para la tinción intracelular de PBMC



## **5.13. CONTROLES PARA CITOMETRÍA DE FLUJO**

### **5.13.1. CONTROLES DE COMPENSACIÓN**

Los controles de compensación tienen el objetivo de eliminar la superposición de los espectros de emisión de cada fluoróforo incluido en panel de tinción. Este tipo de controles consiste en muestras monotañidas con cada uno de los fluoróforos. Para preparar los controles de compensación correspondientes a anticuerpos de ratón, etiquetar 7 tubos de la siguiente manera: Compensación CD4-APC Cy7, Compensación CD8-VioBlue, Compensación CD45RO-PerCP Cy5.5, CD38-PE Dazzle, HLADR- Alexa 700, Compensación IFN gamma FITC y CD154-APC. A cada tubo añadir 1 gota de Mouse Comp Beads positivas (BD Biosciences, No. de Cat: 552843, Parte No. 51-90-9001229) y 1 gota de Mouse Comp Beads negativas (BD Biosciences, No. de Cat: 552843, Parte No. 51-90-9001291). Por último, se adicionar a cada tubo los volúmenes especificados en Tabla 3 y Tabla 4 del anticuerpo correspondiente. La compensación de la fluorescencia proveniente de anticuerpos de rata se compensa etiquetando 2 tubos como: Compensación IL-2 PE y Compensación CCR7-PE Cy7. A cada tubo se le adiciona 1 gota de Rat Comp Beads positivas (BD Biosciences, No. de Cat: 552844, Parte No. 51-90-9001189) y 1 gota de Rat Comp Beads negativas (BD Biosciences, No. de Cat: 552844, Parte No. 51-90-9001291). Adicionar el volumen de anticuerpo especificado en la Tabla 3 y Tabla 4 correspondiente a cada tubo. Por último, se etiquetar un tubo como Compensación negativa y adicionar únicamente una gota de Comp Beads negativas. Dejar incubando los tubos con los anticuerpos por 20 minutos en baño de hielo y acto seguido se lavar las perlas dos veces con 1 ml de PBS con albúmina 1% a 1500 rpm por 5 minutos, después del lavado se resuspender las Comp Beads en 250 µL de PBS con albúmina 1% para analizarlas en el citómetro de flujo.

### **5.13.2. CONTROLES DE COMPENSACIÓN FMO**

Los controles de compensación FMO (*fluorescence minus one* por sus siglas en inglés) son muestras celulares teñidas con todos los fluorocromos menos con la fluorescencia que se desea compensar. Se hicieron FMO de: PerCP Cy5.5 anti-CD45RO, PE Cy7 anti-

CCR7, PE Dazzle 594 anti-CD38 y Alexa Fluor 700 anti-HLADR. La metodología para preparar este tipo de controles se describe en las secciones 5.10 y 5.12.

#### 5.13.4. CITÓMETRO DE FLUJO

Las muestras se procesaron en un citómetro de flujo BD FACS ARIA II A con la configuración que se muestra en la siguiente tabla.

Laser Azul 488nm	Long Pass	Fluorocromos
A 780/60	750LP	PE-Cy7
B 695/40	655LP	PerCP, Pe-Cy5, PerCp-Cy5.5
C 610/20	595LP	PE- Texas Red, 7AAD, PI
D 575/26	556LP	PE
E 530/30	502LP	FITC, AF488, CFSE, GFP
F 488/10	-	SSC
G	-	-
H	-	-
Laser Rojo 633nm	Long Pass	Fluorocromos
A 780/60	735LP	APC-Cy7, APC-H7
B 730/45	710LP	AF700
C 660/20	-	APC, AF647
Laser violeta 405 nm	Long Pass	Fluorocromos
A 530/30	502LP	Amcyan, Aquadye, UV500, BV510
B 450/40	-	DAPI, Pacific Blue, Cascade Blue, UV450, BV421
C	-	-

*Tabla 5. Configuración del equipo FACS ARIA IIA*

Este aparato recibe diariamente mantenimiento continuo; se calibra todos los días con el objetivo de asegurar la correcta alineación de los láseres según los voltajes de referencia. En caso de que exista un problema con la calibración diaria se aplican acciones preventivas o acciones correctivas según sea el caso<sup>104</sup>.

## **5.14. DETERMINACIÓN DE LPS EN PLASMA**

El LPS en plasma se determinó con el kit Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit (Termo Fisher, Cat: 88282). Las muestras de plasma fueron procesadas en el departamento “Microbiology and Immunology Division of Infectious Disease, de la Medical University of South Carolina” por medio de una colaboración con la Dra. Wei Jiang.

La endotoxina bacteriana cataliza la activación de una proenzima (ver glosario) contenida en el lisado de amebocitos de Limulus LAL. La proenzima activada cataliza la formación de la p-nitroanilina p-NA (producto colorido) a partir de Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA (sustrato incoloro). Después de detener la reacción, se determina la absorbancia de la muestra a 405-510 nm en un espectrofotómetro; este valor es proporcional a la concentración de LPS en la muestra. La concentración de LPS en el plasma se calcula por medio de una curva de calibración.

## 5.15. ANÁLISIS

### 5.15.1. ANÁLISIS DE METADATOS FCS

El análisis de los metadatos (ver glosario) de citometría de flujo (archivos FCS) se realizó con el software Flow Jo, LLC 2018 10.5.3 para delimitar en las poblaciones y subpoblaciones de linfocitos T (Figura 10) el porcentaje de células T activadas (Figura 11) y el porcentaje de células T disfuncionales (Figura 12).

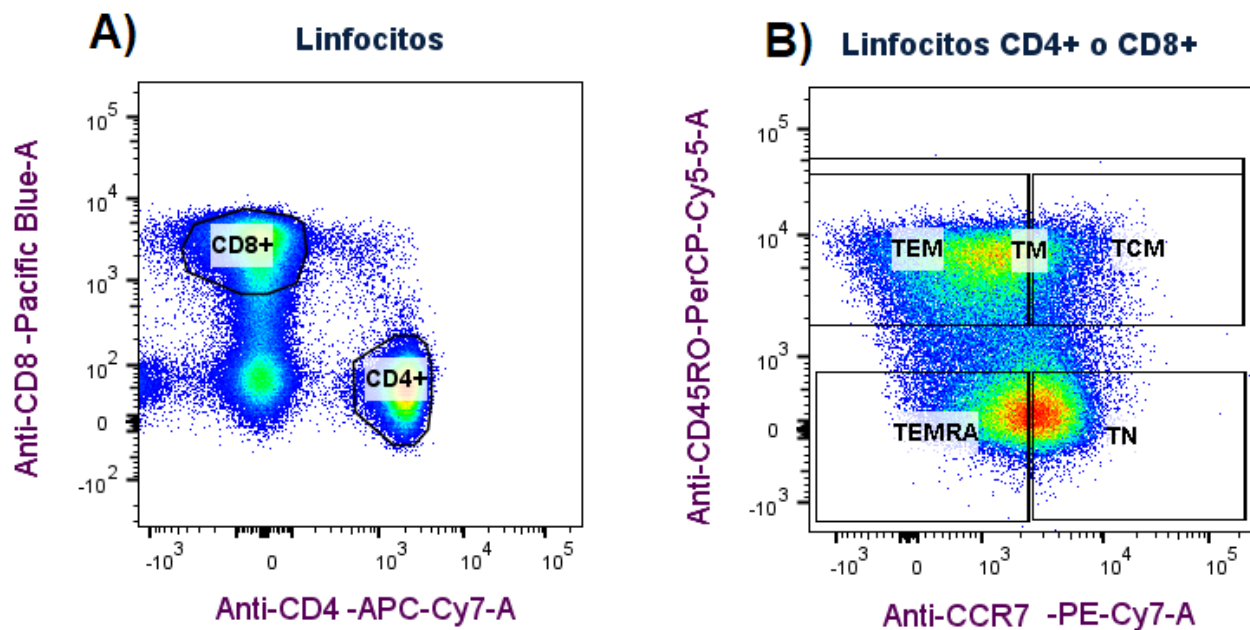


Figura 10. Estrategia de delimitación de poblaciones y subpoblaciones

A) Delimitación de las poblaciones de linfocitos, B) Delimitación de las subpoblaciones de linfocitos T. Los linfocitos T se identificaron por sus propiedades de dispersión de la luz en el citómetro de flujo; forward scatter FCS (dispersión frontal) y side scatter SSC (dispersión lateral). La estrategia de análisis completa se encuentra en el Anexo 5 y el Anexo 6. La población de linfocitos se determina dependiendo de la expresión de los marcadores CD4 y CD8 (Figura 10A). Por último cada subpoblación linfocitaria se identifica por medio de la expresión de los marcadores CCR7 y CD45RO<sup>hi</sup> (Figura 10B). Los linfocitos T con el fenotipo CD45RO<sup>hi</sup> CCR7<sup>-</sup> se identificaron como linfocitos T de memoria efectora (TEM), con el fenotipo CD45RO<sup>hi</sup> CCR7<sup>+</sup> se identificaron como linfocitos T de memoria central (TCM), con el fenotipo CD45RO-CCR7<sup>-</sup> como linfocitos T de memoria efectora CD45RA<sup>+</sup> (TEMRA) y con el fenotipo CD45RO-CCR7<sup>+</sup> se identificaron como linfocitos T Naive<sup>72,105</sup>.

Para este trabajo la activación de células T (Figura 11) se entiende por el porcentaje de células de una población o subpoblación de linfocitos T que coexpresen en su superficie las moléculas HLADR y CD38 (marcadores de activación).

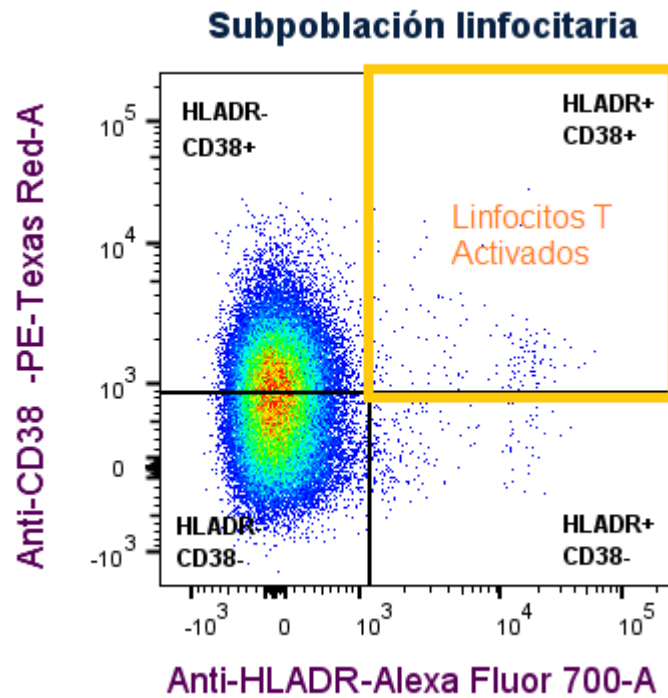
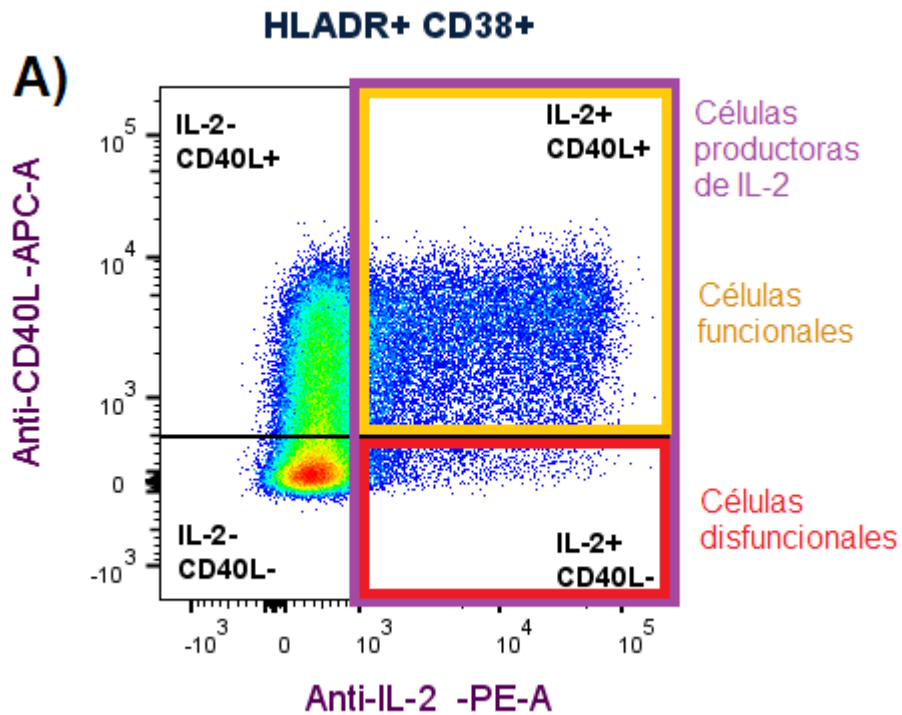


Figura 11. Fenotipo de linfocitos T activados  
 Los linfocitos T activados son células que coexpresan a los marcadores de activación HLADR y CD38<sup>106,107</sup>



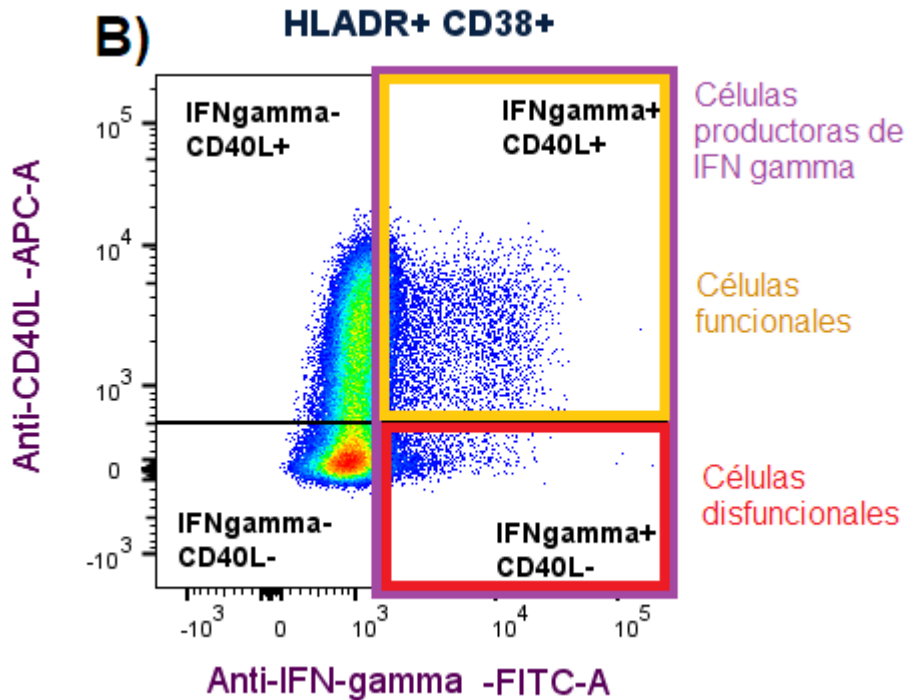


Figura 12. Estrategia de delimitación de células T disfuncionales

Las células T disfuncionales son aquellas células productoras de citocinas, ya sea IL-2 o IFN gamma que no expresen CD40L en respuesta a la estimulación a través del receptor de linfocitos T.

La funcionalidad se determinó por medio de la coexpresión de citocinas las citocinas IL-2 e IFN gamma con el ligando de CD40 o CD40L<sup>80,81</sup>, el cual es necesario para la sinapsis con otras células de la inmunidad. Las células funcionales son aquellas que al ser estimuladas por medio del receptor de linfocitos T inducen la producción de citocinas junto con CD40L. Por ende, las células disfuncionales son aquellas células T que al ser estimuladas por medio de su TCR induzcan la producción de citocinas sin la expresión de CD40L (Figura 12). Para este trabajo, la disfuncionalidad se entiende como el porcentaje de células disfuncionales de alguna población o subpoblación de linfocitos T, el cual puede calcularse por medio de la siguiente formula:

$$\text{Disfuncionalidad} = \frac{\%(\text{IL2+ CD40L-})}{\%\text{IL2+}} \times 100 \quad \text{o} \quad \frac{\%(\text{IFNgamma+ CD40L-})}{\%\text{IFNgamma+}} \times 100$$

### **5.15.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS**

Se utilizó el programa GraphPad Prism 8 para analizar y graficar los datos obtenidos. Debido a que la distribución de los datos no sigue un comportamiento normal se utilizaron pruebas no paramétricas para su análisis.

Se comparó el porcentaje de activación de las poblaciones y subpoblaciones de linfocitos T de adultos eutróficos, obesos, obesos mórbidos y obesos mórbidos sometidos a la cirugía bariátrica. Se graficaron los valores individuales y las medianas con un intervalo de confianza del 95%. La diferencia estadística entre grupos se determinó por medio de un análisis de varianza (ANADEVA) no paramétrico Kruskal-Wallis ( $p < 0.05$ ). Se determinó el grado de correlación entre el porcentaje de las poblaciones y subpoblaciones de células T activadas con su respectivo IMC por medio del análisis de correlación de Spemann ( $p < 0.05$ ). Se realizó el mismo análisis descrito anteriormente para los mismos sujetos con las concentraciones de LPS (pg/ml) en plasma.

Se comparó el porcentaje de activación de las poblaciones y subpoblaciones de linfocitos T de niños eutróficos y obesos. Se graficaron los valores individuales y las medianas con un intervalo de confianza del 95%. La diferencia estadística entre dos grupos se determinó por medio la prueba no pareada para datos no paramétricos U de Mann Whitney ( $p < 0.05$ ). Se realizó el mismo análisis descrito anteriormente para los mismos sujetos con las concentraciones de LPS (pg/ml) en plasma. Se determinó el grado de correlación entre el porcentaje de las poblaciones y subpoblaciones de células T activadas con la concentración de LPS (pg/ml) en plasma por medio del análisis de correlación de Spemann ( $p < 0.05$ ) en niños y adultos por separado.

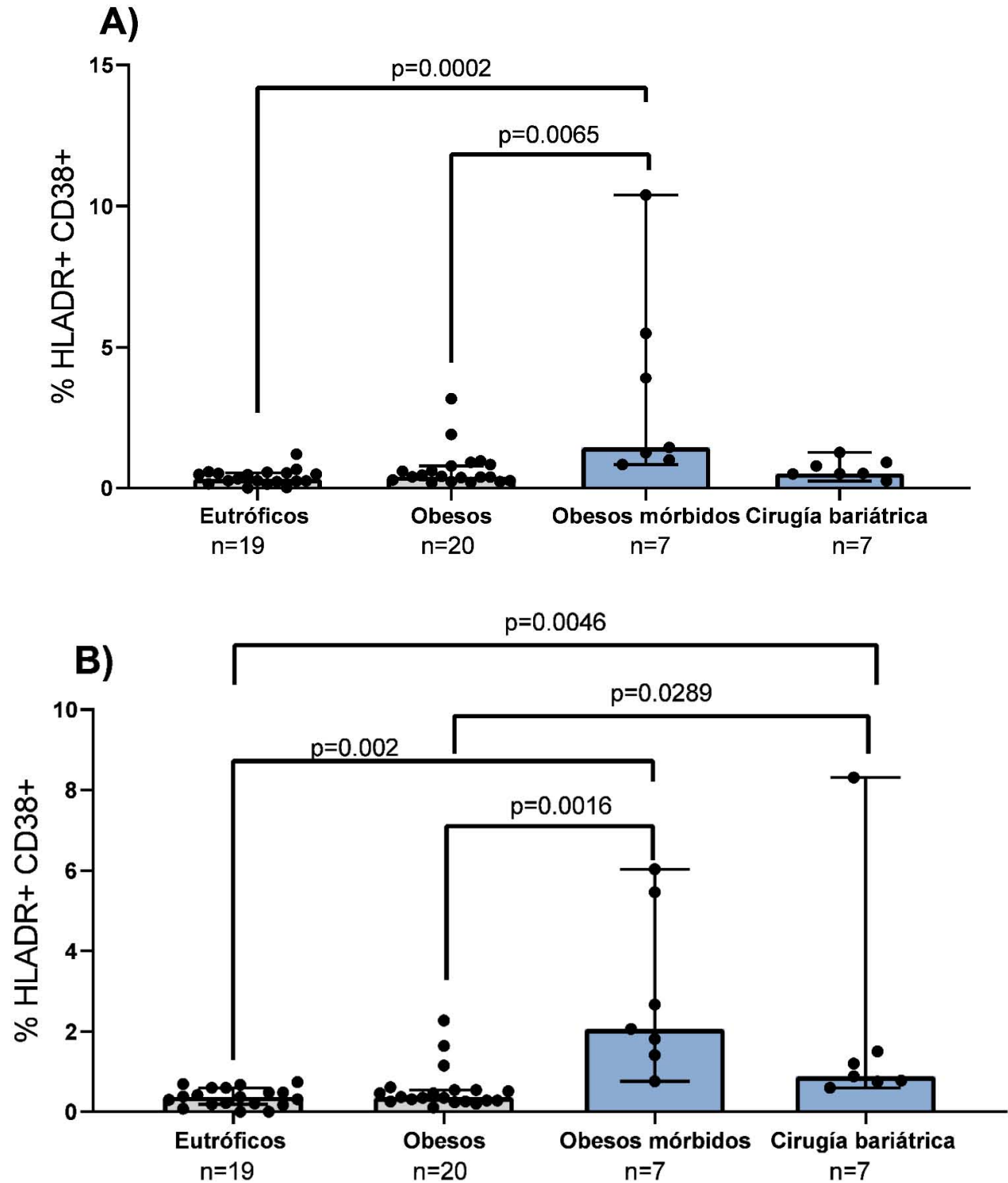
Se comparó el porcentaje de activación de las poblaciones y subpoblaciones de linfocitos T de niños y adultos, obesos y eutróficos. Se graficaron los valores individuales y las medianas con un intervalo de confianza del 95%. La diferencia estadística entre grupos se determinó por medio de un análisis de varianza (ANADEVA) no paramétrico Kruskal-Wallis ( $p < 0.05$ ).

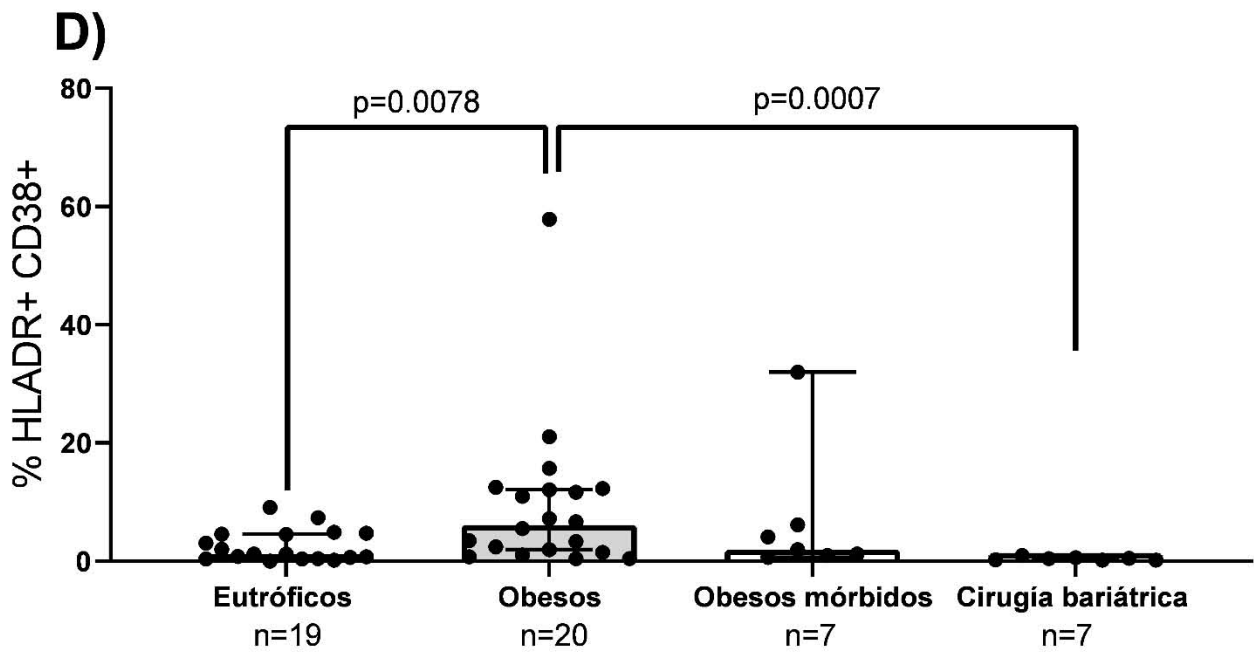
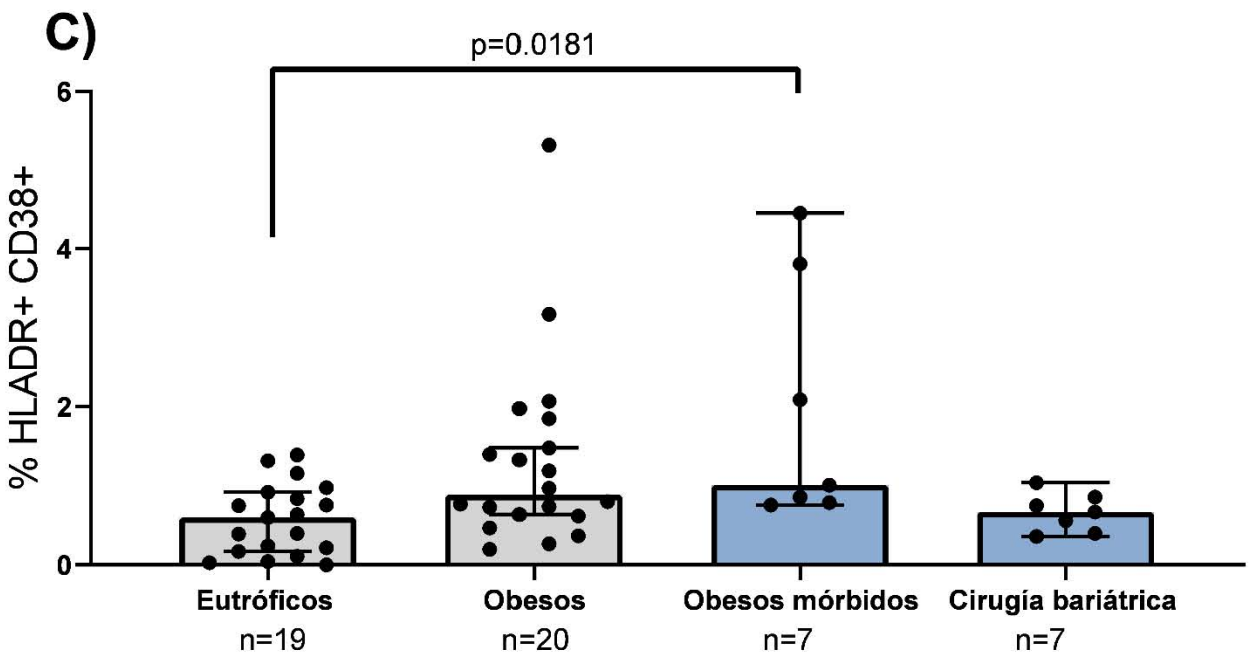
Se comparó el grado de disfuncionalidad de linfocitos T CD4+ y T CD8+ con fenotipo activado y no activado de pacientes con obesidad mórbida antes de la cirugía bariátrica y un año después de esta. No se realizaron pruebas estadísticas debido a la escasa cantidad de datos.



## 6. RESULTADOS

### 6.1. ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T Y SUS SUBPOBLACIONES EN ADULTOS





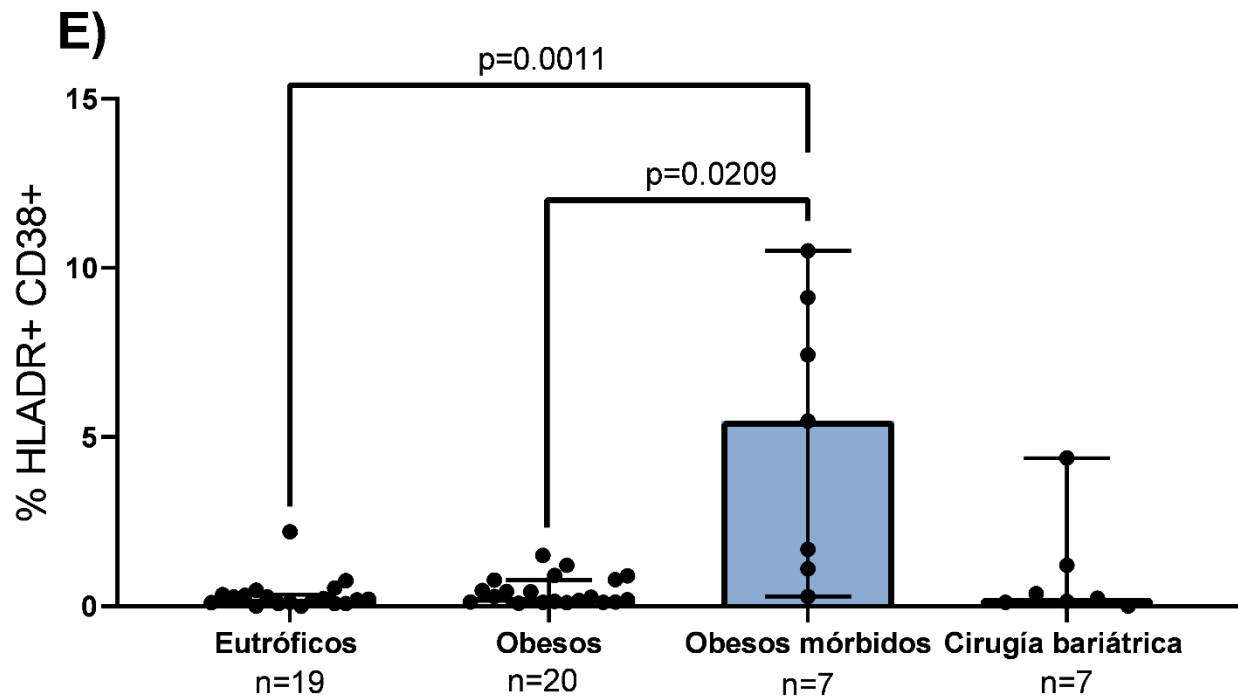
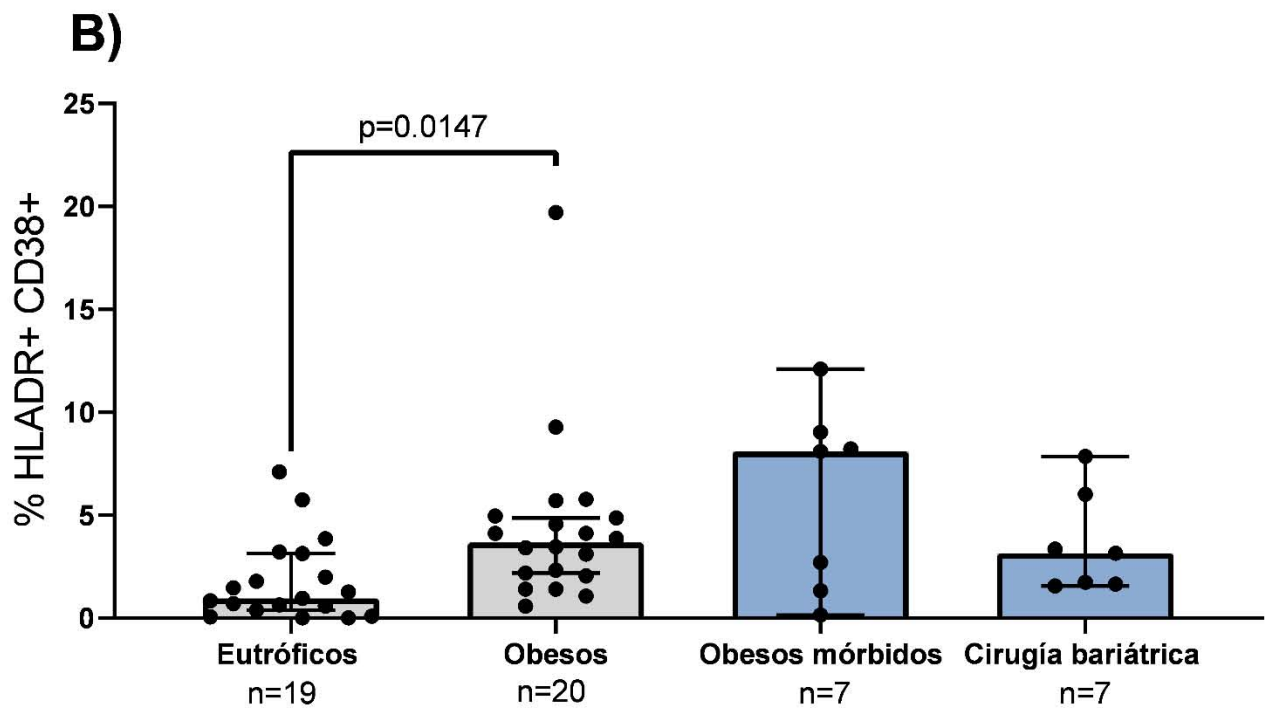
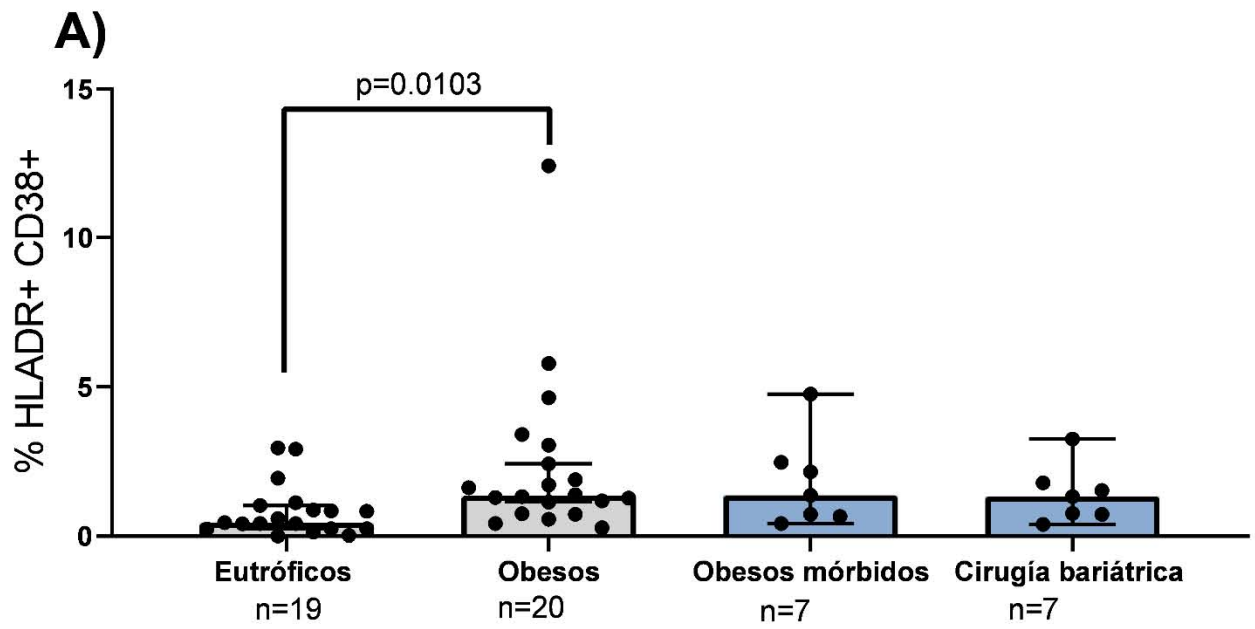


Figura 13. Activación de linfocitos T CD4+ de adultos'

A) Total de linfocitos T CD4+, B) Linfocitos T de memoria centrales ( $T_{CM}$ ) CD4+, C) Linfocitos T de memoria efectora ( $T_{EM}$ ) CD4+, D) Linfocitos T de memoria efectora CD45RA+ ( $T_{EMRA}$ ) CD4+ y E) Linfocitos T de naive ( $T_N$ ) CD4+. El porcentaje de células activadas fue significativamente mayor en obesos con respecto a eutróficos únicamente en la subpoblación de linfocitos  $T_{EMRA}$  ( $p=0.0078$ ). En obesos mórbidos se observa una activación de células T significativamente mayor con respecto a los eutróficos en las células T totales CD4+ ( $p=0.0002$ ), células  $T_{CM}$  ( $p=0.002$ ), células  $T_{EM}$  ( $p=0.0181$ ) y en células  $T_N$  ( $p=0.0011$ ); y significativamente mayor que obesos en células T totales CD4+ ( $p=0.0065$ ), células  $T_{CM}$  CD4+ ( $p=0.0016$ ) y células  $T_N$  CD4+ ( $p=0.0209$ ).

La activación de células T CD4 + y de sus subpoblaciones es significativamente mayor en los adultos obesos (Figura 13A, B, C, D y E). En cuanto a los pacientes que se sometieron a la cirugía bariátrica, se observó disminución en la activación en Linfocitos T CD4+, Linfocitos  $T_{CM}$  CD4 y Linfocitos  $T_N$  CD4+, a pesar de no existir diferencia estadísticamente significativa.



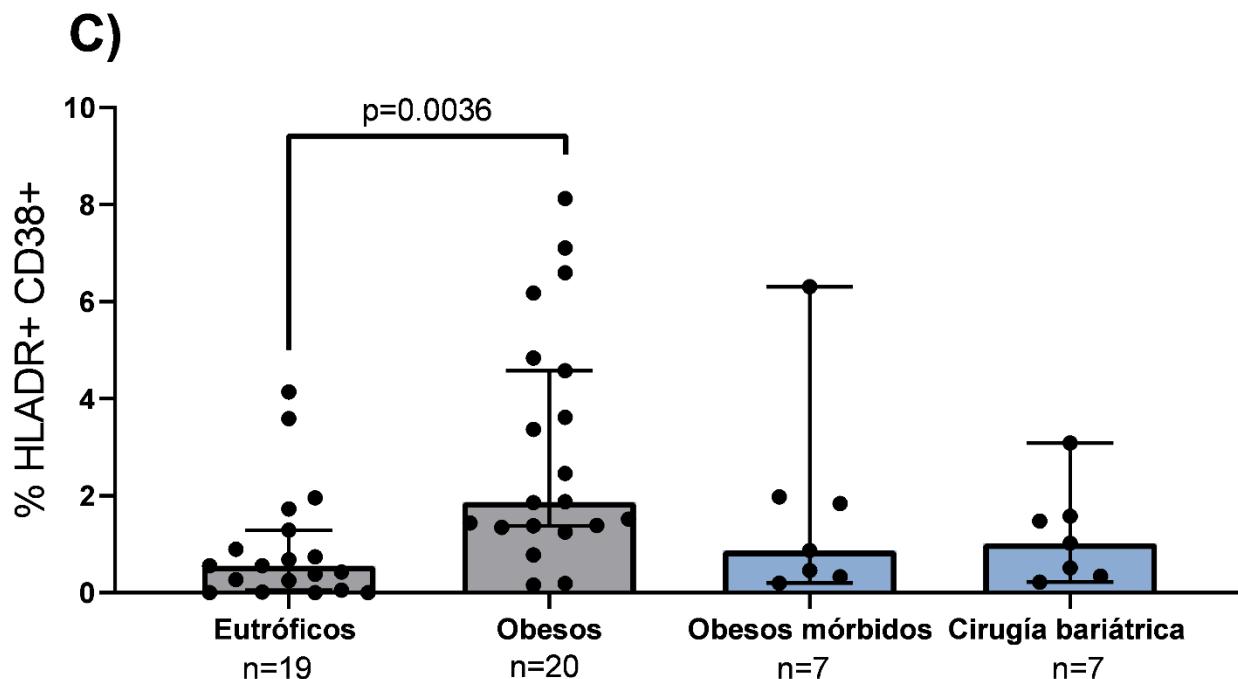


Figura 14. Activación de linfocitos T CD8+ de adultos

A) Total de linfocitos T CD8+, B) Subpoblación de linfocitos T de memoria efectora ( $T_{EM}$ ) CD8+ y C) subpoblación de linfocitos T de memoria efectora CD45RA+ ( $T_{EMRA}$ ) CD8+.

La activación obesos es significativamente mayor con respecto a eutróficos en el total de linfocitos T CD8+ ( $p=0.0103$ ), en la subpoblación  $T_{EM}$  CD8+ ( $p=0.0147$ ), y en la subpoblación  $T_{EMRA}$  ( $p=0.0036$ ).

Población de célula T de pacientes eutróficos (Grupo control)	Población de célula T de pacientes obesos	Población de célula T de pacientes obesos mórbidos	Población de célula T de pacientes obesos mórbidos después de la cirugía bariátrica
Linfocitos T CD4+	Sin tendencia	Significativamente mayor $p=0.0002$	Sin tendencia
Linfocitos T de memoria efectora CD4+	Tiende a ser mayor	Significativamente mayor $p=0.0181$	Tiende a disminuir
Linfocitos T de memoria central CD4+	Sin tendencia	Significativamente mayor $p=0.002$	Tiende a disminuir
Linfocitos T naive CD4+	Sin tendencia	Significativamente mayor $p=0.0011$	Tiende a disminuir
Linfocitos T de memoria efectora CD45RA+ CD4+	Significativamente mayor $p=0.0078$	Sin tendencia	Sin tendencia
Linfocitos T CD8+	Significativamente mayor $p=0.0103$	Sin tendencia	Sin tendencia

Linfocitos T de memoria efectora CD8+	Significativamente mayor p=0.0147	Tiende a ser mayor	Sin tendencia
Linfocitos T de memoria central CD8+	Tiende a ser mayor	Sin tendencia	Sin tendencia
Linfocitos T naive CD8+	Tiende a ser mayor	Sin tendencia	Sin tendencia
Linfocitos T de memoria efectora CD45RA+ CD4+	Significativamente mayor p=0.0036	Sin tendencia	Sin tendencia

*Tabla 6. Diferencia en cuanto a activación de células T y sus subpoblaciones entre los grupos de obesos y obesos mórbidos antes y después de la cirugía bariátrica con respecto a sujetos eutróficos adultos*

La activación de células T CD8+ de adultos es significativamente mayor en obesos con respecto a los eutróficos de manera generalizada (Figura 14A, B y C). En cuanto a los obesos mórbidos no se observa diferencia estadísticamente significativa en el grado de activación de sus linfocitos T CD8+ con respecto a los eutróficos y obesos; a pesar de ello, la mediana de la activación en obesos mórbidos tiende a ser mayor en la subpoblación de linfocitos T<sub>EM</sub> CD8+ (Figura 14B). En cuanto a los pacientes con obesidad mórbida que se sometieron a la cirugía bariátrica, no se observó diferencia en la activación de linfocitos T CD8+ después de la cirugía bariátrica, ver tabla 6.

En el anexo 7 se puede observar que no hubo cambio en la activación de linfocitos T CD8+ y sus subpoblaciones después de la cirugía bariátrica.

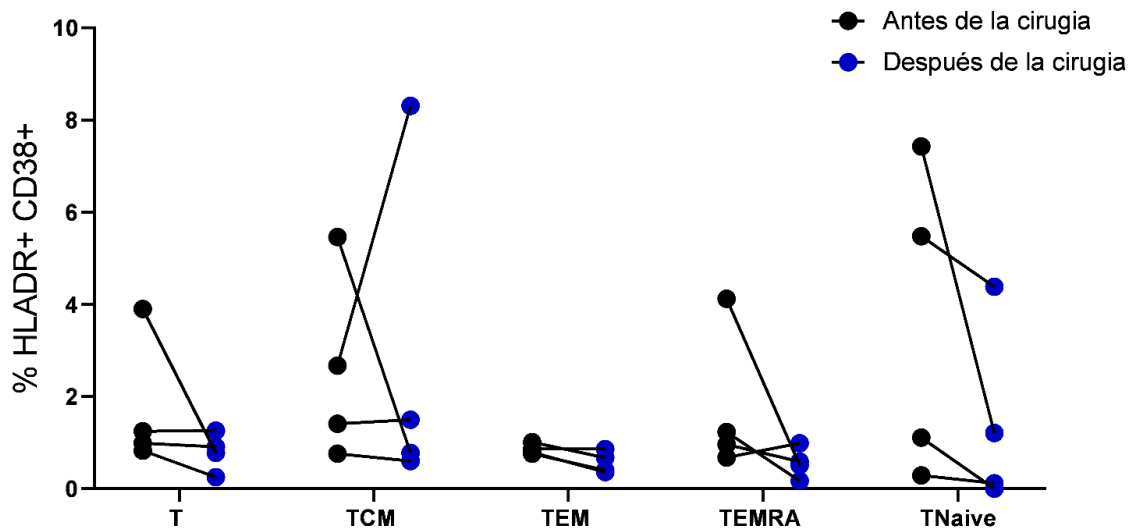


Figura 15. Activación del total linfocitos T CD4+ antes y después de la cirugía bariátrica. En la figura 16 se puede apreciar que el grado de activación tiende a disminuir en el total de linfocitos T CD4+, en la subpoblación de linfocitos T<sub>CM</sub> en un solo paciente, en la subpoblación de linfocitos T<sub>EM</sub> CD4+ de tres pacientes, en la subpoblación de linfocitos T<sub>EMRA</sub> CD4+ de tres pacientes y en las subpoblaciones de linfocitos T<sub>N</sub> de todos los pacientes analizados. En uno de los pacientes el grado de activación aumentó después de la cirugía bariátrica en las subpoblaciones de linfocitos CD4+ T<sub>EM</sub> y T<sub>EMRA</sub>.

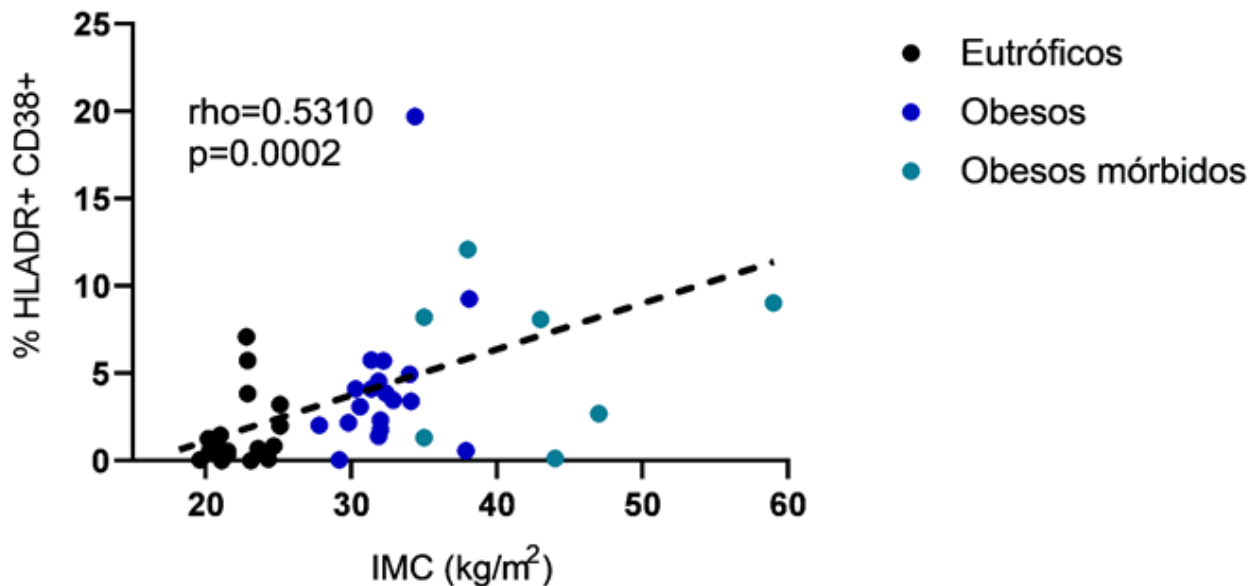


Figura 16. Correlación entre el índice de masa corporal y la activación de Linfocitos de adultos TEM CD8+. El IMC de pacientes adultos correlaciona significativamente de manera positiva con el grado de activación de la subpoblación de linfocitos T<sub>EM</sub> (rho=0.5310, p=0.0002). Para este análisis se incluyeron los resultados los pacientes eutróficos, obesos y obesos mórbidos preoperatorios.

El IMC de pacientes adultos guarda correlación significativa con el porcentaje de células activadas de la subpoblación de linfocitos T<sub>EM</sub>. Se observa que la tendencia entre estas dos variables es positiva.

## 6.2. CONCENTRACIÓN DE LPS EN EL PLASMA DE ADULTOS

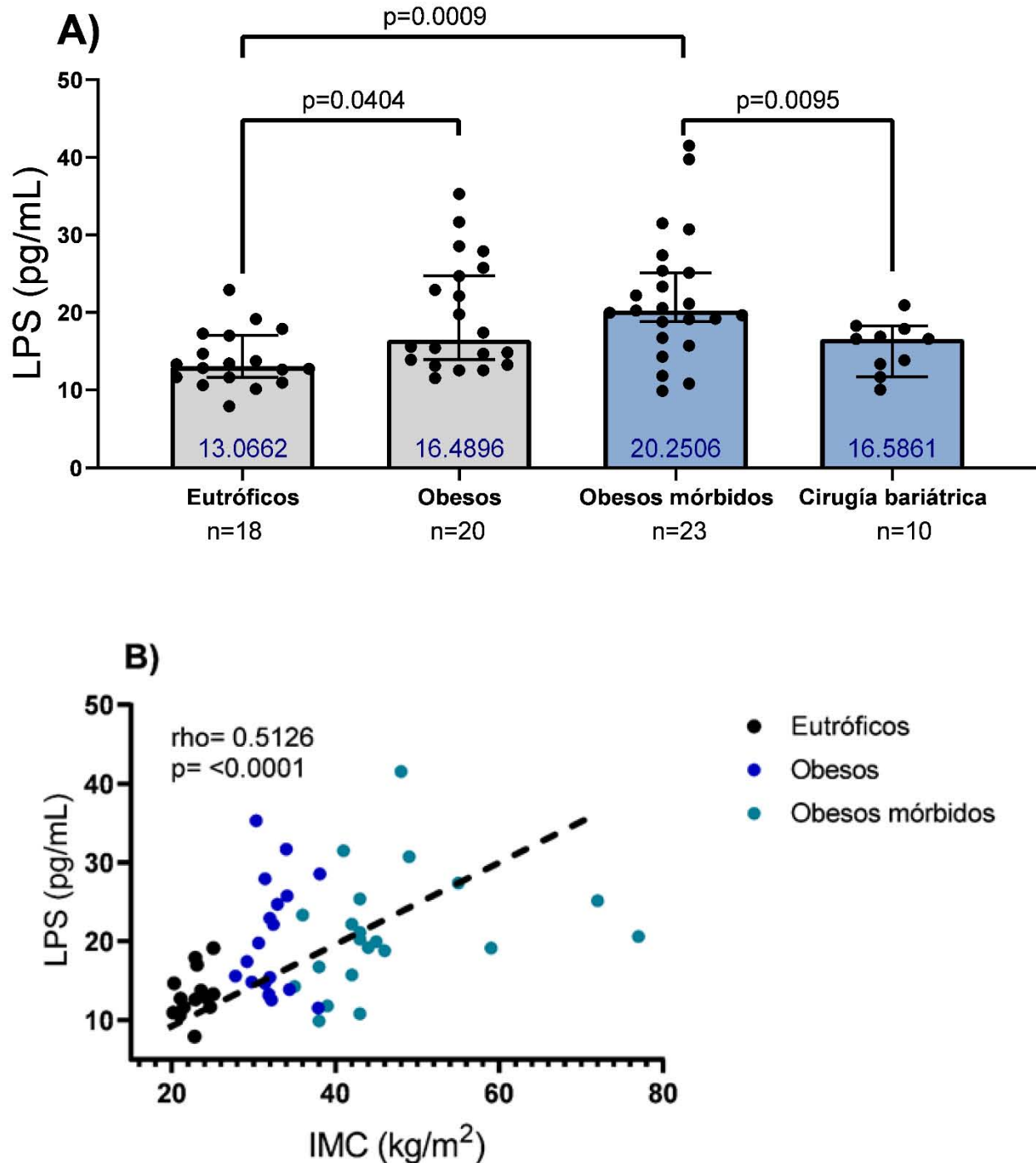


Figura 17. Concentración de LPS en sangre de adultos

A) Gráfica de valores individuales y medianas. B) Correlación de Spearman ( $p < 0.05$ ). Para este análisis se incluyeron los resultados los pacientes eutróficos, obesos y obesos mórbidos preoperatorios.

Las concentraciones de LPS en plasma son mayores en obesos ( $p = 0.0404$ ) y en obesos mórbidos ( $p = 0.0009$ ) comparados con los eutróficos. Al año de la cirugía bariátrica, la concentración en el plasma de los pacientes se redujo significativamente ( $p = 0.0095$ ).

De manera adicional, existe correlación entre el IMC y las concentraciones de LPS en plasma en adultos ( $\rho = 0.5126$ ,  $p < 0.0001$ ).



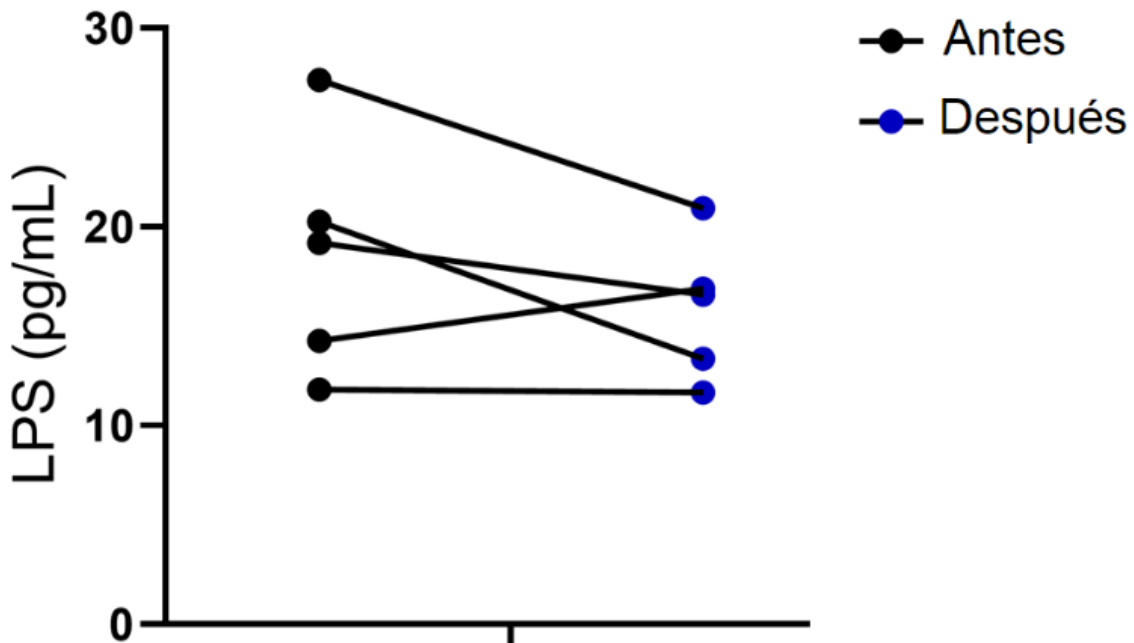


Figura 18. Concentraciones de LPS antes y después de la cirugía bariátrica

La concentración de LPS tienen disminuir en 3 de los pacientes analizados; en uno de los pacientes parece no existir cambio y en otro de los pacientes la concentración de LPS en plasma aumenta después de la cirugía bariátrica.

No se encontró correlación alguna entre la activación de células T CD4+ o CD8+, ni en ninguna de sus subpoblaciones con la concentración de LPS en sangre.

### 6.3. DISFUNCIONALIDAD DE LINFOCITOS T ACTIVADOS

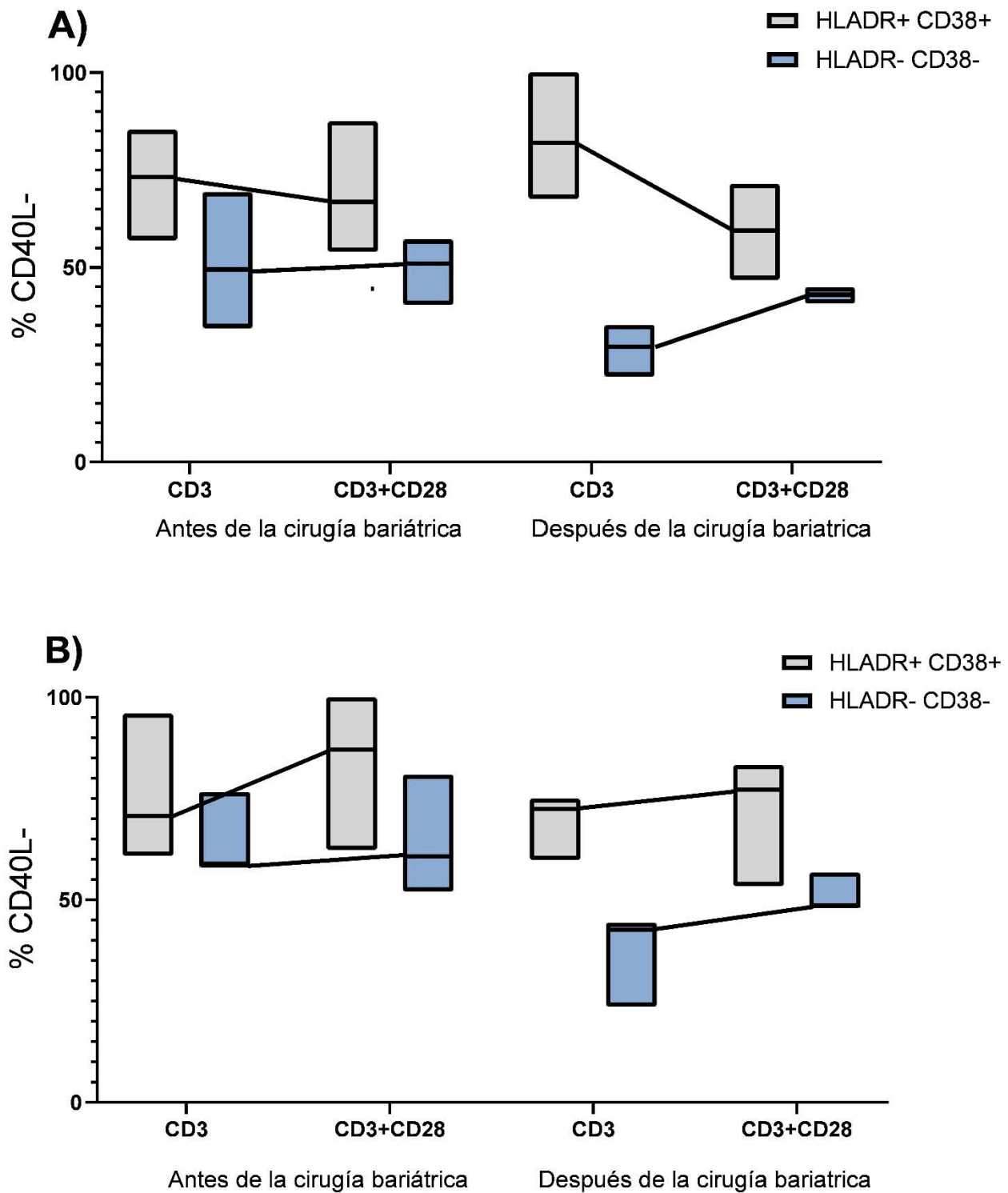
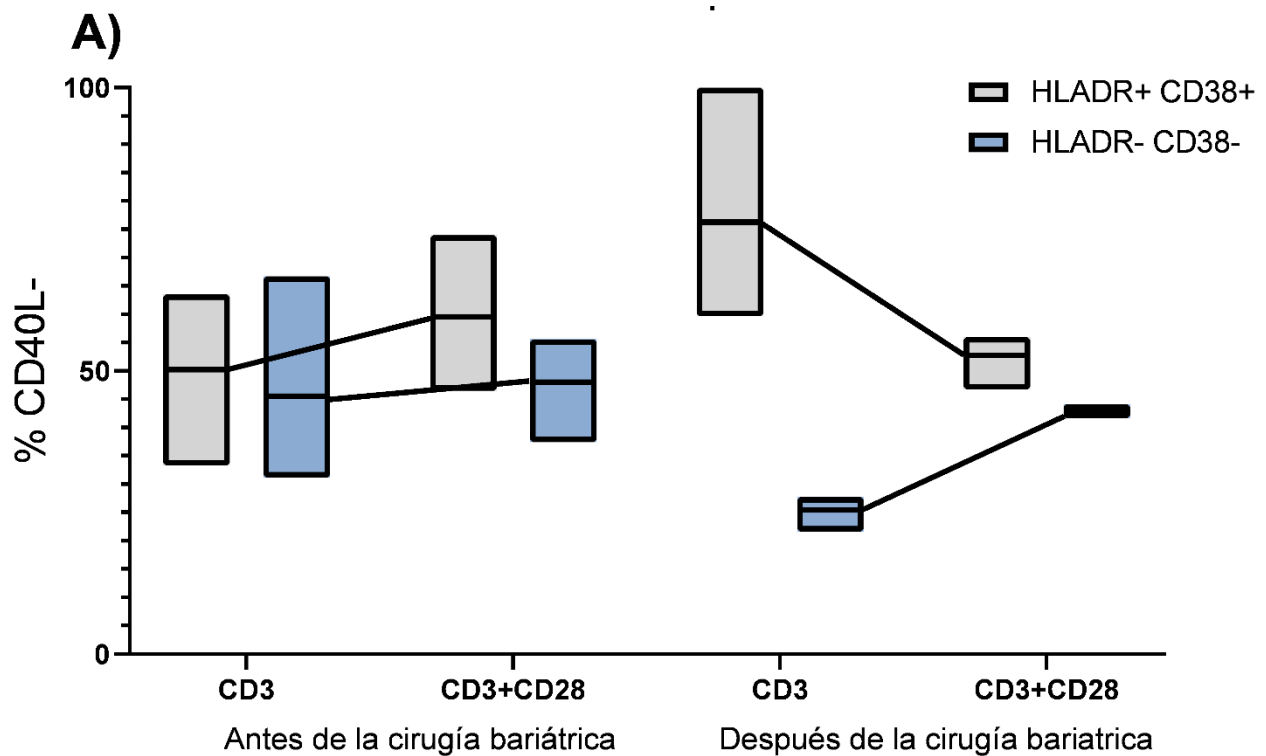


Figura 19. Disfuncionalidad de linfocitos T CD4+  
Linfocitos T productores de A) IL-2 antes y después de la cirugía bariátrica y B) IFN gamma antes y después de la cirugía bariátrica.

La población de linfocitos T CD4+ con fenotipo activado presentan mayor porcentaje de células disfuncionales con respecto a linfocitos T CD4 + no activados (Figura 19), tanto en células con un único estímulo (CD3) como en aquellas con ambos estímulos (CD3 y CD28). En las células T CD4+ activadas no se observó cambio en el porcentaje de células disfuncionales después de la cirugía bariátrica. En cuanto a la población de linfocitos T CD4+ no activados el porcentaje de células disfuncionales tendió a disminuir al año de la cirugía bariátrica.



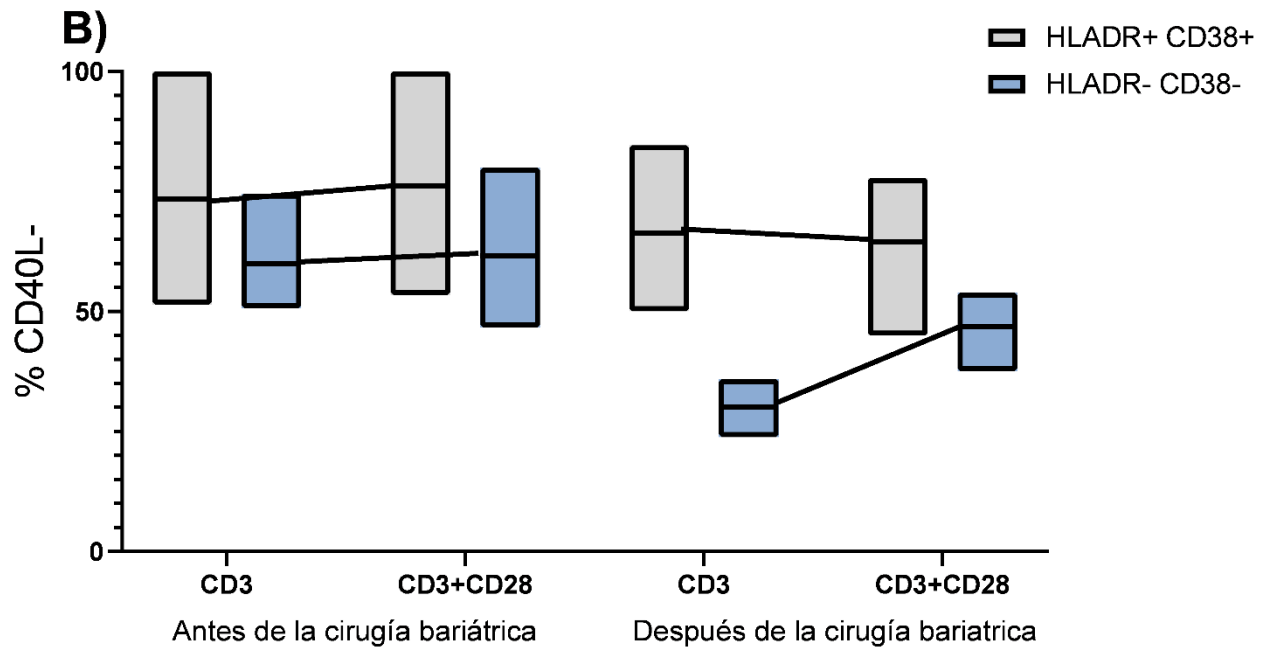


Figura 20. Disfuncionalidad de linfocitos T de memoria (T<sub>M</sub>) CD4+  
Linfocitos T productores de A) IL-2 antes y después de la cirugía bariátrica y B) IFN gamma antes y después de la cirugía bariátrica

La subpoblación de linfocitos T de memoria CD4+ de memoria productores de IL-2 activados (Figura 20A) presentan mayor porcentaje de linfocitos disfuncionales con respecto a los linfocitos no activados de esta misma población. El fenómeno descrito anteriormente puede verse antes de la cirugía bariátrica y un año después de esta. Este efecto también se observa en la subpoblación células T<sub>M</sub> CD4+ productoras de IFN gamma+. En la subpoblación de linfocitos T<sub>M</sub> no activadas productoras de IL-2 o IFN gamma parece disminuir porcentaje de células disfuncionales al año de la cirugía bariátrica. En cambio, en la subpoblación de linfocitos T<sub>M</sub> activados no existe cambio al año de la cirugía bariátrica (Figura 20).

## 6.4. ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T Y SUS SUBPOBLACIONES EN NIÑOS

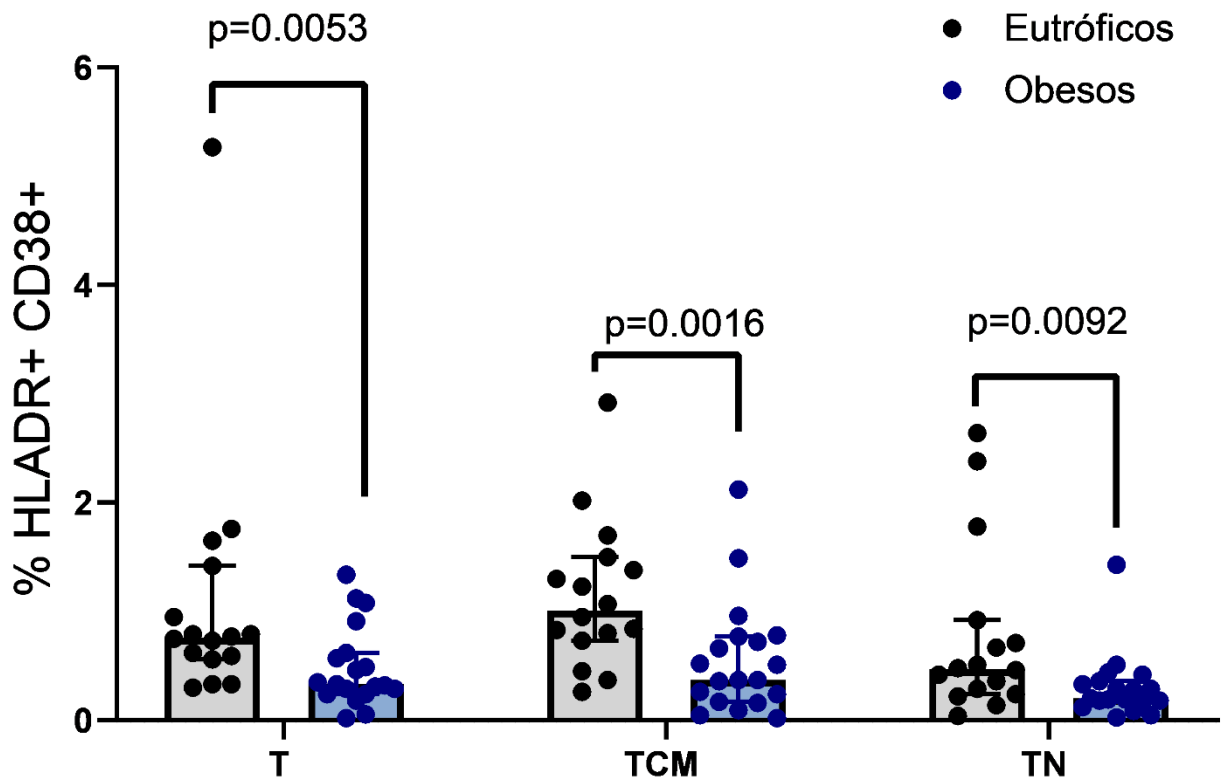


Figura 21. Activación de Linfocitos T CD4+ de niños

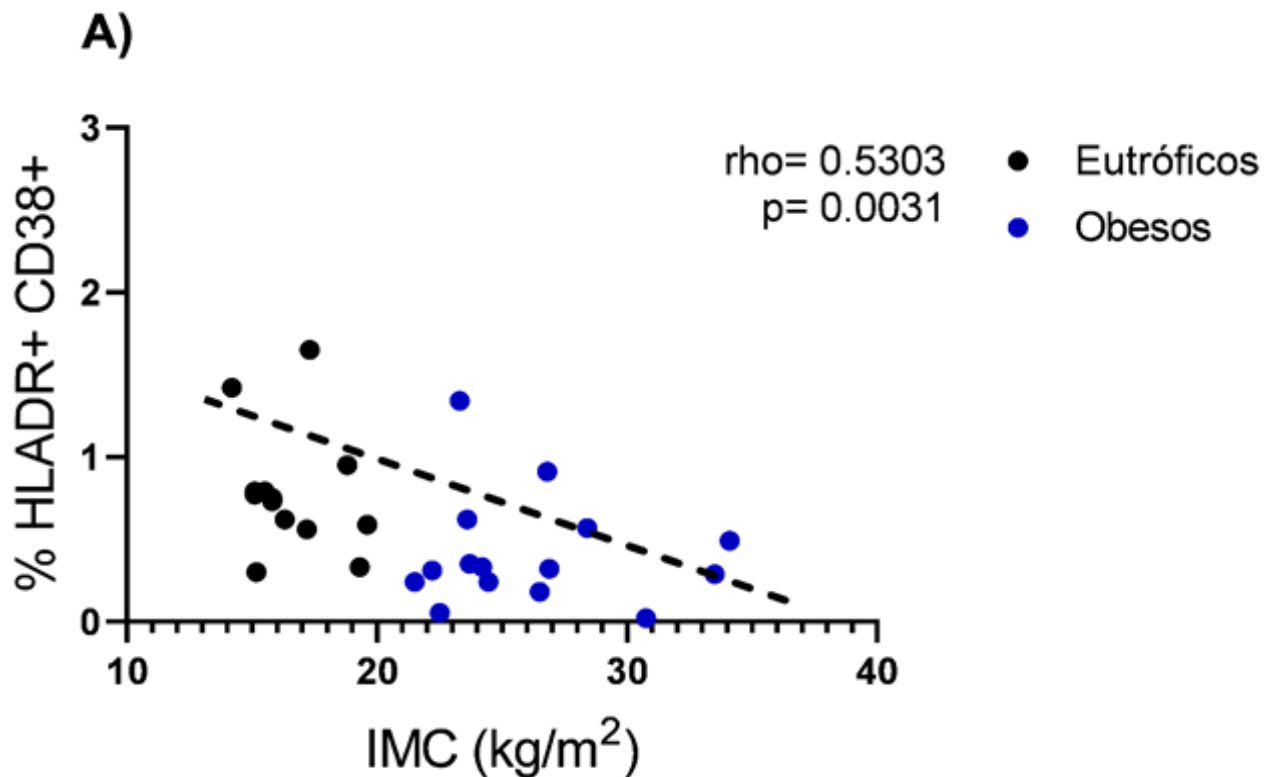
El porcentaje de células activadas es significativamente mayor en niños eutróficos con respecto a niños obesos en linfocitos T CD4+ ( $p=0.053$ ), linfocitos T de memoria centrales ( $p=0.0016$ ), y linfocitos T CD4+ Naive ( $p=0.0092$ ).

Población de célula T de niños eutróficos (Grupo control)	Población de célula T de niños obesos
Linfocitos T CD4+	Significativamente menor $p=0.0053$
Linfocitos T de memoria efectora CD4+	Sin tendencia
Linfocitos T de memoria central CD4+	Significativamente menor $p=0.0016$
Linfocitos T naive CD4+	Significativamente menor $p=0.0092$

Linfocitos T de memoria efectora CD45RA+ CD4+	Sin tendencia
Linfocitos T CD8+	Sin tendencia
Linfocitos T de memoria efectora CD8+	Sin tendencia
Linfocitos T de memoria central CD8+	Sin tendencia
Linfocitos T naive CD8+	Sin tendencia
Linfocitos T de memoria efectora CD45RA+ CD4+	Sin tendencia

*Tabla 7 Diferencia en cuanto a la activación de células T y sus subpoblaciones del grupo de niños obesos con respecto al grupo de niños eutróficos*

En las subpoblaciones de linfocitos T<sub>EM</sub> y T<sub>EMRA</sub> CD4+ no se encontró diferencia significativa (Anexo 7). Además, no se encontró diferencia alguna en la activación de linfocitos T CD8 + y sus subpoblaciones entre los grupos de niños obesos y eutróficos, ver Anexo 8.



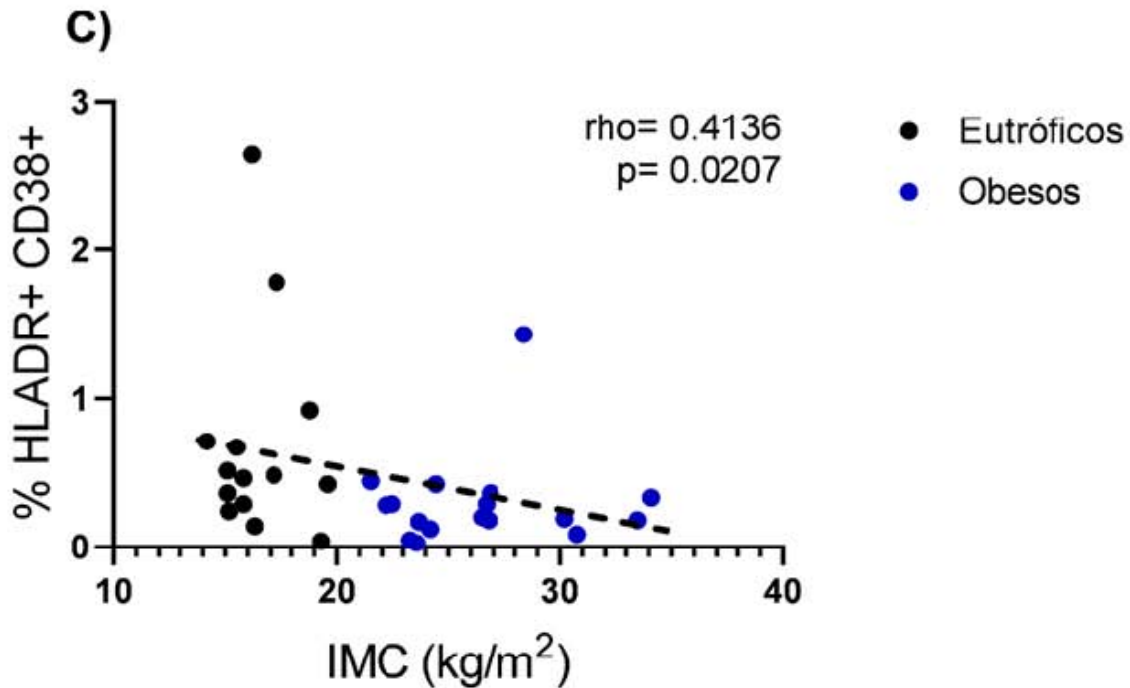
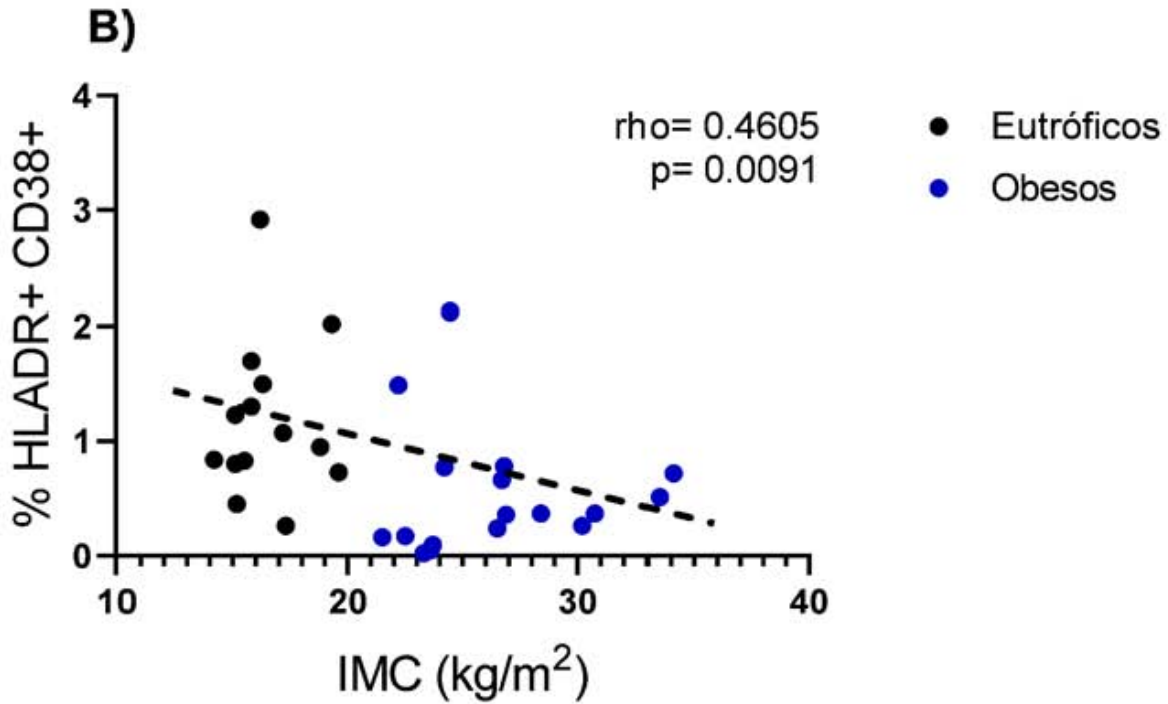


Figura 22. Correlación entre la activación de Linfocitos T CD4+ y el IMC de niños. A) Linfocitos T CD4+, B) Linfocitos T de memoria centrales ( $T_{CM}$ ) CD4+ y C) Linfocitos T naïve ( $T_N$ ) CD4+. El IMC en niños correlaciona con el porcentaje de células activadas del: total de linfocitos T CD4+ ( $\rho=0.0053$ ,  $p=0.0031$ ), de la subpoblación de linfocitos  $T_{CM}$  CD4+ ( $\rho=0.4605$ ,  $p=0.0091$ , ver Figura 22B) y de la subpoblación de linfocitos  $T_N$  CD4+ ( $\rho=0.4136$ ,  $p=0.0207$ ).

La activación de linfocitos T CD4+ guarda correlación significativa de manera negativa con el índice de masa corporal en las subpoblaciones T<sub>CM</sub> y T<sub>N</sub> (Figura 22).

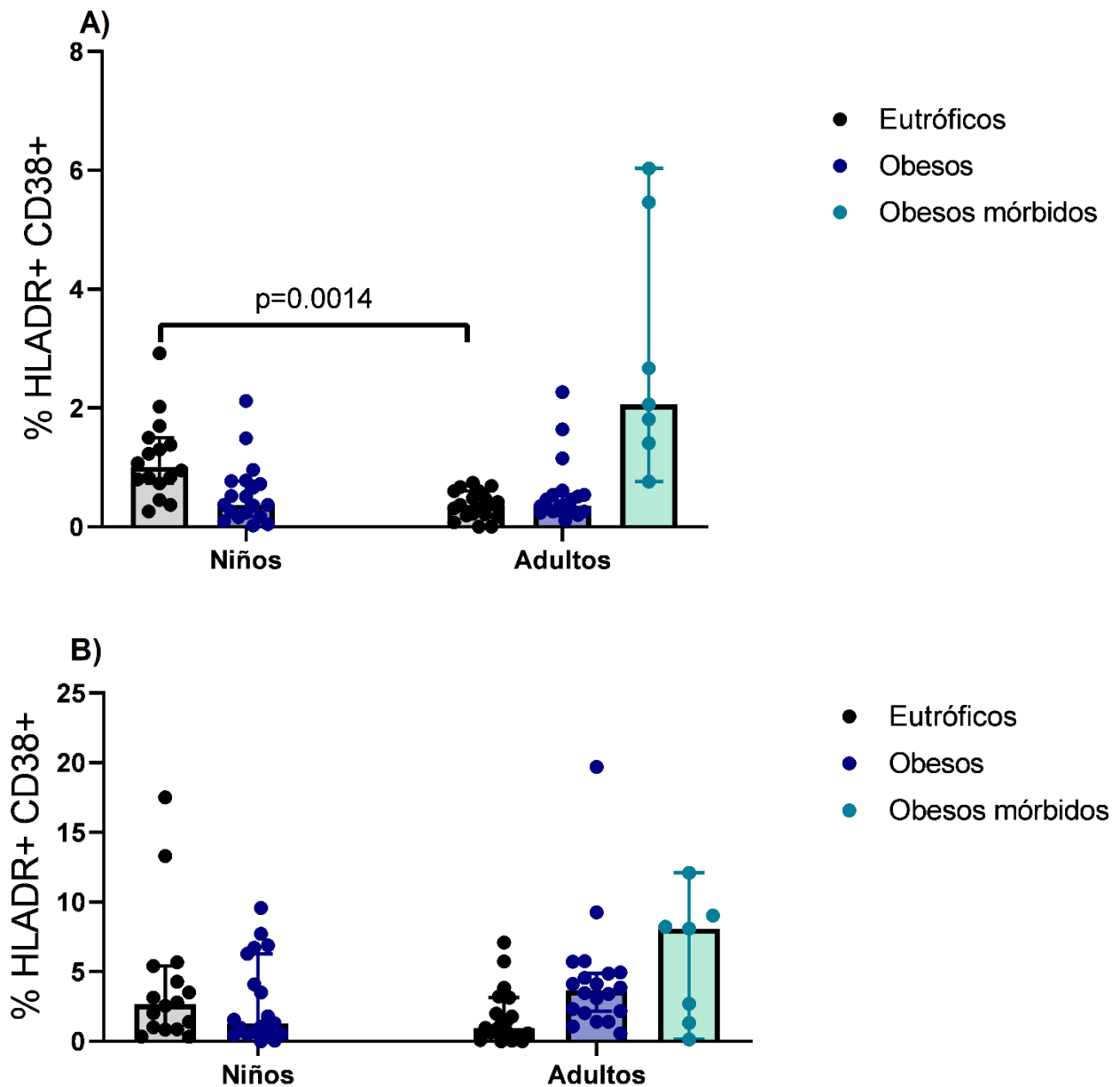


Figura 23. Activación de linfocitos T en niños y en adultos.

A) Linfocitos T de memoria centrales (T<sub>CM</sub>) CD4+ y B) Linfocitos T de memoria efectora (T<sub>EM</sub>) CD8+. La activación de los linfocitos de la subpoblación T<sub>CM</sub> de niños eutróficos es significativamente mayor que la activación de eutróficos adultos.



A manera de resumen resultados mostrados anteriormente indican que la activación de células T (coexpresión de las moléculas de membrana CD38 y HLADR) tiende a ser significativamente menor en niños obesos (Figura 21); mientras que en los adultos se presenta todo lo contrario, es decir, la activación de células T aumenta significativamente con el IMC (Figuras 13 y 14). Por otro lado, el patrón de activación de células T muestra diferencias con la edad entre pacientes obesos y eutróficos (Figura 23). En los pacientes eutróficos la activación parece disminuye con la edad, en cambio en pacientes obesos la activación de células T aumenta con el envejecimiento.

## 6.5. CONCENTRACIÓN DE LPS EN PLASMA DE NIÑOS

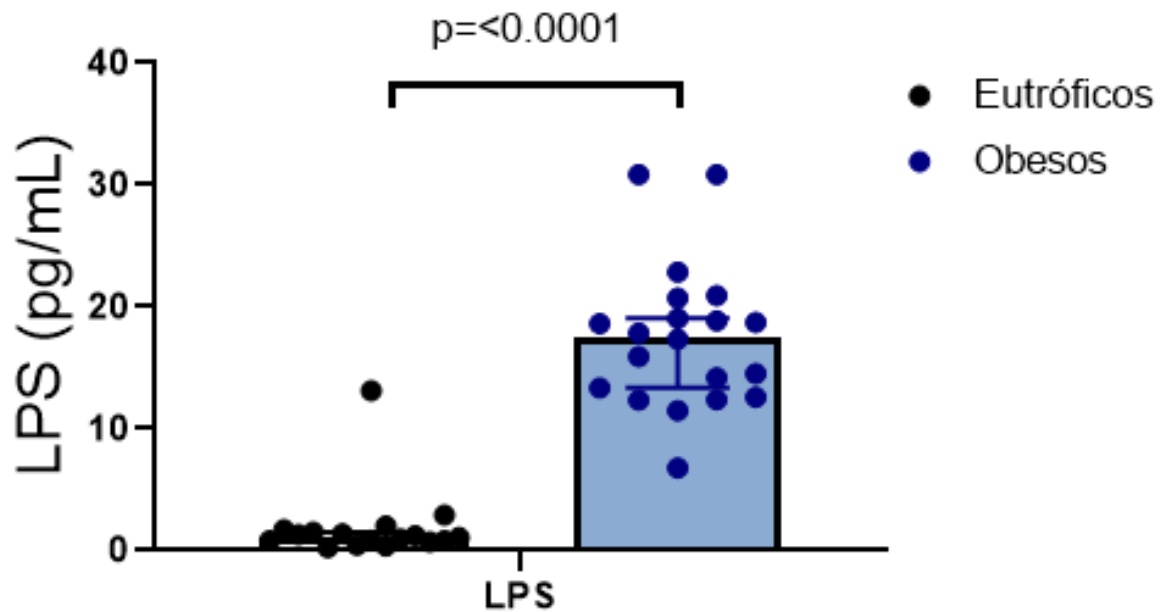


Figura 24. Concentración de LPS en el plasma de niños eutróficos y obesos.  
La concentración de LPS en plasma es mayor niños obesos con respecto a niños eutróficos ( $p < 0.0001$ )

La concentración de LPS es significativamente mayor en el plasma de los niños obesos (Figura 24), y en niños al igual que en los adultos, no se encontró correlación alguna entre las concentraciones de LPS en plasma y el grado de activación de linfocitos T CD4+ o CD8+ ni en ninguna de sus subpoblaciones.

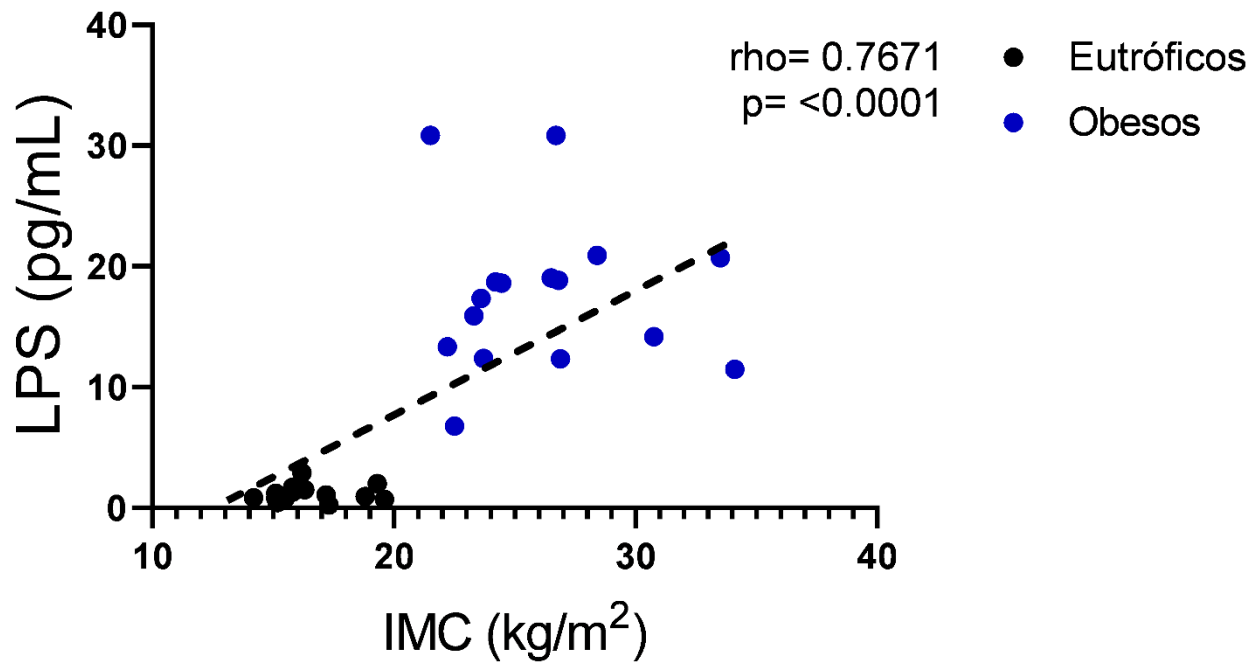


Figura 25. Correlación entre el IMC y las concentraciones de LPS en plasma de niños  
Correlación significativa entre la concentración de LPS en plasma y el IMC en niños ( $\rho=0.7671$ ,  $p<0.0001$ ).

La concentración entre el LPS en el plasma de los niños guarda correlación significativa y positiva con el IMC (Figura 25).

## 7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La activación de linfocitos T es una respuesta normal ante una infección viral, los cuales se encargan de frenar la replicación viral en las células infectadas<sup>41</sup>. Los sujetos que participaron en esta investigación no presentaron ningún rastro infección viral activa detectable por evaluación clínica durante su reclutamiento y aun así se encontró mayor activación tanto en linfocitos T CD4+ como en linfocitos T CD8+; sin embargo, en los linfocitos T CD8+ de obesos adultos, la activación se encuentra generalizada. Se debe tener en cuenta que en la obesidad existe inflamación generalizada del tejido adiposo<sup>108</sup> y que la producción de citocinas proinflamatorias en la obesidad esta proporcionalmente relacionada con la cantidad de masa corporal extra que presente el paciente, en especial si se trata de grasa intraabdominal<sup>26</sup>. La activación de células T efectoras correlaciona positivamente con significancia estadística con el IMC de pacientes adultos, lo cual muestra que el peso corporal no solamente está relacionado con la activación del sistema inmune innato como se ha descrito en estudios anteriores, sino que también se asocia con la activación del sistema inmune adaptativo, específicamente en linfocitos T CD8+ de memoria efectoras. Será importante en el futuro determinar si las células T reclutadas al tejido adiposo ocasionan el estado inflamatorio o son activadas por éste.

Un aspecto importante que discutir de la activación crónica es su posible causa. La translocación de material bacteriano del intestino a la sangre es una causa de activación en diversas enfermedades infecciosas. Sin embargo, a pesar de que se encontró mayores concentraciones de LPS en plasma de los pacientes obesos esta no mantiene correlación alguna con la activación de células T, por lo que la translocación de material bacteriano parece no ser el motivo de la activación de células T en los obesos. Hasta el momento, se desconoce el motivo de la activación generalizada de células T en obesos sin presencia de infección aparente. La célula activación de células T, las cuales son componentes de la inmunidad específica parece no resolverse, lo cual indica activación crónica de células T.

Existen otras enfermedades no infecciosas en donde se observó correlación estadísticamente significativa entre las concentraciones de LPS en sangre y la activación

de linfocitos T como en la enfermedad de Crohn y en la colitis ulcerativa<sup>91</sup>. Al no existir correlación significativa entre la activación de células T con las concentraciones de LPS en sangre, estos resultados sugieren que la activación de linfocitos T en la obesidad se debe a otros motivos además de la translocación bacteriana o también puede deberse a que el número de sujetos incluidos en este proyecto es demasiado pequeño en comparación con las cohortes de los estudios citados en este trabajo. En un estudio reciente se demostró que las señales restringidas al MHC-II de los macrófagos del tejido adiposo son muy importante en la activación inducida por obesidad de células T de tal manera que la pérdida de MHC-II por parte de los macrófagos residentes del tejido adiposo es suficiente para evitar la generación de células T de memoria efectoras<sup>109,110</sup>.

También queda por descubrir cual es motivo de que existan mayores concentraciones de LPS en sangre. Los resultados muestran que la concentración de LPS en plasma correlaciona con el IMC, lo que apoya la idea de que la translocación de LPS a la sangre en pacientes obesos podría deberse al paso junto con las micelas de la dieta<sup>111</sup>. Hasta ahora se desconoce que existan alteraciones de la mucosa intestinal en obesos, sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que se encuentre alterada.

En la cohorte de obesos mórbidos la activación de células T CD4+ es generalmente mayor a la de los eutróficos. T, también se puede observar la misma tendencia en células T CD8+ de memoria efectoras, aunque no exista diferencia estadística. Adicionalmente se encontró en estos pacientes presentan concentraciones aún mayores de LPS en sangre, lo cual refuerza nuestros hallazgos anteriores: a mayor de masa corporal, mayor activación de células T tanto CD4+ como CD8+ y mayor endotoxemia, incluso se encontró correlación significativa entre la activación de células T de memoria efectora CD8+ y el IMC. Sin embargo, el IMC es un parámetro pobre para estimar riesgos a la salud comparado con la masa de grasa visceral, que da en un futuro determinar si la grasa visceral guarda correlación con la activación de linfocitos T.

No es nuevo el hecho de que pacientes con obesidad mórbida tienen baja calidad de vida, incluso peor que pacientes que presentan solo obesidad<sup>112</sup>. Tanto la activación de células T como endotoxemia se han relacionado con promover un estado proinflamatorio y de resistencia a la insulina, por lo que ambas variables podrían estar involucradas con los

problemas de salud con los que viven los obesos mórbidos. Estos resultados muestran la importancia que tiene mantener el peso corporal dentro de un rango saludable por medio de dieta y ejercicio, sin embargo, en pacientes con obesidad mórbida el único tratamiento efectivo para hacerlos bajar de peso es la cirugía bariátrica<sup>112</sup>, el cual se lleva a cabo como última opción cuando el tratamiento farmacológico ha fallado. La cirugía bariátrica no solo ayuda a perder peso cuando ya no hay otro remedio, también mejora diversos parámetros metabólicos y bioquímicos tal como la resistencia a la insulina, hipertensión, dislipidemia y glucemia<sup>112</sup> y endotoxemia<sup>113</sup>. En la cohorte de pacientes que se sometieron a la cirugía bariátrica mostraron mejoría en cuanto a la activación de células T y los niveles de endotoxemia. La activación de células T CD4 + de memoria centrales y Naive disminuyó incluso a niveles muy similares a los de los eutróficos. Y las concentraciones de LPS disminuyeron a niveles muy similares al de los pacientes con obesidad. Estos resultados verifican nuestros hallazgos anteriores en donde se observó que la activación de células T y la endotoxemia están asociadas con el exceso de masa corporal, además expone mejoras adicionales atribuibles a la cirugía bariátrica.

Nuestros resultados muestran que las poblaciones de linfocitos T CD4+ totales y de memoria activados de pacientes con obesidad mórbida tienen mayor porcentaje de linfocitos T disfuncionales a nivel inmune con respecto a aquellas células T no activadas. Estas células son disfuncionales debido a que tienden a producir las citocinas como IFN gamma o la IL-2 desconectada de la expresión de CD40L, el cual es un ligando importante para la comunicación de los linfocitos T con los linfocitos B y así, para la producción de anticuerpos. Asimismo, esta comunicación es necesaria para modular las funciones efectoras de la inmunidad innata. Este fenómeno de disfuncionalidad promovido por la activación crónica de linfocitos T también se ha observado en la infección por VIH<sup>80,81</sup>. En esta infección la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8+ efectoras tiende a declinar con el avance de la infección por HIV y por ende se pierde la capacidad de controlar la infección<sup>114</sup>. La activación crónica de células T y la disfunción de las células T con fenotipo activado que se observó en nuestro estudio podría ser una de las razones por la cual los obesos estuvieron más propensos a contraer influenza de H1N1 en el 2009 con desenlaces fatales<sup>82</sup>. A pesar de los que resultados anteriores mostraron disminución de activación crónica de células T CD4+ y menores concentraciones de LPS después de la

cirugía bariátrica, no se observó mejoría en cuanto a la disfuncionalidad de células T. Aún queda por investigar en un futuro si existen diferencia en la disfuncionalidad de células T entre pacientes obesos y eutróficos, ya que en el presente estudio sólo se evaluó la disfuncionalidad de células T de pacientes con obesidad mórbida.

A diferencia de lo que se esperaba en los niños, se observó que los infantes obesos tenían menor grado de activación de células T CD4+ de memoria centrales y Naive junto con mayores grados de endotoxemia. Aquí se observa un fenómeno interesante ya que el IMC correlaciona de manera negativa con la activación de células T CD4+ de memoria centrales y Naive, contrario a lo que se observó en adultos, y correlaciona de manera positiva con las concentraciones de LPS sanguíneo. El patrón de activación de células T también parece mostrar diferencias con la edad entre pacientes obesos y eutróficos. En los sujetos eutróficos la activación parece disminuir con la edad, en cambio en pacientes obesos parece ser que la activación de células T aumenta. Adicionalmente no se encontró correlación entre la activación de células T y las concentraciones de LPS en sangre.

Estos resultados sugieren que la obesidad en niños interfiere con el funcionamiento del sistema inmunológico desde la infancia, aunque no se hicieron ensayos de funcionalidad de células T de niños en este estudio. Aun así esto sugiere que la obesidad en niños interfiere con la respuesta de linfocitos ante un reto antigénico, como por ejemplo con las vacunas, en donde en los niños obesos la efectividad de las vacunas del tétanos<sup>115</sup>, hepatitis B<sup>116</sup> e influenza<sup>117</sup> fue menor, puesto que generaron un menor título de anticuerpos del que se esperaba.

## 8. CONCLUSIÓN

La activación crónica de células T es un aspecto negativo para la salud que asocia con la pérdida de sus funciones efectoras y la elevada endotoxemia se relaciona con problemas metabólicos. En adultos obesos la activación de linfocitos T es mayor y al contrario de lo que ocurre en adultos, es menor en los niños obesos. En cuanto a los niveles de endotoxemia correlacionan con el IMC a cualquier edad, sin embargo, no existe relación aparente entre la activación de células T y la concentración de LPS en plasma. La cirugía bariátrica sigue siendo el tratamiento más efectivo para perder peso y además ayuda a disminuir el porcentaje de células T activadas y los niveles de endotoxemia.



## GLOSARIO

**Diabetes mellitus tipo 2:** es el subtipo de diabetes más frecuente y se caracteriza por altos niveles de glucosa derivada de resistencia a la insulina y a la deficiencia relativa en la producción de insulina por el páncreas<sup>6</sup>.

**Diabetes:** describe a un grupo de enfermedades metabólicas caracterizada por concentraciones elevadas de glucosa, la diabetes puede ser causada por falta de producción de insulina en el páncreas (tipo 1) o derivada de resistencia a la insulina (tipo 2)<sup>6</sup>.

**Dislipidemia:** condición en la cual existen concentraciones elevadas de colesterol total (>240 mg/dl), triglicéridos (>200 mg/dl) y de colesterol LDL (>130 mg/dl), y concentraciones reducidas de HDL (<35 mg/dl)<sup>6</sup>.

**Endotoxemia metabólica:** ligero aumento de lipopolisacárido bacteriano en plasma asociado el ambiente oxidativo y proinflamatorio observado en la obesidad<sup>94</sup>.

**Eosinófilo:** son células granulocíticas móviles del sistema inmunológico que pueden migrar desde la sangre hasta los tejidos. Desempeñan un papel importante en la defensa contra parásitos. Estas células pueden secretar citocinas que regulan la respuesta inmune. En menor medida los eosinófilos están involucrados en condiciones de asma y alergia<sup>41</sup>.

**Hiperplasia de adipocitos:** aumento en número de adipocitos<sup>6</sup>.

**Hipertensión arterial:** se produce por un aumento en la fuerza de presión que ejerce la sangre sobre las paredes de los vasos sanguíneos, se caracteriza por disfunción endotelial con una disrupción entre la homeostasis de la vasodilatación y la vasoconstricción, en donde comúnmente hay incremento de volumen plasmático y sodio<sup>118</sup>.

**Hipertrofia de adipocitos:** aumento de tamaño de las gotas lipídicas de adipocitos<sup>6</sup>.

**Linfocito:** son células de la inmunidad adaptativa. Pueden dividirse a grandes rasgos en tres poblaciones con base en sus diferencias funcionales y fenotípicas como linfocitos T (células T), linfocitos B (células B) y células asesinas naturales (NK)<sup>41</sup>.

**Lipólisis:** descomposición de los triglicéridos en AGL y glicerol<sup>31</sup>.

**Lipogénesis:** síntesis de ácidos grasos de cadena larga esterificados también conocidos como triglicéridos<sup>119</sup>.

**Macrófago:** son células fagocíticas presentadoras de antígeno profesionales. Los macrófagos inflamatorios desempeñan un doble papel en el sistema inmunitario como células fagocíticas para eliminar patógenos y para generar un ambiente proinflamatorio. Algunos macrófagos residentes en tejido desempeñan un papel importante en la reparación y regeneración de tejidos como macrófagos antiinflamatorios<sup>41</sup>.

**Malnutrición:** Es un estado patológico que se presenta cuando las necesidades de nutrientes y energía no se cubren totalmente con la dieta, el término implica alteración de la dieta, tanto desnutrición como hipernutrición<sup>120</sup>.

**Mastocito:** son células del sistema inmunitario que se encuentran en diversos tejidos, tienen una gran cantidad de gránulos citoplasmáticos que contienen histamina y otras sustancias biológicamente activas. Desempeñan un papel importante en la aparición alergias<sup>41</sup>.

**Metadatos:** son un conjunto de datos que describen el contenido informativo de un recurso, de archivos o de información de los mismos<sup>121</sup>.

**Monocito:** son un grupo heterogéneo de células mononucleadas que migran tejido y se diferencian en células fagocíticas como los macrófagos y las células dendríticas. Se han identificado dos tipos de monocitos, los monocitos inflamatorios entran rápidamente a tejidos en respuesta a una infección y los monocitos circulantes proporcionan un reservorio de los monocitos en tejido<sup>41</sup>.

**Neutrófilo:** son células granulocíticas móviles polimorfonucleadas (PMN). Están involucrados en la respuesta a muchos tipos de infecciones, ya que son las células que responden primero. Son células fagocíticas productoras de citocinas y proteínas antimicrobianas<sup>41</sup>.

**NKT:** es un tipo de células de la línea linfoide que comparte características con los linfocitos T y los NK<sup>41</sup>.

**Proenzima:** también conocido como zimógeno. Es un precursor enzimático inactivo, los cuales se activan después de una escisión enzimática proteolítica<sup>119</sup>.

**Resistencia a la insulina:** estado en el cual los niveles normales o elevados de insulina producen una respuesta atenuada en tejido muscular, hepático y adiposo. Clásicamente se refieren a una disminución de los efectos hipoglucemiantes mediados por la insulina, por lo que hay presencia de altas concentraciones de glucosa<sup>6</sup>.

**Síndrome metabólico:** es un desorden en el uso y almacenamiento de energía que aumentan el riesgo de presentar diabetes y enfermedades cardiovasculares. Está caracterizado por obesidad central, dislipidemia, hipertensión e hiperglucemia<sup>6</sup>.

## REFERENCIAS

1. Józsa, L. Obesity in paleolithic era, as portrayed on sculptures. *Orv. Hetil.* **149**, 2309–2314 (2008).
2. World Health Organization. *Obesity : preventing and managing the global epidemic : report of a WHO consultation.* (World Health Organization, 2000).
3. OMS. Obesidad y sobrepeso. <https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/obesity-and-overweight>.
4. Secretaria de Salud. Ensanut 2016. **2016**, 67–80 (2016).
5. OMS. Enfermedades no transmisibles. <https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/noncommunicable-diseases>.
6. Balderas Rentería, I. *Diabetes, obesidad y síndrome metabólico : un abordaje multidisciplinario.* (Editorial El Manual Moderno, 2015).
7. Stunkard, A. J., Foch, T. T. & Hrubec, Z. A Twin Study of Human Obesity. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **256**, 51 (1986).
8. Woods, S. C. & Seeley, R. J. Understanding the physiology of obesity: Review of recent developments in obesity research. *Int. J. Obes.* **26**, S8–S10 (2002).
9. Racette, S. B., Deusinger, S. S. & Deusinger, R. H. Obesity: Overview of Prevalence, Etiology, and Treatment. *Phys. Ther.* **83**, 276–288 (2003).

10. Turcotte, M. *et al.* Genetic contribution to waist-to-hip ratio in Mexican children and adolescents based on 12 loci validated in European adults. *Int. J. Obes.* **43**, 13–22 (2019).
11. Comuzzie, A. G. *et al.* The genetics of obesity in Mexican Americans: the evidence from genome scanning efforts in the San Antonio family heart study. *Hum. Biol.* **75**, 635–46 (2003).
12. UNICEF. UNICEF México - Salud y Nutrición - Infancia y salud. [https://www.unicef.org/mexico/spanish/17047\\_17494.html](https://www.unicef.org/mexico/spanish/17047_17494.html).
13. Shaper, A. G. Obesity and Cardiovascular Disease. in 90–107 (John Wiley & Sons, Ltd, 2007). doi:10.1002/9780470514962.ch6.
14. Basen-Engquist, K. & Chang, M. Obesity and cancer risk: recent review and evidence. *Curr. Oncol. Rep.* **13**, 71–6 (2011).
15. Milner, J. J. & Beck, M. A. The impact of obesity on the immune response to infection. in *Proceedings of the Nutrition Society* vol. 71 298–306 (2012).
16. Hanslik, T., Boelle, P.-Y. & Flahault, A. Preliminary estimation of risk factors for admission to intensive care units and for death in patients infected with A(H1N1)2009 influenza virus, France, 2009-2010. *PLoS Curr.* **2**, RRN1150 (2010).
17. Ananthapavan, J., Sacks, G., Moodie, M. & Carter, R. Economics of obesity - Learning from the past to contribute to a better future. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **11**, 4007–4025 (2014).
18. McKinsey Global Institute. *Overcoming obesity: An initial economic analysis*. (2014).

19. IMCO. Kilos de más, pesos de menos: Los costos de la obesidad en México - Instituto Mexicano para la Competitividad A.C. [https://imco.org.mx/banner\\_es/kilos-de-mas-pesos-de-menos-obesidad-en-mexico/](https://imco.org.mx/banner_es/kilos-de-mas-pesos-de-menos-obesidad-en-mexico/) (2014).
20. Ciencia MX. ¿Cuál es el impacto económico de las enfermedades crónicas? *México Ciencia y Tecnología* <http://www.cienciamx.com/index.php/ciencia/salud/11974-el-impacto-economico-de-las-enfermedades-cardiovasculares> (2016).
21. Hayashi, T. *et al.* Visceral adiposity is an independent predictor of incident hypertension in Japanese Americans. *Ann. Intern. Med.* **140**, 992–1000 (2004).
22. von Eyben, F. E. *et al.* Intra-abdominal obesity and metabolic risk factors: a study of young adults. *Int. J. Obes.* **27**, 941–949 (2003).
23. Colín-Ramírez, E. *et al.* Waist Circumference and Fat Intake Are Associated with High Blood Pressure in Mexican Children Aged 8 to 10 Years. *J. Am. Diet. Assoc.* **109**, 996–1003 (2009).
24. Medina-Gaona, L. A. *et al.* Frequency and Correlation of Body Mass Index and Waist-Hip Ratio with Fasting Glycemia and Blood Pressure in High School Students from Mexico. *Int. J. Med. Stud.* **6**, 38–46 (2018).
25. Acerca del índice de masa corporal para niños y adolescentes | Peso Saludable | DNPAO | CDC. [https://www.cdc.gov/healthyweight/spanish/assessing/bmi/childrens\\_bmi/acerca\\_indice\\_masa\\_corporal\\_ninos\\_adolescentes.html](https://www.cdc.gov/healthyweight/spanish/assessing/bmi/childrens_bmi/acerca_indice_masa_corporal_ninos_adolescentes.html) (2019).

26. Kershaw, E. E. & Flier, J. S. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 2548–2556 (2004).
27. Stephens, J. M. The Fat Controller: Adipocyte Development. *PLoS Biol.* **10**, 11–13 (2012).
28. Attie, A. D. & Scherer, P. E. Adipocyte metabolism and obesity: Fig. 1. *J. Lipid Res.* **50**, S395–S399 (2008).
29. Blüher, M. Adipose Tissue Dysfunction in Obesity. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **117**, 241–250 (2009).
30. Nature Research. Adipocytes - Latest research and news | Nature. <https://www.nature.com/subjects/adipocytes>.
31. Kalderon, B., Mayorek, N., Berry, E., Zevit, N. & Bar-Tana, J. Fatty acid cycling in the fasting rat. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **279**, E221–E227 (2000).
32. Rosen, E. D. & Spiegelman, B. M. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* **444**, 847–853 (2006).
33. Frayn, K. N. *et al.* Regulation of fatty acid movement in human adipose tissue in the postabsorptive-to-postprandial transition. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **266**, E308–E317 (1994).
34. Santomauro, A. T. *et al.* Overnight lowering of free fatty acids with Acipimox improves insulin resistance and glucose tolerance in obese diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes* **48**, 1836–1841 (1999).

35. Boden, G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* **46**, 3–10 (1997).
36. Yazıcı, D. & Sezer, H. Insulin Resistance, Obesity and Lipotoxicity. in *Advances in experimental medicine and biology* vol. 960 277–304 (2017).
37. Greenberg, A. S. & Obin, M. S. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* **83**, 461–465 (2006).
38. Donath, M. Y. & Shoelson, S. E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 98–107 (2011).
39. Lumeng, C. N., Bodzin, J. L. & Saltiel, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. Clin. Invest.* **117**, 175–184 (2007).
40. Zeyda, M. *et al.* Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production. *Int. J. Obes.* **31**, 1420–1428 (2007).
41. Owen, J. A., Punt, J., Stranford, S. A., Jones, P. P. & Ribera Muñoz, B. *Kuby inmunología*. (McGraw Hill Interamericana, 2014).
42. Poitou, C. *et al.* CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> and CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes in obesity and during weight loss: relationships with fat mass and subclinical atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 2322–2330 (2011).
43. Fujisaka, S. *et al.* Regulatory Mechanisms for Adipose Tissue M1 and M2 Macrophages in Diet-Induced Obese Mice. *Diabetes* **58**, 2574–2582 (2009).



44. Shaul, M. E., Bennett, G., Strissel, K. J., Greenberg, A. S. & Obin, M. S. Dynamic, M2-Like Remodeling Phenotypes of CD11c<sup>+</sup> Adipose Tissue Macrophages During High-Fat Diet-Induced Obesity in Mice. *Diabetes* **59**, 1171–1181 (2010).
45. Chong, L. *et al.* High-fat-diet induces airway hyperresponsiveness partly through activating CD38 signaling pathway. *Int. Immunopharmacol.* **56**, 197–204 (2018).
46. Sartipy, P. & Loskutoff, D. J. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 7265–7270 (2003).
47. Uysal, K. T., Wiesbrock, S. M., Marino, M. W. & Hotamisligil, G. S. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- $\alpha$  function. *Nature* **389**, 610–614 (1997).
48. Chapman, N. M. & Chi, H. Dietary Fat Inflames CD4<sup>+</sup>T Cell Memory in Obesity. *Cell Metab.* **25**, 490–492 (2017).
49. Griffin, M. E. *et al.* Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C  $\theta$  and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* **48**, 1270–1274 (1999).
50. Weisberg, S. P. *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* **112**, 1796–1808 (2003).
51. Langin, D. & Arner, P. Importance of TNF $\alpha$  and neutral lipases in human adipose tissue lipolysis. *Trends Endocrinol. Metab.* **17**, 314–320 (2006).
52. Poulsen, L. la C., Siersbæk, M. & Mandrup, S. PPARs: Fatty acid sensors controlling metabolism. *Semin. Cell Dev. Biol.* **23**, 631–639 (2012).

53. Stephens, J. M., Lee, J. & Pilch, P. F. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -induced Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes Is Accompanied by a Loss of Insulin Receptor Substrate-1 and GLUT4 Expression without a Loss of Insulin Receptor-mediated Signal Transduction. *J. Biol. Chem.* **272**, 971–976 (1997).
54. O'Rourke, R. W. *et al.* Depot-specific differences in inflammatory mediators and a role for NK cells and IFN- $\gamma$  in inflammation in human adipose tissue. *Int. J. Obes.* **33**, 978–990 (2009).
55. Ohmura, K. *et al.* Natural Killer T Cells Are Involved in Adipose Tissues Inflammation and Glucose Intolerance in Diet-Induced Obese Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 193–199 (2010).
56. Liu, J. *et al.* Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. *Nat. Med.* **15**, 940–945 (2009).
57. Lee, E.-H. *et al.* Eosinophils support adipocyte maturation and promote glucose tolerance in obesity. *Sci. Rep.* **8**, 9894 (2018).
58. Zhang, Y. *et al.* Eosinophils Reduce Chronic Inflammation in Adipose Tissue by Secreting Th2 Cytokines and Promoting M2 Macrophages Polarization. *Int. J. Endocrinol.* **2015**, 1–5 (2015).
59. Wu, D. *et al.* Eosinophils Sustain Adipose Alternatively Activated Macrophages Associated with Glucose Homeostasis. *Science* **332**, 243–247 (2011).

60. Husaarts, L. *et al.* Chronic helminth infection and helminth-derived egg antigens promote adipose tissue M2 macrophages and improve insulin sensitivity in obese mice. *FASEB J.* **29**, 3027–3039 (2015).
61. Lumeng, C. N. Innate immune activation in obesity. *Mol. Aspects Med.* **34**, 12–29 (2013).
62. Noels, H. & Weber, C. Catching up with important players in atherosclerosis: type I interferons and neutrophils. *Curr. Opin. Lipidol.* **22**, 144–145 (2011).
63. Gerriets, V. A. & MacIver, N. J. Role of T cells in malnutrition and obesity. *Front. Immunol.* **5**, 1–11 (2014).
64. Strissel, K. J. *et al.* T-cell recruitment and Th1 polarization in adipose tissue during diet-induced obesity in C57BL/6 mice. *Obes. Silver Spring Md* **18**, 1918–25 (2010).
65. Jung, C. *et al.* Alterations in systemic levels of Th1, Th2, and Th17 cytokines in overweight adolescents and obese mice. *Pediatr. Diabetes* **18**, 714–721 (2017).
66. Gong, P. *et al.* Association between Th1/Th2 immune imbalance and obesity in women with or without polycystic ovary syndrome. *Gynecol. Endocrinol.* **34**, 709–714 (2018).
67. Nishimura, S. *et al.* CD8<sup>+</sup> effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat. Med.* **15**, 914–920 (2009).
68. Donninelli, G. *et al.* Distinct Blood and Visceral Adipose Tissue Regulatory T Cell and Innate Lymphocyte Profiles Characterize Obesity and Colorectal Cancer. *Front. Immunol.* **8**, 643 (2017).

69. C., M. *et al.* Obesity-Induced Metabolic Stress Leads to Biased Effector Memory CD4+ T Cell Differentiation via PI3K p110 $\delta$ -Akt-Mediated Signals. *Cell Metab.* **25**, 593–609 (2017).
70. Gonzalez, S. M., Taborda, N. A. & Rugeles, M. T. Role of Different Subpopulations of CD8+ T Cells during HIV Exposure and Infection. *Front. Immunol.* **8**, 936 (2017).
71. Crawley, D. *et al.* Modeling energy savings. *ASHRAE J.* **52**, (2010).
72. Sallusto, F. *et al.* Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions [see comments]. *Nature* **401**, 708–712 (1999).
73. Doisne, J.-M. *et al.* CD8+ T Cells Specific for EBV, Cytomegalovirus, and Influenza Virus Are Activated during Primary HIV Infection. *J. Immunol.* **173**, 2410–2418 (2004).
74. Odumade, O. A. *et al.* Primary Epstein-Barr virus infection does not erode preexisting CD8+ T cell memory in humans. *J. Exp. Med.* **209**, 471–8 (2012).
75. Papasavvas, E. *et al.* High-risk oncogenic HPV genotype infection associates with increased immune activation and T cell exhaustion in ART-suppressed HIV-1-infected women. *Oncolimmunology* **5**, e1128612 (2016).
76. Santos-Oliveira, J. R. *et al.* Evidence that lipopolisaccharide may contribute to the cytokine storm and cellular activation in patients with visceral leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **5**, (2011).
77. Santos-Oliveira, J. R. *et al.* Microbial translocation induces an intense proinflammatory response in patients with visceral leishmaniasis and HIV type 1 coinfection. *J. Infect. Dis.* **208**, 57–66 (2013).

78. Wang, Z. *et al.* Clonally diverse CD38+HLA-DR+CD8+ T cells persist during fatal H7N9 disease. *Nat. Commun.* **9**, 824 (2018).
79. Paiardini, M. & Müller-Trutwin, M. HIV-associated chronic immune activation. *Immunol. Rev.* **254**, 78–101 (2013).
80. Espinosa, E. *et al.* Dissociation of CD154 and cytokine expression patterns in CD38+ CD4+ memory T cells in chronic HIV-1 infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **55**, 439–445 (2010).
81. Olvera-García, G., Espinosa, E., Sieg, S. F. & Lederman, M. M. Cytomegalovirus-specific responses of CD38+ memory T cells are skewed towards IFN- $\gamma$  and dissociated from CD154 in HIV-1 infection. *Aids* **28**, 311–316 (2014).
82. Van Kerkhove, M. D. *et al.* Risk Factors for Severe Outcomes following 2009 Influenza A (H1N1) Infection: A Global Pooled Analysis. *PLoS Med.* **8**, e1001053 (2011).
83. Estes, J. D. *et al.* Damaged intestinal epithelial integrity linked to microbial translocation in pathogenic simian immunodeficiency virus infections. *PLoS Pathog.* (2010) doi:10.1371/journal.ppat.1001052.
84. Ehman, E. C. *et al.* HHS Public Access. **46**, 1247–1262 (2017).
85. Lu, Y.-C., Yeh, W.-C. & Ohashi, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* **42**, 145–151 (2008).
86. Dalby, M. J. *et al.* Diet induced obesity is independent of metabolic endotoxemia and TLR4 signalling, but markedly increases hypothalamic expression of the acute phase protein, SerpinA3N. *Sci. Rep.* **8**, 1–15 (2018).

87. Boutagy, N. E., McMillan, R. P., Frisard, M. I. & Hulver, M. W. Metabolic endotoxemia with obesity: Is it real and is it relevant? *Biochimie* **124**, 11–20 (2016).
88. Brenchley, J. M. *et al.* Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat. Med.* **12**, 1365–1371 (2006).
89. Brenchley, J. M., Price, D. A. & Douek, D. C. HIV disease: Fallout from a mucosal catastrophe? *Nat. Immunol.* **7**, 235–239 (2006).
90. Jiang, W. *et al.* Plasma Levels of Bacterial DNA Correlate with Immune Activation and the Magnitude of Immune Restoration in Persons with Antiretroviral-Treated HIV Infection. *J. Infect. Dis.* **199**, 1177–1185 (2009).
91. Funderburg, N. T. *et al.* Circulating CD4+and CD8+T cells are activated in inflammatory bowel disease and are associated with plasma markers of inflammation. *Immunology* **140**, 87–97 (2013).
92. Lassenius, M. I. *et al.* Bacterial endotoxin activity in human serum is associated with dyslipidemia, insulin resistance, obesity, and chronic inflammation. *Diabetes Care* **34**, 1809–1815 (2011).
93. Creely, S. J. *et al.* Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **292**, E740–E747 (2007).
94. Cani, P. D. *et al.* Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes* **56**, 1761–1772 (2007).

95. Clemente-Postigo, M. *et al.* Endotoxin increase after fat overload is related to postprandial hypertriglyceridemia in morbidly obese patients. *J. Lipid Res.* **53**, 973–978 (2012).
96. Sullivan, M. *et al.* Swedish obese subjects (SOS)--an intervention study of obesity. Baseline evaluation of health and psychosocial functioning in the first 1743 subjects examined. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* **17**, 503–12 (1993).
97. Bennett, J. M. H., Mehta, S. & Rhodes, M. Surgery for morbid obesity. *Postgrad. Med. J.* **83**, 8–15 (2007).
98. Rucker, D., Padwal, R., Li, S. K., Curioni, C. & Lau, D. C. W. Long term pharmacotherapy for obesity and overweight: updated meta-analysis. *BMJ* **335**, 1194–1199 (2007).
99. Sjöström, C. D., Peltonen, M. & Sjöström, L. Blood Pressure and Pulse Pressure during Long-Term Weight Loss in the Obese: The Swedish Obese Subjects (SOS) Intervention Study. *Obes. Res.* **9**, 188–195 (2001).
100. Science, J. M. E. C. for C. D. and C. Cirugía para bajar de peso en adultos con diabetes o prediabetes y niveles bajos de obesidad. (2014).
101. Herrera, M. F., Zárate, X. & Gil Cárdenas, A. Complicaciones posteriores a derivación gastroeyunal en Y de Roux. *Rev. Gastroenterol. México* **75**, 35–39 (2010).
102. Ávila-Portillo, L. M. *et al.* Fundamentos de criopreservación. *Rev. Colomb. Obstet. Ginecol.* **57**, 291–300 (2006).

103. Chattopadhyay, P. K., Yu, J. & Roederer, M. Live-cell assay to detect antigen-specific CD4<sup>+</sup> T-cell responses by CD154 expression. *Nat. Protoc.* **1**, 1–6 (2006).
104. BD. BD FACSAria II User's Guide. 354 (2009).
105. Mackay, C. R. Dual personality of memory T cells. *Nat. Immunol.* **7**, 659–660 (1999).
106. Giorgi, J. V & Detels, R. T-cell subset alterations in HIV-infected homosexual men: NIAID Multicenter AIDS cohort study. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **52**, 10–8 (1989).
107. Kestens, L. *et al.* Expression of activation antigens, HLA-DR and CD38, on CD8 lymphocytes during HIV-1 infection. *AIDS Lond. Engl.* **6**, 793–7 (1992).
108. Deiluiis, J. *et al.* Visceral adipose inflammation in obesity is associated with critical alterations in tregulatory cell numbers. *PLoS ONE* **6**, (2011).
109. Cho, K. W. *et al.* An MHC II-dependent activation loop between adipose tissue macrophages and CD4<sup>+</sup>T cells controls obesity-induced inflammation. *Cell Rep.* **9**, 605–617 (2014).
110. Mauro, C. *et al.* Obesity-Induced Metabolic Stress Leads to Biased Effector Memory CD4<sup>+</sup>T Cell Differentiation via PI3K p110 $\delta$ -Akt-Mediated Signals. *Cell Metab.* **25**, 593–609 (2017).
111. Clemente-Postigo, M. *et al.* Endotoxin increase after fat overload is related to postprandial hypertriglyceridemia in morbidly obese patients. *J. Lipid Res.* **53**, 973–978 (2012).



112. Molina-Ayala, M. *et al.* Clinical and biochemical characteristics of patients with morbid obesity at the time of hospital admission and one year after undergoing bariatric surgery. *Características Clin. Bioquim. Pacientes Con Obes. Extrema Al Ingr. Un Año Despues Someterse Cirugia Bariatrica* **54 Suppl 2**, S118-23 (2016).
113. Li, Y. *et al.* Lipopolysaccharide and inflammatory cytokines levels decreased after sleeve gastrectomy in Chinese adults with obesity. *Endocr. J.* **66**, 337–347 (2019).
114. Sachdeva, M., Fischl, M. A., Pahwa, R., Sachdeva, N. & Pahwa, S. Immune Exhaustion Occurs Concomitantly With Immune Activation and Decrease in Regulatory T Cells in Viremic Chronically HIV-1–Infected Patients. *JAIDS J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **54**, 447–454 (2010).
115. Eliakim, A. *et al.* Reduced tetanus antibody titers in overweight children. *Autoimmunity* **39**, 137–41 (2006).
116. Weber, D. J., Rutala, W. A., Samsa, G. P., Santimaw, J. E. & Lemon, S. M. Obesity as a predictor of poor antibody response to hepatitis B plasma vaccine. *JAMA* **254**, 3187–9 (1985).
117. Park, H.-L. *et al.* Obesity-induced chronic inflammation is associated with the reduced efficacy of influenza vaccine. *Hum. Vaccines Immunother.* **10**, 1181–6 (2014).
118. García Casilimas, G. A. *et al.* Fisiopatología de la hipertensión arterial secundaria a obesidad. *Arch. Cardiol. México* **87**, 336–344 (2017).
119. Voet, Donald. & Voet, J. G. *Bioquímica*. (Editorial Médica Panamericana, 2006).

120. Hernández Rodríguez, Manuel. & Sastre Gallego, Ana. *Tratado de nutrición*. (Ediciones Díaz de Santos, 2000).
121. Spidlen, J. *et al.* Data File Standard for Flow Cytometry, version FCS 3.1. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* **77**, 97–100 (2010).

# ANEXOS

## Anexo 1. Consentimiento informado del Hospital General de México

### Consentimiento informado.

#### FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Número de Protocolo:	
Número del Sitio (si es aplicable)	
Título del Estudio	<b>Utilidad de la curva de tolerancia a la glucosa oral en niños para predecir disfunción endotelial e inflamación asociados a obesidad. Estudio de validación cruzada.</b>
Versión	
Idioma	Español

INVESTIGADOR (DOCTOR DEL ESTUDIO)

Dr. Juan C López Alvarenga

DIRECCION DEL (OS) CENTRO (S) DE ESTUDIO: HOSPITAL GENERAL DE MEXICO

O.D. DR. BALMIS 148, DOCTORES C.P. 06726

NUMERO DE TELEFONO EN HORAS DE

2789 2000 EXT.1353

50043842

OFICINA Y DESPUES DE HORAS HABILES:

### **Participación**

Se le está invitando a usted a participar en un estudio de investigación. Su elegibilidad para participar en el estudio está sujeta a los procedimientos de selección descritos a continuación y a otros criterios de elegibilidad. Antes de que usted participe en este estudio, es importante que usted comprenda lo que involucra el estudio. Por favor lea cuidadosamente esta información y pregunte todo lo que no entienda, con gusto responderemos a sus inquietudes. *Un comité de Ética independiente ha revisado los objetivos y la conducción de este estudio y lo ha aprobado.*

### **Objetivo del Estudio**

La obesidad es un problema grave en el país, y empieza desde edad muy temprana. Además, otras enfermedades comunes en México, como la diabetes, obesidad, o hábitos como la ingestión de alcohol pueden aumentar la posibilidad de padecer o modificar el curso de la enfermedad.

En este estudio buscamos conocer la frecuencia de hepatitis B y C, además de si padece de otras enfermedades crónicas que modifiquen a la enfermedad.

Para lograr esta meta se le entrevistará, llenará un cuestionario y tomaremos exámenes de sangre para verificar si tiene el virus de hepatitis B y C, además de conocer la concentración de azúcar (glucosa), grasas en sangre y algunas pruebas para conocer cómo funciona su hígado.

**Número Aproximado de Participantes y la Duración Esperada de su Participación en el Estudio.**

Solo podremos incluir a 260 personas que voluntariamente quieran participar en este estudio.

### **Procedimientos del Estudio**

Antes de llenar cualquier cuestionario o de tomarle las muestras de sangre deberá leer y firmar este consentimiento informado.

Luego llenará un cuestionario, se le registrará el peso, la talla, lectura de presión arterial, la circunferencia de cadera y circunferencia de cintura.

Posteriormente se le tomará una muestra de 15 ml sangre para hacer pruebas bioquímicas que medirán si tiene anemia, el grado de inflamación que presenta. Se le dejará un pequeño catéter para tomar otras muestras de sangre y que no se le den más piquetes. Luego se le dará un vaso de agua con azúcar que se conoce como glucosa, tiene un sabor dulce, que deberá beberlo en menos de 5 minutos. Se tomará cuatro muestras de sangre más de 3 ml cada una para medir el azúcar e insulina en la sangre.

Finalmente, se le hará un ultrasonido del cuello para ver qué tan rígidas están sus arterias. Además, se le colocará un tensiómetro en el brazo lo que le apretará durante 3 minutos, esto puede causar una ligera incomodidad, luego se le liberará del tensiómetro y se medirá con ultrasonido en dos ocasiones cómo se recupera el paso de sangre por el brazo. Esto no le ocasionará ningún problema posterior.

Nada de esto tiene costo para usted.

Esperamos que escriba claramente la forma de localizarlo en caso de que alguno de los exámenes saliera anormal.

### **Esperamos que usted pueda (estas son sus responsabilidades):**

Proporcionar la información solicitada de forma veraz y completa

Asegurarse que los datos de localización que nos dé sean correctos.

## **Riesgos y posibles reacciones adversas**

### **Muestra Sanguínea**

La muestra sanguínea es un procedimiento de diagnóstico comúnmente utilizado. La cantidad de sangre extraída no tiene ningún riesgo importante para su salud. Existe la posibilidad de un pequeño moretón por la toma de la muestra.

### **Beneficios**

Ninguno de estos estudios tiene costo alguno para usted. En caso de que detectemos algún problema con los exámenes se le localizará y se le orientará para que asista al Hospital General de México.

### **Compensación por Lesiones**

Si sufre un daño directo producido por la toma de muestra en la investigación, deberá comunicarse inmediatamente con el: Dr. Juan Carlos López Alvarenga, la Dra. América Arroyo.

Teléfono: 50043842

### **Cualquier Pago Prorrateado**

Usted no recibirá ninguna compensación monetaria por su participación en este estudio.

### **Gastos Anticipados**

Usted recibirá reembolso en forma de viáticos por los gastos causados por su arribo al hospital.

### **Participación Voluntaria/ Retiro del Estudio**

Su participación en este estudio es completamente voluntaria, y aunque usted decida participar, es libre de dejar el estudio en cualquier momento sin proporcionar razón alguna. Esto no afectará su tratamiento médico futuro en ninguna forma.

### **Permiso para la Revisión de los Registros, Confidencialidad y Acceso a los Registros**

Todos los datos recolectados serán mantenidos en forma confidencial y serán utilizados para la evaluación del estudio, además pueden ser utilizados en el futuro en estudios relacionados o en otros estudios. Los datos serán sometidos a las autoridades de salud para propósitos de registro. Los miembros de las autoridades de salud y el comité de Ética, Comité de Revisión Institucional u otras personas requeridas por la ley podrán revisar los datos proporcionados. Estos datos también se podrán utilizar en las publicaciones acerca de este tema.

En ningún momento su identidad, incluyendo su nombre o identidad serán revelados en ninguna compilación, reporte del estudio o publicación, únicamente personas autorizadas tendrán acceso a la lista.

Usted tiene derecho a obtener cualquier información inicial y actualizada acerca de los datos registrados, así como el derecho de requerir correcciones de los errores de acuerdo con las leyes y procedimientos locales. Esta información también podrá ser enviada a su médico de atención primaria, si así lo desea.

Si usted está de acuerdo, su médico personal será informado de su participación en el estudio.

### **13) Preguntas/Información**

a) Si usted o su representante tienen alguna pregunta con respecto al estudio o en el caso de lesiones relacionadas al estudio, usted debe contactar a sus médicos del estudio:

Dra. América Arroyo [Teléfono 500043842].

Si usted o su representante tienen alguna pregunta con respecto a sus derechos como paciente en relación con el estudio, usted debe contactar.

REPRESENTANTE DEL COMITÉ: DRA. Estela García

CENTRO/HOSPITAL DEL ESTUDIO: HOSPITAL GENERAL DE MEXICO O.D.

BALMIS 148, DOCTORES, CP 06726,

MEXICO D.F.

NUMERO DE TELEFONO 27892000 ext. 1164

### **Firmas de Consentimiento**

Favor de leer esta sección cuidadosamente y si está de acuerdo por favor imprima su firma y la fecha en la parte inferior de la página.

Se me han proporcionado los detalles de los efectos secundarios y os riesgos conocidos y esperados del procedimiento del estudio que yo puedo recibir

Entiendo que tengo la libertad de aceptar o rehusar participar en cualquier momento sin necesidad de proporcionar razón alguna. Mi decisión de aceptar o rehusar mi participación no tendrá ningún efecto sobre la continuación de mi tratamiento. Conservaré todos mis derechos.

Estoy de acuerdo en que los datos recolectados para el estudio serán utilizados para el propósito descrito anteriormente, incluyendo la transferencia de datos.



Estoy de acuerdo que el acceso directo a mis registros médicos será proporcionado a las personas autorizadas, así como a las autoridades nacionales, Comité de Ética y Comité de Revisión Institucional.

Entiendo que los registros de mi estudio pueden ser enviados a mi Médico de Atención Primaria, si se lo solicito a mi médico del estudio

No perderé ninguno de los derechos que tengo bajo la ley local, firmando y fechando este formato

He leído y entiendo la información presentada en este formato de Consentimiento Informado. Se me ha proporcionado la oportunidad de hacer preguntas y todas mis preguntas han sido respondidas

Recibiré una copia firmada y fechada de este formato de Consentimiento Informado

## **FIRMA**

### **ACEPTO LIBREMENTE PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO**

Debe firmarse simultáneamente, (esto es la misma fecha), por todas las partes:

---

Nombre del sujeto	Firma	Fecha
-------------------	-------	-------

## **Anexo 2. Criterios de inclusión y exclusión para los donadores del Hospital General de México**


### **Criterios de inclusión.**

- 1) Que los padres o el tutor firmen un consentimiento informado respecto a los objetivos del estudio.
- 2) Que el niño exprese verbalmente en frente del investigador y los testigos su disposición de participar en el estudio.
- 3) Ambos sexos y con edad entre 8 y 12 años (Etapa 1), en el caso de los adultos deberá tener edad entre 25 y 45 años.
- 4) IMC dentro de los percentiles 40 y 95 de las tablas del CDC. En el caso de los adultos entre 20 y 35.

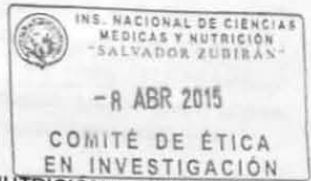
### **Criterios de exclusión.**

- 1) Mujeres a) en período de lactancia, b) embarazadas, d) que utilicen anticonceptivos orales, anticonceptivos implantados o inyectables, parches de estrógenos.
- 2) Cirugía gastrointestinal que altere la absorción de la glucosa: v.gr. gastroplastía para reducción de peso, banda gástrica.
- 3) Trabajadores nocturnos que hubieran modificado el ciclo día-noche y cuyo trabajo incluya desde media noche hasta las 4:00 a.m.
- 4) Hipertensión arterial.
- 5) Historia clínica de insuficiencia renal, cardíaca, hepática.
- 6) Presencia de arritmias relevantes como fibrilación auricular, flutter, taquicardia ventricular.
- 7) Pacientes con diagnóstico de diabetes.
- 8) Historia de drogadicción o dependencia de alcohol dentro de los últimos 6 meses.
- 9) Obesidad de origen monogénico.
- 10) Utilización de corticosteroides.
- 11) Condiciones que se sabe se asocian a modificación de la antropometría como hipotiroidismo, acromegalia, amputación de algún miembro.
- 9) Cualquier condición clínica que, en opinión del investigador, podría interferir con los criterios de estudio.

## Anexo 3. Consentimiento informado del Hospital de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"



INS. NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"  
- 8 ABR 2015  
COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"

**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**  
VERSION 26 DE MARZO DE 2015

**Título del proyecto:**  
Efecto de la cirugía bariátrica sobre la composición de la microbiota y su relación con la reducción de peso y comorbilidades.

**INVITACION A PARTICIPAR Y DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO**

Estimado Sr. (a) \_\_\_\_\_

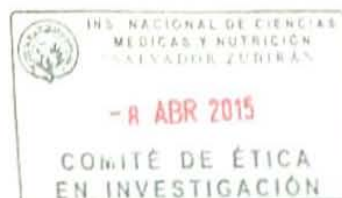
El Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición realiza un proyecto de investigación dentro del Programa de Cirugía Bariátrica con el objetivo de conocer los cambios que ocurren en la microflora intestinal (microbiota) después de la cirugía bariátrica y cómo esto se asocia con la reducción del peso y los cambios en el metabolismo de la glucosa y los lípidos sanguíneos.

A quienes acepten participar en el proyecto se les solicitará la obtención de muestras fecales dentro de los dos días previos a la realización de la derivación gastroyeyunal (DGY) y una toma de sangre para el análisis de ácidos biliares. Los pacientes serán seguidos en el primer año después de la cirugía en dos periodos trimestrales inicialmente y posteriormente a los seis meses para la determinación del perfil antropométrico y el perfil metabólico. En cada visita se evaluarán varios factores que influyen en el éxito de la cirugía, incluyendo comorbilidades, conducta alimentaria y actividad física por medio de entrevista médica, psicológica y nutricional. Un año posterior a la cirugía se obtendrán nuevamente muestras fecales para la extracción y análisis de la microbiota y una muestra de sangre para el análisis de los ácidos biliares. Se extraerá RNA y DNA de las muestras fecales y se realizarán estudios moleculares de las mismas. Se analizará el efecto de la reducción de peso después de un año sobre la composición de la microbiota y si estos cambios en la microbiota están relacionados con una reducción exitosa del peso (por lo menos 20% del peso prequirúrgico). También se evaluará la relación de los cambios en la

Avenida Vasco Quiroga No. 14  
Colonia Belisario Domínguez Sección XVI  
Delegación Tlalpan  
Código Postal 14080  
México, Distrito Federal  
Tel. (52) 54870900  
www.incmnsz.mx



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN



microbiota con los cambios en la glucosa, el colesterol, los triglicéridos, los ácidos biliares, la masa grasa corporal y la masa libre de masa (músculo y hueso) del cuerpo

Este conocimiento puede generar estrategias de tratamiento que mejoren la respuesta al tratamiento de la obesidad, ya que en la actualidad existen intervenciones aprobadas para la modificación de la microflora intestinal .

Dichos estudios no implicarán ningún costo para usted.

**Beneficios:** Usted no recibirá un beneficio directo por su participación en el estudio, sin embargo si usted acepta participar, estará colaborando con las instituciones ya mencionadas para poder proporcionar un mejor tratamiento para la obesidad.

**Confidencialidad:** Toda la información que usted nos proporcione para el estudio será de carácter estrictamente confidencial; será utilizada únicamente por el equipo de investigación del proyecto y no estará disponible para ningún otro propósito. Usted quedará identificado(a) con un número y no con su nombre. Los resultados de este estudio serán publicados con fines científicos, pero se presentarán de tal manera que no podrá ser identificado.

**Riesgos potenciales/compensación:** Este es un estudio sin riesgo potencial para usted. Si la obtención de las muestras de materia fecal le provoca alguna molestia (se proporciona un contenedor para que el paciente deposite la muestra y entregue el contenedor al personal médico), tiene el derecho de no repetir su realización. Usted no recibirá ningún pago por participar en el estudio, y tampoco implicará algún costo para usted.

**Participación voluntaria/retiro:** La participación en este estudio es absolutamente voluntaria. Usted está en plena libertad de negarse a participar o de retirar su participación del mismo en cualquier momento. Su decisión de participar o de no participar no afectará de ninguna manera la forma cómo le tratan en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición.

**Datos de contacto:** Si usted tiene alguna pregunta, comentario o preocupación con respecto al proyecto le vamos a dejar una tarjeta con la información de la investigadora responsable del estudio (Dra. Marcela Rodríguez Flores, tel. 54870900, ext 5535, 5534). Asimismo, si tiene preguntas generales relacionadas con sus derechos como participante en un estudio de investigación le dejamos los datos de los presidentes del Comité de Ética en Investigación del INNSZ (Dr. Arturo Galindo Fraga. Teléfono: 54870900 ext 6101).

Avenida Vasco de  
Quiroga No. 15  
Colonia Belisario  
Dominguez Sección XVI  
Delegación Tlalpan  
Código Postal 14080  
México, Distrito Federal  
Tel. (52)54870900  
www.incmnsz.mx





INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

**DECLARACIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO**

He leído con cuidado este consentimiento informado, he hecho todas las preguntas que me han sido hechas y todas me han sido respondidas satisfactoriamente. Para poder participar en el estudio, estoy de acuerdo con todos los siguientes puntos:

Estoy de acuerdo en participar en el estudio descrito anteriormente. Los objetivos generales, particulares del reclutamiento y los posibles daños e inconvenientes me han sido explicados a mi entera satisfacción.

Estoy de acuerdo en donar de forma voluntaria mis muestras biológicas (sangre y tejido adiposo subcutáneo) para ser utilizadas en éste estudio. Así mismo, mi información médica y biológica podrá ser utilizada con los mismos fines.

Estoy de acuerdo, en caso de ser necesario, que se me contacte en el futuro si el proyecto requiere coleccionar información adicional o si encuentran información relevante para mi salud. Mi firma también indica que he recibido un duplicado de este consentimiento informado.

Por favor responda las siguientes preguntas:

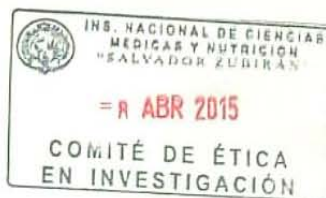
	SÍ (marque por favor)	NO (marque por favor)
a. ¿Ha leído y entendido la forma de consentimiento informado, en su lenguaje materno?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
b. ¿Ha tenido la oportunidad de hacer preguntas y de discutir este estudio?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
c. ¿Ha recibido usted respuestas satisfactorias a todas sus preguntas?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
d. ¿Ha recibido suficiente información acerca del estudio y ha tenido el tiempo suficiente para tomar la decisión?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
e. ¿Entiende usted que su participación es voluntaria y que es libre de suspender su participación en este estudio en cualquier momento sin tener que justificar su decisión y sin que esto afecte su atención médica o sin la pérdida de los beneficios a los que de otra forma tenga derecho?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
f. <b>Si aplica</b> : ¿Autoriza se dé acceso a sus registros médicos para este estudio de investigación y para propósitos regulatorios a agencias gubernamentales de la salud en México y posiblemente otras agencias gubernamentales de la salud en otros países en donde se pueda considerar al fármaco en estudio para la aprobación de su comercialización?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
¿Entiende los posibles riesgos, algunos de los cuales son aún desconocidos, de participar en este estudio?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Avenida Vasco de Quiroga No. 15  
Colonia Belisario Domínguez Sección XVI  
Delegación Tlalpan  
Código Postal 14080  
México, Distrito Federal  
Tel. (52)54870900  
www.incmnsz.mx

INS. NACIONAL DE CIENCIAS  
MÉDICAS Y NUTRICIÓN  
"SALVADOR ZUBIRÁN"  
- R ABR 2015  
COMITÉ DE ÉTICA  
EN INVESTIGACIÓN



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN



- |  | SÍ<br>(marque<br>por<br>favor) | NO<br>(marque<br>por<br>favor) |
|--|--------------------------------|--------------------------------|
| h. ¿Entiende que puede no recibir algún beneficio directo al participar en este estudio?   | <input type="checkbox"/>       | <input type="checkbox"/>       |
| i. ¿Ha discutido usted otras opciones de tratamiento con el médico participante en el estudio y entiende usted que otras opciones de tratamiento están a su disposición?   | <input type="checkbox"/>       | <input type="checkbox"/>       |
| j. ¿Entiende que no está renunciando a ninguno de sus derechos legales a los que es acreedor de otra forma como sujeto en un estudio de investigación?   | <input type="checkbox"/>       | <input type="checkbox"/>       |
| k. ¿Entiende que el médico participante en el estudio puede retirarlo del mismo sin su consentimiento, ya sea debido a que Usted no cumplió con los requerimientos del estudio o si el médico participante en el estudio considera que médicamente su retiro es en su mejor interés? | <input type="checkbox"/>       | <input type="checkbox"/>       |
| l. <i>Si aplica</i> ¿Entiende que el estudio puede ser suspendido por el patrocinador del estudio en cualquier momento?  | <input type="checkbox"/>       | <input type="checkbox"/>       |
| m. ¿Entiende que usted recibirá un original firmado y fechado de esta Forma de Consentimiento, para sus registros personales?  | <input type="checkbox"/>       | <input type="checkbox"/>       |

Declaración del paciente: Yo,

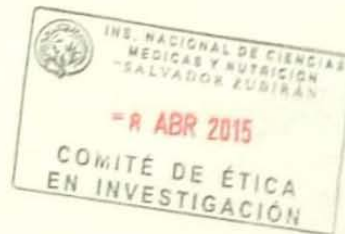
\_\_\_\_\_ declaro que es mi decisión participar en el estudio. Mi participación es voluntaria. He sido informado que puedo negarme a participar o terminar mi participación en cualquier momento del estudio sin que sufra penalidad alguna o pérdida de beneficios. Si suspendo mi participación, recibiré el tratamiento médico habitual al que tengo derecho en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) y no sufriré perjuicio en mi atención médica o en futuros estudios de investigación. Yo puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos o beneficios potenciales derivados de mi participación en el estudio. Si usted tiene preguntas sobre el estudio, puede ponerse en contacto la Dra. Marcela Rodríguez Flores en el INCMNSZ (teléfono: 5487 0900 ext: 5532, 5534, 5535). Si usted tiene preguntas acerca de sus derechos como participante en el estudio, puede hablar con el coordinador del Comité de Ética en Investigación del Instituto (Dr. Arturo Galindo Fraga. Teléfono: 54870900 ext 6101). Todas las preguntas han sido respondidas a mi satisfacción. He entendido que recibiré una copia firmada de este consentimiento informado.

Avenida Vasco de  
Quiroga No. 15  
Colonia Belisario  
Dominguez Sección XVI  
Delegación Tlalpan  
Código Postal 14080  
México, Distrito Federal  
Tel. (52)54870900  
www.incmnsz.mx





INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN



\_\_\_\_\_  
Nombre del Participante                      Firma del Participante                      Fecha

\_\_\_\_\_  
Coloque su huella digital si no sabe escribir

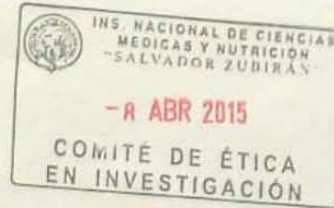
\_\_\_\_\_  
Nombre del representante legal                      Firma del representante legal                      Fecha  
(si aplica)

\_\_\_\_\_  
Nombre del Investigador                      Firma del Investigador                      Fecha  
que explicó el documento

Avenida Vasco de  
Quiroga No. 15  
Colonia Belisario  
Dominguez Sección XVI  
Delegación Tlalpan  
Código Postal 14080  
México, Distrito Federal  
Tel. (52)54870900  
www.incmnsz.mx



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN



\_\_\_\_\_  
Nombre del Testigo 1

\_\_\_\_\_  
Firma del Testigo 1

\_\_\_\_\_  
Fecha

Relación con el participante: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Nombre del Testigo 2

\_\_\_\_\_

Firma del Testigo 2

\_\_\_\_\_

Fecha

Relación que guarda con el participante: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

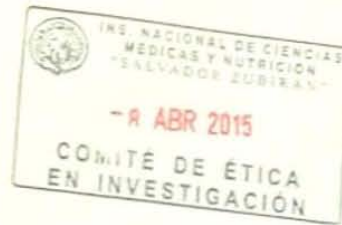
Lugar y Fecha: \_\_\_\_\_

Avenida Vasco de  
Quiroga No. 15  
Colonia Belisario  
Dominguez Sección XVI  
Delegación Tlalpan  
Código Postal 14080  
México, Distrito Federal  
Tel. (52)54870900  
www.incmnsz.mx





INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN



¡Muchas gracias por su participación!

**INFORMACIÓN DE LA INVESTIGADORA RESPONSABLE DEL ESTUDIO:**

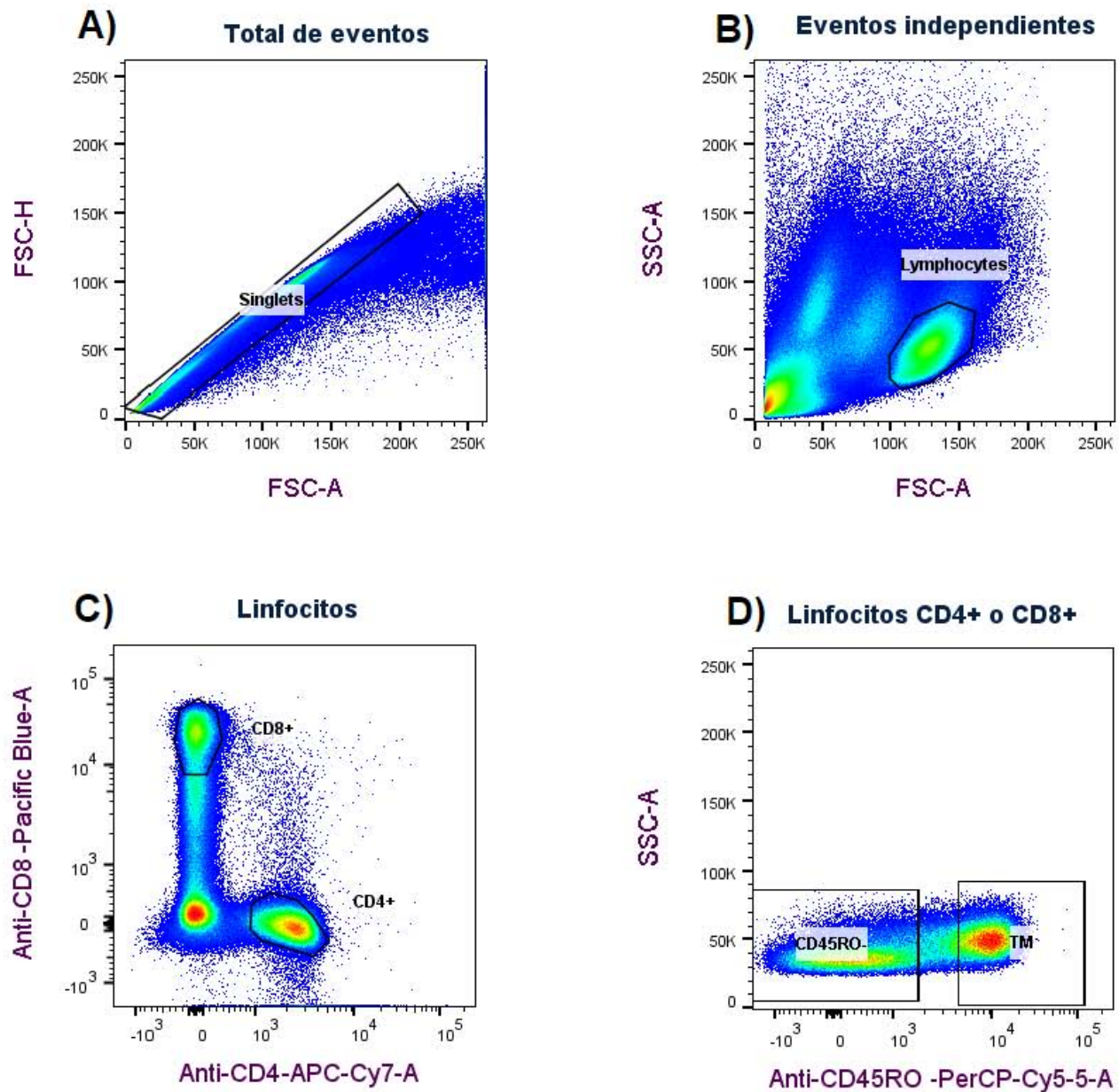
Dra. Marcela Rodríguez Flores  
Clínica de Obesidad y Trastornos de la Conducta Alimentaria  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"  
Teléfono: 55 5487 0900, ext. 5535, 5534  
Correo electrónico: chelor76@yahoo.com

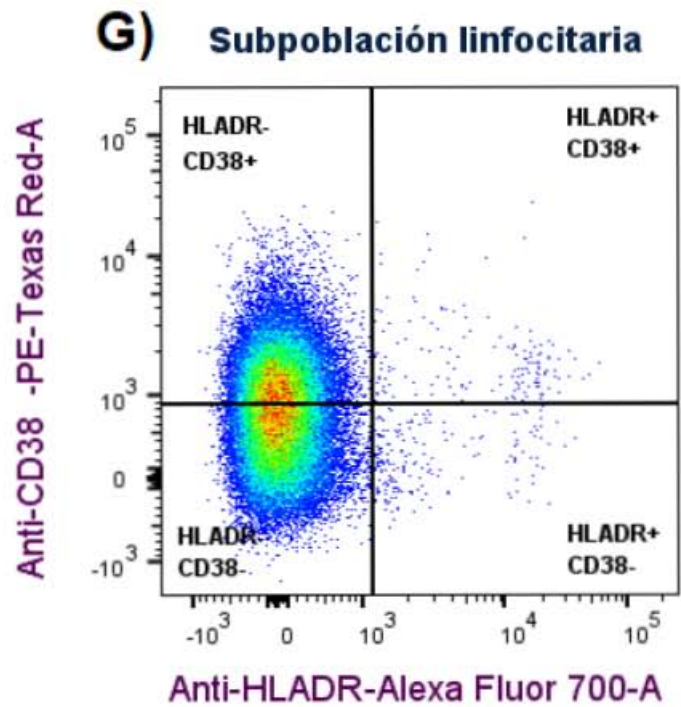
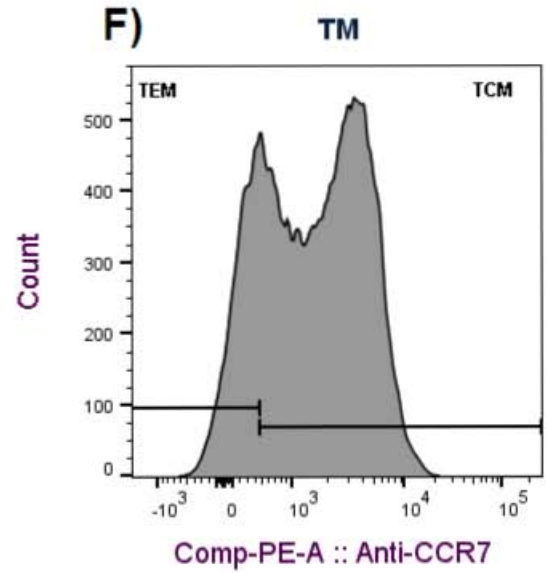
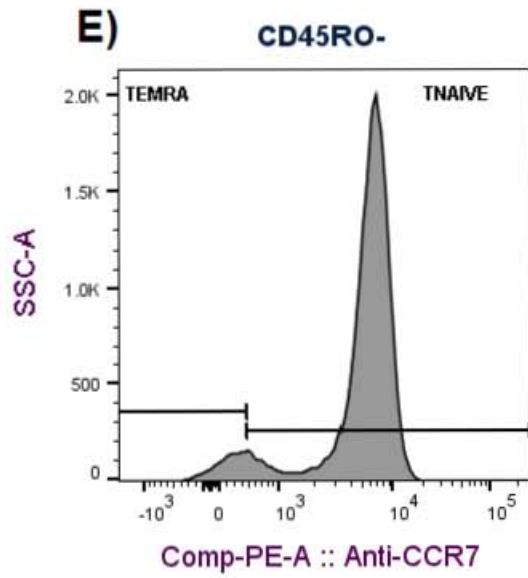
**DATOS DEL PRESIDENTE DEL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN DEL  
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN:**

Dr. Arturo Galindo Fraga  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"  
Teléfono: 55 54870 900 ext. 6101

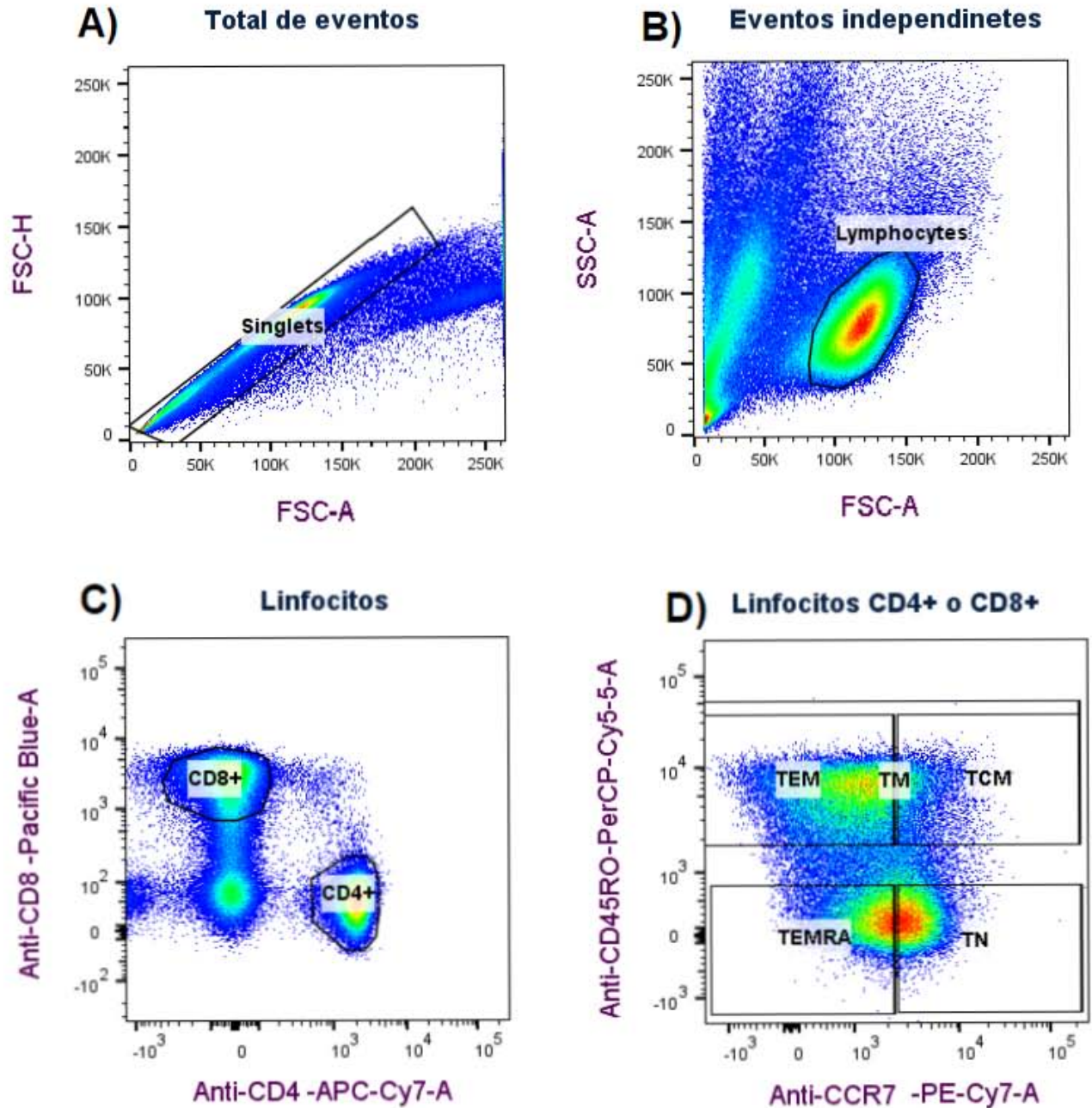
Avenida Vasco de  
Quiroga No. 15  
Colonia Belisario  
Dominguez Sección XVI  
Delegación Tlalpan  
Código Postal 14080  
México, Distrito Federal  
Tel. (52)54870900  
www.incmnsz.mx

## Anexo 4. Estrategia de gating para la cohorte de obesos y eutróficos



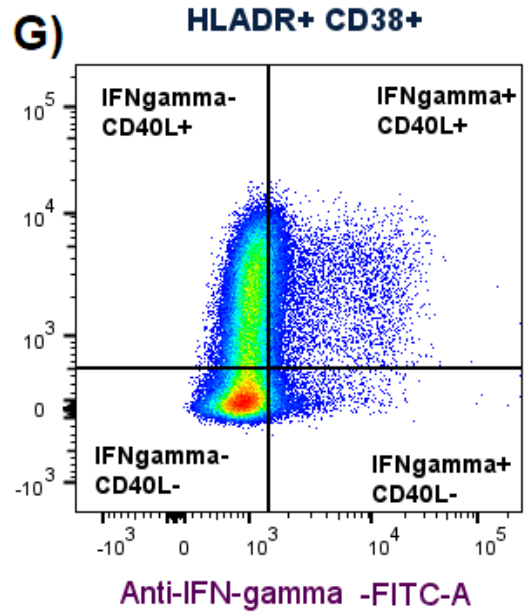
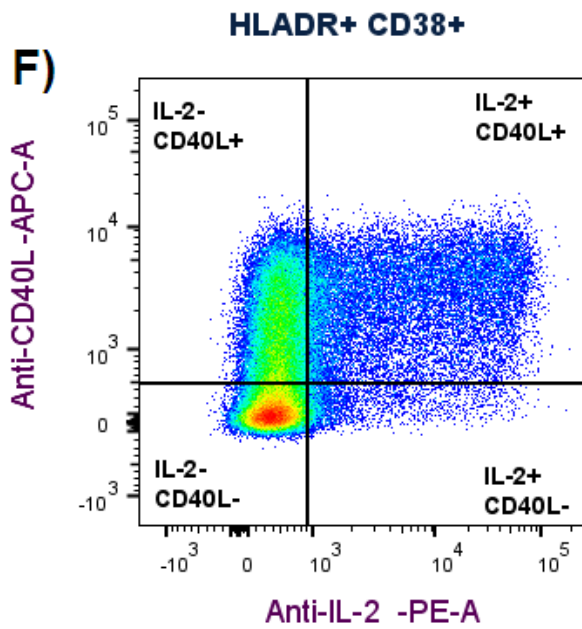
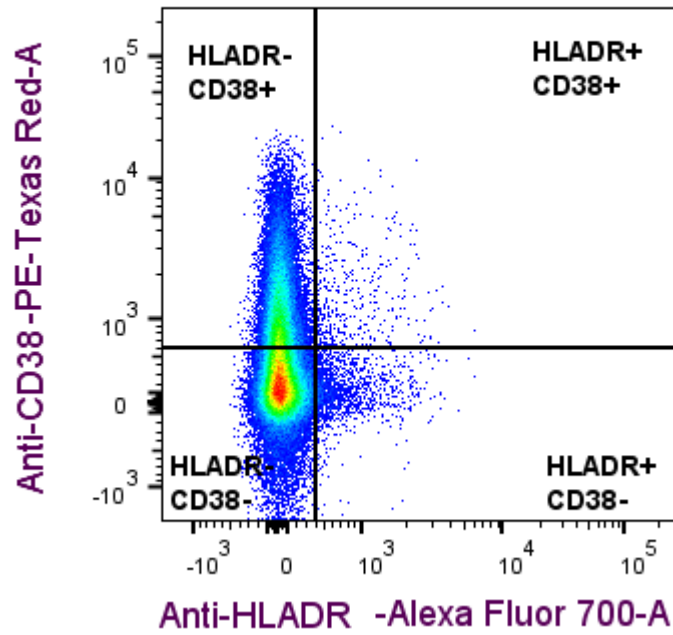


## Anexo 5. Estrategia de gating para determinar funcionalidad en la cohorte de obesos mórbidos

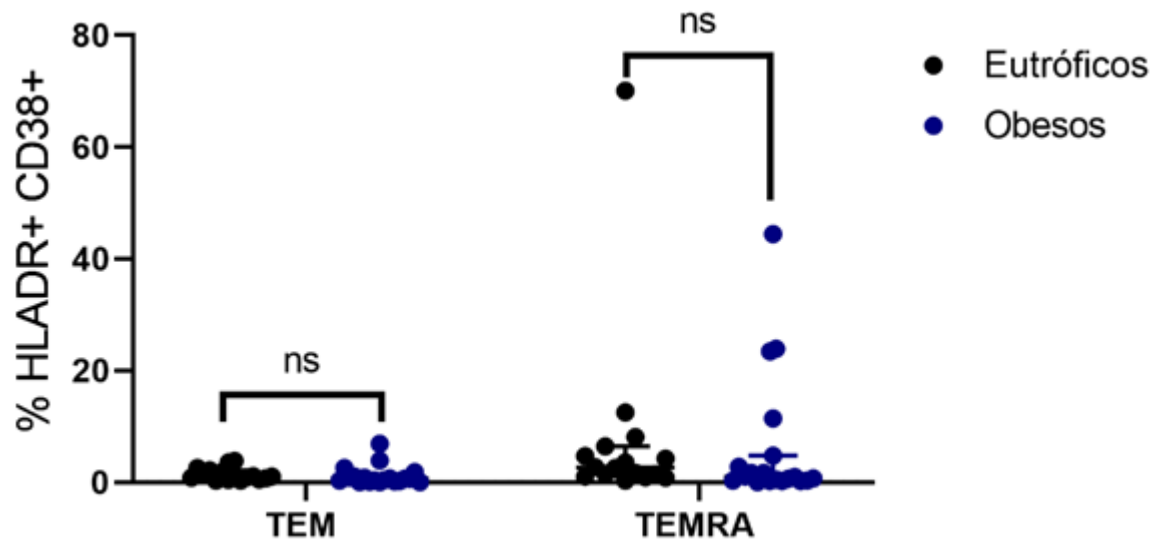




### E) Subpoblación linfocitaria

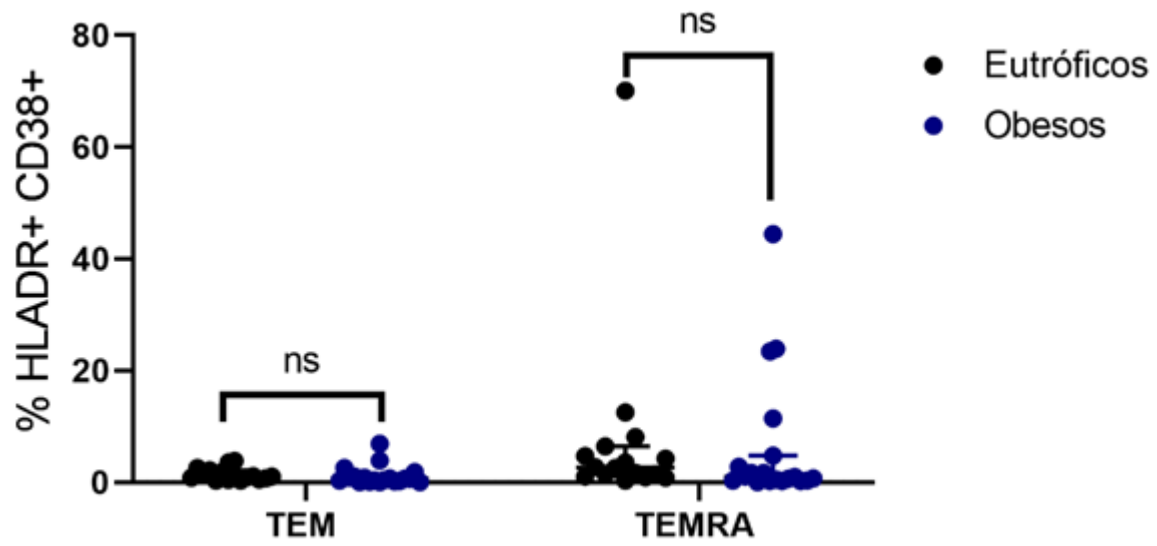


## Anexo 6. Activación de linfocitos T CD8+ en adultos



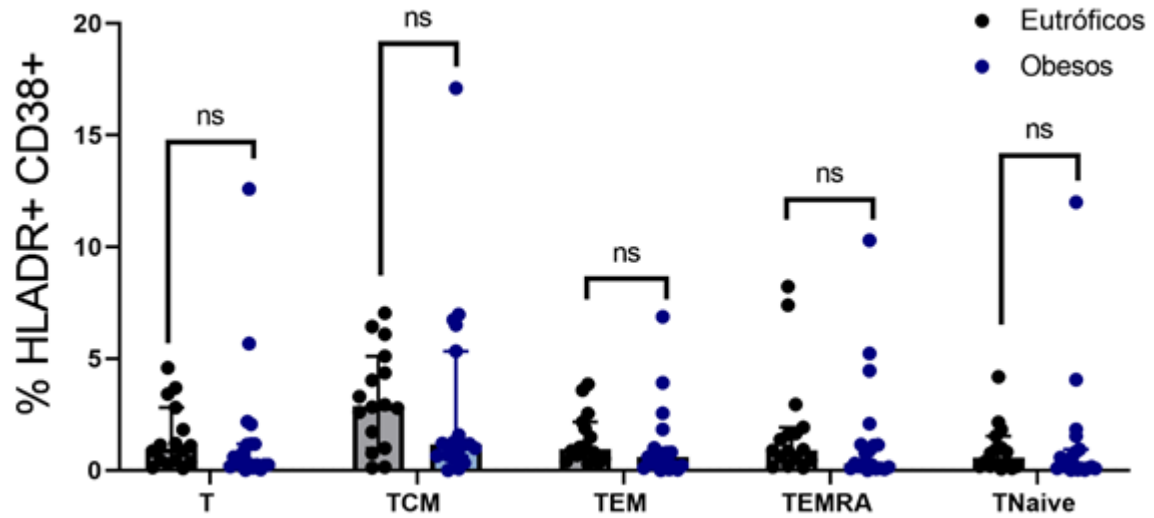
No existe diferencia significativa entre eutróficos y obesos en cuanto a la activación de células  $T_{EM}$  y  $T_{EMRA}$   $CD8^+$

## Anexo 7. Activación de linfocitos T CD4+ en niños



No existe diferencia significativa entre eutróficos y obesos en cuanto a la activación de células  $T_{EM}$  y  $T_{EMRA}$  CD4+ en niños

## Anexo 8. Activación en linfocitos T CD8+ de niños



*No existe diferencia significativa entre eutróficos y obesos en cuanto a la activación de células T CD8+ y todas sus subpoblaciones.*