



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

Asociación del perfil inflamatorio de mujeres  
embarazadas sanas y obesas con el perfil  
inflamatorio perinatal.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADA EN QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA

P R E S E N T A

**BRENDA GRISSEL CASORLA CERVANTES**

ASESOR: DR. ISMAEL MANCILLA HERRERA

ASESOR TÉCNICO: M. EN C. YESENIA BRITO PÉREZ

Coyoacán, Cd. Universitaria, Ciudad de México, 2022





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: LÓPEZ MACIAS CONSTANTINO III ROBERTO**

**VOCAL: MANCILLA HERRERA ISMAEL**

**SECRETARIO: CASTRO ESCAMILLA OCTAVIO**

**1er. SUPLENTE: HECTOR ENRIQUE ESPINOSA ARCINIEGA**

**2° SUPLENTE: ALBERTO GARCIA LOZANO**

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

**INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA ISIDRO ESPINOZA DE LOS REYES**

**ASESOR PRINCIPAL: DR. ISMAEL MACILLA HERRERA**

**ASESOR TÉCNICO: M. EN C. YESENIA BRITO PÉREZ**

**SUSTENTANTE: BRENDA GRISEL CASORLA CERVANTES**

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>ANTECEDENTES</b>	1
➤ Problemática de la obesidad: Situación demográfica.	1
➤ Mujeres embarazadas obesas en México	4
➤ Impacto de la obesidad materna en el recién nacido	6
➤ Obesidad como un estado inflamatorio	8
➤ El tejido adiposo y su papel en el estado inflamatorio	9
➤ Cambios fisiológicos durante el embarazo con obesidad	14
➤ El sistema inmune del recién nacido	18
➤ Impacto de la obesidad materna sobre el estado inflamatorio del recién nacido	20
➤ Efecto de la obesidad en Linfocitos B	23
➤ Efecto de la obesidad en Células Natural Killer	24
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	26
<b>PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b>	27
<b>HIPÓTESIS</b>	27
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	27
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b>	27
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	28
➤ Características del estudio	28
➤ Pacientes y grupos de estudio	28

➤ Procesamiento de las muestras e inmunomarcaje de superficie	30
➤ Algoritmo de análisis para la identificación de linfocitos y estados de activación	31
➤ Análisis estadístico	32
<b>RESULTADOS</b>	33
➤ Descripción poblacional	33
➤ Evaluación del estado materno	36
➤ Evaluación del estado del recién nacido	42
<b>DISCUSIÓN</b>	49
<b>CONCLUSIONES</b>	53
<b>REFERENCIAS</b>	54

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
1. Índices de obesidad en la población adulta a nivel mundial	3
2. Distribución del estado nutricional de hombres y mujeres $\geq 20$ años de acuerdo a la clasificación del IMC 2012	4
3. Diferencias celulares en tejido adiposo de ratones sanos y obesos.	11
4. Fisiología de la placenta y tejido adiposo durante el embarazo obeso.	17
5. Ejemplo de algoritmo de análisis para fenotipificación de poblaciones linfocitarias.	32
6. Distribución de linfocitos totales maternos.	37
7. Distribución de subpoblaciones de linfocitos T maternos.	38
8. Estados de activación temprana en linfocitos T maternos.	40
9. Relación entre el IMC y estados de activación temprana en linfocitos T maternos.	40
10. Estados de activación tardía en linfocitos T maternos.	41
11. Relación entre el IMC y estados de activación tardía en linfocitos T maternos.	42
12. Distribución de linfocitos totales en recién nacidos.	43

13.	Distribución de subpoblaciones de linfocitos T en recién nacidos.	44
14.	Estados de activación temprana en linfocitos T de recién nacidos.	45
15.	Relación entre el IMC y estados de activación tardía en linfocitos T de recién nacidos.	46
16.	Estados de activación tardía en linfocitos T de recién nacidos.	47
17.	Relación entre el IMC y estados de activación tardía en linfocitos T de recién nacidos.	47

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
1. Clasificación de obesidad según la OMS.	2
2. Principales complicaciones asociadas a la obesidad durante el embarazo	5
3. Panel de anticuerpos monoclonales acoplados a fluorocromos para el inmunomarcaje superficial de linfocitos humanos.	31
4. Descripción poblacional materna	35
5. Descripción poblacional de recién nacidos	36
6. Asociación del IMC materno sobre características fenotípicas de linfocitos maternos.	38
7. Impacto del IMC materno sobre características fenotípicas de linfocitos de CU.	44



## LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Células Presentadoras de Antígeno
ATMs	Macrófagos alternativamente activados
DC	Células dendríticas
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
FL	Hígado fetal
GWG	Ganancia de peso durante la gestación
HPC	Células progenitoras hematopoyéticas
HSC	Células troncales hematopoyéticas
IMC	Índice de masa corporal
IL	Interleucina
LcT	Linfocitos T
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LGA	Largo para la edad gestacional
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MO	Médula ósea
OID	Obesidad Inducida por la Dieta
OMS	Organización Mundial de la Salud
OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
RN	Recién nacido
SCU	Sangre de cordón umbilical
SDG	Semanas de gestación
SGA	Pequeño para la edad gestacional
SPM	Sangre periférica materna
SI	Sistema inmune
TA	Tejido adiposo
TNF	Factor de Necrosis Tumoral

UCIN	Unidad de Cuidados Intensivos
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad

## RESUMEN

La gestación es una etapa clave para el desarrollo de los individuos en los que el microambiente fetal se ve influenciado por condiciones maternas como la obesidad. Por ejemplo, los hijos de madres con sobrepeso y obesidad pregestacional tienen mayores índices de morbilidad neonatales e infantiles, en las que se destacan las infecciones, y sus repercusiones pueden trascender incluso hasta la vida adulta de la prole con mayor riesgo de padecer obesidad y enfermedades cardiovasculares. La obesidad está asociada con un estado inflamatorio crónico de bajo grado y en el embarazo, esta condición puede afectar la funcionalidad de la placenta y el desarrollo del producto gestante. Recientes estudios han mostrado que la inflamación materna induce alteraciones en el fenotipo y funcionalidad de células linfoides, lo que pudiera estar asociado al incremento en el riesgo de enfermedades infecciosas en la vida temprana. El objetivo de este trabajo fue evaluar el impacto de la obesidad en las subpoblaciones y estados de activación de linfocitos como un indicador del estado inflamatorio en sangre materna y en el recién nacido. Para ello, a través del inmunomarcaje de células de sangre periférica materna (SPM) y de cordón umbilical (CU), evaluamos la frecuencia de linfocitos T, B, NKs, así como su estado de activación temprana y tardía (CD69+/CD279+) de mujeres sanas, con sobrepeso y obesidad a la resolución del embarazo. Observamos que la frecuencia de linfocitos T, B y NK es similar entre los tres grupos. Interesantemente, en el grupo de obesidad (incluyendo Grados I/II/III), la frecuencia de células T activadas (CD69+/CD279+), se relacionan inversamente proporcional con el IMC en SPM y CU. Nuestros resultados sugieren que, en el estado de obesidad, los linfocitos T pierden su capacidad de activación basal lo que pudiera estar relacionado al incremento en el riesgo de enfermedades infecciosas.

## **ANTECEDENTES**

### **Problemática de la obesidad: situación demográfica.**

La obesidad es una enfermedad de etiología multifactorial de curso crónico en la cual se involucran aspectos genéticos, ambientales y de estilo de vida. Se caracteriza por un balance positivo de energía, que ocurre cuando la ingestión de calorías excede al gasto energético, ocasionando un aumento en los depósitos de grasa corporal y, por consiguiente, ganancia de peso [1]. Es el principal factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades crónicas como diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), enfermedades cardiovasculares, hipertensión arterial, dislipidemias, enfermedades osteoarticulares y ciertos tipos de cáncer como el de mama y próstata [2]. En los niños, la obesidad infantil se asocia a una mayor probabilidad de muerte prematura, enfermedades metabólicas, así como mayor probabilidad de desarrollar obesidad mórbida y condiciones de discapacidad física como pueden ser menor capacidad respiratoria, limitaciones en el movimiento, dolor articular, pérdida de extremidades en casos severos debido a problemas circulatorios graves durante la edad adulta [3].

La clasificación más utilizada para definir el grado de obesidad en adultos es con base en el índice de masa corporal (IMC), el cual es una herramienta para evaluar la composición corporal a nivel poblacional, es de bajo costo, fácil aplicación y la forma de calcularlo no varía en función del sexo ni la edad en la población adulta [4]. El IMC se calcula dividiendo el peso de una persona en kilogramos entre el cuadrado de su talla en metros ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ), con el valor obtenido se puede clasificar los diferentes grados de obesidad de la población (Tabla 1) [5]. Además, con este indicador puede establecerse el riesgo de padecer ciertas comorbilidades, el cual está influenciado por diversos factores como la carga genética, la dieta, grupo étnico y nivel de actividad física. Los riesgos asociados con el aumento del IMC son continuos y graduales, comienzan a aumentar, siendo mayores en individuos con un IMC superior a 25 [6].

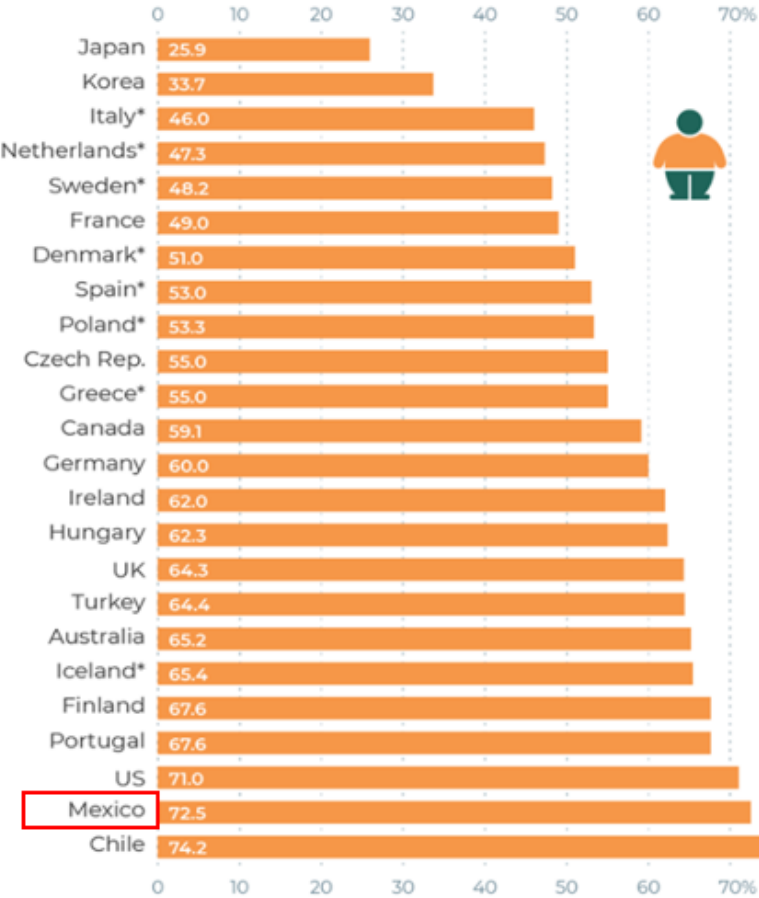
**Tabla 1.** Clasificación de obesidad según la OMS.

Clasificación	Bajo peso	Normal	Sobrepeso	Obesidad		
				Grado I	Grado II	Grado III
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	< 18.5	18.5-24.9	25.0-29.9	30.0-34.9	35.0-39.9	>40.0

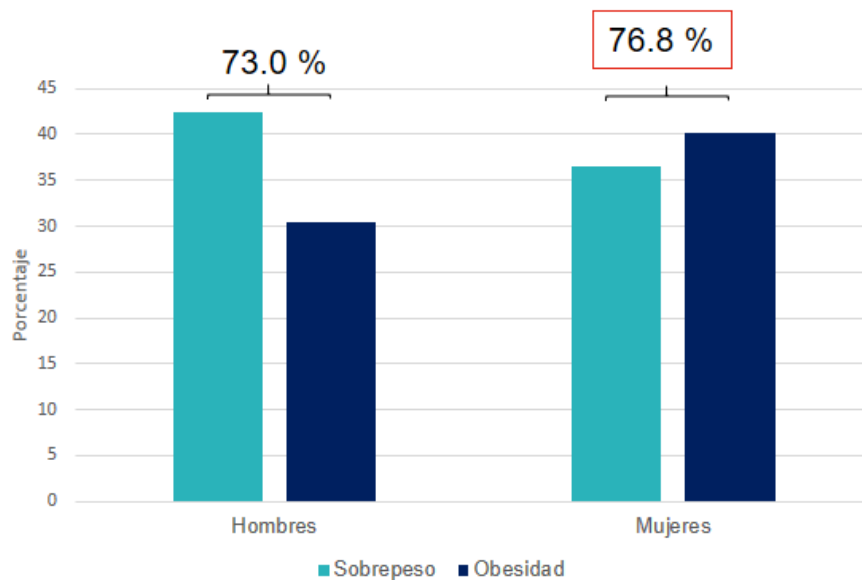
**Adaptado de:** WHO (2000) Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic, Report of a WHO Consultation on Obesity.[5]

De manera alarmante, entre 1975 y 2016, la prevalencia mundial de la obesidad casi se ha triplicado. De esta manera, en el 2016 la OMS reportó que el 39% de personas mayores a 18 años (39% en hombres y 40% en mujeres mayores de 18 años) tenían sobrepeso, es decir, más de 1900 millones de personas adultas padecían esta condición, y más de 650 millones cursaban con obesidad. Estos datos muestran que la obesidad se ha convertido en un problema importante de salud pública que afecta a personas de todas edades y condiciones socioeconómicas [7]. Por otra parte, la OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico) dice que más de la mitad de la población tiene sobrepeso en 34 de los 36 países pertenecientes a esta organización (Figura 1). Las tasas promedio de obesidad adulta han aumentado del 21% en 2010, al 24% en 2016, lo que significa que ahora 50 millones de personas adicionales son obesas [8]. En el caso de la población mexicana, la prevalencia de la obesidad ha tenido un aumento sin precedentes en las últimas tres décadas, siendo que México y Estados Unidos ocupan los primeros lugares de prevalencia mundial de obesidad en población adulta. En México según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) [9] y datos de la OCDE, alrededor de 70% (Figura 1) de la población mexicana adulta padece sobrepeso u obesidad, y de estas el 76.8 %

incluye mujeres en edad reproductiva que supone la mayoría de ellas se convertirán en madres (Figura 2).



**Figura 1:** Índices de obesidad en población adulta a nivel mundial  
**Modificado de:** The Heavy Burden of Obesity. The Economics of Prevention.  
Disponible en: <https://www.oecd.org/health/the-heavy-burden-of-obesity-67450d67-en.htm>



**Figura 2:** Distribución del estado nutricional de la población adulta en México, de acuerdo a la clasificación del IMC\*

**Modificado de:** Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT, 2018). Disponible en: <https://ensanut.insp.mx>

Si bien la obesidad y el sobrepeso son condiciones complejas de origen multifactorial, se reconoce que el sistema inmunológico puede ser causante de su inicio y/o mantenimiento por el incremento en el estado inflamatorio. La inflamación se define como una serie ordenada y secuencial de eventos que tienen la finalidad de mantener la homeostasis de los tejidos y órganos [10], y se caracteriza por el incremento de mediadores séricos como el Factor de Necrosis Tumoral (TNF)- $\alpha$ , Interleucina (IL)-6, IL-8 [11], así como otras citocinas y quimioatrayentes que promueven la infiltración y activación de células inmunes a los tejidos, particularmente al tejido adiposo [12].

### Mujeres embarazadas obesas en México

El incremento de la prevalencia de obesidad materna durante los últimos años constituye un problema de salud pública [13]. Como parte natural de la epidemia

de obesidad, se ha observado que la prevalencia de sobrepeso y obesidad en mujeres en edad reproductiva también se ha incrementado. La evidencia muestra que en países industrializados una de cada cinco mujeres padece obesidad durante el embarazo [14]. En México, se sabe que el 73 % de las mujeres en edad reproductiva tienen obesidad. Esta elevada prevalencia es de suma importancia debido a que la obesidad preconcepcional se asocia con diversas complicaciones durante el embarazo, como lo son hipertensión, preeclampsia, eclampsia, complicaciones durante el parto, entre otras (Tabla 2) [9].

Independientemente de la adiposidad previa al embarazo, todas las mujeres aumentan las reservas de grasa materna al comienzo del embarazo para cumplir con las demandas energéticas de la gestación y lactancia. Se considera un aumento de peso normal alrededor de 3,8 kg de grasa, aunque pueden existir variaciones [15]. La mujer embarazada con obesidad está en riesgo de presentar problemas obstétricos prenatales, intraparto y posparto (Tabla 2) [16-18]. Estas complicaciones pueden conducir a una disminución de la calidad de vida materna, así como afecciones en la descendencia durante los primeros años de vida e incluso hasta la vida adulta [19, 20].

**Tabla 2.** Principales complicaciones asociadas a la obesidad durante el embarazo

<b>Periodo</b>	<b>Complicaciones</b>
Previas al embarazo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infertilidad</li> <li>• Abortos involuntarios recurrentes</li> <li>• Aborto espontáneo después del tratamiento de fertilidad.</li> </ul>
Antes del parto	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diabetes gestacional</li> <li>• Preeclampsia-eclampsia</li> <li>• Infecciones urinarias y / o del tracto genital.</li> <li>• Eventos trombóticos</li> <li>• Trastornos hipertensivos del embarazo.</li> </ul>
Intraparto	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Necesidad de inducción.</li> <li>• Falta de progreso</li> <li>• Riesgo de cesárea</li> <li>• Riesgos anestésicos / perioperatorios.</li> </ul>
Posparto	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Distocia de hombros</li> <li>• Hospitalización prolongada.</li> </ul>



Complicaciones fetales

- Mayor susceptibilidad a infecciones periparto
  - Hemorragia post parto
  - Mala lactancia / dificultades con la lactancia
  - Muerte fetal
  - Macrosomía
  - Admisión a la UCIN
  - Muerte neonatal
  - Anomalías congénitas
- 

Adaptado de: Arendas, et al. 2008. [21]

### **Impacto de la obesidad materna en el recién nacido**

Durante el embarazo, la suma de las condiciones gestacionales condicionan el desarrollo y el crecimiento fetal, y se ha propuesto que son capaces de “programar” las respuestas fisiológicas que predisponen a la descendencia a enfermedades metabólicas y cardiovasculares durante la vida temprana y adulta [22, 23]. Considerando la obesidad como un estado de inflamación crónica que afecta directamente a la madre, potencialmente pudiera programar a la progenie y ser en parte responsable de múltiples complicaciones [24]. En este sentido, diversos estudios muestran que el IMC materno está proporcionalmente asociado con mayores índices de adiposidad infantil y una distribución adversa de grasa corporal [25, 26]. En el caso de los aumentos del peso gestacional también se asocia con un mayor IMC infantil y una mayor masa grasa [26]. Adicionalmente, ambas situaciones, están asociados a incrementos en riesgo a cursar con presión arterial elevada, un perfil lipídico adverso y resistencia a la insulina durante la infancia [25, 27, 28]. Otros estudios destacan la obesidad materna en el embarazo como un factor que predispone a la progenie a mayor riesgo de mortalidad prematura por todas las causas, ingresos hospitalarios por enfermedades cardiovasculares, coronarias, diabetes tipo 2 y accidente cerebrovascular [29, 30].

Los niños nacidos de mujeres con obesidad pregestacional tienen mayor riesgo de presentar resultados adversos a largo plazo para la salud, incluyendo una mayor incidencia de obesidad [31], déficit de desarrollo cognitivo y Trastorno de Déficit de

Atención (TDAH) [32], diabetes tipo 2 [33], enfermedad cardiovascular [29] y algunos tipos de cáncer [34] en comparación con los niños nacidos de madres delgadas. Así mismo, en un estudio en el que se evaluó el crecimiento y el desarrollo del recién nacido, se encontró que un elevado IMC materno pregestacional se relaciona con perfiles cardiometabólicos adversos en la descendencia [25], además de mayor incidencia de enfermedades infecciosas, rinitis, alérgica y asma a lo largo de la infancia de recién nacidos de madres con obesidad e incluso síndrome metabólico [35].

La OMS define al síndrome metabólico como la presencia de dos o más de los siguientes componentes: obesidad, hipertensión, resistencia a la insulina y dislipidemia. Esta condición durante el embarazo aumenta el riesgo de procrear niños macrosómicos, y de que la progenie reproduzca esta condición materna en la vida adolescente y adulta [36]. Además, el síndrome metabólico durante el embarazo vincula el mayor peso al nacer con el desarrollo de obesidad en adolescentes y adultez de 25 años de edad [37, 38]. Así mismo, las elevadas tasas de obesidad explican gran parte del aumento de la prevalencia de DMT2 entre los jóvenes. Se piensa que la epidemia de obesidad y el riesgo posterior a desarrollar DMT2 y síndrome metabólico pueden tener origen en el desarrollo uterino. Este riesgo de desarrollar síndrome metabólico en adolescentes fue abordado en otro estudio, en el cual Boney y colaboradores en el año 2005 concluyendo que, los infantes que fueron clasificados como LGA al nacer tuvieron una mayor relación de riesgo de desarrollar esta condición a los 11 años de edad, al igual que los hijos de mujeres obesas [39].

## **Obesidad como un estado inflamatorio**

Mientras que la inflamación inducida por la obesidad se asemeja a la inflamación clásica en muchos sentidos, difiere en la magnitud, en la que se encuentran niveles más bajos de citocinas inflamatorias circulantes, y la propia persistencia, por lo que se ha catalogado como inflamación crónica de bajo grado. A nivel local, la acumulación de macrófagos tiene efectos sobre la fisiología de los adipocitos, generando una comunicación intercelular que exacerba el funcionamiento patológico de este tejido. Los factores derivados de macrófagos como TNF- $\alpha$  modifican el perfil de expresión y secreción de adipocinas por parte de los adipocitos, tornándolo en un ambiente que condiciona insulino-resistencia, aterogénesis e inflamación. Los productos secretados por el tejido adiposo no solo tienen consecuencias autocrinas, sino que también tienen repercusiones sistémicas (acción endocrina) y en los órganos adyacentes (acción paracrina) [40]. La obesidad también condiciona un estado inflamatorio a nivel sistémico. Éste se manifiesta al medir los mediadores inflamatorios en sangre periférica, como son la interleucina 6 (IL-6) y la proteína C reactiva (PCR), entre otras. Los niveles plasmáticos de los mediadores inflamatorios están asociados positivamente con la magnitud de los depósitos adiposos (índice de masa corporal, porcentaje de grasa corporal, circunferencia cintura) así como con las consecuencias metabólicas de la obesidad (insulino-resistencia, dislipidemia, presión arterial), tanto en población pediátrica como adulta [39]. Se denomina estado de inflamación crónica a la que presenta un curso prolongado, de semanas a meses, con signos de inflamación aguda y se caracteriza por infiltración de células mononucleares en diferentes tejidos. Así mismo, la obesidad está considerada como un estado de inflamación crónica debido a que la reversión de los marcadores inflamatorios requiere tratamientos de dieta prolongados (>8 semanas en modelos animales) antes de que sea claramente discernible en el tejido adiposo (TA), el cual, de todos los tejidos sensibles a la insulina, presenta

mayor inflamación inducida por la obesidad, caracterizado por el aumento de citocinas inflamatorias e infiltración de células inmunes tanto de la línea mieloide y linfoide [40]. Los leucocitos infiltrados, así como los adipocitos, también reaccionan a los cambios en disponibilidad de nutrientes, que a su vez influyen en el metabolismo intrínseco de las células vecinas influyendo en la homeostasis metabólica del tejido entero [41] [42].

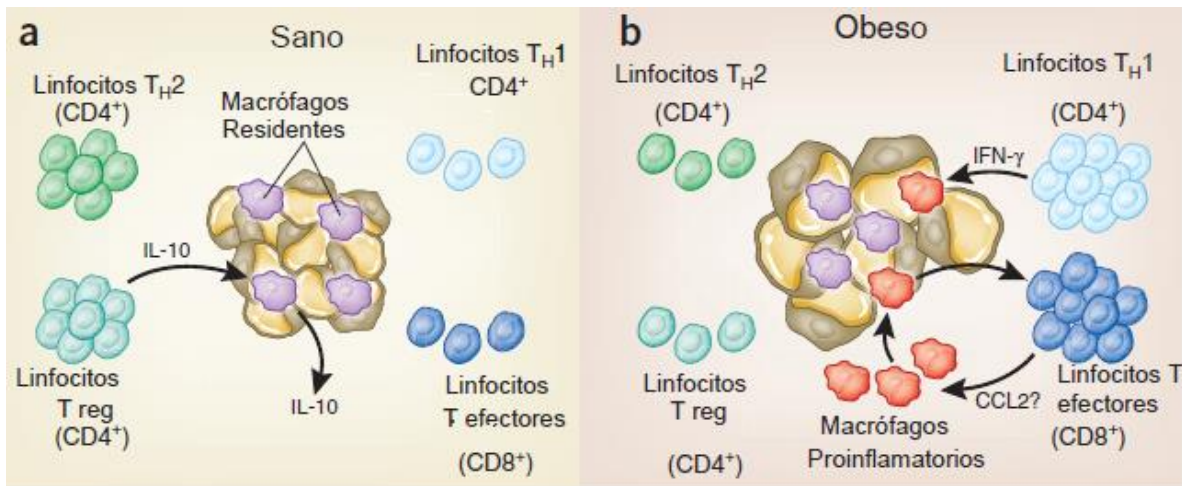
En la obesidad, el exceso en la ingesta calórica contra el escaso gasto energético y/o la sobrealimentación, promueven la formación de TA que hoy en día es considerado como una glándula que sirve como reservorio de energía y participa activamente en el equilibrio metabólico. Adicionalmente El TA es un órgano endocrino con capacidad de responder de manera rápida y dinámica a las alteraciones del ambiente que lo rodea. Además desempeña múltiples funciones, las cuales ejerce a través de una gran variedad de hormonas y citocinas (adipocinas), que funcionan como mediadores entre el TA con órganos adyacentes y a distancia como el endotelio, hígado, músculo, páncreas, glándulas suprarrenales y sistema nervioso [43].

Entre las funciones del TA se encuentran el mantenimiento del balance energético, termorregulación, metabolismo de lípidos y glucosa, modulación de la función hormonal y reproductiva, regulación de la presión arterial y de la coagulación sanguínea. Además, desempeña un papel fundamental sobre las cascadas inflamatorias, procoagulantes, antifibrinolíticas y vasoactivas, lo que sugiere una influencia directa sobre el proceso inflamatorio [44]. La remodelación del TA es un proceso continuo que se acelera patológicamente con la obesidad y, con el consecuente reordenamiento celular, angiónérico y estructural, es favorecido un ambiente inflamatorio que se retroalimenta de sí mismo [45].

Estudios recientes indican que varios subconjuntos de leucocitos son capaces de infiltrarse y residir en el TA, regulando el estado inflamatorio y la sensibilidad a la

insulina [46]. Sin embargo, el papel de los leucocitos residentes en TA asociado al desarrollo de obesidad no ha sido completamente caracterizado. Sin embargo, se ha demostrado que la obesidad reduce la timopoyesis y restringe el repertorio del receptor de células T (TCR), lo cual conduce a una reducción de la diversidad de reconocimiento inmune. Además se ha observado la presencia de células T efectoras en tejido adiposo son ricas en citocinas como el IFN- $\gamma$  y granzima B. y la activación de su TCR trae como consecuencia el incremento del ambiente inflamatorio [47].

En el año 2009 mediante un estudio realizado en ratones, Lumeng y colaboradores observaron diferencias en la polarización de los perfiles de linfocitos T así como en la producción de citocinas proinflamatorias en TA de ratones obesos comparados con un grupo control (Figura 3). Los investigadores reportaron que, en TA de ratones delgados, predominan los linfocitos T (LcT T) tipo regulador (Treg) y la prevalencia del perfil de linfocitos Th2. Estas células son capaces de secretar IL-10, estimulando a su vez la producción de IL-10 de Macrófagos Alternativamente Activados (ATMs), que a su vez se relaciona con el incremento de la sensibilidad a la insulina de los adipocitos, incluso en presencia de TNF- $\alpha$ . Por otra parte, en TA de ratones obesos, el tipo de linfocitos que infiltran el tejido son LcT CD8+ y predomina el perfil Th1, donde estas células y el microambiente favorecen la infiltración de ATMs para inducir el perfil M1 de los macrófagos, caracterizados por la producción de CCL2. De esta manera, los LcT, tanto CD4 como CD8, en TA pueden contribuir a la ganancia de peso favoreciendo el estado proinflamatorio [48].



**Figura 3:** Diferencias celulares en TA de ratones sanos y obesos. a) Se observa el TA de ratones sanos, con predominio del perfil Th2 sobre el Th1, además de la presencia en mayor medida de linfocitos T reguladores y la producción de IL-10; b) Se observa la polarización hacia el perfil Th1 y una menor proporción de linfocitos T reguladores respecto a los T efectoros (CD8+), los cuales mediante la producción y retroalimentación de citocinas como IFN- $\gamma$  y CCL2 alteran el fenotipo de macrófagos residentes, predominando el fenotipo proinflamatorio. **Modificado de:** Lumeng, et al. 2009. [48]

Además de la presencia de mediadores inflamatorios en plasma por el que cursan los individuos obesos, se ha observado que el estado de activación de los leucocitos en sangre periférica es diferente al de los individuos de peso normal. Los diferentes estados de activación de los linfocitos condicionan el tipo y magnitud de la respuesta inmune que genera, y dicho estado puede condicionarse por tiempo de exposición a los diferentes estímulos considerando lo anterior existen moléculas asociadas a un estado de activación temprana y tardía. Un ejemplo de las moléculas asociadas a estados de activación es CD69, relacionada con el estado de activación temprana de las células linfoides [49-51]. Aunque los linfocitos de sangre periférica en reposo no la expresan, se induce su expresión rápidamente en los sitios con ambientes inflamatorios, así como en ambientes con inflamación crónica [52]. Se ha observado que la mayoría de las células T expresan CD69 en niveles altos en presencia de diversas enfermedades en humanos, como hepatitis viral crónica, asma [53, 54], artritis [55], colitis [56], miocarditis [57], respuesta contra patógenos, frente a tumores [58, 59] y obesidad

[60, 61], mostrando que el ambiente inflamatorio está involucrado en la expresión de esta molécula.

La rápida expresión de CD69 en la membrana celular (entre 2 y 4 horas tras la activación) sitúa a esta molécula dentro del grupo de genes “tempranos” inducidos durante la activación linfocitaria [62]. El ligando natural de CD69 aún no se conoce, lo cual dificulta el estudio de la función fisiológica de este receptor. Sin embargo, se ha visto que su expresión se manifiesta en todos los linajes hematopoyéticos a excepción de eritrocitos, además se detecta *in vivo* en algunos subtipos de linfocitos T y B en tejidos linfoides periféricos [63-66]. Si bien su función tampoco está del todo clara, la interacción con anticuerpos agonistas induce la expresión de TGF- $\beta$  y suprime la producción de citocinas proinflamatorias como IL-17 e IFN- $\gamma$  [56, 58, 67, 68]. También se ha observado que las células T CD69+ son capaces de inducir la expresión de la enzima indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) en macrófagos asociados a tumores ejerciendo un efecto negativo en las respuestas inmunes, por lo que éstas células han sido propuestas como reguladoras en respuestas dependientes de TGF- $\beta$  [69]. Además de regular la respuesta frente a citocinas, ha sido demostrado que CD69 afecta la migración de las células inmunes pero el mecanismo molecular de este efecto no está completamente descrito [70].

Otra molécula asociada a la activación, pero de manera tardía, es PD-1 (programmed cell death, también conocida como CD279). Es una proteína transmembranal que contiene un motivo de cambio basado en un inmunoreceptor de tirosina y se encuentra sobreexpresado en la muerte celular programada [71, 72]. La activación de células T, células B y monocitos induce su expresión, cuya función principal es atenuar la respuesta inmune. Diversos trabajos han mostrado la importancia de la molécula PD1 en el fenotipo de “agotamiento” de los linfocitos T en pacientes con infecciones crónicas [71]. El fenotipo de agotamiento se describe como la disminución en la secreción de citocinas y funciones efectoras

por parte de las células que se encuentran en este estado. Este fenómeno se presenta en infecciones crónicas, estados de autoinmunidad y en procesos tumorales [73]. El agotamiento representa un estado adaptativo de hiporreactividad que, aunque resulta ser insuficiente para eliminar completamente el patógeno frente a infecciones, puede proporcionar al hospedero la capacidad de controlar la infección sin causar una respuesta inmune exacerbada. La evidencia descrita en la literatura sugiere que PD1 está involucrada en la tolerancia inmune, ya que actúa como regulador negativo de las respuestas de las células T efectoras mientras que la deficiencia de la molécula en ratones favorece la aparición de enfermedades autoinmunes [74].

Por otra parte en el caso de modelos de obesidad, se sabe que en el Tejido adiposo subcutáneo (SAT) y sangre periférica existe una alta frecuencia de células T CD4+CD69+ de memoria en comparación con los animales en condiciones normales. así como una expresión similar de CD69 en las células T CD8+ de SAT y sangre [60, 61]. Adicionalmente se ha reportado que la expresión de CD69 en las células T CD4+ aumenta proporcionalmente a la intolerancia progresiva a la glucosa en ratones no diabéticos, lo cual no se observa en las células T CD8+ [75]. También se ha evaluado la capacidad de activación de los LcT CD8+ en obesidad, mostrando que esta condición da como resultado activación disminuida de células T CD8+ por la baja expresión de CD69 en respuesta a antígenos de influenza [76].

Por otro lado, se ha reportado que la obesidad inducida por dieta (OID) en modelos de ratones incrementa la proporción de Lc T con fenotipo de agotamiento en sangre periférica, hígado y bazo respecto a los ratones control. Moléculas relacionadas a este fenotipo incluyen PD-1 (CD279) y su expresión puede estar aumentada hasta 2 veces en ratones OID respecto al grupo control [77]. Interesantemente, en el modelo mencionado, la obesidad promueve el crecimiento



tumoral y el agotamiento de las células T. Sumado a lo anterior, la frecuencia de las células T PD-1+ visceral es más alta respecto a ratones control en el TA [78].

### **Cambios fisiológicos durante el embarazo con obesidad**

Durante el embarazo normal, se producen cambios en la anatomía, fisiología, endocrinología y metabolismo maternos para preparar a la madre para el parto, postparto y para proporcionar nutrientes esenciales para el crecimiento y desarrollo fetal [79]. En el embarazo obeso, las adaptaciones fisiológicas difieren de las mujeres de peso normal, lo cual está relacionado con las alteraciones propias de la obesidad en el estado pregestacional. Entre estas alteraciones destacan: alteración en el intercambio de nutrientes (glucosa, ácidos grasos y aminoácidos), infiltración de macrófagos de tipo proinflamatorio, aumento en la producción de citocinas proinflamatorias, además de la alteración de la función vascular placentaria, cambios en el recambio celular y el aumento de lesiones maternas en respuesta al ambiente proinflamatorio generado. Además, se ha descrito mayor grado de musculatura en las paredes de los vasos sanguíneos así como la disminución de apoptosis en células placentarias de madres con obesidad. Se cree que estos cambios contribuyen a una mayor disponibilidad de energía para el crecimiento fetal [80]. Dada su capacidad para regular respuestas inmunes innatas y adaptativas, la placenta es el órgano principal que contribuye en los cambios inflamatorios específicos del embarazo. Se ha considerado a la placenta como un órgano endócrino debido a que es una fuente de adipocinas como leptina, además es capaz de generar citocinas proinflamatorias como IL-6 y TNF- $\alpha$ . Así mismo se ha observado que durante el embarazo la producción de adiponectina se ve disminuida de manera similar a lo que ocurre en la obesidad [81]. Además de la producción de citocinas proinflamatorias, se ha observado que en condiciones normales existe la infiltración de macrófagos en la placenta.

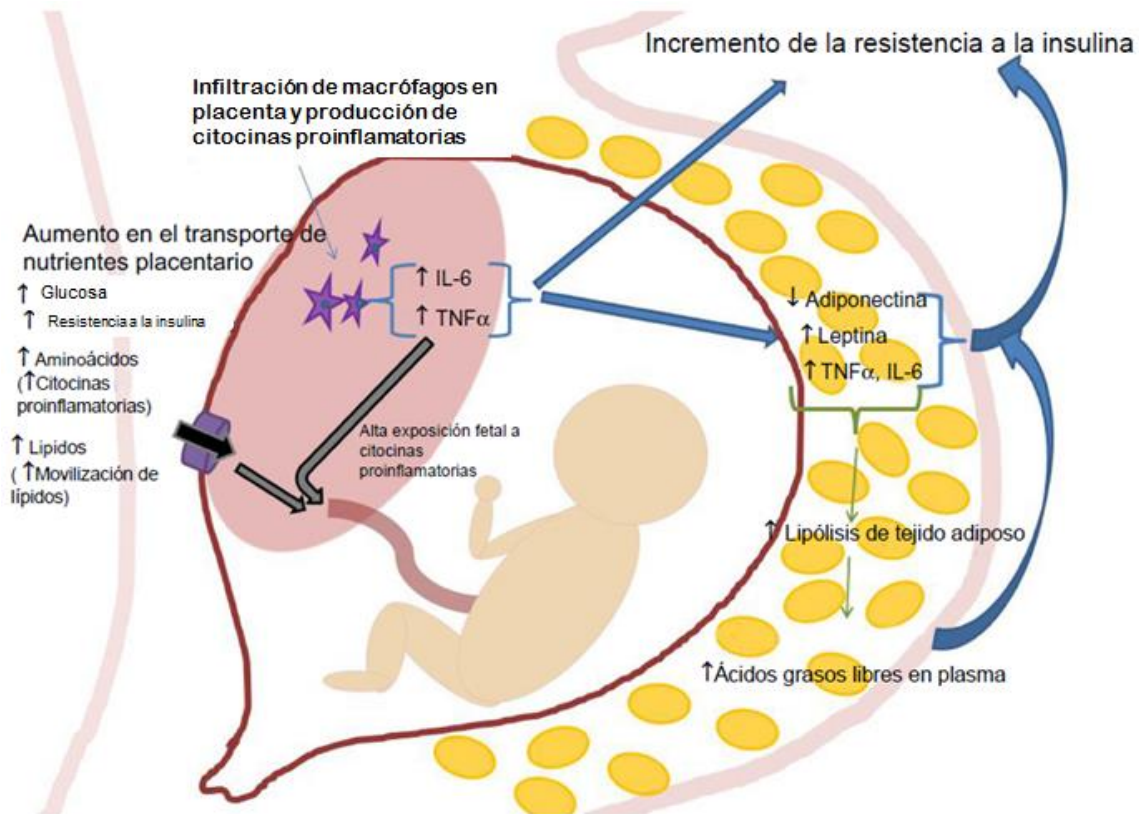
Durante el embarazo normal, el metabolismo de los lípidos se altera para promover la acumulación de depósitos de grasa materna a principios y mediados del embarazo y finalmente, mejorar la redistribución y lipólisis de la grasa al final de este, con el fin de utilizar estas reservas de energía para el uso del feto, ayudando a su crecimiento y desarrollo [82]. El metabolismo de estas macromoléculas propicia aumentos en las concentraciones plasmáticas de ácidos grasos y glicerol los cuales son consistentes con la movilización de las reservas de lípidos para el uso del feto en su crecimiento y desarrollo. En un estudio se analizó el patrón de cambios en los perfiles lipídicos durante el embarazo en mujeres obesas y de peso saludable [83], en ambos grupos hubo aumentos fisiológicos normales en colesterol total, triglicéridos (TG), lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) y lipoproteína de baja densidad (LDL), que es el mecanismo para movilizar lípidos en la circulación materna. Los investigadores encontraron que las madres obesas presentaron niveles de TG más altos que las mujeres de peso saludable al comienzo de la gestación, siendo que estos niveles alcanzan el mismo nivel en ambos grupos hacia el final de embarazo, lo que sugiere una menor flexibilidad metabólica en la condición de obesidad. Adicionalmente, en el embarazo que cursaba con obesidad, se observaron características arterogénicas, lo cual puede comprometer la salud vascular futura de la madre y la descendencia [80].

Respecto a la obesidad en el embarazo se observa la hipertrofia e hiperplasia del TA, lo cual conduce a la liberación desregulada de adipocinas, ácidos grasos libres en plasma así como como TNF- $\alpha$  e IL-6 [84], mientras que la infiltración de macrófagos en placenta incrementa [85]. En conjunto, el aumento en la producción de citocinas por parte del TA y la placenta de las mujeres obesas podría generar que la descendencia este expuesta a un mayor ambiente proinflamatorio durante el desarrollo gestacional al que se tendría en condiciones normales de embarazo, lo cual se asocia con las complicaciones tanto maternas como fetales.

Por otro lado, se ha observado que un ambiente proinflamatorio es capaz de alterar el transporte de nutrientes, incluyendo glucosa, ácidos grasos libres y aminoácidos, a través de la placenta [79]. Los factores que contribuyen a este estado incluyen concentraciones altas de cortisol y disminución de la sensibilidad a la insulina (50–60%) [81], y que pueden ser ocasionados por la obesidad gestacional, baja actividad física, niveles elevados de resistina y TNF- $\alpha$ , entre otros [86]. Adicionalmente, las alteraciones en las concentraciones de la insulina mencionadas, suprimen la lipólisis de todo el cuerpo, produciendo una elevación de los ácidos grasos libres en plasma e hiperlipidemia, lo cual, en conjunto, aumenta significativamente la energía disponible para el transporte de nutrientes hacia el feto, [87]. En ese sentido, el desarrollo fetal puede verse comprometido en embarazos que cursan con obesidad por un entorno excedente en nutrientes [88], ocasionando una absorción proporcionalmente mayor de glucosa por la placenta [89]. Relacionado con lo anterior, un estudio reciente encontró que la actividad del sistema transportador de aminoácidos A en la placenta tiene una correlación positiva con el alto peso al nacer [90]. También se ha demostrado que la elevación en concentraciones fisiológicas de IL-6 y TNF- $\alpha$  estimulan la actividad del sistema transportador A de aminoácidos [91]. Además, se ha sugerido que en la obesidad materna, el aumento de citocinas proinflamatorias en la placenta podría estimular también la actividad del transportador del sistema A.[92]. En conjunto, estos datos sugieren que el aumento del transporte de aminoácidos placentario puede contribuir al sobrecrecimiento fetal en el embarazo obeso.

Siendo la placenta el principal determinante del desarrollo fetal, las diferencias en su estructura y función pueden contribuir a estados de crecimiento fetal alterados. En la figura 4 se describen los cambios principales en la fisiología placentaria y del TA en el embarazo obeso. Se piensa que el aumento en la infiltración de macrófagos placentarios contribuye a una elevada producción de citocinas proinflamatorias (incluyendo TNF- $\alpha$  e IL-6), que al encontrarse en conjunto con el

ambiente proinflamatorio del TA contribuyen a la permanencia de este estado, acompañado del aumento de la resistencia a la insulina y la lipólisis. A su vez, el aumento de ácidos grasos libres también contribuye al aumento de la resistencia a la insulina. Así mismo, el transporte alterado de nutrientes incluye mayor transporte de glucosa, aminoácidos y lípidos [93].



**Figura 4: Fisiología de la placenta y TA durante el embarazo obeso.** El aumento de citocinas proinflamatorias del TA y el aumento de lipólisis de ácidos grasos al entrar en contacto con la placenta ocasiona que esta secreta sus propias citocinas proinflamatorias, se da el aumento de transporte de nutrientes así como infiltración de macrófagos M1 y a su vez, se genera retroalimentación entre la placenta y TA, exponiendo al feto a un ambiente proinflamatorio. IL: interleucina; TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa. **Modificado de:** Stirrat et al. 2014. [80]

## **El sistema inmune del recién nacido**

El sistema inmune (SI) es nuestra primera línea de defensa contra estímulos extraños. Se compone de leucocitos que secretan diversas moléculas inmunes como citocinas, quimiocinas, inmunoglobulinas y proteínas complementarias para eliminar agentes patógenos, así como mediar la comunicación de célula a célula. Todos aquellos mecanismos que el organismo utiliza para combatir los desequilibrios homeostáticos se denominan respuestas inmunes y se dividen en dos ramas principales: respuesta inmune innata y adaptativa [94].

El SI innato está compuesto de neutrófilos, eosinófilos, basófilos, células asesinas naturales (NKs), monocitos / macrófagos y células dendríticas (DC); así como barreras mucosas y péptidos antimicrobianos [95]. Estas células pueden distinguirse de los patógenos invasores al expresar receptores de reconocimiento de patrones (PRR) que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). La señalización a través de estos PRR resulta en cascadas de señalización que culminan en la producción de citocinas, quimiocinas y proteínas del complemento, que pueden interferir con la replicación del patógeno y reclutar células inmunes adicionales al sitio de la infección. La respuesta innata responde inmediatamente a los patógenos, pero, a diferencia de la respuesta adaptativa, su especificidad es limitada al reconocimiento de estructuras moleculares conservadas como lo son los patrones [93]. La activación de la respuesta innata es crítica para el inicio de la adaptación de la respuesta inmune; que se requiere para eliminar completamente los patógenos y establecer a largo plazo memoria inmunológica. La respuesta inmune adaptativa está compuesta de células T y B. Particularmente en el feto, la rama que se presume predomina durante la gestación es principalmente de tipo tolerogénicas, posiblemente para prevenir respuestas autoinmunes a los tejidos maternos [96]. En el contexto tanto infección como de vacunación, hay un predominio del perfil Th2 en los recién nacidos, aunque esta condición puede verse influenciada por las vacunas que se

administran al nacer. Sin embargo, el exceso de células Th2 relacionadas a la inflamación es característico de ciertas patologías en la infancia como son infecciones y enfermedades en vías respiratorias [97]. El sistema inmune adaptativo del recién nacido ha estado expuesto a un reducido número de experiencias antigénicas, evidenciada por la presencia predominante de células T y B vírgenes [97] y por lo tanto en el sistema inmune predomina la respuesta de tipo innata. La protección adicional contra infecciones durante los primeros 6 meses de vida es proporcionada por anticuerpos maternos adquiridos en el útero y a través de la lactancia materna, la cual ayuda a proteger contra las infecciones gastrointestinales y respiratorias [98]. Además, los recién nacidos muestran respuestas de tipo Th17 (IL-17a, IL-23), baja producción de interferones y poca respuesta Th1 (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) [99]. Durante las primeras semanas después del nacimiento, hay un gran aumento en el número de linfocitos periféricos [100]. Sin embargo, las respuestas de las células T permanecen predominantemente hacia el fenotipo Th2, con baja producción de IL-2 e IFN- $\gamma$  [101]. Se cree que este sesgo se debe a diferencias en la funcionalidad de las células dendríticas, encargadas de la diferenciación de las células T CD4 vírgenes hacia el perfil Th1 [97]. Durante la infancia, el sistema inmunitario del recién nacido experimenta un cambio de respuestas predominantemente Th2 a Th1, que promueven la activación de macrófagos [96]. A los dos años de edad, la polarización del fenotipo Th1 y el aumento de la producción de IL-12p70 por las células dendríticas, promueve aún más desarrollo de respuestas Th1 [99]. Con la edad y la experiencia antigénica, las respuestas de las células T aumentan, y las células T citotóxicas y cooperadoras desarrollan poblaciones celulares de memoria central y efectoras [100, 102]. Del mismo modo, las células B son, en su mayoría, vírgenes al nacimiento y con respuestas limitadas. Las células B inmaduras experimentan maduración en el bazo desde el tercer trimestre de gestación, donde cambian su fenotipo para aumentar la expresión de los anticuerpos de clase IgM e IgD [103].

## **Impacto de la obesidad materna sobre el estado inflamatorio del recién nacido**

La inflamación juega un papel importante en todas las etapas del embarazo, desde la implantación, el parto y la recuperación posparto. Los mismos mediadores inflamatorios son capaces de estimular el propio estado inflamatorio fetal si estos cruzan la barrera placentaria, e indirectamente al desencadenar la liberación de citocinas de la placenta en la circulación fetal [104]. Siendo el desarrollo prenatal un período de rápido crecimiento y remodelación epigenética, el organismo es particularmente vulnerable a los desequilibrios del estado inflamatorio materno, afectando negativamente la organogénesis que predisponen a la prole a diversas enfermedades en la etapa postnatal descritas en secciones anteriores [112]. Tanto la evidencia epidemiológica como la experimental respaldan el papel de la obesidad materna en la restricción del crecimiento fetal, los defectos en el desarrollo cerebral, las anomalías cardíacas y la disfunción endocrina [113-115]. Otros órganos como glándulas adrenales, riñones, hígado, corazón y cerebro también pueden ser afectados en estas condiciones [105].

Con el fin de determinar el impacto de la inflamación materna en el entorno fetal se han realizado estudios que relacionan las citocinas maternas durante el embarazo, explorando la estabilidad, el cambio y función de estas conforme al curso de la gestación. Algunos reportes sugieren que la inflamación materna conduce a elevaciones de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  en líquido amniótico y cerebro fetal [106, 107], mientras que otro estudio evaluó el impacto del estrés materno en las concentraciones de citocinas proinflamatorias presentes en sangre periférica materna (SPM) y sangre de cordón umbilical (SCU) durante el tercer trimestre. Los investigadores encontraron que en SPM se encuentran concentraciones elevadas de IL-6 y disminuidas de IL-10 mientras que en SCU se observó mayor concentración de IL-6 e IL-8 y de igual manera menores concentraciones de IL-10

e IL-13 [108]. Estas evidencias muestran que la inflamación materna durante el embarazo puede traducirse en aumento de mediadores inflamatorios en la circulación fetal. De esta forma, la presencia de factores proinflamatorios elevados en circulación fetal se ha asociado con aumento del riesgo de alteraciones en el desarrollo neurológico, anormalidades hormonales, así como alteraciones conductuales como autismo, esquizofrenia, parálisis cerebral y afecciones cognitivas [104].

La evidencia también sugiere que el estado metabólico materno durante la vida postnatal puede estar relacionado con el estado inflamatorio en el ambiente fetal durante la gestación [39, 109-111]. Se ha evaluado el papel regulador que juegan los nutrientes para modular la inflamación materna a través de mecanismos epigenéticos. Existe evidencia que sugiere que la sobrenutrición materna y obesidad dan como resultado enfermedades como dislipidemias y aumento de la inflamación sistémica materna, lo cual a su vez ha demostrado tener efectos perjudiciales en el embrión en desarrollo [112]. Se encontró además que la dieta materna alta en grasas saturadas induce vías de inflamación en la descendencia [113, 114], lo cual predispone a padecer enfermedades vasculares que involucran desregulación hormonal y liberación de citocinas inflamatorias. También se ha encontrado un aumento en las concentraciones de adiponectina sérica en madres con dietas altas en grasas durante la gestación [115].

La obesidad y el embarazo están asociados con la resistencia a la insulina y cambios en la producción de mediadores inflamatorios, los cuales se exacerban en combinación de estas dos condiciones, aumentando la transferencia de lípidos durante la gestación. Mientras que la hiperglucemia materna contribuye al aumento del crecimiento fetal y el desarrollo de trastornos metabólicos [116], un trabajo reciente sugiere que los niveles de peso y TG maternos tienen una correlación directa con el desarrollo del síndrome metabólico a los 6 años de vida en la descendencia o progenie [39]. Además, la obesidad está asociada con la



inflamación del tejido adiposo y la resistencia sistémica a la insulina, lo que resulta en un aumento de lipólisis en este tejido, así como la secreción de lipoproteínas de muy baja densidad. Cuando se combina con el embarazo, esto conduce a un aumento de los lípidos circulantes maternos con el avance de la gestación. La posterior hidrólisis de TG maternos por la lipoproteína lipasa placentaria y el aumento de la absorción y transporte de ácidos grasos libres por la placenta produce a una transferencia excesiva de lípidos al feto en desarrollo. Este aumento en la exposición a los lípidos puede afectar los órganos fetales como el hígado, el músculo esquelético, el tejido adiposo, el cerebro y el páncreas, aumentando el riesgo de desarrollar enfermedades metabólicas durante la infancia [112].

Al nacimiento, el neonato tiene su sistema inmunológico completo, aunque considerado inmaduro, pero es capaz de responder a los estímulos antigénicos. Los linfocitos T del neonato tienen baja producción de citocinas, se ha demostrado que en el feto y el RN estas células exhiben deficiencias tales como baja respuesta proliferativa, menor producción de IL-2, disminución de la actividad citolítica y producción anormal de citocinas. Por esto, las respuestas como citotoxicidad dependiente de CD8+ y la producción de anticuerpos dependientes de CD4+ están reducidas o retardadas en comparación con el adulto [109]. Si bien, la respuesta inmune de los recién nacidos es considerada como altamente regulada, diversos factores inherentes a la gestación pueden jugar un papel muy importante en determinar la presencia de leucocitos, así como la magnitud de las respuestas inmunes. En este sentido, un estudio en ratones mostró que la obesidad materna, particularmente cuando se combina con una dieta alta en grasa durante la gestación, restringe la expansión fisiológica de células troncales y precursoras fetales al tiempo que acelera la diferenciación de células linfoides (células B y T) y mieloides [117]. El acelerado desarrollo, activación y diferenciación celular pueden traer como consecuencia la desregulación en su

actividad, con respuestas primordialmente inflamatorias, y favorecer el desarrollo de enfermedades autoinmunes y alérgicas [118].

Adicional a las alteraciones en la ontogenia de células hematopoyéticas de la progenie de madres obesas, los sitios de maduración celular pueden estar comprometidos. A razón de lo anterior, se ha observado que el tamaño del timo de fetos de mujeres embarazadas obesas es mayor respecto al de fetos control, siendo que esta afectación es dependiente del microambiente inflamatorio como se ha mostrado en otras situaciones inflamatorias como infecciones [119-121]. Por lo anterior, es probable que los estados inflamatorios secretados por los tejidos grasos subcutáneos maternos puedan afectar al sistema inmunológico fetal predisponiéndolo a padecer diversos tipos de enfermedades metabólicas, sépticas y asépticas. La alteración de estos leucocitos en una etapa tan temprana de desarrollo sugiere que la programación del desarrollo temprano del sistema inmune por la obesidad materna puede afectar la respuesta postnatal.

### **Efecto de la obesidad en Linfocitos B**

La obesidad no solo causa efectos en el compartimento de células T como representantes de las respuestas adaptativas. También se ha observado que genera alteraciones en las células B. Se ha observado en ratones obesos que la IgG2c está elevada en el tejido adiposo, sin embargo poco se sabe sobre la influencia de la obesidad en los cambios de isotipos, o las citocinas que pudieran producir [122, 123]. En un estudio realizado por Kosaraju y colaboradores en ratones con diabetes mellitus tipo II, las células B secretan citocinas proinflamatorias, similares a las de los pacientes diabéticos y / o obesos con niveles elevados de glucosa en ayunas [122]. Por otro lado, en pacientes diabéticos recién diagnosticados se ha observado supresión de las citocinas inflamatorias de las células B tras la estimulación, lo cual nos puede sugerir una alteración en su función.

Por otro lado, en humanos se observó que existe un aumento en la frecuencia de las células B en pacientes obesos y diabéticos tipo II respecto a los grupos control [123]. En otro ensayo de los mismos autores, donde se estudió una cohorte de individuos obesos y delgados, un aumento significativo en las frecuencias de células B naive y una disminución significativa en las frecuencias de células B de memoria en individuos obesos respecto a individuos de peso normal. Si bien esto es indicativo de la alteración de la función de los linfocitos B influenciada por el estado inflamatorio prevalente en pacientes con obesidad y diabetes mellitus Tipo 2, hace falta evaluar más a fondo el mecanismo por el cual se dan estas alteraciones [124].

### **Efecto de la obesidad en Células Natural Killer**

Existen datos sobre diferencias en el número de células NK en sangre periférica y órganos, aunque los resultados son contradictorios. Numerosos estudios demostraron una disminución de la cantidad de células NK en la sangre, así como en el bazo, pulmón e hígado de roedores obesos [125-128]. Por el contrario, existen otros informes que no muestran cambios o un aumento del número de células NK en sangre y diferentes tejidos de individuos obesos [129-131]. Estas discrepancias pueden explicarse por características metabólicas dependientes de la especie o cepa o por diferencias en el estado de desarrollo, degradación o migración de las células NK. Sin embargo, a pesar de los cambios en la frecuencia de células NK, es importante mencionar que se ha demostrado que existe una disminución en la expresión de los receptores NKp46 y NKG2D en tejido esplénico y hepático de ratones con obesidad inducida por la dieta, lo cual indica que en los roedores con obesidad se observa un estado de activación disminuido de las NK. Lo anterior se demuestra con ayuda de otro estudio realizado por Nave y sus colaboradores, en el cual, por medio de la transferencia de células NK demostró que su funcionalidad depende del entorno metabólico circulante, ya que el fenotipo de las NK transferidas de ratas obesas a ratas con peso normal podría regresar a

su funcionalidad en este segundo entorno. Estos datos sugieren que el fenotipo de células NK alterado en la obesidad puede mejorarse generando el entorno metabólico fisiológico de individuos con peso normal [130].

## JUSTIFICACIÓN

Actualmente, las enfermedades metabólicas como la obesidad representan un grave problema de salud pública en nuestro país y en el mundo. Estas enfermedades impactan directamente en la morbilidad perinatal complicando principalmente el curso del embarazo y se asocian a pérdida gestacional, prematuridad, restricción en el crecimiento intrauterino e incrementan el riesgo de la progenie a desarrollar enfermedades metabólicas durante toda su vida postnatal. Se ha demostrado que el feto es altamente vulnerable a condiciones metabólicas e inflamatorias de la madre, las cuales pueden generar alteraciones permanentes en la estructura corporal, metabolismo y respuesta inmune que lo predisponen a sufrir infecciones durante los primeros meses de vida [132]. Debido a estas observaciones, entender este tipo de patologías es de gran importancia, así como conocer las condiciones adversas a las que se expone el individuo desde el desarrollo perinatal y para esto es fundamental estudiar el binomio madre-hijo. Por ello, en este proyecto estudiamos en una cohorte de mexicanas embarazadas con obesidad, el efecto de esta condición en el estado de activación de linfocitos maternos sobre el resultado perinatal inmune al nacimiento de la progenie.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuál es el impacto de la obesidad pregestacional en el estado de activación de linfocitos maternos y en el recién nacido?

## **HIPÓTESIS**

La obesidad materna pregestacional favorece la presencia de linfocitos con fenotipos activados, como índice del estado proinflamatorio, en la madre a la resolución del embarazo y en el cordón umbilical del recién nacido.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el impacto de la obesidad pregestacional en la frecuencia de linfocitos T y su estado de activación como índice del estado proinflamatorio en sangre periférica materna y de cordón umbilical del recién nacido.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Determinar el impacto del IMC pregestacional en la frecuencia de linfocitos T, B y células NKs de sangre periférica de madres con peso normal, sobrepeso y obesidad.
2. Evaluar el impacto del IMC pregestacional en el estado de activación de linfocitos T (CD69+, CD279+) en sangre periférica de madres con peso normal, sobrepeso y obesidad.
3. Determinar el impacto del IMC pregestacional en las frecuencias de linfocitos T, B y células NKs en sangre de cordón umbilical de recién nacidos de madres con peso normal, sobrepeso y obesidad.
4. Evaluar el impacto del IMC en el estado de activación de linfocitos T (CD69+, CD279+) en sangre de cordón umbilical de recién nacidos de madres con peso normal, sobrepeso y obesidad.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

El diseño del presente estudio fue evaluado y aprobado por el comité de investigación, ética y bioseguridad del Instituto Nacional de Perinatología (INPer). Así mismo, el Instituto financió el protocolo (**Registro del proyecto: 2017-2-85**).

**Tipo de investigación:** Observacional

### **Características del estudio:**

- Por la participación del investigador: Analítico
- Por temporalidad del estudio: Transversal
- Por la lectura de los datos: Prolectivo
- Por el análisis de datos: Analítico

### **Pacientes y grupos de estudio**

- Definición del grupo control: Mujeres con IMC pregestacional entre 18 y 24.9 Kg/m<sup>2</sup> con embarazo único, con el inicio de seguimiento del embarazo antes de las 18 SDG. Edad igual o mayor a 18 años, residentes en la Ciudad de México y/o área conurbada. Las mujeres participantes firmaron un consentimiento informado para ser parte del protocolo, el cual se encuentra en el Anexo 1.

### **Criterios de selección:**

- Las mujeres embarazadas que acuden a control prenatal antes de las 18 semanas de gestación y que sean incluidas en uno de los siguientes cuatro grupos: obesidad, diabetes mellitus tipo 2, hipertensión arterial sistémica crónica o sana.

**Criterios de inclusión:**

- Generales: Embarazo único menor de 18 SDG, mayores o iguales a 18 años de edad, residentes en la Ciudad de México y/o área conurbada que no tarden en llegar al INPer más de 2 horas.
- Grupo de estudio: Obesas con IMC pregestacional  $\geq 27 \text{ Kg/m}^2$ .

**Criterios de exclusión:**

- Generales: Patologías agregadas como lupus, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, VIH, leucemia, hipertiroidismo, cardiopatías no corregidas, insuficiencia renal crónica, epilepsia, esquizofrenia, Trastorno Obsesivo Compulsivo, toxicomanías, síndrome de mala absorción, asma en descontrol, cualquier tipo de cáncer, no nacidos en el INPer.
- Grupo de estudio: Diabetes Mellitus pregestacional.

**Criterios de eliminación:**

- Mujeres que durante el control prenatal no asistan a 2 o más citas programadas del protocolo.
- Binomio madre-hijo que no asistan a 2 o más citas programadas del seguimiento.

Tipo de muestreo: No probabilístico de casos consecutivos.

**Obtención de las muestras**

Mujeres embarazadas sanas, con sobrepeso u obesidad sin alguna morbilidad que acudieron al control prenatal al Instituto Nacional de Perinatología con embarazo único y edad  $\geq 18$  años fueron programadas para cesárea. Antes del nacimiento, a la madre se le tomó una muestra de sangre y una vez practicada la cesárea, se tomó una muestra de sangre de cordón umbilical.



Desde Agosto del 2018 hasta Enero del 2020 se recolectaron en tubos con Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), muestras de sangre periférica de 20 mujeres voluntarias adultas en condición de sobrepeso (IMC entre 25 y hasta 29.9 kg/ m<sup>2</sup>), 16 voluntarias adultas en condición de obesidad (IMC  $\geq$  30 kg/ m<sup>2</sup>) así como las muestras de los recién nacidos correspondientes a cada una de las madres participantes. Como controles, se recolectaron muestras de sangre periférica de 22 mujeres sanas de peso normal así como de cada uno de los recién nacidos de cada participante.

### **Procesamiento de muestras e inmunomarcaje de superficie**

Para cada muestra de sangre periférica materna preparto y sangre de cordón umbilical se realizó el siguiente procedimiento para el inmunomarcaje de superficie.

A tubos de ensayo de polietileno de 12x75 rotulados para cada muestra se adicionó sangre total (25 $\mu$ L). Las muestras fueron homogenizadas e incubadas (15 min/Tamb) con volúmenes titulados de los anticuerpos fluorocromados según la Tabla 3. Después de la incubación, a cada muestra se les adicionó 450  $\mu$ L de la solución FACS™ Lysing Solution, BD (contiene cloruro de amonio y paraformaldehído) con el fin de lisar los eritrocitos y fijar las células. El exceso de anticuerpo se eliminó mediante un lavado con 500  $\mu$ L de PBS y posteriormente las muestras se centrifugaron (400g/5 minutos). Se desechó el sobrenadante por decantación y se resuspendió el botón celular con 100  $\mu$ L de solución FACS Flow (BD). Los eventos de las muestras procesadas fueron analizados en un citómetro de flujo FACS Aria III (BD Biosciences) y la estrategia de análisis analizada con el programa BD FACSDiva (BD Biosciences).

**Tabla 3.** Panel de anticuerpos monoclonales acoplados a fluorocromos para el inmunomarcaje superficial de linfocitos humanos.

<b>Anticuerpo anti-</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Catálogo</b>	<b>Marca</b>	<b>Volumen titulado (<math>\mu</math>L)</b>
<b>CD3</b>	AF488	300320	BioLegend	0.3
<b>CD279</b>	PE	580795	BD	1.0
<b>CD69</b>	Pe-Cy/5	310908	BioLegend	5.0
<b>CD16</b>	PE-Cy/7	25-0168-42	eBioscience	0.3
<b>CD5</b>	PE-Cy/7	300622	BioLegend	0.3
<b>CD56</b>	APC	17-0566-12	eBioscience	0.3
<b>CD19</b>	APC-Cy/7	302218	BioLegend	0.3
<b>CD4</b>	APC-Cy/7	341095	BD	0.3
<b>CD45</b>	BV421	563879	BD	0.3

### **Algoritmo de análisis para la identificación de linfocitos y estados de activación**

El algoritmo de análisis general, representado en diagramas de puntos por medio de citometría de flujo para la identificación de las subpoblaciones celulares se representa en la Figura 5. A partir del parámetro de tamaño en su función pico y su función área se seleccionaron los eventos sencillos (Figura 5A), de los cuales, mediante la función área del detector SSC (SSC-A) y la expresión de CD45 se seleccionó la región linfoide (Figura 5B). Partiendo de esta población, mediante la expresión de CD3 y CD45 se seleccionó la población correspondiente a linfocitos T, así como la población de linfocitos no T con fenotipo CD45+ y CD3- (linfocitos B y células NK) (Figura 5C), posteriormente, partiendo de la población de linfocitos T y mediante la expresión de CD4 se identificaron las poblaciones LcT CD4+ y CD4- (Figura 5D). La evaluación de los estados de activación se realizó mediante la expresión de CD69, para lo cual se seleccionaron las poblaciones de LcT CD4+ y CD4- (estado de activación temprana), así como la expresión de CD279 (estado

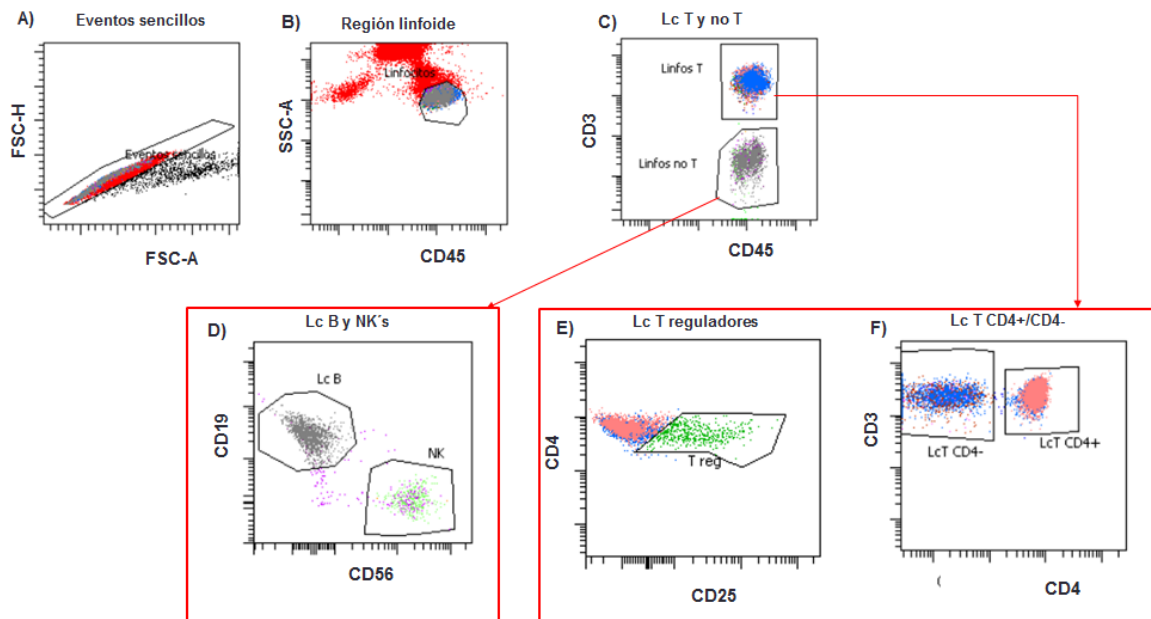
de activación tardía).. La identificación de cada subpoblación de linfocitos estuvo dada por los siguientes fenotipos:

Linfocitos T CD4: CD45+ CD3+ CD4+ CD19- CD56-

Linfocitos T CD8: CD45+ CD3+ CD4- CD19- CD56-

Linfocitos B: CD45+ CD3- CD19+ CD56-

Natural Killers: CD45+ CD3- CD19- CD56+



**Figura 5.** Ejemplo de algoritmo de análisis para fenotipificación de poblaciones linfocitarias en SCU y SPM.

### **Análisis Estadístico**

Los datos obtenidos en este estudio fueron analizados usando el software GraphPad Prism 7.0. Para la comparación entre los grupos de estudio se utilizó la prueba de ANOVA de 1 vía, como prueba post-hoc se utilizó la prueba de Turkey. Para establecer la relación entre el IMC materno y las subpoblaciones celulares se utilizó la prueba de correlación de Pearson, mientras que para establecer la relación entre el IMC materno y las subpoblaciones celulares se utilizó la prueba

de correlación de Spearman. Se consideran valores significativos con  $P < 0.05$ .

## RESULTADOS

### Descripción general del grupo de estudio

En el periodo comprendido entre Agosto del 2018 y Enero 2020 se reclutaron 58 mujeres a quienes se les dio seguimiento gineco-obstétrico desde el segundo trimestre del embarazo y hasta la resolución del mismo. De este universo de pacientes atendidas en el INPer, 16 mujeres cursaron el embarazo con obesidad pregestacional ( $IMC \geq 30$ ), 20 con sobrepeso ( $25 \leq IMC < 30$ ) y 22 fueron incluidas como grupo control ( $IMC < 25$ ). Las edades de las madres fueron similares entre los 3 grupos y no se incluyeron menores de edad o madres añosas (tabla 4). Dentro de las características somatométricas, como esperábamos, el peso y el IMC pregestacional, fue mayor en las mujeres con sobrepeso y obesidad. Además, los valores de las presiones sistólica y diastólica, así mismo, las mediciones bioquímicas, enzimas hepáticas (ALT o SGPT o GPT), y lípidos, fueron similares entre los grupos, interesantemente, la glucosa en ayuno fue mayor en el grupo de sobrepeso respecto al grupo control, aunque mantenidos dentro de los intervalos normales (Tabla 4). Estos resultados nos indican que las mediciones inmunológicas son la consecuencia de las diferencias del IMC y no están sesgadas por comorbilidades que comúnmente se asocian a la obesidad como síndrome metabólico o HTA.

En el caso de los recién nacidos de los tres grupos, todos a término de gestación ( $>37$  SDG), mostraron resultados somatométricos (peso, talla, perímetro cefálico) correspondientes a intervalos de medición considerados como normales. Así mismo la valoración clínica a través de la prueba de Apgar mostró que los recién nacidos de nuestra población toleró y evolucionó de la mejor manera el nacimiento, sin mostrar alguna afectación (Tabla 5).

**Tabla 4.** Descripción somatométrica y bioquímica materna.

Parámetro	Control (n=22)	Sobrepeso (n=20)	Obesidad (n=16)	P
Edad (años)	28+/-5.8	32+/-5.2	32+/-5.7	0.058
Talla (m)	1.6+/-0.06	1.6+/-0.06	1.6+/-0.05	0.600
Peso pregestacional (Kg)*	59+/-11	69+/-7.8	89+/-17	<b>&lt;0.0001</b> , <sup>a, b, c</sup>
IMC pregestacional (Kg/m <sup>2</sup> )*	24+/-3.5	27+/-1.8	36+/-5.6	<b>&lt;0.0001</b> <sup>a, b, c</sup>
Incremento de peso (Kg)*	7.5+/-4.2	8.1+/-6	6.2+/-8.5	0.669
No. Gestas	2.8+/-1.2	3+/-1.4	2.9+/-1	0.927
Presión sistólica (mmHg)	106+/-8.7	109+/-7	106+/-7.9	0.331
Presión diastólica (mmHg)	68 +/-6.9	69 +/-5.3	68 +/-7.5	0.903
Glucosa (mg/dL)	78 +/-6.1	88 +/-23	77 +/-9	<b>0.041</b> <sup>a</sup>
Urea (mg/dL)	16 +/-3.9	19 +/-7.1	16 +/-5.3	0.295
BUN (mg/dL)	7+/-1.8	8.2 +/-3.1	7.6+/-2.5	0.294
Creatinina Sérica (mg/dL)	0.43+/-0.11	0.51+/-0.12	0.48+/-0.093	0.081
TGO/AST (UI)	22+/-5	21+/-12	24+/-20	0.887
Ácido Úrico (mg/dL)	4.1 +/-1.2	4.2 +/-1.3	4.2 +/-0.7	0.966
Colesterol (mg/dL)	204 +/-50	193 +/-39	206 +/-34	0.702
LDL (mg/dL)	109 +/-37	95 +/-44	101 +/-28	0.721
HDL(mg/dL)	67+/-15	61+/-11	60+/-9.2	0.471
Triglicéridos (mg/dL)	150+/-42	204+/-107	183+/-64	0.364
TGP/ALT (UI)	19+/-4.8	26+/-10	18+/-11	0.238
TGO/AST (UI)	22+/-5	21+/-12	24+/-20	0.887

Prueba de Turkey para comparaciones múltiples. Valores significativos con P<0.05  
Diferencias entre grupos. a: control vs sobrepeso; b: control vs obesidad;  
c: sobrepeso vs obesidad

**Tabla 5.** Descripción poblacional de recién nacidos

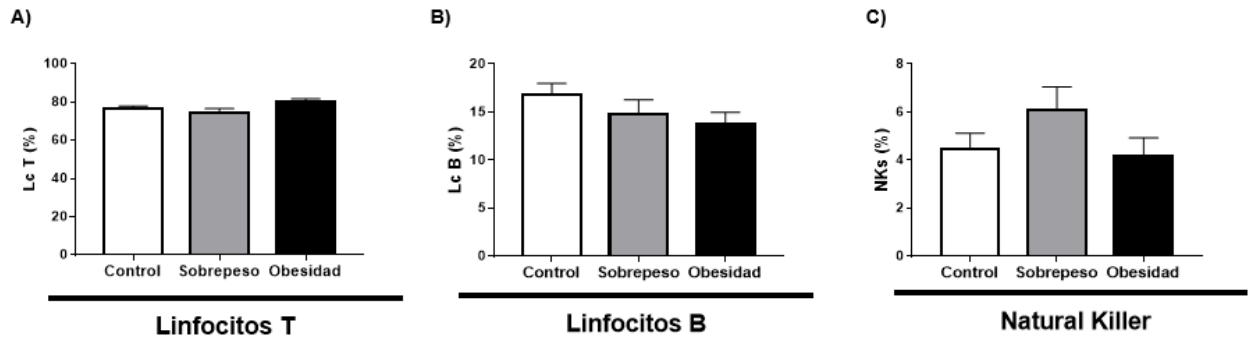
Parámetro	Control (n=22)	Sobrepeso (n=20)	Obesidad (n=16)	P
Edad gestacional (SDG)	38+/-1	38+/-0.93	39+/-1	0.0960
Peso (g)	2910+/-80	2908+/-98	3090+/-86	0.2957
Talla (cm)	48+/-2.1	48+/-3.1	49+/-1.4	0.3169
Perímetro cefálico (cm)	34+/-1.7	34+/-1.3	35+/-1.3	0.2130
Apgar 1	8.4+/-0.49	8+/-0.92	7.8+/-1.2	0.1133
Apgar 5	9+/-0	8.9+/-0.31	8.9+/-0.25	0.3473
Género (F/M)	13/8	11/9	7/9	--

Prueba de Turkey para comparaciones múltiples. Valores significativos con P<0.05

## **Evaluación del estado inmune materno**

### **I. Distribución de las poblaciones celulares de la línea linfoide**

Los linfocitos son células de las respuestas inmunes que se han asociado que al mantenimiento de la inflamación en personas con obesidad con cambios cuantitativos y fenotípicos. Para saber si esta desregulación inmunológica se manifiesta en el embarazo, nosotros evaluamos el porcentaje y expresión de moléculas asociadas a la activación en mujeres embarazadas. Nuestros resultados muestran que la frecuencia de linfocitos T, es similar entre los grupos de estudio, así mismo el IMC no se relaciona con la frecuencia de las mismas (Figura 6A y Tabla 5). Este resultado va acompañado con porcentajes similares entre los grupos de células B y células NK, ambas sin estar relacionadas con el IMC (Figura 6B-C y Tabla 6) en los grupos de madres con peso normal, sobrepeso y obesidad.

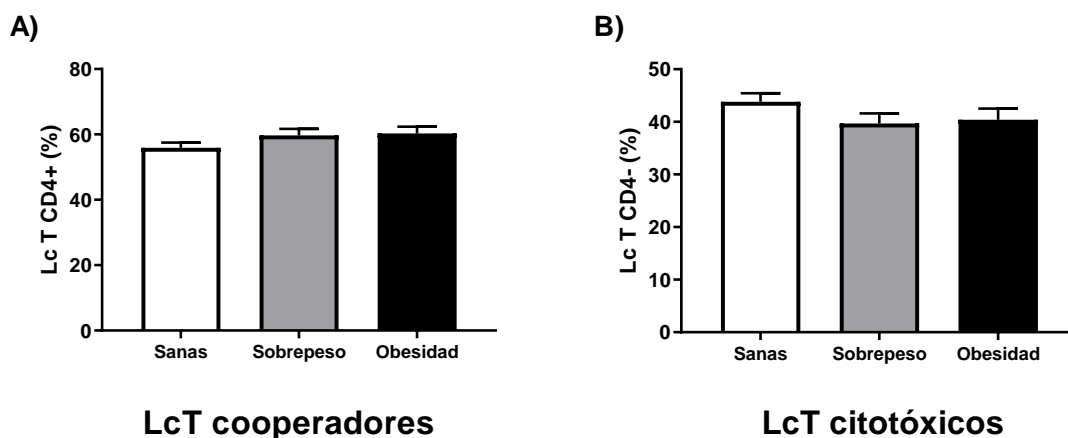


**Figura 6. Distribución de linfocitos totales maternos.** A) Frecuencias de Lc T totales en grupos control (n=22), sobrepeso (n=20), y obesidad (n=16). B) Frecuencias de Lc B totales en grupos control, sobrepeso y obesidad. C) Frecuencias de células NKs en grupos control, sobrepeso y obesidad. Los graficos de barras representan el promedio de las frecuencias observadas con su respectivo error estándar. Las diferencias fueron calculadas con prueba Kruskal-Wallis y post hoc de Dunn.

## II. Distribución de las subpoblaciones celulares de linfocitos T

Adicionalmente, en cada grupo de las mujeres embarazadas evaluamos la frecuencia de las subpoblaciones de los linfocitos T, incluyendo células T cooperadoras y citotóxicas. Nuestros resultados muestran que los porcentajes de los linfocitos T cooperadores tienden a incrementar en el grupo de obesidad (Figura 7 A), y se relacionan de manera directa al IMC (Tabla 6). En el caso de la frecuencia de los linfocitos T citotóxicos, su disminución tiende a ser menor en la condición de obesidad (Figura 7B), relacionándose de manera negativa con el IMC (Tabla 6).





**Figura 7. Distribución de subpoblaciones de linfocitos T maternos.** A) Frecuencias de Lc T cooperadores en grupos control, sobrepeso y obesidad. B) Frecuencias de Lc T citotóxicos en grupos control, sobrepeso y obesidad. Los resultados se muestran en gráficas de barras que representan el promedio de las observaciones con su respectivo error estándar. Las diferencias fueron calculadas con prueba Kruskal-Wallis y post hoc de Dunn.

**Tabla 6.** Asociación del IMC materno sobre características fenotípicas de linfocitos maternos.

Parámetro	r	R cuadrada	P	P resumen
<b>Linfocitos totales</b>				
Lc T (%)	0.128	0.0163	0.3426	ns
B (%)	0.01969	0.0003	0.8844	ns
NK (%)	-0.04998	0.0024	0.7119	ns
<b>Linfocitos T</b>				
Lc TCD4+ (%)	<b>0.3336</b>	<b>0.1112</b>	<b>0.0112</b>	*
Lc Th conv (%)	-0.0922	0.0085	0.4952	ns
LcTCD4- (%)	<b>-0.2868</b>	<b>0.0822</b>	<b>0.0306</b>	*
<b>Activación temprana</b>				
Lc TCD4+CD69+ (%)	0.08438	0.0071	0.5326	ns
Lc TCD8 CD69+ (%)	0.04665	0.0021	0.7304	ns
<b>Activación tardía</b>				
Lc TCD8 CD279+(%)	0.1767	0.0312	0.1885	ns

<b>Lc TCD4+CD279+ (%)</b>	0.1123	0.0126	0.4057	ns
---------------------------	--------	--------	--------	----

Prueba de correlacion de Spearman Valores significativos con P<0.05

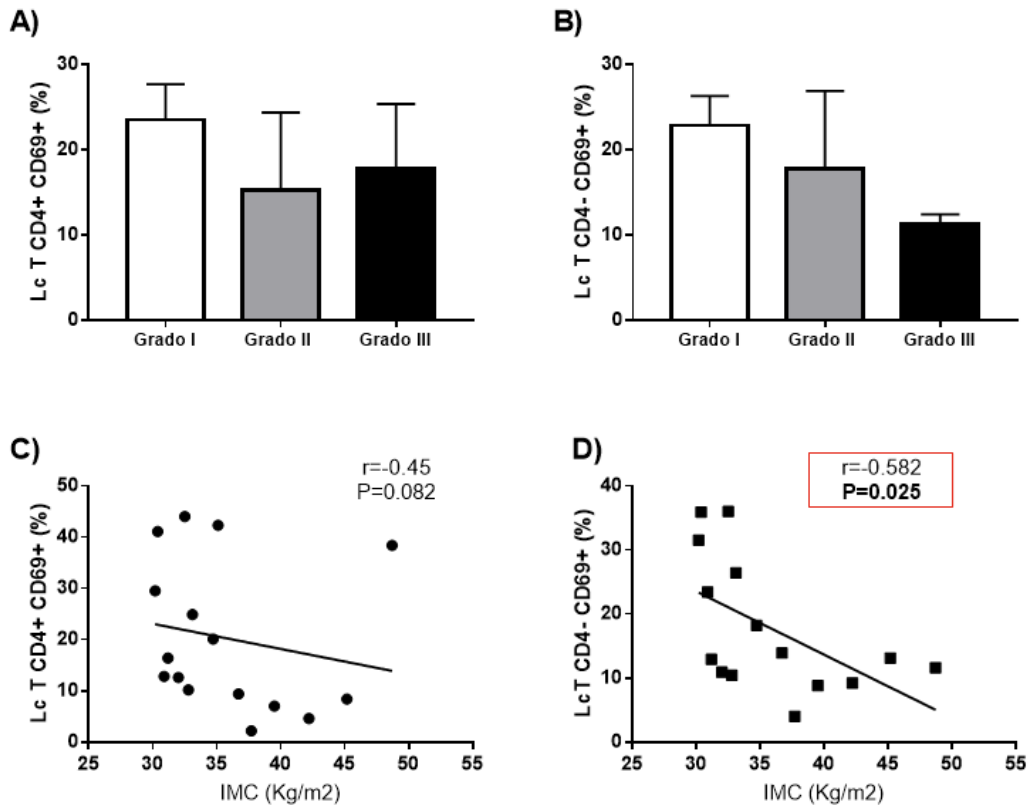
### III. Estados de activación en linfocitos T.

En desordenes inflamatorios como diabetes, artritis reumatoide, asma, enfermedad inflamatoria intestinal, entre otras, se observa un incremento de células T con fenotipos activados en circualción. De esta manera, evaluamos la frecuencia de células que expresan el marcador de activación temprana y tardía, CD69 y CD279, respectivamente, en sangre periférica de las madres. Encontramos que la frecuencia de células T cooperadoras (Figura 8a), así como las células T citotóxicas (Figura 8b), CD69+ es similar entre las mujeres control, sobrepeso y obesidad.

Por otra parte, la obesidad puede clasificarse en grado I (IMC entre 30 a 34.9), II (IMC entre 35 a 39.9), y III (IMC igual o mayor a 40) de acuerdo a la severidad por la que cursa una persona con esta condición. Clasificando a las mujeres embarazadas con obesidad con esta categoría, observamos que la frecuencia de linfocitos T cooperadores CD69+ son similares entre estos subgrupos (Figura 9A y 9C). Interesantemente, y contrario a lo que esperabamos, la frecuencia de células T citotóxicas CD69+ tiende a ser menor en los grupos con obesidad grado II y III, y ésta baja frecuencia de células con fenotipos activados, se asocia al aumento del IMC pregestacional (Figura 9B y 9D).



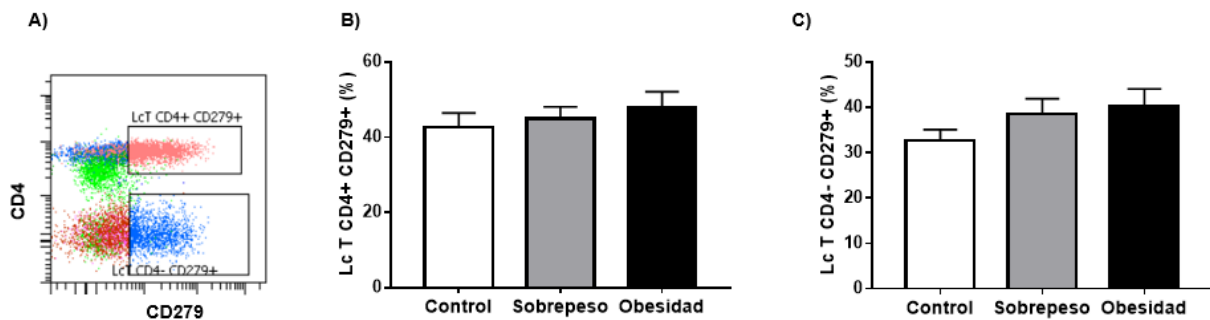
**Figura 8. Estados de activación temprana en linfocitos T maternos.** A) Imagen representativa de los diagramas de puntos para la selección de Lc T CD4+ CD69+ y LcT CD4-CD69+. B) Frecuencias de Lc T CD4+CD69+ en grupos control, sobrepeso y obesidad. C) Frecuencias de Lc T CD4-CD69+ en grupos control, sobrepeso y obesidad. Los resultados se muestran en gráficas de barras que representan el promedio de las observaciones con su respectivo error estándar. Las diferencias fueron calculadas con prueba Kruskal-Wallis y post hoc de Dunn.



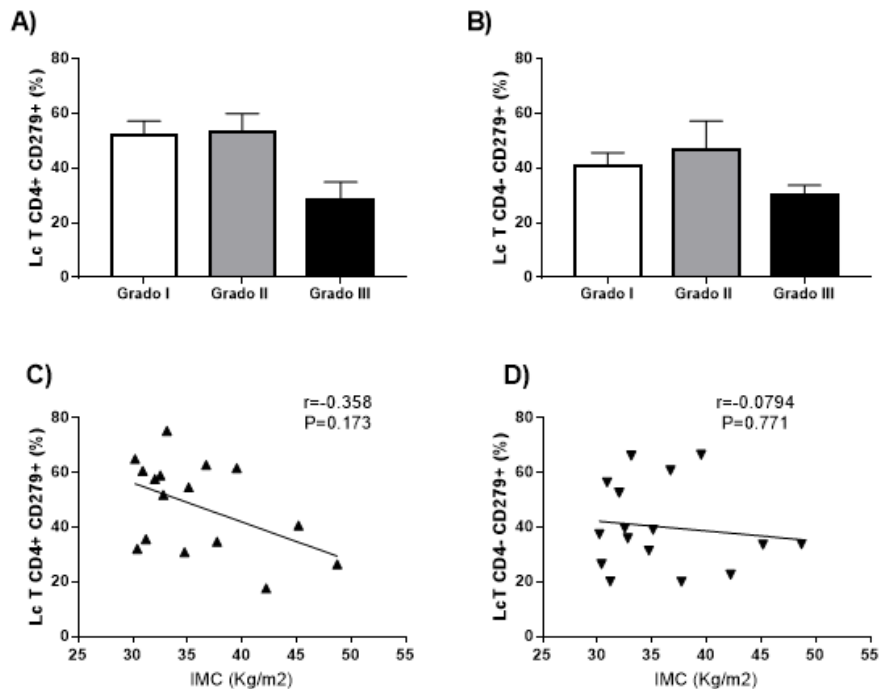
**Figura 9. Relación entre el IMC y estados de activación temprana en linfocitos T maternos.** A) Frecuencias de Lc T CD4+CD69+ en grupos con obesidad grado I, II y III. B) Frecuencias de Lc T CD4-CD69+ en grupos con obesidad grado I, II y III. C) Relación entre la frecuencia de Lc T

CD4+CD69+ y el IMC. D) Relación entre la frecuencia de Lc T CD4-CD69+ y el IMC. En la Figura A y B se muestran gráficas de barras que representan el promedio de las observaciones con su respectivo error estándar. Las diferencias fueron calculadas con prueba Kruskal-Wallis y post hoc de Dunn. Para la figura C y D se realizó una prueba de correlación de Spearman.

En lo que concierne a la presencia de células T CD279+ como indicador de estados de activación tardía, encontramos en sangre periférica materna que la frecuencia de células T cooperadoras (Figura 10 a y b), así como T citotóxicas (Figura 10c), que expresan CD279 es similar entre los grupos control, sobrepeso y obesidad. Sumado a lo anterior, la estratificación de las donadoras acorde al nivel de obesidad, no muestra correlación con la frecuencia de células con estos fenotipos en las células T cooperadoras ni citotóxicas (Figura 11).



**Figura 10. Estados de activación tardía en linfocitos T maternos.** A) Imagen representativa de los diagramas de puntos para la selección de Lc T CD4+ CD279+ y LcT CD4-CD279+. B) Frecuencias de Lc T CD4+CD279+ en grupos control, sobrepeso y obesidad. C) Frecuencias de Lc T CD4-CD279+ en grupos control, sobrepeso y obesidad.



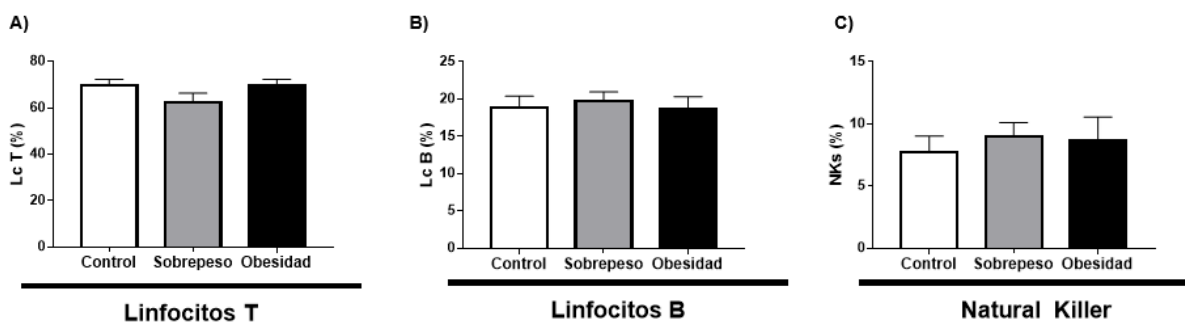
**Figura 11. Relación entre el IMC y estados de activación temprana en linfocitos T maternos.** A) Frecuencias de Lc T CD4+CD279+ en grupos con obesidad grado I, II y III. B) Frecuencias de Lc T CD4-CD279+ en grupos con obesidad grado I, II y III. C) Relación entre la frecuencia de Lc T CD4+CD279+ y el IMC. D) Relación entre la frecuencia de Lc T CD4-CD279+ y el IMC. Para la Figura A y B se muestran en gráficas de barras que representan el promedio de las observaciones con su respectivo error estándar. Las diferencias fueron calculadas con prueba Kruskal-Wallis y post hoc de Dunn. Para la figura C y D se realizó una prueba de correlación de Spearman.

## Evaluación del estado del recién nacido

### I. Distribución de las poblaciones celulares de la línea linfoide

Se realizó la evaluación de la distribución de las poblaciones celulares del recién nacido siguiendo la misma estrategia que para el estado materno. Nuestros resultados muestran que la frecuencia de linfocitos T, es similar entre los grupos de estudio, a la vez que el IMC materno no tiene relación con la frecuencia de estas células (Figura 12A y Tabla 7). Para el caso de los porcentajes de células B

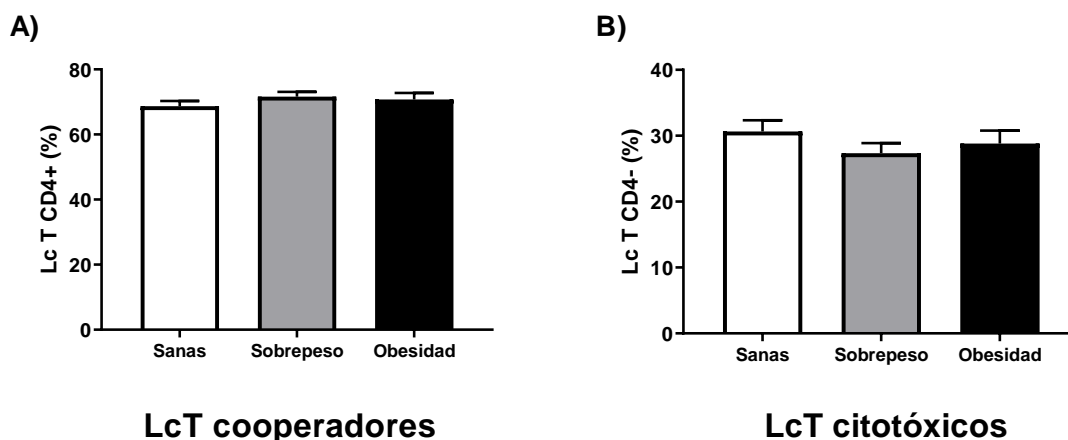
y células NK, observamos un comportamiento similar, ambas sin tener relación con el IMC materno (Figura 12B y 12C y Tabla 7).



**Figura 12. Distribución de linfocitos totales en recién nacidos.** A) Frecuencias de Lc T totales en recién nacidos de grupos control, sobrepeso y obesidad. B) Frecuencias de Lc B totales en recién nacidos de grupos control, sobrepeso y obesidad. C) Frecuencias de células NKs en recién nacidos de grupos control, sobrepeso y obesidad. Los resultados se muestran en gráficas de barras que representan el promedio de las observaciones con su respectivo error estándar. Las diferencias fueron calculadas con prueba Kruskal-Wallis y post hoc de Dunn.

## II. Distribución de las subpoblaciones celulares de linfocitos T

Para el caso de las subpoblaciones de linfocitos T en recién nacidos nuestros resultados muestran que los porcentajes de los linfocitos T cooperadores tienen un comportamiento similar entre los grupos de estudio (Figura 13A), a la vez que no existe relación entre el porcentaje de éstas células y el IMC materno (Tabla 7). En cuanto a la frecuencia de los linfocitos T citotóxicos, sus porcentajes son similares entre ambos grupos de estudio (Figura 13B), además de que no existe relación entre el porcentaje de estas células y el IMC (Tabla 7).



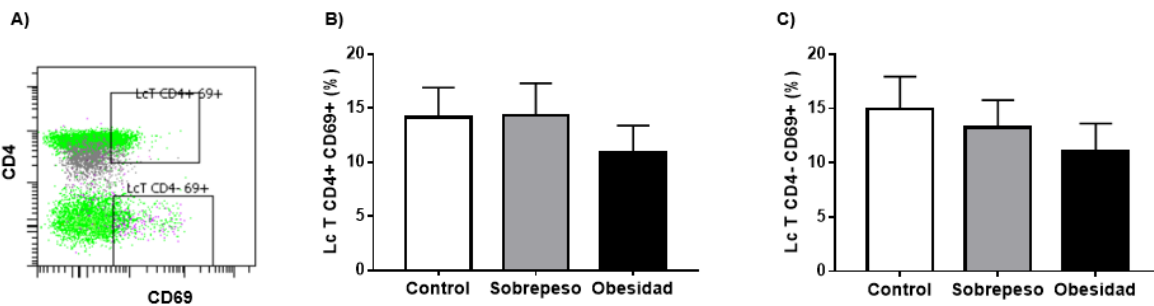
**Figura 13. Distribución de subpoblaciones de linfocitos T en recién nacidos.** A) Frecuencias de Lc T cooperadores en recién nacidos de grupos control, sobrepeso y obesidad. B) Frecuencias de Lc T citotóxicos en recién nacidos de grupos control, sobrepeso y obesidad. Los resultados se muestran en gráficas de barras que representan el promedio de las observaciones con su respectivo error estándar. Las diferencias fueron calculadas con prueba Kruskal-Wallis y post hoc de Dunn.

**Tabla 7. Impacto del IMC materno sobre características fenotípicas de linfocitos de CU.**

Parámetro	r	R cuadrada	P	P Resumen
<b>Linfocitos totales</b>				
Lc T (%)	0.01413	0.00020	0.9185	ns
B (%)	-0.02235	0.00050	0.8713	ns
NK (%)	0.1244	0.01548	0.3657	ns
<b>Linfocitos T</b>				
Lc TCD4+ (%)	0.09248	0.00855	0.5019	ns
Lc Th conv (%)	0.1761	0.03101	0.1943	ns
LcTCD4- (%)	-0.05907	0.00349	0.6684	ns
<b>Activación temprana</b>				
Lc TCD4+CD69+ (%)	-0.01752	0.00031	0.899	ns
Lc TCD8 CD69+ (%)	-0.00805	0.00006	0.9535	ns
<b>Activación tardía</b>				
Lc TCD4+CD279+ (%)	0.05748	0.00330	0.6768	ns
Lc TCD8CD279+ (%)	0.1243	0.01545	0.3659	ns

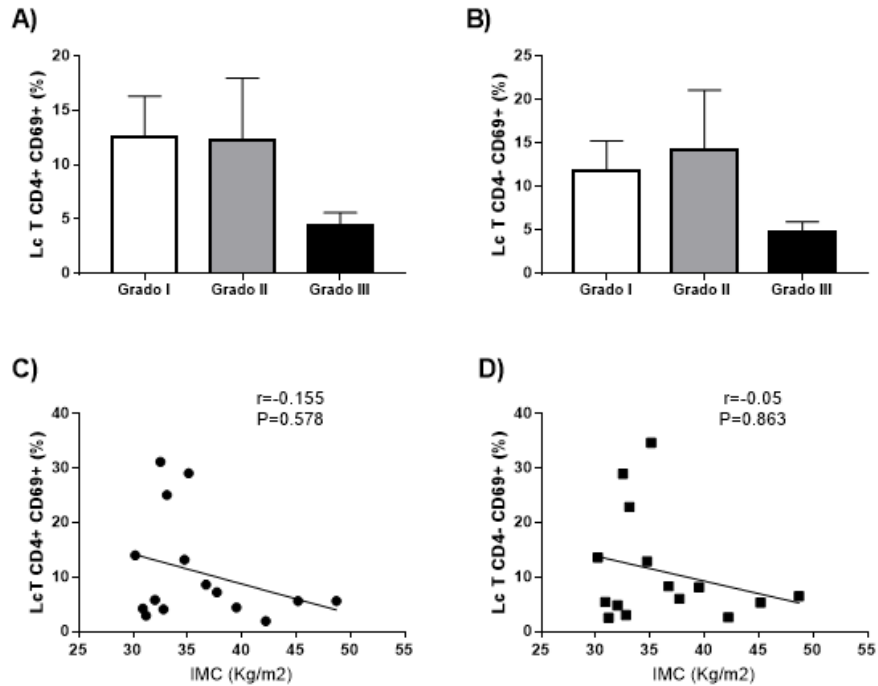
### III. Estados de activación en linfocitos T.

En este caso, se encontró que la frecuencia de células T cooperadoras (Figura 14a) y citotóxicas CD69+ (Figura 14b) es similar entre los recién nacidos de madres del grupo control, sobrepeso y obesidad. Se clasificó a la población de acuerdo al grado de obesidad con el objetivo de determinar si el grado de esta condición impacta de manera significativa la frecuencia de linfocitos T y sus diferentes estados de activación, encontrando que al estratificar a los recién nacidos a corde a su ascendencia materna en obesidad grado I, II y III, la frecuencia de linfocitos T cooperadores CD69+ es similar entre estos subgrupos (Figura 15A y 15C). De la misma manera ocurre con la población de linfocitos T citotóxicos (Figura 15B y 15D). Cabe destacar que, para el caso del estado materno se encontró una relación inversamente proporcional entre la frecuencia de células T citotóxicas con fenotipos activados y el aumento del IMC (figura X) pregestacional, lo cual no se ve reflejado en el estado del recién nacido.



**Figura 14. Estados de activación temprana en linfocitos T de recién nacidos.** A) Imagen representativa de los diagramas de puntos para la selección de Lc T CD4+ CD69+ y LcT CD4-CD69+. B) Frecuencias de Lc T CD4+CD69+ en recién nacidos de grupos control, sobrepeso y obesidad. C) Frecuencias de Lc T CD4-CD69+ en recién nacidos de grupos control, sobrepeso y obesidad. Los resultados se muestran en gráficas de barras que representan el promedio de las observaciones con su respectivo error estándar. Las diferencias fueron calculadas con prueba Kruskal-Wallis y post hoc de Dunn.

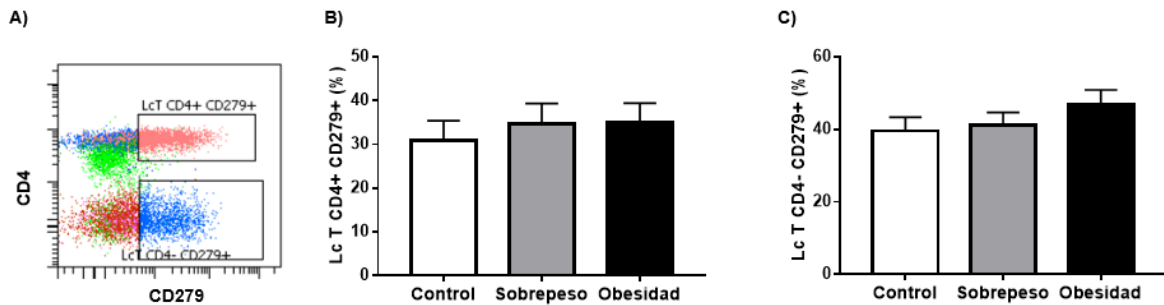




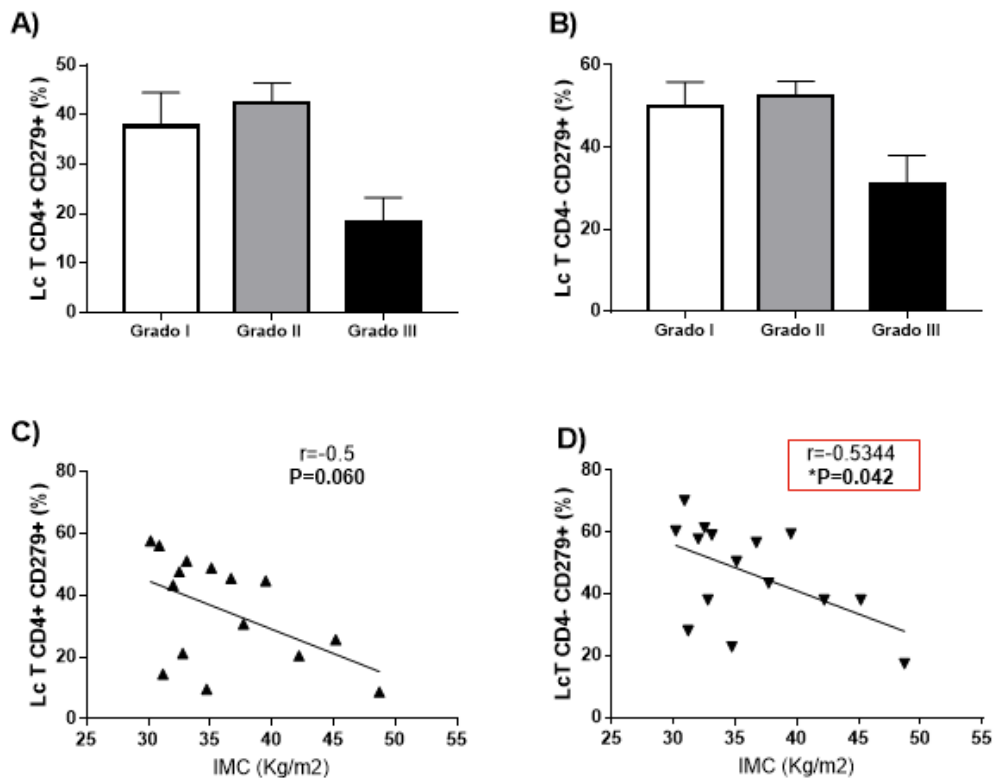
**Figura 15. Relación entre el IMC y estados de activación temprana en linfocitos T de recién nacidos.** A) Frecuencias de Lc T CD4+CD69+ en recién nacidos de grupos con obesidad grado I, II y III. B) Frecuencias de Lc T CD4-CD69+ en recién nacidos de grupos con obesidad grado I, II y III. C) Relación entre la frecuencia de Lc T CD4+CD69+ recién nacidos y el IMC materno. D) Relación entre la frecuencia de Lc T CD4-CD69+ recién nacidos y el IMC materno. Para la Figura A y B se muestran en gráficas de barras que representan el promedio de las observaciones con su respectivo error estándar. Las diferencias fueron calculadas con prueba Kruskal-Wallis y post hoc de Dunn. Para la figura C y D se realizó una prueba de correlación de Spearman.

Respecto a la expresión de CD279+ en sangre de cordón umbilical se encontró que la frecuencia de células T cooperadores (Figura 16A), así como citotóxicas (Figura 16b), que expresan esta molécula es similar entre los grupos control, sobrepeso y obesidad. De manera interesante se encontró que, al realizar la estratificación de los recién nacidos acorde al nivel de obesidad materna, la frecuencia de células T cooperadoras y citotóxicas CD279+ tiende a ser menor en los grupos con obesidad grado III (17A), además de que la baja frecuencia de estas células con fenotipos activados, se asocia al aumento del IMC materno pregestacional (Figura 17B y 17D), de tal manera que conforme incrementa el IMC

materno, la frecuencia de células que expresan CD279 disminuye en las células T cooperadoras y citotóxicas.



**Figura 16. Estados de activación tardía en linfocitos T de recién nacidos.** A) Imagen representativa de los diagramas de puntos para la selección de Lc T CD4+ CD279+ y LcT CD4- CD279+. B) Frecuencias de Lc T CD4+ CD279+ en recién nacidos de grupos control, sobrepeso y obesidad. C) Frecuencias de Lc T CD4- CD279+ en recién nacidos de grupos control, sobrepeso y obesidad. Los resultados se muestran en gráficas de barras que representan el promedio de las observaciones con su respectivo error estándar. Las diferencias fueron calculadas con prueba Kruskal-Wallis y post hoc de Dunn.



**Figura 17. Relación entre el IMC y estados de activación tardía en linfocitos T de recién nacidos.** A) Frecuencias de Lc T CD4+ CD279+ en recién nacidos de grupos con obesidad grado I,

II y III. B) Frecuencias de Lc T CD4-CD279+ en recién nacidos de grupos con obesidad grado I, II y III. C) Relación entre la frecuencia de Lc T CD4+CD279+ recién nacidos y el IMC materno. D) Relación entre la frecuencia de Lc T CD4-CD279+ recién nacidos y el IMC materno. Para la Figura A y B se muestran en gráficas de barras que representan el promedio de las observaciones con su respectivo error estándar. Las diferencias fueron calculadas con prueba Kruskal-Wallis y post hoc de Dunn. Para la figura C y D se realizó una prueba de correlación de Spearman.

## DISCUSIÓN

En las últimas dos décadas, la prevalencia de obesidad ha tenido un aumento significativo a nivel mundial. Al día de hoy, México tiene el primer puesto como el país con mayor obesidad infantil del mundo y el segundo en obesidad entre adultos [9]. La prevalencia de obesidad en mujeres en edad reproductiva está aumentando considerablemente, y es una preocupación por la salud de al menos dos generaciones, ya que se sabe que el desarrollo prenatal es un período de rápido crecimiento y durante la cual el feto es particularmente vulnerable a condiciones que afectan negativamente el desarrollo de órganos y la propensión a enfermedades más tarde en la vida de la progenie [133]. Hablando particularmente del sistema inmunológico, se ha observado una polarización de perfiles principalmente de tipo proinflamatorio en recién nacidos de madres con obesidad, así como respuestas deficientes frente a estímulos como virus y bacterias, haciendo al neonato más susceptible a enfermedades infecciosas durante los primeros meses de vida [89].

En nuestros resultados esperamos que las mediciones bioquímicas representaran un estado metabólico alterado en las mujeres con sobrepeso y obesidad. Sin embargo, estos valores fueron similares entre los tres grupos, y todos ellos en los intervalos de medición normal (Tabla 4). Estos resultados pueden deberse a que las mujeres que se incluyeron en el estudio, acudieron a su seguimiento durante los dos últimos trimestres de la gestación, y tanto las mujeres con sobrepeso y obesidad, fueron controladas con medidas higiénico-dietéticas. Estas incluyen dietas conformadas por el consumo de 30% de grasa, 15 a 20% de proteína y 50 a 55% de hidratos de carbono, con ingesta de energía individualizada a las necesidades de la madre, ejercicio y cambio de conducta durante la gestación. Cabe mencionar que no se realizó una restricción calórica importante debido a la gestación, sin embargo si se buscó la pérdida de peso, con el fin de que la progresión de su condición metabólica no impactara de manera significativa el

desarrollo de la gestación y la resolución del embarazo. Se ha visto que las mujeres gestantes con altos grados de obesidad (Grado II y III), además de las complicaciones que pueden afectar al recién nacido, aumenta significativamente el riesgo de presentar diversas de las complicaciones perinatales como macrosomía, admisión a la UCIN, muerte neonatal, anomalías congénitas y mayor susceptibilidad a padecer enfermedades infecciosas. [134]. Estos resultados dejan claro la necesidad de extender el estudio a la población que no tiene un control clínico durante el embarazo y que su condición representa un riesgo mayor hacia la progenie.

Aunque los diferentes estudios han mostrado notables diferencias entre la frecuencia de células linfoides entre estados de peso normal y obesidad en mujeres embarazadas [32], en nuestro estudio no se observó tal fenómeno. Una de las razones a la que se podría atribuir esto es el hecho de que las mujeres participantes en este estudio estuvieron controladas durante su seguimiento perinatal. Prueba de ello es que los grupos control, sobrepeso y obesidad tengan valores similares de parámetros bioquímicos, y todos ellos dentro de los valores de referencia (Ver tabla 4). De la misma manera ocurre con las frecuencias celulares del linaje linfoide, la cual, según nuestros resultados, no se ve alterada por la condición de sobrepeso u obesidad materna.

Adicionalmente, y de manera interesante, reportamos que los altos grados de obesidad (II y III) tienen relación con la baja expresión de CD69+ en las poblaciones de linfocitos T citotóxicos. Se conoce que, dentro de las funciones de la expresión de CD69, es la capacidad de adhesión a diferentes tejidos[49]. Además, la expresión de esta molécula en linfocitos T está asociada al estado de activación temprana, en el que las células presentan su capacidad efectora ya que pueden secretar citocinas proinflamatorias, migrar a diferentes tejidos, contrarrestar un estado infeccioso. Esto les permite llevar a cabo los mecanismos de respuesta correspondientes frente a los diferentes estímulos de manera

eficiente. El hecho de que se encuentren bajos porcentajes de células T citotóxicas que expresan CD69 en SPM puede ser indicativo de alteraciones en el estado de activación de los linfocitos circulantes, aunque también una de las posibilidades es que las células que lo están expresando se encuentran concentradas en otros tejidos [56, 59], como puede ser TA; ya que parte de la evidencia muestra que esta población se encuentra aumentada en el TA de personas con obesidad y no así en sangre periférica.

Por otra parte, se sabe que el control de una respuesta inmune se logra a través de mecanismos reguladores a través de moléculas estimuladoras o inhibitorias [135]. En general, el equilibrio entre las vías de señalización de estimulación o inhibición determina la polarización de los diferentes perfiles de las células T y la respuesta por parte del sistema inmune. En este sentido se sabe que la molécula CD279, o PD-1, tiene función reguladora, ya que en condiciones homeostáticas como puede ser la ausencia de enfermedades infecciosas, ni las células T ni B expresan este marcador. Sin embargo, tras su activación, CD279 se expresa y se asocia a un estado de agotamiento celular, ya que al unirse a su ligando (PD-L1) en la célula blanco, ocasiona que la célula entre en un estado de “hiporreactividad” en el que la capacidad de respuesta se encuentra disminuida; por lo que es considerada como una de las vías por la cual se regula la activación de los linfocitos T, como mecanismo para evitar que se produzca una sobreactivación celular. Por lo anterior se considera que su expresión ejerce una acción de modulación negativa. De igual forma se conoce que PD-L1 se expresa tanto en órganos linfoides secundarios como en tejidos no linfoides, lo que sugiere que la vía PD-1 / PD-L puede modular respuestas inmunes en órganos linfoides secundarios así como en sitios periféricos [71-73].

En este estudio se encontró que en los recién nacidos la disminución en la expresión de PD-1 en los linfocitos T citotóxicos tiene relación con el incremento del IMC materno. Esto puede indicar que los mecanismos de control por parte del

sistema inmune del recién nacido no son suficientes para atenuar la respuesta de estas células, lo que puede ocasionar que la duración de los estados proinflamatorios aumente. Lo anterior nos puede llevar a pensar que la expresión de PD-1 es uno de los posibles mecanismos implicados en las comorbilidades asociadas en estos recién nacidos de madres con obesidad, como son mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares, infecciosas y metabólicas, entre otras, enfermedades donde el estado proinflamatorio no se controle de manera eficiente. Es decir, las afectaciones en ligandos de tipo inhibidores pueden conllevar a una desregulación del sistema inmunológico, haciéndolo más susceptible a las diferentes enfermedades proinflamatorias antes mencionadas. De acuerdo con su función de regulación negativa, se ha demostrado que la deficiencia de PD-1 *in vivo* resulta en el desarrollo de trastornos autoinmunes [72, 136, 137], además la deficiencia de PD-1 parece alterar el equilibrio entre la activación y señales inhibitorias, lo que resulta en la pérdida de tolerancia periférica [136]. En estudios realizados *in vivo*, la deficiencia de PD-1 resulta en el desarrollo de trastornos linfoproliferativos, en los que se observa infiltración linfocítica en múltiples órganos [137], siendo que la progenie de madres con obesidad tienen mayores riesgos de sufrir estas patologías [138].

Existe evidencia suficiente que corrobora que el estado metabólico materno como sobrepeso y obesidad crea un riesgo significativo para el desarrollo de la gestación, la resolución del embarazo y complicaciones perinatales para la madre y la descendencia. Particularmente en este estudio, el sobrepeso materno durante el embarazo, no impacta en la frecuencia ni estado de activación de los linfocitos T de recién nacidos, mientras que los altos grados de obesidad (grado II y III) tienen un impacto en los estados de activación celular de la madre y el recién nacido.

## **CONCLUSIÓN**

La obesidad materna pregestacional disminuye la frecuencia de linfocitos T citotóxicos CD69+ en la madre y la frecuencia de linfocitos T citotóxicos CD279+ en el recién nacido, lo cual, puede conllevar al mantenimiento del estado inflamatorio de bajo grado que caracteriza la obesidad en el recién nacido. Adicionalmente, sería interesante evaluar la producción de citocinas proinflamatorias tanto en madres con obesidad como en sus recién nacido. Cabe mencionar que las madres voluntarias que participaron en este proyecto llevaron un monitoreo clínico durante el embarazo, sin embargo, estos resultados dejan claro la necesidad de extender el estudio a la población que no tiene un control clínico durante el embarazo y que su condición representa un riesgo mayor hacia la progenie, ya que, nuestros resultados y los diferentes estudios antes mencionados identifican una posible explicación para la mayor susceptibilidad a los agentes infecciosos en la descendencia de madres con obesidad, así como la predisposición a desarrollar enfermedades metabólicas y cardiovasculares durante la vida temprana y adulta.



## BIBLIOGRAFIA

1. Weinsier, R.L., et al., *The etiology of obesity: relative contribution of metabolic factors, diet, and physical activity*. Am J Med, 1998. **105**(2): p. 145-50.
2. Astrup, A., et al., *Nutrition transition and its relationship to the development of obesity and related chronic diseases*. Obes Rev, 2008. **9 Suppl 1**: p. 48-52.
3. Freeman-Fobbs, P., *Feeding our children to death: the tragedy of childhood obesity in America*. J Natl Med Assoc, 2003. **95**(2): p. 119.
4. F. Xavier Pi-Sunyer, M.D., M.P.H., Diane M. Becker, Sc.D., M.P.H., William H. Dietz, M.D., Ph.D., John P. Foreyt, Ph.D., Scott M. Grundy, M.D., Ph.D., *Clinical guidelines on the identification, evaluation and treatment of overweight and obesity in adults*, 2006, National Institute of Health. p. 226.
5. Organization, W.H., *Obesity : preventing and managing the global epidemic : report of a WHO consultation.*, 2000: Geneva, Switzerland. p. 252.
6. Sengier, A., *[Multifactorial etiology of obesity: nutritional and central aspects]*. Rev Med Brux, 2005. **26**(4): p. S211-4.
7. Organization, W.H., *Obesidad y sobrepeso: Datos y cifras*, 2018.
8. Development, T.O.f.E.C.-o.a., *The Heavy Burden of Obesity*. The Economics of Prevention, ed. O.H.P. Studies. 2019, Paris.
9. Nutrición, E.N.d.S.y., *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición: Resultados Nacionales*, 2012, Instituto de Salud Pública, Secretaría de Salud. p. 180.
10. Romano, M., *Inflammation resolution: does the bone marrow have a say?* Am J Hematol, 2008. **83**(6): p. 435-6.
11. Plutzky, J., *Expansion and contraction: the mighty, mighty fatty acid*. Nat Med, 2009. **15**(6): p. 618-9.
12. Vieira-Potter, V.J., *Inflammation and macrophage modulation in adipose tissues*. Cell Microbiol, 2014. **16**(10): p. 1484-92.
13. Leddy, M.A., M.L. Power, and J. Schulkun, *The impact of maternal obesity on maternal and fetal health*. Rev Obstet Gynecol, 2008. **1**(4): p. 170-8.
14. Lee, K.K., et al., *Maternal Obesity During Pregnancy Associates With Premature Mortality and Major Cardiovascular Events in Later Life*. Hypertension, 2015. **66**(5): p. 938-44.
15. Lederman, S.A., et al., *Body fat and water changes during pregnancy in women with different body weight and weight gain*. Obstet Gynecol, 1997. **90**(4 Pt 1): p. 483-8.
16. Weiss, J.L., et al., *Obesity, obstetric complications and cesarean delivery rate--a population-based screening study*. Am J Obstet Gynecol, 2004. **190**(4): p. 1091-7.
17. Usha Kiran, T.S., et al., *Outcome of pregnancy in a woman with an increased body mass index*. BJOG, 2005. **112**(6): p. 768-72.

18. Callaway, L.K., et al., *The prevalence and impact of overweight and obesity in an Australian obstetric population*. Med J Aust, 2006. **184**(2): p. 56-9.
19. Wagner, S.J., S. Barac, and V.D. Garovic, *Hypertensive pregnancy disorders: current concepts*. J Clin Hypertens (Greenwich), 2007. **9**(7): p. 560-6.
20. Hall, J.G., *The importance of the fetal origins of adult disease for geneticists*. Clin Genet, 2007. **72**(2): p. 67-73.
21. Arendas, K., Q. Qiu, and A. Gruslin, *Obesity in pregnancy: pre-conceptual to postpartum consequences*. J Obstet Gynaecol Can, 2008. **30**(6): p. 477-488.
22. Catalano, P.M. and H.M. Ehrenberg, *The short- and long-term implications of maternal obesity on the mother and her offspring*. BJOG, 2006. **113**(10): p. 1126-33.
23. Pathi, A., U. Esen, and A. Hildreth, *A comparison of complications of pregnancy and delivery in morbidly obese and non-obese women*. J Obstet Gynaecol, 2006. **26**(6): p. 527-30.
24. Madan, J.C., et al., *Maternal obesity and markers of inflammation in pregnancy*. Cytokine, 2009. **47**(1): p. 61-4.
25. Gaillard, R., et al., *Childhood cardiometabolic outcomes of maternal obesity during pregnancy: the Generation R Study*. Hypertension, 2014. **63**(4): p. 683-91.
26. Lawlor, D.A., et al., *Exploring the developmental overnutrition hypothesis using parental-offspring associations and FTO as an instrumental variable*. PLoS Med, 2008. **5**(3): p. e33.
27. Gaillard, R., et al., *Maternal weight gain in different periods of pregnancy and childhood cardio-metabolic outcomes. The Generation R Study*. Int J Obes (Lond), 2015. **39**(4): p. 677-85.
28. Oostvogels, A.J., et al., *Maternal prepregnancy BMI, offspring's early postnatal growth, and metabolic profile at age 5-6 years: the ABCD Study*. J Clin Endocrinol Metab, 2014. **99**(10): p. 3845-54.
29. Reynolds, R.M., et al., *Maternal obesity during pregnancy and premature mortality from cardiovascular event in adult offspring: follow-up of 1 323 275 person years*. BMJ, 2013. **347**: p. f4539.
30. Eriksson, J.G., et al., *Long-term consequences of maternal overweight in pregnancy on offspring later health: findings from the Helsinki Birth Cohort Study*. Ann Med, 2014. **46**(6): p. 434-8.
31. Leibowitz, K.L., et al., *Maternal obesity associated with inflammation in their children*. World J Pediatr, 2012. **8**(1): p. 76-9.
32. Buss, C., et al., *Impaired executive function mediates the association between maternal pre-pregnancy body mass index and child ADHD symptoms*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e37758.

33. Barker, D.J., et al., *Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth*. Diabetologia, 1993. **36**(1): p. 62-7.
34. Silver, M.J., et al., *Independent genomewide screens identify the tumor suppressor VTRNA2-1 as a human epiallele responsive to periconceptual environment*. Genome Biol, 2015. **16**: p. 118.
35. Forno, E., et al., *Maternal obesity in pregnancy, gestational weight gain, and risk of childhood asthma*. Pediatrics, 2014. **134**(2): p. e535-46.
36. Oken, E. and M.W. Gillman, *Fetal origins of obesity*. Obes Res, 2003. **11**(4): p. 496-506.
37. Garn, S.M. and D.C. Clark, *Trends in fatness and the origins of obesity Ad Hoc Committee to Review the Ten-State Nutrition Survey*. Pediatrics, 1976. **57**(4): p. 443-56.
38. Curhan, G.C., et al., *Birth weight and adult hypertension and obesity in women*. Circulation, 1996. **94**(6): p. 1310-5.
39. Boney, C.M., et al., *Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus*. Pediatrics, 2005. **115**(3): p. e290-6.
40. Poston, L., et al., *Preconceptional and maternal obesity: epidemiology and health consequences*. Lancet Diabetes Endocrinol, 2016. **4**(12): p. 1025-1036.
41. Hotamisligil, G.S., *Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders*. Nature, 2017. **542**(7640): p. 177-185.
42. Wellen, K.E. and G.S. Hotamisligil, *Inflammation, stress, and diabetes*. J Clin Invest, 2005. **115**(5): p. 1111-9.
43. Sun, K., C.M. Kusminski, and P.E. Scherer, *Adipose tissue remodeling and obesity*. J Clin Invest, 2011. **121**(6): p. 2094-101.
44. Flores-Lázaro JR, R.-M.E., Rivas-Arancibia S. , *Metabolic consequences of the functional alterations of adipose tissue in obese patients*. Revista Médica del Hospital General 2011. **74**: p. 157-165.
45. Hotamisligil, G.S., N.S. Shargill, and B.M. Spiegelman, *Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance*. Science, 1993. **259**(5091): p. 87-91.
46. Winer, S., et al., *Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy*. Nat Med, 2009. **15**(8): p. 921-9.
47. Yang, H., et al., *Obesity increases the production of proinflammatory mediators from adipose tissue T cells and compromises TCR repertoire diversity: implications for systemic inflammation and insulin resistance*. J Immunol, 2010. **185**(3): p. 1836-45.
48. Lumeng, C.N., I. Maillard, and A.R. Saltiel, *T-ing up inflammation in fat*. Nat Med, 2009. **15**(8): p. 846-7.

49. Cebrian, M., et al., *Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes*. J Exp Med, 1988. **168**(5): p. 1621-37.
50. Hara, T., et al., *Human T cell activation. III. Rapid induction of a phosphorylated 28 kD/32 kD disulfide-linked early activation antigen (EA 1) by 12-o-tetradecanoyl phorbol-13-acetate, mitogens, and antigens*. J Exp Med, 1986. **164**(6): p. 1988-2005.
51. Lanier, L.L., *NK cell receptors*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 359-93.
52. Testi, R., et al., *The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells*. Immunol Today, 1994. **15**(10): p. 479-83.
53. Martin, P., et al., *The leukocyte activation antigen CD69 limits allergic asthma and skin contact hypersensitivity*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **126**(2): p. 355-65, 365 e1-3.
54. Miki-Hosokawa, T., et al., *CD69 controls the pathogenesis of allergic airway inflammation*. J Immunol, 2009. **183**(12): p. 8203-15.
55. Murata, K., et al., *CD69-null mice protected from arthritis induced with anti-type II collagen antibodies*. Int Immunol, 2003. **15**(8): p. 987-92.
56. Radulovic, K., et al., *CD69 regulates type I IFN-induced tolerogenic signals to mucosal CD4 T cells that attenuate their colitogenic potential*. J Immunol, 2012. **188**(4): p. 2001-13.
57. Cruz-Adalia, A., et al., *CD69 limits the severity of cardiomyopathy after autoimmune myocarditis*. Circulation, 2010. **122**(14): p. 1396-404.
58. Esplugues, E., et al., *Induction of tumor NK-cell immunity by anti-CD69 antibody therapy*. Blood, 2005. **105**(11): p. 4399-406.
59. Esplugues, E., et al., *Enhanced antitumor immunity in mice deficient in CD69*. J Exp Med, 2003. **197**(9): p. 1093-106.
60. Damouche, A., et al., *High proportion of PD-1-expressing CD4(+) T cells in adipose tissue constitutes an immunomodulatory microenvironment that may support HIV persistence*. Eur J Immunol, 2017. **47**(12): p. 2113-2123.
61. Couturier, J., et al., *Human adipose tissue as a reservoir for memory CD4+ T cells and HIV*. AIDS, 2015. **29**(6): p. 667-74.
62. Lopez-Cabrera, M., et al., *Transcriptional regulation of the gene encoding the human C-type lectin leukocyte receptor AIM/CD69 and functional characterization of its tumor necrosis factor-alpha-responsive elements*. J Biol Chem, 1995. **270**(37): p. 21545-51.
63. Sanchez-Mateos, P., et al., *Expression of a gp33/27,000 MW activation inducer molecule (AIM) on human lymphoid tissues. Induction of cell proliferation on thymocytes and B lymphocytes by anti-AIM antibodies*. Immunology, 1989. **68**(1): p. 72-9.
64. Garcia-Monzon, C., et al., *Expression of a novel activation antigen on intrahepatic CD8+ T lymphocytes in viral chronic active hepatitis*. Gastroenterology, 1990. **98**(4): p. 1029-35.

65. Laffon, A., et al., *Upregulated expression and function of VLA-4 fibronectin receptors on human activated T cells in rheumatoid arthritis*. J Clin Invest, 1991. **88**(2): p. 546-52.
66. Mampaso, F., et al., *Expression of adhesion molecules in allograft renal dysfunction. A distinct diagnostic pattern in rejection and cyclosporine nephrotoxicity*. Transplantation, 1993. **56**(3): p. 687-91.
67. Sancho, D., et al., *CD69 downregulates autoimmune reactivity through active transforming growth factor-beta production in collagen-induced arthritis*. J Clin Invest, 2003. **112**(6): p. 872-82.
68. Li, M.O., et al., *Transforming growth factor-beta regulation of immune responses*. Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 99-146.
69. Zhao, Q., et al., *Activated CD69+ T cells foster immune privilege by regulating IDO expression in tumor-associated macrophages*. J Immunol, 2012. **188**(3): p. 1117-24.
70. Feng, C., et al., *A potential role for CD69 in thymocyte emigration*. Int Immunol, 2002. **14**(6): p. 535-44.
71. Ishida, Y., et al., *Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death*. EMBO J, 1992. **11**(11): p. 3887-95.
72. Nishimura, H., et al., *Immunological studies on PD-1 deficient mice: implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses*. Int Immunol, 1998. **10**(10): p. 1563-72.
73. Schietinger, A. and P.D. Greenberg, *Tolerance and exhaustion: defining mechanisms of T cell dysfunction*. Trends Immunol, 2014. **35**(2): p. 51-60.
74. Chen, L., *Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(5): p. 336-47.
75. Wanjalla, C.N., et al., *Adipose Tissue in Persons With HIV Is Enriched for CD4(+) T Effector Memory and T Effector Memory RA(+) Cells, Which Show Higher CD69 Expression and CD57, CX3CR1, GPR56 Co-expression With Increasing Glucose Intolerance*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 408.
76. Sheridan, P.A., et al., *Obesity is associated with impaired immune response to influenza vaccination in humans*. Int J Obes (Lond), 2012. **36**(8): p. 1072-7.
77. Wang, Z., et al., *Paradoxical effects of obesity on T cell function during tumor progression and PD-1 checkpoint blockade*. Nat Med, 2019. **25**(1): p. 141-151.
78. Shirakawa, K., et al., *Obesity accelerates T cell senescence in murine visceral adipose tissue*. J Clin Invest, 2016. **126**(12): p. 4626-4639.
79. Dowling, D. and F.M. McAuliffe, *The molecular mechanisms of offspring effects from obese pregnancy*. Obes Facts, 2013. **6**(2): p. 134-45.
80. Stirrat L, R.R., *Effects of maternal obesity on early and long-term outcomes for offspring*. Research and Reports in Neonatology, 2014. **2014**:4: p. 43—53.

81. Catalano, P.M., et al., *Adiponectin in human pregnancy: implications for regulation of glucose and lipid metabolism*. *Diabetologia*, 2006. **49**(7): p. 1677-85.
82. Higa, R. and A. Jawerbaum, *Intrauterine effects of impaired lipid homeostasis in pregnancy diseases*. *Curr Med Chem*, 2013. **20**(18): p. 2338-50.
83. Meyer, B.J., et al., *Maternal obesity is associated with the formation of small dense LDL and hypoadiponectinemia in the third trimester*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013. **98**(2): p. 643-52.
84. de Ferranti, S. and D. Mozaffarian, *The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences*. *Clin Chem*, 2008. **54**(6): p. 945-55.
85. Challier, J.C., et al., *Obesity in pregnancy stimulates macrophage accumulation and inflammation in the placenta*. *Placenta*, 2008. **29**(3): p. 274-81.
86. Hivert, M.F., et al., *Associations of adiponectin, resistin, and tumor necrosis factor-alpha with insulin resistance*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008. **93**(8): p. 3165-72.
87. Gangestad, S.W., A.E. Caldwell Hooper, and M.A. Eaton, *On the function of placental corticotropin-releasing hormone: a role in maternal-fetal conflicts over blood glucose concentrations*. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2012. **87**(4): p. 856-73.
88. Chevalier, S., et al., *Whole-body protein anabolic response is resistant to the action of insulin in obese women*. *Am J Clin Nutr*, 2005. **82**(2): p. 355-65.
89. Nelson, S.M., P. Matthews, and L. Poston, *Maternal metabolism and obesity: modifiable determinants of pregnancy outcome*. *Hum Reprod Update*, 2010. **16**(3): p. 255-75.
90. Jansson, N., et al., *Activation of placental mTOR signaling and amino acid transporters in obese women giving birth to large babies*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013. **98**(1): p. 105-13.
91. Jones, H.N., T. Jansson, and T.L. Powell, *IL-6 stimulates system A amino acid transporter activity in trophoblast cells through STAT3 and increased expression of SNAT2*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009. **297**(5): p. C1228-35.
92. Denison, F.C., et al., *Obesity, pregnancy, inflammation, and vascular function*. *Reproduction*, 2010. **140**(3): p. 373-85.
93. Higgins, L., et al., *Maternal obesity and its effect on placental cell turnover*. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2013. **26**(8): p. 783-8.
94. Charles A Janeway, J., Paul Travers, Mark Walport, and Mark J Shlomchik., *Janeway's immunobiology*, G. Science, Editor 2012.
95. Parkin, J. and B. Cohen, *An overview of the immune system*. *Lancet*, 2001. **357**(9270): p. 1777-89.

96. Levy, O., *Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(5): p. 379-90.
97. Dowling, D.J. and O. Levy, *Ontogeny of early life immunity*. Trends Immunol, 2014. **35**(7): p. 299-310.
98. Brandtzaeg, P., *The mucosal immune system and its integration with the mammary glands*. J Pediatr, 2010. **156**(2 Suppl): p. S8-15.
99. Kollmann, T.R., et al., *Innate immune function by Toll-like receptors: distinct responses in newborns and the elderly*. Immunity, 2012. **37**(5): p. 771-83.
100. Ygberg, S. and A. Nilsson, *The developing immune system - from foetus to toddler*. Acta Paediatr, 2012. **101**(2): p. 120-7.
101. Sautois, B., G. Fillet, and Y. Beguin, *Comparative cytokine production by in vitro stimulated mononucleated cells from cord blood and adult blood*. Exp Hematol, 1997. **25**(2): p. 103-8.
102. Frostegard, J., *Immunity, atherosclerosis and cardiovascular disease*. BMC Med, 2013. **11**: p. 117.
103. Adkins, B., C. Leclerc, and S. Marshall-Clarke, *Neonatal adaptive immunity comes of age*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 553-64.
104. Jonakait, G.M., *The effects of maternal inflammation on neuronal development: possible mechanisms*. Int J Dev Neurosci, 2007. **25**(7): p. 415-25.
105. Romero, R., et al., *Inflammation in pregnancy: its roles in reproductive physiology, obstetrical complications, and fetal injury*. Nutr Rev, 2007. **65**(12 Pt 2): p. S194-202.
106. Beloosesky, R., et al., *N-acetyl-cysteine suppresses amniotic fluid and placenta inflammatory cytokine responses to lipopolysaccharide in rats*. Am J Obstet Gynecol, 2006. **194**(1): p. 268-73.
107. Bell, M.J., J.M. Hallenbeck, and V. Gallo, *Determining the fetal inflammatory response in an experimental model of intrauterine inflammation in rats*. Pediatr Res, 2004. **56**(4): p. 541-6.
108. Ross, K.M., et al., *Patterns of peripheral cytokine expression during pregnancy in two cohorts and associations with inflammatory markers in cord blood*. Am J Reprod Immunol, 2016. **76**(5): p. 406-414.
109. Catalano, P.M., et al., *Perinatal risk factors for childhood obesity and metabolic dysregulation*. Am J Clin Nutr, 2009. **90**(5): p. 1303-13.
110. Catalano, P.M., et al., *Fetuses of obese mothers develop insulin resistance in utero*. Diabetes Care, 2009. **32**(6): p. 1076-80.
111. Kral, J.G., et al., *Large maternal weight loss from obesity surgery prevents transmission of obesity to children who were followed for 2 to 18 years*. Pediatrics, 2006. **118**(6): p. e1644-9.
112. Heerwagen, M.J., et al., *Maternal obesity and fetal metabolic programming: a fertile epigenetic soil*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2010. **299**(3): p. R711-22.

113. Diraison, F., P. Moulin, and M. Beylot, *Contribution of hepatic de novo lipogenesis and reesterification of plasma non esterified fatty acids to plasma triglyceride synthesis during non-alcoholic fatty liver disease*. *Diabetes Metab*, 2003. **29**(5): p. 478-85.
114. Draznin, B., *Molecular mechanisms of insulin resistance: serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and increased expression of p85alpha: the two sides of a coin*. *Diabetes*, 2006. **55**(8): p. 2392-7.
115. Li, S., I.M. Tse, and E.T. Li, *Maternal green tea extract supplementation to rats fed a high-fat diet ameliorates insulin resistance in adult male offspring*. *J Nutr Biochem*, 2012. **23**(12): p. 1655-60.
116. Group, H.S.C.R., et al., *Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes*. *N Engl J Med*, 2008. **358**(19): p. 1991-2002.
117. Kamimae-Lanning, A.N., et al., *Maternal high-fat diet and obesity compromise fetal hematopoiesis*. *Mol Metab*, 2015. **4**(1): p. 25-38.
118. Esaki, H., et al., *Accelerated T-cell activation and differentiation of polar subsets characterizes early atopic dermatitis development*. *J Allergy Clin Immunol*, 2016. **138**(5): p. 1473-1477 e5.
119. Toti, P., et al., *Acute thymic involution in fetuses and neonates with chorioamnionitis*. *Hum Pathol*, 2000. **31**(9): p. 1121-8.
120. Tangshewinsirikul, C. and P. Panburana, *Sonographic measurement of fetal thymus size in uncomplicated singleton pregnancies*. *J Clin Ultrasound*, 2017. **45**(3): p. 150-159.
121. Gasthaus, C.L., et al., *Influence of maternal HIV infection on fetal thymus size*. *J Perinat Med*, 2019. **48**(1): p. 67-73.
122. Wang, S., et al., *IL-21 drives expansion and plasma cell differentiation of autoreactive CD11c(hi)T-bet(+) B cells in SLE*. *Nat Commun*, 2018. **9**(1): p. 1758.
123. Wehr, C., et al., *A new CD21low B cell population in the peripheral blood of patients with SLE*. *Clin Immunol*, 2004. **113**(2): p. 161-71.
124. Wlodarczyk, M. and G. Nowicka, *Obesity, DNA Damage, and Development of Obesity-Related Diseases*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(5).
125. Spielmann, J., et al., *Significantly enhanced lung metastasis and reduced organ NK cell functions in diet-induced obese rats*. *BMC Obes*, 2017. **4**: p. 24.
126. Lamas, B., et al., *Dietary fat without body weight gain increases in vivo MCF-7 human breast cancer cell growth and decreases natural killer cell cytotoxicity*. *Mol Carcinog*, 2015. **54**(1): p. 58-71.
127. Behrendt, P., et al., *Diet-induced obesity, exogenous leptin-, and MADB106 tumor cell challenge affect tissue leukocyte distribution and serum levels of cytokines in F344 rats*. *Endocrine*, 2010. **38**(1): p. 104-12.
128. Lo, C.K., et al., *Leptin signaling protects NK cells from apoptosis during development in mouse bone marrow*. *Cell Mol Immunol*, 2009. **6**(5): p. 353-60.



129. Lee, B.C., et al., *Adipose Natural Killer Cells Regulate Adipose Tissue Macrophages to Promote Insulin Resistance in Obesity*. *Cell Metab*, 2016. **23**(4): p. 685-98.
130. Nave, H., et al., *Resistance of Janus kinase-2 dependent leptin signaling in natural killer (NK) cells: a novel mechanism of NK cell dysfunction in diet-induced obesity*. *Endocrinology*, 2008. **149**(7): p. 3370-8.
131. Gong, J.H., G. Maki, and H.G. Klingemann, *Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells*. *Leukemia*, 1994. **8**(4): p. 652-8.
132. Haberg, S.E., et al., *Maternal obesity in pregnancy and respiratory health in early childhood*. *Paediatr Perinat Epidemiol*, 2009. **23**(4): p. 352-62.
133. Li, Y., *Epigenetic Mechanisms Link Maternal Diets and Gut Microbiome to Obesity in the Offspring*. *Front Genet*, 2018. **9**: p. 342.
134. Denison, F.C., et al., *Care of Women with Obesity in Pregnancy: Green-top Guideline No. 72*. *BJOG*, 2019. **126**(3): p. e62-e106.
135. Carreno, B.M. and M. Collins, *The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses*. *Annu Rev Immunol*, 2002. **20**: p. 29-53.
136. Nishimura, H., et al., *Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor*. *Immunity*, 1999. **11**(2): p. 141-51.
137. Nishimura, H., et al., *Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice*. *Science*, 2001. **291**(5502): p. 319-22.
138. Williams, C.B., K.C. Mackenzie, and S. Gahagan, *The effect of maternal obesity on the offspring*. *Clin Obstet Gynecol*, 2014. **57**(3): p. 508-15.