



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS

MÉDICAS ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

FUNCIONES DE LOS NEUTRÓFILOS EN PACIENTES CON OBESIDAD GRADO III

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

C. D. ALEJANDRO HERNÁNDEZ ESPINOSA

TUTORA:

DRA. EILEEN URIBE QUEROL

DEPEI, Facultad de Odontología, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. CARLOS ROSALES LEDEZMA

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

DRA. PATRICIA VICTORIA TORRES DURÁN

Facultad de Medicina, UNAM

Ciudad Universitaria, CD. MX. Enero, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo de tesis de maestría se realizó bajo la dirección de la **Dra. Eileen Uribe Querol**, con apoyo del proyecto **PAPIIT IN222120** otorgado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México.

El alumno **Alejandro Hernández Espinosa**, con número cuenta: 309083678, recibió la **beca No. 899750** del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud.

A la División de Estudios de Posgrado e Investigación (DEPEI) de la Facultad de Odontología.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca No. 899750 otorgada.

A la Clínica de Obesidad del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora, la Dra. Eileen Uribe Querol, por brindarme la oportunidad de guiarme durante la elaboración de este proyecto. Gracias por su confianza, su amabilidad y su paciencia. Sobre todo, por enseñarme con su ejemplo a ser una mejor persona y a superarme cada vez más. La admiro mucho.

Al Dr. Carlos Rosales Ledezma, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de laboratorio, por compartir sus conocimientos, sus enseñanzas y sabios consejos. Un ejemplo a seguir.

A la Dra. Patricia Torres Durán, por su total disposición y su amabilidad, por los consejos y por guiarme no solo académicamente, si no también personalmente.

Al Dr. Aldo Ferreira Hermosillo, por todo el apoyo ofrecido para la toma de muestras. Gracias por su amabilidad.

Al Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez, por todo el apoyo ofrecido.

A la M. en IBB. Nancy Yorley Mora Pérez, por todo su apoyo y consejos como técnico de laboratorio durante la realización de los ensayos.

A mis profesores, gracias por sus conocimientos y por ser un ejemplo para mí.

A todas las personas que donaron sangre, fueron indispensables para la realización de este proyecto.

A mis compañeras Fer, Dani, Jime y Viri. Por su amistad y apoyo dentro y fuera de las aulas.

A mi amiga Lore. Por su amistad y todo su apoyo durante las clases.

A mis amigos: Ricardo, Abi, Lili, Pepe, Daylin, Janeth, Marisol, Luis, Fernando, Arturo, Gerardo, Bryan, Alex Avilés, Haira, Alfredo y David. Gracias por su amistad y su tiempo.

A mis abuelos y tíos que partieron antes de tiempo.

A mis tías y tíos: Por enseñarme que la humildad, el sacrificio, la gratitud y el respeto son clave para el éxito.

A mis primas y primos: Por ser un ejemplo para mí, por demostrarme que se puede salir adelante.

A mis sobrinas y sobrinos: Por llenar mis días de alegría. Espero, algún día, ser un ejemplo para ustedes.

DEDICATORIA

A mi madre, por alentarme a seguir y darme la fuerza para no desistir, por darme la vida, por apoyarme y creer en mí en cada acontecimiento de mi vida, por enseñarme lo que es el sacrificio y las recompensas del esfuerzo, por enseñarme a ser fuerte para salir adelante por más difícil que se presente la situación.

A mi padre, por enseñarme a nunca rendirme y a no depender de otras personas para salir adelante. Por forjar mi camino, por enseñarme los valores y principios de la vida, por estar pendiente de mí en cada momento y por alentarme a lograr cada meta que me proponga.

A mi hermano por escucharme, apoyarme y entenderme. Por contagiarme de su alegría, empatía y nobleza, por estar siempre a mi lado.

ÍNDICE

RESUMEN	9
ABSTRACT	10
I. INTRODUCCIÓN	11
1. Definición de obesidad	11
2. Epidemiología	12
3. Comorbilidades asociadas a la obesidad y calidad de vida	13
4. Adipocitos.....	16
5. Tejido adiposo.....	18
5.1 Células del sistema inmunológico en el tejido adiposo	19
6. Inflamación y obesidad.....	19
7. Neutrófilos.....	22
8. Funciones de los neutrófilos.....	24
8.1 Desgranulación.....	24
8.2 Fagocitosis.....	26
8.3 Formación de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS).....	29
7.4 Formación de Trampas Extracelulares de Neutrófilos (NET).....	33
9. Neutrófilos y enfermedades.....	36
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	39
III. JUSTIFICACIÓN	39
IV. HIPÓTESIS	40
V. OBJETIVO GENERAL	40

VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
VII. DISEÑO DEL ESTUDIO	40
VIII. METODOLOGÍA.	44
1. Purificación de neutrófilos sanguíneos	44
2. Ensayo de formación de especies reactivas de oxígeno (ROS)	44
3. Ensayo de fagocitosis.....	45
4. Ensayo de formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET)	45
IX. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	46
X. RESULTADOS.....	47
1. Purificación de neutrófilos sanguíneos de personas con peso normal y de pacientes con obesidad grado III.....	47
2. No existen diferencias en la formación de ROS entre los neutrófilos sanguíneos de personas con peso normal y con obesidad grado III.	48
3. Los neutrófilos sanguíneos de personas con peso normal y de pacientes con obesidad grado III son capaces de fagocitar.	50
4. Los neutrófilos sanguíneos de pacientes con obesidad grado III tienen mayor capacidad de fagocitar que los neutrófilos sanguíneos de personas con peso normal..	50
5. Los neutrófilos sanguíneos de un paciente con obesidad grado III son capaces de producir NET	54
XI. DISCUSIÓN	56
XII. CONCLUSIONES.....	63
XIII. PERSPECTIVAS	64
XIV. BIBLIOGRAFÍA.....	65
XV. ANEXOS	69

RESUMEN

La obesidad se define como una acumulación excesiva de grasa en el cuerpo, asociada a un desequilibrio entre la ingesta y el gasto calórico. La obesidad puede clasificarse en distintos grados con base en el Índice de Masa Corporal (IMC), siendo la obesidad grado III la más severa. La obesidad representa un problema de salud pública en México. La obesidad genera un estado inflamatorio del tejido adiposo, donde existe un aumento en la concentración de moléculas y células del sistema inmunológico. Los neutrófilos son los leucocitos más abundantes en la sangre, participan en la defensa contra patógenos y son los principales efectores en los sitios de inflamación o infección. Las funciones que emplean los neutrófilos incluyen a la desgranulación, la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), la fagocitosis, y la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET). Existe poca evidencia de las funciones de los neutrófilos en la obesidad y no se conoce si las funciones de los neutrófilos sanguíneos están alteradas en pacientes con obesidad. Como hipótesis se tiene que los neutrófilos sanguíneos de pacientes con obesidad grado III presentan mayor formación de ROS, fagocitosis y formación de NET que los neutrófilos sanguíneos de personas con peso normal. Por lo cual, el objetivo de esta investigación fue evaluar y comparar las funciones de los neutrófilos sanguíneos de pacientes con obesidad grado III y de personas con peso normal.

Se realizó la extracción de sangre y posterior purificación de los neutrófilos sanguíneos. Se evaluó la formación de ROS mediante la técnica con dihidroetidio (DHE). Para evaluar la fagocitosis, los neutrófilos se incubaron con perlas opsonizadas y no opsonizadas con inmunoglobulina G (IgG), posteriormente se obtuvo el índice fagocítico. Se evaluó la formación de NET mediante la incubación de los neutrófilos con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA).

Se concluyó que no existen diferencias en la formación de ROS en neutrófilos sanguíneos de neutrófilos de personas con peso normal y de pacientes con obesidad grado III. Por otro lado, los neutrófilos sanguíneos de pacientes con obesidad grado III tienen mayor capacidad de fagocitar que los neutrófilos sanguíneos de personas con peso normal. Por último, los neutrófilos sanguíneos de un paciente con obesidad son capaces de producir NET.

ABSTRACT

Obesity is defined as an excessive accumulation of fat in the body, associated with an imbalance between caloric intake and expenditure. Obesity can be classified into different grades based on Body Mass Index (BMI), with grade III obesity being the most severe. Obesity represents a public health problem in Mexico. Obesity generates an inflammatory state of the adipose tissue, where there is an increase in the concentration of molecules and cells of the immune system. Neutrophils are the most abundant leukocytes in the blood, they participate in the defense against pathogens and are the main effectors at sites of inflammation or infection. Functions employed by neutrophils include degranulation, reactive oxygen species (ROS) formation, phagocytosis, and neutrophil extracellular trap (NET) formation. There is little evidence of neutrophil functions in obesity and it is not known whether blood neutrophil functions are altered in patients with obesity. It is hypothesized that blood neutrophils from patients with grade III obesity have higher ROS formation, phagocytosis and NET formation than blood neutrophils from normal weight individuals. Therefore, the objective of this research was to evaluate and compare the functions of blood neutrophils from patients with grade III obesity and normal weight individuals.

Blood collection and subsequent purification of blood neutrophils was performed. ROS formation was evaluated using the dihydroethidium (DHE) technique. To evaluate phagocytosis, neutrophils were incubated with opsonized and non-opsonized beads with immunoglobulin G (IgG), after which the phagocytic index was obtained. NET formation was assessed by incubating neutrophils with phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA).

It was concluded that there are no differences in ROS formation in blood neutrophils from neutrophils of normal weight individuals and patients with grade III obesity. On the other hand, blood neutrophils from patients with grade III obesity have a higher phagocytic capacity than blood neutrophils from normal weight individuals. Finally, blood neutrophils from a patient with obesity can produce NET.

I. INTRODUCCIÓN

1. Definición de obesidad

La obesidad se define como una acumulación anormal o excesiva de grasa en el cuerpo, asociada principalmente a un desequilibrio entre la ingesta y el gasto calórico. (CENETEC, 2018; Gregor & Hotamisligil, 2011; OMS, 2020; Russo & Lumeng, 2018)

Los factores que subyacen a la etiología de la obesidad son múltiples, entre ellos destacan la fisiología del individuo, la genética y la epigenética, la psicología individual, la actividad física, el consumo de alimentos y los entornos ambiental, sociocultural y económico. (Blüher, 2019; Gadde et al., 2018)

La obesidad puede clasificarse con base en el Índice de Masa Corporal (IMC) (Tabla 1). El IMC es un indicador simple de la relación entre el peso y la talla del individuo. Se calcula dividiendo el peso de una persona en kilogramos entre el cuadrado de su talla en metros (kg/m^2). (CENETEC, 2018; Gadde et al., 2018; Goossens, 2017; OMS, 2020)

Tabla 1. Clasificación del peso y obesidad con base en el IMC.

IMC (kg/m^2)	Clasificación
< 18.5	Bajo peso
18.5 – 24.9	Peso normal
25.0 – 29.9	Sobrepeso
30 – 34.9	Obesidad grado I
35 – 39.9	Obesidad grado II
> 40	Obesidad grado III

IMC: Índice de Masa Corporal

2. Epidemiología

La obesidad representa un problema de salud pública a nivel mundial debido a su creciente prevalencia. Según la Organización Mundial de la Salud, la obesidad se ha triplicado en todo el mundo desde 1975, llegando a ser una pandemia. (Blüher, 2019; Chung et al., 2018; Cottam et al., 2004; Cottam et al., 2002; Gadde et al., 2018; Gregor & Hotamisligil, 2011; Minervino et al., 2015; OMS, 2020; Pirzgalaska & Domingos, 2018; Seijkens et al., 2014)

En 2016, más de 1900 millones de adultos mayores de 18 años tenían sobrepeso, de los cuales, más de 650 millones eran obesos. En otras palabras, el 39% de los adultos mayores de 18 años (39% de los hombres y 40% de las mujeres) tenían sobrepeso, mientras que el 13% de la población adulta mundial (11% de hombres y 15% de mujeres) eran obesos. (OMS, 2020)

Con base en la Encuesta Nacional de Salud (ENSANUT) del 2018, en México, el 74.9% de los adultos mayores de 20 años tenían sobrepeso (39.55%) u obesidad (35.35%). La obesidad fue mayor en mujeres (40.2%) que en hombres (30.5%). (Shamah-Levy T. et al., 2020)

La prevalencia de obesidad grado III, o también llamada obesidad mórbida ($IMC \geq 40,0$ kg/m^2), fue del 2.9% en adultos mayores de 20 años. Las mujeres (4.1%) tuvieron una mayor prevalencia de obesidad mórbida que los hombres (1.4%), siendo 2.4 veces más alta en mujeres que en hombres. (Salud., 2016)

En el 2020, el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) reportó que el 77.5% de sus derechohabientes de 20 años en adelante presentaron sobrepeso (61.3%) u obesidad (38.7%). con base en lo anterior, 4 de cada 10 derechohabientes padecen esta enfermedad. (IMSS, 2020)

3. Comorbilidades asociadas a la obesidad y calidad de vida

La obesidad incrementa el riesgo de desarrollar distintas comorbilidades. La comorbilidad, se define como la interacción de dos o más condiciones médicas o enfermedades presentes en el mismo individuo que ocurren al mismo tiempo y que pueden agravar la evolución de las enfermedades. (Valderas et al., 2009)

Entre las comorbilidades asociadas a la obesidad se encuentran:

1. La resistencia a la insulina, la hiperinsulinemia y la diabetes

La resistencia a la insulina, es decir, la disminución de la utilización de glucosa estimulada por la insulina, aumenta de manera proporcional con la masa grasa. Una de las consecuencias de esta resistencia a la insulina es el requerimiento de secreción aumentada de insulina (hiperinsulinemia). La hiperinsulinemia promueve a su vez, la sobreactivación de las células β pancreáticas productoras de insulina e incrementa la susceptibilidad a su insuficiencia, dando por resultado, la diabetes mellitus tipo 2. (Gardner G. David & Shoback., 2018)

2. La dislipidemia

La obesidad se relaciona con la dislipidemia. La dislipidemia se caracteriza por un aumento en la concentración de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), de los triglicéridos, del colesterol total y de las partículas de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y por una disminución en la concentración de las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Todos estos componentes son aterogénicos y participan en la generación de la aterosclerosis y de la enfermedad cardiovascular. (Gardner G. David & Shoback., 2018)

3. Las enfermedades cardiovasculares

La obesidad es uno de los principales factores de riesgo para desarrollar hipertensión, fenómenos tromboembólicos, insuficiencia cardíaca, cardiopatía coronaria, arteriopatía periférica y fibrilación auricular. La hemodinámica alterada por la obesidad ocasiona un incremento del volumen sanguíneo total, de la presión arterial

sistémica y del gasto cardiaco, mismos que promueven un aumento en el esfuerzo del corazón para realizar su trabajo. Los pacientes con obesidad presentan una dilatación e hipertrofia ventriculares izquierdas y agrandamiento auricular izquierdo. Estas anormalidades estructurales incrementan el riesgo de insuficiencia cardiaca y de fibrilación auricular. (Gardner G. David & Shoback., 2018)

4. Las complicaciones pulmonares

La obesidad puede ocasionar un fenómeno restrictivo al limitar la correcta expansión de los pulmones, derivando en una hipoventilación alveolar y como consecuencia, aumento del volumen sanguíneo pulmonar. La obesidad también se relaciona con el síndrome de apnea obstructiva del sueño, provocando un mayor riesgo de hipertensión sistémica y pulmonar, insuficiencia cardiaca, arritmias, infarto del miocardio y mortalidad. (Gardner G. David & Shoback., 2018)

5. Las enfermedades gastrointestinales

La enfermedad de hígado graso no alcohólica se relaciona con la resistencia a la insulina y la obesidad. En esta enfermedad se acumula grasa dentro del hígado acompañada de un reclutamiento de células inflamatorias y de fibrosis. Esta enfermedad provoca a su vez, esteatosis, fibrosis avanzada y cirrosis. Otras complicaciones de la obesidad son la enfermedad por reflujo gastroesofágico y la hernia hiatal. Estas dos afecciones pueden causar cambios erosivos de la mucosa en la parte baja del estómago. (Gardner G. David & Shoback., 2018)

La obesidad también se asocia con un aumento en la secreción biliar de colesterol, con la sobresaturación de la bilis y con una mayor incidencia de cálculos biliares (colelitiasis). (Kasper DL et al., 2017)

6. La enfermedad ósea y cutánea

La obesidad se asocia con un mayor riesgo de osteoartrosis como parte del traumatismo por una mayor carga de peso, sobre todo en las rodillas y la zona lumbar de la columna vertebral. Uno de los problemas cutáneos asociados con la obesidad es la acantosis nigricans. La acantosis se manifiesta por el oscurecimiento y el engrosamiento de los pliegues cutáneos del cuello, de los codos y de los espacios interfalángicos dorsales. La acantosis refleja la gravedad de la resistencia a la insulina subyacente. Por otro lado, debido a la inmovilidad ocasionada por el exceso de grasa, sobre todo en los pliegues cutáneos, se favorece el aumento de la humedad de la piel. El continuo roce de la piel genera maceración e intensifica el riesgo de presentar infecciones causadas por las bacterias, los hongos y las levaduras. (Kasper DL et al., 2017)

7. El síndrome metabólico

El síndrome metabólico es un conjunto de alteraciones metabólicas que confieren un mayor riesgo de presentar enfermedad cardiovascular y diabetes mellitus. Las principales características del síndrome metabólico incluyen obesidad central, hipertrigliceridemia, concentraciones bajas de HDL, hiperglucemia e hipertensión. (Kasper DL et al., 2017)

8. El cáncer

La obesidad se asocia con un mayor riesgo de varios tipos de cáncer. Además, puede conducir a resultados terapéuticos más deficientes y con mayor mortalidad. En hombres, la obesidad se asocia con una mayor mortalidad por cáncer de esófago, colon, recto, páncreas, hígado y próstata. En las mujeres, la obesidad se asocia con una mayor mortalidad por cáncer vesicular y de vías biliares, de mama, endometrial, cervicouterino y ovárico. (Kasper DL et al., 2017)

Estas comorbilidades asociadas a la obesidad pueden relacionarse posteriormente con una menor esperanza de vida, discapacidad y/o una muerte prematura. La esperanza de vida puede verse reducida de 5 a 20 años. De igual manera, la obesidad puede mermar la calidad de vida, promover desventajas sociales, afectar la productividad y el desempleo del individuo que la presenta. (Blüher, 2019; Chung et al., 2018; Cottam et al., 2004; Dam et al., 2016; Dixon & O'Brien, 2006; Engin, 2017; Gadde et al., 2018; Goossens, 2017; Gregor & Hotamisligil, 2011; Kanneganti & Dixit, 2012; Pirzgalska & Domingos, 2018; Russo & Lumeng, 2018; Ryder et al., 2014; Seijkens et al., 2014)

4. Adipocitos

Los adipocitos son las principales células del tejido adiposo. La función de los adipocitos es regular la homeostasis del metabolismo de lípidos de todo el cuerpo. (Ali et al., 2013; Kanneganti & Dixit, 2012)

La adipogénesis es el proceso mediante el cual las células troncales mesenquimales multipotenciales similares a los fibroblastos restringen su destino al linaje adipogénico, diferenciándose en adipocitos maduros, llenos de triglicéridos. Las células similares a fibroblastos se comprometen al linaje de adipocitos sin ningún tipo de cambios morfológicos, formando un preadipocito (adipocito comprometido). (Figura 1). Después, los preadipocitos, que aún son morfológicamente similares a fibroblastos, se someten a la detención o arresto de su crecimiento, acumulando lípidos en su interior (preadipocitos diferenciados). Finalmente, los preadipocitos maduran en adipocitos funcionales, que responden a la insulina (Figura 1). (Ali et al., 2013; Ghaben & Scherer, 2019)

El adipocito maduro se caracteriza por contener una gran gota lipídica que representa un poco más del 90% de su volumen celular, de tal forma que el citoplasma se compacta en una capa delgada alrededor de esta gota lipídica, mientras que su núcleo y sus organelos se desplazan hacia el borde exterior de la célula (Figura 1). (Ali et al., 2013; Maurizi et al., 2018)

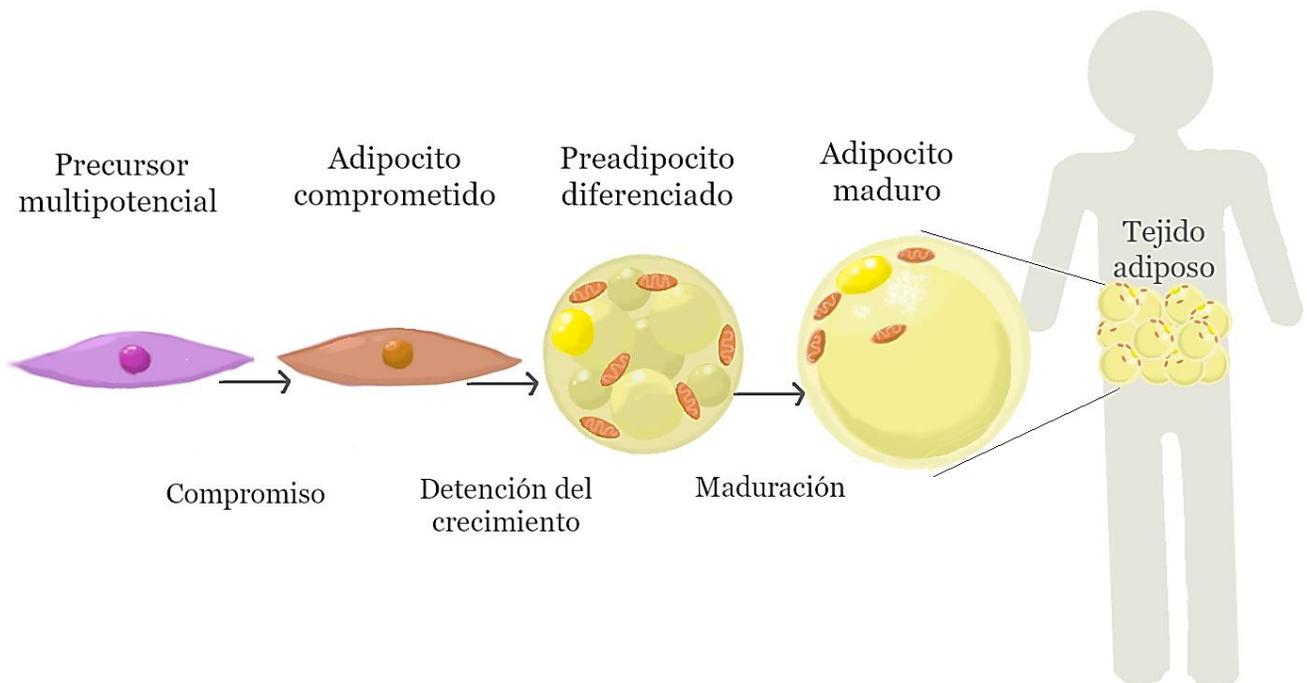


Figura 1. Adipogénesis. Etapas de diferenciación de un adipocito, desde su precursor multipotencial hasta un adipocito maduro. Los adipocitos maduros conforman al tejido adiposo. (Ali et al., 2013; Ghaben & Scherer, 2019)

Los adipocitos controlan el equilibrio energético almacenando triacilglicerol en períodos de exceso de energía y oxidándolo durante la privación o alta demanda de energía, como el ayuno y el ejercicio. (Ali et al., 2013; Kanneganti & Dixit, 2012; Maurizi et al., 2018)

Los adipocitos expresan un perfil biológico complejo y altamente adaptativo. Ante diversos estímulos ambientales, los adipocitos son capaces de activar diferentes vías metabólicas para diferenciarse y desdiferenciarse, convirtiéndose así en diferentes fenotipos según las necesidades metabólicas. (Maurizi et al., 2018)

5. Tejido adiposo

Los adipocitos se acumulan en grandes cantidades, constituyendo la mayor parte del tejido adiposo. El tejido adiposo es un tejido conectivo que además de adipocitos, está constituido por fibroblastos, células endoteliales, células estromales vasculares y células del sistema inmunológico. (Chung et al., 2018; Kanneganti & Dixit, 2012; Maurizi et al., 2018) El tejido adiposo forma una capa aislante debajo de la piel que ayuda a regular la temperatura del cuerpo, además de amortiguar y proteger los distintos órganos y partes del cuerpo. (Ali et al., 2013; Goossens, 2017) Así mismo, el tejido adiposo normal constituye un órgano metabólico y endócrino capaz de secretar diversas moléculas como citocinas, quimiocinas y adipocinas. Entre estas moléculas se encuentran la leptina, la adiponectina, el angiotensinógeno, las prostaglandinas, la resistina, el factor de necrosis tumoral α (TNF α), la interleucina (IL) 6, la IL-8, la IL-10, la IL-1a, la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), la proteína inflamatoria de macrófagos-1 β (MIP-1 β), el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), la fosfatasa alcalina y la adiponectina. (Ali et al., 2013; Chung et al., 2018; Dam et al., 2016; Kanneganti & Dixit, 2012; Maurizi et al., 2018)

La secreción de las moléculas antes mencionadas está determinada por el tamaño o volumen de los adipocitos. Siendo así, que la liberación de citocinas proinflamatorias es mayor en los adipocitos de gran tamaño que en los adipocitos de menor tamaño. La pérdida de peso resulta en una reducción en la secreción de citocinas proinflamatorias y como consecuencia, en una disminución de las comorbilidades asociadas. (Ali et al., 2013; Cottam et al., 2004)

Las moléculas liberadas por el tejido adiposo juegan un papel importante en el metabolismo de otros tejidos, la regulación del apetito, la homeostasis energética, la sensibilidad a la insulina y las respuestas inmunológicas ante enfermedades. (Ali et al., 2013)

5.1 Células del sistema inmunológico en el tejido adiposo

Las células del sistema inmunológico residentes en el tejido adiposo desempeñan funciones importantes para el mantenimiento y homeostasis del tejido ya que participan en la eliminación de desechos moleculares y de células apoptóticas. (Chung et al., 2018; Kanneganti & Dixit, 2012; Maurizi et al., 2018; Seijkens et al., 2014)

En el tejido adiposo normal, las células del sistema inmunológico, incluidos los eosinófilos, los macrófagos y los linfocitos T reguladores (Treg), contribuyen al mantenimiento de la homeostasis metabólica dentro del tejido adiposo. (Figura 2a) Por otro lado, el estado inflamatorio del tejido adiposo en condiciones de obesidad provoca que exista un incremento en el número de células, además de la participación de otras células del sistema inmunológico. (Figura 2b). (Caër et al., 2017; Chung et al., 2018; Kanneganti & Dixit, 2012)

6. Inflamación y obesidad

La obesidad genera un estado inflamatorio del tejido adiposo de tipo crónico de bajo grado. La expansión de la masa de tejido adiposo durante el desarrollo de la obesidad implica una remodelación tisular acompañada de angiogénesis y respuestas proinflamatorias. Sin embargo, los factores iniciales que generan los eventos inflamatorios en la obesidad no están claros. (Cottam et al., 2004; Dam et al., 2016; Elgazar-Carmon et al., 2008; Goossens, 2017; Gregor & Hotamisligil, 2011; Kanneganti & Dixit, 2012; Russo & Lumeng, 2018; Ryder et al., 2014; Seijkens et al., 2014)

Una característica distintiva de la inflamación metabólica presente en la obesidad es que se vuelve crónica. La expresión de citocinas proinflamatorias e infiltración de células del sistema inmunológico parece ocurrir gradualmente, pero la inflamación no se resuelve con el tiempo. (Gregor & Hotamisligil, 2011; Kanneganti & Dixit, 2012)

Se sabe que esta inflamación está regulada por diversas células y mediadores inmunológicos inflamatorios en respuesta al exceso de nutrientes, energía y grasa, provocando alteraciones fibróticas y metabólicas del tejido adiposo. (Caër et al., 2017; Maurizi et al., 2018; Trottier et al., 2012)

Es probable que el continuo exceso calórico provoque estrés oxidativo intracelular, principalmente del retículo endoplásmico, aumentando la expresión de diversos marcadores inflamatorios en diferentes células y tejidos. (Gregor & Hotamisligil, 2011; Maurizi et al., 2018)

Además, la sobrealimentación prolongada provoca una acumulación excesiva de triglicéridos en el citoplasma de los adipocitos, misma que induce hiperplasia e hipertrofia de los adipocitos. Los adipocitos hipertróficos tienen una capacidad para almacenar rápidamente grasa en la dieta. Así, el resultado es una redirección de lípidos hacia otros órganos metabólicos como el hígado o los músculos. Aunque el aumento en el número de adipocitos puede ser bien tolerado por el organismo, el crecimiento de tamaño es dañino pues induce estrés e hipoxia celular, así como cambios moleculares. Los adipocitos hipertróficos producen una cantidad anormal de citocinas, quimiocinas y adipocinas, estimulando la generación de nuevos vasos sanguíneos o angiogénesis y el reclutamiento de diversas células del sistema inmunológico. (Figura 2b) (Goossens, 2017; Kanneganti & Dixit, 2012; Maurizi et al., 2018; Russo & Lumeng, 2018; Seijkens et al., 2014)

En particular estas células son macrófagos proinflamatorios M1, mastocitos, neutrófilos, células asesinas naturales (NK) y linfocitos T y B. (Figura 2b) Durante el desarrollo de la obesidad, estas células experimentan una producción anormal de citocinas y quimiocinas, un aumento de la expresión de varios receptores o ligandos inflamatorios y activación de vías de señalización de tipo inflamatorio. (Gregor & Hotamisligil, 2011; Kanneganti & Dixit, 2012; Maurizi et al., 2018; Pirzgalska & Domingos, 2018; Russo & Lumeng, 2018; Ryder et al., 2014; Seijkens et al., 2014)

A diferencia del tejido adiposo normal, el microambiente del tejido adiposo en condiciones de obesidad provoca un aumento en la concentración de diversos mediadores inmunológicos los cuales son responsables del reclutamiento y activación de las células del sistema inmunológico. Entre estos mediadores se encuentran el angiotensinógeno, la resistina, el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), el TNF α y las IL-1 β , IL-6 e IL-8. Es de destacar que, aunque la expresión de estos mediadores inflamatorios en individuos con obesidad aumenta, su expresión es menor que la que se presenta en casos de infección, trauma o respuesta inmune aguda. (Cottam et al., 2004; Dam et al., 2016; Gregor & Hotamisligil, 2011; Seijkens et al., 2014)

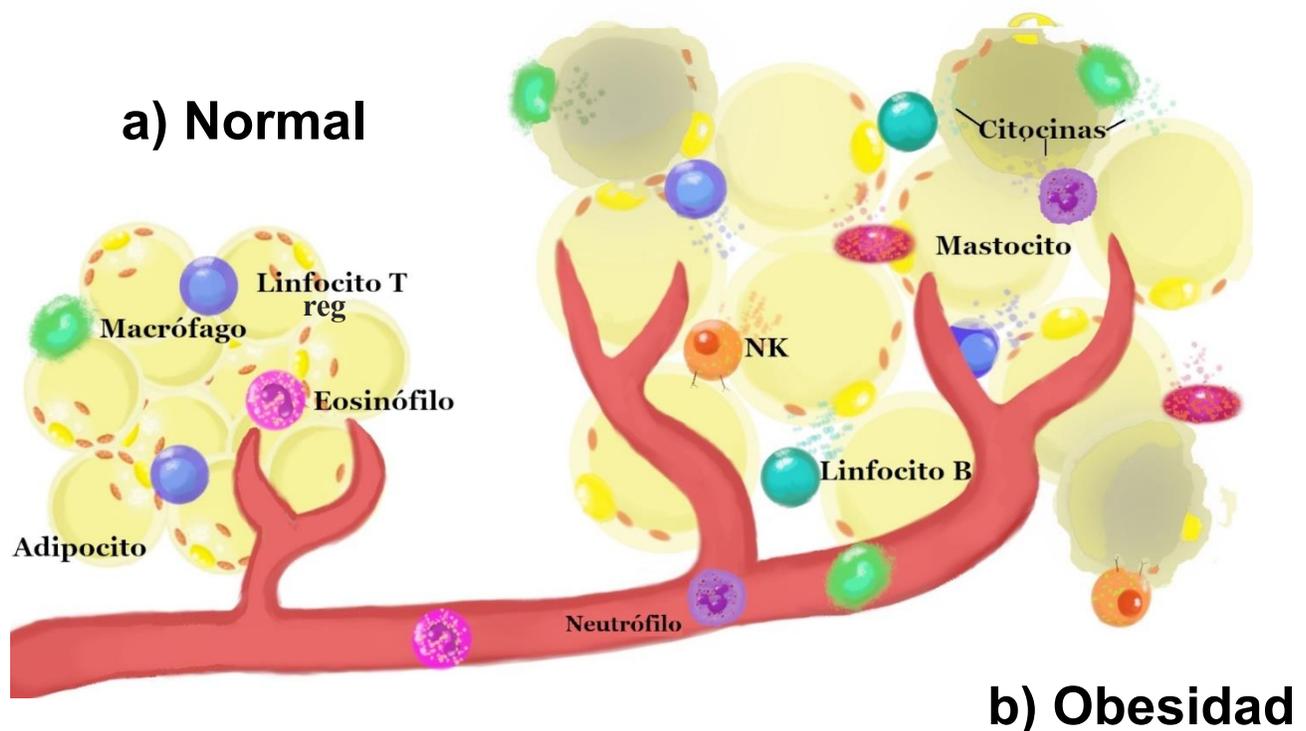


Figura 2. Tejido adiposo normal y en obesidad. a) El tejido adiposo normal está constituido por adipocitos y células como macrófagos, linfocitos T reguladores, eosinófilos, etc. b) En condiciones de obesidad, los adipocitos sufren de hiperplasia e hipertrofia. Estos cambios provocan estrés e hipoxia celular que desencadenan muerte celular y liberación de citocinas. A su vez, se estimula el reclutamiento de neutrófilos, mastocitos, linfocitos B y células asesinas naturales (NK).

7. Neutrófilos

Los neutrófilos son los leucocitos más abundantes en la sangre. Representan aproximadamente el 70% de los mismos. Se producen en la médula ósea en grandes cantidades, aproximadamente 10^{11} células por día. Los neutrófilos pertenecen al sistema inmune innato y son considerados fagocitos profesionales. Los neutrófilos muestran una morfología nuclear condensada y multilobulada, en su citoplasma contiene pocas mitocondrias y una gran cantidad de gránulos y vesículas. Estas características permiten que sean designados como leucocitos polimorfonucleares (PMN). (Figura 3). (Dam et al., 2016; Delgado et al., 2017; Fadini et al., 2016; Futosi et al., 2013; Mantovani et al., 2011; Nguyen et al., 2017; Rosales, 2018; Segal, 2005; Selders et al., 2017; Sollberger et al., 2018; Winterbourn et al., 2016)

Los neutrófilos tienen una vida media corta, de 6 a 12 horas en el torrente sanguíneo. Cuando son estimulados por quimiocinas liberadas por estímulos microbianos o inflamatorios, como el interferón de tipo I y II (IFN-I y II), el factor estimulante de colonia de granulocitos (G-CSF), el TNF, el leucotrieno B₄ o la IL-8, los neutrófilos migran hacia los tejidos a través de un proceso llamado diapédesis, donde tienen una vida útil más prolongada de entre 3 y 7 días. Posteriormente, los neutrófilos son eliminados por los macrófagos en el hígado, el bazo o la médula ósea. (Delgado et al., 2017; Futosi et al., 2013; Kubes, 2018; Mantovani et al., 2011; Rosales, 2018; Selders et al., 2017; Sollberger et al., 2018; Winterbourn et al., 2016)

Los neutrófilos responden a múltiples señales, siendo capaces de producir grandes cantidades de citocinas y quimiocinas, incluidas el TNF- α , la IL-1 β , la IL-8 y la quimiocina (región C-C) ligando 3 (CCL3) también conocida como proteína inflamatoria del macrófago 1 α (MIP1 α). La expresión de estas moléculas induce, a su vez, el reclutamiento temprano de diversas células del sistema inmunológico, como macrófagos, células dendríticas, células NK y linfocitos. (Dam et al., 2016; Mantovani et al., 2011; Maurizi et al., 2018; Rosales, 2018; Selders et al., 2017)

Los neutrófilos participan en la defensa contra patógenos extracelulares y son los principales efectores de la reacción inflamatoria aguda, ya que son las primeras células que se reclutan en el sitio de la inflamación. Los neutrófilos pueden activarse mediante patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), como los N-formil péptidos, o mediante patrones moleculares asociadas a daño (DAMP), como ácido desoxirribonucleico (DNA) o adenosín trifosfato (ATP). Estos PAMP y DAMP son reconocidos por una gran cantidad de receptores de superficie celular presentes en los neutrófilos, tales como los receptores Fc (FcR), los receptores tipo Toll (TLR), los receptores acoplados a proteínas G (GPCR), los receptores para citocinas, las integrinas y las selectinas, entre otros. La actividad de defensa de los neutrófilos se basa en el reconocimiento y eliminación de moléculas o microorganismos a través de distintos mecanismos o funciones. (Delgado et al., 2017; Futosi et al., 2013; Mantovani et al., 2011; Maurizi et al., 2018; Rosales, 2018; Selders et al., 2017; Sollberger et al., 2018)

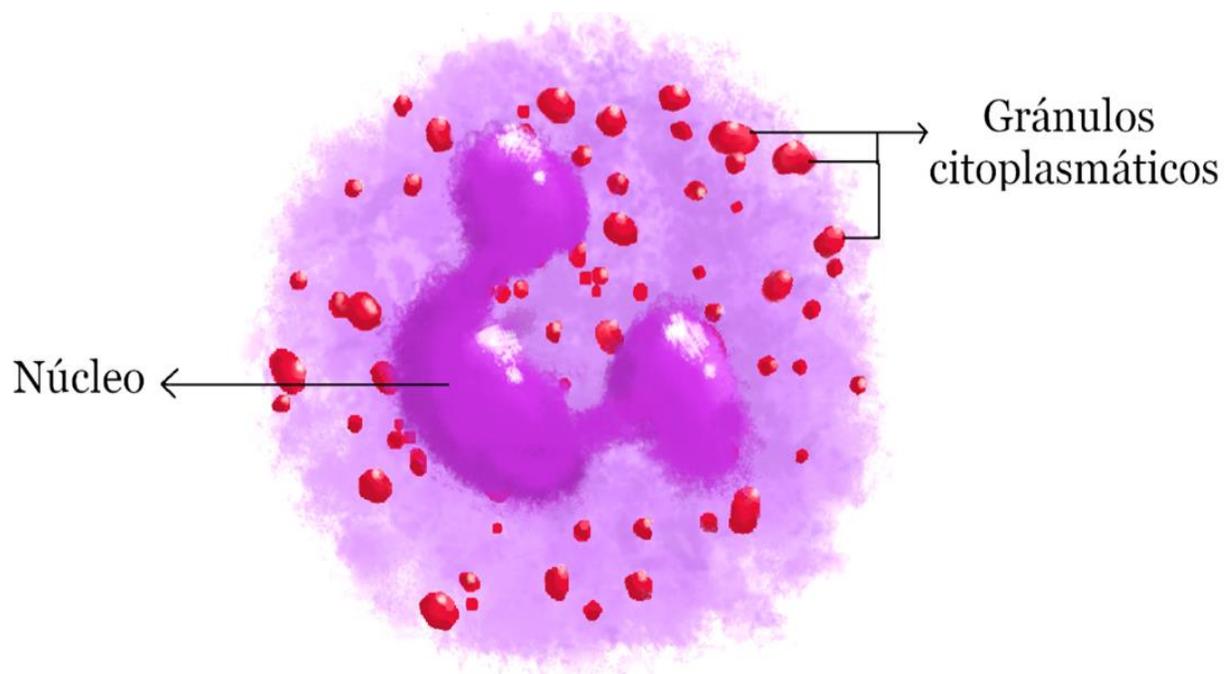


Figura 3. Morfología del neutrófilo. El neutrófilo se caracteriza por tener un núcleo multilobulado y presencia de múltiples gránulos citoplasmáticos.

8. Funciones de los neutrófilos

8.1 Desgranulación

El neutrófilo contiene tres tipos de gránulos en su citoplasma, los gránulos primarios o azurófilos (Figura 4a), los secundarios o específicos (Figura 4b) y los terciarios o de gelatinasa (Figura 4c), además contiene vesículas secretoras (Tabla 2). Durante la maduración de los neutrófilos en la médula ósea, los gránulos primarios son los primeros en producirse. Contienen enzimas como la mieloperoxidasa (MPO), las defensinas, la lisozima, la proteinasa 3, la catepsina G y la elastasa de neutrófilos (NE). Los gránulos secundarios son los siguientes en formarse y contienen proteínas como la lactoferrina (que se une y secuestra el hierro y el cobre), la M-ficolina y la lisozima. Además, contienen proteínas de membrana como el flavocitocromo b558 (cytb 558) de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa o NOX. Después, se forman los gránulos terciarios o de gelatinasa contienen proteínas como la gelatinasa, las metaloproteinasas de matriz 2 y 9 (MMP-2, MMP-9) y la arginasa. Finalmente se forman las vesículas secretoras que contienen albúmina de suero humano, las moléculas de adhesión y receptores como la integrina alfa subunidad M (conocida como CD11b) y el receptor de péptido formilo 1 (FPR1). La reasociación de estas vesículas con la membrana plasmática repone lo que se consume durante la fagocitosis. La desgranulación ocurre cuando los receptores del neutrófilo son estimulados y los gránulos son movilizados a la membrana plasmática para que su contenido sea liberado al interior del fagosoma durante la fagocitosis o al espacio extracelular, respectivamente, permitiendo la eliminación de agentes patógenos y/o la degradación de la matriz extracelular. (Figura 4) (Segal, 2005; Selders et al., 2017; Zeng et al., 2019)

Tabla 2. Tipos de gránulos. Contenido enzimático de los gránulos del neutrófilo.

Gránulos	Contenido
Primarios	MPO, defensinas, lisozima, proteinasa 3, catepsina G y NE.
Secundarios	Lactoferrina, M-ficolina y lisozima.
Terciarios	Gelatinasa, MMP-2, MMP-9 y arginasa.

MPO: mieloperoxidasa; NE: elastasa de neutrófilos; MMP-2: metaloproteínasa de matriz 2; MMP-9: metaloproteínasa de matriz 9.



Figura 4. Desgranulación. El neutrófilo contiene tres tipos de gránulos, los primarios (a), los secundarios (b) y los terciarios (c). Cada uno de estos gránulos contienen diferentes componentes enzimáticos que son liberados al exterior para eliminar a los agentes patógenos.

8.2 Fagocitosis

La fagocitosis es el proceso de detección, procesamiento y eliminación de partículas de más de 0.5 μm de diámetro, incluidos microorganismos, sustancias extrañas y células apoptóticas. (Uribe-Querol & Rosales, 2020)

El proceso de fagocitosis involucra las siguientes fases:

1. Detección de la partícula a ingerir.

La detección de partículas está mediada por receptores presentes en la membrana plasmática de la célula fagocítica. Estos receptores se clasifican en receptores no opsónicos y receptores opsónicos.

Los receptores no opsónicos son principalmente receptores de reconocimiento de patrones (PRR), quienes reconocen PAMP.

Los receptores opsónicos, tal como su nombre lo indica, reconocen opsoninas, las cuales son proteínas derivadas del huésped. Entre estos receptores se encuentran los receptores Fc-gamma ($\text{Fc}\gamma\text{R}$), que se unen específicamente al fragmento cristizable (Fc) de las moléculas de inmunoglobulina G (IgG); los receptores del complemento (CR), que se unen a moléculas de complemento activadas y depositadas en microorganismos o células (Figura 5a).

2. Internalización de la partícula y formación del fagosoma.

Cuando los receptores fagocíticos reconocen una partícula se activan distintas vías de señalización para iniciar la fagocitosis. Produciendo así, una reorganización del citoesqueleto de actina y cambios en la membrana, que resulta en la formación de una copa fagocítica. La copa es una depresión del área de la membrana que toca a la partícula. Posteriormente, se forman pseudópodos alrededor de la partícula hasta que la membrana cubre completamente la partícula. Los pseudópodos se fusionan en su extremo distal formando una vesícula, la cual se desprende de la membrana plasmática hacia el interior de la célula. Esta nueva vesícula que contiene a la partícula es el fagosoma (Figura 5b).

3. Maduración del fagosoma y eliminación de la partícula.

Una vez internalizado, el fagosoma madura, es decir que cambia su composición membranal y su contenido mediante eventos sucesivos de fusión y fisión de vesículas. Estos cambios permiten que el fagosoma madure y se transforme en una nueva vesícula, el fagolisosoma, capaz de degradar a la partícula ingerida.

La maduración del fagosoma a fagolisosoma consiste en tres etapas:

1. Fagosoma temprano:

El fagosoma recién formado se combina con endosomas tempranos. Esta combinación se da por eventos de fusión de membranas. Aún cuando el fagosoma se combina con varios endosomas, el fagosoma no incrementa su tamaño debido a que también de él se eliminan vesículas, llamadas vesículas de reciclaje. (Figura 5c)

2. Fagosoma tardío:

El fagosoma temprano se combina con endosomas tardíos, permitiendo la incorporación de proteasas como catepsinas e hidrolasas. En su membrana se acumulan moléculas de ATPasa de tipo vacuolar (V-ATPasa), la cual es responsable de la acidificación del interior del fagosoma. El interior tiene un pH aproximado de 5.5 - 6.0. (Figura 5d)

3. Fagolisosoma:

El fagosoma tardío se fusiona con los lisosomas formando el fagolisosoma. Los lisosomas son organelos celulares con la capacidad de degradar microorganismos. Esta capacidad está dada por que su interior es muy ácido, con un pH aproximado de 5.5. Los lisosomas contienen enzimas hidrolíticas como catepsinas, proteasas, lisozimas y lipasas. Además, la membrana del recién fagolisosoma presenta el complejo NADPH oxidasa, responsable de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). (Figura 5e) (Uribe-Querol & Rosales, 2020; Winterbourn et al., 2016)

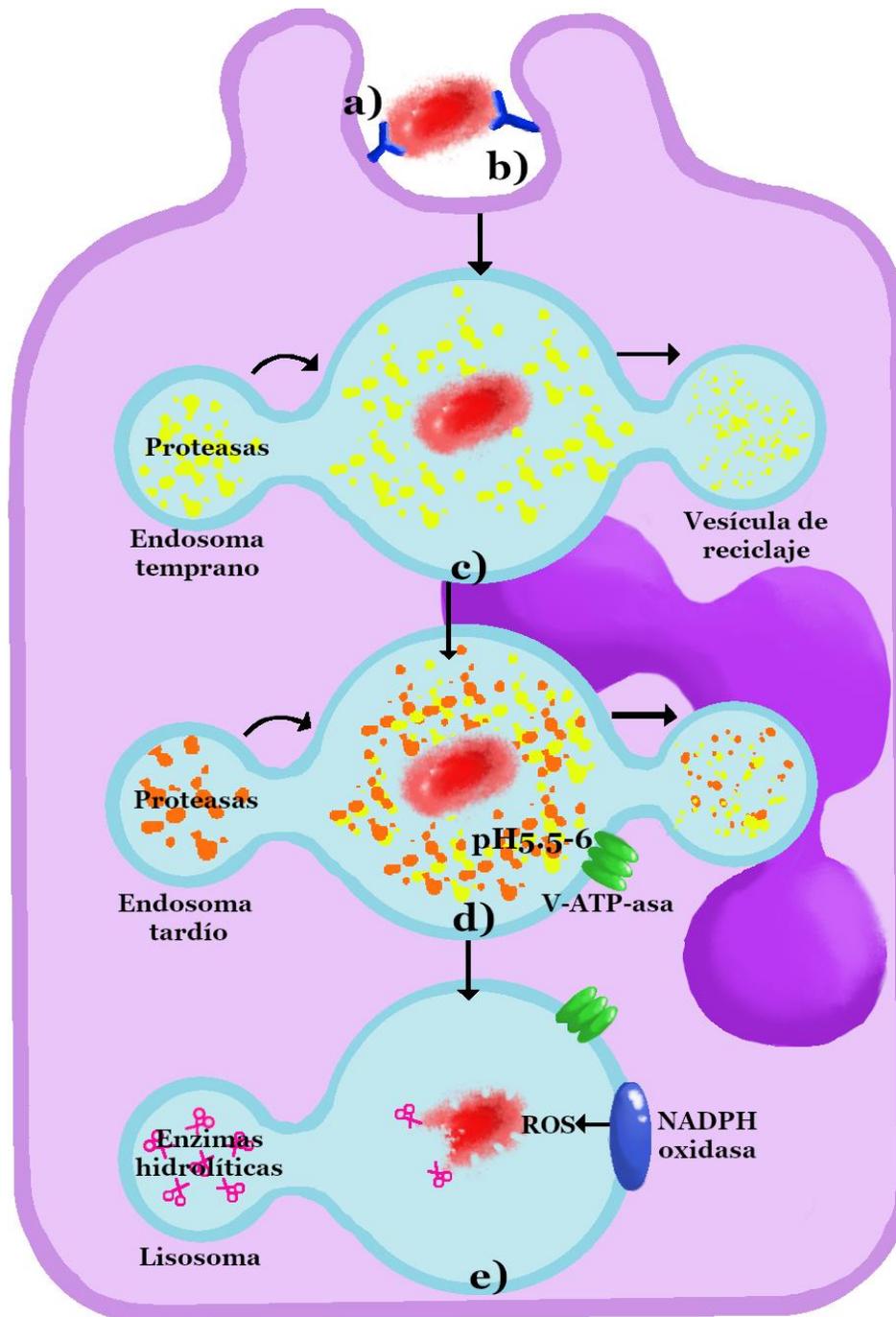


Figura 5. Fagocitosis. El mecanismo de fagocitosis consta de distintas etapas: a) Detección de la partícula a ingerir. b) Internalización a través de la formación de la copa fagocítica y pseudópodos para la posterior formación del fagosoma. Maduración del fagosoma y eliminación de la partícula: c) Formación del fagosoma temprano, d) formación del fagosoma tardío, e) formación del fagolisosoma. *V-ATPasa*: ATPasa de tipo vacuolar; *ROS*: Especies reactivas de oxígeno; *NADPH*: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato.

8.3 Formación de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

La formación de ROS o también llamado estallido respiratorio, es un mecanismo antimicrobiano y un componente principal de la defensa inmune innata contra infecciones bacterianas y fúngicas. En este mecanismo se consumen grandes cantidades de oxígeno y se metabolizan en radicales superóxido. Los neutrófilos son los productores más intensos de este radical. Por otra parte, la formación de ROS tiene participación en distintas vías de señalización que modulan distintas respuestas celulares como la desgranulación, la apoptosis, la fagocitosis y la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET). (Nguyen et al., 2017; Winterbourn et al., 2016; Zeng et al., 2019)

Los neutrófilos producen ROS a través de la NADPH oxidasa. Los componentes de NADPH oxidasa están latentes en las células en reposo y se activan en respuesta a mediadores proinflamatorios, microorganismos, fagocitosis y/o la activación de PRR. Esta activación se presenta cuando los neutrófilos fagocitan, por lo tanto, la localización de este complejo se encuentra mayormente en la membrana del fagosoma. (Nguyen et al., 2017; Winterbourn et al., 2016; Zeng et al., 2019)

La NADPH oxidasa está formada por el complejo de fagocitos oxidasa (phox), que incluye cinco subunidades: p40^{phox} (Figura 6a), p47^{phox} (Figura 6b), p67^{phox} (Figura 6c), p22^{phox} (Figura 6d) y gp91^{phox} (Figura 6e). En su estado de reposo, gp91^{phox} y p22^{phox} forman una subunidad heterodimérica, el cytb 558, que constituye el núcleo catalítico de la NADPH oxidasa y reside en las membranas celulares, incluidas las membranas de los fagosomas, vesículas secretoras, gránulos específicos y la membrana plasmática. gp91^{phox} es la transferasa de electrones de la NADPH oxidasa, su dominio citosólico acepta electrones de NADPH y los transfiere a través de la membrana a la molécula de oxígeno (O₂) para generar el anión superóxido (O⁻²). p22^{phox} actúa como un sitio de acoplamiento para el complejo trimérico regulador a través de su interacción con p47^{phox}. El complejo regulador, compuesto por p40^{phox}, p47^{phox} y p67^{phox}, reside como un complejo en el citoplasma de las células inactivas. Tras la activación, el complejo regulador interactúa con cytb558 para promover la transferencia de electrones de NADPH oxidasa a flavin adenina dinucleótido (FAD). Además de estas subunidades de oxidasa, la enzima

guanosina trifosfatasa (GTPasa) pequeña de la familia Rac 2 (Rac2) (Figura 6f) es una subunidad esencial y está secuestrada en el citoplasma como Rac-GDP en células en reposo. (Nguyen et al., 2017; Segal, 2005; Zeng et al., 2019)

Cuando los neutrófilos son estimulados, el ensamblaje de la NADPH oxidasa se inicia mediante dos eventos simultáneos: la activación de Rac2 mediante el intercambio de difosfato de guanosina (GDP) por trifosfato de guanosina (GTP) a Rac-GTP y la fosforilación de p47^{phox} en múltiples sitios de serina. Tras la activación, Rac2 y el complejo p47^{phox}/p4^{phox}/p67^{phox} fosforilado se trasladan simultáneamente a la membrana para interactuar con cytb558, formando el complejo NADPH oxidasa. Una vez formado, el complejo NADPH oxidasa cataliza la oxidación de NADPH a nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP⁺) + H⁺, posteriormente se da la transferencia de electrones del citoplasma a la molécula de O₂, generando finalmente O²⁻. (Nguyen et al., 2017; Winterbourn et al., 2016)

Tras su liberación, el O²⁻, sufre una dismutación espontánea o enzimática a peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Luego, el H₂O₂ puede oxidar el hierro ferroso para generar radical hidroxilo (OH·) altamente reactivo a través de un mecanismo conocido como reacción de Fenton. Este radical es altamente tóxico para las bacterias. Por otro lado, la MPO liberada de los gránulos primarios convierte el H₂O₂ en ácido hipocloroso (HOCl), que es altamente bactericida a pH neutro o bajo, favoreciendo la eliminación de patógenos (Figura 6g). Estos derivados del oxígeno tienen la capacidad de restringir el crecimiento bacteriano, ya que pueden difundirse a través de las membranas de patógenos bacterianos, tanto intracelulares como extracelulares y dañar sus moléculas de DNA, proteínas y lípidos. (Figura 6) (Nguyen et al., 2017; Segal, 2005; Winterbourn et al., 2016; Zeng et al., 2019)

Las ROS se pueden liberar extracelularmente al ambiente en el sitio de la infección o intracelularmente en el fagolisosoma luego de la fagocitosis de partículas o microorganismos. También es de importancia destacar que las ROS pueden aumentar aún más la respuesta antimicrobiana general de los neutrófilos al activar la liberación de gránulos, inducir la formación de NET y estimular la producción de citocinas proinflamatorias como el TNF α y proteína inflamatoria de macrófagos 2 (MIP-2). (Nguyen et al., 2017; Winterbourn et al., 2016)

Una respuesta inmunológica enérgica con frecuencia elimina un patógeno mediante la formación de ROS, pero puede causar daños locales significativos y, en algunos casos, el daño puede ser a largo plazo. El daño extenso puede contribuir a la lesión tisular y enfermedades inflamatorias. (Nguyen et al., 2017)

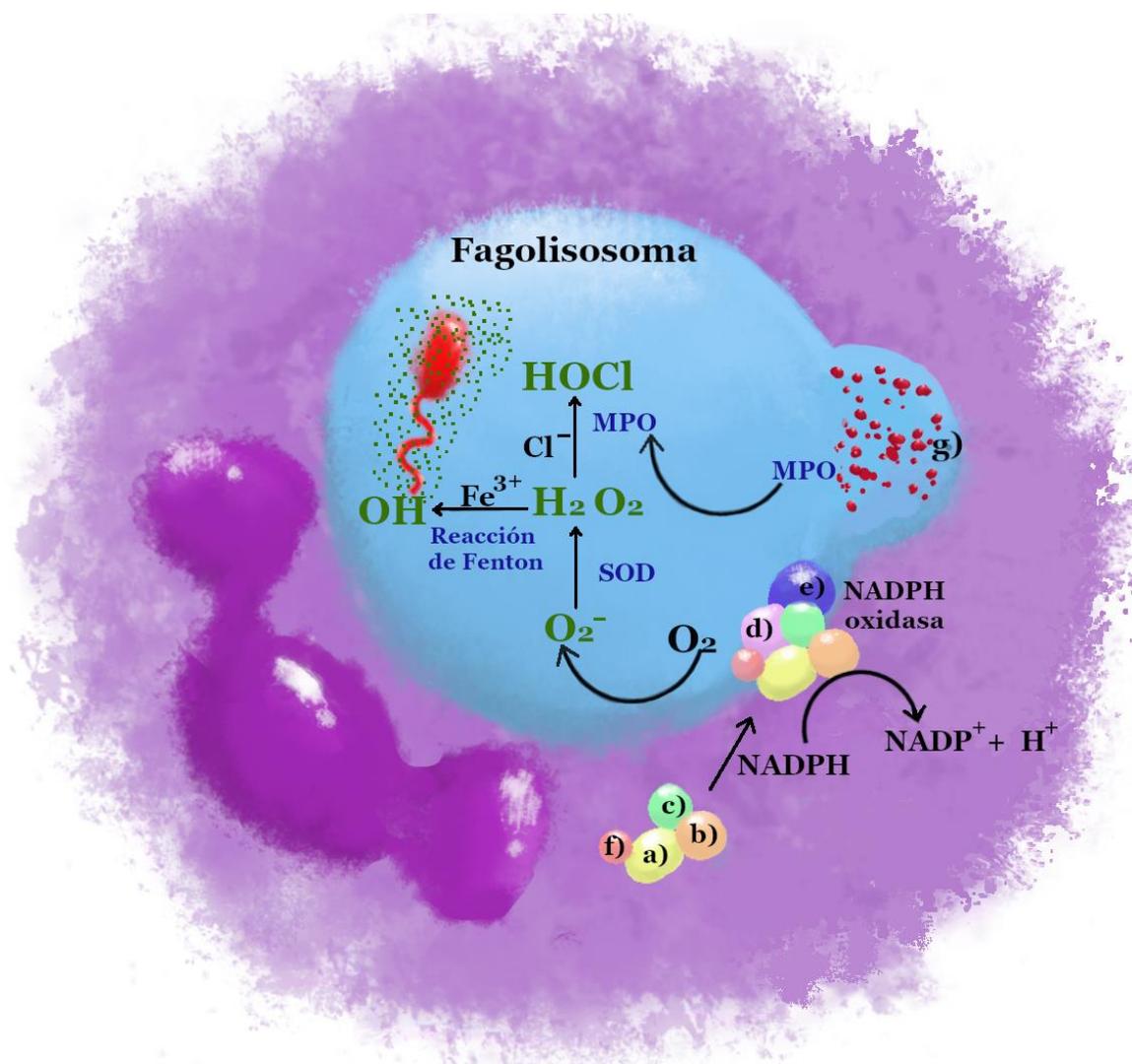


Figura 6. Formación de Especies Reactivas de Oxígeno. La nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa está conformada por las subunidades p40phox (a), p47phox (b), p67phox (c), p22phox (d) y gp91phox (e), además de Rac2 (f). La NADPH oxidasa cataliza la oxidación de NADPH y facilita la transferencia de electrones del citoplasma a la molécula de oxígeno (O_2), generando anión superóxido (O_2^-). El O_2^- sufre dismutación a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) mediante la enzima superóxido dismutasa (SOD). Luego, el H_2O_2 oxida el hierro ferroso (Fe^{3+}) para generar radical hidroxilo ($OH\cdot$) mediante la reacción de Fenton. La mieloperoxidasa (MPO) liberada de los gránulos primarios convierte el H_2O_2 en ácido hipocloroso (HOCl) (g). Estos derivados del oxígeno tienen la capacidad de restringir el crecimiento bacteriano y permitir su eliminación.

7.4 Formación de Trampas Extracelulares de Neutrófilos (NET)

Los neutrófilos pueden llevar a cabo la expulsión de redes fibrilares extracelulares de DNA denominadas NET. Estas redes están compuestas por cromatina (histonas, a menudo citrulinadas, y DNA) y proteínas derivadas de los gránulos primarios, secundarios y terciarios. Entre las enzimas se encuentran la elastasa, la MPO, la catepsina G, la lactoferrina, la pentraxina 3, la gelatinasa y la proteinasa 3, entre otras. Las NET actúan como una red o malla voluminosa y pegajosa que atrapa a los microorganismos y, a su vez, facilita la interacción con las proteínas derivadas de los gránulos para su eliminación. Al proceso por el cual el neutrófilo libera las NET se le denomina NETosis. La NETosis es un tipo de muerte celular distinta de la necrosis, de la apoptosis, de la necroptosis y de la autofagia. (Delgado et al., 2017; Fadini et al., 2016; Mantovani et al., 2011; Sollberger et al., 2018)

Los eventos que tienen lugar durante la NETosis siguen un proceso coordinado de varios pasos, siendo estos: (Figura 7) (Delgado et al., 2017; Fadini et al., 2016; Selders et al., 2017; Sollberger et al., 2018)

1. El neutrófilo reconoce el estímulo, como bacterias, hongos, virus, parásitos, citocinas o químicos, a través de sus receptores membranales. (Figura 7a)
2. La activación de los receptores membranales induce una cascada de señalización que culmina en la activación del complejo de NADPH oxidasa, responsable de la formación de ROS. (Figura 7a)
3. Las ROS permiten la citrulinación de la enzima arginina-deaminasa 4 (PAD4) de las histonas, modificando así los aminoácidos de arginina a citrulina para permitir la descondensación de la cromatina al promover la pérdida de las cargas positivas necesarias para la interacción de las histonas con el DNA. (Figura 7b)
4. La membrana nuclear se rompe y se forman pequeñas vesículas individuales. (Figura 7c)
5. La cromatina se dispersa por todo el citoplasma, donde se mezcla con proteínas citoplasmáticas y enzimas granulares. (Figura 7d)
6. La membrana plasmática se rompe. (Figura 7d)

7. La cromatina descondensada y mezclada con proteínas proteínas granulares es liberada al espacio extracelular. (Figura 7d)

La cromatina posee una actividad antimicrobiana intrínseca. El DNA actúa como un agente quelante de los cationes, capaz de romper las membranas de los microorganismos. Debido a sus cargas negativas, el DNA forma la columna vertebral pegajosa de las NET, a la que se adhieren las histonas y las enzimas. Estos filamentos se organizan en redes que atrapan físicamente a las bacterias, pero también permiten la concentración local de componentes bactericidas. (Delgado et al., 2017; Fadini et al., 2016)

Por otro lado, es probable que una NETosis excesiva represente un mecanismo de daño tisular en varias condiciones patológicas. Por ejemplo, las histonas liberadas, además de ser bactericidas, también pueden matar células eucariotas e inducir toxicidad y trombosis tisular. Así mismo, el DNA expulsado es reconocido por células circulantes como un DAMP, induciendo una activación exagerada de la inmunidad innata. Por lo que el daño del DNA inducido por inflamación y la inflamación inducida por el DNA forman un círculo vicioso. Como resultado, la NETosis y sus componentes asociados pueden inducir inflamación que, si no se resuelve, puede causar daño tisular y vascular. (Fadini et al., 2016; Kubes, 2018; Selders et al., 2017; Sollberger et al., 2018)

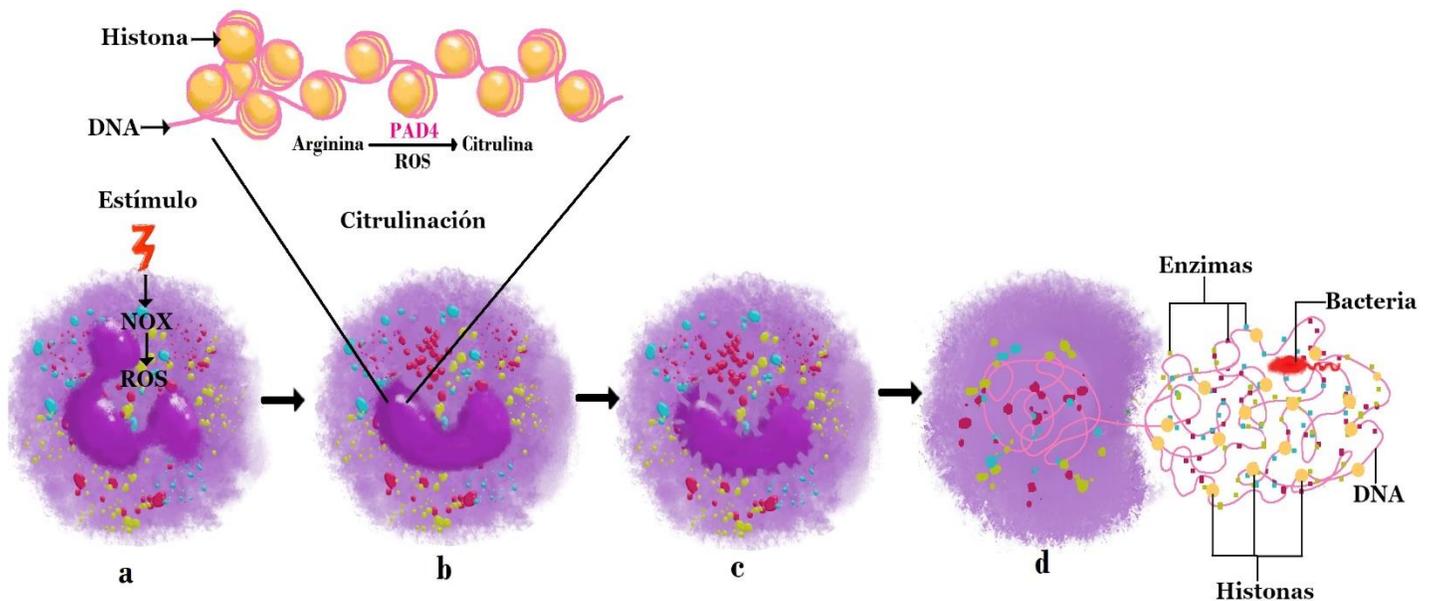


Figura 7. Formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET). a) El neutrófilo reconoce el estímulo, siendo microorganismos, citocinas o químicos, a través de sus receptores membranales. Posteriormente, se induce una cascada de señalización que culmina en la activación de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa o NOX y la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). b) Las ROS formadas permiten la citrulinación de las enzimas arginina-deaminasa 4 (PAD4) de las histonas, modificando los aminoácidos de arginina a citrulina. Esto desencadena la descondensación de la cromatina, histonas y ácido desoxirribonucleico (DNA). c) La membrana nuclear se rompe, formando pequeñas vesículas. d) La cromatina se dispersa por todo el citoplasma, mezclándose con proteínas citoplasmáticas y de los gránulos. La membrana plasmática se rompe, liberando las NET al espacio extracelular, es decir cromatina descondensada mezclada con distintas proteínas.

9. Neutrófilos y enfermedades

Cada vez es más evidente que los neutrófilos, en tejidos en condiciones homeostáticas, son células que cumplen funciones más allá de eliminar microorganismos. Sin embargo, en tejidos con diversas condiciones patológicas, los neutrófilos también presentan distintas propiedades o funciones celulares.

Cáncer

Las células inflamatorias son un componente esencial del microambiente tumoral, participando en la progresión del tumor. Las células tumorales producen diversas citocinas y quimiocinas inflamatorias, como IL-8, que permiten la quimiotaxis de neutrófilos. A estos neutrófilos se les denomina neutrófilos asociados a tumores (TAN). Los TAN pueden promover la inestabilidad genética, posiblemente a través de la producción de ROS; estimular la angiogénesis o a través de la producción de metaloproteinasa de matriz 9 (MMP9) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). (Mantovani et al., 2011)

Diabetes mellitus

La diabetes mellitus se caracteriza por una inflamación crónica que involucra factores humorales y diferentes tipos de glóbulos blancos, incluidos los leucocitos mononucleares y polimorfonucleares. Se sabe que en los individuos diabéticos hay un aumento del recuento de neutrófilos y disfunción de la actividad fagocítica. Se ha observado que el microambiente diabético puede favorecer la NETosis, ya que en condiciones diabéticas (hiperglucemia), los neutrófilos generan estrés oxidativo y producen citocinas como IL-6 y TNF- α , que predisponen a los neutrófilos a producir NET. (Delgado et al., 2017)

En la hiperglucemia, los neutrófilos humanos y de ratón están preparados para sufrir NETosis. Los neutrófilos en circulación responden a las concentraciones altas de glucosa, liberando proteínas S100 que se unen a calcio, las cuales interactúan con receptores que inducen a los macrófagos y a las células progenitoras mieloides en la médula ósea para que secreten G-CSF. En consecuencia, aumenta la producción de neutrófilos. Estos nuevos neutrófilos liberados están preparados para la producción de ROS y la formación de NET. (Rosales, 2018)

Enfermedades cardiovasculares

La NETosis y la disfunción de las células endoteliales pueden interactuar para promover el daño vascular. Además, la contribución de las NET en la estimulación de la trombosis está bien establecida, ya que las NET atrapan y activan las plaquetas y también pueden activar la vía intrínseca de la coagulación, principalmente a través del DNA de doble cadena. Las NET se pueden detectar en placas ateroscleróticas, donde los cristales de colesterol desencadenan la liberación de NET, que a su vez preparan a los macrófagos para la liberación de citocinas, activando las células T cooperadoras 17 (Th17) que amplifican el reclutamiento de las células del sistema inmunológico. (Fadini et al., 2016)

Obesidad

En modelos murinos obesos en condiciones de una dieta alta en grasas, se ha demostrado que hay una mayor diferenciación de los progenitores mieloides en neutrófilos y monocitos en la médula ósea, produciendo cantidades mayores a las normales de neutrófilos y monocitos en la sangre y en el bazo. El contenido de neutrófilos del tejido adiposo incrementa 20 veces. Los neutrófilos invaden el tejido adiposo en tres días, mientras que los macrófagos tardan siete días. Esto sugiere que los neutrófilos son las primeras células del sistema inmunológico que se reclutan en el tejido adiposo. Posteriormente, los neutrófilos secretan citocinas para el reclutamiento de células T y B. (Chung et al., 2018; Dam et al., 2016; Maurizi et al., 2018; Seijkens et al., 2014; Talukdar et al., 2012)

En humanos, al evaluar y comparar el número de neutrófilos sanguíneos entre los pacientes con obesidad (4.5 ± 2.4) y personas delgadas (4.1 ± 0.3), se ha reportado que no existen diferencias. (Brotfain et al., 2015)

Sin embargo, también se ha reportado que el número de neutrófilos es significativamente mayor entre el grupo de individuos con obesidad (5359 ± 1788) en relación con el grupo de individuos delgados (4585 ± 1473). (Karakaya et al., 2019) Incluso, el número de neutrófilos es más alto cuando el IMC incrementa. (Dixon & O'Brien, 2006). Así mismo, la frecuencia de agregados de leucocitos polimorfonucleares y plaquetas (PMNL-PLT) se ven incrementados significativamente en pacientes con obesidad (7.47 ± 2.45 [6.82 –

8.11]% a diferencia de las personas con peso normal (5.85 ± 1.89 [5.14 – 6.55]%). (Minervino et al., 2015) Por otro lado, el número de neutrófilos sanguíneos aumenta en pacientes con obesidad (4.528 ± 268) a diferencia de los individuos delgados (3.662 ± 427), pero esta diferencia no es significativa. (Trottier et al., 2012)

En cuanto al sexo, en hombres la obesidad se asoció con un aumento significativo en el porcentaje de neutrófilos (52.95 ± 9.74) en comparación con los hombres delgados (46.45 ± 11.15). En las mujeres, no hubo diferencias significativas entre los casos de obesidad (54.18 ± 10.30) y los controles delgados (55.92 ± 10.77). De acuerdo con el recuento de células, hubo un aumento significativo en el número total de neutrófilos en sujetos masculinos con obesidad (3.33 ± 1.62) a diferencia de los sujetos delgados (2.39 ± 1.14). En las mujeres obesas (3.48 ± 1.34), no hubo diferencias significativas en el número total de neutrófilos en comparación con las mujeres delgadas (3.18 ± 1.19). (Xu et al., 2015)

Al evaluar el número de neutrófilos infiltrados en vasos sanguíneos de la grasa subcutánea, el número de neutrófilos es significativamente mayor en mujeres obesas (6.5 ± 0.7), que en las mujeres con sobrepeso y en las mujeres con peso normal (2.1 ± 0.7). Así mismo, el número de neutrófilos por vaso sanguíneo correlaciona significativamente con el IMC ($r = 0.48$). (Shah et al., 2010)

En estudios realizados en individuos que se sometieron a cirugía para pérdida de peso, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje relativo de neutrófilos a los 1, 3, 6 y 12 meses (48,6%, 50,77%, 49,5%, 51%, respectivamente). (Cottam et al., 2002)

En contraste, se ha observado una disminución significativa en el número de neutrófilos de individuos con obesidad (4.43 ± 1.40) que se han sometido a la disminución de su peso corporal después de dos años (3.72 ± 1.36). (Dixon & O'Brien, 2006)

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Según la OMS, hoy en día, México, ocupa los primeros lugares de prevalencia mundial en obesidad y sobrepeso (OMS, 2020). La obesidad y el sobrepeso son los factores de riesgo con mayor incidencia en la población infantil, adolescente y adulta, así mismo es alarmante que la obesidad mórbida o grado III se presenta desde jóvenes. Varias enfermedades han sido relacionadas con la obesidad, tales como la diabetes mellitus, las enfermedades cardiovasculares y la resistencia a la insulina. (Shamah-Levy T. et al., 2020) La obesidad es un estado fisiopatológico crónico y complejo causado por la acumulación excesiva del tejido adiposo en el organismo. El tejido adiposo de los pacientes con obesidad promueve un entorno proinflamatorio potencialmente activador de neutrófilos. Existe poca evidencia de las funciones de los neutrófilos en el tejido adiposo. Sin embargo, no se conoce si las funciones de los neutrófilos sanguíneos están alteradas en pacientes con obesidad. En la Clínica de obesidad del IMSS, se atienden diariamente aproximadamente cinco pacientes con obesidad grado II o III. En este trabajo se exploran cambios en la fagocitosis, la formación de ROS y la formación de NET de neutrófilos sanguíneos de pacientes con obesidad grado III.

III. JUSTIFICACIÓN

Debido a que la tasa de obesidad grado III va en aumento a nivel mundial, es relevante conocer la participación del sistema inmunológico en este escenario. El sistema inmunológico innato y adaptativo mantienen la homeostasis corporal. Sin embargo, cuando el peso corporal aumenta por acumulación de grasa este estado de homeostasis se rompe. Hasta el momento se ha demostrado que los neutrófilos promueven un estado inflamatorio en el tejido adiposo. Sin embargo, no se conoce si en pacientes con obesidad los neutrófilos sanguíneos son más susceptibles a ser activados, y por ende modificar sus funciones. El conocer el estado de activación de los neutrófilos sanguíneos nos llevará a entender mejor los cambios que se presentan en pacientes con obesidad grado III.

IV. HIPÓTESIS

- Los neutrófilos sanguíneos de pacientes con obesidad grado III presentan mayor formación de ROS que los neutrófilos sanguíneos de personas con peso normal.
- Los neutrófilos sanguíneos de pacientes con obesidad grado III presentan mayor fagocitosis que los neutrófilos sanguíneos de personas con peso normal.
- Los neutrófilos sanguíneos de pacientes con obesidad grado III presentan mayor formación de NET que los neutrófilos sanguíneos de personas con peso normal.

V. OBJETIVO GENERAL

Comparar las funciones de los neutrófilos sanguíneos de pacientes con obesidad grado III y de personas con peso normal.

VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Comparar la formación de especies reactivas de oxígeno de los neutrófilos sanguíneos en pacientes con obesidad grado III y en personas con peso normal.
- 2) Comparar la actividad fagocítica de los neutrófilos sanguíneos en pacientes con obesidad grado III y en personas con peso normal.
- 3) Comparar la formación de NET de los neutrófilos sanguíneos en pacientes con obesidad grado III y en personas con peso normal.

VII. DISEÑO DEL ESTUDIO

1. Población de estudio:

Pacientes con diagnóstico de obesidad grado III que acudieron a la clínica de Obesidad del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS.

Personas con peso normal que acudieron a la clínica de Obesidad del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS o al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

2. Periodo de estudio:

De agosto de 2019 a marzo de 2020.

3. Descripción del estudio:

Se invitó a participar a los pacientes con obesidad grado III y a personas con peso normal, que acudieron a consulta en la Clínica de Obesidad del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI o al Instituto de Investigaciones de la UNAM, en el periodo de tiempo determinado. Para su inclusión en el estudio, se solicitó a los participantes la firma de una carta de consentimiento informado (Anexo 1). El Doctor Aldo Ferreira Hermsillo, encargado de la Clínica de Obesidad del IMSS, se encargó de diagnosticar a los donadores, de acuerdo con los criterios establecidos (Tabla 3). El protocolo de investigación fue aprobado por el comité de Investigación y el comité de Ética del IMSS.

Tabla 3. Criterios de inclusión, no inclusión y eliminación para los donadores de peso normal y con obesidad.

Criterio	Características
Criterios de inclusión	<p>Para los pacientes con obesidad:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Edad \geq 18 años, de ambo sexos. 2. IMC \geq 40 kg/m², sin importar sus comorbilidades asociadas. 3. Que acepten participar en el estudio y firmen su carta de consentimiento informado. 4. Sin datos clínicos de infecciones agudas o crónicas. 5. Sin leucocitosis o leucopenia en la biometría hemática y con examen general de orina sin datos de infección. <p>Para las personas con peso normal:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Edad \geq 18 años, de ambo sexos. 2. IMC \leq 25 kg/m², sin comorbilidades conocidas.

	<ol style="list-style-type: none"> 3. Que acepten participar en el estudio y firmen su carta de consentimiento informado 4. Sin datos clínicos de infecciones agudas o crónicas. 5. Sin leucocitosis o leucopenia en la biometría hemática y con examen general de orina sin datos de infección.
Criterios de no inclusión	<p>Para ambos grupos:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Participantes con enfermedades autoinmunes inflamatorias (como artritis reumatoide, Lupus eritematoso sistémico), en tratamiento con esteroides o fármacos antioxidantes en los últimos 3 meses. 2. Participantes que hayan tenido procedimientos quirúrgicos en los últimos tres meses. 3. Participantes con tabaquismo activo o consumo de drogas en los últimos 3 meses. 4. Participantes con antecedente de infección por VIH.
Criterios de eliminación	<p>Pacientes con obesidad:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Pacientes con muestra inadecuada para la medición (cantidad insuficiente o suero lisado). 2. Pacientes que retiren su consentimiento para participar. <p>Personas con peso normal:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Muestra inadecuada para la medición. 2. Que derivado de los resultados de laboratorio o toma de variables antropométricas resulten con alguna comorbilidad como glucosa en ayuno alterada, hipertensión o dislipidemia. 3. Que retiren su consentimiento para participar.

IMC: Índice de Masa Corporal; VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

4. Tamaño de la muestra.

Para calcular el tamaño de muestra se utilizó la siguiente fórmula:

$$n = \left(\frac{(Z_{\alpha/2})(\sigma)}{E} \right)^2$$

Donde Z es el valor z obtenido de la tabla de distribución Z, σ es la desviación estándar y E es el margen de error que se desea.

Se consideraron los datos con una significancia de p menor a 0.05 y un margen de error de 2. De esta forma, para los ensayos de formación de ROS, tomando una desviación estándar de 5.3, se obtuvo un tamaño de muestra de 26.

Al calcular el tamaño de muestra para los ensayos de fagocitosis y de formación de NET, se tomó una desviación estándar de 2.5 y se obtuvo un tamaño de muestra de 6 para cada uno de los ensayos. Es decir, se necesita una muestra mínima de 38 participantes. A pesar de que el tamaño de muestra máximo es de 38 participantes, se consideró tener un tamaño de muestra de al menos 50 participantes por grupo.

Debido a las condiciones de la emergencia sanitaria de la pandemia por la enfermedad por coronavirus de 2019 (COVID-19), no se pudieron llevar a cabo obtener los tamaños de muestra planteados.

Para el ensayo de formación de ROS, se obtuvo una muestra de 3 para el grupo de personas con peso normal, mientras que para el grupo de pacientes con obesidad se obtuvo una muestra de 3.

Para el ensayo de fagocitosis, se obtuvo una muestra de 3 para el grupo de personas con peso normal, mientras que para el grupo de pacientes con obesidad se obtuvo una muestra de 2.

Por último, para el ensayo de formación de NET se obtuvo una muestra de 1, siendo parte del grupo de pacientes con obesidad.

VIII. METODOLOGÍA.

1. Purificación de neutrófilos sanguíneos

Los neutrófilos se obtuvieron, tal como se describió previamente (García-García et al., 2013), a partir de una muestra de 10 mL de sangre periférica fresca de los donadores, mediante punción de la vena antecubital. La sangre se colectó en un tubo de centrifuga estéril de 15 mL con 0.25 ml de heparina (1000 UI/mL) y 2 mL de dextrán T500 al 6%. El dextrán favorece la aglutinación de los eritrocitos que se sedimentan formando dos fases. La fase plasmática contiene los leucocitos. El tubo se mezcló con cuidado para evitar que se formen burbujas y se dejó sedimentar por 40 minutos a temperatura ambiente. Una vez que se separó el plasma de los eritrocitos, se tomó el plasma y se transfirió en las paredes de un tubo de 15 mL que contenía 5 mL de Ficoll-Plaque®, un medio en gradiente de densidad. El Ficoll-Plaque® se adicionó cuidadosamente sobre el plasma, sin mezclarlos. Posteriormente, se centrifugó a 516 rpm, por 20 minutos, a 4 °C. Los neutrófilos se localizaron en el fondo del tubo como un botón celular. Para eliminar a los eritrocitos restantes, se agregó 10 mL de solución hipotónica durante 1 minuto, posteriormente se agregó 10 mL de solución hipertónica. Los neutrófilos obtenidos se conservaron en amortiguador de fosfato salino (PBS) a pH 7.4 hasta su uso. El número de células obtenidas se determinó por conteo en la cámara de Neubauer.

2. Ensayo de formación de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Para la detección de ROS se utilizó la técnica de dihidroetidio (DHE) usada previamente (catalog no. 12013, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) (Fonseca et al., 2018). Brevemente, se resuspendieron 1×10^6 neutrófilos y DHE 15 μ M en PBS, se incubaron durante 30 minutos a 37 °C en oscuridad. Posteriormente, los neutrófilos se centrifugaron a 1.375g durante 1 minuto en microcentrífuga y se lavaron con PBS. A continuación, 1×10^6 PMN se agregaron a cada pozo de una placa de cultivo de 48 pozos (Costar R 3548; Corning Inc., Corning, NY). La placa se incubó durante 20 minutos a 37 °C en la oscuridad, y luego se adicionó forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) 20 nM a cada pozo (catalog no. P8139, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). La placa se incubó durante 60 minutos a 37 °C en una incubadora con CO₂ al 5%. Por último, se añadió paraformaldehído (PFA)

al 2% a cada pozo. Después de 30 minutos, las placas se observaron con un microscopio invertido de fluorescencia modelo IX-70 de Olympus y se tomaron fotografías.

3. Ensayo de fagocitosis

Se resuspendieron 2×10^5 PMN en 100 μ L de amortiguador de fagocitosis en un tubo eppendorf para cada condición. Posteriormente, a los tubos se agregaron 2.5 μ l de perlas opsonizadas con IgG o bien 2.5 μ l de perlas no opsonizadas, como control.

Los tubos se mezclaron por inversión y se incubaron a 37°C (en baño maría) por 30 minutos. Después, los tubos se llevaron a 4°C por 3 minutos (baño de agua fría). Los tubos se centrifugaron a 6,000 rpm durante 1 minuto y se eliminó el sobrenadante. La pastilla celular de cada tubo se disgregó y se resuspendió en 100 μ L de tripsina fría. Los tubos se incubaron a 4°C (en agua fría) por 15 minutos y se agregaron 500 μ L de PBS. Nuevamente se centrifugó a 6,000 rpm durante 1 minuto y se eliminó el sobrenadante. La pastilla celular se disgregó y se resuspendió en 100 μ L de PBS. En una placa de 48 pozos, se colocaron los 100 μ L de la suspensión celular por condición y se fijó con 100 μ L de PFA al 2% durante 30 min. Las células se observaron al microscopio y se tomaron fotografías para obtener el índice fagocítico. El índice fagocítico se calculó contando el número de perlas opsonizadas con IgG o sin opsonizar ingeridas por cada 100 neutrófilos. (Rosales & Brown, 1991)

4. Ensayo de formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET)

Se resuspendieron 1×10^6 PMN en 500 μ L de medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) y se añadieron a cada pozo de una placa de cultivo de 24 pozos. Los neutrófilos se incubaron durante 30 min a 37 °C y 5% de CO₂. Posteriormente, a cada pozo se añadieron 100 μ L de PMA 120 nM en PBS, o bien 100 μ L de PBS como control. Las placas se incubaron durante 4 h a 37 °C y 5% de CO₂.

A continuación, a cada pozo se añadieron suavemente 600 μ L de PFA al 2% en PBS, y las placas se guardaron a 4°C. El PFA se eliminó por aspiración muy suave al lado del pozo, y se añadió 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 150 nM en PBS durante 30 minutos

a temperatura ambiente. Las placas se observaron con microscopio de fluorescencia y se tomaron fotografías. (Alemán et al., 2016; Fonseca et al., 2018)

IX. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos serán expresados como la media \pm error estándar de la media (SEM). La homogeneidad de la varianza será comprobada mediante la prueba de Levene.

Las comparaciones entre los grupos, personas con peso normal y pacientes con obesidad grado III, se realizarán usando una prueba de ANOVA con una prueba posthoc de Tukey.

Los análisis se realizarán utilizando el programa de computadora KaleidaGraph versión 4.5.2 para Mac y se considerarán diferencias como significativas cuando el valor p sea menor a 0.05.

Debido al número de ensayos que se pudieron realizar, no se pudo realizar un análisis estadístico.

X. RESULTADOS

1. Purificación de neutrófilos sanguíneos de personas con peso normal y de pacientes con obesidad grado III.

Una vez obtenidos, tanto los neutrófilos sanguíneos de personas con peso normal como de pacientes con obesidad, su morfología fue observada al microscopio. Las células purificadas muestran una morfología circular y presencia de núcleos multilobulados, características de los neutrófilos. (Figura 8).

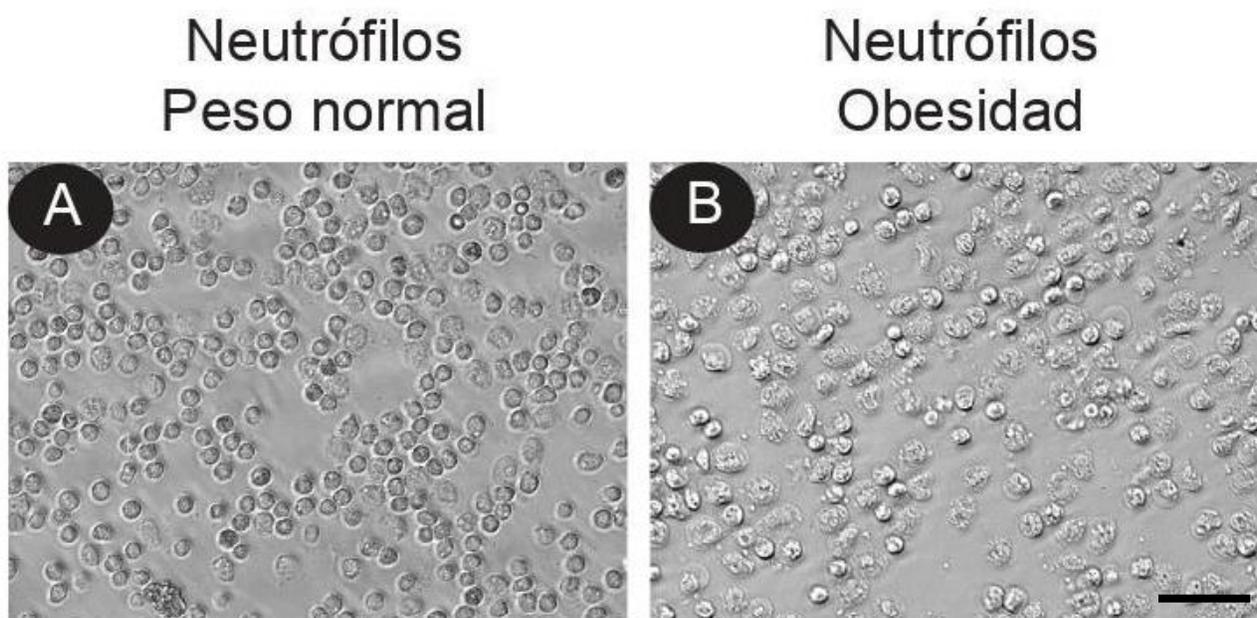


Figura 8. Neutrófilos sanguíneos purificados de sangre de personas con peso normal (A) y pacientes con obesidad grado III (B) para realizar los ensayos de formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), fagocitosis y formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET).

2. No existen diferencias en la formación de ROS entre los neutrófilos sanguíneos de personas con peso normal y con obesidad grado III.

Con el propósito de conocer la formación de ROS, se purificaron neutrófilos sanguíneos de personas con peso normal y con obesidad grado III. Las ROS fueron cuantificadas indirectamente utilizando DHE. Este es un colorante que al unirse al $O_2^{\cdot-}$, se oxida a 2-hidroxietidio y que puede intercalarse en el DNA emitiendo fluorescencia roja, la cual puede ser detectada. Por lo tanto, la fluorescencia emitida por el DHE es un indicador de la formación de ROS.

Tanto los neutrófilos sanguíneos de personas con peso normal como de pacientes con obesidad que no fueron estimulados producen ROS. En ambos grupos se puede observar la fluorescencia roja emitida (Figura 9 B y F). Por lo cual, los neutrófilos de ambos grupos producen ROS. De la misma forma, en ambos grupos, tras ser estimulados con PMA, se puede observar la fluorescencia roja emitida. (Figura 9 D y H). Al comparar la fluorescencia de los grupos de neutrófilos de personas con peso normal y de pacientes con obesidad, tanto al ser estimulados con PMA como sin estimulación, se puede observar que no existe diferencia. (Figura 9).

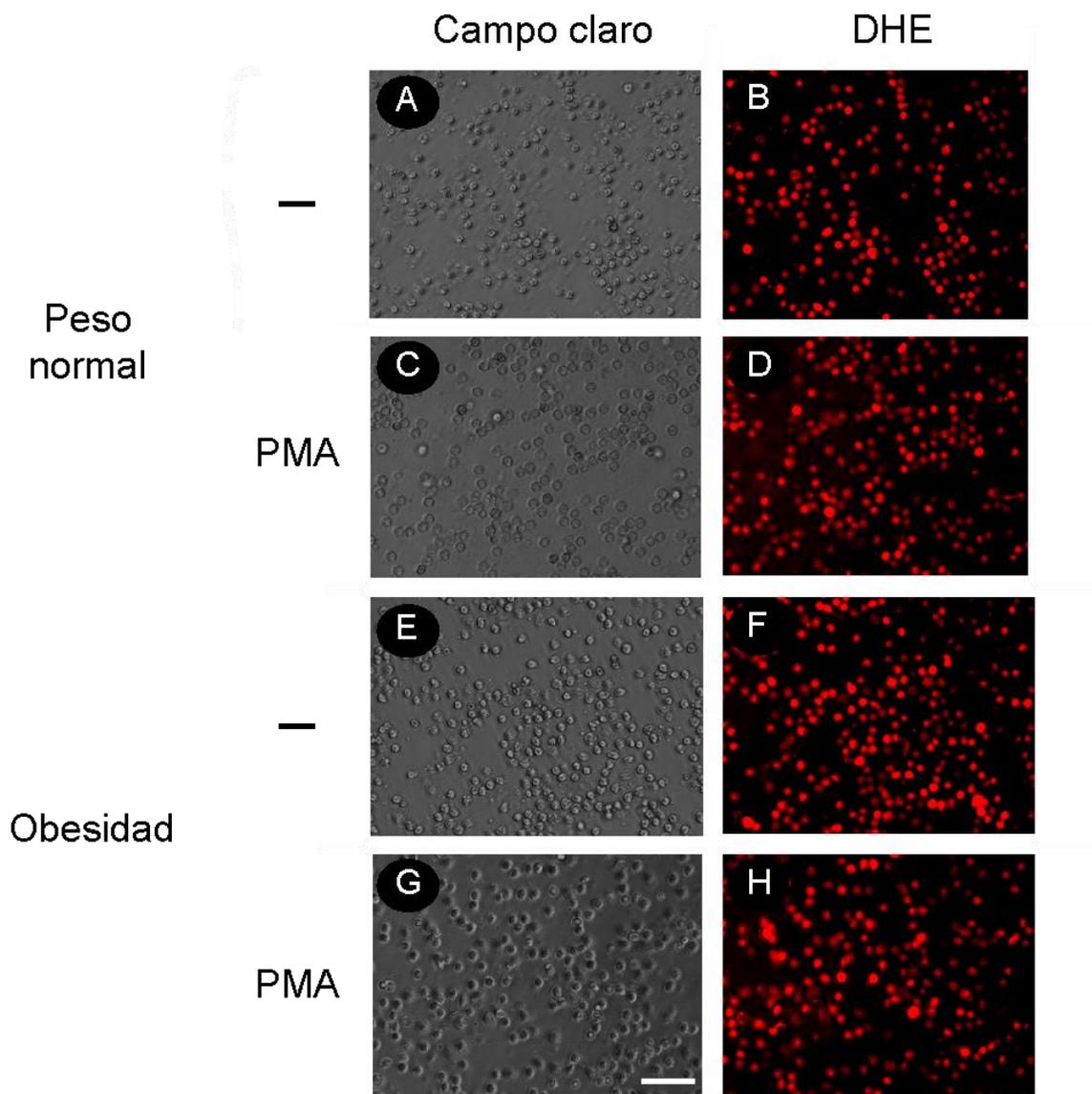


Figura 9. Detección de especies reactivas de oxígeno (ROS) en neutrófilos de personas con peso normal y con obesidad grado III. Fotografías de campo claro de neutrófilos de personas con peso normal (A y C) y con obesidad (E y G). Fotografías de fluorescencia de la formación de ROS, visualizadas mediante la técnica con dihidroetidio (DHE), de los neutrófilos de personas con peso normal y con obesidad, sin estímulo (B y F, respectivamente) y expuestos a forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) 20 nM (D y H, respectivamente). Las fotografías de los neutrófilos de personas con peso normal y de pacientes con obesidad, estimulados con PMA o sin estimulación, son representativas de 3 ensayos independientes para cada grupo, respectivamente. Escala 50 μ m.

3. Los neutrófilos sanguíneos de personas con peso normal y de pacientes con obesidad grado III son capaces de fagocitar.

Una vez purificados y obtenidos los neutrófilos sanguíneos de personas con peso normal y con obesidad grado III, se llevaron a cabo los ensayos de fagocitosis. El ensayo consiste en contar el número de neutrófilos y de perlas fagocitadas. Las perlas se opsonizaron con anticuerpos IgG. Se realizaron tres ensayos de fagocitosis en neutrófilos de personas con peso normal y dos ensayos en neutrófilos de pacientes con obesidad. El índice fagocítico se calculó mediante el conteo de perlas fagocitadas (opsonizadas o no opsonizadas) de 100 neutrófilos al azar, en distintos campos de varias fotografías. Se comparó el índice fagocítico de neutrófilos expuestos a perlas sin opsonizar y perlas opsonizadas con IgG. Una vez obtenidas las fotografías en el microscopio, se puede observar que los neutrófilos de personas con peso normal y de pacientes con obesidad son capaces de fagocitar a las perlas no opsonizadas y opsonizadas con IgG. (Figura 10).

4. Los neutrófilos sanguíneos de pacientes con obesidad grado III tienen mayor capacidad de fagocitar que los neutrófilos sanguíneos de personas con peso normal.

Para los neutrófilos de personas con peso normal y de pacientes con obesidad que fueron incubados con perlas sin opsonizar, se obtuvieron los índices fagocíticos de 17 y 33, respectivamente. Mientras que, cuando fueron incubados con perlas opsonizadas con IgG se obtuvieron los índices fagocíticos de 75 y 112, respectivamente. (Figura 11). El índice fagocítico de los neutrófilos de personas con peso normal que fueron incubados con perlas opsonizadas (75), es mayor que el índice fagocítico de las perlas sin opsonizar (17). Por lo tanto, al parecer, los neutrófilos sanguíneos de personas con peso normal presentan una mayor actividad fagocítica al reconocer a las partículas opsonizadas que sin opsonizar. (Figura 11) De igual modo, el índice fagocítico de los neutrófilos de pacientes con obesidad que fueron incubados con perlas opsonizadas (112) es mayor

que el índice fagocítico de las perlas sin opsonizar (33). Por lo tanto, al parecer, los neutrófilos sanguíneos de pacientes con obesidad presentan una mayor actividad fagocítica al reconocer a las partículas opsonizadas que sin opsonizar (Figura 11).

Al comparar los índices fagocíticos de perlas sin opsonizar de neutrófilos de ambos grupos de individuos, se puede observar que el índice fagocítico de los pacientes con obesidad es casi el doble en comparación con el índice fagocítico de las personas con peso normal; 33 y 17, respectivamente.

En cuanto al índice fagocítico de perlas opsonizadas de los neutrófilos de pacientes con obesidad se observa un índice fagocítico mayor que en los neutrófilos de personas con peso normal; 112 y 75, respectivamente.

Por lo cual, al parecer, los neutrófilos sanguíneos de pacientes con obesidad presentan una mayor actividad fagocítica al reconocer las partículas opsonizadas que en los neutrófilos sanguíneos de personas con peso normal. (Figura 11).

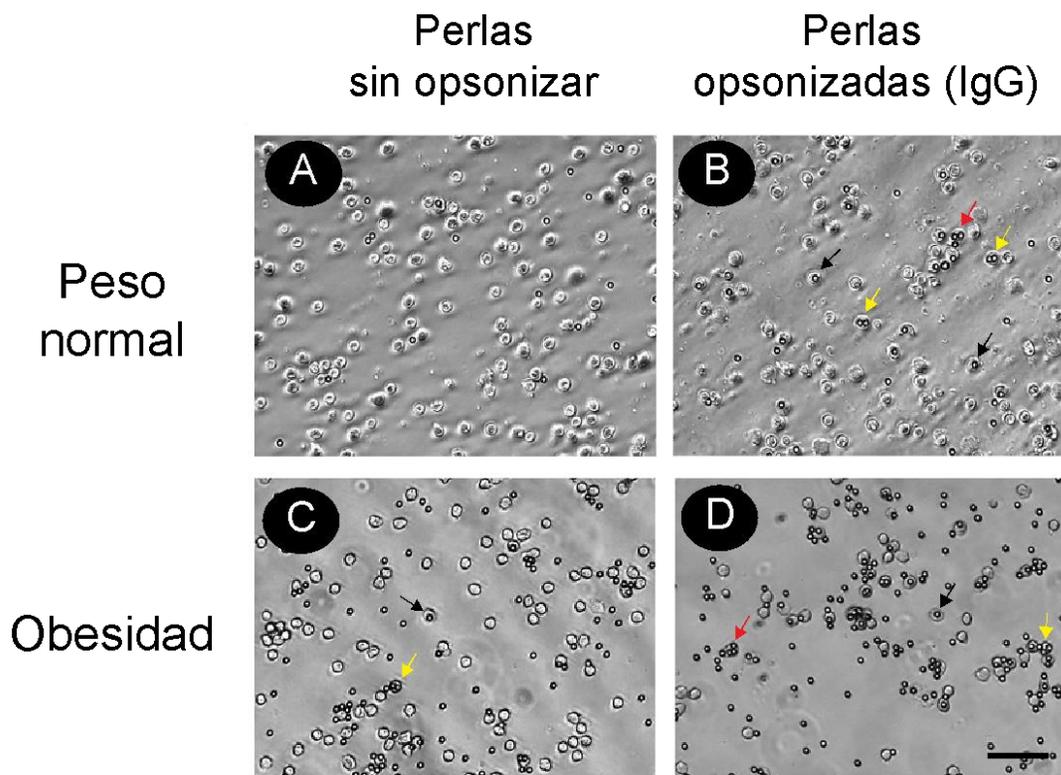


Figura 10. Fagocitosis de perlas por neutrófilos de personas con peso normal y con obesidad grado III. Fotografías de campo claro representativas de la actividad fagocítica de los neutrófilos de personas con peso normal (A y B) y de pacientes con obesidad (C y D). Perlas sin opsonizar y perlas opsonizadas con inmunoglobulina G (IgG) (A-C y B-D, respectivamente). Flechas negras representan neutrófilos que fagocitaron una perla. Flechas amarillas representan neutrófilos que fagocitaron dos perlas. Flechas rojas representan neutrófilos que fagocitaron tres o cuatro perlas. Las fotografías de la actividad fagocítica de perlas no opsonizadas y opsonizadas con IgG, de las personas con peso normal y de los pacientes con obesidad, son representativas de 3 y 2 ensayos independientes, respectivamente. Escala 50 μ m.

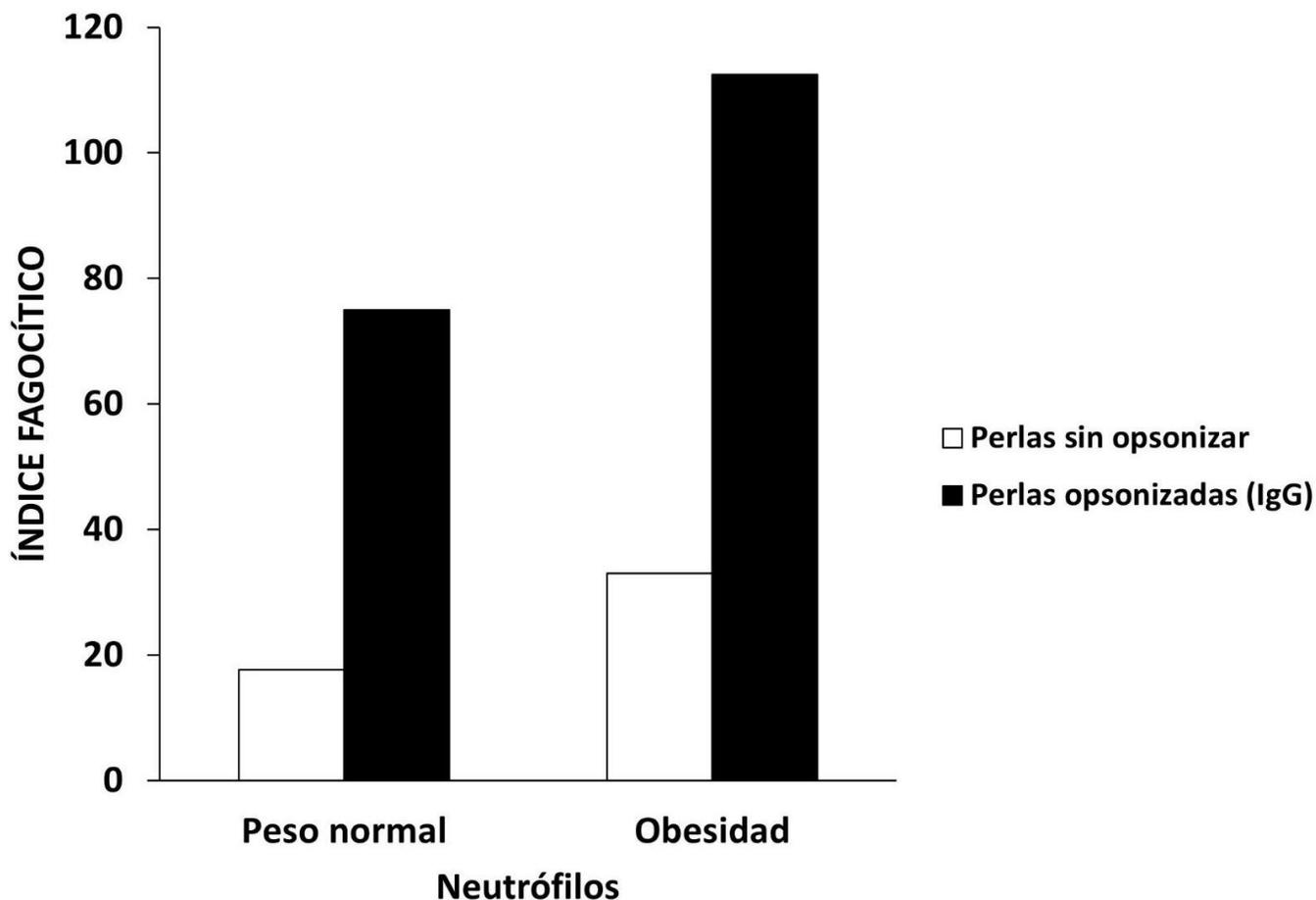


Figura 11. Los neutrófilos sanguíneos de pacientes con obesidad grado III tienen mayor capacidad de fagocitar que los neutrófilos sanguíneos de personas con peso normal. Índices fagocíticos de neutrófilos incubados con perlas sin opsonizar (barra blanca) y con perlas opsonizadas con inmunoglobulina G (IgG) (barra negra) de personas con peso normal y de pacientes con obesidad. Los datos de los índices fagocíticos de los neutrófilos de personas con peso normal, no opsonizados y opsonizados con IgG, representan el promedio de 3 ensayos independientes. Los datos de los índices fagocíticos de los neutrófilos de pacientes con obesidad, no opsonizados y opsonizados con IgG, representan el promedio de 2 ensayos independientes. El índice fagocítico representa el número de perlas fagocitadas por 100 neutrófilos.

5. Los neutrófilos sanguíneos de un paciente con obesidad grado III son capaces de producir NET

Con el propósito de conocer si los neutrófilos realizan la formación de NET en obesidad, se purificaron neutrófilos sanguíneos de un paciente con obesidad grado III. El ensayo consiste en estimular a los neutrófilos con PMA, un éster de forbol, el cual ha sido reportado como un potente estimulador de formación de NET. Posteriormente se usa DAPI, un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de DNA. De tal forma que permite visualizar a las fibras de DNA.

Sólo se pudo realizar un ensayo para determinar y visualizar la formación de NET. Se obtuvieron fotografías de campo claro y fluorescencia para visualizar a los neutrófilos sanguíneos y la producción de NET, respectivamente.

En los neutrófilos de un paciente con obesidad que fueron estimulados con PMA, se observa la descondensación de los núcleos y la liberación de fibras de DNA, eventos propios de la formación de NET. (Figura 12).

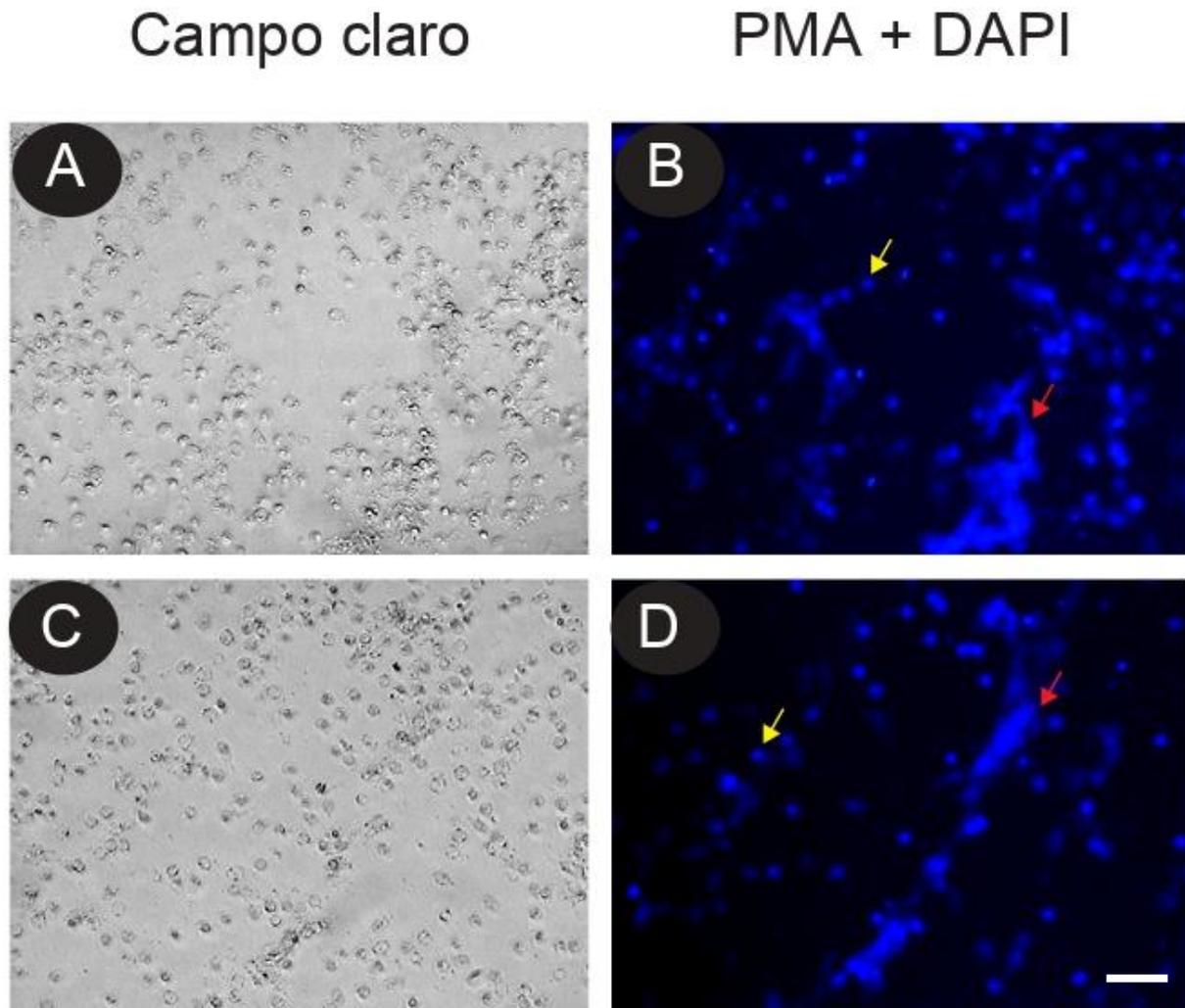


Figura 12. Los neutrófilos de un paciente con obesidad grado III pueden formar trampas extracelulares de neutrófilos (NET). Fotografías de campo claro representativas de los neutrófilos obtenidos de un paciente con obesidad (A y C). Fotografías de fluorescencia representativas de la liberación de la descondensación de los núcleos (Flechas amarillas) y la liberación de fibras de ácido desoxirribonucleico (DNA) (Flechas rojas) de neutrófilos sanguíneos expuestos a forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) 20 nM y 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (B y D). Escala 50 μ m.

XI. DISCUSIÓN

FORMACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Una de las preguntas que quisimos contestar en esta tesis fue conocer la producción basal de ROS de los neutrófilos sanguíneos de personas con peso normal y de pacientes con obesidad. Las ROS fueron cuantificadas indirectamente utilizando DHE. El DHE al unirse al $O_2^{\cdot-}$, se oxida y emite una fluorescencia que sirve como un indicador de la formación de ROS.

Un primer hallazgo fue que tanto los neutrófilos sanguíneos de las personas con peso normal como los neutrófilos de pacientes con obesidad producen ROS detectables en condiciones basales. Este resultado es similar al reportado utilizando la técnica de reducción de acetil ferricitocromo C, donde los neutrófilos producen ROS en condiciones basales en concentraciones muy bajas de ambos grupos de estudio. (Brotfain et al., 2015; Trottier et al., 2012). Sin embargo, los resultados difieren de otro reporte donde, al usar DHE, los neutrófilos de personas con peso normal no producen ROS en condiciones basales (Fonseca et al., 2018). Es probable que la formación de ROS que nosotros observamos sea producto de la activación inespecífica de neutrófilos durante su manejo.

Posteriormente nos preguntamos si la producción de ROS aumenta al estimular a los neutrófilos con PMA. Encontramos que, tanto en los neutrófilos de personas con peso normal como los neutrófilos de pacientes con obesidad, la producción de las ROS no se ve modificada al estimular a los neutrófilos con PMA. Este resultado también difiere de lo ya reportado. Cuando los neutrófilos de personas con peso normal son estimulados con PMA, la fluorescencia emitida por el DHE es de mayor intensidad que la emitida por los neutrófilos sin estimular. (Fonseca et al., 2018).

Este aumento en la producción de ROS al exponer a los neutrófilos a PMA también se obtuvo al utilizar la técnica de placa de microtitulación a través de la reducción de acetil ferricitocromo C en presencia de $O_2^{\cdot-}$. Así mismo, cuando los neutrófilos de pacientes con obesidad son estimulados con PMA aumenta la formación de $O_2^{\cdot-}$. (Brotfain et al., 2015; Trottier et al., 2012)

Otra de las preguntas que quisimos contestar fue si los neutrófilos de pacientes con obesidad producen más ROS que los neutrófilos de personas con peso normal, tanto en condiciones basales como al estimularlos con PMA.

Encontramos que en condiciones basales la fluorescencia emitida por el DHE es similar en ambos grupos. Sin embargo, se ha reportado que el grupo de neutrófilos de pacientes con obesidad produce mayor cantidad de O_2^- que el grupo de neutrófilos de personas con peso normal en condiciones basales. (Trottier et al., 2012) Existiendo incluso una correlación entre el IMC y la producción de O_2^- . (Brotfain et al., 2015)

Al igual que en condiciones basales, al estimular los neutrófilos con PMA, la fluorescencia emitida por el DHE es similar en ambos grupos. Esto concuerda con otros reportes donde se menciona que no existen diferencias en la formación de O_2^- en los neutrófilos sanguíneos de pacientes con obesidad y en las personas con peso normal. (Brotfain et al., 2015). Sin embargo, se ha reportado que los neutrófilos de personas con peso normal producen una mayor cantidad de O_2^- que los neutrófilos de pacientes con obesidad. Así mismo, se menciona que existe una correlación negativa entre el IMC y la producción de O_2^- . (Trottier et al., 2012)

Hasta el momento existen pocos estudios sobre la producción de ROS en neutrófilos de pacientes con obesidad y en estos estudios se utilizan técnicas diferentes para la medición de las especies reactivas. Los grupos de Brotfain y Trottier usan la técnica de microtitulación de placa para detectar la producción de O_2^- y sus resultados son opuestos al estimular los neutrófilos con PMA. Nosotros usamos la técnica de DHE que también se usa para detectar la producción de O_2^- , pero nuestros resultados no concuerdan en su totalidad con los reportes antes mencionados. Así mismo, se deberán realizar otros ensayos que puedan complementar el estudio de la formación de ROS y del sistema antioxidante, como por ejemplo la evaluación de la catalasa, la MPO, la glutatión peroxidasa o el glutatión. Por lo cual es importante plantear otras técnicas para cuantificar la producción de ROS y poder comparar con lo ya reportado. Es importante destacar que otra posible explicación en el aumento de la fluorescencia basal es que los

neutrófilos pudieron estar ya activados antes de realizar los ensayos. Esta hipótesis no pudo ser comprobada debido a las condiciones de la emergencia sanitaria de esta pandemia por la COVID-19, el número de ensayos realizados fue muy bajo.

Además de usar técnicas diferentes los estímulos usados también fueron diferentes. Tanto en los estudios realizados por Trottier, Fonseca y en nuestro estudio se utilizó PMA como estímulo, el cual es un agonista no fisiológico. No obstante, en el estudio realizado por Brotfain, se utilizaron N-formilmetionil-leucil-fenilalanina (fMLP) y zymosan como estímulos. En los ensayos realizados con estos compuestos como estímulos, se reportó que existe una diferencia significativa en la formación de O_2^- entre los grupos de neutrófilos sanguíneos de pacientes con obesidad y las personas con peso normal. También se podría plantear el usar otro tipo de estímulos para poder evaluar la formación de ROS en distintas condiciones.

FAGOCITOSIS

En esta tesis quisimos evaluar y comparar la actividad fagocítica de los neutrófilos sanguíneos de personas con peso normal y de pacientes con obesidad. La actividad fagocítica se evaluó mediante microscopía al obtener el índice fagocítico, el cual es una fórmula matemática que nos indica el número de perlas, opsonizadas con IgG o no opsonizadas, que fueron fagocitadas por 100 neutrófilos al azar. (Rosales & Brown, 1991)

Un primer hallazgo fue que los neutrófilos sanguíneos, tanto de personas con peso normal como de pacientes con obesidad, que fueron incubados tanto con perlas sin opsonizar como con perlas opsonizadas con IgG, fagocitaron.

El índice fagocítico de las perlas sin opsonizar de los neutrófilos de personas con peso normal (17) es similar a lo reportado al usar eritrocitos de oveja sin opsonizar, donde el índice fagocítico corresponde a 15. En este mismo estudio, se reportó un índice fagocítico de 30 cuando los neutrófilos fueron incubados con eritrocitos de oveja opsonizados con IgG. Sin embargo, nuestro estudio difiere, ya que el índice fagocítico

que se obtuvo en los neutrófilos de personas con peso normal que fueron incubados con perlas opsonizadas con IgG fue de 75. (García-García et al., 2002)

Otro hallazgo realizado, fue que tanto los neutrófilos sanguíneos de personas con peso normal como de pacientes con obesidad que fueron incubados con perlas opsonizadas con IgG, tienen un índice fagocítico mayor que los que fueron incubados con perlas sin opsonizar. Este resultado es de esperarse, ya que el receptor Fcγ presente en la superficie celular de los neutrófilos tiene gran afinidad por la IgG. Este receptor, al activarse, desencadena una vía de señalización permitiendo la fagocitosis.

Por otro lado, los dos grupos de neutrófilos sanguíneos de pacientes con obesidad (incubados con perlas opsonizadas con IgG o incubados con perlas sin opsonizar), presentaron un mayor índice fagocítico que los dos grupos de neutrófilos sanguíneos de personas con peso normal. Por lo que el grupo de neutrófilos sanguíneos de pacientes con obesidad tienen una actividad fagocítica mayor. Posiblemente, el estado inflamatorio sistémico de los pacientes con obesidad pueda estar activando a los neutrófilos.

En contraste a nuestros resultados, se ha reportado que al usar partículas de zymosan opsonizado, no existen diferencias en la actividad fagocítica en los neutrófilos sanguíneos de pacientes con obesidad y de personas con peso normal. En este estudio, la fagocitosis se determinó al microscopio en al menos 100 células y se definió como el porcentaje de células que contenían más de dos partículas fagocitadas. (Brotfain et al., 2015) Consistente a lo anterior, al usar otro tipo de estímulo como partículas de E. coli, se reportó que también se llevó a cabo la función de fagocitosis por neutrófilos de personas con peso normal y de pacientes con obesidad, la cual fue estimada mediante la intensidad media de fluorescencia por citometría de flujo. Sin embargo, no existen diferencias en la actividad fagocítica tanto de neutrófilos sanguíneos de pacientes con obesidad como de personas con peso normal. (Trottier et al., 2012)

Hasta el momento existen pocos estudios sobre la fagocitosis por neutrófilos de pacientes con obesidad y en estos estudios se utilizan técnicas y análisis diferentes para su evaluación. Por lo cual es importante plantear otras técnicas y análisis para cuantificar

la actividad fagocítica y poder compararlo con lo ya reportado. En nuestro estudio, a pesar de ser pocos los ensayos realizados, claramente se puede observar que los neutrófilos de pacientes con obesidad fagocitan más que los de personas con peso normal. Lo cual nos da un antecedente para realizar un mayor número de ensayos.

Además de usar técnicas diferentes, los estímulos usados en los diferentes reportes también fueron distintos. En nuestro estudio se utilizaron perlas de látex no opsonizadas y opsonizadas con IgG. No obstante, en los estudios realizados por García, Brotfain y Trottier se utilizaron como estímulo a eritrocitos de oveja (no opsonizados y opsonizados con IgG), zymozán opsonizado y partículas de E. coli, respectivamente. Por lo cual, es importante también plantear el uso de otro tipo de estímulos para poder evaluar la actividad fagocítica en distintas condiciones.

FORMACIÓN DE NET

Por último, se evaluó la formación de NET de neutrófilos sanguíneos de personas con peso normal y de pacientes con obesidad. La formación de NET se evaluó mediante microscopía, a través de la fluorescencia emitida por DAPI, el cual es un colorante que se une al DNA.

En este trabajo, solo se pudo realizar un ensayo de formación de NET en neutrófilos sanguíneos de un paciente con obesidad, los cuales fueron incubados con PMA. No se pudieron llevar a cabo los ensayos de formación de NET de neutrófilos de personas con peso normal, así como ensayos control en neutrófilos de pacientes con obesidad, los cuales serían incubados con PBS.

Como único hallazgo, se encontró que los neutrófilos sanguíneos del paciente con obesidad, al ser estimulados con PMA, pueden presentar sus núcleos descondensados y también pueden formar fibras de DNA; por lo que podríamos estar hablando de la formación de NET.

Como antecedente, se sabe que los neutrófilos sanguíneos incubados con PBS, no forman redes extracelulares. Por el contrario, al ser incubados con PMA, los neutrófilos sanguíneos pueden formar redes, las cuales se pueden visualizar como fibras de DNA.

Además de la descondensación o de la formación de fibras de DNA, para evaluar la formación de redes se busca la presencia de otras moléculas como MPO o histonas citrulinadas. (Alemán et al., 2016; Fonseca et al., 2018)

Existe muy poca evidencia sobre la formación de NET en humanos con obesidad, sin embargo, se han realizado ensayos en modelos animales. La formación de NET ha sido descrita en ratones. En un modelo experimental de tejido adiposo de ratones alimentados con una dieta alta en grasas, la tinción inmunofluorescente para el marcador de superficie de neutrófilos Ly6G, la proteína catelicidina y el DNA, reveló la co-localización de estas moléculas, las cuales son indicativas de formación de NET. Por otro lado, se ha reportado que la citrulinación de las histonas participan en la formación de NET. En este mismo estudio, el estado de citrulinación de la histona H3, evaluado mediante dot blot, es mayor en el tejido adiposo de ratones obesos que en el tejido adiposo de los ratones delgados. (Braster et al., 2016)

En humanos, se ha reportado que los neutrófilos de pacientes con obesidad severa, existe una acumulación significativamente mayor de complejos de MPO-DNA (término usado por los autores para referirse a la formación de NET) que en los neutrófilos de personas con peso normal. Así mismo, la concentración de complejos MPO-DNA se asoció significativamente con el peso, el IMC y la circunferencia de cintura y cadera. Más tarde, los pacientes con obesidad severa fueron sometidos a cirugía de gastrectomía en manga para la reducción de peso. Un año después, se realizó la evaluación de los complejos de MPO-DNA, en donde los pacientes fueron estratificados en dos grupos distintos. Un grupo incluía a los pacientes en los que la gastrectomía en manga se asoció con una disminución en la acumulación de complejos de MPO-DNA. El otro grupo incluía a pacientes en el que, tras la cirugía, persistió la acumulación de complejos de MPO-DNA o incluso aumentó. Esto sugiere que la pérdida de peso per se, no es suficiente para modificar el estado de activación de los neutrófilos. (D'Abbondanza et al., 2019)

Los experimentos de NET no pudieron ser realizados por las condiciones sanitarias, sin embargo, consideramos que es importante realizar los ensayos de formación de NET

con las personas con peso normal y en pacientes con obesidad, para poder establecer si la formación de redes aumenta con el grado de obesidad.

Así mismo, es importante incluir la evaluación de otras moléculas que permitan definir mejor a las NET, como la presencia de distintas enzimas, como MPO o elastasa, por mencionar algunas; o la citrulinación de las histonas. De igual modo, sería interesante poder evaluar a los pacientes tras cualquier procedimiento quirúrgico que permita la reducción de peso y poder comparar el estado funcional de los neutrófilos previo y post a la cirugía.

XII. CONCLUSIONES

1. No existen diferencias en la formación de especies reactivas de oxígeno entre neutrófilos sanguíneos de personas con peso normal y de pacientes con obesidad grado III.
2. Los neutrófilos sanguíneos de pacientes con obesidad grado III tienen mayor capacidad de fagocitar que los neutrófilos sanguíneos de personas con peso normal.
3. Los neutrófilos sanguíneos de un paciente con obesidad grado III son capaces de producir NET.

XIII. PERSPECTIVAS

1. Realizar un mayor número de ensayos, tanto de neutrófilos sanguíneos de personas con peso normal como de pacientes con obesidad grado III.
2. Realizar los ensayos con diferentes estímulos, así como distintos grados de obesidad y en distintas condiciones (antes y después de alguna cirugía para pérdida de peso).
3. Complementar ensayos del sistema antioxidante.
4. Evaluar la formación de NET mediante otras moléculas, como enzimas e histonas.

XIV. BIBLIOGRAFÍA

- Alemán, O. R., Mora, N., Cortes-Vieyra, R., Uribe-Querol, E., & Rosales, C. (2016). Differential Use of Human Neutrophil Fc γ Receptors for Inducing Neutrophil Extracellular Trap Formation. *J Immunol Res*, 2016, 2908034. <https://doi.org/10.1155/2016/2908034>
- Ali, A. T., Hochfeld, W. E., Myburgh, R., & Pepper, M. S. (2013). Adipocyte and adipogenesis. *Eur. J. Cell Biol.*, 92(6-7), 229-236. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2013.06.001>
- Blüher, M. (2019). Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat. Rev. Endocrinol.*, 15(5), 288-298. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0176-8>
- Braster, Q., Silvestre Roig, C., Hartwig, H., Beckers, L., den Toom, M., Döring, Y., . . . Soehnlein, O. (2016). Inhibition of NET Release Fails to Reduce Adipose Tissue Inflammation in Mice. *PLoS One*, 11(10), e0163922. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163922>
- Brotfain, E., Hadad, N., Shapira, Y., Avinoah, E., Zlotnik, A., Raichel, L., & Levy, R. (2015). Neutrophil functions in morbidly obese subjects. *Clin. Exp. Immunol.*, 181(1), 156-163. <https://doi.org/10.1111/cei.12631>
- Caër, C., Rouault, C., Le Roy, T., Poitou, C., Aron-Wisnewsky, J., Torcivia, A., . . . André, S. (2017). Immune cell-derived cytokines contribute to obesity-related inflammation, fibrogenesis and metabolic deregulation in human adipose tissue. *Sci Rep*, 7(1), 3000. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02660-w>
- CENETEC. (2018). Diagnóstico y tratamiento del sobrepeso y obesidad exógena. Guía de Evidencias y Recomendaciones: Guía de Práctica Clínica., 56. <http://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/guiasclinicas/046GER.pdf>
- Chung, K. J., Nati, M., Chavakis, T., & Chatzigeorgiou, A. (2018). Innate immune cells in the adipose tissue. *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, 19(4), 283-292. <https://doi.org/10.1007/s11154-018-9451-6>
- Cottam, D. R., Mattar, S. G., Barinas-Mitchell, E., Eid, G., Kuller, L., Kelley, D. E., & Schauer, P. R. (2004). The chronic inflammatory hypothesis for the morbidity associated with morbid obesity: implications and effects of weight loss. *Obes. Surg.*, 14(5), 589-600. <https://doi.org/10.1381/096089204323093345>
- Cottam, D. R., Schaefer, P. A., Shaftan, G. W., Velcu, L., & Angus, L. D. (2002). Effect of surgically-induced weight loss on leukocyte indicators of chronic inflammation in morbid obesity. *Obes- Surg.*, 12(3), 335-342.
- D'Abbondanza, M., Martorelli, E. E., Ricci, M. A., De Vuono, S., Migliola, E. N., Godino, C., . . . Lupattelli, G. (2019). Increased plasmatic NETs by-products in patients in severe obesity. *Sci Rep*, 9(1), 14678. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51220-x>
- Dam, V., Sikder, T., & Santosa, S. (2016). From neutrophils to macrophages: differences in regional adipose tissue depots. *Obes. Rev.*, 17(1), 1-17. <https://doi.org/10.1111/obr.12335>
- Delgado, V., Martínez, A., Iñiguez, L., García, A., Alvarado, A., & Fafutis, M. (2017). Neutrophil Extracellular Traps and its implications in inflammation: An overview [Review]. *Front. Immunol.*, 8(81). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00081>
- Dixon, J. B., & O'Brien, P. E. (2006). Obesity and the white blood cell count: changes with sustained weight loss. *Obes. Surg.*, 16(3), 251-257. <https://doi.org/10.1381/096089206776116453>

- Elgazar-Carmon, V., Rudich, A., Hadad, N., & Levy, R. (2008). Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding. *J. Lipid. Res.*, *49*(9), 1894-1903. <https://doi.org/10.1194/jlr.M800132-JLR200>
- Engin, A. (2017). The definition and prevalence of obesity and metabolic syndrome. *Adv. Exp. Med. Biol.*, *960*, 1-17. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_1
- Fadini, G. P., Menegazzo, L., Scattolini, V., Gintoli, M., Albiero, M., & Avogaro, A. (2016). A perspective on NETosis in diabetes and cardiometabolic disorders. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, *26*(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2015.11.008>
- Fonseca, Z., Díaz-Godínez, C., N, M., Alemán, O., Uribe-Querol, E., Carrero, J., & Rosales, C. (2018). *Entamoeba histolytica* Induce Signaling via Raf/MEK/ERK for Neutrophil Extracellular Trap (NET) Formation. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *8*(226). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00226>
- Futosi, K., Fodor, S., & Mócsai, A. (2013). Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol*, *17*(3), 638-650. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2013.06.034>
- Gadde, K. M., Martin, C. K., Berthoud, H. R., & Heymsfield, S. B. (2018). Obesity: Pathophysiology and management. *J. Am. Coll. Cardiol.*, *71*(1), 69-84. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.11.011>
- García-García, E., Rosales, R., & Rosales, C. (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase are recruited for Fc receptor-mediated phagocytosis during monocyte-to-macrophage differentiation. *J Leukoc Biol*, *72*(1), 107-114.
- García-García, E., Uribe-Querol, E., & Rosales, C. (2013). A simple and efficient method to detect nuclear factor activation in human neutrophils by flow cytometry. *J Vis Exp*(74). <https://doi.org/10.3791/50410>
- Gardner G. David, & Shoback., D. (2018). *Greenspan. Endocrinología básica y clínica*. (10 ed.). McGraw-Hill.
- Ghaben, A. L., & Scherer, P. E. (2019). Adipogenesis and metabolic health. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *20*(4), 242-258. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0093-z>
- Goossens, G. H. (2017). The metabolic phenotype in obesity: fat mass, body fat distribution, and adipose tissue function. *Obes. Facts.*, *10*(3), 207-215. <https://doi.org/10.1159/000471488>
- Gregor, M. F., & Hotamisligil, G. S. (2011). Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol*, *29*, 415-445. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101322>
- IMSS. (2020). *Atención de la obesidad comienza con el control del peso y una revisión periódica sobre el estado de salud*. <http://www.imss.gob.mx/prensa/archivo/202002/059#:~:text=En%20el%20IMSS%2C%2077.5%25%20los,10%20derechohabientes%20padecen%20esta%20enfermedad>.
- Kanneganti, T. D., & Dixit, V. D. (2012). Immunological complications of obesity. *Nat. Immunol.*, *13*(8), 707-712. <https://doi.org/10.1038/ni.2343>
- Karakaya, S., Altay, M., Kaplan Efe, F., Karadağ, İ., Ünsal, O., Bulur, O., . . . Taner Ertuğrul, D. (2019). The neutrophil-lymphocyte ratio and its relationship with insulin resistance in obesity. *Turk. J. Med. Sci.*, *49*(1), 245-248. <https://doi.org/10.3906/sag-1804-68>
- Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Harser SL, Longo DL, & JL., J. (2017). *Principios de medicina interna de Harrison*. (19 ed., Vol. 2). Mc Graw-Hill Interamericana.
- Kubes, P. (2018). The enigmatic neutrophil: what we do not know. *Cell Tissue Res.*, *371*(3), 399-406. <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2790-5>

- Mantovani, A., Cassatella, M. A., Costantini, C., & Jaillon, S. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*, *11*(8), 519-531. <https://doi.org/10.1038/nri3024>
- Maurizi, G., Della Guardia, L., Maurizi, A., & Poloni, A. (2018). Adipocytes properties and crosstalk with immune system in obesity-related inflammation. *J Cell Physiol*, *233*(1), 88-97. <https://doi.org/10.1002/jcp.25855>
- Minervino, D., Gumiero, D., Nicolazzi, M. A., Carnicelli, A., Fuorlo, M., Guidone, C., . . . Landolfi, R. (2015). Leukocyte activation in obese patients: effect of bariatric surgery. *Medicine (Baltimore)*, *94*(40), e1382. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000001382>
- Nguyen, G. T., Green, E. R., & Mecsas, J. (2017). Neutrophils to the ROScue: Mechanisms of NADPH oxidase activation and bacterial resistance. *Front Cell Infect Microbiol*, *7*, 373. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00373>
- OMS. (2020). *Obesidad y sobrepeso*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- Pirzgalska, R. M., & Domingos, A. I. (2018). Macrophages in obesity. *Cell. Immunol.*, *330*, 183-187. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.04.014>
- Rosales, C. (2018). Neutrophil: A cell with many roles in inflammation or several cell types? *Front. Physiol.*, *9*, 113. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00113>
- Rosales, C., & Brown, E. J. (1991). Two mechanisms for IgG Fc-receptor-mediated phagocytosis by human neutrophils. *J Immunol*, *146*(11), 3937-3944.
- Russo, L., & Lumeng, C. N. (2018). Properties and functions of adipose tissue macrophages in obesity. *Immunology*, *155*(4), 407-417. <https://doi.org/10.1111/imm.13002>
- Ryder, E., Diez-Ewald, M., Mosquera, J., Fernández, E., Pedrañez, A., Vargas, R., . . . Fernández, N. (2014). Association of obesity with leukocyte count in obese individuals without metabolic syndrome. *Diabetes Metab. Syndr.*, *8*(4), 197-204. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2014.09.002>
- Salud., S. d. (2016). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino. Informe final de resultados*. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/209093/ENSANUT.pdf>
- Segal, A. W. (2005). How neutrophils kill microbes. *Annu. Rev. Immunol.*, *23*, 197-223. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115653>
- Seijkens, T., Kusters, P., Chatzigeorgiou, A., Chavakis, T., & Lutgens, E. (2014). Immune cell crosstalk in obesity: a key role for costimulation? *Diabetes*, *63*(12), 3982-3991. <https://doi.org/10.2337/db14-0272>
- Selders, G., Fetz, A., Radic, M., & Bowlin, G. (2017). An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration [Review]. *Regen. Biomater.*, *4*(1), 55-68. <https://doi.org/10.1093/rb/rbw041>
- Shah, T. J., Leik, C. E., & Walsh, S. W. (2010). Neutrophil infiltration and systemic vascular inflammation in obese women. *Reprod Sci*, *17*(2), 116-124. <https://doi.org/10.1177/1933719109348252>
- Shamah-Levy T., Vielma-Orozco E., Heredia-Hernández O., Romero-Martínez M., Mojica-Cuevas J., Cuevas-Nasu L., . . . J., R.-D. (2020). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-19: Resultados Nacionales. 268. https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut_2018_informe_final.pdf

- Sollberger, G., Ogmire, D., & Zychlinsky, A. (2018). Neutrophil Extracellular Traps: The biology of chromatin externalization [Review]. *Dev. Cell*, *Volume 44*(Issue 5), 533-652. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.01.019>.
- Talukdar, S., Oh, D. Y., Bandyopadhyay, G., Li, D., Xu, J., McNelis, J., . . . Olefsky, J. M. (2012). Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. *Nat Med*, *18*(9), 1407-1412. <https://doi.org/10.1038/nm.2885>
- Trottier, M. D., Naaz, A., Kacynski, K., Yenumula, P. R., & Fraker, P. J. (2012). Functional capacity of neutrophils from class III obese patients. *Obesity (Silver Spring)*, *20*(5), 1057-1065. <https://doi.org/10.1038/oby.2011.354>
- Uribe-Querol, E., & Rosales, C. (2020). Phagocytosis: Our current understanding of a universal biological process. *Front Immunol*, *11*, 1066. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01066>
- Valderas, J. M., Starfield, B., Sibbald, B., Salisbury, C., & Roland, M. (2009). Defining comorbidity: implications for understanding health and health services. *Ann Fam Med*, *7*(4), 357-363. <https://doi.org/10.1370/afm.983>
- Winterbourn, C. C., Kettle, A. J., & Hampton, M. B. (2016). Reactive Oxygen Species and neutrophil function. *Annu. Rev. Biochem.*, *85*, 765-792. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014442>
- Xu, X., Su, S., Wang, X., Barnes, V., De Miguel, C., Ownby, D., . . . Chen, W. (2015). Obesity is associated with more activated neutrophils in african american male youth. *Int. J. Obes. (Lond)*, *39*(1), 26-32. <https://doi.org/10.1038/ijo.2014.194>
- Zeng, M. Y., Miralda, I., Armstrong, C. L., Uriarte, S. M., & Bagaitkar, J. (2019). The roles of NADPH oxidase in modulating neutrophil effector responses. *Mol Oral Microbiol*, *34*(2), 27-38. <https://doi.org/10.1111/omi.12252>

XV. ANEXOS

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN Y POLÍTICAS DE SALUD
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD
UMAE HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI**

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

TÍTULO DEL PROYECTO: **Funciones de los neutrófilos de pacientes con obesidad**

LUGAR Y FECHA: México DF. a _____ de _____ del año _____

NÚMERO DE REGISTRO _____

Usted está siendo invitado a participar en este estudio porque tiene una enfermedad llamada **obesidad**. Debe leer esta forma antes de aceptar participar en el estudio. Esta forma de consentimiento puede incluir palabras difíciles de entender, pida al médico o al personal del estudio que le expliquen cualquier palabra o hecho que no entienda.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVO DEL ESTUDIO:

La obesidad es el índice de masa corporal por arriba de 30 kg/m²; esta medida se obtiene dividiendo el peso actual sobre su estatura y nuevamente sobre su estatura. Esta enfermedad incrementa el riesgo de tener alteraciones de las células de defensa llamadas neutrófilos, lo cual podría incrementar el riesgo de infecciones.

En este estudio se buscará correlacionar la obesidad que padece con la función de los neutrófilos en su sangre.

PROCEDIMIENTO:

Si usted acepta participar primero se le realizará una entrevista donde deberá contestar algunas preguntas relacionadas con sus enfermedades y sus antecedentes sobre ellas. Después, se le tomarán estudios de laboratorio que se hacen comúnmente para el seguimiento de su consulta. Se le tomarán 10 mililitros de sangre (equivalente a dos cucharaditas) de una vena de uno de sus brazos. La muestra se tomará en la primera semana después de su primera cita, en el laboratorio de Endocrinología. Durante su primera consulta se le pesará, medirá y tomará su presión arterial.

El NO participar en este estudio, **NO** influirá ni en su tratamiento ni en su seguimiento regular en la consulta.

POSIBLES RIESGOS Y MOLESTIAS:

Las molestias durante la toma de muestra de sangre son mínimas; en algunas ocasiones puede causar un poco de dolor o una discreta molestia o raramente un moretón que desaparece en menos de una semana.

POSIBLES BENEFICIOS

Usted no recibirá beneficio directo por su participación, los resultados del estudio permitirán conocer si existen alteraciones en la células de defensa en la sangre de los pacientes con obesidad.

PARTICIPACIÓN O RETIRO: Usted tiene la garantía de recibir respuesta a cualquier duda y de poder retirar su consentimiento y abandonar el estudio sin que esto afecte la atención médica que usted recibe en el IMSS

PRIVACIDAD Y CONFIDENCIALIDAD: Todos los datos que lo puedan identificar se almacenarán en diferentes sitios bajo un número de código. No será identificado tampoco en las publicaciones que resulten del estudio.

AUTORIZACIÓN PARA TOMA DE MUESTRA

Si autoriza que se tome la muestra sólo para este estudio

BENEFICIOS AL TÉRMINO DEL ESTUDIO: Los pacientes al término del estudio no recibirán beneficios derivados de su participación. No recibirán pago alguno por ingresar al estudio.

En caso de dudas o aclaraciones podrá dirigirse con el Investigador responsable:

Investigador responsable: Dr. Aldo Ferreira Hemosillo. Matrícula: 9938713. Investigador Asociado de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Endocrinas. Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. Correo electrónico: immercadca@yahoo.com Teléfono: 56276900 extensión 21551.

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: comisión de Ética de Investigación de la CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4º piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Col. Doctores. México, DF. CP 06720 Teléfono: (55) 56276900 Extensión 21230. Correo electrónico: comiteeticainv.imss@gmail.com

Nombre y firma del paciente

Nombre y firma de quien solicita el consentimiento informado

Nombre, dirección y parentesco de Testigo

Nombre, dirección y parentesco de Testigo

Anexo 1. Consentimiento informado para participar en el proyecto de investigación titulado "Funciones de los neutrófilos de pacientes con obesidad".